

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VİROLOJİ ANABİLİM DALI

MARMARA BÖLGESİNDE KOYUNLARDAN ALINAN
ABORT VE POSTNATAL ÖRNEKLERDE VİRAL
ETKENLERİN (PESTİVİRUS, MAVİDİL VE AKABANE
VİRUS) ARAŞTIRILMASI

DOKTORA TEZİ

ZÜLEYHA PESTİL

ELAZIĞ – 2014

ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Mustafa KAPLAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Doktora Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.



Prof. Dr. Hakan BULUT
Viroloji Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Doktora Tezi olarak
kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Hakan BULUT
Danışman



Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Hakan BULUT

Prof. Dr. Hasan ÖNGÖR

Prof. Dr. A. Kürşat AZKUR

Doç. Dr. Şükrü TONBAK

Doç. Dr. Kezban Can ŞAHNA



İTHAF

Bu tez, erken ve ani ölümleriyle açtıkları boşluğu hiçbirşeyle dolduramadığım canım Annem, Babam ve Firdevs halama ithaf edilmiştir.

TEŐEKKÖR

Bilimsel geliŐimimde bŸyŸk katkısı olan Saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Hakan BULUT'a, tezimin yŸrŸtŸlmesinde emekleri geğen hocalarım Prof. Dr. Yusuf BOLAT, Doç. Dr. ŐŸkrŸ TONBAK, Dr. Nurettin ANAKOğLU ve Dr. Engin BERBER'e, laboratuvarı her zaman tedarikli ve dŸzenli bırakan değerli çalışma arkadaŐım Dr. Ahmet SAİT'e, laboratuvarda huzurlu ve mutlu bir Şekilde çalıŐmama katkıları olan Viral Teşhis Laboratuvar Őefi Dr. Aysel BACA, Vedat YILDIZ, Abbas KIRMIZIBAYRAK, Reyhan KÖSTEK ve SongŸl DEMİR'e, tezimin maddi olanaklarını sağladıklarından dolayı Pendik Veteriner Kontrol EnstitŸsŸ MŸdŸrlŸęŸ'ne, manevi desteklerinden dolayı kadim dostum Doç. Dr. Nesrin ÇELEN'e, tez çalıŐmalarım esnasında bensiz hayatını idame ettirebilme gayreti ve becerisinden dolayı oğlum Hamit ve eŐim Selahattin APUHAN'a sonsuz teŐekkŸrler.

ZŸleyha PESTİL

04 Nisan 2014

İÇİNDEKİLER

| | |
|--------------------------------------|-------------|
| BAŞLIK SAYFASI..... | i |
| ONAY SAYFASI | ii |
| İTHAF | iii |
| TEŞEKKÜR..... | iv |
| İÇİNDEKİLER..... | v |
| TABLolar LİSTESİ..... | viii |
| ŞEKİLLER LİSTESİ..... | x |
| KISALTMALAR LİSTESİ | xi |
| 1. ÖZET..... | 1 |
| 2. ABSTRACT | 2 |
| 3. GİRİŞ | 3 |
| 3.1. Pestivirus Enfeksiyonları | 5 |
| 3.1.1. Etiyoloji | 5 |
| 3.1.2. Epidemiyoloji..... | 8 |
| 3.1.3. Klinik ve Patogenez | 9 |
| 3.1.4. Teşhis | 14 |
| 3.1.5. Koruma ve Kontrol | 15 |
| 3.2. Mavidil Enfeksiyonları | 18 |
| 3.2.1. Etiyoloji | 18 |
| 3.2.2. Epidemiyoloji..... | 20 |
| 3.2.3. Klinik ve Patogenez | 23 |
| 3.2.4. Teşhis | 25 |
| 3.2.5. Koruma ve Kontrol | 26 |

| | |
|---|-----------|
| 3.3. Akabane Enfeksiyonları..... | 27 |
| 3.3.1. Etiyoloji..... | 27 |
| 3.3.2. Epidemiyoloji..... | 30 |
| 3.3.3. Klinik ve Patogenez | 31 |
| 3.3.4. Teşhis | 33 |
| 3.3.5. Koruma ve Kontrol | 33 |
| 4.GEREÇ ve YÖNTEM..... | 35 |
| 4.1. Gereç..... | 35 |
| 4.1.1. Serum Örnekleri..... | 35 |
| 4.1.2. Viral Teşhis Materyalleri..... | 36 |
| 4.1.3. Referans Viruslar | 37 |
| 4.1.4. Kimyasal Maddeler | 37 |
| 4.1.5. Ticari Kitler | 38 |
| 4.1.6. Cihazlar..... | 39 |
| 4.2. Yöntem..... | 39 |
| 4.2.1. Pestivirus Antikorları için İndirek ELISA Testi | 39 |
| 4.2.2. Mavidil Antikorları için İndirek ELISA Testi | 41 |
| 4.2.3. Akabane Antikorları için İndirek ELISA Testi..... | 41 |
| 4.2.4. Viral RNA Ekstraksiyonu..... | 42 |
| 4.2.5. Pestivirus Dupleks RT-PCR | 43 |
| 4.2.6. Akabane RT-PCR | 45 |
| 4.2.7. Pestivirus ve Akabane Virus PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi..... | 46 |
| 4.2.8. Mavidil real-time RT-PCR Sonuçlarının Değerlendirilmesi | 48 |

| | |
|---|-----------|
| 4.2.9. Sekanslama | 49 |
| 5. BULGULAR..... | 51 |
| 5.1. Antikor ELISA | 51 |
| 5.2. RT-PCR, real-time RT-PCR ve Sekanslama | 51 |
| 6. TARTIŞMA..... | 59 |
| 7. KAYNAKLAR | 69 |
| 8. EKLER | 78 |
| 9. ÖZGEÇMİŞ | 79 |

TABLolar LİSTESİ

| | |
|---|----|
| Tablo 1. Flaviviridae ailesinde yer alan viruslar, etkilediği konakçılar ve coğrafik dağılımı | 8 |
| Tablo 2. <i>Bunyaviridae</i> ailesinde yer alan viruslar, etkilediği konakçılar ve coğrafik dağılımı | 29 |
| Tablo 3. Kan serumu örneklerinin illere göre dağılımı | 35 |
| Tablo 4. Viral örneklerin yıllara ve aylara göre dağılımı | 37 |
| Tablo 5. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler | 38 |
| Tablo 6. Çalışmada kullanılan ELISA, ekstraksiyon ve PCR kitleri..... | 38 |
| Tablo 7. Çalışmada kullanılan laboratuvar cihaz ve ekipmanlar | 39 |
| Tablo 8. Pestivirus nested RT-PCR tekniğinde kullanılan primer setleri | 44 |
| Tablo 9. Pestivirus RT-PCR tekniğinde kullanılan PCR karışımı ve ısı protokolü | 44 |
| Tablo 10. Pestivirus nested RT-PCR tekniğinde kullanılan PCR karışımı ve ısı protokolü | 44 |
| Tablo 11. Pestivirus dubleks RT-PCR tekniğinde kullanılan PCR karışımı ve ısı protokolü | 45 |
| Tablo 12. Akabane RT-PCR tekniğinde kullanılan primer setleri..... | 45 |
| Tablo 13. Akabane RT-PCR tekniğinde kullanılan PCR karışımı ve ısı protokolü | 46 |
| Tablo 14. Mavidil real-time RT-PCR tekniğinde kullanılan primer ve prob seti | 47 |
| Tablo 15. Mavidil real-time RT-PCR tekniğinde kullanılan PCR karışımı ve ısı protokolü | 48 |
| Tablo 16. Test edilen koyun kan serumu antikor sonuçları..... | 51 |

Tablo 17. Pestivirus yönünden incelenen doku materyallerinin örneklendiği yıl ve klinik neticesine göre dağılımları 52

Tablo 18. Doku örneklerinin pestivirus yönünden illere göre dağılımı 54

ŞEKİLLER LİSTESİ

| | |
|---|----|
| Şekil 1. Atıkların olası sebepleri | 4 |
| Şekil 2. Pestivirus partikülü ve genom organizasyonu | 7 |
| Şekil 3. Orbivirus partikülü..... | 19 |
| Şekil 4. Serotiplerine göre mavidil virusunun yayılımı..... | 22 |
| Şekil 5. Bunyavirus partikülü..... | 29 |
| Şekil 6. Test edilen örneklerin toplandığı iller | 36 |
| Şekil 7. Pestivirus RT-PCR jel elektroforez görüntüsü 1. tur (290 bp). | 54 |
| Şekil 8. Pestivirus dubleks RT-PCR jel elektroforez görüntüsü. | 55 |
| Şekil 9. Akabane virus RT-PCR jel elektroforez görüntüsü. | 55 |
| Şekil 10. Mavidil real-time RT-PCR analiz görüntüsü.1-29: Klinik örnekler (tüm örnekler negatif), 30: Negatif kontrol, 31: BTV PCR pozitif kontrol (Mavi eğri) 32: BTV ekstraksiyon (EXT) pozitif kontrol (Pembe eğri) | 56 |
| Şekil 11. BVD-1 olarak belirlenen örneğin (2013/TR/EDRN.1) PHYLIP dizilim programında, neighbour-joining metodunda 0.75 maksimum sekans uzaklığına göre filogenetik analizi | 57 |
| Şekil 12. BDV olarak belirlenen örneğin (2013/TR/ÇNKL.1) PHYLIP dizilim programında, neighbour-joining metodunda 0.75 maksimum sekans uzaklığına göre filogenetik analizi | 58 |

KISALTMALAR LİSTESİ

| | |
|------------------------|--|
| °C | : Santigrat derece |
| µg | : Mikrogram |
| µl | : Mikrolitre |
| AGID | : Agar Gel Immunodiffusion |
| AHS | : Arthrogryposis-hydranencephaly syndrome |
| AKAV | : Akabane virus |
| BDV | : Border disease virus |
| BHK-21 | : Yavru hamster böbrek hücresi (baby hamster kidney) |
| BLAST | : Basic Local Aligment Search Tool |
| bp | : Baz çifti |
| BTV | : Mavidil virus |
| BVDV | : Bovine viral diarrhoea virus |
| cDNA | : Komplementer DNA |
| c-ELISA | : Yarışmalı enzim ilintili immünosorbent deneyi |
| CFT | : Komplement fikzasyon testi |
| CPE | : Sitopatojen etki |
| CSFV | : Klasik domuz ateşi virusu |
| dH₂O | : Distile su |
| DMSO | : Dimetil sülfoksit |
| DNA | : Deoksiribonükleik asit |
| dNTP | : Deoksinükleotit trifosfat |
| EDTA | : Etilen-diamin-tetra asetik asit |
| EHDV | : Epizootic hemorrhagic disease virus |

| | |
|----------------|---|
| ELISA | : Enzim ilintili immünosorbent deneyi |
| FAT | : Floresan antikor tekniği |
| HI | : Hemaglütinasyon inhibisyon |
| ICTV | : International Committee on Taxonomy of Viruses |
| IHC | : İmmunohistokimya |
| Kb | : Kilobaz |
| Kd | : Kilodalton |
| Mab | : Monoklonal antikorlar |
| MD | : Mukozal disease |
| mg | : Miligram |
| ml | : Mililitre |
| mRT-PCR | : Multipleks tersine transkripsiyon-polimeraz zincir reaksiyonu |
| NCP | : Nonsitopatojen |
| nm | : Nanometre |
| NP | : Nükleoprotein |
| NSm | : Yapısal olmayan orta büyüklükte protein |
| NSs | : Yapısal olmayan küçük protein |
| OIE | : Dünya Hayvan Sağlığı Organizasyonu |
| ORF | : Açık okunabilir bölge |
| PBS | : Phosphate buffered saline |
| PI | : Persiste infekte |
| RNA | : Ribonükleik asit |
| rpm | : Dakikadaki devir sayısı |

| | |
|--------------------------|--|
| RT-PCR | : Tersine transkripsiyon-polimeraz zincir reaksiyonu |
| RVF | : Rift Vadisi humması |
| SNT | : Serum nötralizasyon testi |
| TCID₅₀ | : Doku kültürü infeksiyöz doz ₅₀ |
| UTR | : Translate olmayan bölge |
| VI | : Virus izolasyon |
| VLP | : Virus benzeri partikül |
| VNT | : Virus nötralizasyon testi |
| VP | : Viral protein |

1. ÖZET

Bu tezde Marmara Bölgesindeki koyunlarda görülen abort ve postnatal olgularda, ülkemizde en önemli viral atık etkenleri olarak kabul edilen pestiviruslar, mavidil virus (BTV) ve Akabane virus (AKAV) varlığının araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla Marmara Bölgesinde 12 farklı ilde serum, abort ve postnatal örnekler toplandı. Enzim ilintili immünosorbent deneyi (ELISA) neticesinde koyun kan serum örneklerinin %67'sinde (800/1200) pestivirus, %38,7'sinde (465/1200) BTV ve %0,08'inde (1/1200) ise AKAV spesifik antikorlar tespit edilmiştir. Pestivirus tersine transkripsiyon-polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) neticesinde toplam 103 postnatal örneğin 23'ünde (%23,33) ve 178 atık fötüs örneğinin ise 34'ünde (%19,10) pestivirus pozitifliği belirlenmiştir. Bu neticelere göre, toplam 281 klinik örneğin 57'sinde (%20,28) pestivirus pozitifliği saptanmıştır. İncelenen klinik örneklerin hiç birinde BTV ve AKAV spesifik RNA varlığı tespit edilememiştir.

Sonuç olarak, Marmara Bölgesinde abortlar ve postnatal ölümlerde pestivirusların yüksek prevalansı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar dikkate alınarak, Marmara Bölgesinde pestiviruslara karşı aşılama başta olmak üzere diğer kontrol-mücadele metotlarının ivedilikle uygulanması önerilmektedir.

Anahtar kelimeler: Pestivirus, Mavidil virus, Akabane virus, koyun, seroloji, RT-PCR.

2. ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE VIRUSES (PESTIVIRUS, BLUETONGUE AND AKABANE VIRUS) IN ABORTION AND POSTNATAL SAMPLES FROM SHEEP IN MARMARA REGION

In this thesis, the detection of presence of pestiviruses, bluetongue (BTV) and Akabane virus (AKAV), which are accepted to be the most important viral abort agents in Turkey, from the aborted and postnatal specimens is aimed. The samples were collected from 12 provinces at Marmara area. Of 1200 sheep serum samples, 800 (67%), 465 (38,7%) and 1 (0,08) were detected to be seropositive by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for pestivirus, BTV and AKAV, respectively. The presence of pestivirus RNA was detected by reverse transcription- polymerase chain reaction of (RT-PCR) into 23 of 103 (23,3%) postnatal specimens and 34 (19,1%) of 178 aborted fetus samples. Therefore, pestivirus was detected in 57 (20,28%) of total 281 clinical specimen. BTV and AKAV specific RNA's were not detected in any of clinical specimens. In conclusion, there's a high prevalence of pestivirus prevalence among abortions and postnatal deaths in Marmara region. According to the results, we suggest immediately application of vaccination and other prevention and control methods against pestiviruses in Marmara region.

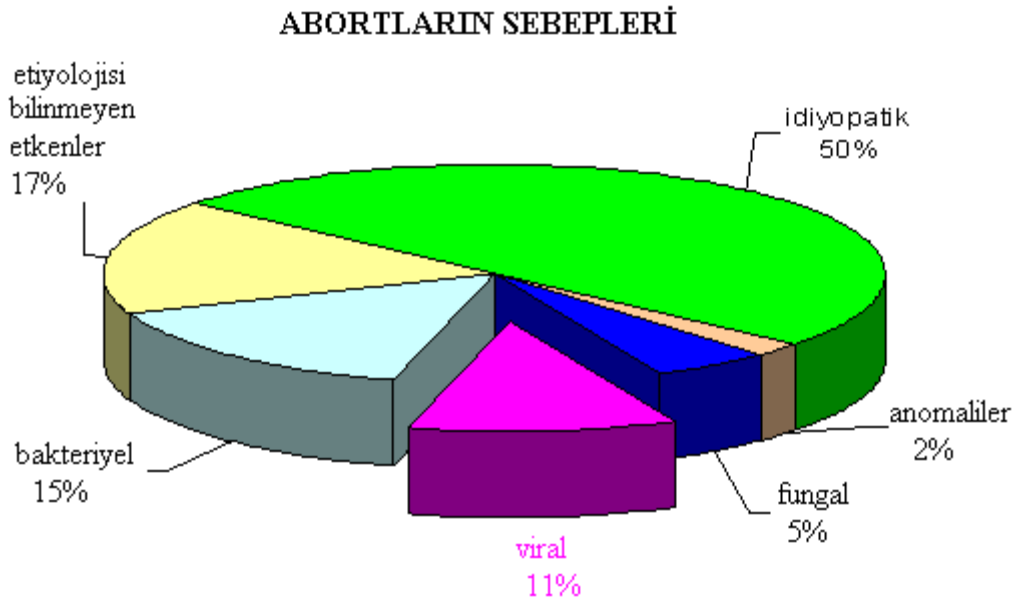
Key Words: Pestivirus, bluetongue virus, Akabane virus, sheep, serology, RT-PCR.

3. GİRİŞ

Koyun yetiştiriciliğinde, işletme devamlılığı ve ekonomik kapasitesinin sürekliliği için, her koyundan sağlıklı yavru alınması oldukça önemlidir. Ayrıca atık yapan koyunlarda süt veriminin olmaması da ekonomik açıdan önemlidir. Bu bakımdan gebeliğin şekillenmesi kadar, gebeliğin devamının sağlanması ve sağlıklı kuzuların elde edilmesi bir yetiştiricinin en önemli beklentisidir. Virus kaynaklı transplasental enfeksiyonların yol açtığı fetal ve embriyonik ölümler, ekonomik bir yetiştiriciliğin devamlılığının sağlanması önündeki problemlerin başında yer almaktadır (1, 2, 3).

Genel olarak ruminantlardaki fetal ve embriyonik ölüm vakaları incelendiğinde, bu vakalarda metabolik ve hormonal bozukluklar, beslenme yetersizlikleri, travma, zehirlenmeler, idiyopatik (sebebin belirlenemediği olgular) ve enfeksiyöz ajanlar gibi çok çeşitli sebepler karşımıza çıkmaktadır (2). Bu nedenle, fetal ve embriyonik ölümlerin sebeplerini tek nedene bağlamak veya bu vakaların etiyojisini belirlemek oldukça zordur. Sağlıklı bir sürüde %3 oranındaki fetal ve embriyonik ölüm vakalarının tolere edilebileceği vurgulanmaktadır. Ancak, kuzulama döneminde bu oran aşıldığında çözüm için teşhise yönelik yardım talebinde bulunmak, analiz için teşhis laboratuvarlarına numune gönderilmesi gerekmektedir. Yapılan çalışmalarda fetal ve embriyonik ölüm vakalarının yaklaşık %5'inde fungal, %11'inde viral, %15'inde bakteriyel ve %17'sinde etiyojisi belirlenemeyen enfeksiyöz etkenler tespit edilmiştir. Kalan yaklaşık %50'sinin ise idiyopatik olduğu ortaya koyulmuştur (Şekil 1). Viruslar dışındaki enfeksiyöz etkenler (örn. *Brucella* spp., *Listeria*

monocytogenes, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Coxiella burnetii*, *Chlamydomphila abortus*) her yıl önemli sayıda ftal ve embriyonik ölümlere neden olmalarına rağmen, sporadik seyrettikleri ve sürü içerisinde yayılım göstermedikleri için yetiştiricilik için sınırlı düzeyde problem oluştururlar (4). Atıkların sebepleri Şekil 1’de özetlenmiştir.



Şekil 1. Atıkların olası sebepleri (4)

Fötal ve embriyonik ölümlere neden olan viral etkenlerin oranı yapılan değerlendirmelerde %28’lere vardığı görülmekle birlikte ortalama %11 civarında olduğu bildirilmektedir. Bu viral etkenlerin önemli özelliği sürü içinde hızla yayılması ve gebeliğin farklı evrelerinde intrauterin veya transplasental enfeksiyon sonucu, gelişmekte olan yavruda etkenin alındığı evreye bağlı olarak değişen (embriyonik ölümler, mumifikasyon, maserasyon, anomalili yavru doğumu, zayıf yavru doğumu, persiste enfekte yavru doğumu) bir dizi

bozukluklara neden olmalarıdır. Bu bakımdan virusların sebep olduğu transplasental enfeksiyonlar genel olarak sürü sağlığını etkilemektedir (4).

Türkiye’de koyunlarda görülen abortlarda bakteriyel etiolojinin araştırılmasına yönelik birçok çalışmaya rastlanmıştır (5-12). Ancak koyunlarda direkt abort olgularında viral etiolojinin araştırılmasına yönelik bu tezde konu edilen viruslar için az sayıda çalışma tespit edilmiştir (1, 2, 13, 14). Abort gibi pek çok etkenin sebep olduğu olgularda sadece bakteriyel etkenlerinin varlığına bakılması epidemiyolojik olarak eksik verilerin elde edilmesine sebep olmaktadır.

Dünyada koyunlarda görülen virus kaynaklı enfeksiyonların başlıcaları Akabane, Mavidil, Pestivirus ve Rift vadisi hummasıdır (2, 3, 13-19). Ülkemizde Rift vadisi hummasının görüldüğüne dair bir bilginin olmaması ve epidemiyolojik olarak özellikle bölgede görülme ihtimalinin çok zayıf olması nedeniyle bu tez kapsamında bu enfeksiyonun varlığı araştırılmamıştır.

Bu tezde Marmara Bölgesindeki koyunlarda görülen abort ve postnatal ölümlerde ülkemizde en önemli viral atık etkenleri olarak kabul edilen pestiviruslar, mavidil virusu (BTV) ve Akabane virusu (AKAV) varlığının araştırılması amaçlanmıştır.

3.1. Pestivirus Enfeksiyonları

3.1.1. Etiyoloji

Pestivirus enfeksiyonuna neden olan viruslar, *Flaviviridae* ailesinin *Pestivirus* grubunda yer alır. Bu grupta klasik domuz vebası (classical swine fever; CSF), sığırların viral diyare virusu (bovine viral diarrhoea virus; BVDV), koyun ve keçilerde enfeksiyon oluşturan sınır hastalığı virusu (border disease virus;

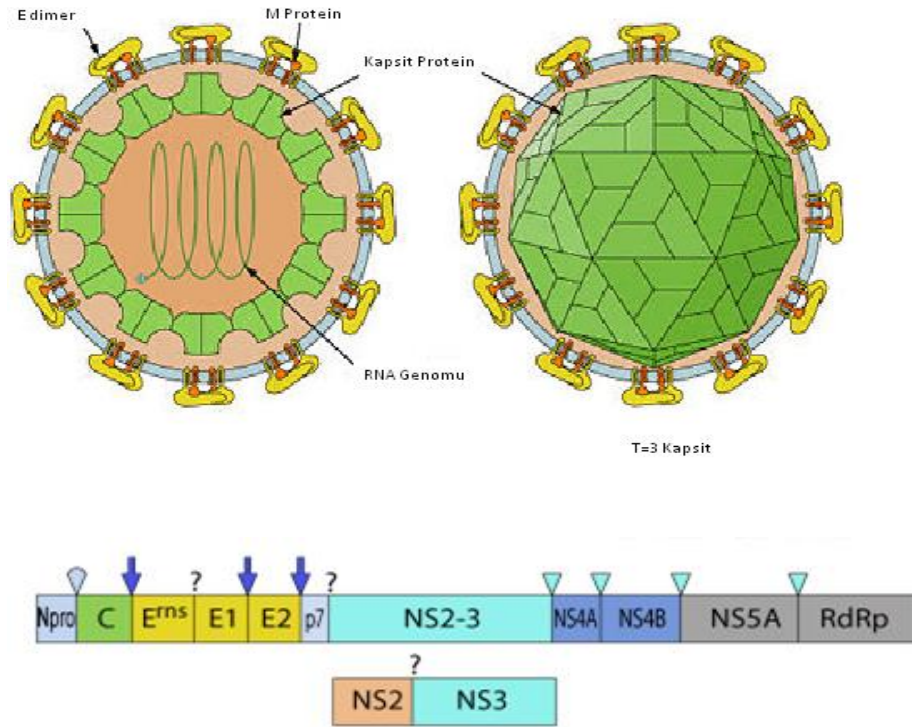
BDV) ve hepatovirus olarak ifade edilen insanlardaki hepatitis C virusu bulunmaktadır (20, 21-23). BVDV ve BDV izolatlarının antijenik yakınlığı, fiziksel ve biyolojik benzerlikleri nedeniyle her iki virus pestivirus generusu içinde aynı tür olarak tanımlanmaktadır (20).

Yakın akraba olan bu virusların (BVDV 1, BVDV 2, BDV ve CSF) sınıflandırılması, türler arası geçiş olasılığı sebebiyle oldukça sorun teşkil etmektedir. Genel olarak koyun ve keçilerin pestivirus enfeksiyonlarının etkeni BDV kabul edilmektedir (23, 24). BDV ilk bildiriimi 1959'da İngiltere ile Wales sınır bölgesindeki koyunlardan tespit edilmesinden dolayı "*sınır hastalığı*" adı verilmiştir. Ayrıca bu hastalık, "hairy shaker disease" veya "fuzzy lambs syndrome" gibi isimlerle de anılmaktadır (23-25). BDV, hem kendi spesifik konakçısı olan koyun ve keçileri, hem de diğer hayvan türlerini (domuz ve vahşi ruminantlar) enfekte edebilmektedir (3, 26). Ancak, son yıllarda yapılan çalışmalarda, koyunlarda pestivirus olgularında kayda değer oranlarda BVDV'un varlığı da tespit edilmiştir. Bu nedenle birçok teşhis laboratuvarı gerek sığırlarda gerekse koyunlarda pestiviruslara bireysel olarak bakmak yerine pestivirus generusu düzeyinde tanıya gitmektedirler.

İzole edilen sınır hastalığı, saha virusları konakçı spesifitesi ve genetik/antijenik analizleri neticesinde kendi aralarında 4 farklı altgrupta (BDV-1, BDV-2, BDV-3 ve BDV-4) toplanmıştır. Benzer şekilde BVDV'un da birden fazla genotipi veya subtipleri bulunduğu ve bunların sayılarının farklı çalışmalarda farklı sayılarda olduğu ifade edilmektedir (23).

Pestivirus genomu tek iplikçikli pozitif polariteli lineer yaklaşık 12,5 kb uzunluğunda, 50 nm çapında, küçük ve zarflı viruslardır (16, 27, 28). Virus

genomu; iki ucundan translate olmayan bölgelerle (5' ve 3', untranslate region UTR) çevrelenmiş, bir açık okunabilir bölgeye (open reading frame, ORF) sahiptir. UTR bölgeleri, virus proteinlerinin sentezi ve virus genomunun replikasyonu için önemli sinyalleri bulundurmaktadır. ORF; yaklaşık 4000 aminoasitten oluşan bir poliprotein olarak kodlanır, yapısal olan ve olmayan 11-12 adet proteine sahiptir (27). Pestivirus partikülü şematik olarak Şekil 2'de, *Flaviviridae* ailesinde yer alan viruslar, etkilediği konakçılar ve coğrafik dağılımı Tablo 1'de verildi.



Şekil 2. Pestivirus partikülü ve genom organizasyonu (29)

Tablo 1. Flaviviridae ailesinde yer alan viruslar, etkilediği konakçılar ve coğrafik dağılımı (22, 23, 30)

| Genus | Etken | Konakçı | Coğrafik Dağılım |
|------------|----------------------------|---------------------------|-----------------------|
| Flavivirus | Louping ill | Koyun, at, insan | Avrupa |
| | Wesselsbron | Koyun | Afrika |
| | Japon ensefalitisi | Domuz,at,insan | Asya |
| Pestivirus | BVD (tip1,2) | Sığır, koyun, keçi, domuz | Dünyada Yaygın |
| | BD (tip 1a,b, 2a,b,3,4a,b) | Koyun, keçi | Dünyada Yaygın |
| | CSF (hog cholera) | Domuz | Bazı ülkelerde yaygın |

3.1.2. Epidemiyoloji

Pestivirusların konakçı spektrumu geniştir ve sadece esas konakçısına spesifik değildir. Virus interspecies bir özellik göstermekte olup, örneğin; BVDV sadece sığırları değil ayrıca koyun, keçi, domuz, geyik ve zürafaları, BDV enfeksiyonu ise hem kendi spesifik konakçısı olan koyun ve keçileri, hemde diğer hayvan türlerini (domuz ve vahşi ruminantlar) de enfekte edebilmektedir (3, 30).

Pestiviruslarda bulaşma direkt ve indirekt yollarla olmaktadır. Virus az oranda akut hasta hayvanlardan ve persiste enfekte hayvanlardan duyarlı konakçılara direkt olarak, gözyaşı, burun akıntısı, gayta, sperma, aborte fötüs, plasenta ve idrarla kontamine gıdalar vasıtasıyla indirekt olarak hayvandan hayvana veya sürüden sürüye kolayca taşınmaktadır. Ayrıca, vertikal bulaşma da sözkonusudur. Yavru verme yaşına kadar yaşayan persiste enfekte dişiler, persiste enfekte yavru verebilir. Bu nedenle virusun taşınması devamlı olmaktadır. İdarecilik sistemleri değişmemiş sürüye duyarlı ve genç hayvanların girişiyle, bir

yıllık periyot genellikle sporadik kayıplarla sonlanır. Bir sürüde enfeksiyon yok ise, persiste enfekte bir hayvanın sürüye girişiyle önemli kayıplar söz konusu olabilir. Enfeksiyon koyun, keçi ve sığırlarda olduğu kadar; domuz, geyik, bizon ve diğer ruminantlarda da meydana gelir. Bu türler, sürülerinde enfeksiyon başlangıcı için virus kaynağı olabilmektedir (30). Pestivirus enfeksiyonu gebe keçilerde genel olarak abort, malformasyonlu fötüsle sonuçlanır ve koyunlardaki enfeksiyonlarının tersine keçilerde persiste enfekte hayvan bildirimini yoktur (21).

Diğer etkili enfeksiyon kaynağı ise pestiviruslarla kontamine modifiye canlı aşılardır. Bilindiği üzere dünya genelinde tüm modifiye canlı aşılar koyun, sığır veya domuz hücre kültürlerinde ve bu türlerden elde edilen serum (pestiviruslarla kontamine olma riski taşıyan) eklenmiş vasatlarda üretilmektedir. Bu nedenle pestivirus yönünden negatif serum ve hücre kullanımı enfeksiyonun kontrol altına alınmasında önemlidir (23, 25, 31-33).

Diğer bulaşma yollarına kıyasla daha az önemli olduğu düşünülse de kan emen kenelerin mekanik olarak virüsü bulaştırdığı da bildirilmiştir (23, 31, 32).

3.1.3. Klinik ve Patogenez

Pestivirusların farklı genotipleri vardır (33). Bu genotipler E2 ve E^{RNS} major glikoproteinlere karşı oluşmuş monoklonal antikorlar ile ya da genetik analizler ile birbirinden ayırt edilebilir (33-35). Ayrıca multipleks tersine transkriptaz-polimeraz zincir reaksiyon (mRT-PCR) tekniği ile kan örneklerinden elde edilen virusların, genotipik tiplendirilmesi yapılabilmektedir (33, 36). Bu genotip farklılıklarına ilave olarak, pestiviruslar iki biyotipe sahip olup, bu biyotipler hastalığın patogenezinde oldukça önemli rol oynar. Bunlar; hücre

kültürlerinde morfolojik bozukluk oluşturan (sitopatojen; cp) ve hücre kültürlerinde morfolojik bozukluk yapmadan (nonsitopatojen; ncp) çoğalabilen biyotiplerdir. Her iki biyotip akut, konjenital ve kronik form şeklinde seyreden klinik tablonun oluşmasında etkin role sahiptir. Nonsitopatojenik biyotipler doğada %95 oranında yaygındır (23, 37- 41).

Akut enfeksiyon; Border Disease virusuna sağlıklı yenidoğan ve gebe olmayan ergin koyunlar maruz kalırsa, hastalık klinik olarak anlaşılmayan (subklinik) veya orta düzeyde bir hastalık tablosu şeklinde görülebilir. Hafif ateş ve orta düzeyde lökopeni ile ilişkili kısa süreli (4-11gün) viremi belirlenebilir, daha sonra nötrilze edici antikorların oluşumuyla bu belirtiler yok olur. Nadiren BDV izolatları genç kuzularda şiddetli depresyon, yüksek ateş, ağır ve uzun süren lökopeni tablosu, anoreksi, konjunktivitis, nazal akıntı, solunum güçlüğü, diyare ve %50 mortalite ile seyredebilir. Otopside sekum, kolon ve mezenterik lenf nodüllerinde hemorajiler görülür. Erkek hayvanlarda da geçici depresyon, infertilite ve sperma ile virus saçılımı şekillenebilir. Akut enfeksiyonlar tek başına önemli bir hastalık tablosu oluşturmasa da, enfekte hayvanlar immunsuprese olduklarından özellikle solunum sistemi etkenleri ile ikincil enfeksiyonlara karşı duyarlı hale gelirler (25).

Fötal enfeksiyon; BDV ile ilgili önemli kabul edilen klinik bulgular gebe koyunlarda gözlenir. Annenin enfeksiyonu subklinik veya orta şiddette iken fötüs için ciddi sonuçlar doğurur. Bu tür enfeksiyonda enfekte hayvan genelde klinik bulgu göstermez (subklinik enfekte) ve virus plasenta yoluyla fötusa geçer. Annenin immun sistemi virusu kendi dokularından temizleyebilir ancak transplasental yolla yavruya virus geçişi olması durumunda, fötüs annedeki

immün cevaptan etkilenmez. Bunun nedeni ruminantlarda plasental antikör geçişinin olmamasıdır (42, 43, 44).

Enfekte olan fötusun erken ölümü absorbe olabilir veya gebe anne rahatsızlık bulgusu göstermeyebilir ve yemesine-içmesine devam eder. Enfeksiyonları takiben kuzulama mevsiminde büyük fötüs abortları (fötüs kahverengi, mumifiye ve şişmiş durumdadır), ölü doğum, konjenital anomalili kuzu doğumları, erken doğum ve canlı fakat zayıf persiste viremik kuzu doğumları görülebilmektedir. Etkilenen kuzular zayıftır ve ayakta duramazlar. Sinirsel bulgular, deride kılsız bölgeler veya dikleşmiş köpek kılı manzaralı alanlar görülür. Arka bacak kaslarında şiddetli ritmik titremeler, nadiren baş, kulak ve kuyrukta da gözlemlenebilir. Deride düzgün kenarlı kahverengi siyah pigmentasyon görülebilir. Enfekte olmuş kuzulara, bu belirtilerden dolayı “hairy shaker” veya “fuzzy lambs” olarak da isimler verilmiştir (25, 45, 46).

Pestiviruslarla oluşabilecek transplasental enfeksiyonlarda fetal ölümler gebeliğin herhangi bir döneminde gerçekleşebilir. Ancak yaygın fötüs enfeksiyonu, gebeliğin ilk döneminde olur. Enfeksiyonun fötustaki seyrini; virusun biyotipi, dozu ve enfeksiyonun geliştiği fetal gelişme dönemi gibi faktörler belirler (47).

Hem sitopatojen hem de nonsitopatojen biyotipler plasental lezyonlar meydana getirirler. Bu özellikleri nedeniyle hem intrauterin ve hem de transplasental enfeksiyon oluştururlar (43). Enfekte fötuslardaki düşük doğum ağırlığına plasental yetersizliğin sebep olduğu söylenmektedir. Ayrıca intrauterin gelişimini sürdürmekte olan fötüs viral ajanlardan etkilenerek sağlıklı fötüsa oranla daha küçük yapıda ve sağlıksız fizyolojide olabilir ki, buna intrauterin

gelişme geriliği adı verilmektedir. Diğer bir taraftan pestiviruslar tiroid bezini etkileyerek yetersiz çalışmasına, (hipotiroidizme) neden olurlar. Tiroid bezinin yetersiz çalışması durumunda T3 ve T4 gibi hormonlar gerektiği kadar salgılanamaz. Bu durum da büyüme ve gelişmenin yavaşlamasına yol açar (38, 42).

Virus, lenforetiküler dokuda yaptığı tahribatla ilgili olarak (timusta atrofi) immunsupresif bir etki gösterir. Virusun immunsupresif etkisine bağlı olarak T ve B lenfositlerinin sayısında azalma vardır. Virus lenfosit yıkımına neden olur (42, 47).

Fötal enfeksiyonun sonucu ise iki değişkene bağlıdır (47);

1. Enfeksiyon zamanında fötusun yaşı
2. Enfekte eden virusun biyotipi

Gebeliğin ilk 16 günü için patogeneizde bir kesinlik yoktur. Bu süre içinde virus maternal dokuda serbest bulunur ve gebelik oranını düşürebilir. Uterus endometriumu ile fötal trofoblastlar arasındaki yapışma/bağlantı 16. gün civarında olduğu için, bu köprü oluşana kadar vertikal bulaşma söz konusu değildir.

Koyun fötusları yaklaşık olarak gebeliğin 60-80. günlerinde immun yeterli hale gelirler. Fötusun periyot öncesi (gebeliğin 60-80. günü), periyot boyunca ve periyot sonrasındaki enfeksiyonu, farklı klinik bulgularının oluşumuna neden olur.

Gebeliğin ilk 60 gününden önce enfeksiyon meydana gelirse %50 ölümle sonuçlanır veya fötal emilme ile abortlar görülebilir. Bu dönemde immun sistemi henüz gelişimini tamamlamadan pestivirus ile enfekte olan bazı fötuslar ise yaşamlarını devam ettirebilirler. Yaşamını devam ettiren kuzularda virus tüm organizmada yaygındır ve herhangi bir yangı belirtisi yoktur. Patolojik bulgu

olarak, tremorlar ve primer kıl folliküllerinde aşırı artış vardır. Bunun nedeni merkezi sinir sistemindeki myelin yetersizliğidir. Bu dönemde fötüs, virüsü yabancı olarak tanımaz ve dolayısıyla da virüse karşı immün yanıt oluşturmaz (persiste enfeksiyon). Bu nedenle gebeliğin ilk yarısında, özellikle 16-80. günlerde oluşan enfeksiyon “persiste viremik kuzu” doğumu ile sonuçlanabilir. Bu kuzular sürekli olarak virus saçıcısı olup, sürüde virusun sirkülasyonunda potansiyel kaynaktırlar. Virus, kanın lenfosit kısmında veya çeşitli organ ve dokularda (deri gibi) yaşam boyu tespit edilebilir (20, 22, 30, 33, 42).

Gebeliğin 60-80. günleri arasında oluşan fötal enfeksiyonlarda, fötüsün immün sisteminin gelişimine bağlı olarak, seropozitiflik ya da seronegatif persistent enfeksiyonlar sözkonusu olabilir. Virus persistensi sırasında, özellikle lenfatik dokulara, epitel ve sinir hücrelerine affinite gösterir. Bu dönemde enfeksiyon, persiste viremik kuzu doğumları ya da serebral çöküntü alanları ve serebellar displaziye neden olan merkezi sinir sisteminde yaygın yangısal lezyonlar oluşturur (37, 40, 45).

Gebeliğin 80. gününden sonra oluşan enfeksiyonda ise fötüs immün yanıt oluşturma yeteneğine sahiptir. İmmün sistemi gelişmiş fötüsün enfeksiyonunda immün yanıt konakçıda virusun eliminasyonu esasına dayanmaktadır. Bu dönemde enfekte olmuş kuzular virus taşımazlar ancak kolostrium almamış hayvanların kan örneklerinde antikor tespit edilebilir (20, 40).

Antijenik olarak farklı pestivirus izolatları, bu hayvanlarda etkili bir immünite sağlarlar. Ancak çapraz koruma oluşturmaz. Nonsitopatojen biyotiple persiste enfekte doğan hayvanlar, yaşamlarının bir döneminde, homolog

sitopatojen biyotiple tekrar enfekte olduklarında akut mukozal disease (MD) vakaları ortaya çıkar (21, 37, 38).

MD, persiste enfekte olmuş, viremik hayvanlarda antijenik homolog olmayan bir sitopatojen virusla da gerçekleşebilir. Bu durum, Late-onset (kronik) MD enfeksiyonu olarak anılır. Bu sendromlu kuzularda inatçı diyare aşırı zayıflama, aşırı göz ve burun akıntısı, zaman zaman solunum zorluğu, nekropside ayrıca fokal hiperplastik enteropatiden kaynaklı ileum, sekum ve kolonun distalinde kalınlaşma gözlenebilir. Bu durum sığır mukozal enfeksiyonu ile benzerlik gösterir (21, 38, 48, 49, 50).

3.1.4. Teşhis

Genellikle kuzulardaki klinik tablo (tipik hairy shaker klinik belirtisi olan kuzu doğumu) teşhise yardımcı olur. Ancak, hastalığın kesin teşhisinde antijen tespiti amacıyla, enfeksiyonun viremi devresinde alınan defibrine kan, nazal svab, deri parçaları (özellikle kulak derisi), aborte fötustan dalak, karaciğer, beyin ve lenf yumrusu soğuk zincirde laboratuvara gönderilir. Kesin teşhis için virus veya viral antijen deteksiyonu gereklidir. Deteksiyon amaçlı virus izolasyonu kuzu böbrek ve kas hücre kültürlerinde gerçekleştirilir. Virus izolasyonunun spesifitesi yüksek olmasına rağmen zaman alıcı, maliyetli, uzmanlık ve özel laboratuvar kaynağı gerektirmektedir. Ayrıca otoliz varlığında virus üretilmesi zor/mümkün olmadığından sensitivitesi yeterli değildir (3). İzolasyon esnasında karşılaşılması muhtemel nonsitopatojen virusların tespiti için, immunfloresan, immunperoksidaz ve RT-PCR testleri laboratuvarlarda rutin olarak kullanılmaktadır. Virus izolasyonuna gidilmeksizin yapılacak direkt teşhis de ise

çoğunlukla antijen ELISA ve RT-PCR teknikleri tercih edilmektedir. 1990'lardan itibaren RT-PCR çeşitli enfeksiyonların teşhisinde rutin olarak kullanılmaktadır ve ayrıca amplifiye edilen gen/bölge sekanslanarak teşhis açısından konfirme edilebilmektedir. Spesifik antikorların belirlenmesinde, antikor ELISA ve serum nötralizasyon testleri en çok kullanılan tekniklerdir. Son yıllarda persiste enfeksiyonların (PI) tespitinde lökositlerden virus izolasyonu çok zaman aldığı için monoklonal antikor (mab) kullanılarak geliştirilen ELISA, immunfloresan boyama ve DNA dot-blot hibridizasyon gibi biyoteknolojik teşhis metotları da kullanılmaktadır. ELISA sığırlarda PI hayvanları tespit etmede çok uygun ve kullanışlı bir tekniktir ancak koyunlarda kullanımı konusunda fazla bir bilgi yoktur. Pestivirusla enfekte koyun sürülerinde PI hayvanları belirlemede virus miktarı düşükse RT-PCR'in sensitivitesinin daha yüksek olduğu vurgulanmıştır (16). Özellikle PI tespiti amacıyla yapılan sürü taramalarında çok sayıda hayvanın kulak derisi parçalarından oluşturulan havuzlardan hazırlanan örneklerin RT-PCR ile test edilmesi hem zamandan hem de test maliyetinden tasarruf sağladığından son yıllarda tercih edilmektedir (3, 16, 25, 46, 51-64).

3.1.5. Koruma ve Kontrol

Pestiviruslarda transplasental nakil için enfeksiyöz etkenlerin öncelikle anneyi enfekte etmesi gerekir. Bu nedenle aşılama, embriyo transferi ve suni tohumlama epidemiyolojik olarak pestiviruslarda korumada oldukça önemlidir. Ayrıca, sürü içindeki subklinik enfekte ve özellikle de persiste viremik hayvanların kontrolü pestivirus enfeksiyonu ile mücadelede önem taşımaktadır.

Enfekte embriyo transferi ve enfekte hayvanlardan sağlanan spermalarla suni tohumlama uygulamaları, pestivirus enfeksiyonunun yayılmasına yol açmaktadır. Embriyo transferi ve suni tohumlama istasyonlarındaki donörlerin mutlaka kontrolleri yapılmalı ve persiste ya da akut enfekte hayvanlar belirlenerek sürüden elimine edilmelidir. Persiste enfekte hayvanlar önemli miktarda virüsü çevreye saçarlar ve sürü içinde enfeksiyonun kalıcılığına neden olurlar. Bu amaçla serolojik ve virolojik rutin sürü kontrollerinin yapılması gereklidir. Serolojik olarak pozitif non-viremik hayvanların güvenli olduğu düşünülür. Ancak persiste viremik hayvanların yaklaşık %15 inde NS/2 protein ve daha düşük düzeyde E2 glikoprotein antikorları vardır (33). Bu nedenle de seropozitiflik durumu özellikle suni tohumlama ve embriyo transferi çalışmalarında avantaj olarak düşünülmemelidir.

Akut enfeksiyon geçirerek iyileşen hayvanlarda genellikle latent enfeksiyon şekillenmemesine rağmen, akut enfeksiyonu takiben iyileşen hayvanların spermalarından nadiren de olsa şüphe edilmelidir (4).

Doku kültürü aşılarının hazırlanmasında kullanılan hücre ve serumların kontrolsüz olması halinde, pestiviruslarla kontamine aşılar enfeksiyonun yayılmasına sebep olur. Bu yüzden aşı hazırlanmasında dikkatli olunmalı ve mutlaka aşılar persiste viral etkenler yönünden test edilmelidir. Biyolojik ürün imalatında bu potansiyel tehlikenin farkındalığı oldukça önemlidir (25, 33).

İthal hayvanların pestiviruslar yönünden negatif olup olmadığı kontrol edilmelidir. Bireysel olarak seronegatif hayvanlar, virus taşıyabileceğinden bu hayvanlar sürülere kabul edilmemelidir. Endemik vakalarda enfeksiyon yayılmaya başlamışsa, persiste enfekte hayvanların tespiti ve bunların eliminasyonu

önemlidir. Hastalığın endemik olduğu ülkelerden alımlarda dikkatli olunmalıdır (25).

BDV'de standart bir aşı yoktur, ancak çok sayıda ticari preparatlar mevcuttur (25, 32, 33). BVDV'den korumanın en etkili yolu fetal enfeksiyonu önlemek amacıyla polivalan BVDV aşısı ile gebelik öncesi annelerin aşılmasıdır, fakat aşılama %100 korumayabilir. Zira birden fazla suşunun olması BVDV'ye karşı yapılan aşılamalarda güçlükler neden olmaktadır. Polivalan BVDV aşıları BVDV'nin farklı suşlarıyla yapılmaktadır. Suşlar arası çapraz koruma zayıf olduğundan başarılı bir mücadele için her çiftliğin kendi suşuyla otojen aşılması gerekir (4).

Aşı uygulanmasında dikkat edilmesi gereken bir diğer nokta gebelerde aşılama zamanıdır. Gebelik öncesinde aşılanmış seropozitif annelerin fetusları enfeksiyonlardan fazla etkilenmemektedir. Eğer canlı aşı kullanılıyorsa, aşı virusunun gebeliğin üç aylık döneminde yavruya transplasental olarak geçebileceği göz önünde tutulmalı, gebe hayvanlara veya süt emme dönemindeki hayvanlara modifiye canlı aşı uygulanmamalıdır. İnaktif aşılar genellikle aşının, ikinci dozunu (rapelini) gerektirir. Bu uygulama gebe hayvanlarda transplasental enfeksiyonu önlemek için en ideal olan uygulamadır (4).

Avrupa'da BVDV için sığırlarda zorunlu ve gönüllü eradikasyon programları vardır (62). İskandinav ülkelerinde 1990'lı yılların başından itibaren sığırlarda BVDV'nin eradikasyonu amacıyla PE sığırların saptanması ve sürüden çıkarılması metodu uygulanmaktadır (43).

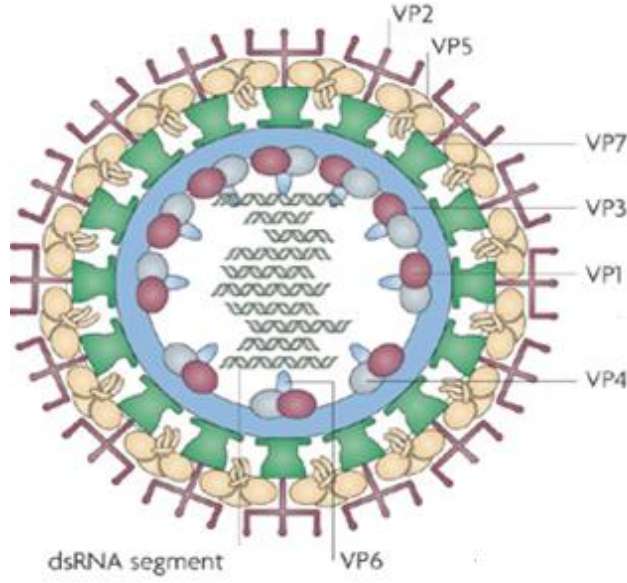
Avrupa’da koyunlar için BDV eradikasyon programı bildirimi yoktur (63). Türkiye’de ise ne sığırlar ne de koyunlarda pestiviruslar için zorunlu bir aşılama, eradikasyon ve kontrol programı mevcut değildir.

3.2. Mavidil Enfeksiyonları

3.2.1. Etiyoloji

Reoviridae ailesinin, *Orbivirus* genusunda yer alan çift iplikli, segmentli RNA virusudur. Mavidil virusu ruminantlar arasında insektler ile transfer edilir (14, 18, 65- 67).

Virion büyüklüğü 60-80 nm’dir. Virion zarsız olup, kübik simetrik nükleokapsit 2 katmanlıdır. Dış kapsit düzenli yayılmış VP2 ve VP5 yapısal proteinlerden meydana gelmiştir. Dış kapsitin altında çekirdek adı verilen iç kapsit ve genom bulunur. İç kapsit düzenli yayılmış VP1, VP3, VP4, VP6 ve VP7 yapısal proteinleri ile NS1, NS2 yapısal olmayan proteinlerden meydana gelmektedir. Her iki katman da ikosahedral simetri sergiler. VP1, VP4, VP6 küçük yapılı, VP3 ve VP7 büyük yapılı polipeptidlerdir (65, 68). Mavidil virus partikülü Şekil 4’de şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 3. Orbivirus partikülü (69)

Mavidil (Bluetongue) virus genomu, dış etkenlere karşı oldukça dayanıklı, çift iplikçikli, pozitif polariteli, linear yapıda, büyüklüğü 19,2 kb olan RNA taşır ve 10 segmentlidir. Segment 1-4, Segment 6, Segment 9 ve Segment 7 yapısal proteinleri (VP1-VP7) kodlar. Segment 5, Segment 8 ve Segment 10 yapısal olmayan proteinleri; NS, NS2 ve NS3/NS3A kodlamaktadır (68).

En küçük genom segmenti olan Seg-10, yapısal olmayan NS3 ve NS3A proteinlerini kodlamaktadır. NS3, 229 aminoasitten, NS3A ise 216 aminoasitten oluşmuştur. Bu proteinler öncelikle virulensin belirlenmesinde önemlidirler. Sitotoksik bir etkiye sahiptirler ve hücre membranlarında hasar oluşturabilirler. NS1 ve NS2 enfekte memeli hücrelerinde tespit edilirken NS3/NS3A insekt hücrelerinde fazla oranda bulunur. NS3 ve NS3A prolinde zengin bir amino ucu iki glikoprotein bölgesi ve iki hidrofobik bölgeden meydana gelmiştir. İki hidrofobik kısım sitotoksiteyi sağlamaktadır. Protein fonksiyonlarını etkileyecek

yapısal değişiklikler sonucunda virusun aminoasit sekansında farklılıklar görülebilmektedir. NS3/NS3A proteinleri hücreden yeni virionların dışarıya çıkmasında ve virusun hücreler arası transferinde önemli rol oynamaktadır. Ayrıca, bu proteinler konak hücrenin annexin II protein kompleksiyle ilişki kurarak virulensin ortaya çıkmasında etkili olmaktadır (68).

Dış kapsitte yer alan VP2, memeli hücrelerinde mavidil virusunun hücreye adsorbsiyon ve penetrasyonunda önemli rol oynamaktadır. VP2 nötralizan epitoplara içerip, serotip spesifik antijendir ve serotipin belirlenmesinde, nötralizasyon ve hemaglutinasyonda önemli aktiviteye sahiptir (68).

Mavidil virusu sokucu sinekler olarak isimlendirilen *culicoidesler* tarafından nakledilir. Dünyada *culicoideslerin* 1000 kadar türü tanımlanmış ve yapılan çalışmalar ile 57 türünün Türkiye’de varlığı tespit edilmiştir (70). Yalnızca 30 türü BTV enfeksiyonu için potansiyel vektördür (71).

Hastalığın gelişimini etkileyen faktörler; virusun serotipi ve dozu, hayvanın kondisyonu, ırk, yaş, duyarlılık ve iklim koşullarıdır. Etkenin 26 serotipi olup transplasental geçişte çoğunlukla 4, 10, 11, 13, 17 serotipleri üzerinde çalışılmıştır. Mavidil, genellikle koyunların belirli ırklarında, özellikle Avrupa ırkı yapağı koyunlarında ve beyaz kuyruklu geyik gibi bazı yabancı ruminant türlerinde görülür. Hastalık aynı zamanda sporadik olarak sığırlarda, Güney Amerika develerinde ve karnivorlarda tespit edilmiştir (18, 42, 72).

3.2.2. Epidemiyoloji

Hastalığın epidemiyolojisinde rezervuar, vektör, iklim ve serotip dörtlüsü önemli faktör olarak rol oynamaktadır. En önemli rezervuar olarak

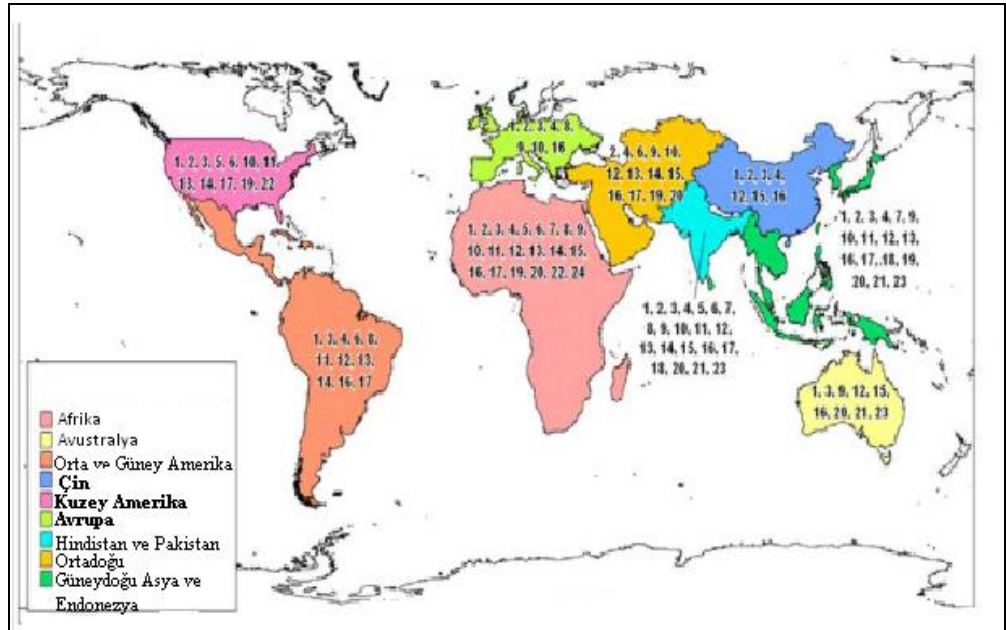
görülen sığırlar hastalığı nadiren yakalanmakta, koyunlarda 30 gün süren vireminin, sığırlarda 100 gün sürmesi rezervuar olarak sığırları ön plana çıkartmaktadır. Sığırlardaki vireminin uzun olmasının hem enfeksiyonun naklinde, hem de vektörün aktif olmadığı kış aylarında etkenin bir sonraki sezona aktarılmasında önemli rol oynadığı belirtilmektedir. Mavidil enfeksiyonu, vektör biyolojisi için uygun iklimsel koşullar olan 34° güney enlemleri ile 53° kuzey enlemleri arasındaki bölgelerde var olmakla birlikte, coğrafik dağılımı çok hızlı değişmektedir. Dünyada yaygın olmasında iklimsel değişimin önemli bir faktör olduğu ileri sürülmüştür. İklimsel değişim sonucu, vektör sinek *culicoides*'lerin daha önce ulaşamadıkları bölgelere, örneğin Akdeniz havzasına ulaşmasının mümkün olduğu düşünülmektedir (18, 67, 71).

Mavidil virusu belirli coğrafi bölgelerinde ve uygun mevsimlerde hızlı bir şekilde yayılma özelliğine sahiptir. Mavidil hastalığının yayılışı vektörlere bağlı olduğundan, hastalık en çok vektör popülasyonunun azami seviyeye eriştiği sıcak yaz ortalarında ve genellikle yağışlı mevsimlerde görülmektedir. Tüm bunlarla birlikte, salgın meydana gelen ülkenin hayvan ve hayvansal ürünlerine uygulanan karantina sonucunda çok ciddi sosyo-ekonomik problemleri de beraberinde getirmektedir (66, 67, 73).

Mavidil hastalığı ilk kez 1800 yılında Güney Afrika'daki koyunlarda görülmüştür. Hastalığın ilk tanımı yapıldığında fever, malarial catarrhal fever, epizootic catarrhal gibi isimlendirmeler yapılmıştır. Daha sonraları hastalık; etkilenen koyunlarda karakteristik siyanotik dilin görünümünü ifade etmek için, bluetongue (BT; mavidil) olarak isimlendirilmiştir (18, 73).

1940'lı yıllara kadar yalnızca Afrika'da tanınan mavidil hastalığının Afrika dışına çıkışı; 1943 yılında Kıbrıs adasında bildirilmiştir (18, 71). Daha sonra 1952 yılında California'da koyunlardan izole edilmiştir. 1956-1957 yıllarında Portekiz ve İspanya topraklarının olduğu İber Yarımadasında, 1959 yılında da Japonya'da büyük salgınlar bildirilmiştir. Yine 1959 yılında Pakistan'da, Kuzey Avustralya, Papua ve Yeni Gine'de, 1963 yılında da Hindistan'da varlığı ortaya konmuştur (71).

BTV'nin son zamanlarda Avrupa'nın büyük bir kesimi, ABD'nin güneydoğusu ve Avustralya'nın kuzeyine kadar yayıldığı tespit edilmiştir (18). Mavidil serotiplerinin küresel yayılımı Şekil 4'de gösterilmiştir.



Şekil 4. Serotiplerine göre mavidil virusunun yayılımı (74)

Türkiye'de mavidil hastalığının ilk defa 1944 yılında Hatay bölgesinde görüldüğü bildirilmiştir. Fakat bu olgular klinik olarak teşhis edilmiş olmasına karşın, laboratuvar teyidi yapılmamıştır. Mavidil hastalığının 1977 yılı sonbahar

mevsiminde Türkiye'nin batısında bulunan Aydın ilinde tekrar ortaya çıktığı bildirilmiştir. Yonguç *ve ark.* 1978 yılında ilk kez, koyunlarda mavidil virusunu izole etmişlerdir. Hastalık 1977 ve 1979 yılları arasında Ege ve Akdenize sınır illerde endemik seyretmiştir. Koyun ve buzağılardan izole ve identifiye edilen baskın serotipin BTV-4 olduğu tespit edilmiştir (75). Mavidil hastalığı 1999 yılı, Temmuz ayında Edirne ilinde tekrar ortaya çıkmış ve komşu illere de yayılım göstermiştir. Son vaka 2000 yılı Ağustos ayında rapor edilmiştir. Edirne, İzmir, Manisa ve Denizli illerine ait izolatlardan BTV-9 ve BTV-16 serotipleri belirlenmiştir (75). Bugüne kadar Türkiye'de belirlenen serotipler BTV-2, BTV-4, BTV-9, BTV-16' dır (76).

3.2.3. Klinik ve Patogenez

BTV'nin patogenezini koyun ve sığırlarda benzerdir. Ancak hastalığın klinik belirtileri ve hastalığın şiddeti türler arasında ve virusun serotipleri arasında farklılık gösterir. BTV koyun yetiştiriciliğinde yaygın olarak görülmekle birlikte hastalığın görüldüğü enzootik bölgelerde, sığırlar ve keçilerde genellikle subklinik enfeksiyona neden olur. Bu durum, konakçı türlerinin endotelial hücrelerinin enfeksiyona karşı göstermiş oldukları yanıtındaki farklılıktan ileri gelir. Koyunlarda mukoza lezyonları yanında, ayak lezyonları beraber seyredir. Enfekte hayvanlarda virus özellikle üreme organlarına yerleşerek yavru veriminde azalma, abort ve konjenital malformasyonlara neden olarak önemli ekonomik kayıplara yol açar (18, 42).

BTV vektör sinek tarafından deriye inokule edildiğinde bölgesel lenf yumrularında ilk replikasyonunu gerçekleştirdikten sonra vücudun değişik

dokularına yayılır ve buralarda, özellikle mononükleer fagositik hücrelerde, endotelial hücrelerde, lenfositlerde, akciğer, deri ve diğler dokularda replike olur. Patogeneziste BTV'nin hedef dokusu küçük kan damarlarıdır ve bu damarlarda lezyonlara sebep olur. Bu virusun endotelial hücrelerde meydana getirdiği sitoliz ve vazoaaktif mediatörlerin nasıl oluştuğu net değildir. Virusun meydana getirdiği lezyonlar karakteristiktir ve oral mukozada üst gastrointestinal bölümde hemoraji ve ülserler, kas ve iskelet kaslarında nekrozlar, akciğer arterinde subintimal hemoraji, perikardial, pleural ve abdominal boşluklarda sıvı birikimi, deri altında, kas fasialarında ve akciğerlerde ödem görülür (18).

Enfekte hayvanlarda viremi hücre ilişkili olup uzun sürebilir ancak ruminantlarda persiste enfeksiyon şekillenmez. Viremi sırasında virus tüm kan hücreleri ile vücuda yayılır ancak özellikle eritrosit ve trombositler bu yayılımda en çok kullanılan hücrelerdir. Özellikle ruminantlardaki viremi sırasında trombositlerin kısa ömürlü, eritrositlerin uzun ömürlü olmalarından dolayı, eritrositlerin enfeksiyonu önem kazanır. Bu nedenle eritrositlerin enfeksiyonu, ruminantlarda ve kanla beslenen insektlerde enfeksiyonun hem kalıcılığını artırır, hem de nötrale edici antikorların varlığında dahi kanda virusun sirkülasyonunu devam ettirir (18).

Enfekte ruminant kanında BTV nükleik asitinin kalış süresi eritrositlerin yarılanma süresine benzerdir ve bu nedenle de bu süre sığırda koyunlardakinden oldukça fazladır. BTV'nin virulansında etkili viral determinantlar kısmen belirlenmesine rağmen, BTV serotipleri arasındaki ayırım tam olarak yapılmıştır. Genetik varyasyonlar, diğler segmentli genoma sahip viruslardakine benzer şekilde genetik driftte ilave olarak, genetik shift sonucu da

ortaya çıkabilir. Genetik shift, hayvanlardaki veya insektlerdeki, birden fazla serotip ya da suş tarafından oluşturulan enfeksiyon sırasında bireysel gen segmentlerinin suşlar arası değişimi sonucu gerçekleşir (18, 42).

BTV'nin transplasental nakliyle ilgili ilk bildirim California'da 1950'lerin başlarında embriyolu yumurtada canlı–attenued BTV serotip 10 suşu ile 5-6 haftalık gebe koyunların aşılanmasından sonra beyin defektli kuzu doğumları sonucu yapılmıştır. Yine Avustralya'da adapte edilmeyen BTV serotip 23'ün transplasental geçiş yapamadığı, ancak aynı suştan hücre kültürlerinde pasajlanarak üretilmiş aşıların gebeliğin erken döneminde kullanıldığında beyin defektli kuzu doğumlarında artışlara sebep olduğu tespit edilmiştir. BTV serotip 8 ile deneysel ve doğal enfeksiyonlarda da vertikal geçişin olduğu ve defektli buzağı doğumlarına sebebiyet verdiği görülmüştür. Bu çalışmalardan elde edilen veriler ışığında saha suşlarının gerek embriyolu yumurtada gerekse hücre kültürlerinde adaptasyonundan sonra transplasental geçiş yeteneği kazandığı ve ftal enfeksiyonlara neden olduğu kanısına varılmıştır. Ayrıca fötus enfeksiyonunda fötus yaşının önemli olduğu tespit edilmiştir (18, 42). Gebeliğin erken döneminde yavruya Mavidil virusunun geçmesi durumunda fötusun merkezi sinir sisteminde lezyonlar oluşurken, gebeliğin geç döneminde enfekte olan fötus viremik doğar ve önemli beyin malformasyonları göstermez (18).

3.2.4. Teşhis

Mavidil virusunun teşhisi için ateşin yüksek olduğu dönemde aseptik şartlarda alınan defibrine kan rneği soğuk zincirde laboratuvara gönderilir. Mavidil virusunun teşhisinde virus izolasyonu yapılabilir. Direkt teşhiste

ise viral RNA'nın belirlenmesi için RT-PCR ve RNA hibridizasyon metodları kullanılmaktadır. Yine direkt teşhiste viral antijenin belirlenmesi için genel olarak Floresan antikor tekniği (FAT) ve sandwich ELISA testleri tercih edilir. Hayvanlarda antikor tespiti için farklı antikor ELISA yöntemleri kullanılmaktadır (65, 66, 76 - 79).

3.2.5. Koruma ve Kontrol

Mavidil virusu ulusal hayvan ticaretinde çok önemli ekonomik zararlara neden olur ve bu nedenle de Dünya Hayvan Sağlığı Organizasyonu (World Organisation for Animal Health; OIE) tarafından List A'da sınıflandırılmış olup ihbari mecburi hastalıktır.

Mavidil enfeksiyonunda bilinen 26 serotip arasında düşük düzeyde çapraz nötralizasyonun olması nedeniyle, enfeksiyondan korunma ve mücadele bu önemli problemdir. Enfeksiyonun çıktığı odaklarda koruyucu aşılardan başarılı sonuç alınabilmesi için enfeksiyonu oluşturan serotipe spesifik aşının uygulanması gerekmektedir. (71).

Sığırların, enfeksiyonun bulaştırılmasında rezervuar olarak önemli bir rol aldıkları ve kanlarındaki enfeksiyon etkenini bir sonraki döneme kadar taşıyabildikleri düşünüldüğünde, bu hayvanların kanlarından virus izolasyon çalışması ile birlikte, bir sonraki enfeksiyon sezonundan önce serotip spesifik aşı üretimi hazırlıkları için zaman kazandıracak erken uyarı sistemi olarak değerlendirilmelidirler (68).

Mavidil enfeksiyonundan korunma amacıyla dünya genelinde uzun yıllardır zayıflatılmış canlı (attenüe) aşılar kullanılmaktadır. Monovalan ve

polivalan olarak kullanıma sunulan bu aşıların en büyük dezavantajları; aşı viruslarının viremisi, kan emici sineklerdeki biyolojik siklus sırasında meydana gelen virulens artışları ve aşılanan hayvanlardaki eş zamanlı saha virus ile süper enfeksiyonları sırasındaki antijenik değişim olasılıklarıdır. Bu nedenle virus enfeksiyonundan korunmada yeni jenerasyon rekombinant aşıların (virus-like particles-VLP) ve inaktif polivalan virus aşıların üretimine yönelik çalışmaların sayısında artış gözlenmektedir (68, 78).

3.3. Akabane Enfeksiyonları

3.3.1. Etiyoloji

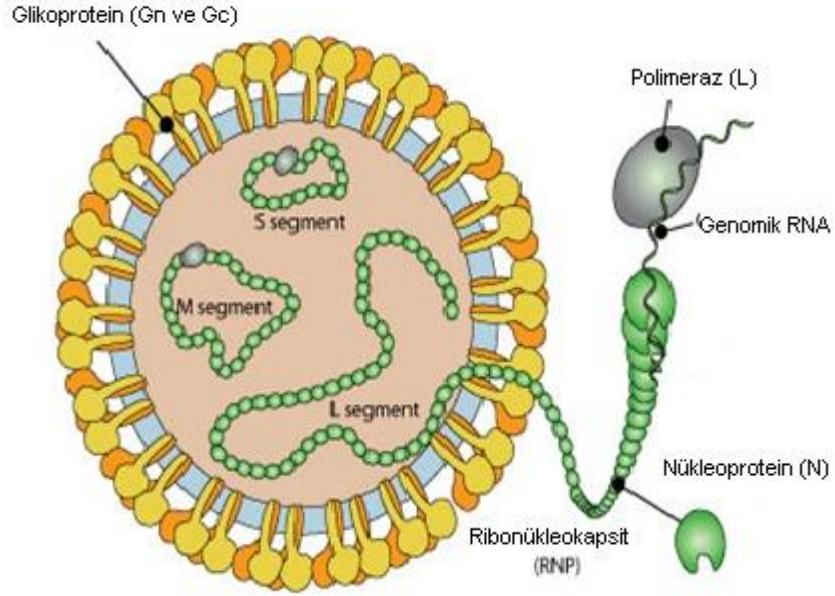
Akabane virusu *Bunyaviridae* ailesinin Orthobunyavirus cinsinin bir üyesidir (80). *Bunyaviridae* ailesi memeli viruslarının en büyük familyası ve en son keşfedilenlerinden biridir. Bu aile 300'den fazla virus içerir ve hemen hemen hepsi sineklerde ve kenelerde çoğalır ve taşınır. Son konakçıları memeli veya kanatlı omurgalı konakçılardır. Önemli zoonotik Hantavirus, Rift Valley fever ve Kırım-Kongo hemorajik fever virusu Ulusal ve Uluslararası hastalık kontrol merkezlerince özel dikkatle incelenmektedir. Çoğu Bunyaviruslar transovarial taşınma vasıtasıyla arthropot vektörlerinde persiste'dir. Virus arthropot yumurtaları, larva, nymph ve ergin gibi jenerasyonlarını enfekte eder ve vertebralı konakçılara taşıma yeteneğindedirler (81).

Geçmiş yıllardaki çalışmalarda, AKAV ve AKAV-ilişkili diğer 24 virus, komplement fikzasyon testine dayanarak, Simbu serogrubunun içinde sınıflandırmıştır. Ancak ICTV'nin son raporunda, önceden Simbu serogrubunda

yer alan Ti-naroorvirus, Sabovirus ve Yaba-7 virusları, Akabane virus izolatları yada serotipleri olarak sınıflandırılmaktadır (82).

Akabane virus *Orthobunyavirus* cinsindeki diğer viruslar ile birçok ortak özelliğe sahiptir. Virionları yaklaşık 90-100 nm çapında büyüklüğe sahip olup, RNA yapıdaki genomu tek iplikçikli, üç segmentli, negatif polaritelidir. Genom segmenteri uzunluklarına göre large (L; 6868 nükleotit), medium (M; 4309 nükleotit) ve small (S; 858 nükleotit) olarak isimlendirilmektedir. Segment L viral genomun transkripsiyon ve replikasyonu için RNA polimeraz aktivitesini kodlar. Segment M iki viral zar glikoproteini (Gn ve Gc) ve yapısal olmayan polipeptid protein (NSm) açıklayan genleri ihtiva eder. S RNA segmenti ise nükleokapsit (N) protein ve daha küçük, yapısal olmayan proteini (NSs) açıklamaktadır (80).

Akabane virusun prototip şuşu olan JaGAR 39 ilk olarak sokucu sineklerde 1959' da izole edildi. Bir çoğu da Japonya'da culicoides türlerinden ve sığırlardan izole edilmiştir (80, 81). Bunyavirus partikülü Şekil 5'de gösterilmiştir.



Şekil 5. Bunyavirus partikülü (83)

Tablo 2. *Bunyaviridae* ailesinde yer alan viruslar, etkilediği konakçılar ve coğrafik dağılımı (22, 30)

| <u>Genus</u> | <u>Etken</u> | <u>Konakçı</u> | <u>Coğrafik dağılım</u> |
|------------------------|--|---------------------------------------|-------------------------|
| Orthobunyavirus | Akabane | Koyun, keçi, sığır, deve, at, buffalo | Afrika Ortadoğu |
| Plebovirus | Rift Valley fever | Koyun, insan | Afrika |
| Nairovirus | Kırım-Kongo hemorajik fever Nairobi koyun hast. | İnsan koyun | Asya Afrika Avrupa |
| Hantavirus | Human hemorajik fever | İnsan | Asya Avrupa |
| Tospovirus | Tomato spotted wilt virus | Bitki | Asya Afrika Avrupa |

Son zamanlardaki çalışmalarda, AKAV saha izolatlarında, antijenik özellikler ve nükleotit sekansları arasında önemli düzeyde farklılıkların bulunduğu tespit edilmiştir. Akabane virusunun antijenik farklılığı çapraz nötralizasyon test ile identifiye edilmiştir. Özellikle İriki suşu virusun tipik varyantı olarak bilinir. Buzağılardaki seroepidemiolojik araştırmalar ve deneysel enfeksiyonlar bu suşun, hastalığın en temel etkeni olduğunu göstermiştir. Akabane virusu ergin sığırlarda genellikle klinik belirti göstermeksizin geçici viremiyle sonuçlanır. Doğum sonrasında yüksek patojenik suşlarla enfeksiyon sığırlarda potansiyel ensefalitis sebebi olabilir (80).

3.3.2. Epidemiyoloji

Akabane virus ilk olarak 1959 yılında Japonya'da sokucu sineklerin farklı alt ailelerinde izole edilmiştir. Bunu 1972 yılında Avustralya ve Afrika'da *Culicoides*'lerdeki izolasyonlar izlemiştir (2, 84).

Akabane etkenine karşı antikor varlığı sığır, koyun, keçi, at, manda ve develerde bildirilmiştir. AKAV enfeksiyonu Ortadoğu, Asya, Kıbrıs, Afrika'da düzensiz Avustralya ve Japonya'da düzenli epidemiler şeklinde görülmektedir (84).

Akabane, gebe sığır, koyun ve keçilerde transplasental enfeksiyonlar sonucu ftopatilere neden olan arboviral bir hastalıktır. Virus, genel olarak *Culicoides* spp. (Japonya'da *Culicoides oxystoma*, Avustralya'da *Culicoides brevitarsis* ve *C. wadeii*, Afrika'da *C. milnei* ve *C. imicola*) sinekleri ile bulaştırılır, tropikal ve subtropikal bölgelerde yaygın olarak bulunur. Ayrıca AKAV'ın, Japonya'da *Aedes vexans* ve *Culex tritaeniorhynchus*, Afrika'da

Anopheles funestus sinekleri aracılığıyla da nakledildiği tespit edilmiştir (2, 85). Taşıyıcı vektör sinekler tarafından yaşamlarının ilk yıllarında enfekte edilen hayvanlar uzun süreli bağışıklığa sahip olurlar. Bu yüzden konjenital bulaşma ve buna bağlı anomaliler nadiren görülür. Ancak nemli havaların uzun süre hüküm sürdüğü dönemlerde artan sokucu sinek popülasyonu nedeniyle yeni duyarlı hayvan popülasyonunun olduğu bölgelere yayılarak konjenital bozuklukların görüldüğü salgınlar ortaya çıkabilir.

3.3.3. Klinik ve Patogenez

Akabane enfeksiyonunun patogenezini ruminantlarda iyi anlaşılmıştır. Vektör aracılığı ile enfekte olan gebe hayvan herhangi bir klinik semptom göstermez, ancak virus plasenta aracılığıyla geçiş yaptıktan, gebeliğin orta yada geç dönemindeki enfeksiyonlarda abort yada konjenital arthrogryposis-hdranencephaly syndrome (AHS) vakalarına yol açar (81, 86). Gebeliğin ilk döneminde enfekte olan fötüsler ya doğumlarından kısa bir süre sonra ölürlere ya da özellikle hareket ve göz sinir sisteminde hasarlara sahiptirler. Gebeliğin ikinci döneminde enfekte olan fötusta arthrogryposis, nörojenik tortikolis ve skalyoz meydana gelir (2).

Hastalığın insidansı gebeliğin dönemine göre değişmektedir. Özellikle gebeliğin 3-4. aylarındaki enfeksiyonlarda insidans ve konjenital kusurlu yavru doğumlarında %40'lara varan artışlar gözlenmektedir. Aynı zamanda virusun suşu da hastalığın sonucunu belirlemede önemlidir. Etken plasenta ve fötusta uzun süre persiste kalabilir.

Transplasental enfeksiyon halinde, fötusta üç formda fötopati meydana gelir:

1. Arthrogryposis
2. Arthrogryposis ve Hidranensefali
3. Hidranensefali

Klinik olarak AKAV tarafından oluşturulan hastalık tablosu Japonya, Avustralya, İsrail, Kore, Tayvan ve Türkiye'den rapor edilmiştir (17). Serolojik çalışmalarda Bahreyn, Kıbrıs, Filipinler, Suudi Arabistan, Singapur, Tayvan, Tayland ve Yemen gibi çok sayıda Afrika ülkelerinde virusa karşı seropozitifliğe rastlanmıştır (81).

Türkiye de ilk defa 1980 yılında Aydın ilinde sığırlardan toplanan kan serumlarının AKAV' a karşı nötralizan antikor varlığı yönünden taranmasıyla Akabane olguları doğrulanmıştır. Serolojik çalışmalar Türkiye'nin sahil kesimindeki birçok ilinde virusun varlığını göstermiştir (81).

AKAV genel olarak çiftlik hayvanları endüstrisinde tekrarlanan ciddi ekonomik kayıplara sebep olmuştur. 1972-75 yılları arasında Japonya'daki en büyük salgında tahminen 42.000'den fazla anormal buzağı doğumlarına neden olmuştur. Bu salgınların ardından hastalıktan korunmak için 1974'de doğal enfekte sığır fötuslarından OBE-1 suşunun izolasyon temeline dayalı attenüe ve inaktif aşılar geliştirilmiştir (80).

Virusun endemik olduğu bölgelerde dişi hayvanlardaki antikor varlığı fetal enfeksiyonu önler fakat AKAV'a maruz kalan sığır ve koyun plasentalarında uzun dönem kalabilme özelliği taşımaktadır. Bu süre koyunlarda 30-70 gün, sığırlarda 30-150 gündür (84).

3.3.4. Teşhis

Özellikle virus izolasyonu amacıyla viremik hayvanlardan kan örnekleri, plasenta, fetal beyin ve kas dokusu örnekleri alınabilir. Ayrıca kan serumları yavrudan kolostrum almadan önce alınmalıdır. Bu örnekler soğuk zincirde laboratuara gönderilir. Direkt teşhiste alınan örneklerde VI, HI, VNT, ELISA, CFT, FAT, RT-PCR teknikleri ile teşhise gidilebilir (84). Nested ve multiplex real-time RT-PCR teknikleri de AKAV ve ilgili diğer viruslar için son yıllarda direkt teşhiste sıklıkla kullanılmaktadır (17, 87, 88).

3.3.5. Koruma ve Kontrol

AKAV enfeksiyonlarıyla savaşmada farklı ülkelerde, enfeksiyonun yaygınlığına bağlı olarak, farklı yaklaşımlar uygulandığı görülmektedir. AKAV enfeksiyonunun neden olduğu endemi ve epidemiler düzenli aralıklarla Japonya ve Avustralya'dan bildirilmektedir. Ayrıca bu ülkelerde aşılamanın fetal kaybı önlemede faydalı olduğu kabul edilmektedir. Bu nedenle de Japonya ve Avustralya'da sığır ve keçileri immunize etmek için inaktif aşı kullanılmaktadır. Saha çalışmalarında üretilen inaktif aşılardan 3 ml kas içi uygulandığında ilk uygulamada %88 oranında yüksek virus nötralizan antikorlar oluşturduğu, 4 hafta aralıklarla tekrar uygulandığında bu oranın %100'e ulaştığı ve gebe hayvanlarda kullanımının güvenli olduğu bildirilmiştir (84). Japonya'da canlı ticari aşılardan vektörlerin aktif olmadığı dönemde 1 ml deri altına uygulanarak yapılmaktadır. Lökopeni, viremi ve ateş gözlenmeksizin nötralizan antikor yanıtı oluşturmaktadır. Canlı aşılardan sığırlar için güvenli bulunmuştur. Deneme çalışmalarında test edilen gebe koyunların birçoğunda viremi ve birçok fötusa ait

organlarda virus tespit edilmiştir. Canlı aşı uygulamaları fetal problemlere neden olmamasına rağmen, koyunlar için kullanımı önerilmemektedir veya riskli bulunmaktadır (84). Japonya ve Avustralya'da bu uygulamalara rağmen birçok ülkede ise virus enfeksiyon bildirim ve aşılama gibi uygulamalara rastlanmamaktadır (84).

4.GEREÇ ve YÖNTEM

4.1. Gereç

4.1.1. Serum Örnekleri

Tezin seroepidemiolojik çalışmalarına yönelik, Marmara Bölgesinde bulunan bölgenin genel durumunu yansıtacak şekilde 12 ilden (Şekil.6) aşılanmamış 6 aylığın üzerindeki 1200 adet koyundan, tesadüfi örnekleme yoluyla kaolinli tüplere kan örnekleri toplandı. Kan serumu örneklerinin alındığı iller Tablo 3’de liste halinde verildi.

Kanlar laboratuvara getirildikten sonra soğutmalı santrifüjde +4°C’de 1000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilerek eppendorf tüplerine aktarılan serum örnekleri ELISA testinde kullanılıncaya kadar – 80 °C’de saklandı.

Tablo 3. Kan serumu örneklerinin illere göre dağılımı

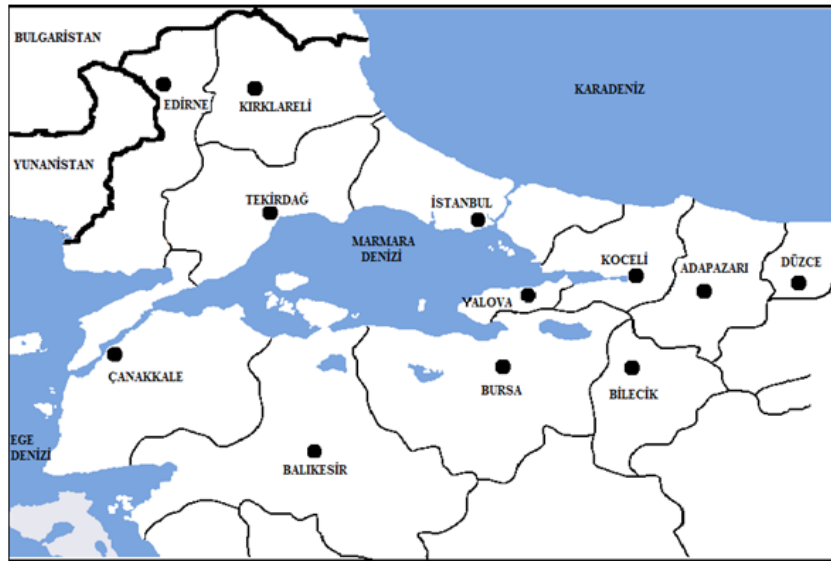
| Marmara Bölgeleri | Bölgesi | Koyun Mevcudu | İlin bölge geneline oranı (%) | Test Edilen Örnek Sayısı |
|-------------------|---------|----------------|-------------------------------|--------------------------|
| Balıkesir | | 592440 | 29 | 300 |
| Ç.Kale | | 393893 | 19 | 200 |
| Bursa | | 252589 | 12 | 155 |
| Kırklareli | | 214741 | 10 | 130 |
| Tekirdağ | | 182684 | 9 | 90 |
| Edirne | | 163049 | 8 | 90 |
| İstanbul | | 70459 | 3 | 50 |
| Bilecik | | 66877 | 3 | 32 |
| Kocaeli | | 58355 | 3 | 30 |
| Sakarya | | 46977 | 2 | 63 |
| Yalova | | 15118 | 1 | 50 |
| Düzce | | 10543 | 1 | 10 |
| TOPLAM | | 2067725 | 100 | 1200 |

*Hayvan sayıları Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK)’ndan temin edilmiştir.

Çalışılacak materyal sayısını tespit etmek için; %99 güven aralığı ve %5 hata payı dikkate alınmıştır. Ayrıca, çalışmanın yapıldığı Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsüne bağlı 12 il genelinde daha önce prevalans çalışması yapılmadığından tahmini prevalans %50 olarak alınmış ve örnek büyüklüğü 663 olarak tespit edilmiştir. Çalışmada bu örnek büyüklüğünün yaklaşık iki katı örnek test edilmesi tercih edilmiştir.

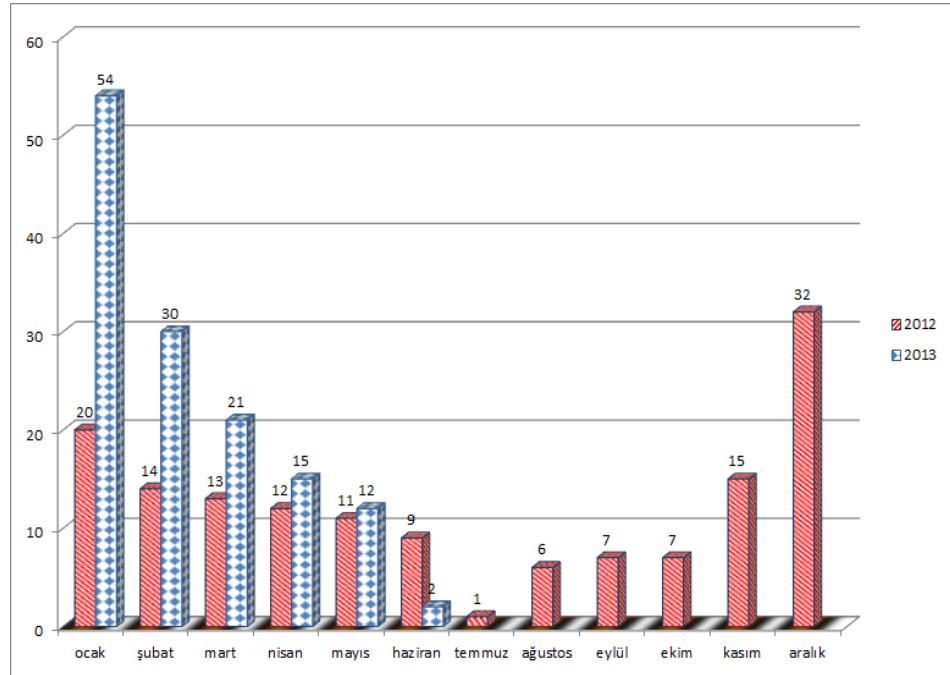
4.1.2. Viral Teşhis Materyalleri

Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü, viral teşhis laboratuvarı'na gelen koyun atık fötüs karaciğer, akciğer, dalak, lenf yumruları, tiroid, böbrek, kas doku ve beyin doku örnekleri toplandı. Ayrıca çalışma kapsamında, doğumu takip eden ilk iki günde ölen yavrulara ait yukarıda ifade edilen organ örnekleri alındı. Toplanan örnekler RNA izolasyonu gerçekleştirilinceye kadar -80°C'de saklandı. Örneklerin alındığı iller Şekil 6'da belirtilmiştir. Örneklerin yıllara ve aylara göre dağılımları ise Tablo 4' de verilmiştir.



Şekil 6. Test edilen örneklerin toplandığı iller

Tablo 4. Viral örneklerin yıllara ve aylara göre dağılımı



4.1.3. Referans Viruslar

Çalışmada, pestivirus tespiti için BVDV referans NADL suşu Elazığ, Fırat Üniversitesi Viroloji Anabilim Dalı virus koleksiyonundan temin edildi. Mavidil pozitif kontrol olarak, Etlik Veteriner Kontrol Enstitüsü'nden temin edilen mavidil serotip-4 aşı virusu tercih edildi. Aynı tezde AKAV için RT-PCR çalışmalarında kontrol olarak Pendik Araştırma Enstitüsü Viral Teşhis Laboratuvarında mevcut olan virus kullanıldı.

4.1.4. Kimyasal Maddeler

Tez çalışmalarında kullanılan kimyasal maddeler ticari olarak temin edildi. Bu kimyasallar Tablo 5' de liste halinde mevcuttur.

Tablo 5. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler

| Kimyasalar | Firma |
|----------------------|---------------------|
| Agaroz | Prona, EU |
| Borik asit | Merck, Almanya |
| EDTA | Merck, Almanya |
| Tris-HCL | Merck, Almanya |
| Trizma baz | Merck, Almanya |
| Mutlak etanol | Merck, Almanya |
| Etidiyum bromit | Sigma, ABD |
| Yükleme tamponu | Fermentas, Litvanya |
| DNA merdiveni 100 bp | Fermentas, Litvanya |

4.1.5. Ticari Kitler

Çalışmada kan serumlarından antikor varlığı için kullanılan ELISA, klinik örneklerden RNA izolasyonu ve RT-PCR için kullanılan ekstraksiyon ve PCR kitleri Tablo 6’da liste halinde sunulmuştur.

Tablo 6. Çalışmada kullanılan ELISA, ekstraksiyon ve PCR kitleri

| Kitler | Firmalar |
|--------------------------------------|-----------------|
| BVD/MD/BDV p80 Protein Antikor ELISA | IDEX, İsviçre |
| Mavidil VP7 Antikor c-ELISA | IDEX, İsviçre |
| Akabane Antikor ELISA | ID Vet, Fransa |
| High Pure Viral Nükleik Acid Kit | Roche, Almanya |
| Qiagen OneStep RT-PCR Kit | Qiagen, Almanya |
| 2xMaster Mix | MBI Fermentas |
| DNA Purification Kit | Qiagen, Almanya |

4.1.6. Cihazlar

Çalışma süresince Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü, viral teşhis laboratuvarına ait cihazlar kullanıldı. Çalışma süresince kullanılan cihazlar Tablo 7’de liste halinde verilmiştir.

Tablo 7. Çalışmada kullanılan laboratuvar cihaz ve ekipmanlar

| Cihazlar | Firma |
|------------------------------|----------------------------|
| -20 ve-80 °Cderin dondurucu* | Thermo, Japon |
| Laminar flow | Holten HWR 2448 |
| Magna-Lyser doku parçalayıcı | Roche, ABD |
| Soğutmalı Mikro santrifüj | Sigma, ABD |
| Vorteks | Heidolph Reax Top, Almanya |
| Kuru blok ısıtıcı | Techne, UK |
| Mikro santrifüj | Hettich micro 22 R, Japon |
| Termal Cycler | Techne, İngiltere |
| LightCycler 2.0 | Roche, Almanya |
| Hassas terazi | Presica, İsviçre |
| Mikrodalga fırın | Arçelik, TR |
| Elektroforez cihazı | EC-320 |
| Güç kaynağı | EC 250-90 |
| Transİlluminator | 312 Vilber Lourmat |
| Jel Görüntüleme Sistemi | Poloroid, GelCam, UK |

*Cihazların yıllık kalibrasyonları ve günlük sıcaklık takibi yapılmaktadır.

4.2. Yöntem

4.2.1. Pestivirus Antikorları için İndirek ELISA Testi

Kan serumlarından pestivirus antikorlarının varlığı ticari ELISA testi (BVDV/MD/BDV p80 Protein Antikor Test Kit, Idexx, İsviçre), üretici firmanın prosedürüne göre yapıldı. Sonuçlar ELISA cihazında okundu ve optik dansite

(OD) değerlerine göre pozitif serumlar kaydedildi. Test aşağıda tarif edildiği gibi gerçekleştirildi.

Testte baŐlamadan önce bütün kimyasallar 18-26 °C oda ısısına getirildi ve yıkama solüsyonu 1/20 oranında distile su ile sulandırıldı. Kit içerisindeki sulandırma solüsyonunun 75 µl'si pleytin kontrol için kullanılacak dört gözü hariç tüm gözlere dağıtıldı. Kontrollerin konulacağı dört kuyucuğa bu solüsyondan 50 µl konuldu. Bu kuyucukların ikisine Negatif Kontrol (NK) diğer ikisine ise Pozitif Kontrol (PK) den 50 µl konuldu. Diğer tüm kuyucuklara çalışılacak serum örneklerinden, her örnek için pipet deęiŐtirilmek kaydı ile 25 µl eklendi. ELISA pleytlerin üstleri alüminyum folyo ile kapatıldı ve bir gece + 4°C'de inkube edildi. Bu süre sonunda tüm kuyucuklar 300 µl yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkandı. Yıkamayı takiben, konjugat solüsyonundan tüm kuyucuklara 100 µl konuldu. Pleytler 30 dk. oda ısısında (18-26 °C) inkubasyona bırakıldı. Yıkama işlemi tekrar edildi ve son yıkamadan sonra kuyucuklara 100 µl TMB substrate eklendi. Reaksiyon için karanlık ortamda ve 18-26 °C'da 20 dk. beklendi. Bu süre sonunda reaksiyonlar 100 µl stop solüsyonu ile durduruldu. Tüm örneklerin ve kontrollerin optik dansite değerleri 450 nm dalga boyunda ELISA okuyucuda okutuldu. Sonuçlar aşağıda belirtildiği gibi hesaplandı.

$$NK\bar{x} = \frac{NK1 A_{450} + NK2 A_{450}}{2} \quad \text{/N(\%)} = 100 \times \frac{\text{rnek } A_{450}}{NK\bar{x}}$$

NK1 = Negatif Kontrol 1 (birinci kuyucuk OD değeri)

NK2 = Negatif Kontrol (ikinci kuyucuk OD değeri)

$NK\bar{x}$ = Negatif Kontrol ortalaması (negatif kontrollerin 1 ve 2 inci kuyucukların OD toplamlarının ikiye bölünmesi ile elde edilen ortalama OD değeri.

Sonuçların yorumlanması ise aşağıda tarif edildiği şekilde gerçekleştirildi.

- Örneklerin \bar{O}/N yüzdesi % 50 den büyük veya eşit ise sonuç negatif
- Örneklerin \bar{O}/N yüzdesi % 40'dan büyük ve %50'den düşük ise şüpheli
- Bu örnekler yeniden test edildi.
- Örneklerin \bar{O}/N yüzdesi %50'ye eşit veya düşük ise pozitif

\bar{O} = Örneğin yüzdesi

N = Negatif kontrol yüzdesi

4.2.2. Mavidil Antikorları için İndirek ELISA Testi

Kan serumları BTV antikorları yönünden ticari ELISA testi ile, üretici firmanın (Idexx, İsviçre) talimatları doğrultusunda ve pestivirus antikor ELISA'da tarif edildiğine benzer şekilde, test edildi. Sonuçlar ELISA cihazında okundu ve OD değerlerine göre antikor pozitif serumlar kaydedildi.

4.2.3. Akabane Antikorları için İndirek ELISA Testi

Kan serumları Akabane antikorları yönünden ticari ELISA testi ile, üretici firmanın (Idexx, İsviçre) talimatları doğrultusunda ve pestivirus antikor ELISA'da tarif edildiğine benzer şekilde test edildi. Sonuçlar ELISA cihazında okundu ve OD değerlerine göre antikor pozitif serumlar kaydedildi.

4.2.4. Viral RNA Ekstraksiyonu

RNA ekstraksiyonu yapılırken ekstraksiyon aşamasının kontrolü olarak, yukarıda belirtilen pestivirus, BTV ve AKAV pozitif örnekler ile birlikte negatif örnek kontrolü olarak da steril distile su çalışmaya dahil edilerek optimizasyonları sağlandı.

Doku örneklerinden (fötus ve postnatal örneklerinde; lenf yumrusu, akciğer, dalak, böbrek, timus, kas dokusu ve fötal beyin homojenat havuzları) High Pure Viral Nükleik Asid Kiti (Roche, Almanya) kullanılarak, üretici firmanın önerileri doğrultusunda RNA'lar elde edildi. RNA ekstraksiyonları, aşağıda belirtilen yöntemle göre gerçekleştirildi.

Öncelikle, iç organ ve dokuların her birinin en az üç farklı bölgesinden bistüri ve pens kullanılarak alınan (her farklı örnek için farklı bistüri ve pens) doku parçaları (yaklaşık 30 mg) 2 ml'lik ticari tüplere (Magna Lyser Green Beads) aktarıldı. Numunelerin üzerine 1'er ml distile su konularak, tüpler Magna Lyser cihazına yerleştirilerek 4000 rpm'de 40 saniye süre ile dokuların parçalanması sağlandı. Homojenat haline getirilen örnek 14000 devirde soğutmalı santrifüjde 3 dakika santrifüj edilerek, süpernatantlardan 200'er µl alındı ve 1,5 ml'lik ependorf tüplere konuldu. Örnek içeren tüplere 200'er µl bağlanma tamponu, 50 µl proteinaz K solüsyonu (25 U/mg), 4 µl poly (A) eklendi ve vorteks yardımıyla karıştırıldı. Bu karışım 72°C'de 10 dk. inkube edilerek tüplerin üzerine 100'er µl bağlanma tamponu (Guanidinium HCL/Triton x-100) ilave edilerek vortekslendi. Hazırlanan karışım toplama tüpleri içerisine yerleştirilen filtreli tüplere aktarılarak 8000 g'de 1 dk. santrifüj edildi.

Santrifüjü takiben altta sıvı biriken toplama tüpler atıldı. Üstteki filtreli tüpler yeni toplama tüplere yerleştirildi. Tüplere 500 µl inhibitor uzaklaştırma tamponu eklenip 8000 g'de 1 dk. santrifüj edildi. Santrifüj sonrası altta sıvı biriken toplama tüp atıldı. Üstteki filtreli tüpler yeni toplama tüp içine yerleştirilerek üzerine 450 µl yıkama tamponu eklendi ve 8000 g'de 1 dk. santrifüj edildi. Bu basamak bir kez daha tekrar edildi. Ardından filtrede kalan etanolün tamamen uzaklaştırılması için 14000 g'de 10 saniye santrifüj edildi. Daha sonra filtreli tüpler yeni bir 1.5 ml'lik eppendorf tüpler içine yerleştirildi ve üzerine daha önceden 70°C'de ısıtılmış çözünme tamponundan 50'şer µl eklendi ve 8000 g'de 1 dk. santrifüj edildi. Son olarak üstteki tüp atıldı ve eppendorf tüp içindeki örnek, hedef RNA olarak PCR testinde kullanılmaya kadar, -80°C'de muhafaza edildi.

4.2.5. Pestivirus Dupleks RT-PCR

Pestivirus tespitinde Wilcek *et al.* ile McGoldrick *et al.* tarafından bildirilen yöntemler modifiye edilerek kullanıldı (58, 64). Kısaca, ön çalışmalarda konvansiyonel RT-PCR protokolü uygulanmıştır. Ancak, sonraki çalışmalarda gerek zaman gerekse maliyet hesaplamaları dikkate alınarak, ayrıca kontaminasyon riskini ortadan kaldırmak için nested RT-PCR'da kullanılan primerlerin ortak karışımı ile hazırlanan dupleks RT-PCR tekniği tercih edilmiştir.

PCR testinin ticari OneStep RT-PCR kiti (Qiagen, Almanya) kullanılarak optimizasyonu gerçekleştirildi. Çalışmada kullanılan primer dizinleri Tablo 8'de, PCR karışımı ve ısı döngü protokolü Tablo 9'da sunulmuştur.

Tablo 8. Pestivirus nested RT-PCR tekniğinde kullanılan primer setleri

| Primerler | Primer dizini (5'-3') | Hedef gen | Ürün (bp) | Referans |
|---------------|---------------------------------|-----------|-----------|----------|
| F V324 | ATGCCCGTAGTAGGACTAGCA | 5' NCR | 290 | (58) |
| R V326 | TCAACTCCATGGCCATGTAC | | | |
| Nested (F)A11 | AGTACAGGGTAGTCGTCAGT GGTTCCG | | 220 | (64) |
| Nested (R)A14 | CTGCTGTACATGGCACATGGAGTTG | | | |

Tablo 9. Pestivirus RT-PCR tekniğinde kullanılan PCR karışımı ve ısı protokolü (1.siklus)

| Bileşen | Miktar | Sıkluslar |
|-------------------------------|--------------|--|
| Deiyonize su | 6 µl | |
| 5x | 4 µl | |
| Q sol | 4 µl | 50°C'de 30 dk |
| DNTP | 0,8 µl | 95°C'de 15 dk |
| Enzim | 0,8 µl | |
| V324 F- Primer (20 pmol / µl) | 1 µl | 94°C'de 1 dk 58°C'de 1 dk 72°C'de 1 dk |
| V326 R-Primer- (20 pmol / µl) | 1 µl | |
| RNA | 2,4 µl | |
| | | 72°C'de 10 dk |
| Total | 20 µl | |

Tablo 10. Pestivirus nested RT-PCR tekniğinde kullanılan PCR karışımı ve ısı protokolü (2. siklus)

| Bileşen | Konsantrasyon | Kullanılan Program |
|---------------------|---------------|--|
| 2x Master Mix | 10 µl | |
| Deiyonize su | 7µl | 95°C'de 2dk Denatürasyon |
| A11 (20 pmol / µl) | 0,5 µl | 95°C'de 1 dk 58°C'de 1 dk 72°C'de 1 dk |
| A14 (20 pmol / µl) | 0,5µl | |
| RNA | 2 µl | |
| | | 72°C'de 10 dk Final |
| Total | 20 µl | |

Tablo 11. Pestivirus dubleks RT-PCR tekniğinde kullanılan PCR karışımı ve ısı protokolü

| Bileşen | Konsantrasyon | Kullanılan Program |
|--------------|---------------|--------------------|
| Deiyonize su | 5 µl | |
| Sx | 4 µl | 50°C'de 30 dk |
| Q sol | 4 µl | 95°C'de 15 dk |
| DNTP | 0,8 µl | |
| Enzim | 0,8 µl | 95°C'de 1 dk |
| V324 | 0,5 µl | 58°C'de 1 dk |
| V326 | 0,5 µl | 72°C'de 1 dk |
| A11 | 0,5 µl | |
| A14 | 0,5 µl | |
| DMSO | 0,4 µl | 72°C'de 10 dk |
| RNA | 3 µl | |
| Genel Toplam | 20µl | |

40 siklus

4.2.6. Akabane RT-PCR

Akabane RT-PCR, ticari olarak OneStep RT-PCR kiti (Qiagen, Almanya) ve tek primer çifti kullanılarak gerçekleştirildi (89). Akabane virus kontrol kullanılarak RT-PCR ticari Qiagen kitinin deteksiyon limiti tespit edildi ve kit sonraki çalışmalar için optimize edildi.

Çalışmada kullanılan primer dizinleri Tablo 12, PCR karışımı ve ısı protokolü Tablo 13'de sunulmuştur.

Tablo 12. Akabane RT-PCR tekniğinde kullanılan primer setleri

| Primerler | Primer dizini (5'-3') | Hedef gen | Ürün büyüklüğü (bp) | Referans |
|-----------|--------------------------|-----------|---------------------|----------|
| AKSF19 | TAACTACGCATTGCAAT GGC | S gen | 722 | (89) |
| AKSF740 | TAAGCTTAGATCTGGAT ACC | | | |

Tablo 13. Akabane RT-PCR tekniğinde kullanılan PCR karışımı ve ısı protokolü

| Bileşen | Konsantrasyon 1X | Kullanılan Program |
|-----------------------|-------------------------|---------------------------|
| Deiyonize su | 10,3 µl | |
| 5x | 4 µl | 50°C'de 30 dk |
| MgCl ₂ | 0,5 µl | 95°C'de 15 dk |
| Primer1(10pmol / µl) | 0,8 µl | |
| Primer2(10pmol / µl) | 0,8 µl | 95°C'de 15 san |
| dNTP | 0,8 µl | |
| Enzim mix | 0,8 µl | 50°C'de 45 san |
| RNA | 2 ul | 72°C'de 2 dk |
| | | 45 döngü |
| | | 40°C'de 30 san |
| Total | 20 µl | |

4.2.7. Pestivirus ve Akabane Virus PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi

Beher içine % 1.1'lik agaroz jel hazırlamak için; 0.55 gr agaroz konulup üstüne 50 ml 1X TAE (Tris-Asetik Asit-EDTA) buffer ilave edildi. Mikrodalga fırında 1-2 dk. ısıtılarak agarozun çözülmesi sağlandı ve jel 50-55 °C'ye kadar soğutulduktan sonra üzerine 0,5 µg/ml oranında ethidium bromide konuldu. Tarak yerleştirilmiş olan jel taşıyıcısına hazırlanan bu karışım döküldü.

Yaklaşık 20 dakika sonra donmuş jelden taraklar çıkarılıp, jel taşıyıcı tanka yerleştirildi. Jel tankı agarın üzerini örtecek şekilde TAE buffer ile dolduruldu.

PCR ürünleri yükleme boyası ile (6x Loading Dye, Fermentas, Litvanya) agaroz jelde kuyucuklara sırasıyla yüklendi.

Ürün büyüklüğünün yaklaşık olarak belirlenebilmesi için yükleme boyası içinde 100 bp merdiven (DNA merdiveni, Fermentas, Litvanya) solüsyonundan ilk ve son kuyucuklara 6 µl yüklendi.

Ürünler yaklaşık 30 dakika, 100 Volt elektrik akımında örnekler jelin 2/3 ünü geçene kadar yürütüldü.

Jel görüntüleme sistemi (Polaroid, GelCam, UK) kullanılarak PCR sonucu oluşan spesifik bantlar görüntülendi.

Mavidil Virus real-time RT-PCR

BTV virus genomunun Segment 1 (VP1) bölgesini çoğaltmak ve göstermek için, Anthony Shaw *et al.* 'nın bildirdiği yöntem kullanıldı. (78). Real-time RT-PCR amplifikasyonu ve tespiti Roche Light Cycler 2.0 real-time PCR (Roche, Almanya) cihazıyla yapıldı. Bu amaçla kullanılan primer ve prob seti Tablo 14, PCR karışımı ve ısı protokolü Tablo 15'de gösterildi.

Tablo 14. Mavidil real-time RT-PCR tekniğinde kullanılan primer ve prob seti

| Primerler | Primer dizini (5'-3') | Hedef gen | Referans |
|-----------------------|----------------------------------|-------------------|-----------------|
| RSA(east) F primer | GCGTTCGAAGTTTACATCAAT | Segment1 (VP1) | |
| RSA(east) R primer | CAGTCATCTCTCTAGACACTCTATAATTACG | | |
| UNI(west) F primer | GCTTTTGAGGTGTACGTGAAC | | (78) |
| UNI(west) R primer | TCTCCCTTGAAACTCTATAATTACG | | |
| BTV RSA ProPedunR | FAM-CYGGATCAAGTTCCTCCAYGGC-BHQ-1 | | |

Tablo 15. Mavidil real-time RT-PCR tekniğinde kullanılan PCR karışımı ve ısı protokolü

| Bileşen | Konsantrasyon 1X | Kullanılan Program |
|-------------------------|------------------|--|
| Deiyonize su | 5,4 µl | |
| 5x | 4 µl | |
| MgCl ₂ | 1 µl | 50°C'de 30 dk |
| Primer 1(10pmol/ µl) | 1 µl | 95°C'de 15 dk none |
| Primer 2 (10pmol/ µl) | 1 µl | 95°C'de 15sn none } 45xQuantification 60°C' de 1dk single |
| Primer 3 (| 1 µl | |
| Primer 4 | 1 µl | |
| Prob (5pmol/ µl) | 1 µl | |
| dNTP | 0,8 µl | |
| Enzim mix | 0,8 µl | |
| RNA | 3 µl | 40°C'de 20 san none |
| Total | 20 µl | |

Real-time RT-PCR metoduna geçilmeden önce çift zincirli BTV RNA'sı denatürasyon işlemine tabii tutuldu. Bu amaçla RNA örnekleri master mikse eklenmeden önce 95 °C'de 5 dk. termal ısı cihazında inkübe edildikten sonra derhal buz içine alınarak soğutuldu. Test edilecek örnek sayısından bir fazla olmak üzere master miks hazırlandı ve vortekslendi. Lightcycler kapillerlerinin her birine 17 µl master miks konularak üzerlerine 3 µl RNA eklenerek 15 saniye süre santrifüj edildi. Kapiller tüpler cihaza yerleştirilmeden önce günde bir kez olmak üzere cihaza self test yaptırıldı. Kapiller tüpler LightCycler 2.0 cihazına ait alana yerleştirildi ve uygun program kodu seçilerek deney gerçekleştirildi.

4.2.8. Mavidil real-time RT-PCR Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Real-time RT-PCR sonuçları floresans verilerine göre, 60 °C'de ve 530 kanalında Fam filtresi yardımıyla elde edildi. Deney sonuçlarını analizi için kantitatif analiz modu seçildi ve paralel çalışılan kontrol örnekleri (BTV kontrol

virusu ve iç kontrol) ile test örnekleri karşılaştırılarak sonuçlar değerlendirildi. Paralel çalışılan örneklerle test örnekleri karşılaştırılarak sonuçlar analiz edildi. Referans örnekten curve analizi (Threshold cycle; Ct, Ct değeri) yapılarak PCR'in etkinliği saptandı. LightCycler için optimum efficieny 2.0 olarak tespit edildi. Bir örneğin pozitif mi yoksa negatif mi olduğunu analiz ederken; Ct değeri <30 ise örnek pozitif, Ct değeri 30-35 arasında ise ve sigmoid logaritmik bir eğri ise örnek zayıf pozitif, Ct değeri >35 ise ve amplifikasyon eğrisi linear bir yapıda ise örnek negatif olarak kaydedildi. Şüpheli sonuçlarda pozitif olduğu bilinen bir örnekten hazırlanan standart dilüsyonları ile şüpheli örnek kullanılarak real-time RT-PCR yenilendi. Yükselen bir eğri oluşturan en düşük konsantrasyondaki pozitif örnek ile incelenen örnek karşılaştırılarak karar verildi.

4.2.9. Sekanslama

RT-PCR sonuçlarının ek doğrulanması ve daha detaylı epidemiyolojik veri elde etmek amacıyla pestivirus RT-PCR pozitif amplifikasyon ürünlerinin bir bölümü sekanslatıldı. Bu amaçla, pestivirus RT-PCR pozitif 57 örnekten tesadüfî olarak seçilen 10 adet örnekten sekanslama gerçekleştirildi. Bu amaçla, öncelikle, pozitif örneklerden V324 ve V326 primerleri kullanılarak yaklaşık 290 bç uzunluğunda aplifikasyon ürünü elde edildi. Daha sonra bu ürünler DNA pürifikasyon kiti ile (QIAquick gel purification kiti; Qiagen Co, Hilden, Almanya) gelden pürifiye edildi. Pürifiye ürünler ile V324 ve V326 primerleri kullanılarak çift yönlü sekanslama işlemi otomatik sekanslama cihazında (Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzers; Hitachi Appliance Inc., Japonya) gerçekleştirildi. Elde edilen dizilimler önce ClustalW programı ile bileştirildi ve bu dizilimler BLAST

programında, virusların sekanslatıldığı gen bölgelerine içeren gen bankasındaki dizilimler ile kıyaslatıldı. Daha sonra, bu dizilimlerin filogenetik ağacı PHYLIP dizilim programında neighbour-joining metoduna kullanılarak, 0.75 maksimum sekans uzaklığına (Max Seq Difference) göre belirlendi.

5. BULGULAR

5.1. Antikor ELISA

Serolojik teşhis amacıyla test edilen toplam 1200 koyun kan serum örneğinden 800 adedinde (%67) pestivirus spesifik antikorlar, 465 adedinde (%38,7) BTV'a spesifik antikorlar ve bir adedinde (%0,08) ise AKAV'a spesifik antikorlar tespit edilmiştir. AKAV, ELISA test sonuçlarının confirmasyonu amacıyla, pozitif olarak tespit edilen serum örneğine ilave olarak, test örnekleri içinde tesadüfî seçilen toplam 100 serum örneği ikinci kez ELISA ile test edildi. Bu tekrar testi sonucunda da, pozitif tespit edilen tek örnek haricinde, diğer örneklerde seronegatiflik teyit edilmiştir.

ELISA sonuçlarına göre, üç virusa karşı elde edilen antikor pozitifliği dağılımları Tablo 16'da gösterilmiştir.

Tablo 16. Test edilen koyun kan serumu antikor sonuçları

| Viruslar | Negatif | | Pozitif | | Toplam Örnek Sayısı n |
|-------------------|---------|------|---------|------|--------------------------|
| | n | % | n | % | |
| PestivirusAntikor | 400 | 33 | 800 | 67 | 1200 |
| Mavidil Antikor | 735 | 61,3 | 465 | 38,7 | 1200 |
| Akabane Antikor | 1199 | 99,9 | 1 | 0,08 | 1200 |

5.2. RT-PCR, real-time RT-PCR ve Sekanslama

Klinik örneklerin test edilmesine geçilmeden önce titresi bilinen NADL virus suşu hedef RNA'larla ile gerçekleştirilen RT-PCR çalışması neticesinde

Pestivirus nested RT-PCR'in deteksiyon limiti yaklaşık 50 virion olarak tespit edildi.

Klinik örneklerle gerçekleştirilen RT-PCR'a ait agaroz jel elektroforez görüntüleri Şekil 7 (Birinci adım RT-PCR) ve Şekil 8 (Dubleks RT-PCR)'da verilmiştir. Araştırmada, 2012 ve 2013 yıllarında örneklenen toplam 281 postnatal örnek ve atık fötüs materyalleri değerlendirilmiştir. 2012 yılında toplam 147 örnekteki 45 postnatal örneğin 8 adedinde (%17,8) pestivirus nükleik asidi tespit edilirken, 2013 yılında örneklenen 134 materyalden 58 postnatal örneğin 15 adedinde (%25,86) pestivirus nükleik asidi saptanmıştır.

2012 yılında toplam 102 atık fötüsün 17 adedinde (%17,64), 2013 yılında 76 atık fötüsün 17 adedinde (%22,36) pestivirus nükleik asidi tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre, yıllar dikkate alınmaksızın, toplam 103 postnatal örneğin 23 (%23,33)'ünde ve 178 atık fötüs örneğinin ise 34 (%19,10)'ünde pestivirus pozitifliği tespit edilmiştir. Sonuç olarak toplam 281 örneğin 57 (%20,28)'sinde pestivirus genom pozitifliği saptanmıştır (Tablo 17).

Tablo 17. Pestivirus yönünden incelenen doku materyallerinin örneklendiği yıl ve klinik neticesine göre dağılımları

| Örnek Alınan Yıllar | Postnatal Örnek | | Atık Fötüs | | Toplam |
|---------------------|-----------------|--------------------|------------|-------------------|------------|
| | Toplam | Pozitif | Toplam | Pozitif | |
| 2012 | 45 | 8 (%17,8) | 102 | 17 (%17,64) | 147 |
| 2013 | 58 | 15 (%25,86) | 76 | 17(%22,36) | 134 |
| Genel Toplam | 103 | 23 (%22,33) | 178 | 34(%19,10) | 281 |

Klinik örneklerde AKAV RNA'sının tespitine yönelik RT-PCR işlemine geçilmeden önce kontrol virus RNA örnekleri ile gerçekleştirilen çalışma

neticesinde RT-PCR'ın deteksiyon limiti yaklaşık 100 viron olarak tespit edildi. Mavidil virusunun deteksiyon limiti ise firma tarafından bildirildiği kadarı ile yaklaşık 20 virion olarak kaydedilmiştir.

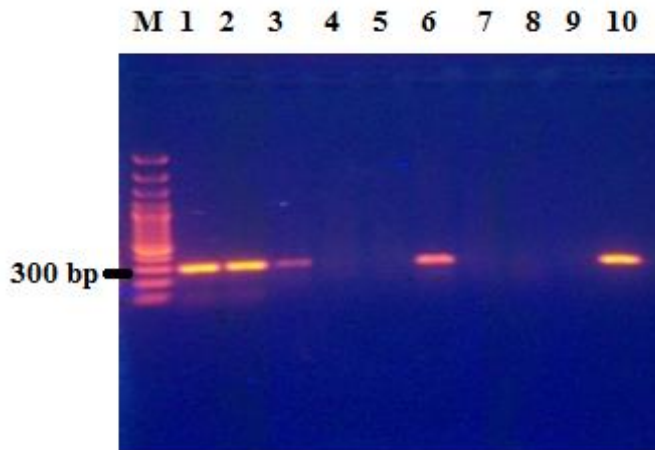
Mavidil virus ve AKAV için pozitif virus kontrolleri ile yapılan çalışmalarda beklenen amplifikasyon ürünleri tespit edilmesine rağmen, çalışmada test edilen klinik örneklerin hiç birinde BTV ve AKAV nükleik asidi tespit edilememiştir. Elde edilen PCR sonuçları Tablo 16'da özetlenmiştir. AKAV'a ait agaroz jel elektroforez görüntüleri ile BTV real-time RT-PCR sonuçları Şekil 9 ve Şekil 10'da verilmiştir.

RT-PCR sonuçlarına göre pestivirus pozitif olarak tespit edilen 10 örneğin çift primerlerle sekans dizilimlerinin ClustalW programında bileştirilmesi neticesinde 6 örneğin yaklaşık % 100 doğrulukla bileştirilmesi sağlandı. Bu nedenle, filogenetik analizde bu 6 örnek değerlendirilmeye alındı. Değerlendirilmeye alınan 6 örnekten dördüne ait dizilimlerin BLAST programında gen dizilimleri ile kıyaslanması neticesinde bu dizilimin BVDV-1'in 5'-UTR bölgeleri ile % 94-98 oranında benzerliği tespit edildi. PHYLIP dizilim programında, neighbour-joining metodu kullanılarak, 0.75 maksimum sekans uzaklığına göre filogenetik analizi neticesinde bu örneklerin BVDV-1 olduğu teyit edildi. Bu dört örnekten birine ait (2013/TR/EDRN.1) filogenetik analiz Şekil 11'de sunulmuştur. Değerlendirilmeye alınan 6 örnekten ikisine ait dizilimlerin BLAST programında ve filogenetik analizinde ise bu örneklerin BDV olduğu tespit edildi. BDV olarak tespit edilen örneklerden birine ait filogenetik analizi Şekil 12'de verilmiştir. ClustalW programında bileştirilmesi % 60-80 oranında gerçekleştirilen ve bu nedenle de filogenetik analizi yapılamayan kalan dört

örneğin birleştirilen dizilimlerinin BLAST sonuçları bunların pestivirus olduklarını ortaya koymuştur.

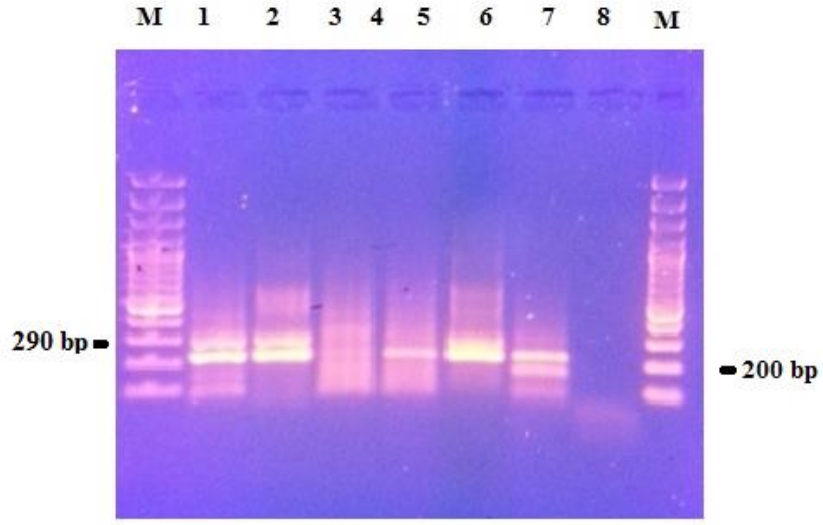
Tablo 18. Doku örneklerinin pestivirus yönünden illere göre dağılımı

| Örnek Alınan İller | 2012 | | 2013 | | Toplam |
|---------------------|-------------|--------------|--------------|--------------|---------------|
| | Kuzu | Atık fötüs | Kuzu | Atık fötüs | |
| | +/n | +/n | +/n | +/n | |
| Bahkesir | 1/9 | 5 /16 | 2/7 | 1/14 | 9/46 |
| Çanakkale | 2/4 | 3/13 | 0/5 | 3/5 | 8/27 |
| Bursa | 0/2 | 3/8 | 2/2 | 1/7 | 6/19 |
| Kırklareli | 2/5 | 2/13 | 2/10 | 2/9 | 8/37 |
| Tekirdağ | 1/1 | 1/0 | 2/2 | 1/1 | 5/4 |
| Edirne | 0/4 | 1/14 | 5/6 | 5/7 | 11/31 |
| İstanbul | 1/4 | 0/6 | 1/5 | 1/2 | 3/17 |
| Bilecik | 0/1 | 0/1 | 0/0 | - | 0/2 |
| Kocaeli | 0/7 | 1/8 | 1/5 | 1/3 | 3/23 |
| Sakarya | 1/0 | 1/4 | 0/0 | 0/0 | 2/4 |
| Yalova | 0/0 | 0/1 | 0/0 | 0/1 | 0/2 |
| Düzce | 0/0 | 0/1 | 0/1 | 2/10 | 2/12 |
| Genel Toplam | 8/37 | 17/85 | 15/43 | 17/59 | 57/224 |



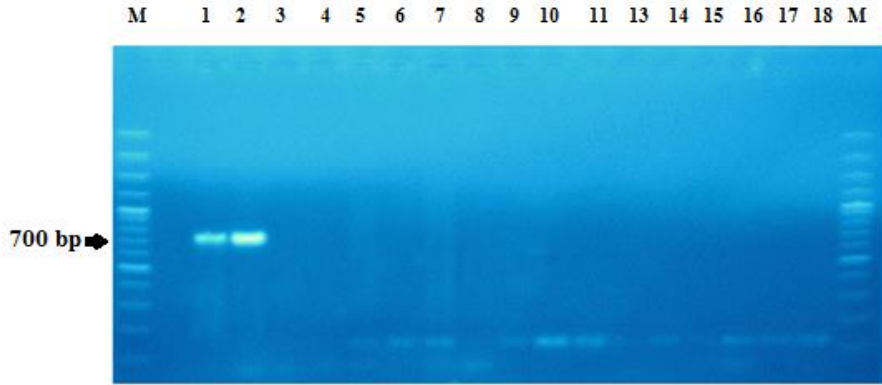
Şekil 7. Pestivirus RT-PCR jel elektroforez görüntüsü 1. tur (290 bp).

M: 100 bp DNA merdiveni, 1: Virus pozitif kontrol, 2-10: Klinik örnekler



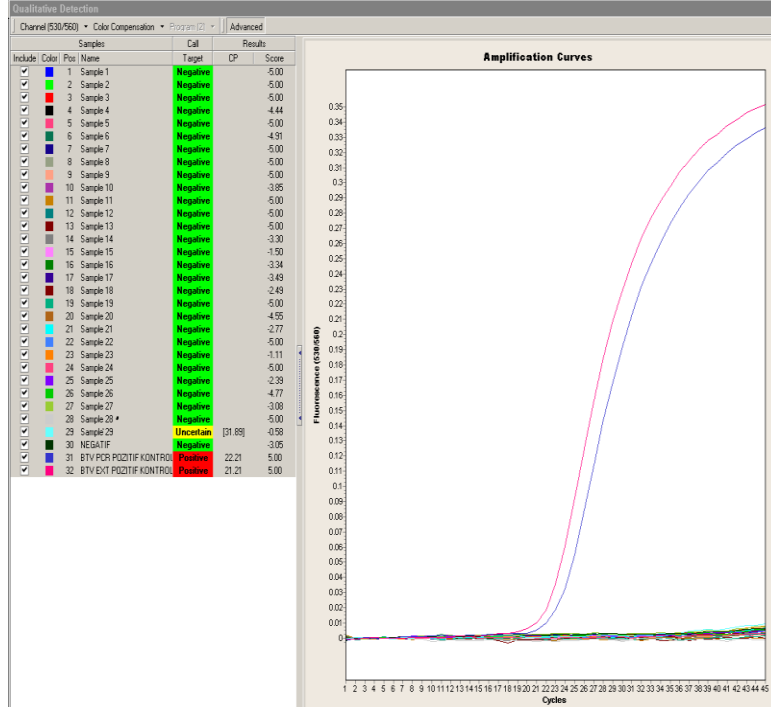
Şekil 8. Pestivirus dubleks RT-PCR jel elektroforez görüntüsü.

M: DNA merdiveni 100 bp, 1: Virus pozitif kontrol, 2-8: Klinik örnekler

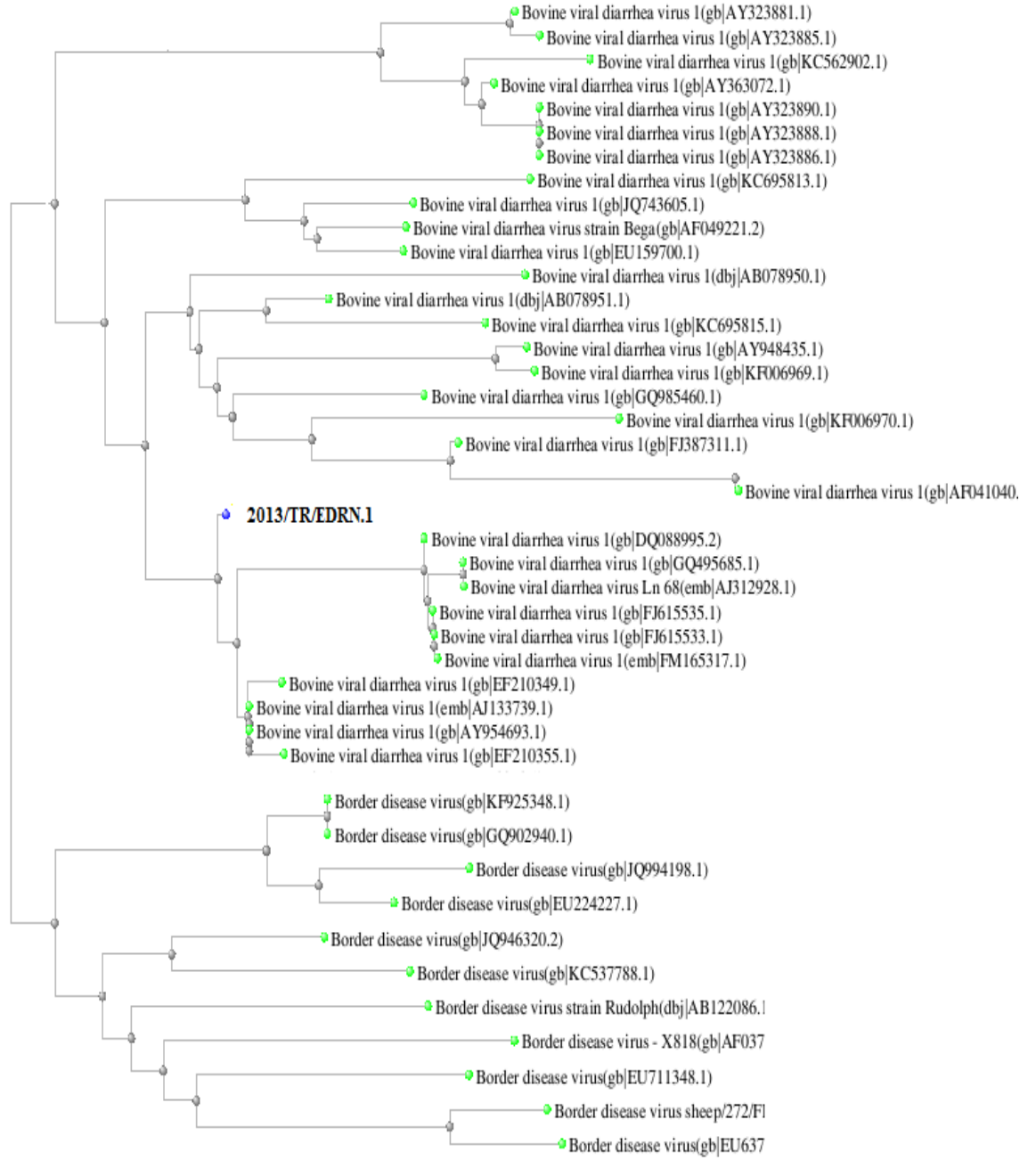


Şekil 9. Akabane virus RT-PCR jel elektroforez görüntüsü.

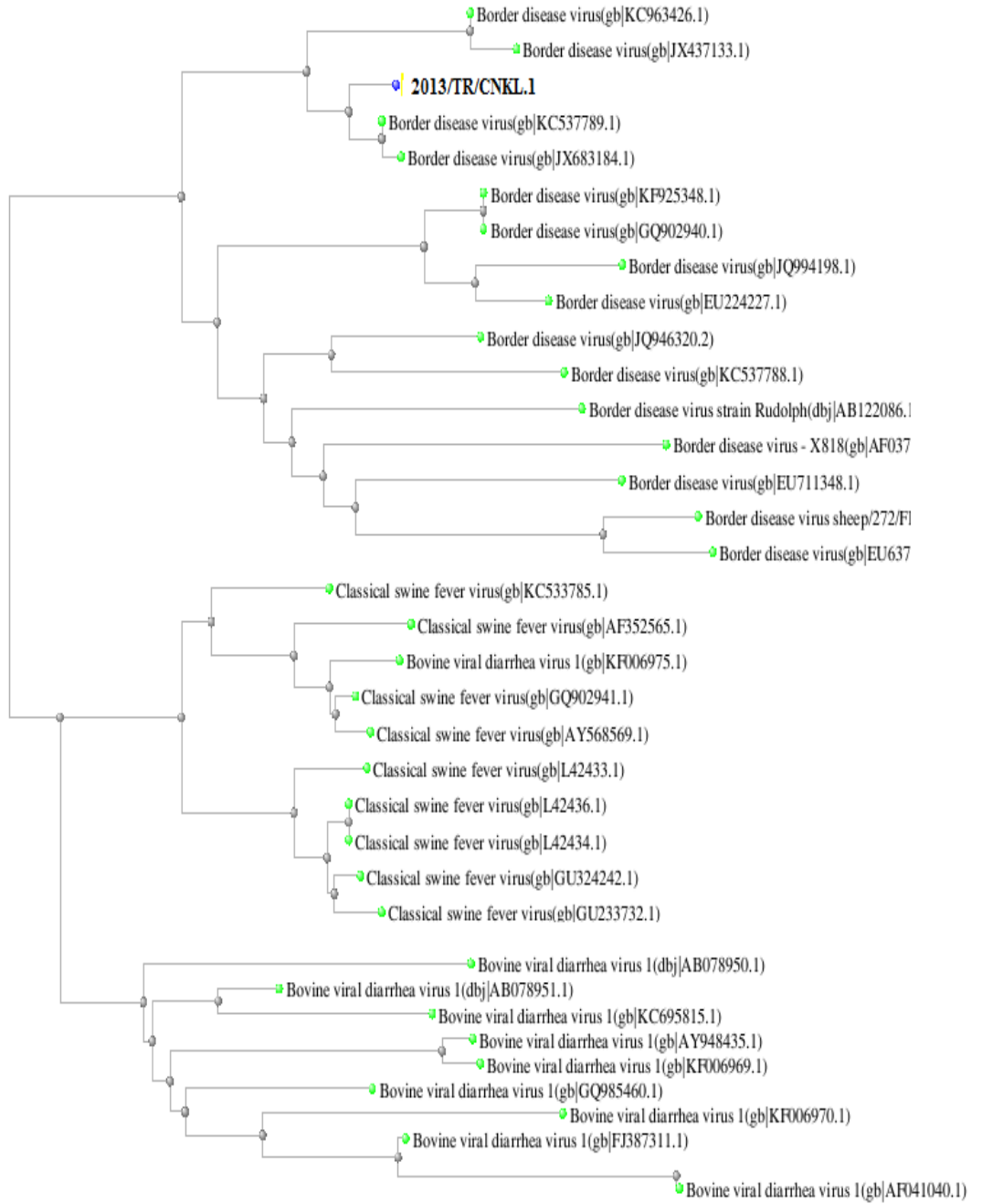
M: 100 bp DNA merdiveni, 1 ve 2: AKAV pozitif kontrol virus, 3-18: Klinik örnekler, M: 100 bp DNA merdiveni



Şekil 10. Mavidil real-time RT-PCR analiz görüntüsü.1-29: Klinik örnekler (tüm örnekler negatif), 30: Negatif kontrol, 31:BTV PCR pozitif kontrol (Mavi eğri) 32: BTV ekstraksiyon (EXT) pozitif kontrol (Pembe eğri)



Şekil 11. BVD-1 olarak belirlenen örneğin (2013/TR/EDRN.1) PHYLIP dizilim programında, neighbour-joining metodunda 0.75 maksimum sekans uzaklığına göre filogenetik analizi



Şekil 12. BDV olarak belirlenen örneğin (2013/TR/ÇNKL.1) PHYLIP dizilim programında, neighbour-joining metodunda 0.75 maksimum sekans uzaklığına göre filogenetik analizi

6. TARTIŞMA

Abortlar koyun yetiştiriciliğindeki ekonomik kayıpların en önde gelen sebeplerindendir. Bu nedenle gerek ülkesel gerekse bölgesel seviyede abort etiyojilerinin aydınlatılması ve bu verilerle mücadele stratejilerinin belirlenmesi ekonomik yetiştiricilik için oldukça önemlidir. Mevcut tezde, Marmara Bölgesinde bulunan illerde koyunlarda abort etiyojisinin aydınlatılmasına yönelik olarak, ülkemizde ve dünyada abortların en önde gelen viral etkenler olarak kabul edilen üç virusun prevalansları araştırılmıştır.

Pestivirus enfeksiyonları, dünyada sığır, koyun, keçi ve domuz yetiştiriciliğinin yapıldığı birçok ülkede bildirilmiştir (3, 21, 25, 50). Farklı ülkelerde koyunlarda yapılan çalışmalarda pestivirus seroprevalans oranları %5-50 arasında rapor edilmiştir (3, 21, 25, 50). Türkiye’de bu oranın (%2-90) arasında değiştiği bildirilmiştir (90, 91). Bu araştırmada, pestivirus seroepidemiolojisinin tespiti amacıyla, Marmara Bölgesinde bulunan bölgenin genel durumunu yansıtacak şekilde 12 ilde, pestivirus yönünden aşılammış 6 aylığın üzerindeki 1200 adet koyundan, tesadüfi örnekleme yoluyla, serum örnekleri toplandı. Örneklenen hayvanların %67’sinde pestivirus antikorları tespit edildi. Ülkemizde yapılan benzer bir çalışmada, Burgu *ve ark.* toplam 661 koyundan ve 770 kuzudan kan örneği alarak bu hayvanlarda sırasıyla %25 ve %21,5 oranında seropozitiflik saptandığını bildirmişlerdir (20). Burgu *ve ark.* yaptıkları diğer bir çalışmada ise Ankara ilindeki farklı mezbahanelerden toplanan 100 gebe koyuna ait kan serumlarında pestivirus yönünden % 41,3 seropozitiflik

saptadıklarını, 108 fütusa ait 584 farklı organ ve kan örneklerinden bir adedinde ise nonsitopatojen pestivirus suşu tespit ettiklerini raporlamışlardır (92).

Okur-Gümüşova *ve ark.* Karadeniz ve iç bölgelerinden toplam 11 ilde yetiştirilen sağlıklı koyunlardan topladıkları 2444 serum örneğinde serum nötralizasyon testi ile %18,94 seropozitiflik saptanmış, iç bölgelerde yetiştirilen koyunlardaki seropozitifliğin (%18,94) sahil illerinde elde edilen verilerden daha yüksek (%4,90) olduğunu bildirmişlerdir (93).

Hasırcıoğlu *ve ark.* Burdur ilinde abort yapmış 735 koyun ve 35 adet keçi serumu ve lökosit örnekleri ile 48 adet abort/ölü doğmuş kuzu dokularından elde edilen örneklerde pestivirus antijen ve antikor varlığı yönünden ELISA ile yapılan incelemelerinde; 735 adet abort yapmış koyunun 475 (%64,6) adedinin pestivirus antikorları yönünden pozitif olduğunu kaydetmişlerdir. Aynı çalışmada, abort yapan koyunların lökosit örneklerinin 5 (%0,7)'inde pestivirus antijenleri saptanırken, abort yapmış keçi lökosit örneklerinin hiç birinde antijen varlığının belirlenemediği bildirilmiştir (94).

Gür, Afyonkarahisar ilinde abort vakaları görülen 7 adet Akkaraman koyun sürüsünden elde edilen 568 adet kan lökosit ve serum örneklerinde 2 adet lökosit örneğinden (%0,035) *ncp* pestivirus izolasyonu yapıldığını, serum nötralizasyon testi ile de 446 adet kan serum örneğinin %78,5'inde pestivirus spesifik antikor tespit edildiğini bildirmiştir. Aynı çalışmada, pestivirus antikor oranının Batı Anadolu'da %63,6 ve Güney Anadolu'da ise %67,2 olduğunu tespit etmiştir (95).

Özdemir *ve ark.* yaptıkları çalışmada toplanan 91 koyun fetus örneğinden antijen ELISA ile 17 adedinde (%19) pozitiflik saptarken, RT-PCR ile 30

adedinde (%33) RNA pozitiflik tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada ELISA ve RT-PCR ile pozitif bulunan örneklerin hücre kültüründe virus izolasyonları gerçekleştirilmiş ve izolatlarının 24 adedinin (%80) *ncp* BVDV, 6 adedinin (%20) ise *ncp* BDV tespit edilmiştir (46).

Turan *ve ark.* Marmara Bölgesinde koyunlardan toplanan kan serumu örneklerinde pestivirus antikor ve antijenlerinin saptanmasına yönelik yaptıkları çalışmalarında BVDV antijen ELISA ile test edilen 2404 adet kan lökosit örneğinden 29'unda (%1,2) ve antikor ELISA ile pestivirus antikorları yönünden test edilen koyun kan serumlarının %2,32'sinde pestivirus seropozitiflik tespit edildiğini bildirmişlerdir (90).

Azkur *ve ark.* Kırıkkale ilinden 25 koyun sürüsünden elde ettikleri 1075 adet koyun serum örneğinde ELISA ile %74,51 oranında pestivirus seropozitiflik saptamışlardır (53).

Yazıcı *ve ark.* Orta ve Doğu Karadeniz Bölgesinden 13 atık kuzu organ materyalinin %69,23'ünde RT-PCR ile BDV nükleik asidi saptamışlardır. Aynı çalışmada örneklenen 401 kan serumunun ELISA testi ile %48,12'sinde, serum nötralizasyonla ise %42,89'unda seropozitiflik tespit etmişlerdir (96).

Ozan *ve ark.* Samsun ilinden rastgele toplanan 144 koyun kan serumu örneğini ELISA testi ile pestivirus ve mavidil virusu antikor varlığı yönünden araştırılmış, pestivirus için %90,27 seropozitiflik saptanmasına karşın, mavidil antikor varlığı tespit edilememiştir. Aynı çalışmada 3 adet koyunda ELISA testi ile pestivirus antijeni tespit edilmiştir (91). Karadeniz Bölgesindeki başka bir çalışmada ise Albayrak *ve ark.* RT-PCR ile 21 atık kuzu örneğinden 14 adedinde (%66,66) BDV nükleik asidi saptamışlardır (13).

İssi ve ark. Elazığ ilinden abort olaylarının görüldüğü 4272 koyunun bulunduğu 8 ayı sürüden toplanan 219 koyun serumu ve 20 fetal doku örnekleri ELISA testi ile araştırılmış, kan örneklerinin %65,75'inde pestivirus antikor, fetusların ise %55'inde pestivirus tespit etmişlerdir (97). Engin ve ark. ise Elazığ, Malatya, Tunceli illerindeki 160 adet koyun kan örneklerinin %22,5'inde ELISA ile pestivirus saptanmıştır (98).

Yukarıda da ifade edildiği üzere, Ülkemizdeki değişik araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalar incelendiğinde, pestivirus antijen seropozitifliğinin %2,3 ile %90,3 arasında varlığı bildirilmiştir (20, 53, 90-95, 97). Bu tezdeki pestivirus seroprevalans oranının bazı araştırmacıların (20, 90, 92-94, 97) bulgularından yüksek diğerlerinden (91, 95) ise düşük olduğu saptanmıştır. Bu durumun, büyük oranda, çalışılan coğrafik bölge farklılıklarına, çalışma yılına ve test edilen hayvanların yaşına bağlı olarak seroprevalanstaki farklıktan kaynaklandığını düşünmekteyiz. Ayrıca, daha zayıf bir ihtimal olmakla birlikte, kullanılan test metodlarının farklılıkları da bu çalışmalarda seroprevalans farklılıklarının muhtemel bir sebebi olabilir.

Türkiye'de yukarıda yapılan çalışmalar dikkate alındığı zaman, pestivirus seropozitiflik oranlarındaki farklılıklara benzer şekilde, pestivirus pozitifliğinin de oldukça farklı oranlarda prevalans kaydedilmiştir. Ülkemizde pestivirus antijen/nükleik asit pozitifliği oranları %0,4-69,2 arasında saptanmıştır (13, 46, 92, 95-98). Mevcut tezde ise %20,28 oranında bir pestivirus nükleik asit pozitifliği tespit edilmiştir. Bu farklılıkların sebebinin büyük oranda bölgesel virus prevalans farklılığından ve yıllara göre artan pestivirus pozitifliğinden kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz. Bununla birlikte kullanılan metod ve çalışılan dokuların

farklılıklarından da prevalans oranının değişebileceği kaydedilmiştir. Örneğin, Özdemir *ve ark.* yaptıkları çalışmada, ELISA ile %19 oranında pestivirus antijeni ve RT-PCR tekniği ile %33 oranında virus nükleik asidi tespit etmişlerdir (46). Horner *ve ark.* ruminant pestiviruslarının teşhisinde real-time RT-PCR (real-time RT-PCR), ELISA ve immun peroksidaz (IP) tekniklerinin performanslarını karşılaştırdıkları bir çalışmada BVDV referens suşu ve persiste enfekte hayvanlardan alınan örneklerde real-time RT-PCR tekniğinin diğer test tekniklerine göre daha duyarlı olduğu bildirilmiştir (15). Kenedy *et al.* yaptıkları çalışmada ise BVDV ile persiste enfekte sığırları tespit etmek amacıyla 3,599 sığırdan alınan kulak derisi örneğinden 100 hayvanlık süpernatant havuzları hazırlanmış ve immunohistokimya (IHC), antigen capture-ELISA (Ag capture-ELISA) ve RT-PCR metodları ile test etmişlerdir. Her üç testin de persiste enfekte hayvanları tespit etmede %100'lük bir uyuma sahip oldukları görülmüştür (99).

Genel olarak koyun ve keçilerin pestivirus enfeksiyonlarının etkeni BDV kabul edilmektedir (23, 24). Mevcut tezde değerlendirilmeye alınan pestivirus RT-PCR pozitif 6 koyun örneğine sekanslama sonuçlarına göre dört örneğin BVDV-1 olduğu belirlendi. Değerlendirilmeye alınan diğer iki örneğe ait gen dizilimlerinin filogenetik analizinde ise bu örneklerin BDV olduğu tespit edildi. Yakın akraba olan pestiviruslarında (BVDV 1, BVDV 2, BDV ve CSF) hayvan türleri arası geçiş bilinmektedir (3, 30).

Pestiviruslarla birlikte abortların diğer önemli viral etkeni olan BTV ülkemizde uzun yıllardır varlığı bilinen ve dönemsel olarak önemli ekonomik kayıplara yol açan virustur (71, 73, 75- 77, 100-109). Diğer ülkelerde yapılan önceki araştırmalarda, BTV enfeksiyonunun seroprevalansının (%1,6-50) arasında

olduğu tespit edilmiştir (110, 111). Lopez *ve ark.* tarafından Amerika Birleşik Devletlerinin New York eyaletinde yapılan surveyde 52 ilden 6'sında BTV pozitif hayvan tespit edilmiştir (112). Amerika Birleşik Devletlerinin Colorado eyaletinde yapılan bir çalışmada 108 koyun iftliğinden, 2544 hayvanda %7,6-83 arasında seropozitiflik tespit edilirken, RT-PCR ile viral RNA prevalansı %4,8-48 arasında saptanmıştır (113). Shi *ve ark.* tarafından in'de ithal edilen ve karantinaya alınan 964 sığır ve 650 koyunda yapılan serolojik ve virolojik çalışmada üç sığır ve 41 koyunda seropozitiflik tespit edilirken, iki koyundan virus izole edilebilmiştir (114). Hindistan'da koyunlarda yapılan retrospektif bir çalışmada 50 örnekten 8'inde virus izolasyonu gerçekleştirilmiştir (115). Aynı şekilde, Kulkarni *ve ark.* Hindistan'nın Mharashtra eyaletindeki koyun sürülerinde BT enfeksiyonu morbiditesinin %20, mortalitesinin ise %80'lere ulaştığını rapor etmişlerdir. Bu ülkede 1981 salgınında BTV-9 ve BTV-18 salgınlara yol açarken, 1983 salgınından sadece BTV-9 izole edilebilmiştir (116).

Türkiye'de ise farklı bölgelerde yapılan çalışmalarda, BTV'nin seroprevalans oranlarının %0-87,5 arasında değiştiği bildirilmektedir (73, 77, 91, 100-109). Farklı bölgelerde yapılan çalışmalarda, Albayrak *ve ark.* Karadeniz Bölgesinde (Samsun, Sinop, Ordu, Amasya, Tokat) bulunan 5 ilde BTV seroprevalansını %3 olarak bildirmişlerdir (105). Duman *ve ark.* Konya bölgesinde BTV antikor oranını %4,68 ve antijen oranını ise %1.56 olarak raporlamışlardır (109). Ataseven *ve ark.* Doğu ve Güneydoğu Anadolu illerinde keçilerde BTV antikor oranını 14,5 kaydetmişlerdir (106). Bulut *ve ark.* Konya ve Burdur illerinde seroprevalansı sırasıyla %17,1 ve %1,5 (103) olarak raporlar iken Bolat, Doğu ve Güneydoğu Anadolu Bölgesinde (Elazığ, Diyarbakır ve

Şanlıurfa, Gaziantep, Kayseri, Muş, Van ve Tunceli) bulunan illerde yetiştirilen koyunlardan alınan kan serumlarında BTV seroprevalansını %21,32 olarak bildirmişlerdir (100). Gür, yaptığı çalışmada Ceylanpınar çiftliğinde bulunan koyunlarda seropozitifliği %29,5 olarak belirlemiştir (104). Öztürk *ve ark.* Konya Merkez Hayvancılık Araştırma Enstitüsünde bulunan koyun kan serumlarında %36,04 seropozitiflik tespit etmişlerdir (102). Ertürk, farklı illerde yetiştirilen koyunlarda %34,4 BTV seropozitifliği raporlamıştır (73). Girgin ve Yonguç, Aydın, İzmir, Balıkesir, Çanakkale illerinde koyunlarda seroprevalansı %46 olarak belirlemişlerdir (101). Azkur *ve ark.* (77), Kırıkkale ilinde koyunlarda seropozitifliği %49,8 Özgünlük ve Çabalar ise Şanlıurfa ilinde koyunlarda seropozitifliği %87,50 olarak tespit edilmiştir (107). Yaptığımız kaynak taramaları sonucunda, Marmara Bölgesinde koyunlarda BTV'ye yönelik bir çalışma tespit edilememiştir. Yapılan tezde ELISA çalışması sonucunda BTV seropozitiflik oranı %38,7 olarak saptanmıştır.

Türkiye'de koyunlarda BTV virus prevalansına dair az sayıda çalışma rapor edilmiştir (77, 109). Türkiye'de yapılan çalışmalarda Duman *ve ark.* Konya bölgesinde koyunlarda antijen pozitifliği oranını %1,56 olarak tespit etmişlerdir (109). Azkur *ve ark.* Kırıkkale ilinde koyun kan örneklerinden nested PCR ile %2,87 oranında BTV nükleik asit pozitifliği belirlemişlerdir (77). Mevcut tezde çalışılan klinik örneklerin hiç birinde BTV RNA'sı tespit edilememiştir.

Mevcut tezde BTV seropozitiflik oranı %38,7 olarak saptanmıştır. Örnek alınan hayvanların aşısız olması dikkate alındığı zaman, daha önceki yıllarda bölgemizde BTV'ye hayvanların maruz kaldığı sonucu çıkarılmaktadır. Ancak

mevcut tezde %38,7'lik bir seropozitifliğe karşın, RT-PCR tekniği ile virus varlığı tespit edilememiştir. Arbovirus enfeksiyonları arasında yer alan BTV epidemiyolojisi konak-vektör-iklim-serotip döngüsüne dayanmaktadır (91). Subtropik iklim kuşağında yer alan ülkemizde yıllık ısı-nem ve yağmur ortalamaları özellikle batı, kuzey ve doğu kesimlerinde yüksektir (91). Bu iklim yapısına bağlı olarak Türkiye'de vektör aktivitesi Mart-Ekim arasındaki geniş zaman diliminde görülebilmektedir. Bu tezde koyunlarda yüksek seropozitiflik tespit edilmesine rağmen viral nükleik asidi tespit edilememesinin muhtemel bir nedeninin, araştırmada kullanılan abort ve neonatal materyallerinin önemli bir kısmının (2012 yılında %60, 2013 yılında %63), Marmara Bölgesinin iklim koşullarına bağlı olarak, vektör aktivitesinin görülmediği kış döneminde alınmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Ayrıca BTV enfeksiyonunun akut bir enfeksiyon olmasını ve örneklerin klinik hasta koyun veya bu koyunların yavrularından alınmamasının da diğer bir sebep olabileceğini değerlendirmekteyiz. Seroprevalanstaki yüksek düzeyin ise BTV hastalığını atlatan hayvanlarda antikörlerin 2 yıla kadar saptanabilmesinden kaynaklı olabileceğini düşünmekteyiz (73, 100). Sonuç olarak, bu araştırmada tespit edilen %38,7 oranındaki seropozitiflik nedeniyle Marmara Bölgesinde BTV'un zaman zaman sirkülasyonda bulunan bir virus olduğu kanaatine varılmıştır. Ancak, bu konuda daha güvenilir sonuçlar için takip eden yıllarda da benzer çalışmaların tekrarı önerilmektedir.

Mavidil virusu gibi insekt vektör kaynaklı olan ve abortların diğer bir önemli viral etkeni olarak kabul edilen AKAV enfeksiyonunun Dünya'da geniş bir coğrafyada varlığı bildirilmiştir. 1972-77 yılları arasında Japonyada meydana

gelen salgınlarda 42.000 sığırın etkilendiği, bunlardan %37'sinin abort ve prematüre doğum , %22 sinin ölü doğum , %41'inin ise kongenital AH sendromlu buzağı doğumu ile sonuçlandığı, bu salgınlarda oluşan ekonomik kaybın ise yaklaşık 20.000.000 Amerikan dolarına eşdeğer olduğu bildirilmiştir (117). Mohamed *et al.* Sudan'da AKAV seroprevalansının koyunlarda %27, keçilerde %36 ve sığırlarda %47 olduğunu rapor etmişlerdir (118). Qiao *et al.* Çin'de koyunlarda %18,15 ve sığırlarda %19,6 seroprevalans tespit etmişlerdir (119). Benzer bir çalışmada ise, Afaleq *et al.* Arabistan'da koyun ve keçilerde %17, sığırlarda %49 oranında seroprevalans varlığını kaydetmişlerdir (120).

Akabane enfeksiyonunun Türkiye'deki varlığı ilk defa Urman *ve ark.* tarafından Aydın ili ve çevresinde AH sendromlu buzağılarda hastalığın klinik ve patolojik olarak bildirmeleri ile ortaya konulmuştur (121). Sonraki yıllarda, Yonguç *ve ark.* AH sendromlu buzağılarda AKAV spesifik antikor tespitini, Hazıroğlu ise Akdeniz Bölgesinde anomalili buzağılarda patolojik olarak Akabane enfeksiyonu teşhisini gerçekleştirmiştir (122, 123). Akabane enfeksiyonuna yönelik ilk geniş kapsamlı serolojik araştırma, Mellor *ve ark.* tarafından Güney, Güneydoğu ve Batı Anadolu Bölgelerindeki sığırlarda gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada enfeksiyonun sığırlardaki seroprevalansını %12,3 olarak bildirmişlerdir (124). Karaoğlu *ve ark.* Trakya bölgesinden beş ile bağlı 21 ilçe/köyden örnekledikleri toplam 557 sığır kan serumlarında Akabane enfeksiyonu seropozitifliğini %0,14 olarak bildirmişlerdir (76). Özgünlük *ve ark.* 4 farklı süt sığırcılığı işletmesindeki değişik yaşlardan 288 sığırdan alınan kan serum örneklerinde Akabane virus seropozitifliğini %9,72 olarak belirtmişlerdir (125). Güneydoğu Anadolu Bölgesinde 9 il ve 1 kamuya ait işletmede yetiştirilen

sığırlarda yapılan diğerk bir çalışmada ise halk elindeki hayvanlarda %12,90-34,78; kamuya ait işletmede ise %27,98 seropozitiflik tespit edilmiştir (108). Yapılan araştırmalar incelendiğinde Akabane enfeksiyonu ile ilgili Tırkiye'deki çalışmaların çoğunun sığırlarda olduğu anlaşılmaktadır. Ülkemizde koyunlarda AKAV'a yönelik az sayıda çalışmaya rastlanmıştır (105, 126). Albayrak ve Ozan yaptıkları çalışmada, Karadeniz Bölgesinde yer alan 5 ilde (Samsun, Sinop, Ordu, Amasya ve Tokat) bulunan 200 koyun örneğinde ELISA testi ile Akabane enfeksiyonunun seroprevalansını koyunlarda %0,5, sığırlarda ise %22 olarak rapor etmişlerdir (105).

Mevcut tezde, Marmara Bölgesini yansıtacak sayıda (1200) koyun örneğinden AKAV'a karşı oldukça düşük oranda (%0,08) seroprevalans tespit edilmiştir. Ayrıca abort ve postnatal örneklerle gerçekleştirilen RT-PCR çalışması neticesinde, test edilen hiçbir örnekte viral etken varlığına rastlanmamıştır. Bu bulgular ışığında, AKAV'un Marmara Bölgesinde görülen abort ve postnatal olgularına sebep olabilecek muhtemel viruslardan biri olmadığı kanaatine varılmıştır.

Sonuç olarak, mevcut tezde çalışılan üç virus için, Marmara Bölgesinde abortlar ve postnatal ölümlerde pestivirusların yüksek prevalansı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar dikkate alınarak, Marmara Bölgesinde pestiviruslara karşı aşılama başta olmak üzere diğerk kontrol-mücadele metotlarının ivedilikle uygulanmasını önermekteyiz. Ayrıca, bu yüksek prevalansın sebepleri üzerinde durulması ve aydınlatılmasının önemli olduğunu düşünmekteyiz. Pestiviruslara ilave olarak, seroprevalansı dikkate alındığında, BTV'unun ise ileriki yıllarda takibinin faydalı olacağı kanaatini taşımaktayız.

7. KAYNAKLAR

1. Menzies PI. Control of important causes of infectious abortion in sheep and goats. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2011; 27: 81-93.
2. Givens MD, Marley MSD. Infectious causes of embryonic and fetal mortality. *Theriogenology* 2008; 70: 270-285.
3. García-Pérez AL, Minguijón E, Barandika JF, et al. Detection of border disease virus in fetuses, stillbirths and newborn lambs from natural and experimental infections. *J Vet Diagn Invest* 2009; 21: 331-337.
4. Yaeger M. "Cattle abortions-causes and prevention, range beef cow symposium". (http://digitalcommons.unl.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=118&context=rangebeef_cowsymp) University of Nebraska – Lincoln, 1993.
5. Çetinkaya B, Öngör H, Muz A, et al. Detection of brucella species DNA in the stomach content of aborted sheep fetuses by PCR. *Vet Record* 1999; 144: 239-240.
6. Duman R, Durak Y. Investigations on chlamydia psittaci infections causing abortion in sheep in Konya district using complement fixation test. *Turkish Journal of Veterinary Animal Science* 1998; 22: 511-516.
7. Erganiş O, Kaya O, Hadimli LL, et al. Rapid diagnosis of ovine brucella, campylobacter and salmonella Infections from fetal stomach contents by coagglutination test. *Small Ruminants Research* 2002; 45: 123-127.
8. Güler L, Gündüz K, Ok Ü. Comparison of polymerase chain reaction and bacteriological culture for the diagnosis of sheep brucellosis using aborted fetus samples. *Vet Microbiol* 2003; 93: 53-61.
9. Güler L, Hadımlı HH, Erganiş O, et al. Field evaluation of a PCR for the diagnosis of chlamydial abortion in sheep. *Vet Rec* 2006; 159: 742-745.
10. Öngör H, Çetinkaya B, Açıık MN, et al. Detection of chlamydia abortus in ovine milk by immunomagnetic separation-polymerase chain reaction. *J Vet Med B* 2004; 50: 43-45.
11. Sareyyüpoğlu B, Diker S, Güngördü S. Koyunlarda abortif bakteriyel infeksiyonların tanısında multiplex-PCR tekniklerinin geliştirilmesi. TUBİTAK-Proje, 2010.
12. Muz A, Özer H, Eröksüz H, et al. Bacteriologic, serologic and pathologic studies on abortus cases of goats and sheep in Elazığ and its vicinity. *Turk J Vet Anim Sci* 1999; 23: 177-188.
13. Albayrak H, Gumusova SO, Ozan E, et al. Molecular detection of pestiviruses in aborted foetuses from provinces in northern Turkey. *Trop Anim Health Prod* 2012; 44: 677-680.

14. Hofmann MA, Renzullo S, Mader M, et al. Genetic characterization of toggenburg orbivirus, a new bluetongue virus, from goats, Switzerland. *Emerging Infectious Diseases* 2008; 14: 1855–1861.
15. Horner GW, Tham KM, Orr D, et al. Comparison of an antigen capture enzyme-linked assay with reverse transcription--polymerase chain reaction and cell culture immunoperoxidase tests for the diagnosis of ruminant pestivirus infections. *Vet Microbiol* 1995; 43: 75-84.
16. Hurtado A, Sanchez I, Bastida F, et al. Detection and quantification of pestivirus in experimentally infected pregnant ewes and their progeny. *Viol J* 2009; 6: 189.
17. Kobayashi T, Yanase T, Yamakawa M, et al. Genetic diversity and reassortments among Akabane virus field isolates. *Virus Res* 2007; 130: 162-171.
18. Maclachlan NJ, Drew CP, Darpel KE, et al. The Pathology and pathogenesis of bluetongue. *J Comp Path* 2009; 141: 1-16.
19. Wilson WC, Hindson BJ, O'Hearn ES, et al. A multiplex real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay for detection and differentiation of bluetongue virus and epizootic hemorrhagic disease virus serogroups. *J Vet Diagn Invest* 2009; 21: 760-770.
20. Burgu İ, Akça Y, Alkan F, ve ark. Koyunlarda doğum öncesi ve sonrası dönemlerde bovine viral diarrhoea (BVD) virus enfeksiyonunun serolojik, virolojik ve patogenezi yönünden araştırılması. *Turk J Vet Anim Sci* 2001; 25: 551-555.
21. The Merck Veterinary Manual, Bovine Viral Diarrhea, 9th Ed. Merck&Co. Inc., New York 1998; 162-164.
22. Fenner F., Bachmann P.A., Gibbs E.P.J., Studdert M.J., White D.O. *Viruses of Domestic Animals. Fenner's Veterinary Virology.* Academic Press Inc., San Diego, 2011.
23. Oğuzoğlu TÇ. Sınır hastalığı (border disease). *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2008; 55: 69-74.
24. Valdozo-Gonzales B, Alvarez-Marinez M, Greiser-Wilke I. Genetic typing and prevalence of border disease virus in small ruminants flocks in Spain. *Vet Microbiol* 2006; 117: 141-143.
25. OIE Terrestrial Manual. Chapter 2.7.1. Border Disease 2008.
26. Paton DJ, Sands JJ, Lowings JP, et al. A proposed division of the pestivirus genus using monoclonal antibodies, supported by cross neutralization assays and genetic sequencing. *Vet Res* 1995; 26: 92-109.
27. Heinz FX, Collett MS, Purcell RH, et al. Family flaviviridae. virus taxonomy, seventh report of the international committee on taxonomy of viruses. *Academic Press* 2000; 859-878
28. Yeşilbaş K. *Genel Viroloji*. 1. Baskı, Bursa: Medipres, 2010.
29. http://viralzone.expasy.org/all_by_species/39.html 13.01.2014.

30. Bolat Y, Doymaz MZ. Veteriner Viroloji (Ders Notları). Elazığ: 1998.
31. Carlsson U. Border disease in sheep caused by transmission of virus from cattle persistently infected with bovine virus diarrhoea virus. *Vet Rec* 1991; 128: 145-147.
32. Xue W, Minocha HC. Identification of bovine viral diarrhoea virus receptor in different cell types. *Vet. Microbiol* 1996; 49 (1-2): 67-69.
33. OIE Terrestrial Manual. Chapter X.10. Bovine Viral Diarrhoea 2008.
34. Ridpath JF, Bolin SR, Dubovi EJ. Segregation of bovine viral diarrhoea virus into genotypes. *J Virol* 1994; 205: 66-74.
35. Pellerin C, Vandenhurk J, Lecomte J, et al. Identification of a new group of bovine viral diarrhoea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. *J Virol* 1994; 203: 260-268.
36. Gilbert SA, Burton KM, Prins SE, et al. Typing of bovine viral diarrhoea viruses directly from blood of persistently infected cattle by multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 2020-2023.
37. Brownlie J. The pathways for bovine viral diarrhoea virus biotypes in the pathogenesis of disease. *Arch Virol* 1990; 3: 79-96.
38. Osburn BI, Castrucci G. Diaplacental infections with ruminant pestiviruses. *Arch Virol Suppl* 1991; 3: 71-78.
39. Brock KV. Diagnosis of bovine viral diarrhoea virus infections. *Vet Clin North Am* 1995; 11: 549-561.
40. Nettleton PF. Pestivirus infections in ruminants other than cattle. *Revue Scientifique et Technique el Office International des Epizooties* 1990; 9: 131-150.
41. Vantsis JT, Borlow RM, Fraser J, et al. Experiments in border disease. VIII. propagation and properties of a cytopathic virus. *J Comp Pathol* 1976; 86: 111-120.
42. Oğuzoğlu TÇ. Gevişgetiren hayvanlarda virusların neden olduğu transplental enfeksiyonlar. Seminer notları, Ankara: Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 1997.
43. Moening V, Liess B. Pathogenesis of intrauterine infections with bovine viral diarrhoea virus. *Vet Clin of N Am* 1995; 11: 477-487.
44. Tremblay R. Transmission of bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Med* 1996; 91: 858-866.
45. Sawyer MM. Border disease of sheep: the disease in the newborn, adolescent and adult. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 1992; 15: 171-177.
46. Özdemir S, Gülyaz V, Gülaçtı İ, ve ark. Marmara Bölgesinde koyunlarda abort vakalarında pestivirus enfeksiyonunun saptanması. TAGEM/HS/08/02/08/133 İstanbul: 2008.
47. Özkul A. Gebe ineklerde ve fütüslerinde bovine virus diarrhoea-mucosal disease (BVD-MD). Doktora Tezi, Ankara: Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 1992.

48. Nettleton PF, Gilmour JS, Herring JA, et al. The production and survival of lambs persistently infected with border disease virus. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 1992; 15: 179-188.
49. Thabti F, Fronzaroli L, Dlissi E, et al. Experimental model of border disease virus infection in lambs; comparative pathogenicity of pestiviruses isolated in France and Tunisia. *Vet Res* 2002; 33: 35-39.
50. Plant JW, Walker KH, Acland HM, et al. Pathology in the ovine foetus caused by ovine pestivirus. *Aust Vet J* 1983; 60: 137-140.
51. İssi M, Gülaçtı İ, Kızıl Ö, ve ark. Kliniğimizde gözlemlenen reverse transkriptaz-polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile doğrulanan mukoza hastalığı olguları. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi* 2006; 20: 253-258.
52. Karaoğlu MT. Sahadan izole edilen bovine viral diarrhoea virus (BVDV) suşlarının immunoplak test yardımıyla biyotip karakterlerinin sitopatejen (cp) ve sitopatojen olmayan (ncp) saptanması. Doktora Tezi, Doktora Tezi, Ankara: Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 1996.
53. Azkur AK, Gazyağcı S, Aslan ME, ve ark. Molecular and serological characterization of pestivirus infection among sheep in Kırıkkale, Turkey. *Kafkas Univ Vet Fak Der* 2011; 17: 83-92.
54. Potts BJ, Sawyer M, Shekarchi IC, et al. Peroxidase-labeled primary antibody method for detection of pestivirus contamination in cell cultures. *J Virol Methods* 1989; 26: 119-124.
55. Pratelli A, Martella V, Cirone F, et al. Genomic characterization of pestivirus isolated from lambs and kids in southern Italy. *J Virol Methods* 2001; 94: 81-85.
56. Vilcek S, Nettleton PF, Paton DJ, et al. Molecular characterization of ovine pestiviruses. *J Gen Virol* 1997; 78: 725-35.
57. Entrican G, Dand A, Nettleton PF. A double monoclonal antibody ELISA for detecting pestivirus antigen in the blood of viraemic cattle and sheep. *Vete Microbiol* 1995; 43: 65-74.
58. Vilcek S, Paton DJ. A RT-PCR assay for the rapid recognition of border disease virus. *Vet Res* 2000; 31: 437-445.
59. Fredriksen B, Pres CM, Sandvik T, et al. Detection of viral antigen in placenta and fetus of cattle acutely infected with bovine viral diarrhoea virus. *Vet Pathol* 1999; 36: 267-275.
60. Klucinskas R, Lukauskas K, Milus J, et al. A detection of bovine viral diarrhoea virus in saliva samples. *Bull Vet Inst Pulawy* 2008; 52: 31-37.
61. Ronan GO'Neill, Michael O'Connor and Patrick JO'Reilly. A survey of antibodies to pestivirus in sheep in the republic of Ireland. *Irish Veterinary Journal* 2004; 57: 525-530.

62. Nettleton PF, Gilray JA, Russo P, et al. Border disease of sheep and goats. *Vet Res* 1998; 29: 327-340.
63. Greiser-Wilke İ, Grummer B, Volker M. Bovine viral diarrhoea eradication and control programme. *Biologicals* 2003; 31: 113-118.
64. McGoldrick A, Bensaude E, Ibata G, Sharp G, Paton DJ. Closed one-tube reverse transcription nested polymerase chain reaction for the detection of pestiviral RNA with fluorescent probes. *J Virol Methods* 1999; 79: 85-95.
65. Chaignat V, Worwa G, Scherrer N, et al. Toggenberg orbivirus, a new bluetongue virus: initial detection, first observation in the field and experimental infection of sheep and goats. *Veterinary Microbiology*
66. Anthony S, Jones H, Darpel KE, et al. A duplex RT-PCR assay for detection of genome segment 7 (VP7 gene) from 24 BTV serotypes. *J Virol Methods* 2007; 141: 188-197.
67. OIE Terrestrial Manual. Chapter 2.1.3. Bluetongue 2009.
68. Özkul A, Bozoğlu F, Ertürk A, ve ark. Türkiye’de mavidil virus moleküler epidemiyolojisi ve profilaktik yaklaşımlar: farklı inaktivasyon yöntemlerinin kapsit proteinler üzerine etkisi. (2008). TÜBİTAK TOVAG-1050241
69. http://viralzone.expasy.org/all_by_species/106 10.12.2013
70. Dik B. Ceratopogonid’ler ve parazitolojik önemleri. In, Özcel MA, Daldal N (Eds): parazitolojide artropod hastalıkları ve vektörler. *Türkiye Parazitoloji Dergisi* 1997; 13: 111-143.
71. Karaoğlu T, Özgünlük İ, Yıldırım Y, et al. Seroepidemiology of bluetongue virus infection in Northeast and Southeast Anatolia, Turkey. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2012; 59: 289-294.
72. Ruiz-Fons F, Sanchez-Matamoros A, Gortazar C, Sanchez Vizcaino JM. The role of wildlife in bluetongue virus maintenance in Europe: Lessons learned after the natural infection in Spain. *Virus Research* 2014; 182: 50-58.
73. Ertürk A. Çeşitli serumlarda (koyun, keçi, sığır) mavidil antikorlarının agar-jel presipitasyon testi ile araştırılması. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi* 1994; 5: 1-19.
74. Anonim. Presentation at BVA Congress 25-27 September 2008 London, UK
75. Ertürk A, Tatar N, Kabaklı O, ve ark. The current situation of bluetongue in Turkey. *Vet Ital* 2004; 40: 137-140.
- Karaoğlu T, Özgünlük İ, Demir B, et al. Seroprevalence of culicoides-borne disease in cattle in European Turkey. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2007; 54: 121-125.
76. Azkur AK, Gazyagcı S, Aslan ME. Serological and epidemiological investigation of bluetongue, maedi-visna and caprine arthritis-encephalitis viruses in small ruminant in Kirikkale District in Turkey. *Kafkas Univ Vet Fak Der* 2011; 17: 803-808.

- Shaw AE, Monaghan P, Alpar HO, et al. Development and initial evaluation of a real-time RT-PCR assay to detect bluetongue virus genome segment 1. *J Virol Methods* 2007; 145: 115-126.
77. Roy P, Bishop DH, Leblois H, Erasmus BJ. Long-lasting protection of sheep against bluetongue challenge after vaccination with virus-like particles: evidence for homologous and partial heterologous protection. *Vaccine* 1994; 12: 805-811.
 78. Kono R, Hirata M, Kaji M, et al. Bovine epizootic encephalomyelitis caused by Akabane virus in southern Japan. *BMC Vet Res* 2008; 13: 4-20.
 79. Taylor WP and Meillor PS. The distribution of Akabane virus in the Middle East. *Epidemiol Infect* 1994; 113: 175-185.
 80. Calisher CH. History, classification and taxonomy of viruses in the family Bunyaviridae. Plenum Press 1996; 1-17.
 81. http://viralzone.expasy.org/all_by_species/250.html 13.03.2014.
- OIE terrestrial manual. chapter 2.9.1. Akabane. 2008.
82. <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/akabane.pdf> /10.12.2013.
 83. Lee JK, Park JS, Choi JH, et al. Encephalomyelitis associated with Akabane virus infection in adult cows. *Vet Pathol* 2002; 39: 269-73.
 84. Ohashi S, Yashida K, Yanase T, et al. Simultaneous detection of bovine arboviruses using single-tube multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 2004; 120: 79-85.
 85. Tsuda T, Yoshida K, Yanase T, et al. Competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of the antibodies specific to Akabane virus. *J Vet Diagn Invest* 2004; 16: 571-576.
 86. Akashi H, Nakamura K, Murakami T. Restriction fragment length polymorphism analysis of Akabane virus nucleoprotein gene. *J Vet Med Sci* 1997; 59: 837-840.
 87. Turan N, Gülyaz V, İyisan S, ve ark. Marmara Bölgesindeki koyunlarda pestivirus prevalansının saptanması. TAGEM/HS/09/06/02/146 İstanbul: 2009.
 88. Ozan E, Turan HM, Albayrak H, ve ark. Samsun ilindeki küçük ruminantlarda pestivirus, mavidil virusu ve küçük ruminants vebası virusunun serolojik olarak belirlenmesi. Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi 2012; 7: 27-33.
 89. Burgu İ. Gebe koyunlar ve fötüslerinde pestivirus enfeksiyonu. Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Kesin Raporu, Ankara: 2003.
 90. Okur-Gümüsova S, Yazıcı Z, Albayrak H. Pestivirus seroprevalence in sheep populations from inland and coastal zones of Turkey. *Revue Med Vet* 2006; 157: 595-605.
 91. Hasırcıoğlu S, Kale M, Acar A. Investigation of pestivirus infections in aborted sheep and goats in Burdur region. *Kafkas Univ Vet Fak Der* 2009; 15: 163-167.
 92. Gür S. A investigation of border disease virus in sheep in western Turkey. *Trop Anim Health Prod* 2009; 41: 1409-1412.

93. Yazıcı Z, Serdar MS, Gumusova SO, ve ark. Molecular diagnosis and seroepidemiology of pestiviruses in sheep. *Veterinarski Arhiv* 2012; 82: 35-45.
94. İssi M, Gül Y, Gürçay M, ve ark. Elazığ yöresindeki koyunlarda saptanan pestivirus enfeksiyonu. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi* 2012; 26: 165-169.
95. Berber E, Sözdutmaz İ. Elazığ, Malatya ve Tunceli illerinde koyunlarda görülen abort vakalarında pestivirusların rolünün araştırılması. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi* 2013; 27: 39-41.
96. Kennedy JA, Mortimer RG, Powers B. Reverse transcription-polymerase chain reaction on pooled samples to detect bovine viral diarrhoea virus by using fresh ear-notch-sample supernatants. *J Vet Diagn Invest* 2006; 18: 89-93.
97. Bolat Y. Elazığ, Diyarbakır ve Şanlıurfa illerinde koyunların mavidil hastalığının yayılması üzerinde serolojik araştırmaları. *Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 1986a; 2: 103-112.
98. Girgin H, Yonguç AD. Türkiye'deki koyunların mavidil hastalığının serolojik etiyolojik ve patolojik durumu üzerinde araştırmalar. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi* 1988; 6: 15-24.
99. Öztürk F, Yavru S, Eröz S. Koyunlarda mavi dil enfeksiyonu üzerinde seroepizootolojik araştırmalar. *Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 1990; 1: 37-40.
- Bulut O, Yavru S, Yapıkçı O, ve ark. Serological investigation of bluetongue virus infection by serum neutralization test and ELISA in sheep and goats. *Bull Vet Inst Pulawy* 2006; 50: 305-307.
100. Gür S. A serologic investigation of bluetongue virus (BTV) in cattle, sheep and gazella subgutturosa subgutturosa in southeastern Turkey. *Trp Anim Health Prod* 2008; 40: 217-221.
101. Albayrak H, Ozan E. Orta karadeniz bölgesinde ruminant ve tek tırnaklılarda kan emici sineklerle nakledilen bazı arboviral enfeksiyonların seroprevalansı. *Kafkas Univ Vet Fak Der* 2010; 16: 33-36.
102. Ataseven VS, Ataseven L, Tan T, ve ark. Seropositivity of agents causing abortion in local goat breeds in Eastern and South-eastern Anatolia, Turkey. *Revue Med Vet* 2006; 157: 545-550.
103. Özgünlük İ, Çabalar M. Şanlıurfa yöresindeki koyun ve keçilerde mavidil virus antikorlarının araştırılması. *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2013; 2: 12-17.
104. Özgünlük İ. Güneydoğu Anadolu Projesi (GAP) kapsamındaki bölgede sığırlarda mavidil, Akabane ve İbaraki enfeksiyonlarının seroepidemiolojisi. Doktora tezi, Ankara: Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2003.
105. Duman R. Yavru S. Kale M. Virological and serological investigations of

- bluetongue virus (BTV) infection in sheep in Konya region. *J Anim Vet* 2009; 11: 2399-2403.
106. Gibbs EP, Greiner EC. Serological observations on epidemiology of bluetongue virus infections in the Caribbean and Florida. *Prog Clin Biol Res* 1985; 178: 563-570.
106. Tamayo R, Schoebitz R, Alonso O, Wenzel J. First report of bluetongue antibody in Chile. *Prog Clin Biol Res* 1985; 178: 555-558.
107. Lopez JW, Dubovi EJ, Cupp EW, Lein DH. An examination of the bluetongue virus status of New York state. In: *Bluetongue, African Horse Sickness and related Orbiviruses. Proceedings of the Second International Symposium*, Walton T.E. and Osburn B.I. (Eds.). CRC Press, USA, 1992; 140-146.
108. Mayo C. Prevalence and risk factors associated with bluetongue virus among Colorado sheep flocks. Master Thesis of Science, Colorado State University, Fort Collins, Colorado, 2010.
109. Shi SK, Zhang XD, Xu ZZ, et al. Serologic and virologic diagnosis and investigation of bluetongue of imported animals. In: *Bluetongue, African horse sickness and related orbiviruses. Proceedings of the second international symposium*, Walton T.E. and Osburn B.I. (Eds.). CRC Press, USA, 1992; 162-167.
110. Mehrotra ML. Studies on bluetongue in India: Distribution and isolation of viruses. In: *Bluetongue, African horse sickness and related orbiviruses. Proceedings of the second international symposium*, Walton T.E. and Osburn B.I. (Eds.). CRC Press, USA, 1992; 181-187.
111. Kulkarni DD, Bannaliker AS, Karpe AG. Epidemiologic observations on bluetongue in sheep in the Marathwada region of Maharashtra state in India. In: *Bluetongue, African horse sickness and related orbiviruses. Proceedings of the second International symposium*, Walton T.E. and Osburn B.I. (Eds.). CRC Press, USA, 1992; 193-196.
112. Inaba Y, Matumoto M. Akabane Virus. In: Dinter Z, Morein B. (Editors). *Virus Infection of Ruminants*. Amsterdam, The Netherland: 1990: 467-477.
113. Mohamed ME, Mellor PS, Taylor P. Akabane virus serological survey of antibodies in livestock in the Sudan. *Rev Elev Med Vet Pays Trop* 1996; 49: 285-288.
114. Qiao J, Qingling M, Zaichao Z. et al. A serological survey of Akabane virus infection in cattle and sheep in northwest China. *Trop Anim Health Prod* 2012; 44: 1817-1820.
115. Al-Afaleq AI, Abu Elzein EME, Mellor PS. Prevalence of neutralizing antibodies to Akabane virus in ruminants in Saudi Arabia. *J Vet Med* 1998; 45: 257-262.
116. Urman HK, Milli Ü, Mert N, ve ark. Türkiye’de buzağlarda konjenital epizootik arthrogriposis ve hydranencephalie olayları. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 1979; 26: 287-292.

117. Yonguç AD, Taylor WP, Csonton L, et al. Bluetongue in western Turkey. *Vet Rec* 1982; 111: 144-146.
118. Hazıroğlu R. Buzağılarda hydranencephalie olgularında patolojik-anatomik bulgular. Doktora tezi, Ankara: Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 1987.
119. Mellor PS, Jennings DM, Hambling C et al. Control of Akabane disease and surveillance of bluetongue and ephemeral fever. United nations development programme, food and agriculture organization of the united nations, Rome. 1995.
120. zgnlk İ, Yıldırım Y, Gr S, Tan MT. Aydın yöresindeki sığırlarda Akabane ve İbaraki enfeksiyonlarının seroprevalansı. *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2013; 1: 36-41.
121. Burgu İ, Urman HK, Akça Y, et al. Serologic survey and vector surveillance for bluetongue in southern Turkey. In, Walton TE, Osburn BI (Eds): *Bluetongue, African horse sickness and related orbiviruses*. CRC Press Boca Raton 1992; 168-174.

8. EKLER

EK 1: Hayvan deneyleri yerel etik kurul kararı



T.C.

TARIM VE KÖYİŞLERİ BAKANLIĞI

PENDİK VETERİNER KONTROL VE ARAŞTIRMA ENSTİTÜSÜ HAYVAN DENEYLERİ
YEREL ETİK KURULU

Sayı:47

04.05.2011

Karar No:31


Başvuru Tarihi:20.04.2011

Sayın Züleyha PESTİL

Sorumluluğunu üstlendiğiniz "Marmara Bölgesinde Koyunlarda Görülen Abort Vakalarında Viral Etkenlerin Araştırılması" isimli çalışmanız kurumumuz tarafından incelenmiş ve Etik Kurul ilkelerine "UYGUN" bulunmuştur.


Dr. Rüçhan ALP
PEVHADYEK Başkanı


Dr. Ümre ÖZDEMİR
Başkan Yardımcısı


Doç. Dr. Gülay URAL
Üye

Dr. Ayşe ATEŞOĞLU
Üye
Kaitılmadı


Dr. Veli GÜLBAZ
Üye


Uzm. Vet. Hek. AY ÖZKARA
Üye

Dr. Arkan GÜREL
Üye
Kaitılmadı


Vet. Hek. Doğan YARIMBI
Üye

9. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Züleyha PESTİL

T.C Kimlik No : 38464829622

Doğum Yeri,Tarihi : Bingöl, 01.09.1973

Öğrenim Durumu : Üniversite Mezunu

| Derece | Bölüm/Program | Üniversite | Yıl |
|----------------------------------|---------------|--|------|
| Veteriner Hekim Yüksek Lisans | Veterinerlik | İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi | 1997 |
| Uzmanlık | Viroloji | Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı | 2004 |
| Doktora | Viroloji | Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi | 2014 |

Uzmanlık Tez Başlığı ve Tez Danışmanı: Marmara Bölgesinde koyunlarda peste despetits ruminants (PPR) virus varlığının immunocapture-ELISA ile saptanması. **Uzm. Vet. Hekim; Alev BİTGEL.**

Doktora Tezi Başlığı ve Danışmanı: Marmara Bölgesinde koyunlarda görülen abort vakalarında viral etkenlerin araştırılması. **Prof.Dr. Hakan BULUT.**

I. MAKALELER

A.Yurtdışı Dergilerde Yayımlanan Makaleler

1.Azkur AK, Albayrak H, Rişvanli A, **Pestil Z**, Ozan E, Yılmaz Y, Tonbak S, Cavunt A, Kadı H, Macun HC, Acar D, Özgenç E, Alparslan S, Bulut H. Antibodies to Schmallenbergvirus in domestic livestock in Turkey. Trop Anim Health Prod 2013; 45: 1825-1828.

2.Tonbak S, Berber E, Yoruk MD, Azkur AK, **Pestil Z**, Bulut H. A Large-Scale Outbreak of Bovine Ephemeral Fever in Turkey. J Vet Med Sci 2013; 11: 1511-1514.

3.Risvanli A, **Pestil Z**, Azkur AK, Alparslan S, Tonbak S, Bulut H. Seroprevalence of Schmallenberg virus in repeat breeder cows. Online J of Vet Res 2013; 17: 432-435.

B.Yurtiçi Dergilerde Yayımlanan Makaleler

1. **Pestil Z**. Marmara Bölgesinde koyunlarda Peste Des Petits Ruminants (PPR). Virus varlığının immunocapture-ELISA İle saptanması. Pendik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi 2011.01.OAM.02

2. **Pestil Z**, Gülyaz V, Hasöksüz M. Marmara Bölgesinde yeni doğan buzağı ishallerinde bovine coronavirusların saptanması ve patojenite çalışması. Pendik Mikrobiyoloji Dergisi 2012.01.OAM.05

II. PROJELER

1. Gülyaz V, Özdemir S, Pestil-Apuhan Z. Attenüe Denizli koyun çiçek aşısının koyun ve kuzularda bağışıklık süresi ve raf ömrünün saptanması. (2009-629). TÜBİTAK-TOVAK Proje No: 107O058.

2. Hasöksüz M, Özdemir S, **Pestil-Apuhan Z**. Türkiye'de ishalleri buzağı dışkılarından izole edilen sığır rotaviruslarının moleküler karakterizasyonu. TÜBİTAK -TOVAK Proje No: 107O137.