ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Pınar PALANCI

CANİNE PARVOVİRÜS ENFEKSİYONU TANISINDA RT-PCR, ELISA VE HEMATOLOJİK YÖNTEMLERİN KULLANILMASI VE C-REAKTİF PROTEİN DEĞERİNİN ARAŞTIRILMASI

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

ADANA - 2021

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

CANİNE PARVOVİRÜS ENFEKSİYONU TANISINDA RT-PCR, ELISA VE HEMATOLOJİK YÖNTEMLERİN KULLANILMASI VE C-REAKTİF PROTEİN DEĞERİNİN ARAŞTIRILMASI

Pınar PALANCI

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman : Dr. Öğr.Üyesi Bilge Kaan TEKELİOĞLU
Yıl: 2021, Sayfa: 73
Jüri : Dr. Öğr.Üyesi Bilge Kaan TEKELİOĞLU
: Prof. Dr. Mehmet ÇELİK
: Doç. Dr. Serdar KARAKURT

Bu çalışmada Canine parvovirüs (CPV) enfeksiyonu tanısında RT-PCR, ELISA ve Hematolojik yöntemler kullanılmış ve Serum C-Reaktif Protein (CRP) değerleri araştırılmıştır. CPV köpeklerde ciddi enfeksiyonlara neden olan köpek kanlı ishal hastalığının etkeni olup Parvoviridae ailesi içerisinde yer alır, küçük, zarfsız ve tek iplikçikli DNA'ya sahiptir. CPV köpeklerden izole edilen CPV-1 ve CPV-2 olmak üzere iki tipi ve CPV-2'nin ise CPV-2a, CPV-2b ve CPV-2c olarak adlandırılan 3 varyantı vardır. Çalışma sırasında Adana ve Osmaniye Belediyeleri hayvan barınakları ile özel veteriner hekim muayenehanelerine getirilen hiç aşılanmamış, halsizlik, kusma, ateş ve ishal şikayeti bulunan 52 köpekten kan, serum ve dışkı örnekleri toplanarak incelenmiştir. ELISA yöntemi ile anti CPV IgM ve IgG antikor (CPV Ab IgM ve IgG) yönünden incelenen örneklerden 27'si CPV Ab IgM ve IgG (%51,9) pozitif bulunurken, RT-PCR yöntemi ile 29'u (%55,8) pozitif bulunmuştur. Hematolojik testler yapılmış ve serum CRP ölçümleri ELISA yöntemi ile incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar CPV enfeksiyonunun tanısında hematolojik verilerin ve serum CRP değerlerinin hastalığın tanısında, önemli veriler içerdikleri anlaşılmıştır. ELISA CPV IgM ve IgG antikor ve RT-PCR sonuçları arasında büyük bir farklılık olmadığı ve CPV klinik belirtileri gösteren 2 köpeğin ELISA ile serolojik olarak negatif oldukları halde RT-PCR testi ile pozitif sonuç verdikleri saptanmıştır. CPV enfeksiyonu tanısında ELISA yönteminin kolay ulaşılabilir, güvenli, pratik ve ekonomik bir test olduğu ve RT-PCR'ın ise hızlı sonuç veren ve güvenilir bir test olduğu ve serolojik sonuçların doğrulayıcı tanısı için kullanılması gerektiği kanısına varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Canine parvovirüs, köpek, RT-PCR, ELISA, IgM, IgG, CRP, hematoloji.

ABSTRACT

MSc THESIS

THE USE OF RT-PCR, ELISA AND HEMATOLOGICAL METHODS IN THE DIAGNOSIS OF CANINE PARVOVIRUS INFECTION AND INVESTIGATION OF C-REACTIVE PROTEIN LEVELS

Pınar PALANCI

CUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY

Supervisor : Dr. Öğr. Üyesi Bilge Kaan TEKELİOĞLU
Year: 2021, Page: 73
Jury : Dr. Öğr. Üyesi Bilge Kaan TEKELİOĞLU
: Prof. Dr. Mehmet ÇELİK
: Doç. Dr. Serdar KARAKURT

In this study, real time polymerase chain reaction (RT-PCR) and ELISA methods were used in the diagnosis of Canine parvovirüs (CPV) infection and hematological and serum C-reactive protein (CRP) levels were investigated. CPV causes serious infections and fatal systemic disorders in dogs. Disease agent Canine parvovirüs (CPV) is a small, non-enveloped and single-stranded virüs within the Parvoviridae family. Since this date two types of canine parvovirüs (CPV) isolated and known as canine parvovirüs type-1 (CPV-1) and canine parvovirüs type-2 (CPV-2). CPV-2 has 3 variants known as CPV-2a, CPV-2b and CPV-2c. In this study, blood, serum and fecal samples collected from non-vaccinated 52 dogs that were brought to Adana and Osmaniye Municipalities' animal shelters and private veterinary clinics, which had complaints of lethargy, vomiting, fever and diarrhea, were collected and analyzed. While 27 of the samples examined for anti-CPV IgM and IgG antibody (CPV Ab IgM and IgG) by ELISA method were found to be positive for CPV Ab IgM and IgG (51,9%) and 29 (55,8%) were found to be positive with RT-PCR. Hematological tests were done by a veterinary autoanalyzer and serum CRP by ELISA method. The results obtained were found to contain important data in the diagnosis of CPV infection. Hematological data and serum CRP values were found to contain valuble data in the diagnosis of the disease. It was determined that there are no big differences between ELISA and RT-PCR results and 2 dogs showing clinical signs of CPV were serologically negative by ELISA, but were positive by RT-PCR test. It was concluded that the CPV Ab ELISA method in the diagnosis of CPV infection is an easily accessible, safe, practical and economical test, and RT-PCR is a fast and reliable test and should be used for the confirmatory diagnosis of serological results.

Keywords: Canine parvovirüs, dog, RT-PCR, ELISA, IgM, IgG, CRP, hematology.

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Canine parvovirüs (CPV) köpeklerde ciddi enfeksiyonlara neden olup, özellikle yavru köpeklerde ölümcül sistemik rahatsızlıklar meydana getiren yaygın ve bilinen adıyla "Köpek kanlı ishal" hastalığının etkenidir. Hastalık etkeni Canine parvovirüs (CPV) Parvoviridae ailesi içerisinde yer alır, küçük, zarfsız ve tek iplikçikli DNA ya sahiptir (Goddard ve Leisewitz, 2010). Genellikle akut, fibrinli, nekrotik ve hemorajik enteritis, kimi zaman da myokarditis ile seyreden çok bulaşıcı ve öldürücü bir viral hastalıktır (Prittie, 2004). Canine parvovirüsün (CPV) köpeklerden izole edilmiş, canine parvovirüs tip-1 (CPV-1) ve canine parvovirüs tip-2 (CPV-2) olmak üzere iki suşu vardır. Asıl patojenik olan tip CPV-2 kısa zaman içerisinde canine parvovirüs tip-2a (CPV-2a), canine parvovirüs tip-2b (CPV-2b) (Binn ve ark., 1970; Parrish ve ark., 2007) ve bazı Batı Avrupa, Asya ve Güney Amerika ülkelerinde canine parvo virüs tip-2c (CPV-2c) olarak isimlendirilen ve patogenezleri aynı olan antijenik formlara dönüşmüştür (Decaro ve ark., 2007; Perez ve ark., 2007). CPV enfeksiyonunda virüs vücuda oral yolla girerek hastalık oluşturmaktadır. Enfekte hayvanların etrafa yoğun miktarda virüs saçmaları sonucu 1970'lerin sonlarına doğru CVP enfeksiyonu tüm dünyada hızla yayılım göstermiştir (Pollock ve Coyne, 1993). Virüs replikasyonu, orofarenksin lenfoid dokusunda, mezenterik lenf yumrularında ve timusda başlayarak enfeksiyondan yaklaşık 3-4 gün sonra hematojen yolla (viremi) ince bağırsak kriptlerine kadar ulaşır. Viremi sonrasında CPV-2 özellikle hızlı bölünen DNA sentezleyen timus, lenf nodülleri, kemik iliği, ince bağırsak gibi organlar ile ağız boşluğu, dil ve özofagus epitelyumunda lokalize olur. Sistemik enfeksiyon sonrası akciğer, dalak, karaciğer, böbrekler ve miyokart dokularından virüs izole edilmiş ve bu durum CPV enfeksiyonunun sistemik bir hastalık olduğunu ve kan yoluyla tüm vücuda yayıldığını gösteren en önemli kriter olarak bildirilmiştir (Decaro ve ark., 2009a; Elia ve ark., 2007; Goddard ve Leisewitz, 2010; Pollock, 1982). Hastalığın tanısında klinik bulguların yeterli olabileceği belirtilse de köpeklerde

coronavirüs, rotavirüs gibi farklı viral patojenlerin de ishale neden olabileceği göz önünde bulundurulmalı ve klinik tanının laboratuar sonuçlarıyla desteklenmelidir (Decaro ve Buonavoglia, 2012).

Bu çalışmada halsizlik, durgunluk, iştahsızlık, yüksek ateş, kusma, ishal / kanlı ishal semptomları gösteren ve doğal nedenli viral enfeksiyon şüphesi ile muayene edilen hiç aşılanmamış 52 köpek yaş, ırk, cinsiyet, sahiplilik durumu ve sahiplenildiği yer bilgileri kaydedilerek incelenmiştir. Köpeklerden hematoloji için 5 ml. EDTA'lı tam kan, seroloji ve CRP testleri için 8 ml serum örnekleri jugular ve sefalik venadan alınarak soğuk zincirde muhafaza edilmiştir. Moleküler inceleme için köpeklerden steril swaplar kullanılarak rektumdan dışkı örneği toplanmış ve testler yapılana kadar moleküler testler için alınan dışkı örnekleri -20°C'de saklanmıştır. Seroloji ve biyokimya testleri için kuru serum tüplerine alınan örnekler ise oda sıcaklığında pıhtılaşma tamamlanıncaya kadar dik olarak 30 dakika bekletilmiş, sonrasında 2000 d/d'da 15 dakika boyunca soğutuculu cihazda +4°C'de santrfüj edilerek elde edilen serumlar çalışma yapılana kadar -80ºC'de muhafaza edilmiştir. Hematolojik testlerde otomatik veteriner otoanalizör ve hematokrit santrfüj ile tam kan sayımı ve semikantitatif lam froti incelemeleri sonrasında lökosit (WBC), lenfosit (LYM), eritrosit (RBC), hemoglobin (HGB), hematokrit (HCT) ve trombosit (PLT) sayımları yapılarak sonuçlar değerlendirilmiştir. Hematolojik ve biyokimyasal parametreler tek başlarına parvoviral enfeksiyonu tanımlamak için yeterince spesifik değildir, ancak ayırıcı tanıya yardımcı olarak önemlidir ve ayrıca hastanın tedaviye yanıtını değerlendirmek ve prognozu belirleyebilmek için klinik olarak önemli bilgiler sağlayabilmektedirler. Bu nedenle bu çalışmanın amaçları arasında yer almışlardır. CPV enfeksiyonunun laboratuvar sonuçlarının klinik viroloji açısından önemli ve tanıya yardımcı belirteçleri ve belirleyicileri olarak yararlılıklarını araştırmak ve serolojik ve moleküler yöntemler ile CPV enfeksiyonu tanısı konan köpeklerde klinik, hematolojik ve biyokimyasal bulguları karakterize etmek amaçlanmıştır. Hasta köpeklerde lökopeni (%44,8), lenfopeni (%89,6), anemi (%72,4),

hemoglobinemi (%68,9), düşük hematokrit (%75,8) ve trombositopeni (%86,2) saptanmıştır.

Köpek C-Reaktif Proteini (CRP) seviyesini test etmek için çift antikorlu sandviç teknolojisi enzim bağlantılı immünosorbent testi (ELISA) prensibine dayalı ELISA Kiti kullanıldı. Tüm kit reaktifleri buzdolabından çıkarıldı ve kullanmadan önce oda sıcaklığına (20-25°C) ulaşmaları beklendi. Objektif antikorla önceden kaplanmış kuyucuklara standart ve numune eklendi, ardından bir immün kompleksi oluşturmak için HRP-Konjugat reaktifi eklendi, inkübasyon ve yıkama yoluyla, bağlanmamış enzimin çıkarılması yapıldı ve ardından substrat A ve B eklendi ve ardından çözeltinin asit etkisi ile önce maviye ve sonunda sarıya dönüşmesi gözlemlendi. Örneklerin okunan optik dansiteleri, test prosedüründe tarif edildiği gibi düzeltildikten sonra optik dansitenin geri elde edilmesi ile ölçümler doğrulandı. Elde edilen sonuçlara göre CRP değerlerinin en yüksek 6,05 g/L ve en düşük 3,27 g/L olduğu ve ortalama değerinin 4,66 g/L olduğu saptanmıştır. ELISA çalışmalarında Canine Anti-Parvovirüs IgM ve IgG Antikor seviyeleri ölçülmüştür. Sağlanan mikrotitre plakası antijen ile önceden kaplanıp numune eklenmiş, sırasıyla yaban turbu peroksidaz enzimi (horse radish peroxidase, HRP) eklenerek inkübe edilmiş ve iyice yıkanmıştır. Durdurma Solüsyonu rengi maviden sarıya değiştirir ve renk yoğunluğu spektrofotometre kullanılarak 450 nm'de ölçülmüştür. Kalibrasyon standartları numunelerle aynı anda test edilmiştir ve bir CUT OFF değeri elde edilmiştir. Daha sonra CUT OFF değeriyle karşılaştırarak, örneklerde Parvovirüs Ab IgM ve IgG'nin var olup olmadığına karar verilmiştir. IgM test sonuçlarını belirlemek amacıyla Optik Yoğunluğu (O.D.) ölçmek için mikrotitre plakaları BioTek ELX 800 mikrotitre plaka okuyucu cihazı kullanarak 450 nm'de okutulmuştur. Çalışma sonuçlarında CUT OFF değeri üretici firma tarafından belirlenen formülle hesaplanarak sonuç 0,215 çıkmış ve pozitif kuyucuk ortalamasının 2,256 olduğu ve üretici firma tarafından belirlenen test protokolünde belitildiği gibi ≥1,00 değeri olan testin geçerliliği koşulunu sağladığı belirlendi. IgG test sonuçlarını belirlemek amacıyla

Optik Yoğunluğu (O.D.) ölçmek için mikrotitre plakaları BioTek ELX 800 mikrotitre plaka okuyucu cihazı kullanarak 450 nm'de okutuldu. IgG çalışaması sonunda yine CUT OFF değeri üretici firma tarafından belirlenen formülle hesaplanmış ve sonuç 0,227 olarak bulunmuştur. Çalışmamızda pozitif kuyucuk ortalamasının 2,618 olduğu ve üretici tarafından verilen test protokolünde belitildiği gibi ≥1.00 değeri olan testin geçerliliği koşulunu sağladığı belirlendi. Çalışma sonunda 29 örnekten 27'sinin Canine Anti-Parvovirüs IgM ve IgG Antikor seviyeleri açısından pozitif olduğu saptanmıştır.

Çalışmada incelenen 52 köpek dışkısından ekstraksyon işlemi ile izole edilen DNA örneklerinden yapılan RT-PCR test sonuçları sonrası 29 köpeğin dışkısında Canine Parvovirüse ait DNA saptanmıştır ve pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (%55,8). Bir reaksiyon için 25 ml'lik PCR master mix karışımı 12,5 ml ve 50 nM primer CPV-For (5'-AAACAGGAATTAACTATACTAATATATTTA-3') ve CPV-Rev (5'-AAATTTGACCATTTGGATAAACT-3'), 200 nM prob CPV-Pb (5'-FAM-TGGTCCTTTAACTGCATTAAATAATGTACC-BHQ1-3') ve 10 ng şüpheli DNA kullanılarak yapılmıştır. RT-PCR testi termal döngü protokolü: Taq DNA polimerazın 95°C'de 10 dakika süreyle aktivasyonu ve 95°C'de 15 sn'lik denatürasyon, 52°C'de 30 sn'lik primer annealing ve 60°C'de 1 dakika uzatma içeren 40 döngü şeklinde uygulanmıştır.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmam sürecinde benden bilgisini esirgemeyen ve iyi bir yol gösterici olan danışmanım Dr. Öğr.Üyesi Bilge Kaan TEKELİOĞLU'na,

Çalışmalarım sırasında örnek temininde bana imkan sağlayan Adana ve Osmaniye Belediyelerine, örnek toplanmasında yardımcı olan Veteriner Hekim Bünyamin AKIN'a, Veteriner Hekim Dr. Ramazan ÖZDEMİR'e, Veteriner Hekim Kasım BERBER'e, CPV pozitif kontrol DNA'sını gönderen Veteriner Hekim Prof Dr. Atilla ŞİMŞEK ve Dr. Irmak DİK'e, laboratuar çalışmalarımda bana yardımcı olan Ar.Gör. Çağrı AVCI'YA. Çalışmalarımı yaptığım Biyoteknoloji Anabilim Dalı ile Biyoteknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezinin akademik ve idari personeline katkı, yardım ve destekleri için,

Benden yaşamım boyunca sevgi ve desteklerini esirgemeyen ailem, bedenen yanımda olmasada kalben her zaman yanımda hissettiğim rahmetli babam Yakup'a, tez çalışmam süresince gösterdikleri sevgi, destek, sabır ve yardımlarından ötürü annem Zekiye'ye, ablam Berrak'a ve kız kardeşim Damla'ya Teşekkür Ederim.

İÇİNDEKİLER **SAYFA**

ÖZ I
ABSTRACT II
GENİŞLETİLMİŞ ÖZET III
İÇİNDEKİLER VIII
ÇİZELGELER DİZİNİ X
ŞEKİLLER DİZİNİ XII
SİMGE VE KISALTMALAR XIV
1. GİRİŞ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1. Etiyoloji 5
2.2. Epidemiyoloji 8
2.3. Patogenez ve Patoloji 11
2.4. Klinik Bulgular 14
2.5. Teşhis 16
2.6. Korunma ve Kontrol 19
3. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 23
4. MATERYAL VE METOD 29
4.1. Materyal 29
4.1.1. Dışkı ve Kan Örneklerinin Toplanması 29
4.2. Metod 29
4.2.1. Hematolojik Değerlendirme 29
4.2.2. ELISA Yöntemi ile Canine Anti-Parvovirüs IgM ve IgG Antikor Seviyesi Ölçüm Testleri 30
4.2.3. ELISA Yöntemi ile Canine Serum C-Reaktif Protein Ölçüm Testi 33
4.2.4. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) Testleri 36
4.2.4.1. RT-PCR İçin Şablon (Template) DNA Hazırlama Metodu 36
4.2.4.2. RT-PCR için Primerler ve Prob Tasarımı 36

4.2.4.3. Standart DNA Hazırlama 37
4.2.4.4. Pozitif Kontrol CPV DNA..... 39
4.2.4.5. Gerçek Zamanlı PCR..... 39
4.2.5. Çalışmalar Sırasında Uyulan Genel Biyogüvenlik Önlemleri 41
4.2.6. İstatitik Analizleri 42
5. BULGULAR ve TARTIŞMA..... 43
5.1. Epidemiyolojik Verilere Ait Bulgular 43
5.2. Hematoloji Testlerinin Sonuçları..... 44
5.2.1. İstatistik Analizlerin Sonuçları 44
5.3. ELISA Testleri Bulguları..... 47
5.3.1. Canine Anti-Parvovirüs IgM Antikor Seviyesi Ölçümlerinin Sonuçları: 47
5.3.2. Canine Anti-Parvovirüs IgG Antikor Seviyesi Ölçümlerinin Sonuçları: 48
5.3.3. Canine Serum C-Reaktif Protein Değerlerinin Hesaplanması. 49
5.4. Real Time PCR (RT-PCR) Testi Sonuçları 53
6. SONUÇ VE ÖNERİLER..... 57
KAYNAKLAR 61
ÖZGEÇMİŞ 73

ÇİZELGELER DİZİNİ **SAYFA**

Çizelge 2.1. Parvovirüs sınıflandırması 5
Çizelge 4.1. RT-PCR için kullanılan primerler..... 40
Çizelge 4.2. RT-PCR reaksiyonları için kullanılan bileşenler ve miktarları..... 40
Çizelge 4.3. RT-PCR reaksiyonları ısı döngüleri 41
Çizelge 5.1. Köpeklerin özelliklerine ilişkin betimleyici istatistikler..... 43
Çizelge 5.2. Hematoloji test sonuçlarında ırklar arası görülen istatistiksel 45

ŞEKİLLER DİZİNİ **SAYFA**

Şekil 2.1. Parvovirüs partikülünün şematik görünümü 6
Şekil 2.2. Dünya genelinde tespit edilen CPV suşlarının dağılımı. 10
Şekil 2.3. CPV'nin Patogenezi. 12
Şekil 4.1. Canine Anti-Parvovirüs IgM-Canine Anti-Parvovirüs IgG çalışması-1 . 32
Şekil 4.2. ELISA yöntemi ile Canine C-Reaktif Protein ölçüm çalışmaları. 35
Şekil 4.3. Step One Plus RT-PCR cihazı 39
Şekil 5.1. Canine Serum C-Reaktif Protein Ölçüm Test Sonucu Hesaplaması 50
Şekil 5.2. Canine parvovirüs RT-PCR test sonucu 54
Şekil 5.3. Canine parvovirüs RT-PCR test sonucu 54

SİMGE VE KISALTMALAR

CDV : Canine Distemper Virüs
CnMV : Canine Minute Virüs
CPV : Canine Parvovirüs
CPV-1 : Canine Parvovirüs Tip-1
CPV-2 : Canine Parvovirüs Tip-2
CPV-2a : Canine Parvovirüs Tip-2a Varyantı
CPV-2b : Canine Parvovirüs Tip-2b Varyantı
CPV-2c : Canine Parvovirüs Tip-2c Varyantı
CRFK : Crandell Feline Kidney
CRP : C-reaktif Protein
DNA : Deoksiribo Nükleik Asit
ELISA : Enzim Linked Immunosorbent Assay
EM : Elektron Mikroskopi
FAT : Floresan Antikor Testi
FPV : Feline Panlöykopeni Virüs
GRAN : Granulosit
HA : Hemaglütinasyon
HCT : Hematokrit
HGB : Hemoglobin
HI : Hemaglütinasyon İnhibisyon
HRP : Horseradish Peroxidase (HRP), Yaban Turbu Peroksidaz enzimi
IC : İmmunokromatografi
IFA : Immunfloresan Antikor Testi
IgG : İmmunglobulin G
IgM : İmmunglobulin M
LAT : Latex Agglutination Test
LYM : Lenfosit

MDCK : Madin Darby Canine Kidney
MEV : Mink Enterit Virüs
MONO : Monosit
NS1/2 : Parvovirüs Yapısal Olmayan Proteinler
OD : Optik Yoğunluk
PCR : Polymerase Chain Reaction
PLT : Trombosit
RBC : Eritrosit
RPV : Rakun Parvovirüs
RT-PCR : Real Time Polymerase Chain Reaction
VP1/2/3 : Parvovirüs Viral Kapsid Proteini
WBC :Lökosit

1. GİRİŞ

İnsan, hayvan ve bitkilerin bir arada yaşadığı evren içindeki tek ev şüphesiz Düyamızdır. Bu evde en bilinen, insanlık için önemi olan pet hayvanı yapılan arkeolojik çalışmalarla da bilindiği üzere şüphesiz köpeklerdir.

Ülkemizde her geçen gün insanlar, gerek yoğun şehirleşmenin verdiği stres faktörlerinden uzaklaşmak için gerekse kendilerini doğal ortamlara daha yakın hissetmek amaçlı kendi yaşam alanlarında evcil hayvan besleme ihtiyacı duymaya başalmış ve evcil hayvan taleplerini genellikle köpekler oluşturmuştur. Fakat görülüyor ki günümüzde köpek ticaretinin önemli derecede ekonomik getirisinin olması ve ticari açıdan değerlerinin artmasıyla birlikte köpeklerin daha kalabalık ve bakım şartlarının daha kötü olduğu ortamlarda barındırılmalarına yol açmıştır (Arsoy, 2015).

Köpeklerin parvoviral enfeksiyonları dünya genelinde pek çok yerde sıklıkla rastlanılan bir viral hastalığıdır. Kanlı ishalle karakterize, çok bulaşıcı ve öldürücü olan bu viral enfeksiyon 'köpeklerin kanlı ishali' adıyla bilinmekte ve hastalık genellikle genç ve yavru köpeklerde yüksek mortalite ve morbiditeyle seyretmektedir. Genellikle akut, fibrinli, nekrotik ve hemorajik enteritis, kimi zaman da myokarditis ile seyreden çok bulaşıcı ve öldürücü bir viral hastalıktır. Aşılanmış anne köpeklerden doğan yavruların yeterince maternal antikorları alamaması veya bu antikorların oluşmaması ya da koruyucu antikor düzeyinin yeterli süre devam edememesi sonucunda da bu aşılanmış annelerden doğan yavru köpeklerde de canine parvovirüs enfeksiyonu şekillenebilmektedir (Prittie, 2004).

Yeni doğan köpekler Canine parvoviral enteritise daha kolay yakalanabilmekte ve yapılan tedaviye rağmen ölümler gerçekleşebilmektedir. Yavru köpeklerin CPV enfeksiyonuna karşı daha duyarlı olmasına sebep birçok risk faktörü bulunmaktadır. Bu faktörler arasında; koruyucu yeterli immunitenin oluşmaması, barınaklarda yeterince dezenfeksiyon yapılmaması ve sağlıksız, bir o kadar da kalabalık olması, barınak koşullarının uygun olmamasından kaynaklanan

stres, doğum sonrası yeterli kolostrum alınmaması, ekto ve endoparazitizmdir (Goddard ve Leisewitz, 2010; Pritte, 2004).

Dünyada çok yaygın olan CPV enfeksiyonu için yıllardır yapılan mücadele çalışmalarına rağmen henüz önemli bir başarı sağlanamamış ve CPV nin evrimsel kabiliyetinin yüksek olmasıyla birlikte çevre şartlarına dayanıklı olması hastalığın güncel kalmasına ve dünya genelinde önemini sürdürmesine neden olmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

Canine parvovirüs (CPV) köpeklerde ciddi enfeksiyonlara neden olan ve özellikle 6-20 haftalık yavru köpeklerde ölümcül sistemik rahatsızlıklar meydana getiren yaygın ve bilinen adıyla "Köpek Kanlı İshal" hastalığının etkenidir. Canine parvovirüs (CPV) enfeksiyonuna dünyanın pek çok yerinde rastlanır. Enfeksiyon kanlı ve çok kötü kukulu ishalle karakterize, özellikle yavru köpeklerde yüksek mortalite ve morbiditeyle seyreden, genellikle akut, fibrinli, nekrotik ve hemorajik enteritis, kimi zaman da myokarditis ile seyreden çok bulaşıcı ve öldürücü bir viral hastalıktır. Aşılanmış anne köpeklerden doğan yavruların yeterince maternal antikorları alamaması veya bu antikorların oluşmaması ya da koruyucu antikor düzeyinin yeterli süre devam edememesi sonucunda da bu aşılanmış annelerden doğan yavru köpeklerde de canine parvovirüs enfeksiyonu şekillenebilmektedir (Prittie, 2004). Hastalıktan korunmak için aşı uygulamaları yapılsa da CPV-2 enfeksiyonu tüm dünyada yetişkin ve yavru köpeklerin önemli hastalık sorunu olmaya devam etmektedir (Panda ve ark., 2009).

Hastalık etkeni Canine parvovirüs (CPV) Parvoviridae ailesi içerisinde yer alır, küçük, zarfsız ve tek iplikçikli DNA ya sahiptir (Goddard ve Leisewitz, 2010). Canine parvovirüsün (CPV) köpeklerden izole edilmiş, canine parvovirüs tip-1 (CPV-1) ve canine parvovirüs tip-2 (CPV-2) olmak üzere iki tipi vardır. Asıl patojenik olan tip CPV-2 kısa zaman içerisinde canine parvovirüs tip-2a (CPV-2a), canine parvovirüs tip-2b (CPV-2b) (Binn ve ark., 1970; Parrish ve ark., 2007) ve bazı Batı Avrupa, Asya ve Güney Amerika ülkelerinde canine parvo virüs tip-2c (CPV-2c) olarak isimlendirilen ve patogenezleri aynı olan antijenik formlara dönüşmüştür (Decaro ve ark., 2007; Perez ve ark., 2007). CPV-2a, CPV-2b ve CPV-2c formları CPV-2 formuna oranla konakçı aralığı geniş olup kedilerde kedi panleukopeni enfeksiyonu ile doğal olarak ortaya çıkan aynı hastalığa neden olabilmektedir (Greene, 2012).

Canine parvovirüs (CPV) ısı ve pH değişimlerine ve bir çok dezenfektana dayanıklı, çevrede uzun süre canlılığını koruyan, önemli bir kısmı türe özel patojen olan ve bir çok memelide hastalığa yol açan bir virüstür (Lamm ve Rezabek, 2008; Pollock ve Coyne, 1993; UWE, 2006). Virüs çoğalmak için özellikle hızlı bölünen, DNA sentezleyen hücrelere (enterositler, kemik iliğindeki öncü hücreler, myokardiyositler) ihtiyaç duyarlar (Nandi ve Kumar,2010; Truyen,1999).

CPV-2 enfeksiyonu her yaş, cinsiyet ve ırktaki köpeklerde görülmekle birlikte hastalığa özellikle 6 hafta ile 6 ay arası yaşlardaki yavru köpeklerin duyarlılıklarının fazla olduğu ve ölümcül enfeksiyonlara neden olduğu bildirilmektedir (Pollock ve Goyne, 1993; Prittie, 2004; Turgut, 2001). Canine parvovirüs tip 2'de, depresyon (laterji ve anoreksi), ateş, kusma ve mukoid ya da şiddetli hemorajik ve çok kötü kokulu ishalle birlikte seyreden ciddi enteritisler ile ishale bağlı dehidrasyon şekillenebilir (Desario ve ark., 2005; Pollock ve Goyne, 1993). CPV-2'nin köpeklerde en etkili bulaşma yolu direkt ve indirekt fekal-oral bulaşmadır. Akut enfeksiyon sonrası, hastalıktan kurtulan köpeklerin hafta hatta aylar sonra bile virüsü yaymaya devam ettikleri bildirilmiştir (Nandi ve Kumar, 2010). Öyle ki enfekte olup ölen bir köpeğe ait dezenfekte edilmemiş tasma, yem, su kapları ve yatakları ile aylar sonra temas eden yeni bir yavru köpekte enfeksiyon oluşabilmektedir. Hastalığın tanısında her ne kadar klinik bulguların yeterli olabileceği belirtilse de köpeklerde coronavirüs, adenovirüs, morbillivirüs, rotavirüs gibi farklı viral patojenlerin de ishale neden olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Klinik tanının laboratuvar sonuçlarıyla desteklenmesi gerekmektedir. Genellikle köpeklerin dışkılarından alınan örneklerden veya ölen hayvanların bağırsak içeriklerinin direkt incelenmesi ile kesin ve hızlı tanı konulabilmektedir. CPV ye bağlı viremi uzun süreli olduğu için enfeksiyonun geç evrelerinde kan örneklerinin incelenmesinin tanı için yararlı olduğu bildirilmektedir (Decaro ve Buonavoglia, 2012).

CPV-2, köpekler arasında hızla yayılım özelliği göstermesi ve birçok hasta hayvanın ölümü ile sonuçlanan enfeksiyonlara neden olması açısından önemli bir virüstür.

2.1. Etiyoloji

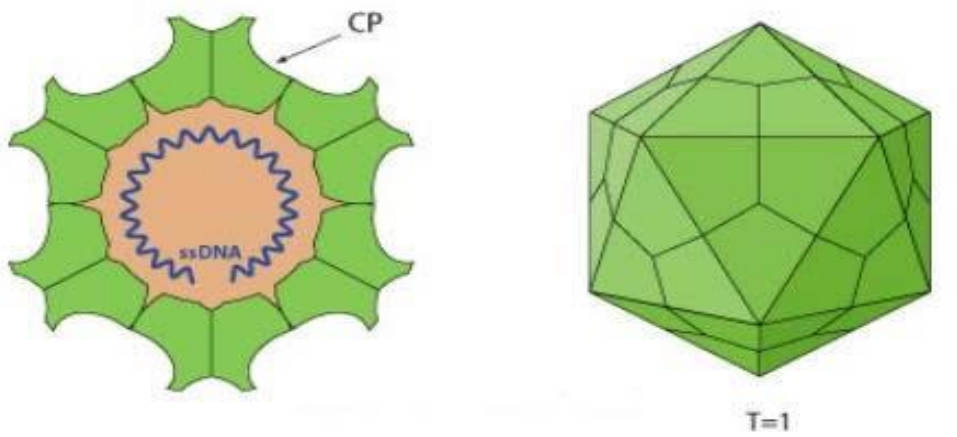
Parvoviridae ailesi, Parvovirinae ve Densovirinae isimli iki alt aileden oluşmaktadır. Parvovirinae ailesi omurgalı canlılarda enfeksiyona neden olurken *Densovirinae* ailesi insektlerde enfeksiyona neden olmaktadır. 2013 yılına kadar *Parvovirinae* ailesinin beş cinsten oluştuğu (Parvovirüs, Erythrovirüs, Dependovirüs, Amdovirüs ve Bocavirüs) bilinirken, 2013 yılının Temmuz ayından itibaren Uluslararası Virüs Taksonomi Komitesi tarafından CPV-2 olarak bilinen hastalık etkeni Parvoviridae ailesi, Parvovirinae alt familyası, Protoparvovirüs cinsi içerisinde sınıflandırılmaya başlanmasıyla birlikte aynı zamanda Parvovirinae ailesi içerisinde bazı küçük değişiklikler yapılmıştır (Çizelge 2.1) (ICTV, 2013; Cotmore ve ark., 2014).

Çizelge 2.1. Parvovirüs sınıflandırması (ICTV, 2013; Cotmore ve ark., 2014)

Aile	Parvoviridae
Alt Aile Genus	Parvovirinae Amdoparvovirus Aveparvovirus Bocaparvovirus Copiparvovirus Dependoparvovirus Erythroparvovirus Protoparvovirus
Alt Aile *Genus*	Densovirinae Ambidensovirus Brevidensovirus Hepandensovirus Iteradensovirus Penstyldensovirus

Parvovirüsler tür spesifik olmakla birlikte çeşitli memelilerde de hastalıklara neden olabilmektedir (Schoeman ve ark., 2013). CPV-2; feline

panleukopenia virüs (FPV), mink enteritis virüs (MEV) ve rakun parvovirüs (RPV) ile beraber *Parvoviridae* ailesi içerisinde sınıflandırılmıştır (Çabalar ve Aksoy, 2017; Decaro ve Buonavoglia, 2012). Parvovirüsler küçük (18-26 nm), zarfsız, tek zincirli DNA yapısında olup küresel bir kapsitten oluşmuş (Şekil 2-1), çevrede uzun süre (5-7 ay) çalılığını koruyabilen, yüksek sıcaklık, asit ve alkali pH değerleri, tripsin, yağ çözücüleri ve birçok dezenfektana karşı dirençli bir organizmadır (Lamm ve Rezabek, 2008; UWE, 2006). Formalin, sodyum hipoklorit, beta propiyolakton, hidroksilamin ve ultraviole ışınlarla inaktive edilebilen parvovirüsler farklı memeli ve kanatlı hayvanların eritrositlerini de hemaglütine etme özelliğine sahip organizmalardır (Decaro ve Buonavoglia, 2012).



Şekil 2.1. Parvovirüs partikülünün şematik görünümü
(https://viralzone.expasy.org/103?outline=all_by_species; 2019)

Köpeklerden Canine parvovirüs tip-1 (CPV-1) ve Canine parvovirüs tip-2 (CPV-2) olmak üzere iki parvovirüs tipi izole edilmiştir. CPV-1 Bocaparvovirüs cinsi içerisinde yer almakta ve genetik ve antijenik olarak CPV-2 ile ilişkisi bulunmamaktadır. CPV-1 in köpeklerde patojenik özellik göstermediği ancak CPV-2, FPV ve MEV in antijenik olarak birbirleriyle ilişkili olduğu bildirilmektedir (Decaro ve Buonavoglia, 2012; Dik, 2017). CPV-2 enfeksiyonu

1978 yılında yeni bir etken olarak kabul edilirken FPV nin yaklaşık olarak 100 yıl, MEV in ise 1947 yılında tanımlandığı bildirilmektedir. Kedi, mink ve köpeklerde görülen parvovirüs hastalıkları, özellikle lökopeni ve enterit oluşturmaları açısından oldukça benzerlik göstermeleri bakımından MEV ve CPV-2'nin, kedilerdeki parvovirüsun konakçıda meydana gelen bir dizi mutasyon sonucu ortaya çıktığı düşünülmektedir (Decaro ve Buonavoglia, 2012). FPV in vitro koşullarda ve yalnızca kedi kökenli hücre kültürlerinde çoğalabilmekte ve yine in vitro koşullarda köpek hücrelerinde çoğalamaz sadece in vivo koşullarda köpek hücrelerinde çık sınırlı replikasyon gösterebilmekte, CPV ise hem kedi hem de köpek kökenli hücre kültürlerinde ve ayrıca CPV-2 in vitro koşullarda kedi hücrelerinde çoğalabilmektedir, ancak in vivo koşullarda kedilerde çoğalamamaktadır (Truyen, 2006). Aynı zamanda, şiddetli klinik enteritis belirtileri gösteren kedilerde CPV-2c tespit edilmiştir (Miranda ve ark. 2014; Mochizuki ve ark. 1996).

1980'li yıllarda CPV-2 nin mutasyonu ile birlikte CPV-2a ve CPV-2b olarak isilendirilmiş, monoklonal antikorlar (MAb) ile ayırt edilebilen iki antijenik varyantı ve son dönemlerde ise CPV-2c adı verilen yeni bir tipi ortaya çıkmıştır. CPV-2 nin üçüncü varyantı olan CPV-2c 2000 yılında ilk kez İtalya'da tespit edilmiş ve farklı ülkelerde yüksek derecede virülent, yüksek morbidite ve mortalite nedeni olarak bildirilmiştir (Decaro ve Buonavoglia, 2012; Geetha, 2015; Kaur ve ark., 2015).

Virüs DNA'sı, üç yapısal (VP1, VP2 ve VP3) ve iki yapısal olmayan proteinden (NS1 ve NS2) oluşmuş yaklaşık olarak 5000 nükleotide sahip bir DNA molekülüdür (Geetha,2015; Kaur ve ark. 2015; Lamm ve Rezabek, 2008; Nandi ve Kumar, 2010; Prittie, 2004). X-ışını kristalografisi aracıyla, parvovirüs kapsidinin yapısı VP1, VP2 ve VP3 olarak adlandırılan ve 60 protein alt ünitesinden oluşan 3 farklı polipeptid zincirinden oluşmuş; en çok yapısal protein olan VP2, viral kapsidinin %90'ını oluşturmakta ve konakçı aralığı ile virüs-konakçı

etkileşimlerinin ana belirleyicisini temsil etmektedir (Decaro ve Buonavoglia, 2012; Geetha, 2015).

Virüs çoğalmak için özellikle hızlı bölünen, DNA sentezleyen hücrelere (enterositler, kemik iliğindeki öncü hücreler, myokardiyositler) ihtiyaç duymaktadır. Özellikle fetüs ve yeni doğanların hızlı bölünen hücrelerini, yetişkin ve genç hayvanların hematopoetik ve barsak hücrelerini hedef alır (Goddard ve Leisewitz, 2010; Lamm ve Rezabek, 2008). Canine parvovirüs çoğalmak için selüler proteinlerden çok hücre metabolizmasını kullandığı için hücre mitozisini bozar ve hücre ölümüne neden olur (Nandi ve Kumar,2010; Truyen,1999).

2.2. Epidemiyoloji

Canine parvovirüs enfeksiyonu dünya genelinde evcil ve vahşi etoburlarda yaygın görülen viral bir hastalıktır (MacLachlan ve Dubovi, 2017; Mech ve ark. 1997; Steinel ve ark. 2001; Veijalainen ve ark. 1986). Parvovirüs ilk kez Amerika Birleşik Devletlerinde 1967 yılında askeri köpeklerde solumun ve gastrointestinal sistem hastalığı olarak izole edilmiş ve tespit edilen bu virüs CnMV olarak isimlendirilmiştir. Daha sonra virüs ismi CPV-1 olarak değiştirilmiştir. (Binn ve ark., 1970; Goddard ve Leisewitz, 2010; Järplid ve ark., 1996).

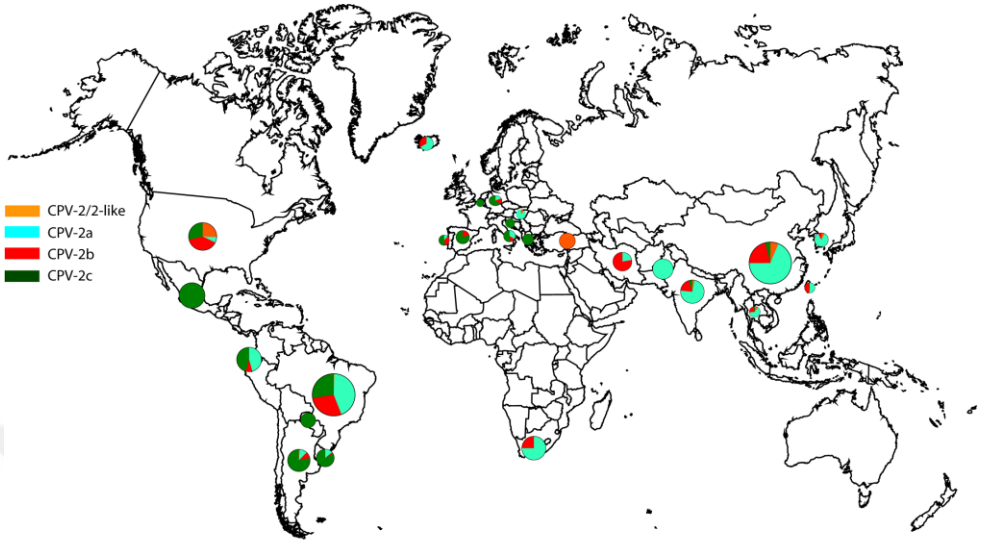
Köpeklerde yüksek mortalite ve morbidite oranına sahip olan parvovirüs tipi ise yine ilk kez 1978 yıllarının başlarında Amerika Birleşik Devletlerinde yaklaşık olarak altı haftalık ve daha büyük olan köpeklerde kusma, ishal; yeni doğanlarda ise miyokarditislere neden olduğu ancak bu etkenin daha önce köpeklerde görülen hastalıklardan farklı olduğu belirlenmiştir (Parrish, 1999). Bu viral etken ile enfekte olan köpeklerden alınan dışkı ve doku örnekleri elektron mikroskop ile incelendiğinde küçük, yuvarlak ve zarsız bir virüs olduğu tespit edilmiş ve daha ölümcül olan bu virüs CPV-2 olarak adlandırılmıştır (Blanco ve Lopez, 2015; Schoeman ve ark., 2013). 1980'li yıllarda CPV-2'nin yeni bir suşu daha saptanmış ve bu suş CPV-2a olarak adlandırılmıştır. Sonraki zamanlarda virüsun mutasyona uğraması sonucu, 1984'te CPV-2b olarak adlandırılan yeni bir

suş daha ortaya çıkmıştır (Geetha, 2015; Goddard ve Leisewitz, 2010; Lamm ve Rezabek, 2008).

2000'li yıllara kadar hastalığın daha önce tespit edilen CPV-2a ve CPV-2b suşlarından oluştuğu düşünülmekteydi. Fakat bu iki antijenik varyanttan sonra İtalya'da 2000 yılında yeni bir varyant olan canine parvovirüs tip-2c (CPV-2c) bulunmuştur (Buonavoglia ve ark., 2001; Shackelton ve ark., 2005).

CPV-2'nin antijenik varyantları bazı ülkelerde farklı oranlarda tespit edilmiştir. CPV-2b prevalansı, Brezilya, ABD, Japonya, İsviçre ve Güney Afrika gibi ülkelerde; CPV-2a, Fransa, Tayvan ve İtalya'da yaygın antijenik tip olarak tespit edilmiştir. Bununla beraber, hem CPV-2a hem de CPV-2b'nin İspanya ve İngiltere'de eşit oranda dağılım gösterdiği araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir. En son bulunan suş CPV-2c ise Vietnam, İspanya, İngiltere, Güney Amerika, Kuzey Amerika ve Türkiye'de saptanmıştır (Şekil-2) (Decaro ve ark., 2007; Gagari, 2015; Kang ve ark., 2008; Nandi ve Kumar, 2010; Perez ve ark., 2007).

CPV-2 enfekte köpeklerden duyarlı hayvanlara direkt temas (fekal- oral bulaşma) ya da indirekt olarak bulaşmaktadır. Virüs çevre şartlarına çok dayanıklı olduğu için yüksek düzeyde bulaşıcı özelliğe sahiptir. Bu nedenle, yavrularda bağışıklık olmaması, bağırsak parazitleri, aşırı kalabalık, sağlıksız ve stresli çevre koşulları parvoviral enfeksiyonuna zemin hazırlamaktadır. Yetişkin köpekler yavru köpeklere göre parvovirüs enfeksiyonlerına karşı daha dirençlidir. Bu durum spesifik bağışıklığın, aşılamanın ve daha önce geçirilmiş subklinik enfeksiyonların sonucu olarak kabul edilmektedir. Ancak son yıllarda CPV enfeksiyonu yetişkin köpeklerde de görülür hale gelmiştir. Yetişkin köpeklerde bildirilen çalışmalar çoğunlukla CPV-2c ile ilişkilidir (Decaro ve ark., 2008; 2009). Köpeklerin parvoviral enfeksiyonunda ırk yatkınlığı da söz konusudur. Özellikle; Rottweiler, Doberman Pinscher, American Pit Bull Terrier, Labrador Retriever ve Alman çoban köpeği gibi belli başlı ırkların diğer ırklara göre parvovirüs enfeksiyonuna yakalanma riskinin daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Bird ve Tappin 2013; Geetha 2015; Nandi ve Kumar 2010; Perez ve ark. 2007).



variants	Number																								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
	latin America							Europe							Asian										
	Argentina	Ecuador	Brazil	Mexico	Paraguay	Uruguay	USA	Germany	Greece	Belgium	Spain	Portugal	Italy	Croatia	Ireland	Hungary	Turkey	South Korea	Pakistan	China	India	Iran	Taiwan	Thailand	South Africa
CPV-2/2-like	1	0	1	0	0	0	35	0	0	0	0	0	1	0	0	2	1	2	0	34	7	0	0	3	0
CPV-2a	7	11	81	0	0	5	9	2	0	0	0	4	54	0	2	15	0	23	11	373	172	2	17	19	3
CPV-2b	6	2	53	0	0	1	53	2	0	0	4	11	23	0	1	0	0	2	0	115	44	7	15	7	1
CPV-2c	51	11	51	5	1	30	39	7	2	1	16	17	86	5	0	0	0	0	0	21	11	0	1	1	0

Şekil 2.2. Dünya genelinde tespit edilen CPV suşlarının dağılımı (Zhou ve ark., 2017).

CPV-2 enfeksiyonu farklı ırk, yaş ve cinsiyetteki köpeklerde görülebilmesine rağmen, 6 hafta ile 6 ay yaş arasındaki yavru köpeklerin enfeksiyona daha duyarlı oldukları bildirilmektedir (Goddard ve Leisewitz, 2010; Nandi ve Kumar, 2010). Köpeklerin cinsel olgunluğa erişmesi, dişi ve erkek köpeklerin temaslarının artmasına neden olduğu için CPV-2 enfeksiyonun görülme riski de artmaktadır. Altı aydan büyük olan köpekler arasında CPV enteritisinin görülme oranının, dişilere göre erkeklerde 2 kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Goddard ve Leisewitz, 2010; Prittie, 2004).

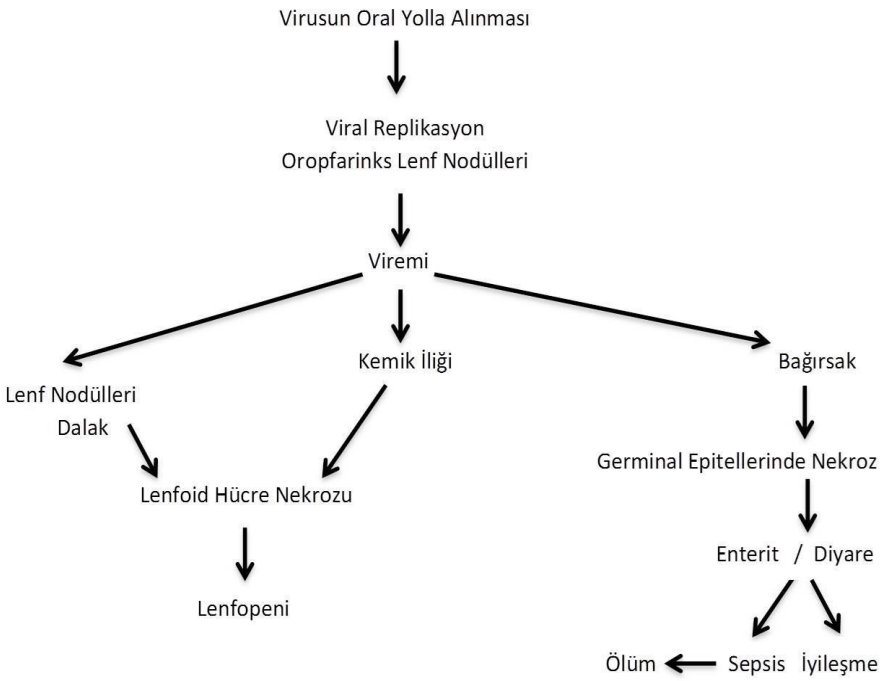
2.3. Patogenez ve Patoloji

CPV enfeksiyonunda virüs vücuda oral yolla girerek hastalık oluşturmaktadır. Minimum bulaşıcı doz bilinmemekte, fakat 100 doku kültürü enfektif doz kadar çok düşük seviyelerde olduğu düşünülmektedir. Enfekte hayvanların etrafa yoğun miktarda virüs saçmaları sonucu 1970'lerin sonlarına doğru CVP enfeksiyonu tüm dünyada hızla yayılım göstermiştir (Pollock ve Coyne, 1993).

CPV-2 nin köpekler arasında en hızlı bulaş yolu fekal oral bulaşma olup diğer bulaşma yolu ise indirekt bulaşma olan dışkı ile kontamine olmuş maddelerle temas sonucu oronazal yol ile bulaşmadır. CPV-2 enfeksiyonu çok hızlı yayılım özelliği göstermektedir (Goddard ve Leisewitz, 2010). Yapılan çalışmalarda, virüsun fekal yayılımının inokulasyondan sonra en erken 3. günde başladığı ve en çok 3-4 haftaya kadar devam ettiği görülmüştür. Virüs replikasyonu, orofarenksin lenfoid dokusunda, mezenterik lenf yumrularında ve timusda başlayarak enfeksiyondan yaklaşık 3-4 gün sonra hematojen yolla (viremi) ince bağırsak kriptlerine kadar ulaşır. Viremi sonrasında CPV-2 özellikle timus, lenf nodülleri, kemik iliği, ince bağırsak gibi organlar ile ağız boşluğu, dil ve özofagus epitelyumunda lokalize olur. Sistemik enfeksiyon sonrası akciğer, dalak, karaciğer, böbrekler ve miyokart dokularından virüs izole edilmiştir. Bu durum CPV enfeksiyonunun sistemik bir hastalık olduğunu ve kan yoluyla tüm vücuda yayıldığını gösteren en önemli kriter olarak bildirilmektedir (Decaro ve ark., 2009a; Elia ve ark., 2007; Goddard ve Leisewitz, 2010; Pollock 1982).

Parvovirüs sadece mitoz bölünmenin S fazındaki konakçı hücrelerinde replikasyon gerçekleştirebilir. Virüsun vücuda alınmasıyla enfeksiyonun ilk iki gününde virüs replikasyonu, orofarinks lenfoid dokularında, mezenterik lenf nodüllerinde ve timusta başlar ve daha sonra kemik iliği ile hassas bağırsak hücreleri (ince bağırsaktaki kript hücreleri) gibi hızla bölünen hücreleri içeren yeni organlara hematojen yolla (enfeksiyondan 3-4 gün sonra) dağılım gösterir, mitoz bölünmenin S fazındaki uygun reseptöre sahip hücreleri enfekte eder (Şekil 2-3)

(Cotmore ve Tattersall, 1987; Goddard ve Leisewitz, 2010; Nandi ve Kumar, 2010; Pollock ve Coyne, 1993).



Şekil 2.3. CPV'nin Patogenezi (Pollock ve Coyne 1993).

Kemik iliğinde replike olan virüs, bağışıklık sisteminin genç hücrelerini tahrip ederek vücudun en iyi savunma mekanizmasını yok edilmesinden sorumludur. CPV enfeksiyonları, kemik iliği enfeksiyonu oluşumuna bağlı olarak beyaz kan hücre sayısında düşüş ile karakterize bir hastalıktır. Virüsün en yıkıcı tahribatı gastrointestinal sistemde oluşmaktadır (Miranda ve Thompson, 2016; Nandi ve Kumar, 2010).

Hastalık şiddetini etkileyen ana faktörlerden biri lenfoid ve intestinal hücrelerdeki yenilenme hızıdır ve hücre yenilenme hızı direk olarak virüs replikasyonunu da artırarak böylece daha fazla hücrenin ölmesine neden olabilmektedir. Yavruyu hastalığa karşı duyarlı hale getirme nedenlerinin başında

stres faktörleri, intestinal parazitlerin varlığı ve sütten kesilme sayılabilir. Sütten kesilme esnasında bağırsaklardaki bakteriyel florada ve diyette meydana gelen değişiklikler sonucu intestinal kriptlerdeki enterositlerin mitotik indeksi artabileceğinden bu durum hızlı bölünen hücrelere karşı viral tropizm artırarak yavruyu hastalığa karşı duyarlı hale getirebilir (Goddard ve Leisewitz, 2010; Meunier ve ark., 1985).

Parvovirüs, bağırsak kriptlerinin germinal epitelyumlarını enfekte ederek epitelyal hasara ve villusların bozulmasına neden olmaktadır. Bunun sonucunda hücrelerin normal döngüsüne (genellikle ince bağırsakda 1-3 gün) zarar verir, kısalmış ve atrofiye olmuş villuslar gibi karakteristik patolojik lezyonlara yol açmaktadır. Villuslardaki atrofi döneminde ince bağırsak emilim kapasitesini kaybeder (Goddard ve Leisewitz, 2010). Virüs tarafından istila edilen kript epitellerinde dejenerasyon ve villöz atrofi şekilleneceğinden besinler absorbe edilemez hale gelir ve bunun sonucunda da ishal şekillenir. Sindirim sisteminin koruyucu bariyeri bozulmuş olur. Bağırsak bariyerinin kaybedilmesi, tüm vücudun potansiyel olarak bakteri istilasına uğramasına neden olur, bakteriler vücuda girip yaygın enfeksiyona neden olabilir, kanlı ishal meydana gelir. Virüs, ishal ve kusmaya bağlı olarak şok ve ölümle sonuçlanabilecek derecede yoğun sıvı kaybı ve dehidrasyon meydana getirebilir (Nandi ve Kumar, 2010).

CPV enfeksiyonu olan köpeklerde ölüm nedeni genellikle sepsis kaynaklıdır. Sepsis hipoperfüzyon, hipotansiyon ve çeşitli organlarda fonksiyon bozukluklarına neden olacağından sepsis ve özellikle septik şok akut organ yetmezliklerinin en önemli sebeplerinden biridir. Sepsis olgularında görülen böbrek fonksiyon bozukluklarında önce oligüri sonra poliüri, proteinüri ve azotemi görülmekte ve bu değişikliklerin çoğunlukla akut tubuler nekroz, nadiren kortikal nekroz, glomerulonefritis veya interstisyel nefritisin ortaya çıkması ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Bonville ve ark., 2004; Cankurtaran ve Kıykım 2002; Fransonn ve ark., 2007; Otto ve ark., 2000).

Sitokinler lokal enfeksiyonun eliminasyonunda etkili olmaktadır ancak, sitokinlerin fazlasının yaygın endotel hücre hasarına neden olduğu bildirilmiştir. Damar endotelindeki ciddi yıkım hemodinamik değişiklikler ve akut organ yetmezliklerine yol açtığından bu olgularda ölüm genellikle organ yetmezliklerine bağlı gerçekleşir (Lee ve ark., 2007; Nemzek ve ark., 2007; Otto ve ark., 1997).

2.4. Klinik Bulgular

CPV-2'nin neden olduğu hastalık büyük oranda bulaşıcı ve öldürücü bir karaktere sahip olmakla birlikte, klinik belirtiler 3-7 günlük bir inkübasyon süresi sonunda meydana gelir. Klinik olarak depresyon, kusma ve mukoid veya kanlı ishal, dehidrasyon, anoreksi ve yüksek ateş tespit edilir. Hastalığın akut hemorajik enterit ve miyokarditis olmak üzere iki klinik formu vardır (Bird ve Tappin, 2013; Decaro N, Buonavoglia, 2012; Geetha, 2015; Lamm ve Rezabek, 2008; Prittie, 2004). CPV-2 nin en karakteristik klinik tablosu hemorajik enteritis olarak kabul edilir ve bu durumun genellikle CPV ile enfekte yavruların maternal antikor titrelerine bağlı olduğu bildirilmektedir. Yavru köpeklerde mortalte oranları %70 gibi yüksek olmakla birlikte yetişkinlerde bu oran genellikle %1 den azdır (Decaro ve Buonavoglia 2012). Hastalığın erken belirtileri arasında depresyon, kusma, yüksek ateş, iştahsızlık ve şiddetli ishal sayılabilir. Hastalığın başlangıç aşamasında vücut ısısında artış görülmektedir. Dışkının belirgin karakteristik bir özelliği yoktur fakat ilerleyen şiddetli olgularda dışkı sulu kıvamlı, açık sarı renkte ya da kanlı görülebilir. Gastrointestinal sistem yoluyla yoğun sıvı ve protein kayıplarına bağlı olarak ciddi dehidrasyon şekillenebilir ve sonuçta da hipovolemik şok gelişebilir (Prittie 2004). Hızlı şekillenen dehidrasyon oldukça tehlikelidir. Köpeklerde çoğunlukla klinik semptomların görülmesinden itibaren 3 gün içerisinde ölümle sonuçlanacak şiddette kusma ve ishal gözlenir. Hastalığın seyri ve klinik bulgular virüsun enfeksiyoz dozuna bağlı olarak değişmekte, fakat klinik belirtiler genellikle enfeksiyondan 3-5 gün sonra ortaya çıkmaktadır. Ortalama 5-7 gün sürmektedir. Morbidite ve mortalite oranları, hayvanların yaşları dışında; bağışıklık durumlarına

ve organizmada başka bir enfeksiyonun var olup olmadığına bağlı olarak değişebilmektedir. Yavru köpeklerde bağışıklığın tam gelişmemesine bağlı olarak hastalığın ilk iki günü gibi erken bir zamanda şoka bağlı ölümler meydana gelebilir (Nandi ve Kumar 2010).

Parvoviral enteritisli köpeklerin tipik ultrasonografik görüntüsü; içi sıvı dolu, abdominal palpasyonda da hissedilebilen atonik ince ve kalın bağırsaklardır. Duodenal ve jejunal mukoza tabakaları incelmiş, duvar katmanları belirsizleşmiştir. Luminal-mukozal yüzeyler düzensiz yapıda olmakla birlikte hiperekoik mukozal lekelenmeler görmek mümkündür. Görülen bağırsak lezyonları mukozal erezyon, ülserasyon ve kript nekrozu gibi histopatolojik verilerle de uyumsağlamaktadır (Stander ve ark 2010).

Canine parvovirüs tip 2'nin bir diğer klinik formu ise 3 aydan küçük yavruları etkileyebilen miyokarditтir. CPV-2 kökenli miyokarditisler nadiren tanımlanır, çünkü enfeksiyona yakalanan yavrular klinik semptomlar gelişmeden veya ortaya çıktıktan kısa bir süre sonra ölmektedir. Miyokarditise bağlı kalp kasında multifokal nekroz, kas fibrillerinde yangılı veya yangısız lizis şekillenebilir ve kalp kası hücrelerinde intranükleer inklüzyon cisimciklerine rastlanabilir (Goddard ve Leisewitz 2010; Pollock ve Coyne 1993). Enfekte ve 8 haftalıktan küçük yavru köpeklerin %70'inde kalp defektine bağlı ölümler gözlenir, kalan %30'luk kısımda ise patolojik değişiklikler meydana gelir ve bu durum aylar hatta yıllar sonra ölümle sonuçlanabilmektedir. CPV-2 miyokardit formunun en belirgin ve etkileyici semptom 4 haftalıktan küçük yavrularda meydana gelen ani ölümlerdir. Ölmek üzere olan yavru köpeklerin ekstremitelerinde ısı kaybı, mukozalarında solgunluk ve solunum yetmezliği veya terminal konvülsiyonlar şekillenebilir. Solunum güçlüğü ile birlikte akut kalp yetmezliği, 4-8 haftalık veya daha küçük yavrularda ortaya çıkar. Subakut kalp yetmezliğine ise genellikle 8 hafta veya daha yaşlı yavrularda rastlanır. Taşikardi, bazen aritmi oluşur ve zayıf bir nabız alınır. Yavru hayvanların büyük kısmı kardiyojenik şok sebebiyle ölür. Bununla birlikte, eğer hayvan enfekte olduktan sonra ölmeyip hayatta kalırsa,

kronik miyokardiyal ve dolaşım komplikasyonları görülebilir. Hastalığın bu formunda virüs kalpteki olgunlaşmamış kas hücrelerinde hızla çoğaldığı için ishal gözlenmez (Nandi ve Kumar 2010).

CPV-2 enfeksiyonlarında lökopeni önemli bir bulgu olarak kabul edilir ve hastalık sırasında 2000- 3000 hücre/ml altında olduğu kayıt edilmiştir. Fakat bazı durumlarda beyaz kan hücreleri, virüs kaynaklı olan lenfopeni ve fırsatçı bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlar sonucu oluşan nötrofilden dolayı normal değerde görülebilir. Bununla birlikte akciğer enfeksiyonları da solunum sistemi problemlerine yol açabilir ve yetişkin köpeklerde subklinik enfeksiyonlar şekillenebilir (Decaro N, Buonavoglia, 2012; Geetha, 2015; Lamm ve Rezabek, 2008).

2.5. Teşhis

Canine parvovirüs enfeksiyonlarında oluşan semptomlar enfeksiyonun klinik teşhisine yardımcı olabilir. Özellikle aşısız yavrularda meydana gelen kusma, sulu veya kanlı ishal, bunların devamında meydana gelen depresyon, dehidrasyon, ateş ve lökopeni gibi bulguların bir arada görülmesi teşhisin konulması yönünde yol gösterici olabilir (Goddard ve Leisewitz 2010; Pollock ve Coyne 1993). Ancak Coronavirüs, Adenovirüs, Morbilivirüs, Rotavirüs, Reovirüs, Norovirüsler gibi köpeklerde ishale neden olan başka patojenlerin de varlığı düşünüldüğü zaman teşhis için sadece klinik bulgular yetersiz kalır. Bu nedenle klinik bulguları destekleyecek çeşitli tanı yöntemleri kullanılmaktadır.

CPV enfeksiyonunun laboratuvar tanısı için, elektron mikroskopi (EM), virüs izolasyonu (VI), hemaglutinasyon (HA) testi, ELISA, latex aglütinasyon (LA) testi, virüs nötralizasyon (VN) testi, immunokromatografi (IC) ve konvanisiyonel PCR ve Real-Time PCR gibi moleküler tanı yöntemleri kullanılmaktadır. Bu yöntemler farklı sensitivite ve spesifite değerlerine sahiptirler (Geetha,2015; Markovich ve ark, 2012; Mochizuki ve ark. 1996; Nandi ve Kumar, 2010; Rimmelzwaan, 1990).

Virolojik teşhis için çoğunlukla enfekte köpeklerin dışkıları ya da CPV enfeksiyonundan ölmüş köpeklerin bağırsak içerikleri incelenmek üzere alınır. Ayrıca, enfekte köpeklerde vireminin uzun sürdüğü durumlarda EDTA'lı kan örnekleri de tanıda kullanılabilir. En kısa sürede virüs tespiti için elektron mikroskopi yöntemi kullanılabilir. Bu yöntem ile dışkı materyalinden hazırlanan preparatlarda kolaylıkla virüs partikülü tespit edilebilir. Ancak bu yöntem hızlı olmasına rağmen analitik duyarlılığı yeterli düzeyde olmadığı için rutin teşhiste kullanımı sınırlıdır. Virüs izolasyonu amacıyla dışkı örneklerinden hazırlanan inokulumlar primer böbrek hücre kültürleri ya da Madin Darby Canine Kidney (MDCK) ve Crandell Feline Kidney (CRFK) gibi devamlı böbrek hücre kültürleri kullanılabilir ve bu hücre kültürlerine inokule edilebilir. Ancak virüs izolasyonu kesin teşhis için en güvenilir yöntem olmasına rağmen zaman alıcı ve zahmetli olduğundan rutin çalışmalrda tercih edilen bir yöntem değildir (Frost ve Klünker, 1984; Nandi ve Kumar,2010).

Parvoviral antijenlerin gösterilmesinde kullanılan yöntemlerin başında hemaglütinasyon testi, ELISA ve immunokromatografik yöntemler gelmektedir. Hemaglütinasyon (HA) testi için domuz, kedi ve rhesus maymun taze eritrositlerine ihtiyaç olup bu materyallerin yeterli miktarda elde edilmesi zor, zahmetli ve zaman alıcıdır. HA testinden doğru sonuç alabilmek ancak hasta olmayan ve stresten uzak olan hayvanlardan kaliteli eritrosit alınmasına bağlıdır. Bütün şartlar uygun hale geldikten sonra 96 kuyucuklu platelerde gerçekleştirilen HA testi birçok örneğin hızlı bir şekilde işlenmesine olanak sağlar ve sonuçlar sadece 4 saat kadar sonra okunmaktadır (Decaro ve Buonavoglia, 2012).

Viral antijen tespiti için kullanılan en yaygın metotlardan bir diğeri ise Enzim Linked Immunosorbent Assay (ELISA) yöntemidir. ELISA, enzim ile işaretlenmiş konjugatın aranan antijene bağlanmasıyla, daha sonra eklenen substratın indirgenip renk değişimine neden olmasıyla oluşan renk yoğunluğunun spektrofotometrede ölçülüp değerlendirilmesi esasına dayanmaktadır. ELISA, diğer teşhis yöntemlerinden daha ucuz, hızlıdır ve veteriner kliniklerinde uygulanması

oldukça kolay bir yöntemdir (Nandi ve Kumar, 2010). İmmunokromatografi (IC) yöntemi; immunokromatografik kart test, strip test, dipstick test, lateral flow assay, lateral flow immunoassay, rapid test, immunoassay rapid test gibi değişik isimlerle de tanımlanmaktadır. Son yıllarda dünya genelinde yaygın olarak kullanılan bir teşhis yöntemi olmuştur. Bu yöntemde, duyarlılığının yüksek olması, üretiminin kolay olması, hızlı sonuç alınması, maliyetinin düşük olması, tek örnek için uygulanabilmesi, değerlendirme için cihaza gerek duyulmaması, laboratuvar dışında da uygulanabilir olması, raf ömrünün uzun olması, uygulama için uzmanlık gerektirmemesi, sonucun gözle görülebilir olması, kullanımının rahat ve kolay olması, yüksek güvenilirlikli sonuçlar elde edilmesi gibi avantajları vardır. Tüm bu avantajlarının yanı sıra, tam bir kantitatif uygulamaya sahip olmaması, değerlendirmede kullanıcılar arasında farklılıklar olabilmesi ve sadece sıvı örnekler için kullanılabilmesi gibi dezavantajları da bulunmaktadır. Bu yöntemde yüksek seçiciliğe sahip antijen-antikor reaksiyonu kullanıldığı için doğruluk oranı %98'in üzerine çıkmaktadır (Kaya ve ark., 2014).

Moleküler teşhis yöntemleri için özel laboratuvarlara, yetişmiş uzman personel ve yeterli zamana ihtiyaç vardır. CPV-2 DNA'sının tespitinde PCR duyarlılığı yüksek bir yöntemdir. Virüs izolasyonuna kıyasla PCR yönteminin uygulanmasında daha az süre ve daha az iş gücüne ihtiyaç duyulur (Decaro ve Buonavoglia, 2012). Şüpheli dışkı ve nekropsi materyalinde bulunan çok az miktardaki CPV-2'nin, PCR ile tespiti mümkün olmasına rağmen ELISA bu şekilde az miktarlardaki CPV-2 nin tespiti mümkün değildir. PCR ile spesifik primerler kullanılarak CPV-2'nin farklı suşlarını da belirlemek mümkün olmaktadır. Canlı CPV aşısıyla aşılama sonrası aşı virüsunun dışkı ile 7-10 gün boyunca saçılımına bağlı olarak oluşan yanlış pozitif sonuçları da PCR ile ayırt etmek mümkündür (Nandi ve Kumar, 2010; Prittie, 2004).

Serolojik yöntemlerden özellikle indirekt ELISA, parvovirüs antikorlarının tespit edilmesi için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Hastalığın akut dönemlerinde saptanan IgM varlığı ya da konvalesan dönemde IgG varlığının saptanması ile

klinik tanı doğrulanır. Fakat bununla birlikte akut enfeksiyon sonrasında saptanabilir düzeyde antikor oluşumu gerçekleşmeden hayvan enfeksiyondan ölebilir. Bu nedenle, enfekte olmuş hayvanların dışkısında antijen ya da viral DNA tespitine yönelik testler daha yaygın olarak kullanılan teşhis yöntemleridir (MacLachlan, 2017; Prittie, 2004).

2.6. Korunma ve Kontrol

CPV'den korunmanın en etkili yolu geniş aşılama programlarıdır. İnaktif aşılar sadece kısa süreli bağışıklık oluşturduğundan, modifiye canlı virüs aşıları uzun süreli bağışıklık kazanımı sağlaması açısından daha yaygın olarak kullanılmaktadır. Orijinal tür CPV-2 ya da varyantı olan CPV-2b kullanılarak hazırlanan bu aşıların, yavruları hastalığa karşı koruyacak kadar etkili olması ve aşı sonrası reaksiyonların da ender gözlenmesi açısından daha güvenlidir (Decaro ve ark 2007b). CPV-2'ye karşı aşılanmış olan köpekler uzun süreli bağışıklık kazanır. Aşılanan annelerden doğan yavrular yaşamlarının ilk birkaç haftasında enfeksiyona karşı maternal antikorlar tarafından korunduğundan hastalık neonatallerde erken dönemde nadiren görülür (Baştan 2012; Rice ve ark., 1982). Aşılama yapılmasına rağmen köpeklerde korunmanın oluşmamasındaki ana neden kolosturum ile anneden yavruya aktarılan yüksek seviyelerdeki maternal antikorlardır. Bu nedenle aktif bağışıklık ile etkileşim olmasını önlemek amacıyla aşılar yavru köpeklere maternal antikor seviyeleri düştükten hemen sonra uygulanmalıdır. Dünya Küçük Hayvan Veteriner Hekimliği Derneği Aşı Rehberi Grubu, dayanıklı maternal antikorlara sahip yavrularda tam korunmanın oluştuğundan emin olmak için, parvovirüs aşılama süreci bitiminin 14-16 haftalık yaşa kadar ertelenmesini önerisinde bulunmuştur. Uygulanan aşılama programları, ölümler ile birlikte virüs yayılımının büyük ölçüde azaltıldığı sürü bağışıklığının köpek popülasyonlarında oluşmasını sağladığı halde yeni parvovirüs varyantlarının ortaya çıkmasına da katkıda bulunmuştur. Günümüzde antijenik varyantlar, ticari aşıların birçoğunda halen kullanılmakta olan orijinal CPV-2'nin yerini tamamen almıştır.

Virüsun enfekte hayvanların dışkıları ile çereye saçılması, klinik belirtilerin kaybolmasını takiben 6 hafta daha devam etmektedir. Bu sebeple, hasta ve hastalığı atlatmış olan hayvanların sağlıklı hayvanlara da virüs bulaşmasını önlemek için belirli bir süre izole edilmeleri önemlidir (Lamm ve Rezabek, 2008). Canine parvovirüs zarfsız virüs olduğu için, çevresel şartlara da oldukça dayanıklıdır. Kışın dondurucu soğuklarda bile uzun süre aktivitesini koruyabilmekte, evlerde kullanılan birçok dezenfektan maddesine karşı da dirençli olduğu bilinmektedir ve bu sebeple kapalı alanlarda virüsu inaktive etmek zordur. (Nandi ve Kumar, 2010). Virüs oda sıcaklığında 6 aydan daha uzun sürede aktifliğini koruyabilir. Köpek kulübeleri, enfekte hayvan dışkısıyla kirli bulaşık alanlar veya insanlar vasıtasıyla kolayca taşınabilir. Köpek kulübesi ve pet kliniklerinde virüs bulaşmasının önlenmesi için tüm maruz kalmış yüzeylerin sodyum hipoklorit ile dezenfeksiyonu ve hijyenik uygulamaların iyi yapılması çok önemlidir (Goddard ve Leisewitz, 2010; Nandi ve Kumar, 2010; Prittie, 2004). CPV enfeksiyonlarının tedavisi için etkili bir antiviral ajan olmadığı için, destekleyici ve semptomatik tedavi uygulanır. Sıvı-elektrolit uygulaması ile birlikte sekonder bakteriyel enfeksiyonlara karşı da antibiyotik tedavisi yapılması önem arz eder. Şiddetli kusmaların önlenmesi için antiemetikler kullanılabilir. Kusmanın sona erene kadar diyet ve istirahate dikkat edilmeli ve gerektiğinde enteral beslenme yapılarak hayvanın iyileşme süreci hızlandırılmalıdır. Hasta ve tedavisi yapılmakta olan hayvanların, sağlıklı hayvanlarla temas etmesi önlenmelidir (Bird ve Tappin, 2013; Öcal, 1999).

3. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Hoang ve ark. (2019) yaptığı çalışmada bulundukları bölgede CPV-2'nin genotipik yaygınlığının sınırlı olasından dolayı 3 bölgede CPV-2'nin genotip prevalansını ve dağılımını araştırmıştır. Yaptıkları bu çalışmada Kasım 2016'dan Şubat 2018'e kadar 3 farklı bölgeden toplamda 260 köpekten rektal sürüntü toplayarak gerçek zamanlı PCR ile virüs izolasyonu yapmış ve parvovirüs pozitif çıkmıştır. Daha sonra pozitif olarak tanımlanan bu numuneler Simple Prob gerçek zamanlı PCR kullanılarak daha fazla genotiplendirilmiş ve yapılan genotiplendirme sonrasında bulundukları bölgede CPV-2'nin en yaygın görülen suşunun CPV-2c olduğunu görmüşlerdir. Diğer yaygın olan tip CPV-2a iken bu çalışmada hiçbir numunede CPV-2b varlığına rastlanmamıştır (Hoang ve ark., 2019)

Mokhtari ve ark. (2018), 2014-2016 yılları arasında 60 köpekten ishalli dışkı örnekleri alarak CPV varlığını PCR yöntemi ile araştırmışlardır. İncelenen köpeklerde CPV enfeksiyonu prevalansını % 8.33 olarak hesaplamışlardır. Farklı yaş grupları ve ırklar arasında önemli bir fark bulunmamakla birlikte hemorajik ishalli köpeklerde enfeksiyon anlamlı olarak daha yüksek çıkmıştır (3/25), ancak ki-kare testi sonrası istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). Yapılan bu çalışmanın, hemorajik ishalin ve aşılama eksikliğinin köpeklerde CPV enfeksiyonu için önemli semptomlar ve risk faktörleri olarak kabul edilebileceğini göstermiştir (Mokhtari ve ark., 2018).

Yapılan bir çalışmada CPV-2'ye karşı hiç aşılanmamış, 0-12 aylık, farklı cinsiyet ve ırkta, ishal belirtileri olan toplam 100 adet köpekten dışkı numuneleri alınmış. Hayvanlardan alınan örnekler ticari ELISA ve hızlı test kiti ile protokollerine uygun olarak incelenmiş. Bunlarla birlikte her bir dışkı örneği CPV-2a-b'nin VP-2 proteinini kodlayan gene spesifik primerler kullanılarak PCR testine tabi tutulmuş. PCR testi ile 66 adet (%66), hızlı test ile 24 adet (%24), ELISA ile 16 adet (%16) örnekte CPV-2 yönünden pozitiflik belirlenmiş. Sonrasında, kullanılan testlerin duyarlılıkları ve özgüllükleri hesaplanmış. PCR yöntemi ile

karşılaştırıldığında hızlı testin duyarlılığı %36,36, ELISA'nın ise %24,24; her iki testin özgüllükleri ise %100 olarak tespit edilmiş. Bu üç testin sonuçları değerlendirildiği zaman aralarında istatistiksel olarak önemli fark bulunmuş ($p<0.05$). Sonuç olarak CPV-2'nin teşhisinde ELISA ve hızlı testin duyarlılıklarının PCR'a göre oldukça düşük seviyede olduğu saptanmış. Bu sebepten ishalli köpeklerden elde edilen dışkılarda CPV-2'nin kesin teşhisini yapabilmek için diğer teşhis yöntemleri ile negatif olarak belirlenen sonuçların PCR gibi moleküler temele dayalı yöntemlerle mutlaka doğrulanması gereklidir (Dik, 2017).

Pineiro ve ark. (2018), yaptıkları çalışmada köpeklere özgü reaktifler ve standartları kullanarak köpek C-Reaktif proteininin (cCRP) kantifikasyonu için parçacıkla geliştirilmiş türbidimetrik immünolojik test geliştirilmiş ve tam otomatik bir analiz cihazı ile belirsizlik, doğrusallık sınırları, algılama sınırları, prozon etkileri ve girişimler üzerine çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bu yeni yöntem, cCRP için ticari olarak temin edilebilen diğer 2 otomatik immünolojik test ile karşılaştırılmıştır. Bu otomatik testler; türbidimetrik immünolojik test (Gentian CRP) ve manyetik geçirgenliğe dayalı bakım noktası testi olarak belirtilmiştir (Life Assays CRP). Çalışma içi ve günler arası belirsizlik sırasıyla %1,7 ve %4,2 olarak belirlenmiştir. Geliştirilen yeni test, 150 mg/L'ye kadar analitik bir aralıkta CRP'yi orantılı olarak ölçmüş ve prozon etkisi > 320 mg/L cCRP konsantrasyonlarında ortaya çıktığı açıklanmıştır. Hemoglobin (20 g/L), trigliseritler (10 g/L) veya bilirubin (150 mg/L) ile ilgili herhangi bir etkileşim tespit edilmemiştir. Geliştirilen yeni yöntemle elde edilen sonuçlar ile Gentian cCRP türbidimetrik immünolojik test arasında iyi bir uyum gözlendiği ifade edilmiştir. Yeni türbidimetrik immünolojik test (Turbovet canine CRP, Acuvet Biotech), otomatik analizörlerde kolayca kurulabildiği ve rutin klinik kullanım için uygun bir araç olduğu için cCRP'nin ölçümünde hızlı, sağlam, kesin ve doğru bir yöntemdir.

Kubesy ve ark. (2019) yaptıkları çalışmada, prokalsitoninin bir inflamatuar biyobelirteç olarak tanısal değerini C-reaktif protein ve köpek parvovirüs

enteritinde toplam lökosit sayısı ile karşılaştırarak değerlendirmişlerdir. Kontrol olarak kullanılan 14 köpek, görünüşte sağlıklı 41 köpek ve CPV'den etkilenen 27 köpek üzerinde gerçekleştirilmiş olan bu çalışmada, enflamatuar biyobelirteç analizi, C-reaktif proteinde önemli bir artış, lökosit sayısında önemli bir azalma ve prokalsitonin seviyesinde önemsiz bir artış göstermiştir. Hematolojik profil, eritrosit sayısında, hemoglobin içeriğinde, paketlenmiş hücre hacminde %, ortalama korpüsküler hemoglobinde önem arz etmeyen bir artış ve bunlara ek olarak nötropeni, lenfopeni ve monositoz ile ilişkili önemli lökopeni göstermiştir. CPV enteritinde hipoproteinemi. C-reaktif protein konsantrasyonunun analizinin, köpek parvovirüs enteritinde inflamatuar bir biyobelirteç olarak lökosit sayımı ve prokalsitonin konsantrasyonundan daha etkili olduğu görülmüştür.

Kocatürk ve ark. (2010), CPV enfeksiyonlu köpeklerde akut faz protein yanıtını klinik sonucun öngörücüsü olarak değerlendirmişlerdir. Klinik bulgulara dayanarak 6 aylıktan küçük 43 köpekte CPV enfeksiyonu teşhis edilmiş ve CPV antijen testi ile doğrulanmış. Tam kan sayımı ve akut faz proteinleri (C-reaktif protein, haptoglobin, seruloplazmin, albümin) için tedavi öncesi kan örnekleri toplanmış. Tedavi sırası veya sonrasında 23 köpeğin öldüğü ve geri kalanının iyileşme gösterdiği kaydedilmiş. CPV enfeksiyonlu köpeklerde serum CRP, seruloplazmin ve haptoglobin seviyeleri yüksek çıkmış (sırasıyla $p<0.001$, $p<0.01$ ve $p<0.001$), ama serum albümini kontrol grubundaki köpeklerin değerlerinden daha düşük çıkmış ($p<0.001$). Ölen hayvanların ortalama CRP ve seruloplazmin değerleri hayatta kalanlara oranla daha yüksek bulunmuş ($p<0.01$). Bu bulgu CRP'nin hayatta kalanlarla ölen köpekleri ayırmak için seruloplazmin, haptoglobin ve albüminden daha üstün olduğunu göstermiştir. CRP'nin 92,4 mg/l'den yüksek değerleri mortaliteyi tahmin etmek için %91'lik duyarlılığa sahip bulunmuş. Çalışma sonucunda CPV enfeksiyonlu köpeklerde akut faz proteinlerindeki artış hastalığın prognozu açısından yararlı bir gösterge olarak görülmüş. Özellikle CRP değerindeki artış CPV enfeksiyonlu köpeklerde mortalitenin güçlü bir öngörücüsü olarak kabul edilmiş.

McClure ve ark. (2013) yaptıkları çalışmada, CPV enfeksiyonlu köpek yavrularında serum C-reaktif protein (CRP) konsantrasyonunun hastanede kalış süresi ve sonuçla ilişkisini değerlendirmişlerdir. Bu çalışma için CPV ile doğal enfekte olan 79 yavru köpek kullanmışlar. Yavru köpeklerin tamamına destekleyici bakım verilmiş. Serum C-RP konsantrasyonu hastaneye ilk yatış anından itibaren ölçüldükten sonra 48 saat boyunca her 10-12 saatte bir ve hastaneden taburcu edilene veya hastanın ölümüne kadar her 24 saatte bir ölçülmüş. Bu şekilde değişik zaman aralıklarındaki sonuçlarla CRP konsantrasyonu arasındaki ilişkiler ya da zamanla CRP konsantrasyonundaki değişiklikler çoklu lojistik regreyon yoluyla değerlendirilmiş. Tüm değerlendirmeler sonucu elde ettikleri bulgular; kabul sırasında ve 12-24 saat sonrasında serum CRP konsantrasyonları, ölüm olasılıkları ile pozitif olarak ve hastaneye kabulden 12 ve 24 saat sonra ise CRP konsantrasyonlarının yavruların hayatta kalma süreleri ile negatif olarak ilişkilendirilmiş. Hayatta kalanlar arasında ise hastaların hastanede kalış süreleri boyunca yatıştan itibaren 12-24 ve 36. saatler içinde CRP konsantrasyonları ile pozitif olarak ilişkili olduğu ileri sürülmüş. Sonuçta CRP konsantrasyonunun hastaneye yatıştan 24 saat sonrasında hayatta kalanlarla ölen hayvanları ayırt etmedeki duyarlılığı ve özgüllüğü sırasıyla %86,7 ve %78,7 olarak bildirilmiş ve bu değerler orta derecede doğru kabul edilmiş.

Nandi ve ark. (2009), yaptıkları çalışmada 2006 yılında CPV şüpheli olan 36 köpeği incelemiş. Virüsün VP2 genini bir parçası farklı yöntemlerle (PCR, kısıtlama endonükleaz, DNA sekans analizi) analiz edilmiş. Bu 36 örnektan 16 tanesi geleneksel PCR ile CPV-2a/2b suşları için pozitif bulunmuş. 6 adet pozitif örnek için DNA dizilimi yapılmış ve bu örneklerden de 3 tanesi CPV-2c olarak tespit etmişler. Timurkan ve Oğuzoğlu'nun (2015), Türkiye'de CPV enfeksiyonlu köpeklerde CPV'nin moleküler karakterizasyonu üzerine yaptığı çalışmada; Nisan/2009 ve Şubat/2010 yılları arasında CPV enfeksiyonunun klinik belirtilerini gösteren ve klinik belirti göstermeyen 65 numue toplamış ve daha sonra bu numeleri PCR kullanarak CPV için test etmiş. Toplanan 65 numuneden 25 tanesi

CPV pozitif (%38,4 oranında) çıkmış. Pozitif numuneler daha sonra sekans analizi ile test edilmiş ve sonuç olarak CPV-2a (17/25, %68) ve CPV-2b (8/25, %32) suşlarının Türkiye'deki köpeklerde var olduğunu bildirmişler.

Karapınar ve ark. (2018), CPV enfeksiyonu şüpheli köpeklerden aldıkları kan ve rektal swap örnekleri ile PCR tekniğini kullanarak hem CPV enfeksiyonu varlığını belirlemek hem de virüslerin yerel karakterizasyonunu yapmak amacıyla yaptıkları çalışmada, klinik olarak CPV enfeksiyonu belirtilerini gösteren köpeklerden aldıkları 76 adet rektal swap örneğinden 57 adedi (%75), 62 adet kan örneğinden ise 40 adedi (%64) PCR yöntemi ile pozitif olarak belirlenmiş. Seçilen pozitif örnekler ile sekans analizi yapılarak virüsün moleküler karakterizasyonu gerçekleştirilmiş. Elde ettikleri sekans sonucu bilgilerini değerlendirdiklerinde örneklerin CPV-2a ve CPV-2b suşları olduğunu ve bu suşların kendi aralarında benzerlik gösterdiklerini belirlemişler. Daha sonra elde ettikleri virüs suşu sekanslarını Genbankasından sağladıkları diğer suşlarla karşlaştırarak %99-100 oranında homoloji gösterdiğini belirlemişlerdir. Litster ve ark. (2012), ELISA test kitinin doğruluğunu araştırmak amacıyla bir çalışma yapmışlar. Yaptıkları bu çalışmada hayvan barınaklarında bulunan köpeklerden alınan kan serumlarını kullanıp bir referans laboratuvarı tarafından belirlenmiş olan CPV hemaglütinasyon inhibisyon titreleri ile karşılaştırmalı olarak ELISA testinin tanısal doğruluğunu belirlemişlerdir. Çalışma ELISA test kiti hem saha hem de laboratuvar şartlarında kullanılmış ve çift numunelerde ekstra yıkama adımı kullanmış ve bu şekilde işlemişlerdir. Saha koşullarında ELISA test kitinin verdiği sonuçlarda CPV için %92,3 duyarlılık ve %93,5 özgüllük olarak ölçülmüş ve bu değerler ile saha koşulları için test kitinin doğru sonuçlar vereceğini bildirmişlerdir. Çalışma sonunda; ELISA testinin her hasta hayvanda kullanılması ile serum CPV aşılamasına yönelik kararlar alınmasına fayda sağlarken, popülasyon yönetimi için hayvan barınaklarında antikor durumunu belirlemek açısından da faydalı olabileceğini göstermişler.

Decaro ve ark. (2003), canine parvovirüsüne (CPV) karşı immünglobulin M (IgM) antikorlarını saptamak amacıyla nokta enzim bağlantılı ELISA çalışması yapmışlardır. 100 köpekten aldıkları örnekleri CPV'ye karşı IgM antikorlarının titrelerini Immunocomb ELISA kiti ile ölçmüş ve immünfloresan antikor testinden (IFA) elde ettikleri sonuçlarla karşılaştırmışlar. Nokta enzim bağlantıı ELİSA yöntemi sonuçları ile IFA sonuçları arasında güçlü bir korelasyon olduğunu ($p<0.001$) bildirmişler. Ayrıca nokta enzim bağlantılı ELISA kitini polivalent bir aşı ile aşılanmış olan 10 yavruda CPV karşı ımmunglobulin G (IgG) ve IgM antikor seviyelerini değerlendirmek için kullanmışlar ve CPV'ye karşı oluşan yüksek IgM antikor seviyelerinin ilk olarak aşılanmayı takiben 7 gün sonra gerçekleştiğini tespit etmiş ve 9 gün sonunda tüm yavrularda CPV'ye karşı yüksek IgG antikor titreleri olduğunu bildirmişler.

4. MATERYAL VE METOD

4.1. Materyal

4.1.1. Dışkı ve Kan Örneklerinin Toplanması

Çalışma sırasında halsizlik, durgunluk, iştahsızlık, yüksek ateş, kusma, ishal / kanlı ishal semptomları gösteren ve doğal nedenli viral enfeksiyon şüphesi ile muayene edilen hiç aşılanmamış 52 köpek incelenmiştir. Köpeklerin yaş, ırk, cinsiyet, sahiplilik durumu ve sahiplenildiği yer bilgileri kaydedilmiştir. Köpeklerden hematoloji için 5 ml. EDTA'lı tam kan, seroloji ve CRP testleri için 8 ml serum örnekleri jugular ve sefalik venadan alınmış ve soğuk zincirde muhafaza edilmiştir. Moleküler inceleme için köpeklerden steril svaplar kullanılarak rektumdan dışkı örneği toplanmıştır. Moleküler testler için alına dışkı örnekleri -20 °C'de, serolojik ve biyokimyasal analizler için toplanan örnekler testler yapılana kadar -80 °C'de saklanmıştır.

Seroloji ve biyokimya testleri için kuru serum tüplerine alınan örnekler 30 dakika oda sıcaklığında pıhtılaşma tamamlanıncaya kadar dik olarak bekletilmiş ve 10 dakika süresince 2000 d/d'da santrfüj edilmiştir. Elde edilen serumlar soğuk zincirde muhafaza edilerek çalışılana kadar -80 °C'de saklanmıştır.

4.2. Metod

4.2.1. Hematolojik Değerlendirme

Aynı gün içinde tam kan sayımı Mindray Veteriner Otoanilizör cihazı ve kan sayım kitleri kullanılarak, hamatokrit ölçümleri Nüve otomatik hematokrit santrfüj cihazı kullanılarak yapılmıştır ve semikantitatif trombosit sayımı için lam frotileri hazırlanarak havada kurutulmuştur. Tam kan sayımı, hematokrit ve trombosit sayımı sonrası lökosit (WBC), lenfosit (LYM), eritrosit (RBC), hemoglobin (HGB), hematokrit (HCT) ve trombosit (PLT) sayımları yapılmıştır.

Trombosit sayımı için periferal kan örneklerinden lam frotileri hazırlanmıştır. Havada kurutulan froti örnekleri fikse edilmeden üzerlerine 1

damla yeni metilen mavisi damlatılarak ve üzerlerine lamel kapatılarak 'ıslak preparat' şeklinde hazırlanmış ve incelenmiştir. Toplam 10 immersiyon sahası incelenmiştir. Bu preparat kalıcı değildir ve olgun eritrositleri veya eozinofil granülleri boyamaz. Her immersiyon sahasındaki mavi-mor boyanmış trombosit sayıları belirlenmiş ve referans değer tablosu ile karşılaştırılarak semikantitatif trombosit sayımı işlemi yapılmıştır (Turgut, 2000).

Kapiller santrifüj testi Nüve NF 048 cihazında 12.000 devir/dakika hızında otomatik olarak yapılmıştır, cihaz otomatik saatlidir, kapiller tüplerin konacağı yerler bulunmaktadır, mikro hematokrit tüpler kullanılmıştır (kapiller boru şeklindedir ve içleri çok ince heparin katı ile kaplanmıştır) ve sonuçlar cihazla birlikte bulunan okuma skalası ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir (belirli oranda 0 – 100 arası birimli cetvel). Kapiller tüp örneği periferik kan alınan tüplerden çekilen kanla ¾ oranında kanla doldurulmuştur. Tüpün kansız olan ucu macunla kapatılmıştır. Tüpler karşılıklı olarak ve kapalı uçları dışa gelecek biçimde santrifüj cihazına yerleştirilmiştir. Kapak kapatılarak cihazın otomatik olarak çalışması sağlanmıştır. Test sonrasında şekilli hücrelerin merkez kaç kuvvetinin ve özgül ağırlıklarının etkisiyle tüpün dip kısmında belirli bir yer kapladıkları ve serumun üstte kaldığı gözlemlenmiştir. Değerlendirme sırasında tüm kan hacmi 100 kabul edilir ve ve kapiller tüp okuma skalasına yerleştirilir ve okuma yapılmıştır.

4.2.2. ELISA Yöntemi ile Canine Anti-Parvovirüs IgM ve IgG Antikor Seviyesi Ölçüm Testleri

ELISA yöntemi ile yapılan CPV Ab IgM ve IgG serolojik testleri için ticari bir firmadan (Shanghai Coon Koon Biotech Co., Ltd, IgM Cat No: CK-bio-20590, IgG Cat No: CK-bio- 20589) temin edilen Canine Anti-Parvovirüs IgM ve IgG antikor (Canine Parvovirüs Ab IgM ve IgG) ELISA test kitleri kullanılmıştır. Test kiti çalışılana kadar +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

ELISA testi: Kalitatif enzim immunoassay yöntemini kullanmaktadır. Sağlanan mikrotitre plakası antijen ile önceden kaplanmış, numune eklenmiş, sırasıyla yaban turbu peroksidaz enzimi (horse radish peroxidase, HRP) eklenmiş, inkübe edilmiş ve iyice yıkanmıştır. Durdurma Solüsyonu rengi maviden sarıya değiştirir ve renk yoğunluğu spektrofotometre kullanılarak 450 nm'de ölçülmüştür. Kalibrasyon standartları numunelerle aynı anda test edilmiştir ve bir CUT OFF değeri elde edilmiştir. Daha sonra CUT OFF değeriyle karşılaştırarak, örneklerde Parvovirüs Ab IgM ve IgG'nin var olup olmadığına karar verilmiştir.

Test yöntemi: Üreticinin uygulama talimatlarına uyuldu.

1. Test yöntemine başlamadan önce tüm reaktifler hazırlandı. Tüm Standartlar ve Numuneler Microelisa Stripplate'e iki kopya halinde eklendi.
2. Pozitif ve Negatif kuyucuğa ayrı ayrı 50µl Pozitif kontrol ve Negatif kontrol eklendi. Test numunesi 10 µL eklendi, ardından numune kuyucuğuna 40 µL örnek seyreltici solüsyon eklendi.
3. Her kuyucuğa 100 µL HRP-konjugat reaktifi eklendi, yapışkan bir şeritle kapatıldı ve 60 dakika 37 °C'de inkübe edildi.
4. Her kuyucuk aspire edildi ve toplam beş yıkama için işlem dört kez daha tekrarlayarak yıkandı. Her kuyucuk yıkama solüsyonuyla (400 µL) yıkandı. Her adımda sıvının tamamen çıkarılması için mikroplate tabla ters çevrilerek lavaboya sertçe vurularak içindekilerin tamamen dökülmesi ve ortamdan uzaklşatırılmaları sağlandı. Son yıkamadan sonra, kalan yıkama solüsyonu aspire edilerek çıkarıldı. Plaka ters çevildi ve temiz kağıt havluların üzerinde kurulandı.
5. Her kuyuya kromojen solüsyonu A 50 µL ve kromojen solüsyonu B 50 µL eklendi. Yavaşça karıştırıldı ve 37 °C'de 15 dakika inkübe edildi ve ışıktan korundu.

6. Her kuyuya 50 µL durdurma solüsyonu eklendi. Kuyulardaki renklerin maviden sarıya değiştiği gözlemlendi.
7. Optik Yoğunluğu (O.D.) ölçmek için hemen BioTek ELX 800 mikrotitre plaka okuyucu cihazı kullanarak 450 nm'de okutuldu.

Sonucun belirlenmesi:

1. Testin geçerliliği: Pozitif kontrol kuyucuğunun ortalamasının ≥1.00; Negatif kontrol kuyusunun ortalamasının ≤0.15 olduğu görüldü ve testin geçerli olduğu anlaşıldı.
2. Kritik (CUT OFF) değerinin hesaplaması:
   Kritik değer = Negatif kontrol kuyucuğunun ortalaması + 0.15
   Negatif Sonuç: Örnek OD < Kritik (CUT OFF) değeri Negatif olarak değerlendirildi.
   Pozitif Sonuç: Örnek OD ≥ Kritik (CUT OFF) değeri Pozitif olarak değerlendirildi.



Şekil 4.1. Canine Anti-Parvovirüs IgM-Canine Anti-Parvovirüs IgG çalışması-1

4.2.3. ELISA Yöntemi ile Canine Serum C-Reaktif Protein Ölçüm Testi

Serum C-reaktif protein seviyesi köpek için tür spesifik olan ve ticari bir firmadan temin edilen (Shanghai Coon Koon Biotech Co., Ltd, Cat No:CK-bio-18804) canine CRP ELISA kiti ile incelenmiştir. Test kiti çalışılana kadar +4 °C'de muhafaza edilmiştir. Testin duyarlılığı (sensitivite) 0,1 mg/L ve standart eğri aralığı ise (Standard Curve Range) 1 mg/L-24 mg/L olarak üretici firma tarafından verilmiştir. Test köpek serum, plazma, tükürük, idrar, doku homojenatı, hücre kültürü süpernatanları ve diğer biyolojik sıvılarda köpek C-Reaktif Protein (CRP) konsantrasyonlarının kantitatif tespiti için üretilmiştir.

Test Prensibi: ELISA Kiti, çift antikorlu sandviç teknolojisi enzim bağlantılı immünosorbent testi (ELISA) prensibine dayalı olarak Köpek C-Reaktif Proteini (CRP) seviyesini test etmek için kullanıldı. Tüm kit reaktifleri buzdolabından çıkarıldı ve kullanmadan önce oda sıcaklığına (20-25 °C) ulaşmaları beklendi. Objektif antikorla önceden kaplanmış kuyucuklara standart ve numune eklendi, ardından bir immün kompleksi oluşturmak için HRP-Konjugat reaktifi eklendi, inkübasyon ve yıkama yoluyla, bağlanmamış enzimin çıkarılması yapıldı ve ardından substrat A ve B eklendi ve ardından çözeltinin asit etkisi ile önce maviye ve sonunda sarıya dönüşmesi gözlemlendi. Renk derinliği veya ışık, C-Reaktif Protein (CRP) konsantrasyonu ile pozitif korelasyon göstermektedir.

Test prosedürü:

1. Test prosedürüne başlamadan önce tüm reaktifleri hazırlandı. Tüm standartlar ve numuneler Microelisa Stripplate'e iki kopya halinde eklendi.
2. Standart eklendi: Standart kuyuları ayarlandı, numune kuyuları test edildi. Standart kuyuya standart 50 µL eklendi.
3. Numune Eklendi: Numune kuyucuğuna 10 µL mumune eklendi, ardından numuneyi test etmek için numune seyrelticisi 40 µL eklendi. Boş kuyucuğa hiçbir şey eklenmedi. Her kuyucuğa 100 µL HRP-

konjugat reaktifi eklendi (Standart kuyucuklar ve test numune kuyucukları), ardından sızdırmaz plaka membranı ile kapatıldı, hafifçe sallandı ve 37 °C'de inkübasyonda 60 dakika karıştırıldı.

4. Yıkama solüsyonunun hazırlanması: Yıkama konsantrasyonu için (20X) daha sonra kullanmak üzere distile su ile seyreltildi.
5. El ile yıkama: Sızdırmazlık filmi dikkatlice çıkarıldı, sıvı boşaltıldı, kurutuldu, her kuyu yıkama solüsyonuyla dolduruldu, 1 dakika kenarda bekletildi, ardından sıvı boşaltıldı ve bu işlem 5 kez tekrarlandı, kurutuldu. (Otomatik yıkama: Her kuyucuk 350 µL yıkama solüsyonuna enjekte edildi, 1 dakika ıslatıldı, plaka 5 kez yıkandı)
6. Renk geliştirme: İlk olarak her kuyucuğa 50 µL kromojen solüsyonu A eklendi, ardından her birine de 50 µL kromojen solüsyon B eklendi. Karıştırmak için yavaşça sallandı. Renk gelişimi için ışıktan uzakta 37 °C'de 15 dakika inkübe edildi.
7. Durdurma: Reaksiyonu durdurmak için her kuyuya 50 µL durdurma solüsyonu eklendi ve mavi rengin hemen sarıya dönüştüğü gözlemlendi.
8. Değerlendirme: Boş kuyucuk sıfırın olarak değerlendirildi, her kuyucuğun absorbansı (OD) 450 nm dalga boyunda tek tek ölçüldü; bu işlem durdurma solüsyonu eklendikten hemen sonra 15 dakika içinde yapıldı.
9. Standart eğrinin doğrusal regresyon denklemini hesaplamak için standartların konsantrasyonlarına ve karşılık gelen OD değerlerine göre hesaplama yapıldı. Daha sonra numunelerin OD değerine göre ilgili numunenin konsantrasyonu hesaplandı.
10. ELİSA test kiti ile birlikte gönderilen standart çözeltisinin 2 katlı sulandırmaları ile örneklerin optik dansitelerinin karşılaştırılması ile kantitatif ölçüm yapabilmek için CurveExpert Professional (version

2.6.5) kullanıldı. Standart ve blank gözlerin okunan optik dansiteleri y eksenini, karşılık gelen madde miktarı (ng/dl, mg/dl) ise x eksenini oluşturacak şekilde programa girilen veriler ile Lowess Smooting ve Bleasdale metodları ile eğriler oluşturuldu. Eğrilerin doğruluğunun teyit edilmesi için girilen standart verileri oluşturulan eğri üzerinde test edildi ve sapma göstermeksizin standart miktarını veren ve en az 970/1000 skora sahip eğriler analiz için kullanıldı.

Örneklerin okunan optik dansiteleri, test prosedüründe tarif edildiği gibi düzeltildikten sonra (blank adsorbansının örnek adsorbansına etkisinin hesaplanması) her bir örnek optik dansitesinin eğri üzerinde karşılık geldiği madde miktarı hesaplandı. Geriye dönük kontrol için de x ekseninin y fonksiyonu olarak madde miktarları girilerek karşılık geldiği optik dansitenin geri elde edilmesi ile ölçümler doğrulandı.



Şekil 4.2. ELISA yöntemi ile Canine C-Reaktif Protein ölçüm çalışmaları.

4.2.4. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) Testleri

4.2.4.1. RT-PCR İçin Şablon (Template) DNA Hazırlama Metodu

Dışkı örnekleri, ishalli köpeklerin rektumundan steril bir svapla alındı ve fosfat tamponlu salin (PBS) içinde homojenize edildi (% 10 w/v).

Dışkı süspansiyonları, bir mikrofüjde yüksek hızda kısa bir santrifüjleme ile berraklaştırıldı ve 200 ml süpernatan alikotları, daha önce tarif edildiği gibi, PCR inhibitörlerini etkisizleştirmek ve buz üzerinde soğutma için 10 dakika işlem görerek DNA hazırlanması için kullanıldı.

Bu yöntemin, Taq polimeraz inhibitörlerini ortadan kaldırdığı gösterilmiştir (Decaro 2007).

DNA polimeraz aktivitesinin kalıntı inhibitörleri, geleneksel veya gerçek zamanlı PCR tahlilleri ile amplifikasyondan önce DNA ekstraktlarının distile su içinde 1:10 oranında seyreltilmesiyle etkisiz bir konsantrasyona düşürülmüştür.

4.2.4.2. RT-PCR için Primerler ve Prob Tasarımı

Bu amaçla Decaro ve ark. (2007) kullandıkları yöntem kullanılan probe modifiye edilerek takip edildi. Yöntemde kullanılan FAM-TAMRA probe yerine FAM-BHQ-1 probe kullanılmıştır. Primerler ve prob Macrogen, Seoul, Güney Kore firması tarafından üretildi. TaqMan probu, 50 ucunda floresan raportör boya 6-karboksifloresein (FAM) ve 30 ucunda söndürücü boya 6-karboksitetrametilrhodamin (BHQ-1) ile etiketlendi.

Applied Biosystems TaqMan Gen Ekspresyon testleri, gen ekspresyonunun kantitatif gerçek zamanlı PCR analizi için kullanılmıştır ve bir çift etiketlenmemiş PCR primeri ve 5 'ucunda bir boya etiketi (FAM) ve 3 'ucunda floresan olmayan söndürücü (NFQ) küçük bir oluk bağlayıcısı (MGB) olan bir TaqMan probundan oluşmaktadır.

Literatür bilgiye istinaden TAMRA boyası, emisyon maksimum değeri 560 nm'den az olan floroforlar için etkili bir söndürücü olarak bilinmektedir. Daha uzun dalga boyu emisyonlarına sahip boyalar TAMRA tarafından etkili bir şekilde

söndürülemeyebilmektedir. Ek olarak, TAMRA'nın, kanallar arasındaki karışma nedeniyle veri analizini zorlaştıran kendi floresansına sahip olduğu bilinmektedir. Bunun aksine, Black Hole Quencher® boyaları floresan sinyali olmayan gerçek "koyu" söndürücüler olarak bilinmektedir. Kullanımları, qPCR tahlillerinin tasarımını, uygulamasını ve yorumlanmasını basitleştirdiği bildirilmektedir. Ayrıca, BHQ® boyalarının, spektral olarak farklı geniş bir muhabir yelpazesinin kullanılmasını sağlamak için 480-580 nm (BHQ-1), 559-670 nm (BHQ-2) ve 620-730 nm (BHQ-3) arasında geniş bir absorpsiyona sahip oldukları bilinmektedir. Çok katlı deney tasarımlarında boyalar. Bazı boya eşleşmelerinde FRET su verme, statik söndürme mekanizmasıyla desteklenmektedir. Spesifik olarak, hidrofobik ve elektrostatik etkileşimler, gelişmiş söndürme ve geliştirilmiş sinyal-gürültü oranları için molekül içi bir dimer oluşturmak üzere BHQ boyalarının belirli habercilerle birleşmesini kolaylaştırmaktadır. Bu nedenle, BHQ boyaları, emisyon spektrumu BHQ absorpsiyon sınırlarının ötesinde olan bazı floroforları söndürebildiği bilinmekte olup tüm bu nedenlerle çalışmalarda TAMRA yerine BHQ-1 prob kullanılmıştır.

4.2.4.3. Standart DNA Hazırlama

Ekstraksiyon işlemleri pozitif kontrol (CPV-2) ile birlikte yürütüldü. Toplanan dışkı örneklerinden 'QIAamp DNA Stool Mini Kit' (QIAGEN, 51504, Almanya) kullanılarak viral DNA ekstraksiyonu yapıldı. Bu amaçla;

1. 180-220 mg kadar dışkı örneği 2ml'lik steril santrifüj tüpüne aktarıldı.
2. Herbir dışkı örneğinin üzerine Miktar>200 µL olacak şekilde PBS ilave edildi. Daha sonra dışkı örnekleri homojen dağılımın gerçekleşmesi için 1 dk boyunca vortekslendi.
3. 2 ml'lik yeni santrifüj tüplerine ilk olarak 20 µL Proteinase-K eklendi ve üzerine 200 µL miktarında süpernatant eklenerak tekrar homojen

dağılım için 1 dk boyunca vortekslendi. Geriye kalan dışkı peletleri atıldı.

4. Yeni bir 2 ml'lik santrifüj tüplerine 100 µL BUFFER VXL ve üzerine 2µL cRNA eklendi.
5. cRNA'lı tüpler içine proteinase-K'lı örnekten 200 µL ekleyerek kısa süreli santrifüj sonrasında 15 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
6. 15 dk sonra lizata 350 µL buffer ACB eklenerek vortekslendi ve kısa süreli santrifüj edildi.
7. 2ml'lik steril toplama tüplerine yerleştirilmiş spin collum tüpünün kapakları etiketlendi. Son adımda elde edilen lizat spin colluma dikkatlice konuldu. Kapak kapatılarak 8000 devirde 1 dk santrifüj yapıldı. Sonra spin collum tüpü yeni bir 2 ml'lik toplama tüpüne yerleştirildi. Eski toplama tüpü atıldı.
8. Spin collumun kapağı açılarak 600 µL buffer AW1 ilave edildi. Kapak kapatılarak tekrar 8000 devirde 1 dk santrifüj yapıldı. Daha sonra spin collum yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi. Eski toplama tüpü atıldı.
9. Spin collumun kapağı dikkatlice açılarak 600 µL buffer AW2 ilave edildi, kapak kapatılarak 8000 devirde 1 dk santrifüj yapıldı. Toplama tüpü filtrat ile birlikte atıldı.
10. Daha sonra spin collum yeni bir 2 ml'lik toplama tüpüne yerleştirildi ve 14000 devirde 2 dk santrifüj edildi.
11. Spin collum etiketlenmiş yeni 2 ml lik mikrosantrifüj tüpüne transfer edildi. Spin collumun kapağı dikkatlice açılarak içerisine 100 µl Buffer AVE'i doğrudan QIAamp membranın üzerine ilave edildi. Kapağı kapatıp 1 dk oda ısısında inkübe ettikten sonra DNA elüsyonu için 14000 devirde 1 dk santrifüj edildi.
12. Ekstraksiyon işlemi sonucunda elde edilen DNA ekstraksiyon ürünleri PCR'da kullanılıncaya kadar -20 ºC'de muhafaza edildi.

4.2.4.4. Pozitif Kontrol CPV DNA

Pozitif kontrol olarak kullanılmak üzere Konya Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof.Dr.Atilla Şimşek ve Dr. Irmak Dik'ten temin edilen Canine Parvovirüs DNA'sı kullanıldı.

4.2.4.5. Gerçek Zamanlı PCR

Gerçek zamanlı PCR (RT-PCR) testleri Step One Plus (Applied Biosystems) RT-PCR cihazı kullanılarak yapılmıştır ve veriler cihazın yazılımı ile analiz edilmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.3. Step One Plus RT-PCR cihazı

CPV standart dilüsyonlarının ve DNA şablonlarının kopyaları eş zamanlı olarak gerçek zamanlı analize tabi tutulmuştur. Çalışmada kullanılan örneklerde CPV varlığının Real Time PCR ile tespit edilebilmesi için Decaro ve ark. (2007) çalışmasındaki gibi aşağıdaki primerler (Çizelge 4.1) kullanılmıştır;

Çizelge 4.1. RT-PCR için kullanılan primerler

CPV primer F	5'-AAACAGGAATTAACTATACTAATATATTTA-3'
CPV primer F	5'-AAATTTGACCATTTGGATAAACT-3'
CPV probe	5'-FAM-TGGTCCTTTAACTGCATTAAATAATGTACC-BHQ1-3'

Real Time reaksiyonlarının gerçekleştirilebilmesi için aşağıdaki bileşenler (Çizelge 4.2) her bir örnek için 8'li strip tüplere (optik kapaklı) aktarılmıştır.

Çizelge 4.2. RT-PCR reaksiyonları için kullanılan bileşenler ve miktarları

Bileşen	**Hacim/Reaksiyon**
2x QuantiNova Probe PCR Master Mix	10.0 µl
Primer F	1.0 µl
Primer R	1.0 µl
Probe	0.25 µl
DNA	5.0 µl
Rox passive dye	1.0 µl
Nuclease-free su	1.75 µl
Toplam	20 µl

Real Time PCR reaksiyonları ısı döngüleri Decaro ve ark. (2007) protokolü modifiye edilerek göre aşağıdaki gibi (Çizelge 4.3) kullanılmıştır;

Çizelge 4.3. RT-PCR reaksiyonları ısı döngüleri

Basamak	**Süre**	**Sıcaklık**
Enzim aktivasyonu	5 dk	95ºC
Denaturasyon*	30 sn	95ºC
Annealing*	45 sn	51 ºC
Extension*	§30 sn	60ºC
* 40 döngü	§ Gerçek zamanlı okuma bu basamak sonunda yapılmıştır	

4.2.5. Çalışmalar Sırasında Uyulan Genel Biyogüvenlik Önlemleri

1. Çalışmalar sırasında laboratuar önlüğü, CE belgeli, 3 katmanlı cerrahi tip yüz maskesi ve tek kullanımlık eldiven kullanıldı ve COVID-19 güvenlik mesafesi kurallarına uyularak çalışıldı.
2. Tezgahlar ve ekipman çalışma öncesi ve sonrası %70 etanol slüsyonu ile silinerek temizlendi. Laboratuvar zemini %5 lik sodyum hipoklorit solüsyonu ile silindi.
3. Test yöntemi uygulanırken tek kullanımlık eldivenler giyildi. Özellikle bilinen hiçbir test yöntemi, fare kanından türetilen ürünlerin bulaşıcı ajanlar yaymayacağına dair tam bir güvence sunamadığı bilinmektedir. Bu nedenle, tüm kan türevleri potansiyel olarak bulaşıcı kabul edilmiştir ve iyi laboratuvar uygulamaları takip edilmiştir.
4. Tüm örnekler virüsleri etkisiz hale getirecek şekilde imha edilmiştir.
5. Sıvı Atık İmhası: Bu amaçla %5,25 Sodyum Hipoklorit %1 konsantrasyonunda dilüe edilerek kullanılmıştır. İmha edilmeden önce, virüsleri etkisiz hale getirmek için tüm atıkların en az 30 dakika bu solüsyonda bekletilmesine izin verilmiştir.
6. Substrate slüsyonu kolayca kontamine olabilmektedir. Üreticinin tavisyesine göre mavi renge dönüşümün kontaminasyon işareti olduğu

bildirildiğinden dolayı kullanmadan önce mavimsi renk oluşumunun olmadığı gözlemlenmiştir. Ayrıca Substrat B'nin, ışığa duyarlı olduğu bilindiği için uzun süre ışığa maruz kalması önlenmiştir.

4.2.6. İstatitik Analizleri

Çalışmanın verileri MS Excel programında istatistik ham verisi olarak tablolar haline getirilmiş ve daha sona SPSS 17 istatistik programı ile analiz edilmiştir. Elde edilen veriler Çizelge 5.1 ve Çizelge 5.2 de verilmiştir.

5. BULGULAR ve TARTIŞMA

5.1. Epidemiyolojik Verilere Ait Bulgular

Araştırmada çalışma grubunu, Adana Büyükşehir Beldiyesi ve Osmaniye Belediyesi Hayvan Barınakları ve özel veteriner hekim muayenehanelerine getirilen ve doğal nedenli canine prvoviral enfeksiyon belirtisi ve ishal saptanan 52 köpek oluşturmaktadır. Örneklemeler Haziran 2020 ve Ocak 2021 yılları arasında yapılmıştır. Hasta köpeklerden EDTA'lı kan, serum ve rektal dışkı örnekleri toplanmıştır. Çizelge 5.1, 52 köpeğin; yaş, ırk, cinsiyet bulgularının yanı sıra ilk muayenelerinde saptanan klinik belirtiler açısından dağılımını vermektedir. Tedaviye alınan köpeklerin tamamı 1-12 aylık olup, 27 erkek, 25 dişidir. Köpeklerin 31'i sahipli değil iken, 21'si sahipsizdir. Aralarından 29'unun (%55,8) Canine Parvovirüs enfeksiyonlu olduğu RT-PCR ile moleküler test yöntemi ile ve 27'sinin (%51,9) serolojik olarak ELISA yöntemi ile yapılan testlerle saptanmıştır.

Çizelge 5.1. Köpeklerin özelliklerine ilişkin betimleyici istatistikler

	Gruplar	Sayı (adet)	Yüzde (%)
Yaş aralığı	1-3 aylık	39	75
	4-6 aylık	11	21,16
	≥ 7 aylık	2	3,84
Irk	Kangal	11	21,15
	Mix	21	40,39
	Golden retriever	5	9,62
	German pointer	4	7,69
	German Sepherd	3	5,77
	Terrier	1	1,92
	Setter	1	1,92
	Cane corsa	2	3,85
	Beagle	1	1,92
	Alabay	1	1,92
	Maltese	1	1,92
	Tea cup	1	1,92
Cinsiyet	Erkek	27	51,92
	Dişi	25	48,07

CPV Pozitif	**Evet**	**29**	**55,77**
	Hayır	**23**	**44,23**
Hasta	**Erkek**	**17**	**58,62**
	Dişi	**12**	**41,38**
Sağlıklı	**Erkek**	**10**	**43,48**
	Dişi	**13**	**56,52**
Sahipsiz	**Evet**	**21**	**40,38**
	Hayır	**31**	**59,62**
Kusma	**Evet**	**37**	**71,15**
	Hayır	**15**	**28,85**
İshal	**Evet**	**52**	**100**
	Hayır	**-**	**0**
Kanlı ishal	**Evet**	**39**	**75**
	Hayır	**13**	**25**
Serbest dolaşım	**Evet**	**49**	**94,23**
	Hayır	**3**	**5,77**
Dehidrasyon	**Evet**	**44**	**84,62**
	Hayır	**8**	**15,38**
Ateş	**Evet**	**38**	**73,08**
	Hayır	**14**	**26,92**
Halsizlik	**Evet**	**44**	**84,62**
	Hayır	**8**	**15,38**
Anemi	**Evet**	**35**	**67,31**
	Hayır	**17**	**32,69**
Mukozal solgunluk	**Evet**	**43**	**82,69**
	Hayır	**9**	**17,31**

5.2. Hematoloji Testlerinin Sonuçları

5.2.1. İstatistik Analizlerin Sonuçları

Çizelge 5.2. WBC, RBC, HGB, HCT, PLT ve LYMPH değerlerinin ırklar arası istatistiksel olarak faklılıklar görülmüştür $0,05<p$ (n:3).

Çizelge 5.2. Hematoloji test sonuçlarında ırklar arası görülen istatistiksel farklılıklar

KÖPEK IRKLARI	WBC	RBC	HGB	HCT	PLT	LYMPH
REFERANS DEĞERLER	<6,7 10^9/L	<5,6 101^2/L	<12,9 g/L	<37 %	<200 10^9/L	<4,4 10^9/L
Kangal.1	10,5±0,32^{i}	5,29±0,25^{h}	10,7±0,21^{n}	34,2±0,35^{ı}	355±2,14^{c}	1±0,05^{o}
Kangal.2	6,6±0,05^{m}	5,74±0,14^{f}	14,6±0,31^{d}	39,2±0,42^{c}	374±2,31^{a}	1,4±0,09^{lm}
Kangal.3	5,96±0,07^{n}	6,57±0,27^{c}	15,4±0,24^{c}	41,9±0,14^{b}	142±1,34^{l}	1,73±0,21^{i}
Kangal.4	6,6±0,08^{m}	5,74±0,18^{f}	14,6±0,17^{d}	39,2±0,34^{c}	174±1,28^{gh}	1,4±0,09^{lm}
Kangal.5	5,5±0,11^{o}	4,55±0,18^{o}	11,3±0,34^{l}	29,9±0,27^{m}	163±1,36^{ı}	0,00±0,00
Kangal.6	3,1±0,08^{r}	4,61±0,23^{n}	9,5±,28^{u}	29±0,37^{o}	148±1,21^{k}	0,8±0,02^{ö}
Kangal.7	5,1±0,04^{ö}	5,54±0,31^{g}	13,1±,28^{g}	38,2±0,19^{d}	104±1,09^{s}	1,6±0,09^{k}
Mix.1	10,5±0,15^{i}	4,68±0,14^{i}	12,8±0,04^{h}	24,5±0,25^{ü}	112±1,43^{r}	2,3±0,14^{g}
Mix.2	6,30±0,09^{m}	4,79±0,21^{k}	11,3±0,17^{l}	26±0,18^{u}	105±1,48^{s}	2,9±0,19^{e}
Mix.3	20,7±0,14^{e}	4,73±0,24^{l}	12,3±0,28^{i}	34±0,29^{i}	173±1,28^{gh}	5,1±0,31^{b}
Mix.4	20,42±0,31^{e}	14,78±0,38^{a}	10,1±0,11^{ö}	31,1±0,19^{l}	367±2,05^{b}	3,33±0,11^{d}
Mix.5	24,77±0,11^{b}	4,3±0,05^{ö}	9,8±0,10^{s}	27,8±0,37^{r}	196±1,09^{e}	2,06±0,08^{ı}
Mix.6	11,32±0,19^{ı}	5,06±0,21^{ı}	11,8±0,28^{k}	32,7±0,27^{k}	163±1,34^{ı}	1±0,05^{o}
Mix.7	21,08±0,25^{d}	4,21±0,14^{r}	8,7±0,36^{z}	26,1±0,24^{u}	179±1,28^{f}	1,43±0,21^{lm}
Mix.8	12,57±0,27^{g}	4,33±0,12^{ö}	9,9±0,28^{r}	28,1±0,29^{ö}	171±1,32^{h}	1,95±0,18^{ı}
Mix.9	11,08±0,17^{ı}	4,62±0,07^{n}	9,6±0,24^{t}	29,2±0,27^{n}	147±1,05^{k}	1,25±0,13^{n}
Mix.10	14,47±0,32^{f}	4,02±0,06^{s}	8,4±0,34^{x}	26,5±0,24^{ş}	137±0,96^{m}	1,4±0,09^{lm}
G.Sepherd.1	5,1±0,14^{ö}	5,57±0,28^{g}	14,6±0,38^{d}	36,7±0,28^{f}	177±1,64^{fg}	1,5±0,12^{kl}
G.Sepherd.2	23,6±0,19^{c}	6,69±0,13^{b}	17,6±0,35^{b}	48,2±0,34^{a}	180±1,46^{f}	4,5±0,42^{c}
G.Sepherd.3	5,2±0,14^{oö}	3,3±0,09^{v}	8,9±0,19^{v}	23,2±0,28^{v}	156±1,54^{i}	0,7±0,05^{o}
Pointer.1	11,1±0,21^{ı}	3,37±0,09^{u}	9,9±0,14^{r}	18,8±0,28^{z}	128±1,28^{n}	2,2±0,11^{g}
Pointer.2	2,9±0,05^{s}	6,46±0,32^{d}	18,4±0,32^{a}	47,8±0,35^{z}	272±1,63^{d}	1±0,24^{o}
Pointer.3	42,5±0,28^{a}	5,86±0,28^{e}	13,7±0,19^{e}	36,3±0,39^{g}	54±1,26^{ü}	9±0,15^{a}
G.Rertiever.1	0,98±0,17^{v}	6,47±0,39^{d}	13,4±0,42^{f}	37,6±0,39^{e}	122±1,28^{o}	0,79±0,24^{ö}
G.Retriever.2	5,32±0,08^{oö}	4,83±0,14^{i}	12,6±0,18^{ı}	35,9±0,28^{h}	117±1,24^{ö}	0,98±0,31^{o}
G.Retriever.3	9,9±0,28^{k}	4,67±0,14^{m}	8,8±0,09^{y}	27,1±0,34^{s}	124±1,64^{o}	3,3±0,08^{d}
Cane Corsa	2,5±0,14^{t}	3,86±0,05^{t}	11,1±0,09^{m}	20,5±0,38^{y}	176±1,34^{fg}	1,3±0,08^{mn}
Alabay	12±0,25^{h}	2,5±0,34^{z}	9,2±0,18^{ü}	10±0,18^{x}	94±1,42^{t}	1,2±0,05^{n}
Maltese	7,7±0,17^{l}	2,66±0,28^{y}	10,6±0,28^{o}	18,8±0,21^{z}	78±1,58^{u}	2,7±0,17^{f}

WBC (referans değeri = < 6,7 10^9/L) = m,n,o,ö,r,s,t,v < referans değeri < a,b,c,d,e,f,g,h,ı,i,k,l ($p<0,05$)

RBC (referans değeri = <5,6 10^{12}/L)= g,h,ı,i,k,l,m,n,o,ö,r,s,t,u,v,y,z <referans değer<a,b,c,d,e,f (p<0,05)

HGB (referans değeri = < 12,9 g/L) = ,h,ı,i,k,l,m,n,o,ö,r,s,t,u,ü,v,y,z < referans değer < a,b,c,d,e,f,g (p<0,05)

HCT (referans değeri = < 37 %) = f,g,h,ı,i,k,l,m,n,o,ö,r,s,t,u,v,y,z < referans değer < a,b,c,d,e (p<0,05)

PLT (referans değeri = <200 10^9/L) = e, f,g,h,ı,i,k,l,m,n,o,ö,r,s,t,u,v,y,z < referans değer < a,b,c,d (p<0,05)

LYMPH (referans değeri= <4,4 10^9/L) = d,e, f,g,h,ı,i,k,l,m,n,o,ö,r,s,t,u,v,y,z < referans değer < a,b,c (p<0,05)

Bu çalışmada incelenen hasta köpeklerden alınan kanlar veteriner otoanalizör, otomatik hematokrit santrfüj cihazı ve lam frotisi yeni metilen mavisi boyaması ile incelendiklerinde hasta köpeklerde yaygın lenfopenia (%89,6), lökopenia (%44,8), anemia (%68,9), düşük hematokrit (%82,8) saptanmıştır.

Castro ve ark. (2013) Brezilya'da yaptıkları bir çalışmada 1 yaşından küçük ve CPV enfeksiyonlu köpeklerden alınan kanları hematolojik incelemişler ve inceleme sonunda hasta hayvanlarda anemia, lenfopenia ve lökopeni görülme yüzdelerini sırası ile %61,5, %77 ve %46,1 olarak hesaplamışlardır.

Ukrayna'da Terzungwe (2018) farklı ırklardan ve 6 haftalıktan 6 ay yaşa kadar olan CPV enfeksiyonlu 29 köpeklerle yaptığı çalışmada %20,7 anemia, %31 lökopeni, %27,6 lenfopenia olduğunu saptadıklarını açıklamışlardır.

Alves ve ark. (Brezilya,2020) CPV enfeksiyonlu 1 yaştan küçük 103 köpekle yaptıkları çalışmada hasta köpeklerin %75'inde şiddetli lökopeni görmüşlerdir. Lökopeni olan hastaların ise %40,4'lük bir kısmının öldüğünü bildirmişlerdir.

Arslan ve ark. (2017) CPV enfeksiyonlu köpeklerin kan parametreleri üzerine yaptığı çalışmada HCT %36,97 olarak hesaplanmış ve bu yüzde kontrol grubundan daha düşük bulduklarını açıklamışlardır.

Yapılan çalışmaların tümünde hematolojik incelemeler sonucunda eritrosit (RBC), lenfosit (LYMP), hematokrit (HCT) ve lökosit (WBC) yıkımlanması sonucu hasta hayvanların ölümüyle sonuçlanabilecek hastalıklar oluştuğu bildirilmektedir. CPV etkeni bağırsak epitelleri, kemik iliği gibi hızlı çoğalma özelliğine sahip dokulara yerleşir. Bunun sonucunda enfeksiyonlu hastalarda virüsün lenfopoetik sistem ve kemik iliğindeki myoproliferatif hücreleri yıkımlaması sonucu lenfopeni, panlökopeni, anemi ve immunsupresyon gelişir. Yapılan çalışmalarda da görüldüğü gibi CPV enfeksiyonu özellikle yavru köpeklerde ölümle sonuçlanan bir enfeksiyondur. Bunun sebebi yavru köpeklerin aşılanma durumları, aşılanmış annelerden doğmuş olsa bile maternal antikorların yeterince oluşamaması veya koruyuculuk düzeyini uzun süre sürdürememesi olabilir. Fiziksel ve hematolojik bulguların ilişkisi, parvovirüslü köpekler için prognostik bir faktör olarak çok faydalıdır. Şiddetli anemi, lenfopeni, lökopeni veya bu koşullardan en az ikisine sahip hastalar, önemli ölçüde daha yüksek ölüm riskine sahip oldukları bilinmektedir.

5.3. ELISA testleri bulguları

27'sine ELISA serolojik olarak CPV tanısı konulmuştur. İlk muayene sırasında viral enfeksiyon ile klinik bulguları uyumlu olan köpekler ELİSA yöntemleri ile serolojik olarak incelenmiş ve CPV pozitif olanlar belirlenmiştir

ELISA yöntemi ile yapılan serolojik muayene sonrası 52 köpekten 27'sinin CPV ile enfekte oldukları saptanmıştır.

5.3.1. Canine Anti-Parvovirüs IgM Antikor Seviyesi Ölçümlerinin Sonuçları:

IgM test sonuçlarını belirlemek amacıyla Optik Yoğunluğu (O.D.) ölçmek için mikrotitre plakaları BioTek ELX 800 mikrotitre plaka okuyucu cihazı kullanarak 450 nm'de okutuldu.

Sonuçlar pozitif kuyucuk ortalamasının 2,256 olduğu ve üretici tarafından verilen test protokolünde belitildiği gibi ≥1.00 değeri olan testin geçerliliği koşulunu sağladığı belirlendi.

CUT OFF değeri hesaplaması: Üretici tarafından verilen formül uygulandı.

Kritik değer = Negatif kontrol kuyucuğunun ortalaması + 0.15.

Kritik değer = 0,065 + 0,15 = 0,215

Negatif Sonuç: 0,215 değerinden düşük olan örnekler Negatif olarak değerlendirildi.

Pozitif Sonuç: 0,215 değerinden yüksek olan örnekler Pozitif olarak değerlendirildi.

29 örnekten 27 sinin Canine Anti-Parvovirüs IgM antikor seviyesi yönünden pozitif olduğu saptandı.

5.3.2. Canine Anti-Parvovirüs IgG Antikor Seviyesi Ölçümlerinin Sonuçları:

IgG test sonuçlarını belirlemek amacıyla Optik Yoğunluğu (O.D.) ölçmek için mikrotitre plakaları BioTek ELX 800 mikrotitre plaka okuyucu cihazı kullanarak 450 nm'de okutuldu.

Sonuçlar pozitif kuyucuk ortalamasının 2,618 olduğu ve üretici tarafından verilen test protokolünde belitildiği gibi ≥1.00 değeri olan testin geçerliliği koşulunu sağladığı belirlendi.

CUT OFF değeri hesaplaması: Üretici tarafından verilen formül uygulandı.

Kritik değer = Negatif kontrol kuyucuğunun ortalaması + 0.15.

Kritik değer = 0,077 + 0,15 = 0,227

Negatif Sonuç: 0,227 değerinden düşük olan örnekler Negatif olarak değerlendirildi.

Pozitif Sonuç: 0,227 değerinden yüksek olan örnekler Pozitif olarak değerlendirildi.

29 örnekten 27 sinin Canine Anti-Parvovirüs IgG antikor seviyesi yönünden pozitif olduğu saptandı.

Babaloa ve ark. (2016) Nijerya'da aşılanmış ve aşılanmamış 48 köpekle CPV enfeksiyonuna karşı IgG antikorlarının bağışıklık ve seropozitifliğinin değerlendirilmesi üzerine yaptıkları çalışma sonunda örneklenen köpeklerden %79,2 (38 köpek) gibi yüksek düzeyde anti-CPV antikor titresi ve %20,8 (10 köpek) düşük düzeyde anti-CPV antikor titresi elde ederek Nijerya'nın Abeokuta kentindeki köpekler arasında köpek parvovirüsüne karşı IgG antikorlarının varlığını doğrulamışlardır.

Waner ve ark. (2004) serum IgM ve IgG Rapid Dot ELISA kullanılarak doğal olarak enfekte köpeklerde CPV-2 tanısı üzerine yaptıkları çalışmada tüm köpeklerin IgM ve IgG antikorlarına sahip olduklarını bildirmişlerdir. Doğal olarak enfekte köpeklerde IgM antikorlarının titrelerinin, kantitatif olarak daha yüksek olduğunu söylemişlerdir.

Yaptığımız bu çalışmada Canine Anti-Parvovirüs IgM pozitif kuyucuk ortalamasının 2,256, Canine Anti-Parvovirüs IgG pozitif kuyucuk ortalamasının 2,618 olduğu belirlendi. Çalışma sonunda 29 örnekten 27 sinin Canine Anti-Parvovirüs IgM ve IgG Antikor seviyeleri açısından pozitif olduğu saptanmıştır.

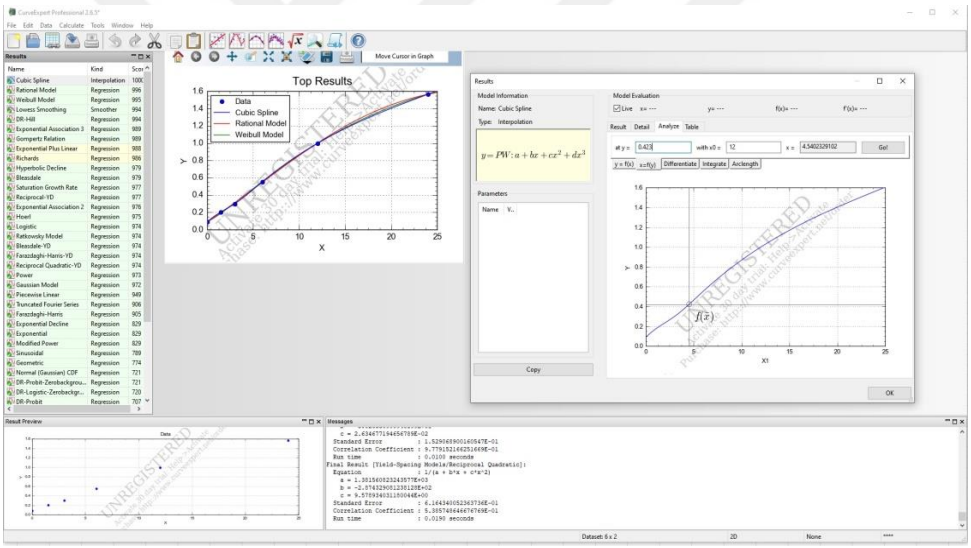
Yapılan çalışmalarda Canine Anti-Parvovirüs IgM ve IgG antikor seviyeleri açısından pozitif olduğu saptanmıştır. IgG antikor seviyesiyesinin pozitifliği köpeklerde CPV enfeksiyonuna karşı bağışıklık sisteminin yanıt verdiğini göstermektedir.

5.3.3. Canine Serum C-Reaktif Protein Değerlerinin Hesaplanması.

ELİSA test kiti ile birlikte gönderilen standart çözeltisinin 2 katlı sulandırmaları ile örneklerin optik dansitelerinin karşılaştırılması ile kantitatif ölçüm yapabilmek için CurveExpert Professional (ver.2.6.5) kullanıldı. Standart ve blank gözlerin okunan optik dansiteleri y eksenini, karşılık gelen madde miktarı (ng/dl, mg/dl) ise x eksenini oluşturacak şekilde programa girilen veriler ile

Lowess Smooting ve Bleasdale metodları ile eğriler oluşturuldu. Eğrilerin doğruluğunun teyit edilmesi için girilen standart verileri oluşturulan eğri üzerinde test edildi ve sapma göstermeksizin standart miktarını veren ve en az 970/1000 skora sahip eğriler analiz için kullanıldı.

Örneklerin okunan optik dansiteleri, test prosedüründe tarif edildiği gibi düzeltildikten sonra (blank adsorbansının örnek adsorbansına etkisinin hesaplanması) her bir örnek optik dansitesinin eğri üzerinde karşılık geldiği madde miktarı hesaplandı. Geriye dönük kontrol için de x ekseninin y fonksiyonu olarak madde miktarları girilerek karşılık geldiği optik dansitenin geri elde edilmesi ile ölçümler doğrulandı.



Şekil 5.1. Canine Serum C-Reaktif Protein Ölçüm Test Sonucu Hesaplaması

Elde edilen sonuçlara göre CRP değerlerinin en yüksek 6,05 g/L ve en düşük 3,27 g/L olduğu ve ortalama değerinin 4,66 g/L olduğu saptandı.

C-reaktif protein (CRP), köpeklerde karaciğerde üretilen önemli bir akut faz proteinidir. Sağlıklı köpeklerde konsantrasyonlar oldukça düşüktür ancak akut iltihaplanmaya yanıt olarak hızla belirgin artışlar (50 katın üzerinde)

meydana gelir. İnflamasyonun çözülmesiyle konsantrasyonlar da hızla azalır, bu nedenle zaman içindeki seri değişikliklerin izlenmesi, belirli bir hayvandaki inflamasyonun çözülmesini veya kötüleşmesini belgelemeye yardımcı olabilir. Akut faz proteinleri, doğuştan gelen bağışıklık tepkisinin bir parçası olarak kabul edilir ve antibakteriyel etkilere sahiptir. Nitekim CRP, Pneumococcus'un bakteri hücre duvarındaki techoik aside (C-polisakkarit olarak da bilinir) bağlanma kabiliyetiyle adlandırılmıştır. CRP, hücre duvarına bağlanarak klasik komplement yolunu (C1q) aktive ederek bakteriyel opsonizasyona yol açar ve bu da fagositler tarafından temizlenmesini destekler. Aynı zamanda, fosfatidilkolin ve zar lipidleri ve hasarlı hücrelerdeki DNA dahil olmak üzere diğer ligandlara da bağlanır.

C-reaktif protein, her biri yaklaşık 20 kDa'lık 5 alt birimden oluşur ve bir pentamer oluşturur. Karaciğerde interlökin-1, interlökin-6 ve tümör nekroz faktörü-α gibi inflamatuar sitokinlere yanıt olarak üretilir. Elektroforetogramın gama bölgesinde hareket eder, ancak konsantrasyonlar, belirgin artışlar meydana geldiğinde bile elektroforetogramda değişikliklere neden olmak için çok düşük olduğu literatür bilgide bildirilmiştir.

CRP'yi ölçmek için ELISA, immünotürbidometrik testler, lateks aglütinasyon ve zamanla çözümlenmiş immünoflorometrik test dahil olmak üzere tümü immünolojik temelli olan çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bu çalışmada köpek türüne spesifik olarak üretilen canine CRP ELISA kiti kullanılmıştır.

Bu çalışma sonunda Canine Serum C-Reaktif Protein değerlerinin en yüksek 6,05 g/L ve en düşük 3,27 g/L olduğu ve ortalama değerinin 4,66 g/L olduğu saptandı. Mcclure ve ark. (2013) Canine parvovirüs ile enfekte olmuş yavru köpeklerde sonucu tahmin etmek için serum C-reaktif protein konsantrasyonunun kullanımının değerlendirilmesi üzerine yaptıkları çalışmada

CRP konsantrasyonunu 9,73 g/L (97,3 mg/L) olarak hesaplamışlardır. Hindenberg ve ark. (2017) yaptıkları çalışmada CRP konsantrasyonunu 4 ile 281 mg/l arasında değişen değerlerde bulmuşlardır. Bu çalışmanın bulguları Mcclure ve ark. (2013) bulguları ile benzerlikler göstermektedir.

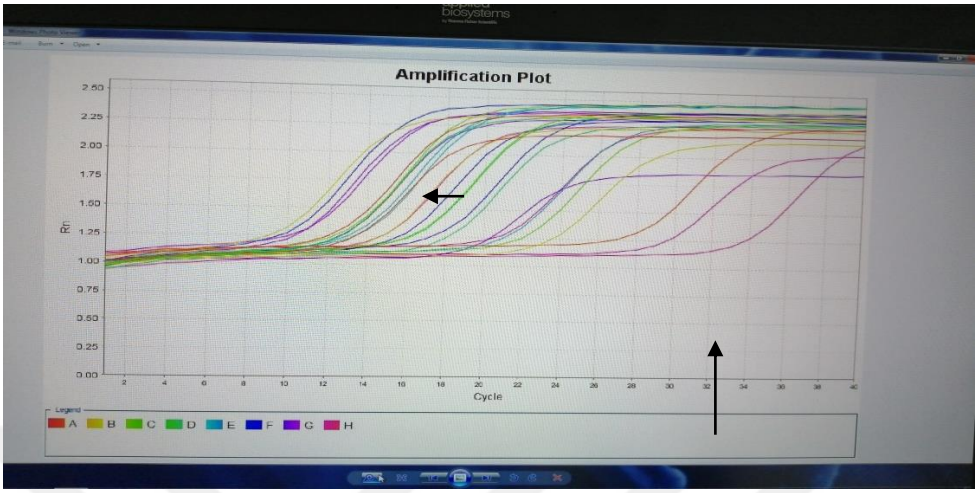
Yüksek CRP konsantrasyonlarının patofizyolojik bir bulgu olarak genellikle çeşitli koşullarda özellikle de bakteriyel enfeksiyonlarda inflamasyonun hassas bir belirteci olarak kabul edildiği bilinmektedir, ayrıca çeşitli kanser türlerine sahip köpeklerde, özellikle hematopoietik kökenli (lenfoma, lösemi, kronik lenfositik lösemi, akut lenfoid ve miyeloid lösemi) yüksek CRP konsantrasyonları bildirilmiştir. Ek olarak travma (ameliyat sonrası gibi), enfeksiyöz veya enfeksiyöz olmayan nedenlere bağlı enflamasyon ve konjestif kalp yetmezliği dahil olmak üzere çeşitli hakaret türleriyle artabileceği de bilinmektedir (Cornell eClinPath, 2021). Köpeklerde CRP konsantrasyonları değerinin enflamasyona bağlı olarak lokal veya sistemik enflamasyonla non-spesifik olarak artabileceği çeşitli araştırıcılar tarafından önceki çalışmalarda bildirlmiştir (Christensen ve ark. 2014, Torrente ve ark. 2015). 116 köpek üzerinde yapılan bir prospektif çalışmada (Torrente ve ark.2015), sistemik inflamatuar yanıt sendromu veya sepsisli köpeklerde (165 ± 82 mg / L), lokalize inflamasyona (108 ± 70 mg / L) göre önemli ölçüde daha yüksek ortalama konsantrasyonlar görüldüğünü bildirmişlerdir.

Sasaki ve ark. (2002) viral enfeksiyonlar ile bakteriyel enfeksiyonlar arasında CRP konsantrasyonlarının farklılıklarının belirlenebilmesi için yaptıkları bir çalışmada hastalığın erken evresinde inflamatuar belirteçleri ölçerek bakteriyel ve viral enfeksiyonu ayırt etmek için bir yöntem bulmayı amaçladıklarını belirtmişlerdir. Patojenin izolasyonu veya pozitif seroloji ile teşhis edilen bakteriyel ve viral enfeksiyon şikayeti olan çocuklardan elde edilen serumlarda C-reaktif protein (CRP), serum amiloid A (SAA) ve 2'-5'-

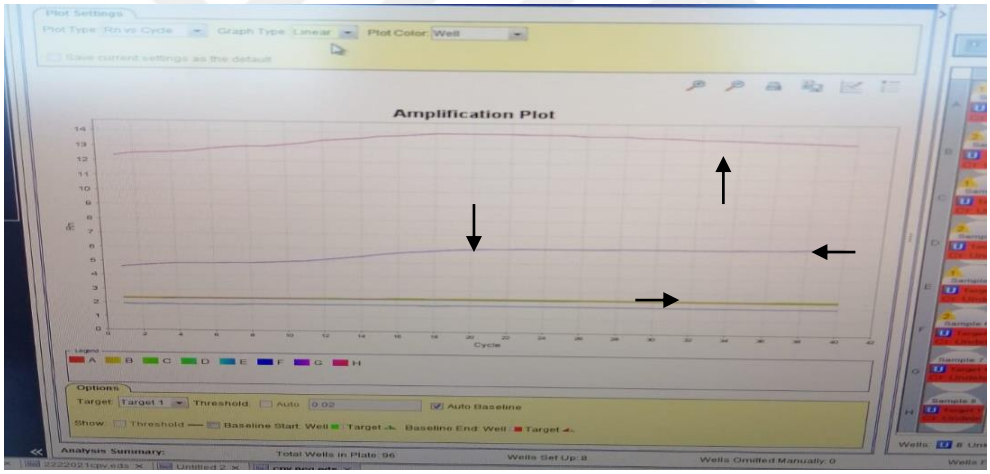
oligoadenilat sentetaz (2-5A sentetaz) dahil olmak üzere akut faz proteinlerinin aktivitesini incelediklerini ve CRP ve SAA düzeylerindeki artışların genellikle birbirine paralel olduğunu saptadıklarını bildirmişlerdir. Bakteriyel enfeksiyonların akut aşamasında, CRP seviyeleri orta veya yüksek derecede arttığını ve 2-5A sentetaz seviyeleri normal iken, viral enfeksiyonlarda CRP seviyelerin normal veya hafif arttığını ve 2-5A sentetaz seviyelerinin arttığını bildirmişlerdir. Bakteriyel ve viral enfeksiyonu daha iyi ayırt etmek için, diferansiyel indeks olarak CRP'nin (mg/L) 2-5A sentetaz (pmol/dl) x10 oranını kullandıklarını ve bakteriyel enfeksiyonlarda bu indeksin değerleri 3,9 ile 50 arasında değişirken ve 0 ile 0,9 arasında değişen viral enfeksiyonlardaki değerlerden daha yüksek bulunduğunu bildirmişlerdir. Sonuç olarak hastalığın akut fazında (başlangıcından itibaren 5 gün içinde) hem CRP hem de 2-5A sentetaz ölçümünün, enfeksiyonun bir bakteri veya virüs kaynaklı olup olmadığını belirlemek için değerli olduğunu önermişlerdir. Literatür bilgi CRP seviyelerinin hastalığın hangi gününde örneklemeye dahil edildiği ile yakın ilişkili olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada incelenen hasta köpeklerin enfeksiyonun ilk 5 günü içerisinde örneklemeleri yapılmıştır ve CRP değerlerinin en yüksek 6,05 g/L ve en düşük 3,27 g/L olduğu ve ortalama değerinin 4,66 g/L saptanması ile Sasaki ve ark. (2002) bulguları ile örtüştüğü anlaşılmıştır.

5.4. Real Time PCR (RT-PCR) Testi Sonuçları

Çalışmada incelenen 52 köpek dışkısından ekstraksyon ile izole edilen DNA örneklerinden yapılan RT-PCR test sonuçları sonrası 29 köpeğin dışkısında Canine Parvovirüse ait DNA saptanmıştır ve pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (%55,8).



Şekil 5.2. Canine parvovirüs RT-PCR test sonucu (CPV pozitif) (← pozitif kontrol, ↑ negatif kontrol)



Şekil 5.3. Canine parvovirüs RT-PCR test sonucu (CPV negatif) (↑Pozitif kontrol, ↓negatif kontrol, ← pozitif örnek, → negatif örnek)

Bu çalışmada elde edilen bulgular %55,8 oranında CPV pozitifliği olduğunu göstermektedir. Ülkemizde geçmiş yıllarda yapılan az sayıda çalışmalarda farklı sonuçlar alındığı çeşitli araştırıcılar tarafından bildirilmiştir. Şahna ve ark. (2008) Kayseri'de ishalli sokak köpeklerinden toplanan dışkı örneklerinin PCR testi ile incelenmesiyle yaptıkları çalışma sonrası %76,5

oranında CPV-2 saptadıklarını, Dik (2017) ise 2017 yılında CPV-2ab'ye spesifik primerler kullanılarak yapılan PCR analizleri sonucunda ishalli köpeklerde %66 oranında pozitiflik elde ettiklerini bildirmişlerdir. Her iki çalışmanın bulguları bu çalışmanın bulgularından daha yüksek bulunmuştur. Dik'in örneklem sayısının bu çalışmadaki örneklem sayısından fazla olması bu farklılığa neden olmuş olabilir.

Bu çalışmanın bulgularından daha düşük olarak köpeklerin dışkı örneklerinin PCR ile incelenmesi sonucu yapılan farklı çalışmalarda, Timurkan ve Oğuzoğlu (2015) Ankara'da CPV-2 yönünden %38,4 oranında pozitiflik tespit edildiğini, Yılmaz ve ark. (2005) ve Yeşilbağ ve ark (2007) Bursa bölgesinde sırasıyla %35 ve %35,5 oranlarında CPV-2 pozitifliği saptadıklarını bildirmişlerdir. Çalışmalar arasında farklılıklar olmasının köpeklerin yaşam ortamları, maternal antikor ve kolostruma bağlı koruyuculuk eksikliği ve diğer bireysel faktörlere bağlı olabileceği nedeniyle oluştuğu kanısına varılmıştır. Sonuç olarak yapılan çalışmaların virüsün varlığının ülkemizde köpekler arasında yüksek oranda devam ettirdiğini göstermesi açısından önemli bulunmuştur.

Elbaz ve ark. (2021) Mısır'da yaptıkları bir çalışmada topladıkları 50 örnekten 35'inde (%70) hızlı bir antijen tarama testi olarak immüno-kromatografi Ag (IC-Ag) kullandıklarını ve CPV-2 için pozitif sonuçlar elde ettiklerini, oysa ki aynı örneklerin polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) testi ile incelendiklerinde 42 örnekte (%84) CPV-2 DNA tespit etiklerini bildirmişlerdir. Hirasawa ve ark. (1996) Japon köpeklerinde canine parvovirüs tip 2 (CPV-2) prevalansı ve virüs suşları arasındaki genomik varyasyonları incelemiş ve 74 dışkı numunesiyle yapılan PCR testi sonucunda virüs pozitiflik oranını %54,1 olarak saptadıklarını bildirmişlerdir. Awad ve ark. (2019) Mısır'da CPV enfeksiyonunun prevalansı üzerine yaptıkları bir diğer araştırmada çalışma popülasyonu arasında CPV-2b enfeksiyonu prevalansını % 55.56 olarak saptadıklarını bildirmişlerdir. Bu çalışmada RT-PCR ile yapılan

testler sonrası %55,8 oranında pozitiflik bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar Elbaz ve ark. (2021) bulgularına göre düşük olmakla birlikte Hirasawa ve ark. (1996) ve Awad ve ark. (2019) çalışma bulgularıyla büyük benzerlikler gösterdiği belirlenmiştir ve çalışma bölgelerinin dünyanın farklı noktalarında olmasına rağmen benzerlikler içermesi CPV enfeksiyonunun dünya genelinde yaygınlığı bilgilerini desteklediği kanısına varılmıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma viral hayvan hastalıklarının tanısı için veteriner laboratuvar uygulamaları sırasında Biyoteknolojinin kullanılması ile önemli veriler içermesi ve yöntem olarak referans alınabilecek çalışma metotları geliştirmesi açısından özgündür. Çalışma sonrası elde edilen veriler ülkemiz ve dünya genelinde yapılan çalışmalar ile karşılaştırılmıştır. Çalışma multi ve interdisipliner çalışmaların yapılması ve önemini ortaya koyması açısından özgün olup önemli veriler içermektedir. Bir yüksek lisans tezi olmasına rağmen RT-PCR ile moleküler, ELISA ile serolojik ve hematolojik testler olarak 3 farklı yöntem kullanılmıştır.

RT-PCR çalışmalarında bu çalışmaya özgünlük katan uygulama ile Decaro ve ark. (2007) kullandıkları yöntemde kullanılan probe modifiye edilerek FAM-TAMRA probe yerine FAM-BHQ-1 probe kullanılmıştır. TaqMan probu, 50 ucunda floresan raportör boya 6-karboksifloresein (FAM) ve 30 ucunda söndürücü boya 6-karboksitetrametilrhodamin (BHQ-1) ile etiketlenmiştir.

Bu çalışmada RT-PCR ile yapılan testler sonrası %55,8 oranında pozitiflik bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar ülkemiz ve dünya genelinde yapılan çalışmaların bulgularıyla karşılşaştırılarak benzerlik ve farklılıkları ortaya konulmuş ve nedenleri üzerşinde tartışılmıştır. Bulgular çalışma bölgelerinin dünyanın farklı noktalarında olmasına rağmen benzerlikler içermesi CPV enfeksiyonunun dünya genelinde yaygınlığı bilgilerini desteklediği kanısına varılmıştır. Çalışmalar arasında farklılıklar olmasının köpeklerin yaşam ortamları, maternal antikor ve kolostruma bağlı koruyuculuk eksikliği ve diğer bireysel faktörlere bağlı olabileceği nedeniyle oluştuğu kanısına varılmıştır. Sonuç olarak yapılan çalışmaların virüsün varlığının ülkemizde ve dünya genelinde köpekler arasında yüksek oranda devam ettirdiğini göstermesi açısından önemli bulunmuştur.

Bu tez çalışması sırasısında yapılan çalışmalarda Canine Anti-Parvovirüs IgM ve IgG antikor seviyeleri açısından pozitif olduğu saptanmıştır. IgM antikor

seviyelerinin pozitifliğinin aktif enfeksiyonu gösterdiği ve IgG antikor seviyesiyesinin pozitifliğinin ise köpeklerde CPV enfeksiyonuna karşı bağışıklık sisteminin yanıt verdiğini göstermesi açısından önemli bulgular olarak saptanmıştır ve literatür bilgi ile benzerlikler içermesi açısından önemlidir.

Hematolojik değerlendirmede tam kan sayımı sonrasında lökosit (WBC), lenfosit (LYM), eritrosit (RBC), hemoglobin (HGB), hematokrit (HCT) ve trombosit (PLT) sayımları yapılarak sonuçlar değerlendirilmiştir. Hematolojik ve biyokimyasal parametreler tek başlarına parvoviral enfeksiyonu tanımlamak için yeterince spesifik değildir, ancak ayırıcı tanıya yardımcı olarak önemlidir ve ayrıca hastanın tedaviye yanıtını değerlendirmek ve prognozu tahmin belirleyebilmek için klinik olarak önemli bilgiler sağlayabilmektedirler. Bu nedenle bu çalışmanın amaçları arasında yer almışlardır. CPV enfeksiyonunun laboratuvar sonuçlarının klinik viroloji açısından önemli ve tanıya yardımcı belirteçleri ve belirleyicileri olarak yararlılıklarını araştırmak ve serolojik ve moleküler yçntemler ile CPV enfeksiyonu tanısı konan köpeklerde klinik, hematolojik ve biyokimyasal bulguları karakterize etmek amaçlanmıştır. Hasta köpeklerde lökopeni (%44,8), lenfopeni (%89,6), anemi (%72,4), hemoglobinemi (%68,9), düşük hematokrit (%75,8) ve trombositopeni (%86,2) saptanmıştır.

Serum C reaktif protein (CRP) değeri ölçümleri sonrası hastalığın akut fazında (başlangıcından itibaren 5 gün içinde) ölçümünün, enfeksiyonun bir bakteri veya virüs kaynaklı olup olmadığını belirlemek için değerli olduğunu kanısına varılmıştır. Literatür bilgi benzer şekilde CRP seviyelerinin hastalığın hangi gününde örneklemeye dahil edildiği ile yakın ilişkili olduğunu desteklemektedir. Bu çalışmada incelenen hasta köpeklerin enfeksiyonun ilk 5 günü içerisinde örneklemeleri yapılmıştır ve CRP değerlerinin en yüksek 6,05 g/L ve en düşük 3,27 g/L olduğu ve ortalama değerinin 4,66 g/L saptanması ile benzer sonuçlar açıklayan araştırıcıların bulguları ile örtüştüğü anlaşılmıştır.

Sonuç olarak bu çalışmada elde edilen sonuçlar CPV enfeksiyonunun tanısında hematolojik verilerin ve serum CRP değerlerinin hastalığın tanısında,

hastanın tedaviye yanıtında ve hayatta kalma oranlarının takip edilebilmesinde tek başlarına spesifik bulgu olarak değerlendirilmememsi gerektiği ve sonuçların tanı için kesinlik içermemekle birlikte hastalığın prognozunun belirlenebilmesi açısından önemli yardımcı veriler içerdikleri anlaşılmıştır. ELISA ve RT-PCR sonuçları arasında farklılık olmadığı ve CPV klinik belirtileri gösteren 2 köpeğin ELISA ile serolojik olarak negatif oldukları halde RT-PCR testi ile pozitif sonuç verdikleri saptanmıştır. CPV enfeksiyonu tanısında ELISA yönteminin kolay ulaşılabilir, güvenli, pratik ve ekonomik bir test olduğu ve RT-PCR'ın ise hızlı sonuç veren ve güvenilir bir test olduğu ve serolojik sonuçların doğrulayıcı tanısı için kullanılması gerektiği kanısına varılmıştır.

KAYNAKLAR

Akdağ, E., 2014. Canine parvoviral enteritisli köpeklerde klinoptilolitin sağaltım etkinliğinin araştırılması (Yüksek Lisans Tezi). Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aydın, Türkiye.

Alves, F.S., Alonso, F.H., Horta, R.S., Barbosa, B.C., Beier, S., Paes, P.R.O., 2020. Prognostic values of physical and hematological parameters of dogs naturally infected with parvovirus PVC-2: retrospective study of 103 cases. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., 72, n.6, p.2127-2134.

Arslan, H.H., Güzel, M., Meral, Y., Daldın, D., Gökalp, G., Özcan, Ü., 2017. A New Approach to Blood Parameters in Dogs with Hemorrhagic Enteritis. Acta Scientiae Veterinariae, 45: 1458.

Arsoy, D., 2015. Köpek Yetiştiriciliği (Ders Notları). Yakın Doğu ÜniversitesiVeteriner Hekimliği Fakültesi, Lefkoşa/ KKTC.

Awad, R.A., Attallah, A.G., Khalil, W.K.B., 2019. Mısır'da Köpek Parvovirüs Enfeksiyonunun Prevalansı: Köpeklerde Teşhisi İçin Kullanılan Bazı Moleküler Yöntemlerin Güvenilirliği. Biyolojik Bilimler Dergisi, 19: 192-200.

Baştan, İ., 2012. Parvovirüs enfeksiyonlu köpeklerde yaşama şansını etkileyen parametrelerin araştırılması (Doktora Tezi). Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye.

Binn, L.N., Lazar, E.C,. Eddy, G.A., Kajima, M., 1970. Recovery and characterization of a minute virüs of canines. İnfect immun, 1(5):503-508

Bird, L., Tappin, S., 2013. Canine parvovirüs: where are we in the 21st century?Companion Animal; 18: 142-146.

Blanco, B.H., López, F.C., 2015. Are licensed canine parvovirüs (CPV2 andCPV2b) vaccines able to elicit protection against CPV2c subtype in

puppies?: A systematic review of controlled clinical trials. Vet Microbiol, 180, 1-9.

Babalola, E.T., Ijaopo, O.K., Okonko, I.O., 2016. Evaluation of Immunity and Seropositivity of IgG Antibodies to Canine Parvoviruses in Vaccinated and Unvaccinated Dogs in Abeokuta, Nigeria. J Immunoassay Immunochem; 37(1):16-28.

Bonville, D.A., Parker, T.S., Levine, D.M., Gordon, B.R., Hydo, L.J.,Eachempati, S.R., Barie, P.S. 2004. The relationships of hypocholesterolemia to cytokine concentartions and mortality in critically III patients with systemic inflammatory response sendrome. Surgical Infections 5(1):39-48.

Buonavoglia, C., Martella, V., Pratelli, A., Tempesta, M., Cavalli, A., Buonavoglia, D., Bozzo, G., Elia, G., Decaro, N., Carmichael, L.E., 2001. Evidence for evolution of canine parvovirüs type-2 in Italy. Journal of General Virology; 82:1555–1560.

Cankurtaran, M., Kıykım, A. 2002. Sepsiste renal hemodinami ve mediyatörler. Erciyes Tıp Dergisi 24: 202-208.

Christensen, M.B., Langhorn, R., Goddard, A., Andreasen, E.B., Moldal, E., Tvarijonaviciute, A., Kirpensteijn, J., Jakobsen, S., Persson, F., Kjelgaard-Hansen, M., 2014. Comparison of serum amyloid A and C-reactive protein as diagnostic markers of systemic inflammation in dogs. Can Vet J.;55(2):161-8.

Cotmore, S.F., McKenna, M.A., Chiorini, J.A., Mukha, D.V., Pintel, D.J., Qiu, J., Venermo, M.S., Tattersall, P., Tijssen, P., Gatherer, D., Davison, A.J., 2014. The family parvoviridae. Arch Virol, 159(5), 1239-47.

Cotmore, S.F., Tattersall, P., 1987. The autonomously replicating parvovirüses of vertebrates. Adv Virüs Res, 33, 91-174.

Çabalar, M., Aksoy, G., (2017,Temmuz). Importance of zoonotic diseases in animal rescue. International Animal Rescue Conference, p. 85-86, Aksaray/Turkey.

Decaro, N., Buonavoglia, C., 2012. Canine parvovirüs a revieew of epidemiological and diagnostic aspects with emphasis on type 2c. Veterinary Microbiology, 155, 1-12

Decaro, N., Desario, C., Addie, D.D., Martella, V., Vieira, M.J., Elia, G., Zicola, A., Davis, C., Thompson, G., Thiry, E., Truyen, U., Buonavoglia, C., 2017. Moleculer epidemiology of canine parvovirüs, Europe. Emerg. Infect. Dis., 13(8), 1222-1224.

Decaro, N., Desario, C., Elia, G., Campolo, M., Lorusso, A., Mari, V., Martella, V., Buonavoglia, C., 2007. Occurrence of severe gastroenteritis in pups after canine parvovirüs vaccine administration: A clinical and laboratory diagnostic dilemma. Vaccine; 25:1161-1166.

Decaro, N., Eliaa, G., Martellaa, V., Desario, C., Compoloa, M., Tiranib, L.D., Tarsitanoa, E., Tempestaa, M., Buonavogliaa, C., 2005. A real-time PCR assay for rapid detection and quantitationof canine parvovirüs type 2 in the feces of dogs. Veterinary Microbiology 105,19–28.

Decaro, N., Desario, C., Elia, G., Martella, V., Mari, V., Lavazza, A., Nardi, M., Buonavoglia, C., 2008. Evidence for immunisation failure in vaccinated adult dogs infected with canine parvovirüs type 2c. New Microbiol, 31, 125-30.

Decaro, N., Desario, C., Parisi, A., Martella, V., Lorusso, A., Miccolupo, A., Mari, V., Colaianni, M.L., Cavalli, A., Trani, L.D., Buonavoglia, C., 2009. Genetic analysis of canine parvovirüs type 2c. Virology, 385, 5-10.

Decaro, N., Cirone, F., Desario, C., Elia, G., Lorusso, E., Colaianni, M.L., Martella, V., Buonavoglia, C., 2009a. Severe parvovirüs in a 12-yearold dog that had been repeatedly vaccinated. Veterinary Record; 164:593-595.

Denham, E., Mohn, B., Tucker, L., Lun, A., Cleave, P., Boswell, D.R., 2007. Evaluation of immunoturbidimetric specific protein methods using the Architect ci8200 comparison with immunonephelometry. Ann Clin Biochem, 44, 529-536.

Desario, C., Decaro, N., Campolo, M., Cavalli, A., Cirone, F., Elia, G., Buonavoglia, C., 2005. Canine parvovirüs infection. Which diagnostic test for virüs? J. Virol. Methods, 126(1), 179-185.

Dik, I., 2017. Canine parvovirüs enfeksiyonlarının teşhisinde PCR, Elisa ve hızlı testin karşılaştırılması, Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya, Türkiye.

Eclin Path, C-Reaktive Protein. Cornell University College of Veterinary Medicine. https://eclinpath.com/chemistry/proteins/acute-phase-proteins/c-reactive-protein/

Elbaz, E., El-Tholot, M., Elfadl, E.A.A., Mosad, S.M., 2021. Molecular investigation on the presence of canine parvovirüs in Egypt. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases 74 (2021) 101576

Elia, G., Cavalli, A., Desario, C., Lorusso, E., Lucente, M.S., Decaro, N., Martella, V., Buonavoglia, C., 2007. Detection of infectious canine parvovirüs type 2 by mRNA real-time RT-PCR. Journal of Virological Methods; 146:202-208

Ellis, J.A., 2019. Canine IgA and IgA deficiency: Implications for immunization against respiratory pathogens. Can Vet J.; 60(12): 1305–1311.

Franson, B.A., Lagerstedt, A.S., Bergstrom, A., Hagman, R., Park, J.S., Chew,B.P., Evans, M.A., Ragle, C.A. 2007. C-reactive protein, tumor necrosis factor α, and interleukin-6 in dogs with pyometra and SIRS. J Vet Emerg Crit Care 17(4): 373-381.

Frost, J.W., Klünker, G., 1984. The use of tissue culture for routine diagnosis of canine parvovirüs infection. Zbl Vet Med B; 31: 623- 626

Gargari, S., 2015. Gastroenteritis semptomlu köpeklerde canine parvovirüs tip 2'nin tespiti ve moleküler karakterizasyonu. Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Viroloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Ankara.

Geetha, M., 2015. Epidemiology, pathogenesis, clinical findings and diagnosis of canine parvo viral infection-A mini review. International Journal of Scientific Engineering and Applied Science (IJSEAS); 1(9):21-27.

Goddard, A., Leisewitz, A.L., 2010. Canine parvovirüs. Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice, 40, 1041–1053.

Goddard, A., Leisewitz, A.L., Christopher, M.M., Duncan, N.M., Becker, P.J., 2008. Prognostic usefulness of blood leukocyte changes in canine parvoviral enteritis. J Vet Intern Med., 22, 309-316.

Greene, C.E., 2012. Feline enteric viral infections. In; Greene CE., editor infectious diseases of the dog and cat. 4th ed. St Louis, MO: Elsevier Saunders; 80-91.

Hirasawa, T., Yono, K., Mikazuki, K., 1996. Detection and genomic analysis of canine parvovirüs by the polymerase chain reaction. Zentralbl Veterinarmed B.;43(9):545-54.

Hoang, M., Lin, W.H., Le, V.P. et al., 2019. Molecular epidemiology of canine parvovirüs type 2 in Vietnam from November 2016 to February 2018. Virol J 16, 52.

International Committee on Taxonomy of Virüses (ICTV), 2013. Rationalization and extension of the taxonomy of the family Parvoviridae, Erişim tarihi 29 Ocak 2017. Erişim adresi, http://www.ictvonline.org/proposals/2013.001a-aaaV.A.v4.Parvoviridae.pdf.

Järplid, B., Johansson, H., Carmichael, L.E., 1996. A fatal case of pup infection with minute virüs of canines (MVC). J Vet Diagn Invest, 8, 484-87.

Kalli, I., Leontides, L.S., Mylonakis, M.E., Adamama-Moraitou, K., Rallis, T., Koutinas, A.,2010. Factors affecting the occurrence, duration of hospitalization and final outcome in canine parvovirüs infection. Res Vet Sci., 89, 174-178.

Kang, B.K., Song, D.S., Lee, C.S., Jung, K.I., Park, S.J., Kim, E.M., Park, B.K., 2008. Prevalence and genetic characterization of canine parvovirüses in Korea. Virüs Genes; 36(1): 127-133.

Karapınar, Z., Dinçer, E., Özkan, C., 2018. The Investigation and Phylogenetic Analysis of Canine Parvovirüs 2 Infection from Blood and Rectal Swab Samples from Dogs in Van Province, Turkey, Van Vet J, 29(2) 83-86.

Kaur, G., Chandra, M., Dwivedi, P.N., Narang, D., 2015. Current approaches in the diagnosis of canine parvovirüs: An overview. Journal of Microbiology, Immunology and Biotechnology; 2: 1-4.

Kaya, E., Akata, I., Bakırcı, S., Dereli, D., Küçükgüven, E., Yılmaz, İ., 2014. İmmünokromatografik kart testlerin çalışma prensibi ve üretim teknikleri. Düzce Medical Journal; 16(3): 45-53

Kocaturk, M., Martinez, S., Eralp, O., Tvarijonaviciute, A., Ceron, J., Yilmaz, Z., 2010. Prognostic value of serum acute-phase proteins in dogs with parvoviral enteritis. Journal of Small Animal Practice;51:478–83.

Kubesy, A.A., Rakha, G.M., Salem, S.I. et al., 2019. Altered blood procalcitonin, C-reactive protein, and leucocytes count in association with canine parvovirüs (CPV) enteritis. Comp Clin Pathol 28, 1095-1099. https://doi.org/10.1007/s00580-019-02941-y

Lamm, C.G., Rezabek, G.B., 2008. Parvovirüs infection in domestic companion animals. Vet. Clin. North Am Small Anim Pract., 38(4):837-50.

Lee, H.H., Song, I.H., Frgedrgch, M., Gaulgard, A., Detert, J., Röwert, J., Audrgng, H., Kary, S., Burmeste, G.R., Sterry, W., Worm, M., 2007. Cutaneous side-effects in patients with rheumatic diseases during

application of tumour necrosis factor-α antagonists British Journal of Dermatology. 15(3): 486–491.

Litster, A.L., Pressler, B., Volpe, A., Dubovi, E., 2012. Accuracy of a Point-of-care ELISA Test Kit for Predicting the Presence of Protective Canine Parvovirüs and Canine Distemper Virüs Antibody Concentrations in Dogs. Vet J.; 193(2):363-6.

Lobetti, R., (Ekim, 2003). Canine Parvo Virüs and Distemper. 28th World Congress Of The World Small Animal Veterinary Association World Congress Proceedings. Bangkok/Thailand.

MacLachlan, N.J., Dubovi, E.J., 2017. Parvoviridae, In. Fenner's Veterinary Virology, Fifth Edition, Academic Press, Elsevier Inc., USA.: 225-237

Macintire, D.K., Smith-Carr, S.,1997. Canine parvovirüs. PartII. Clinical signs, diagnosis, and treatment. Compend Contin Educ Pract Vet 1997; 19(3):291-302.

Markovich, J.E., Stucker, K.M., Carr, A.H., Harbison, C.E., Scarlett, J.M., Parrish, C.R., 2012. Effects of canine parvovirüs strain variations on diagnostic test results and clinical management of enteritis in dogs. J Am Vet Med Assoc; 241: 66-72.

McClure, V., Van Schoor, M., Thompson, P.N., Kjelgaard-Hansen, M., Goddard, A., 2013. Evaluation of the use of serum C-reactive protein concentration to predict outcome in puppies infected with canine parvovirüs. J Am Vet Med Assoc, 1;243(3):361-6.

Mech, L.D., Kurtz, H.J., Goyal, S., 1997. Death of a wild wolf from canine parvoviral enteritis. J Wildl Dis; 33(2): 321-322.

Meunier, P.C., Cooper, B.J., Appel, M.J.G., Slauson, D.O., 1985. Pathogenesis of canine parvovirüs enteritis: the ımportance of viremia. Vet Pathol, 22, 60-71.

Miranda, C., Parrish, C.R., Thompson, G., 2014. Canine parvovirüs 2c infection in a cat with severe clinical disease. J Vet Diagn Invest; 26(3):462-464.

Miranda, C., Thompson, G., 2016. Canine parvovirüs: the worldwide occurrence of antigenic variants. Journal of General Virology, 97, 2043-57.

Mochizuki, M., Horiuchi, M., Hiragi, H., San Gabriel, M.C., Yasuda, N., Uno, T., 1996. Isolation of canine parvovirüs from a cat manifesting clinical signs of feline panleukopenia. J Clin Microbiol; 34(9): 2101-2105.

Mokhtari, A., Farmani, N., Rajabi, M., 2018. Detection of Canine Parvovirüs by PCR and its association with some of risk factors. Revista MVZ Córdoba, 23(2), 6607- 6616.

Nandi, S., Chidri S., Kumar M., Chauhan R.S., 2010. Occurrence of canine parvovirüs type 2c in the dogs with haemorrhagic enteritis in India, Research in Veterinary Science 88:169–171

Nandi, S., Kumar, M., 2010. Canine parvovirüs: Current perspective. Indian J Virol; 21(1): 31-44.

Nemzek, J.A., Agrodnia, M.D., Hauptman, J.G., 2007. Breed-specific pro-inflamamtory cytokine production asa predisposing factor for susceptibility to sepsis in the dog. J Vet Emerg Crit Care 17(4):368-372.

Otto, C.M., Drobatz, K., Soter, C., 1997. Endotoxemia and tumor necrosis factor activity in dogs with naturally occuring parvoviral enteritis. J Vet Intern Med. 11: 65–70

Otto, C.M., Reiser, T.M., Brooks, M.B., Russell, M.W. 2000. Evidence of hypercoagulability in dogs with parvoviral enteritis. JAVMA 217(10): 1500-1504.

Öcal, N., 1999. Total parenteral beslenmenin parvoviral hemorajik gastroenteritisli köpeklerin sağıltımına etkisi. Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Ankara.

Panda, D., Patra, R.C., Nandi, S and Swarup, D., 2009. Oxidative stres indices in gastroenteritis in dogs with canine parvoviral infection. Research in Veterinary Science, 86:36-42.

Parrish, C.R., O'Connel, P.H., Evermann, J.F., Carmichael, L.E., 1985. Natural variation of canine parvovirüs. Science 230, 1046–1048.

Parrish, C.R., 1999. Host range relationships and the evolution of canine parvovirüs. Vet Microbiol, 69, 29-40.

Pérez, R., Francia, L., Romero, V., Maya, L., Lopez, I., Hernandez, M., 2007. First detection of canine parvovirüs type 2c in South America. Veterinary Microbiology; 124: 147-152.

Piñeiro, M., Pato, R., Soler, L., Peña, R., García, N., Torrente, C., Saco, Y., Lampreave, F., Bassols, A., Canalias, F., 2018. A new automated turbidimetric immunoassay for the measurement of canine C-reactive protein. Vet Clin Pathol.; 47(1), 130-137.

Pollock, R.V., 1982 Experimental canine parvovirüs infection in dogs. Cornell University College of Veterinary Medicine;72:103–119.

Pollock, R.V.H., Coyne, M.J., 1993. Canine parvovirüs. Vet Clin North Am Small Anim Pract, 23(3), 555-68.

Prittie, J., 2004. Canine parvoviral enteritis: A review of diagnosis, management, and prevention. J Vet Emerg Crit Care; 14(3): 167-176.

Qi, S., Zhao, J., Guo, D., Sun, D., 2020. A Mini-Review on the Epidemiology of Canine Parvovirüs in China. Front Vet Sci. 20;7:5.

Rıce, J.B., Wınters, K.A., Krakowka, S., Olsen, R.G., 1982. Comparison of systemic and local immunity in dogs with canine parvovirüs gastroenteritis. Infection and Immunity; 38(3):1003-1009.

Rimmelzwaan, G.F., Juntti, N., Klingeborn, B., Groen, J., UytdeHaage, F.G.C.M., Osterhaus, A.D.M.E., 1990. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay based on monoclonal antibodies for the serology and antigen detection in canine parvovirüs infections. Vet Quartery; 12(1): 14-20.

Sasaki, K., Fujita, I., Hamasaki, Y., Miyazaki, S., 2002. Differentiating between bacterial and viral infection by measuring both C-reactive protein and 2'-5'-oligoadenylate synthetase as inflammatory markers. J Infect Chemoth;. 8(1):76-80.

Şahna, K.C., Gencay, A., Atalay, O., 2008.Viral aetiology of diarrhoea in puppies from a same shelter in Turkey: presence of mixed infections. Revue Méd Vét, 159(6), 345-47.

Schoeman, J.P., Goddard, A., Leisewitz, A.L., 2013. Biomarkers in canine parvovirüs enteritis. N Z Vet J, 61(4), 217-22.

Sevindik, E., Abacı, Z.T., 2013. Nested PCR ve kullanım alanları. Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi, 6(2), 22-26.

Shackelton, L.A., Parrish, C.R., Truyen, U., Holmes, E.C., 2005. High rate of viral evolution associated with the emergence of carnivore parvovirüs. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America;11:379-384.

Stander, N., Wagner, W.M., Goddard, A., Kirberger, R.M., 2010. Ultrasonographic appearance of canine parvoviral enteritis in puppies. Veterinary Radiology & Ultrasound;51:69-74.

Steinel, A., Parrish, C.R., Bloom, M.E., Truyen, U., 2001. Parvovirüs infections in wild carnivores. J Wildl Dis; 37(3): 594-607

Timurkan M.Ö., Oğuzoğlu T.Ç., 2015. Molecular characterization of canine parvovirüs (CPV) infection in dogs in Turkey, Veterinaria Italiana, 51(1), 39-44.

Tion, M.T., 2018. Hematological Parameters of Dogs Infected With Canine Parvovirus Enteritis in Sumy Ukraine. World Journal of Innovative Research (WJIR) ISSN: 2454-8236, Volume-5, Issue-3, Pages 01-05

Truyen, U., 1999. Emergence and recent evolution of canine parvovirüs. Veterinary Microbiology;69:49-50.

Turgut, K., 2000. Veteriner Klinik Laboratuvar Teşhis. 2. Baskı. Bahçıvanlar Basımevi, ISBN: 975-94595-1-5. SS: 140-141.

Truyen, U., 2006. Evolution of canine parvovirüs-a need for new vaccines? Vet Microbiol; 117: 9-13.

Turgut, K., Ok, M., 2001. Kanin parvoviral enteritis. "Kedi ve Köpek Gastroenterolojisi, semptomdan teşhisi." Bahçivanlar Basım Sanayi A.Ş. Konya.

Ukwueze, C.S., Anene, B.M., Ezeokonkwo, R.C., and Nwosuh, C.I., 2018. Prevalence of canine parvovirüs infection in South Eastern region, Nigeria. Bangl. J. Vet. Med. 16 (2): 153–161.

UWE, T., 2006. Evolution of canine parvovirüs-A need for new vaccines. Veterinary Microbiology; 117: 9-13.

Veijalainen, P.M., Neuvonen, E., Niskanen, A., Juokslahti, T., 1986. Latex agglutination test for detecting feline panleukopenia virüs, canine parvovirüs, and parvovirüses of fur animals. J Clin Microbiol; 23(3): 556-559.

Viralzone Parvoviridae. URL; https://viralzone.expasy.org/103?outline=all_by_species; Erişim tarihi: 17 Şubat, 2019.

Waner, T., Kornblatt, E.K., Shemesh, O., Mazar, S., 2004. Diagnosis of Acute Canine Parvovirüs Infection (CPV-2) in Naturally Infected Dogs Using Serum IgM and IgG Rapid Dot Elisa. Israel Journal of Medicine Vol. 59 (1-2).

Yeşilbag, K., Yilmaz, Z., Özkul, A., Pratelli, A., 2007. Aetiological role of virüses in puppies with diarrhoea. Vet Rec, 161, 169-70.

Yılmaz, Z., Pratelli, A., Torun, S., 2005. Distribution of antigen types of canine parvovirüs type 2 in dogs with hemorrhagic enteritis in Turkey. Turk J Vet Anim Sci, 29, 1073-76.

Zhou, P., Zeng, W., Zhang, X., Li, S., 2017. The genetic evolution of canine parvovirüs–A new perspective. PloS one; 12(3): e0175035

ÖZGEÇMİŞ

2009 yılında Çukurova Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesinden mezun oldu. Mesleğini yaptıktan sonra 2018 yılında Eskişehir Anadolu Üniversitesi/Açık Öğretim Fakültesi Laborant ve Veteriner Sağlık önlisans programından mezun oldu. Aynı yıl girdiği dikey geçiş sınavı ile Çukurova Üniversitesi Ceyhan Veteriner Fakültesinde lisans eğitimine başladı. 2019 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine de başladı.

Halen Çukurova Üniversitesi Ceyhan Veteriner Fakültesin'de lisans eğitimine devam etmektedir.