

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BOVINE VIRAL DIARRHEA/MUKOZAL DISEASE (BVD/MD)
ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR**

Baki SARIKAYA

**MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DANIŞMAN

Doç. Dr. A. Kürşat AZKUR

2011 – KIRIKKALE

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BOVINE VIRAL DIARRHEA/MUKOZAL DISEASE (BVD/MD)
ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR**

Baki SARIKAYA

**MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DANIŞMAN

Doç. Dr. A. Kürşat AZKUR

Bu tez, Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (No: K.Ü. BAP 2010/6) tarafından desteklenmiştir.

2011 – KIRIKKALE

Kırıkkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Mikrobiyoloji (Veteriner) Yüksek Lisans Programı çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri üyeleri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 13 /01/2011

İmza
Prof. Dr. Murat YILDIRIM
Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
Jüri Başkanı

İmza
Doç. Dr. A. Kürşat AZKUR
Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
Üye

İmza
Yrd. Doç. Dr. Serkan DAZYAĞCI
Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
Üye

Şekil 2. Kabul ve Onay sayfası

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	I
İçindekiler	II
Önsöz	IV
Simgeler ve Kısaltmalar	V
Şekiller	VII
Tablolar	X
ÖZET	1
SUMMARY	2
1. GİRİŞ	3
1.1. ETİYOLOJİ	3
1.2. REPLİKASYON	7
1.3. EPİDEMİYOLOJİ	9
1.4. KLİNİK BELİRTİLER	10
1.4.1. AKUT ENFEKSİYONLAR	10
1.4.2. KONGENİTAL ENFEKSİYON	11
1.4.3. PERSİSTE ENFEKSİYON	12
1.4.4. MUKOZAL HASTALIK (MD=MUCOSAL DISEASE)	13
1.5. PATOLOJİ VE PATOGENEZ	15
1.6. BAĞIŞIKLIK (İMMUNİTE)	16
1.7. TANI	17
1.7.1. ANTİJENLERİN BELİRLENMESİ	18
1.7.1.1. İMMUNOHİSTOKİMYA	18
1.7.1.2. ANTİJEN ELISA	19
1.7.2. ANTİKOR BELİRLENMESİ	20
1.7.2.1. ANTİKOR ELISA	20
1.7.2.2. VİRÜS NÖTRALİZASYON TESTİ	20

1.7.3. NÜKLEİK ASİTLERİN SAPTANMASI	21
1.8. KONTROL-MÜCADELE	22
1.8.1. AŞILAR	22
1.8.1.1. MODİFİYE CANLI AŞILAR	23
1.8.1.2. İNAKTİF AŞILAR	23
1.8.1.3. KARMA AŞILAR	24
1.8.1.4. AŞI HAZIRLANMASI	24
2.GEREÇ VE YÖNTEM	27
2.1. ÖRNEKLENEN HAYVANLAR	27
2.2. AŞILAMA	28
2.3. KAN ÖRNEKLERİNİN TOPLANMASI	29
2.3.1. TAM KAN SAYIMI	30
2.3.2. ELISA	30
2.3.2.1. ANTİJEN ELISA	30
2.3.2.2. ANTİKOR ELISA	31
2.3.3. RNA İZOLASYONU	31
2.3.4. TERSİNE TRANSKRİPSİYON (TT) VE NESTED POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (N-PZR)	32
2.3.5. PZR ÇOĞALMA ÜRÜNLERİNİN JEL ELEKTROFOREZİ	34
3. BULGULAR	35
3.1. BİR İŞLETMEDE BVDV AŞISININ KAN DEĞERLERİ ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI	35
3.2. ELISA SONUÇLARI	50
3.3. PZR SONUÇLARI	51
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	54
KAYNAKLAR	61
ÖZGEÇMİŞ	77

ÖNSÖZ

Bovine viral diarrhoea-mukozal hastalık (BVD-MD), sığırlarda çok yaygın olarak görülen viral bir hastalıktır ve bovine viral diarrhoea virüs (BVDV) tarafından meydana gelir. Hastalığın birbirinden farklı iki klinik formu bulunmaktadır. Bu formlar çoğunlukla sporadik, nadiren enzootik seyir gösterir. BVD-MD, dünya genelinde sığır yetiştiriciliğinde ciddi ekonomik kayıplara neden olur. Bu nedenle yetiştiricilerin BVD-MD'nin bulaşma yollarını, risk faktörlerini ve kontrol önlemlerini iyi bilmeleri gerekmektedir.

Yüksek lisans eğitimim süresince destek ve ilgilerini esirgemeyen, tez konumun belirlenmesinde ve yürütülmesinde bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, fikirleri ile bana yol gösteren danışman hocam, Sayın Doç. Dr. A. Kürşat AZKUR'a teşekkür ederim.

Tezimin projelendirilmesinde bilgi, deneyim, her türlü yardım ve yakın ilgilerini esirgemeyen anabilim dalı başkanı Sayın Prof. Dr. Murat YILDIRIM hocama teşekkür ederim. Ayrıca Sayın Yrd. Doç. Dr. Serkal GAZYAĞCI'ya ve laboratuvar çalışmalarında değerli yardımını esirgemeyen doktora öğrencisi Muhammet Eren ASLAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmanın bir kısmı BAP2010/6 nolu proje olarak desteklenmiştir. Sağladıkları bu destekten dolayı Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne şükranlarımı sunarım.

Bana her zaman sabır ve anlayış gösteren, tüm hayatım boyunca büyük özveri gösteren ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

SİMGELER VE KISALTMALAR

AB	Avrupa Birliği
BDV	Border Disease Virus (Border Hastalığı Virüsü)
BVD	Bovine Viral Diarrhea
BVDV	Bovine Viral Diarrhea Virüs
CP	Cyto Pathogenic (Sito patojenik)
CPE	Cytopathic Effect (Sitopatik Etki)
CSFV	Classic Swine Fever Virus (klasik domuz ateş virüsü)
DNA	Deoksiribonükleik Asit
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FCS	Fetal Calf Serum (Fötal Buzağı Serumu)
fl	Femtolitre (1 fl=10 ⁻¹⁵ litre)
Hct	Hematokrit
Hgb	Hemoglobin
KB	Kilo Base (Kilo Baz)
kDa	Kilo Dalton
Lym	Lenfosit
MAbs	Monoklonal Antikorlar
MCH	Eritrositlerdeki hemoglobin miktarı
MCHC	Eritrositlerdeki ortalama hemoglobin konsantrasyonu
MCV	Eritrositlerin ortalama büyüklüğü
MD	Mucosal Disease (Mukozal Hastalık)
Mon	Monosit
MPV	Trombosit hacmi
NCP	Non Cyto Pathogenic (Sito patojenik olmayan)
NK	Negatif Kontrol
N/Gr	Nötrofil/Granülosit
N-PZR	Nested Polimeraz Zincir Reaksiyonu
OD	Optical Density (Optikal Dansite)

PBS	Phosphate Buffer Saline (Fosfat Tampon Çözeltisi)
PG	Pikogram ($1\text{pg}=10^{-12}$ gram)
PI	Persiste Enfekte
PK	Pozitif Kontrol
PLT	Trombosit (Platelet = Kan Pulcukları)
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RBC	Eritrosit (Red Blood Cell = Kırmızı Kan Hücreleri)
RNA	Ribo Nükleik Asit
RT-PZR	Reverse Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu
V	Volt
VN	Virüs Nötralizasyon
WBC	Lökosit (White Blood Cell = Beyaz Kan Hücreleri)

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. BVDV sınıflandırılmasının gösterimi.....	4
Şekil 1.2. BVD Virüsü. 1-Spike 2-Zarf 3-Kapsit 4-Genom.....	4
Şekil 1.3. Sitopatik olmayan (ncp) ve sitopatik (cp) BVDV nihai protein ürünlerinin şematik temsili.....	6
Şekil 1.4. BVDV'nin replikasyonu.....	8
Şekil 1.5. Konak populasyonlarda ki pestivirüslerin genetik heterojenliği(N ^{pro}) BDV= Border hastalığı virüsü, CSFV=klasik svine ateş virüsü.....	9
Şekil 1.6. Fötusta BVD'nin seyri.....	13
Şekil 1.7. BVDV enfeksiyonunun klinik formları.....	14
Şekil 1.8. PAMP (Patojen-ilişkili moleküler desenler)lar ile ya da PAMP'sız doğuştan gelen bağışıklık sisteminin kontrolü.....	17
Şekil 3.1. Lökosit değerinin 23 buzağıdaki aşı öncesi (0. gün), aşılardan 1 ve 3 hafta sonraki durumu.....	35
Şekil 3.2. Eritrosit değerinin 23 buzağıdaki aşı öncesi (0. gün), aşılardan 1 ve 3 hafta sonraki durumu	36
Şekil 3.3. Trombosit değerinin 23 buzağıdaki aşı öncesi (0. gün), aşılardan 1 ve 3 hafta sonraki durumu	37
Şekil 3.4. Lökosit, eritrosit ve trombosit değerlerinin 23 buzağıdaki aşı öncesi (0. gün), aşılardan 1 ve 3 hafta sonraki durumları	37
Şekil 3.5. Lenfosit değerinin 23 buzağıdaki aşı öncesi (0. gün), aşılardan 1 ve 3 hafta sonraki % durumu	38
Şekil 3.6. Lenfosit değeri sayısının 23 buzağıdaki aşı öncesi (0. gün), aşılardan 1 ve 3 hafta sonraki durumu	39
Şekil 3.7. Monosit değerinin 23 buzağıdaki aşı öncesi (0. gün), aşılardan 1 ve 3 hafta sonraki % durumu	39
Şekil 3.8. Monosit değeri sayısının 23 buzağıdaki aşı öncesi (0. gün), aşılardan 1 ve 3 hafta sonraki durumu.....	40

Şekil 3.9. Nötrofil/granülosit değerinin 23 buzağıdaki aşı öncesi (0. gün), aşılardan 1 ve 3 hafta sonraki % durumu	41
Şekil 3.10. Nötrofil/granülosit değeri sayısının 23 buzağıdaki aşı öncesi (0. gün), aşılardan 1 ve 3 hafta sonraki durumu.....	41
Şekil 3.11. Hematokrit değerinin 23 buzağıdaki aşı öncesi (0. gün), aşılardan 1 ve 3 hafta sonraki % durumu	42
Şekil 3.12. Lenfosit, monosit, nötrofil/granülosit ve hematokrit değerlerinin 23 buzağıdaki aşı öncesi (0. gün), aşılardan 1 ve 3 hafta sonraki % durumları.....	42
Şekil 3.13. Lenfosit, monosit ve nötrofil/granülosit değerleri sayılarının 23 buzağıdaki aşı öncesi (0. gün), aşılardan 1 ve 3 hafta sonraki durumları.....	43
Şekil 3.14. Eritrositlerin ortalama büyüklük değerinin 23 buzağıdaki aşı öncesi (0. gün), aşılardan 1 ve 3 hafta sonraki durumu	44
Şekil 3.15. Trombositlerin hacim değerinin 23 buzağıdaki aşı öncesi (0. gün), aşılardan 1 ve 3 hafta sonraki durumu... ..	44
Şekil 3.16. Eritrositlerin ortalama büyüklük ve trombositlerin hacim değerlerinin 23 buzağıdaki aşı öncesi (0. gün), aşılardan 1 ve 3 hafta sonraki durumları.....	45
Şekil 3.17. Eritrositlerdeki ortalama hemoglobin konsantrasyonu değerinin 23 buzağıdaki aşı öncesi (0. gün), aşılardan 1 ve 3 hafta sonraki durumu.....	46
Şekil 3.18. Hemoglobin değerinin 23 buzağıdaki aşı öncesi (0. gün), aşılardan 1 ve 3 hafta sonraki durumu.....	46
Şekil 3.19. Eritrositlerdeki ortalama hemoglobin konsantrasyonu ve hemoglobin değerlerinin 23 buzağıdaki aşı öncesi (0. gün), aşılardan 1 ve 3 hafta sonraki durumları	47
Şekil 3.20. Eritrositlerdeki hemoglobin miktarı değerinin 23 buzağıdaki aşı öncesi (0. gün), aşılardan 1 ve 3 hafta sonraki durumu.....	48
Şekil 3.21. Eritrositlerdeki hemoglobin miktarı değerinin 23 buzağıdaki aşı öncesi (0. gün), aşılardan 1 ve 3 hafta sonraki durumu	48
Şekil 3.22. BVDV antijen ELISA sonuçları.....	50

Şekil 3.23. Aşılama öncesi ve sonrası BVDV antikor ELISA sonuçlarının karşılaştırılması.....	51
Şekil 3.24. % 1.5'lik agaroz jelde örneklerin elektroforez görüntüsü. A-GAPDH Primer M:marker 1:Pozitif kontrol (NADL), 2-Su, 3, 4, 5 (Klinik örnekler) B-Panpesti Primer M:marker 1:Pozitif kontrol (NADL), 2-Su, 3 (Panpesti), 4 (BVDV-1a), 5 (BVDV-2) (Klinik örnekler).....	53

TABLULAR

Tablo 1.1. BVDV ile <i>in vitro</i> enfeksiyonun sığır makrofaj fonksiyonları üzerine etkisi.....	16
Tablo 1.2. BVDV antijen tespiti için kullanılan testler.....	18
Tablo 1.3. ELISA protokolleri.....	19
Tablo 1.4. Aşılanmamış bir sığır populasyonunda BVDV prevalansına göre hayvan kategorileri, serumdaki antikor ve virüs test sonuçları.....	21
Tablo 1.5. BVDV modifiye canlı aşılar ile inaktif aşıların özellikleri.....	23
Tablo 2.1. Kan numuneleri alınan hayvan sayıları ve işletme bilgileri.....	27
Tablo 2.2. BVDV aşısının kan değerleri üzerine etkisini görmek için seçilen 23 adet buzağıya ait özellikler.....	28
Tablo 2.3. Kullanılan BVDV aşısının (Pregsure BVD, Pfizer®) özellikleri.....	29
Tablo 2.4. BVDV'nin çoğaltılması için kullanılan primerlerin sekans dizilimleri.....	33
Tablo 3.1. BVDV aşısının, kan parametreleri üzerine etkisinin istatistiksel olarak karşılaştırılması.....	49
Tablo 3.2. Plazma örneklerinde nested PZR sonuçları.....	51
Tablo 3.3. BVDV pozitif kan örneklerinin tiplendirilmesi.....	52

ÖZET

Bovine Viral Diarrhea/Mukozal Disease (Bvd/Md) Üzerine Araştırmalar

Bovine viral diarrhoea virüs (BVDV) dünyanın birçok yerinde çok yaygın görülen ve sığırlarda ekonomik önemi olan viral bir hastalıktır. Bu tez iki kısımdan oluşmaktadır. Birinci kısım; ticari BVDV aşısının kan değerleri üzerine etkisi olup olmadığı amaçlandı. Kırıkkale ili sınırlarında süt sığırcılığı yapılan bir işletmedeki sağlıklı 23 buzağı kullanıldı. Aşının kan değerleri üzerine etkisinin belirlenmesi için aşılama öncesi ve aşılama sonrası birinci ve üçüncü haftalarda kan örnekleri alındı ve incelendi. Elde edilen değerler istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Aşılamadan önceki ve aşılamadan sonraki ilk haftada kan değerlerinden Hct, Hgb, RBC ve WBC, toplam Lym, toplam N/Gr ve McHC seviyelerinde düşüş gözlemlendi ($p \leq 0.005$). Aşılamadan önce ve aşılamadan üç hafta sonraki kan değerlerinden McHC ($p \leq 0.007$) ve monosit yüzdesinde artış bulundu ($p \leq 0.001$). Aşı sonrası birinci ve üçüncü hafta karşılaştırıldığında Hct, Hgb ve RBC değerlerinde azalma ($p \leq 0.005$); lökosit, toplam Lym, toplam N/Gr'de artış saptandı ($p \leq 0.005$). Aşılamanın MCV, MCH, MPV, toplam monosit, % N/Gr değerleri üzerinde etkisinin olmadığı görüldü ($p \geq 0.05$). Tüm gruplar aralarında karşılaştırıldığında Hct, Hgb ve RBC'de sürekli düşüş gözlemlendi ($p \leq 0.005$). Sonuç olarak tek doz aşılamanın lenfopeniye yol açtığı gözlenmesine rağmen, aşılama sonrası ELISA sonucunda BVDV özgül antikor belirlenmemesi diğer çalışmalar ile uyumlu bulundu. İkinci kısım; Kırıkkale ili ve çevresindeki yedi işletmeden 160 sığır plazmalarından nested-polimeraz zincir reaksiyonu yardımıyla BVDV'nin tespiti ve tiplendirilmesi yapıldı. Plazma örneklerinden RNA izolasyonu yapıldı ve reverse-transkriptaz ile RNA'lardan cDNA elde edildi. n-PZR sonucu örneklerin 15 tanesinde (% 9.375) pozitif sonuç tespit edildi. Kan örneklerinde % 1.25 panpesti, % 0.625 BVDV-1a ve % 7.5 BVDV-2 pozitif tespit edildi. Bu tez Kırıkkale bölgesinde BVDV-1a ve BVDV-2 varlığını gösteren ilk çalışma özelliğini taşımaktadır. BVDV-1 alt gruplarının ve BVDV-2 suşlarının; uygulanan aşılarla birlikte kullanılması önerilmektedir.

Anahtar Sözcükler: ELISA, kan değerleri, pestivirüs, PZR, sığır.

SUMMARY

Investigations on Bovine Viral Diarrhea / Mucosal Disease (BVD / MD)

Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in many parts of the world's very common and economically important viral disease of cattle. This thesis consists of two parts. In the first part; commercial BVDV vaccination whether the effect on blood parameters aimed. A dairy farm in the province of Kirikkale 23 healthy calves were used to determine the effect on blood parameters of the vaccine before vaccination and the first and third weeks post-vaccination blood samples were collected and analyzed. The obtained values were statistically compared between the group blood parameters including Hct, Hgb, RBC and WBC, Lym total, total N/Gr and McHC levels were decreased ($p \leq 0.005$) at the first week after vaccination, and before vaccination. Before vaccination and three weeks after vaccination, the percentage of blood monocytes ($p \leq 0.001$) and McHC values ($p \leq 0.007$) were increased. Compared to the first and third week after vaccination Hct, Hgb and RBC values decreased ($p \leq 0.005$); WBC, total Lym, and total N/Gr were increased too ($p \leq 0.005$). Vaccination did not impact on the values of MCV, MCH, MPV, total monocyte, % N/Gr ($p \geq 0.05$). When all groups were compared, Hct, Hgb and RBC values were observed in the continuous decline ($p \leq 0.005$). Although they had a single-dose vaccination induced lymphopenia, BVDV specific antibodies after vaccination is not detected by ELISA these findings were consistent with other studies. The second part, detection and typing of BVDV was carried out blood plasma from 160 cattle in seven farms by nested-polymerase chain reaction. RNA isolation was performed from the blood plasma and cDNA were obtained from RNA with reverse-transcriptase reaction. As a result n-PCR finding showed that 15 samples were given positive band (9.375 %). The results showed that 0.625 % of the analysed animals were seropositive to BVDV-1a, 7.5 % to BVDV-2 and 1.25 % panpestiviruses. In this thesis, Kirikkale region showing the presence of BVDV-1a and BVDV-2 is the first feature to study. It was suggested that vaccine should contain both BVDV-1 subtypes and BVDV-2 strains to provide full protection for BVDV.

Key Words: Blood values, bovine, ELISA, PCR, pestivirus.

1. GİRİŞ

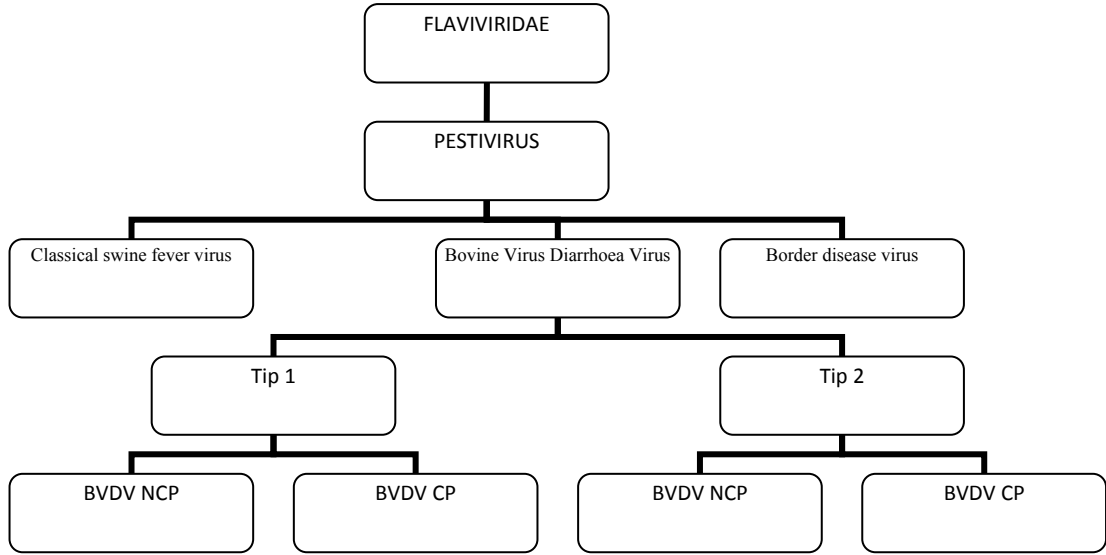
Bovine viral diarrhoea virüs (BVDV), sığırlar işletmelerinde ekonomik kayıplara yol açan önemli viral enfeksiyon etkenleri arasındadır (Houe 1999). BVD, sığırlarda sindirim sistemi enfeksiyonları ve transplasental enfeksiyonlar sonucu gelişen performans düşüklüğüne yol açan ve subklinik formdan ölümcül mukozal hastalığa (MD) kadar değişebilen seyir izleyen bir hastalıktır (Fritzmayer ve ark. 1997).

1.1. Etiyoloji

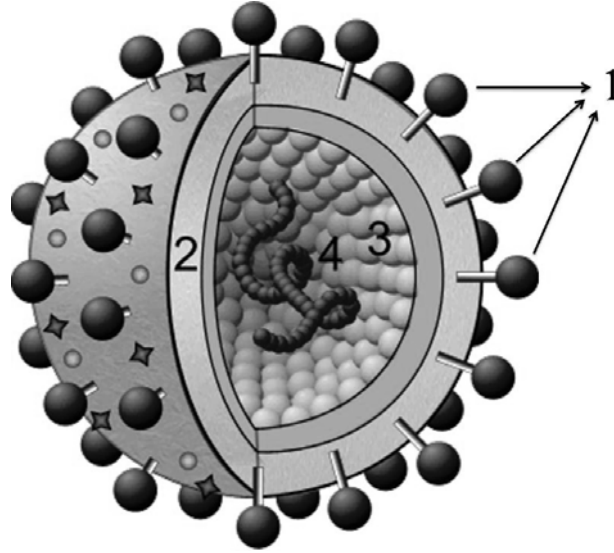
Bovine viral diarrhoea virüs *Flaviviridae* ailesinde *Pestivirus* cinsi içinde sınıflandırılır (Şekil 1.1.) Pestivirus cinsinin diğer üyeleri klasik domuz ateş virüsü (Classical Swine Fever virus=CSFV) ve border hastalığı virüsü (Border disease virus=BDV)'dür. (Pellerin ve ark. 1994; Ridpath ve Bolin 1995). BVDV, CSFV ve BDV etkenleri; küçük, zarlı, pozitif anlamlı, tek zincirli, RNA virüsleridir (Şekil 1.2.) (Becher ve Thiel 2002, Zoth ve Taboga 2006). BVDV genomu yaklaşık 12.5 kb'dır. Genom, 5' ve 3' UTR ile çevrelenmiş geniş bir open reading frame (ORF) yapısı içerir (Collett ve ark. 1988; Ridpath ve Bolin 1995).

Bovine viral diarrhoea; yüksek ateş ile seyreden, ishal, sindirim sisteminde erozyonlara neden olan; birçok ülkede yaygın olan, hayvancılık sektöründe önemli ekonomik kayıplara neden olan bir hastalıktır (Baker 1987). Sağlıklı sığırlar BVDV ile enfekte olduklarında geçici yüksek ateş, burun akıntısı, aşırı salivasyon veya ishal gözlenir (Bolat ve Doymaz 1998). Gebe hayvan, sitopatojenik olmayan (ncp) BVDV ile enfekte olursa, virüs kolayca plasentayı geçer ve uterusu virüs fütusa bulaştırabilir. Fötuslarda klinik belirtiler yaşa göre değişir, BVDV için ncp suşu olan bir enfeksiyon durumunda ise 80–120 fetal günde, immun tolerans gelişir. Böyle

fötuslar persiste enfekte (PI) buzağı olarak doğarlar. PI buzağular sağlıklı görünür ancak sürekli olarak BVDV'yi üretir ve saçarak tüm sürüyü enfekte ederler (Thiel ve ark. 1996). BVDV ile persiste enfekte buzağular, ölümcül mukozal hastalığa karşı koyamayabilir. Böyle durumlarda sitopatojenik (cp) ve sitopatojenik olmayan BVDV izole edilir (Brownlie, 1991).



Şekil 1.1.: BVDV sınıflandırılmasının gösterimi. (Brownlie 2000)



Şekil 1.2.: BVD Virüsü. 1-Spike 2-Zarf 3-Kapsit 4-Genom [http://www.bvd-info.ch/veterinarians/properties.html]

BVDV'nin; BVDV-1 ve BVDV-2 olmak üzere iki genotipik suşu bulunmaktadır. BVDV-1, BVDV-1a ve BVDV-1b olmak üzere iki suşa ayrılır. Bu sınıflandırılmanın temelini; 5' UTR ya da E2 geninin nükleotid diziliminde meydana gelen farklılıklar oluşturur (Collett ve ark. 1988; Thiel ve ark. 2005). BVDV suşları en az 11 genetik alt gruba daha ayrılır (Vilcek ve ark. 2001, Nagai ve ark. 2004). Yüksek patojeniteye ve hemorajik hastalığa neden olan BVDV-2 suşu ilk kez 1994 yılında rapor edilmiştir (Corapi ve ark. 1989; Pellerin ve ark. 1994; Ridpath ve ark. 1994). BVDV-2 suşu en az 2 genetik alt gruba ayrılır (Becher ve ark. 1999, Tajima ve ark. 2001, Flores ve ark. 2002;).

BVDV'nin cp ve ncp iki biyotipi mevcuttur (Yamane ve ark. 2005). Sitopatik BVDV, hücre kültürlerinde hücrelerin yuvarlaklaşması, hücre dökülmeleri ve ölüm gibi sitopatik etkilere neden olur (Gillespie ve ark. 1960). Sitopatik olmayan BVDV ise hücre kültürü üzerine herhangi bir etki meydana getirmez (Lee ve Gillespie 1957).

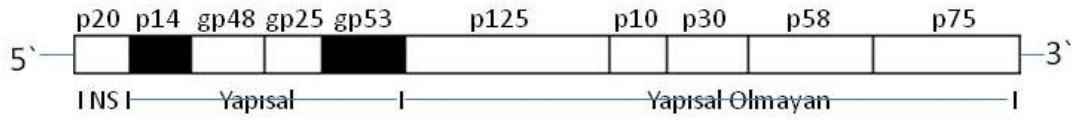
BVDV virionu, çoğunlukla küresel yapıdadır. Yaklaşık 45-50 nanometre (nm) çapında bir zarfı vardır. Pestivirüs genomik RNA boyutu, yaklaşık 12-13 kilo baz (kb) uzunluğunda ve ikosehedral bir yapıdadır (Collett 1992).

BVDV, yapısal ve yapısal olmayan proteinler içermektedir. Yapısal proteinler C, E^{ms}, E1, E2 ve p7'dir. C; oldukça basit bir yapıya sahip, % 21 oranında lizin içeren, kapsit proteindir. Ağırlığı 14 kilo dalton (kDa) dur (Heimann ve ark. 2006). E0 ya da gp44/48 olarak da bilinen E^{ms}, zar glikoproteindir. Ağırlığı 44-48 kDa'dır (Thiel ve ark. 1991, Langedijk ve ark. 2002). Ağırlığı 25 kDa olan E1, zar glikoproteindir. E2 de bir zar glikoproteindir ve ağırlığı 53 kDa'dır (Weiland ve ark. 1990). p7, RNA replikasyonu için gerekli olmayan (Behrens ve ark. 1998) ama enfekte virüs üretimi için gerekli olan (Harada ve ark. 2000) proton kanalı olarak işlev gören bir proteindir ve ağırlığı 7 kDa'dır.

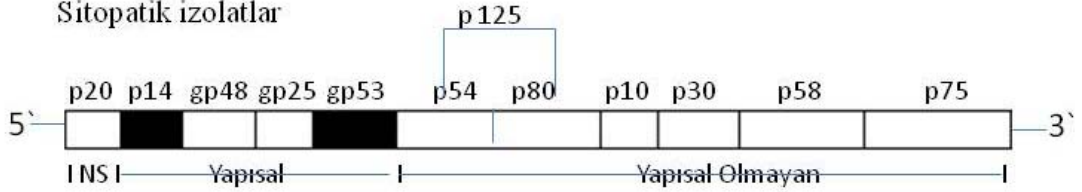
Yapısal olmayan proteinler N^{pro}, NS2/3, NS4A, NS4B, NS5A ve NS5B'dir. N^{pro}, N terminal proteindir (sistin proteaz). Üretilen poliproteini, Cys-168 ve Ser-169

bölgesinden kesen bir otoproteaz olup (Stark ve ark. 1993; Steffens ve ark.1999) 20 kDa ağırlıktadır. Ağırlığı 125 kDa (55 kDa -80 kDa) olan NS2/3 ise serin proteazdır. NS4A serin proteaz kofaktörüdür, NS4B ise viral sitopatogenezde rol oynar. NS4A ve NS4B'nin immün yanıtla herhangi bir ilgileri yoktur. Ağırlıkları sırasıyla 7.2 kDa ve 38 kDa'dır. NS5A, replikasyon kompleksinin bir parçasıdır ve 55-56 kDa ağırlıktadır. NS5B, RNA-polimeraz aktivitesinde görevlidir. Ağırlığı 81-82 kDa'dır [http://www.bvd-info.ch/veterinarians/genome.html].

Sitopatik olmayan izolatlar



Sitopatik izolatlar



Şekil 1.3.:Sitopatik olmayan (NCP) ve sitopatik (CP) BVDV nihai protein ürünlerinin şematik temsili (Anderson 2000).

BVDV'nin çevre şartlarına karşı dayanıklılığı düşüktür. Oda sıcaklığında 4-5 gün, 56°C de 45-60 dakika, [http://www.bvd-info.ch/veterinarians/properties.html]-40°C de ise 16 ay enfektivitesini korur. Virüs pH 5.7-9.3'de enfektivitesini korur iken, optimum yaşamı pH 7.4'te gerçekleşir. Virüs fenol ve kloroheksidin gibi dezenfektanlarla kolayca inaktive olur (Murphy ve ark. 1999).

1.2.Replikasyon

Viral genomun replike olabilmesi için duyarlı hücreye tutunması, penetrasyon, transkripsiyon, translasyon, viral RNA'nın üretimi, kurgu ve serbest kalma aşamalarının gerçekleşmesi gerekmektedir.

BVDV'nin çeşitli duyarlı hücrelere girebilmesi için tutunacağı birkaç farklı reseptör bulunur. Bunlar düşük yoğunluklu lipoprotein (low density lipoprotein=LDL), CD46 ve heparan sülfat reseptörleridir. Bu reseptörler aracılığıyla tutunma olayı gerçekleşebilir.

CD46 reseptörlerinin domuz hücrelerinde açıklanması BVDV duyarlılığını 100 kat arttırmaktadır. Fare veya insan hücrelerinde BVD virüsünün RNA replikasyonu başarılı olmasına rağmen CD46'nın açıklanması duyarlılığa neden olmaz. Bu bulgular şimdiye kadar bilinmeyen yardımcı bir reseptör(ler)ün BVDV enfeksiyonu için gerekli olduğunu göstermektedir (Maurer ve ark. 2004).

Heparan sülfat ve diğer glikozaminoglikanlar, BVDV Pe515 suşu E^{ms} glikoproteininin C-terminal etki alanındaki temel amino asitlerin bir grubuna bağlanır (Iqbal ve ark. 2000, Iqbal ve ark. 2002).

BVDV'nin hücreye girişinde LDL reseptörünün önemli bir rolü olduğu bildirilmiştir. Anti-LDL reseptörü monoklonal antikor ile bloke edilirse BVDV'nin enfeksiyona neden olmadığı ve BVDV enfeksiyonuna dirençli hücrelerin oluştuğu rapor edilmiştir (Flores ve Donis 1995, Agnello ve ark. 1999).

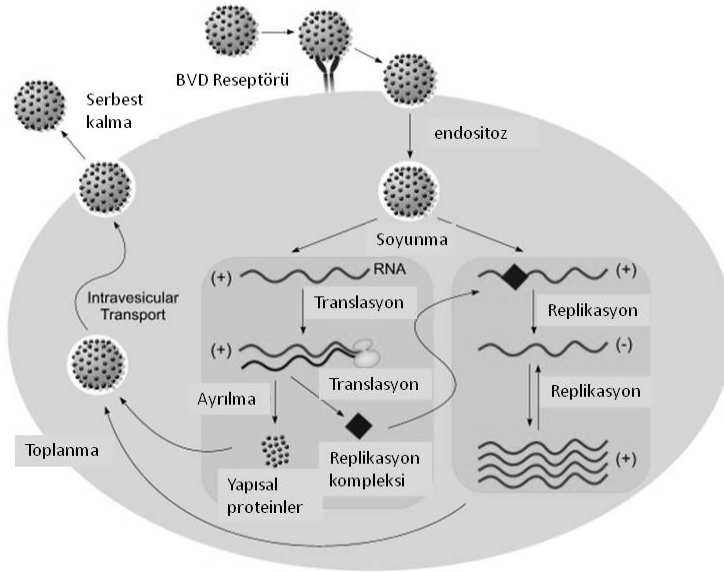
Penetrasyon safhasında zarflı virionlar, endositik zarı eriterek duyarlı hücrelere genomik RNA'yı transfer eder (Flores ve ark. 1996).

BVD virüsünün cp biyotipi, viral replikasyon sırasında sitoplazmik vakuollerin artışı, pinosis ve apoptozisi takip eden hücre ölümleri gibi morfolojik ve yapısal

değişikliklere neden olurken, ncp biyotipi herhangi bir değişikliğe neden olmamaktadır (Grummer ve ark. 2002).

Transkripsiyonda pozitif polariteli tek iplikli RNA (ssRNA)'ya sahip olan BVDV'nin, virion içinde transkriptaza ihtiyacı yoktur. Tek bir polisistronik mRNA görevi gören genom, bir poliprotein sentezler. Bu proteinlerden biri RNA'ya bağlı RNA polimerazdır. RNA polimeraz, pozitif polariteli ssRNA'dan komplementer negatif polariteli ipliği sentezler. Bu negatif polariteli iplik, pozitif polariteli virüs genomunu üretmek için şablon olarak kullanılır (Gong ve ark. 1996, Gong ve ark. 1998).

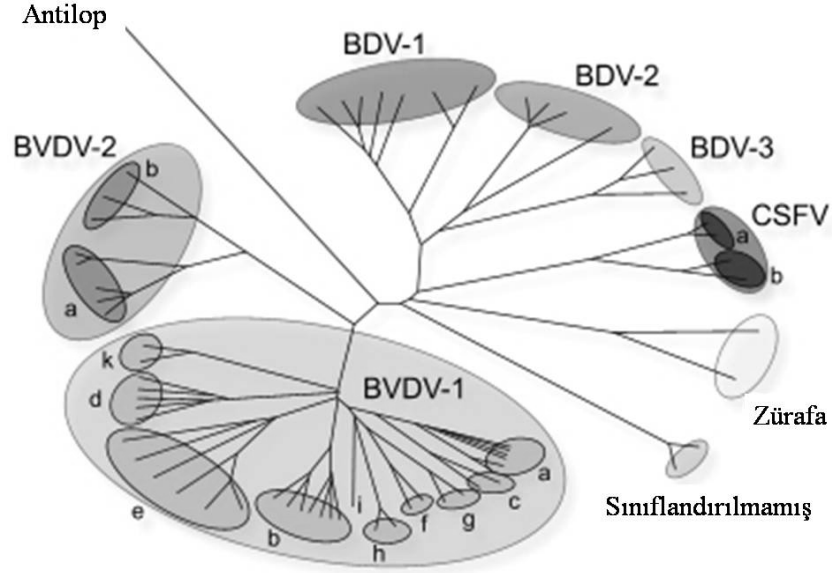
Viral RNA, polisistronik olarak translasyona uğrar olur. Translasyon neticesinde ortaya çıkan poliprotein proteaz aktivitesine sahiptir. Proteazlar belli tanıma bölgelerinden poliproteini daha küçük parçalara keserler. İlk kesim, viral protein ribozoma bağlı iken gerçekleşir. Daha büyük ara ürünler bir süre sonra kesilirken, küçük olanların kesimi için farklı proteazlar kullanılır (Thiel ve ark. 1996). BVDV'nin serbest kalma safhasında hücreden çıkışı tomurcuklanma ile olur. Golgi kompleksi veya granüllü endoplazmik retikulumun membranı ile plazma membranı füzyona uğrar ve virionlar ekzositozla salınır (Şekil 1.4.)(Bielefeldt-Ohmann ve Block 1982, Bolat ve Doymaz 1998, Grummer ve ark. 2001).



Şekil 1.4.:BVDV'nin replikasyonu. [http://www.bvd-info.ch/veterinarians/replication.html]

1.3. Epidemiyoloji

BVDV-1 dünya da ilk kez 1954 yılında izole edilmiştir (Baker ve ark. 1954) . BVDV-2 ise ABD ve Kanada'da 1990'lı yılların başında yüksek patojenik viral etken olarak keşif edildi. (Pellerin ve ark. 1994, Ridpath ve ark. 1994). BVDV-2 suşları, Kuzey Amerika'da yaygın olarak bulunurken, Avrupa ülkelerinde ise nadir olarak görünür ya da görünmez (Wolfmeyer ve ark. 1997, Luzzago ve ark. 2001, Vilcek ve ark. 2001, Couvreur ve ark. 2002, Flores ve ark. 2002, Arias ve ark. 2003, Toplak ve ark. 2004).



Şekil 1.5.:Konak popülasyonlarda ki Pestivirüslerin genetik heterojenliği (N^{pro}); BDV= Border hastalığı virüsü, CSFV=klasik svine ateş virüsü [http://www.bvdinfo.ch/veterinaria_ns/geno_types.html]

Ülkemizde BVD enfeksiyonu ilk kez 1964 yılında, kültür ırkı ineklerde klinik bulgulara göre tespit edilmiştir (Öncül ve ark. 1964)

Solunum ve sindirim sisteminde enfeksiyonlara neden olan BVDV, ayrıca repeat breeding, embriyonik ölüm, abort, infertilite ve buzağlardaki kongenital defektlerden sorumludur (Givens 2006). Tüm dünyada yaygın olarak bulunan BVDV

enfeksiyonunun prevalansı ülkelere göre değişiklik gösterir. Seropozitif hayvanların oranı % 60–85 arasında, persiste enfekte hayvanların oranları ise % 1-2 arasındadır (Burgu ve ark. 1999).

Sığırlar, BVD virüsünün rezervuarıdır. Bunun yanında geyik, koyun, domuz ve vahşi ruminantlarda da antikor belirlenmiştir (Nettleton 1990). Virüs vücuda ağız veya burun yolu ile girer. Virüsün ilk replikasyonu üst solunum yolu ve barsak epitel hücrelerinde gerçekleşir. Buradan sistemik kan dolaşımına geçerek lökosit ve reticulo-endotelial sistemde sekonder replikasyonu gerçekleşir ve tüm vücuda yayılır. Enfekte hayvanlar nasal, oral sekresyon, dışkı ve idrar ile virüsü saçarlar. Semen ve kontamine materyal ile de bulaşma görülebilir. Bulaşma vertikal ve horizontal olabilir. Plasentadan fötusa geçmek suretiyle vertikal bulaşma gerçekleşir. Horizontal bulaşma da ise; direkt kontakt, su ve yiyeceklerin ortak kullanımı sonucu kontaminasyonla, aerosol, kontamine ya da canlı aşularla, mekanik vektörlerle gerçekleşir (Houe 1999)

1.4. Klinik Belirtiler

1.4.1. Akut Enfeksiyonlar:

Sığırların BVD akut enfeksiyonları, özellikle genç hayvanlarda meydana gelir ve subklinik seyredebildiği gibi hafif sulu sarı ishalde görülebilir (Baker 1995). BVDV'den etkilenen hayvanlar ikincil enfeksiyonlara yatkın olabilir (Potgieter 1988). Boğaların semenle virüs saçtığı rapor edilmiştir (Paton ve ark. 1989). Dişi sığırlar, virüsle enfekte olduklarında ovaryumlarda fonksiyon bozuklukları (Grooms ve ark. 1998), gonadotropin ve progesteron hormonlarındaki anormal değişiklikler ile birlikte infertilite görülür (Fray ve ark. 2002). Akut enfeksiyonlar sırasında, kısa bir

viremi görülür ve virüs dışarı saçılır (Şekil 1.7.). Geçici bir leukopenia, trombositopeni veya yüksek ateş görülebilir. Klinik tablo genellikle yüksek bir morbidite ve düşük mortaliteyle seyrederken bazı vakaların daha şiddetli seyrettiği rapor edilmiştir (Brownlie 1990). Özellikle, hemorajik lezyonlar, trombositopeni ve yüksek mortalite ile akut hastalığın şiddetli formunun sporadik salgınları bazı ülkelerde bildirilmiştir (Bolin ve Ridpath 1992, Baker 1995). Özellikle BVD tip 2 virüsü ile enfeksiyon sonucu trombosit fonksiyonlarında değişim tespit edilmiştir (Walz ve ark. 2001). Akut vakalarda bildirilen diğer semptomların, hemoraji ile birlikte seyreden ateş, pnömoni, ishal ve ani ölüm olduğu bildirilmiştir (Carman ve ark. 1998).

1.4.2. Kongenital Enfeksiyon:

Sığırlarda gebe hayvanın fötüsü ncp BVDV ile enfekte olursa; teratojenik etkilerle neonatal buzağılarda persiste kongenital enfeksiyona neden olur. Sonucunda persiste enfekte (PI) buzağıkların doğumu, abortlar veya anomali ile sonuçlanabilir (Şekil 1.7.) (Duffell ve Harkness 1985, Moennig ve Liess 1995). Bir abort vakasının BVDV tarafından oluşturulup oluşturulmadığının tespiti çoğu zaman zor olmuştur (Ruth 1987). Bunun yanında virüs bazı durumlarda fötal dokudan viral antijenin veya RNA genomunun tespiti ile belirlenebilir. Fötal sıvılar, serum örnekleri ya da doku süspansiyonu süpernatantından spesifik antikörlerinde tespiti gerekmektedir. Ölü doğumlar veya teratojenik etkiler, geç gebeliğin ortasında virüse karşı gelişen aktif fötal immün yanıtla ilişkili olabilir (Lindberg ve ark. 2001).

BVDV'nin kongenital enfeksiyonu sık sık abortlara yol açmasına rağmen sahada her zaman ayırt edilemez. Gebeliğin ilk trimesterinde enfeksiyon fötusun abortuyla sonuçlanabilir. Enfeksiyonun diğer olası sonucu fötusun mumifiye olmasıdır. Fötusun, deri altında ödem ve bol pleural ve peritoneal effüzyon sık sık gözlenir. Büyüme gecikmesiyle sonuçlanan doğuştan gelen anomaliler, serebellar hipoplasi ve

dismyelinasyon gibi merkezi sinir sistemi bozuklukları ile katarakt ve retinal artropi gibi göz kusurları olabilir (Trautwein ve ark. 1986). Bunun yanında artrogripozis de görülebilir.

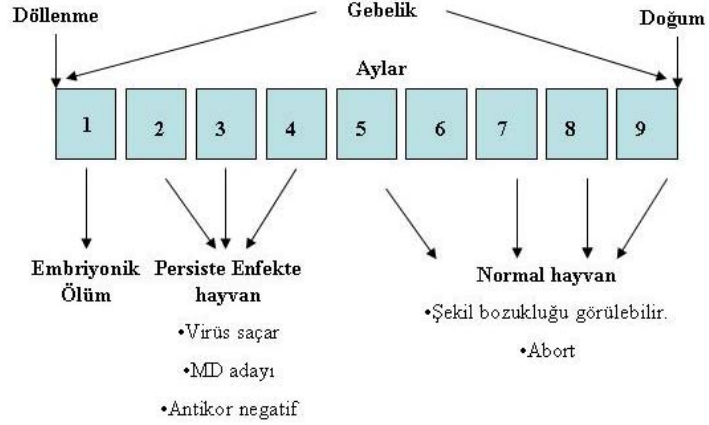
Ölü doğmuş buzağular, gebeliğin 150. gününden önce kongenital enfeksiyonun sonucu olarak rapor edilmiştir. Bu buzağular genellikle, doğumda gelişimlerini tamamlamış görünürler ama kurtarılamazlar. Yinede birçok olayda BVD virüsünün bu hayvanlardan izole edilemediği ve PZR negatif olduğu bildirilmiştir. Eğer hastalık, gebeliğin 150. gününden sonra meydana gelirse, fötusta virüse karşı bağışıklık geliştirilecek ve antikor yanıtı oluşup normal bir buzağı doğumuyla sonuçlanacaktır (Şekil 1.6.).

1.4.3. Persiste Enfeksiyon:

Fötusun enfeksiyonu, gebeliğin yaklaşık olarak 110. gününden önce yani bağışıklığın yeterli seviyeye ulaşmasından önce meydana gelirse; buzağı, persiste enfekte (PI) doğabilir (Şekil 1.6. ve Şekil 1.7.). Bu hayvanların teşhisi, kanda sitopatojenik olmayan BVDV'nin tespiti ile yapılır. Virüs immunohistokimya ile deriden de teşhis edilebilir. Ağız mukozasında hiperemilere rastlanır. Maternal antikorların varlığı virüs izolasyonunu gölgeleyebilir (Brownlie 1990).

Persiste enfekte boğaların verimliliği düşer, semenleri yüksek ölçüde virüsle enfektiftir (Revell ve ark. 1988, Kirkland ve ark. 1994). Tüm boğalar doğal veya suni tohumlama için kullanılmadan önce BVDV enfeksiyonu yönünden araştırılmalıdır (Roeder ve Hakness 1986). Attenué virüs aşısı ile aşılamadan sonra da seropozitif boğaların oluşabildiği rapor edilmiştir (Voges ve ark. 1998, Givens ve ark. 2007). BVDV ile PI inekler, hastalığın potansiyel kaynağıdır (Vanroose ve ark. 1998). *İn vitro* fertilizasyon teknikleri içinde kullanılan kontaminasyon riski yüksek olan

biyolojik malzemeler (sığır serum, sığır hücre kültürleri için) BVDV'den arındırılmış olmalıdır (Booth ve ark. 1995).

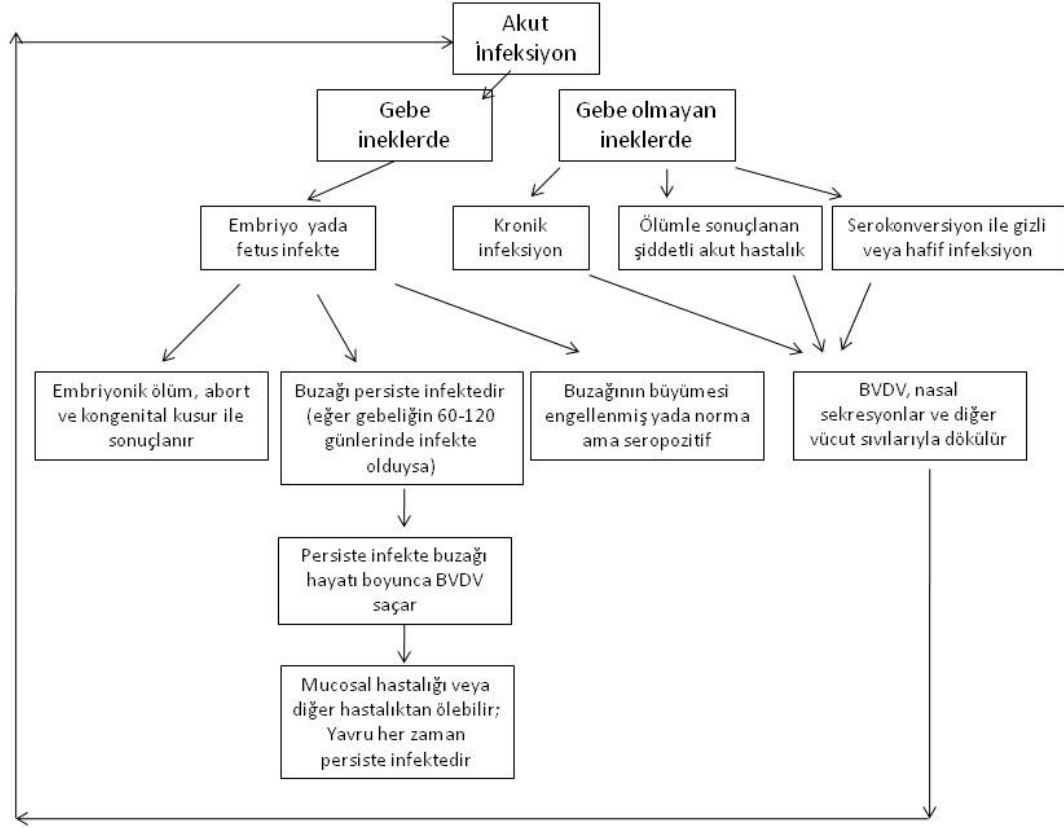


Şekil 1.6. Fötusta BVD'nin seyri.

1.4.4. Mukozal Hastalık (MD=Mucosal Disease):

Persiste enfekte hayvanlarda, nadiren mukozal hastalığın geliştiği bildirilmiştir (Brownlie 1985). Bu sendromun sitopatojenik biyotiple (cp) sitopatojenik olmayan biyotip (ncp) arasındaki rekombinasyonla ilişkili süperenfeksiyon yoluyla ya da persiste biyotipin mutasyonu (Loehr ve ark. 1998) ile ortaya çıktığı çeşitli çalışmalarla kanıtlanmıştır (Bolin 1995). Sonuç olarak; mukozal hastalığın ayırıcı tanısı, etkilenen sığırdan sitopatojenik virüs izolasyonunu içermelidir. Bu biyotip kanda, bağırsak epitel hücreleri ve peyer plaklarından tespit edilmiştir (Clarke ve ark. 1987). Mukozal hastalık, viral antijen immunofloresans veya immunoperoksidaz ile tespit edilir.

Mukozal hastalık mortalite yüksektir. Ölüm şekillenmeden önce abdominal ağrı ve harekette isteksizlik, yoğun bir ishal ve kondisyon kaybı şekillenir. Genel olarak, mukozal hastalık nadiren görülür ve seyri sporadiktir.



Şekil 1.7.:BVDV enfeksiyonunun klinik formları. (Tremblay 1996)

BVDV, subklinikten ağır klinik semptomların gözlemlendiği MD'ye kadar değişen birçok klinik tablodan sorumludur. Bununla birlikte transplasental enfeksiyon reproduktif bozukluklara, teratojenik defektlere veya immuntolerant PI buzağı doğumlarına neden olabilmektedir. PI buzağılar ya çok düşük düzeyde spesifik antikor taşırlar ya da seronegatiflerdir. Buna rağmen sürekli virüs saçmalarından dolayı enfeksiyonun yayılmasında çok önemli rolleri vardır (Mockeliuniene ve ark. 2004; Zoth ve Taboga 2006). Enfeksiyona karşı duyarlı ineklerde/düvelerde akut enfeksiyonu takiben gelişen viremiye bağlı olarak fötal enfeksiyonlar meydana gelebilir. Gebeliğin 42–125. günü arasında virüsün ncp biyotipi ile fötusun

etkilenmesi sonucu persiste enfeksiyon gelişir ve hayvanlar canlı doğar. Böyle hayvanlar yaşar ise immuntoleredirler (Baker 1995, Obando ve ark. 1999, Fulton ve ark. 2003, Givens 2006).

1.5. Patoloji ve Patogenez

Sığırlar, BVDV-1 ve BVDV-2 ile doğal enfekte olur. Koyunlar BDV ve BVDV ile ve domuzlar ise pestivirüslerin dört türüyle de enfekte olabilirler. Genellikle BVDV-1 sadece hafif ishal oluştururken; BVDV-2 suşlarının, şiddetli trombositopeniye, hemorajiye veya mukozal hastalığa neden olduğu bildirilmiştir (Corapi ve ark. 1989, Pellerin ve ark. 1994, Ridpath ve ark. 1994, Carman ve ark. 1998).

Abomasumda kanama ve ülserler görülür. Bağırsaklarda ülserlere rastlanır. Peyer plakları hiperplastik yapıda olup yüzeyleri nekrotik kitleler, kan pıhtıları veya difteroid membranlarla örtülü ülserlere rastlanır. Baş ve boyun bölgesindeki lenf düğümleri büyümüş, ödemli ve kanamalıdır. Mikroskopik olarak, lezyonlar üst sindirim sistemindeki kutan mukozada epitelin nekrozu ile başlar. Epitelin derin kısımlarındaki hücre grupları ya da tek hücreler eozinofilik karakter kazanırlar, şişkindirler ve çekirdekleri piknotiktir (Blowey ve Weaver 2003).

Ağız içerisinde diş etleri, yanak, damak ve dil mukozasında erozyonlara da rastlanır. Erken dönemde lamina propria'da çok az infiltrasyon vardır, ancak nötrofiller epitele infiltre olurlar. Erozyon ve ülserleşme durumunda lamina propria'da yoğun hücre infiltrasyonu ve hiperemi görülür. İnce bağırsaklardaki karakteristik lezyon, liberkün bez epitellerinin yıkılmasıdır. Kriptlerde dilatasyon vardır. Peyer plaklarının lenfoid foliküllerinde nekroz ve BVDV'ye bağlı ülserleşme görülür (Blowey ve Weaver 2003).

1.6. Bağışıklık (İmmunite)

BVDV yönünden negatif olan hayvanlar, virüs ile karşılaşılırsa antikor oluştururlar. Viral enfeksiyonun doğuştan gelen immuniteye etkisi Şekil 1.8.'de özetlenmiştir. Enfeksiyondan sonra ortaya nötralizan, presipitan ve komplementi bağlayan antikorlar oluşur. Nötralizan antikorlar 3-4 hafta sonra ortaya çıkar ve bir yıla yakın koruma sağlarlar. Ayrıca enfeksiyonun yayılımını da engeller (Roeder ve Harkness 1986).

Nötralizan antikorlar, aktif veya pasif immünite sağlar. Enfekte sığırlarda antikor belirlenememesi PI veya kronik enfeksiyona bağlı olabilir. İmmüno-supresyon ya da immünotoleransdan dolayı antikor üretimi gerçekleşmeyebilir.

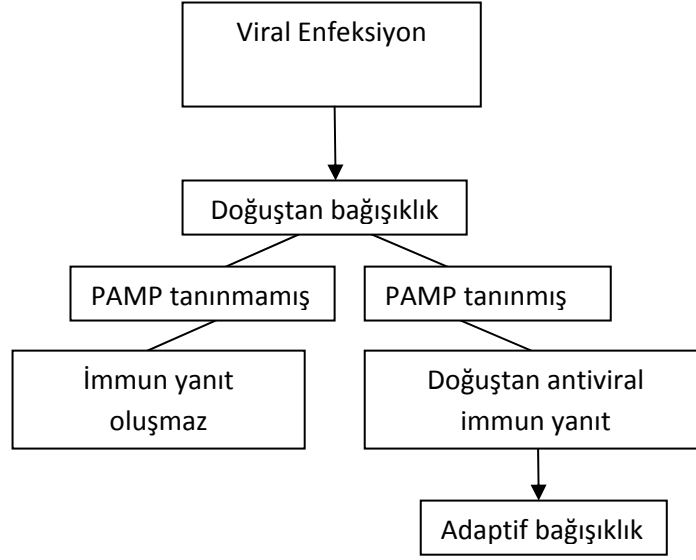
Buzağılar annelerinden aldıkları kolostrumdaki maternal antikorlar ile pasif immunizasyon gösterir ve aşılannmış gibi görülebilir. Zamanla antikorların yok olması sonucu 2-11 aydan sonra antikor teşhisi yapılamaz (Liess ve ark. 1987).

BVDV lenfoid organlara yerleştiği için immüno-supresyona yol açar. İnterferon ve antikor yapımı baskılanabilir. Hatta lökosit, lenfosit ve monosit hücre sayıları artmaz (Perdrizet ve ark. 1987). BVDV enfeksiyonu sonucu sığır makrofaj fonksiyonlarındaki değişiklikler Tablo 1.1.'de verilmiştir.

Tablo 1.1.: BVDV ile *in vitro* enfeksiyonun sığır makrofaj fonksiyonları üzerine etkisi (Peterhans ve ark. 2003).

Makrofaj Fonksiyonları Üzerine Etki	nep BVDV	cp BVDV
IFN tip 1 sentezi	Hiçbir etki yok	Artmış
Apoptozise neden olma	Hiçbir etki yok	Artmış
Prostaglandin E ₂ sentezi	Hiçbir etki yok	Artmış
LPS ya da S. dublin tedavisinden sonra NO sentezi	Artmış	Azalan
LPS tedavisinden sonra TNF- α sentezi	Artmış	Azalmış
PMA nedeniyle süperoksit üretimi	Azalmış	Azalmış

S.dublin nedeniyle procoagulant aktivitesi	Hiçbir etki yok	Hiçbir etki yok
LPS nedeniyle IL-1 inhibitör aktivitesi	Artmış	Artmış
Sitokin nedeniyle kemotaksis	Azalmış	Azalmış



Şekil 1.8.: PAMP (Patojen-ilişkili moleküler desenler)lar ile ya da PAMP'sız doğuştan gelen bağışıklık sisteminin kontrolü (Peterhans ve ark. 2003).

1.7. Tanı

Patognomik klinik belirtileri olmadığı için BVDV'nin varlığı, laboratuvara yönelik araştırmalar, virüse ait antijen ve antikor taramaları ile yapılabilir. PI hayvanların tespitinde; kan örnekleri, ELISA ile kontrol edilebilir (Sandvik 1999).

BVD virüsü tespiti için; virüs izolasyonu, ELISA ve immunohistokimya testleri kullanılır. Buzağılarda kolostrum yolu ile aldıkları antikorların ortalama onbeşinci haftaya kadar antijenleri gölgelemesiyle ELISA'da yanlış sonuçlar elde edildiği rapor edilmiştir. Bundan dolayı persiste enfeksiyonların teşhisinde Real Time PZR (RT=Gerçek Zamanlı PZR) testlerinin kullanılmasının daha uygun olduğu

görülmüştür (Hyndman ve ark. 1998, Deregt ve ark. 2002, Ridpath ve ark. 2002, Kozasa ve ark. 2005).

1.7.1. Antijenlerin Belirlenmesi

BVDV antijenlerinin belirlenmesinde kullanılan testler Tablo 1.2.'de gösterilmiştir.

Tablo 1.2.: BVDV antijen tespiti için kullanılan testler (Brownlie 2000).

Test	Tek hayvan ya da grup	Gereksinimler	Ölçümler	Yorum-Açıklama
İmmunoperoksidaz boyama	Tek hayvan	Kan (EDTA) ya da doku örneği	Viral antijen	Test negatif ya da pozitif sonuç sağlar
Antijen ELISA	Tek hayvan	Kan (EDTA)	Viral antijen	Test negatif ya da pozitif sonuç sağlar
Virüs İzolasyonu	Tek hayvan	Kan (EDTA)	Canlı virüs	Test negatif ya da pozitif sonuç sağlar
Toplu süt PZR	100'ün üzerinde hayvandan toplanmış süt	Taze toplu süttten 300 ml (koruyucu eklenmemiş)	Viral RNA	Sağım sırasında grup en az bir PI hayvan olumlu sonucu gösterir

1.7.1.1.İmmunohistokimya

Enzimle işaretli yöntemler, spesifik maternal antikoların mevcut doku kesitlerinde BVDV antijenini tespit etmek için kullanılır (Wilhelmsen 1991). PI sığırların teşhisi için lenf düğümleri, tiroit bezi, deri, beyin, abomasum ve plasenta kullanılır (Clarke ve ark. 1987).

1.7.1.2. Antijen ELISA

Yarışmalı (kompetatif) olan ve olmayan ELISA türleri antijen tespiti için kullanılır (Tablo 1.2.). Kompetatif ELISA yönteminde; aranan antijene özgül monoklonal antikolar katı faza bloklanmıştır. Enzimle işaretli antijen ve test edilecek antijen katı fazdaki antikora aynı zamanda eklenir ve her iki antijenin de antikordaki bağlanma bölgeleri için yarışması için beklenir. Ardından yıkama ile bağlanamayan antijenler uzaklaştırılır. Ortama enzim substratı eklenir, bekleme süresinin ardından enzim substratla reaksiyona girerek renk değişikliğine neden olur. Sonuçlar spektrofotometrede değerlendirilir iken substratın hidroliz miktarı, örnekteki antijen miktarı ile ters orantılı alınır. Renk değişikliğinin olmaması örneğin antijen yönünden pozitif olduğunu bildirir (Hendry 1992, Baron ve ark. 1994, Coligan ve ark. 1994, Gülmezoğlu ve Ergüven 1994).

Yarışmalı olmayan sandviç ELISA tekniğiyle de antijen tespit edilir (Tablo 1.3.). Aynen yarışmalı ELISA'daki gibi spesifik monoklonal antikor katı faza bloklanmıştır. Üzerine antijen içeren şüpheli serum konulur. İnkübasyon sonrası yıkama işlemi enzimle işaretli antikor eklenir. Tekrar yıkama işleminden sonra enzimin özel substratı eklenir. Bağlı enzim substratla reaksiyona girerek renk değişikliğine neden olur. Bu renk değişikliği aranan antijenin şüpheli serumda var olduğunu gösterir (Baron ve ark. 1994, Coligan ve ark. 1994).

Tablo 1.3.: ELISA protokolleri (Coligan ve ark. 1994)

ELISA Protokolü	Kullanım Alanı	Yorumlar
İndirekt	Antikor tespiti	Relatif olarak fazla miktarda antijen gerektirir.
Direkt kompetatif (yarışmacı)	Çözünür antijenin tespitinde	Antijenik çapraz reaksiyonu ölçmede çok avantajlı.
Antikor-sandviç yöntemi	Çözünür antijenin tespitinde	En hassas antijen testidir.
Çift antikor-sandviç yöntemi	Antikor tespiti	Uzun bir testtir.
Direkt hücresel	Hücresel antijen	Heterojen karışık hücre gruplarında hassas

yöntem	ekspresyonunun ölçümü	değildir.
İndirekt hücresel yöntem	Hücresel antijenlere karşı oluşan antikorların tespiti	Düşük miktarda ekspresse edilen hücresel antijenlere özgü antikorları saptayamayabilir.

1.7.2. Antikor Belirlenmesi

1.7.2.1. Antikor ELISA

Yarışmalı olmayan ELISA, örnekte aranılan antikorun olup olmadığını tespit etmek içinde kullanılır. Katı faza, bu metotta bilinen antijen bağlıdır. Kuyucuklara antikor yönünden test edilecek şüpheli serum eklenir. Eğer serum içerisinde, antijene özgü antikor varsa antijen-antikor kompleksi oluşacaktır. Yıkamadan sonra enzimle işaretli anti-globulin konulur. Bekleme ve yıkama safhalarından sonra ortama substrat eklenir. Spesifik antikor varsa enzimle işaretli anti-globuline bağlanır. Bunun sonucunda substrat hidrolize olacaktır. Absorbans miktarı mevcut antijen veya antikorun miktarıyla doğru orantılıdır (Beatty ve ark. 1987, Baron ve ark. 1994, Coligan ve ark. 1994).

1.7.2.2. Virüs Nötralizasyon Testi

BVDV'nin yaygın olarak kullanılan iki sitopatojenik suş vardır. Bunlar "Oregon C24V" ve "NADL" suşlarıdır. BVD tip 2 virüsünün antikor düzeyi, tip 1 suşu için kullanılan nötralizasyon testi tarafından algılanamayabilir. Tip 1 antikor düzeyini de tip 2 için kullanılan nötralizasyon testi algılamayabilir (Fultron ve ark. 1997).

1.7.3. Nükleik Asitlerin Saptanması:

RT-PZR yöntemi, BVD viral genomunun tespiti teşhisi amacıyla uygulanır (Brock 1995, Hamel ve ark. 1995, Kim ve Dubovi 2003, Letellier ve Kerkhofs 2003). Hücre kültüründen ya da direkt kan örneklerinden izole edilen virüsün genomunun farklı uzunluktaki PZR ürünlerinin çoğaltılmasında ve tiplendirilmesinde multipleks PZR kullanılabilir (Gilbert ve ark. 1999). Primerlerin seçilip dizayn edilmesinde, genomun 5' ucundaki mutasyonlardan daha çok korunan bölgelerinden olan UTR veya NS3 (p80 geni) seçilmelidir. Moleküler metotlarını uygulayacak personelin deneyimli ve dikkatli olması gereklidir, aksi halde kontaminasyon meydana gelebilir. Bu da yanlış negatif veya pozitif sonuçlara neden olur. Dokulardan viral nükleik asit enzim işaretli riboprolar ile in-situ hibridizasyon yöntemleri kullanılarak tespit edilebilir. (Desport ve ark. 1994, Bhudevi ve Weinstock 2003).

BVDV'ye karşı oluşmuş spesifik antikorlar, standart virüs nötralizasyon testi (VN) ya da ELISA gibi birkaç metottan birinin kullanımı ile serumdan tespit edilir (Tablo 1.3. ve Tablo 1.4.) (Howard ve ark. 1985, Katz ve Hanson 1987, Edwards 1990, Paton ve ark. 1991). Büyük sürülerde BVDV'nin tanısının maliyeti yüksek olduğu için, sürüden toplanan sütlerin tamamı ELISA yöntemi ile değerlendirilmelidir. (Niskanen 1993). BVD virüsün tespitine yönelik hızlı 'spot testler'in kullanılması kontrol ve eradikasyon açısından önemli olduğu belirtilmiştir (Lindberg ve Alenius 1999).

Tablo 1.4.: Aşılammamış bir sığır populasyonunda BVDV prevalansına göre hayvan kategorileri ve serumdaki antikor ve virüs test sonuçları. (Sandvik 1999)

Kategori	Antikor	Virüs	Yorumlar
İnfekte olmamış hayvanlar	-	-	
Şiddetli infekte hayvanlar	-	+/-	Kanda düşük ve kısa virüs titresi
Akut enfeksiyondan sonra bağışık hayvanlar	+	-	

Pasif bağışıklanmış buzağular	+	-	Antikorlar 5-9 ay tespit edilebilir
PI hayvanlar	-	+	
Bağışık ineklerin PI buzağuları	+	-/+	Antikorlar 4-10 hafta tespit edilebilir
MD durumundakiler	-/+	+/-	Nötralize antikorlar
PI buzağı taşıyan gebe inekler	+ /++	-	Geç gebelikte yüksek antikor titresi
Bağışıklı boğalar	+	-	Semen virüs pozitif olabilir

+: Var; -:Yok

1.8. Kontrol – Mücadele

Sürüler sürekli olarak BVDV varlığı yönünden kontrol edilmeli ve düzenli aşılama yapılmalıdır. BVDV enfeksiyonundan korunmanın en temel yolu, sürüdeki PI sığırların çıkarılmasıdır. Sürüye yeni katılacak dişi veya erkek sığırlara öncelikle BVDV aşısı yapılmalı ve sürüye dahil edilmelidir. BVDV yönünden negatif sığırlar sürülere dahil edilir iken veteriner hekimlerin kontrolünün önemi ortaya çıkmaktadır. Ayrıca biyogüvenlik önlemleri titizlikle uygulanmalıdır. (Tremblay 1996).

1.8.1. Aşılar:

Çiftliklerde BVD virüsü en fazla solunum yol ile bulaşır. Özellikle genç hayvanların korunması için bulaşmanın kontrolüne yönelik tedbirlerin alınması gereklidir. Ayrıca fötüsü koruyacak bir aşı preparatının kullanılması, uterus enfeksiyonunu önlemek için gereklidir (Brownlie ve ark. 1995).

1.8.1.1. Modifiye Canlı Aşılar

Gebe sığırlarda, canlı virüs aşılarının uygulaması, veteriner hekim kontrolünde olmalıdır. Çünkü aşı da kullanılan virüsün sitopatojenik suşu, plasentayı geçebilir. Bunlara ilaveten sitopatojenik suş PI hayvanlarda süperenfeksiyon sonucu mukoza hastalığına neden olabilir veya hızlandırabilir (Frey ve Eicken 1995).

1.8.1.2. İnaktif Aşılar

Deneysel inaktif aşıların hazırlanmasında; baculovirüs-BVD virüste bulunan viral glikoprotein E2 kullanılmıştır (Bruschke ve ark. 1999). İnaktif aşıları kullanmak güvenli olmasına rağmen, istenilen bağışıklığın elde edilmesi için yetersiz kalır. Canlı aşı ile inaktif aşıdan hazırlanan karma aşı protokolünün kullanımı canlı aşı suşların zararlı etkisini azaltabilir. Modifiye canlı aşılarla inaktif aşıların karşılaştırılması Tablo 1.5.'de verilmiştir.

Tablo 1.5.: BVDV'ye karşı hazırlanmış modifiye canlı aşılar ile inaktif aşıların özellikleri (<http://www.bvd-info.ch/veterinarians/infos/faq.html>).

	Modifiye canlı aşılar	İnaktif aşılar
İmmun yanıt	İyi, düzenli	Zayıf
Kros reaksiyonları	İyi	İyi
Koruma süresi	Uzun	Kısa
Güvenlik	Uygun	İyi
Fötüsü koruma	Yeterli	Şüpheli
Maternal antikör etkisi	Ağır	Ağır
İmmünosupresyon	Mümkün	-

-: Yok

1.8.1.3. Karma Aşılar

İmmün sistemi baskılanmış konakçılarda, BVDV'nin solunum yolu hastalıkları ile patogenezi karıştırılır. Bu nedenle, genellikle BVDV aşısı suşları solunum yolu hastalıklarını önlemek için multivalent aşılar içine dâhil edilmiştir. Hazırlanan aşısı kombinasyonuna; bovine herpesvirüs 1, bovine parainfluenza-3 virüsü, bovine respiratory syncytial virüs ve *Pasteurella multocida* dâhil edilerek kullanılmaktadır (Littlejohns 1985).

BVDV'ye karşı hazırlanan aşısı BVD virüsü suşlarını içermelidir. (Paton ve ark. 1995). BVDV-2 genotipinin ortaya çıkışı ile BVDV-1 genotipine karşı hazırlanmış aşısının BVDV-2 genotipine karşı koruyuculuğunun sorgulanmasına neden olmuştur.

BVDV aşılamaının sürü içerisinde PI sığırlar üzerine hiçbir etkisi bulunmamaktadır (Bolin 1996).

Sığırlarda BVDV'ye karşı etkili bir bağışıklama için birinci aşılamaadan sonra 3 hafta içerisinde etki arttırıcı ikinci bir aşısı daha uygulanır. BVDV için yapılan aşılamaada ömür boyu bağışık görülmez. Bu nedenle her yıl aşılama tekrarlanmalıdır (Kelling 1996).

1.8.1.4. Aşısı Hazırlanması

Ticari olarak hazırlanan tüm aşısının güvenlik ve etkinliklerine yönelik piyasaya sürülmeden önce standart testleri geçmesi gerekir. Canlı aşısının gebe sığırlarda kullanılabilmesi için güvenli şekilde kullanılabilmesine dair lisans almış olması gerekir. Aksi halde gebe hayvanlarda abortlara neden olabileceğinden dolayı kullanılmaması için uyarılmalıdır. BVD virüsünün sitopatojenik suşlarını içeren

ticari canlı aşılar, persiste enfekte hayvanda mukozal hastalık oluşturması riskine karşı uyarıcı bilgiye sahip olmalıdır (Bolin 1993, Howard ve ark. 1994, Brownlie ve ark. 1995). Hazırlanan tüm aşı türleri yetişkin damızlık sığırlarda transplasental bulaşmayı azaltmak, verimlerini arttırmak ve tam korunmanın sağlanması için tasarlanmıştır (Brownlie ve ark. 1995).

Bir BVDV aşısının, hücre kültürü ve geleneksel laboratuvar teknikleri kullanılarak standart bir üretim metodu yoktur. İnaktif aşılar, ikili ethylenimine veya beta-propiolactone inaktivasyon gibi metotlar ile hazırlanabilir (Park ve Bolin 1987, Howard ve ark. 1994). Buna ilaveten çeşitli adjuvanlar kullanılabilir (Neaton 1986, Howard ve ark. 1994). Adjuvanlar; mineral tuzları, tensoaktif bileşikler, mikroorganizma kaynaklı adjuvanlar, emülsiyon adjuvanlar, partikül adjuvanlar ve diğer adjuvanlar olmak üzere gruplara ayrılır. Mineral tuzlarından olan alüminyum tuzları BVDV aşılarında en yaygın kullanılan adjuvandır. Geniş bir yüzeye sahip olması antijen emiciliğini artırır (Butler ve ark. 1969, Simon ve Edelman 2006). Tensoaktif adjuvanlar ise çok toksik yapıdadır (Kensil ve ark. 1995). Mikroorganizma kaynaklı adjuvanlar, bakteri hücre duvarı peptidoglikan ve lipopolisakkaritleridir. Ama bunlar da oldukça toksiktir (Audibert ve Lise 1993). Emülsiyon adjuvanlarda yağ içinde su, su içinde yağ emülsiyonları bulunur. Bunlar Freund İnkomplet adjuvanları (FIA), Montanide, Adjuvant 65 ve Lipovalanttır. Etkilerini enjekte edildikleri bölgede depolanarak antijenin yavaş salınmasını ve süregelen antikor uyarımını uyarmak şeklinde gösterirler (Freund 1956). Partikül adjuvanlar protein subünit ve DNA aşılarında yaygın olarak kullanılır. Bu grupta; lipozomlar, polimerik mikrosferler, nano-bead adjuvanlar, immuno-stimülan kompleks adjuvanlar (Quil A lipid, kolesterol ± antijen) ve virüs benzeri partiküller bulunur (Panyam ve Labhassetwar 2003, Butts ve ark. 2005, Antonis ve ark. 2006, Saupe ve ark. 2006, Scheerlinck ve ark. 2006, Skene ve Sutton 2006).

İnaktif ticari bir aşının hazırlanması sırasında içerisinde BVD virüsünün olmadığı kesin olarak belirlenmesi için hücre kültüründe birkaç kez pasajlanmalıdır. Ayrıca aşının kullanımına izin verilmeden önce (inaktivasyondan önce) yasaklanan çeşitli ajanların yokluğunu garanti etmek zorunludur (Gay 2010).

Aşılama sonrası antikorların oluşum sürelerini belirten çalışmalar az sayıdadır. Kullanılan aşının cinsine göre araştırmacılar BVDV'ye karşı sığırların senede bir veya iki kez aşılmasını uygun görmüşlerdir. (Howard ve ark. 1989, Bolin ve Ridpath 1995).

BVDV inaktif virüs aşısı, eğer 4°C'de tutulursa en az 1 yıl boyunca kullanılabilir. Daha düşük sıcaklıklarda, attenuue aşıda adjuvantlar raf ömrünü azaltır. *In vitro* fertilizasyon prosedürlerinde ya da embriyo transferlerinde kontamine olmamış biyolojik materyaller, steril testler ve BVDV ile bulaşık olmayan serumlar kullanılmalıdır (Harasawa 1995). BVDV ile enfekte sığırların etkin bir tedavi yöntemi yoktur.

Bu tezde; BVDV aşısının, sığırlarda kan değerleri üzerine etkisi olup olmadığını ve Kırıkkale ilinde BVDV farklı altgruplarının tespiti amaçlandı.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Örneklenen Hayvanlar

Bu tezde kullanılan örnekler Kırıkkale ilinde süt sığırcılığı yapılan yedi farklı işletmede ki ineklerden rastgele örnekleme metodu ile elde edildi (Tablo 2.1). Yedi işletmedeki toplam 160 hayvandan alınan tam kan örnekleri EDTA'lı negatif basınçlı 9 ml'lik steril tüplere (Green Vac-tube[®], Kore) alınırken, serum elde edilmesi için kan 10 ml'lik antikoagluansız steril serum tüplerine (Vacutest[®], İtalya) alındı. Tüm tüplerin üzerine kan alınan hayvanları daha sonrada tespit edebilmek için gerekli kodlamalar yapıldı. Bu sayede olası karışıklıklar önlendi. Kan örnekleri laboratuara soğuk zincirde hızlı bir şekilde taşındı.

Tablo 2.1.: Kan numuneleri alınan hayvan sayıları ve işletme bilgileri.

İşletme	Yıl	İşletmedeki toplam hayvan sayısı	Kan örneği alınan hayvan sayısı	Örnekleme yaşı	Cinsiyet	Yetiştirme Tipi
1	2010	300	49	36-60 ay	Dişi	Yarı Açık
2	2010	350	23	6-12 ay	Dişi	Yarı Açık
3	2010	35	9	6-36 ay	Dişi	Kapalı
4	2010	15	8	6-36 ay	Dişi	Kapalı
5	2010	25	12	6-36 ay	Dişi	Kapalı
6	2010	125	39	6-60 ay	Dişi	Kapalı-Yarı Açık
7	2010	250	20	2-8 ay	Dişi	Kapalı-Yarı Açık

2.2. Aşılama

BVDV aşısının etkisini görmek için 2 no'lu işletmeden seçilen, yaşları 6-10 ay arasında değişen Holstein ırkı 23 buzağıya ait bazı özellikler Tablo 2.2.'de verilmiştir.

Tablo 2.2.: BVDV aşısının kan değerleri üzerine etkisini görmek için seçilen 23 adet buzağıya ait özellikler.

Buzağı	Cinsiyet	Doğum Tarihi	İrk	Yetiştirme Tipi	BVDV Aşılama Tarihi
1	Dişi	22.02.2009	Holstein	Yarı Açık	18.02.2010
2	Dişi	14.03.2009	Holstein	Yarı Açık	18.02.2010
3	Dişi	19.03.2009	Holstein	Yarı Açık	18.02.2010
4	Dişi	28.03.2009	Holstein	Yarı Açık	18.02.2010
5	Dişi	28.03.2009	Holstein	Yarı Açık	18.02.2010
6	Dişi	29.03.2009	Holstein	Yarı Açık	18.02.2010
7	Dişi	09.04.2009	Holstein	Yarı Açık	18.02.2010
8	Dişi	09.04.2009	Holstein	Yarı Açık	18.02.2010
9	Dişi	23.04.2009	Holstein	Yarı Açık	18.02.2010
10	Dişi	28.04.2009	Holstein	Yarı Açık	18.02.2010
11	Dişi	26.05.2009	Holstein	Yarı Açık	18.02.2010
12	Dişi	21.06.2009	Holstein	Yarı Açık	18.02.2010
13	Dişi	25.06.2009	Holstein	Yarı Açık	18.02.2010
14	Dişi	15.07.2009	Holstein	Yarı Açık	18.02.2010
15	Dişi	21.07.2009	Holstein	Yarı Açık	18.02.2010
16	Dişi	22.07.2009	Holstein	Yarı Açık	18.02.2010
17	Dişi	22.07.2009	Holstein	Yarı Açık	18.02.2010
18	Dişi	25.07.2009	Holstein	Yarı Açık	18.02.2010
19	Dişi	30.07.2009	Holstein	Yarı Açık	18.02.2010
20	Dişi	30.07.2009	Holstein	Yarı Açık	18.02.2010
21	Dişi	04.08.2009	Holstein	Yarı Açık	18.02.2010
22	Dişi	25.08.2009	Holstein	Yarı Açık	18.02.2010
23	Dişi	25.08.2009	Holstein	Yarı Açık	18.02.2010

Buzağılar, bir kez (Pregsure BVD, Pfizer[®], UK) deri altı aşı preparatı ile işletme veteriner hekimi tarafından 18 Şubat 2010 tarihinde aşılandı. Kullanılan BVDV aşısına ait bazı özellikler Tablo 2.3.'de gösterilmiştir.

Tablo 2.3.: Kullanılan BVDV aşısının (Pregsure BVD, Pfizer[®]) özellikleri.

Doz	Buzağı ve ineklere 2 ml
Aşılama yolu	Subkutan
Aşılama programı	3 hafta arayla 2 aşılama, her 12 ayda aşılama ile desteklenir.
Üretici uyarısı	Rastgele enjeksiyon tehlikelidir.
Saklama koşulları	+2°C ve +4°C'ler arasında saklanmalıdır. Dondurulmaz.
Bileşimi	1 dozu (2ml), titresi 5.6 log ₂ , sitopatik tip1 inaktive BVDV 5960 suşu içerir.
Adjuvanlar	Procision-A TM , Quil A, kolesterol, Amphigen baz ve likid parafin.

2.3. Kan Örneklerinin Toplanması

BVDV aşısının kan değerleri üzerine etkisini tespit için aşılanmadan önce kan örnekleri Şubat 2010 tarihinde alındı. Aynı buzağılardan aşılamadan 1 ve 3 hafta sonra tekrar kan örnekleri Şubat 2010 ve Mart 2010 tarihlerinde alındı.

Plazma elde edilemesi için; EDTA'lı negatif basınçlı 9 ml'lik steril tüplere alınmış kan örnekleri, 3000 rpm devirde 10 dakika santrifüj (Eppendorf[®], 5417R, Almanya) edildi. Santrifüj sonrası ayrılan plazma mikropipet (Eppendorf[®], Acura825) yardımıyla eppendorf tüplere alındı. Daha sonra PZR testleri yapılmaya kadar -20°C'de, derin dondurucuda saklandı.

Serum tüplerine alınan kan örnekleri 3000 rpm devirde 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası ayrılan serum mikropipet yardımıyla eppendorf tüplere alındı. ELISA aşamasına kadar -20°C'de, derin dondurucuda saklandı.

2.3.1. Tam Kan Sayımı

Kan örnekleri MS9-3 hemogram cihazında (Melet Schloesing Labarotoires[®], Fransa) analiz edildi. Hasta ismi olarak hayvanların küpe numaraları kaydedildi. Bu işlem 23 kan örneği için tek tek uygulandı. Bu analiz ile lökosit (WBC), monosit (Mon), lenfosit (Lym), nötrofil-granülosit (N/Gr), eritrosit (RBC), MCV, hematokrit (Hct), McHC, MCH, hemogloblin (Hgb), MPV, trombosit (PLT) değerleri ölçüldü (Gazyacı ve ark. 2010).

2.3.2. ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

2.3.2.1. Antijen ELISA

Alınan kan örnekleri BVDV NSP2-3 ve E0 antijen ELISA kiti (Institut Pourquier[®], Fransa) ile test edildi. Test üretici firmanın önerdiği prosedüre göre aşağıdaki gibi yapıp değerlendirildi. Pleytin her kuyucuğuna 50 µl örnek inkübasyon bufferi eklendi. Sulandırılmamış 50 µl negatif kontrol A1 kuyucuğuna, 50 µl pozitif kontrol B1 ve C1 kuyucuğuna ilave edildi. Diğer kuyucuklara da 50 µl serum örneklerinden kondu. Pleyt hafifçe sallanarak homojenize edilip alüminyum folyo ile sarılıp 90 dakika bekletildi. Karışım boşaltıldıktan sonra 1X olacak şekilde hazırlanan yıkama solüsyonu (20X) ile 3 kez yıkandı. Tüm kuyucuklara 100'er µl enzimle işaretlenmiş konjugat kuyucuklara eklendi ve karanlıkta 30 dakika oda ısısında bekletildi. Ardından; pleyt içeriği dökülüp 3 kez yıkandı. Son aşamada ise 100'er µl revelation solüsyonu (enzim-substrat) tüm kuyucuklara eklendi. Pleyt ışısız bir ortamda 20 dk bekletildi. 100'er µl stop solüsyonu (H₂SO₄ 0.5M) her kuyucuğa eklenerek reaksiyon durduruldu. Değerlendirme için ELISA reader'a (Seac[®], Sirio S, İtalya) pleyt yerleştirildi ve 450 nm (OD-450) de okutuldu.

2.3.2.2. Antikor ELISA

Örnekler BVDV'ye karşı spesifik antikorlar BVDV p80 protein antikor ELISA (Institut Pourquier[®], Fransa) kiti ile test edildi. Test, üretici firmanın önerdiği prosedüre göre aşağıdaki gibi yapıp değerlendirildi. İlk üç kuyucuğa, sulandırılmış dilue 50'şer µl Buffer 9 eklendi. A1 kuyucuğuna konsantre halde 50µl pozitif kontrol konuldu. Sonra da B1 ve C1 kuyucuğuna ise 50'şer µl negatif kontrol eklendi. Her kuyucuğa (69) 75'şer µl Buffer 9 kondu. Serum örneklerinden bu 69 kuyucuğa 25'şer µl eklendi. Kuyucuklardaki içerik, pleyt hafifçe sallanarak homojenize edildikten sonra pleyt alüminyum folyaya sarılarak 1 gece +5°C'de inkübasyona bırakıldı. Yıkama basamağında ise; konsantre yıkama solüsyonu (20X), 1X olacak şekilde sulandırıldı, pleytin içeriği hafifçe vurularak boşaltıldı, 200 µl konsantre yıkama solüsyonu ile yıkandı. Bu işlem 3 kez tekrarlandı ve tüm kuyucuklara 100'er µl sulandırılmış enzimle işaretli konjugat kuyucuklara eklenip pleyt alüminyum folyoya sarılıp 30 dakika oda ısısında bekletildi. Yıkama tekrarlandı. Son safhada ise 100'er µl revelation solüsyonu (enzim substrat) tüm kuyucuklara eklendi. Pleyt ışısız bir ortamda 20 dakika oda ısısında bekletildi. Reaksiyonu durdurmak için her kuyucuğa 100'er µl stop solüsyonu (H₂SO₄ 0.5M) eklendi. Değerlendirme için ELISA reader'a (Seac[®], Sirio S, İtalya) pleyt yerleştirildi ve 450 nm (OD-450) de okutuldu.

2.3.3. RNA izolasyonu

160 hayvandan alınan kanlardan elde edilen plazma örneklerinin daha kolay incelenebilmesi için farklı işletmelerin numuneleri karıştırılıp 2'li havuz yapıldı. Toplam 80 havuz oluşturuldu. Plazma örneklerinden QIAamp®Viral RNA Kit (QIAGEN[®], Almanya) ile RNA izolasyonu yapıldı. Oluşabilecek kontaminasyon riskine karşı tüm işlemler Laminair flow kabinde (Nüve, MN120) gerçekleştirildi

RNA izolasyonu üretici firmanın prosedürüne uygun olarak aşağıdaki gibi yapılmıştır. Bu işleme 560 µl Buffer AVL 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüplere konularak başlandı. Sonrasında 140 µl plazma tüplere ilave edilip 15 saniye vortekslendi (Boeco[®], V1, Almanya) ve 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Kısa santrifüj ile kapaktaki damlalar uzaklaştırıldı. Üzerlerine 560 µl etanol (% 96-100, Merck) konuldu, vorteks tekrarlandı ve kısa santrifüj yapıldı. Oluşan karışımdan 630 µl QIAamp mini spin columna ilave edildi. 8000 rpm hızda 1 dakika santrifüj edilen QIAamp spin column'u temiz 2 ml toplama tüplerine yerleştirildi ve içinde filtrat bulunan toplama tüpleri atıldı. Bu basamak tekrarlandı ve mevcut karışımın tamamı membrandan geçirilmiş oldu. Daha sonra QIAamp mini spin column'a 500µl Buffer AW1 eklenip 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilidi ve filtrat atıldı. QIAamp mini spin columun kapağı dikkatlice açılıp 500 µl Buffer AW2 eklenip 14000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi. QIAamp mini spin column'a 60 µl Buffer AVE konuldu. Kapak kapatıldıktan sonra oda sıcaklığında 1 dakika bekletildi ve 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Elde edilen örnekler, RT-PZR işleminde kullanılmak üzere -20 °C de saklandı.

2.3.4. Tersine Transkripsiyon (TT) ve nested Polimeraz Zincir Reaksiyonu (n-PZR)

Tersine transkripsiyon için plazmadan elde edilen viral RNA kalıp olarak kullanıldı. Mikrosantrifüj tüpünün içerisine 10 µl RNA ve 5 µl random primer ilave edilip 55°C de 10 dakika bekletildi. Oda ısısına alınan RNA primer karışımı üzerine 5 µl RT buffer (Promega, Co, Madison, WI, A.B.D.), 2.5 µl 2mM dNTP (Promega, Co, Madison, WI, A.B.D.), 1 µl RNasin (Promega, Co, Madison, WI, A.B.D.), 1 µl MLV-RT (Promega, Co, Madison, WI, A.B.D.), 1 µl steril dH₂O eklenip karışım 37°C de 1 saat tutuldu. Bu işlem sonunda elde edilen kopya DNA (cDNA)'lar PZR'de kalıp olarak kullanıldı. Her bir örnekte 2 µl cDNA, 2 µl 10 pmol 324A ve 324B primer, 4 µl 1.25 mM dNTP (Promega, Co, Madison, WI, A.B.D.), 5 µl 25mM

MgCl₂ (Promega, Co, Madison, WI, A.B.D.), 5 µl 10x PZR buffer (Promega, Co, Madison, WI, A.B.D.), 1 µl 2 U Taq DNA polimeraz (Promega, Co, Madison, WI, A.B.D.) ve 31 µl dH₂O'nun kullanıldığı 50 µl'lik PZR karışımı hazırlandı. 95°C de 2 dakika ön ısıtmayı takiben 95°C de 30 saniye, 55°C de 30 saniye, 72°C de 30 saniye, 32 döngü ve 72°C de 6 dakika son uzatmayla sonlandırılan PZR programı Thermal cyclerde (Boeco, Almanya) uygulandı. Nested PZR için PZR'de elde edilen DNA ürünleri spesifik iç primerler kullanılarak çoğaltıldı (Tablo 2.4.). Her bir örnek için 6 µl PZR ürünü DNA, 2 µl 10 pmol B5 ve B6 primer, 4 µl 1.25 mM dNTP (Promega, Co, Madison, WI, A.B.D.), 5 µl 25mM MgCl₂ (Promega, Co, Madison, WI, A.B.D.), 5 µl 10x PZR buffer (Promega, Co, Madison, WI, A.B.D.), 1 µl 2 U Taq DNA polimeraz (Promega, Co, Madison, WI, A.B.D.) ve 27 µl dH₂O kullanıldığı 50 µl'lik PZR karışımı hazırlandı. 94°C de 2 dakika ön ısıtmayı takiben 94°C de 45 saniye, 56°C de 45 saniye, 72°C de 45 saniye de 32 döngü ve 72°C de 5 dakika son uzatmayla sonlandırılan PZR programı uygulandı (Renshaw ve ark. 2000). Buna ilaveten BVDV'nin diğer suşunun varlığını tespit etmek için BVDV-1a spesifik 1AF (Texas, A.B.D.), BVDV-1b spesifik 1BF (Texas, A.B.D.) ve her ikisi için 1ABR primerleri (Texas, A.B.D.) de yukarıda dizayn edilen prosedür dahilinde kullanılmıştır.

Tablo 2.4.: BVDV'nin çoğaltılması için kullanılan primerlerin sekans dizilimleri (Willoughby ve ark. 2006).

Primer	Hedef	Sekans (5'-3')	Büyüklik (BP)	Referans
324	Pan-Pestivirus	ATGCCCWTAGTAGGACTAGCA	288	Vilcek ve ark. (1994)
326	Pan-Pestivirus	TCA ACT CCA TGT GCC ATG TAC	288	
1AF	BVDV-1a	TCG ACG CCT TRR CAT GAA GGT	169	Ridpath ve Bolin (1998)
1BF	BVDV-1b	TCG ACG CTT TGG AGG ACA AGC	169	
1ABR	BVDV- 1a ve b	CCA TGT GCC ATG TAC AG	169	
B5	BVDV-2	ACT AGC GGT AGC AGT GAG	91	Letellier ve ark. (1999)
B6	BVDV-2	CTA GCG GAA TAG CAG GTC	91	

2.3.5. PZR oğalma Ürünlerinin Jel Elektroforezi

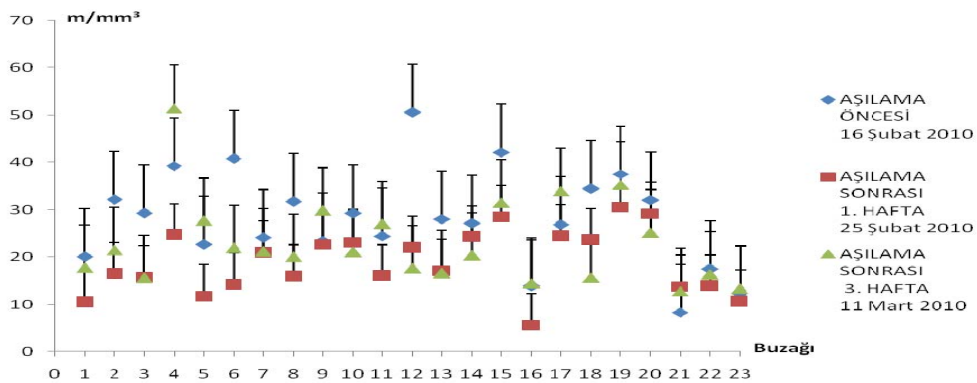
Tris base'dan (Sigma) 121 g alınıp 28.55 ml asetik asit (Merck) eklendi. 0.5M pH'ı 8.0 olan EDTA'dan (kullanmadan önce kuvvetlice çalkalandı) 50 ml ilave edildi. Sonrasın da 400 ml distile H₂O eklenip 50X TAE hazırlandı. Agaroz jel hazırlanması sırasında 1X olacak şekilde seyreltilti. PZR ürününü görüntülemek için % 1.5'lik agaroz jel hazırlandı. Bu amaçla 50 ml tris asetat/EDTA elektroforez tamponu (TAE 0.04 M Tris Asetat, 0.0001 M EDTA) içerisinde 0.75 gram (g) agaroz dNTP (Promega, Co, Madison, WI, A.B.D.) kaynatıldı. Agarozun ısısı yaklaşık 50°C ye düştükten sonra eriyiğe 0.5 µg/ml oranında ettidium bromide ilave edilerek donduruldu. Örnekler 6X yükleme tamponu (% 0.35 bromfenol mavisi ve % 30 gliserol) ile jele yüklendi. Elektorforez işleminin, Cleaver elektroforez cihazı (Warwickshire, İngiltere) ile 100 volt (V) akımda 60 dakika yapıldı. Agaroz jel; ultraviyole (UV) ışık kaynağı (Illuminix, A.B.D) ile bakılarak PZR ürünü belirlendi (Azkur ve ark. 2003).

3. BULGULAR

3.1. Bir İşletmede BVDV Aşısının Kan Değerleri Üzerine Etkisinin Araştırılması

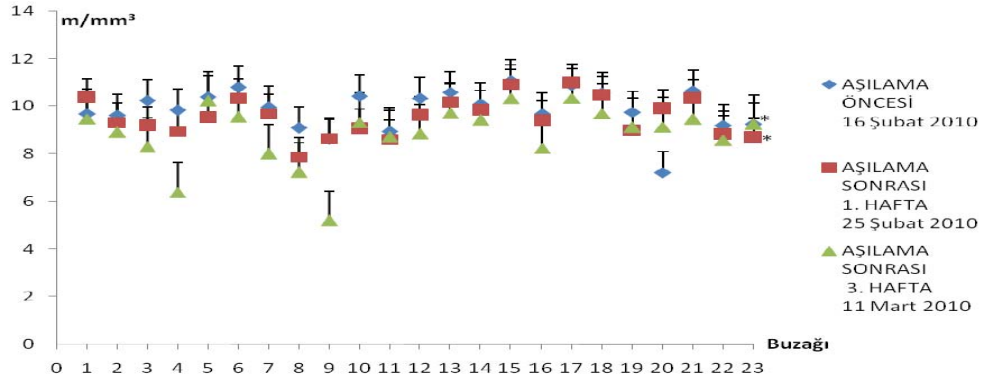
BVDV aşısının kan değerleri üzerine etkisinin araştırılması amacı ile süt sığırcılığı yapılan bir işletme seçildi. Bu işletmede yaşları 6–10 ay arasında değişen 23 buzağı üzerinde yapılan analizler sonucu aşağıdaki bulgular elde edildi.

WBC'nin sığırlardaki normal değeri 4-15 m/mm³ tür (Feldman ve ark. 2000). Aşılama öncesi 23 buzağıdan 3 tanesinde WBC değeri 4-15 m/mm³ aralığında, 20 buzağıda ise 15 m/mm³ üzerinde tespit edildi. Aşılama öncesi 23 buzağıya ait ortalama WBC değeri 28.14 ±10.16, aşılamadan 1 hafta sonra 18.90 ±6.65 ve 3 hafta sonra 22.96 ±9.04 olarak bulundu (Şekil 3.1.). Aşılamadan 1 hafta sonra 23 buzağıdan 7 tanesinde WBC değeri 4-15 m/mm³ arasında belirlenir iken, 16 tanesinde 15 m/mm³'ün üzerinde tespit edildi. Aşılamadan 3 hafta sonrasında 3 tane buzağıda 4-15 m/mm³ ortalama değeri tespit edilir iken geriye kalan 20 buzağıda 4-15 m/mm³ üzerinde değer belirlendi (Şekil 3.1.).



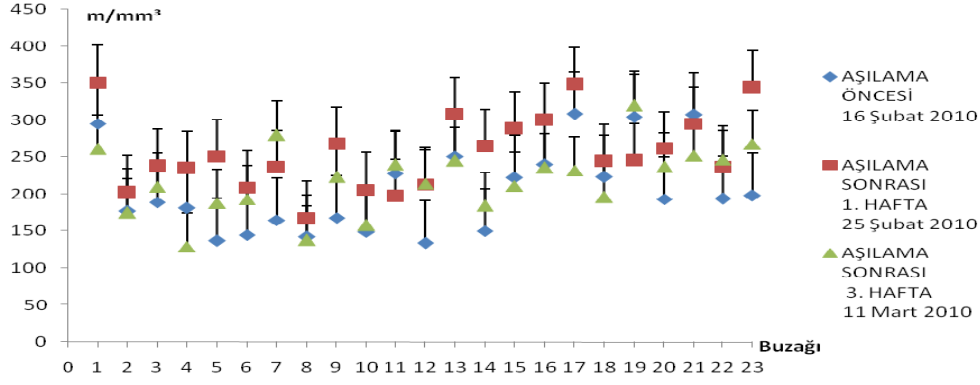
Şekil 3.1.: Lökosit değerinin 23 buzağıdaki aşı öncesi (0. gün), aşılamadan 1 ve 3 hafta sonraki durumu. *:Değerler arasında anlamlı bulunan farklılıklar (p<0.05). X eksen, çalışmada kullanılan her bir buzağıyı temsil etmektedir (n=23). Y eksen, WBC parametresinin 1 mm³ kandaki değerini ifade etmektedir.

RBC'nin sığırlardaki normal değeri 6-11 m/mm³ tür (Feldman ve ark. 2000). Aşılama öncesi 23 buzağının 22'sinde RBC değeri, 6-11 m/mm³ aralığında ölçüldü. Aşılama öncesi 23 buzağıya ait ortalama RBC değeri 9.86 ±0.87, aşılamadan 1 hafta sonra 9.55 ±0.80 ve 3 hafta sonra 8.84 ±1.23 olarak tespit edildi (Şekil 3.2.). Aşılamadan 1 ve 3 hafta sonra 23 buzağının hepsinde RBC değeri 6-11 m/mm³ ortalama değerleri bulundu (Şekil 3.2.).



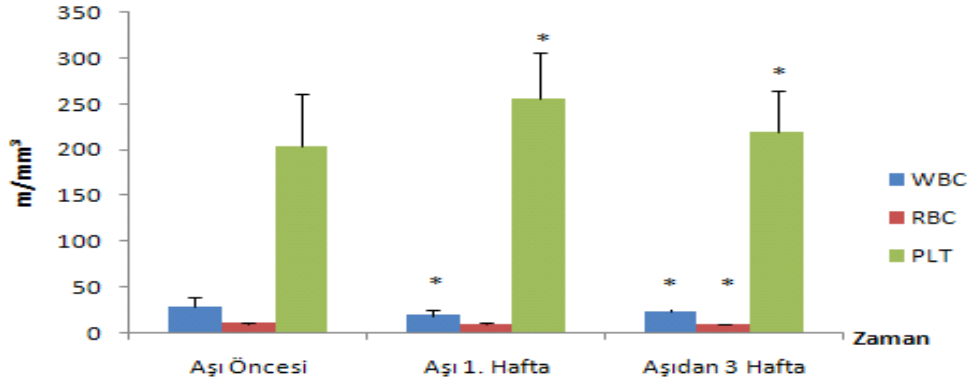
Şekil 3.2.: Eritrosit değerinin 23 buzağıdaki aşı öncesi(0. gün), aşılamadan 1 ve 3 hafta sonraki durumu. *:Değerler arasında anlamlı bulunan farklılıklar (p<0.05). X eksen, çalışmada kullanılan her bir buzağıyı temsil etmektedir (n=23). Y eksen, RBC parametresinin 1 mm³ kandaki değerini ifade etmektedir.

Plt'nin sığırlardaki normal değeri 100-800 m/mm³ tür (Feldman ve ark. 2000). Aşılama öncesi 23 buzağının hepsinde Plt değeri, fizyolojik sınırlar içerisinde ölçüldü. Aşılama öncesi tüm hayvanlara ait ortalama Plt değeri 204.34 ±57.08, aşılamadan 1 hafta 256.73 ±50.03 ve 3 hafta sonra 219 ±45.60 olarak belirlendi (Şekil 3.3.). Aşılamadan 1 ve 3 hafta sonra da buzağılarda Plt değeri fizyolojik sınırlar içerisinde olduğu gözlemlendi (Şekil 3.3.).



Şekil 3.3.: Trombosit değerinin 23 buzağıdaki aşı öncesi(0. gün), aşılamadan 1 ve 3 hafta sonraki durumu. *:Değerler arasında anlamlı bulunan farklılıklar ($p<0.05$). X eksenini, tezde kullanılan her bir buzağıyı temsil etmektedir ($n=23$). Y eksenini, PLT parametresinin 1 mm^3 kandaki değerini ifade etmektedir.

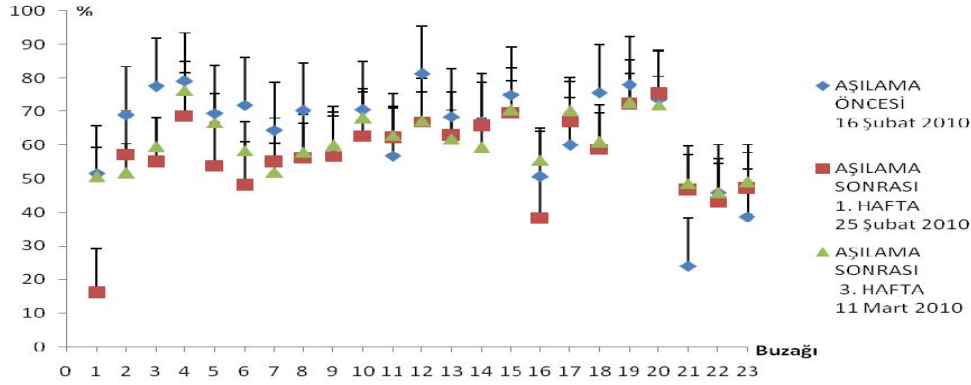
Yirmiiç buzağıya ait WBC, RBC ve PLT değerlerinin zamana göre değişimi Şekil 3.4.'de gösterilmiştir.



Şekil 3.4.: Lökosit (WBC), eritrosit (RBC) ve trombosit (PLT) değerlerinin 23 buzağıdaki aşı öncesi (0. gün), aşılamadan 1 ve 3 hafta sonraki durumları. *:Değerler arasında anlamlı bulunan farklılıklar($p<0.05$). X eksenini, aşılama öncesi ve sonrası periyotları ifade etmektedir. Y eksenini, bu değerlerin 1 mm^3 kandaki değerini ifade etmektedir.

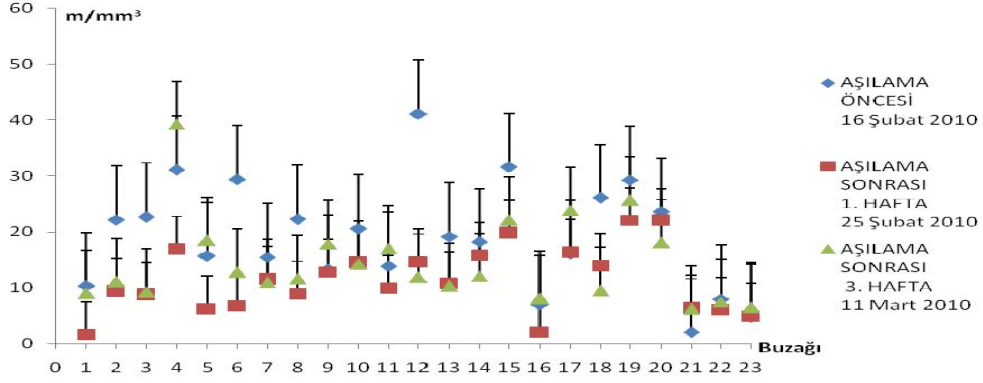
Sığırlarda kandaki normal lenfosit değeri % 45-80'dir (Feldman ve ark. 2000). Aşılama öncesi 23 buzağıdan 2'sinde lenfosit değeri % 45'in altında, bir tanesinde % 80'nin üzerinde, geriye kalan hayvanlarda % 45-80 arasında ölçüldü. Aşılama öncesi 23 buzağıya ait ortalama lenfosit değeri $\% 64.23 \pm 14.27$, aşılamadan 1 hafta sonra $\% 56.78 \pm 13.06$ ve 3 hafta sonra $\% 60.83 \pm 45.60$ olarak tespit edildi (Şekil 3.5.). Aşılamadan 1 hafta sonra 3 buzağıda lenfosit değeri % 45'in altında, 20 tanesinde ise

% 45-80 arasında ölçüldü. Aşılamadan 3 hafta sonrasında tüm buzağılarda lenfosit değeri % 45-80 ortalama değerleri arasındaydı (Şekil 3.5.).



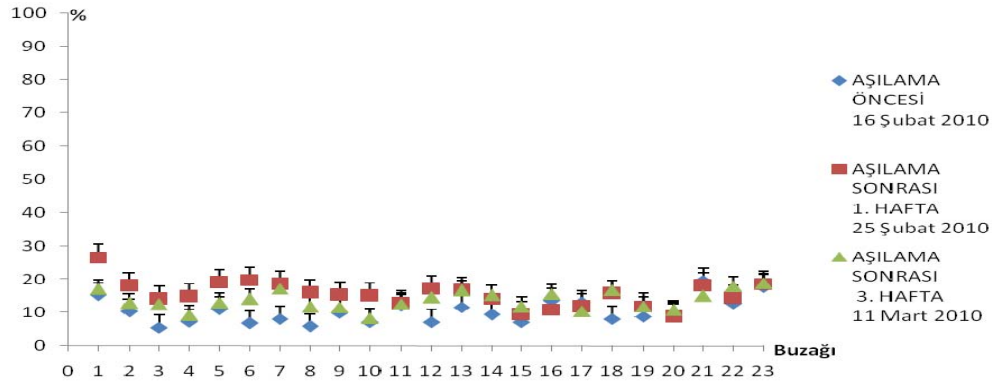
Şekil 3.5.: Lenfosit değerinin 23 buzağıdaki aşı öncesi (0. gün), aşılamadan 1 ve 3 hafta sonraki % durumu. *:Değerler arasında anlamlı bulunan farklılıklar ($p < 0.05$). X eksen, bu tezde kullanılan her bir buzağıyı temsil etmektedir ($n=23$). Y eksen, lenfosit parametresinin 1 mm^3 kanda % değerini ifade etmektedir.

Lenfosit sayısının sığırlardaki normal değeri $1.8-12 \text{ m/mm}^3$ tür (Feldman ve ark. 2000). Aşılama öncesi 23 buzağıdan 5 tanesinde lenfosit sayısı $1.8-12 \text{ m/mm}^3$ aralığında, 18 tanesinde ise 12 m/mm^3 'ün üzerinde tespit edildi. Aşılama öncesi 23 buzağıya ait ortalama lenfosit sayısı 19.30 ± 9.61 , aşılamadan 1 hafta sonra 11.41 ± 5.81 ve 3 hafta sonra 14.51 ± 7.70 olarak bulundu (Şekil 3.6.). Aşılamadan 1 hafta sonra ise bu 23 buzağının birinde 1.8 m/mm^3 'ün altında belirlenir iken, 12 tanesinde $1.8-12 \text{ m/mm}^3$ arasında ve 10 tanesinde ise 12 m/mm^3 'ün üzerinde tespit edildi. Aşılamadan 3 hafta sonrasında 12 buzağıda $1.8-12 \text{ m/mm}^3$ ortalama değeri tespit edilir iken, geriye kalan 11 buzağıda 12 m/mm^3 'ün üzerinde değer belirlendi (Şekil 3.6.).



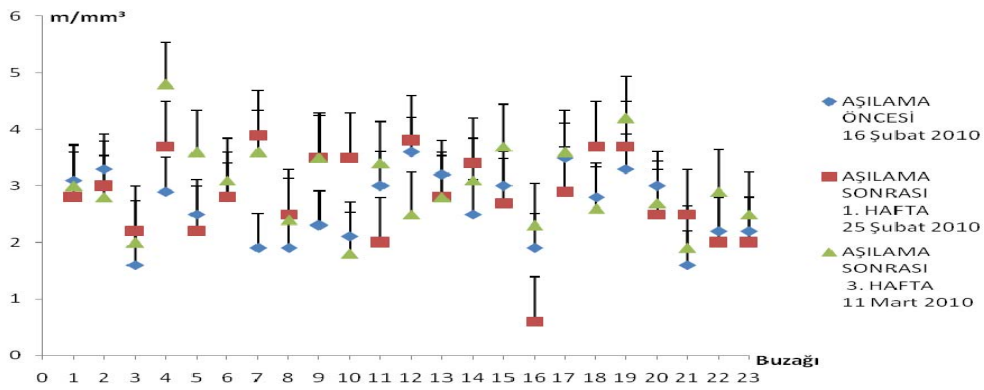
Şekil 3.6.: Lenfosit değeri sayısının 23 buzağıdaki aşı öncesi (0. gün), aşılamadan 1 ve 3 hafta sonraki durumu. *:Değerler arasında anlamlı bulunan farklılıklar($p<0.05$). X eksen, tezde kullanılan her bir buzağıyı temsil etmektedir (n=23). Y eksen, lenfosit sayısı parametresinin 1 mm^3 kandaki değerini ifade etmektedir.

Sığırlarda kandaki normal monosit değeri % 1-5'dir (Feldman ve ark. 2000). Aşılama öncesi 23 buzağının tümünde monosit değeri % 5'in üstünde ölçüldü. Aşılama yapılmadan 23 buzağıya ait ortalama monosit değeri % 10.35 ± 3.69 'dür. Aşılamadan 1 hafta sonra % 15.51 ± 3.90 ve 3 hafta sonra % 13.74 ± 2.86 olarak tespit edildi (Şekil 3.7.). Aşılamadan 1 ve 3 hafta sonra tüm hayvanlarda monosit değeri % 5'in üstünde ölçüldü (Şekil 3.7.).



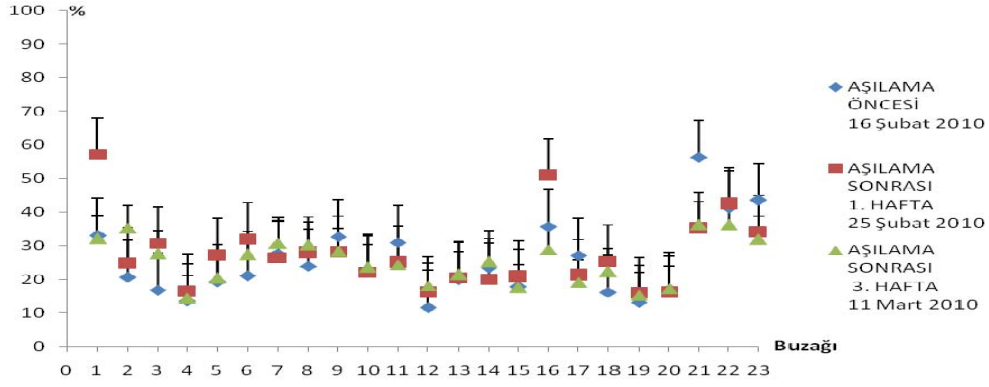
Şekil 3.7.: Monosit değerinin 23 buzağıdaki aşı öncesi (0. gün), aşılamadan 1 ve 3 hafta sonraki % durumu. *:Değerler arasında anlamlı bulunan farklılıklar ($p<0.05$). X eksen, tezde kullanılan her bir buzağıyı temsil etmektedir (n=23). Y eksen, monosit parametresinin 1 mm^3 kandaki % değerini ifade etmektedir.

Monosit sayısının sığırlardaki normal değeri $0-0.7 \text{ m/mm}^3$ tür (Feldman ve ark. 2000). Aşılama öncesi tüm buzağılarda monosit sayısı değeri 0.7 m/mm^3 'ün üzerinde tespit edildi. Aşılama öncesi 23 buzağıya ait ortalama monosit sayısı 2.61 ± 0.61 , aşılama öncesi 1 hafta sonra 2.81 ± 0.79 ve 3 hafta sonra 2.99 ± 0.73 olarak bulundu (Şekil 3.8.). Aşılama öncesi 1 hafta sonra ise sadece 1 buzağıda monosit sayısı $0-0.7 \text{ m/mm}^3$ arasında belirlenir iken, 22 tanesinin monosit sayısı 0.7 m/mm^3 'ün üzerinde tespit edildi. Aşılama öncesi 3 hafta sonrasında buzağuların tamamında monosit sayısı 0.7 m/mm^3 'ün üzerinde belirlendi (Şekil 3.8.).



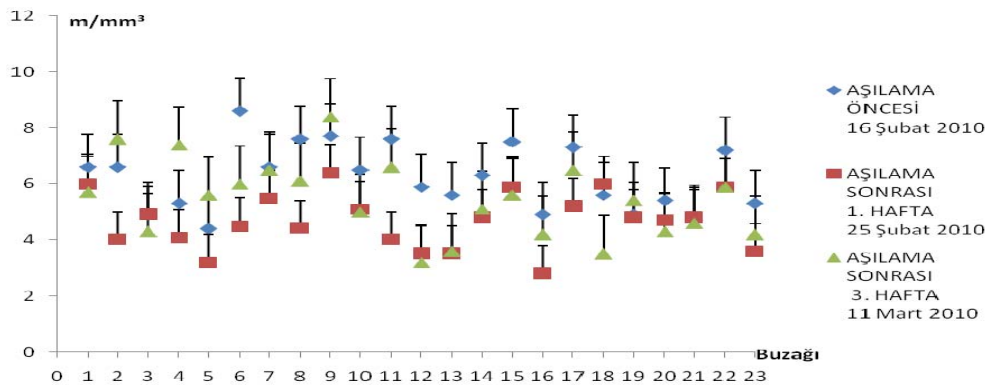
Şekil 3.8.: Monosit sayısının 23 buzağıdaki aşılama öncesi (0. gün), aşılama öncesi 1 ve 3 hafta sonraki durumu. *:Değerler arasında anlamlı bulunan farklılıklar ($p < 0.05$). X eksenini, tezde kullanılan her bir buzağıyı temsil etmektedir ($n=23$). Y eksenini, monosit sayısı parametresinin 1 mm^3 kandaki değerini ifade etmektedir.

Sığırlarda kandaki normal nötrofil/granülosit değeri % 10-30'dur (Feldman ve ark. 2000). Aşılama öncesi 23 buzağının 16'sında nötrofil/granülosit değeri % 10-30 belirlendi. Nötrofil/granülosit değeri 7 buzağıda ise % 30'un üstünde ölçüldü. Aşılama öncesi 23 buzağıya ait ortalama nötrofil/granülosit değeri % 25.41 ± 11.03 , aşılama öncesi 1 hafta sonra % 27.69 ± 10.75 ve 3 hafta sonra % 25.4 ± 6.75 olarak tespit edildi (Şekil 3.9.). Aşılama öncesi 1 ve 3 hafta sonrasında 16 hayvanda nötrofil/granülosit değeri % 10-30 aralığında, 7 tane hayvanda ise % 30'un üzerinde belirlendi (Şekil 3.9.).



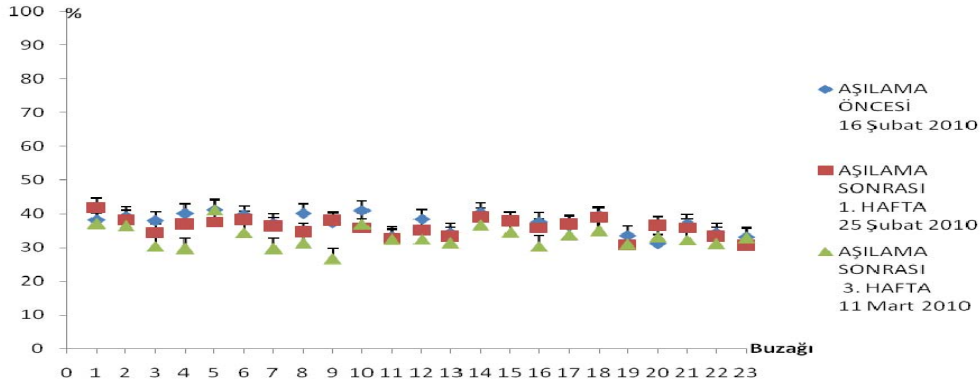
Şekil 3.9.: Nötrofil/Granülosit değerinin 23 buzağıdaki aşı öncesi (0. gün), aşılamadan 1 ve 3 hafta sonraki % durumu. *:Değerler arasında anlamlı bulunan farklılıklar ($p<0.05$). X eksen, tezde kullanılan her bir buzağıyı temsil etmektedir ($n=23$). Y eksen, nötrofil/granülosit parametresinin 1 mm^3 kandaki % değerini ifade etmektedir.

Nötrofil/granülosit sayısının sığırlardaki normal değeri $0.4-4.5 \text{ m/mm}^3$ olarak daha önemli çalışmalarda rapor edilmiştir (Feldman ve ark. 2000). Aşılama öncesi 23 buzağıdan 1 tanesinde nötrofil/granülosit sayısı $0,4-4,5 \text{ m/mm}^3$ aralığında, 22 tane buzağıda ise 4.5 m/mm^3 üzerinde tespit edildi. Aşılama öncesi 23 buzağıya ait ortalama nötrofil/granülosit sayısı 6.21 ± 1.16 , aşılamadan 1 hafta sonra 4.67 ± 0.99 ve 3 hafta sonra 5.44 ± 1.36 olarak bulundu (Şekil 3.10.). Aşılamadan 1 hafta sonra 23 buzağıdan 10 tanesinde nötrofil/granülosit sayısı $0.4-4.5 \text{ m/mm}^3$ arasında belirlenir iken, 13 tanesinde 4.5 m/mm^3 'ün üzerinde tespit edildi. Aşılamadan 3 hafta sonrasında 7 tane buzağıda $0.4-4.5 \text{ m/mm}^3$ ortalama değeri tespit edilir iken geriye kalan 16 buzağıda 4.5 m/mm^3 üzerinde değer belirlendi (Şekil 3.10.).



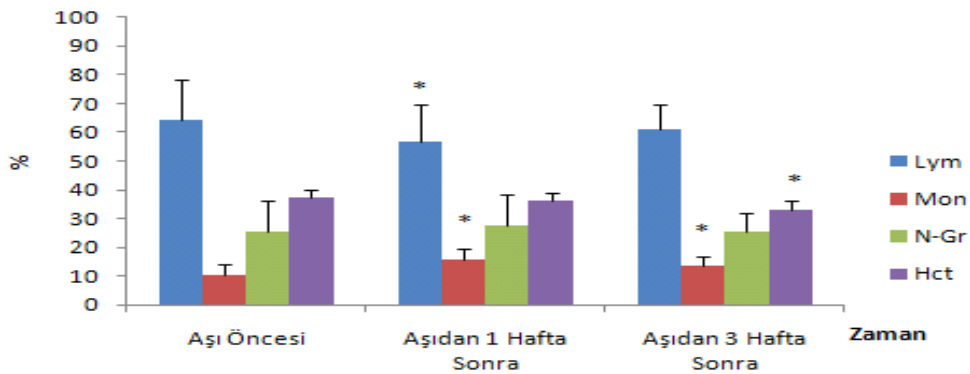
Şekil 3.10.: Nötrofil/granülosit değeri sayısının 23 buzağıdaki aşı öncesi (0. gün), aşılamadan 1 ve 3 hafta sonraki durumu. *:Değerler arasında anlamlı bulunan farklılıklar ($p<0.05$). X eksen, tezde kullanılan her bir buzağıyı temsil etmektedir ($n=23$). Y eksen, nötrofil/granülosit sayısının 1 mm^3 kandaki değerini ifade etmektedir.

Hematokrit normal değeri sığırlarda % 25-50'dir (Feldman ve ark. 2000). Aşılama öncesi, ve sonrasında hayvanların tamamında Hct değeri % 25-50 aralığında ölçüldü (Şekil 3.11.). Aşılama öncesi 23 buzağıya ait ortalama Hct % 37.34 ± 2.82 , aşılamadan 1 hafta sonra % 36.03 ± 2.71 ve 3 hafta sonra % 33.09 ± 3.19 değerinde tespit edildi (Şekil 3.11.).



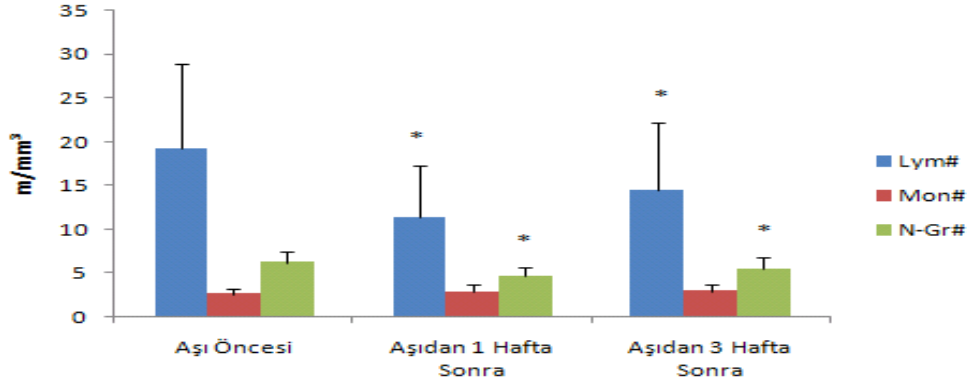
Şekil 3.11.: Hematokrit değerinin 23 buzağıdaki aşı öncesi (0. gün), aşılamadan 1 ve 3 hafta sonraki % durumu. *:Değerler arasında anlamlı bulunan farklılıklar ($p < 0.05$). X eksenini, tezde kullanılan her bir buzağıyı temsil etmektedir ($n=23$). Y eksenini, hematokrit değerinin 1 mm^3 kandaki % değerini ifade etmektedir.

23 buzağıya ait Lym, Mon, N/Gr ve Hct değerlerinin zamana göre değişimi Şekil 3.12.'da gösterilmiştir.



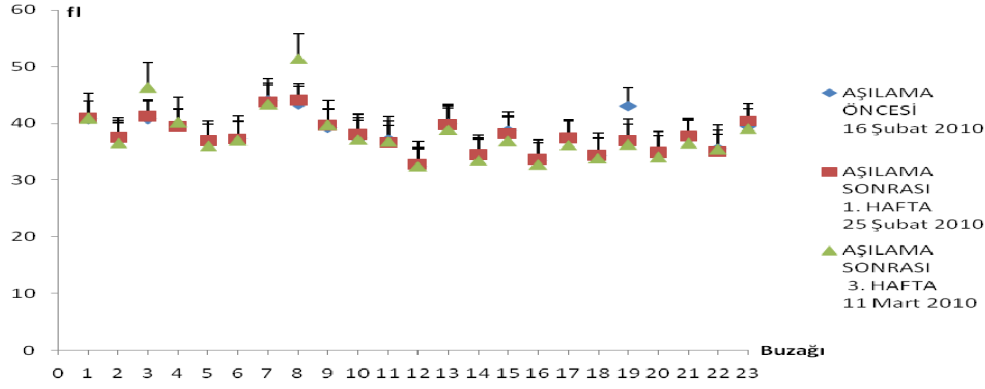
Şekil 3.12.: Lenfosit, monosit, nötrofil/granülosit ve hematokrit değerlerinin 23 buzağıdaki aşı öncesi (0. gün), aşılamadan 1 ve 3 hafta sonraki % durumları. *:Değerler arasında anlamlı bulunan farklılıklar ($p < 0.05$). X eksenini, aşılamadan önce ve sonrası periyotları ifade etmektedir. Y eksenini, bu parametrelerin 1 mm^3 kandaki % değerini ifade etmektedir.

23 buzağıya ait lenfosit, monosit ve nötrofil/granülosit sayılarının zamana göre değişimi Şekil 3.13.'de gösterilmiştir.



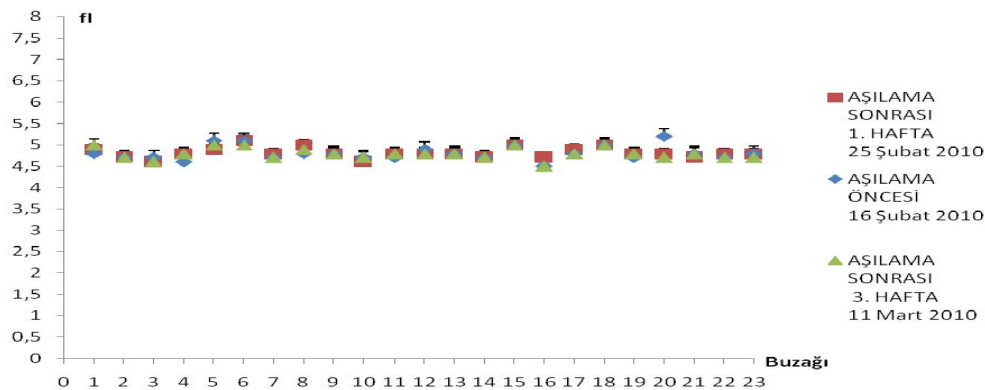
Şekil 3.13.: Lenfosit, monosit ve nötrofil/granülosit değerleri sayılarının 23 buzağıdaki aşı öncesi (0. gün), aşılama öncesi ve sonrası periyotları ifade etmektedir. Y eksenini, bu parametrelerin, 1 mm³ kandaki değerini ifade etmektedir. *:Değerler arasında anlamlı bulunan farklılıklar (p<0.05). X eksenini, aşılama öncesi ve sonrası periyotları ifade etmektedir.

MCV'nin (Mean corpuscular volume= Eritrositlerin ortalama büyüklüğü) sığırlardaki normal değeri 40-60 femtolitredir (fl) (Feldman ve ark. 2000). Aşılama öncesi 23 buzağıdan 17 tanesinde MCV değeri 40 fl'nin altında, 6 tanesinde ise 40-60 fl aralığında tespit edildi. Aşılama öncesi 23 buzağıya ait ortalama MCV değeri 38 ±3.16, aşılama öncesi 1 hafta sonra 37.86 ±3.01 ve 3 hafta sonra 37.88 ±4.43 olarak bulundu (Şekil 3.14.). Aşılama öncesi 1 hafta sonra ise 23 buzağıdan 18 tanesinde MCV değeri 40 fl'nin altında belirlenir iken, 5 tanesinde ise 40-60 fl aralığında tespit edildi. Aşılama öncesi 3 hafta sonrasında 5 buzağıda MCV değeri 40-60 fl ortalama değeri tespit edilir iken geriye kalan 18 buzağıda 40 fl'nin altında değer belirlendi (Şekil 3.14.).



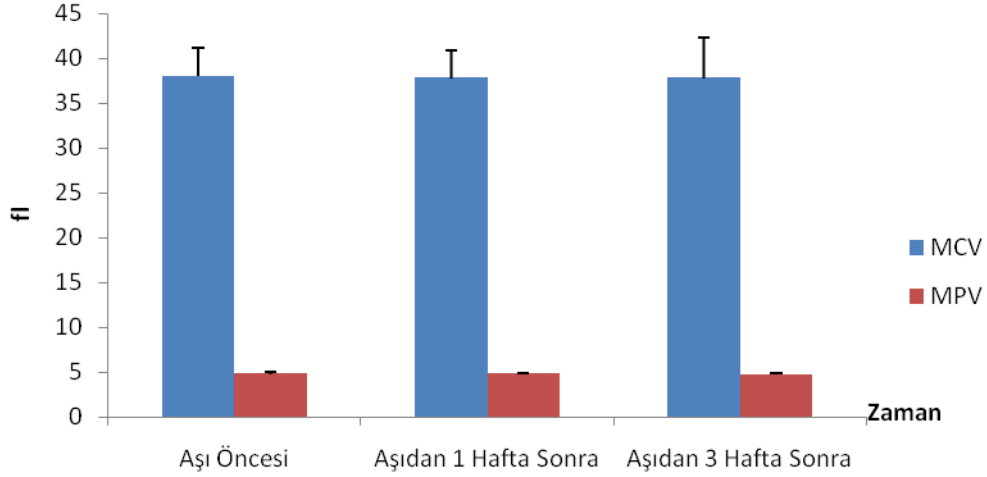
Şekil 3.14.: Eritrositlerin ortalama büyüklük değerinin, 23 buzağıdaki aşı öncesi (0. gün), aşılamadan 1 ve 3 hafta sonraki durumu. *:Değerler arasında anlamlı bulunan farklılıklar ($p<0.05$). X eksen, tezde kullanılan her bir buzağıyı temsil etmektedir ($n=23$). Y eksen, MCV parametresinin kanda femtolitre (fl) cinsinden değerini ifade etmektedir.

MPV'nin (Trombosit hacmi) sığırlardaki normal değeri 3-8 fl'dir (Feldman ve ark. 2000). Aşılama öncesi 23 buzağının tamamında MPV değeri 3-8 fl ortalama değeri tespit edildi. Aşılama öncesi 23 buzağıya ait ortalama MPV değeri 4.8 ± 0.17 , aşılamadan 1 hafta sonra 4.81 ± 0.12 ve 3 hafta sonra 4.79 ± 0.13 olarak bulundu (Şekil 3.15.). Aşılamadan 1 ve 3 hafta sonrasında tüm buzağılarda 3-8 fl ortalama değeri tespit edildi (Şekil 3.15.).



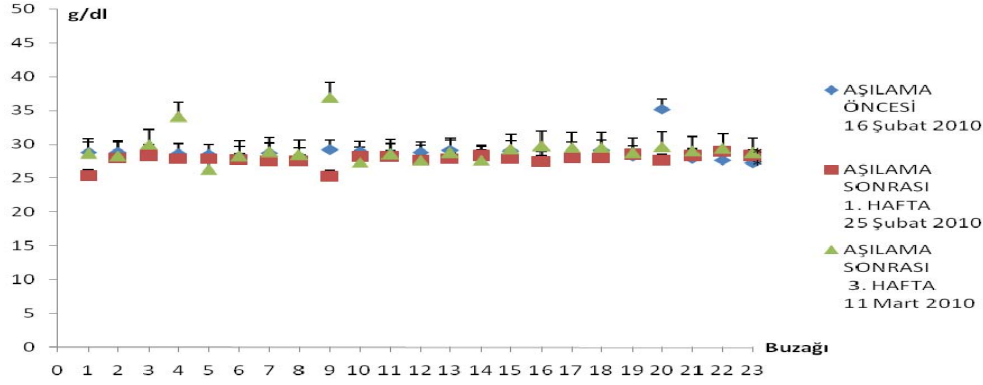
Şekil 3.15.: Trombositlerin hacim değerinin 23 buzağıdaki aşı öncesi (0. gün), aşılamadan 1 ve 3 hafta sonraki durumu. *:Değerler arasında anlamlı bulunan farklılıklar ($p<0.05$). X eksen, tezde kullanılan her bir buzağıyı temsil etmektedir ($n=23$). Y eksen, MPV parametresinin kanda fl cinsinden değerini ifade etmektedir.

23 buzağıya ait MCV ve MPV değerlerinin zamana göre değişimi Şekil 3.16.'da gösterilmiştir.



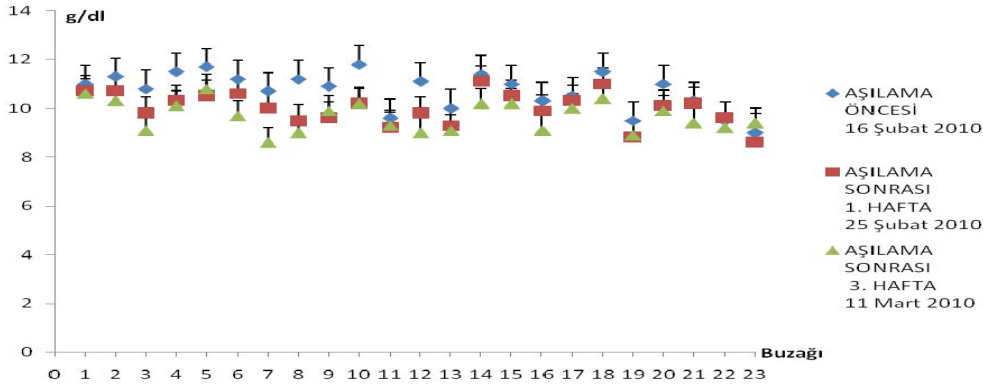
Şekil 3.16.: Eritrositlerin ortalama büyüklük (MCV) ve trombositlerin hacim (MPV) değerlerinin 23 buzağıdaki aşı öncesi (0. gün), aşılamadan 1 ve 3 hafta sonraki durumları. *:Değerler arasında anlamlı bulunan farklılıklar ($p<0.05$). X eksenini, aşılamadan önce ve sonrası periyotları ifade etmektedir. Y eksenini, bu parametrelerin kanda fl cinsinden değerini ifade etmektedir.

McHC'nin (Eritrositlerdeki ortalama hemoglobin konsantrasyonu) sığırlardaki normal değeri 30-40 g/dl'dir (Feldman ve ark. 2000). Aşılamadan önce 23 buzağıdan 22 tanesinde McHC değeri 30 g/dl'nin altında tespit edildi. Geriye kalan 1 buzağıda McHC değeri 30-40 g/dl ortalama değeri bulundu. Aşılamadan önce 23 buzağıya ait ortalama McHC değeri 28.76 ± 1.49 , aşılamadan 1 hafta sonra 27.79 ± 0.83 ve 3 hafta sonra 29.31 ± 2.19 olarak tespit edildi (Şekil 3.17.). Aşılamadan 1 hafta sonra tüm buzağılarda McHC değeri 30 g/dl'nin altında belirlendi. Aşılamadan 3 hafta sonrasında 21 buzağıda 30 g/dl'nin altında tespit edilir iken geriye kalan 2 buzağıda 30-40 g/dl ortalama değeri belirlendi (Şekil 3.17.).



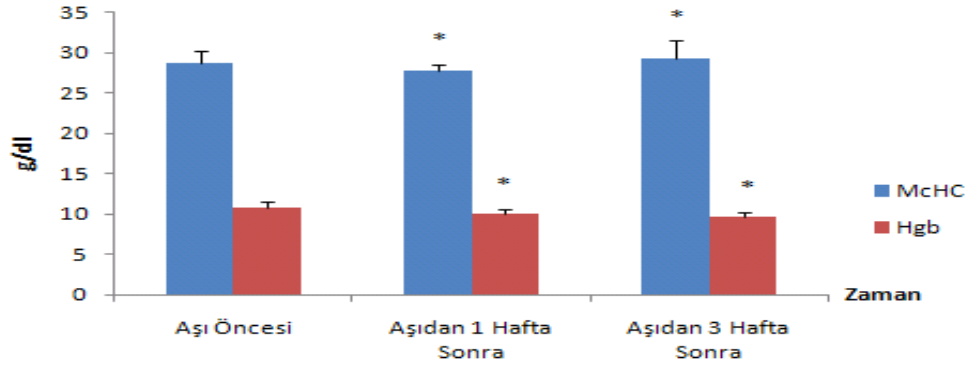
Şekil 3.17.: Eritrositlerdeki ortalama hemoglobin konsantrasyonu değerinin 23 buzağıdaki aşı öncesi (0. gün), aşılamadan 1 ve 3 hafta sonraki durumu. *:Değerler arasında anlamlı bulunan farklılıklar ($p<0.05$). X eksen, tezde kullanılan her bir buzağıyı temsil etmektedir ($n=23$). Y eksen, McHC parametresinin kanda g/dl cinsinden değerini ifade etmektedir.

Hgb'nin (hemoglobin değeri) sığırlardaki normal değeri 8-15 g/dl'dir (Feldman ve ark. 2000). Aşılama öncesi, aşılamadan 1 ve 3 hafta sonrasında 23 buzağının tümünde Hgb değeri 8-15 g/dl ortalama değerinde tespit edildi (Şekil 3.18.). Aşılama öncesi 23 buzağıya ait ortalama Hgb değeri 10.73 ± 0.77 , aşılamadan 1 hafta sonra 10.01 ± 0.65 ve 3 hafta sonra 9.66 ± 0.61 olarak bulundu (Şekil 3.18.).



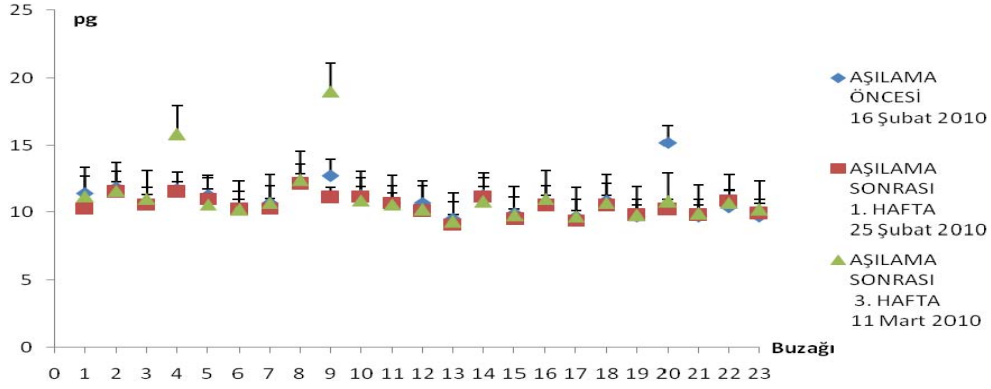
Şekil 3.18.: Hemoglobin değerinin 23 buzağıdaki aşı öncesi (0. gün), aşılamadan 1 ve 3 hafta sonraki durumu. *:Değerler arasında anlamlı bulunan farklılıklar ($p<0.05$). X eksen, tezde kullanılan her bir buzağıyı temsil etmektedir ($n=23$). Y eksen, hemoglobin parametresinin kanda g/dl cinsinden değerini ifade etmektedir.

23 buzağıya ait McHC ve Hgb değerlerinin zamana göre değişimi Şekil 3.19'da gösterilmiştir.



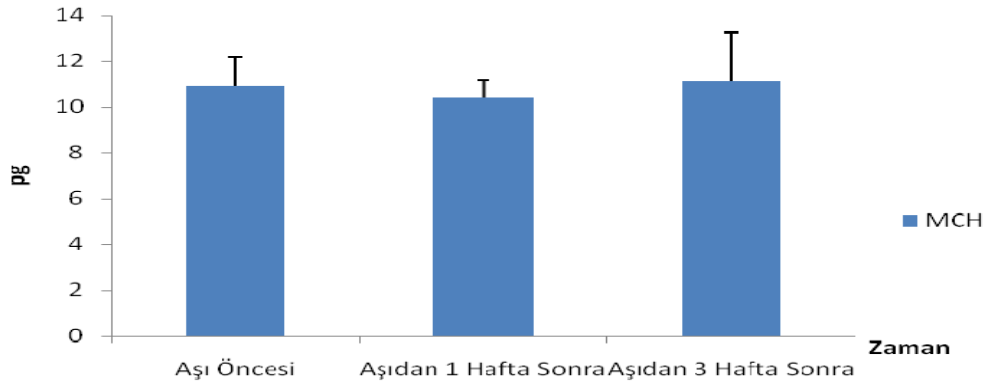
Şekil 3.19.: Eritrositlerdeki ortalama hemoglobin konsantrasyonu (McHC) ve hemoglobin (Hgb) değerlerinin 23 buzağıdaki aşı öncesi (0. gün), aşılama 1 ve 3 hafta sonraki durumları. *:Değerler arasında anlamlı bulunan farklılıklar ($p<0.05$). X eksenini, aşılama öncesi ve sonrası periyotları ifade etmektedir. Y eksenini, bu parametrelerin kanda g/dl cinsinden değerini ifade etmektedir.

MCH'nin (Eritrositlerdeki hemoglobin miktarı) sığırlardaki normal değeri 11-17 pikogramdır ($\text{pg}=10^{-12}\text{g}$) (Feldman ve ark. 2000). Aşılama öncesi 23 buzağıdan 14 tanesinde MCH değeri 11 pg 'ın altında, 9 buzağıda ise 11-17 pg ortalama değerleri arasında tespit edildi. Aşılama öncesi 23 buzağıya ait ortalama MCH değeri 10.96 ± 1.26 , aşılama 1 hafta sonra 10.49 ± 0.74 ve 3 hafta sonra 11.16 ± 2.13 olarak bulundu (Şekil 3.20.). Aşılama 1 hafta sonra 23 buzağıdan 16 tanesinde MCH değeri 11 pg 'ın altında belirlenir iken, 7 tanesinde 11-17 pg arası ortalama değerleri arasında tespit edildi. Aşılama 3 hafta sonrasında 16 tane buzağıda 11 pg 'ın altında ölçüldü. 6 buzağıda 11-17 pg ortalama değeri tespit edilir iken geriye kalan 1 buzağıda ise 17 pg 'ın üstünde bir değer belirlendi (Şekil 3.20.).



Şekil 3.20.: Eritrositlerdeki hemogloblin miktarı değerinin 23 buzağıdaki aşı öncesi (0. gün), aşılamadan 1 ve 3 hafta sonraki durumu. *:Değerler arasında anlamlı bulunan farklılıklar ($p<0.05$). X eksenin, tezde kullanılan her bir buzağıyı temsil etmektedir ($n=23$). Y eksenin, MCH parametresinin kanda pikogram (pg) cinsinden değerini ifade etmektedir.

23 buzağıya ait MCH değerlerinin zamana göre değişimi Şekil 3.21.'de gösterilmiştir.



Şekil 3.21.: Eritrositlerdeki hemogloblin miktarı değerinin 23 buzağıdaki aşı öncesi (0. gün), aşılamadan 1 ve 3 hafta sonraki durumu. *:Değerler arasında anlamlı bulunan farklılıklar ($p<0.05$). X eksenin, aşılamadan önce ve sonrası periyotları ifade etmektedir. Y eksenin, MCH parametresinin kanda pg cinsinden değerini ifade etmektedir.

Tezde kullanılan, 2 nolu işletmedeki 23 buzağıdan elde edilen tüm veriler Microsoft Windows veritabanlı Statistical Package for Social Sciences (SPSS; Veri:15.0) istatistik programına yüklendi. Buzağılara ait kontrol grubu (aşı öncesi) verileri, aşılamadan 1 hafta sonraki ve 3 hafta sonraki gruplarla istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Verilerin değerlendirilmesinde; bağlı gruplar arasında iki ortalama arasındaki farkın önemliliği testinde One-Way ANOVA testi, kategorik

değişkenlerin karşılaştırılmasında LSD testi kullanıldı. Tüm veriler çift yönlü olarak karşılaştırıldı ve $p < 0.05$ olduğunda aradaki fark istatistiksel olarak önemli kabul edildi. Grafikler, Microsoft Windows Excel (Office 2007) bilgisayar programı ile çizildi.

Aşılamadan önceki ve aşılama sonrası ilk haftadaki kan değerlerinden Hct, Hgb, RBC ve WBC, total Lym, total N/Gr ve McHC’de düşüş gözlemlendi ($p \leq 0.005$). Aşılamadan önce ve 3. hafta arasındaki kan değerlerinde McHC ($p \leq 0.007$) ve % monositte artış bulundu ($p \leq 0.001$). Aşı sonrası 1.ve 3. hafta karşılaştırıldığında Hct, Hgb ve RBC değerlerindeki azalma ($p \leq 0.005$) ve WBC, total Lym, total N/Gr’de saptanan artış belirlendi ($p \leq 0.005$). Aşılamanın MCV, MCH, MPV, total monosit, % (N/Gr) değerleri üzerinde etkisi olmadığı tespit edilirken ($p \geq 0.05$), tüm gruplar karşılaştırıldığında Hct, Hgb ve RBC’de sürekli düşüş gözlemlendi ($p \leq 0.005$) (Tablo 3.1.).

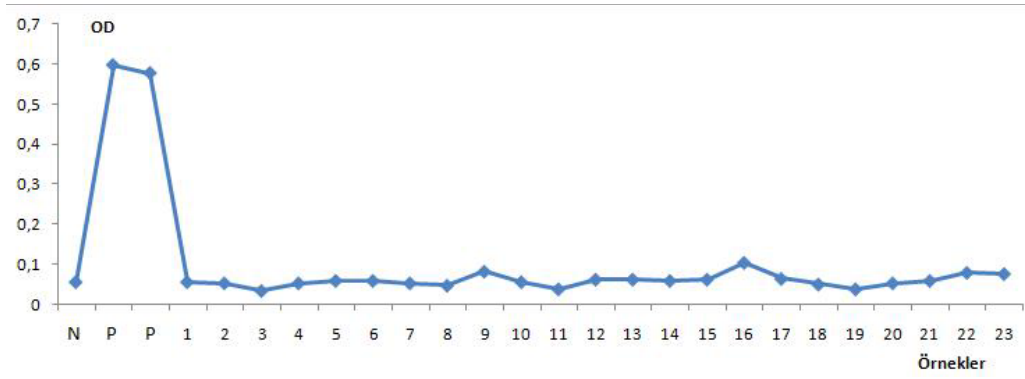
Tablo 3.1.: BVDV aşısının, kan parametreleri üzerine etkisinin istatistiksel olarak karşılaştırılması.

Parametreler	p(Sig.) Değerlerinin Karşılaştırılması		
	Aşı Öncesi-Aşıdan 1 Hafta Sonrası	Aşı Öncesi –Aşıdan 3 Hafta Sonrası	Aşıdan 1 Hafta Sonrası - Aşıdan 3 Hafta Sonrası
WBC	0.001*	0.048*	0.121
Lym %	0.043*	0.351	0.265
Mon %	<0.001*	0.002*	0.093
N/Gr %	0.429	0.995	0.426
Lym#	0.001*	0.043*	0.187
Mon#	0.359	0.082	0.403
N/Gr#	<0.001*	0.031*	0.031*
RBC	0.284	0.001*	0.019*
MCV	0.890	0.909	0.980
Hct	0.132	<0.001*	0.001*
McHC	0.043*	0.251	0.002*
Hgb	0.001*	<0.001*	0.094
PLT	0.001*	0.335	0.015*
MPV	0.84	0.762	0.615
MCH	0.291	0.645	0.131

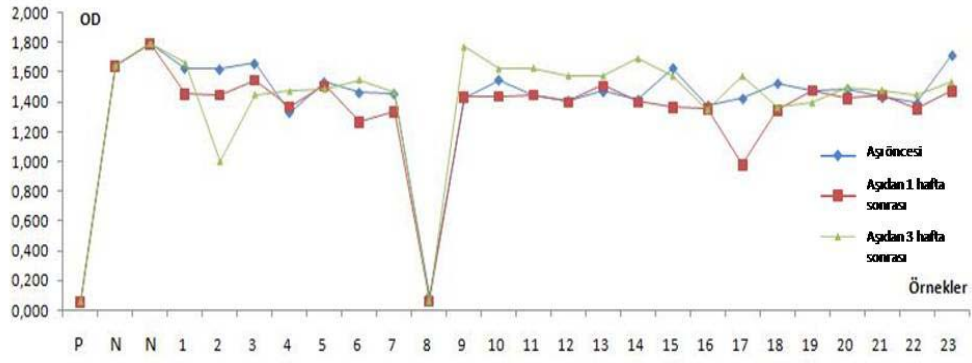
*:Değerler arasında anlamlı bulunan farklılıklar ($p < 0.05$).

3.2. ELISA Sonuçları

Aşılama öncesi, aşılamadan 1 ve 3 hafta sonrası şeklinde üç gruba ayrılmış örneklerden elde edilen serumlar BVDV'ye karşı antijen ve antikor ELISA ile test edildi. Serum örneklerinde BVDV'ye karşı antijen ve antikor bulunmadı. Sonuç olarak tek doz aşılamamanın lökopeni ve lenfopeniye yol açtığı gözlenmesine rağmen tek doz aşılama sonrası yapılan antikor ELISA sonucunda BVDV özgül antikor belirlenmemesi diğer çalışmalar ile uyumlu bulundu.



Şekil 3.22.: BVDV antijen ELISA sonuçları (N: Negatif Kontrol; P: Pozitif Kontrol; X sütunundaki her sayı bir hayvanı temsil etmektedir (n=23). Y eksenini OD değerini ifade etmektedir.)



Şekil 3.23.: Aşılama öncesi ve sonrası BVDV antikor ELISA sonuçlarının karşılaştırılması. P: Pozitif Kontrol; N: Negatif Kontrol. X sütunundaki her sayı bir hayvanı temsil etmektedir (n=23). Y eksenini OD değerini ifade etmektedir.

3.3. PZR Sonuçları

Toplam 80 havuzdaki 12 havuzun BVDV antijeni n-PZR ile belirlendi. Bu 12 havuzu oluşturan örnekler tek tek aynı işlemlere tabi tutuldu. 24 örnekten 15'inde pozitif sonuç bulundu (Tablo 3.2.).

Tablo 3.2.: Plazma örneklerinde nested PZR sonuçları.

	Panpesti virüs	BVDV-1a	BVDV-2
1	-	-	+
2	-	-	+
3	-	-	-
4	-	-	+
5	-	-	-
6	-	-	+
7	-	-	+
8	-	-	-
9	-	-	+
10	-	-	-
11	-	-	-
12	-	-	+

13	-	-	-
14	-	-	-
15	-	-	-
16	-	-	+
17	-	-	-
18	+	-	+
19	-	+	+
20	-	-	-
21	-	-	-
22	-	-	+
23	+	-	+
24	-	-	-

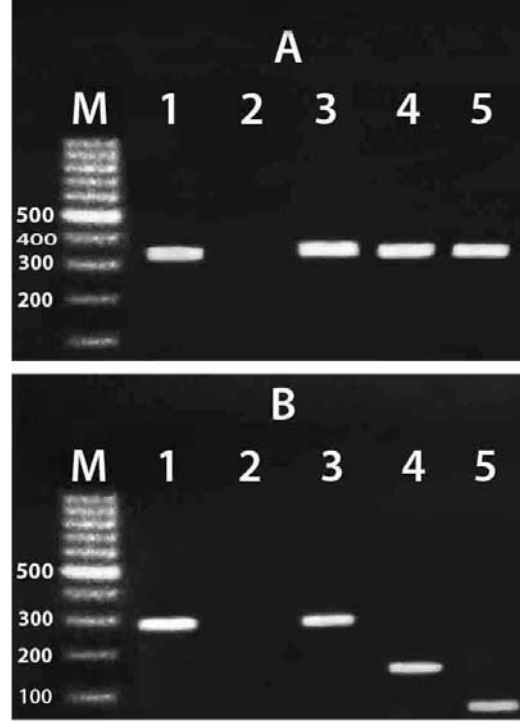
(+:Pozitif, -:Negatif)

Rasgele 80 havuza dağıtılmış 160 kan örneğinden spesifik primerler kullanılarak pozitif bulunan 15 tanesinin %'lik dağılımı Tablo 3.3.'de gösterilmiştir. 80 havuzdaki kan örneklerinde % 1.25'de panpesti, % 0.625 BVDV-1a ve % 7.5 BVDV-2 pozitif tespit edildi (Tablo 3.3.).

Tablo 3.3.: BVDV pozitif kan örneklerinin tiplendirilmesi.

Panpesti pozitiflerin yüzdesi	BVDV-1a pozitiflerin yüzdesi	BVDV-2 pozitiflerin yüzdesi
% 1.25 (2/160)	% 0.625 (1/160)	% 7.5 (12/80)

324 ve 326 primerleri (288 bp) kullanılarak BVDV-Panpesti pozitif bulundu (Şekil 3.24.B. hat 3). 1AF ve 1BF primerleri (169 bp) kullanılarak da BVDV-1a pozitif sonuç belirlendi (Şekil 3.24.B. hat 4). B5 ve B6 primerlerinin (91 bp) kullanılmasıyla da BVDV-2 pozitif sonuç tespit edildi (Şekil 3.24.B hat 5).



Şekil 3.24.: % 1.5'lik agaroz jelde örneklerin elektroforez görüntüsü. A-GAPDH Primer M:marker 1:Pozitif kontrol (NADL), 2-Su, 3, 4, 5 (Klinik örnekler) B- Panpesti Primer M:marker 1:Pozitif kontrol (NADL), 2-Su, 3(Panpesti), 4 (BVDV-1a), 5 (BVDV-2) (Klinik örnekler)

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Ülkemiz, coğrafi konumu ve sekiz ülke ile kara sınırına sahip olması nedeniyle sürekli olarak viral enfeksiyonların tehdidi altındadır. Buna rağmen son yıllarda viral enfeksiyonlar ile mücadelede veteriner hekimlerin gayretleri sonucu sığır vebası hastalığı eradike edilmiştir (Gür ve Akça 2008). Ancak BVD için böyle iyimser bir tablodan söz etmek şu an için mümkün değildir.

BVD'nin kontrol ve eradikasyonu, yetiştiriciler ve veteriner hekimler için problem olarak varlığını sürdürmektedir. Bazı Avrupa Birliği (AB) ülkeleri sığır löykozu, infeksiyöz bovine rhinotracheitis (IBR) ve bovine viral diarrhea (BVD) virüs enfeksiyonları için kontrol-eradikasyon programları başlatmış ve başarılı sonuçlar elde etmiştir. Türkiye'de ise bu amaçla BVD'ye karşı aşılama programları geliştirilmiş fakat tam bir neticeye ulaşılamamıştır.

Dünyada BVDV enfeksiyonunun prevalansı ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmaların sonucunda BVDV'nin seropozitiflik ortalaması % 60-80 ve PI hayvanların oranının ise % 0.5-2 arasında olduğu rapor edilmiştir (Susan ve ark. 1983, Ghirotti ve ark. 1991).

Raue ve ark. (2010), farklı firmalara ait BVDV aşılarının BVDV'ye karşı koruyuculuğunu test etmek ve p80 ELISA kitleri ile tam virüs ELISA kitlerinin BVDV antikorunu tespit etme güçlerini karşılaştırmak için yaptıkları çalışmada 47 düve kullandılar. Hayvanları 5 gruba ayırdılar. 1. gruba serum fizyolojik, 2. gruba Pregsure BVDV, 3. gruba Bovilis, 4. gruba Bovidec ve 5. gruba Mucobovin-Vacoviron aşıları 2'şer kez uyguladılar. Antikor titrelerindeki ilk serokonversiyonu 28. günde tespit ettiler. Ayrıca çalışmalarının 49. gününde BVDV-1 11249 suşu ile çelinç yaptılar.

Liang ve ark. (2008) BVDV E2 glikoproteini içeren inaktif aşuların, BVDV-2 çelincina karşı koruyuculuğunu araştırdılar. Yaptıkları çalışmada, BVDV antijen ve BVDV antikor yönüyle negatif 24 sığır kullandılar. Bu hayvanları 4 gruba ayırdılar. 1. grup (kontrol), 2. grup (E2.1), 3. grup (E2.2) ve 4. gruba (E2.1+E2.2) 0. ve 21. günde plazmit, 42. günde ise güçlendirici verdiler. 58. günde ise hayvanlara BVDV-2 ile çelinc yaptılar. Araştırmalarının sonucunda DNA (E2.2 ya da E2.1+E2.2) veya protein koruyucusu (E2.2 ya da E2.1+E2.2) içeren aşular ile aşılamanın, sığırları BVDV-2 çelincina karşı tamamen koruduğunu tespit ettiler. WBC değerini 13 gün boyunca ölçtüklerinde; fosfat tampon çözeltisi (PBS) içeren kontrol grubunda (Grup 1) düşük, diğer 3 grupta ise (E2.1, E2.2 ve E2.1+E2.2) kontrol grubuna göre 12 gün boyunca istatistiksel olarak yüksek çıktığını rapor ettiler.

Walz ve ark. (1999) neonatal buzağılarda BVDV-2'ye bağlı trombositopeni oluşumunu araştırdılar. Çalışmalarında hayvanları kontrol (n=4) ve enfekte olarak gruplara (n=5) ayırdılar. Enfeksiyondan 12 gün sonra kan sayımı yaptılar. WBC sayısında azalma meydana geldiğini ve 7-12. günler arasındaki bu değişimi istatistiksel olarak anlamlı bulduklarını rapor ettiler. Ayrıca tüm enfekte buzağılarda MPV değerinin istatistiksel olarak anlamlı bulunacak kadar azaldığını buldular.

Ellis ve ark. (1988) BVDV ile enfekte düvelerde, lenfositlerin flow sitometrik analizini yaptılar. 7 ile 9 ay arasında değişen yaşlarda 12 adet düveyi kullandılar. Çalışmalarında, WBC kan değerlerinde önce azalma ardından da artma tespit ettiler. Araştırmalarında ayrıca 5 ml inaktif BVDV aşısını, gluteal kasa 0. ve 13. günlerde uyguladılar ve WBC değerini analiz ettiler. 12. güne kadar WBC değerinde sürekli bir artış, 12. günden sonra ise azalma rapor ettiler.

Woods ve ark. (1970) canlı virüs aşuları ile ilgili kontrollü bir saha çalışması yaptılar. Araştırmalarında; Angus ve Hereford ırkı 64 düve kullandılar. Grup 1'deki düvelere tek doz IBR ve BVD modifiye canlı virüs aşuları uyguladılar. Grup 2, 3 ve 4' teki hayvanlara ise IBR ve PI3 canlı virüs aşuları uyguladılar. Grup 5'teki düvelere IBR, BVD ve PI3'e karşı antikorlar içeren sığır kökenli antiserum verdiler.

Aşılardan 2 hafta sonra kan sayımı yaptılar. Grup 1'deki hayvanlarda WBC ve RBC değerlerinde önce bir azalma ardından da artma olduğunu gözlemlədiler.

Bu tezde ise WBC değerinde önce bir azalma ardından da artmanın gözlemlenmesi Woods ve ark. (1970) ile Ellis ve ark. (1988) çalışmalarına bir paralellik göstermektedir (Şekil 3.1., Şekil 3.4. ve Tablo 3.1.). Woods ve ark. (1970)'nın tek doz BVDV aşısı uygulamaları bu benzerliğin nedeni olduğu düşünülmektedir. Ama bu tezde BVDV aşısı sonrası değerler ile Ellis ve ark. (1988)'nin çalışmalarında buldukları değerler arasında farklılık tespit edildi. Bu duruma; Ellis ve ark. (1988)'nin iki doz BVDV aşısı uygulamaları, bu tezde ise tek doz aşının uygulanması ve tek doz aşının gerekli etkiyi yapamaması olduğu düşünüldü. Ayrıca bu tezde, WBC değerinin aşılardan sonra genelde düşük çıkması (Şekil 3.1., Şekil 3.4. ve Tablo 3.1.), Liang ve ark. (2008) ile Walz ve ark. (1999) çalışmaları ile uyumlu bulunmadı. Ayrıca bu tezde, MPV değerinde istatistiksel olarak anlamlı bulunabilecek bir değişimin tespit edilememesi (Şekil 3.15., Şekil 3.16. ve Tablo 3.1.) Walz ve ark. (1999) çalışmaları ile uyumlu bulunmadı. Bu iki durumun nedeninin ise bu tezde çelinc yapılmaması olduğu düşünüldü. Ayrıca bu tezde serum örnekleri, BVDV antikorunun varlığını tespit etmek amacıyla BVDV p80 protein antikor ELISA (Institut Pourquier, Fransa) kiti ile tarandı. Sonuçta örneklerin hiçbirinde seropozitiflik tespit edilemedi (Şekil 3.23.). Bunun nedeninin bu tezde çelinc yapılmaması ve tek doz aşı uygulanması olduğu düşünüldü. Seropozitifliğin tespit edilememesi Raue ve ark. (2010) yaptıkları çalışma ile uyumlu bulundu.

Liang ve ark. (2008) BVDV E2 glikoproteini içeren inaktif aşılardan, BVDV-2 çelincına karşı koruyuculuğunu araştırdıkları çalışmalarında, monosit değerini 13 gün boyunca ölçtüler. Monosit değerinin; PBS içeren kontrol grubuna (Grup 1) göre diğer 3 grupta (E2.1, E2.2 ve E2.1+E2.2) 4 gün boyunca yüksek çıktığını tespit ettiler. Bu sonucu istatistiksel olarak anlamlı bulduklarını rapor ettiler.

Ellis ve ark. (1988) BVDV ile infekte düvelerde, lenfositlerin flow sitometrik analizini yaptılar. Çalışmalarında; 7 ile 9 ay arasında değişen yaşlarda 12 adet düveye, 5 ml inaktif BVDV aşısını gluteal kasa 0. ve 13. günlerde uyguladılar.

Araştırma sonunda monosit değerini analiz ettiklerinde aşılanan hayvanlarda monosit değerinde; ilk 3 günde sürekli bir artış, 12. güne kadar da azalma saptadılar.

Bu tezde ise monosit değeri, aşılama öncesinde ve aşından 3 hafta sonra istatistiksel olarak birbirinden farklı bulundu (Şekil 3.7., Şekil 3.8., Tablo 3.1.). Monositler, makrofajlarla birlikte fagositoz yapabilen ve lenfositlerle direkt ya da indirekt şekilde immun sistemin regülasyonunda rol oynayan hücrelerdir. BVDV aşısının vücutta immun sistemi uyardığı ve sonucunda monosit sayısının arttığı bu durumun da Liang ve ark. (2008) ile Ellis ve ark. (1988) yaptıkları çalışmaya paralellik gösterdiği düşünüldü.

Corapi ve ark. (1989) ncp BVDV ile deneysel enfekte ettikleri buzağılarda şiddetli trombositopeniyi araştırdılar. Çalışmalarında yaşları 1 hafta ile 2 ay arasında değişen 8 buzağı kullandılar. Bunlardan 7 tanesini ncp BVDV saha izolatu ile enfekte ettiler. Araştırma sonunda buzağuların kanındaki Plt değerini ölçtüler. Araştırmalarında, Plt değerinin enfeksiyondan sonra ilk 4 gün boyunca sürekli arttığını rapor ettiler. Ardından 16. güne kadar da 1., 2. ve 6. buzağıda ise sürekli azalma rapor ettiler. 2. buzağı 19. günde öldü. 24. güne kadar Plt değerinin sürekli arttığını, 24. günden sonra ise azalmaya başladığını saptadılar.

Walz ve ark. (1999) neonatal buzağılarda BVDV-2'ye bağlı ortaya çıkan trombositopeniyle ilgili araştırmalarında kontrol ve enfekte gruplar oluşturular ve enfeksiyondan 12 gün sonra serumdan kan sayımı yaptılar. Tüm enfekte buzağuların kan sayımlarında Plt değerinin azaldığını buldular ve 7-12. günler arasındaki bu değişimi istatistiksel olarak anlamlı bulduklarını rapor ettiler.

Bu tezde Plt değeri; aşılama 1 hafta sonra artmakta, 3. haftada ise azalmakta ama yinede aşılama öncesine göre yüksek kaldı (Şekil 3.3. ve Tablo 3.1.). Bu sonuçlar Corapi ve ark. (1989) ile Walz ve ark. (1999) araştırma sonuçlarına paralellik göstermektedir. Plt değerinin azalmasına, kemik iliğinde trombosit üretiminin azalmasının sebep olduğu düşünülmektedir.

Liang ve ark. (2008) BVDV E2 glikoproteini içeren inaktif aşılardan, BVDV-2 çelincine karşı koruyuculuğunu araştırdıkları çalışmada, lenfosit değerini 13 gün boyunca ölçtüler. Lenfosit değerinin; PBS içeren kontrol grubunda (Grup1) düşük, diğer 3 grupta ise (E2.1, E2.2 ve E2.1+E2.2) kontrol grubuna göre 11 gün boyunca istatistiksel olarak yüksek çıktığını buldular.

Bu tezde, lenfosit değeri aşılamadan 1 hafta sonra, aşılama öncesine göre 7 gün boyunca istatistiksel olarak yüksek olduğu tespit edildi (Şekil 3.5., Şekil 3.6., Tablo 3.1.). BVDV aşısı sonrası lenfosit sayısının artması, Liang ve ark. (2008) yaptıkları çalışmaya paralellik göstermektedir.

Corapi ve ark. (1989) ncp BVDV ile deneysel enfekte ettikleri buzağılarda şiddetli trombositopeniyi araştırdıkları çalışmalarında lenfosit sayısının 8 buzağıdan 6 tanesinde azaldığını yani lenfopeniyi rapor ettiler. Ayrıca nötrofil sayısının da 8 buzağının tamamında azaldığını tespit ettiler.

Walz ve ark. (1999) enfekte buzağılarda, enfeksiyondan 12 gün sonra serumdan kan sayımı yaptıklarında tüm enfekte buzağılarda lenfosit sayısının istatistiksel olarak anlamlı bulunacak kadar azaldığını rapor ettiler.

Bu tezde lenfosit sayısı aşılamadan 1 hafta sonra azalması (Şekil 3.9., Şekil 3.10., Tablo 3.1.) Corapi ve ark. (1989) ile Walz ve ark. (1999)'nın buldukları sonuçlara uygunluk göstermekle birlikte 3. haftada artması ise uygunluk göstermemektedir.

Bu tezde nötrofil sayısı aşılamadan 1 hafta sonra azaldı, 3. hafta ise arttı (Şekil 3.9., Şekil 3.10., Tablo 3.1.). Nötropeniye viral enfeksiyonlar ve kemik iliği anomalilerinin neden olduğu bilinmektedir. Buzağılar; başka bir enfeksiyona maruz kalmış olabilirler, vertikal yolla analarından enfeksiyon bulaşmış olabilir veya aşılama sonucu vücutta suni bir enfeksiyon meydana getirilmiş olabilir. Sonuçta görülen nötropeni durumu Corapi ve ark. (1989) çalışmalarına paralellik gösterdi.

Flaviviridae ailesi içindeki *Pestivirus* cinsi; BVDV-1, BVDV-2, CSFV ve BDV üyelerinden oluşur. Fauquet ve ark. (2005) BVDV enfeksiyonlarının dünya çapında daha çok sığır üreticisi olan ülkelerde önemli ekonomik kayıplara neden olduğunu rapor etmişlerdir. Houe (1995) BVDV antikor pozitif sürülerin prevalansının yaklaşık olarak ortalama % 55 olduğunu bildirmiştir. Tsuboi ve ark. (2010) en az 2 yıl BVDV aşısı yapılmamış ve üreme sorunları gözlenen sürülerden alınan serum örneklerinde BVDV seropozitiflik oranının % 53.3 olduğunu rapor ettiler. BVDV abort sorunlarına yol açmaktadır ve Tsuboi ve ark. (2010) yaptıkları araştırmada, 73 fetustan % 13'ündeki aborta BVDV enfeksiyonunun neden olduğunu saptamışlardır. Aynı çalışmada, abort oranı *Neospora caninum* (% 10) ve mikozis (% 5) olarak bulunmuş ve BVDV'nin abort yapan diğer patojenlere göre daha fazla oranda abort oluşturduğu bildirilmiştir. Toplak ve ark. (2004) ile Vilcek ve ark. (2004) bazı Avrupa ülkelerinde BVDV alt gruplarını rapor etmişlerdir. BVDV alt grupları için farklı coğrafik dağılımlar rapor edilmiştir. Yeşilbağ ve ark. (2008) orta Avrupa'nın sınırlı bazı ülkelerinde BVDV-1a, 1b, 1c, 1d, 1f ve 1s'ye rağmen BVDV-1g bulunduğunu saptamışlardır. Ülkemizde Yeşilbağ ve ark. (2008) Türkiye'nin batısında BVDV-1a, BVDV-1b, BVDV-1d, BVDV-1f ve BVDV-1h farklı genetik tipleri tespit ettiler. İlaveten Yeşilbağ ve ark. (2008) elde ettikleri izolatların Avrupa'da dolaşan BVDV-1 ana alt gruplarına da yakın olduğunu rapor ettiler. Pratelli ve ark. (2001) ile Wolfmeyer ve ark. (1997) farklı Avrupa ülkelerinde, Oguzoglu ve ark. (2010) ise Ankara ilinde BVDV-2'nin varlığını rapor etmişlerdir. Bu tez Kırıkkale bölgesinde BVDV-1a ve BVDV-2 varlığını gösteren ilk çalışma özelliğini taşımaktadır. Elde edilen sonuçlara göre BVDV-1a % 0.625 ve BVDV-2 % 7.5 oranında tespit edildi (Tablo 3.2., Tablo 3.3. ve Şekil 3.24.). BVDV alt tiplerinin yaygın prevalansı, aynı veya farklı bölgelerde ki çiftlikler arasında yoğun sığır hareketleri ile ve zayıf BVDV kontrol işlemleri ile açıklanabilir. Obritzhauser ve ark. (2005) son yıllarda, BVDV eradikasyon programlarının birçok ülkede uygulandığını rapor etmiştir. Bu bulguların, aşı geliştirme ve aşılama stratejileri için önemli etkileri vardır. BVDV-1 ve BVDV-2 suşlarının her ikisinin; uygulanan aşılarında kullanılması, BVDV'ye karşı etkin bir mücadele için önemli olduğu tezi diğer bir çıktısıdır.

Alkan ve ark. (1997) Türkiye'de önceki yıllarda yapılan çalışmalarda % 62-80 civarında seropozitiflik tespit edildiğini rapor ettiler. Bu durum BVDV'ye karşı

gerekli korunmanın yapılmadığı sonucunu ortaya çıkarmaktadır. Bu kadar yüksek bir pozitiflik oranının olası sebepleri şunlar olabilir. İşletmelerin genelde kapalı işletmeler olması dolayısıyla hayvanların birbirlerine kolaylıkla temas etmeleri ve virüsü kolaylıkla diğer hayvanlara bulaştırabilmeleridir. Diğer bir neden ise aşılama çalışmalarının düzenli yapılmamasıdır. Karşılaşılabilecek olası zararlara göre aşı maliyetinin oldukça düşük olmasına rağmen üreticilerin bu uygulamaya fazla önem göstermedikleri görülmektedir. Yüksek pozitiflikle karşılaşılmasının bir diğer nedeni ise işletmelerin hayvan hastalıkları yönünden sağlık taramalarının yapılması, ekonomik bir kayıp olarak düşünülerek düzenli yapılmaması olabilir. Sonuç olarak bu tezde elde edilen veriler, Kırıkkale ilinde numune alınan işletmelerdeki hayvanların bir kısmında BVDV enfeksiyonunu belirlemiştir. Bu verilere dayanılarak söz konusu işletme yetkililerine öncelikle PI hayvanların sürüden uzaklaştırılması önerildi. Ayrıca sürülerin PI yönünden takibinin yapılması ve sürüye yeni hayvan nakillerinin dikkatle izlenmesi gerektiği de bildirildi. Bunun yanısıra, gebe sığırların akut enfeksiyonlara bağlı olarak PI buzağı doğumu veya reproduktif problemlerin oluşabileceği düşünülerek, erişkin sığırların tohumlama öncesi bağışıklıklarının sağlanması amacıyla inaktif BVDV aşısı ile aşılanmalarının (tohumlamadan 6-8 ay önce) yararlı olacağı belirtildi. Tek doz aşı uygulamasının yeterli immun etkiyi oluşturmadığı düşünüldü. Aşı üreticisinin prospektüsü ile belirttiği doz ve periyotlarda aşılanmanın önemi bir daha ortaya çıkmıştır. Bu veri ve değerlendirmelerden hareketle, gerek büyük sığır işletmelerinde gerekse küçük işletmelerdeki hayvanlarda enfeksiyonun epidemiyolojik durumlarının araştırılması; yetiştiricilerin BVDV konusunda bilinçlendirilmesi ve çeşitli kurumlar tarafından uygulanan teşvik programları ile hastalığın kontrolüne yönelik çalışmaların yapılmasında yarar görülmektedir. Ayrıca ELISA yönteminin saha taramalarında pratik, güvenilir olması ve çok miktarda numuneden kısa zamanda sonuç alınabilmesi nedeniyle eradikasyon programlarında yer aldığı fakat enfeksiyonların serolojik ve virolojik olarak çabuk teşhisine yönelik kullanılan ELISA'nın, virüs izolasyonu ve PCR gibi metotlarla desteklenmesinin daha doğru olacağı ve yapılması planlanan çalışmalara bu metotların dâhil edilmesi gerektiği sonucuna varıldı.

KAYNAKLAR

- ADAMSON JW, HAYASHI A, STAMATOYANNOPOULOS G and BURGER WF (1972) Erythrocyte Function and Marrow Regulation in Hemoglobin Bethesda (0145 Histidine) *The Journal of Clinical Investigation* Volume 51.
- AGNELLO V, ABEL G, ELFAHAL M, KNIGHT GB, and ZHANG QX (1999) Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:12766–12771.
- ALKAN F, ÖZKUL A, KARAOĞLU MT, BİLGE S, AKÇA Y, BURGU İ, YEŞİLBAĞ K, OĞUZOĞLU T Ç (1997) Sığırlarda viral nedenli solunum sistemi enfeksiyonlarının seroepidemiolojisi, *A. Ü. Vet. Fak. Derg.*, 44(1), 73-80.
- ANDERSON PD (2000) In Thesis: Bovine Pestivirus Disease: An investigation of a severe outbreak of bovine viral diarrhoea virus infection in calves in New Zealand.
- ANTONIS AF, BRUSCHKE CJ, RUEDA P, MARANGA L, CASAL JI, VELA C, et al., (2006) A novel recombinant virus-like particle vaccine for prevention of porcine parvovirus-induced reproductive failure. *Vaccine*; 24: 5481-90.
- ARIAS P, ORLICH M, PRIETO M, ROSALES SC, THIEL HJ, ALVAREZ M, BECHER P. (2003) Genetic heterogeneity of bovine viral diarrhea viruses from Spain. *Vet. Microbiol.* 96, 327–336.
- ARSLAN E, YAKAR T, YAVAŞOĞLU İ (2008) Sigaranın genç erkeklerde ortalama trombosit hacmi ve lipit düzeylerine etkisi. *Anadolu Kardiyol Derg.* 8: 422-5.
- AUDIBERT FM, LISE LD (1993) Adjuvants: current status, clinical perspectives and future prospects. *Immunol Today*; 14: 281-4
- AZKUR AK, BOLAT Y, DOYMAZ MZ (2003) Sığır Vebası Virüsü RBOK Aşı Suşu Matriks Geninin Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile çoğaltılması ve TOPO® XL Klonlama Vektörüne Yerleştirilmesi. *Turk J Vet Anim Sci* 27; 229-233
- BAKER J, YORK CJ, GILLESPIE JH and MITCHELL GB (1954) Virus diarrhea in cattle, *Am. J. Vet. Res.* 57, pp. 525–531.

- BAKER JC (1987) Bovine viral diarrhoea virus: a review. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 190: 1449-1458.
- BAKER JC (1995) The clinical manifestations of bovine viral diarrhoea infection. *Vet. Clin. North. Am. – Food Animal Practice*, 11, 425–445.
- BARON JE, PETERSON LR, FINEGOLD SM (1994) Nontraditional Methods for Identification and detection of pathogens or their products. In: Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 9th ed. Missouri: Mosby-Year Book,; 125-7.
- BEATTY JD, BEATTY BG, VLAHOS WG (1987) Measurement of monoclonal affinity by noncompetitive immunoassay. *J Immunol Methods*; 100: 173-9.
- BECHER P, ORLICH M, KOSMIDOU A, KONIG M, BAROTH M and THIEL HJ (1999) Genetic diversity of pestiviruses: identification of novel groups and implications for classification. *Virology* 262: 64-71.
- BECHER P, THIEL HJ, (2002) Genus *Pestivirus* (Flaviviridae). In: Tidona, C.A., Darai, G. (Eds.), The Springer Index of Viruses. *Springer*, Heidelberg, Germany, pp. 327–331.
- BEHRENS SE, GRASSMANN CW, THIEL HJ, et al., (1998) Characterization of an autonomous subgenomic pestivirus RNA replicon. *J Virol*;72(3):2364-2372.
- BHUDEVI B & WEINSTOCK D (2003) Detection of bovine viral diarrhoea virus in formalin fixed paraffin embedded tissue sections by real time RT-PCR (Taqman). *J. Virol. Methods*, 109, 25–30.
- BIELEFELDT OH, BLOCH B (1982) Electron microscopic studies of bovine viral diarrhoea virus in tissues of diseased calves and in cell cultures. *Arch Virol* 71:57-74.
- BLOWEY RG, WEAVER DA. (2003) Color Atlas of Diseases and Disorders of Cattle. *Elsevier Health Sciences*.
- BOLAT Y, DOYMAZ MZ (1998) Veteriner Viroloji. Fırat Üniversitesi Yayınları. Elazığ. S:287,288.
- BOLIN SR (1993) Immunogens of bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Microbiol.*, 37, 263–271.
- BOLIN SR (1995) The pathogenesis of mucosal disease. *Vet. Clin. North. Am.*, 11, 489–500

- BOLIN SR (1996) The clinical significance of genetic variation among bovine viral diarrhoea viruses. *Veterinary Medicine*; 10:958-961.
- BOLIN SR & RIDPATH JF (1992) Differences in virulence between two noncytopathic bovine viral diarrhoea viruses in calves. *Am. J. Vet. Res.*, 53, 2157–2163.
- BOLIN SR & RIDPATH JF (1995) Assessment of protection from systemic infection or disease afforded by low to intermediate titers of passively acquired neutralizing antibody against bovine viral diarrhoea virus in calves. *Am. J. Vet. Res.*, 56, 755–759.
- BOOTH PJ, STEVENS DA, COLLINS ME & BROWNLIE J (1995) Detection of bovine viral diarrhoea virus antigen and RNA in oviduct and granulosa cells of persistently infected cattle. *J. Reprod. Fertil.*, 105, 17–24.
- BRÆKKAN SK, MATHIESEN EB, NJØLSTAD I, WILSGAARD T and HANSEN JB (2010) Hematocrit and risk of venous thromboembolism in a general population. The Tromsø study. *Haematologica* ; 95(2)
- BROCK KV (1995) Diagnosis of bovine viral diarrhoea virus infections. *Vet. Clin. North. Am.*, 11, 549–561.
- BROWNLIE J (1985) Clinical aspects of the bovine virus diarrhoea/mucosal disease complex in cattle. *In Practice*, 7, 195–202.
- BROWNLIE J (1990) The pathogenesis of bovine virus diarrhoea virus infections. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 9, 43–59.
- BROWNLIE J (1991) The pathways for bovine virus diarrhoea virus biotypes in the pathogenesis of disease. *Arch. Virol. (Suppl.)* 3: 79-96.
- BROWNLIE J, CLARKE MC, HOOPER LB & BELL GD (1995) Protection of the bovine fetus from bovine viral diarrhoea virus by means of a new inactivated vaccine. *Vet. Rec.*, 137, 58–62.
- BROWNLIE J, THOMPSON I, and CURWEN A (2000) Bovine virus Diarrhoea virus-strategic decisions for diagnosis and control. *In Practice*, 176-187.
- BRUSCHKE CM, VAN OIRSCHOT JM & VAN RIJN P.A. (1999) An experimental multivalent bovine virus diarrhoea virus E2 subunit vaccine and two experimental conventionally inactivated vaccines induce partial fetal protection in sheep. *Vaccine*, 17, 1983–1991.

- BURGU İ, ALKAN F, YEŞİLBAĞ K (1999) Türkiye'de sığırlarda persiste BVD virüs enfeksiyonu. *Ankara Üniv Vet. Fak Derg*, 46, 169-177.
- BUTLER NR, VOYCE MA, BURLAND WL, HILTON ML. (1969). Advantages of aluminium hydroxide adsorbed diphtheria, tetanus and pertussis vaccines for the immunization of infants. *Br Med J*; 1: 663-6.
- BUTTS C, MURRAY N, MAKSYMUK A, et al. (2005). Randomized phase IIB trial of BLP25 liposome vaccine in stage IIIB and IV non-small cell lung cancer. *J Clin Oncol*; 23: 6674-81.
- CARMAN S, VAN DREUMEL T, RIDPATH J, HAZLETT M, ALVES D, DUBOVI E, TREMBLAY R, BOLIN S, GODKIN A & ANDERSON N (1998). Severe acute bovine viral diarrhoea in Ontario, 1993–1995. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 10, 27–35.
- CLARKE MC, BROWNLIE J & HOWARD CJ (1987). Isolation of cytopathic and non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus from tissues of infected animals. In: *Pestivirus Infections of Ruminants*, Harkness J.W., ed. Commission of the European Communities, Brussels, Belgium, EUR10238, 3–10.
- COLIGAN JE, KRUISBEEK AM, MARGULIES DH, SHEVACH EM, STROBER W (1994). Antibody Detection and Preparation. In: *Current Protocols in Immunology*. Vol 1., New York: John Wiley & Sons.; 2.1.1-2.1.4.
- COLLETT MS. (1992). Molecular genetics of pestivirus. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 15, 145-54.
- COLLETT MS, LARSON R, GOLD C, STRICK D, ANDERSON DK, PURCHIO AF, (1988). Molecular cloning and nucleotide sequence of the pestivirus bovine viral diarrhoea virus. *Virology* 165, 191–199.
- CORAP WV, FRENCH TW and DUBOVI EJ (1989). Severe thrombocytopenia in young calves experimentally infected with noncytopathic bovine viral diarrhoea virus. *J. Virol.* 63:3934-3943.
- COUVREUR B, LETELLIER C, COLLARD A, QUENON P, DEHAN P, HAMERS C, PASTORET PP, KERKHOF P, (2002). Genetic and antigenic variability in bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates from Belgium. *Virus Res.* 85, 17–28.
- DEREGT D, CARMAN PS, CLARK RM, BURTON KM, OLSON WO, GILBERT SA, (2002). A comparison of polymerase chain reaction with and without RNA extraction and virus isolation for detection of bovine viral diarrhoea virus in young calves. *J. Vet. Diagn. Invest.* 14, 433–437.

- DESPOIT M, COLLINS ME & BROWNLIE J (1994). Detection of bovine virus diarrhoea virus RNA by *in situ* hybridisation with digoxigenin-labelled riboprobes. *Intervirology*, 37, 269–276.
- DUFFELL SJ & HARKNESS JW (1985). Bovine virus diarrhoea-mucosal disease infection in cattle. *Vet. Rec.*, 117, 240–245.
- EDWARDS S (1990). The diagnosis of bovine virus diarrhoea-mucosal disease in cattle. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 9, 115–130.
- ELLIS JA, DAVIS CW, BELDEN EL and PRATT DL (1988). Flow Cytofluorimetric Analysis of Lymphocyte Subset Alterations in Cattle Infected with Bovine Viral Diarrhea Virus. *Vet. Pathol.* 25:231-236.
- FAUQUET CM, MAYO MA, MANILOFF J, DESSELBERGER U, BALL LA (2005). Virus Taxonomy. 8th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Academic Press*, New York.
- FELDMAN BF, ZINKL JG, JAIN NC. (2000). Schalm's Veterinary Hematology. 5th Ed., Lippincott Williams and Wilkins. A Wolters Company. Philadelphia, Baltimore, New York, London:1076.
- FLORES E F and Donis RO. (1995). Isolation of a mutant MDBK cell line resistant to bovine viral diarrhoea virus infection due to a block in viral entry. *Virology* 208:565–575.
- FLORES EF, KREUTZ LC, DONIS RO (1996). Swine and ruminant pestiviruses require the same cellular factor to enter bovine cells. *J Gen Virol*; 77: 1295-303.
- FLORES EF, RIDPATH JF, WEIBLEN R, VOGEL FS and GIL LH (2002). Phylogenetic analysis of Brazilian bovine viral diarrhoea virus type 2 (BVDV-2) isolates: evidence for a subgenotype within BVDV-2. *Virus. Res.* 87: 51-60.
- FRAY MD, MANN GE, BLEACH ECL, KNIGHT PG, CLARKE MC & CHARLESTON B. (2002). Modulation of sex hormone secretion in cows by acute infection with bovine viral diarrhoea virus. *Reproduction*, 123, 281-289.
- FREUND J. (1956). The mode of action immunological adjuvants. *Adv Tuberc Res*; 7: 50-5.
- FREY H.R. & EICKEN K. (1995). Untersuchungen über die Wirksamkeit einer inaktivierten BVD-Vakzine sur Erhöhung der Sicherheit einer BVD-Lebendvakzine. *Tierarztl. Umsch.*, 50, 86–93.

- FRITZMAYER J, HAAS L, LIEBLER E, MOENING V, GRIESERWILKE I (1997): The development of early vs. late onset mucosal disease is a consequence of two different pathogenic mechanisms. *Arch Virol*, 142, 1335-1350.
- FULTON RW, SALIKI JT, BURGE LJ, DOFFAY JM, BOLIN SR, MAES RK, BAKER JC & FREY ML (1997). Neutralizing antibodies to type-1 and type-2 bovine viral diarrhoea viruses – detection by inhibition of viral cytopathology and infectivity by immunoperoxidase assay. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 4, 380–383.
- FULTON RW, STEP DL, RIDPATH JF, SALIKI JT, CONFER AW, JOHNSON BJ, BRIGGS RE, HAWLEY RV, BURGE LB, PAYTON ME (2003) Response of calves persistently infected with noncytopathic bovine viral diarrhoea virus (BVDV) subtype 1b after vaccination with heterologous BVDV strains in modified live virus vaccines and Mannheimia haemolytica bacterin-toxoid. *Vaccine*; 21: 2980–2985.
- GAZYAĞCI S, AZKUR AK, ÇAĞLAYAN O (2010) Comparison of hematological and biochemical parameters in sheep naturally and persistently infected with a border disease virus. *Trop Anim Health Prod* DOI 10.1007/s11250-010-9754-4
- GAY J (2010). VM577 Vaccine Information Exercise. Erişim: [http://www.vetmed.wsu.edu/courses-jmgay/VM577VaccineExercise.htm] Erişim tarihi: 01.12.2010.
- GHIROTTI G, SEMPRONI G, DE MENEGHI D, MUNGABA FN, NANNINI D, CALZETTA G, PAGANICO G (1991) Seroprevalences of selected cattle disease in the Kafue flats of Zambia. *Vet. Res. Commun.*, 15, 26-36.
- GILBERT SA, BURTON KM, PRINS SE & DEREGT D (1999). Typing of bovine viral diarrhoea viruses directly from blood of persistently infected cattle by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 37, 2020–2023.
- GILLESPIE JH, LEE KM, BAKER JA, Mc ENTEE K. (1960). A cytopathogenic strain of virus diarrhoea virus. *Cornell Vet.* 50:73-79.
- GIVENS MD (2006). A clinical, evidence-based approach to infectious causes of infertility in beef cattle. *Theriogenology*; 66: 648–654.
- GIVENS MD, RIDDELL KP, WALZ PH, RHOADES J, HARLAND R, ZHANG Y, GALIK PK, BRODERSEN BW, COCHRAN AM, BROCK KV, CARSON RL & STRINGFELLOW DA (2007). Noncytopathic bovine viral diarrhoea virus can persist in testicular tissue after vaccination of peri-pubertal bulls but prevents subsequent infection. *Vaccine*, 25, 867–876.

- GONG Y, TROWBRIDGE R, MACNAUGHTON TB, et al. (1996). Characterization of RNA synthesis during a one-step growth curve and of the replication mechanism of bovine viral diarrhoea virus. *J Gen Virol* 77:2729-2736.
- GONG Y, SHANON A, WESTAWAY EG, et al. (1998). The replicative intermediate molecule of bovine viral diarrhoea virus contains multiple nascent strands, *Arch Virol* 143:399-404.
- GROOMS DL, BROCK KV & WARD LA (1998). Detection of bovine viral diarrhoea virus in the ovaries of cattle acutely infected with bovine viral diarrhoea virus. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 10, 125–129.
- GRUMMER B, BEER M, LIEBLER-TENORIO E, GREISER-WILKE I (2001). Localization of viral proteins in cells infected with bovine viral diarrhoea virus, . *J Gen Virol* 82:2597-605.
- GRUMMER B, BENDFELT S, WAGNER B, GREISER-WILKE I. (2002). Induction of the intrinsic apoptotic pathway in cells infected with cytopathic bovine virus diarrhoea virus. *Virus Res*; 90: 143-53.
- GÜLMEZOĞLU E, ERGÜVEN S (1994). İmmünoloji. Ankara: Hacettepe - Taş Kitapçılık. 287-9.
- GÜR S, AKÇA Y (2008). BVD seropozitif mandalarda IBR/IPV ve sığır vebasının seroepidemiolojisi. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 55, 45-50, 2008
- HABIBZADEH MDF, YADOLLAHIE MDM, ROSHANIPOOR BScM, HAGSHENAS MDM (2001). Derivation of blood hemoglobin Concentration from hematocrit: A simple method for rural areas. *Arch Irn Med*; 4(3): 120-122
- HAMEL AL, WASYLYSHEN MD & NAYAR GPS (1995). Rapid detection of bovine viral diarrhoea virus by using RNA extracted directly from assorted specimens and a one-tube reverse transcription PCR assay. *J. Clin. Microbiol.*, 33, 287–291.
- HARADA T, TAUTZ N, THIEL HJ. (2000). E2-p7 region of the bovine viral diarrhoea virus polyprotein: processing and functional studies. *J Virol*;74(20):9498-9506.
- HARASAWA R (1995). Adventitious pestivirus RNA in live virus vaccines against bovine and swine diseases. *Vaccine*, 13, 100–103.
- HEIMANN M, SOSA GR, MARTOGLIO B et al., (2006). Core protein of pestiviruses is processed at the C terminus by signal peptide peptidase. *J Virol*;80(4): 1915-1921.

- HENDRY DI. (1992) Identification of viral isolates by enzyme immunoassay. In: Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington: *American Society for Microbiology*,: 2: 8.1.1-8.1.9.
- HOUE H (1995) Epidemiology of bovine viral diarrhoea virus. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 11: 521-547.
- HOUE H (1999) Epidemiological features and economical importance of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections. *Veterinary Microbiology* 64, 89–107.
- HOWARD CJ, CLARKE MC & BROWNLIE J (1985) An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in cattle sera. *Vet. Microbiol.*, 10, 359–369.
- HOWARD CJ, CLARKE MC & BROWNLIE J (1989) Protection against respiratory infection with bovine virus diarrhoea virus by passively acquired antibody. *Vet. Microbiol.*, 19, 195–203.
- HOWARD CJ, CLARKE MC, SOPP P & BROWNLIE J (1994) Systemic vaccination with inactivated bovine virus diarrhoea virus protects against respiratory challenge. *Vet. Microbiol.*, 42, 171–179.
- HUNDELSHAUSEN PV, WEBER C (2007) Platelets as Immune Cells Bridging Inflammation and Cardiovascular Disease. *Circ Res.* 100:27-40.
- HYNDMAN L, VILCEK S, CONNER J, NETTLETON PF (1998) A novel nested reverse transcription PCR detects bovine viral diarrhoea virus in fluids from aborted bovine fetuses. *J. Virol. Methods* 71, 69–76.
- Institute of Veterinary Virology , University of Bern (2006) 2.1. The properties. Erişim: [<http://www.bvd-info.ch/veterinarians/properties.html>], Erişim tarihi: 12.04.2010.
- Institute of Veterinary Virology , University of Bern (2006) 2.2. Genotypes. Erişim: [<http://www.bvd-info.ch/veterinarians/properties.html>], Erişim tarihi: 12.04.2010.
- Institute of Veterinary Virology , University of Bern (2006) 2.4. The BVD-Genome. Erişim: [<http://www.bvd-info.ch/veterinarians/genome.html>], Erişim tarihi: 12.04.2010.
- Institute of Veterinary Virology , University of Bern (2006) 2.5. Replication. Erişim: [<http://www.bvd-info.ch/veterinarians/replication.html>], Erişim tarihi: 12.04.2010.

- IQBAL M, FLICK-SMITH H, and McCAULEY JW (2000) Interactions of bovine viral diarrhoea virus glycoprotein E(rns) with cell surface glycosaminoglycans. *J. Gen. Virol.* 81:451–459.
- IQBAL M, and Mccauley JW (2002) Identification of the glycosaminoglycan-binding site on the glycoprotein E(rns) of bovine viral diarrhoea virus by site-directed mutagenesis. *J. Gen. Virol.* 83:2153–2159.
- KATZ JB & HANSON SK (1987) Competitive and blocking enzyme-linked immunoassay for detection of fetal bovine serum antibodies to bovine viral diarrhea virus. *J. Virol. Methods*, 15, 167–175.
- KELLING CL (1996) Planning bovine viral diarrhea virus. *Veterinary Medicine*;9:858-866.
- KENSIL CR, WU J-Y, SOLTYSIK S (1995) Structural and immunological characterization of the vaccine adjuvant QS-21. In: Powell MF, Nevman MJ (eds). Vaccine design: the subunit and Adjuvant Approach. New York. Plenum Press;. p. 525-41
- KIM SG & DUBOVI EJ (2003) A novel simple one-step single-tube RT-duplex PCR method with an internal control for detection of bovine viral diarrhoea virus in bulk milk, blood, and follicular fluid samples. *Biologicals*, 31, 103–106.
- KIRKLAND PD, MACKINTOSH SG & MOYLE A (1994) The outcome of widespread use of semen from a bull persistently infected with pestivirus. *Vet. Rec.*, 135, 527–529.
- KOZASA T, TAJIMA M, YASUTOMI I, SANO K, OHASHI K, ONUMA M, (2005) Relationship of bovine viral diarrhea virus persistent infection to incidence of diseases on dairy farms based on bulk tank milk test by RT-PCR. *Vet. Microbiol.* 106, 41–47.
- LANGEDIJK JP, VAN VEELLEN PA, SCHAAPER WM, et al. (2002) A structural model of pestivirus E(rns) based on disulfide bond connectivity and homology modeling reveals an extremely rare vicinal disulfide. *J Virol*;76(20):10282-10392.
- LEE KM, GILLESPIE JH. (1957) Propagation of virus diarrhea virus of cattle in tissue culture. *Am J Vet Res.*;18:952-955.
- LETELLIER C, KERKHOF S P, WELLEMANS G, VANOPDENBOSCH E (1999) Detection and genotyping of bovine diarrhea virus by reverse transcription-polymerase chain amplification of the 5' untranslated region. *Vet. Microbiol.* 64, 155–167.
- LETELLIER C & KERKHOF S P (2003) Real-time PCR for simultaneous detection and genotyping of bovine viral diarrhea virus. *J. Virol. Methods*, 114, 21–27.

- LIANG R, VAN DEN HURK J V, LANDI A, LAWMAN Z, DEREGT D, TOWNSEND H, BABIUK LA. and VAN DRUNEN L, VAN DEN HS (2008) DNA prime–protein boost strategies protect cattle from bovine viral diarrhoea virus type 2 challenge. *Journal of General Virology*, 89, 453–466.
- LIESS B, FREY HR, ORBAN S, TRAUTWEIN G. (1987) Impact of intrauterin bovine viral diarrhoea (BVD) virus infection in cattle. *A Ű Vet Fak Derg.*;34(3):555-561.
- LINDBERG ALE & ALENIOUS S (1999). Principles for eradication of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections in cattle populations. *Vet. Microbiol.*, 64, 197–222.
- LINDBERG A, GROENENDAAL H, ALENIOUS S & EMANUELSON U (2001) Validation of a test for dams carrying foetuses persistently infected with bovine viral-diarrhoea virus based on determination of antibody levels in late pregnancy. *Prev. Vet. Med.*, 51, 199–214.
- LITTLEJOHNS IR (1985) Complications to the study of the relationship between bovine lymphocytic antigens and mucosal disease. In: Characterisation of the Bovine Immune System and the Genes Regulating Expression of Immunity with Particular Reference To their Role in Disease Resistance. Davis WC, Shelton JN, Weens CW (eds) Washington State University, Pullman, pp 179 – 190.
- LOEHR BI, FREY HR, MOENNIG V & GREISER WI (1998) Experimental induction of mucosal disease: consequences of superinfection of persistently infected cattle with different strains of cytopathogenic bovine viral diarrhoea virus. *Arch. Virol.*, 143, 667–679.
- LUZZAGO C, BANDI C, BRONZO V, RUFFO G, ZECCONI A (2001) Distribution pattern of bovine viral diarrhoea virus strains in intensive cattle herds in Italy. *Vet. Microbiol.* 83, 265–274.
- MAURER K, KREY T, MOENNIG V, THIEL HJ and RÜMENAPF T (2004) CD46 is a cellular receptor for bovine viral diarrhoea virus. *J. Virol.* 78:1792–1799.
- MOCKELIUNIENE V, SALOMSKAS A, MOCKELIUNAS R, PETKEVICIUS S (2004) Prevalence and epidemiological features of bovine viral diarrhoea virus infection in Lithuania. *Vet Microbiol*; 99: 51–57.
- MOENNIG V & LIESS B. (1995) Pathogenesis of intrauterine infections with bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Clin. North. Am.*, 11, 477–487.
- MURPHY FA, GIBBS EP, HORZINEK MC and STUDDERT MJ (1999) *Veterinary Virology*, London Academic Press, San Diego, USA.

- NAGAI M, HAYASHI M, SUGITA S, SAKODA Y, MORI M, MURAKAMI T, OZAWA T, YAMADA N and AKASHI H (2004) Phylogenetic analysis of bovine viral diarrhoea viruses using five different genetic regions. *Virus. Res.* 99: 103—113.
- NEATON HJ (1986) Which BVD vaccine should I use? *Vet. Med.*, 81, 876–881.
- NETTLETON PF (1990) Pestivirus infections in ruminants other than cattle, *Revue Scientifique et Technique de OIE.*, 9, 131.
- NISKANEN R (1993) Relationship between the levels of antibodies to bovine viral diarrhoea virus in bulk tank milk and the prevalence of cows exposed to the virus. *Vet. Rec.*, 133, 341–344.
- OBANDO RC, HIDALGO M, MEZRA M, MONTOYA A, KLINGEBORN B, MORENO-LOPEZ J (1999) Seroprevalence to bovine virus diarrhoea virus and other viruses of the bovine respiratory complex in Venezuela. *Prev Vet Med*; 41: 271–278.
- OBRITZHAUSER W, KLEMENS F, JOSEF K (2005) BVDV infection risk in the course of the voluntary BVDV eradication program in Styria/Austria. *Prev Vet Med.* 72, 1–2, 127–132.
- OGUZOGLU TC, MUZ D, YILMAZ V, ALKAN F, AKCA Y, BURGU I. (2010) Molecular characterization of Bovine virus diarrhoea viruses species 2 (BVDV-2) from cattle in Turkey. *Trop Anim Health Prod* 42,1175-80.
- ÖNCÜL S, MERİÇ I ve KORKUT F (1964) Türkiye’de ilk defa Lalahan Zootekni Araştırma Enstitüsü sığırlarında tespit edilen mucosal disease (Mukoza Hastalığı)’nın klinik yönü, *J Anim Breed Res Inst* 4: 186-199
- ÖZBAL Y (2006) Tüberküloz immünolojisi. *Erciyes Tip Dergisi (Erciyes Medical Journal)* 28 (1) 025-034.
- PANYAM J, LABHASETWAR V (2003) Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv Drug Deliv Rev*; 55: 329-47.
- PARK BK & BOLIN SR (1987) Molecular changes of bovine viral diarrhoea virus polypeptides treated with binary ethylenimine, beta-propiolactone and formalin. *Res. Rep. Rural Dev. Admin. (L&V) Korea*, 29, 99– 103.
- PATON DJ, GOODEY R, BROCKMAN S & WOOD L (1989) Evaluation of the quality and virological status of semen from bulls acutely infected with BVDV. *Vet. Rec.*, 124, 63–64.

- PATON DJ, IBATA G, EDWARDS S & WENSVOORT G (1991) An ELISA detecting antibody to conserved Pestivirus epitopes. *J. Virol. Methods*, 31, 315–324.
- PATON DJ, SANDS JJ, LOWINGS JP, SMITH JE, IBATA G, EDWARDS S (1995) A proposed division of the pestivirus genus using monoclonal antibodies, supported by cross-neutralisation assays and genetic sequencing. *Vet. Res.*, 26, 92–109.
- PELLERIN C, VAN DEN HURK J, LECOMTE J, TUSSEN P (1994) Identification of a new group of bovine viral diarrhoea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. *Virology* 203, 260–268.
- PERDRIZET JA, REBHUM WC, DUBOVI EJ and DONIS RO (1987) Bovine virus diarrhoea clinical syndromes in dairy herds, *Cornell Vet* 77,46-74.
- PETERHANS E, JUNGI TW, SCHWEIZER M (2003) BVDV and innate immunity. *Biologicals* 31, 107–111
- POTGIETER LN (1988) Immunosuppression in cattle as a result of bovine viral diarrhoea virus infection. *Agric. Pract.* 9, 7–19.
- PRATELLI A, MARTELLA V, CIRONE F, BUONAVOGLIA D, ELIA G, TEMPESTA M, BUONAVOGLIA C (2001) Genomic characterization of pestiviruses isolated from lambs and kids in southern Italy. *J. Virol. Methods* 94, 81–85.
- RAUE R, HARMEYER SS, NANJIANI IA (2010) Antibody responses to inactivated vaccines and natural infection in cattle using bovine viral diarrhoea virus ELISA kits: Assessment of potential to differentiate infected and vaccinated animals. *The Veterinary Journal*, doi:10.1016/j.tvjl.2009.12.013
- RENSHAW R W, RAY R, DUBOVI EJ (2000) Comparison of Virus Isolation and Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Assay for Detection of Bovine Viral Diarrhoea Virus in Bulk Milk Tank Samples. *J Vet Diagn Invest* 12:184–186
- REVELL SG, CHASEY D, DREW TW & EDWARDS S (1988) Some observations on the semen of bulls persistently infected with bovine virus diarrhoea virus. *Vet. Rec.*, 123, 122–125.
- RIDPATH JF, BOLIN SR and DUBOVI EJ (1994) Segregation of bovine viral diarrhoea virus into genotypes. *Virology* 205: 66-74.

- RIDPATH JF, BOLIN SR (1995) The genomic sequence of a virulent bovine viral diarrhoea virus (BVDV) from the type 2 genotype: detection of a large genomic insertion in a noncytopathic BVDV. *Virology* 212, 39–46.
- RIDPATH JF, BOLIN SR (1998) Differentiation of types 1a, 1b and 2 bovine viral diarrhoea virus (BVDV) by PCR. *Mol. Cell Probes* 12, 101–106.
- RIDPATH JF, HIETALA SK, SORDEN S, NEILL JD (2002) Evaluation of the reverse transcription-polymerase chain reaction/probe test of serum samples and immunohistochemistry of skin sections for detection of acute bovine viral diarrhoea infections. *J. Vet. Diagn. Invest.* 14, 303–307.
- ROEDER PL and HARKNESS JW (1986) BVD virus infection: Prospects of control, *Vet Rec*, 143-147.
- RUTH GR (1987) Bovine viral diarrhoea: a difficult infection to diagnose. *Vet. Med.*, 81, 870–874.
- SANDVIK T (1999) Laboratory diagnostic investigations for bovine viral diarrhoea virus infections in cattle. *Vet Microbiol*; 64: 123–134.
- SAUPE A, McBURNEY W, RADES T, HOOK S (2006) Immunostimulatory colloidal delivery systems for cancer vaccines. *Expert Opin Drug Deliv*; 3: 345-54
- SCHEERLINCK JP, GLOSTER S, GAMVRELLIS A, MOTTRAM PL, PLEBANSKI M. (2006) Systemic immune responses in sheep, induced by a novel nano-bead adjuvant. *Vaccine*; 24: 1124-31.
- SHAYKHIEV R, BALS R (2007) Interactions between epithelial cells and leukocytes in immunity and tissue homeostasis. *Journal of Leukocyte Biology Volume* 82.
- SIMON JK, EDELMAN R (2006) Clinical evaluation of adjuvants, in: V.E.J.C. Schijns, D.T. O'Hagan (eds). *Immunopotentiators in Modern Vaccines*. Burlington, MA. Academic Press;. p. 319.
- SKENE CD, SUTTON P (2006) Saponin-adjuvanted particulate vaccines for clinical use. *Methods*; 40: 53-9.
- STARK R, MEYERS G, RÜMENAPF T et al. (1993) Processing of pestivirus polyprotein: cleavage site between autoprotease and nucleocapsid protein of classical swine fever virus. *J Virol*;67(12):7088-7095.

- STEFFENS S, THIEL HJ, BEHRENS SE (1999) The RNA-dependent RNA polymerases of different members of the family *Flaviviridae* exhibit similar properties in vitro. *J Gen Virol*;80(Pt 10):2583-2590.
- SUSAN VM, ONUMA M, AGUILAR RE, MURAKAMI Y (1983) Prevalence of bovine herpesvirus-1, parainfluenza-3, bovine rotavirus, bovine viral diarrhoea, bovine adenovirus-7, bovine leucemia virus and bluetongue virus antibodies in cattle in Mexico, *Jap. J. Vet. Res.*, 31, 125-132.
- TAJIMA M, FREY HR, YAMATO O, MAEDE Y, MOENNIG V, SCHOLZ H and GREISER-WILKE I (2001) Prevalence of genotypes 1 and 2 of bovine viral diarrhoea virus in Lower Saxony, Germany. *Virus. Res.* 76: 31^2.
- THIEL HJ, STARK R, WEILAND E et al., (1991) Hog cholera virus: molecular composition of virions from a pestivirus. *J Virol*;65(9):4705-4712
- THIEL H J, PLAGEMANN PGW and MOENNIN V (1996) Pestiviruses. pp. 1059-1073. *In: Fields Virology* (Fields, B. N., Knipe, D. M., Howley, P. M., et al., ed), Lippincott – Raven Philadelphia.
- THIEL HJ, COLETT MS, GOULD EA, HEINZ FX, HOUGHTON M, MEYERS G, PURCELL RH and RICE CM (2005) *Flaviviridae*. pp. 981-998. *In: Virus Taxonomy Eighth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses* (Fanquet, C. M., Mayo, M. A., Maniloff, J., Desselberger, U. and Ball, L. A. eds.), Elsevier, San Diego.
- TOPLAK I, SANDVIK T, BARLIC-MAGANJA D, GROM J, PATON D, (2004) Genetic typing of bovine viral diarrhoea virus: most Slovenian isolates are of genotypes 1d and 1f. *Vet. Microbiol.* 99, 175–185.
- TRAUTWEIN G, HEWICKER M, LIESS B, ORBAN S & GRUNERT E (1986) Studies on transplacental transmissibility of a bovine virus diarrhoea (BVD) vaccine virus in cattle. III. Occurrence of central nervous system malformations in calves born from vaccinated cows. *J. Vet. Med.*, B33, 260–268.
- TREMBLAY R (1996) Transmission of bovine viral diarrhoea virus. *Veterinary Medicine* 858-864.
- TSUBOI T, OSAWA T, KIMURA K, KUBO M, HARITANI M (2010) Experimental infection of early pregnant cows with bovine viral diarrhoea virus: Transmission of virus to the reproductive tract and conceptus. *Res Vet Sci.* May 28

- VANROOSE G, NAUWYNCK H, VAN SOOM A, VANOPDENBOSCH E & DE KRUIF A (1998) Replication of cytopathic and noncytopathic bovine viral diarrhoea virus in zona-free and zona-intact *in vitro*-produced bovine embryos and the effect on embryo quality. *Biol. Reprod.*, 58, 857–866.
- VILCEK S, HERRING AJ, HERRING JA, NETTLETON PF, LOWINGS JP, PATON DJ (1994) Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. *Arch. Virol.* 136, 309–323
- VILCEK S, PATON DJ, DURKOVIC B, STROJNY L, IBATA G, MOUSSA A, LOITSCH A, ROSSMANITH W, VEGA S, SCICLUNA MT and PAIFI V (2001) Bovine viral diarrhoea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups. *Arch. Virol.* 146:99-115.
- VILCEK S, DURKOVIC B, KOLESÁROVÁ M, GREISER-WILKE I, PATON D (2004) Genetic diversity of international bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates: identification of a new BVDV-1 genetic group. *Vet Res.* 35(5):609
- VOGELZANG A, McGUIRE HM, YU D, SPRENT J, MACKAY CR, and KING C (2008) A Fundamental Role for Interleukin-21 in the Generation of T Follicular Helper Cells. *Immunity* 29, 127–137.
- VOGES H, HORNER GW, ROWE S & WELLENBERG GJ (1998) Persistent bovine pestivirus infection localized in the testes of an immuno-competent, non-viremic bull. *Vet. Microbiol.*, 61, 165–175.
- WALZ PH, BELL TG, STEFICEK BA, KAISER L, MAES RK, BAKER JC (1999) Experimental model of type II bovine viral diarrhoea virus-induced thrombocytopenia in neonatal calves. *J Vet Diagn Invest* 11:505–514.
- WALZ PH, BELL TG, GROOMS DL, KAISER L, MAES RK & BAKER JC (2001) Platelet aggregation responses and virus isolation from platelets in calves experimentally infected with type 1 or type II bovine viral diarrhoea virus. *Can. J. Vet. Res.*, 65, 241–247.
- WEILAND E, STARK R, HAAS B, et al. (1990) Pestivirus glycoprotein which induces neutralizing antibodies forms part of a disulfide-linked heterodimer. *J Virol*; 64(8):3563-3569.
- WILHELMSSEN CL, BOLIN SR, RIDPATH JF, CHEVILLE FN & KLUGE JP (1991) Lesions and localization of viral antigen in tissues of cattle with experimentally induced or naturally acquired mucosal disease, or with naturally acquired chronic bovine viral diarrhoea. *Am. J. Vet. Res.*, 52, 269–275.

- WILLEKENS FLA, ROERDINKHOLDER-STOELWINDER B, GROENEN-DÖPP YAM, BOS HJ, BOSMAN GJCGM, VAN DEN BOS AG, VERKLEIJ AJ and WERRE JM (2003) Hemoglobin loss from erythrocytes in vivo results from spleen-facilitated vesiculation *Blood*, Volume 101, Number 2.
- WILLOUGHBY K, VALDAZO-GONZ'ALEZ B, MALEY M, GILRAY J and NETTLETON PF (2006) Development of a real time RT-PCR to detect and type ovine pestiviruses. *Journal of Virological Methods* 132, 187–194
- WOLFMAYER A, WOLF G, BEER M, STRUBE W, HEHNEN HR, SCHMEER N, KAADEN OR (1997) Genomic (5'-UTR) and serological differences among German BVDV field isolates. *Arch. Virol.* 142, 2049–2057.
- WOODS GT, MANSFIELD ME and KRONE JA (1970) Controlled Field Study Using Live Virus Vaccines and an Antiserum in a Preconditioning Program. *Can. J. Com. Med.*
- YAMANE D, NAGAI M, OGAWA Y, TOHYA Y, AKASHI H (2005) Enhancement of apoptosis via an extrinsic factor, TNF- α , in cells infected with cytopathic bovine viral diarrhoea virus. *Microbes and Infection.*;7:1482-1491.
- YESİLBAG K, FÖRSTER C, BANK-WOLF B, YILMAZ Z, ALKAN F, OZKUL F, BURGU I, CEDILLO ROSALES S, THIEL HJ, KÖNIG M (2008) Genetic Heterogeneity of Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) Isolates from Turkey: Identification of a New Subgroup in BVDV-1. *Vet. Microbiol.* 130, 258-267.
- ZOTH SC and TABOGA O (2006) Multiple recombinant ELISA for the detection of bovine viral diarrhoea virus antibodies in cattle sera. *J Virol Methods*; 138: 99–108.

ÖZGEÇMİŞ

1979 yılında Denizli’de doğdu. Denizli Ahmet Nuri Özsoy İlkokulu’ndan 1990 yılında, Cumhuriyet Lisesi orta kısmından 1993 yılında, lise kısmından ise 1996 yılında mezun oldu. Aynı yıl üniversite sınavını kazanıp, Lisans eğitimini 19 Mayıs Üniversitesi Eğitim Fakültesi, Biyoloji Bölümü’nde 2000 yılında tamamladı. 2008 yılında Mikrobiyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladı.