



RESEARCH ARTICLE

Solunum sistemi problemleri kedilerde Feline Herpesvirus 1 (FHV-1) ve Feline Calicivirus varlığının moleküler olarak araştırılması

Seval Bilge Dağalp^{1*,a}, Fırat Doğan^{2,b}, Touraj Aligholipour Farzani^{1,c},
Ali Rıza Babaoğlu^{3,d}, Gülizar Acar Kırmızı^{4,e}, Mehmet Çabalar^{5,f}

¹Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

²Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı, Hatay, Türkiye

³Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı, Van, Türkiye

⁴Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı, Erzurum, Türkiye

⁵Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı, Şanlıurfa, Türkiye

Geliş:12.04.2019, Kabul: 06.06.2019

*sevalbilge@hotmail.com

^aORCID: 0000-0002-1166-721X, ^bORCID: 0000-0001-8656-3645, ^cORCID: 0000-0002-1392-4048,

^dORCID: 0000-0001-8023-3442 ^eORCID: 0000-0002-0800-1564, ^fORCID: 0000-0001-9505-0809

Molecular investigation of Feline Herpesvirus 1 (FHV-1) and Feline Calicivirus in cats with respiratory system problem

Eurasian J Vet Sci, 2019, 35, 3, 131-138

DOI: 10.15312/EurasianJVetSci.2019.236

Öz

Amaç: Bu çalışmada FHV (Feline Herpesvirus) ve FCV (Feline Calicivirus) şüpheli örneklerde söz konusu enfeksiyonların varlığı/yaygınlığının araştırılması, bildirilen semptomlarla ilişkilendirilmesi ve bu virusların moleküler karakterizasyonu amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: Bu amaçla klinik olarak solunum sistemi problemi gösteren toplam 70 kediden 31 nasal, 30 konjunktival, 8 oral, 7 orafarengal ve 11 rektal swap ile 32 EDTA'lı kan örneği olmak üzere toplam 119 örnek alınmıştır. Alınan örneklerden viral nükleik asit ekstraksiyonu yapıldı ve söz konusu enfeksiyonların varlığı PCR ile araştırıldı. Pozitif bulunan örnekler moleküler karakterizasyon için dizin analizi işlemine tabi tutuldu.

Bulgular: Örneklenen kedilerin toplam %45,71'i (32/70) FHV-1 ve %10'u (7/70) FCV nükleik asit varlığı yönünden pozitif olarak tespit edildi. Toplam pozitifliği bildirilen bu kedilerin, %4,29'i (3/70) her iki etken için birlikte pozitif olarak değerlendirildi. Örneklenen solunum sistemi bulgulu kedilerde FHV-1 enfeksiyonun daha yaygın olduğu görüldü; yaş bilgisi olan kedilerde enfeksiyonların her yaş grubunda olduğu gözlenirken; özellikle oral ve/veya orafarengal swap örneklerinin her iki enfeksiyonun teşhisinde de duyarlı örnekler olduğu tespit edildi.

Öneri: Bu enfeksiyonların, enfekte kedilerde görülmesinin yanı sıra sağlıklı görünümlü hayvanlarda da tespit edilebildiği ve söz konusu enfeksiyonların buluşunda bu durumun göz ardı edilmemesi gerekliliği ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle klinik belirtilerin şiddetinin azaltılması, saçılımın ve persistansın en aza indirilmesi adına özellikle toplu yaşayan, dışarıda bir arada bulunan kedilerin düzenli aşılması üzerinde durulmalıdır. Ayrıca FHV ve FCV dışındaki etkenlerin de (M.felis, C.felis, B.bronchoseptica gibi bakteriler) kedilerde solunum, göz ve oral lezyonlarda bulunabileceği unutulmamalı ve bu etkenler de enfekte kedilerde kontrol edilmelidir.

Anahtar kelimeler: Feline Herpesvirus 1, Feline Calicivirus, PCR, dizin analizi,

Abstract

Aim: The aim of this study was to investigate the presence / prevalence of these infections in FHV (Feline Herpesvirus) and FCV (Feline Calicivirus) suspected samples, to correlate them with reported symptoms and molecular characterization of these viruses.

Materials and Methods: For this purpose, a total of 119 specimens were collected from 70 cats clinically showing respiratory system problem, 31 nasal, 30 conjunctival, 8 oral, 7 orafarengal and 11 rectal swaps and 32 EDTA blood samples. Viral nucleic acid extraction was performed from the samples and the presence of these infections was investigated by PCR. Samples with positive results were subjected to sequence analysis for molecular characterization.

Results: Sampled cats were evaluated as positive for 45.71% (32/70) FHV-1 and 10% (7/70) FCV. 4.29% (3/70) of these cats were positive for both infections. FHV-1 infection was more common in cats with respiratory system findings. While age-conscious cats were observed in all age groups; especially oral and / or orafarengal swap samples were found to be sensitive samples in the diagnosis of both infections.

Conclusion: These infections, as well as being seen in infected cats, can also be detected in healthy-looking animals and it should be noted that this should not be ignored in the transmission of these infections. Therefore, in order to reduce the severity of the clinical symptoms, to minimize the scattering and persistence, it is necessary to focus on the regular vaccination of the cats that live together, especially in the community. In addition, factors other than FHV and FCV (bacteria such as M.felis, C.felis, B.bronchoseptica) can be found in cats with respiratory, eye and oral lesions and these factors should be checked in infected cats.

Keywords: Feline Herpesvirus 1, Feline Calicivirus, PCR, Sequence analysis,

Giriş

FHV-1 (Feline Herpesvirus -1) ve FCV (Feline Calicivirus), evcil kedilerin özellikle üst solunum yolu problemlerinde yaygın olarak tespit edilen iki önemli etkindir (Binns ve ark 2000). FHV-1 Herpesviridae ailesinin Alphaherpesvirinae alt ailesinin Varicellovirus genusunda yer alan, dsDNA içeren zarflı bir virustur. Etken özellikle üst solunum yolu ve göz epitelinde replike olarak rhinitis ve konjunktivitisin yaygın olduğu üst solunum yolu ve göz enfeksiyonlarına neden olabilmektedir. Özellikle korneanın yangısı şeklinde karşımıza çıkan stromal keratit, korneal dentritik ülserler FHV-1 için patognomoniktir. FHV-1 ayrıca, mukozal yüzeylerde erozyon ve ülserlerle seyrebilmekte ancak bu lezyonlar daha yaygın olarak FCV enfeksiyonunda görülmektedir. FHV-1 diğer alphaherpesviruslarda olduğu gibi primer enfeksiyonun ardından sensorik nöronların ganglionlarında yaşam boyu latent kalabilmektedir. Latent enfekte kediler virus taşıyıcısı ve saçıcısı olarak rol oynamaktadır (Gaskel ve ark 2007). Enfeksiyona her yaşta ki dişi ya da erkek veya beslenme şekline göre tüm kediler duyarlıdır fakat ciddi semptomlar genellikle 6 aylığa kadar olan yavru kedilerde görülmektedir (Povey ve ark 1969). Virus oral, nasal ve konjunktival sekresyonlarla saçılabilir (Povey 1979, Thiry ve ark 2009).

Calicivirusların Vesivirus genusuna dahil olan FCV'lar ise ssRNA viruslarıdır (Radford ve ark 2007). Calicivirus enfeksiyonu FHV'dan daha hafif olarak görülmekle beraber, özellikle solunum yolu ve oral lezyonlarla ilişkilidir. Enfeksiyon ateş, depresyon ve iştahsızlık belirtilerinin dışında, hafif oküler ve nazal bozukluklar ve ayak pedlerinde (footpad), dilde, sert damakta ya da burunda ülserlerle karakterizedir. Ağızda oluşan ülserler bazen tek bulgu olarak görülebilse de, bazı kedilerde bu ağız lezyonları görülmeyip, yalnızca oküler ve/veya nasal semptomlar ortaya çıkmaktadır. Ayrıca FCV enfeksiyonunda FHV-1 enfeksiyonundan farklı olarak gastrointestinal sistem, karaciğer ve pankreas da etkilenebilmekte ve enfekte kedilerde kusma, ikterus, diyare gibi semptomlar da gözlemlenebilmektedir. FCV dünya genelinde kedilerde yaygın olarak bulunmakta (Daniels ve ark 1999, Filoni ve ark 2006, Radford ve ark 2007, Johann ve ark 2009, Henzel ve ark 2013) ve kedilerin barınma şekline göre prevalansı değişiklik göstermektedir. Büyük gruplar halinde barındırılan kedilerde prevalans %50-90'lara ulaşırken, küçük gruplarda yer alan bu oran %10'lara düşmektedir (Radford ve ark 2001). Son yıllarda Kuzey Amerika ve Avrupa'da ortaya çıkan FCV enfeksiyonunda oluşan pnemoniye bağlı ölümler de görüldüğü bildirilmiştir (Coyne ve ark 2006, Schulz ve ark 2011). Klinik belirtilerin şiddetini virusun alınma yolu, diğer enfeksiyonların varlığı, yaş grubu, virusun titresi, kedilerin aşı geçmişi ve immun durumları gibi faktörler etkilemektedir (Pederson ve ark 2000, Schorr-Evans ve ark 2003, Coyne ve ark 2006, Reynolds ve ark 2009, Radford ve ark 2009, Schulz ve ark 2011). FCV enfeksiyonu geçiren kedilerin %15-91 oranında virus persiste kalabilmekte ve persiste enfekte bireylerde virus

yaşam boyu saçılım göstermektedir (Radford ve ark 2009). Özellikle her iki enfeksiyonun epidemiyolojisi ve kontrol/eradikasyonunda persiste enfekte hayvanların büyük önemi vardır. FCV konak hücre ve çevresel faktörlere bağlı olarak çok fazla mutasyona uğradığından dolayı, suşlar arasında genetik çeşitlilik ortaya çıkmaktadır. Bu genetik çeşitliliğe bağlı olarak aşı etkinliği de değişmektedir (Radford ve ark 2007, Radford ve ark 2009).

Her iki enfeksiyonun bulaşmasında nasal, konjunktival ve oral/orofarengal sekret ve ekskretler önemlidir (Povey 1979). Söz konusu iki enfeksiyon tek başına görülebildiği gibi klinik belirtili ve/veya belirtisiz olarak birlikte de seyrebilmektedir (Henzel ve ark 2012).

Ülkemizde kedilerde solunum sistemi problemleri yaygın olarak bildirilmekle birlikte etiyojilerinin araştırıldığı çalışmalar sınırlı sayıdadır. Söz konusu enfeksiyonlarda etiyojistik ajan olarak FHV-1'in araştırıldığı çalışmalar (Bilge ve Akça 2004, Çabalar ve Dağalp 2008, Karapınar ve ark 2014, Küçük ve ark 2017) olmakla birlikte FCV varlığının moleküler teknikler ile araştırıldığı herhangi bir çalışmaya rastlanmadı. Bu bilgiler ışığında planlanan bu çalışmada, FHV-1 ve FCV enfeksiyonu şüpheli olarak 2005-2017 yılları arasında söz konusu etkenler yönünden aşılammış kedilerden alınan ve anabilim dalımız laboratuvarına gelen, klinik örneklerde her iki enfeksiyonun varlığının moleküler olarak tespiti, bildirilen semptomlar ile ilişkilendirilmesi ve pozitif örneklerin moleküler karakterizasyonu amaçlandı.

Gereç ve Yöntem

Örneklenen hayvanlar

Bu çalışmada, 2005-2017 yılları arasında Viroloji Anabilim Dalı laboratuvarına gelen 70 klinik enfekte kediden alınan 30 konjunktival, 31 nasal, 8 oral, 7 orofarengal, 11 rektal swap ve 32 EDTA'lı kan örneği olmak üzere toplam 119 örnek kullanıldı. Bazı hayvanlarda birden fazla örnek alındı. Örneklenen hayvanlara ait bilgiler Tablo 1'de sunuldu. Örneklenen kedilerin sahiplerinden her iki etken yönünden de aşılammış olduğu öğrenildi.

Polymerase chain reaction (PCR)

DNA ekstraksiyonu Sambrook ve ark. (1989), RNA ekstraksiyonu ise Chomczynski ve Sacchi'nin (1987) bildirdikleri yöntemlere uygun olarak yapıldı. FHV-1 DNA amplifikasyonu için Nunberg ve ark. (1989) bildirdiği timidin kinaz (TK) gen bölgesine yönelik primer çifti kullanılırken, FCV için Radford ve ark.(1997) belirttiği VP1 kapsit proteinine yönelik primer çifti kullanılarak nested PCR yapıldı. Kısaca PCR reaksiyonunda FCV için öncelikle RT-PCR ile cDNA (Thermo Scientific Cat No: K1622) sentezi yapıldı. Elde edilen cDNA hedef DNA olarak kullanıldı. PCR reaksiyon karışımı 30 µl olacak şekilde içerisinde 3 µl (50 ng) hedef DNA, 2,5 U Taq DNA polimeraz



Tablo 1: Örnek alınan kedilerde görülen klinik semptomlar ve PCR sonuçları

| Klinik semptom | Toplam kedi sayısı | FHV (+) | FCV (+) | FHV ve FCV (+) | Toplam (+) | Toplam (-) |
|----------------|--------------------|----------|---------|----------------|------------|------------|
| | | 29 | 4 | 3 | 36 | 34 |
| | 70 | (%41,43) | (%5,71) | (%4,29) | (%51,43) | (%48,57) |
| Oral Lezyon | 10 | 5 | 1 | 2 | 8 | 2 |
| | | (%50) | (%10) | (%20) | (%80) | (%20) |
| Nasal Akıntı | 42 | 17 | 2 | 1 | 20 | 22 |
| | | (%40,48) | (%4,76) | (%2,38) | (%47,61) | (%52,38) |
| Okuler Akıntı | 30 | 14 | 3 | 1 | 18 | 12 |
| | | (%46,67) | (%10) | (%3,33) | (%60) | (%40) |
| Salivasyon | 6 | 6 | - | - | 6 | 0 |
| | | (%100) | - | - | (%100) | (%0) |
| İshal | 14 | 6 | 1 | - | 6 | 8 |
| | | (%42,86) | (%3,13) | - | (%42,86) | (%57,14) |
| Ateş | 32 | 12 | - | - | 13 | 19 |
| | | (%37,5) | - | - | (%40,63) | (%59,38) |
| İştahsızlık | 8 | 6 | - | - | 6 | 2 |
| | | (%75) | - | - | (%75) | (%25) |
| Öksürük | 19 | 10 | - | - | 10 | 9 |
| | | (%52,63) | - | - | (%52,63) | (%47,37) |

enzimi (Thermo Scientific Cat No: EP0402), 3,5 mM dNTP, her bir primerden 10pmol, 1,5 mM MgCl₂ ve 10X PCR buffer olacak şekilde ayarlandı. Isı döngüleri FHV için 95 °C de 5 dk ön denaturasyon işlemini takiben 35 siklus 95 °C de 30sn, 56 °C de 45 sn, 72 °C de 1 dk olacak şekilde ayarlandı. Daha sonra 72 °C de 10 dk son uzama basamağı uygulandı.

FCV için ise 95 °C de 2 dk ön denaturasyon işlemini takiben 40 siklus 95 °C de 1dk, 40 °C de 1dk, 72 °C de 3 dk olacak şekilde ayarlandı. Daha sonra 72 °C de 5 dk son uzama basamağı uygulandı. FCV ikinci turu için aynı ısı döngüleri kullanılarak, 30 siklus olacak şekilde ayarlandı. Elde edilen PCR ürünleri %1 lik agaroz jelde görüntülendi. Elde edilen ürün büyüklükleri FHV için 287 bp, FCV' nin birinci turu için 519 bp, ikinci turu için ise 210 bp olarak tespit edildi. Çalışmada FHV için pozitif kontrol olarak Anabilim Dalımız stoklarında bulunan referens FHV suşu kullanıldı. FCV için ise daha önce immünofloresan ile pozitif olarak tespit edilen saha örneği kullanıldı. Negatif kontrol için ise streil distile su kullanıldı.

Dizin analizi

PCR sonucunda pozitif olarak belirlenen ve iyi ürün kalitesine sahip olan FHV-1 için 14 örnek, FCV için 3 örnek dizin analizine alındı. Örneklerin dizin analizi, Beckman Coulter

CEQ8000 Genetik Analiz sistemiyle yapıldı. Virus dizileri, GenBank veri tabanından elde edilen diğer FHV-1 TK gen dizileri ve FCV için kapsit proteini gen dizinleri kullanılarak karşılaştırıldı. Filogenetik ağaçlar MEGA6 yazılım programı kullanılarak yapıldı.

Bulgular

PCR ve Dizin analizi

Örneklenen kedilerin toplam %45,71'i (32/70) FHV-1 ve %10'u (7/70) FCV nükleik asit varlığı yönünden pozitif olarak değerlendirildi. Kedilerin %41,43'ü yalnızca FHV-1, %5,71'i yalnızca FCV yönünden pozitif bulunurken, %4,29'u (3/70) hem FHV-1, hem de FCV yönünden pozitif olarak değerlendirildi. Böylece örneklenen kedilerin %51,43'ü FHV-1 ve/veya FCV yönünden pozitif olarak belirlendi. Alınan örnekler açısından bir değerlendirme yapıldığında; özellikle orafarengeal ve konjunktival swap örneği FHV, oral swap örnekleri ise FCV teşhisinde duyarlı örnekler olarak görülmektedir (Tablo 1).

Bazı hayvanlardan birden fazla örnek alındı ancak aynı hayvana ait birden fazla örnekte pozitiflik tespit edilemedi. Klinik belirtilere göre söz konusu enfeksiyonların yaygınlığına

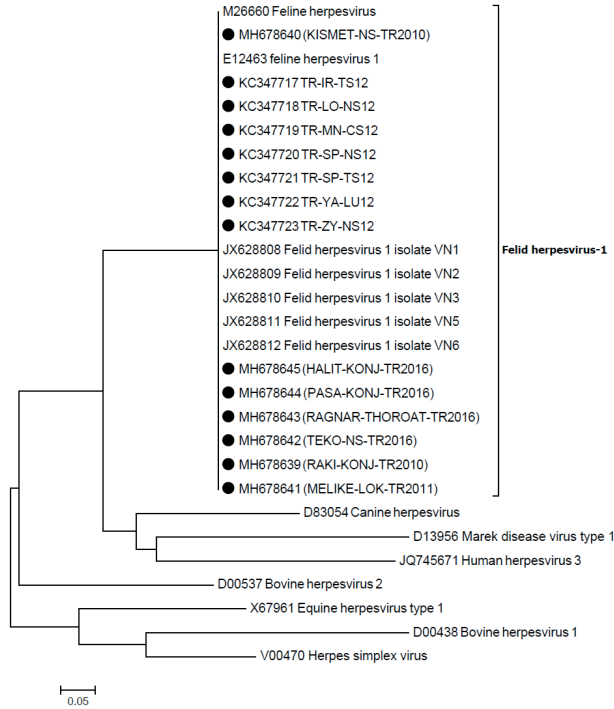
Tablo 2. PCR sonuçlarının yaş, cinsiyet ve alınan örneklerle göre dağılımı

| Epidemiyolojik veri | Toplam | FHV (+) | FCV (+) | FHV ve FCV (+) | Toplam (+) | Toplam (-) |
|---------------------|--------|--------------------|------------------|-------------------|--------------------|--------------------|
| Kedi sayısı | 70 | %41,43 (29/70) | %5,71 (4/70) | %4,29 (3/70) | %51,43 (36/70) | %48,57 (34/70) |
| Yaş | | | | | | |
| <1 yaş | 23 | %52,17 (12/23) | %8,70 (2/23) | %0 (0/23) | %60,87 (14/23) | %39,13 (9/23) |
| 1-5 yaş | 9 | %66,67 (6/9) | %0 (0/9) | %11,11 (1/9) | %77,78 (7/9) | %22,22 (2/9) |
| >5 yaş | 4 | %75 (3/4) | %0 (0/4) | %0 (0/4) | %75 (3/4) | %25 (1/4) |
| Bilgi Yok | 34 | %23,53 (8/34) | %5,88 (2/34) | %5,88 (2/34) | %35,29 (12/34) | %64,71 (22/34) |
| Cinsiyet | | | | | | |
| Dişi (♀) | 12 | %66,67 (8/12) | %8,33 (1/12) | %8,33 (1/12) | %83,33 (10/12) | %16,67 (2/12) |
| Erkek (♂) | 23 | %60,87 (14/23) | %4,35 (1/23) | %0 (0/23) | %65,22 (15/23) | %34,78 (8/23) |
| Bilgi yok | 35 | %20 (7/35) | %5,71 (2/35) | %5,71 (2/35) | %31,43 (11/35) | %68,57 (24/35) |
| Örnekler | | | | | | |
| Nasal swab | 31 | %22,58 (7/31) | %3,23 (1/31) | %0 (0/31) | %25,81 (8/31) | %74,19 (23/31) |
| Konjunktival swab | 30 | %46,67 (14/30) | %6,67 (2/30) | %3,33 (1/30) | %56,67 (17/30) | %43,33 (13/30) |
| Oral swab | 8 | %12,5 (1/8) | %12,5 (1/8) | %25 (2/8) | %50 (4/8) | %50 (4/8) |
| Orofarengeal swab | 7 | %85,71 (6/7) | %0 (0/7) | %0 (0/7) | %85,71 (6/7) | %14,29 (1/7) |
| Rektal swab | 11 | %18,18 (2/11) | %0 (0/11) | %0 (0/11) | %18,18 (2/11) | %81,82 (9/11) |
| Kan (lökosit) | 32 | %25 (8/32) | %0 (0/32) | %0 (0/32) | %25 (8/32) | %75 (24/32) |
| Toplam örnek | 119 | %31,93 (38/119) | %3,36 (4/119) | %2,52 (3/119) | %37,82 (45/119) | %62,18 (74/119) |

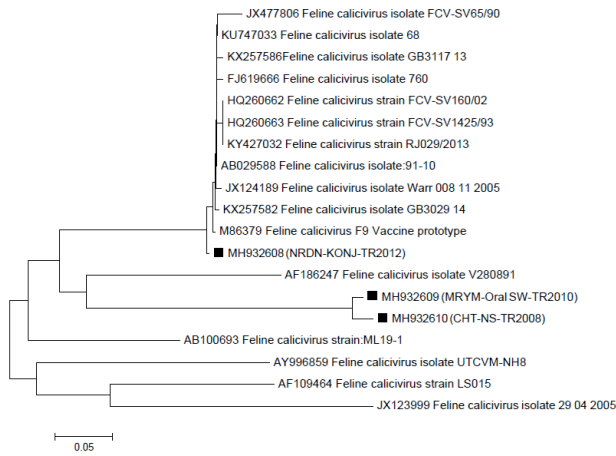
bakıldığında ise konjunktivitis semptomlu kedilerin %50'si FHV-1, oral lezyonların yaygın olduğu kedilerin ise %30'u FCV pozitif olarak belirlendi. Yaş bilgisi olan kedilerde enfeksiyonların her yaş grubunda olduğu gözlenirken, cinsiyet açısından da belirgin bir farklılık tespit edilemedi. Pozitif bu-

lunan örneklerle ilgili ayrıntılı bilgi Tablo 2'de verildi.

FHV-1 yönünden pozitif olarak belirlenen 14 örnek ile FCV pozitif 3 örneğin dizin analizi sonucu yapılan filogenetik ağaçları sırasıyla Şekil 1 ve 2' de verildi. Türkiye'de ve diğer



Şekil 1. FHV-1 için çizilen filogenetik ağaç



Şekil 2. FCV için çizilen filogenetik ağaç

ülkelerde tespit edilen FHV-1 saha suşlarının TK gen bölgesi baz alındığında, %90'ın üzerinde birbirlerine yakın oldukları tespit edildi. Türkiye'de ve diğer ülkelerde tespit edilen FCV saha suşları arasında ise farklılıklar belirlendi. Filogenetik ağaçta yer alan bir saha suşumuzun (MH932208) aşı suşu olan F9 prototip suşa yakın olduğu gözlenirken, diğer iki saha virusumuzun başka bir dalda yer aldığı gözlemlendi.

Tartışma

Kedilerin üst solunum sistemi patojenlerinin en önemlilerinden olan FHV-1 ve FCV tek başlarına görülebildiği gibi, (Gaskell ve ark 2004), hem iki etken birlikte, hem de diğer viral (Retrovirus vb.) ve bakteriyel etkenler ile de koenfeksiyona

neden olabilmektedirler. Her iki etkenin birlikte enfeksiyon oluşturduğu durumlarda tablo çok daha ağırlaşmaktadır. Solunum sistemi problemleri kedilerde tüm bu enfeksiyöz etkenlerin varlığı düşünülmelidir. Ayrıca solunum sistemi problemlerinin tanısında, sadece enfeksiyöz ajanlar değil, diğer non-enfeksiyöz faktörler (tümörler, yabancı cisim gibi) de unutulmamalıdır (Berger ve ark 2015).

Bu çalışmada örneklenen kedilerin %51,43'ü FHV-1 ve/veya FCV yönünden pozitif olarak belirlendi (Tablo 1). Bu veri kedilerin solunum sistemi problemlerinde her iki etkenin önemli rol oynadığını bir kez daha ortaya koymaktadır. Henzel ve ark. (2012) 2006-2009 yılları arasında gerçekleştirdikleri bir çalışmada, klinik semptomlu ve sağlıklı görünümü 302 kediden alınan oral ve orofarengeal swap olmak üzere toplam 572 swap örneğini PCR ile test etmişler ve örneklenen kedilerin %18,2 (55/302) oranında FHV-1 ve/veya FCV enfeksiyonu yönünden pozitif bulunduğunu bildirmişlerdir. Söz konusu çalışmada hem sağlıklı görünümü kediler hem de klinik semptomlu kedilerden örnek alınmış olması nedeniyle pozitiflik oranları bizim çalışmamızda belirlenen oranlardan düşük bulunmuştur. Ayrıca örneklenen popülasyona göre de pozitiflik oranları farklılık göstermekle birlikte aynı araştırmacılar, pozitif bulunan örneklerde ise tek başına FCV oranını %52,7 (29/55), tek başına FHV oranını %38,2 (21/55) olarak bulmuşlardır.

Araştırmamız sonucunda elde edilen verilere göre, solunum sistemi belirtisi gösteren kedilerde FHV-1 yüksek oranda (%45,71; 32/70), FCV ise daha düşük oranda (%10; 7/70) tespit edilmiştir (Tablo 1). Söz konusu kedilerde belirlenen solunum sistemi bulgularının etiyojisinde FHV-1'in rolünün FCV'ye göre daha önemli olduğu düşünülmektedir. Ancak alınan örneklerin niteliği, örneklerin transportu, Calicivirus'da genetik çeşitliliğinin çok olmasına bağlı olarak moleküler tanıda kullanılan primerlerin uygun olup/olmaması gibi nedenlerden dolayı yanlış negatifliklerle de karşılaşabilmektedir (Radford ve ark 2009). Tüm bu olasılıklar da göz ardı edilmemelidir.

Çalışmamızda örneklenen kedilerin %4,29'u (3/70) her iki enfeksiyon yönünden pozitif olarak değerlendirildi (Tablo 1). Henzel ve ark. (2012) FHV-1 ve FCV ikili enfeksiyon oranını %9,1 (5/55) olarak bulmuşlardır. Araştırmacılar (Gaskell ve ark 2004) her iki etkenin birlikte seyrettiği durumlarda tablonun çok daha ağır olduğunu bildirmişlerdir.

Türkiye'de kedilerin solunum sistemi etkenlerinin araştırıldığı çalışmalar sınırlı sayıdadır (Bilge-Dağalp ve Akça 2004, Karapınar ve ark 2014, Dokuzeylül ve ark 2016, Küçük ve ark 2017). Karapınar ve ark. (2014) oküler ve solunum sistemi semptomlu Van kedilerinde FHV-1 enfeksiyonu varlığını PCR ile %45 oranında bulmuşlardır. FCV ile ilgili Türkiye'de yapılmış moleküler çalışma bulunmamaktadır. Ancak Dokuzeylül ve ark. (2016) kedilerde oral lezyon olgularında hızlı test kit-



leri ile %8 oranında FCV tespit etmişlerdir.

Araştırmacılar üst solunum sistemi enfeksiyonlarında FCV varlığının (%20-53) FHV-1 varlığından (%10-34) daha yaygın olduğunu bildirmişlerdir (Binns ve ark 2000, Harbour ve ark 1991, Knowles ve ark 1989). Ancak Berger ve ark.(2015) yaptığı çalışmada aksine üst solunum sistemi problemlili kedilerde FCV oranı, FCV negatif kedilere oranla çok düşük bulunmuştur. Baumworcel ve ark. (2017) tarafından yapılan bir çalışmada, konjunktivitis semptomlu ve sağlıklı görünümü kedilerden alınan örneklerin %57,4'ünde (62/88) FHV-1, %37'sinde (40/88) FCV pozitif bulunurken, birlikte pozitiflik oranı %10 olarak belirlenmiştir. FHV genellikle solunum sistemi belirtileri gösteren kedilerden izole edilirken, FCV daha çok oral lezyonlu (gingivitis, stomatitis, oral/lingual ülserasyonlar gibi) kedilerde tespit edilmektedir (Flagstad ve ark 1972, Knowles ve ark 1989, Zicola ve ark 2009, Dokuzeylül ve ark 2016). Yapılan bu çalışmada pozitiflik tespit edilen hayvanlarda FHV-1 ve FCV oranının klinik semptomlara göre üst solunum yolu bulgulu ve oral lezyonlu hayvanlarda eşit bir dağılım gösterdiği tespit edildi (Tablo 2). Ancak FCV pozitif örnek sayısı az olduğundan bu anlamda istatistik bir değerlendirme yapılamadı.

Söz konusu viruslar yalnızca klinik belirtili kedilerde değil, sağlıklı görünümü kedilerde de tespit edilmektedirler. Yapılan bu çalışmada örnek alınan kedilerin hepsi klinik olarak farklı semptomlar gösterdiğinden dolayı, sağlıklı ve klinik olarak enfekte hayvanlardaki pozitiflik oranı karşılaştırılmadı. Farklı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda sağlıklı görünümü kedilerde FCV oranı %15-31 iken, FHV-1 %1-63 oranında pozitif bulunmuştur (Binns ve ark 2000, Helps ve ark 2005, Kang ve Park 2008, Knowles ve ark 1989). Bilge Dağalp ve Akça'nın (2004) FHV-1 üzerine yaptığı çalışmada sağlıklı ve klinik bulgulu kedilerde enfeksiyonun varlığı sırasıyla %7,3, %18,1 olarak belirlenmiştir. Küçük ve ark. (2017) FHV-1 varlığını sağlıklı görünümü kedilerde %16,7, klinik semptomlu kedilerde ise %47,6 oranında belirlemişler ve sağlıklı görünümü kedilerin hastalığın saçılmasındaki önemini belirtmişlerdir. Sağlık görünümü kedilerde saptanan pozitiflikler her iki enfeksiyonun epidemiyolojisine ilgili olarak önemle üzerinde durulması gereken bir konudur. Özellikle bu durum aşılamanın önemini de bir kez daha ortaya koymaktadır.

Her iki enfeksiyonun tanısında konjunktival, oral, orofarengeal, nasal swap örnekleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada özellikle orafarengeal ve konjunktival swap örnekleri FHV; oral swap örnekleri ise FCV teşhisinde duyarlı örnekler olarak tespit edildi. Ancak pozitiflik sayıları düşük olduğu için istatistik bir değerlendirme yapılamamıştır. Yaşa göre yapılan değerlendirmelerde FCV enfeksiyonunun ortalama 38 aylık kedilerde, FHV enfeksiyonunun ise ortalama 29,9 aylık kedilerde daha sık görüldüğü bildirilmiştir (Zicola ve ark 2009). Binns ve ark.(2000) gerçekleştirdiği bir

çalışmada ise FHV enfeksiyonu 1-3 ay yaşlı kedilerde %16,9, 4-11 ay yaşlı kedilerde %8,7 ve >11 ay yaşlı kedilerde ise % 50 oranında tespit edilmiştir. Yapılan bu çalışmada FHV enfeksiyonunun yaşa bağlı olarak arttığı gözlenmekte ancak FCV enfeksiyonu için elde edilen verilere göre böyle bir değerlendirme yapılamamaktadır (Tablo 2).

Yapılan filogenetik değerlendirmeye göre, Türkiye'de ve diğer ülkelerde tespit edilen FHV-1 saha suşlarının TK gen bölgesi baz alındığında, %90'ın üzerinde birbirlerine yakın oldukları tespit edildi. Türkiye'de ve diğer ülkelerde tespit edilen FCV saha suşları arasında ise farklılıklar belirlenmiş; filogenetik ağaçta yer alan bir saha suşumuzun (MH932208) aşısı suşu olan F9 prototip suşa yakın olduğu gözlenirken, diğer iki saha virusumuzun başka bir dalda yer aldığı gözlendi (Şekil 1 ve 2). FCV'de görülen bu genetik farklılıkların antijenik farklılıklara neden olup/olmadığı ilerde yapılması planlanan deneysel çalışmalarla ortaya konulabilecektir.

Her iki virus ile enfeksiyon sonrasında virus persiste kalabilir ve enfekte kediler taşıyıcı olarak kalabilirler (Gaskell 1977, Sykes 2014). Taşıyıcılık durumu aylarca hatta yıllarca sürebilmektedir (Gaskell ve ark 1982, Povey ve ark 1973, Wardley 1976). Bu durum enfeksiyonun epidemiyolojisi ve kontrolü açısından oldukça önemlidir.

FHV ve FCV nasal, oral ve konjunktival yollar ile doğal olarak saçılmaktadır; enfekte ve duyarlı hayvanlar arasında direkt temasla bulaşan her iki etken indirekt olarak kontamine kafesler, temiz olmayan bakım besleme ve personel aracılığıyla da olabilmektedir (Gaskell ve ark 2007, Radford ve ark 2007). Enfeksiyonların önlenmesi ve kontrolü için aşılama, toplu yaşam alanlarının (barınakların) dezenfeksiyonu, enfekte ve taşıyıcı hayvanla temasların önlenmesi gerekmektedir. Ayrıca kediler arasında hızla bulaşan bu etkenlere karşı kontrol amacıyla kedilerin küçük gruplar halinde barındırılması önerilmektedir (Foley ve ark 1997).

Söz konusu enfeksiyonların özellikle genç yaştaki kedilerde prognozunun daha kötü olduğu, persiste enfeksiyonlara neden olabildiği ve sağlıklı görünümü hayvanlarda da virus saçılımının olduğu dikkate alındığında, bu enfeksiyonlara karşı aşılamanın önemi ortaya çıkmaktadır. Aşılar persiste enfeksiyonların varlığını tamamen önleyememekte ancak klinik enfeksiyonların şiddetini en aza indirgeyebilmektedir. Özellikle FHV enfeksiyonunda trigeminal gangliyondaki latent virus yükünü azalttığı bildirilmektedir (Maggs 2005, Gaskell ve ark 2007). Düzenli aşılamanın koruyucu etkisi ortaya konmuştur (Horzinek ve Thiry 2009). FHV-1 ve FCV aşıları kombine olarak ticari şekilde bulunabilmekte ve 1970 yılından bu yana uygulanmaktadır. FCV'ye karşı üretilen aşılardan etkinliği son yıllarda sürekli yeni izolatlarının sahada sirküle olmasından dolayı tartışma konusu olmuştur. Araştırmacılar bu nedenle, farklı izolatları içeren aşılardan geliştirilmesinin gerekli olduğunu bildirmektedirler (Lauritzen ve ark 1997, Radford ve ark 2006, Porter ve ark 2008, Addie ve ark 2008).





Sonuç olarak bu çalışmada üst solunum sistemi belirtileri gösteren ve/veya oral lezyonlu kedilerde FHV ve FCV'nin varlığı moleküler tekniklerle araştırıldı ve bazı parametrelere göre değerlendirilmeler yapılmaya çalışıldı. Elde edilen sonuçlara göre, söz konusu semptomların etiolojisinde FHV'nin FCV'ye oranla önemli bir rol oynadığı görülmektedir. Yapılan filogenetik değerlendirmede TK bölgesi açısından izolatların %90'ın üzerinde birbirine yakın olduğu tespit edildi. Örneklenen kedilerde FCV varlığı düşük oranda bulunmasına rağmen, FCV'nin de FHV kadar söz konusu enfeksiyonların oluşumunda rol oynadığı göz ardı edilmemelidir. Ancak FCV'nin tespitinde örneklerin uygun bölgeden alınması, muhafaza koşulları, kullanılan teknikler gibi faktörlerin önemi büyüktür.

Öneriler

Bu enfeksiyonların, enfekte kedilerde görülmesinin yanı sıra sağlıklı görünümlü hayvanlarda da tespit edilebildiği ve söz konusu enfeksiyonların bulaşında bu durumun göz ardı edilmemesi gerekliliği ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle klinik belirtilerin şiddetinin azaltılması, saçılımın ve persistansın en aza indirgenmesi adına özellikle toplu yaşayan, dışarıda bir arada bulunan kedilerin düzenli aşılanması üzerinde durulmalıdır. Ayrıca FHV ve FCV dışındaki etkenlerin de (M.felis, C.felis, B.bronchoseptica gibi bakteriler) kedilerde solunum, göz ve oral lezyonlarda bulunabileceği unutulmamalı ve bu etkenler de enfekte kedilerde kontrol edilmelidir.

Bu çalışmada, solunum sistemi bulgulu kedilerde FHV-1 ve FCV varlığı moleküler yöntemlerle araştırılmıştır. Bu çalışma aynı zamanda Türkiye'de FCV enfeksiyonunun moleküler olarak araştırıldığı ilk çalışma niteliğindedir. İleride yapılması planlanan çalışmalarda aşı/aşısız, semptomlu/sağlıklı görünümlü ve yaş, cinsiyet, barınma koşulları da göz önünde tutularak değerlendirmeler yapılması sonrasında, her iki enfeksiyonun epidemiyolojisi ile ilgili güncel verilere ulaşılabilmesinin yanı sıra, enfeksiyonların kontrol/eradikasyonuna ilişkin çalışmalara da katkı sağlanabilecektir.

Kaynaklar

- Addie D, Poulet H, Golder MC, McDonald M, et al., 2008. Ability of antibodies to two new caliciviral vaccine strains to neutralise feline calicivirus isolates from the UK. *Vet Rec.*163(12):355-7
- Baumworcel N, Soares AMB, Silva SB, Almeida NKO, et al., 2017. Correlation between clinical signs of feline conjunctivitis and molecular detection of felid herpesvirus-1, feline calicivirus, Chlamydomphila felis and Mycoplasma felis in cats from shelters in Rio de Janeiro. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 54(1), 18-26.
- Berger A, Willi B, Meli ML, Boretti FS, et al., 2015. Feline calicivirus and other respiratory pathogens in cats with Feline

calicivirus-related symptoms and in clinically healthy cats in Switzerland. *BMC Veterinary Research*, 11(1), 282.

- Bilge-Dağalp S, Akça Y, 2004. Detection of feline herpesvirus-1 from domestic cats with or without respiratory symptoms. *Indian Vet* 81 (1): 11-5.
- Binns SH, Dawson S, Speakman AJ, Cuevas LE, et al., 2000. A study of feline upper respiratory tract disease with reference to prevalence and risk factors for infection with feline calicivirus and feline herpesvirus. *J Feline Med Surg* 2: 123-133,
- Cabalar M, Bilge-Dağalp S, 2008. Feline herpesvirus-1 infection in Turkish Van cats with conjunctivitis and upper respiratory tract disease. XIV. International Congress of Virology. August, 10-15, 2008; Istanbul, Turkey
- Chomczynski P, Sacchi N, 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry*, 162(1), 156-159.
- Coyne KP, Jones BR, Kipar A, Chantrey J, et al., 2006. Lethal outbreak of disease associated with feline calicivirus infection in cats. *Vet Rec.* 158(16):544-50.
- Daniels MJ, Golder MC, Jarrett O, MacDonald DW, 1999. Feline viruses in wildcats from Scotland. *Journal of Wildlife Diseases*, 35(1), 121-124.
- Dokuzeylul B, Kayarm A, Or ME, 2016. Prevalence of systemic disorders in cats with oral lesions. *Veterinari Medicina*, 61(4), 219-223.
- Filoni C, Catão-Dias JL, Bay G, Durigon EL, et al., 2006. First evidence of feline herpesvirus, calicivirus, parvovirus, and Ehrlichia exposure in Brazilian free-ranging felids. *Journal of Wildlife Diseases*, 42(2), 470-477.
- Flagstad A, 1972. Isolation and classification of feline picornavirus and herpesvirus in Denmark. *Acta. Vet. Scand.* 13 (4), 462-471.
- Gaskell RM, 1977. Feline viral respiratory disease : a review with particular reference to its epizootiology and control. 1-16.
- Gaskell CJ, Gaskell RM, Dennis PE, Wooldridge MJ, 1982. Efficacy of an inactivated feline calicivirus (FCV) vaccine against challenge with United Kingdom field strains and its interaction with the FCV carrier state. *Res. Vet. Sci.* 32 (1), 23-26.
- Gaskell RM, Radford AD, Dawson S, 2004. Feline infectious respiratory disease. In *Feline Medicine and Therapeutics*, 3rd edn, pp. 577-595.
- Gaskell R, Dawson S, Radford A, Thiry E, 2007. Feline herpesvirus. *Veterinary research*, 38(2), 337-354.
- Harbour DA, Howard PE, Gaskell RM, 1991. Isolation of feline 567 calicivirus and feline herpesvirus from domestic cats 1980 to 1989. *Vet. Rec.* 128 (4), 77-80
- Helps CR, Lait P, Damhuis A, Bjornehammar U, et al., 2005. Factors associated with upper respiratory tract disease caused by feline herpesvirus, feline calicivirus, Chlamydomphila felis and Bordetella bronchiseptica in cats: experience from 218 European catteries. *Vet. Rec.* 156, 669-673.
- Henzel A, Brum MCS, Lautert C, Martins M, et al., 2012. Isolation and identification of feline calicivirus and feline her-



- pesvirus in Southern Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(2), 560-568.
- Henzel A, Sperotto Brum MC, Lovato LT, Weiblen R, 2013. Serological Survey of Feline Calicivirus and Felid Herpesvirus in Rio Grande do Sul, Brazil. *Acta Scientiae Veterinariae*, 41(1).
- Johann JM, Caetano CF, Hass R, Guim TN, et al., 2009. Serum survey for antibodies to coronavirus, herpesvirus, calicivirus, and parvovirus in domestic cats from Rio Grande do Sul, Brazil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 61(3), 752-754.
- Kang BT, Park HM, 2008. Prevalence of feline herpesvirus 1, feline calicivirus and *Chlamydomyces felis* in clinically normal cats at a Korean animal shelter. *Journal of veterinary science*, 9(2), 207-209.
- Karapınar Z, Dinçer E, Ataseven VS, Karaca M, 2014. Feline herpesvirus-1 infection in Van cats with conjunctivitis. *YYU Vet Fak Derg.* 25 (1): 15-7.
- Küçük A, Sağ N, Çakır C, Acar G, et al., 2017. Sağlıklı Görünüşlü ve Solunum Sistemi Problemlili Barınak Kedilerinde Feline Herpesvirus Tip 1 (FeHV-1) Enfeksiyonu. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 14(1), 25-30.
- Knowles JO, Gaskell RM, Gaskell CJ, Harvey CE, et al., 1989. Prevalence of feline calicivirus, feline leukaemia virus and antibodies to FIV in cats with chronic stomatitis. *Vet. Rec.* 124 (13), 336- 338.
- Lauritzen A, Jarrett O, Sabara M, 1997. Serological analysis of feline calicivirus isolates from the United States and United Kingdom. *Vet Microbiol.* 56(1-2):55-63.
- Maggs DJ, 2005. Update on pathogenesis, diagnosis, and treatment of feline herpesvirus type 1. *Clin Tech Small Anim Pract* 20:94-101.
- Nunberg JH, Wright DK, Cole GE, Petrovskis EA, et al., 1989. Identification of the thymidine kinase gene of feline herpesvirus: use of degenerate oligonucleotides in the polymerase chain reaction to isolate herpesvirus gene homologs. *Journal of Virology*, 63(8), 3240-3249.
- Pedersen NC, Elliott JB, Glasgow A, Poland A, et al., 2000. An isolated epizootic of hemorrhagic-like fever in cats caused by a novel and highly virulent strain of feline calicivirus. *Vet Microbiol.* 73(4):281-300.
- Porter CJ, Radford AD, Gaskell RM, Ryvar R, et al., 2008. Comparison of the ability of feline calicivirus (FCV) vaccines to neutralise a panel of current UK FCV isolates. *J Feline Med Surg.*10(1):32-40. doi:10. 1016/j.jfms.2007.06.011.
- Povey RC, Johnson RH, 1969. A standardized serum neutralization test for feline viral rhinotracheitis. II. The virus-serum system. *J. Comp. Pathol.* 79 (3), 387-392.
- Povey RC, Wardley RC, Jessen H, 1973. Feline picornavirus infection: the in vivo carrier state. *Vet. Rec.* 92 (9), 224-229.
- Povey RC, 1979. A review of feline viral rhinotracheitis (feline herpesvirus I infection). *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2: 373-387,
- Radford AD, Bennett M, McArdle F, Dawson S, et al., 1997. The use of sequence analysis of a feline calicivirus (FCV) hypervariable region in the epidemiological investigation of FCV related disease and vaccine failures. *Vaccine*, 15(12-13), 1451-1458.
- Radford AD, Sommerville L, Ryvar R, Cox MB, et al., 2001. Endemic infection of a cat colony with a feline calicivirus closely related to an isolate used in live attenuated vaccines. *Vaccine*, 19(31), 4358-4362.
- Radford AD, Dawson S, Coyne KP, Porter CJ, et al., 2006. The challenge for the next generation of feline calicivirus vaccines. *Vet Microbiol.* 117(1): 14-8.
- Radford AD, Coyne KP, Dawson S, Porter CJ, et al., 2007. Feline calicivirus. *Vet. Res.* 38 (2), 319-335.
- Radford AD, Addie D, Belák S, Boucraut-Baralon C, et al., 2009. Feline calicivirus infection: ABCD guidelines on prevention and management. *Journal of feline medicine and surgery*, 11(7), 556-564.
- Reynolds BS, Poulet H, Pingret JL, Jas D, et al., 2009. A nosocomial outbreak of feline calicivirus associated virulent systemic disease in France. *J Feline Med Surg.* 11(8):633-44.
- Sambrook J, 1989. *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Second Edition 1989.
- Schorr-Evans EM, Poland A, Johnson WE, Pedersen NC, 2003. An epizootic of highly virulent feline calicivirus disease in a hospital setting in New England. *J Feline Med Surg.* 5(4):217-26.
- Schulz BS, Hartmann K, Unterer S, Eichhorn W, et al., 2011. Two outbreaks of virulent systemic feline calicivirus infection in cats in Germany. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 124(5-6):186-93.
- Sykes JE, 2014. Pediatric feline upper respiratory disease. *Vet Clin North Am - Small Anim Pract* 44: 331-342,
- Thiry E, Addie D, Belák S, Boucraut-Baralon C, et al., 2009. Feline herpesvirus infection ABCD guidelines on prevention and management. *J Feline Med Surg* 11: 547-555,
- Zicola A, Saegerman C, Quatpers D, Viandier J, et al., 2009. Feline herpesvirus 1 and feline calicivirus infections in a heterogeneous cat population of a rescue shelter. *J. Feline Med. Surg.* 11 (12), 1023- 1027.
- Wardley RC, 1976. Feline calicivirus carrier state. A study of the host/virus relationship. *Arch. Virol.* 52 (3), 243-249

