



T.C.
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FELİNE CORONAVİRUSUN (FCoV) MOLEKÜLER TEKNİKLERLE KARŞILAŞTIRMALI ANALİZİ

Veteriner Hekim Enis DALKIRAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

VETERİNERLİK VİROLOJİ ANA BİLİM DALI

Danışman
Dr. Öğr. Üyesi SİBEL HASIRCIOĞLU

BURDUR-2025

T.C.
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FELİNE CORONAVİRUSUN (FCoV) MOLEKÜLER
TEKNİKLERLE KARŞILAŞTIRMALI ANALİZİ**

Veteriner Hekim Enis DALKIRAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

VETERİNERLİK VİROLOJİ ANA BİLİM DALI

Danışman
Dr. Öğr. Üyesi SİBEL HASIRCIOĞLU

Bu Araştırma “Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü” tarafından 0980-YL-23 proje numarası ile desteklenmiştir.

BURDUR-2025

KABUL ve ONAY

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Enis DALKIRAN tarafından *Dr. Öğr. Üyesi SİBEL HASIRCIOĞLU* yönetiminde hazırlanan “Feline Coronavirusun (FCoV) Moleküler Tekniklerle Karşılaştırmalı Analizi” başlıklı tez çalışması jüri üyeleri olarak tarafımızdan okunmuş;kapsamı ve niteliği açısından Veterinerlik Viroloji Anabilim Dalında *Yüksek Lisans Tezi* olarak oy birliği / oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Sınavı Tarihi/....../.....

(imza)
Unvanı Adı ve Soyadı
Kurumu
Başkan

(imza)
Unvanı Adı ve Soyadı
Kurumu
Jüri

(imza)
Unvanı Adı ve Soyadı
Kurumu
Jüri

ONAY

Bu tez, Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Lisans Üstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu ... / ... / Tarih ve sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

(imza)
Unvanı, Adı ve Soyadı
Müdür
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

TEŞEKKÜR

Tez dönemim süresince bana her konuda destek veren, yardım ve tavsiyelerini esirgemeyen danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Sibel HASIRCIOĞLU' na, değerli meslektaşım Öğretim Görevlisi Sayın Ozan KOÇLU'ya yine bu süreç boyunca bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşarak tez çalışmamın bütün aşamalarında yardım eden ve manevi destek sağlayan Muratcan Filiz ve Anıl Göl'e teşekkürü bir borç bilirim.



ETİK BEYAN

“Feline Coronavirus (FCoV) Moleküler Tekniklerle Karşılaştırmalı Analizi” başlıklı tez çalışmamdaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Dr. Öğr. Üyesi SİBEL HASIRCIOĞLU danışmanlığında Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kılavuzuna göre yazıldığını beyan ederim

Enis DALKIRAN

Tarih:

İmza:



İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK SAYFASI	i
KABUL ve ONAY SAYFASI	ii
TEŞEKKÜR	iii
BEYAN SAYFASI	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER	vii
TABLolar	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR	ix
TÜRKÇE ÖZET	x
İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT)	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Etiyoloji	3
2.2. Epidemiyoloji	6
2.3 Patogenez	7
2.3.1. Viral Mutasyon ve Makrofaj Tropizminin Kazanılması	7
2.3.2. İmmün Sistemin Rolü ve Hastalığın Şekillenmesi	8
2.4. Klinik Formların İmmünolojik Temeli ve Detayları	9
2.4.1. Efüsiv Olmayan Form (Kuru Form)	9
2.4.2. Efüsiv Form (Islak Form)	10
2.5. Tanı	12
2.5.1. Klinik, Patolojik ve İndirekt Tanı Yaklaşımları	12
2.5.2. Doğrulayıcı, Virolojik ve Moleküler Tanı Yaklaşımları	13
3. GEREÇ ve YÖNTEM	17
3.1. Gereçler	17
3.1.1. Örnekler	17
3.1.2. PCR Materyalleri	18
3.1.2.1. Kontrol Viruslar	18
3.1.2.2. Viral RNA İzolasyonu	18
3.1.2.3. cDNA Sentezi	18
3.1.2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	18
3.1.2.5. Primerler	18
3.1.3. LAMP Materyalleri	19
3.1.3.1 LAMP Primerleri	19
3.2. Yöntem	20
3.2.1. Rektal Sürüntü Örneklerinin ve Asites Sıvısının Hazırlanması	20
3.2.2. Kan Örneklerinin Hazırlanması	20
3.2.3. RNA İzolasyonu	20
3.2.4. cDNA Sentezi	21
3.2.5. Nested Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Nested PCR)	22
3.2.5.1. Nested PCR Birinci Aşama	22
3.2.5.2. Nested PCR İkinci Aşama	23
3.2.6. LAMP Reaksiyon Çalışmaları	23
4. BULGULAR	26

4.1. Nested PCR Bulguları	26
4.2. Florimetrik LAMP Sonuçları	29
4.3. Kolorimetrik LAMP Sonuçları	30
5. TARTIŞMA	32
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	35
KAYNAKLAR	36
ÖZGEÇMİŞ	40



ŞEKİLLER

Şekil 2.1.	FCoV genomunun yapısını ve farklı RT-PCR testleri tarafından hedeflenebilen gen bölgelerini (Spike, M, N, 7b vb.) gösteren şematik görüntü. (Tasker, 2018)	5
Şekil 2.2.	Koronavirus virion yapısının şematik görüntüsü (Gao, 2023)	6
Şekil 2.3.	Pozitif rivalta esti. (Tasker, 2018)	13
Şekil 2.4.	Efüsiv olmayan form FİP olgusunda, böbrek parankimindeki tipik piyogranülomatöz lezyon. (Pedersen, 2009)	14
Şekil 2.5.	Bir piyogranülom içindeki makrofajlarda FCoV antijeninin immünofloresan boyama ile parlak yeşil renkte pozitif olarak saptandığını gösteren mikroskopik görüntü. (Pedersen, 2009)	14
Şekil 4.1.	İki pozitif asites örneğine ait Nested PCR 1. raund jel resmi	26
Şekil 4.2.	İki pozitif asites örneğine ait Nested PCR 2. raund jel resmi	26
Şekil 4.3.	Florimetrik FCoV LAMP Sonucu	29
Şekil 4.4.	Kolorimetrik FCoV LAMP Sonucu	30
Şekil 4.5.	LAMP ürünleri agoroz jel görüntüsü	31

TABLÖLAR

Tablo 2.1.	Coronaviridae ailesindeki kedilerde enfeksiyonlara neden olan coronavirusların bulunduğu Alphacoronavirusları (ICTV, 2024)	4
Tablo 3.1.	Örneklenen kedilerin ırklara göre dağılımı	17
Tablo 3.2.	Nested PCR çalışmalarında kullanılan primerler (Herrewegh ve ark. 1995)	19
Tablo 3.3.	Geliştirilen FCoV LAMP primerleri (S2 gen bölgesi)	19
Tablo 3.4.	cDNA sentezi kit bileşenleri	22
Tablo 3.5.	cDNA sentezi reaksiyon karışımı	22
Tablo 3.6.	cDNA sentezi için ısı döngüleri	22
Tablo 3.7.	PCR Mix karışımı Master Miks	23
Tablo 3.8.	PCR için Isı döngüleri	23
Tablo 3.9.	Primer miks bileşeni için kullanılan primerler ve kullanılan miktarlar	24
Tablo 3.10.	Florimetrik ve kolorimetrik LAMP master miks içerisinde kullanılan komponentler	25
Tablo 4.1.	Nested PCR kolorimetrik ve florimetrik LAMP test sonuçları	27
Tablo 4.2.	Nested PCR'in LAMP'e göre Sensitivite ve Spesifisite oranları	29
Tablo 4.3.	LAMP'in Nested PCR'a göre Sensitivite ve Spesifisite oranları	31

SİMGELER ve KISALTMALAR

A/G	Albümin/Globulin Oranı
BIP	Backward Inner Primer
BOS	Beyin Omurilik Sıvısı
bp	Base pair
BST	Bacillus stearothermophilus
cDNA	Komplementer DNA
COVID-19	Coronavirus Hastalığı 2019
dNTP	Deoksiribonükleotid Trifosfat
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
ELISA	Enzim Bağlantılı İmmünosorbent Testi
FAM	Florosein Amitit
FCoV	Feline Koronavirüs
FECV	Feline Enterik Koronavirüs
FİP	Feline İnfeksiyöz Peritonit
FİPV	Feline İnfeksiyöz Peritonit Virüsü
FİP	Forward Inner Primer
ICTV	Uluslararası Virüs Taksonomi Komitesi
IFA	İndirekt Floresan Antikor
IHC	İmmünohistokimya
LB	Loop Backward Primer
M	Membrane Protein
MERS	Orta Doğu Solunum Sendromu
N	Nucleocapsid Protein
nPCR	Nested Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
LAMP	Loop Mediated Isothermal Amplification
RT-PCR	Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu
S	Spike Glikoproteini
SAA	Serum Amiloid A
SARS	Şiddetli Akut Solunum Sendromu
°C	Santigrat Derece
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar
RdRp	RNA'ya Bağımlı RNA Polimeraz
RFU	Relative Fluorescence Unit

ÖZET

Feline Koronavirüs (FCoV) Moleküler Tekniklerle Karşılaştırmalı Analizi

Feline Koronavirüs (FCoV) enfeksiyonu, kedilerde ölümcül Feline İnfeksiyöz Peritonit (FİP) hastalığına yol açabilen önemli bir viral problemidir. Bu çalışmanın amacı, FCoV enfeksiyonunun tanısında kullanılan iki farklı moleküler tekniğin; virüsün S2 gen bölgesini hedef alan yeni geliştirilmiş Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) ve standart nested PCR (nPCR) yöntemlerinin tanısal performanslarını karşılaştırmalı olarak analiz etmektir. Bu kapsamda, 50 FİP şüpheli ve 10 sağlıklı kediden alınan asites, kan ve rektal sürüntü olmak üzere toplam 60 klinik örnek her iki moleküler yöntemle analiz edilmiştir. İncelenen 60 örneğin 15'i (%25) nPCR ile pozitif bulunurken, LAMP yöntemiyle 23 (%38,3) örnekte FCoV pozitifliği saptanmıştır. Geliştirilen LAMP testi nin, nPCR referans alındığında tanısal sensitivitesi %100, spesifisitesi ise %82,2 olarak hesaplanmıştır. Nested PCR'ın LAMP'e göre sensitivitesi %65,2, spesifisitesi %100 olarak hesaplanmıştır. LAMP testi, nPCR ile pozitif bulunan tüm örnekleri doğru bir şekilde tespit etmenin yanı sıra, nPCR'ın saptayamadığı 8 ek pozitif vaka daha belirlemiştir. Ayrıca, testin kolorimetrik ve florimetrik sonuçlarının tüm örneklerde birbiriyle tam uyumlu olduğu gözlemlenmiştir. Sonuç olarak, geliştirilen LAMP yöntemi FCoV RNA'sının saptanmasında nPCR'a göre üstün bir sensitivite göstermiş olup, özellikle pratik kolorimetrik formatı sayesinde klinik ve saha koşulları için nPCR'a kıyasla daha hızlı, hassas ve uygulanabilir bir alternatif olma potansiyeli taşımaktadır.

Anahtar Kelimeler: Feline İnfeksiyöz Peritonit, FİP, Feline Koronavirüs, FCoV, Moleküler Tanı, Nested PCR, LAMP.

ABSTRACT

Comparative Analysis of Feline Coronavirus (FCoV) by Molecular Techniques

Feline Coronavirus (FCoV) infection is a significant viral problem in cats, as it can lead to the fatal disease Feline Infectious Peritonitis (FIP). The aim of this study was to conduct a comparative analysis of the diagnostic performance of two different molecular techniques for the detection of FCoV: a newly developed Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) assay targeting the S2 gene region of the virus, and the standard nested PCR (nPCR) method. For this purpose, a total of 60 clinical samples—comprising ascites fluid, blood, and rectal swabs from 50 FIP-suspected and 10 healthy cats—were analyzed by both molecular methods. Of the 60 samples examined, 15 (25%) were found to be positive by nPCR, whereas the LAMP assay detected FCoV positivity in 23 (38.3%) samples. When nPCR was used as the reference method, the developed LAMP test was calculated to have a diagnostic sensitivity of 100% and a specificity of 82.2%. Conversely, when LAMP was considered the reference, the sensitivity of nPCR was calculated to be 65.2%, with a specificity of 100%. The LAMP assay correctly identified all samples that were positive by nPCR and, additionally, identified 8 more positive cases that nPCR failed to detect. Furthermore, it was observed that the colorimetric and fluorometric results of the LAMP test were in complete agreement across all samples. In conclusion, the developed LAMP method demonstrated superior sensitivity compared to nPCR for the detection of FCoV RNA. Its practical colorimetric format, in particular, suggests that this assay holds the potential to be a faster, more sensitive, and feasible alternative to nPCR for clinical and field conditions.

Keywords: Feline Infectious Peritonitis, FIP, Feline Coronavirus, FCoV, Molecular Diagnosis, Nested PCR, LAMP.

1. GİRİŞ

Coronaviridae ailesi, türler arası bulaşma ve yüksek mutasyon potansiyeli ile hem insan hem de hayvan sağlığını tehdit eden, RNA genomuna sahip önemli bir virüs ailesidir (Peck ve ark, 2015). Son yirmi yılda insanlarda ortaya çıkan Orta Doğu Solunum Sendromu (MERS), Şiddetli Akut Solunum Sendromu (SARS) ve özellikle tüm dünyayı etkisi altına alan COVID-19 pandemisi, bu virüs ailesinin küresel ölçekte ne denli ciddi bir risk taşıdığını ve bu virüslere karşı yeni tanı ve kontrol stratejilerinin geliştirilmesinin ne kadar hayati olduğunu açıkça ortaya koymuştur (Peck ve ark, 2015; Sweet ve ark, 2022). Bu ailenin bir üyesi olan Feline Koronavirüs (FCoV), veteriner hekimlik alanında önemli bir yere sahip olup, kedilerde yol açtığı Feline İnfeksiyöz Peritonit (FİP) hastalığı ile dikkat çekmektedir.

FCoV, dünya genelindeki kedi popülasyonlarında oldukça yaygın (endemik) bir patojendir (Addie ve ark, 2009). Genellikle kedilerde sadece hafif ve geçici enterit tablosuyla veya belirti göstermeden seyreden bu enfeksiyon, virüsün konakçı içinde spontan mutasyonlara uğramasıyla ölümcül bir hastalık olan FİP'e dönüşebilmektedir (Kipar ve Meli, 2014; Pedersen, 2014). FİP, klinik belirtileri ortaya çıktığında mortalitesi neredeyse %100 olan, özellikle genç kedilerde ve çok kedili yaşam ortamlarında (barınaklar, kedi evleri) görülen önemli bir hastalıktır (Pedersen, 2014; Sweet ve ark, 2022).

FİP'in bu ölümcül doğası, hastalığın erken ve doğru teşhisini kritik hale getirmektedir. Ancak mevcut tanı yöntemleri yeterli değildir ve önemli zorluklar barındırmaktadır. FİP tanısı, canlı bir hayvanda tek bir teste dayandırılmaz, birçok hastalığı taklit edebilen klinik bulguları nedeniyle veteriner hekimler için zordur ve karmaşık bir süreç gerektirir (Hartmann, 2005; Tasker, 2018). Serolojik testler, kediler arasında yaygın FCoV maruziyeti nedeniyle FİP'e özgü değildir ve tanısız değeri sınırlı kalmaktadır (Tasker, 2018). Kesin tanı ise, genellikle invaziv bir yöntem olan veya post-mortem uygulanan immünohistokimya (IHC) ile lezyonlu dokularda viral antijenin gösterilmesine dayanmaktadır (Hartmann, 2005). Bu durum, FİP şüphesi olan vakalarda, özellikle hastalığın erken evrelerinde, veteriner hekimler için büyük

bir tanısal zorluk yaratmaktadır. Bu boşluğu doldurmak amacıyla, viral nükleik asidi doğrudan tespit eden moleküler yöntemler ön plana çıkmaktadır.

Standart RT-PCR ve nested PCR gibi yöntemler uzun yıllardır kullanılmakla birlikte, zaman alıcı olmaları ve özel laboratuvar altyapısı gerektirmeleri gibi dezavantajlara sahiptir. Son yıllarda, bu limitasyonları aşmayı hedefleyen, sonuçları daha hızlı veren ve saha koşullarına daha uygun olan izotermal amplifikasyon teknikleri geliştirilmiştir (Stranieri ve ark, 2017). Bu tekniklerden biri olan Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP), FCoV tanısında umut vadeden yeni bir yaklaşım olarak dikkat çekmektedir (Stranieri ve ark, 2017; Tasker, 2018).

Bu tez çalışmasının amacı, FİP şüpheli kedilerden toplanan çeşitli klinik örneklerde (asites sıvısı, kan ve rektal sürüntü) FCoV varlığının tespiti için, virüsün S2 gen bölgesini hedef alan özgün tasarımı bir LAMP yöntemini (hem florimetrik hem de kolorimetrik) geliştirmek ve bu yöntemin tanısal performansını, literatürde kabul görmüş standart bir nested PCR yöntemi ile karşılaştırmalı olarak değerlendirmektir. Çalışmamızın hipotezi, stratejik primer tasarımı ile optimize edilen LAMP testinin, nPCR yöntemine kıyasla daha yüksek bir analitik duyarlılık sunacağı ve FİP tanısında daha pratik bir alternatif olabileceğidir.

2. GENEL BİLGİLER

Kedilerde oldukça yaygın olan Feline Koronavirüs (FCoV) enfeksiyonu genelde ishal gibi hafif bağırsak belirtilerine neden olur. Bununla beraber, FCoV enfeksiyonlarının yaklaşık olarak %10'luk bir kısmı, kediler için ölümcül bir hastalık olarak tarif edilen Feline İnfeksiyöz Peritonit (FİP) ile sonuçlanmaktadır (Tasker, 2018).

Feline İnfeksiyöz Peritonit (FİP) 1963 yılında Holzworth'un, bu hastalığı "kediler için önemli bir sorun" olarak tanımlamasıyla bilimsel literatüre girmiştir fakat başlangıçta FİP'in bulaşıcı özelliği fark edilse de, hastalığın hangi özgül patojenden kaynaklı olduğu o dönemde saptanamamıştır. Hastalığın etiolojisinin aydınlatılmasındaki önemli gelişme, Ward'ın FİP virusu (FİPV) içeren dokulardaki partiküllerin *Coronaviridae* ailesi üyelerine olan benzerliğini fark etmesiyle gerçekleşmiştir. 1972 yılında ise Montali ve Strandberg, FİPV enfeksiyonunun granülomatöz (kuru, parankimatöz) veya effüziv (ıslak, non-parankimatöz) olmak üzere iki farklı formda seyredebileceğini ilk kez rapor etmişlerdir. Bu temel keşifler, FİP'in günümüzdeki patogenezi, teşhisi ve tedavisine yönelik yapılan modern çalışmaların temelini oluşturmuştur (Pedersen, 2009).

2.1. Etiyoloji

Coronaviridae ailesine ismini elektron mikroskobu altındaki karakteristik görünümü, vermiştir. Latince 'taç' veya 'hale' anlamına gelmekte olan *corona* kelimesinden türetilen bu isim, virionların yüzeyinde bulunan projeksiyonların oluşturduğu ve güneşin korona tabakasını andıran imgeye atıfta bulunmaktadır. Standart virolojik taksonomiye uygun olarak, bir virus ailesini tanımlayan "-viridae" ekinin de eklenmesiyle ailenin tam bilimsel adı oluşturulmuştur (Peck ve ark, 2015; Woo ve ark, 2023)

Feline Koronavirüs'un (FCoV) Uluslararası Virus Taksonomi Komitesi (ICTV) tarafından belirlenen sınıflandırma sistemine dayanan güncel taksonomik konumu şu şekildedir. (Tablo 2.1) (ICTV, 2024).

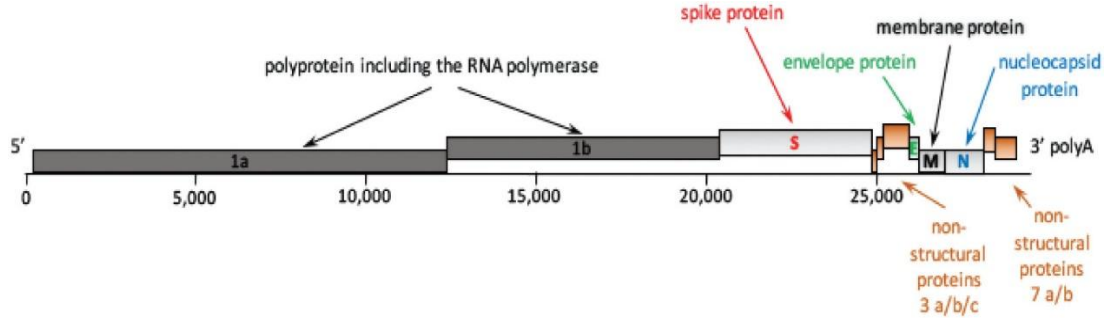
Tablo 2.1. Coronaviridae ailesindeki kedilerde enfeksiyonlara neden olan coronavirusların bulunduğu Alphacoronavirusları (ICTV, 2024)

TAKIM: Nidovirales
ALT TAKIM: Cornidovirineae
AİLE: Coronaviridae
ALT AİLE: Orthocoronavirinae
CİNS: Alphacoronavirus
ALT CİNS: Tegacovirus
TÜR: Alphacoronavirus 1
ALT TÜR: Canine coronavirus
ALT TÜR: Feline coronavirus
GENOTİP: Feline coronavirus genotip 1 (enteric)
GENOTİP: Feline coronavirus genotip 2 (infectious peritonitis)
ALT TÜR: Swine enteric coronavirus
ALT TÜR: Transmissible gastroenteritis virus

Bu sisteme göre FCoV; Nicoviridae takımı içerisinde yer alan Coronaviridae familyasına ait Orthocoronavirinae alt familyasındaki Alphacoronavirus cinsinin Tegacovirus alt cinsinde bulunan Alphacoronavirus 1 türü içerisinde sınıflandırılmaktadır (ICTV, 2024).

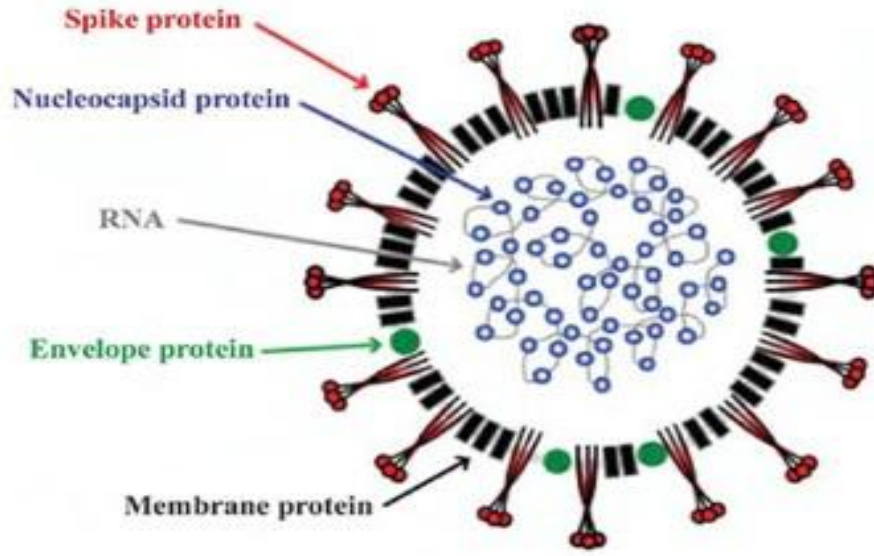
Feline Koronavirus (FCoV) zarflı ve tek sarmallı bir RNA virusudur (Pedersen, 2014). Patobiyolojik özelliklerine göre iki temel biyotipe ayrılan Feline Koronavirus'un (FCoV), genelde hafif klinik bulgularla sonuçlanan formu, Feline Enterik Koronavirus (FECV) olarak adlandırılır (Leibowitz ve ark., 2011; Sweet ve ark, 2022). Diğer biyotipi FECV'nin spontan mutasyonlarından meydana gelen feline infectious peritonitis virustur (FIPV) ve bu etken kedilerde sistemik Feline İnfeksiyöz Peritonit hastalığına neden olmaktadır. (Pedersen, 2014; Sweet ve ark, 2022). RNA virusleri, RNA'ya bağımlı RNA polimerazlarının (RdRp) kopyalama sırasındaki düşük doğruluğu (fidelity) nedeniyle doğalarından dolayı yüksek mutasyon oranlarına sahiptirler. Bu da, virus popülasyonlarının hızla evrimleşmesine ve yeni konak

türlerine adapte olabilen yeni fenotipler geliştirmesini mümkün kılmaktadır (Peck ve ark, 2015).



Şekil 2.1. FCoV genomunun yapısını ve farklı RT-PCR testleri tarafından hedeflenebilen gen bölgelerini (Spike, M, N, 7b vb.) gösteren şematik görüntü. (Tasker, 2018)

FCoV'un (Şekil 2.1) konak hücrelerini enfekte etme ve hastalığa yol açma kabiliyetinin temelinde, virüsün yüzeyinden dışarıya doğru uzanan ve ona özgü "taç" şeklini veren Spike (S) glikoproteini bulunmaktadır (Li, 2016). Yaklaşık olarak 180 kDa büyüklüğünde olan bu protein, virüsün konak hücreye girişini yönetmektedir ve virolojik olarak S1 ve S2 olmak üzere iki temel alt birime ayrılır (Li, 2016; Tasker, 2018). S proteininin yanı sıra üç temel yapısal protein daha içerir. Bunlar; virüsün bir araya gelmesi ve formunu oluşturmasında görev alan Membran (M) ve Zarf (E) proteinleri ile viral genomu bir kılıf gibi sararak paketleyen Nükleokapsid (N) proteinidir (Li, 2016; Peck ve ark, 2015). FCoV'un bu yüksek mutasyon yeteneği, bir RNA virüsü olmasının ve genomunu kopyalayan RNA polimeraz enziminin düşük doğruluğunun bir sonucudur (Peck ve ark, 2015).



Şekil 2.2. Koronavirüs virion yapısının şematik görüntüsü (Gao, 2023)

2.2. Epidemiyoloji

Feline İnfeksiyöz Peritonit (FİP), dünya çapında hem evcil hem de yabani kedigilleri hasta eden, ilerleyici ve çoğu zaman ölümcül sonuçlar doğuran sistemik bir hastalıktır (Hartmann, 2005). Hastalığın epidemiyolojisi, FCoV'un (Şekil 2.2) oldukça bulaşıcı yayılım dinamikleri ve virusun konakçı vücuttaki mutasyonunu tetikleyen risk faktörleri ile şekillenir (Addie ve ark, 2009). FİP kedilerde sıklıkla gözlenen ve çok kedili ortamlarda yaşayan kedilerin %90'ının enfekte olduğu bir hastalık etkenidir (Tasker, 2018).

FCoV enfeksiyonu, dünya çapında yaygın olmakla birlikte neredeyse tüm kedi popülasyonlarında endemik olarak bulunmaktadır (Sweet ve ark, 2022). Kedilerin yaşam koşulları ve popülasyon yoğunluğuna bağlı olarak virusun ne sıklıkla görüldüğü büyük farklılıklar gösterebilmektedir. Tek başına yaşamakta olan kedilerde seroprevalans %10-50 arasında değişmekte iken çok kedili evler, barınaklar gibi ortamlarda bu oran %80-100'e kadar çıkabildiği söylenmiştir (Hartmann, 2005; Tasker, 2018). Tasker (2018), çalışmasında FCoV ile enfekte kedilerin FİP geliştirme oranının yaklaşık %5-10'u kadar olduğunu söylemiştir.

FCoV'un başlıca bulaşma yolu fekal-oral yoldur. Bu durumda virus, enfekte kedilerin dışkılarıyla dışarı atılır ve sağlıklı kediler tarafından ağız yoluyla alınır (Tasker, 2018). Ortak kum kapları, virusun yayılmasında kritik bir rol üstlenmektedir. Virus yayılması enfeksiyondan sonraki ilk hafta içinde başlamaktadır ve bazı kedilerde ömür boyu sürebilmektedir. Bu sürekli virus yayan kediler, popülasyondaki enfeksiyonun devamlılığı için ana kaynak olarak değerlendirilmektedir (Foley ve ark, 1997).

Pedersen (2014), yaptığı çalışmada vakaların en çok görüldüğü yaş aralığını 4-16 aylık kediler olarak belirtmiştir. Yapılan çalışmalarda melez kedilerin safkan kedilere göre FİP geliştirme olasılığı daha düşük olduğunu ayrıca Abyssinian, Bengal, Birman, Himalayan ve Ragdoll gibi safkan ırkların daha büyük risk altında olduğu belirtilmiştir (Pesteanu-Somogyi ve ark, 2006). Kalıtsal yatkınlığın, FİP vakalarının yaklaşık olarak %50'sinde rol oynadığı tahmin edilmektedir (Pedersen, 2009).

2.3. Patogenez

Feline İnfeksiyöz Peritonit (FİP) patogenezini, virus ve konakçı arasındaki karmaşık etkileşimlere dayanmaktadır. Bu hastalığın gelişimi, büyük ölçüde kedinin bağışıklık yanıtının özelliklerine ve gücüne bağlıdır (Kipar ve Meli, 2014; Sweet ve ark, 2022). Hastalık, kedilerde sıkça rastlanan ve genelde sindirim sisteminde hafif belirtilerle kendini gösteren Feline Enterik Koronavirüs'ün (FECV), konakçı organizmasında internal mutasyona uğrayarak Feline Enfeksiyöz Peritonit Virüsü (FİPV) adı verilen patojenik bir forma dönüşmesiyle başlar (Pedersen, 2014). Bu dönüşüm, FİP'in gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır ve virüse, hastalığın vücutta yayılmasını sağlayan makrofajları ve monositleri enfekte etme yeteneği kazandırır (Rottier ve ark, 2005; Tasker, 2018).

2.3.1. Viral Mutasyon ve Makrofaj Tropizminin Kazanılması

İnternal mutasyon hipotezi, FİP patogenezinin temeli olarak bilinen bir teoridir (Vennema ve ark, 1998). Yaygın şekilde bulunan Feline Enterik Koronavirüs (FECV) bu hipoteze göre enfekte kedilerin organizmalarında çeşitli mutasyonlar geçirmektedir. Özellikle virusun hücrelere tutunmak için ihtiyaç duyduğu Spike (S)

proteini bu mutasyonlardan etkilenir ve bu değişiklikler S proteininde virusun hedef olarak aldığı hücre tipini yani hücre tropizmini değiştirmektedir (Rottier ve ark, 2005). Kan dolaşım yolları ile tüm vücuda yayılabilen makrofajlar sayesinde virus bu hücreleri birer “taşıyıcı” veya “Truva atı” gibi kullanabilir olmaktadır ve sistemik bir enfeksiyona neden olur ayrıca bu yöntem ile vücudun diğer organlarına (karaciğer, böbrekler, merkezi sinir sistemi, gözler vb.) ulaşabilmektedir (Kipar ve Meli, 2014).

Bu değişimin sayesinde virus, monositleri ve makrofajları güçlü bir şekilde enfekte etme yeteneği kazanmaktadır (Pedersen, 2009; Rottier ve ark, 2005; Tasker, 2018).

2.3.2. İmmün Sistemin Rolü ve Hastalığın Şekillenmesi

Kipar ve Meli (2014), yaptıkları çalışmalarında FİP’in en hasar verici etkisinin, virüsün doğrudan yol açtığı hücre hasarından (sitopatik etkiden) ziyade, konağın virüse karşı oluşturduğu etkisiz ve aşırı bağışıklık yanıtından kaynaklandığını belirtmişlerdir. Virusa karşı üretilen antikorların hastalığın gelişimini engellemek yerine daha da kötüleştirmesi FİP patogenezinin en dikkat çekici yönlerinden biri olarak belirtilmiştir (Pedersen, 2009).

FİPV’ye karşı oluşan antikorlar, doğrudan virüs partiküllerine tutunur. Antikorla kaplanmış bu virüsler, daha sonra makrofaj yüzeyindeki Fc reseptörlerine bağlanır ve bu bağlanma sayesinde kolayca hücre içine alınır (Pedersen, 2009). Bu olay, "Antikora Bağımlı Enfeksiyon Güçlenmesi" (ADE) olarak isimlendirilmektedir ve virusun makrofajlar içerisindeki replikasyonunu arttırarak daha şiddetli bir hastalık tablosuna yol açmaktadır (Pedersen, 2009; Sweet ve ark, 2022).

FİP’in temelinde yatan patolojinin vaskülit yani damar iltihabı olduğu belirtilmiştir (Sweet ve ark, 2022). Enfekte olan makrofajlar çoğunlukla küçük toplardamarların etrafında toplanarak kompleman sisteminin aktive olmasına sebep olur ve bölgenin nötrofil ve lenfosit gibi bağışıklık hücrelerince zenginleşmesiyle şiddetli bir inflamatuvar reaksiyon tektiklenir. Bu tepki, damar duvarlarında hasara (nekrotizan flebit) ve plazmanın damar dış ortamına sızmasına yol açar. Hastalığın

ıslak formunda vücut boşluklarında görülmekte olan protein açısından zengin bu sıvı plazmanın damar dış ortamına sızmasından meydana gelmektedir. Bu hücrel odakların "piyogranülom" adı verilen tipik FİP lezyonlarını meydana getirdiği söylenmiştir (Pedersen, 2009).

2.4. Klinik Formların İmmünolojik Temeli ve Detayları

Feline İnfeksiyöz Peritonit (FİP) gelişiminde konağın bağışıklık sistemi kritik bir rol oynar (Kipar ve Meli, 2014). T hücreleri aracılığıyla ortaya çıkan etkili bir hücrel bağışıklık yanıtı, FİP'e karşı koruyucu bir rol oynarken; bu yanıtın zayıf veya yetersiz olması hastalığın gelişmesine yol açmaktadır (Kipar ve Meli, 2014; Sweet ve ark, 2022).

Feline İnfeksiyöz Peritonit (FİP), temel olarak iki ana klinik formda seyretilmektedir. Bunlar ıslak (effüziv) ve kuru (non-effüziv) formlardır (Kipar ve Meli, 2014). FİP'e karşı gelişmiş olan bağışıklık yanıtının kalitesi, hastalığın hangi klinik formda (ıslak veya kuru) ortaya çıkacağını belirleyen en önemli unsurdur (Pedersen, 2009).

2.4.1 Efüsiv Olmayan Form (Kuru Form)

Konağın viruse karşı kısıtlı ancak etkisiz bir hücrel bağışıklık yanıtı geliştirdiği durumlarda şekillenmekte olan forma Efüsiv Olmayan Form (Kuru Form) denmektedir (Pedersen, 2009). Bu kısmi bağışıklık yanıtı, virusun kontrolsüz bir şekilde yayılmasını engelleyerek yaygın vaskülit ve sıvı sızıntısını sınırlandırır. Bununla birlikte virüsle enfekte makrofajların çevresinde toplanan bağışıklık hücreleri organların parankiminde daha organize ve katı piyogranülom yapılarının oluşmasına yol açar. Bağışıklık sisteminin virüsü belirli bir bölgede hapsedme ve sınırlama çabası bu lezyonların oluşumuna sebep olur (Pedersen, 2009; Rottier ve ark, 2005)

Hastalığın kuru formu genellikle haftalar veya aylar süren, sinisi ve yavaş bir şekilde ilerleyen kronik bir hastalıktır (Tasker, 2018). Klinik belirtiler, etkilenmiş olan organ veya organ sistemlerine bağlı olarak oldukça değişkenlik gösterebilmektedir. Bu

değişkenlikten dolayı kuru formun tanısını ıslak forma göre daha zor olabilir (Sweet ve ark, 2022).

Bu formda lezyonlar çok çeşitli organları etkileyebilir ama özellikle merkezi sinir sistemi (MSS) ve gözler en çok etkilenen bölgelerdir. Kuru form vakalarının önemli bir miktarında nörolojik belirtiler gözlemlenmektedir (Kipar ve Meli, 2014; Sweet ve ark, 2022). Lezyonlar beyin zarlarında (meningitis), beyin ventriküllerinin astarında (ependimit) ve beyin parankiminde oluşabilir (Pedersen, 2009). En çok gözlemlenen nörolojik belirtiler arasında ataksi (dengesizlik), nistagmus (göz titremesi), nöbetler, davranış değişiklikleri ve arka bacaklarda felç (paraparezi) yer alabilmektedir (Tasker, 2018). Beyin-omurilik sıvısı (BOS) analizinde genelde yükselmiş protein seviyeleri ve hücre sayısı (pleositoz) saptanmıştır (Ives ve ark, 2013). Ataksi (dengesizlik), kafa eğikliği, nistagmus (göz titremesi), nöbetler ve davranış değişiklikleri gibi merkezi sinir sistemi bulguları sıkça rapor edilmiştir (Sweet ve ark, 2022; Tasker, 2018).

En sık rastlanan göz bulguları arasında anterior ve/veya posterior uveitis (gözün iç katmanlarının iltihabı) ve korioretinit yer almaktadır. Bu durum, iris rengi değişimine, korneada birikintilere (keratik presipitatlar) ve bulanık bir görünüme yol açabilmektedir (Sweet ve ark, 2022; Tasker, 2018). Gözün arka kısmında ise korioretinit (retina ve koroid tabakasının iltihabı) görülebilmektedir (Pedersen, 2009).

Abdominal bölgede fiziksel muayene esnasında böbreklerde büyüme ve düzensizlik (renomegali) veya mezenterik lenf düğümlerinde büyüme palpe edilebilmektedir (Tasker, 2018). Bu dokular ultrasonografik muayenede kitle benzeri yapılar olarak görülebilir (Kipar ve Meli, 2014). Nadiren, deride kaşıntısız papüller veya nodüllerle karakterize kutanöz (deri) lezyonlar da bildirilmiştir (Tasker, 2018).

2.4.2. Efüsiv Form (Islak Form)

Hastalığın ıslak formu, konağın virüse karşı zayıf veya etkisiz bir hücresel bağışıklık yanıtı vermesi durumunda ortaya çıkar (Pedersen, 2009). T hücreleri, virüsle enfekte olmuş makrofajları etkili bir şekilde yok edemez ve konak güçlü bir humoral

(antikor) yanıt geliştirir. Bu süreçte üretilen antikorlar, “Antikora Bağımlı Güçlendirme” (ADE) mekanizması aracılığıyla virüsün makrofajlara girişini kolaylaştırmakta ve hastalığın seyrini ağırlaştırmaktadır (Kipar ve Meli, 2014; Pedersen, 2009; Sweet ve ark, 2022). Kontrolsüz viral replikasyon ve aşırı immün yanıt, FİP patolojisinin temelinde yer alan yaygın ve ağır bir damar iltihabı (vaskülit) tablosunu tetiklemektedir (Hartmann, 2005; Rottier ve ark, 2005). Hasar gören damarlardan protein ve fibrin bakımından zengin plazmanın vücut boşluklarına sızması, ıslak form FİP'in en belirgin özelliği olan efüzyonların oluşmasına yol açar (Pedersen, 2009).

Islak FİP, genellikle hızlı bir şekilde gelişen ve FİP vakalarının en yaygın görülen türü olarak bilinir; bazı araştırmalara göre vakaların %80'ine kadarını oluşturduğu belirtilmiştir. Hastalığın seyri çoğunlukla birkaç gün ya da hafta içerisinde hızla ilerler ve prognozu oldukça kötüdür (Tasker, 2018).

Sıvı birikimi en sık karın boşluğunda (asites) görülür ve bu durum kedilerin karınlarında belirgin bir şişliğe neden olmaktadır. Göğüs boşluğunda meydana gelen sıvı birikimi, plevral efüzyon olarak adlandırılır ve bu da solunum güçlüğüne, yani dispneye yol açabilir (Pedersen, 2009). Ayrıca, perikardiyal boşlukta (kalp zarı çevresinde) veya erkek kedilerde testisleri çevreleyen tunikalarda da sıvı birikimi gözlemlenebilir, ancak bu durumlar daha seyrektir (Tasker, 2018). Genel klinik bulgular arasında tedaviye yanıt vermeyen dalgalı ateş, iştahsızlık (anoreksi), kilo kaybı ve belirgin letarji (durgunluk) yer alabilmektedir (Riemer ve ark, 2016; Sweet ve ark, 2022).

Bu sıvı tipik olarak saman sarısı rengine, berrak veya hafif bulanık, viskoz (yumurta akı kıvamında) ve yapışkan bir yapıdadır (Kipar ve Meli, 2014). Düşük Albumin/Globulin oranı ($<0,4$) ve yüksek protein içeriği (3,5 g/dL) ile karakterizedir (Norris ve ark., 2005). Rivalta testi gibi basit testler, sıvının bu eksudat (iltihaplı sıvı) niteliğini doğrulamada yardımcı olabilir (Sweet ve ark, 2022).

Efüzyonun yanı sıra, ıslak form FİP vakalarında sarılık (ikterus) sıkça karşılaşılan bir bulgudur ve bu genellikle serum bilirubin seviyelerindeki artıştan

kaynaklanır (Norris ve ark, 2005). Nekropsi bulgularında ise, karın ve göğüs organlarının serozal yüzeylerinde (dış zarlarında) fibrin iplikçikleriyle birlikte, küçük beyaz-gri renkli piyogranüloamatöz odaklar gözlenmektedir (Pedersen, 2009).

2.5. Tanı

FİP tanısı, veteriner hekimliğin en zorlu alanlarından birini oluşturur; bir hayvanda hastalığı kesinlikle doğrulayacak tek bir test bulunmamaktadır (Hartmann, 2005; Sweet ve ark, 2022). FİP'in klinik belirtileri ve laboratuvar bulguları birçok başka hastalıkla (örn: lenfoma, toksoplazmoz, sistemik mantar enfeksiyonları, lenfositik kolanjit) karıştırılabilen "taklitçi" bir hastalıktır. Bu sebeble ne yazık ki tanı süreci yalnızca bir test sonucuna indirgenemez. Bunun yerine, bir çok bulgunun bir araya getirilmesiyle oluşturulan kapsamlı bir kanıtlar setine dayanır. Bu bütünsel yaklaşım, hayvanın anamnezi, fiziksel muayene bulguları, klinikopatolojik, virolojik ve moleküler testlerin dikkatlice değerlendirilmesi sayesinde tamamlanabilir (Tasker, 2018).

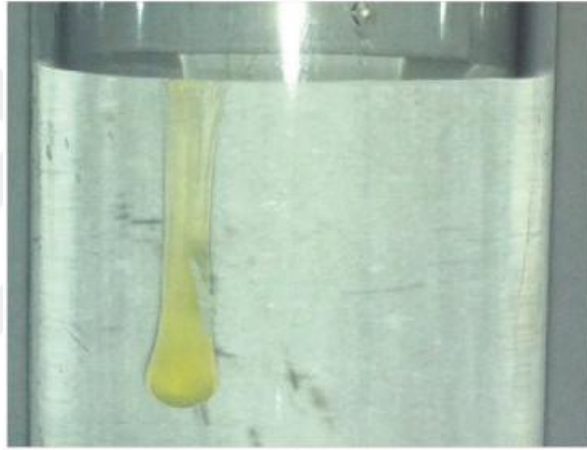
2.5.1 Klinik, Patolojik ve İndirekt Tanı Yaklaşımları

Pedersen (2014), yaptığı çalışmasında FİP şüphesi, çoğunlukla 4-36 aylık kedilerde, kedi evleri veya barınaklar gibi kedi sayısının çok olduğu yerlerden gelen, antibiyotiklere yanıt vermeyen inatçı ve ateşi belirli aralıklarla yükselip normale dönen bir kedi öyküsü ile ortaya çıkar ayrıca karında şişkinlik (asites), solunum güçlüğü (plevral efüzyon), sarılık, uveitis veya çeşitli nörolojik belirtiler bu şüpheyi kuvvetlendirir demiştir.

FİP'in sistemik inflamatuvar karakterini hematoloji ve serum biyokimyası gibi temel bulgular ortaya koymaktadır. En yaygın gözlenen bulgular arasında, hastalığın kronik doğasına bağlı gelişen non-rejenaratif anemi, belirgin lenfopeni ve nötrofili yer almaktadır (Hartmann, 2005; Riemer ve ark, 2016). Biyokimyasal incelemelerde ise, tipik olarak hipoalbuminemi ile birlikte seyreden poliklonal hiperglobulinemi öne çıkmaktadır (Pedersen, 2014; Riemer ve ark, 2016). Geniş kapsamlı bir retrospektif çalışmada, FİP vakalarının %89'unda hiperglobulinemi ve %64,5'inde hipoalbuminemi bildirilmiştir (Riemer ve ark, 2016). Bunun doğal sonucu olarak,

Albumin/Globulin (A/G) oranının 0,4'ün altına inmesi, FİP tanısı için yüksek düzeyde anlamlı kabul edilmektedir (Norris ve ark, 2005). Ayrıca hastalığın ıslak formunda, karaciğer enzimlerinde belirgin bir artış olmaksızın görülen hiperbilirubinemi de karakteristik bir bulgu olarak tanımlanabilir (Riemer ve ark, 2016).

Islak FİP şüphesinde, efüzyon sıvısının elde edilmesi tanı için oldukça önemli bir adımdır. Bu sıvının analizi için Rivalta testi (Şekil 2.3) uygulamak pratik bir yaklaşımdır (Tasker, 2018). Pozitif bir Rivalta testi, sıvının protein açısından zengin bir eksudat olduğunu göstermektedir ve %93 gibi yüksek bir negatif prediktif değere sahiptir (Fischer ve ark, 2012).

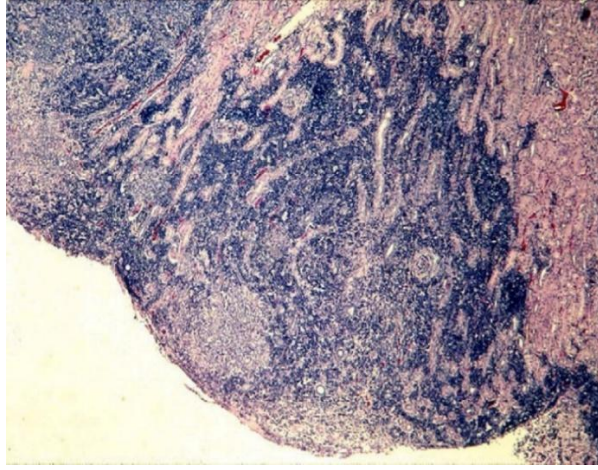


Şekil 2.3. Pozitif rivalta testi. (Tasker, 2018)

Biyokimyasal analiz genellikle sıvının yüksek protein içeriğini (35 g/L) gösterirken, sitolojik incelemede düşük hücresellik (<5000 hücre/ μ L) ve baskın olarak makrofajlar ile non-dejeneratif nötrofillerin görülmesi tipiktir (Hartmann, 2005).

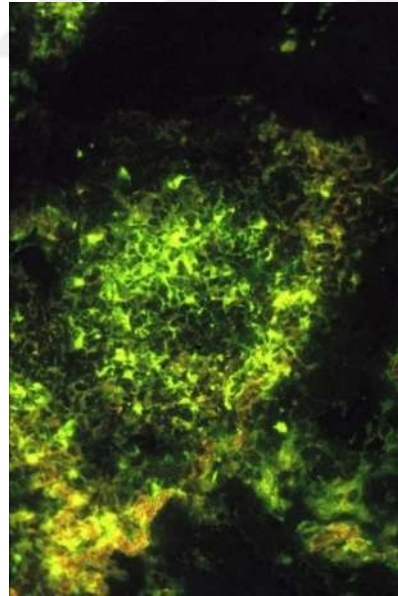
2.5.2. Doğrulayıcı, Virolojik ve Moleküler Tanı Yaklaşımları

FİP'in kesin ve güvenilir tanısı, etkilenen dokulardan alınan biyopsi örneklerinin incelenmesine dayanmaktadır (Hartmann, 2005; Paltrinieri ve ark, 1999). Histopatolojik olarak, lezyonlar damarın çevresinde bulunan piyogranülomlar şeklinde ortaya çıkar (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Efüsiv olmayan form FİP olgusunda, böbrek parankimindeki tipik piyogranülomatöz lezyon. (Pedersen, 2009)

Tanının kesinleşmesi bu lezyonlar içindeki makrofajlarda FCoV antijeninin, spesifik monoklonal antikorlar (örn: FİPV3-70) kullanılarak immünohistokimya (IHC) ile gösterilmesiyle olur (Şekil 2.5). Bu test oldukça özgül olsa da, invaziv olması veya genellikle post-mortem uygulanması en büyük kısıtlamasıdır (Hartmann, 2005).



Şekil 2.5. Bir piyogranülom içindeki makrofajlarda FCoV antijeninin immünofloresan boyama ile parlak yeşil renkte pozitif olarak saptandığını gösteren mikroskopik görüntü (Pedersen, 2009)

FCoV antikor testleri (IFA, ELISA), bir kedinin FİP'e sahip olduğunu kesin olarak belirtmez. Bu testler yalnızca kedinin FCoV ile karşılaştığını

gösterebilmektedir. Özellikle çok sayıda kedinin bulunduğu ortamlarda yaşayan sağlıklı kedilerin büyük bir kısmı zaten seropozitif durumdadır. Bu sebeble antikor testleri FİP tanısı koymak için yeterince güvenilir değildir (Tasker, 2018).

Günümüzde FİP şüphesinde en güçlü kanıtları sunan yöntemler, viral nükleik asit tespitine dayanan moleküler tekniklerdir (Tasker, 2018). Örneklerde virüsün genetik materyali olan RNA'yı belirlemek için ters transkriptaz PCR (RT-PCR) yöntemi kullanılır. FCoV genomu üzerindeki farklı gen bölgeleri (örn: 7b geni, M geni veya S geni) hedeflenebilir (Şekil 2.1). RT-PCR testleri, virüsün replikasyonu sırasında bol miktarda üretilen subgenomik mRNA'ları da saptayabilen ve 3' ucuna yakın M veya N genlerini hedefleyen primerler kullandığında bu testler daha hassas sonuçlar verebilmektedir. Bu testler FCoV'u saptar ancak FİPV ve FECV arasında ayırım yapamamaktadır (Sangl ve ark, 2020; Tasker, 2018).

RT-PCR'nin tanısal değeri en fazla olan örneklerdir. Efüzyon veya BOS sıvısında FCoV RNA'sının tespit edilmesi, özellikle yüksek viral yük durumunda, FİP açısından oldukça kuvvetli bir kanıt olarak görülmektedir. Çalışmalar, bu örneklerde testin özgüllüğünün %100'e yakın olarak ölçüldüğünü göstermektedir (Doenges ve ark, 2016; Longstaff ve ark, 2017). Buna karşılık kanda (serum, plazma veya lökositler) RT-PCR uygulanması FİP tanısı için güvenilir kabul edilmemektedir. FİP'li kedilerde viremi her zaman saptanamayabilir ve sağlıklı FCoV taşıyıcısı kedilerde de geçici viremi görülebilmektedir (Can-Sahna ve ark, 2007). Dışkıda RT-PCR yapılması FİP tanısı için anlamlı değildir ve kedinin o dönem FCoV saçtığını göstermektedir (Pedersen, 2009). Son dönemlerde, klinik ortamlarda daha hızlı sonuçlar elde etmeyi hedefleyen LAMP (Loop Mediated Isothermal Amplification) gibi yeni yöntemler ortaya çıkmıştır (Stranieri ve ark, 2017; Tasker, 2018).

FİP tanısında moleküler yöntemlerin en gelişmiş ve en çok tartışılan alanı, virüsün genetik yapısındaki belirli değişikliklerin incelenmesine yöneliktir. Bu incelemelerin odak noktasında virüsün konak hücreye girişini ve hücre tropizmini belirleyen Spike (S) glikoproteini yer almaktadır (Li, 2016). S proteini, virusun konak hücreye girişini yöneten kilit bir yapıdır ve reseptör tanımadan sorumlu S1 ile membran füzyonundan sorumlu S2 alt birimlerinden oluşur. Virusun hücreye

girebilmesi için, S1/S2 birleşme noktasında ve S2 alt birimi içindeki S2' füzyon peptidinin başında olmak üzere iki ayrı bölgede proteolitik olarak parçalanması büyük bir öneme sahiptir (Longstaff ve ark, 2017). FİP patogenezinin, zararsız FECV'nin S geninde meydana gelen mutasyonlarla başladığı ve bu mutasyonların virüse makrofajları enfekte etme yeteneği kazandırdığı düşünülmektedir (Rottier ve ark, 2005). Bu bağlamda, S proteinin füzyon peptidini kodlayan bölgedeki M1058L ve S1060A gibi spesifik amino asit değişikliklerinin, FİP'e özgü birer "moleküler imza" olabileceği hipotezi ortaya atılmıştır (Chang ve ark, 2012). Sonrasında gerçekleştirilen incelemelerde bu mutasyonların FİP hastalığına özgü olmadığını, virüsün bağırsak dışına çıkıp sistemik olarak yayılma yeteneği ile bağlantılı olduğunu göstermiştir. Bu mutasyonlar sistemik FCoV enfeksiyonu olan anca FİP gelişimi gözlenmeyen sağlıklı kedilerde de bulunabildiği söylenmiştir (Porter ve ark, 2014). Bu sebeple, Spike geni mutasyon analizi tek başına FİP tanısı koyduramamaktadır ve RT-PCR'a ek olarak yapılmasının tanısal faydası kısıtlıdır. Bir çalışmada, FCoV RNA'sı tespit edildikten sonra yapılmış olan mutasyon analizinin tanının doğruluğunu belirgin bir şekilde artırmadığı, aksine düşük virüs yükü gibi faktörler nedeniyle testin hassasiyetini düşürebileceği gösterilmiştir (Felten ve ark, 2017).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Örnekler

Bu çalışmada, Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi (MAKÜ) Hayvan Hastanesi'ne getirilen toplam 60 kediden (50'si klinik olarak Feline İnfeksiyöz Peritonit şüpheli ve aşısız, 10'u sağlıklı) toplamda 25 adet asites sıvısı, 23 adet kan örneği ve 12 adet rektal sürüntü temin edilmiştir. Örnekler test edilinceye kadar -80°C derin dondurucuda saklanmıştır. Örneklemeye çalışmaları, her yaş aralığından, cinsiyetten ve ırktan oluşan kedilerden yapılmıştır (Tablo 3.1). Örnekler test edilinceye kadar -80°C derin dondurucuda saklanmıştır. Çalışma için etik kurul belgesi Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan 29.11.2023 tarih ve 1223 sayılı kararınca alınmıştır.

Tablo 3.1. Örneklenen kedilerin ırklara göre dağılımı

İrk	Cinsiyet	Yaş (ay)	Adet
Melez	Erkek	(6-48)	17
Melez	Dişi	(3-48)	13
Ankara	Erkek	(6-18)	2
Ankara	Dişi	(7-36)	3
Scottish cat	Erkek	(3-36)	6
Scottish cat	Dişi	(6-24)	3
British cat	Erkek	(3-48)	4
British cat	Dişi	(5-48)	7
Van	Erkek	(7-36)	3
Van	Dişi	(6-24)	2

3.1.2. PCR Materyalleri

3.1.2.1. Kontrol Viruslar

FCoV PCR testleri için pozitif kontroller hedef gen fragmentleri SUGENOMİK BİYOTEKNOLOJİ firmasına (Ankara) sentetik olarak sentez ettirilmiştir ve bu sentetik fragmentler testlerde pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

3.1.2.2. Viral RNA İzolasyonu

3.1.2.2. Total RNA izolasyonu için ticari trizol solüsyonuna (GeneAll® RiboEx™, Güney Kore) ek olarak kloroform (Sigma, ABD), izopropil alkol (Sigma, ABD) ve etanol (Sigma, ABD) gibi saf kimyasallar kullanıldı. Ticari firmanın önerdiği RNA ekstraksiyon prosedürleri soğutmalı santrifüj (Hettich, Almanya) ile yürütüldü.

3.1.2.3. cDNA Sentezi

İzole edilen viral RNA'lerden cDNA elde edilmesi amacıyla ticari bir kit olan ABScript III RT Master Mix for qPCR (Katalog No: RK20428; ABclonal, Güney Kore) kullanılmıştır.

3.1.2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Bu amaçla A.B.T.™ 2X PCR MasterMix (with BlueDye) (A.B.T. Laboratory Industry, cat no: P01-02-05; Türkiye) kullanıldı. Kitin içeriğinde; solüsyonlar sırasıyla 5X Green Go Taq Flexi Buffer, MgCl₂ (25mM), dNTP (10mM), Go Taq Flexi DNA Polymerase bulunmaktadır. PCR mixi test prosedürüne göre hazırlandı.

3.1.2.5. Primerler

Sağlıklı ve FİP şüpheli aşısız kedilerden toplanan rektal sürüntü, kan, asites örnekleri de FCoV varlığının nested yöntemi ile belirlenmesinde kullanılan primerlerin dizilimleri, seçtikleri gen bölgesi ve PCR ürünlerinin bant büyüklükleri aşağıdaki tabloda belirtilmiştir (Tablo 3.2).

Tablo 3.2. Nested PCR çalışmalarında kullanılan primerler (Herrewegh ve ark. 1995).

Hedef Virus	Sekans	Ürün Fragment Büyüklüğü
FCoV (1.Round)	P205 (Forward) 5'-GGCAACCCGATGTTTAAAAC TGG-3'	223 bp
	P211 (Reverse) 5'-CACTAGATCCAGACGTTAGC TC -3'	
FCoV (2.Round)	P276 (Forward) 5'-CCGAGGAATTACTGGTCATC GCG-3'	177bp
	P204 (Reverse) 5'-GCTCTTCCATTGTTGGCTCGT C3'	

3.1.3. LAMP Materyalleri

Tez çalışmasında kullanılan kolorimetrik ve florimetrik LAMP tekniği SUGENOMİK BİYOTEKNOLOJİ firması ile birlikte tasarlanmış ve geliştirilmiştir. Tamami ile bu çalışma için geliştirilmiş özgün bir tekniktir.

3.1.3.1. LAMP Primerleri

Çalışmada kullanılan LAMP primerleri özgün olarak SUGENOMİK BİYOTEKNOLOJİ firması ile birlikte tasarlanmıştır. FCoV 'un S2 gen bölgesini hedef alan üç çift primer dizayn edilmiştir. Geliştirilen FCoV LAMP primerleri aşağıdaki tabloda sunulmuştur (Tablo 3.3).

Tablo 3.3. Geliştirilen FCoV LAMP primerleri (S2 gen bölgesi)

Primer Adı	Nükleotid Dizisi (5'-3')
F3	GCTCTATCTGCACAAGCA
B3	ACTAATTGCACGTCTGTCA
FİP	CCGTGTGATTTACAAACTCAAACATTAACGATGAAATA GTTGGAGCT

Tablo 3.3. (Devam) Geliştirilen FCoV LAMP primerleri (S2 gen bölgesi)

BIP	CACGTAGGTCAACAGTCGAAACACGATGTGTCATTATT CCTT
LB	GTACAAACCTACACTATGCCGCA

3.2. Yöntem

3.2.1. Rektal Sürüntü Örneklerinin ve Asites Sıvısının Hazırlanması

Numuneler, steril ticari sürüntü çubukları kullanılarak içerisinde antibiyotikli PBS bulunan tüpler içerisine toplanmıştır. Asites sıvısı ise, akışkan ise direk olarak ekstraksiyonda kullanıldı; yoğun ise, yoğunluğuna göre 1/2-1/4 oranında PBS ile sulandırılmıştır. Karıştırıcı kullanılarak iyice homojenleştirildi ve ardından tüm sıvı, steril 2 ml'lik mikrotüplere aktarılmıştır. Santrifüj işlemi, +4 °C'de 3000 devirde 20 dakika süresince gerçekleştirilmiştir. Elde edilen supernatanlar, nükleik asit ekstraksiyonu yapılana kadar -80 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.2. Kan Örneklerinin Hazırlanması

Kedilerden jugular venden alınan periferik kan örnekleri, etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) içeren tüplere toplanmıştır. Bu kan örnekleri, 2000 devir/saniye hızında 10 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Lökosit tabakası ayrıldı ve steril 2 ml'lik tüplere, içerisinde Biochrom marka Phosphate-Buffered Saline (PBS) bulunan mikrotüplere aktarıldı. Sonra, 4°C 'de 10 dakika süreyle 2000 devir/saniye hızında tekrar santrifüj edildi. Dipte biriken lökositler tekrar toplanmış ve üzerlerine PBS eklenerek 2000 devir/saniye hızında 10 dakika süreyle 4°C 'de yeniden santrifüj edildi. Bu işlem bir kez daha tekrarlandı ve dipte kalan lökositlerin üzerine 1 ml antibiyotikli PBS ilave edildi. Lökosit örnekleri nükleik asit ekstraksiyonu yapılınca kadar -80 °C'de stoklanmıştır.

3.2.3. RNA İzolasyonu

Viral nükleik asit izolasyonu Riboex Total RNA isolation solution (GeneAll®, cat no: 301-001; Güney Kore) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu solüsyon ile

inokulumlardan viral RNA ekstrakte edilmiştir. Bu amaçla -80°C’ de saklanan inokulumlar çıkarılmış ve çözünmesi için oda ısısında bekletilmiştir. Kit prosedürüne göre RNA ekstaksiyonu yapılmıştır. Buna göre;

1. Her bir inokulumdan 250µl alınarak steril ependorflara alındı.
2. Ependorflara 750µl trizol solusyonu eklendi.
3. Ependorftaki karışımlar 5 dk oda ısısında inkübe edildi ve -80°C’de donduruldu.
4. Dondurulmuş karışımlar oda ısısında çözündürüldü.
5. Ependorflara 200µl chloro
6. form ilave edildi ve 15sn çalkalandıktan sonra 2dk oda ısısında inkübe edildi.
7. Ependorflar +4°C’de 12.000 x g’de 15 dk sanrifüj edildi.
8. Akuatik faz temiz ependorflara alındı.
9. Ependorfların üzerine 500µl isopropanol eklendi ve 10dk oda ısısında inkübe edildi.
10. Ependorflar +4°C’de 12.000 x g’de 10 dk sanrifüj edildi.
11. Supernatantlar atıldı.
12. Peletlerin üzerine 1000µl %75’lik etanol eklendi ve vortexlendi.
13. Ependorflar +4°C’de 7500 x g’de 5 dk sanrifüj edildi.
14. Supernatantlar atıldı.
15. Ependorflar +4°C’de 7500 x g’de 5 dk sanrifüj edildi.
16. Supernatantlar atıldı.
17. Peletler 5-10 dk kurumaya bırakıldı.
18. Ependorflara 30µl RNase-free su ilave edildi ve blok ısıtıcıda 58°C’de çözündürüldü.
19. Viral nükleik asit ekstraktları testin yapılacağı zamana kadar -80°C’de saklanmıştır.

3.2.4. cDNA Sentezi

RNA örneklerinden cDNA sentezi, kullanılan ticari kitin (ABScript III RT Master Mix for qPCR) prosedürüne uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon karışımı ve ısı döngü koşulları aşağıda belirtildiği şekilde uygulanmıştır.

Tablo. 3.4. c DNA sentezi kit bileşenleri

Bileşenler	Miktar
5X ABScript III RT Mix*	400 µL
Nükleazsız Su	2 × 1,25 mL

Tablo. 3.5. c DNA sentezi reaksiyon karışımı

Master Miks (Her bir örnek için)	Miktar
5X ABScript III RT Mix	4 µL
Toplam RNA	10 pg – 1 µg
Nükleazsız Su	1µl
Toplam	20µl

Tablo 3.6. c DNA sentezi için ısı döngüleri

Sıcaklık (C)	Zaman (dk)
55	15
85	5
4	Bekletme

3.2.5. Nested Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Nested PCR)

3.2.5.1. Nested PCR Birinci Aşama

Sentezlenen DNA'lar template olarak nested PCR'ın birinci aşamasında kullanılmıştır. Test prosedürün den aşağıda bahsedilmiştir. Her bir örnek için 5µl RNA'nın üzerine belirtilen şekilde hazırlanan PCR reaksiyon karışımından 15µl ilave edilmiştir (Tablo 3.7). PCR için belirtilen sıcaklık, zaman ve siklus sayısı uygulanmıştır (Tablo 3.8).

Tablo. 3.7. PCR Mix karışımı Master Miks

Master Miks (Her bir örnek için)	Miktar
PCR PreMix	10µl
RNA	5µl
Primer F (10pmol)	1µl
Primer R (10pmol)	1µl
RNase-free su	3µl
Toplam	20µl

Tablo 3.8. PCR için Isı döngüleri

Sıcaklık (C)	Zaman (dk)	Siklus
45	30	1
94	5	1
94	1	40
55	1	40
72	1	40
72	1	5

3.2.5.2. Nested PCR İkinci Aşama

Nested PCR İkinci Aşama FCoV için; Nested PCR'ın birinci aşasından alınan PCR ürünleri ile Nested PCR'ın ikinci aşaması için Tablo. 3.7'de belirtilen karışım hazırlanmış ve Tablo 3.8'de belirtilen sıcaklık, zaman ve siklus sayısı uygulanmıştır.

3.2.6. LAMP Reaksiyon Çalışmaları

LAMP mastermiks ve primer miks bileşenlerinin optimum konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla öncelikle, literatürde kabul görmüş primer konsantrasyonları dikkate alınarak 10X konsantrasyonda primer miks bileşeni elde edilmiştir. Tablo 3.9'de gösterildiği gibi F3, B3, FİP, BİP, LF ve LB primerlerinin konsantrasyonları optimize edilmiştir. FCoV'un tespitinde yararlanmak üzere hazırlanan tüm primer setleri için aynı miktarlar kullanılmıştır. Laboratuvarımıza liyofilize halde gelen

primerler konsantrasyonu 100 μM olacak şekilde sulandırıldıktan sonra belirli hacimlerde karıştırılmışlardır. Primer miks bileşeni için kullanılan primerler ve kullanılan miktarlar Tablo 3.9’da gösterilmiştir.

Tablo 3.9. Primer miks bileşeni için kullanılan primerler ve kullanılan miktarlar

LAMP Primer Adı	İlk Konsantrasyon	Kullanılan Hacim	10X Primer Miks İçerisindeki Konsantrasyon	Master Miks İçerisindeki Konsantrasyon
F3	100 μM	1,25 μl	2 μM	0,2 μM
B3	100 μM	1,25 μl	2 μM	0,2 μM
LB	100 μM	5 μl	8 μM	0,8 μM
FIB	100 μM	10 μl	16 μM	1,6 μM
BIP	100 μM	10 μl	16 μM	1,6 μM
ddH ₂ O	-	35 μl	-	-

LAMP çalışmalarında, BST DNA polimeraz, reaksiyon tampon çözeltisi, dNTP, LAMP özgün primerler, boya ve magnezyum sülfat tek bir mastermiks olarak formülize edilmiştir. LAMP çalışmalarında floresan ölçümlerde kullanılan master miks bileşenleri Tablo 3.10’da LavaLAMP™ DNA (LGC Biotechnology, Cat No: 30096-1 ve 30076-1), dNTP (Thermofisher, Cat No: R0180) ve Green Fluorescent Dye (LGC Biotechnology, Cat No: 30078-1) komponentleri kullanılarak optimize edilmiştir.

Tablo 3.10. Florimetrik ve kolorimetrik LAMP master miks içerisinde kullanılan komponentler

Bileşen	Başlangıç Konsantrasyonu	Hacim	Son Konsantrasyon
10X BST3 Buffer	10X	2,5 µl	1X
BST 3 Pol DNA Enzyme	8 U/µl	1 µl	0,32 U
Magnesium Sulfate	100 mM	1,25 µl	5 mM
dNTP Miks	2,5 mM (each)	8 µl	0,8 mM
Green Fluorescent Dye (florimetrik) veya Neutral red (kolorimetrik, kolorimetrik test için malachite green boyası da değerlendirilmiştir)	50X	0,5 µl	1X
ddH ₂ O	-	4,25 µl	-
TOPLAM		17,5 µl	-

LAMP reaksiyonu için gereken bileşenler literatürde kabul görmüş konsantrasyonlar dikkate alınarak elde edilmiştir. LAMP bileşeni için kullanılan primer miks, master miks ve kullanılan viral DNA miktarları Tablo 3.11’de gösterilmiştir. LAMP testi, 65 °C’de 45 dakika süreyle inkübe edilerek uygulanmış ve her 60 saniyede bir FAM okuma ölçümü alınmıştır.

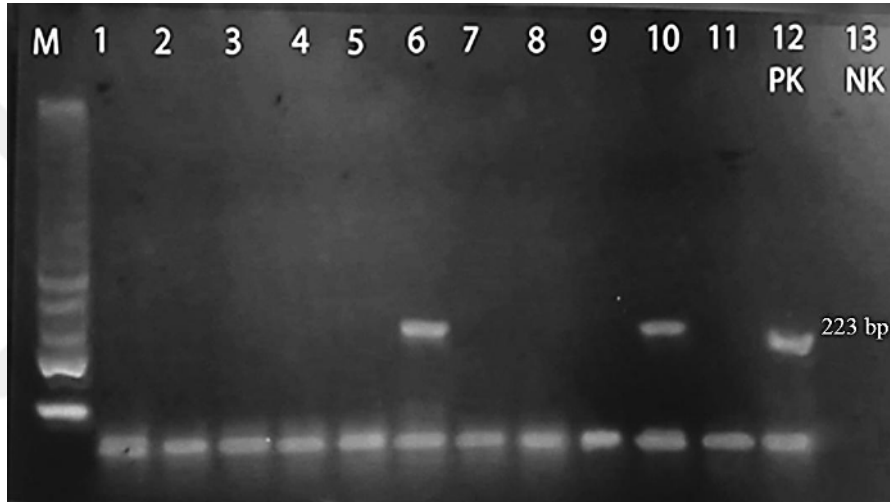
Tablo 3.11. LAMP bileşenleri

LAMP/LAMP Bileşeni	Hacim
LAMP Master Miks	17,5 µl
Primer Miks	2,5 µl
Viral RNA	5 µl
Toplam	25 µl

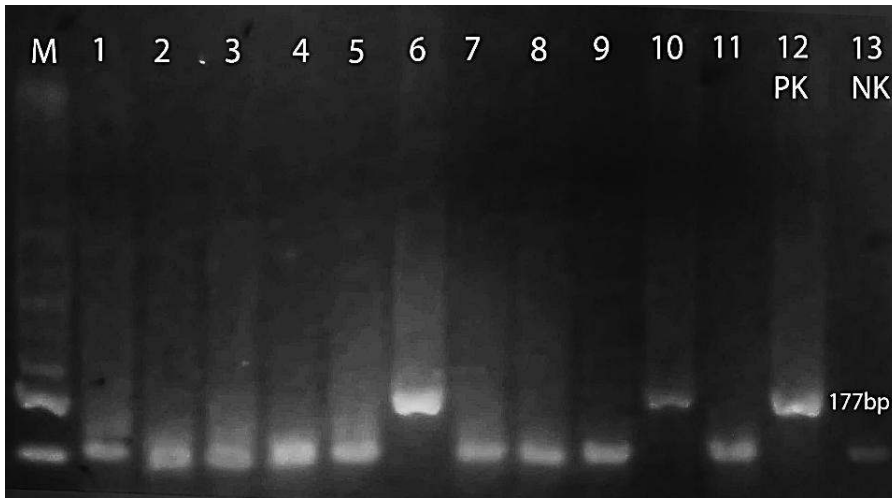
4. BULGULAR

4.1. Nested PCR Bulguları

Çalışmada incelenen toplam 60 kediye ait örneklerin nested PCR ile analizi sonucunda, 15 örnekte (%25) FCoV RNA'sı pozitif olarak saptanmıştır. Pozitiflik saptanan bu örneklerin 9'unun asites sıvısı, 5'inin rektal sürüntü ve 1'inin ise kan örneği olduğu belirlenmiştir. Aşağıda, nested PCR jel görüntüleri (Şekil 4.1) ve nested PCR test sonuçları (Tablo 4.1) kolorimetrik ve florimetrik LAMP sonuçları ile birlikte verilmektedir.



Şekil 4.1. İki pozitif asites örneğine ait Nested PCR 1. raund jel resmi



Şekil 4.2 İki pozitif asites örneğine ait Nested PCR 2. raund jel resmi

Tablo 4.1. Nested PCR kolorimetrik ve florimetrik LAMP test sonuçları

FİP Şüpheli Hayvanlar	Nested PCR	Florimetrik Lamp	Kolorimetrik Lamp
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	-	-	-
26	+	+	+
27	-	+	+
28	+	+	+
29	-	-	-
30	-	-	-
31	+	+	+
32	-	-	-
33	-	+	+
34	+	+	+
35	-	-	-
36	-	-	-
37	-	+	+

Tablo 4.1. (Devam) Nested PCR kolorimetrik ve florimetrik LAMP test sonuçları

38	-	-	-
39	-	+	+
40	+	+	+
41	-	-	-
42	-	-	-
43	+	+	+
44	-	+	+
45	-	-	-
46	+	+	+
47	-	-	-
48	+	+	+
49	-	-	-
50	+	+	+
51	-	-	-
52	-	-	-
53	-	-	-
54	-	-	-
55	-	-	-
56	-	-	-
57	-	-	-
58	-	-	-
59	-	-	-
60	-	-	-

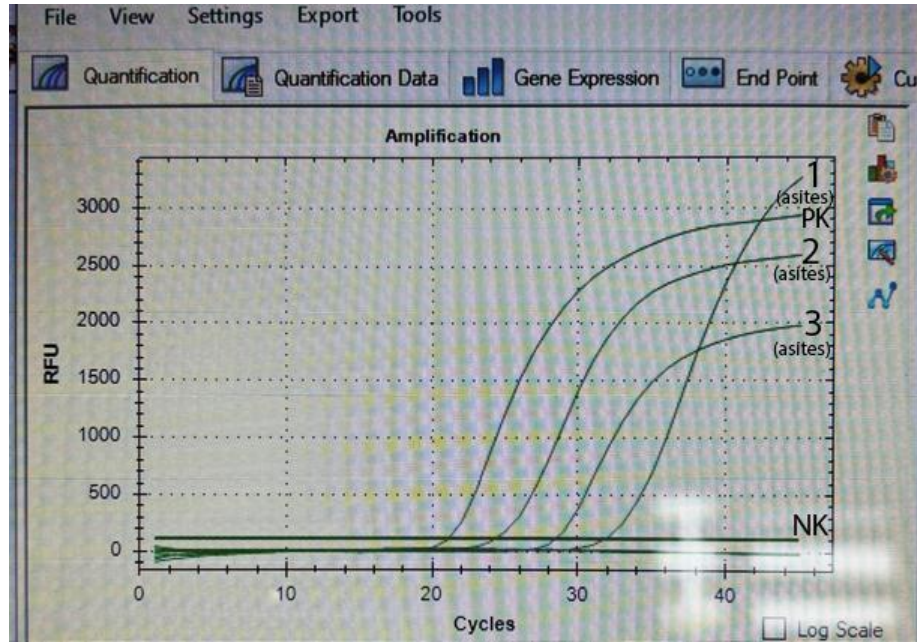
Sonuçlara göre Nested PCR'ın LAMP'e göre sensitivitesi %65,2, spesifisitesi %100 olarak belirlenmiştir. Ayrıca, LAMP testinin kolorimetrik ve florimetrik formatlarının sonuçları paralel bulunduğundan, Sensitivite ve Spesifisite tablolarının sunumunda tekrardan kaçınmak ve verileri daha sade bir şekilde yansıtmak amacıyla, her iki yöntemin bulguları birleştirilerek tek bir "LAMP" başlığı altında sunulmuştur (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. Nested PCR’ın LAMP’e göre Sensitivite ve Spesifisite oranları

		LAMP			
		+	-	Toplam	Sensitivite Spesifisite
Nested PCR	+	15	-	15	
	-	8	37	45	%65,2 %100
	Toplam	23	37	60	

4.2. Florimetrik LAMP Sonuçları

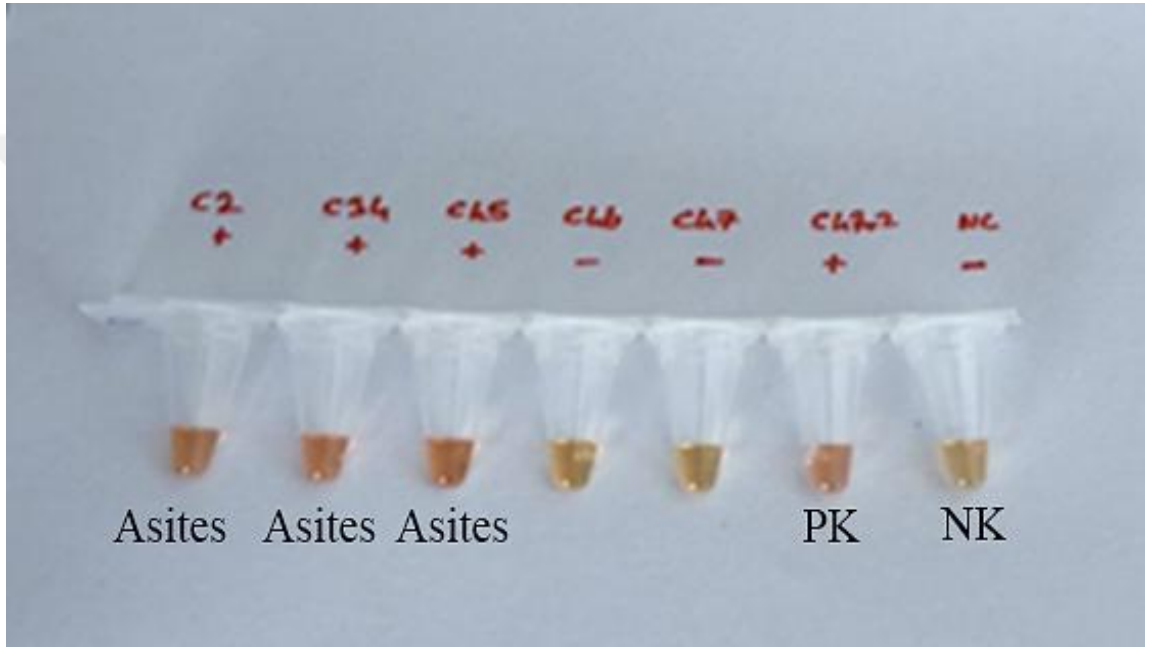
FİP şüpheli aşısız ve sağlıklı toplam 60 kediye ait örneklerin florimetrik LAMP tekniği ile analizi sonucunda, toplam 23 örnekte (%38,3) FCoV RNA'sı pozitif olarak saptanmıştır. Pozitif bulunan bu örneklerin 12'si asites sıvısı, 8'i rektal sürüntü ve 3'ü kan örneğidir. Ayrıca, LAMP ile pozitif saptanan bu 23 örneğin 15'inin nested PCR ile de uyumlu olarak pozitif sonuç verdiği görülmüştür. Aşağıdaki görselde (Şekil 4.3) florimetrik LAMP sonuçları sunulmaktadır.



Şekil 4.3. Florimetrik FCoV LAMP Sonucu

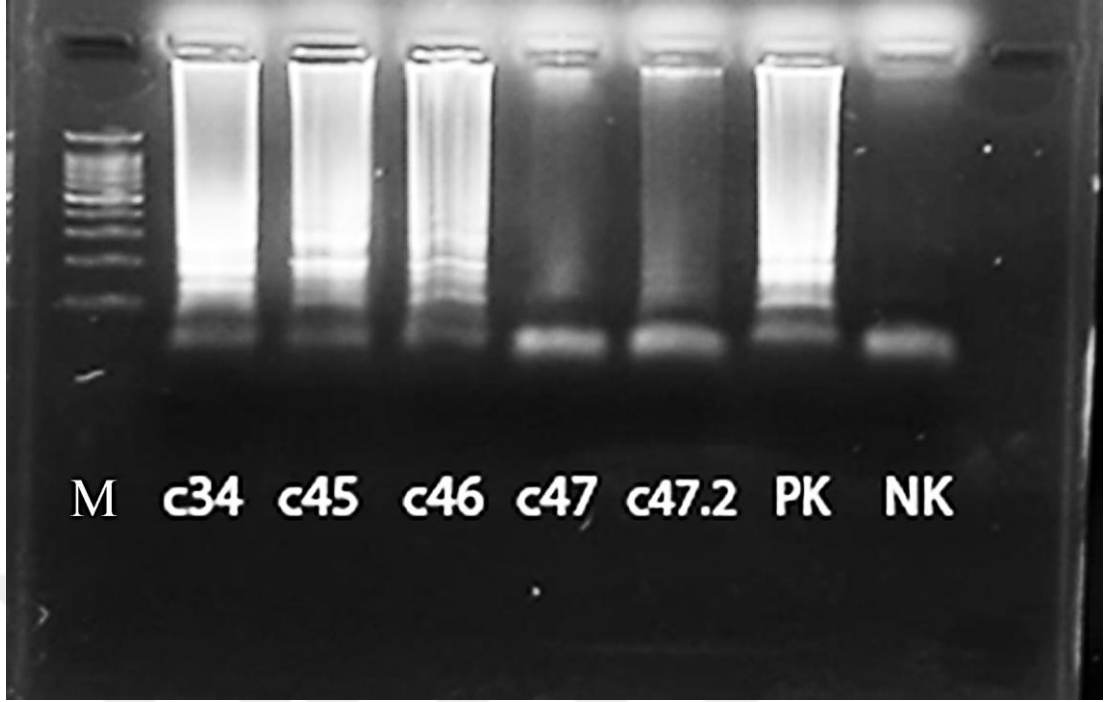
4.3. Kolorimetrik LAMP Sonuçları

Kolorimetrik LAMP tekniği ile toplam 60 örnek incelenmiştir. Elde edilen sonuçların, florimetrik LAMP testi bulgularıyla tamamen uyumlu olduğu görülmüştür. Bu doğrultuda, incelenen 60 örneğin 23'ü (%38,3) FCoV yönünden pozitif olarak tespit edilmiştir. Her iki testle aynı örnekler FCoV yönünden pozitif olarak bulunmuştur (Tablo 4.1). Aşağıdaki görsel (Şekil 4.4) kolorimetrik olarak yapılan LAMP sonuçlarını göstermektedir.



Şekil 4.4. Kolorimetrik FCoV LAMP Sonucu

LAMP testi sonucu elde edilen LAMP ürünleri agorose jel de yürütülerek sağlaması yapılmıştır. Aşağıda verilen jel görüntüsü (Şekil 4.5) ve yukarıda verilen (Şekil 4.4) kolorimetrik LAMP görseli incelenecek olursa sonuçlar paralellik göstermektedir.



Şekil 4.5. LAMP ürünleri agaroz jel görüntüsü

Sonuçlara göre LAMP'in Nested PCR'a göre sensitivitesi %100, spesifisitesi %82,2 olarak bulunmuştur. Ayrıca, LAMP testinin kolorimetrik ve florimetrik formatlarının sonuçları paralel bulunduğundan, sensitivite ve spesifisite tablolarının sunumunda tekrardan kaçınmak ve verileri daha sade bir şekilde yansıtmak amacıyla, her iki yöntemin bulguları birleştirilerek tek bir "LAMP" başlığı altında sunulmuştur. (Tablo 4.2).

Tablo 4.3. LAMP'in Nested PCR'a göre Sensitivite ve Spesifisite oranları

		Nested PCR			
		+	-	Toplam	
LAMP	+	15	8	23	
	-	0	37	37	%100
	Toplam	15	45	60	%82,2

5. Tartışma

Bu çalışmada, Feline Koronavirüs'un (FCoV) moleküler tanısında, virüsün S2 gen bölgesine özgü tasarlanan bir Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) yöntemi ile standart bir nested PCR (nPCR) yönteminin sonuçları karşılaştırılmıştır. Toplam 60 kediye (50 FİP şüpheli, 10 sağlıklı) ait klinik örneklerin analizi sonucunda, nPCR ile 15 (%25) örnek pozitif saptanırken, geliştirilen LAMP yöntemi ile 23 (%38,3) örnekte pozitiflik tespit edilmiştir.

İki yöntemin sonuçları birbirleriyle kıyaslandığında, geliştirilen LAMP testinin, nPCR tarafından pozitif olarak saptanan 15 örneğin tamamını tespit ederek %100'lük bir duyarlılık gösterdiği belirlenmiştir. Buna karşılık nPCR, LAMP tarafından saptanan 23 pozitif örneğin 15'ini tespit edebilmiş ve duyarlılığı %65,2 olarak hesaplanmıştır. LAMP testinin, nPCR'ın tespit edemediği ek 8 örnekte daha pozitif sonuç vermesi, bu çalışmada kullanılan yöntemin FCoV RNA'sını saptamada daha yüksek bir duyarlılığa sahip olduğunu net bir şekilde göstermektedir. Bu durum, özellikle düşük viral yüke sahip veya nPCR'ın tespit sınırının altında kalan şüpheli vakaların atlanmasını önlemede LAMP yönteminin ne kadar değerli olabileceğini göstermektedir.

Çalışmamızda elde edilen bulgular, FCoV tanısında LAMP yöntemini araştıran diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında, hem teknolojinin potansiyelini doğrulayan benzerlikler hem de geliştirdiğimiz testin özgün başarısını öne çıkaran önemli farklılıklar göstermektedir. Bizim çalışmamızda, 60 klinik örnekte LAMP pozitifliği 23 (%38,3), nPCR pozitifliği ise 15 (%25) olarak saptanmış; bu doğrultuda geliştirdiğimiz LAMP testi, nPCR'a göre %100 sensitivite ve %82,2 spesifisite göstermiştir. Bu sonuçlar, literatürdeki diğer LAMP çalışmalarıyla önemli paralellikler taşımaktadır.

Techangamsuwan ve arkadaşları (2013), FİP şüpheli kedilerden alınan asites sıvısı örneklerinde 3' UTR bölgesini hedefleyen bir RT-LAMP testi ile 63 örneğin 28'inde (%44) pozitiflik, RT-PCR testi ile 63 örneğin 24'ünde (38%) pozitiflik saptamışlardır ve LAMP'ın RT-PCR'a kıyasla %100 sensitivite ve %89,7 spesifisite

gösterdiğini bildirmişlerdir. Benzer şekilde, Khumtong ve arkadaşları (2025) FİP şüpheli kedilerden alınan efüzyon sıvısı örneklerinde N genini hedefleyen bir RT-LAMP testi ile 77 örneğin 17'sinde (%22,1) pozitiflik saptarken, referans yöntem olarak kullandıkları qPCR ile de yine 77 örneğin 17'sinde (%22,1) pozitiflik tespit etmişlerdir. Onların çalışmasında LAMP testi, qPCR'a kıyasla %100 sensitivite ve %100 spesifisite göstermiştir. Bu durum, bizim çalışmamızda nPCR'a karşı elde ettiğimiz %100'lük sensitivite bulgumuzla tam bir uyum içindedir ve LAMP teknolojisinin ne kadar güvenilir olduğunu bir kez daha teyit etmektedir.

Günther ve arkadaşları (2018) tarafından yapılan çalışmada FCoV tanısı için M genini hedefleyen iki farklı ticari (kullanıma hazır) RT-LAMP kitini, tanısı kesin olarak doğrulanmış 34 FİP'li ve 37 kontrol kedisinden alınan 71 efüzyon sıvısı örneğinde test etmişlerdir. Kullandıkları ilk ticari kit ile FİP vakalarını saptamada %35,3 sensitiviteye ulaşırken, daha iyi performans gösteren ikinci kit %58,8'e çıkabilmiştir. Bu, test ettikleri en iyi kitin bile kesin FİP tanısı almış vakaların %40'ından fazlasını gözden kaçırdığı anlamına gelmektedir. FCoV tespiti için LAMP yöntemi geliştiren bir diğer araştırmacı Stranieri ve arkadaşları (2017) ise, geliştirdikleri RT-LAMP testinin, referans aldıkları RT-nPCR'a kıyasla %100 spesifisiteye fakat %54,5 düşük bir sensitiviteye sahip olduğunu bildirmişlerdir. Bu sonuç, bizim çalışmamızda nPCR'a karşı elde ettiğimiz %100 sensitivite ile tam bir zıtlık oluşturmaktadır. Benzer şekilde Rapichai ve arkadaşları (2022) tarafından yapılan çalışma da ORF1a/1b gen bölgesini hedefleyen RT-LAMP testi ile 81 klinik örneğin 61'inde (%75,3) pozitiflik saptarken, standart RT-PCR ile aynı örneklerin 64'ünde (%79) pozitiflik tespit etmişlerdir. Bu bulgular ışığında, kendi LAMP testlerinin RT-PCR'a kıyasla sensitivitesini %94, spesifisitesini ise %94,12 olarak hesaplamışlardır. Bu çarpıcı zıtlık, LAMP yönteminin başarısının tesadüfi olmadığını ve doğrudan primer tasarımının kalitesine ve hedeflenen gen bölgesinin uygunluğuna bağlı olduğunu kanıtlamaktadır. Stranieri ve arkadaşlarının testindeki düşük duyarlılık, büyük olasılıkla tasarladıkları primer setinin FCoV RNA'sını verimli bir şekilde çoğaltamamasından kaynaklanmaktadır. Buna karşılık, bizim S2 genini hedefleyen primer setimizin gösterdiği yüksek performans, standart nPCR'ın bile tespit edemediği pozitif vakaları saptamamızı sağlamıştır. Bu durum, başarılı bir

LAMP testi geliştirmenin anahtarının, optimize edilmiş ve yüksek verimliliğe sahip bir primer seti tasarlamaktan geçtiğini net bir şekilde ortaya koymaktadır.

Bu çalışmada incelenen örnek tipleri arasında, pozitif sonuçların büyük bir kısmının asites sıvısı (n=12) ve rektal sürüntü (n=8) rneklerinden elde edildiği görülmüştür. Kan örneklerinde ise sadece 3 pozitif sonuç saptanmıştır. FİP tanısında asites sıvılarının yüksek viral yük içermesi nedeniyle en değerli örnek tipi olduğu, literatür bilgisiyle örtüşmektedir. Nitekim Longstaff ve arkadaşları (2017) ile Doenges ve arkadaşları (2016) da FCoV tanısında asites ve beyin omurilik sıvısı gibi örneklerde yüksek saptama oranları bildirmişlerdir. Kan örneklerindeki düşük pozitiflik oranı ise, FİP olgularında vireminin her zaman saptanamayabileceğini bildiren çalışmalarla uyumludur.

Çalışmamızın dikkat çeken bir diğer bulgusu ise, kolorimetrik ve florimetrik LAMP sonuçlarının birbiriyle tam uyumlu olmasıdır. Bu zellik, geliştirilen testin özellikle saha ve klinik koşullarda hızlı bir tarama aracı olarak kullanılabilme potansiyelini artırmaktadır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Sonuç olarak, bu çalışmada, FİP şüpheli kedilerden alınan klinik örneklerde Feline Koronavirüs (FCoV) varlığının tespiti amacıyla, virüsün S2 gen bölgesini hedef alan özgün bir LAMP yöntemi geliştirilmiş ve bu yöntemin tanısal performansı, standart bir nested PCR (nPCR) metodu ile karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar neticesinde geliştirilen florimetrik ve kolorimetrik LAMP testlerinin, referans olarak kabul edilen nPCR yöntemine kıyasla FCoV RNA'sını saptamada daha yüksek bir tanısal duyarlılığa sahip olduğu kanıtlanmıştır. Bu çalışmanın sonuçlarına göre geliştirilen LAMP testinin, özellikle pratikliği ve hızlı sonuç vermesi nedeniyle, kolorimetrik formatının veteriner kliniklerinde ve barınak gibi saha koşullarında FİP şüpheli vakaların hızlı taranması ve ön tanısı için kullanılabileceği öngörülmektedir. LAMP'in tanısal gücünü daha iyi değerlendirmek amacıyla, daha geniş bir hasta popülasyonu ile ek validasyon çalışmalarının yapılması gerekmektedir. Gelecekteki çalışmaların, LAMP testini, RNA izolasyonu gibi laboratuvar gerektiren adımları basitleştirecek veya ortadan kaldıracak "direkt" örnek analiz protokolleri ile birleştirerek, tamamen bir "hasta başı test" (point-of-care) formatına dönüştürme potansiyeli üzerine odaklanması, yöntemin pratik değerini daha da artıracaktır. Çalışmamızda FİP semptomları gösteren 50 kedinin sadece 23'ünde FCoV tespit edilmesi, klinik bulguların tek başına tanı için yeterli olmadığını ortaya koymaktadır. Bu sonuç, FİP şüpheli hayvanlarda tedaviye başlamadan önce bulguların laboratuvar testleri ile desteklenmesi gerektiği gerçeğini gözler önüne koymaktadır.

KAYNAKLAR

- Addie D, Belák S, Boucraut-Baralon C, Egberink H, Frymus T, Gruffydd-Jones T, Hartmann K, Hosie MJ, Lloret A, Lutz H, Marsilio F, Pennisi MG, Radford AD, Thiry E, Truyen U, Horzinek MC (2009).** Feline infectious peritonitis. ABCD guidelines on prevention and management. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, **11(7)**, 594-604.
- Can-Sahna K, Soydal Ataseven V, Pinar D, Oğuzoğlu TC (2007).** Detection of feline coronaviruses in blood samples from cats by mRNA RT-PCR. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, **9(5)**, 369-372.
- Chang HW, Egberink HF, Halpin R, Spiro DJ, Rottier PJ (2012).** Spike protein fusion peptide and feline coronavirus virulence. *Emerging Infectious Diseases*, **18(7)**, 1089-1095.
- Doenges SJ, Weber K, Dorsch R, Fux R, Fischer A, Matiassek K, Hartmann K (2016).** Detection of feline coronavirus in cerebrospinal fluid for diagnosis of feline infectious peritonitis in cats with and without neurological signs. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, **18(2)**, 104-109.
- Felten S, Hartmann K (2019).** Diagnosis of feline infectious peritonitis: A review of the current literature. *Viruses*, **11(11)**, 1068.
- Felten S, Weider K, Doenges S, Leutenegger CM, Hartmann K (2017).** Detection of feline coronavirus spike gene mutations as a tool to diagnose feline infectious peritonitis. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, **19(4)**, 321-335.
- Fischer Y, Sauter-Louis C, Hartmann K (2012).** Diagnostic accuracy of the Rivalta test for feline infectious peritonitis. *Veterinary Clinical Pathology*, **41(4)**, 558-567.
- Foley JE, Poland A, Carlson J, Pedersen NC (1997).** Risk factors for feline infectious peritonitis among cats in multiple-cat environments with endemic feline enteric coronavirus. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **210(9)**, 1313-1318.
- Gao YY, Wang Q, Liang XY, Zhang S, Bao D, Zhao H, Gao FS (2023).** An updated review of feline coronavirus: mind the two biotypes. *Virus Research*, **326**, 199059.
- Gunn-Moore DA, Gruffydd-Jones TJ, Harbour DA (1998).** Detection of feline coronaviruses by culture and reverse transcriptase-polymerase chain reaction of blood samples from healthy cats and cats with clinical feline infectious peritonitis. *Veterinary Microbiology*, **62(3)**, 193-205.
- Günther S, Felten S, Wess G, Hartmann K, Weber K (2018).** Detection of feline coronavirus in effusions of cats with and without feline infectious peritonitis using loop-mediated isothermal amplification. *Journal of Virological Methods*, **256**, 32-36.

Hartmann K (2005). Feline infectious peritonitis. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, **35(1)**, 39-79.

Herrewegh AA, de Groot RJ, Cepica A, Egberink HF, Horzinek MC, Rottier PJ (1995). Detection of feline coronavirus RNA in feces, tissues, and body fluids of naturally infected cats by reverse transcriptase PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, **33(3)**, 684-689.

ICTV (2024). <https://ictv.global/report/chapter/coronaviridae/coronaviridae> (Erişim Tarihi: 13.07.2025).

Ives EJ, Vanhaesebrouck AE, Cian F (2013). Immunocytochemical demonstration of feline infectious peritonitis virus within cerebrospinal fluid macrophages. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, **15(12)**, 1149-1153.

Khumtong K, Rapichai W, Saejung W, Khamsingnok P, Meecharoen N, Ratanabunyong S, Dong HV, Tuanthap S, Rattanasrisomporn A, Choowongkamon K, Rungsuriyawiboon O, Rattanasrisomporn J (2025). Colorimetric reverse transcription loop-mediated isothermal amplification with xylenol orange targeting nucleocapsid gene for detection of feline coronavirus infection. *Viruses*, **17(3)**, 418.

Kipar A, Meli ML (2014). Feline infectious peritonitis: Still an enigma? *Veterinary Pathology*, **51(2)**, 505-526.

Leibowitz J, Kaufman G, Liu P (2011). Coronaviruses: propagation, quantification, storage, and construction of recombinant mouse hepatitis virus. *Current protocols in microbiology*, **21(1)**, 15E-1.

Li F (2016). Structure, function, and evolution of coronavirus spike proteins. *Annual Review of Virology*, **3**, 237-261.

Litster AL, Pogranichniy R, Lin TL (2013). Diagnostic utility of a direct immunofluorescence test to detect feline coronavirus antigen in macrophages in effusive feline infectious peritonitis. *The Veterinary Journal*, **198(2)**, 362-366.

Longstaff L, Porter E, Crossley VJ, Hayhow SE, Helps CR, Tasker S (2017). Feline coronavirus quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction on effusion samples in cats with and without feline infectious peritonitis. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, **19(2)**, 240-245.

Norris JM, Bosward KL, White JD, Baral RM, Catt MJ, Malik R (2005). Clinicopathological findings associated with feline infectious peritonitis in Sydney, Australia: 42 cases (1990-2002). *Australian Veterinary Journal*, **83(11)**, 666-673.

Paltrinieri S, Cammarata MP, Cammarata G (1999). In vivo diagnosis of feline infectious peritonitis by comparison of protein content, cytology, and direct immunofluorescence test on peritoneal and pleural effusions. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **11(4)**, 358-361.

Peck KM, Burch CL, Heise MT, Baric RS (2015). Coronavirus host range expansion and Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus emergence: Biochemical mechanisms and evolutionary perspectives. *Annual Review of Virology*, **2**, 95-117.

Pedersen NC (2009). A review of feline infectious peritonitis virus infection: 1963–2008. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, **11(4)**, 225-258.

Pedersen NC (2014). An update on feline infectious peritonitis: virology and immunopathogenesis. *The Veterinary Journal*, **201(2)**, 123-132.

Pesteanu-Somogyi LD, Radzai C, Pressler BM (2006). Prevalence of feline infectious peritonitis in specific cat breeds. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, **8(1)**, 1-5.

Porter E, Tasker S, Day MJ, Harley R, Kipar A, Siddell SG, Helps CR (2014). Amino acid changes in the spike protein of feline coronavirus correlate with systemic spread of virus from the intestine and not with feline infectious peritonitis. *Veterinary Research*, **45(1)**, 49.

Rapichai W, Saejung W, Khumtong K, Boonkaewwan C, Tuanthap S, Lieberzeit PA, Choowongkamon K, Rattanasrisomporn J (2022). Development of colorimetric reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for detecting feline coronavirus. *Animals*, **12(16)**, 2075.

Riemer F, Kuehner KA, Ritz S, Sauter-Louis C, Hartmann K (2016). Clinical and laboratory features of cats with feline infectious peritonitis - a retrospective study of 231 confirmed cases (2000-2010). *Journal of Feline Medicine and Surgery*, **18(4)**, 348-356.

Rottier PJ, Nakamura K, Schellen P, Volders H, Haijema BJ (2005). Acquisition of macrophage tropism during the pathogenesis of feline infectious peritonitis is determined by mutations in the feline coronavirus spike protein. *Journal of Virology*, **79(22)**, 14122-14130.

Sangl L, Felten S, Matiassek K, Dörfelt S, Bergmann M, Balzer HJ, Pantchev N, Leutenegger C, Hartmann K (2020). Detection of feline coronavirus RNA, spike gene mutations, and feline coronavirus antigen in aqueous humor of cats in the diagnosis of feline infectious peritonitis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **32(4)**, 527-534.

Stranieri A, Lauzi S, Giordano A, Roccabianca P, Paltrinieri S (2017). Reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification for the detection of feline coronavirus. *Journal of Virological Methods*, **243**, 105-108.

Sweet AN, André NM, Stout AE, Licitra BN, Whittaker GR (2022). Clinical and molecular relationships between COVID-19 and Feline Infectious Peritonitis (FIP). *Viruses*, **14(3)**, 481.

Tasker S (2018). Diagnosis of feline infectious peritonitis: Update on evidence supporting available tests. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, **20(3)**, 228-243.

Tasker S, Addie D, Belák S, Boucraut-Baralon C, Egberink H, Frymus T, Gruffydd-Jones T, Hartmann K, Hosie MJ, Lloret A, Marsilio F, Pennisi MG, Radford AD, Thiry E, Truyen U, Möstl K (2022). Feline infectious peritonitis. ABCD guidelines on FIP. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, **24(1)**, 3-24.

Techangamsuwan S, Radtanakatikanon A, Thanawongnuwech R (2013). Development and application of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) for feline coronavirus detection. *The Thai Journal of Veterinary Medicine*, **43(2)**, 229-233.

Vennema H, Poland A, Foley J, Pedersen N (1998). Feline infectious peritonitis viruses arise by mutation from endemic feline enteric coronaviruses. *Virology*, **243(1)**, 150-157.

Woo PC, de Groot RJ, Haagmans B, Lau SK, Neuman BW, Perlman S, Yeh SH (2023). ICTV Virus Taxonomy Profile: Coronaviridae 2023: This article is part of the ICTV Virus Taxonomy Profiles collection. *Journal of General Virology*, **104(4)**, 001843.

