



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
VETERİNERLİK VİROLOJİ ANABİLİM DALI

**KARADENİZ BÖLGESİ'NDEKİ RUMİNANTLARDA  
BORDER DİSEASE EPİDEMİYOLOJİSİ**

**DOKTORA TEZİ**

**Ayhan AKMAN**

**Samsun  
Haziran-2019**





ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
VETERİNERLİK VİROLOJİ ANABİLİM DALI

**KARADENİZ BÖLGESİ'NDEKİ RUMİNANTLARDA  
BORDER DİSEASE EPİDEMİYOLOJİSİ**

**DOKTORA TEZİ**

**Ayhan AKMAN**

**Danışman  
Prof. Dr. Semra GÜMÜŞOVA**

**Samsun  
Haziran-2019**

T.C.  
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ayhan AKMAN tarafından Prof. Dr. Semra GÜMÜŞOVA Danışmanlığında hazırlanan “Karadeniz Bölgesi’ndeki Ruminantlarda Border Disease Epidemiyolojisi” başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından 21/06/2019 tarihinde yapılan sınav ile Viroloji Anabilim Dalında DOKTORA Tezi olarak kabul edilmiştir.

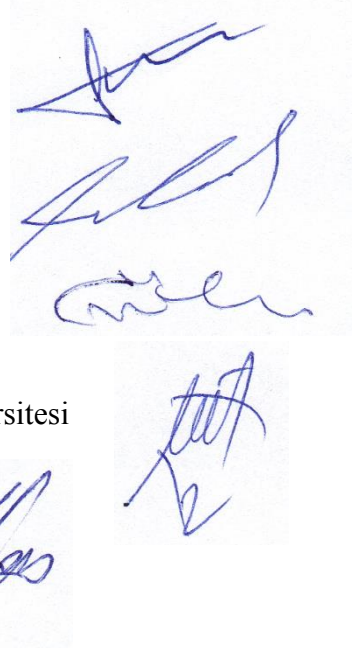
Başkan : Prof.Dr. Semra GÜMÜŞOVA. Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Üye : Prof.Dr. Harun ALBAYRAK. Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Üye : Prof.Dr. Gül Fatma YARIM. Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Üye : Prof.Dr. Yakup YILDIRIM. Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi

Üye : Prof.Dr. Kezban CAN ŞAHNA. Fırat Üniversitesi



ONAY

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleritarafından uygun görülmüştür.

.... / .... / .....

**Prof. Dr. Ahmet UZUN**  
**Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü**

## TEŞEKKÜR

Öncelikle doktora eğitimine başladığım Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı'nın bir üyesi olmaktan onur ve gurur duyduğumu belirtmek isterim.

Uzun doktora eğitimim boyunca desteklerini benden esirgemeyen başta tez danışmanın Prof. Dr. Semra GÜMÜŞOVA ile Prof. Dr. Zafer YAZICI'ya, Prof. Dr. Harun ALBAYRAK'a ve Prof.Dr. Gül Fatma YARIM'a katkılarından dolayı çok teşekkür ederim.

Doktora eğitimim süresince teşvik ve desteklerini her daim gördüğüm Samsun Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürü İsmail Aydın'a, Dr. Hamza KADI'ya, Dr. Yunus KILIÇOĞLU'na, şefliğini yapmış olduğum Bakteriyolojik Teşhis Laboratuvarı ile Numune Kabul ve Raporlama Birimi personeline, Prof. Dr. Elif SEVİM'e, Araştırma Görevlisi Cüneyt TAMER'e ve bu sürece beraber başladığımız Dr. A. Anıl ÇAĞIRGAN'a çok teşekkür ederim.

Son olarak, eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi desteğini esirgemeyen aileme, arkadaşlarıma ve eşim Aysun AKMAN'a çok teşekkür ederim.

Bu çalışma, PYO.VET.1904.17.003 proje numarası ile Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Komisyonu Başkanlığı tarafından desteklenmiştir.

## ÖZET

### KARADENİZ BÖLGESİ'NDEKİ RUMİNANLARDA BORDER DİSEASE EPİDEMİYOLOJİSİ

**Amaç:** Bu tezin amacı Karadeniz Bölgesi'nde koyun ve keçilerde BDV verilerini güncellemek, Türkiye' de ilk kez sığırlarda BDV' nin prevalansını ortaya koymak ve bölgede sığır, koyun ve keçilerde sirküle olan genotipi tespit etmektir.

**Materyal ve Metot:** Bu tez kapsamında 2015-2017 yılları arasında Samsun Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü'ne bölge illerinden gönderilen 100 adet koyun, 20 adet keçi ve 193 adet sığır abort materyali BDV yönünden ELISA ve RT-PCR tekniği ile incelenmiştir.

**Bulgular:** Yapılan Ag-ELISA sonucu sığırlarda %50,26 (97/193), koyunlarda %58 (58/100) ve keçilerde %55 (11/20) oranında pestivirus yönünden pozitiflik tespit edilmiştir. Aynı örneklerde BDV problemleri kullanılarak yapılan Real Time RT-PCR testi sonucu sadece 1 adet koyunda (%1) BDV pozitif tespit edilmiş olup 324/326 panpesti primerleri ve PBD1/PBD2 BDV spesifik primerleri ile yapılan konvansiyonel RT-PCR ile 3 adet koyunda (%3) ve 1 adet sığırdan (%0,52) BDV pozitif sonuç elde edilmiştir. Keçilerde ise pozitiflik belirlenmemiştir. Ayrıca RT-PCR ile koyun abortlarından pozitif bulunan örneklerden yapılan filogenetik dizi analizi sonucunda incelenen bölgede sirküle olan 2 farklı genotip (BDV-3 ve BDV-7) olduğu da ortaya konmuştur. Ancak sığırdan elde edilen pozitif örnek, filogenetik dizi analizi sonucunda BVD-1 olarak belirlenmiştir.

**Sonuç:** Bu tez çalışması sonucunda sığırlarda pestivirus varlığı araştırılırken BDV'nin de dikkate alınması gerektiği görülmektedir. Abort materyallerde pestivirusların tespitinde Ag-ELISA testi yerine daha duyarlı bir test olan RT-PCR yönteminin kullanılması önem arz etmektedir. Yerli suşlarımız kullanılarak yapılacak primer ve probe dizaynı ile yeni bir Real-Time RT-PCR panelinin optimize edilmesine ihtiyaç olduğu da bu çalışmadan çıkarılacak bir diğer önemli sonuçtur.

**Anahtar Kelimeler:** Abort; BDV; Karadeniz Bölgesi; keçi; koyun; sığır

**Ayhan AKMAN, Doktora Tezi**

**Ondokuz Mayıs Üniversitesi – Samsun, Haziran-2019**

## ABSTRACT

### BORDER DISEASE EPIDEMIOLOGY IN RUMINANTS IN THE BLACK SEA REGION

**Aim:** The aim of this thesis is update the BDV data in sheep and goats in the Black Sea region, determine the prevalence of BDV in cattle for the first time in Turkey and identify the genotype circulated in cattle, sheep and goats in the region.

**Material and Method:** For this purpose, 100 sheep, 20 goats and 193 cattle abort materials sent from the regional provinces to Samsun Veterinary Control Institute between 2015-2017 were analyzed in terms of BDV by ELISA and RT-PCR technique.

**Results:** The results of Ag-ELISA were found to be positive for cattle with a rate of 50.26% (97/193), in sheep with 58% (58/100) and in goats with a rate of 55% (11/20) in terms of pestivirus. RealTime RT-PCR test was performed with the same samples by BDV probes, and BDV positive was detected in only 1 sheep (1%) and 324/326 panpest primers and PBD1 / PBD2 were performed with conventional RT-PCR in 3 sheeps (3%). and BDV positive result was obtained in 1 cattle (0.52%). No positivity was determined in goats. In addition, two different genotypes (BDV-3 and BDV-7) were found to be circulated in the investigated area as a result of phylogenetic sequence analysis performed with samples found positive from sheep abortions by RT-PCR. However, the positive sample obtained from cattle was determined as BVD-1 after phylogenetic sequence analysis.

**Conclusion:** As a result of this study, it is seen that BDV should be taken into consideration while searching for the presence of pestivirus in cattle. In the detection of pestiviruses in abort materials, it is important to use the RT-PCR test which is a more sensitive test rather than Ag-ELISA test. Another important result of this study is the need to optimize a new Real-Time RT-PCR panel with primary and probe design using our native strains.

**Key Words:** Abort; BDV; Black Sea Region; cattle; goat; sheep

Ayhan AKMAN (Ph. D. Thesis)

Ondokuz Mayıs University – Samsun, June – 2019

## SİMGELER VE KISALTMALAR

<b>aa</b>	: Aminoasit
<b>BD</b>	: Border Disease
<b>BDV</b>	: Border Disease Virus
<b>BVD</b>	: Bovine Viral Diarrhea Virus
<b>cp</b>	: Sitopatojenik
<b>cpe</b>	: Sitopatik efekt
<b>CSFV</b>	: Klasik Domuz Vebası Virus
<b>ELISA</b>	: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
<b>IFA</b>	: Immunofloresan Değerlendirme
<b>mAbs</b>	: Monoklonal Antikorlar
<b>MLV</b>	: Modified Live Virus
<b>MSS</b>	: Merkezi Sinir Sistemi
<b>N<sup>pro</sup></b>	: Nonstructural autoprotease
<b>non-cp</b>	: Non-sitopatojenik
<b>nRT-PCR</b>	: Nested Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
<b>OIE</b>	: World Organization For Animal Health
<b>ORF</b>	: Açık Okuma Bölgesi
<b>PI</b>	: Persiste Enfekte
<b>RNA</b>	: Ribonucleic Acid
<b>RT-PCR</b>	: Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction
<b>SFT-R</b>	: Sheep Tyhmus Cell Line
<b>VNT</b>	: Virus Nötralizasyon Testi
<b>5' UTR</b>	: 5' Untranslated Region
<b>%</b>	: Yüzde
<b>µl</b>	: Mikrolitre
<b>bç</b>	: Baz çifti
<b>C</b>	: Santigrat
<b>kb</b>	: Kilo Base Pair
<b>g</b>	: Gram
<b>ml</b>	: Mililitre
<b>nm</b>	: Nanometre



° : Derece  
**rpm** : Rounds Per Minute  
**V** : Volt



## İÇİNDEKİLER

<b>TEŞEKKÜR</b> .....	iii
<b>ÖZET</b> .....	iv
<b>ABSTRACT</b> .....	v
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR</b> .....	vi
<b>1.GİRİŞ</b> .....	1
<b>2.GENEL BİLGİLER</b> .....	3
2.1. Etiyoloji .....	4
2.1.1. Sınıflandırma .....	4
2.1.2. Genom özellikleri .....	6
2.1.3. Morfoloji.....	9
2.2. Epidemiyoloji .....	10
2.3. Bulaşma .....	12
2.4. Patogenez.....	13
2.5. Klinik Semptomlar ve Patolojik Değişiklikler .....	14
2.5.1. Akut Enfeksiyon.....	14
2.5.2. Fötal enfeksiyon .....	16
2.5.3. Persiste Enfeksiyon .....	18
2.6. Teşhis.....	20
2.6.1. Konvansiyonel Teknikler .....	22
2.6.2. Moleküler Teknikler.....	23
2.7. Koruma ve Kontrol.....	25
2.8. Amaç.....	26
<b>3.MATERYAL VE METOT</b> .....	27
3.1. Materyal.....	27
3.1.1. Virus .....	27

3.1.2. ELISA Kiti.....	27
3.1.3. RNA Ekstraksiyon Kiti.....	27
3.1.4. RT-PCR Kiti.....	27
3.1.5. Sekans Cihazı .....	28
3.1.6. Abort Materyalleri .....	28
3.2. Metot.....	30
3.2.1. Numunelerin İşlenmesi.....	30
3.2.2. Numunelerde Pestivirus Antijenin (Ag-ELISA Testi ile) Belirlenmesi.....	30
3.2.3. RT-PCR .....	31
RNA Ekstraksiyon İşlemi.....	32
PCR Aşamaları .....	32
Konvansiyonel PCR Ürünlerinin Görüntülenmesi .....	34
3.2.4. Elde Edilen Suşların Genotipinin Belirlenmesi.....	34
3.2.5. Veri Analizi .....	35
<b>4.BULGULAR.....</b>	<b>36</b>
4.1. Pestivirus Ag-ELISA Sonuçları .....	36
4.2. RT-PCR Sonuçları.....	37
4.2.1. BDV Real Time RT-PCR Sonuçları.....	37
4.2.2. BDV Konvansiyonel RT-PCR Sonuçları .....	38
4.2.3. Sekans Sonuçları .....	41
<b>5.TARTIŞMA.....</b>	<b>46</b>
<b>6.SONUÇ VE ÖNERİLER .....</b>	<b>53</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>55</b>
<b>EKLER .....</b>	<b>69</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>74</b>

## 1. GİRİŞ

Border disease virusu (BDV) *Flaviviridae* ailesi içerisinde yer alan bir *Pestivirus*'tur ve Klasik domuz vebası virusu (CSFV) , Bovine viral diarrhea virusu (BVDV) ile yakın ilişkilidir. Resmi olarak tanınan dört tür vardır; CSFV, BVDV tip 1 ve 2 ve de BDV (ICTV, 2016). CSFV baskın bir şekilde domuzlar ile sınırlı iken, diğer üç türün tamamı koyunlarda tespit edilmiştir. Diğer türlerden ayrı olarak yetiştirilen koyun ve keçilerin buldukları bölgelerde izolatların çoğu BDV olarak tanımlanırken, küçük ruminantlarla sığırlar arasında yakın temasın olduğu bölgelerde BVDV sıklıkla tanımlanabilir (Carlsson, 1991; Vilcek ve ark., 1997). Nadiren sitopatik BDV izole edilse de, çoğu kez nonsitopatik BDV izole edilmektedir (Vantsis ve ark., 1976).

BDV vertikal ve oro-nasal yolla koyunlar arasında doğal bir şekilde yayılır. Koyun ve keçilerde konjenital enfeksiyonun başlıca bir nedenidir. Ancak akut ve persiste enfeksiyona neden olabilir (OIE, 2017). Koyun, keçi ve Pirene dağ keçilerinden elde edilen BD viruslarının birkaç genotipi tanımlanmıştır. Nükleotid sekans analizleri kullanılarak yapılan filogenetik analizler, BD virusları arasındaki genetik çeşitliliğin diğer pestivirusgenotiplerinin her birinden daha fazla olduğunu göstermektedir. Tunus koyunu ve bir keçiden elde edilen pestivirusgenotiplerinin yanı sıra BDV'nin sekiz farklı genotip tanımlanmıştır (Becher ve ark., 2003; Vilcek ve Nettleton, 2006; Peterhans ve ark., 2010; Vilcek ve ark., 2014; Peletto ve ark., 2016). Bu suşlar yetişkin hayvanlarda klinik belirti, abort oranı ve konjenital anomaliler bakımından virulans farklılıkları gösterirler (Chappuis ve ark., 1984; Nettleton ve ark., 1992; Bethune, 2015). Ruminant pestivirusları olarak bilinen BVD'ye sebep olan BVDV ve BD'ye sebep olan BDV ortak antijenik özelliklere sahiptir (Schweizer ve Peterhans, 2014; Braun ve ark., 2015).

BVDV tüm dünyada sığırlarda yaygın ve ekonomik önemi olan bir patojendir (Walz ve ark., 2010; Schweizer ve Peterhans, 2014). BDV enfeksiyonlarının da dünya çapında meydana geldiği ve küçük ruminant popülasyonunda önemli kayıplara neden olduğunu bildirilmiştir (Arnal ve ark., 2004; De Mia ve ark., 2005; Thabti ve ark., 2005; Valdazo-Gonzalez ve ark.; 2007). Türkiye'de yakın bir geçmişe kadar BDV ve BVDV ayrımı yapılmaksızın ortak antijene karşı hazırlanmış pestivirus ELISA kitleri ile yapılan pestivirus çalışmalarında %0,93-74,38 aralığında pestivirus varlığı bildirilmiştir

(Çokçalışkan, 2000; Burgu ve ark., 2001; Ataseven ve ark., 2006; Okur Gumusova ve ark., 2006; Yazıcı ve ark., 2012).

BDV, koyun ve keçi populasyonları için önemli bir risk oluşturmanın yanı sıra sığır populasyonlarında da saptanmış ve O'Neill ve ark. (2004) İrlanda'da, Lunden ve ark. (1992) İsveç'te, pestivirus bulaşının büyük ölçüde sığırlardan koyunlara geçtiğini belirtmişlerdir. Carlsson (1991) ise gebe koyunların BVDV PI (persiste enfekte) buzağılara maruz kalmasından dolayı iki BDV salgını tespit etmiş ve bu tür bir çapraz-tür geçişini deneysel olarak yeniden ortaya koymuştur. BVDV-2' nin ise dört İspanyol koyun sürüsünde abort salgınlarının nedeni olarak tanımlanmıştır (Elvira-Partida ve ark., 2017).

Ayrıca enfeksiyonun koyunlardan sığırlara bulaşarak abort, persiste enfeksiyonlar ve infertiliteye neden olduğu da bildirilmiştir, hatta BVDV' nin eradike edilebilmesi için sığırlarda BDV varlığının belirlenmesinin gerekliliği de vurgulanmıştır (McFadden ve ark., 2012).

Border disease, genellikle kuzularda düşük yaşam şansı ve doğum ağırlığı olan yavru doğumları, köpek kılı görünümü ve tremorlarla karakterize kongenital hastalıklara neden olmaktadır (Monies ve ark., 2004). Hastalık keçi yavrularında da kuzulardakine benzer vücutta tremorlar, sıçrama ve yürümede zorluklar ile karakterize klinik semptomlar meydana getirmektedir (Loken ve ark., 1982). Çin'de ishalleri keçi yavrularının barsak numunelerinde de BDV varlığı tespit edilmiştir (Li ve ark., 2013a). Ayrıca, BDV enfeksiyonunun gebe keçilerde de abort, fütusta ve yeni doğanlarda malformasyonlarla sonuçlandığı bildirilmiştir (Depner ve ark., 1990; Wohlsein ve ark., 1992).

Bu tez çalışmasının amacı Karadeniz Bölgesi'nde sığır, koyun ve keçilerde BDV prevalansını ELISA ve RT-PCR testleri ile ortaya koymak, bölgede sirküle olan genotipi belirlemek ve abort olmuş fütüslarda Ag-ELISA ve RT-PCR uygulamasını karşılaştırarak etkinliğini araştırmaktır.

## 2. GENEL BİLGİLER

Border disease, BDV'nin neden olduğu koyun ve keçilerin önemli bir viral enfeksiyonudur. BD ilk olarak 1959 yılında Galler ve İngiltere arasındaki sınır bölgesindeki koyunlarda bildirilmiştir (Hughes ve ark., 1967). Enfekte koyun sürülerinde başlıca klinik belirtiler kısırılık, abort, erken doğum, zayıf ve güçsüz kuzu doğumlarıdır. Etkilenen kuzularda tremor, anormal vücut şekli ve 'Hairy Shaker Sendromu' ( köpek kılı görünümü veya karışık tüylü görünüm) gözlemlenmektedir. Bu nedenle bu hastalık 'Hairy Shaker Hastalığı' olarak da tanımlanmaktadır. Kuzuların intrauterin enfeksiyonları abort ve erken doğumun yanı sıra merkezi sinir sistemi (MSS) hipomyelinasyonu ve PI hayvanlarda Hairy Shaker Sendromu olan kıl tabakasının anormal oluşumuna neden olabilmektedir (Nettleton ve ark, 1992; Nettleton ve ark., 1998). BD dünya çapında yaygın bir hastalık olup koyunlarda prevalans oranları ülkeler arasında ve ülkelerde bölgeden bölgeye %5'ten %50'ye kadar değişiklik göstermektedir (Nettleton ve Willoughby, 2010). Vertikal bulaşma bu hastalığın epidemiyolojisinde önemli bir rol oynamaktadır. Fötüsün enfeksiyonu PI kuzuların doğumu ile sonuçlanabilir. Bu PI kuzular viremik, antikör negatif ve sürekli olarak virüsü saçarlar. Keçilerde enfeksiyonun asıl belirtisi olan abortlar daha az görülmektedir (OIE, 2017).

Bir koyun sürüsünde MSS ve yapağıdaki konjenital anomaliler, zayıf kuzuların doğumu, erken doğum, abort, yüksek kısırılık oranlarının varlığı ve enfeksiyöz hastalıkların normalden daha yüksek oranlarda seyretmesi BD için potansiyel indikatörlerdir. Hairy Shaker Sendromu'nun yokluğu ovine pestivirus enfeksiyonu ihtimalini ortadan kaldırmaz (Bonniwell ve ark., 1987).

BD dünyanın bazı bölgelerinde özellikle koyun, keçi ve sığırların arasında daha yakın temasın olduğu yerlerde BVDV'nin neden olduğu hastalıklardaki aynı klinik belirtileri gösterir. Bu nedenle BDV ve BVDV arasındaki genetik ve antijenik farkları, hastalık salgınları araştırılırken veya uluslararası transferde gen kaynakları ve hayvanlar sertifikalandırılırken dikkate alınmasına gerek vardır. Viremik PI hayvanların tespit edilmeleri önem arz etmektedir. Bunun sonucunda pozitif tespit edilen hayvanlar damızlık ve ticari amaçlı kullanılmayacaklardır (OIE, 2017).

## 2.1. Etiyoloji

### 2.1.1. Sınıflandırma

BDV *Flaviviridae* ailesi içerisinde *Pestivirus* genusuna dahil olup helikal simetrik, zarflı, pozitif anlamlı tek iplikçikli RNA (+ssRNA) virusudur. BDV'nin yanı sıra, *Pestivirus* genusu, çiftlik hayvanları hastalıklarından sorumlu olan üç türü de (BVDV-1, BVDV-2 ve CSFV) içermektedir (Paton, 1995). Bu viruslar fiziksel, kimyasal ve biyolojik karakteristikleri açısından ortak özelliklere ve kısmen de ortak antijenlere sahiptirler. Bu virusların türler arasında enfeksiyona neden oldukları teyit edilmiştir. Pestiviruslara karşı oluşan antikorlar sığır, koyun ve keçinin de dahil olduğu kırktan fazla ruminant türünde tespit edilmiştir ve türler arası enfeksiyon geçişleri de gözlemlenmiştir (Hamblin ve Hedger, 1979).

Tarihsel olarak, *Pestivirus* genusu içerisinde yer alan viruslar konakçı türü orijinlerine göre isimlendirilmiş ve sınıflandırılmıştır. BDV konakçıları koyun ve keçiler olup BVDV-1 ve BVDV-2 sığır türü ile ilişkilidir. CSFV ise domuzları enfekte etmektedir (Becher ve ark., 1997). Önceki sınıflandırma sisteminin ciddi sınırlamaları vardı ve pratik uygulamalarda yetersiz kalmaktaydı. O nedenle daha sonra pestivirusların türler arasındaki çapraz enfeksiyonları kolay bir şekilde tespit edilebilmiştir. Bu durum, kontamine fetal dana serumundan tespit edilen, sığır kaynaklı 'Hobi-like' pestiviruslarının dahil olduğu birçok sınıflandırılmamış pestivirusların son yıllarda keşfedilmesi ile açıkça ortaya konulmuştur (Schirrmeyer ve ark., 2004; Stalder ve ark., 2005; Ståhl ve ark., 2007; Mao ve ark., 2012). Ayrıca bunlara antiloptan tespit edilen pestivirus ile domuzdan tespit edilen Bungowannah virusu da örnek gösterilebilir (Vilcek ve ark., 2005; Kirkland ve ark., 2007).

Pestivirusların genotiplendirilmesi ve filogenetik analizi pestivirus gruplandırılmasında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Tiplendirme, orijinal virusların sınıflandırılması ve bu virusların evrimsel geçmişinin açığa çıkarılması için çok önemlidir. GenBank'tan N<sup>pro</sup> ve/veya 5'UTR (untranslated region) bölgelerinin sekanslarının filogenetik çalışmaları temel alındığında, BDV izolatları sekiz filogenetik gruba ayrılmaktadır (Strong ve ark., 2010; Giammarioli ve ark., 2011; Peterhans ve ark., 2010). BDV-1 ABD, İngiltere, Avustralya ve Yeni Zelanda'da bir koyundan izole edilmiştir (Becher ve ark., 1994; Sullivan ve ark., 1997; Vilcek ve ark., 1997; Vilcek ve ark., 1998). BDV-2, BDV-3 ve BDV-4 Avrupa'da, BDV-5 ve BDV-6 ise Fransa'da

izole edilmiştir (Becher ve ark., 2003; Stalder ve ark., 2005; Krametter-Froetscher ve ark., 2007, Dubois ve ark., 2008; Valdazo-Gonzalez ve ark., 2008). Çin’de koyun ve keçilerden izole edilen dört BDV izolatu BDV-3 grubuna aittir (Li ve ark., 2013a; Liu ve ark., 2013). BDV-7 ise Türkiye’den izole edilmiştir (Oguzoglu ve ark., 2009). Son olarak BDV-8 İsviçre ve İtalya’da izole edilmiştir (Peterhans ve ark., 2010; Peletto ve ark., 2016).

Önceden BDV olarak düşünülen bazı pestivirus suşları filogenetik özellikleri esas alınarak diğer pestivirustürleri içerisinde tekrar klasifiye edilmiştir. Bunlardan biri, Kore’de BD belirtileri gösteren keçiden izole edilmiş bir pestivirusun BVDV-2 genotipi olarak tanımlanmıştır (Kim ve ark., 2006). 1990’larda İtalya’da BD benzeri semptomlar gösteren kuzu ve oğlaklardan izole edilen ve BDV olarak karakterizasyonu yapılan birkaç pestivirus sonrasında BVDV-1 veya BVDV-2 olarak tanımlanmıştır (Buonavoglia ve ark., 1994; Pratelli ve ark., 2001). Ayrıca, 2006-2008 yılları arasında İngiltere’de sığırlarda pozitif olarak teşhis edilen beş BVDV de BDV olarak klasifiye edilmekte olup bunların ikisinin BDV-1a grubuna diğer üçünün ise BDV-1b grubuna ait oldukları bildirilmiştir (Strong ve ark., 2010). Japonya’da domuzdan izole edilen şüpheli BVDV-1 izolatu FNK2010-1 BDV genotip 1 içerisinde gruplandırılmıştır (Nagai ve ark., 2014).

Önemli bir genotiplendirme metodu, pestivirusların 5’UTR sekansları ve palindromik nükleotid yer değiştirimi ile analiz edilen onların ikincil yapı varyasyonları temel alınarak yapılmaktadır. Giangaspero (2011) 536 pestivirus suşu bu yöntem kullanılarak incelemiştir. Bunlardan 131 suş BDV türü olarak gruplandırılmıştır ve dahası en az 8 genotip içerisinde sınıflandırılmıştır. Bu bilgiler temel alınarak *Pestivirus* genusunun sayısal sınıflandırılması için bir yazılım sistemi geliştirilmiştir. 543 pestivirus izolatının analizi, BVDV-1, BVDV-2, BVDV-3, CSFV, Amerikan antilobu, zürafa, Bungowannah, BDV-1 ve BDV-2’nin dahil olduğu 9 türün ayırımına neden olmuştur. İlginç bir şekilde, BDV-1 olarak tiplendirilen 131 suş koyun, Pirene dağ keçisi, sığır, domuz, ren geyiği ve bizondan tespit edilirken, 5 BDV-2 suşu koyun ve keçilerden tespit edilmiştir (Giangaspero ve ark., 2013).

Antijenik tiplendirme de BDV suşlarının gruplandırılmasında kullanılmaktadır. Tipik olmayan iki domuz pestivirusunun (CSFV ve BVDV için spesifik monoklonal antikorlar [mAbs] ile daha düşük reaksiyon) dahil olduğu 18 BDV suşu, BDV

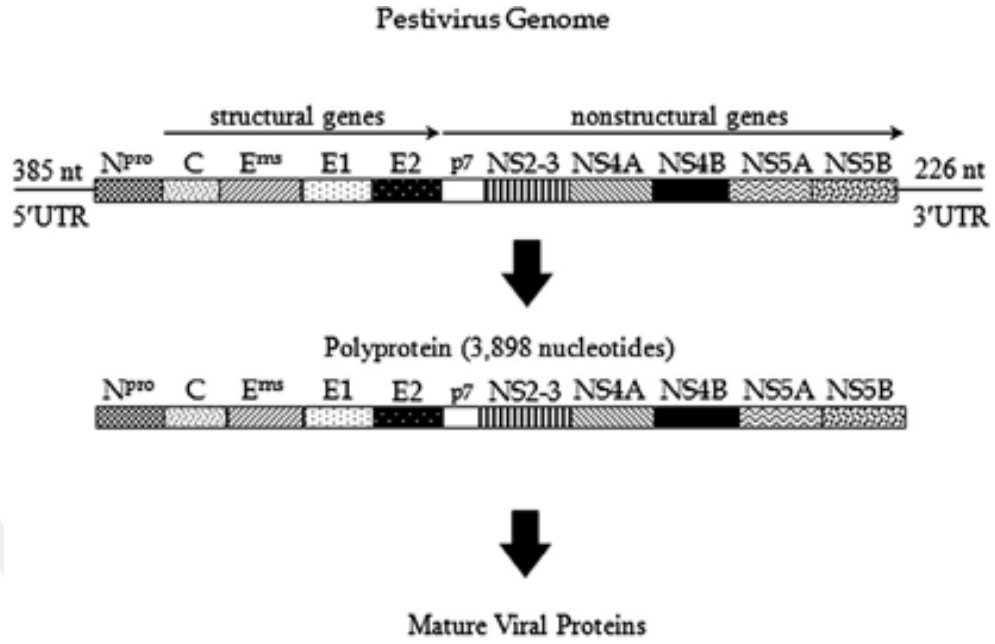


proteinleri olan E2, E<sup>ms</sup> ve NS2-3 proteinlerine karşı meydana gelen mAbs ile 3 gruba ayrılmıştır(Giammarioli ve ark., 2011). 4 İtalyan BDV izolatu, BDV-1 ve BDV-5 suşları ile ilişkili olarak çapraz reaksiyonu bilinen mAbs ile tanımlanmış ve gruplandırılmıştır. Ancak bu dört izolat BDV, BVDV ve CSFV'nin antijenik karakterizasyonu için E2, E<sup>ms</sup>, NS2-3'e karşı oluşan mAbs'lerin farklı durumu ile değişken reaksiyon da göstermektedir (Paton ve ark., 1994; Jiang ve Li, 2016).

### 2.1.2. Genom özellikleri

BDV-1, BDV-2, BDV-3, BDV-4, BDV-5 ve BDV-7 genotiplerinin tam genom sekansı belirlenmiştir (Becher ve ark., 1998; Avalos-Ramirez ve ark., 2001; Liu ve ark., 2013; Rasmussen ve ark., 2010; Vilcek ve ark., 2010; Vilcek ve ark., 2014). Tam sekansı bildirilen BDV suşları, *Pestivirus* genusunun diğer türlerine benzer olarak tek iplikçikli pozitif anlamlı yaklaşık 12,3 kb uzunluğunda olan bir RNA genomunu içerir. Genomun 3' terminal ucu sadece poliadenilasyon noktası olmayıp aynı zamanda kısa bir poly(C) bölgesi ile sonlanır. Translasyon başlangıcını kontrol etmek için 5' ucunda internal ribozomal giriş bölgesi vardır. Hairy Shaker Sendromu görülen bir kuzudan izole edilmiş ilk sekansı yapılan BDV suşu BD31'in genomu 12.268 nükleotid (nt) uzunluğundadır ve 357. nükleotidden başlayan 11.688 nt tek bir açık okuma bölgesine (ORF) sahiptir (Ridpath ve Bolin, 1997). BDV suşu Aveyron 12.284 nt'dir ve 370 nt uzunluğunda olan 5' UTR ve 214 nt uzunluğunda olan 3' UTR ile 11.700 nt uzunluğunda bir ORF bölgesini içerir (Vilcek ve ark., 2014). Tek bir ORF 3.899 aminoasit (aa) uzunluğunda bir viral poliproteini kodlar. Japon BDV-1 suşu FNK2012-1 11.685 nt uzunlukta ORF bölgesi olmakla beraber 12.327 nt içermektedir (Nagai ve ark., 2014). Pirene dağ geçisinden izole edilmiş ve BDV-4 olarak tiplendirilmiş H2121 BDV suşunun genomu, 76 nt uzunluğunda 5' UTR ve 229 nt uzunluğunda 3' UTR ile 3.899 aa kodlayan bir ORF bölgesini de kapsayan 12.305 nt uzunluğuna sahiptir (Vilcek ve ark., 2010). Poliprotein içerisinde sırasıyla (N terminal ucundan C terminal ucuna) dizilmiş viral proteinler; N<sup>pro</sup>, C, E<sup>ms</sup> (E0), E1, E2, p7, NS2-3 (NS2, NS3), NS4A, NS4B, NS5A ve NS5B'dir. Bu poliprotein hücrel ve viral proteazlar tarafından dört yapısal proteine ayrılmıştır. Bunlar nükleokapsid protein (C) ve üç zarf glikoproteini (E<sup>ms</sup>, E1 ve E2) olup ayrıca en az 8 adet yapısal olmayan proteinler (N<sup>pro</sup>, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A ve NS5B) de mevcuttur (Wiskerchen ve Collet, 1991; Xu ve ark., 1991; Vilcek ve ark., 2014). Glikoproteinlerden E2 büyük immunodominant zarf

proteinidir ve hayvanlarda büyük nötralizasyon antikor cevabına neden olur (Li ve ark., 2013b; Jiang ve Li, 2016).



**Şekil 1.** Pestivirusların genomik organizasyonu (Newcomer ve Givens, 2013'ten)

N<sup>pro</sup>: polyproteinden kendi kendini ayırılır ve konakçı interferon üretimini engeller.

C: viral RNA'yı sarmalayan bir nükleokapsid proteinidir.

E<sup>ms</sup>: antikorları uyaran bir zarf ribonükleazıdır.

E1: nötralizan antikorları uyarmayan bir zarf glikoproteinidir.

E2: nötralizan antikorları uyaran bir zarf glikoproteinidir.

P7: fonksiyonu bilinmemektedir.

NS2-3 nonsitopatik suşlara yapışmış olarak kalan yapısal olmayan bir proteindir

NS2: bir çinko eklentisi ve hidrofobik bölgeyi kapsayan oldukça değişken bir proteindir.

NS3: sitopatik etkiyle sonuçlanan hücrel apoptozisi uyaran immunojenik bir proteindir. Bu protein serin proteaz ve RNA helikaz alanını içerir.

NS4A: bölünme için gerekli olan serin proteaz (NS3) kofaktörüdür.

NS4B: bir replikaz komponentini içerdiği varsayılmaktadır.

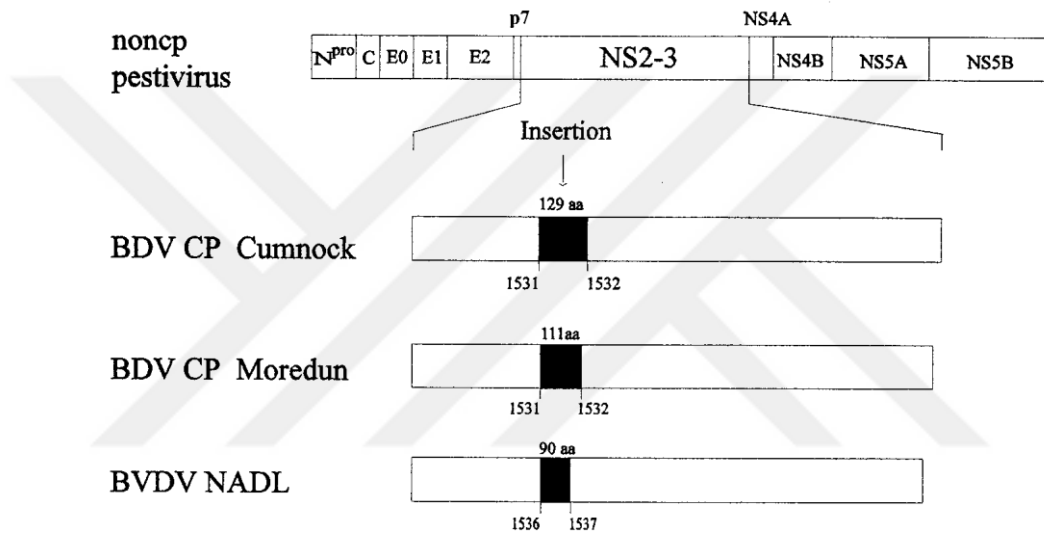
NS5A: bir replikaz komponenti içerdiği düşünülen fosforlanmış bir proteindir.

NS5B: RNA bağımlı RNA polimeraz enzimidir.

Bu genom, 12 olgun proteinle sonuçlanan post-translasyonel sürecine bağımlı tek bir polipeptid kodlar. Nt: nükleotid, UTR: untranslated region

BDV suşlarının iki biyotipi vardır. Hücre kültürlerinde etkileri sayesinde sitopatojenik (cp) ve non-cp olarak tanımlanmıştır (Vantsis ve ark., 1976; Laude ve Gelfi, 1979; Nettleton ve ark., 1992). BDV Cumnock ve BDV Moredun olarak

adlandırılan iki cp BDV izolatı moleküler seviyede analiz edilmiştir. Non-cp viruslar ile birlikte enfekte hayvanlardan bu iki virus da izole edilmiştir (Vantsis ve ark., 1976; Becher ve ark., 1996). Bir hayvandan izole edilen cp ve non-cp viruslar antijenik olarak yakın ilişkili bulunmuşlardır. Böylece BVDV sistemine benzer olarak, cp ve non-cp Cumnock viruslarının yanı sıra cp ve non-cp Moredun virusları, virus çiftleri olarak dikkate alınmıştır. RT-PCR ile yapılan genom analizleri, cp virusların non-cp virus mutantlarını yansıttığını gösteren olgularda her çiftin üyeleri için % 99 nükleotid sekans benzerliğini ortaya koymuştur (Becher ve ark., 1996; Jiang ve Li, 2016).



**Şekil 2.** İki cp BDV CP Cumnock ve CP Moredun, BVDV NADL ile non-cp pestivirusun genom organizasyonunun şematik gösterimi (Kirkland ve ark., 2007'den). Cp genomlarında NS2-3 kodlama bölgesi içerisinde hücresel sekanslar yerleştirildi. Eklentilerin uzunluğu gösterildi. Eklenti bölgeleri BVDV SD-1'in aminoasit sekansına göre numaralandırıldı.

Non-cp viruslardan farklı olarak cp viruslardaki ilave bölgeler NS2-3 genlerinde identifiye edilmiştir. İlgili sekanslar non-cp izolatların genomlarında yoktur. Söz konusu ilave sekans cp BDV Moredun RNA'sında 333 nt uzunluğunda iken cp BDV Cumnock suşunda 387 nt uzunluğundadır ve bu bölgeler NS2'nin C-terminal bölgesini kodlayan özdeş bir genomik bölgedeki konak hücresel komponentlerden gelmektedir (Becher ve ark., 1996). BDV-4 izolatu Chamois-1 NS2'yi kodlayan genin N-terminal ucunda 4 ek aa (AEVG) eklentisine sahiptir ve sitopatik efekt (CPE) olmaksızın gelişim gösterir (Vilcek ve ark., 2010). BDV-5 suşu olan Aveyron da NS2'nin C-terminal bölgesinde dört aa'yi (KAPD) kapsar ve CPE fonksiyonuna sahiptir

(Vilcek ve ark., 2014). Bu iki virus Western blot analizine bağılı olarak diğeri BDV suşlarından daha fazla miktarda NS3 proteini üretirler (Vilcek ve ark., 2010; Vilcek ve ark., 2014; Jiang ve Li, 2016) .

BDV suşlarının tüm genom sekanslarının karşılaştırması göstermektedir ki; BDV'nin farklı suşları BDV-7 dışında %75'den fazla nükleotid sekans benzerliğini paylaşırlar. Bu oran CSFV suşları ile % 70-75, BVDV-1 ile % 67-70 iken BVDV-2 ile % 67'den daha azdır (Liu ve ark., 2013; Vilcek ve ark. 1994). Ancak, pestiviral proteinler benzer nükleotid sekanslarından daha yüksek özdeşliğe sahiptir. BDV izolatları, CSFV suşları ve diğeri pestiviruslarda gözlemlenenen daha yüksek bir orana sahip olan tam poliprotein sekanslarında % 85 benzerlik göstermektedir (Vilcek ve ark. 2010). Pestivirusların viral proteinleri de değişik seviyelerde türdeşlik gösterirler. E2, p7 ve NS5A daha az korunan bölgeler olarak ortaya çıkmaktadır. NS2 proteini konak protein faktörlerinin eklenmesi nedeniyle çeşitlilik göstermektedir (Becher ve ark., 1998; Vilcek ve ark., 2010; Rosamilia ve ark., 2014).

### **2.1.3. Morfoloji**

BDV partikülleri *Pestivirus* genusunda yer alan diğeri viruslara oldukça benzerdir. Olgun BDV virionu 20-25 nm ile yaklaşık 40-60 nm çapa sahip ve genel hatlarıyla sirkülerdir (Gray ve Nettleton, 1987). Virionlar viral genom RNA ile bağlanan kapsid proteinlerine (C) ek olarak üç membran proteinini (E<sup>ms</sup>, E1, E2) kapsar. Aktif yoğunluğu sukroz gradyanda 1.115 g/ml kadardır (Vantsis ve ark., 1976). Virus 90 dakika boyunca 60 °C ısıya maruz kalması ile inaktif olur ve eter uygulamasına duyarlıdır (Gardiner ve ark., 1972). BDV izolatları onların hücre kültürlerindeki etkilerine göre iki çeşit biyolojik fenotip gösterirler. Birçok BDV suşu CPE meydana getirmez. Ancak koyundan birkaç cp BDV izole edilmiştir (Vantsis ve ark., 1976; Laude ve Gelfi, 1979). Fakat bunlardan birinin in vitro ortamda BVDV'den ayırt edilemediği belirlenmiştir (Laude ve Gelfi, 1979). BDV suşları genel olarak koyun primer hücrelerinde ve hücre hatlarında (SFT-R) çoğalabilirler ve genellikle BDV izolatlarının pasajlanması bu hücre hatlarında gerçekleşir (Oğuzoğlu ve ark., 2009). Domuzdan izole edilen BDV Japon FNK2012-1 domuz primer hücrelerinde ve hücre hatlarında da çoğalabilir ancak sığır ve koyun hücrelerinde daha iyi çoğalır (Nagai ve ark., 2014; Jiang ve Li, 2016).

## 2.2. Epidemiyoloji

BD enfeksiyonları Türkiye dahil olmak üzere Avrupa, Hindistan, Japonya ve Çin'in de dahil olduğu Asya, Kuzey Amerika, Avustralya, Yeni Zelanda'da tespit edilmiştir (Oguzoglu ve ark., 2009; Nettleton ve Willoughby, 2010; Giangasper ve ark., 2011; Li ve ark., 2013a). Yetişkin koyunlar arasında antikör prevalans oranları ülkeler ve bölgeler arasında % 5-50 arasında değişkenlik göstermektedir (OIE, 2017). Örneğin; BDV varlığı Kuzey İspanya'daki 25 ticari sürü çiftliklerinin 8'inde pozitif olarak belirlenmiştir (%32) (Garcia-Perez, 2009), Japonya'da koyunlardan alınan örneklerin % 17,6'sı (29/165) BDV yönünden seropozitif tespit edilmiştir (Graham ve ark., 2001). Seroprevalans, endemik olarak enfekte olan sürülerde yaşlı hayvanlarda daha genç hayvanlara kıyasla daha yüksek olma eğilimindedir (Berriatua ve ark., 2004).

Benzer klinik ve patolojik özellikler koyunlarda olduğu gibi BDV ile doğal veya deneysel enfekte olan keçilerde de gözlemlenmektedir. Keçilerin BDV enfeksiyonları giderek artan oranda tespit edilmektedir. 1984 yılındaki Kanada'daki BD enfeksiyonlarının dışında keçilerdeki BD'nin serolojik araştırmaları keçilerin yaklaşık % 16'sının spesifik antikör reaksiyonu yönünden pozitif olduğunu ve bölgeler arasında % 2,6 ile %45,5 arasında değişkenliği bildirilmiştir (Lamontagne ve Roy, 1984). BVDV-1 ve BDV'yi kapsayan pestiviruslara karşı oluşan bu spesifik antikörler, 2006 yılında Avusturya'nın dört bölgesinden 80 sürüde 549 keçide % 31,3 sürü prevalansı ve % 11,5 bireysel prevalansa sahiptir (Krametter-Froetscher ve ark., 2006). Türkiye'nin Doğu ve Güneydoğu Anadolu Bölgeleri'nde incelenen keçilerde BDV seropozitifliği % 63,6 olarak belirlenmiştir (Ataseven ve ark., 2006).. Hollanda'daki 126 sütçü keçi çiftliklerinden alınan 34 serum örneği %32 sürü prevalansı ile BDV yönünden % 27 pozitif bulunmuştur (Orsel ve ark., 2009). İsviçre'de BDV yönünden 382 koyun sürüsünden alınan 5059 serum örneği yaklaşık % 9,54, keçi sürüsünden alınan 503 serum örneği yaklaşık % 6 pozitif tespit edilmiştir (Danuser ve ark., 2009). Şunu da belirtmek gerekir ki; önceki serosörvey çalışmaları BDV enfeksiyonlarından BVDV enfeksiyonlarını ayırt etmede büyük zorluklara sahipti. Keçilerden izole edilen daha önceki üç BDV 5'UTR ve N<sup>pro</sup> gen sekansları ve tiplendirilmesi sayesinde BVDV-1 olarak tekrar sınıflandırılmıştır ve Kore'de bildirilen BD benzeri hastalıkların BVDV-2 virus enfeksiyonları olduğu doğrulanmıştır (Becher ve ark., 1997; Kim ve ark., 2006). Keçi BDV enfeksiyonlarının sadece birkaç vakası doğru bir şekilde tanımlanmıştır.

Gebe keçilerde BDV'nin deneysel enfeksiyonları 1975 ve 1987 yıllarında ortaya konulmuştur (Barlow ve ark., 1975; Loken, 1987). BDV ile doğal enfekte keçilerin ilk vakası 1982 yılında olmuştur (Loken ve ark., 1982). Norveç'te beş keçi sürüsündeki BD salgınına kontamine aşılardan neden olmuştur (Loken ve ark., 1991). İshal ile keçilerdeki BDV'nin belirlenmesi ilk defa 2013 yılında Çin'de doğrulanmıştır ve BDV-3 enfeksiyonu olarak sınıflandırılmıştır (Li ve ark., 2013a). Bir BDV-3 izolatu da 2 İtalyan keçi sürüsünden elde edilmiştir ve sırasıyla 67 keçinin 61'inde ve 169 keçinin 38'inde pozitif antikor tespit edilmiştir (Rosamilia ve ark., 2014).

2001'den beri BDV-4 enfeksiyonu ile ilişkili hastalık salgınları dağ keçilerinde gözlemlenmektedir. Bu enfeksiyon Fransız ve İspanyol Merkezi Pirene dağlarında dağ keçisi popülasyonunda kayda değer bir azalmaya neden olmuştur (Arnal ve ark., 2004; Hurtado ve ark., 2004; Marco ve ark., 2007; Marco ve ark., 2009b). İspanya'nın Val d'Aran ve Pallars Sobirà (VAPS) ve Cerdanya, Alt Urgell, Berguedà ve Solsonès (CAUBS) bölgelerinde dağ keçileri için BDV yönünden iki epidemiyolojik alan tespit edilmiş olup VAPS'deki endemik enfeksiyonlar sık sık BD salgınlarıyla sonuçlanmış ve dağ keçilerinin sayısında önemli bir azalmaya neden olmuş, CAUBS'taki daha düşük prevalans dağ keçilerinin popülasyonunda çok daha hızlı bir şekilde eski seviyesine ulaşmasına izin vermiştir (Fernandez-Sirera ve ark., 2012).

Sığırlar da doğal olarak BDV ile enfekte olmaktadır (Cranwell ve ark., 2007; Strong ve ark., 2010) ve bu enfeksiyonların birçoğu BVDV enfeksiyonları ile karıştırılmaktadır. Sadece sekanslama ve genotiplendirme metodları sayesinde enfekte sığırlardan alınan örneklerde BDV enfeksiyonları kesin olarak belirlenebilir (Hornberg ve ark., 2009). Sığır orijinli Avusturalya V/TOB izolatu, antijenik olarak diğer BVDV izolatlarından farklı bir BDV olarak genotiplendirilmiştir (Becher ve ark., 1997). BVDV belirtileri gösteren sığırlarda Birleşik Krallık'ta 2006-2008 arasında BDV enfeksiyonu teşhisi konulmuştur (Strong ve ark., 2010). Yeni Zelanda'da BDV'nin persiste enfeksiyonu aynı yaştaki sağlıklı hayvanlardan beden olarak daha küçük olan ve daha yavaş gelişen bir boğada tespit edilmiştir (McFadden ve ark., 2012). Ancak, daha önce seronegatif olan buzağular arazide PI BDV'li koyunlarla iç içe oldukları zaman BDV bu buzağuları enfekte etmektedir (Krametter-Froetscher ve ark., 2008; Braun ve ark., 2013). Ayrıca, PI koyun ve sığırlar arasında direkt temas, virusun direkt oral inokulasyonundan

daha kolay bir şekilde BDV tarafından enfeksiyonun şekillenmesine olanak sağlamaktadır (Braun ve ark., 2014).

BDV enfeksiyonlarının nadir vakaları diğer çiftlik hayvanları ve yabani ruminantlarda kaydedilmiştir. Domuzlar doğal olarak ve deneysel olarak BDV ile enfekte olmaktadır. Viremi genellikle 2-10 günlük postenfeksiyon döneminde tespit edilir ve antikorlar postenfeksiyonun 14. gününden itibaren artmaya başlar. Hemorajik lezyonlu domuzlardan izole edilen ilk BDV N<sup>pro</sup> geni sayesinde genotiplendirilmiştir (Roehe ve ark., 1992). İki yeni BDV izolatu biri Japonyada'ki PI bir domuzdan diğeri de İspanya'da olmak üzere izole edilmiştir (Kawanishi ve ark., 2014; Rosell ve ark., 2014).

Japonya'da, BDV izole edilen domuz çiftliğinde, CSFV enfeksiyonu geçmişi olmaksızın CSFV E2 grup antijenine karşı domuzlarda yapılan sörvey çalışmasında >%58,5 seropozitiflik oranı tespit edilmiştir (Kawanishi ve ark., 2014). Ayrıca, 2003 yılında bir BDV izolatu da hayvanat bahçesindeki ren geyiği ve bizondan elde edilerek karakterize edilmiştir (Becher ve ark., 2003).

### **2.3. Bulaşma**

BDV genellikle konakçı dışındaki çevresel koşullara hassastır ve çok uzun süre canlılığını sürdüremez. Duyarlı koyun sürülerine BDV için iki bulaşma yolu vardır. Bunlar vertikal ve horizontal bulaşmadır (Shaw, 1971; Gardiner ve Barlow, 1981). Direkt temas (beslenme veya oral-nasal yol) enfekte hayvanlardan virusun saçılımı sayesinde kolay bir şekilde horizontal bulaşmayı hızlandırır. Vertikal bulaşma plasenta sayesinde olur ve hayvanlar için daha hayati öneme sahiptir. Çünkü bu durum olgunlaşmamış immun sisteme sahip fötüsler virus ile enfekte olurken belirli gebelik periyodu sırasında yenidoğanlarda PI'ya neden olabilmektedir (Plant ve ark., 1983). Hastalığa yakalanmış ve persiste koyun hastalığın kaynağıdır ve PI hayvanlar daha tehlikelidirler (Barlow ve ark., 1980; Potts ve ark., 1985). PI kuzular hastalığın en etkili kaynağıdır. Çünkü bu hayvanlar viremik ve sürekli olarak virus saçarlar (Rosamilia ve ark., 2014). BDV enfeksiyonları genellikle koyun sürülerinde PI kuzuların ortaya çıkmasıyla sonuçlanır. Son olarak, PI BDV'li diğer hayvan türleri de PI sığır, PI domuz ve PI keçi gibi belirlenmiştir (McFadden ve ark., 2012; Kawanishi ve ark., 2014; Rosamilia ve ark., 2014).

BDV çapraz-türler arasındaki bulaşma diğer pestiviruslar için olduğu gibi kesin olarak meydana gelmektedir. Koyun BD salgınları sığırdan koyuna virus bulaşmasıyla

olabilmektedir (Carlsson, 1991; Braun ve ark., 2013). Buzağular koyunlarla birlikte tutulduklarında serokonvert olabilirler ve BDV'ye karşı antikor cevabı azalabilir (Krametter-Froetscher ve ark., 2008). BDV, deneysel olarak enfekte edilen hayvanlarla aynı tesiste yetiştirilen domuzları enfekte edebilir ve bu enfeksiyonlar yabancı CSFV bağışıklığına karşı domuzlarda koruyucu antikor cevabının verilmesini düşürebilir (Leforban ve ark., 1992). Avrupa'da yaban domuzu (*Sus scrofa*) BDV ile enfekte olabilir ve pozitif nötralizan antikorlar gösterebilir (Roic ve ark., 2007).

MLV aşılardaki BDV kontaminasyonlarını kapsayan pestiviruslar, şayet MLV aşıları virusla enfekte koyun, keçi ve diğer hayvanlardan alınan serum ve hücrelerde üretiliyorsa hayvanlarda BDV için önemli bir bulaşma biçimi olabilir. BDV ile kontamine olmuş keçi orijinli Ch1Es hücre hattındaki virus varlığı 1995 yılında RT-PCR ile tespit edilmiştir (Harasawa ve Mizusawa, 1995). Koyun ve keçilerdeki BD salgınları canlı aşılardan kullanımı ile ilişkilendirilmektedir (Nettleton ve Entrican, 1995; Thabti ve ark., 2002; Jiang ve Li, 2016).

#### **2.4. Patogenez**

Yetişkin, immun sistemi gelişmiş küçük ruminantlar BDV'ye karşı güçlü bir immun cevap meydana getirebilirler ve akut enfeksiyonun herhangi bir semptomunu göstermezler. Gebe hayvanlar BDV ile enfekte olduklarında virus placentaya yolu ile embriyo veya fötüsü enfekte edebilir. Fötal BD enfeksiyon salgınları büyük oranda gebelik döneminde meydana gelen enfeksiyonlara bağlıdır. Gebeliğin erken dönemlerinde virus enfeksiyonu kolaylıkla fötüsün rezorbe veya abort olmasıyla sonuçlanan embriyo ölümüne neden olur. Birçok vakada, persiste viremik kuzular olmaktadır. Bu durum daha çok koyunlarda gebeliğin 60-85. günleri, keçilerde ise 80-100. günleri arasında immun sistem maturasyonundan önce prenatal olarak kuzuların enfekte olması ile şekillenir (Oguzoglu, 2012). Bu fötüsler immunotoleranttır ve virus çoğalabilir ve de tüm organlara yayılabilir. Bu hayvanlar eğer hayatta kalırlarsa genellikle yaşamları boyunca PI olurlar. Enfeksiyon gebeliğin daha geç safhalarında meydana geldiğinde ve fötüs olgunlaşmış bir immun sisteme sahip olduğunda, bu enfeksiyon genellikle fötal merkezi sinir sistemine zarar verir ve direkt hasarı sayesinde oligodendroglial hücrelerin dejenerasyonu, hipomiyelinasyon ve sinir sisteminin yangısı ve değişken hormon salgısı gibi indirekt fonksiyonlara neden olur (Zakarian ve ark., 1975). Gebeliğin son evrelerindeki enfeksiyon da fötal gelişimi etkiler, kemik ve kaslar



zarar görebilir (Barlow ve ark., 1970; Barlow, 1972). Ayrıca gebe keçilerde BDV enfeksiyonları fötüs ve yeni doğanlarda abortlara ve malformasyonlara neden olabilir. (Oguzoglu ve ark., 2009).

PI koyunlar daha fazla CD8+ T lenfositlerine sahiptir ve CD4+ hücrelerinin toplam sayısı değişkenlik göstermektedir. Lenfosit alt popülasyonlarının dağılımı çok yüksek bir CD8+/CD4+ oranı ile değişkenlik göstermektedir. MHC-I antijenini açığa çıkaran periferik lenfositler ve bu lenfositler önemli derecede azalmıştır (Burells ve ark., 1989; Woldehiwet ve Sharma, 1990).

Doğal bağışıklık sisteminden kaçma, etkilenmiş kuzulardaki BDV PI tespiti için hayati öneme sahiptir. Aktive edilmiş caspase-3 ilişkili apoptosis BDV enfekte koyunlarda olmaktadır. Birçok terminal deoksiniükleotidli transferaz dUTP çentik uçlu işaretli (TUNEL) pozitif ve aktive edilmiş caspase-3 elementleri, BD enfeksiyonlu hayvanların etkilenen nöronlarında, glial hücrelerinde ve endotelial hücrelerinde bulunmuştur (Toplu ve ark., 2011). Nöronal hücrelerde aktive edilmiş caspase-3 yaygın olarak nörolojik korunma ve nörolojik hasarda büyük rol oynar (McLaughlin ve ark., 2003). BD enfekte hayvanlarda aktive edilmiş caspase-3'e benzer olarak caspase-9'un etkili aktivasyonu ve dağılımı, bu hastalığın oluşumu ve gelişiminde apoptosisin intrinsik yollarının rol oynadığını göstermektedir (Toplu ve ark., 2011).

## **2.5. Klinik Semptomlar ve Patolojik Değişiklikler**

### **2.5.1. Akut Enfeksiyon**

Sağlıklı yeni doğan kuzu ve oğlaklar ile yetişkin koyunlar ve keçiler normalde BDV ile enfekte olduklarında klinik olarak ya hafif semptomlar gösterir ya da herhangi bir semptom göstermezler (Valdazo-Gonzalez ve ark., 2008). Bazı enfekte hayvanlarda karakteristik semptomlar dışında hafif ateş ve lökopeni görülür. Bu hayvanlarda 4-11 günlük postenfeksiyon periyodunda kısa bir viremi tablosu şekillenir ve sonrasında virüsü nötralize eden antikör serumda tespit edilebilir (Thabti ve ark., 2002).

Akut enfeksiyonlar birkaç koyundan alınan çift serum örneklerinin kullanılmasıyla serolojik olarak teşhis edilmektedir. Ara sıra BDV izolatlarının yüksek ateş, etkili ve uzun süreli lökopeni, anoreksi, konjunktivitis, nasal akıntı, dispne ve ishal meydana getirdikleri ve genç kuzularda %50 mortaliteye neden oldukları bildirilmiştir. 1984 yılında sütçü koyunlar içinde şiddetli bir BD epidemisinin sorumlu

izolat elde edilmiştir (Chappuis ve ark., 1986). İkinci böyle bir izolat canlı CSFV aşısının BDV kontaminantı da epidemiyeye neden olmuştur (Wensvoort ve Terpstra, 1988).

Zaman zaman yeni bölgelerde BDV salgınları sırasında hasta hayvanlarda yüksek ateş, anoreksia, konjunktivitis, nasal akıntı, solunum güçlüğü, şiddetli ve uzun süreli lökopeni ve bazen de şiddetli ishal gözlemlenir. Böyle durumlarda morbidite ve mortalite oranları yüksektir (Gardiner ve ark., 1983; Roeder ve ark., 1987; Monies ve ark., 2004; Gonzalez ve ark., 2013; Li ve ark., 2013a). Son zamanlarda, BDV enfekte Avrupa dağ keçilerinde depresyon, zayıflık, hareket bozukluğu gözlemlenmiştir. Bu hayvanlarda, tepkisizlik, baş, boyun ve gövdenin asimetric hareketi gibi anormal davranışların yanı sıra deri hiperpigmentasyonu ile seyreden farklı derecelerde kıl dökülmesi meydana gelmektedir. Kronik zayıflama da tüm etkilenen dağ keçilerinde yaygın görülen bir özelliktir (Arnal ve ark., 2004; Marco ve ark., 2009a).



**Şekil 3.**Hastalığa yakalanmış bir keçide klinik ve patolojik gözlemler (Li ve ark., 2013a'dan).

A. Genel durumu bozuk enfekte oğlak, kaba kıl örtüsü ve gelişim yavaşlığı. B.İshalli keçi. Anüs ve çevre doku ishal ile kaplanmış; C ve D. İnce ve kalın bağırsakta hemoraji ve nekroz.

### 2.5.2. Fötal enfeksiyon

BD'nin asıl klinik belirtisi gebe koyunların enfeksiyonunu takiben ortaya çıkar. İlk maternal enfeksiyon subklinik ve orta şiddetli iken fötüs için sonuçlar daha ciddidir (OIE, 2017). BDV enfekte fötüsler klinik olarak farklı BD semptomları gösterirler ve fötal ölüm gebeliğin herhangi bir döneminde meydana gelebilir, ancak daha yaygın olarak gebeliğin erken dönemlerinde gözlemlenmektedir. Kuzu ve oğlaklarda BD mortalitesi genellikle doğum sırasında ve yaşamın ilk evrelerinde yüksektir. Gebeliğin geç evrelerinde daha büyük fötüslerin abortu, erken doğumlar, zayıf ve güçsüz prematüre doğumlar sık sık görülür. Keçilerde enfeksiyon başlıca mevcut semptom olan yavru atma açısından daha az yaygındır (Barlow ve ark., 1970; Barlow, 1972; Nettleton ve ark., 1998). Dişi koyunlar iyi bir şekilde beslenmeye devam ederken veya rahatsızlıklarıyla ilgili hiçbir semptom göstermezken, ufak ölü fötüsler resorbe olabilirler veya onların abort olmaları fark edilmeyebilir. Abort veya erken doğumun BDV nedeniyle olduğunun teyitinin tespiti sıklıkla zordur. Uygun bir Real-Time Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) yönteminin kullanılması, non-enfeksiyöz virustan genom tespiti edilebilmesi ve yüksek duyarlılığa sahip olması avantajı nedeniyle daha yüksek bir başarı getirebilir. Abort olmuş fötüslerde beyin, tiroid ve diğer dokuların immunohistokimyası sayesinde virüsü tespit etmek de olasıdır (Thurb ve ark., 1997; OIE, 2017).

Kuzulama döneminde, BD'nin başlıca klinik olarak karakteristik özelliklerini gösteren enfekte canlı kuzular dışında, aşırı sayıda kısır dişi koyun belirgin hale gelecektir. BD ile enfekte kuzular tarafından sergilenen klinik belirtiler çok değişkendir ve koyunların beslenmesine, virusun virulansına ve enfeksiyonun sürüye giriş zamanına bağlıdır. Etkilenen kuzular genellikle küçük ve zayıfturlar ve birçoğunda ayakta duramama gözlemlenir. Sinirsel belirtiler ve yapağı değişiklikleri sıklıkla ortaya çıkar. BD'nin sinirsel belirtileri onun en karakteristik özelliğidir. Arka ayak ve sırt kaslarının şiddetli ritmik konsantrasyonundan nadiren kafa, kulak ve kuyruğun tespit edilebilir titremesine kadar tremor değişkenlik gösterebilir. Özellikle boyun ve sırtta tüylü yapağı olarak gelişen yapağı anomalileri en belirgin semptomlardandır. Yapağının anormal kahverengi veya siyah pigmentasyonu da BD enfekte kuzularda görülür. BDV veya antikor varlığı için test edilecek kan örnekleri şüpheli kuzulardan kolostrum almadan önce antikoagulanlı tüplere alınmalıdır. Kuzular kolostrumu bir kere aldıklarında 2 aylık

olana kadar ve maternal antikör seviyesi azalana kadar virüsü izole etmek zordur. Ancak bu periyotta immunohistokimya sayesinde deri biyopsisinde, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) veya Real-Time RT-PCR ile lökositlerde viral antijenleri belirlemek mümkün olabilir. E<sup>ms</sup> antijenin tespit edilmesine yönelik olan ELISA, maternal antikörler ile interferense daha az meyilli olduğu gözlemlenmiştir ve serumda antijen tespiti için sıklıkla kullanılabilir (OIE, 2017).

Dikkatli bakım ile ölümler herhangi bir yaşta meydana gelmesine rağmen BD enfekte kuzuların bir kısmı yetiştirilebilir. Sinirsel semptomlar yavaş yavaş geriler ve 3-6 aylık yaşlarda ortadan kalkar. Zayıflık, başın hafif titremesi ile beraber bacaklarda yalpalama, stres anında tekrar görülebilir. Etkilenmiş kuzular sıklıkla yavaş gelişim gösterirler ve normal saha koşulları altında birçoğu süten kesme zamanı esnasında veya öncesinde ölmektedir (OIE, 2017).

Gebelik zamanı ortalarında meydana gelen bazı fetal enfeksiyonlar ciddi sinirsel belirtiler, lokomotor rahatsızlık ve anormal iskelet yapısı ile karakterize kuzulara neden olabilir. Böyle kuzular, nekrotizan inflamasyondan kaynaklanan hidranensefali ve poreensefali, serebellar hipoplazi ve displazi lezyonlarına sahip olabilir. Ciddi yıkıcı lezyonlar immun sistem aracılı olduğu gözlemlenebilir ve böyle lezyonlu kuzularda sıklıkla BDV'ye karşı serum antikör titresi yüksektir. Gebeliğin son döneminde enfekte olan birçok kuzu normal ve sağlıklıdır ve virus tespit edilemez ancak BDV antikoru taşırlar. Bu kuzuların bazıları zayıf olabilir ve erken yaşta ölebilirler (Barlow ve ark., 1982).

Hastalıktan etkilenmiş canlı kuzu ve oğlaklar normal veya PI olabilirler. Yine hastalıktan etkilenen genç kuzular küçük bedene, kubbeli başa sahip olup, zayıftırlar ve paraliz görülür. Hastalığa yakalanmış hayvanlarda bazen ataksiyle beraber zor bir şekilde ayağa kalkma ve yürüme görülür ve bu hayvanlar istemsiz kas tremorları ile posterior sallanma ve koordine olmayan hareketler gösterirler (Loken ve ark., 1991; Garcia-Perez, 2009; Oguzoglu ve ark., 2009; Toplu ve ark., 2012). En dikkat çeken karakteristik belirtilerden biri birçok hasta kuzuda 'Hairy Shaker' olarak adlandırılan uzun ve düz doğum kıllarından oluşan anormal yapağıdır. Etkilenen kuzular kısa bacaklı da olabilirler. Dikkatli bir bakım ile BD enfekte kuzuların bir kısmı yaşayabilir ve normal görülebilir. Kıl değişiklikleri 9-12 haftalar arasında ortadan kalkar ve sinirsel semptomlar 20 haftalık yaşa kadar yavaş yavaş iyileşir (Nettleton ve ark., 1998;

Oguzoglu ve ark., 2009). Bu hayvanlar sıklıkla yaşamları boyunca PI kalırlar. Tipik olarak, az veya hiçbir yangısal reaksiyon göstermezler. Ancak bu hayvanlar sıklıkla normal saha koşulları altında yavaş bir şekilde gelişirler (Nettleton ve ark., 1998; Gonzalez ve ark., 2013).

Enfekte kuzu ve oğlakların nekropsisinde gözle görülebilir lezyonlar gözlemlenmez. Spinal cord enine kesit alanları, hem gri hem beyaz maddede belirgin bir şekilde küçülmüştür (Done ve ark., 1985). Makroskobik değişiklikler gözlemlenmektedir. Fötal anomalilere cerebellar hypoplasia, hidranensefali, porencefali ve artrogriposis dahildir. Kotiledonlar toplu iğne başı büyüklüğünde grimsi lezyonlarla küçük veya hiç olgunlaşmamıştır (Zakarian ve ark., 1975; Potts ve ark., 1985; Garcia-Perez, 2009, Toplu ve ark., 2011).

BDV enfeksiyonlarının mukozal vakalarında tonsiller ve lenf nodülleri genellikle ödemli, genişlemiş ve hemorajiktir. Sert damak üzerinde birkaç yuvarlak hiperemik ülserler yumuşak damak üzerinde toplu iğne başı büyüklüğünde yüzeysel erozyonlar bulunabilir. Özefagus ve kalın barsağın bazı bölümlerinde çok sayıda oval ve çizgisel mukozal ülserler görülebilir (Monies ve ark., 2004; Kessel ve ark., 2011, Toplu ve ark., 2011; Li ve ark., 2013a). BDV enfekte dağ keçilerinde, en kalıcı mikroskobik değişiklikler deri ve beyindedir. Deri lezyonlarına, belirgin ortokeratotik hiperkeratozis ile melanozis ve hiperplazi, foliküler atrofi ile şiddetli alopezidahildir. Beyin genellikle nöronal dejenerasyon, yaygın spongiosis ve ödemli görünür (Marco ve ark., 2007; Jiang ve Li, 2016).

### **2.5.3. Persiste Enfeksiyon**

BDV, BVDV'de olduğu gibi plasentayı geçme ve embriyo veya fötüsü enfekte etme yeteneğine sahiptir. Gebeliğin belirli aşamalarında bu, tüm yaşam boyunca virüsü saçan kalıcı olarak enfekte (PI) bir hayvanın doğmasına neden olur (Sandvik, 2014). Persiste enfeksiyonlar sürüdeki hastalıkların ortadan kaldırılması için önemli kabul edilir ve 5,5 yaşında PI hayvan bildirilmiştir (Nettleton ve ark., 1992).

Fötüs immun sistem gelişmeden önce enfekte olduğu zaman persiste viremi olarak doğar. Küçük ruminant fötüsü 150 günlük gebelik periyodunun yaklaşık olarak 60-85 günleri arasında antijenik uyarıya ilk cevabı verebilirler. İmmun yeterliliğin başlangıcından önce enfekte olmuş fötüsta viral replikasyon kontrol edilemez ve % 50 fötal ölümle sonuçlanır. Gebeliğin ilk dönemlerinde enfeksiyona maruz kalmış canlı

kuzularda virus tüm organlara yayılmıştır. Birçok kuzu virusa karşı tölare görünür ve genellikle yaşamları boyunca persiste enfeksiyona sahip olurlar. Prekolostral dönemde alınan kan örneği virus pozitif, antikor negatif olacaktır. Tipik olarak, herhangi bir yangısal reaksiyon olmaz ve en karakteristik patolojik değişiklikler MSS ve deridedir. MSS'nin tüm aşamalarında myelin noksanlığı söz konusudur. Bu durum orta şiddetli veya hiç semptom göstermeyen kuzularda farkedilemeyebilir ancak sinirsel semptomlar gösteren kuzularda şiddetli olabilir. Deride, primer yapağı folikülleri, tüylü ve kaba koyun postuna neden olan daha az miktardaki sekonder yapağı folikülleri ebatında artış vardır. Persiste viremik koyun kan numunelerinde virus izolasyonu/tespiti sayesinde teşhis edilebilir. Virus, anti-BDV antikorunun düşük seviyelerde gelişim gösterdiği 4 yaşından daha büyük hayvanlarda ve kolostral antikor sayesinde maskelenmiş (gizlenmiş) iken, viremi ilk 2 aylık yaştakiler haricindeki herhangi bir yaşta kolaylıkla tespit edilebilir (Nettleton ve ark., 1992; OIE, 2017). Akut enfeksiyon sırasında kandan virus tespiti zor olmasına rağmen persiste viremi en az 3 haftalık süreden sonra tekrar hayvanların teste tabi tutulması sayesinde teyit edilmelidir (Nettleton ve ark., 1998).

Bazı PI koyunlar seksüel olgunlukta hayatta kalırlar ve damızlık olarak kullanılırlar. Bu enfekte koyunlardan doğan kuzular daima persiste viremiktir. Persiste viremik koyun diğer hayvanlar için sürekli olarak enfeksiyon kaynağıdır ve onların identifikasyonu kontrol programları için başlıca önemli bir faktördür (Nettleton ve ark., 1998).

PI olan koçlar genellikle düşük kaliteli enfektif sperma ve düşük fertiliteye sahiptirler. Damızlık için kullanılan koçların kan örnekleri üzerinden persiste BDV enfeksiyonu için taramadan geçirilmelidir. Sperma örnekleri de virus açısından taramadan geçirilebilir ancak hücre kültürü için sperma örneklerinin toksik olması nedeniyle bu örnekler kana göre daha az tercih edilmektedir (Nettleton ve ark., 1998).

Koyunlarda sığırlara nazaran daha kısa gebelik süresi olması persiste enfeksiyonların daha az olmasına neden olmaktadır. Bu durum, sığırlara kıyasla koyunların daha kapsamlı bir bakımıyla birlikte PI koyunların (% 0,3-0,6) prevanlasının PI sığırlardan (% 5-2) daha düşük gözlemlenmesini açıklayabilir (Kramette-Froetscher ve ark., 2010; Sandvik, 2014).

## 2.6. Teşhis

Fötal dokularda BDV varlığını saptamada çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden biri olan izolasyon zaman alıcı, pahalı ve incelenen dokularda otoliz olduğunda ise hassasiyetini kaybeden bir teşhis yoludur. Pestivirusların zarf glikoproteini gp48'e karşı oluşan monoklonal antikor C15C kullanılarak yapılan immunohistokimya sığır ve koyun fötal dokularında başarıyla uygulanmıştır (Ellis ve ark., 1995; Nettleton, 2000). Ancak her iki yöntem uzmanlık ve özel laboratuvar kaynaklarını gerektirmektedir. Fötal dokulardan elde edilmesi kolay olmayan iyi kalitede RNA'nın tespiti sağlayan RT-PCR uygulaması 1990'lardan itibaren yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Hyndman ve ark., 1998). Viral antijen varlığı ayrıca PI hayvanları tespit etmek amacıyla seronegatif hayvanlardan kan örneklerinde uygulanan hızlı bir teknik olan ELISA ile de araştırılabilir. Bununla birlikte, sığır ve küçükbaş fötüslerinde Ag-ELISA kullanımını hakkında çok fazla bilimsel veri bulunmamaktadır (Garcia-Perez, 2009). Bu bakımdan bu çalışmanın bir amacı da abort olmuş fötüslerde Ag-ELISA ve RT-PCR uygulamasını karşılaştırarak etkinliğini araştırmaktır.

**Tablo 1.** BD teşhisinde uygulanabilir test metodları ve amaçları (OIE, 2017'den)

Metod	Amaç					
	Enfeksiyondan ari populasyon tespiti	Hayvan hareketinden önce enfeksiyondan ari hayvanlar tespiti	Eradikasyon uygulamalarına katkı	Klinik vakaların konfrimasyonu	Enfeksiyonun prevalansı-sörvalans çalışmaları	Aşılama sonrası populasyonların ve tek tek hayvanların immunité durumu
<b>Etken identifikasyonu</b>						
Virus						
izolasyonu	+	++	++	+++	-	-
Ag ELISA	+	++	+++	+++	-	-
Real-time RT-PCR ile NA tespiti	+++	+++	+++	+++	+++	-
ISH ile NA tespiti	-	-	-	+	-	-
<b>İmmun cevabın tespiti</b>						
ELISA	++	++	++	+	++	++
VN	+++	+++	++	+++	+++	+++

+++ = önerilen metod, gösterilen amaç için validasyonu yapılmış; ++ = uygun metod ancak daha ileri validasyona ihtiyaç var; + = bazı durumlarda uygulanabilir, fakat maliyet, güvenilirlik ve diğer faktörler uygulanmasını ciddi şekilde sınırladığında; - = bu amaç için uygun değil; ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay; NA = nucleik asit; RT-PCR = reverse- transcription polymerase chain reaction; ISH = *in-situ* hybridizasyon; VN = virus nötralizasyon



BDV'nin teşhisi için özellikle persiste enfekte hayvanlarda çeşitli metotlar uygulanmaktadır. Bunlar virus izolasyonu, virus nötralizasyon testi (VNT), immunohistokimya, indirekt ve direkt immunoflüoresan değerlendirme (IFA), ELISA, agar jel immunodiffuzyon testi, RT-PCR, nested RT-PCR (nRT-PCR) ve Real-Time RT-PCR (qRT-PCR) teşhis teknikleridir (Vilcek ve Paton, 2000; Graham ve ark., 2001; Willoughby ve ark., 2006; Marco ve ark., 2009b; Toplu ve ark., 2012; Newcomer ve Givens, 2013; Kawanishi ve ark., 2014;). ELISA ve VNT genellikle serolojik araştırmalar için kullanılırken, virus izolasyonu, nükleik asit tespit teknikleri (RT-PCR, nRT-PCR ve qRT-PCR) ve IFA daima etken incelemesi için kullanılır. Dahası, RT-PCR ürünlerinin filogenetik analizlerinin ortaya konulması amacıyla yapılan nükleotid sekanslaması nadiren ve klinik olarak BDV suşlarının genotiplendirilmesi ve identifikasyon için kullanılmaktadır (Vilcek ve ark., 1997; Thabti ve ark., 2005; Oguzoglu, 2009).

### **2.6.1. Konvansiyonel Teknikler**

Serolojik testler özellikle daha önce BDV görülmemiş alanlarda, bir sürüde, bölgede veya ülkedeki BDV enfeksiyonun prevalansını belirlemek için yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Antikor pozitif sonuçlar genellikle sahadaki BDV varlığını ve prevalansını göstermektedir. Bu amaçla VNT yaygın olarak kullanılmaktadır ancak yoğun çalışma ve zaman kaybına neden olmaktadır. Bu nedenle fazla sayıdaki örneklerin incelenmesi için uygun değildir. VNT için BDV'nin hem sitopatik hem de nonsitopatik suşlar kullanılabilir, fakat uygulama kolaylığı nedeniyle sitopatik BDV (örneğin; Moredun, 137/4) önerilmektedir. Ayrıca, farklı pestiviruslara karşı oluşan antikorlar arasındaki çapraz reaksiyon nedeniyle, dört pestivirus grubunun (BDV, BVDV-1, BVDV-2 ve CSFV) her birindeki viruslara karşı titrasyonu yapılan serumlarda farklılaşmış VNT önerilmektedir (Dekker ve ark., 1995; Nettleton ve ark., 1998).

Bir diğer teşhis yöntemi ELISA en değerli tarama aracıdır ve geniş ölçekli epidemiyolojik araştırmalar için uygun bir yöntemdir. mAb-capture ELISA geliştirilmiştir (Fenton ve ark., 1991). 96 gözlü mikropleyte bağlanmış mAb VPM22, BDV enfekte hücrelerden antijen yakalanmasında kullanılmaktadır. Sonuçlar VNT ile iyi bir kalitatif korelasyona sahiptir. Son zamanlarda, tank sütü örneklerine uygulanan ELISA, BDV pozitif sütçü koyun sürülerinin belirlenmesi için geliştirilmiştir (Corbiere

ve ark., 2012). Özellikle p80/p125 proteinini hedef alan antikoları belirleyen ELISA kitleri tüm BVDV ve BDV suşları için ortaktır ve bu amaçla kullanılabilir (Marco ve ark., 2009b, Fernandez-Sirera ve ark., 2012).

Viral antijen tespiti PI hayvanların belirlenmesi için önemlidir. Pestivirus p125/p80 antijenini tespit eden ticari ELISA kitleri PI koyunlarda antijen tespiti için kullanılabilir. 1990 yılında bir mAb-capture ELISA BDV ile persiste enfekte koyunların lökositlerinde spesifik antijenlerin belirlenmesi geliştirilmiştir. Virus izolasyonu ile ELISA'nın duyarlılığı karşılaştırmak için kör denemeler uygulanmaktadır ve iki test arasında total bir uyum vardır (Fenton ve ark., 1990).

OIE'nin Border Disease (Chapter 2.7.1) 2017 yılı manuelinde ELISA ile ilgili bölümünde "Birkaç pestivirus ELISA yöntemi yayınlanmıştır, ancak şu anda BDV'yi saptamak için tam olarak doğrulanmış ticari olarak temin edilebilen herhangi bir kit bulunmamaktadır. Düzenli bir amaç için kullanılmadan önce, bu kitler BDV'nin çok çeşitli saha suşlarının tespit edebildiğinden ve test edilecek numune tipleri için uygun olduklarından emin olmak için kullanılacakları bölgede doğrulanmalıdır." ifadesi yer almaktadır (OIE, 2017). Strong ve ark. (2010)'na göre son zamanlarda E<sup>ms</sup> glikoproteinini hedefleyen BVDV antijen ELISA'ları daha yaygın hale gelmiştir ve E<sup>ms</sup> ELISA'ların sığır BDV'lerini ne ölçüde teşhis edeceğini bilmenin zor olabileceği de vurgulanmıştır. Araştırmacılar göre buna gerekçe olarak da testin antijenik provizyonunun BDV referans suşlarından farklı olduğu ve bu perspektifte düşünüldüğünde BDV'nin abort materyallerinde teşhisinde RT-PCR uygulamasının ELISA testine göre daha duyarlı olduğu belirtilmiştir.

Pestiviruslarda sitopatik ve non-sitopatik ayırımı önemli olup spesifik mAb kullanılarak indirekt immunoperoksidaz (IP) testi ile hücre kültüründe (fetal kuzu böbrek veya kas hücresi) BDV antijeni tespiti yapılmaktadır. Böylece non-sitopatik virus tespit edilebilmektedir (Nettleton, 1990).

### **2.6.2. Moleküler Teknikler**

Moleküler biyolojideki gelişmeler ve pestivirus genomunun sekanslanması çalışmalarını takiben nükleik asit amplifikasyon metotları (RT-PCR, nRT-PCR ve qRT-PCR) BDV enfeksiyonunun teşhisi için kullanımı gittikçe artmaktadır. Pan-pestivirus primerleri (324/326) tüm pestivirus türlerinin tespit edilmesinde önemlidir ve bu nedenle başlangıç testi olarak uygulanabilir. Ancak pozitif sonuçlar, BVDV varlığını

ortadan kaldırmak için daha ileri sekans analizini gerektirirler (Vilcek ve ark., 1994). Birkaç BDV suşunun genom sekanslaması ve diğer pestiviruslarla onların karşılaştırılmasıyla birlikte, BDV spesifik primerleri dizayn edilmiş ve RT-PCR uygulaması için validasyonu gerçekleştirilmiştir (Vilcek ve ark., 1997; Vilcek ve Paton, 2000; Strong ve ark., 2010). Bu spesifik primerler RT-PCR uygulamasında tek olarak kullanılabilir veya nRT-PCR uygulamasında pan-pestivirusların kullanımını takiben kullanılabilir (Tablo 2.)

**Tablo 2.** RT-PCR, nRT-PCR ve qRT-PCR metotları için kullanılabilen primerler

Primerler	Sekans (5'-3')	Hedef Bölge	Büyüklik (bp)	Kaynak
324	ATGCCCWTAGTAGGACTAGCA	5' UTR	288	Vilcek ve ark., 1994
326	TCAACTCCATGTGCCATGTAC			
PBD1	TCGTGGTGAGATCCCTGAG	5' UTR	225	Vilcek ve Paton, 2000
PBD2	GCAGAGATTTTTATACTAGCCTATRC			
320F	GCCTGATAGGGTGYWGCAGAG	N <sup>pro</sup> -C	740	Strong ve ark., 2010
1040R	TTYCCTTTCTTCTTYACCTGGTA			
BD1	TCTCTGCTGTACATGGCACATG	N <sup>pro</sup> -C	738	Vilcek ve ark., 1997
BD2	TTGTTRTGGTACARRCCGTC			
BDV87F	CCGTGTTAACCATACACGTAGTAGGA	5' UTR	155	Willoughby ve ark., 2006
BDV237	GCCCTCGTCCACGTAGCA			
BDV136T (probe)	CTCAGGGATCTCACCACGA			

nRT-PCR metodu spesifikite ve sensitiviteyi arttırmadığı gibi aynı zamanda kontaminasyon riskini de artırır (Fulton ve ark., 1999).

BDV spesifik primerlerinin veya ek olarak flöresan problemlerinin kullanıldığı qRT-PCR yüksek spesifikite ve sensitivite ile kontaminasyonun önlenmesinde avantajlara sahiptir. Bir one-step qRT-PCR uygulaması, koyun örneklerindeki BDV, BVDV-1 ve BVDV-2'nin tespit edilmesi için dizayn edilmiştir (Willoughby ve ark., 2006). qRT-PCR metodu klinik örnekler üzerinde validasyonu gerçekleştirilmiş, virus izolasyonu ve nRT-PCR metodundan daha fazla sensitiviteye sahip olduğu gösterilmiştir ve örneklerin çapraz kontaminasyon ihtimalini de azaltmıştır. Ayrıca qRT-PCR virus tiplendirmesinin sonuçları sekanslama ile tamamen uyumludur (McGoldrick ve ark., 1999). Pestivirusların yaygın tespiti için TaqMan qRT-PCR tekniğini içeren bir uygulama ve

bu qRT-PCR tekniğinde üretilen ampikonların kullanılabilirdiği bir moleküler analiz bildirilmiştir (LeBlanc ve ark., 2010).

## **2.7. Koruma ve Kontrol**

Koyun sürülerinde BDV'nin kontrolü iki temel esasa dayanır: Birincisi PI koyunların tespiti, ikincisi gebeliklerinin ilk yarısı sırasında şüpheli gebe koyunların enfeksiyona yakalanmasının önlenmesidir (Nettleton ve ark., 1998).

Enfekte sürülerde BDV'nin kontrolü zordur ve yetiştirme metotlarıyla ilişkili olarak yetiştiricilerin şartlarına bağlıdır. Sporadik salgının görüldüğü bir sürüde enfeksiyon belirlenen tüm koyun ve kuzular, bir sonraki yetiştirme sezonu başlamadan önce kesime sevk edilip sürüden ayrılmalıdır. Ticari antikor testleri ile endemik olarak enfekte sürülerde farklı yaştaki koyunların bağışıklık durumu ve duyarlı hayvanları tespiti ortaya konabilir. Ayrıca kan testleri de antikor negatif, virus pozitif PI koyunları belirlemede kullanılabilir. Diğer sürülerde PI koyunların identifikasyonu ve imha edilmesi pek uygulanabilir değildir. Bu tür durumlarda, üreme mevsimi dışında, bilinen PI kuzulara maruz bırakılan sürüde bağışıklık seviyesi arttırılabilir. Virusun yayılma hızı en az 3 hafta boyunca kapalı besleme alanlarında sürünün tutulması ile arttırılabilir (Nettleton ve ark., 1998).

BDV'nin kontrolü için birkaç uygulanabilir ticari aşı mevcuttur. Bu aşılarından biri, BD ve BVD-1 viruslarının temsili suşlarını içeren adjuvantlı inaktif bir aşıdır. Ancak BVD ve CSF'de gözlemlenen benzer problemler bu aşılar da ortaya çıkmıştır. Koyunlar için inaktif aşılar geliştirilmiştir, fakat çok uzun süre immunité sağlaması olası değildir ve saha suşlarına karşı yeterli seviyede korumayı sürdürmek için düzenli olarak uygulama gerektirmektedir (Vantsis ve ark., 1980; Brun ve ark., 1993). Ayrıca aşılanmamış koyunlara kıyasla aşılananlarda lökosit sayısı yönünden BDV enfeksiyonunun etkisinin azaldığı ve nazal sekresyonda viral saçılımın da azaldığı gösterilmiş ancak fetal enfeksiyon bakımından koruyucu olup olmadığı incelenmemiştir (Anne, 2012).

Öncelikle ilk gebelik esnasında bağışıklığı maksimum seviyeye çıkarmak amacıyla üreme yaşına ulaşmadan önce genç hayvanlara aşı uygulanmalıdır. Yıllık bağışıklık arttırıcı doz gerekebilir (Nettleton ve ark., 1998).

BDV izolatları en az üç farklı genotip içerisinde (BDV-1, BDV-2, BDV-3) ayrılabilirler (Becher ve ark., 2003). Bu nedenle etkin aşılar yaygın bir derecede çapraz

koruma gösteren viral suşlardan teşekkül etmelidir veya birkaç viral suşu kapsamalıdır. İdeal olarak, BDV aşıları BVDV'den de bir dereceye kadar koruma sağlamalıdır. Çünkü her iki virus da yaygın olarak koyunları enfekte etmektedirler. Etkin BDV aşıları virusun transplental yayılımını önlemelidir, ancak son bilgilere göre fötüsün korunması için gerekli aşılardan sonra oluşan antikör titre seviyesi yeterli değildir (Benjamin ve Daniel, 2013). Ayrıca farklı pestiviruslar ve suşları arasında yetersiz bir çapraz koruma vardır. Vantsis ve ark. (1980) daha önce BVDV veya BDV'ye maruz kalan gebe koyunların %50-92'sinin heterolog suşun klinik etkilerine duyarlı olduklarını (enfekte kuzu doğumlarını) belirledi. Daha önce maruz kaldıkları suşa homolog bir suşa maruz kalan koyunlar, % 100 koruma yani hiçbir klinik belirti göstermemişlerdir ve etkilenmiş kuzu doğumu olmamıştır.

Bir sürüye BD'nin girişini engellemek için sadece işletmenin kendi yetiştirdiği, yenisiyle değiştirilecek dişi hayvanlar kullanılmalıdır. Yeni koçlar satın alınmadan önce BDV yönünden kan testlerine tabi tutulmalı ve sürüye katılmadan önce karantinaya alınmalıdır (Nettleton ve ark., 1998).

Eğer yeni dişi koyunlar satın alınmak zorunda ise PI virus taşıyanları belirlemek için kan testleri yapılmalıdır. Kan testi yapılamadığı takdirde tüm üreme hastalıklarını kontrol altına alabilmek için yeni satın alınan dişi koyunlar daima bir arada ve kuzulama dönemine kadar sürünün geri kalanından ayrı tutulmalıdır. PI sığırlardan koyunlara enfeksiyon bulaşma riski nedeniyle gebe koyunların sığırlarla birlikte asla karışık bir şekilde tutulmamaları gerekir(Nettleton ve ark., 1998).

## **2.8. Amaç**

Bu tezi amacı Samsun Veteriner Kontrol Enstitüsüne gelen sığır, koyun ve keçi abort örneklerinden Ag-ELISA ve RT-PCR testleri ile BDV varlığı araştırılarak Karadeniz Bölge'sindeki BD epidemiyolojisini belirlemektir. Ülkemizde ilk defa sığır abort örneklerinde BDV araştırılması ve ayrıca elde edilen pozitif örneklerden filogenetik analiz ile bölgede sirküle olan BDV genotipi belirlemek tezin önemli çıktılarından olacaktır.

### 3. MATERYAL VE METOT

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Virus

PCR çalışmalarında Samsun Veteriner Kontrol Enstitüsü'nden temin edilen BDV suşu kullanıldı.

##### 3.1.2. ELISA Kiti

BDV tespiti ticari olarak temin edilen BVDV Ag ELISA kiti (IDEXX, 06-43860-12, Westbrook, USA) kullanılarak yapıldı

##### 3.1.3. RNA Ekstraksiyon Kiti

RNA ekstraksiyonları RNA ekstraksiyon kiti (Macherey-Nagel, 1605/010, Düren, Germany) kullanılarak yapıldı.

##### 3.1.4. RT-PCR Kiti

RT-PCR analizi için One – step RT-PCR kit (Qiagen, Cat No: 210212, Hilden, Germany) kullanıldı.

RT-PCR analizi için kullanılan primer ve probe dizinleri, büyüklükleri ve hedef bölgeleri Tablo 3’de, sekans analizinde kullanılan primer dizinleri, büyüklüğü ve hedef bölgesi ise Tablo 4’te gösterildi.

**Tablo 3.** RT-PCR testinde kullanılan primer ve probe dizinleri, hedef bölgeleri ve büyüklükleri

Primer ve Prob	Dizin(5'----- 3')	Hedef bölge	Büyüklük (bp)	Referans
324	ATGCCCWTAGTAGGACTAGCA	5' UTR	288	Vilcek ve ark., 1994
326	TCAACTCCATGTGCCATGTAC			
PBD1	TCGTGGTGAGATCCCTGAG	5' UTR	225	Vilcek ve Paton, 2000
PBD2	GCAGAGATTTTTATACTAGCCTATRC			
BDV87F	CCGTGTTAACCATACACGTAGTAGGA	5' UTR	155	Willoughby ve ark., 2006
BDV237	GCCCTCGTCCACGTAGCA			
BDV136T (probe)	FAM-CTCAGGGATCTCACCACGA-TAMRA			

**Tablo 4.** Kullanılan sekans primer dizinleri, büyüklüğü ve hedef bölgesi

Primerler	Dizin	Hedef bölge	Büyük­lük (bp)	Referans
BD1	TCTCTGCTGTACATGGCACATG	N <sup>pro</sup>	738	Vilcek ve Belak,
BD2	TTGTTRTGGTACARRCCGTC			1996

### 3.1.5. Sekans Cihazı

Test için ABI 3130 XL Genetic Analyzer (Thermo Fischer Scientific, USA) kullanıldı.

### 3.1.6. Abort Materyalleri

Samsun Veteriner Kontrol Enstitüsü'ne 2015, 2016 ve 2017 yıllarında gelen abort olmuş 193 sığır, 100 koyun ve 20 keçi fötüsü olmak üzere toplamda 313 materyal (akciğer, karaciğer, beyin ve dalak dokuları) kullanıldı. Materyallerin temin edildiği yerlere göre materyal sayısı Tablo 5'de gösterilmiştir.

**Tablo 5.** Toplanan abort örneklerinin ait oldukları hayvan türü ve toplandığı yerler

No	Geldiği Yer	Örnek Sayısı		
		Sığır	Koyun	Keçi
1	AMASYA/Gümüşhacıköy	1	1	
2	AMASYA/Merkez	2	9	
3	AMASYA/Merzifon	3	1	
4	AMASYA/Suluova	2		
5	AMASYA/Taşova	2		
6	GİRESUN/Alucra			1
7	GİRESUN/Dereli	1	4	
8	GİRESUN/Piraziz		2	
9	GİRESUN/Şebinkarahisar	1	3	
10	ORDU/Çaybaşı	4		
11	ORDU/Gürgentepe		1	
12	ORDU/Karadüz	1		
13	ORDU/Korgan		1	
14	ORDU/Mesudiye	2		
15	RİZE/Ardeşen	1		
16	SAMSUN/Alaçam	3	4	2
17	SAMSUN/Asarcık	1		

**Tablo 5.** Toplanan abort örneklerinin ait oldukları hayvan türü ve toplandığı yerler (devamı)

		<b>Sığır</b>	<b>Koyun</b>	<b>Keçi</b>
18	SAMSUN/Ayvacık	2		
19	SAMSUN/Bafra	31	4	2
20	SAMSUN/Canik	3	1	
21	SAMSUN/Çarşamba	7	14	
22	SAMSUN/Havza	19	4	1
23	SAMSUN/Kavak	8	2	
24	SAMSUN/Ladik		1	
25	SAMSUN/Merkez	2		
26	SAMSUN/Ondokuzmayıs	2	1	
27	SAMSUN/Salıpazarı	2		
28	SAMSUN/Tekkeköy	6	2	
29	SAMSUN/Terme	2		
30	SAMSUN/Vezirköprü	2	7	1
31	SAMSUN/Yakakent	1		1
32	SİNOP/Boyabat	1		
33	SİNOP/Dikmen		1	
34	SİNOP/Durağan	1	1	
35	SİNOP/Merkez	1	3	
36	SİVAS/Akıncılar	1		
37	SİVAS/Doğanşar	1		
38	SİVAS/Kangal	3		
39	SİVAS/Koyulhisar	1		
40	SİVAS/Merkez	10	1	4
41	SİVAS/Şarkışla		1	
42	SİVAS/Suşehri	1	1	
43	SİVAS/Ulaş		1	
44	SİVAS/Yıldızeli		1	
45	SİVAS/Zara	37		
46	TOKAT/Almus	2	8	4
47	TOKAT/Erbaa	4	5	
48	TOKAT/Merkez	8	8	4
49	TOKAT/Pazar		1	
50	TOKAT/Reşadiye	1	1	
51	TOKAT/Sulusaray	1		
52	TOKAT/Yeşilyurt	1		



**Tablo 5.** Toplanan abort örneklerinin ait oldukları hayvan türü ve toplandığı yerler (devamı)

		<b>Sığır</b>	<b>Koyun</b>	<b>Keçi</b>
53	TOKAT/Zile		1	
54	TRABZON/Akçaabat	1		
55	TRABZON/Arsin	1		
56	TRABZON/Köprübaşı	1		
57	TRABZON/Maçka	1		
58	TRABZON/Sürmene		3	
59	TRABZON/Şalpazarı	1		
60	TRABZON/Tonya	1	1	
61	TRABZON/Vakfikebir	2		
<b>TOPLAM</b>		<b>193</b>	<b>100</b>	<b>20</b>

## **3.2. Metot**

### **3.2.1. Numunelerin İşlenmesi**

Samsun Veteriner Kontrol Enstitüsü' ne gelen abort olmuş sığır, koyun ve keçi fötüslerinin iç organları (akciğer, karaciğer ve dalak dokuları) toplandı. Fötüstan aseptik şartlarda çıkarılan organlardan alınan doku numuneleri virolojik teşhis için 2 mL PBS dilüent ile (1/10) karıştırılıp, MagNa Lyser (Roche, Mannheim, Germany) boncuklu tüplerde 3000 g'de 3 dakika homojenize edildi ve daha sonra homojenat eppendorf tüplerde 3000 g'de 10 dakika +4'de santrifüj edildi ve üstte kalan süpernatant inokulum olarak kullanılıncaya kadar -20 °C de saklandı.

### **3.2.2. Numunelerde Pestivirus Antijenin (Ag-ELISA Testi ile) Belirlenmesi**

Doku örnekleri pestivirus Ag-ELISA kit (IDEXX, 06-43860-12, Westbrook, USA) kullanılarak üretici firmanın talimatına göre pestivirus antijenleri yönünden test edildi. Bu amaçla ticari kitin prosedürleri aşağıdaki gibi uygulandı;

Doku örneklerinden elde edilen süpernatant ile pestivirus antijenini belirlemek amacıyla E<sup>ms</sup> gen bölgesini hedef alan spesifik monoklonal antikolarla kaplanmış 96 kuyucuklu ELISA tabletleri kullanıldı.

Her bir kuyucuğa 'Detection antibody' 50 µl dağıtıldı. A1 ve B1 kuyucuklarına 50 µl pozitif kontrol, C1 ve D1 kuyucuklarına 50 µl negatif kontrol koyuldu. Sonra geri kalan her bir kuyucuğa örneklerden 50 µl konuldu.

Hafifçe pleyte vurarak kuyucuklardaki içeriğin uygun bir şekilde dağılımı sağlandı. Daha sonra steril yapışkan bantla kapatılarak 37 °C’de 2 saat inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon sonrasında kuyucuklardaki miks dökülerek kit içerisindeki ‘Wash Solution’ ile her bir kuyucuk otomatik ELISA yıkayıcı (ELx50 Biotek, Windoski, USA) yardımı ile 5 defa yıkandı ve herhangi bir rezidüe kalıp kalmadığı kontrol edildi.

Her bir kuyucuğa kit içerisinde yer alan konjugattan 100 µl koyuldu ve oda sıcaklığında (18-26 °C) 30 dakika inkübasyona bırakıldı.

Yıkama işlemi yine 5 defa olmak üzere otomatik ELISA yıkayıcı yardımı ile tekrarlandı.

Her bir kuyucuğa TMB N.12 (tetra metil benzidin) substrat solüsyonundan 100 µl koyuldu ve oda sıcaklığında (18-26 °C) 10 dakika inkübasyona bırakıldı.

Her bir kuyucuğa Stop Solution N.3’den 100 µl koyuldu ve reaksiyon durduruldu.

ELISA okuyucu ile 450 nm’de tabletlerdeki örneklerin ve kontrollerin OD değerleri okutuldu. Bu amaçla ticari kitin belirtmiş olduğu aşağıdaki formüller kullanılarak pozitif ve negatif sonuçlar belirlendi;

$$NC \bar{x} = NC1 A(450) +$$

$$PC \bar{x} = PC1 A(450) +$$

$$\text{Validasyon kriterleri: } NC \bar{x} \leq 0,250 \text{ } PC \bar{x} - NC \bar{x} \geq 0,150$$

Her bir örneğin OD (S-N) değerlerinin bulunması ile örneklerdeki antijen varlığı veya yokluğu şu şekilde hesaplanmıştır;

$$S-N = \text{Sample } A(450) - NC \bar{x}$$

S-N ≤ 0,300 olan örnekler negatif, S-N > 0,300 olan örnekler pozitif olarak değerlendirilmiştir.

### 3.2.3. RT-PCR

Abort olmuş fötuslara ait doku örneklerinde BDV’ye ait nükleik asitleri tespit etmek amacıyla RT-PCR tekniği uygulandı.

## RNA Ekstraksiyon İşlemi

Numunelerin RNA ekstraksiyonu, RNA ekstraksiyon kiti (Macherey-Nagel, 1605/010, Düren, Germany) ile üretici firmanın talimatı doğrultusunda aşağıdaki prosedürlere göre yapıldı;

- -20 °C’de saklanan homojenizatlardan 1,5 ml’lik steril ependorf tüpe 200 µl süpernatant, 350 µl Buffer RA1 ve 3,5 µl β-mercaptoethanol eklenerek şiddetli bir şekilde vortexlendi.
- Nukleospin filitrelelere miksi aktarıldı, 11.000 xg de 1 dk santrifüj edildi.
- Nucleospin filitreler atıldı ve 350 µl %70’lik ethanol eklenip 5 kere pipete edildi.
- Her örnek için bir Nukleospin RNA kolonu 2 ml’lik toplama tüplerine yerleştirildi. Lizat 2-3 kere pipete edildikten sonra kolona aktarıldı. 11.000 xg de 30 saniye santrifüj edildi ve kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi.
- 350 µl MDB eklendi ve 11.000 xg’de 1 dk santrifüj edildi.
- Her örnek için steril 1,5 ml’lik ependorf tüpüne 10 µl rDNase miksi ve 90 µl “Reaction Buffer for rDNase” eklendi ve pipete edildi. Bu karışımdan kolonun silika membran merkezine 95 µl eklendi ve oda sıcaklığında 15 dk bekletildi.
- Nucleospin RNA kolona 200 µl “Buffer RAW2” eklendi ve 11.000 xg’de 30 saniye santrifüj edildi. Kolon yeni bir toplama tüpüne aktarıldı.
- Kolona 600 µl “Buffer RA3” eklendi ve 11.000 xg’de 30 saniye santrifüj edildi. Sıvı kısmı atıldı ve kolon tekrar toplama tüpüne yerleştirildi.
- Kolon 250 µl “Buffer RA3” eklendi ve 11.000 xg’de 2 dk santrifüj edildi. Kolon “Nuclease-free” toplama tüpüne (1,5 ml) yerleştirildi.
- 60 µl “RNase-free su” eklenerek 11.000 xg’de 1 dk santrifüj edildi. Böylece ekstraksiyon işlemi tamamlandı.

## PCR Aşamaları

- RT Real Time PCR Uygulaması

BDV varlığını tespit etmek amacıyla Real-Time RT-PCR uygulaması için One – step RT-PCR kit (Qiagen, OneStep RT-PCR KİT, Cat No: 210212, Hilden, Germany) kullanılarak 25 µl hacminde ve 5X (Tris-Cl, KCl, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, DTT) 0,4 mM dNTP, 0,6 µM BDV87F, 0,6 µM BDV237, 0,3 µM BDV136T, 10 U RNase

inhibitör ve enzim miks kullanılarak aşağıdaki oranlarda reaksiyon konsantrasyonu hazırlanmıştır.

dH <sub>2</sub> O	8 µl
5x	5 µl
dNTP mix (10 mM)	1 µl
BDV87F (10 pmol)	1,5 µl
BDV237 (10 pmol)	1,5 µl
BDV136T (5 pmol)	1,5 µl
Enzim mix	1 µl
RNase inhibitör	0,5 µl
RNA	5 µl
Toplam	25 µl

Hazırlanan konsantrasyon Real-Time PCR cihazında (Light Cycler 2.0, Roche, Rotkreuz, Switzerland) 50 °C 30 dk reverse transkripsiyon ve 95 °C 15 dk ile ilk denatürasyon ve enzim aktivasyonunu (Taq polimeraz) takiben 95 °C 15 sn ve 60 °C 30 sn olmak üzere oluşturulan döngü 40 defa tekrar edildikten sonra 72 °C’de 10 dk son uzatma işlemi ile reaksiyon tamamlandı.

- Konvansiyonel RT-PCR Uygulaması

Konvansiyonel RT-PCR ürünü için ise panpesti primerleri olan 324/326 primerleri ve BDV spesifik primerleri olan PBD1/PBD2 primerleri ile yine One – step RT-PCR kit (Qiagen, OneStep RT-PCR KİT, Cat No: 210212, Hilden, Germany) kullanılarak 50 µl son hacimde olacak şekilde aşağıdaki reaksiyon konsantrasyonu hazırlanmıştır.

dH <sub>2</sub> O	24,5 µl
5X Buffer	10 µl
dNTP mix (10 mM)	2 µl
F primer (10 pmol)	3 µl
R primer (10 pmol)	3 µl
Enzim mix	2 µl
RNase inhibitör	0,5 µl
RNA	5 µl
Toplam	50 µl

Hazırlanan konsantrasyon thermal cyclerde (Thermo Fisher Sci., Artık Thermal Cycler, Vantaa, Finland, AKC961101915 ) panpesti primerleri için 50 °C 30 dk reverse transkripsiyon ve 95 °C 15 dk ile ilk denatürasyon ve enzim aktivasyonunu (Taq polimeraz) takiben 95 °C 1 dk, 56 °C 1 dk ve 72 °C 1 dk olmak üzere oluşturulan döngü 35 defa tekrar edildikten sonra 72 °C’de 10 dk son uzatma işlemi ile reaksiyon tamamlandı.

Pozitif sonuç veren örnekler için aynı konsantrasyon ve RT-PCR koşullarında ancak döngü sayısı 40 yapılarak PBD1/PBD2 primerleri ile test edildi.

### **Konvansiyonel PCR Ürünlerinin Görüntülenmesi**

Konvansiyonel PCR sonucu elde edilen ürünlerin görüntülenmesi için agaroz jel kullanıldı. Agaroz (Sigma A9539) % 1 yoğunlukta olmak üzere % 0,5 TBE (Tris Borat EDTA) ile karıştırılarak erlenmayer içerisinde sulandırıldı ve mikrodalga fırında kaynatılarak homojen hale getirildi. Sonrasında oda sıcaklığında 50 °C’ye kadar soğuması sağlandı. İçerisine 5 µl ethidium bromide (Sigma E8751) eklendi ve tarakları takılı jel taşıyıcısı içerisine boşaltıldı. Agaroz jelin +4°C’de 20 dk süresince donması için beklendi. Jel donduktan sonra takılı taraklar çıkarılarak elektroforez tankına yerleştirildi ve jel üzerinde 2-3 mm yükseklikte kalacak şekilde % 0,5 TBE buffer ilave edildi. Jelde sırasıyla ilk göze 1 µl DNA merdiveni konuldu ve takip eden gözlerle 5 µl PCR ürünü 1 µl boya ile karıştırılarak eklendi. Yatay jel elektroforez cihazı (Bio – Rad Wide Mini Sub Cell GT Horizontal Electrophoresis System, California, USA) 120 Volt akımda 40 dk çalıştırılarak yürütme işlemi tamamlandı.

Elektroforez sonucunda jel, jel görüntüleme cihazına (Imaging system / El Logic 200) aktarıldı ve UV altında 225 bç paralelinde PCR ürünleri incelendi.

### **3.2.4. Elde Edilen Suşların Genotipinin Belirlenmesi**

Bulunan BDV pozitif örnekler, N<sup>pro</sup> bölgesini gedef alan BD1 ve BD2 primerleri kullanılarak 738 bç uzunluğundaki bir dizi sekansı yapılmak üzere konvansiyonel PCR sonucu jelde yürütülerek sekansa gönderilmiştir. Bu amaçla yapılan PCR konsantrasyonu ve koşulları aşağıda belirtilmiştir.

dH2O	24,5 µl
5X Buffer	10 µl

dNTP	2 µl
F primer	3 µl
R primer	3 µl
Enzim	2 µl
Rnase inh.	0,5 µl
RNA	5 µl
Toplam	50 µl

Sekans uygulaması için kullanılan BD1 ve BD2 primerleri ile yine hazırlanan 50 µl hacimde konsantrasyon thermal cyclerda (Thermo Fisher Sci., Artik Thermal Cycler, Vantaa, Finland, AKC961101915 ) 50 °C 30 dk ve 95 °C 15 dk' yı takiben 94 °C 1 dk, 53 °C 1 dk ve 72 °C 1 dk olmak üzere oluşturulan döngü 40 defa tekrar edildikten sonra 72 °C 10 dk inkübasyon neticesinde reaksiyon tamamlandı.

- RT-PCR ile çoğaltılan N<sup>pro</sup> bölgesinin Sekansa Gönderilmesi

BD1 ve BD2 primerleri ile çoğaltılan N<sup>pro</sup> bölgesinin nükleotid dizileri sekansyapılması için ilgili kuruluşa gönderildi (Refgen, ANKARA).

### 3.2.5. Veri Analizi

Çalışmada çoğaltılan ve DNA dizi analizi elde edilen N<sup>pro</sup> gen bölgesi dizileri BioEdit programı ile düzenlendi ve GenBank'ta yer alan diğer dizileri ile karşılaştırıldı (Hall, 1999, version 7.09). Benzerlik belirlenen ve çalışmada elde edilen sekanslar filogenetik analizde kullanıldı. Ayrıca filogenetik analiz için BDV ve BVD gruplarının farklı genotiplerine ait sekanslarda kullanılmıştır. BioEdit programında yer alan ClustalW programı sekansların Cluster analizi kullanıldı ve buradan elde edilen veriler MEGA filogenetik programı yardımıyla neighbor-joining (NJ) analizi ile işlendi. Aligment boşlukları kayıp veri olarak değerlendirildi. Oluşturulan dendrogramların güvenilirliği MEGA 6.0 programı kullanarak seç-bağla (bootstrap) analizi ile 1.000 tekrarlı olacak şekilde test edildi (Tamura ve ark., 2011, version 5).

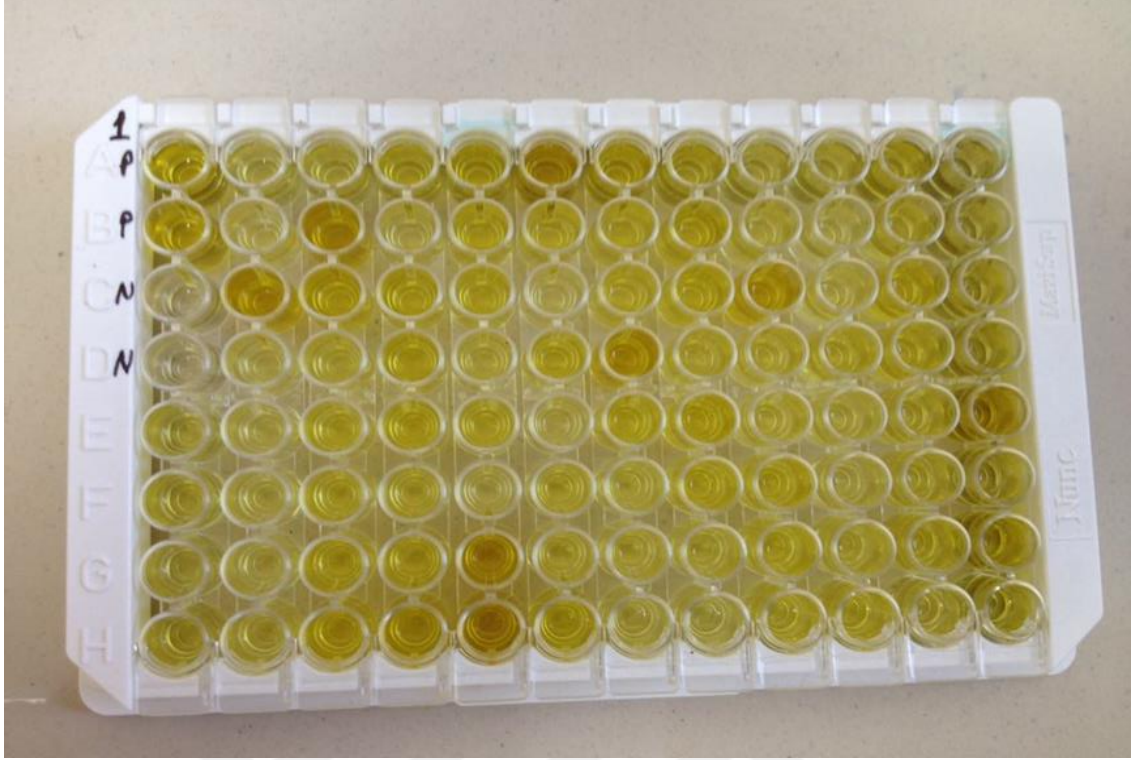
## 4. BULGULAR

### 4.1. Pestivirus Ag-ELISA Sonuçları

Ag-ELISA sonucunda, 193 sığır abort materyalinin 97'sinde (%50,26), 100 koyun abort materyalinin 58'inde (%58), 20 keçi abort materyalinin ise 11'inde (%55) pestivirus pozitif olarak saptandı. Bulunan sonuçların illere ve hayvan türüne göre dağılımı Tablo 6'da gösterildi.

**Tablo6.** İllere göre Pestivirus Ag-ELISA sonuçları

İl Adı	Materyal Sayısı			(+ ) Materyal Sayısı			Prevalans (%)		
	Sığır	Koyun	Keçi	Sığır	Koyun	Keçi	Sığır	Koyun	Keçi
Amasya	10	11	-	5	7	-	50	63,64	-
Giresun	2	9	1	2	7	0	100	77,78	0
Ordu	7	2	-	3	1	-	42,86	50	-
Rize	1	-	-	1	-	-	100	-	-
Samsun	91	40	7	40	21	4	43,96	52,50	57,14
Sinop	3	5	-	3	5	-	100	100	-
Sivas	54	5	4	31	1	3	57,41	20	75
Tokat	17	24	8	7	12	4	41,18	50	50
Trabzon	8	4	-	5	4	-	62,50	100	-
TOPLAM	193	100	20	97	58	11	50,26	58	55



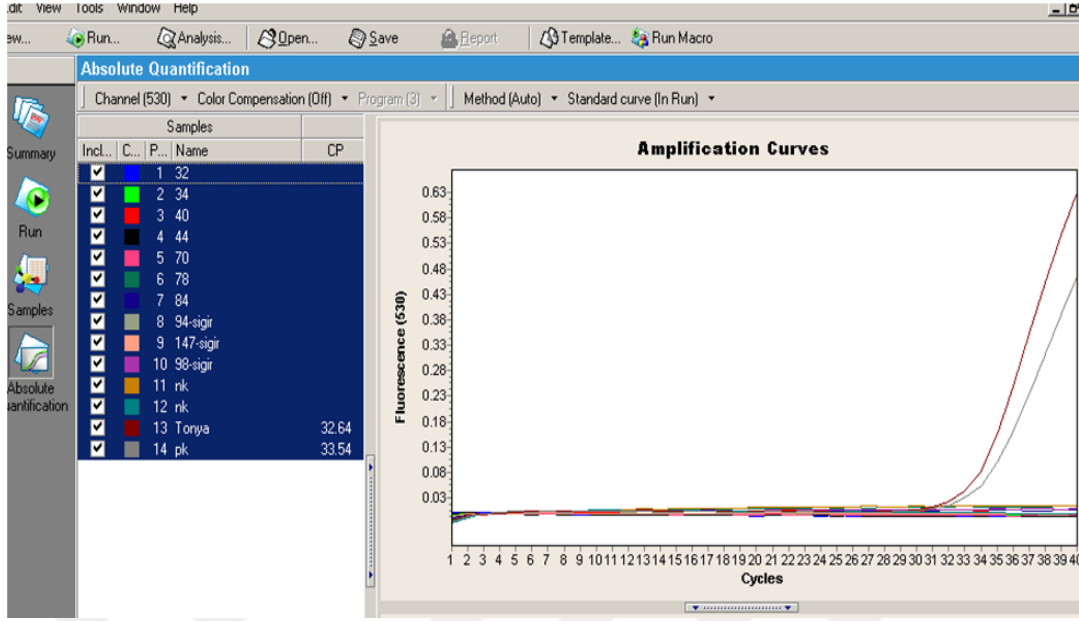
**Şekil 4.** Ag-ELISA uygulanan abort örneklerinde BDV antijen sonuçlarının pleyt üzerinde görünümü. A1 ve B1: Pozitif kontrol. C1 ve D1: Negatif kontrol

## **4.2. RT-PCR Sonuçları**

### **4.2.1. BDV Real Time RT-PCR Sonuçları**

Toplanan 313 abort materyalinin ekstraksiyon işlemlerinin ardından spesifik BDV primer ve probları (Tablo 3) ile yapılan Real Time RT-PCR işlemleri neticesinde Trabzon/Tonya'dan alınan 1 koyun abort materyalinde BDV nükleik asiti tespit edilmiştir. Real Time RT-PCR sonucuna ait görüntü Şekil 5'de gösterilmiştir. Sığır ve keçilerde ise pozitifliğe rastlanmamıştır.





Şekil 5. Real Time RT-PCR sonucu bulunan pozitif örneğin görüntüsü

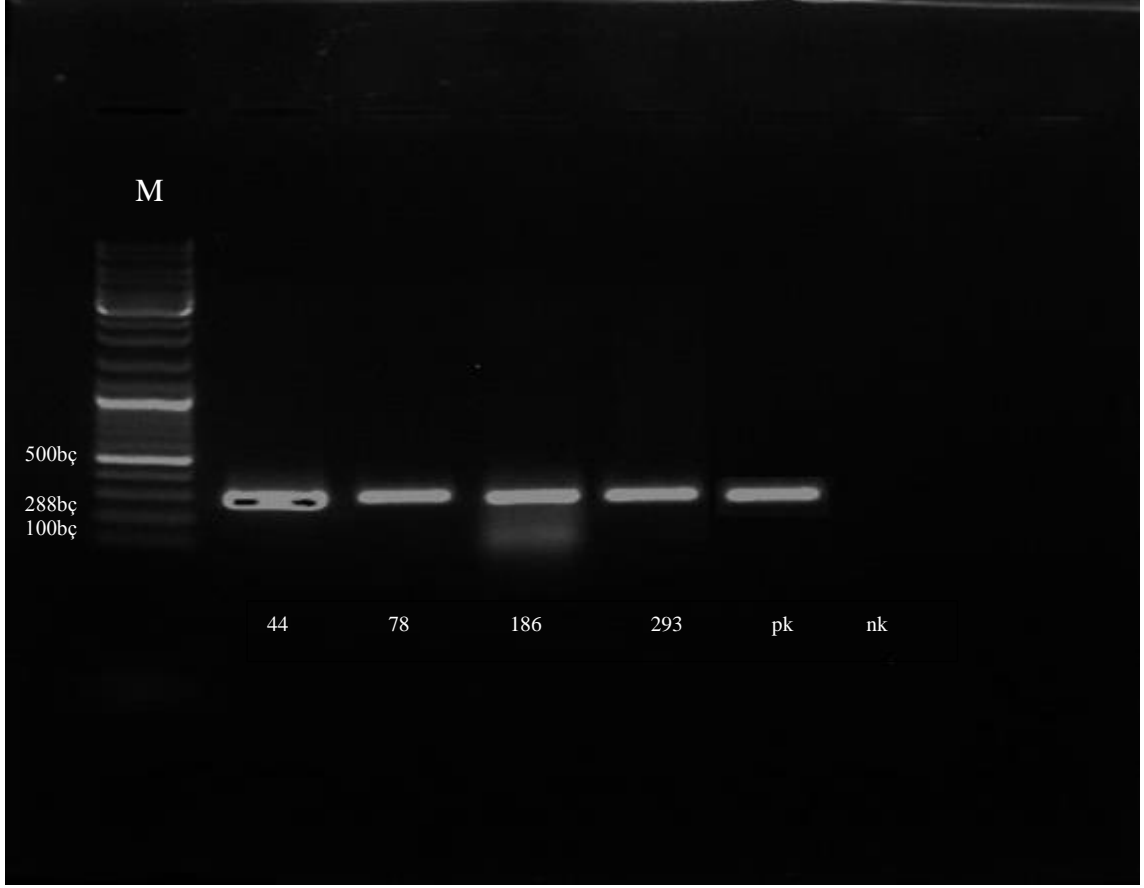
#### 4.2.2. BDV Konvansiyonel RT-PCR Sonuçları

Örneklenen 313 abort materyalinin 324 ve 326 panpesti primerleri ve PBD1 ve PBD2 BDV primerleri ile yapılan konvansiyonel RT-PCR sonuçlarına göre, panpesti primerleri ile 313 hayvanın 4'ünde (%1,27) pestivirus pozitifliği, BDV primerleri ile 3 koyun ve 1 sığır abort materyalinde BDV nükleik asidi saptandı (Tablo 7). Böylece Trabzon/Tonya'dan alınan koyun abort materyalinde hem Real Time RT-PCR hem de konvansiyonel RT-PCR testleri pozitif sonuç verdi.

Tablo 7. Panpesti ile PBD1 ve PBD2 primerleri ile yapılan konvansiyonel RT-PCR sonuçları

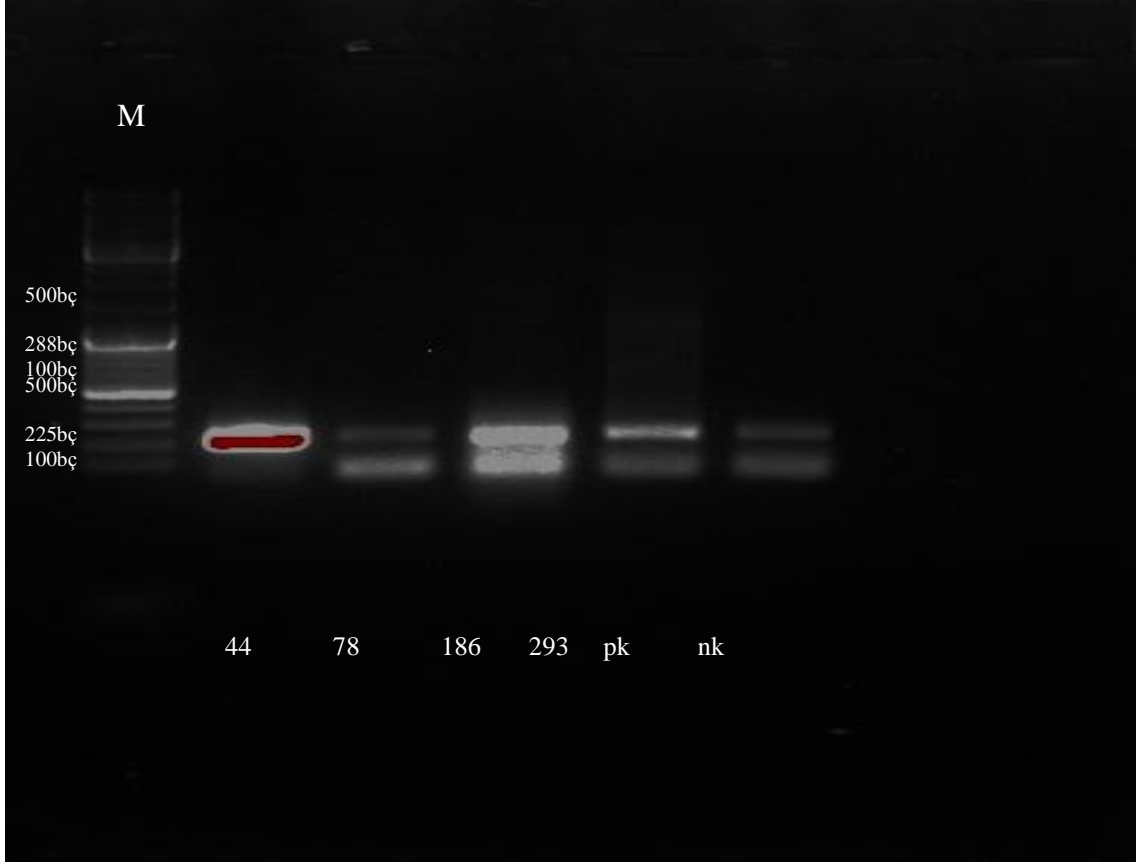
Materyalin Alındığı Yer	Örnek Numarası	Hayvan Türü	Panpesti Primerleri	PBD1/PBD2 Primerleri
TRABZON/Tonya	44	Koyun	Pozitif	Pozitif
SİNOP/Merkez	78	Koyun	Pozitif	Pozitif
TOKAT/Almus	186	Koyun	Pozitif	Pozitif
AMASYA/Merzifon	293	Sığır	Pozitif	Pozitif

Panpesti primerleri kullanıldığı konvansiyonel RT-PCR neticesinde yapılan elektroforez uygulaması sonucu 288 bç'de bant veren 44, 78, 186, 293 numaralı pozitif örneklerin görüntüleri Şekil 6'da gösterilmiştir.



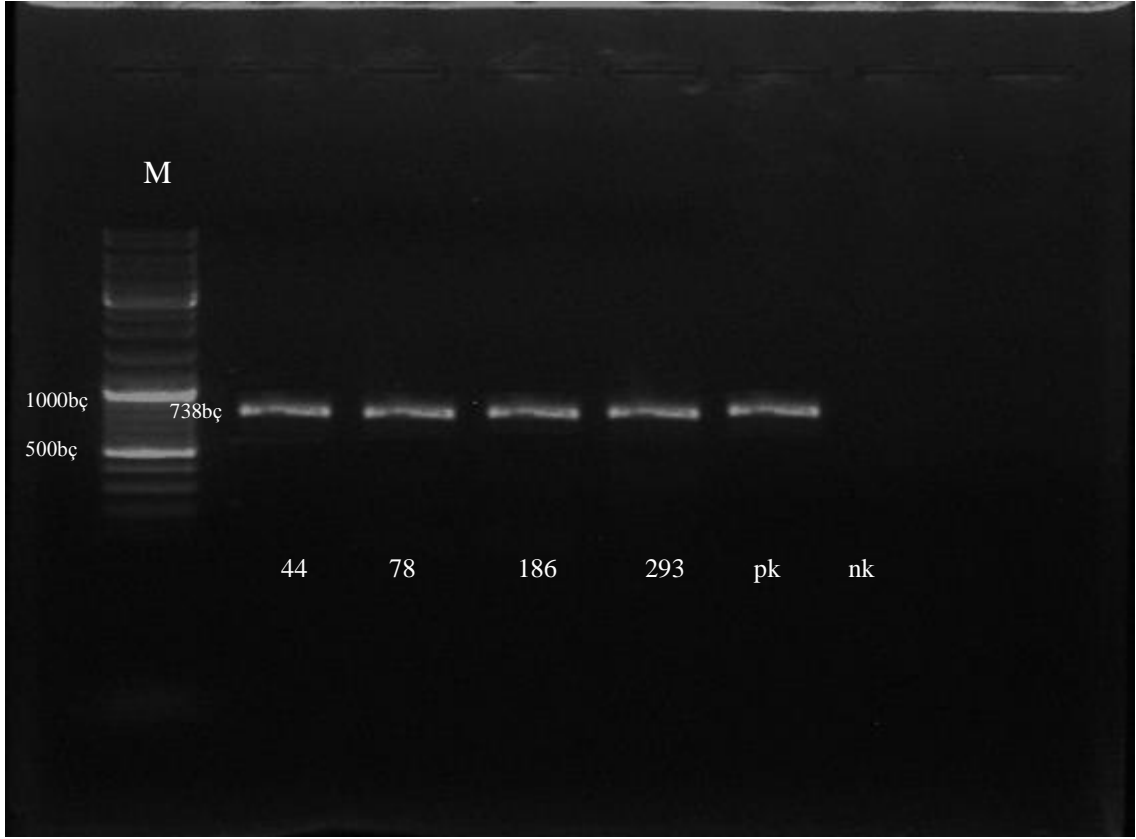
**Şekil 6.** 44, 78, 186 ve 293 numaralı örneklere ait bantlar. M: Marker, pk: Pozitif kontrol, nk: Negatif kontrol, bç: Baz çifti

PBD1 ve PBD2 primerlerinin kullanıldığı konvansiyonel RT-PCR uygulaması sonucu 44, 78, 186, 293 numaralı pozitif örneklerin 225 bç'de bant görüntüleri Şekil 7'de gösterilmiştir.



Şekil 7. 44, 78, 186, 293 numaralı örneklere ait bantlar.M: Marker, pk: Pozitif kontrol, nk: Negatif kontrol, bç: Baz çifti

Konvensiyonel RT-PCR uygulamaları neticesinde pozitif oldukları tespit edilen 44, 78, 186, 293 numaralı örneklerin sekanslama için BD1 ve BD2 primerlerinin kullanıldığı konvasiyonel RT-PCR neticesinde 738 bç'de elde edilen bant görüntüleri Şekil 8'de gösterilmiştir.



**Şekil 8.** 44, 78, 186, 293 numaralı örneklere ait bantlar.M: Marker, pk: Pozitif kontrol, nk: Negatif kontrol, bç: Baz çifti

#### 4.2.3. Sekans Sonuçları

Tez çalışmasında kullanılan  $N^{pro}$  gen bölgesi pozitif olan dört örneğin BD1 ve BD2 primerleri ile DNA dizi sıraları elde edilmiştir. BioEdit programı ile temizlenen DNA dizileri Tablo 8'de verilmiştir.

**Tablo 8.** 44, 78, 186, 293 no'lu örneklerin N<sup>pro</sup> bölgesine göre yapılan sekans dizilimleri

<b>Örnek Numarası</b>	<b>Sekans dizini (5'-3')</b>
44	TAGGGGTCAAAGAACCTGTTTATGACATCGTGGGTGACCCCCTATTTGGTGAAAAAGCACAATACACCCACAAGCA ACCCTCAAATTGCCACATGATAGAGGTGGTGCCGAGGTTAGAACAAGTGTGAAGGATTTGCCCAAAAAGGCGACTG CAGAAGTGGGAACAACCGAGGTCCTGTAAGCGGCATATACATCAAGCCTGGGCCAGTGGTGTACCAGGACTATATAA AACCAGTATACCATAGAGCCCCATTGGAAGTCTGTTCCGAGACACAGTTCTGTGAAGTCACCAAGAGGATAGGGAGG GTTACTGGCAGCGATGGTAGGCTGTATCACCTGTATGTCTGTATAGATGGATGCATATTGCTGAGAACAGCAAGCAG AGTTGGCAAAAACGCTAAAATGGACCCATAATGTTTTGGACTGCCCTCTCTGGGTCACGAGTTGCTCTGACGACGG CAAGAGCAAAGAATCAAGTGACAAGAAACCGGACAGGGTTAAACGGGGAGTTATGAAGATAGCACCTAAGGAAAGT GAAAAAGATAGTAGGTCCAAGCCACTCCGACGCCAC
78	TGCTGTACATGGCACATGGAGTTGATCAATTTTGAATTTTTATGCAAAACAAGCAAACAAAAACCAGCAGGAGTGGA GGAGCCTGTGTACGATTACATGGGGAAGCCCCTGTTCCGGGGAGGCCAGCGAGATACACCCGCAGTCAACCCTGAAGT TGCCGCATGACAGAGGCCGGGCCGAGGTGAGGACCACTTTGAAAGAGCTTCCTCGAAAAGGAGACTGTAGGAGTGG CAATTGTTTAGGCCCAGTCAGTGGAATATACATAAAACCGGGCCCTGTATACTACCAGGATTATAAAGGTCCAGTTA CCAAAGAGCACCGCTAGAAGTCTTTACCGAGGTCCAGTTCTGTGAGGTTACCAAGAGGATTGGAAGGGTGAAGTGGGA GTGACGGACAAGTCTACCACTTATATGTTTGCATAGATGGGTGTGTACTGGTAAAATTGGCTAAAAGGAGTGTGAGT AAAAGTCTCAAGTGGGTAAAGAACACCATGGATAGCCCAGTGTGGGTAGCAAGCTGCTCCGATGACAAGGAAAAA ACCAGAAGAAACCAGACAGAATCAAACAGGGGGCAATGAAGATAACTCCGAAAGAGAGCGAGAAAGACAGTAAAG TGAAGCCCCCTGACGCCACCATCGGGT

**Tablo 8.** 44, 78, 186, 293 no'lu örneklerin N<sup>pro</sup> bölgesine göre yapılan sekans dizilimleri (devamı)

---

186	TACCAAACAGGTAAACAAAACCAGCAGGAGTGGAGGAGCCTGTGTATGACCACACGGGGAAACCCCTGTTCCGGGG AGGCTAGCGAGATACACCCGCAGTCAACCCTAAAGTTACCACATGATAGGGGCCGGGCCGAGGTGAGGACCACTCTT AAAGAGCTTCCTCGTAAGGGGGACTGTAGGAGTGGCAATCATTTCAGGTCCAATCAGTGGAATATACATAAAACCAGG CCCTGTCTACTACCAAGATTATAAAGGTCCAGTCTATCACAGAGCACCGCTAGAACTCTTTACTGAGACCCGGTTCTG TGAAGTTACCAAGAGGATCGGGAGGGTGACTGGGAGTGACGGACAACCTCTACCACTTATATGTCTGCATAGATGGGT GTGTACTGGTAAAATTGGCTAAGAGGGGTGTGAGCAAGACCCTCAAGTGGGTAAAGAACATCATGGATAGCCCACTG TGGGTAGCAAGCTGCTCCGATGACAAAGAAAAGAAAGAAAAAGCCAAAAGAAACCAGACAGAATCAAGCAGGGGA GCGATGAAGATAACTCCAAAAGAGAGCGAGAAGGACAGTAGGGTGAAGCCCCCTGACGCCACCATTGTGGTAGAGG AGTCAAATA
293	TGTTCCGGCGAAAGAGAGTCAATACACCCTCAATCAACGTTAAAACTACCACATGAGAGAGGAAAAAATGATATCCCC ACCAATTTGGCATCCCTACCTAGGAAAGGTGACTGCAGGTCAGGCAATATTAGAGGGCCTGTAAGTGGCATCTATGT AAAACCAGGACCGCTATTTTATCAAGACTACACTGGACCAGTCTACCATAGGGCCCCACTGGAACCTCTTCGAAGAAG GGTCTATGTGTGAAACAACATAAAAGGATTGGGAGGACAACCTGGTAGTGACGGTAAGCTGTACCACATTTATGTGTGC ATAGATGGATGTATATTAGTAAAAAGCGCCACAAGAAACCACCAGAAAATACTCAGATGGGTACACAACAAACTCG AATGCCCTCTGTGGGTAGCAAGTTGCTTTGATACAAAAGGAGAGGGTGCATATAAAAAACAACAGAAACCAGACAG GATGGAAAAGGGGGGCATGAAGATAACACCTAAGGAAACTGAGAA

---

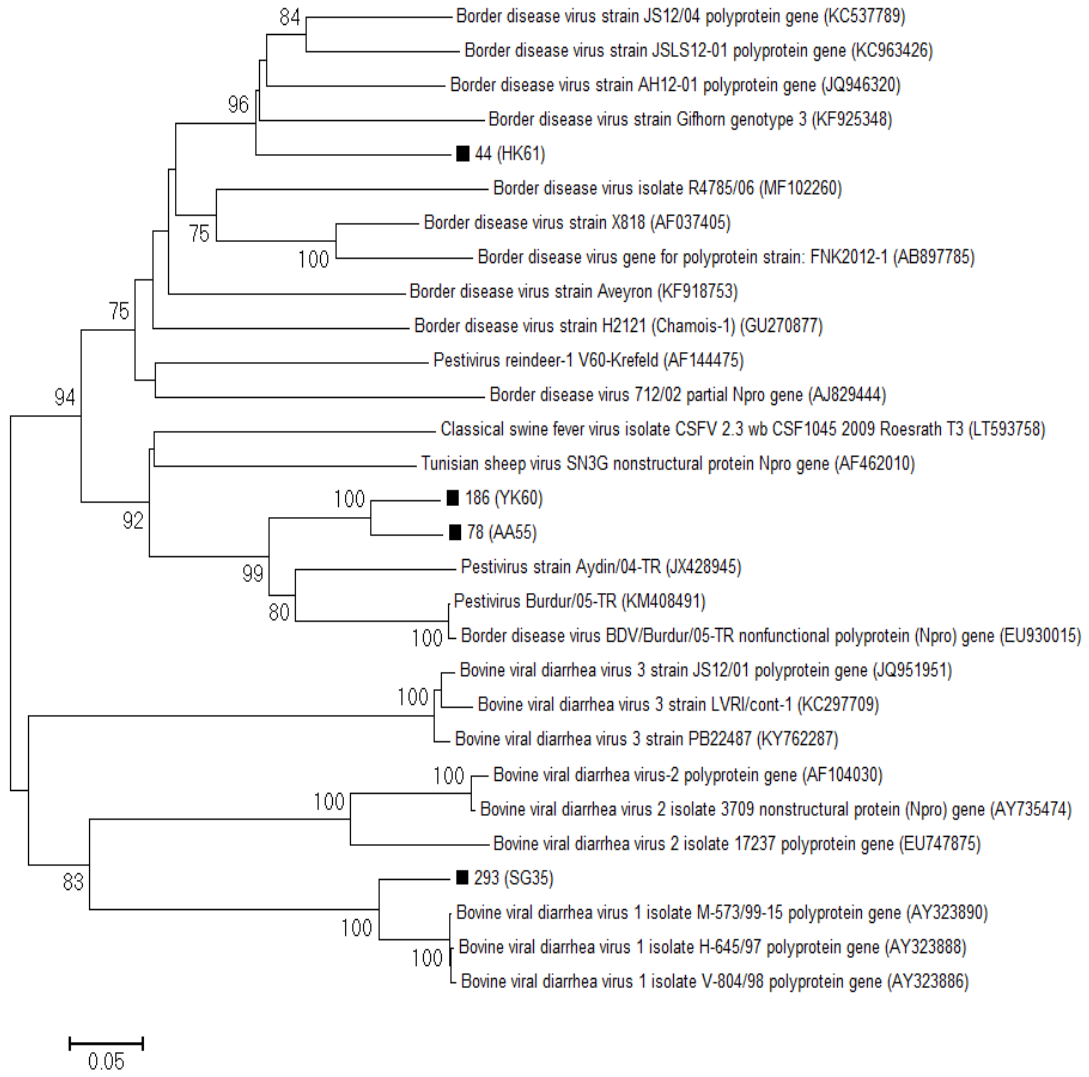
Bu diziler GenBank'ta var olan diğer diziler ile NCBI Blast programında karşılaştırılarak yüzde benzerlikleri belirlenmiştir (Tablo 9).

**Tablo 9:** Npro bölgesi çoğaltılan örneklerin GenBank'ta yer alan diğer örnekler ile yüzde benzerlikleri

Örnek No	Benzer olduğu N <sup>pro</sup> gen bölgesi	Gen Bank No	Örtüşme (%)	Benzerlik (%)
44	Border disease virus strain JS12/04	KC537789	100	80,52
	Border disease virus strain AH12-01	JQ946320	100	79,45
	Border disease virus strain JSLS12-01	KC963426	100	76,87
78	Pestivirus Burdur/05-TR	KM408491	99	80,80
	Pestivirus strain Aydın/04-TR	JX428945	99	78,95
	Border disease virus BDV/Burdur/05-TR	EU930015	95	79,13
186	Pestivirus Burdur/05-TR	KM408491	100	80,75
	Pestivirus strain Aydın/04-TR	JX428945	100	80,26
	Border disease virus BDV/Burdur/05-TR	EU930015	99	79,74
293	Bovine viral diarrhea virus 1 isolate H-645/97	AY323888	100	90,10
	Bovine viral diarrhea virus 1 isolate M-573/99-15	AY323890	100	89,90
	Bovine viral diarrhea virus 1 isolate V-804/98	AY323886	100	89,90

### Filogenetik Ağaç

Çalışmada sekans analizi yapılan örneklerin yakın ilişkili olduğu virüs grupları ile filogenetik benzerlikleri belirlenmiştir. Elde edilen dendogram'a göre Trabzon/Tonya'ya ait 44 numaralı, Sinop/Merkez'e ait 78 numaralı ve Tokat/Almus'a ait 186 numaralı koyun abort materyallerinden elde edilen viruslar BDV olarak tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra dendogram incelendiğinde Amasya/Merzifon'a ait 293 numaralı sığır abort materyalinden elde edilen virus BVD olarak tespit edilmiştir (Şekil 9)



**Şekil 9.** Örneklerin filogenetik ağacı. Dendogram MEGA 6.0 filogenetik programı kullanılarak neighbor-joining (NJ) metodu ile yapılmıştır (Tamura ve ark., 2011). Nodların yanındaki rakamlar seç-bağla (bootstrap) değerlerini göstermektedir. Şeklin altındaki skala ise benzerlik derecesini göstermektedir. **CSFV:** Rosrath(LT593758); **BDV-1:** X818(AF037405), FNK2012-1(AB897785); **BDV-2:** V60(AF144475); **BDV-3:** JS12/04(KC537789), JS12-01(KC963426), AH12-01(JQ946320), Gifhorn(KF925348); **BDV-4:** H2121(GU270877); **BDV-5:** Aveyron(KF918753); **BDV-7:** Aydın/04-TR(JX428945), Burdur/05-TR(KM408491), BDV/Burdur/05-TR(EU930015); **BDV-8:** R4785/06(MF102260); **BDV-Italy:** 712/02(AJ829444); **BDV-Tunisia:** SN3G(AF462010); **BVDV-1:** M-573/99-15(AY323890), H-645/97(AY323888), V-804/98(AY323886); **BVDV-2:** Giessen-1(AF104030), 3709(AY735474), 17237(EU747875); **BVDV-3:** JS12/01(JQ951951), LVRI/cont-1(KC297709), PB22487(KY762287). BDV-6 için N<sup>pro</sup> gen bölgesi sekansına ulaşamamıştır. Bu tez çalışmasında 44(HK61), 78(AA55), 186(YK60), 293(SG35) numaralı örneklerden elde edilen virüslerin sırasıyla Genbank erişim numaraları: MN102085, MN102086, MN102087, MN102088.



## 5. TARTIŞMA

Küçük ruminantlarda önemli ekonomik kayıplara neden olan pestivirus enfeksiyonları ile ilgili ülkemizde (Sinop, Samsun, Ordu, Giresun, Trabzon, Rize, Amasya, Tokat, Sivas, Kayseri, Erzurum, Van, Siirt, Çorum, Aydın, Burdur, Kırıkkale), BDV ve BVDV ayırımı yapılmaksızın ortak antijene karşı hazırlanmış pestivirus ELISA kitleri ve panpesti primerleri kullanılarak yapılan RT-PCR testleri ile yapılan araştırmalarda koyunlarda % 0,9-78,5 arasında değişen oranda enfeksiyon prevalansı bildirilmiştir (Burgu ve ark., 1987; Çokçalışkan, 2000; Burgu ve ark., 2001; Ataseven ve ark., 2006; Okur Gumusova ve ark., 2006; Gür, 2009; Hasircioglu ve ark. 2009; Albayrak ve ark., 2012; Yazıcı ve ark., 2012). Dünyada ELISA ve RT-PCR testleri ile yapılan araştırmalarda ise (Avrupa, Hindistan, Japonya, Çin, Kuzey Amerika, Avustralya ve Yeni Zelanda) koyunlarda bildirilen pestivirus prevalansı ise % 5-88'dir. (Nettleton ve Willoughby, 2010; Garcia-Perez, 2010; Giangaspero ve ark., 2011; Li ve ark., 2013a). Çalışmamızda ise koyun, keçi ve sığır numunelerine uygulanan Ag-ELISA testi sonunda pestivirus prevalansı sığırdaki % 50,28, koyunda % 58 ve keçide % 55 oranında belirlenmiştir.

Garcia-Perez ve ark. (2009) yapmış oldukları çalışmada 25 koyun sürüsünden toplanan abort olmuş 67 fötüs örneğinde pestivirus Ag-ELISA ve panpesti primerleri kullanılarak yaptıkları RT-PCR uygulaması ile pestivirus varlığını karşılaştırmalı olarak araştırmışlar ve Ag-ELISA testi ile %41,4, RT-PCR testi ile ise %7,9 oranında pozitiflik tespit etmişler ve bir sürüdeki pestivirus varlığını doğrulamak için hangi tekniğin kullanılacağına mevcut örneklerin türüne göre seçilmesi gerektiğini ve Ag-ELISA uygulamasının viral RNA'nın stabilitesini etkileyebilecek belirli bir otoliz derecesine sahip fötüsler veya ölü doğumlar için alternatif olabileceğini vurgulamışlardır. Ayrıca OIE 2017 yılı BDV mauneline göre de Ag-ELISA, akut BDV enfeksiyonlarını saptamada yeterli değildir (OIE, 2017). Bu tez ile de Garcia-Perez ve ark. (2009) tarafından bildirilen sonuçlara benzer olarak pestivirus pozitifliği, Ag ELISA ile % 50,26, panpestivirus primerleri kullanılarak yapılan RT-PCR testi ile ise %1,27 oranında bulunmuş ve abort materyallerinde panpestivirus primerleri ile yapılan RT-PCR testlerinin kullanımının daha uygun olduğu sonucu doğrulanmıştır.

BDV, neden olduğu kongenital anomaliler ve persiste enfeksiyonlar açısından koyun ve keçi popülasyonları için önemli bir risk oluşturmanın yanı sıra sığır

popülasyonlarında saptanan pestivirus enfeksiyonu için de önemli bir risktir. Yapılan son çalışmalar BDV'nin koyunlardan sığırlara da bulaşabildiğini, gebe hayvanlarda abort ve persiste enfeksiyonlara ve boğalarda infertiliteye sebep olabildiğini ortaya koymuş, hatta BVDV'nin eradike edilebilmesi için sığırlarda BDV varlığının belirlenmesinin gerekliliğini vurgulamıştır (McFadden ve ark., 2012; Elvira-Partida ve ark., 2017). Dünyada (ABD, İngiltere, Avustralya, Yeni Zelanda, İsviçre, Avusturya, İspanya, Fransa, Almanya, Macaristan, Çin)BDV' ye yönelik spesifik primerlerle koyunlarda yapılan çalışmalarda ise enfeksiyonun prevalansı % 5-50 arasında değişen oranlarda belirlenmiştir (Becher ve ark., 1994; Sullivan ve ark., 1997; Vilcek ve ark., 1997; Vilcek ve ark., 1998; Becher ve ark., 2003; Stalder ve ark., 2005; Kramette-Froetscher ve ark., 2007; Dubois ve ark., 2008; Valdazo-Gonzalez ve ark. 2008; Liu ve ark.2013; OIE, 2017).Karadeniz Bölgesi'nde (Samsun, Sinop, Amasya, Giresun, Ordu, Trabzon, Tokat, Rize, Sivas) Albayrak ve ark. (2012), ise 37 koyun abort materyalinden panpesti generik primerleri (324/326) kullanılarak RT-PCR ile % 91,9 ve 2 keçi abort materyalinin tamamında (% 100) pestivirus pozitifliği tespit etmişlerdir. Türkiye'de yapılan bir araştırmada Göktuna ve ark. (2017) BDV'nin koyun abort materyallerinde tespiti amacıyla yapılan Ag-ELISA uygulaması ile pozitif tespit edilen 5 örnekten birinde, pestivirus ve BDV yönünden PCR negatif sonuç elde etmişlerdir. Yazıcı ve ark. (2012), 2009 yılında Karadeniz Bölgesi'nde yapmış oldukları çalışmada 13 adet aborte koyun fötusunda BDV varlığını araştırmış ve 11 örnekte BDV pozitiflik tespit etmiştir. Türkiye'de yapılmış en kapsamlı BDV varlığı araştırması olan bu çalışmada spesifik BDV primerleri ile yapılan RT-PCR testi sonunda ise, 3 koyunda (% 3) BDV varlığı ortaya konurken, keçilerde BDV yönünden pozitiflik tespit edilememiştir.

BVDV koyunlarda yaygın görünmesine rağmen sığırlarda BDV'nin doğal enfeksiyonuna nadiren rastlanmaktadır (Strong ve ark., 2010). Sığırlarda BDV ile çok az doğal enfeksiyon tespiti vardır. Bunlardan biri, Snowdon'un (1973) diğer sığır izolatlarından antijenik olarak tarif edildiği ve daha sonra Becher ve ark. (1997) tarafından BDV olarak genotiplendirdiği Avustralya'da elde edilen V / TOB izolatıdır. Ayrıca, Avusturya'da rutin testler sırasında BVDV kontrol programının bir parçası olarak sığırlarda bir BDV vakası tanımlanmıştır. Araştırmacıların elde ettikleri izolatlardan birini, N<sup>pro</sup> ve 5'UTR bölgelerinden yapılan sekans analizinde BDV-3 olarak belirlemiştir (Hornberg ve ark., 2009). Bu tez çalışması ile Türkiye'de ilk defa

sığır abort materyallerinde BDV PBD1 ve PBD2 primerleri ile yapılan konvansiyonel RT-PCR uygulaması ile araştırılmış ve 1 sığır abort materyalinde pozitiflik saptanmıştır. Böylece bu çalışma ile Türkiye’ de sığır abortlarında BDV varlığı (%0.52) ilk kez ortaya konmuştur.

Karadeniz Bölgesi’nde BDV tip spesifik primerler kullanılarak keçi abort doku ve organlarında BDV pozitif bildirilmiş bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Türkiye’de ise Oğuzoğlu ve ark. (2009) RT-PCR ile Burdur yöresinde 3 keçide BDV pozitiflik tespit etmişlerdir. Bu araştırmada ise spesifik BDV primerleri ile yapılan RT-PCR testi sonucu keçi abortlarında BDV varlığına rastlanılmamıştır.

Son yıllarda BDV tespiti yanı sıra birçok ülkede BDV saha izolatlarının genotiplendirmesi de yapılmış ve bu çalışmalar sonunda, ABD’de, İngiltere’de, Avustralya’da ve Yeni Zelanda’da koyunlarda BDV-1, Almanya’da ruminantlarda BDV-2, İsviçre’de koyunlarda, Avusturya’da koyun ve keçilerde, Fransa’da koyunlarda ve Çin’de keçilerde BDV-3, İspanya’da keçilerde BDV-4 ve Fransa’da koyunlarda BDV-5 ile BDV-6 genotipleri bildirilmiştir (Becher ve ark., 1994; Sullivan ve ark., 1997; Vilcek ve ark., 1997; Vilcek ve ark., 1998; Becher ve ark., 2003; Arnal ve ark., 2004; Stalder ve ark., 2005; Krametter-Froetscher ve ark., 2007; Dubois ve ark., 2008; Li ve ark., 2013a). Ülkemizde Oguzoglu ve ark. (2009), BDV subgrupları içerisinde sınıflandırmayan bir saha izolatu (BDV-7 olabileceği düşünülmüş) belirlerken, Azkur ve ark. (2011), koyunlardan izole ettikleri BDV genotiplendirmesinde virusun pestivirus 3 ile yakın ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. İtalya’dan koyun ve keçilerden izole edilen pestivirusun BDV-7 olduğu bildirilmiştir (Giammarioli ve ark., 2015; Peletto ve ark., 2016). İtalya’da bir keçide ve İsviçre’de koyun, keçi ve sığırda tespit edilen pestivirusun BDV-8 olduğu belirlenmiştir (Peterhans ve ark., 2010; Peletto ve ark., 2016). Etkili aşılama programı olmayan BD’den korunmak için gereken enfekte hayvanların belirlenmesi, sahadaki etkili genotiplerin ortaya konulması ve bunlara karşı aşı geliştirme çalışmaları yapılmalıdır (Braun ve ark., 2015).

Tarihsel olarak pestiviruslar izole edildikleri hayvan türlerine göre isimlendirilmişlerdir. Ancak türler arası bulaşma deneysel ve doğal olarak ispatlanmıştır (Paton ve ark., 1995; Paton ve ark., 1997). BDV ile ilgili olarak filogenetik çalışmalar genel olarak 5’UTR ve N<sup>pro</sup> bölgelerinin çoğaltılması esasına dayanılarak virus izolatlarını sınıflandırır (Strong ve ark., 2010). Becher ve ark. (1995) ayrıntılı bir

filogenetik analiz için 5'UTR bölgesindeki fragmanların çok küçük olabildiğini ve N<sup>pro</sup> geninin pestivirus cinsi içerisindeki genetik ilişkilerin araştırılması için uygun olduğunu kanıtlamışlardır. Yine Becher ve ark. (1997) tarafından yapılan çalışmaya göre kısmi 5'UTR dizilerine dayanan filogenetik ağaçların istatistiksel analizleri, tür içinde kümelenmenin ve bazı durumlarda pestivirusların türlere göre sınıflandırılmasının bile belirsiz olduğunu ortaya koymuştur. Bu nedenle tezde N<sup>pro</sup> bölgesi hedef alınarak sekanslama yapılmıştır.

Oguzoglu ve ark. (2009) koyun ve keçilerde yapmış oldukları çalışmada Türkiye'de ilk defa BDV'nin moleküler karakterizasyonunu yapmışlardır. Burdur ve Aydın illerinde RT-PCR ile tespit ettikleri izolatları BDV-7 genotipi olarak belirlemişlerdir. 5'UTR ve N<sup>pro</sup> gen bölgeleri hedef alınarak yapılan sekans analizi neticesinde BDV/Burdur/05/cp suşu tespit edilmiştir. Yine aynı çalışmada bir koyundan elde edilen izolat da aynı gen bölgeleri kullanılarak BDV/Aydın/04/ncp suşu tespit edilmiştir. Araştırmacılar her iki suşu da yeni bir genotip (BDV-7) olarak değerlendirmişlerdir. Türkiye'de BDV genotipi olarak BDV-7'nin yanı sıra Toplu ve ark. (2012) da küçük ruminantlarda BDV-3 genotipini belirlemişlerdir. Çalışmamızın sonunda incelemenin yapıldığı illerde sirküle olan BDV'nin moleküler karakterizasyonu yapılmış ve bu çalışmalara benzer olarak BDV-3 ve BDV-7 genotipleri belirlenmiştir.

Trabzon/Tonya'dan identifiye edilen 44 numaralı koyun abort materyalinden yapılan sekans sonucuna göre BDV-3 ile % 80,52-76,87 arasında benzerlik dikkati çekmektedir. Özellikle Li ve ark. (2013a) tarafından 2013 yılında Çin'de bir keçi sürüsünden izole ettikleri JS12/04 ve AH12-01 suşuyla yakın ilişkili bulunmuştur.

Sinop/Merkez'den identifiye edilen 78 numaralı koyun abort materyalinden yapılan sekans sonucuna göre Oguzoglu ve ark. (2009)'nın izole ettikleri Pestivirus Burdur/05-TR ve Pestivirus strain Aydın/04-TR suşlarına % 80,80-79,13 arasında benzerlik dikkati çekmektedir. Tokat/Almus'tan identifiye edilen 186 numaralı koyun abort materyalinden yapılan sekans sonucuna göre Oguzoglu ve ark. (2009)'nın izole ettikleri Pestivirus Burdur/05-TR ve Pestivirus strain Aydın/04-TR suşlarına % 80,75-79,74 arasında benzerlik dikkat çekmektedir. Her iki virus da BDV-7 genotipi olarak belirlenmiştir.

Amasya/Merzifon'dan identifiye edilen 293 numaralı sığır abort materyalinden yapılan sekans sonucuna göre BVDV-1 ile % 90,10-89,90 arasında benzerlik dikkati

çekmektedir. Toplak ve ark. (2004) tarafından Slovenya’da yapılan çalışmada sığır sürüsünden izole ettikleri H-645/97 ile çok yakın ilişkili (%90) olduğu sekans analizi ile belirlenmiştir. Ayrıca Yeşilbağ ve ark. (2008)’nin sığırdan elde ettikleri TR28NEU izolatu ile % 89,27 oranında benzerlik dikkati çekmektedir.

293 numaralı sığır abort materyalinde PBD1-PBD2 ve BD1-BD2 primerleri ile yapılan RT-PCR sonucu pozitif bulunmasına rağmen yapılan sekans analizi sonucunda BVDV-1 ile daha çok benzerlik göstermiştir. Hem BDV’de hem de BVDV’de N<sup>pro</sup> bölgesinin bulunması her iki virusun da yakın ilişkili olması nedeniyle yapılacak PCR çalışmalarında özellikle daha spesifik primer ve probe dizaynlarının yapılarak tespitine gidilmesi önem arz etmektedir. Ayrıca Genbankta sığırlardan elde edilen BDV izolatlarının N<sup>pro</sup> bölgesine ait sekanslamalar sınırlı sayıdadır. RT-PCR uygulaması neticesinde bulunan pozitif örneklerden kesinlikle sekans analizi yapılarak doğrulanmalıdır. Çünkü hem koyunlarda BVDV’nin varlığı hem de sığırlarda BDV’nin varlığı gözönüne alındığı her iki virusun kesin ayırımı yapılacak olan sekans analizi ile ortaya konabilir.

Pestiviruslar sadece sığır ve koyunlar arasındaki tür bariyerini aşmak ile kalmaz, bunun yanında yabani türlerin de dahil olduğu diğer ruminantları da enfekte edebilirler (Passler ve Walz, 2010). Evcil hayvanlarda türler arası enfeksiyonun genellikle sığırlardan koyunlara geçtiği bildirilmektedir (Carlsson ve Belak, 1994; Loken, 1995; Krametter-Froetscher ve ark., 2008; Danuser ve ark., 2009). Tam aksine pestivirusların koyunlar ile sığırlara bulaştığı nadiren bildirilmiştir (Becher ve ark., 1997; Cranwell ve ark., 2007; Krametter-Froetscher ve ark., 2008; Hornberg ve ark., 2009). Seropozitif olan koyunlarla birlikte tutulan buzağılarda BDV’ye karşı direkt olarak antikor oluştuğu gösterilmiştir (Krametter-Froetscher ve ark., 2008). Sığırda BDV ile enfeksiyonun klinik belirtileri ile ilgili bilgiler nadirdir (Marco ve ark., 2007; Marco ve ark., 2011). Braun ve ark. (2014)’nin yaptıkları deneysel bir çalışmada iki PI koyun buzağılarla birlikte tutulmuştur. Bu amaçla 1 yaşlı ve 3 aylık yaşta iki koyun kullanılmış olup her iki koyunda BDV’nin klinik bulguları (tremor, ataksi) gözlemlenmiştir. Her iki hayvanın pestivirus yönünden pozitif olduğu immunohistolojik araştırma ve RT-PCR uygulaması ile tespit edilmiştir. Ayrıca pestivirus antikor yönünden de negatif oldukları tespit edilmiştir. Koyunların lökositinden izole edilen virus tekrarlı olarak koyun sinovial membran hücre hattında kültüre edilmiştir. Yapılan

sekans analizi neticesinde virusların BDV türüne ait olduğu teyit edilmiştir (CH-R4786 ve CH-R4785 suşları). Aynı zamanda CH-R4786 suşunun deneysel çalışmada tek doz inokulasyon için kullanılmasına karar verilmiştir. Bu amaçla iki deney grubu oluşturularak oral olarak virusun inokule edileceği buzağılar 17 gün PI koyunlarla beraber 30 gün karantina altında tutulmuştur. Hayvanlar satın alınmadan önce ve karantina sonunda pestivirus antijeni ve antikoru yönünden negatif oldukları tespit edilmiştir. Çeşitli ırklardan 7 buzağıya (4 erkek, 3 dişi) BDV (4,8 ml doz) oral yolla inokule edilmiştir. Yine çeşitli ırklardan 9 erkek buzağı da 72 gün boyunca PI koyunlarla tutulmuştur. Oral olarak aşılanan yedi buzağıdan dördü enfeksiyon sonrası 2. günde iştah azalmasına karşın bu durum PI koyunların kullanıldığı grupta 6 günde dokuz buzağın üçünde gözlemlenmiştir. Her iki grupta da vücut sıcaklığı >39,5 °C'lik geçici artışlar kaydedilmiştir. PI koyunlarla tutulan tüm buzağılarda ağız mukozasında 3-17 gün arasında erozyon gözlenmiş olup bu durum oral yolla inokulasyon yapılan 7 buzağının dördünde gözlemlenmiştir. Her iki grupta da kan ve nazal svab örneklerinden viral RNA tespit edilemezken sadece PI koyunlarla tutulan 6 buzağıda antikor artışı Ab-ELISA ile tespit edilmiştir.

Krametter-Froetscher ve ark. (2010) yapmış oldukları deneysel çalışmada ise 47-73 günlük gebe olan 8 düve saha koşullarında PI koyunlarla doğal temas sağlanması amacıyla birlikte tutmuşlar ve klinik olarak takip etmişlerdir. Dört düvede vücut sıcaklığındaki hafif artışın yanı sıra, herhangi bir klinik enfeksiyon gözlenmemiştir. Ancak PI koyunlar ile BDV'ye maruz kaldıktan 54 ile 202 gün arasında 5 hayvanda gebelik sonlandırmıştır. BDV RNA dört düvenin fötüsünde ve beşinci düvenin plasentasında RT-PCR ile tespit edildi ve BDV-3 olarak tiplendirilmiştir. Ancak düvelerin hiçbirinde (kan, svab ve süt örneklerinde) BDV RNA tespit edilememiştir. Doğan buzağılardan sadece birinde lökosit örneğinde BDV RNA tespit edilmiştir ancak ölümünden sonra organlarında viral RNA tespit edilememiştir. Gomez-Romero ve ark. (2018)'nin yapmış oldukları çalışmada ise daha önceden %67,1 BVDV seroprevalans bulunan sığırlar sürülerinden topladıkları 402 serum örneğinde 5'UTR bölgesi hedef alınarak yapılan filogenetik analizde 3 serum örneğinde BDV-1 genotipi tespit edilmiş olup klinik olarak da herhangi bir semptomun gözlenmediği bildirilmiştir. Cranwell ve ark. (2007) klinik olarak sığırlarda BDV enfeksiyonunun BVDV enfeksiyonlara benzer olduğunu bildirmişlerdir.

Strong ve ark. (2010) 2006-2008 yılları arasında 5 sığırdan izole edilen ve BVDV olduğu düşünölen pestivirusların yapılan RT-PCR ve sekans analizi ile BDV-1 olduğunu tespit etmişlerdir. Çalışmada filogenetik analiz için N<sup>pro</sup> gen bölgesini hedef alan primerler kullanılmıştır. Araştırmacılar bu bulguların, sığırların BDV enfeksiyonuna karşı varsayılan doğal direncinin artık geçerli olmadığını gösterdiğini vurgulamışlardır. Bunun bir sonucu olarak BVD teşhis deneylerinin BDV'yi de tespit edebilme yetenekleri açısından kontrol edilmesi gerektiği ve ayrıca organize BVD kontrol programları olan alanlarda sığırlarla temas edebilecek olan koyunlardaki BDV durumunun izlenmesi gerekliliğinin altı çizilmiştir. Ayrıca araştırmacılara göre pestivirusların türlerinin belirlenmesinde RT-PCR yanında kısmi sekans yapılması gerekmektedir.

Bu çalışmada Willoughby ve ark. (2006) tarafından ovine pestivirusların Real-Time RT-PCR yöntemi ile tespit edilmesi amacıyla NADL genomu hedef alarak dizayn ettikleri BDV87F ve BDV237R primerleri ile BDV136T probe kullanılmıştır. Ancak Trabzon/Tonya'dan tespit ettiğimiz 44 numaralı koyun abort materyalinden saptanan BDV-3 genotipi Real-Time RT-PCR ile tespit edilirken konvansiyonel PCR uygulamasında PBD1 ve PBD2 primerleri ile sırasıyla 78, 186 ve 293 numaralı abort materyallerinden tespit ettiğimiz BDV Real-Time RT-PCR uygulaması ile tespit edilememiştir. Yapılan sekans analizi sonucunda 78 ve 186 numaralı koyun abort materyellerinde BDV-7 genotipi belirlendiği göz önüne alındığında söz konusu primerler ve probun Türkiye'de sirköle olan BDV-7 genotipinin tespit edilmesinde başarısız olduğu çalışmamızda belirlenmiş olup yerli izolatlarımızın nükleotid dizinleri dikkate alınarak dizayn edilecek primer ve prob ile yeni bir Real-Time RT-PCR panelinin geliştirilmesi gerekmektedir. Tespit edilen pozitif örneklerin konfirme edilmesi açısından da sekans analizlerinin yapılması önemlidir.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

BDV enfekte koyun ve keçilerin, persiste enfekte, yaşam şansı az ve enfeksiyonun sürekli taşıyıcısı olan kuzu ve oğlakların doğumuna sebep olmasının yanısıra sürülerde verim kayıpları oluşturması, infertilite ve abortlar nedeniyle ekonomik kayıplara sebep olması koyun ve keçi yetiştiriciliği için bu hastalığın önemini ortaya koymaktadır. Ayrıca son yıllarda yurt dışında yapılan çalışmalarla varlığı sığırlarda da bildirilen BDV'nin ülkemiz hayvancılığı için önemi daha da artmıştır. Bu çalışmada Ag-ELISA yöntemi ile yaptığımız geniş çaplı tarama sonucunda inceleme yapılan illerdeki sığır abortlarının % 50,26'sı, koyun abortlarının % 58'i ve keçi abortlarının % 55'inin pestivirus kaynaklı olduğu saptanmıştır. Pestivirus pozitif numunelere uygulanan RT-PCR testi sonucu ise keçi abortlarının BDV kaynaklı olmadığı ancak, sığır abortlarının % 0,52'sinin ve koyun abortlarının ise % 3'ünün nedeninin BDV olduğu da belirlenmiştir. Bu sonuçlardan hareketle sığırlarda pestivirus varlığı araştırılırken BDV dikkate alınmalı, koyun ve keçilerde de BVDV dikkate alınmalıdır. BVDV benzeri klinik semptomlar göstermesi ve her iki virusun yakın ilişkili olması nedeniyle semptomlara bakılarak ve tek başına pestivirus kontrolleri ile ayırımı yapılamayan BVD ve BDV enfeksiyonlarının küçük ruminantlarda olduğu gibi sığırlarda da daha kapsamlı araştırılması önerilmektedir.

Tez sonunda elde edilen bir diğer bulgu, abort materyallerde pestivirusların tespitinde Ag-ELISA testi yerine daha duyarlı bir test olan RT-PCR testinin kullanılması gerektiğidir.

Tezin ulaştığı bir diğer önemli veri ise, Real-Time RT-PCR için kullanılan primer ve problemlerin Türkiye'de sirküle olan BDV-7 yi tespit etmede yetersiz kaldığıdır. Dolayısıyla yerli suşlarımız kullanılarak yapılacak primer ve probe dizaynı ile yeni bir Real-Time RT-PCR panelinin optimize edilmesine ihtiyaç olduğunda bu çalışmadan çıkarılacak önemli bir sonuçtur. Ayrıca çalışmalarda saptanan BDV pozitifliklerinin hem koyun ve keçilerden hem de sığırlardan sekans analizi ile konfirmasyonunun sağlanması gerektiği, böylece sirküle olan genotipin belirlenmesi açısından önemli verilere ulaşılabileceği de unutulmamalıdır.

Sonuç olarak BDV ile mücadelede geniş kapsamlı bir eradikasyon programı yapılması gerekmektedir. Türkiye'de BDV ile ilgili herhangi bir eradikasyon stratejisi bulunmamaktadır. BDV varlığı tespit edilen sürülere karantina uygulaması ve PI



hayvanların tazminatlı kesimi gibi uygulamaların getirilmesi hastalıkla mücadele için gereklidir. Aksi takdirde BDV'nin mutasyona yatkın olması ve türler arası bariyeri aşma yeteneği ile sadece koyun ve keçilerde değil sığırlarda da potansiyel bir tehlike olacağı unutulmamalıdır. Ayrıca Tarım ve Orman Bakanlığı'nca her yıl ilan edilen "İhbari Mecburi Hastalıklar Listesi" güncellenerek Border Disease hastalığının eklenmesiyle BDV varlığıyla ilgili Türkiye'de daha sağlıklı verilerin elde edilmesi ve enfekte sürülerin takibinin daha sıkı bir şekilde yapılması mümkündür. Hem İl ve İlçe Tarım ve Orman Müdürlükleri'nde görevli Veteriner Hekimlerin hemde serbest Veteriner Hekimlerin BDV ile ilgili daha fazla bilgilendirilmeleri, böylece yetiştiricilere border disease hakkında gereken eğitimi vermelerinin sağlanması hastalıkla mücadele için önemlidir.

## KAYNAKLAR

- Albayrak H, Gumusova SO, Ozan E, Yazici Z. Molecular detection of pestiviruses in aborted fetuses from provinces in northern Turkey. *Trop Anim Health Prod* 2012; 44: 677-680.
- Albayrak H, Ozan E. The Investigation of pestivirus and rift valley fever virus infections in aborted ruminant foetuses in the Blacksea Region in Turkey. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 2012; 18(3): 457-461.
- Anne S. Vaccination contre la maladie des frontieres (Border disease) chez le mouton: premiers essais d'efficacite du vaccin inactif Bovilis-BVD. *Ecole National Veterinaire de Toulouse-ENVET, Fransa, Doktora Tezi*, 2012; 1-94.
- Arnal M, Fernandez-de-Luco D, Riba L, Maley M, Gilray J, Willoughby K, Vilcek S, Nettleton PF. A novel pestivirus associated with deaths in Pyrenean chamois (*Rupicapra pyrenaica pyrenaica*). *J Gen Virol* 2004; 85: 3653-3657.
- Ataseven VS, Ataseven L, Tan T, Babür C, Oguzoglu TC. Seropositivity of agents causing abortion in local goat breeds in Eastern and South-eastern Anatolia, Turkey. *Revue Med Vet* 2006; 157(11): 545-550.
- Avalos-Ramirez R, Orlich M, Thiel HJ, Becher P. Evidence for the Presence of Two Novel Pestivirus Species. *Virology* 2001; 286(2): 456-465.
- Azkur AA, Gazyagci S, Aslan ME, Unal N. Molecular and serological characterization of pestivirus infection among sheep in Kirikkale, Turkey. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 2011; 17: 83-92.
- Barlow RM, Gardiner AC, Storey IJ, Slater JS. Experiments in Border disease: II. Some aspects of the disease in the foetus. *J Comp Pathol* 1970; 80(4): 635-642.
- Barlow RM, Patterson DSP. Border disease of sheep: a virus-induced teratogenic disorder. *Adv Vet Med (Suppl J Vet Med)* 1982; 36(1): 87-90.
- Barlow RM, Rennie JC, Keir WA, Gardiner AC, Vantsis JT. Experiments in Border disease: VII. The disease in goats. *J Comp Pathol* 1975; 85(2): 291-297.
- Barlow RM, Vantsis JT, Gardiner AC, Rennie JC, Herring JA, Scott FMM. Mechanisms of natural transmission of Border disease. *J Comp Pathol* 1980; 90(1): 57-65.
- Barlow RM. Experiments in border disease. IV. Pathological changes in ewes. *J Comp Pathol* 1972; 82(2): 151-156.
- Becher P, König M, Paton DJ, Thiel H-J. Further characterization of border disease virus isolates: Evidence for the presence of more than three species within the genus pestivirus. *Virology* 1995; 209: 200-206.

- Becher P, Meyers G, Shannon AD, Thiel HJ. Cytopathogenicity of border disease virus is correlated with integration of cellular sequences into the viral genome. *J Virol* 1996; 70(5): 2992-2998.
- Becher P, Orlich M, Shannon AD, Horner G, König MK, Thiel HJ. Phylogenetic analysis of pestiviruses from domestic and wild ruminants. *J Genl Virol* 1997; 78: 1357-1366.
- Becher P, Orlich M, Thiel HJ. Complete genomic sequence of border disease virus, a pestivirus from sheep. *J Virol* 1998; 72(6): 5165-5173.
- Becher P, Shannon AD, Tautz N, Thiel HJ. Molecular characterization of border disease virus, a pestivirus from sheep. *Virology* 1994; Cilt 198: 542-551.
- Becher P, Ramiro Avalos R, Michaela O, Sibilina Cedillo R, Matthias K, Matthias S, Hanspeter S, Horst S, Heinz-Jürgen T. Genetic and antigenic characterization of novel pestivirus genotypes: Implications for classification. *Virology* 2003; 311: 96-104.
- Benjamin WN, Daniel Givens M. Approved and experimental countermeasures against pestiviral diseases: Bovine viral diarrhoea, classical swine fever and border disease. *Antiviral Res* 2013; 100(1): 133-150.
- Berriatua E, Barandika J, Aduriz G, Atxaerandio R, Garrido J, Garcia-Perez AL. Age-specific seroprevalence of Border disease virus and presence of persistently infected sheep in Basque dairy-sheep flocks. *Vet J* 2004; 168(3): 336-342.
- Bethune MA. Influence du genotype virale sur l'infection foetale par le virus de la maladie de la frontiere (Border disease). These d'exercice, Medecine veterinaire, Ecole Nationale Veterinaire de Toulouse-ENVT, Fransa, Doktora Tezi, 2015; 1-129.
- Bonniwell MA, Nettleton PF, Gardiner AC, Barlow RM, Gilmour JS. Border disease without nervous signs or fleece changes. *Vet Rec* 1987; 120(11): 246-249.
- Braun U, Bachofen C, Büchi R, Hässig M, Peterhans E. Infection of cattle with Border disease virus by sheep on communal alpine pastures. *Schweiz Arch Tierheilkd* 2013; 155(2): 123-128.
- Braun U, Hilbe M, Janett F, Hässig M, Zanoni R, Frei S, Schweizer M. Transmission of border disease virus from a persistently infected calf to seronegative heifers in early pregnancy. *BMC Vet Res* 2015; 11(43): 1-8.
- Braun U, Reichle SF, Reichert C, Hassig M, Stalder HP, Bachofen C, Peterhans E. Sheep persistently infected with Border disease readily transmit virus to calves seronegative to BVD virus. *Vet Microbiol* 2014; 168(1): 98-104.

- Brun A, Lacoste F, Reynaud G, Kato F, SaintMarc B. Evaluation of the potency of an inactivated vaccine against border disease pestivirus infection in sheep, in: Edwards S. (Ed.), Proceedings of the Second Symposium on Pestiviruses. Fondation Marcel Merieux, Annecy, France 1993; 257-259.
- Buonavoglia C, Marsilio F, Tempesta M, Buonavoglia D, Cavalli A. Persistent pestivirus infection in sheep in Apulia (southern Italy). *New Microbiol* 1994; 17(2): 163-165.
- Burells C., Nettleton P.F., Reid H.W., Miller H.R., Hopkins J., McConnell I., Gorrell M.D., Brandon M.R. Lymphocyte subpopulations in the blood of sheep persistently infected with border disease virus. *Clin Exp Immunol* 1989; 76(3): 446-451.
- Burgu I, Akça Y, Alkan F, Özkul A, Karaoğlu T, Bilge-Dağalp S, Oğuzoğlu TÇ, Yesilbaş K. The serological and virological investigations and pathogenesis of BVDV infection in sheep during pre- and post-partum periods. *Turk J Vet Anim Sci* 2001; 25: 551-558.
- Burgu I, Ozturk F, Akca Y, Toker A, Frey H-R, Liess B. Investigations on the occurrence and impact of bovine viral diarrhoea (BVD) virus infections in sheep in Turkey. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 1987;94: 292-294.
- Carlsson U, Belak K. Border disease virus transmitted to sheep and cattle by a persistently infected ewe: epidemiology and control. *Acta Vet Scand* 1994; 35(1): 79-88.
- Carlsson U. Border disease in sheep caused by transmission of virus from cattle persistently infected with bovine virus diarrhoea virus. *Vet Rec* 1991; 128: 145-147.
- Chappuis G, Brun A, Kato F, Duffour R, Durant M. Isolement et caractérisation d'un pestivirus dans un foyer d'entérocologie leucopénie chez des moutons de l'Aveyron. *Epidémiol Santé Anim* 1984; 6: 117-118.
- Chappuis G, Brun A, Kato F, Dauvergne M, Reynaud G, Duret C. Etudes serologiques et immunologiques réalisées à la suite de l'isolement d'un pestivirus dans un foyer ovine chez des moutons de l'Aveyron. In: *Pestiviruses des Ovins et des Bovines. Espinasse J, Savey M (eds). Société Française de Buiatrie* 1986; 55-66.
- Corbiere F, Pouget C, Bernardin E, Brugidou R, Schelcher F. Short communication: Performance of a blocking antibody ELISA bulk-tank milk test for detection of dairy sheep flocks exposed to border disease virus. *J Dairy Sci* 2012; 95(11): 6542-6545.
- Cranwell MP, Otter A, Errington J, Hogg RA, Wakeley P, Sandvik T. Detection of Border disease virus in cattle. *Vet Rec* 2007; 161: 211.

- Çokçalışkan C. Gebe koyunlar ve fötüslerinde pestivirus enfeksiyonu. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Doktora Tezi, 2000; 1-43.
- Danuser R, Bogt H-R, Kaufmann T, Peterhans E, Zanoni R. Seroprevalence and characterization of pestivirus infections in small ruminants and new world camelids in Switzerland. *Schweiz Arch Tierheilkd* 2009; 151: 109-117.
- De Mia G.M., Greiser-Wilke I., Feliziani F., Giammarioli M., De Giuseppe A. Genetic characterization of a caprine pestivirus as the first member of a putative novel pestivirus subgroup. *J. Vet. Med. B: Infect. Dis. Vet. Public Health* 2005; 52(5): 206-210.
- Dekker A, Wensvoort G, Terpstra C. Six antigenic groups within the genus pestivirus as identified by cross neutralization assays. *Vet Microbiol* 1995; 47(3-4): 317-329.
- Depner KR, Hubschle OJ, Liess B. Transplacental BVD virus transmission after experimental inoculation of goats in different pregnancy stages. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 1990; 97: 421-423.
- Done JT, Woolley J, Barnard VV, Upcott DH, Hebert CN, Terlecki S. Border disease of sheep: Spinal cord morphometry. *J Comp Pathol* 1985; 95(3):. 325-333.
- Dubois E, Russo P, Prigent M, Thiéry R. Genetic characterization of ovine pestiviruses isolated in France, between 1985 and 2006. *Vet Microbiol* 2008; 130: 69-79.
- Ellis JA, Martin K, Norman GR, Haines DM. Comparison of detection methods for bovine viral diarrhoea virus in bovine abortions and neonatal death. *J Vet Diagn Invest* 1995; 7: 433-436.
- Elvira-Partida L, Fernández M, Gutiérrez J, Esnal A, Benavides J, Pérez V, de la Torre A, Álvarez M, Esperón F. Detection of Bovine Viral Diarrhoea Virus 2 as the Cause of Abortion Outbreaks on Commercial Sheep Flocks. *Transbound Emerg Dis* 2017; 64: 19-26.
- Fenton A, Entrican G, Herring JA, Nettleton PF. An ELISA for detecting pestivirus antigen in the blood of sheep persistently infected with border disease virus. *J Virol Methods* 1990; 27(3): 253-260.
- Fenton A, Sicclair JA, Entrican G, Herring JA, Malloy C, Nettleton PF. A monoclonal antibody capture ELISA to detect antibody to border disease virus in sheep serum. *Vet Microbiol* 1991; 28(4): 327-333.
- Fernandez-Sirera L, Cabezon O, Allepuz A, Rosell R, Riquelme C, Serrano E, Lavin S, Marco I. Two different epidemiological scenarios of border disease in the populations of Pyrenean chamois (*Rupicapra p. pyrenaica*) after the first disease outbreaks. *Plos One* 2012; 7(12): 51031.

- Fulton RW, d'Offay JM, Saliki JT, Burge LJ, Helman RG, Confer AW, Bolin SR, Ridpath JF. Nested reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) for typing ruminant pestiviruses: bovine viral diarrhea viruses and border disease virus. *Can J Vet Res* 1999; 63(4): 276-281.
- Garcia-Perez AL, Minguijo'n E, Barandika JF, Aduriz G, Povedano I, Juste RA, Hurtado A. Detection of Border disease virus in fetuses, stillbirths, and newborn lambs from natural and experimental infections. *J Vet Diagn Invest* 2009; 21(3): 331-337.
- Garcia-Perez AL, Ruiz-Fons F, Barandika JF, Aduriz G, Juste RF, Hurtado A. Border disease virus seroprevalence correlates to antibodies in bulk-tank milk and reproductive performance of dairy sheep flocks. *J Dairy Sci* 2010; 93:2444-9.
- Garcia-Perez AL. Clinical and laboratorial findings in pregnant ewes and their progeny infected with Border disease virus (BDV-4 genotype). *Res Vet Sci* 2009; 86(2): 345-352.
- Gardiner A. C., Barlow R. M. Vertical transmission of Border disease infection. *J Comp Pathol* 1981; 91(3): 467-470.
- Gardiner AC, Nettleton PF, Barlow RM. Virology and immunology of a spontaneous and experimental mucosal disease-like syndrome in sheep recovered from clinical border disease. *J Comp Pathol* 1983; 93(3):463-469.
- Gardiner AC, Barlow RM, Rennie JC, Keir WA. Experiments in Border disease: V. Preliminary investigations on the nature of the agent. *J Comp Pathol* 1972; 82(2):159-161.
- Giammarioli M, La Rocca SA, Steinbaich F, Casciari C, De Mia GM. Genetic and antigenic typing of border disease virus (BDV) isolates from Italy reveals the existence of a novel BDV group. *Vet Microbiol* 2011;147(3-4):231-236.
- Giammarioli M, Rossi E, Casciari C, Bazzucchi, M, Torresi C, De Mia GM. Genetic characterization of border disease virus (BDV)isolates from small ruminants in Italy. *Virus Genes* 2015;50(2):321-324.
- Giangaspero M., Iyata G., Savini G., Osawa T., Tatami S., Takagi E., Moriya H., Okura N., Kimura A., Harasawa R. Epidemiological Survey of Border Disease Virus among Sheep from Northern Districts of Japan. *J Vet Med Sci* 2011;73(12):1629-1633.
- Giangaspero M, Apicellab C, Harasawa R. Numerical taxonomy of the genus Pestivirus: New software for genotyping based on the palindromic nucleotide substitutions method. *Virol Methods* 2013;192:59.
- Giangaspero M. Genetic variation of Border disease virus species strains. *Vet Ital* 2011;47:415.

- Gomez-Romero N, Basurto-Alcantara FJ, Verdugo-Rodriguez A, Lagunes-Quintanilla R, Bauermann FV, Ridpath JF. Detection of border disease virus in Mexican cattle. *Transbound Emerg Dis* 2018;65:267-271.
- Gonzalez JM, Lacasta D, Ferrer LM, Figueras L, Ramos JJ, De las Heras M. Natural border disease virus infection in feedlot lambs. *Vet Rec* 2013;174(3):2-69.
- Göktuna PT, Alpay G, Öner EB, Yeşibağ K. Co-existence of bovine viral diarrhoea and border disease viruses in a sheep flock. *Turk J Vet Anim Sci* 2017;41:1-8.
- Graham DA, Calvert V, German A, McCullough SJ. Pestiviral infections in sheep and pigs in Northern Ireland. *Vet Rec* 2001;148:69-72.
- Gray EW, Nettleton PF. The ultrastructure of cell cultures infected with border disease and bovine virus diarrhoea viruses. *J Gen Virol* 1987;68:2339-2346.
- Gür S. (2009). A investigation of border disease virus in sheep in Western Turkey. *Trop Anim Health Prod* 2009;41:1409-1412.
- Hall TA. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium* 1999;41, 95-98.
- Hamblin C, Hedger RS. The prevalence of antibodies to bovine viral diarrhoea/mucosal disease virus in African wildlife. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 1979;2: 295.
- Harasawa R, Mizusawa H. Demonstration and genotyping of pestivirus RNA from mammalian cell lines. *Microbiol Immunol* 1995;39(12):979-985.
- Hasircioglu S, Kale M, Acar A. Investigation of pestiviruses infections in aborted sheep and goats in Burdur region. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 2009;15:163-167.
- Hornberg A, Fernandez SR, Vogl C, Vilcek S, Matt M, Fink M, Kofler J, Schopf K. Genetic diversity of pestivirus isolates in cattle from Western Austria. *Vet Microbiol* 2009;135(3-4):205-213.
- Hughes LE, Kershaw GF, Shaw IG. Border disease: An undescribed disease of sheep. *Vet Rec* 1967;71:313.
- Hurtado A, Aduriz G, Gomez N, Oporto B, Juste R, Lavin S, Lopez-Olvera J, Marco I. Molecular identification of a new pestivirus associated with increased mortality in the Pyrenean chamois (*Rupicapra pyrenaica pyrenaica*) in Spain. *J Wildl Dis* 2004;40(4):796-800.
- Hyndman L, Vilcek S, Conner J, Nettleton PF. A novel nested reverse transcription PCR detects bovine viral diarrhoea virus in fluids from aborted bovine fetuses. *J Virol Methods* 1998;71(1):69-76.

- International Committee On Taxonomy Of Viruses. *Virus Taxonomy 2015 release*. ICTV: International Committee On Taxonomy Of Virus. <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp> 2016 erişim tarihi:01.05.2019
- Jiang J, Li W. Border Disease Virus. Liu D, editors. *Molecular Detection of Animal Viral Pathogens*. First ed. Broken Sound Parkway NW. CRC Press 2016;211-222.
- Kawanishi N., Tsuduku S., Shimizu H. et al. First isolation of border disease virus in Japan is from a pig farm with no ruminants. *Vet Microbiol* 2014;171(1-2):210-214.
- Kessell A, Finnie J, Windsor P. Neurological diseases of ruminant livestock in Australia. IV: Viral infections. *Aust. Vet J* 2011;89(9):331-337.
- Kim In J, Hyun BH, Shin JH, Lee KK, Lee KW, Cho KO, Kang M. Identification of Bovine Viral Diarrhea Virus type 2 in Korean native goat (*Capra hircus*). *Virus Res* 2006;121(1):103-106.
- Kirkland PD, Frost MJ, Finlaison DS, King R, Ridpath JF, Gu X. Identification of a novel virus in pigs—Bungowannah virus: A possible new species of pestivirus. *Virus Res* 2007;129(1):26-34.
- Krametter-Froetscher R, Benetka V, Mostl K, Baumgartner WW. Transmission of border disease virus from sheep to calves a possible risk factor for the Austrian BVD eradication programme in cattle? *Wien Tierärztl Monatsschr* 2008;95:200-203.
- Krametter-Froetscher R, Duenser M, Preyler B. et al. Pestivirus infection in sheep and goats in West Austria. *Vet J* 2010;186(3):342-346.
- Krametter-Froetscher R, Kohler H, Benetka V, Moestl K, Golja F, Vilcek S, Baumgartner W. Influence of communal Alpine pasturing on the spread of pestiviruses among sheep and goats in Austria: First identification of boarder disease virus in Austria. *Zoonoses Public Health* 2007;54:209-213.
- Krametter-Froetscher R., Loitsch A., Kohler H., Schleiner A., Schiefer P., Moesti K., Golja F., Baumgartner W. Prevalence of Antibodies to Pestiviruses in Goats in Austria. *J Vet Med* 2006;53(1):48.
- Lamontagne L, Roy R. Presence of antibodies to bovine viral diarrhea-mucosal disease virus (border disease) in sheep and goat flocks in Quebec. *Can. J Comp Med* 1984;48(2):225-227.
- Laude H, Gelfi J. Properties of Border disease virus as studied in a sheep cell line. *Arch Virol* 1979;62(4):341-346.



- LeBlanc N, Leijon M, Jobs M, Blomberg J, Belak S. A novel combination of TaqMan RT-PCR and a suspension microarray assay for the detection and species identification of pestiviruses. *Vet Microbiol* 2010;142(1-2):81-86.
- Leforban Y, Vannier P, Cariolet R. Protection of piglets born from ruminant pestivirus experimentally infected sows, and their contacts, to the challenge with hog cholera virus. *Ann Rech Vet* 1992;23(1):73-82.
- Li W, Mao L, Zhao Y, Sun Y, He K, Jiang J. Detection of border disease virus (BDV) in goat herds suffering diarrhea in eastern China. *Virol J* 2013;10(1):1-7.
- Li W., Mao L., Yang L., Bin Z., Jiang J. Development and partial validation of a recombinant E2-based indirect ELISA for detection of specific IgM antibody responses against classical swine fever virus. *J Virol Methods* 2013;191(1):63-68.
- Liu X, Mao L, Li W, Yang L, Zhang W, Wei J, Jiang J. Genome Sequence of Border Disease Virus Strain JSLS12-01, Isolated from Sheep in China. *Genome Announc* 2013;1(6):13.
- Loken T, Bjerkas I, Hyllseth B. Border disease in goats in Norway. *Res Vet Sci* 1982;33:130-131.
- Loken T. Experimentally-induced border disease in goats. *J Comp Pathol* 1987;97(1): 85-89.
- Loken T, Krogsrud J, Bjerkas I. Outbreaks of border disease in goats induced by a pestivirus-contaminated orf vaccine, with virus transmission to sheep and cattle. *J Comp Pathol* 1991;104(2):195-209.
- Loken T. Border disease in sheep. *Vet. Clin. North Am. Food Anim Pract* 1995;11:579-595.
- Lunden A, Carlsson U, Naslund K. Toxoplasmosis and Border disease in Swedish sheep flocks. Seroprevalence and incidence during one gestation period. *Acta Vet Scand* 1992;33(2):175-184.
- Mao L., Li W., Zhang W., Yang L., Jiang J. Genome Sequence of a Novel Hobi-Like Pestivirus in China. *J Virol* 2012;86:1244.
- Marco I, Cabezon O, Rosell R, Fernandez-Sirera L, Allepuz A, Lavin S. Retrospective study of pestivirus infection in Pyrenean chamois (*Rupicapra pyrenaica*) and other ungulates in the Pyrenees (NE Spain). *Vet Microbiol* 2011;149:17-22.
- Marco I, Lopez-Olvera JR, Rosell R, Vidal E, Hurtado A, Juste R, Pumarola M, Lavin S. Severe outbreak of disease in the southern chamois (*Rupicapra pyrenaica*) associated with border disease virus infection. *Vet Microbiol* 2007;120(1-2):33-41.

- Marco I, Rosell R, Cabezon O, Gregorio M, Casas E, Velarde R, Lavin S. Border Disease Virus among Chamois, Spain. *Emerg Infect Dis* 2009;15(3):448-451.
- Marco I, Rosell R, Cabezon O, Beneria M, Mentaberre G, Casas E, Hurtado A, Lopez-Olvera JR, Lavin S. Serologic and virologic investigations into pestivirus infection in wild and domestic ruminants in the Pyrenees (NE Spain). *Res Vet Sci* 2009;87(1):149-153.
- McFadden AMJ, Tisdall DJ, Hill FI, Otterson P, Pulford D, Peake J, Finnegan CJ, La Rocca SA, Kok-Mun T, Weir AM. The first case of a bull persistently infected with border disease virus in New Zealand. *N Z Vet J* 2012;60:290-296.
- McGoldrick A, Bensaude E, Ibata G, Sharp G, Paton DJ. Closed one-tube reverse transcription nested polymerase chain reaction for the detection of pestiviral RNA with fluorescent probes. *J Virol Methods* 1999;79(1):85-95.
- McLaughlin B, Hartnett KA, Erhardt JA, Legos JJ, White RF, Barone FC., Aizenman E. Caspase 3 activation is essential for neuroprotection in preconditioning. *Proc Natl Acad Sci* 2003;100(2):715-720.
- Monies RJ, Paton DJ, Vilcek S. Mucosal disease-like lesions in sheep infected with Border disease virus. *Vet Rec* 2004;155:765-769.
- Nagai M, Aoki H, Sakoda Y et al. Molecular, biological, and antigenic. *J Vet Diagn Invest* 2014;26(4):547-552.
- Nettleton PF, Willoughby K. Border disease. In: *OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. OIE, Paris, France 2010; Chapter 2.7.1: 963.
- Nettleton PF, Entrican G. Ruminant pestiviruses. *Br. Vet J* 1995;151(6):615-642.
- Nettleton PF, Gilmour JS, Herring JA. The production and survival of lambs persistently infected with border disease virus. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 1992;15(3):179-188.
- Nettleton, PF. Border disease. In: *Diseases of sheep*. ed. Martin WB, Aitken ID, 2nd ed., Blackwell, Edinburgh, UK 2000;95-101.
- Nettleton PF. Pestivirus infections in ruminants other than cattle. *Rev Sei Tech Off Int Epiz* 1990;9 (1):131-150.
- Nettleton PF, Gilray JA, Russo P, Dlissi E. Border disease of sheep and goats. *Vet Res* 1998;29(3-4):327-340.
- Newcomer BW, Givens MD. Approved and experimental countermeasures against pestiviral diseases: Bovine viral diarrhea, classical swine fever and border disease. *Antivir Res* 2013;100(1):133-150.

- O'Neill RG, O'Connor M, O'Reilly PJ. A survey of antibodies to pestivirus in sheep in the Republic of Ireland. *Irish Vet J* 2004;57:525-530.
- Oguzoglu TC, Tan MT, Toplu N, Demir AB, Bilge-Dagalp S, Karaoglu T, Ozkul A, Alkan F, Burgu I, Haas L, Greiser-Wilke I. Border disease virus (BDV) infections of small ruminants in Turkey: A new BDV subgroup? *Vet Microbiol* 2009;135:374-379.
- Oguzoglu TC. A review of border disease virus infection in ruminants: Molecular characterization, pathogenesis, diagnosis and control. *Ani Heal Prod Hyg* 2012;1:1-9.
- OIE.World Organization For Animal Health:  
[http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2.07.01\\_BORDER\\_DISEASES/2.07.01\\_BORDER\\_DISEASES.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.07.01_BORDER_DISEASES/2.07.01_BORDER_DISEASES.pdf) 2017 erişim tarihi:01.05.2019
- Okur Gumusova S, Yazici Z, Albayrak H. Pestivirus seroprevalance in sheep populations from inland and coastal zones of Turkey. *Revue Med Vet* 2006;157(12):595-598.
- Orsel K, Antonis AFG, Oosterloo JC, Vellema P, van der Meer FJUM. Seroprevalence of antibodies against pestiviruses in small ruminants in The Netherlands. *Tijdschr Diergeneeskd* 2009;134:380.
- Passler T, Walz PH. Bovine viral diarrhoea virus infections in heterologous species. *Anim Health Res Rev* 2010;11:191-205.
- Paton JD. Pestivirus diversity. *J Comp Pathol* 1995;112:215.
- Paton DJ, Carlsson U, Lowings JP, Sands JJ, Vilcek S, Alenius S. Identification of herd-specific bovine viral diarrhoea virus isolates from infected cattle and sheep. *Vet Microbiol* 1995;43:283-294.
- Paton DJ, Sands JJ, Edwards S. Border disease virus: Delineation by monoclonal antibodies. *Arch Virol* 1994;135:241.
- Paton DJ, Gunn M, Sands J, Yapp F, Drew T, Vilcek S, Edwards S. Establishment of serial persistent infections with bovine viral diarrhoea virus in cattle and sheep and changes in epitope expression related to host species. *Arch Virol* 1997;142: 929-938.
- Peletto S, Caruso C, Cerutti F, Modest P, Zoppi S, Dondo A, Masoero L. A new genotype of border disease virus with implications for molecular diagnostics. *Arch Virol* 2016;161:471-477.
- Peterhans E, Bachofen C, Stalder H, Schweizer, M. Cyto-pathic bovine viral diarrhoea viruses (BVDV): Emerging pestiviruses doomed to extinction. *Vet Res* 2010;41(4):1-14.

- Plant JW, Walker KH, Acland HM, Gard GP. Pathology in the ovine foetus caused by an ovine pestivirus. *Aust Vet J* 1983;60(5):137-140.
- Potts BJ, Berry LJ, Osburn BI, Johnson KP. Viral Persistence and Abnormalities of the Central Nervous System after Congenital Infection of Sheep with Border Disease Virus. *J Infect Dis* 1985;151(2):337-343.
- Pratelli A, Martella V, Cirone F, Buonavoglia D, Elia G, Tempesta M, Buonavoglia C. Genomic characterization of pestiviruses isolated from lambs and kids in southern Italy. *J Virol Methods* 2001;94(1-2):81-85.
- Rasmussen TB, Reimann I, Uttenthal A, Leifer I, Depner K, Schirrmeier H, Beer M. Generation of recombinant pestiviruses using a full-genome amplification strategy. *Vet Microbiol* 2010;142(1-2):13-17.
- Ridpath JF, Bolin SR. Comparison of the complete genomic sequence of the border disease virus, BD31, to other pestiviruses. *Virus Res* 1997;50:237.
- Roeder PL, Jeffrey M, Drew TW. Variable nature of border disease on a single farm: The infection status of affected sheep. *Res Vet Sci* 1987;43(1):28-33.
- Roehe PM, Woodward MJ, Edwards S. Characterisation of p20 gene sequences from a border disease-like pestivirus isolated from pigs. *Vet Microbiol* 1992;33(1-4):231-238.
- Roic B, Depner KR, Jemersic L, Lipej Z, Cajavec S, Toncic J, Lojkic M, Mihavec Z. Serum antibodies directed against classical swine fever virus and other pestiviruses in wild boar (*Sus scrofa*) in the Republic of Croatia. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 2007;114(4):145-148.
- Rosamilia A, Grattarola C, Carusa C, Peletto S, Gobbi E, Tarello V, Caroggio P, Dondo A, Masoero L, Acutis PL. Detection of border disease virus (BDV) genotype 3 in Italian goat herds. *Vet J* 2014;199(3):446-450.
- Rosell R, Cabezon O, Pujols J, Domingo M, Munoz I, Nunez I, Ganges L. Identification of a porcine pestivirus as a border disease virus from naturally infected pigs in Spain. *Vet Rec* 2014;174:18-20.
- Sandvik T. Border disease virus:time to take more notice? *Vet Rec* 2014;174(3):65-66.
- Schirrmeier H, Strebelow G, Depner K, Hoffmann B, Beer M. Genetic and antigenic characterization of an atypical pestivirus isolate, a putative member of a novel pestivirus species. *J Gen Virol* 2004;85:3647-3652.
- Schweizer M, Peterhans E. Pestiviruses. *Annu Rev Anim Biosci* 2014;2:141-163.
- Shaw IG. Border disease of sheep (hypomyelinogenesis). *Agriculture* 1971;78:373.

- Snowdon WA. Mucosal disease: its incidence and diagnosis in Australia. *Bull Off Int Epiz* 1973;79:529-542.
- Stahl K, Kampa J, Alenius S, Wadman AP, Baule C, Aiumlamai S, Belák S. Natural infection of cattle with an atypical 'HoBi'-like pestivirus - Implications for BVD control and for the safety of biological products. *Vet Res* 2007;38:517-523.
- Stalder HP, Meier P, Pfaffen G, Wageck-Canal C, Rüfenacht J, Schaller P, Bachofen C, Marti S, Vogt HR, Peterhans E. Genetic heterogeneity of pestiviruses of ruminants in Switzerland. *Prev Vet Med* 2005;72:37-41.
- Strong R, La Rocca SA, Ibata G, Sandvik G. Antigenic and genetic characterisation of border disease viruses isolated from UK cattle. *Vet Microbiol* 2010;141(3-4):208-215.
- Sullivan DG, Chang GJ, Akkina RK. Genetic characterization of ruminant pestiviruses: Sequence analysis of viral genotypes isolated from sheep. *Virus Res* 1997;47:19-29.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 2011;28, 2731-2739.
- Thabti F, Fronzaroli L, Dliissi E, Guibert JM, Hammami S, Pepin M, Russo P. Experimental model of border disease virus infection in lambs: comparative pathogenicity of pestiviruses isolated in France and Tunisia. *Vet Res* 2002;33(1):35-45.
- Thabti F, Letellier C, Hammami S, Pepin M, Ribiere M, Mesplede A, Kerkhofs P, Russo P. Detection of a novel border disease virus subgroup in Tunisian sheep. *Arch Virol* 2005;150:215-229.
- Thur B, Hilbe M, Strasser M, Ehrensperger F. Immunohistochemical diagnosis of pestivirus infection associated with bovine and ovine abortion and perinatal death. *Am J Vet Res* 1997;58(12):1371-1375.
- Toplak I, Sandvik T, Barlic-Maganja D, Grom J, Paton DJ. Genetic typing of bovine viral diarrhoea virus: most Slovenian isolates are of genotypes 1d and 1f. *Vet Microbiol* 2004;99:175-185.
- Toplu N, Oğuzoğlu TÇ, Epikmen ET, Aydoğan A. Neuropathologic study of border disease virus in naturally infected fetal and neonatal small ruminants and its association with apoptosis. *Vet Pathol* 2011;48(3):576-583.
- Toplu N, Oguzoglu TC, Albayrak H. Dual infection of fetal and neonatal small ruminants with border disease virus and peste des petits ruminants virus (PPRV): Neuronal tropism of PPRV as a novel finding. *J Comp Pathol* 2012;146(4):289-297.

- Toplu NH, Oğuzoğlu TC, Avcı H, Epikmen ET. Pathomorphological Changes and Immunohistochemical Distribution of Border. *Animal Health Prod and Hyg* 2012;1(2):80-85.
- Valdazo-Gonzalez B, Alvarez M, Sandvik T. Prevalence of border disease virus in Spanish lambs. *Vet Microbiol* 2008;128:269.
- Valdazo-Gonzalez B, Alvarez-Martinez M, Sandvik T. Genetic and antigenic typing of border disease virus isolates in sheep from the Iberian Peninsula. *Vet J* 2007;174:316-324.
- Vantsis JT, Barlow RM, Fraser J, Mould DL. Experiments in border disease VIII. Propagation and properties of a cytopathic virus. *J Comp Pathol* 1976;86:111-120.
- Vantsis JT, Rennie JC, Gardiner AC, Wells PW, Barlow RM, Martin WB. Immunization against border disease. *J Comp Pathol* 1980;90(3):349-354.
- Vilcek S, Björklund HV, Horner GW, Meers J, Belák S. Genetic typing of pestiviruses from New Zealand. *N Z Vet J* 1998;46:35-37.
- Vilcek S, Belak S. Genetic identification of pestivirus strain Frijters as a border disease virus from pigs. *J Virol Methods* 1996;60(1):103-108.
- Vilcek S, Leskova V, Meyer D, Postel A, Becher P. Molecular characterization of border disease virus strain Aveyron. *Vet Microbiol* 2014;171:87-92.
- Vilcek S, Nettleton PF, Paton DJ, Belak S. Molecular characterization of ovine pestiviruses. *J Gen Virol* 1997;78:725-735.
- Vilcek S, Nettleton P. Pestiviruses in wild animals. *Vet Microbiol* 2006;116:1-12.
- Vilcek S, Paton DJ. A RT-PCR assay for the rapid recognition of border disease virus. *Vet Res* 2000;31(4):437-445.
- Vilcek S, Ridpath JF, Van Campen H, Cavender L, Warg J. Characterization of a novel pestivirus originating from a pronghorn antelope. *Virus Res* 2005;108(1-2):187-193.
- Vilcek S, Willoughby K, Nettleton P, Becher P. Complete genomic sequence of a border disease virus isolated from Pyrenean chamois. *Virus Res* 2010;152(1-2):164-168.
- Vilcek S, Herring AJ, Herring JA, Nettleton PF, Lowings JP, Paton DJ. 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* 1994;36(3-4):309-323.
- Vilcek S, Nettleton PF, Paton DJ, Belak S. Molecular characterization of ovine pestiviruses. *J Gen Virol* 1997;78:725-735.

- Walz PH, Grooms DL, Passler T, Ridpath JF, Tremblay R, Step DL, Callan RJ, Givens MD. Control of bovine viral diarrhoea virus in ruminants. *J Vet Intern Med* 2010;24:476-486.
- Wensvoort G, Terpstra C. Bovine viral diarrhoea virus infection in piglets born to sows vaccinated against swine fever with contaminated virus. *Res Vet Sci* 1988;45(2):143-148.
- Willoughby K, Valdazo-Gonzalez B, Maley M, Gilray J, Nettleton PF. Development of a real time RT-PCR to detect and type ovine pestiviruses. *J Virol Methods* 2006;132(1-2):187-194.
- Wiskerchen M, Collett M. Pestivirus gene expression: Protein p80 of bovine viral diarrhoea virus is a proteinase involved in polyprotein processing. *Virology* 1991;184:341.
- Wohlsein P, Trautwein G, Depner KR, Hubschle OJ, Liess B. Pathomorphological and immunohistological findings in progeny of goats experimentally infected with pestiviruses. *Zentralbl Veterinarmed* 1992;39:1-9.
- Woldehiwet Z, Sharma R. Alterations in lymphocyte subpopulations in peripheral blood of sheep persistently infected with border disease virus. *Vet Microbiol* 1990;22(2-3):153-160.
- Xu J, Mendez E, Caron PR, Lin C, Murcko MA, Collett MS, Rice CM. Bovine viral diarrhoea virus NS3 serine proteinase: polyprotein cleavage sites, cofactor requirements, and molecular model of an enzyme essential for pestivirus replication. *J Virol* 1997;71(7):5312-5322.
- Yazıcı Z, Serdar Murat S, Okur Gumusova S, Albayrak H. Molecular diagnosis and seroepidemiology of pestiviruses in sheep. *Vet Arhiv* 2012;82(1):35-45.
- Yesilbag K, Förster C, Bank-Wolf B. Genetic heterogeneity of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates from Turkey: Identification of a new subgroup in BVDV-1. *Vet Microbiol* 2008;130(3-4):258-267.
- Zakarian B, Barlow RM, Rennie JC. Periarthritis in experimental Border disease of sheep. I. The occurrence and distribution of the lesion. *J Comp Pathol* 1975;85(3):453-460.

## EKLER

### Ek-1. 44 nolu izolatın kısmi DNA dizisi ve bu dizinin kısmi protein dizisine çevrilmiş hali

3	GGG	GTC	AAA	GAA	CCT	GTT	TAT	GAC	ATC	GTG	GGT	GAC	CCC	CTA	TTT	47
1	Gly	Val	Lys	Glu	Pro	Val	Tyr	Asp	Ile	Val	Gly	Asp	Pro	Leu	Phe	15
48	GGT	GAA	AAA	AGC	ACA	ATA	CAC	CCA	CAA	GCA	ACC	CTC	AAA	TTG	CCA	92
16	Gly	Glu	Lys	Ser	Thr	Ile	His	Pro	Gln	Ala	Thr	Leu	Lys	Leu	Pro	30
93	CAT	GAT	AGA	GGT	GGT	GCC	GAG	GTT	AGA	ACA	ACT	GTG	AAG	GAT	TTG	137
31	His	Asp	Arg	Gly	Gly	Ala	Glu	Val	Arg	Thr	Thr	Val	Lys	Asp	Leu	45
138	CCC	AAA	AAA	GGC	GAC	TGC	AGA	AGT	GGG	AAC	AAC	CGA	GGT	CCT	GTA	182
46	Pro	Lys	Lys	Gly	Asp	Cys	Arg	Ser	Gly	Asn	Asn	Arg	Gly	Pro	Val	60
183	AGC	GGC	ATA	TAC	ATC	AAG	CCT	GGG	CCA	GTG	GTG	TAC	CAG	GAC	TAT	227
61	Ser	Gly	Ile	Tyr	Ile	Lys	Pro	Gly	Pro	Val	Val	Tyr	Gln	Asp	Tyr	75
228	ATA	AAA	CCA	GTA	TAC	CAT	AGA	GCC	CCA	TTG	GAA	CTC	TGT	TCC	GAG	272
76	Ile	Lys	Pro	Val	Tyr	His	Arg	Ala	Pro	Leu	Glu	Leu	Cys	Ser	Glu	90
273	ACA	CAG	TTC	TGT	GAA	GTC	ACC	AAG	AGG	ATA	GGG	AGG	GTT	ACT	GGC	317
91	Thr	Gln	Phe	Cys	Glu	Val	Thr	Lys	Arg	Ile	Gly	Arg	Val	Thr	Gly	105
318	AGC	GAT	GGT	AGG	CTG	TAT	CAC	CTG	TAT	GTC	TGT	ATA	GAT	GGA	TGC	362
106	Ser	Asp	Gly	Arg	Leu	Tyr	His	Leu	Tyr	Val	Cys	Ile	Asp	Gly	Cys	120
363	ATA	TTG	CTG	AGA	ACA	GCA	AGC	AGA	GTT	GGC	CAA	AAA	ACG	CTA	AAA	407
121	Ile	Leu	Leu	Arg	Thr	Ala	Ser	Arg	Val	Gly	Gln	Lys	Thr	Leu	Lys	135
408	TGG	ACC	CAT	AAT	GTT	TTG	GAC	TGC	CCT	CTC	TGG	GTC	ACG	AGT	TGC	452
136	Trp	Thr	His	Asn	Val	Leu	Asp	Cys	Pro	Leu	Trp	Val	Thr	Ser	Cys	150
453	TCT	GAC	GAC	GGC	AAG	AGC	AAA	GAA	TCA	AGT	GAC	AAG	AAA	CCG	GAC	497
151	Ser	Asp	Asp	Gly	Lys	Ser	Lys	Glu	Ser	Ser	Asp	Lys	Lys	Pro	Asp	165
498	AGG	GTT	AAA	CGG	GGA	GTT	ATG	AAG	ATA	GCA	CCT	AAG	GAA	AGT	GAA	542
166	Arg	Val	Lys	Arg	Gly	Val	Met	Lys	Ile	Ala	Pro	Lys	Glu	Ser	Glu	180
543	AAA	GAT	AGT	AGG	TCC	AAG	CCA	CTC	CGA	CGC	CAC	---				578
181	Lys	Asp	Ser	Arg	Ser	Lys	Pro	Leu	Arg	Arg	His	XXX				191



**Ek-2: 78 nolu izolatın kısmi DNA dizisi ve bu dizinin kısmi protein dizisine çevrilmiş hali**

1	TGC TGT ACA TGG CAC ATG GAG TTG ATC AAT TTT GAA TTT TTA TGC	45
1	Cys Cys Thr Trp His Met Glu Leu Ile Asn Phe Glu Phe Leu Cys	15
46	AAA ACA AGC AAA CAA AAA CCA GCA GGA GTG GAG GAG CCT GTG TAC	90
16	Lys Thr Ser Lys Gln Lys Pro Ala Gly Val Glu Glu Pro Val Tyr	30
91	GAT TAC ATG GGG AAG CCC CTG TTC GGG GAG GCC AGC GAG ATA CAC	135
31	Asp Tyr Met Gly Lys Pro Leu Phe Gly Glu Ala Ser Glu Ile His	45
136	CCG CAG TCA ACC CTG AAG TTG CCG CAT GAC AGA GGC CGG GCC GAG	180
46	Pro Gln Ser Thr Leu Lys Leu Pro His Asp Arg Gly Arg Ala Glu	60
181	GTG AGG ACC ACT TTG AAA GAG CTT CCT CGA AAA GGA GAC TGT AGG	225
61	Val Arg Thr Thr Leu Lys Glu Leu Pro Arg Lys Gly Asp Cys Arg	75
226	AGT GGC AAT TGT TTA GGC CCA GTC AGT GGA ATA TAC ATA AAA CCG	270
76	Ser Gly Asn Cys Leu Gly Pro Val Ser Gly Ile Tyr Ile Lys Pro	90
271	GGC CCT GTA TAC TAC CAG GAT TAT AAA GGT CCA GTT TAC CAA AGA	315
91	Gly Pro Val Tyr Tyr Gln Asp Tyr Lys Gly Pro Val Tyr Gln Arg	105
316	GCA CCG CTA GAA CTC TTT ACC GAG GTC CAG TTC TGT GAG GTT ACC	360
106	Ala Pro Leu Glu Leu Phe Thr Glu Val Gln Phe Cys Glu Val Thr	120
361	AAG AGG ATT GGA AGG GTG ACT GGG AGT GAC GGA CAA CTC TAC CAC	405
121	Lys Arg Ile Gly Arg Val Thr Gly Ser Asp Gly Gln Leu Tyr His	135
406	TTA TAT GTT TGC ATA GAT GGG TGT GTA CTG GTA AAA TTG GCT AAA	450
136	Leu Tyr Val Cys Ile Asp Gly Cys Val Leu Val Lys Leu Ala Lys	150
451	AGG AGT GTG AGT AAA ACT CTC AAG TGG GTA AAG AAC ACC ATG GAT	495
151	Arg Ser Val Ser Lys Thr Leu Lys Trp Val Lys Asn Thr Met Asp	165
496	AGC CCA CTG TGG GTA GCA AGC TGC TCC GAT GAC AAG GAA AAA AAC	540
166	Ser Pro Leu Trp Val Ala Ser Cys Ser Asp Asp Lys Glu Lys Asn	180
541	CAG AAG AAA CCA GAC AGA ATC AAA CAG GGG GCA ATG AAG ATA ACT	585
181	Gln Lys Lys Pro Asp Arg Ile Lys Gln Gly Ala Met Lys Ile Thr	195
586	CCG AAA GAG AGC GAG AAA GAC AGT AAA GTG AAG CCC CCT GAC GCC	630
196	Pro Lys Glu Ser Glu Lys Asp Ser Lys Val Lys Pro Pro Asp Ala	210
631	ACC ATC GGG T--	642
211	Thr Ile Gly XXX	213

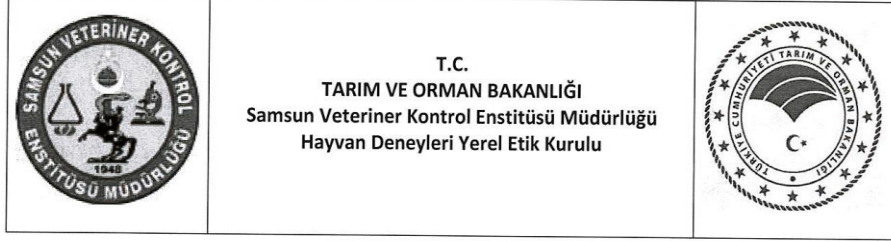
**Ek-3: 186 nolu izolatin kısmi DNA dizisi ve bu dizinin kısmi protein dizisine çevrilmiş hali**

1	TAC CAA ACA GGT AAA CAA AAA CCA GCA GGA GTG GAG GAG CCT GTG	45
1	Tyr Gln Thr Gly Lys Gln Lys Pro Ala Gly Val Glu Glu Pro Val	15
46	TAT GAC CAC ACG GGG AAA CCC CTG TTC GGG GAG GCT AGC GAG ATA	90
16	Tyr Asp His Thr Gly Lys Pro Leu Phe Gly Glu Ala Ser Glu Ile	30
91	CAC CCG CAG TCA ACC CTA AAG TTA CCA CAT GAT AGG GGC CGG GCC	135
31	His Pro Gln Ser Thr Leu Lys Leu Pro His Asp Arg Gly Arg Ala	45
136	GAG GTG AGG ACC ACT CTT AAA GAG CTT CCT CGT AAG GGG GAC TGT	180
46	Glu Val Arg Thr Thr Leu Lys Glu Leu Pro Arg Lys Gly Asp Cys	60
181	AGG AGT GGC AAT CAT TCA GGT CCA ATC AGT GGA ATA TAC ATA AAA	225
61	Arg Ser Gly Asn His Ser Gly Pro Ile Ser Gly Ile Tyr Ile Lys	75
226	CCA GGC CCT GTC TAC TAC CAA GAT TAT AAA GGT CCA GTC TAT CAC	270
76	Pro Gly Pro Val Tyr Tyr Gln Asp Tyr Lys Gly Pro Val Tyr His	90
271	AGA GCA CCG CTA GAA CTC TTT ACT GAG ACC CGG TTC TGT GAA GTT	315
91	Arg Ala Pro Leu Glu Leu Phe Thr Glu Thr Arg Phe Cys Glu Val	105
316	ACC AAG AGG ATC GGG AGG GTG ACT GGG AGT GAC GGA CAA CTC TAC	360
106	Thr Lys Arg Ile Gly Arg Val Thr Gly Ser Asp Gly Gln Leu Tyr	120
361	CAC TTA TAT GTC TGC ATA GAT GGG TGT GTA CTG GTA AAA TTG GCT	405
121	His Leu Tyr Val Cys Ile Asp Gly Cys Val Leu Val Lys Leu Ala	135
406	AAG AGG GGT GTG AGC AAG ACC CTC AAG TGG GTA AAG AAC ATC ATG	450
136	Lys Arg Gly Val Ser Lys Thr Leu Lys Trp Val Lys Asn Ile Met	150
451	GAT AGC CCA CTG TGG GTA GCA AGC TGC TCC GAT GAC AAA GAA AAG	495
151	Asp Ser Pro Leu Trp Val Ala Ser Cys Ser Asp Asp Lys Glu Lys	165
496	AAA GAA AAA AGC CAA AAG AAA CCA GAC AGA ATC AAG CAG GGA GCG	540
166	Lys Glu Lys Ser Gln Lys Lys Pro Asp Arg Ile Lys Gln Gly Ala	180
541	ATG AAG ATA ACT CCA AAA GAG AGC GAG AAG GAC AGT AGG GTG AAG	585
181	Met Lys Ile Thr Pro Lys Glu Ser Glu Lys Asp Ser Arg Val Lys	195
586	CCC CCT GAC GCC ACC ATT GTG GTA GAG GAG TCA AAT A--	624
196	Pro Pro Asp Ala Thr Ile Val Val Glu Glu Ser Asn XXX	207

**Ek-4: 293 nolu izolatin kısmi DNA dizisi ve bu dizinin kısmi protein dizisine çevrilmiş hali**

3	TTC	GGC	GAA	AGA	GAG	TCA	ATA	CAC	CCT	CAA	TCA	ACG	TTA	AAA	CTA	47
1	Phe	Gly	Glu	Arg	Glu	Ser	Ile	His	Pro	Gln	Ser	Thr	Leu	Lys	Leu	15
48	CCA	CAT	GAG	AGA	GGA	AAA	AAT	GAT	ATC	CCC	ACC	AAT	TTG	GCA	TCC	92
16	Pro	His	Glu	Arg	Gly	Lys	Asn	Asp	Ile	Pro	Thr	Asn	Leu	Ala	Ser	30
93	CTA	CCT	AGG	AAA	GGT	GAC	TGC	AGG	TCA	GGC	AAT	ATT	AGA	GGG	CCT	137
31	Leu	Pro	Arg	Lys	Gly	Asp	Cys	Arg	Ser	Gly	Asn	Ile	Arg	Gly	Pro	45
138	GTA	AGT	GGC	ATC	TAT	GTA	AAA	CCA	GGA	CCG	CTA	TTT	TAT	CAA	GAC	182
46	Val	Ser	Gly	Ile	Tyr	Val	Lys	Pro	Gly	Pro	Leu	Phe	Tyr	Gln	Asp	60
183	TAC	ACT	GGA	CCA	GTC	TAC	CAT	AGG	GCC	CCA	CTG	GAA	CTC	TTC	GAA	227
61	Tyr	Thr	Gly	Pro	Val	Tyr	His	Arg	Ala	Pro	Leu	Glu	Leu	Phe	Glu	75
228	GAA	GGG	TCT	ATG	TGT	GAA	ACA	ACT	AAA	AGG	ATT	GGG	AGG	ACA	ACT	272
76	Glu	Gly	Ser	Met	Cys	Glu	Thr	Thr	Lys	Arg	Ile	Gly	Arg	Thr	Thr	90
273	GGT	AGT	GAC	GGT	AAG	CTG	TAC	CAC	ATT	TAT	GTG	TGC	ATA	GAT	GGA	317
91	Gly	Ser	Asp	Gly	Lys	Leu	Tyr	His	Ile	Tyr	Val	Cys	Ile	Asp	Gly	105
318	TGT	ATA	TTA	GTA	AAA	AGC	GCC	ACA	AGA	AAC	CAC	CAG	AAA	ATA	CTC	362
106	Cys	Ile	Leu	Val	Lys	Ser	Ala	Thr	Arg	Asn	His	Gln	Lys	Ile	Leu	120
363	AGA	TGG	GTA	CAC	AAC	AAA	CTC	GAA	TGC	CCT	CTG	TGG	GTA	GCA	AGT	407
121	Arg	Trp	Val	His	Asn	Lys	Leu	Glu	Cys	Pro	Leu	Trp	Val	Ala	Ser	135
408	TGC	TTT	GAT	ACA	AAA	GGA	GAG	GGT	GCG	ATA	AAA	AAA	CAA	CAG	AAA	452
136	Cys	Phe	Asp	Thr	Lys	Gly	Glu	Gly	Ala	Ile	Lys	Lys	Gln	Gln	Lys	150
453	CCA	GAC	AGG	ATG	GAA	AAG	GGG	GGC	ATG	AAG	ATA	ACA	CCT	AAG	GAA	497
151	Pro	Asp	Arg	Met	Glu	Lys	Gly	Gly	Met	Lys	Ile	Thr	Pro	Lys	Glu	165
498	ACT	GAG	AA-		506											
166	Thr	Glu	XXX		168											

## Ek-5: Etik Kurul Raporu



Sayı: 19572899-48

Tarih:25.12.2018

Konu: Proje izni

Karar No:2018-/13-1

Ayhan AKMAN  
Veteriner Hekim

Kurulumuza 19.12.2018 tarihinde sunduğunuz "Karadeniz Bölgesindeki Ruminantlarda Border Disease Epidemiyolojisi" konulu projeniz 25.12.2018 tarihli etik kurul toplantısında grlmtr.

Orman ve Su İleri Bakanlığınca yayınlanan Resmi Gazetenin 15 Őubat 2014 tarih ve 28914 sayılı Hayvan Deneyleri Etik Kurullarının Őalıma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmeliđinin 8.maddesi k bendinin 2. Fıkrasında "l hayvan veya dokusu, mezbaha materyalleri, atık fetuslar, süt sağma, dıki veya altlık rneđi toplama, sürüntü ile örnek alma ile yapılan prosedürler" HADYEK iznine tabi değildir hükmü bulunmaktadır. Bu hüküm çerçevesinde söz konusu projeniz için Etik Kurul iznine gerek yoktur. Enstitü Yerel Etik Kurulu Yönergesinin 5.16 maddesi gereğince projenizin yürütülmesi kurul kararı ile uygun görülmüştür.

Geređini rica ederim.

  
Dr.Neslihan ORMANCI  
Etik Kurul Başkanı V.

## ÖZGEÇMİŞ

**Ad-Soyad** : Ayhan AKMAN  
**Doğum Yeri** : Samsun  
**Doğum Tarihi** : 18.03.1983  
**Medeni Hali** : Evli  
**Bildiği Yabancı Diller** : İngilizce  
**Eğitim Durumu**  
**İlköğretim** : Seyfi Demirsoy İlköğretim Okulu – 1997  
**Lise** : Samsun Veteriner Sağlık Meslek Lisesi – 2000  
**Yüksek Öğretim** : Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi – 2009  
**Yabancı Dil** : İngilizce  
**Çalıştığı Kurumlar ve Yıl**  
Gümüşhane-Kürtün İlçe Tarım ve Orman Müdürlüğü 2003 – 2006  
Ankara-Güdül İlçe Tarım ve Orman Müdürlüğü 2006 – 2013  
Samsun Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü 2013 – Halen  
**E-posta** : [ayhanakman83@hotmail.com](mailto:ayhanakman83@hotmail.com)