



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VİROLOJİ ANABİLİM DALI

**SAMSUN İLİNDE BOVİNE VİRAL DİARRHEA VİRUS
(BVDV) İLE PERSİSTE ENFEKTE SİĞİRLARIN
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Hakan TÜTÜNCÜ

Samsun

Mart-2016



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VİROLOJİ ANABİLİM DALI

**SAMSUN İLİNDE BOVİNE VİRAL DİARRHEA VİRUS
(BVDV) İLE PERSİSTE ENFEKTE SİĞİRLARIN
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Hakan TÜTÜNCÜ

Danışman

Prof. Dr. Zafer YAZICI

Samsun

Mart-2016

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Hakan TÜTÜNCÜ tarafından Prof. Dr. Zafer YAZICI Danışmanlığında hazırlanan “**Samsun İlinde Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) İle Enfekte Sığırların Araştırılması**” başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından /..... /2016 tarihinde yapılan sınav ile Viroloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan :
(Unvanı, Adı Soyadı, Üniversite)

Üye :
(Unvanı, Adı Soyadı, Üniversite)

Üye :
(Unvanı, Adı Soyadı, Üniversite)

Üye :
(Unvanı, Adı Soyadı, Üniversite)

Üye :
(Unvanı, Adı Soyadı, Üniversite)

ONAY:

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

..... / /2016

Doç.Dr. Aydın HİM
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEŞEKKÜR

Çalışmalarımın yürütülmesinde bilgi ve deneyimleri ile beni yönlendiren ve hiçbir zaman desteğini esirgemeyen değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Zafer YAZICI 'ya teşekkür ederim. Tez çalışmalarımı yapmış olduğum Viroloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Semra GÜMÜŞOVA ve Doç. Dr. Harun ALBAYRAK'a teşekkür ederim. Ayrıca projemin yürütülmesinde çalışmalarına maddi olanak sağlayan Ondokuz Mayıs Üniversitesi Proje Yönetimi Ofisi'ne ve çalışmalarındaki katkılarından dolayı değerli meslektaşlarım Veteriner Hekim Ekrem TURAN ve Veteriner Hekim Sinan PİR' e teşekkür ederim. Meslek hayatımın her aşamasında olduğu gibi yüksek lisans çalışmalarım sırasında da maddi ve manevi hiçbir desteğini esirgemeyen ve beni destekleyen ailemin tüm fertlerine ve sevgili eşim Yrd. Doç. Dr. Şerife TÜTÜNCÜ' ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

SAMSUN İLİNDE BOVİNE VİRAL DİARRHEA VİRUS (BVDV) İLE PERSİSTE ENFEKTE SIĞIRLARIN ARAŞTIRILMASI

Amaç: Çalışmamızın amacı; Türkiye'nin kuzeyinde yer alan Samsun ilinin 4 farklı bölgesinde bulunan küçük aile işletmelerindeki Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) ile persiste enfekte sığırların araştırılması ve Samsun ilindeki BVDV'nin mevcut seroprevalansının tespit edilmesidir.

Materyal ve Metot: Türkiye'nin Kuzey bölgesinde bulunan Samsun ilinin dört farklı bölgesinden (Alaçam, Kavak, Ladik, Terme) randomize olarak seçilmiş 119 adet küçük aile işletmesinde bulunan 651 adet sığırdan kan örnekleri toplandı. Alınan kan örnekleri Antigen Captured ELISA (ACE) kullanılarak BVDV antijenleri yönünden ve Serum Nötralizasyon Testi (SNT) kullanılarak BVDV antikorları yönünden kontrol edildi.

Bulgular: 651 sığırdan 2 tanesi (% 0,03) BVDV antijeni pozitif BVDV antikorları yönünden negatif tespit edildi. BVDV antijeni pozitif hayvanlardan 28 gün sonra ikinci kan örnekleri alınarak test edildi ve BVDV antijeni negatif, BVDV antikor pozitif olarak tespit edildi. Yapılan SNT testi ile 651 sığırdan 211 adedi BVDV antikorları yönünden (%32,41) pozitif olarak tespit edildi. Seropozitif sığırların SN titreleri (SN₅₀), 1:2-1:512 arasında değerlendirildi.

Sonuç: Araştırma sonucunda Samsun ilinde küçük aile işletmelerinde BVDV ile persiste enfekte hayvan tespit edilememiştir. Küçük aile işletmelerinde tespit edilen seropozitiflik oranı, bu aile işletmelerinde bulunan hayvanların BVDV enfeksiyonunu subklinik olarak geçirmekte olduğunu ya da geçirdiğini ortaya koymaktadır. Elde edilen yüksek seropozitiflik oranı, Türkiye'de küçük aile işletmelerinde bulunan sığırlarda BVDV enfeksiyonunun yüksek olma olasılığını ortaya koymaktadır.

Anahtar Kelimeler: BVDV; ELISA; nötralizasyon; persiste enfeksiyon; sığır

Hakan, TÜTÜNCÜ, Yüksek Lisans Tezi
Ondokuz Mayıs Üniversitesi - Samsun, Mart-2016

ABSTRACT

INVESTIGATION OF PERSISTENTLY INFECTED CATTLE WITH BOVINE VIRAL DIARRHEA VIRUS IN SAMSUN PROVINCE

Aim: The aims of this were as follows; to investigate the cattle persistently infected (PI) with Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) in small-scale family farms in four different location of Samsun Province, Northern Turkey; to determine the current seroprevalence of BVDV in Samsun Province.

Material and Method: In this study, sampling of cattle was from four different locations (Alaçam, Kavak, Ladik and Terme) of Samsun Province in North Turkey. 119 small scale family farms having between 1 to 12 cattle were randomly selected. Samples were tested for BVDV using commercial antigen capture-ELISA (Antigen Capture ELISA) and tested for BVDV specific antibodies using Virus Neutralization Test (VNT).

Results: 2 of 652 (0.03%) animals were positive for BVDV antigens by ACE and antibody negative by VNT. The antigen positive animals were sampled for second time after 28 days. These animals were found antigen negative and antibody positive. 211 of 651 (31.41%) animals were found seropositive by VNT. VNT titer were calculated from 1:2 to 1:512.

Conclusion: In conclusion, PI cattle with BVDV in small scale family farms were not detected. We detected seropositivity in small scale family farms, this farms of animals reveal that this family farms of animals reveal that BVDV infection that had subclinical or spend. The resulting high seropositivity rate, reveals the possibility that high BVDV infection in cattle found in small family businesses in Turkey.

Keywords: BVDV; cattle; ELISA; neutralization; persistently infected

**Hakan, TÜTÜNCÜ, Master Thesis
Ondokuz Mayıs University - Samsun, March-2016**

SİMGELER VE KISALTMALAR

°C	: Santigrat
µl	: Mikrolitre
ACE	: Antigen Captured Elisa
BVDV	: Bovine Viral Diarrhea Virus
cp	: Sitopatojen
CPE	: Sitopatik Etki
CSFV	: Classical Swine Fever Virus
DKID50	: Doku Kültürü Enfektif Doz
DMEM	: Dulbecco's Modified Essential Medium
EDTA	: Etilendiamin Tetraasetik Asit
ELISA	: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
GP	: Glikoprotein
GPV	: Giraffe Pestivirus
IBR	: Infectious Bovine Rhinotracheitis
IPV	: Infectious Pustular Vulvovaginitis
kb	: Kilo Baz
MAB	: Monoklaonal Antikor
MD	: Mucosal Disease
MDBK	: Madin Darby Bovine Kidney
ml	: Mililitre
nm	: Nanometre
nep	: Sitopatojen Olmayan
NKOD	: Negatif Kontrol Optik Dansite
ONOD	: Örnekleme Yapılan Numune Optik Dansite
ORF	: Open Reading Frame

- PBS** : Phosphate-Buffered Saline
- PCR** : Polymerase Chain Reaction
- PE** : Persiste Enfekte
- PI** : Persistent infection
- RNA** : Ribonükleik Asit
- rpm** : Repeat Per Minute
- RSV** : Respiratory Syncytial Virus
- RT-PCR** : Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction
- SN** : Serum Nötralizasyon
- SNT** : Serum Nötralizasyon Testi
- VD** : Viral Diarrhea

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
SİMGELER VE KISALTMALAR	vi
İÇİNDEKİLER	viii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Tarihçe.....	1
2.2. Etiyoloji.....	2
2.2.1. Taksonomi	2
2.2.2. Virusun Yapısı.....	2
2.2.3. Genotipleri	3
2.2.4. Biyotipleri.....	4
2.3. Epidemiyoloji ve Bulaşma	4
2.4. Patogenez	5
2.4.1. Akut BVDV Enfeksiyonu.....	5
2.4.2. Karışık (Mix) BVDV Enfeksiyonu	6
2.4.3. Veneral Enfeksiyonlar	6
2.4.4. İntrauterin ve Konjenital BVDV Enfeksiyonu	6
2.4.5. Persiste BVDV Enfeksiyonu	7
2.4.6. Mukozal Hastalık (MD)	8
2.5. Klinik Bulgular.....	8
2.5.1. Gebe Olmayan Hayvanlarda Doğum Sonrası BVDV Enfeksiyonu	8
2.5.2. Gebe Hayvanlarda BVDV Enfeksiyonu.....	9
2.5.3. Persiste Enfeksiyon (PE) ve Mukozal Hastalık (MD).....	9
2.6. BVDV'nin Teşhisi	10
2.6.1. Serolojik Yöntemler	10
2.6.1.1. Serum Nötralizasyon	10
2.6.1.2. Antikor ELİSA Testi	10
2.6.2. Antijen Tespit Yöntemleri.....	10
2.6.2.1. Virus İzolasyonu	10
2.6.2.2. Antijen ELİSA Testi	11

2.6.2.3. Moleküler Yöntemler	11
3. MATERYAL VE METOT	12
3.1. MATERYAL	12
3.1.1. Örneklemenin Yapıldığı Bölge	12
3.1.2. Örnekleme Kriterleri	12
3.1.3. Kan Numuneleri	12
3.1.3.1. Kan Numunelerinden Serum Elde Edilmesi	13
3.1.3.2. Kan Numunelerinden Lökosit Elde Edilmesi	13
3.1.4. Hücre kültürü	14
3.1.5. Virus	14
3.1.6. Besiyerleri ve Serum	14
3.1.7. Ticari Antijen ELİSA Kiti	14
3.2. METOT	15
3.2.1. Virusların Üretilmesi	15
3.2.2. BVDV'nin Enfeksiyozite Gücünün Mikrotitrasyon İle Tespit Edilmesi	16
3.2.3. Antijen Yakalama ELİSA Testi (ACE)	17
3.2.4. Serum Nötralizasyon Testi ve Antikor Titre Değerlerinin Tayini	17
4. BULGULAR	20
4.1. Antijen ELİSA Testi Sonuçları	20
4.2. Serum Nötralizasyon Testi (SN) Sonuçları	21
4.3. Seropozitif Numunelerin Antikor Titre Değerleri	22
5. TARTIŞMA	24
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	27
KAYNAKLAR	28
ÖZGEÇMİŞ	34

1.GİRİŞ

BVDV (Bovine Viral Diarrhea Virus), sığırlarda neden oldukları enfeksiyon ve dünya hayvancılık ekonomisine verdiği zarar nedeni ile büyük önem taşımaktadır. Günümüzde birçok ülkede BVDV enfeksiyonlarının kontrolü ve eradikasyonu için uzun soluklu programlar geliştirilmiş ve uygulamaya konulmuştur.

BVDV, Türkiye’de üzerinde virolojik ve serolojik olarak en fazla araştırma yapılan viruslar arasında yer almasına rağmen enfeksiyonun virolojik ve serolojik profilinin değişken olduğu gösterilmiştir. Yapılan araştırmaların çoğunda, örneklemelerde Türkiye’de bulunan devlet tarım işletmeleri temel olarak alınmaktadır, ancak özel besi ve süt sığırı işletmeleri ile ilgili çalışmalarda az sayıdadır.

Araştırmamızda Türkiye’nin Orta Karadeniz Bölgesi’nin en büyük ili ve limanı olan Samsun ili ve ilçelerinde hayvancılıkla uğraşan küçük ölçekli aile işletmelerinde bulunan sığırlarda BVDV enfeksiyonunun persistansı araştırılmıştır. Araştırma ayrıca serolojik olarak destelenerek Samsun iline ait BVDV seroprevalansına ışık tutacak bilgiler güncellenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.Tarihçe

BVDV enfeksiyonu ilk kez 1946 yılında Childs ve Olafson tarafından sığırlarda şiddetli ishalle seyreden akut enfeksiyöz ve kontagiyöz bir hastalık Viral Diyare (Viral Diarrhea, VD) olarak tanımlamıştır (Goens, 2002; Reichel ve ark, 2008). Ramsey ve Chivers, 1953 yılında Mukozal hastalığı (Mucosal Disease,MD) tanımladılar. 1957 yılında MD hastası bir sığırdan sitopatojen (cp) BVDV, VD görülen sığırdan ise sitopatojen olmayan (ncp) BVDV, 1960 yılında yine VD görülen sığırdan cp BVDV suşları izole edildi. 1961 yılında ilk canlı BVDV aşısı Oregon suşundan hazırlanarak uygulamaya sunuldu. 1973 yılında persiste enfekte (PE) hayvanlarda immuntolerans tanımlandı. 1984 yılında MD deneysel olarak üretildi. 1988 yılında BVDV'nin genomik sekansı bildirildi. 1991 yılında Pestivirus cinsi Flaviviridae ailesi içinde yer aldı. 1993 yılında şiddetli akut BVD enfeksiyonu ilk kez tanımlandı ve 1994 yılında BVDV-2 genotipi tanımlandı (Goens, 2002).

2.2. Etiyoloji

2.2.1.Taksonomi

BVDV, *Flaviviridae* virus ailesinin *Pestivirus* cinsinde yer almaktadır. *Flaviviridae*, familyası *Pestivirus*, *Hepacivirus*, *Pegivirus* ve *Flavivirus* olmak üzere dört cinsi içermektedir (ICTV, 2014).

Pestivirus cinsinde, BVDV ile birlikte koyunlarda enfeksiyon oluşturan Border Disease Virus (BDV) ve domuzlarda enfeksiyon oluşturan Classical Swine Fever Virus (CSFV) ve Giraffe Pestivirus (GPV) almaktadır. (Peterhans ve ark., 2010; Yazici ve ark., 2012; Lanyon ve ark., 2013).

2.2.2. Virusun Yapısı

BVDV, 40-60 nm büyüklükte, zarflı ve ikozahedral simetrik kapside sahip, pozitif polariteli, tek iplikçikli RNA genomuna sahip küçük bir virüstür (Kalaycıoğlu, 2007). Viral genom yaklaşık 12,5 kb büyüklüğünde, kodsuz bir 5' ve 3' ucu ile sonlanan geniş bir ORF'a (open reading frame) sahiptir (Meyers ve Thiel, 1996; Ridpath, 2005).

BVDV, yapısal olarak C, E^{ms}, E1, E2, p7, yapısal olmayan N^{pro}, NS2-3(NS-2,NS-3), NS4A, NS4B, NS5A ve NS5B glikoproteinlerinden (gp) oluşur (Ridpath, 2005; Kalaycıoğlu, 2007). Yapısal proteinlerden temel nükleokapsid proteini C(gp14), zarf proteinleri, E^{ms}(gp48), E1(gp25), E2 (gp53), BVDV virionlarını şekillendirir (Kalaycıoğlu, 2007). Bunlar içinde E2 (gp53), genetik ve antijenik nötralizasyondan sorumlu epitoplara sahiptir, BVDV'nin serolojik ve moleküler çeşitliliğini incelemek için kullanılır (Bolin ve ark., 1988; Corapi ve ark., 1990; Ridpath ve ark., Becher ve ark., 2003). E^{ms}, (gp48), intrasellüler olarak kalır ve enfekte hücrelerden salgılanır. Bu durum persiste enfekte hayvanların serumlarında , E^{ms}, serbest olarak bulunmasına neden olur ve teşhis amaçlı kullanılır (Brownlie ve ark., 2000). NS2-3 proteini, monoklonal ve poliklonal antikolar tarafından güçlü bir şekilde tanınır ve korunur (Donis ve ark., 1991), bu nedenle bu proteinler antijen belirleme kitlerinde kullanılır (Sandvik, 2005).

2.2.3. Genotipleri

BVDV'nin genetik olarak BVDV-1 ve BVDV-2 olmak üzere iki ayrı genotipi vardır. Bu iki genotip, kendi aralarında ve diğer pestiviruslardan E2 proteinine karşı ürettikleri antikolar bakımından farklılık gösterebildikleri gibi, yapılan genetik analizlerde genomların farklı bölgelerinde farklılık gösterebilirler (Pellerin ve ark., 1994; Paton ve ark., 1995; Tijssen ve ark., 1996; Ridpath, 2003).

BVDV-1 genotipi, dünya genelinde yaygındır (Brodersen, 2004). BVDV-2 genotipi ise Kanada ve Amerika'da yaygın, Avrupa, Asya ve Güney Amerika'da ülkelerinde ise sporadik olarak görülmektedir (Flores ve ark., 2002; Park ve ark., 2004; Barros ve ark., 2006; Pizarro-Lucero ve ark., 2006). BVDV-2 genotipine bağlı şekillenen enfeksiyonlar, kanamalı sendromlar ile seyreden akut seyirli salgınlara neden olur (Rebhun ve ark., 1989; Carman ve ark., 1998); ancak her iki genotipin sublinik enfeksiyonları daha yaygındır. Yapılan moleküler çalışmalar ve filogenetik analizler sonucunda BVDV-1'in en az 11 adet ve BVDV-2'nin de 2 adet alt tipi olduğu bildirilmiştir (Vilcek ve ark., 2001; Flores, ve ark., 2002).

2.2.4. Biyotipleri

BVDV'nin hücre kültürlerinde sitopatik etki (CPE) oluşturma ve oluşturmama özelliklerine göre isimlendirilen sitopatojen (cp) ve sitopatojen olmayan (ncp) iki biyotipi vardır. cpBVDV, ncpBVDV'un NS2/3 proteinini kodlayan bölgedeki genetik değişimleri sonucu oluşabilirler (Brownlie, 1990; Meyers ve Thiel, 1996; Baroth ve ark., 2000; Kümmerer ve ark., 2000; Becher ve ark., 2002). Sitopatik biyotipler, mukozal hastalık (MD) salgınlarıyla birlikte izole edilmiştir. Nonsitopatik biyotipler doğada yaygın olarak bulunurlar hayvanlarda persistent enfeksiyona sebep olurlar (Bendfeldt ve ark., 2003; Peterhans ve ark., 2003; Schweizer ve ark., 2006).

2.3.Epidemiyoloji ve Bulaşma

BVDV enfeksiyonu hayvancılık ekonomisine verdiği zararlar nedeni ile önemli bir enfeksiyondur. Yapılan araştırmalar BVDV enfeksiyonlarının % 90'dan fazla oranda ncp suşlar tarafından olduğunu ortaya koymaktadır (Kalaycıoğlu, 2007). Ayrıca BVDV-2'nin yüksek morbidite ve mortalite ile karakterize şiddetli akut hemorajik sendroma (Severe Acut Haemorrhagic Syndrom) neden olan ncp suşları Kuzey Amerika, Kanada, Japonya, Brezilya ve çeşitli Avrupa ülkelerinde bildirilmiştir (Kalaycıoğlu, 2007).

Bir çok ülkede BVDV enfeksiyonun kontrol altına alınması ve eradikasyonu üzerine programlar sürdürülmektedir. Danimarka, Norveç, İsveç ve Finlandiya eradikasyon programını başarı ile tamamlamışlardır (Stahl ve Alenius, 2012). Ayrıca bölgesel eradikasyon programlarının uygulandığı İtalya'nın Kuzey bölgesi, Almanya'nın Aşağı Saksonya Eyaleti, Avusturya'nın aşağı bölgelerinde BVDV eradikasyonu tamamlanmıştır. Günümüzde İsviçre, Almanya ve Avusturya'da kontrol ve eradikasyon programları devam etmektedir (Stahl ve Alenius, 2012).

BVDV'nin enfeksiyon spektrumunda sığırlar yer almaktadır; ancak virus tür bariyerini aşarak koyun, keçi, domuz, deve ve bir çok vahşi hayvanda enfeksiyon oluşturmaktadır (Liess ve Moennig, 1990; Deregt ve ark., 2005; Vilcek ve Nettleton, 2006; Passler ve Walz, 2009). Yapılan araştırmalar, BVDV'nin sığırlar dışında kalan diğer türlerde, özellikle vahşi hayvanlarda serolojik olarak tespit edildiğini göstermektedir (Passler ve Walz, 2009). Koyun ve keçiler, BVDV ekolojisinde önemli bir role sahip olabilir. Yapılan filogenetik analizler, koyun ve keçilerin sığırlar ile

ilişkinin diğer türlere nazaran daha yakın olduğunu ortaya koymaktadır (Passler ve Walz, 2009).

BVDV, diğer pestivirus cinsinde yer alan diğer türler gibi konakçıda başarılı olarak çoğalabilmek için immun sistemi baskılayan stratejiler geliştirerek direkt ve çeşitli indirekt yollar ile bulaşır (Passler ve Walz, 2009). Virusun ncp biyotiplerinin en büyük etkisi eğer çiftleşme sezonunda ya da gebelik döneminde enfeksiyon oluştururlar ise persiste enfekte (PE) hayvanların doğumuna neden olmalarıdır (Kalaycıoğlu, 2007). PE hayvanlar, BVDV enfeksiyonunun bulaşmasında en önemli kaynaktır (Passler ve Walz, 2009). PE hayvanlar, yaşamları boyunca vücut sıvıları ile büyük miktarlarda BVDV saçarlar; bu nedenle virus bulaşmasında anahtar rol, enfekte sürülerdeki persiste enfekte (PE) hayvanlar ile direkt temastır (Passler ve Walz, 2009; Stahl ve Alenius, 2012). Kontrol ve eradikasyon programlarının büyük oranda PE hayvanların tespit edilerek sürülerden uzaklaştırılması üzerine dizayn edilmesinde en önemli nedeni bu hayvanların bulaşmada oynadığı anahtar rolden dolayıdır (Kalaycıoğlu, 2007). İndirekt bulaşmada, gaita, sekret, eksret, enfekte doku, organ ve atık materyalleri ve iatrojen yolla olabilir. Persiste enfekte sığırdan ya da akut enfekte bir boğadan alınan semenin dondurulması ve bunların suni tohumlamada kullanılması ile enfeksiyon rahatlıkla bulaştırılabilir. BVDV'nin bu şekilde yayılma potansiyelleri çok yüksektir. Enfeksiyonun yayılmasında diğer önemli yolları ise enfekte ve PE enfekte hayvanların nakledilmesi, kontamine veteriner malzemeleri, araç ve gereçle temastır (Niskanen ve Lindberg, 2003; Schirrmeyer ve ark., 2004; Stringfellow ve ark., 2005).

2.4. Patogenez

2.4.1. Akut BVDV Enfeksiyonu

Sığırlarda, akut BVDV enfeksiyonu genelde çok şiddetli olarak görülmez ve akut enfeksiyonlardan izole edilen BVDV izolatları genellikle ncp BVDV suşlarıdır (Brownlie, 1990). Akut BVDV enfeksiyonlarının patogenezini tam olarak bilinmemekle birlikte, nasal mukozaya iyi adapte olması nedeniyle oronasal mukozalardan başlaması ve sistemik enfeksiyon haline dönüşmesi muhtemeldir (Brownlie, 1990). Bazı akut enfeksiyonlarda okulonasal akıntı ve ağız içi ülserasyonlar görülebilir. Sistemik hale dönüşen akut BVDV enfeksiyonlarında lenfosit ve monositler sensitif hale geçer ve lökopeni oluşumuna neden olur, ayrıca B ve T lenfositlerde geçici bir azalma

mevcuttur. Enfeksiyonun başlamasından 11-17 gün sonra iyileşme görülür (Brownlie, 1990).

2.4.2. Karışık (Mix) BVDV Enfeksiyonu

Sığırlarda akut BVDV enfeksiyonu başka bir patojenle karışık enfeksiyon oluşturmaktadır. BVDV enfeksiyonu özellikle sığırların Infectious Bovine Rhinotracheitis/Infectious Pustular Vulvovaginitis (IBR/IPV), Respiratory Syncytial Virus (RSV) ve adenovirus ile kombine enfeksiyonlar şeklinde solunum sistemi enfeksiyonlarına; rotavirus ve coronavirus ile kombine sindirim sistemi enfeksiyonlarına neden olur. Karışık enfeksiyonların patogeneğinde immunopresyon, lökopeni ve nötrofil disfonksiyonu görülür (Brownlie, 1990).

2.4.3. Veneral Enfeksiyonlar

BVDV ile konjenital enfeksiyonları takiben ürogenital sistemde BVDV yayılımı olasıdır. Persiste viremik hayvanlarda bu daha çok risk içermektedir. Seronegatif hayvanlarda ürogenital sistemin BVDV ile akut enfeksiyonu sistemik hale dönüşerek persiste viremik hayvanların neden olduğu sonuçlardan daha ağır kayıplara neden olabilir (Brownlie, 1990). BVDV ovarium ve testikuler dokuları enfekte eder ve akut enfekte boğaların semeninden elde edilebilir. Semen düşük kalitededir ve seronegatif sürülerde enfeksiyonun yayılmasında potansiyel kaynaktır.

2.4.4. İntrauterin ve Konjenital BVDV Enfeksiyonu

Seropozitif hayvanlarda maternal antikörler virusun plasentayı geçmesine engel olmasından dolayı bu hayvanların fötüslerinde ender olarak BVDV enfeksiyonu şekillenir. Bu nedenle intrauterin ve konjenital enfeksiyonlar BVDV seronegatif dişiler ile sınırlandırılmıştır.

Seronegatif dişilerde akut BVDV enfeksiyonlarında virus yayılarak plasentada replike olabilir ve plasentayı hasar oluşturmadan rahatlıkla geçebilir. Bu durum anneden yavruya virusun transferi ile sonuçlanır. İntrauterin enfeksiyon yüksek oranlı abortlara, erken embriyo ölümlerine, infertilite ve döl tutamamaya neden olur.

İntrauterin enfeksiyonların sonuçları fötusun enfekte olduğu yaş ve enfekte eden virusun biyotipi olmak üzere iki temel faktöre bağlıdır. Sığırlarda gebeliğin ilk

trimesteri (110-120 güne kadar uzayabilir), ikinci trimesteri (yaklaşık 180-200 gün), üçüncü trimesteri (280 gün) ve dördüncü trimesteri ayrı ayrı önemlidir. Gebeliğin ilk iki trimesterinde ncp BVDV ile şekillenen fetal enfeksiyonlar abort ile sonuçlanabilir (Brownlie, 1990). Ancak özellikle gebeliğin ilk trimesterinde mumifikasyon, fetal ölümler abortlar daha fazladır (Bielefeldt-Ohmann, 1995). Ayrıca ilk trimesterde virusa karşı spesifik immuntolerans şekillendiğinden dolayı sağ kalmayı başaran fütüsler persiste enfekte olarak doğarlar (Brock ve Chase, 2000). İkinci trimester, sinir sisteminin ve gözlerin meydana geldiği organogenezisin son aşaması esnasında viral kopyalamanın neden olduğu bozulmalara oldukça hassastır. Kongenital defektler; lens opaklığı, körlük, retinal displazi, katarakt, sereballar hipoplazi ve hidraensefali içerir. Ayrıca çeşitli sinir sistemi bozukları, atrogripoza görülen defektler arasındadır. Gebeliğin 125 gününden sonra fetal immün sistem gelişmeye başlar. Gebeliğin son trimesterinde oluşan enfeksiyonlara fütüs immün yanıt oluşturur ve nötralize edici antikorlar ile virusu ortadan kaldırabilir. Bu fütüsler doğumda immunkompetan oldukları için virus-negatif, antikor pozitifler (Brownlie, 1990; Moennig ve Liess, 1995 ; Graham, 2001).

2.4.5. Persiste BVDV Enfeksiyonu

Gebeliğin ilk trimesterinde ncp biyotiplerin sadece transplasental olarak bulaşması sonucunda, persiste enfekte (PE) buzağular doğar (Charleston ve ark., 2001). PE buzağular BVDV için spesifik immuntoleransa sahiptirler ve virusa karşı herhangi bir antikor ya da T hücre yanıtı oluşturmazlar (Collen ve ark., 2000). Klinik olarak sağlıklı görülen birçok PE hayvan persistans tespit edilirse itlaf edilmektedir. BVDV enfeksiyonlarının sebep olduğu total buzağı kayıpları, endemik enfeksiyonların olduğu ülkelerde % 25 oranındadır (Houe, 2003).

Bu nedenle BVDV enfeksiyonlarının birçok ülkede ciddi hayvan refahı problemlerine neden olduğu düşünülmektedir. Bazı persiste enfekte doğan buzağular erginlik dönemine girinceye kadar yaşayabilir. Bu buzağular ıslah için kullanılır ise yavruları persiste enfekte doğar. PE boğalarda semen üretimi düşebilir ve infertil olabilirler (Moennig ve Liess, 1995). Voges ve ark.(1998), yaptıkları bir çalışmada güçlü şekilde seropozitif ve viremik olmayan bir boğanın semeninde persiste virüslerin yayıldığını bildirmişlerdir. Bu durum boğaların ergenlikte, 'kan-testis' bariyerinin

oluşumu sırasında enfekte olduklarını düşündürmektedir; böylece virus testislerin içerisinde replike oluyor ve bariyerden kaçıyor (Voges ve ark., 1998; Fray ve ark., 2000). BVDV, sığırlarda genital sistemi tehdit eder ve bu sisteme ait bozukluklar sonucunda erken embriyo ölümü ve rezorpsiyonu, abort, metritis gibi fertilité problemlerine de neden olur. Bu olgular sonucunda sürüde "repeat breeder" olarak tanımlanan "döl tutmayan" hayvanlar ortaya çıkar. Fötal enfeksiyonun en önemli ipuçlarından birisi de persiste enfekte (PE) buzağı doğumudur (Burgu ve ark., 2003).

2.4.6. Mukozal Hastalık (MD)

Sığırlarda görülen BVDV enfeksiyonları, büyük oranda ncp biyotipler tarafından oluşturulur. BVDV enfekte hayvanda MD oluşabilmesi için enfekte eden ncp biyotipi ile homolog olan ve genetik ilişkili cp BVDV biyotipi ile süper enfekte olması gerekir (Fenner, 2011). Yapılan çalışmalar, cp biyotiplerin çeşitli mutasyonlar ile ncp biyotipler tarafından oluşturulan persiste enfeksiyonlar oluştuğunu ortaya koymuştur (Ridpath ve Bolin, 1995; Meyers ve Thiel, 1996; Fritzemeier ve ark., 1997; Fenner, 2011). MD, genellikle bir iki hafta içerisinde klinik belirtileri gösteren ve yüksek ölüm oranı (%100) ile seyreden bir hastalıktır. Akut MD vakalarında lenfatik organlarda ve gastrointestinal sistem boyunca nekrozlar oluşur, karakteristik erozyonlar ve ülserler dikkati çeker. Ağız boşluğu ve burun, özefagus, mide ve ince barsak mukozalarında yaygın erozyon ile ülserler oluşur (Baker, 1987; Fenner, 2011). Kronik MD vakalarında gastrointestinal sistem lezyonları karakteristik değildir ancak deri ülserleri, boyun ve bacak derilerinde yaygın hiperkeratoz oluşumu vardır (Fenner, 2011).

2.5. Klinik Bulgular

BVDV enfeksiyonları hayvanın immun durumu, aşı durumu ve sürüde PE enfekte hayvanların bulunup bulunmaması gibi çeşitli faktörlere bağılı olarak gelişebilir. Klinik ve patolojik semptomlar yaş ve gebelik durumu ile ilgili olarak BVDV enfeksiyonlarında 3 farklı tablo şekillendirebilir (Fenner, 2011).

2.5.1. Gebe Olmayan Hayvanlarda Doğum Sonrası BVDV Enfeksiyonu

Sığırlar her yaş dönemlerinde BVDV enfeksiyonuna duyarlıdır. Ancak enzootik enfeksiyon görülen sürülerde genç hayvanlarda enfeksiyon geneldir. Buzağuların

kolostrum yolu ile aldıkları antikorlar 3-8 ay arasında kaybolduğundan bu buzağular enfeksiyondan sonra klinik semptom göstermeyebilir (Fenner, 2011). Duyarlı hayvanlarda enfeksiyon sonrası inkubasyon süresi 5-7 gündür. Duyarlı hayvanlarda bifazik ateş ve lökopeni oluşur. Bazı hayvanlarda ishal gelişebilir (Fenner, 2011). Ağız, burun, dişetleri dudak bölgelerinde erozyonlar şekillenir. Süt ineklerinde süt veriminde azalma dikkati çeker. Bazı duyarlı hayvanlarda trombositopeni yüksek ölüm oranı dikkati çeker. Ayrıca BVDV enfeksiyonları, Bovine Herpes Virus tip-1, RSV, adenovirus tipleri ile kombine solunum; rotavirus ve koronavirus ile kombine olarak da sindirim sistemi enfeksiyonları oluşturabilir (Fenner, 2011).

2.5.2.Gebe Hayvanlarda BVDV Enfeksiyonu

Gebe hayvanların BVDV enfeksiyonu sırasında virusun transplasental olarak enfekte olması sonucu fötusun yaşına ve virusun biyotipine bağlı çeşitli semptomlar şekillenir. Bu semptomlar: Enfeksiyon, gebeliğin erken dönemlerinde şekillenirse sık olarak embriyonik ölümler ve rezorbsiyon görülür (Fenner, 2011). İmmun sistemin gelişiminden önce şekillenen BVDV enfeksiyonlarında destruktif fötal lezyonlar, persiste postnatal enfeksiyonlar ve büyümede gerilik ve buna bağlı olarak normalden düşük kiloda yavru doğumları (weak calf syndrome) ve ölüm oluşur. Fötal enfeksiyon esnasında virusun organogenezisi etkilemesi sonucu retinal displazi, serebellar hipoplazi, hidrosefali şekillenebilir. Gebeliğin erken dönemlerinde enfekte olan ancak hayatta kalan fötüsler persiste enfekte olarak doğarlar ve hayatları boyunca persiste enfekte kalırlar. Yapılan testlerde seronegatif olarak tespit edilirler ancak büyük miktarlarda virus saçarlar. Bazı enfekte sığırlarda mukozal hastalık şekillenir (Fenner, 2011).

2.5.3.Persiste Enfeksiyon (PE) ve Mukozal Hastalık (MD)

Duyarlı sürülerde buzağuların önemli kısmı PE şeklinde doğar. PE enfekte buzağularda büyümede gerilik ve ölüm oranı ilk yıl içinde % 50'den fazladır. MD, sadece ncp ve cp BVDV varlığında şekillenir. ncp BVDV ile enfekte sığırların bu biyotiple homolog olan cp biyotipleri ile süperenfekte olması sonucu MD olur. MD aniden oluşabildiği gibi haftalara aylara yayılabilir. Ateş, anoreksi, sulu şiddetli ishal,

stomatit, dehidrasyon, şiddetli eroziv ve ülseratif lezyonlar şekillenir ve sonuçta ölüm kaçınılmazdır (Fenner, 2011).

2.6. BVDV'nin Teşhisi

BVDV kontrol ve eradikasyonunun yapıldığı ülkelerde persiste hayvanların tespit edilmesi ve sürüden çıkarılması gereklidir. Günümüzde sığırlarda BVDV enfeksiyonlarının teşhisinde çeşitli laboratuvar tanı metotları kullanılmaktadır. Bu metotlar sürülerde BVDV varlığını ortaya koyar ve virus spesifik antikorların tespitini sağlar (Ahmad ve ark., 2014).

2.6.1. Serolojik Yöntemler

2.6.1.1. Serum Nötralizasyon

Serum nötralizasyon (SN) testleri, BVDV enfeksiyonlarında antikor tespiti için kullanılan en önemli testlerden birisidir ve altın standart olarak kabul edilmektedir. SN testleri hassas olmasına rağmen hücre kültürü kullanılması nedeni ile kontaminasyon riskinin yüksek olması, yapılışının ve sonuçlarının okunmasının uzun zaman alması gibi dezavantajları bulunmaktadır (Ahmad ve ark., 2014).

2.6.1.2. Antikor ELISA Testi (Antigen Captured ELISA, ACE)

ACE-ELISA testi, SN testine göre daha hassas, yapılışı daha kolay ve hızlı sonuç veren bir testtir. Büyük miktar numunelerin taranması kısa sürede yapılabilir. (Ahmad ve ark., 2014).

2.6.2. Antijenlerinin Tespit Yöntemleri

2.6.2.1. Virus İzolasyonu

BVDV izolasyonunda sığır fötal böbrek hücre kültürü, sığır turbinata hücre kültürü, sığır endotel hücre kültürü kullanılır (Sandvik, 2005). Hücre kültürleri içinde virus izolasyon çalışmalarında en fazla MDBK (Madin Darby Bovine Kidney) olarak bilinen sığır böbrek epitel hücre kültürü kullanılır (Ahmad ve ark., 2014). cp BVDV suşları 48-72 saat içerisinde hücre kültürlerinde sitopatik etki (CPE) oluşturmaya başlar. Genel olarak BVDV saha suşları ncp biyotipler şeklindedir. Bu nedenle ncp biyotiplerin

hücre kültürlerinde tespitinde immunoperoksidaz ve immunofloresans testleri kullanılmaktadır. Hücre kültürlerine BVDV izolasyonu için lökosit, svab, semen, doku ve organ numuneleri kullanılabilir. BVDV izolasyonunda kullanılacak, hücre kültürü, serum ve besiyerlerinin mutlaka BVDV'nin ncp suşları yönünden ari olması önemlidir (Yazici ve ark., 2012; Ahmad ve ark., 2014).

2.6.2.2. Antijen ELISA (Antigen Captured ELISA, ACE).

BVDV antijenlerinin tespit edilmesinde çeşitli ELISA yöntemleri ticari olarak üretilmekte ve kullanılmaktadır. ACE, viral antijenlere spesifik monoklonal antikorların (Mab) kullanıldığı bir yöntemdir. Yöntem, virus spesifik monoklonal antikorların viral antijenleri yakalama esasına dayanmaktadır. PE hayvanların tespit edilmesinde günümüzde başarı ile kullanılmaktadır (Ahmad ve ark., 2014).

2.6.2.3.Moleküler Yöntemler

RT-PCR (Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction) viral nükleik asidin tespit edilmesinde kullanılan hızlı ve süratli bir tekniktir. Kullanılan konvensiyonel RT-PCR tekniklerinde uygulanan protokol evreleri zaman almasına rağmen günümüzde en sık tercih edilen yöntemdir. Son yıllarda kullanılan gerçek zamanlı (real time) RT-PCR testi gerek kontaminasyon riskini çok aza indirmesi gerekse de konvensiyonel PCR yöntemlerinden daha sensitif olması nedeni ile tercih edilmektedir (Ahmad ve ark., 2014).

3. MATERYAL ve METOT

3.1. MATERYAL

3.1.1. Örneklemenin Yapıldığı Bölge

Araştırma, coğrafik olarak Karadeniz Bölgesinin en büyük ili olan ve coğrafik olarak 36,33⁰ boylam, 41,25⁰ enlem arasında yer alan Samsun sınırları içinde bulunan Alaçam, Kavak, Ladik ve Terme ilçelerinden örnekleme yapılarak gerçekleştirildi.

3.1.2. Örnekleme Kriterleri

Samsun il sınırları içerisinde yer alan Alaçam, Kavak, Ladik ve Terme ilçelerinde yer alan ve randomize olarak seçilen toplam 119 küçük ölçekli aile işletmesinde bulunan 651 sığırdan kan numunesi toplanmıştır. İşletmelerin ve hayvanların ilçelere göre dağılımı Tablo.1’de detaylı olarak verilmiştir. Örnekleme kriterleri ise maddeler şeklinde aşağıda sunulmuştur :

- Örnekleme yapılmadan önce işletme sahiplerinden gerekli izinler alınmıştır.
- Örnekleme yapılan hayvanların klinik durumları ve hastalık geçmişleri detaylı olarak incelenmiş; özellikle konjenital anomalili doğum yapan hayvanların varlığı ya da atık vakaları hakkında bilgi alınmıştır.
- Örnekleme yapılan hayvanların tamamı 1 yaş ve üzerindedir.
- Örnekleme yapılan hayvanların tamamı aşılammamış hayvanlardır.

3.1.3. Kan Numuneleri

Toplam 651 kan numunesi toplanmıştır. Kan numuneleri hayvanlarda vena jugularis’ten serum elde etmek amacı ile vakumlu silikon tüplere ve lökosit numunesi elde etmek amacı ile vakumlu EDTA içeren tüplere alınmıştır. Alınan numuneler soğuk zincir altında işlenmek üzere Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı Laboratuvarları’na getirilmiştir.

Tablo 1. Araştırmada Samsun ilinde örnekleme yapılan küçük ölçekli aile işletmeleri ve örnekleme yapılan hayvan sayıları

Sıra No	Küçük ölçekli aile işletmeleri			
	İşletme Sayısı (Toplam Hayvan Sayısı)			
	Alaçam	Kavak	Ladik	Terme
1	-	1(1)	-	-
2	-	2(4)	2(4)	-
3	2 (6)	7(21)	4(12)	4(12)
4	3(12)	5(20)	6(24)	13(52)
5	4(20)	3(15)	2(10)	6(30)
6	2(12)	4(24)	3(18)	5(30)
7	3(21)	3(21)	3(21)	4(28)
8	6(48)	1(8)	2(16)	1(8)
9	4(36)	3(27)	5(45)	1(9)
10	-	2(20)	-	-
11	-	-	2(22)	-
12	1(12)	-	1(12)	-
Toplam	25(167)	30(161)	30(184)	34(169)

3.1.3.1. Kan Numunelerinden Serum Elde Edilmesi

Vakumlu silikonlu tüplere vena jugularis'ten alınan kan örnekleri soğutmali santrifüj (Nuve, Türkiye) yardımı ile 2000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonunda üst kısımda oluşan serum tüpleri 2 ml hacimli steril mikrotüplere (Eppendorf, Almanya) alınmıştır. Serumlar, 56°C'de 30 dakika inaktive edildikten sonra testlerde kullanılıncaya kadar -20 °C'lik derin dondurucuda (Arçelik, Türkiye) saklanmıştır.

3.1.3.2. Kan Numunelerinden Lökosit Elde Edilmesi

Vakumlu EDTA içeren tüplere vena jugularis'ten alınan kan örnekleri soğutmali santrifüj yardımı ile 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonunda üst kısımda plazma, alt kısımda eritrosit ve orta kısımda ise halka şeklinde lökosit olmak üzere 3 katman şekillenmiştir. Orta kısımda bulunan lökosit katmanları

pastör pipeti yardımı ile dikkatli bir şekilde alınmış ve 1,5 ml Phosphate-buffered saline (PBS) (Gibco, ABD) içeren tüplere aktarılmıştır ve tekrar santrifüj edilmiştir. Yıkama işlemi iki kez gerçekleştirilmiştir. Elde edilen lökosit numuneleri steril mikrotüplerde testlerde kullanılıncaya kadar -80 °C'lik derin dondurucuda (Sanyo, Japan) saklanmıştır.

3.1.4. Hücre Kültürü

Araştırmada mikronötralizasyon testlerinde hücre kültürü olarak Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı hücre stok koleksiyonunda yer alan MDBK (Madin Darby Bovine Kidney) Hücre Kültürü kullanılmıştır.

3.1.5. Virus

Araştırmada mikronötralizasyon testlerinde sitopatik BVDV suşu olarak NADL kullanılmıştır. BVDV-NADL, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı virus stok koleksiyonundan temin edilmiştir.

3.1.6. Besiyerleri ve Serum

MDBK hücre kültürlerinin üretilmesinde DMEM (Dulbecco's Modified Essential Medium) (Gibco, ABD) besiyeri % 10 oranında Fötal Dana Serumu (Biological Industrial, İsrail) ve % 1 oranında antibiyotik solüsyonu (Biological Industrial, İsrail) katılarak kullanılmıştır. Hücrelerin subkültür edilmesi için proteolitik enzim olarak tripsin (Gibco, ABD) kullanılmıştır.

Araştırmada kullanılan hücre kültürleri, besiyerleri, fötal serum, tripsin ve antibiyotik solüsyonu BVDV'nın ncp suşları tarafından olası bir kontaminasyon açısından test edilmiş ve ari oldukları tespit edildikten sonra kullanılmıştır.

3.1.7 Antijen Yakalama ELISA Kiti

Bu araştırmada BVDV antijenlerinin tespiti amacı ile ticari ACE (IDEXX, USA) kitleri kullanılmıştır. Test kitleri, BVDV ile PE hayvanların kan ve dokularında bol miktarda bulunan E^{rns} proteinlerinin tespit edilmesi prensibi ile çalışmaktadır.

3.2. METOT

3.2.1. Virusların Üretilmesi

Araştırmada serum nötralizasyon testlerinde kullanılmak üzere BVDV'nin sitopatojen suşu olan NADL, MDBK hücre kültürlerinde üretilerek stoklanmıştır. Bu amaçla MDBK hücre kültürleri 75 cm² üreme yüzeyine ve 200 ml hacime sahip tek kullanımlık steril polisteren hücre kültürü şişeleri kullanılmıştır.

Test Protokolü:

- MDBK hücrelerinin %10 oranında PBS ve %1 oranında antibiyotik içeren DMEM besi yeri ile subkültürü yapılmıştır.
- Subkültür işleminden 20 saat sonra tamamen hücre kültürü şişesinin yüzeyini tamamen kaplayan hücrelerin besi yeri uzaklaştırılmış ve hücre yüzeyi PBS ile bir defa yıkanmıştır.
- Hücre kültürü şişesinin hacminin %1 oranında BVDV NADL hücre yüzeyine inokule edilmiştir.
- 1 saat süre ile 37°C'de inkubasyona bırakılmıştır.
- Inkubasyon sonrası inokule edilen virus uzaklaştırılmıştır. Hücre kültürü şişesi hacmini %10'u oranında olacak şekilde serum içermeyen DMEM vasatı ilave edilerek 37°C'de inkubasyona kaldırılmış ve virus üremesi yönünden her gün kontrol edilmiştir.
- Hücre kültüründe %80-85 oranında CPE gözlemlendiği zaman virus içeren hücre kültürleri -80 °C'lik derin donduruculara kaldırılmış ve dondurulmuştur. Daha sonra 37 °C de çözülmüştür.
- Dondurma ve çözme işlemi 2 kez yapıldıktan sonra virus içeren süspansiyon 50ml hacimli steril tüplere alınarak 3000 rpm devirde 15 dakika santrifuj edilmiştir.
- Santrifüj işlemi sonunda süpernatant alınarak 0,22 µm filitre sistemlerinden geçirilmiş ve 1 ml porsiyonlar şeklinde ependorf tüplere bölünerek -80 °C'lik derin donduruculara kaldırılmıştır.

3.2.2. BVDV'nin Enfeksiyözite Gücünün Mikrotitrasyon Yöntemi İle Tespit Edilmesi

Üretilen BVDV-NADL suşunun enfeksiyözite gücü Doku Kültürü Enfektif Doz (DKID₅₀/0,1ml) olarak mikrotitrasyon yöntemi ile tespit edilmiştir.

Test Protokolu:

- Virusun 10⁻¹ ile 10⁻⁸ değerleri arasında sulandırması yapılmıştır. Bu amaçla 96 kuyucuklu tablalarda her sulandırma basamağı için 4 kuyucuk seçilmiştir.
- 96 kuyucuklu tablanın tüm kuyucuklarına çok kanallı pipet yardımı ile 100 µl serum içermeyen DMEM vasatı konmuştur.
- İlk dört gözün her biri içine 11µl BVDV-NADL konmuştur böylece virusun 1/10 dilusyonu elde edilmiştir.
- Çok kanallı pipet 11µl oranına ayarlanarak ilk dört gözden 11µl çekilerek ikinci sıradaki dört göze aktarılmış ve dikkatlice karıştırılmıştır. Bu işlem son sulandırma basamağına kadar devam etmiş ve son sulandırma basamağının gözlerinden sulandırmayı takiben 11 µl atılmıştır.
- Dört kuyucuk hücre kontrol için seçilmiştir. Bu gözlerin her birisine 100µl serum içermeyen DMEM vasatı konmuştur. Dört kuyucuk virus kontrol için seçilmiştir. Bu kuyucukların her biri içine 50µl saf virus ve 50µl serum içermeyen DMEM vasatı konmuştur.
- Tüm gözlerin üzerine 3x10⁴ hücre/ 0,1 ml olacak şekilde hazırlanan MDBK hücre süspansiyonu her test gözüne 100µl hacimde ilave edilmiştir. Tablanın üzeri şeffaf bant ile kapatılarak 37 °C, %5 CO₂'li ortamda 3 gün süre ile inkube edilmiştir. Her gün CPE yönünden kontrol edilmiştir.
- İnkubasyon periyodu sonunda virusun DKID₅₀ değeri Reed ve Muench (1938) belirttiği formula göre hesaplanmıştır.

3.2.3. Antijen Yakalama ELISA Testi (ACE)

Test Protokolü :

- Test kitinde bulunan tüm kimyasallar ve 96 kuyucuklu ELISA pleytleri oda ısısına getirilmiştir.
- Tüm kuyucuklar 50µl antikor arama solüsyonundan konularak kaplanmıştır. 50µl negatif kontrol ve 50µl pozitif kontrol seçilen kuyucuklara ilave edilmiştir. Kalan kuyucuklara kontrol edilecek numunlerden 50µl konulmuştur.
- 2 saat süre ile 37 °C’de inkubasyona bırakılmıştır.
- Her kuyucuk 300 µl yıkama solusyonu ile yıkanmıştır.
- Tüm kuyucuklara 100 µl konjugat ilave edilmiştir.
- 30 dakika oda ısısında inkubasyona bırakılmıştır.
- Her kuyucuk 300 µl yıkama solusyonu ile yıkanmıştır.
- Tüm kuyucuklara 100 µl substrat ilave edilmiştir.
- 10 dakika oda ısısında karanlıkta inkubasyona bırakılmıştır.
- Tüm kuyucuklara 100 µl reaksiyonu durdurucu solüsyon ilave edilmiştir.
- Sonuçlar Elisa okuyucusu ile 450 nm’ lik filitre ile okundu.Sonuçlar elde edilen optik dansitelere göre değerlendirilmiştir.

Sonuçların Değerlendirmesi: ACE testi değerlendirilmesi negatif kontrol optik dansite (NKOD) sonuçlarının örnekleme yapılan numune optik dansite (ONOD) sonuçlarından çıkarılması ile yapılmıştır. Buna göre; eğer $ONOD - NKOD \leq 0,3$ ise sonuçlar pozitif olarak, bulunan okuma değeri $ONOD - NKOD \geq 0,3$ ise sonuçlar negatif olarak kabul edilmiştir.

3.2.4. Serum Nötralizasyon Testi

Serum Nötralizasyon Testi ve Antikor Titre Değerlerinin (SN₅₀) Tayini

Araştırmada, serum örneklerinde BVDV spesifik antikorları tespiti amacıyla Frey ve Liess (1971) tarafından uygulanan mikronötralizasyon yöntemi ile test edilmiştir. Test 96 kuyucuklu steril tablalarda (TPP, İsviçre) gerçekleştirilmiştir.

Test Protokolu :

- Her serum örneğinden 96 kuyucuklu mikrotitrasyon tabletlerinde kendileri için ayrılmış 2 kuyucuğa 50 µl konuldu.
- 100 DKID₅₀ oranında sulandırılmış BVDV her kuyucuğa eşit hacimde ilave edilerek 1 saat süreyle 37 °C, %5 CO₂'li ortamda nötralizasyonu sağlamak amacı ile inkubasyona bırakıldı.
- Süre sonunda 2x10⁴ hücre/ 0,1 ml olacak şekilde hazırlanan MDBK hücre süspansiyonu her test gözüne 100 µl hacimde ilave edildi.
- Tabletler 37 °C, %5 CO₂'li ortamda 4 gün süreyle inkübe edildikten sonra test değerlendirildi. Virus üremesini inhibe eden serum örnekleri aranan antikor yönünden pozitif olarak değerlendirildi.

Sonuçların Değerlendirmesi: Nötralizasyon tabletleri ters mikroskopta kontrol edildi ve CPE oluşumunun negatif olduğu kuyucuklar BVDV antikorları yönünden pozitif olarak değerlendirildi.

Seropozitif olan hayvanların serum örneklerinde antikor değerlerinin (SN₅₀) tayin için ise aşağıda detayı verilen protokol uygulanmıştır.

- Mikrotitrasyon tabletlerinin tüm kuyucuklarına 50 µl serum içermeyen DMEM vasatından konulmuştur.
- Her serum örneğinden 96 kuyucuklu mikrotitrasyon tabletlerinde 2 kuyucuk seçilmiş ve ilgili serum numulerinden 50 µl konularak ilk kuyucuklarda ½ lik bir dilusyon elde edilmiştir. Bu sulandırmalardan çok kanallı otomatik pipet yardımı ile 50'şer µl alınarak bir sonraki göze aktarılmış ve bu işlem mikrotitrasyon tablasının son kuyucuklarına kadar devam etmiş ve son kuyucuklardan 50'şer µl atılmıştır. Böylece pozitif serum numunlerinin ½ ile 1/512 arasında iki katlı sulandırmaları elde edilmiştir.
- 100 DKID₅₀ oranında sulandırılmış BVDV her kuyucuğa eşit hacimde (50 µl) ilave edilerek 1 saat süreyle 37 °C, %5 CO₂'li ortamda nötralizasyonu sağlamak amacı ile inkubasyona bırakılmıştır.
- Süre sonunda 2x10⁴ hücre/ 0,1 ml olacak şekilde hazırlanan MDBK hücre süspansiyonu her test gözüne 100 µl hacimde ilave edilmiştir.

- Tabletler 37 °C, %5 CO₂'li ortamda 4 gün süreyle inkübe edildikten sonra test değerlendirildi. Virus üremesini inhibe eden serum örnekleri aranan antikor yönünden pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Sonuçların Değerlendirmesi: Nötralizasyon tabletleri ters mikroskopta kontrol edildi ve CPE oluşumunun negatif olduğu kuyucuklar BVDV antikorları yönünden pozitif olarak değerlendirilmiştir ve CPE yönünden negatif olan kuyucukların sona erdiği dilüsyon oranı o pozitif serumun SN₅₀ değeri olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Antijen Yakalama ELISA Testi Sonuçları

BVDV antijenlerini tespit etmek amacı ile yapılan ACE testi sonuçları Tablo.2’de detaylı olarak gösterilmiştir. Test edilen 651 sığırdan sadece 2 tanesi ACE testi ile % 0,3 (2/651) oranında BVDV antijeni pozitif olarak tespit edilmiştir. Bu hayvanlar SN testi sonucunda BVDV antikoru negatif tespit edilmiştir. Pozitif olarak bulunan hayvanlar Ladik ilçesinden toplanan örnekler arasında bulunmaktadır; ilçe bazında pozitiflik oranı %1,08 (2/184) olarak bulunmuştur.

Tablo 2. Antijen ELISA (ACE) testi Sonuçlarının yerleşim yerlerine göre dağılımı

Yerleşim	Küçük Ölçekli İşletme Sayısı	Test Edilen Hayvan Sayısı	Antijen ELISA(ACE)	
			Pozitif (%)	Negatif (%)
Alaçam	25	167	-	167(100,0)
Kavak	30	161	-	161(100,0)
Ladik	30	184	2 (1,08)	182(98,92)
Terme	34	169	-	169(100,0)
Toplam	119	651	2 (0,3)	649 (99,97)

BVDV antijeni pozitif bulunan hayvanlarda 28 gün sonra ikinci kez kan örnekleri alınarak ACE testi ve SN testleri uygulanmıştır. Bu testler sonucunda daha önce BVDV antijeni pozitif ve BVDV antikoru negatif olarak tespit edilen 2 hayvan, ikinci örnekleme test sonuçlarında BVDV antijenleri negatif ve BVDV antikoru pozitif olarak tespit edilmiştir.

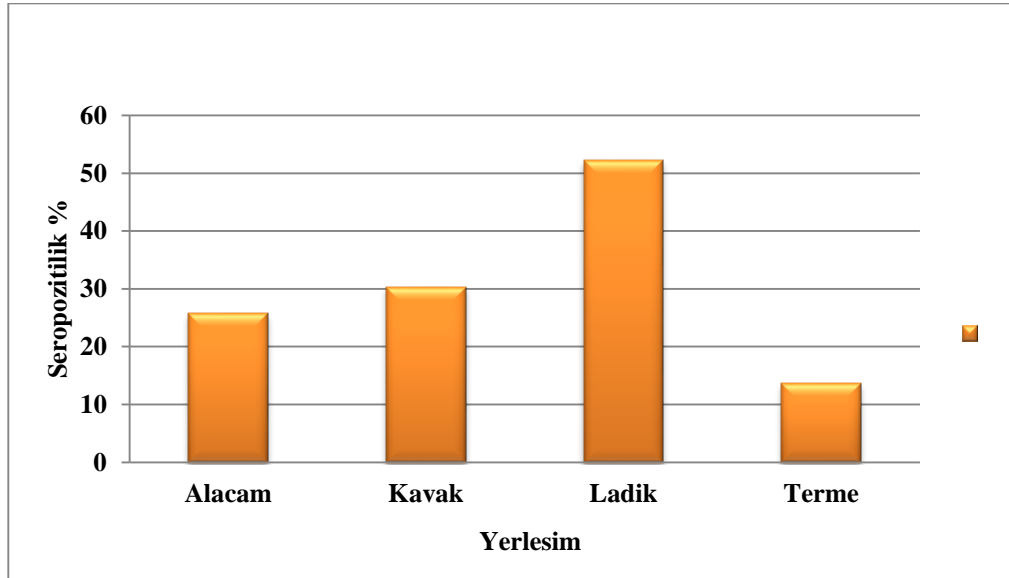
Bu sonuçlar örnekleme yapılan 651 sığır arasında PE hayvan bulunmadığını ortaya koymaktadır.

4.2. Serum Nötralizasyon Testi (SN)

BVDV antikorlarını tespit etmek amacı ile yapılan SN testi sonuçları Tablo.3'de detaylı olarak gösterilmiştir. Test edilen 651 sığırdan sadece 211 tanesi SN testi ile %32,41 (211/651) oranında BVDV antikorları pozitif olarak tespit edilmiştir.

Tablo 3. Serum Nötralizasyon Testi uygulanan örneklerin toplandığı ilçeler, örnek toplanan küçük ölçekli işletmelerin ilçelere göre dağılımı ve SNT sonuçları

Yerleşim	Küçük Ölçekli işletme sayısı	Test Edilen Hayvan Sayısı	Serum Nötralizasyon Testi(SNT)	
			Pozitif (%)	Negatif (%)
Alaçam	25	167	43 (25,74)	124(74,26)
Kavak	30	161	49(30,34)	112(69,66)
Ladik	30	184	96(52,17)	88(47,83)
Terme	34	169	23(13,60)	146(86,40)
Toplam	119	651	211(32,41)	440(67,59)



Şekil 1. Seropozitif hayvanların ilçelere göre dağılımı

Seropozitiflik oranları Ladik ilçesinde % 52,17, Kavak ilçesinde %30,34, Alaçam ilçesinde %25,74 ve Terme ilçesinde %13,60 olarak bulunmuştur. Şekil 1’ de görüldüğü gibi Ladik ilçesinde seropozitiflik oranı en yüksek, Terme ilçesi seropozitiflik oranı en düşük olarak tespit edilmiştir.

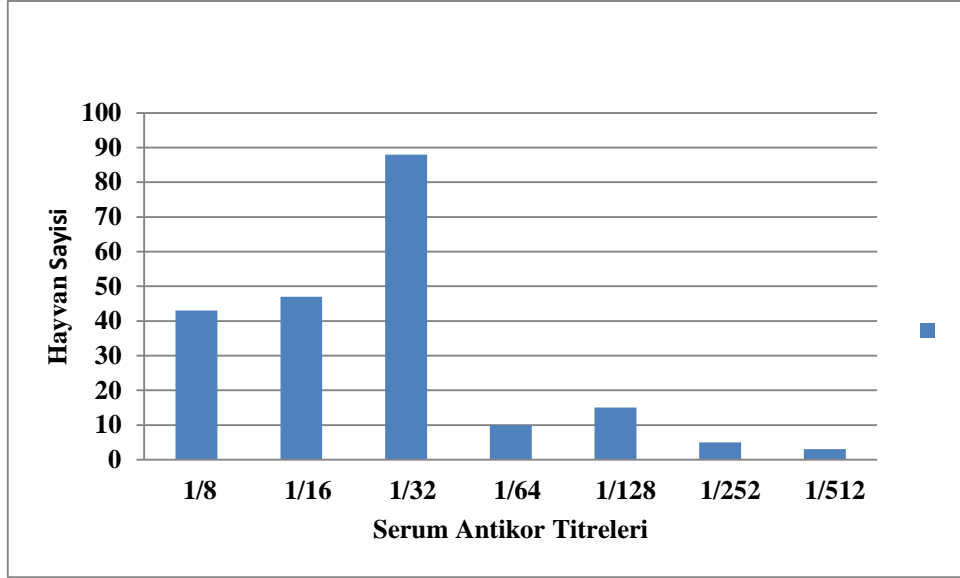
4.3. Seropozitif Numunelerin Antikor Titre Değerleri (SN₅₀)

BVDV antikor pozitif olan hayvanların antikor titre (SN₅₀) değerleri Tablo.4’de detaylı olarak gösterilmiştir. Seropozitif hayvanlarda SN₅₀ değerleri 1/8 ile 1/512 dilüsyon değerleri arasında değişmektedir.

Tablo 4. Pozitif Numunelerin SN₅₀ antikor titre değerlerinin dilüsyonlara ve ilçelere göre dağılımı

Yerleşim	Pozitif Numunelerin SN ₅₀ antikor titre değerleri							Toplam
	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	
Alaçam	13	11	15	1	3	-	-	43
Kavak	7	14	21	3	3		1	49
Ladik	20	17	40	5	9	3	2	96
Terme	3	5	12	1		2	-	23
Toplam	43	47	88	10	15	5	3	211

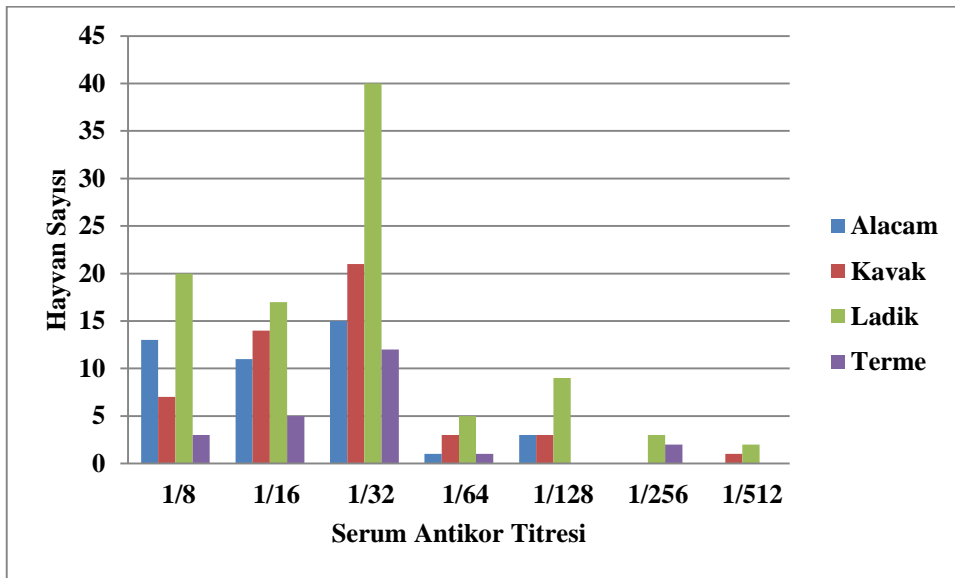
Seropozitif olarak bulunan 211 hayvandan 178 adedinin antikor titre değeri 1/8 ile 1/32 dilüsyon aralığında tespit edilmiştir. 88 adet seropozitif hayvan 1/32 dilüsyon değerinde antikor titresine sahiptir (Şekil 2).



Şekil 2. Pozitif Numunelerin SN₅₀ antikor titre değerlerinin ilçelere göre dağılımı

Seropozitif 33 hayvan 1/64 ile 1/512 dilüsyon değerleri arasında antikor titre değerine sahiptir. Alaçam ilçesinde 1/256 ve 1/512 dilüsyon değerlerinde, Terme ilçesinde 1/128 ve 1/512 dilüsyon değerlerinde ve Kavak ilçesinde d1/256 dilüsyon değerlerinde seropozitif hayvan tespit edilememiştir (Tablo 4 ve Şekil 3).

Ladik ilçesinde dilüsyon değerlerinin tamamında antikor titresine sahip seropozitif hayvanlar tespit edilmiştir.



Şekil 3. Pozitif numunelerin SN₅₀ antikor titre değerlerinin ilçelere göre karşılaştırması

5. TARTIŞMA

Viruslar ve konakçıları milyonlarca yıldır karşılıklı olarak devam eden bir etkileşimi, savaşı sürdürmekte ve evrimsel gelişimlerine bağlı olarak gerek viruslar gerekse konakçı birbirlerine üstünlük sağlayabilmek amacı ile çeşitli stratejiler geliştirmektedir (Johnson, 2010; Gilbert ve Feschotte, 2010; Katzourakis ve Gifford, 2010). Özellikle konakçılar viruslara karşı üstünlük sağlayabilmek için çeşitli mekanizmalar ve sistemler geliştirerek mücadele etmektedir. Akut enfeksiyonlarda bu mekanizmalar ve sistemler sınırlı olsa başarılı olmakta ve virus ile mücadele etmek için konakçıya zaman kazandırmaktadır (Lazaro, 2011). Ancak persiste enfeksiyonlarda ise bu mekanizmalar pek başarılı olamamaktadır. Bu nedenle persiste seyirli viral enfeksiyon ve mücadele yöntemleri viroloji biliminde önemli araştırma sahalarını kaplamaktadır (Lazaro, 2011). Özellikle *flaviviridae* virus ailesinde yer alan, BVDV, BDV ve CSFV gibi önemli virusları içeren *pestivirus* cinsi, persiste enfeksiyonlara model teşkil etmekte başta sığır, koyun, keçi ve domuz gibi evcil ruminant türleri olmak üzere yabani ruminant türlerinde etkilemektedir.

BVDV, tüm dünyada görülen, bir çok ülkede hayvancılık endüstrisinde önemli ekonomik kayıpların nedeni olan ve Hayvan Sağlığı Dünya Organizasyonu'nda (OIE, Office International des Epizooties) uluslararası olarak bildiri öncelikli hastalıklar listesinde yer alan önemli bir patojendir (Misra ve ark., 2009; Delkordi, 2011; Bachofen ve ark., 2013). BVDV'nin yüksek ekonomik etkisine bağlı olarak birçok ülkede BVDV eradikasyon ya da kontrol programları uygulamıştır (Kuhne ve ark., 2005). İskandinavya ülkeleri uzun yıllara yayılan çalışmalar sonrasında BVDV'yi başarılı bir şekilde eradike etmişlerdir (Sarrazin ve ark., 2013). İtalya'nın kuzey bölgesi, bölgesel olarak BVDV eradikasyonunda başarılı olmuştur. Son yıllarda BVDV eradikasyon programları İsviçre ve Avusturya'da devam etmektedir ve Almanya da eradikasyon programlarına başlamıştır (Sarrazin ve ark., 2013).

BVDV'nin en büyük bulaşma kaynağı sürülerde bulunan; virüsü hayat boyu yayan persiste enfekte (PE) hayvanlardır. Endemik enfekte ülkelerde, PE sığır oranları % 0,5 - 2 aralığında bildirilmektedir (Houe, 1999). Geçmişte Türkiye'de BVDV ile PE sığırların tespiti üzerine yapılan araştırmalar bulunmaktadır. Yapılan bu araştırmalarda PE sığır oranları %0,25, %0,07 ve %4,9 olarak tespit edilmiştir (Burgu ve ark., 1999; Burgu ve ark., 2003; Tan ve ark., 2006).

Samsun il sınırlarında gerçekleştirilen araştırmamızda hedef popülasyon olarak küçük aile işletmeleri randomize olarak belirlenmiş ve PE sığırların varlığı araştırılmıştır. Bu amaçla hayvan sayıları 1 ile 12 arasında değişen 119 adet küçük aile işletmesinde toplam 651 sığır BVDV antijeni açısından taranmıştır. Yapılan ilk örneklemede %0,03 (2/651) oranında örnek, antijen pozitif, antikor negatif tespit edilmiştir. Antijen pozitif tespit edilen sığırlardan 28 gün sonra ikinci örnekleme yapılarak BVDV antijenleri yönünden kontrol edilmiştir; BVDV antijeni yönünden negatif, BVDV antikorları yönünden pozitif bulunmuşlardır. Bu hayvanlar ilk örnekleme sırasında BVDV ile akut enfekte ve sonrası şekillenen virus eliminasyonu nedeniyle geçici viremik kabul edildi.

Serolojik çalışmalar, BVDV enfeksiyonunun sürülerde değerlendirilmesinde önemli bir kriter olarak kabul edilmektedir. BVDV'nin seroprevalansı ile ilgili bir çok araştırma bulunmaktadır. Yapılan araştırmalar sonucunda Amerika Birleşik Devletleri, Kanada, Almanya, Kenya, Yeni Zelanda, Avustralya, Kolombiya, İrlanda, Türkiye ve Arjantin'de %50 ile %90 arasında değişen farklı seropozitiflik oranları rapor edilmektedir (Houe ve Meyling, 1991; Obanda ve ark., 1999; Tan ve ark., 2006; Cowley ve ark., 2012). Farklı ülkelerdeki seropozitiflik oranlarındaki çeşitliliğin nedeni, sığırların yaş farklılıkları, sığır yoğunluğu, bakım sistemi, iklim, aşılama, hayvan hareketliliği, biyogüvenlik ve BVDV'nin sürekliliğine bağlı olabilir (Wittum ve ark., 2001). Türkiye'de daha önce yapılan çalışmalarda aşılanmamış sığırlarda BVDV'nin seropozitiflik oranı %62 ile %80 arasında bulunmuştur (Burgu ve ark., 1999; Burgu ve ark., 2003; Tan ve ark., 2006).

Araştırmamızda Samsun il sınırları içinde yer alan ve randomize olarak seçilmiş 119 küçük aile işletmesinde bulunan ve aşı uygulaması yapılmamış 651 sığırda BVDV seroprevalansı araştırılmıştır. Kontrolü yapılan tüm işletmeler BVDV seropozitif hayvan barındırmaktadır ve işletme bazında seropozitiflik oranı %100 (119/119) olarak bulunmuştur. Bu işletmelerde yer alan sığırlarda BVDV seropozitiflik oranı %32,41 (211/651) tespit edilmiştir. Seropozitif olarak tespit edilen hayvanların SN antikor titreleri 1:8 ile 1:512 arasında değişmektedir. BVDV seropozitif hayvanlarda %15,64 (33/211) oranında \geq 1:64 SN antikor titresi bulunmuştur. Seropozitif hayvanlar %84,36 (178/211) oranında 1:8 ile 1:32 arasında dağılan SN antikor titresine sahip oldukları tespit edilmiştir. Düşük oranlarda SN titrelerine sahip olan hayvanlar BVDV

enfeksiyonunu geçirmiş olduğunu, ya da NADL'den farklı BVDV suşu ile enfekte olduğu sonucunu gösterebilir.

Nötralizasyon testi sonucunda Alaçam, Kavak, Ladik ve Terme bölgelerinde sırası ile %25,74, %30,34, %52,17 ve %13,60 oranında seropozitiflik tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre BVDV enfeksiyon oranlarının iç bölgelerde (Kavak ve Ladik) kıyı bölgelerinden (Terme ve Alaçam) daha yüksek olduğunu göstermektedir. BVDV seroprevalansını etkileyen önemli faktörler arasında bölgesel iklim ve coğrafik konum önemli faktör olabilir. Araştırmamızda coğrafik olarak sahil bölgelerinde bulunan Alaçam ve Terme'de seroprevalans düşük tespit edilirken, iç bölgelerde bulunan Ladik ve Kavak'da seroprevalans yüksek tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre BVDV enfeksiyonunun yayılımında coğrafi konum etkili olabilmektedir (Gumusova ve ark., 2006). Ayrıca iklim faktöründe virusun yayılmasında önemli rol olabilir, sıcak iklim koşulları ortamda virüsün viral membran bütünlüğünü ve doğal direncini değiştirerek virüs bulaşmasını azaltacaktır (Gumusova ve ark., 2006).

BVDV enfeksiyonunun prevalansını etkileyen faktörler arasında hayvan hareketliliğinin yoğun olduğu hayvan pazarları, buralarda hayvanlar arasında şekillenen yakın temas ve kontrol edilmeyen ya da edilemeyen hayvan hareketleri önemli rol oynayabilir. Samsun ilinde, kontrolsüz hayvan hareketleri, iç bölgelerde (Kavak ve Ladik) sahil bölgelerinden (Alaçam ve Terme) daha fazladır. Ayrıca Ladik'te Samsun il sınırları içinde yer alan en büyük hayvan pazarlarından birisi yer almaktadır. Buna bağlı olarak hayvan popülasyon yoğunluğu ve kontrolsüz hayvan hareketliliği araştırmamızda yer alan diğer ilçelere göre daha yükündür. Bu durum araştırmamızın sonuçlarında da görülmektedir. İlk örneklemede antijen pozitif tespit edilen hayvanlar, Ladik ilçesinde tespit edilmiştir. Ayrıca Ladik'te tespit edilen %52,17 seropozitiflik oranı Alaçam %25,74, Kavak %30,34 ve Terme %13,60 ilçelerine göre daha yüksektir. Ladik ilçesinde SN antikor titre değeri $\geq 1:64$ olan seropozitif hayvanların oranı %19,79 (19/96) tespit edilmiştir. Diğer bölgelerle karşılaştırıldığında, antikor titreleri $\geq 1:64$ olan hayvanların, seropozitiflik oranları Alaçam, Kavak, ve Terme bölgelerinde sırası ile %9,3, %14,2, ve %13,04 olarak bulunmuştur. Ladik'deki bu yüksek seroprevalansın önemli sebebi, Ladik'in Samsun ilinin en büyük hayvan pazarlarına sahip olması ve hayvan hareketliliğinin diğer bölgelerden daha yoğun olmasıdır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Sonuç olarak, bu araştırmada BVDV ile persiste enfekte sığırların araştırmak için gerekli olan, küçük aile işletmeleri rastgele seçilerek incelenmiştir. Persiste enfeksiyon geçiren sığırlar tespit edilmemesine rağmen, yüksek seroprevalans seviyesi sahip olan çiftlikler tespit edilmesi, BVDV'nin aktif sirkülasyonu devam ettiğini göstermektedir. Hastalığın bulaşma yolları ve duyarlı hayvanlar gibi etkenler enfeksiyonun sirkülasyonunda önemli olduğu için iyi araştırılmalı ve anlaşılmalıdır. Çalışmamızın sonucunda, Samsun'da küçük ölçekli sığır sürülerinde BVDV prevalansı varlığı %32,41 olarak tespit edilmiştir. Bu oran Samsun ilinde Gümüşova ve ark. (2007) tarafından daha önce yapılan bir çalışmanın bulguları (%53,19) ile kıyaslandığında daha düşüktür. Ülkemizde yapılan diğer BVDV çalışmalarına göre, BVDV'nin seroprevalansı %62 ile %80 arasında değişmektedir. Bu oranlar herhangi bir aşılama programı olmayan bir ülke için yüksektir. Ayrıca ülkemizdeki BVDV prevalansı ile ilgili yapılan çeşitli çalışmalar olmasına rağmen Türkiye'de BVDV enfeksiyonun profilini tam olarak ortaya koyan kapsamlı bir araştırmalara ihtiyaç vardır. Bu nedenle :

- 1.Ekonomik etkisi göz önüne alındığında BVDV ve BVDV ile birlikte diğer koyun keçi popülasyonlarında pestivirus varlığı ülke genelinde taranarak genel profili ortaya çıkarılmalıdır.
- 2.Yüksek seroprevalansın her zaman persistans risk ihtimali mevcut olacağından serolojik ve virolojik taramaların düzenli olarak yapılmasına olanak sağlayacak bir kontrol programının geliştirilmesini,
- 3.Geliştirilecek bu kontrol program dahilinde Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı bünyesinde yer alan birimler ile üniversiteler bünyesinde yer alan veteriner fakültelerinin ortak çalışmalarını öneriyoruz.

KAYNAKLAR

- Ahmad A, Rabbani M, Muhammad K, Younus M, Shabbir M Z, Ghaffoor A, Anjum AA, Nazir J, Saleemi MK, Muhammad J, Ali AA, Cepica A. Comparative diagnostic applications of antigen capture ELISA and immunohistochemistry for detection of bovine viral diarrhoea persistent infection. *J Anim Plant Sci.* 2014; 24(4): 1019-25.
- Bachofen C, Vogt HR, Stalder H, Mathys T, Zanoni R, Hilbe M, Schweizer M, Peterhans E. Persistent infections after natural transmission of bovine viral diarrhoea virus from cattle to goats and among goats. *Vet Res.* 2013, 4:32, <http://www.veterinaryresearch.org/content/44/1/32>.
- Baker JC. Bovine viral diarrhoea virus: a review. *J Am Vet Med Assoc.* 1987; 190: 1449-58.
- Baroth M, Orlich M, Thiel HJ, Becher P. Insertion of cellular NEDD8 coding sequences in a pestivirus. *Virology*, 2000; 278: 456-66.
- Barros SC, Ramos F, Pauperio S, Thompson G, Fevereiro M. Phylogenetic analysis of Portuguese bovine viral diarrhoea virus. *Virus Res.* 2006; 118: 192-5.
- Becher P, Thiel HJ, Collins M, Brownlie J, Orlich M. Cellular sequences in pestivirus genomes encoding gamma-aminobutyric acid (A) receptor-associated protein and Golgi-associated ATPase enhancer of 16 kilodaltons. *J Virol.* 2002;76: 13069-76.
- Becher P, Avalos Ramirez R, Orlich M, Cedillo Rosales S, König M, Schweizer M, Stalder H, Schirrmeyer H, Thiel J. Genetic and antigenic characterization of novel pestivirus genotypes: implications for classification. *Virol.* 2003; 311: 96-104.
- Bendfeldt S, Grummer B, Greiser-Wilke I. No caspase activation but overexpression of Bcl-2 in bovine cells infected with noncytopathic bovine virus diarrhoea virus. *Vet Microbiol.* 2003; 96: 313-26.
- Bielefeldt-Ohmann H. The pathologies of bovine viral diarrhoea virus infection. A window on the pathogenesis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 1995; 47-76.
- Bolin S, Moennig V, Kelso Gourley NE, Ridpath J. Monoclonal antibodies with neutralizing activity segregate isolates of bovine viral diarrhoea virus into groups. *Arch Virol.* 1988; 99: 117-23.
- Brock KV, Chase CC. Development of a fetal challenge method for the evaluation of bovine viral diarrhoea virus vaccines. *Vet Microbiol.* 2000; 77: 209-14.
- Brodersen BW. Immunohistochemistry used as a screening method for persistent bovine viral diarrhoea virus infection. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 2004; 20: 85-93.

- Brownlie, J. Pathogenesis of mucosal disease and molecular aspects of bovine virus diarrhoea virus. *Vet Microbiol.* 1990; 23: 371-82.
- Brownlie J, Thompson I, Curwen A. Bovine virus diarrhoea virus – strategic decisions for diagnosis and control. In *Practice.* 2000; 176-187.
- Burgu İ, Alkan F, Yeşilbağ K. Türkiye’de sığırlarda persiste BVD virus enfeksiyonu. *Ankara Univ Vet Fak Derg.* 1999; 169-177.
- Burgu İ, Alkan F, Ozkul A, Yeşilbağ K, Karaoğlu T, Güngör B. Control and epidemiology of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection for dairy herds in Turkey. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi,* 2003; 53: 127-33.
- Carman S, van Dreumel T, Ridpath J, Hazlett M, Alves D, Dubovi E, Tremblay R, Bolin S, Godkin A, Anderson N. Severe acute bovine viral diarrhoea in Ontario, 1993-1995. *J Vet Diagn Invest.* 1998; 10: 27-35.
- Charleston B, Fray MD, Baigent S, Carr BV, Morrison WI. Establishment of persistent infection with non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus in cattle is associated with a failure to induce type I interferon. *J Gen Virol.* 2001; 1893-7.
- Corapi WV, Donis RO, Dubovi EJ. Characterization of a panel of monoclonal antibodies and their use in the study of the antigenic diversity of bovine viral diarrhoea virus. *Am J Vet Res.* 1990; 51: 1388-94.
- Collen T, Douglas AJ, Paton DJ, Zhang G, Morrison WI. Single amino acid differences are sufficient for CD4(+) T-cell recognition of a heterologous virus by cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. *Virology,* 2000; 276: 70- 82.
- Cowley DJ, Clegg TA, Doherty ML, More SJ. Bovine viral diarrhoea virus seroprevalence and vaccination usage in dairy and beef herds in the Republic of Ireland. *Ir vet J.* 2012;65(1):16. doi:10.1186/2046-0481-65-16.
- Donis RO, Corapi WV, Dubovi EJ. Bovine viral diarrhoea virus proteins and their antigenic analyses. *Arch Virol Suppl.* 1991; 3: 29-40.
- Deregt D, Tessaro SV, Baxi MK, Berezowski J, Ellis JA, Wu JT, Gilbert SA. Isolation of bovine viral diarrhoea viruses from bison. *Vet Rec.* 2005; 157: 448-50.
- Delkordi F S. Prevalence study of bovine viral diarrhoea virus by evaluation of antigen capture of ELISA and RT-PCR assay in bovine , Ovine, Caprine Buffalo and Camel aborted fetuses in Iran. *AMB Express.* 2011,1:32, <http://www.amb-express.com/content/1/1/32>.
- Fenner JF. *Fenner's Veterinary Virology,* Fourth Edition, USA, Academic Press, 2011, 467-481.

- Flores EF, Ridpath JF, Weiblen R, Vogel FS, Gil LH. Phylogenetic analysis of Brazilian bovine viral diarrhoea virus type 2 (BVDV-2) isolates: evidence for a subgenotype within BVDV-2. *Virus Res.* 2002; 87: 51-60.
- Fray MD, Paton DJ, Alenius S. The effects of bovine viral diarrhoea virus on cattle reproduction in relation to disease control. *Anim Reprod Sci.* 2000; 615-27.
- Frey HR, Liess B. Vermehrungskinetik und verwendbarkeit einer stark cythopathogenen VD-MD virusstammes für diagnostische untersuchungen mit der Mikrotiter Method. *Zbl. Vet. Med. B.* 1971; 18: 61-71.
- Fritzemeier J, Haas L, Liebler E, Moennig V, Greiser-Wilke I. The development of early vs. late onset mucosal disease is a consequence of two different pathogenic mechanisms. *Arch Virol.* 1997; 1335-50.
- Gilbert C, Feschotte C. genomic fossils calibrate long-term evolution of hepadnaviruses. *PLoS Biol.* 2010; doi: 10.1371/journal.pbio.1000495.
- Goens SD. The evolution of bovine viral diarrhoea: a review. *Can Vet J.* 2002, 43:946-954.
- Graham, D.A. 2001. Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) on cattle farms - disease and control. *Cattle Pract.* 9; 111-118.
- Gümüsova SO, Yazıcı Z, Albayrak H. Pestivirus seroprevalence in sheep populations from inland and coastal zones of Turkey. *Rev Med Vet.* 2006; 12: 595- 598.
- Gümüsova SO, Yazıcı Z, Albayrak H, Çakıroğlu D. Seroprevalence of bovine viral respiratory diseases. *Acta Vet (Beograd).* 2007; 57:11-16.
- Houe H, Meyling A. Prevalence of bovine virus diarrhoea (BVD) in 19 Danish dairy herds and estimation of incidence of infection in early pregnancy. *Prev Vet Med.* 1991; 11:9-16.
- Houe H. Epidemiological features and economical importance of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections. *Vet Microbiol.* 1999; 64: 89-107.
- Houe H. Economic impact of BVDV infection in dairies. *Biologicals,* 2003; 31:137-43.
- <http://www.ictvonline.org/virustaxonomy.asp,2014>
- Johnson WE. Endless forms most viral. *PLoS Genet.* 2010;6(11): e1001210.
- Kalaycıoğlu AT. Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) diversity and vaccination a review. *Vet Q.* 2007; 29(2): 60-67

- Katzourakis A, Gifford RJ. Endogenous viral elements in animal genomes. *PLoS Genet.* 2010; 6(11): e1001191.
- Kuhne S, Schroeder C, Holmquist G, Wolf G, Horner S, Brem G, Ballagi A. Detection of bovine viral diarrhoea virus infected cattle-testing tissue samples derived from ear tagging using an Erns capture ELISA. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 2005; 52: 272-77.
- Kümmerer BM, Tautz N, Becher P, Thiel H, Meyers G. The genetic basis for cytopathogenicity of pestiviruses. *Vet Microbiol.* 2000; 77: 117-28.
- Lanyon SR, Hill FI, Reichel MP, Brownlie J. Bovine viral diarrhoea: Pathogenesis and diagnosis. *Vet J.* 2014; 199: 201-209.
- Lazaro E (2011). RNA viruses, Control, Mutagenesis and Extinction. In: eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester. Doi:10.1002/9780470015902.00023276.
- Liess B, Moennig V. Ruminant pestivirus infection in pigs. *Rev Sci Tech.* 1990; 9: 151-61.
- Meyers G, Thiel HJ. Molecular characterization of pestiviruses. *Adv Virus Res.* 1996; 47: 53-118.
- Misra N, Rajukumar K, Tiwari A, Nema RK, Behera SP, Satav JS, Dubey SC. Prevalence of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) antibodies among sheep and goats in India. *Trop Anim Health Prod.* 2009; 41: 1231-39.
- Moennig V, Liess B. Pathogenesis of intrauterine infections with bovine viral diarrhoea virus. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 1995; 11: 477-87.
- Niskanen R, Lindberg A. Transmission of bovine viral diarrhoea virus by unhygienic vaccination procedures, ambient air, and from contaminated pens. *Vet J.* 2003; 165: 125-30.
- Obanda RC, Hidalgo M, Merza M, Montoya A, Klingeborn B, Moreno-Lopez J. Seroprevalence to bovine virus diarrhoea virus and other viruses of the bovine respiratory complex in Venezuela (Apure State). *Prev Vet Med.* 1999; 41: 271-78.
- Park JS, Moon HJ, Lee BC, Hwang WS, Yoo HS, Kim DY, Park BK. Comparative analysis on the 5'-untranslated region of bovine viral diarrhoea virus isolated in Korea. *Res Vet Sci.* 2004; 76: 157-63.
- Passler T, Walz PH. Bovine viral diarrhoea virus infections in heterologous species. *Anim Health Res Rev.* 2009; 1-15.
- Paton DJ, Sands JJ, Lowings JP, Smith JE, Ibata G, Edwards S. A proposed division of the pestivirus genus using monoclonal antibodies, supported by cross-neutralisation assays and genetic sequencing. *Vet Res.* 1995; 26: 92-109.

- Pellerin C, van den Hurk J, Lecomte J, Tussen P. Identification of a new group of bovine viral diarrhoea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. *Virology*. 1994; 203: 260-8.
- Peterhans E, Jungi TW, Schweizer M. BVDV and innate immunity. *Biologicals*, 2003; 31: 107-12.
- Peterhans E, Bachofen C, Stalder H, Schweizer M. Cytopathic bovine viral diarrhoea viruses (BVDV): emerging pestiviruses doomed to extinction. *Vet Res*. 2010; 41(6):44.
- Pizarro-Lucero J, Celedón MO, Aguilera M, de Calisto A. Molecular characterization of pestiviruses isolated from bovines in Chile. *Vet Microbiol*. 2006;115: 208-17.
- Rebhun WC, French TW, Perdrizet JA, Dubovi EJ, Dill SG, Karcher LF. Thrombocytopenia associated with acute bovine virus diarrhoea infection in cattle. *J Vet Intern Med*. 1989;3: 42-6.
- Reed LJ and Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am J Hyg*. 1938; 23(3): 493-497.
- Reichel MP, Hill FI, Voges H. Does control of bovine viral diarrhoea infection make economic sense? *N Z Vet J*. 2008; 56(2): 60-66.
- Ridpath JF, Bolin SR. Delayed onset postvaccinal mucosal disease as a result of genetic recombination between genotype 1 and genotype 2 BVDV. *Virology*. 1995;212: 259-62.
- Ridpath JF. BVDV genotypes and biotypes: practical implications for diagnosis and control. *Biologicals*, 2003; 31: 127-31.
- Ridpath J. Classification and Molecular Biology. In *Bovine viral diarrhoea virus: diagnosis, management and control*. Ames, Iowa, USA, Blackwell Publishing, 2005, 65-80.
- Sandvik T. Selection and use of laboratory diagnostic assays in BVD control programmes. *Prev Vet Med*. 2005; 72: 3-16.
- Sarrazin S, Veldhuis A, Meroc E, Vangeel I, Laureyns J, Dewulf J, Caij AB, Piepers S, Hooyberghs J, Ribbens S, Van Der Stede Y. Serological and virological BVDV revalence and risk factor analysis for herds to be BVDV seropositive in Belgian cattle herds. *Prev Vet med*. 2013; 108:28-37.
- 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: 3647-52.

- Schweizer M, Matzener P, Pfaffen G, Stalder H, Peterhans E. "Self" and "Nonself" Manipulation of Interferon Defense during Persistent Infection: Bovine Viral Diarrhea Virus Resists Alpha/Beta Interferon without Blocking Antiviral Activity against Unrelated Viruses Replicating in Its Host Cells. *J Virol.* 2006; 80: 6926-35.
- Stahl K, Alenius S. BVDV control and eradication in Europe —an update. *Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers.* 2012; 60: 31-39.
- Stringfellow DA, Riddell KP, Givens MD, Galik PK, Sullivan E, Dykstra CC, Robl J, Kasinathan P. Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in cell lines used for somatic cell cloning. *Theriogenology*, 2005;63: 1004-13.
- Tan MT, Karaoğlu MT, Erol N, Yıldırım Y. Serological and virological investigation of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection in dairy cattle herds in Aydın Province. *Turk J Vet Anim Sci.* 2006; 30: 299-304.
- Tijssen P, Pellerin C, Lecomte J, van den Hurk J. Immunodominant E2 (gp53) sequences of highly virulent bovine viral diarrhoea group II viruses indicate a close resemblance to a subgroup of border disease viruses. *Virol.* 1996; 217: 356-61.
- Vilcek S, Paton DJ, Durkovic B, Strojny L, Ibata G, Moussa A, Loitsch A, Rossmanith W, Vega S, Scicluna MT, Pálfi V. Bovine viral diarrhoea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups. *Arch Virol.* 2001; 146: 99-115.
- Voges H, Horner GW, Rowe S, Wellenberg GJ. Persistent bovine pestivirus infection localized in the testes of an immuno-competent, non-viraemic bull. *Vet Microbiol.* 1998; 61: 165-75.
- Wittum TE, Grotelueschen DM, Brock KV, Kvasnicka WG, Floyd JG, Kelling CL, Odde KG. Persistent bovine viral diarrhoea virus infection in US Beef Herds. *Prev Vet Med.* 2001; 49 (1-2):83-94.
- Yazıcı Z, Serdar MS, Gümüşova S, Albayrak H. Molecular diagnosis and seroepidemiology of pestivirus in sheep. *Veterinarski Arhiv.* 2012; 82: 35-45.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Hakan TÜTÜNCÜ

Doğum Yeri: Sivas

Doğum Tarihi: 09 / 10 / 1977

Medeni Hali: Evli

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl): Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi - 2002

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl: Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı - 2009

E-posta: hakantutuncu@hotmail.com