

Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi

<http://e-dergi.atauni.edu.tr/index.php/VBD>



Koyun-Keçi Çiçeği Hastalığının Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Tanısında Farklı Klinik Örneklerin Kullanımı*

İbrahim SÖZDUTMAZ¹, Hakan BULUT²

1. Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, ERZURUM
2. Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı, ELAZIĞ

ÖZET: Koyun-keçi çiçeği hastalığının hızlı ve kesin tanısı, hastalığın kontrolünde oldukça önemlidir. Bu çalışmada, farklı klinik örneklerden koyun-keçi çiçeği virüsünün teşhisinde polimeraz zincir reaksiyonunun (PZR) etkinliğinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, Erzurum ve çevre illerde klinik olarak koyun-keçi çiçeği hastalığı bildirim yapılmış 11 mihraktaki 53 hayvandan 168 adet materyal temin edildi. PZR sonuçlarına göre; deri örneklerinin % 96,2 (51/53)'sinde, nazal ve oral sıvı örneklerinin % 76,9 (40/52)'unda, akciğer örneklerinin % 90,4 (19/21)'ünde, karaciğer örneklerinin % 42,8 (9/21)'inde ve lenf yumrusu örneklerinin % 61,9 (13/21)'unda pozitiflik tespit edildi. Sonuç olarak, koyun-keçi çiçeği virüsünün PZR ile tanısında deri ve akciğer örneklerinin kullanımının uygun olduğu görülmüştür.

Anahtar kelimeler: Koyun-keçi çiçeği hastalığı, PZR, Teşhis.

Use of Different Clinical Samples in Detection with Polymerase Chain Reaction of Sheep-Goatpox Disease

ABSTRACT: Rapid and accurate diagnosis of sheep-goatpox disease is very important for controlling the disease. The aim of this study was to evaluate the use of polymerase chain reaction (PCR) in detection of sheep-goatpox virus from different clinical samples. For this purpose, 168 clinical specimens of 53 animals from 11 outbreaks in Erzurum and its surroundings were collected. According to the PCR results, sheep-goatpox virus DNA was detected from 96.2 % (51/53), 76.9 % (40/52), 90.4 % (19/21), 42.8 % (9/21) and 61.9 % (13/21) of cutaneous, nasal and oral samples, lung, liver and lymph nodules, respectively. As a result, it is concluded that the use of cutaneous and lung samples is suitable for diagnosis of sheep-goatpox virus with PCR.

Key words: Sheep-goatpox disease, PCR, Diagnosis.

✍ Sorumlu yazar / Corresponding author;

☎ 0 5058055274

✉ ibrahimsozdutmaz@hotmail.com

**Bu çalışma, "Kuzeydoğu Anadolu Bölgesinde Ortaya Çıkan Koyun ve Keçi Çiçeği Olgularının Serolojik, Virolojik ve Epizootiyolojik Yöneden İncelenmesi" başlıklı doktora tezinin verilerinin bir bölümünden derlenmiş olup, Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Projeleri Yönetim Birimi tarafından FÜBAP-1531 ve Tarım ve Köyşeri Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü tarafından TAGEM-HS/09/06/02/147 numaralı projeler ile desteklenmiştir*

GİRİŞ

Koyun-keçi çiçeği hastalığının tarihsel geçmişinin insan çiçek hastalığı kadar eski olduğu bildirilmektedir. (Hutyra ve ark., 1946; Bhanuprakash ve ark., 2005). Koyun ve keçi yetiştiriciliğinin yapıldığı dünyanın her bölgesinde hastalığın varlığı bildirilmiştir. Günümüzde, hastalık Avrupa ülkelerinde eradike edilmiş olmasına rağmen, ülkemiz dahil pek çok Asya ve Afrika ülkelerinde varlığını sürdürmektedir (Yashpal ve ark., 1997; Diallo ve ark., 2002; Mondal ve ark., 2004, Yazıcı ve ark., 2007; Yeruham ve ark., 2007; Roy ve ark., 2008, Özmen ve ark., 2009).

Koyun-keçi çiçeği hastalığı Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü (OIE) kriterlerine göre mücadele edilmesi öncelikli hastalıklardan birisidir. OIE, hastalığın görüldüğü ülkelere canlı hayvan, et ve et ürünleri ile diğer hayvansal ürünlerin ihracatı noktasında önemli kısıtlamalar getirmektedir. Bu nedenle, hastalığın ekonomik kayıpları sadece hasta hayvanlarda yaptıkları kayıplarla sınırlı olmayıp, hastalığın görüldüğü ülkenin ihracatına da etki etmektedir (OIE, 2008).

Koyun-keçi çiçeği hastalığı, Türkiye’de Hayvan Sağlığı Zabıtası Yönetmeliğine göre İhbarı Mecburi Hayvan Hastalıkları kapsamında yer almaktadır (Anonim, 2009). Koyun-keçi çiçeği hastalığının endemik olarak görüldüğü Türkiye’de hastalık bildirişi genellikle klinik belirtilerine dayanılarak yapılmaktadır. Bu bildirimlerin sadece çok az bir kısmının ulusal referans enstitüleri tarafından laboratuvar doğrulaması yapılmaktadır. Hastalığın klinik tanısı büyük oranda spesifik olup kesin tanı için laboratuvar teşhis şarttır.

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), koyun-keçi çiçeği dahil, pek çok hastalığın tanısında son yıllarda sıklıkla kullanılan, kısa sürede sonuç veren, duyarlı ve özgül bir teşhis metodudur (Heine ve ark., 1999; Mangana-Vougiouka ve ark., 1999; Balinsky ve ark., 2009). Bu çalışma, farklı klinik örneklerde koyun-keçi

çiçeği hastalığının tanısı için kullanılan PZR metodunun duyarlılığını belirlemek amacıyla yapılmıştır.

MATERYAL ve METOT

Hücre Kültürü

Virüs izolasyon çalışmalarında Madin Darby Bovine Kidney (MDBK) devamlı hücre kültürü kullanıldı. Hücrelerin üretilmesi Penicilin-Streptomycin-Amphotericin B solüsyonu içeren Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium (DMEM; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Almanya) vasatı içinde gerçekleştirildi. Virüs izolasyonu ve hücrelerin üretilmesi aşamalarında kullanılmak üzere ticari fetal dana serumu (FDS; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Almanya) temin edildi.

Virüs ve Örnekler

Hücre kültürü ve PZR aşamalarında kontrol virüsü olarak koyun çiçeği attenüe aşı suşu (Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü) kullanıldı. Çalışmada Erzurum Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü’ne bağlı 5 ilde (Erzurum, Ağrı, Iğdır, Erzincan, Kars) ortaya çıkan koyun-keçi çiçeği hastalığından şüpheli 11 hastalık mihrakından örneklem yapıldı. Ayrıca, bu mihraklardan enstitüye gelen ölü hayvanlara ait örnekler de kullanıldı (Tablo 1). Çiçek lezyonları gözlenen hayvanlardan deri ve kuyruk altı, ağız ve dil üzerinde bulunan veziküllerden ve deri kazıntılarında aseptik şartlar altında örneklemeler yapıldı. Hastalık gözlenen sürülerde ölmüş hayvanlardan deri, akciğer, karaciğer ve lenf yumrusu örnekleri alındı. Bu örnekler, 1/10 oranında antibiyotik (%1’lik 10 000 IU [International Unite] penisilin/ml, 10 mg streptomisin/ml ve 0,025 mg/ml Amphotericin B) içeren DMEM vasatının bulunduğu steril tüpler içine toplanarak soğuk zincirde laboratuvara getirildi. Örnekler homojenizasyon aşamasına kadar bekletilmek üzere -80 °C derin dondurucuda saklandı.

Tablo 1. Çalışmada kullanılan örnekler için bilgiler.**Table 1.** The information of the samples used in the study.

Mihrak No	Mihrak Adı	Örneklenen Hayvan Sayısı	Materyal Sayısı	Örnekleme Zamanı
1	Ağrı/Doğubayazıt	5 kuzu	16	Şubat 2007
2	İğdir/Aralık	4 kuzu	11	Mart 2007
3	Erzurum/Aşkale	2 kuzu	7	Mart 2007
4	Erzurum/Hınıs	5 kuzu	13	Mart 2007
5	Erzurum/Merkez	7 kuzu	23	Nisan 2007
6	Erzurum/Tekman	4 kuzu	14	Nisan 2007
7	Erzurum/İllica	5 kuzu	19	Nisan 2007
8	Erzincan/Tercan	2 kuzu	6	Nisan 2007
9	Ağrı/Diyadin	2 kuzu	7	Mayıs 2007
10	Kars/Digor	2 kuzu	7	Mayıs 2008
11	Erzurum/Çat	15 keçi/oğlak	45	Şubat 2008
TOPLAM		53	168	2007- 2008

Doku ve Sıvı Örneklerinin Hazırlanması

Koyun-keçi çiçeği hastalığı şüpheli 11 hastalık mihrakından 38 koyun/kuzu'ya ait 38 deri, 16 akciğer, 16 karaciğer, 16 lenf yumrusu ve 37 sıvı olmak üzere toplam 123 örnek ile 15 keçi/oğlağa ait 15 deri, 5 akciğer 5 karaciğer, 5 lenf yumrusu ve 15 sıvı örneği olmak üzere toplam 45 örnek, doku parçalayıcısında homojenize edildi. Daha sonra, bu örnekler +4°C 3000 devirde 10 dakika (dk.) santrifüj edildi ve 0,45 mikrometre (μ m) çaplı enjektör filtreden geçirildi. Her örnek 2 ml'lik 5 adet saklama tüpüne aktarıldı. Bu örnekler PZR ve hücre kültürüne ekim aşamalarına kadar -80 °C derin dondurucuda muhafaza edildi.

PZR

Viral DNA ekstraksiyonu için daha önceden hazırlanan örnek homojenatlarının her birinden 100 mikrolitre (μ l) alındı. Üzerine 1% sodyum dodesil sülfat (SDS), 20 mM β -mercaptoethanol, 20 mM EDTA ve 20 mg Proteinase-K (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Almanya) içeren denaturasyon solüsyonundan 100 μ l ilave edildi. Örnekler 56 °C'de iki saat inkübasyona bırakıldı. Proteinase-K sindirimini takip eden aşamalar klasik fenol-kloroform metoduna göre gerçekleştirildi (Sambrook ve ark., 1989). Pelet DNA üzerine 50 μ l Diethyl

pyrocarbonate'lı (DEPC; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Almanya) distile su ilave edilerek sulandırıldı. PZR ürününün çoğaltılması için 3 μ l örnek DNA'sı, 1 Unit (U) *Taq* DNA polimeraz enzimi (Fermentas UAB, Vilnius, Litvanya), 10 milimolar (mM) deoxyribonucleotide (dNTP) karışımı (Fermentas UAB, Vilnius, Litvanya), 50 mM MgCl₂ (Fermentas UAB, Vilnius, Litvanya), 10x PZR Buffer (Fermentas UAB, Vilnius, Litvanya) ve her birinden 10 pM primerler kullanılarak (Primer Ins-1.1; aga aac gag gtc tcg aag ca ve Primer Ins-1.1'; gga ggt tgc tgg aaa tgt tg) 100 μ l PZR karışımı hazırlandı (Mangana-Vougiouka ve ark., 2000).

PZR ürünlerinin amplifikasyonları ısı döngü cihazı (Thermo Hybaid Px2 Thermal Cyler; Thermohyaid US, Franklin, MA, ABD) kullanılarak 95 °C'de 5 dk. 1 döngü, takiben 95 °C'de 1 dk., 55 °C'de 1 dk., 72 °C'de 1 dk. 35 döngü ve 72 °C'de 10 dk 1 döngü olarak gerçekleştirildi (Mangana-Vougiouka ve ark., 2000).

PZR'ın tüm aşamalarında pozitif kontrol olarak Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü'nden temin edilen aşı suşu, negatif kontrol olarak da distile su kullanıldı.

Klinik örneklerde çalışmaya geçmeden önce titresi belirlenen (Doku kültürü infeksiyöz doz₅₀; 10^{5.75}/0,1ml) kontrol virüsle PZR tesbit limiti belirlendi. Bu amaçla virüs stoğunun önce 1/10 ve daha sonra 1/2 oranında sulandırmalarında PZR işlemi gerçekleştirildi.

PZR ürünlerinin görüntülenmesi 0.5 μ g/ml etidyum bromid içeren % 1'lik agaroz jelin elektroforeziyle gerçekleştirildi.

Doku Örneklerinde Virüs İzolasyonu

PZR sonuçları ile mihraklardaki olguların çiçek olduğu doğrulandıktan sonra, her bir mihrak için birer hayvanın PZR pozitif çıkan doku homojenatlarının karışımından hücre kültürüne ekim yapıldı. Bu amaçla 25 cm²'lik hücre kültürü kaplarına ekilen ve % 90 tek tabaka olmuş MDBK hücreleri kullanıldı. Hücrelere 0,5 ml izolasyon materyali inokule edildi. Hücre kültür kabı

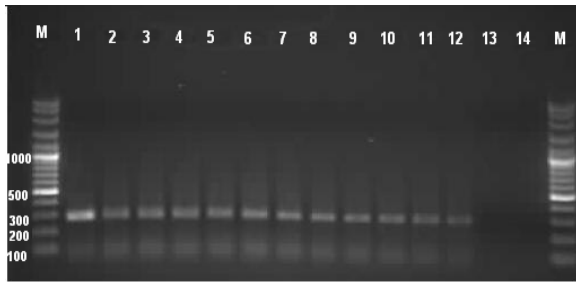
37 °C'de 1 saat adsorbsiyona bırakıldı. Adsorbsiyon süresi sonunda hücreler serumsuz DMEM vasatı ile yıkandı ve %1'lik FDS içeren idame vasatından kaplara 5 ml ilave edilerek, hücreler 37°C'de inkubasyona bırakıldı. Yedi gün süre ile doku kültürü mikroskobunda hücrelerde meydana gelen değişiklikler günlük olarak kontrol edildi. Hücrelerin vasatları 2 günde bir taze vasatlarla değiştirdi. Sitopatik etkiler kontrol virüs ekimi yapılan hücre kültür kapları ile kıyaslanarak gerçekleştirildi. Üst sıvılarda koyun-keçi çiçeği virüsü varlığını PZR ile göstermek ve stok virüs kaynağı oluşturmak için, üst sıvılar küçük porsiyonlar halinde saklama tüplerine bölündü ve -80°C'ye kaldırıldı.

İstatistiksel Analizler

Bu çalışmada PZR pozitifliğinin örnekler göre istatistiksel analizinde ki-kare testi (Fisher's Exact Test) kullanıldı (Akgül, 1997).

BULGULAR

Klinik örneklerin test edildiği PZR aşamasından önce kontrol virüsün dilüsyonları ile gerçekleştirilen DNA ekstraksiyonu ve amplifikasyon neticesinde PZR'nin tespit limiti yaklaşık 50 virion olarak tespit edildi (Şekil 1).



Şekil 1. PZR'nin tespit limitinin belirlenmesine ait jel görüntüsü. M:Marker, 1: DKİD₅₀; 10^{5.75}/0,1 ml, 2: DKİD₅₀; 10^{4.75}/0,1 ml, 3-13: DKİD₅₀; 10^{3.75}/0,1 ml ve 1/2 oranında dilüsyonları, 14: Negatif kontrol (dH₂O).

Figure 1. Gel image of PCR detection limit determination. M: Ladder, 1: TCID₅₀; 10^{5.75}/0,1 ml, 2: TCID₅₀; 10^{4.75}/0,1 ml 3-13: Dilution between TCID₅₀; 10^{3.75}/0,1 ml and 1/2, 14: Negative control (dH₂O).

Polimeraz Zincir Reaksiyonunun tespit limitinin belirlenmesi ve testin standardize edilmesini takiben koyun-keçi çiçeği hastalığı yönünden şüpheli canlı ve ölü toplam 53 hayvandan alınan farklı organ ve dokulara ait toplam 168 örnek PZR ile incelendi. PZR sonuçlarına göre canlı ve ölü hayvanlardan temin edilen deri örneklerinin % 96,2 (51/53)'sinde nazal ve oral sıvap örneklerinin % 76,9 (40/52)'unda, ölü hayvanların akciğer örneklerinin % 90,4 (19/21)'ünde, karaciğer örneklerinin % 42,8 (9/21)'inde ve lenf yumrusu örneklerinin % 61,9 (13/21)'unda pozitiflik tespit edildi. İncelenen toplam 168 örnekten 132 (%78,5)'sinin koyun-keçi çiçeği yönünden pozitifliği belirlendi. Toplanan örneklerin PZR testi sonuçları tablo 2'de gösterildi.

Tablo 2. Örnekler göre PZR pozitiflik sayıları ve yüzdeleri.

Table 2. Numbers and percentages of PCR positive samples.

Örnek türü	Örnek sayısı (n)	Pozitif (n)	Pozitif (%)
Deri	53	51	% 96,2
Akciğer	21	19	% 90,4
Karaciğer	21	9	% 42,8
Lenf yumruları	21	13	% 61,9
Oral ve nazal sıvap	52	40	% 76,9
TOPLAM	168	132	% 78,5

Şüpheli tüm hayvanların çalışılan en az bir örneğinde PZR pozitiflik tespit edildi (Şekil 2). Bu nedenle klinik bulgular, en az bir örnekte pozitifliğin olması ve tüm hayvanlarda izolasyonun yapılmasına bağlı olarak çalışmada konu edilen tüm olguların koyun-keçi çiçeği hastalığı sonucuna varıldı. Örnekler göre PZR pozitifliğinin istatistiksel açıdan karşılaştırılması sonucunda PZR pozitifliği ile deri ve akciğer örnekleri arasında önemli bir ilişki bulundu (P<0.05). Her mihrak için hücre kültürüne yapılan inokulasyonlar neticesinde elde edilen hücre süpernatantlarında da koyun-keçi çiçeği DNA'sının varlığı belirlendi.



Şekil 2. Her mihrak için PZR ürünlerinin jel görüntüsü. M:Marker, 1-11: Mihrak listesindeki sıralamaya göre örnekler, 12: Pozitif kontrol, 13:Negatif kontrol.

Figure 2. Gel image of PCR products for each outbreak, M:Ladder, 1-11: Samples in order to outbreak list, 12: Positive control, 13:Negative control.

TARTIŞMA

Koyun-keçi çiçeği hastalığının klinik formu belirgin olmakla birlikte, özellikle aşılama yapıldığı ülkelerde, aşılanmış olup kısmi koruyucu titrede antikora sahip hayvanlarda, hastalığın spesifik belirtileri görülmeyebilir. Klinik belirtilerin bazen ektima, mavidil, küçük ruminant vebası, fotosensitazyon, dermatofiloz, böcek sokmaları, paraziter pnömöni, kazeöz lenfadenitis ve bazen uyuz gibi enfeksiyöz veya metabolik hastalıklarla karışabilmesi sözkonusudur. Bu nedenle, klinik belirtilere bakılarak hastalıktan şüphe edilse de kesin teşhis için hastalığın laboratuvar tanısı gerekmektedir. Ayrıca, hastalığın birçok ülkede bildirim zorunlu hastalık olması nedeniyle de karantina uygulamasının sonlandırılabilmesi için bu hastalığın laboratuvar tanısı zorunlu olmaktadır (Heine ve ark., 1999; Mangana-Vougiouka ve ark., 1999; OIE 2008).

Klinik örneklerde elektron mikroskopla virüsün belirlenmesi uzun yıllar kullanılmış olmakla birlikte, bu yaklaşımın duyarlılığı oldukça düşüktür. Ayrıca elektron mikroskopik bakıda *Poxviridae* ailesi

içerisindeki türler morfolojik olarak ayırt edilememektedir. Diğer bir önemli kısıtlayıcı neden de elektron mikroskopinin pahalı olması nedeniyle birçok laboratuvar olmamasıdır (Kitching ve Smale, 1986; Munz ve Owen, 1966).

Koyun-keçi çiçeği olgularında özellikle izole edilen virüsün doğrulanmasında agar gel immunodiffüzyon (AGID) testi homolog ve heterolog serumlar kullanılarak yapılabilmektedir. Çalışma prensibi AGID ile aynı olan ve serumların test edilmesinde kullanılan counter immunoelectrophoresis (CIEP) testinin duyarlılığı AGID testinden daha yüksektir. Virüs nötralizasyon testi (VNT) diğer birçok virüslerin teşhisi için oldukça spesifik olmasına rağmen, mevcut olan antikorlarla virüsün kısmen kapatılması ve virüsün bağlanmada çok fazla sayıda yüzey antijenini kullanabilmesi nedeniyle, çiçek virüslerini belirlemede duyarlılığı düşüktür (Martin ve ark., 1975, Rao ve ark., 1997; OIE 2008). Serolojik testlerde karşılaşılan yanlış pozitiflik ve negatiflik sonuçları nedeniyle, bu hastalıkların tanısında, günümüzde pek çok araştırmacı tarafından, viral nükleik asidin tespitini amaçlayan PZR ve PZR'nin modifikasyonu olan diğer genom amplifikasyon temelli testler sıklıkla kullanılmaktadır (Ireland ve Binopal 1998; Heine ve ark., 1999; Mangana-Vougiouka ve ark., 1999; Bhanuprakash ve ark., 2005; Balinsky ve ark., 2009; Cheng ve ark., 2009; Balamurugan ve ark., 2009). Mangana-Vougiouka ve ark. (1999) Koyun çiçeği teşhisinde 40 şüpheli örnekten hücre kültürü ve PZR ile tamamını, direkt floresan testi (DIFA) ile 29'unu ve agar jel immunopresipitasyon testi (AGIPT) ile 16'sunun pozitif olarak bulunabildiğini ortaya koyarak, PZR'nin duyarlılığını %100, DIFA'nın %73 ve AGIPT'nin ise %40 olarak belirtmişlerdir. Oğuzoğlu ve ark., (2006) virüs izolasyonu, elektron mikroskopi ve PZR yöntemiyle yaptıkları çalışmada PZR metodunu kısa sürede sonuç veren ve duyarlı bir metod olarak önermektedirler. Bu çalışmada PZR'nin her hangi bir test ile kıyaslanması amaçlanmamıştır. Ancak, çalışılan örneklerin en az birinde PZR pozitifliği

olması dikkate alınarak, PZR'ın bu hastalığı teşhisi veya doğrulanmasında etkin bir yöntem olduğu kanaatini paylaşmaktayız.

Viral teşhisin başarısı, teşhiste kullanılan metodun seçimi kadar doğru örneğin kullanılması ile de ilişkilidir. Hastalıkta teşhis amacıyla hedef organ veya dokuların seçiminde virüsün patogenezi dikkate alınmalıdır. Bowden ve ark. (2007) deneysel olarak enfekte edilmiş koyun ve keçilerde Capripoxvirus enfeksiyonunun doku tropizmini kantitatif Real-Time PZR tekniği ortaya koydukları çalışmalarında en yüksek virüs saçılımının inokulasyondan sonraki 10. ve 14. günler arasında nazal, konjunktival ve oral sekresyonlarla olduğunu belirlemişlerdir. İnokulasyondan sonraki günlerde virüs konsantrasyonunu en yüksek olarak inokulasyon bölgesinde, ikinci olarak deri lezyonlarında, daha az olarak akciğerlerde gözlemişlerdir. Gülbahar ve ark. (2006), doğal enfekte kuzuların dokularında immunohistokimyasal boyama yöntemi ile deri ve akciğer örneklerinin tamamında 6/6, burun

mukozasında 2/6, mediastinal lenf yumrularında 2/6'sında virüs varlığını gösterirken incedikleri karaciğer örneklerinde tespit edememişlerdir. Bu çalışmada PZR çalışmasında en yüksek pozitiflik % 96,2 ile deri ve en düşük pozitiflik ise % 42,8 ile karaciğer örneklerinde ortaya konuldu. Nazal ve oral sıvap örneklerinin % 76,9'unda, akciğer örneklerinin % 90,4'ünde ve lenf yumrusu örneklerinin % 61,9'unda pozitiflik tespit edildi. Tüm doku ve organların toplamında ise % 78,5 oranında koyun-keçi çiçeği yönünden PZR pozitiflik tespit edildi.

Sonuç olarak, çalışmanın verileri dikkate alınarak koyun-keçi hastalığının hızlı tanısında PZR ile birlikte canlı hayvanda öncelikle deri, daha sonra nazal sıvap örneklerinin, ölü hayvanlarda ise deri ve akciğer örneklerinin tercih edilmesini önermekteyiz. Ancak, çalışmanın verileri her zaman tek bir örnekte çalışmanın sakıncalarını da ortaya koymaktadır. Bu bakımdan teşhis amacıyla en az iki farklı örneğin çalışılmasının metodun duyarlılığını artırmada önemli olduğunu düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

- Akgül A., 1997. Chi-square (χ^2) testi. In "Tıbbi Araştırmalarda İstatistiksel Analiz Teknikleri 1. Baskı", Ed. Akgül A., YÖK Matbaası, Ankara.
- Anonim, 2009. Hayvan Sağlığı Zabıtası Yönetmeliği. <http://www.kkgm.gov.tr/yonetmelik/3285y.htm> l.[Erişim: 30.07.2009].
- Balamurugan V., Jayappa KD., Hosmani M., Bhanuprakash V., Venkatesan G., Kumar RK., 2009. Comparative efficacy of conventional and Taqman polymerase chain reaction assays in the detection of capripoxviruses from clinical samples. J. Vet. Diagn. Invest., 21, 225-231.
- Balinsky CA., Delhon G., Smoliga G., Prarat M., French RA., Geary SJ., Rock DL., Rodriguez LL., 2008. Rapid and preclinical detection of sheeppox virus by a real-time PCR assay. J. Clin. Microbiol., 46, 438-442.
- Bhanuprakash V., Indrani BK., Hosamani M., Singh RK., 2005. The current status of sheep pox disease. Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis., 29, 27-60.
- Bowden TR., Babiuk SL., Parkyn GR., Copps JS., Boyle DB., 2007. Capripoxvirus tissue tropism and shedding: A quantitative study in experimentally infected sheep and goats. Virology., 37, 380-393.
- Cheng Z., Yue J., Li Y., Xu L., Wang K., Zhou B., Chen J., Li J., Jiang N., 2009. Development and application of TaqMan-MGB real-time quantitative PCR assay for detection of goat pox virus Chinese J. Biotech., 25, 464-72.
- Diallo A., Minet C., Berhe G., Le Goff C., Black DN., Fleming M., 2002. Goat immune response to capripox vaccine expressing the hemagglutinin protein of peste des petits ruminants. Ann. NY. Acad. Sci., 969, 88-91.

- Gülbahar MY., Davis WC., Yüksel H, Çabalar M., 2006. Immunohistochemical evaluation of Inflammatory infiltrate in the skin and lung of lambs naturally infected with sheeppox virus. *Vet. Pathol.*, 43, 67–75.
- Heine HG., Stevens MP., Ford AJ., Boyle DB., 1999. A capripoxvirus detection PCR and antibody ELISA based on the antigen P32, the homolog of the vaccinia virüs H3L gene. *J. Immunol. Meth.*, 227, 187-196.
- Hutyrá F., Marek J., Manninger R., 1946. *Special Pathology and Therapeutics of the Diseases of Domestic Animals.*, Bailliere Tindall and Cox Press, London.
- Ireland DC., Binépal YS., 1998. Improved detection of capripoxvirus in biopsy samples by PCR. *J. Virol. Meth.*, 74, 1-7.
- Kitching RP., Smale C., 1986. Comparison of the external dimensions of capripoxvirus isolates. *Res. Vet. Sci.*, 41, 425–427.
- Mangana-Vougiouka O., Markoulatos P., Koptopoulos G., Nomikou K., Bakandritsos N., Papadopoulos O., 1999. Sheep poxvirus identification by PCR in cell cultures. *J. Virol. Meth.*, 77, 75-79.
- Mangana-Vougiouka O., Markoulatos P., Koptopoulos G., Nomikou K., Bakandritsos N., Papadopoulos O., 2000. Sheep pox virus identification from clinical specimens by PCR, cell culture, immunofluorescence and agar gel immuno precipitation assay. *Mol. Cell Probes*, 14, 305-310.
- Martin WB., Erhan B., Onar B., 1975. Koyun çiçeği aşısı üzerine çalışmalar, serum-virüs nöralizasyon testleri. *Pendik Vet. Kont. Araşt. Enst. Derg.*, 1, 26-47.
- Mondal B., Hosamani M., Dutta TK., Senthilkumar VS., Rathore R., Singh RK., 2004. An outbreak of sheep pox on sheep breeding farm in Jamnu, India. *Rev. Sci. Tech. Int. Epiz.*, 23, 943-949.
- Munz EK., Owen NC., 1966. Electron microscopic studies on lumpy skin disease virus type Neethling. *J. Vet. Res.*, 33, 3–8.
- Oğuzoğlu TÇ; Alkan F; Özkul A; Atalay Vural S; Güngör AB; Burgu, I., 2006. A sheep pox virus outbreak in central Turkey in 2003: Isolation and identification of Capripoxvirus Ovis. *Vet. Res. Commun.*, 30, 965-971.
- Ozmen O., Kale M., Haligur M., Yavru S., 2009. Pathological, serological, and virological findings in sheep infected simultaneously with Bluetongue, Peste-des-petits-ruminants and Sheeppox viruses. *Trop. Anim. Health Prod.*, 41, 951-958.
- Rao TV, Negi BS, Bansal MP., 1997. Isolation and characterization of soluble antigens of sheep pox virus. *Indian J. Exp. Biol.*, 35, 597–602.
- Roy P., Purushothaman V., Sreekumar C., Tamizharasan S., Chandramohan A., 2008. Sheep pox disease outbreaks in Madras Red and Mechery breeds of indigenous sheep in Tamilnadu. *India. Res. Vet. Sci.*, 85, 617-621.
- Sambrook J., Fritsch EF., Maniatis T. 1989. Phenol:Chloroform Extractions. In "Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd Edition", Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Yashpal M., Mahesh K., Batra SK., Puranchand M., Khatri Y., 1997. Occurrence of sheep pox in unorganized flocks in Haryana State, *Indian J. Anim. Sci.*, 67, 962–963.
- Yazıcı Z., Oguzoglu TÇ., Okur-Gumusova S., 2008. Detection and phylogenetic analysis of local capripoxvirus from necropsy specimens of sheep suspected of sheeppox infection. *Vlaams Diergen. Tijds.*, 77, 97-100.
- Yeruham I., Yadin H., Van Ham M., Bumbarov V., Soham A., Perl S., 2007. Economic and epidemiologic aspects of an outbreak of sheeppox in a dairy sheep flock. *Vet. Rec.*, 160, 236-237.
- World Organisation for Animal Health (OIE)., 2008. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Chapter 2.7.14., Sheep pox and goat pox: http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.07.14_S_POX_G_POX.pdf [Erişim: 30.07.2009]