

**T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VİROLOJİ ANABİLİM DALI**

**KOYUNLARDA PESTİVİRUSLARIN MOLEKÜLER TANISI
VE
SEROEPİDEMİYOLOJİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyolog Murat Serhat SERDAR

**Samsun
Ağustos-2009**

**T.C
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VİROLOJİ ANABİLİM DALI**

**KOYUNLARDA PESTİVİRUSLARIN MOLEKÜLER TANISI
VE
SEROEPİDEMİYOLOJİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyolog Murat Serhat SERDAR

Danışman: Doç.Dr. Zafer YAZICI

**Samsun
Ağustos-2009**

Bu araştırma Projesi Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı, Lisansüstü Tezleri Destekleme Programı tarafından VET 059 numarasıyla desteklenmiştir.

T.C
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Bu çalışma jürimiz tarafından Veteriner **Viroloji Yüksek Lisans Programında** **Yüksek Lisans tezi** olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof.Dr. Tolga Güvenç (Ondokuz Mayıs Üniversitesi)

Üye: Doç.Dr. Zafer YAZICI (Ondokuz Mayıs Üniversitesi)

Üye: Doç.Dr. Semra GÜMÜŞOVA (Ondokuz Mayıs Üniversitesi)

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurul'unca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

Prof.Dr. Süleyman KAPLAN

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerini paylaştan, çalışmamın planlanması ve yürütülmesi süresince yardımlarını esirgemeyen danışmanım sayın **Doç. Dr. Zafer YAZICI**' ya, Viroloji Anabilim dalı öğretim üyesi sayın **Doç. Dr. Semra GÜMÜŞOVA**' ya, tez çalışmamda materyal sağlanmasında ve laboratuvar çalışmalarının yürütülmesinde yardımcı olan **Veteriner Hekim Dr. Harun ALBAYRAK**, **Veteriner Hekim Emre ÖZAN** ve **Veteriner teknikeri Abdullah ÇAVUNT**' a laboratuvar çalışmalarım süresince bana yardımcı olan çalışma arkadaşım ve meslektaşım **Biyolog Sibel ERDUMAN**' a teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmam boyunca beni yalnız bırakmayan, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen canım ailem, arkadaşlarım ve **Selma SEVİNÇ**' e sonsuz destekleri, sabırları ve teşvikleri için ayrıca teşekkür ediyorum.

ÖZET**KOYUNLARDA PESTİVİRUSLARIN MOLEKÜLER TANISI
VE
SEROEPİDEMİYOLOJİSİ****Biyolog Murat Serhat SERDAR****Yüksek Lisans Tezi****Ondokuz Mayıs Üniversitesi, SAMSUN, Ağustos 2009**

Orta ve Doğu Karadeniz bölgesinde yapılan bu araştırmada koyunlarda abortlara, ölü doğumlara ve kongenital defektlere neden olan Border Disease Virus (BDV) virolojik ve serolojik olarak araştırılmıştır.

Bu araştırmada BDV şüpheli, 13 kuzu atığından toplanan 40 organ materyalinde Reverse Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) tekniği kullanılarak BDV varlığı virolojik olarak araştırılmış ve 24 numune (%60) BDV-RNA yönünden pozitif olarak tespit edilmiştir.

Orta ve Doğu Karadeniz bölgesinde yer alan 4 ilde (Samsun, Amasya, Tokat, Giresun) rastgele seçilen 401 koyundan alınan serum örneklerinde BDV, ticari ELISA kitleri kullanılarak serolojik olarak araştırılmıştır. Daha sonra BDV yönünden seropozitif bulunan örnekler serum nötralizasyon testi (SNT) ile Bovine Viral Daire Virus (BVDV) yönünden kontrolü yapılarak her iki virüsün küçük ruminantlarda duyarlılığı tespit edilmiştir.

ELISA testi ile incelenen BDV seropozitifliği %7,22–74,38 oranında tespit edilmiştir. Serum numunelerinin BVDV yönünden yapılan kontrolünde ise seropozitiflik oranı % 4,81–67,76 arasında belirlenmiştir.

Elde edilen veriler, Orta ve Doğu Karadeniz bölgesinde BDV enfeksiyonunun yaygınlığını ve enfeksiyonun yerleşim birimleri bazında bölgedeki coğrafi koşullar (iklim, v.b) ve yetiştirme şekli gibi faktörlere bağlı olarak değişkenlik gösterdiğini ortaya koymuştur. Ayrıca bu çalışma ile RT-PCR testinin BDV enfeksiyonunun tanısında yüksek tanısal değerlilikte olduğu da saptanmıştır.

ABSTRACT**MOLECULAR DIAGNOSIS AND SEROEPIDEMIOLOGY OF PESTIVIRUSES
IN SHEEP****Biologist Murat Serhat SERDAR****M.Sc. Thesis****University of Ondokuz Mayıs Samsun, August 2009**

In this study, virological and serological presence of BDV which causes abortions, dead births and congenital defects in small ruminants has been investigated in Central and Eastern Black Sea Regions, Turkey.

The study material was consisted of forty tissue and organ materials collected from 13 aborted lamb suspected BDV using the reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) technique and 24 samples (60%) have been identified as positive.

Serum samples collected from 401 randomly selected sheep in 4 provinces (Samsun, Amasya, Tokat, Giresun) of Central and Eastern Black Sea region were detected for BDV antibodies using commercial ELISA kits. After serum samples determined positive with ELISA, had been confirmed with Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) using serum neutralisation test (SNT) and investigated to the sensitivity of both viruses in small ruminants. Seropositivity rate were found 7.22% to 74.38% with ELISA and were found between 4.81% to 67.76% with serum neutralisation test. (SNT).

The obtained data, indicated that BDV infection was widespread in the Central and Eastern Black Sea Region. The prevalence of the infection in these regions vary in accordance with the factors such as geographical conditions (climate, etc.,) and the method of breeding. In addition, RT-PCR test offers more reliable results in the diagnosis of BDV infection.

SİMGELER VE KISALTMALAR

| | |
|--------------------------|--------------------------------------|
| ± | artı, eksi |
| ° C | santigrat derece |
| AH | Arthrogriposis - hidranensefali |
| cp | sitopatojen |
| BD | Border disease |
| BDV | Border disease virus |
| BVDV | Bovine viral diarrhoea virus |
| CSFV | Clasical Swine Fever Virus |
| DKID₅₀ | Dökü kültürü enfektif doz |
| DMEM | Dulbecco's Minimal Essenstial Medium |
| dk | Dakika |
| ELISA | Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay |
| FBS | Fötal Bovine Serum |
| kb | Kilobaz |
| M | Molar |

| | |
|---------------|---|
| MD | Mucosal Disease |
| µl | Mikrolitre |
| ml | Mililitre |
| NADL | National Animal Diagnostic Laboratory |
| nep | non-sitopatojen |
| nm | nanometre |
| NS | Non-structurel |
| OD | Optik Dantisite |
| ORF | Open Reading Frame |
| PBS | Phosphate Buffer Solution |
| PI | Persiste Enfekte |
| PI | Percentage Inhibition |
| PLA | Peroksidse Linked Anyibody |
| rpm | Revolution Per Minute(Devir) |
| RT-PCR | Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction |
| S | Structurel |

| | |
|------------|---------------------------|
| SCP | Sheep Choroid Plexus |
| SNT | Serum Nötralizasyon Testi |
| TBE | Tris Buffer EDTA |

İÇİNDEKİLER

| | |
|---|-----|
| KABUL ve ONAY | ii |
| TEŞEKKÜR | iii |
| ÖZET | iv |
| ABSTRACT | v |
| SİMGELER VE KISALTMALAR | vi |
| İÇİNDEKİLER | ix |
| 1.GİRİŞ | 1 |
| 2.GENEL BİLGİLER | 3 |
| 2.1 Etiyoloji | 5 |
| 2.2 Epidemiyoloji | 6 |
| 2.3 Patogenez | 7 |
| 2.4 Klinik Bulgular | 9 |
| 2.5 Teşhis | 12 |
| 2.5.1 Direkt Tanı | 12 |
| 2.5.2 İndirekt Tanı | 13 |
| 2.6 Mücadele | 13 |
| 3.MATERYAL VE METOT | 15 |
| 3.1 Materyal | 15 |
| 3.1.1 Hücre Kültürü | 15 |
| 3.1.2 Virüs | 15 |
| 3.1.3 Dana Serumumu | 15 |
| 3.1.4 ELISA Kiti | 15 |
| 3.1.5 RT-PCR Kiti | 15 |
| 3.1.6 Serum Numuneleri | 16 |
| 3.1.7 RT-PCR için Kullanılan Materyaller | 17 |
| 3.2 Metot | 18 |
| 3.2.1 Kan Serum Örneklerinin Hazırlanması | 18 |
| 3.2.2 RT-PCR için Kullanılan Materyallerin Hazırlanması | 18 |
| 3.2.3 Kompetatif ELISA (C-ELISA) Testi | 18 |

| | |
|--|-----------|
| 3.2.4 Serum Nötralizasyon Testi (SNT) | 21 |
| 3.2.5 RT-PCR | 21 |
| 3.2.5.1 RNA Ekstrasyonu | 21 |
| 3.2.5.2 cDNA Sentezi | 22 |
| 3.2.5.3 PCR Ürün Eldesi | 23 |
| 3.2.5.4 PCR Ürünlerinin Görüntülenmesi | 23 |
| 4.BULGULAR | 25 |
| 4.1 C-ELISA | 25 |
| 4.2 Serum Nötralizasyon Testi | 28 |
| 4.3 RT-PCR | 28 |
| 5.TARTIŞMA | 32 |
| 6.SONUÇ VE ÖNERİLER | 40 |
| KAYNAKLAR | 42 |
| EKLER | 47 |
| ÖZGEÇMİŞ | 48 |

1. GİRİŞ

Pestiviruslar, sığırlarda, koyunlarda, keçilerde ve domuzlarda önemli ekonomik kayıplara neden olan kongenital bozukluklar ile karakterize enfeksiyonlar oluşturmaktadır (Marco ve ark., 2007). Sığırlarda Bovine Virus Diare Virus (BVDV) genotip 1 ve 2, koyun ve keçilerde Border Disease Virus (BDV) , domuzlarda Avrupa Domuz Vebası Virus (Classical Swine Fever Virus-CSFV) bu grupta yer almakta ve yakın olarak antijenik akrabalık göstermektedir (Heinz ve ark., 2000). Bu antijenik akrabalık nedeniyle pestiviruslar hem spesifik oldukları kendi konakçılarında hem de diğer ruminant türlerinde hastalık meydana getirebilmektedir. Ayrıca Pestiviruslar, tam anlamıyla konakçı spesifik olmadıklarından dolayı, sadece evcil ruminantlarda değil, aynı zamanda yaban hayatındaki ruminant türlerinde de enfeksiyon oluşturabilirler.

Sınır hastalığı olarak bilinen BDV enfeksiyonu özellikle gebe koyun ve keçilerde transplental enfeksiyonlar sonucu abortlar, merkezi sinir sistemi bozuklukları ile karakterize konjenital anomaliler, mumifiye fötüs, kısırlık, zayıf veya ölü kuzu doğumları, kıl ve yapağı kalitesinde bozukluklar, yaşama gücü zayıf ve akranlarına göre büyüme-gelişme geriliği gösteren ve enfeksiyonun sürü içinde devamlılığından sorumlu persiste enfekte (Pİ) yavru doğumlarına sebep olmaktadır (Nettleton,1987 ; Thabtı ve ark ., 2002; Marco ve ark., 2006) .

Pestivirusların konakçı spesifitesi göstermemesi nedeniyle izole edilen BDV saha suşları, konakçı spesifitesi ve genetik/antijenik analizleri sonrasında kendi aralarında 4 farklı altgrupta toplanmışlardır:

- BDV-1, koyun ve keçilerden izole edilmiş ve referans viruslar olarak adlandırılan Moredun, X818 gibi gerçek ya da klasik Border Disease Virusları bu grupta yer almaktadır (Becher ve ark., 2003).
- BDV-2, içlerinde ren geyiklerinden izole edilmiş V60 susunun bulunduğu ikinci altgrup olup, aslında daha çok koyunlardan elde edilen virus izolatlarını kapsamaktadır (Becher ve ark., 2003).

- BDV-3 altgrubunda ise, domuzlardan izole edilen Frijters ve Gifhorn izolatları bulunmaktadır (Becher ve ark., 2003).
- BDV-4 İspanya'da bulunan chamois denen bir geyik türünden izole edilen virusler bu altgrupta sınıflandırılmışlardır (Arnal ve ark, 2004).

BDV enfeksiyonu, ilk kez 1959 yılında İngiltere ve Galler arasındaki sınır bölgelerinde bulunan koyunlarda tespit edilmiştir. Koyun ve keçi popülasyonların da özellikle reproduktif sisteme yönelik bulgularla karakterize, postnatal enfeksiyonlarda genellikle subklinik seyreden bir virus enfeksiyonudur. Hastalık, İngilizcede Hairy Shaker Disease veya Fuzzy Lambs Syndrome gibi sinonim isimlerle de anılmaktadır (Hughes ve ark., 1959 ; Bernard ve Bourdin , 1972).

Bu tez çalışmasının amacı, özellikle küçük ruminantlarda, abortlara, ölü doğumlara ve kongenital defektlerin nedeni ve bir pestivirus olan Border Disease Virüs (BDV) varlığını spesifik olarak teşhis etmek, genetik olarak sınıflandırmasını yaparak enfeksiyonun eradikasyon çalışmalarına katkıda bulunmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

Sınır hastalığı, başlıca koyunları ve keçileri etkileyen, bu hayvan türlerinde neden olduğu sistemik ve kongenital bozukluklar ile dünya çapında önemli ekonomik kayıplar neden olan bir enfeksiyondur (Marco ve ark., 2007). Abortlar, kısırılık, zayıf veya ölü kuzu doğumları, tremor, anormal vücut yapısı hastalığın klinik belirtileridir (Thabtı ve ark., 2002; Marco ve ark., 2006).

Enfeksiyona neden olan etken, “*Flaviviridae*” virus ailesinin “*Pestivirus*” cinsine aittir (Becher ve ark., 1996., Marco ve ark., 2006). Pestivirusların konakçı hayvan türüne göre yapılan taksonomisinde; sığırların esas konakçı BVDV ve koyun ve keçilerde enfeksiyon oluşturan BDV yer alır. Bu iki virus, “ruminant pestivirusları” olarak adlandırılmaktadır. Keçilerde ise doğal Sınır Hastalığı enfeksiyonunun varlığı ilk kez Senegal’ de tespit edilmiştir (Bernard ve Bourdin, 1971).

Gebelik sırasında oluşan bir pestivirus enfeksiyonu immun sistemi henüz gelişmemiş olan yavruya transplasental olarak aktarılırsa (koyunlarda gebeliğin 60-80 gününe kadar, keçilerde 80-100. gününe kadar) yavruda immun tolerans gelişir ve hayatları boyu virus rezervuarı olan persiste enfekte (Pİ) yavrular doğabilir (Hewicker ve Trautwein.,1994). Pİ koyunların yaşam süresi maksimum 5 yıl olarak bildirilmiştir. Eğer Pİ enfekte hayvanlar yaşamlarının bir döneminde sitopatojen BDV biyotipi ile karşılaşır, ölümlü sonuçlanan Mukozal Hastalık (*Mucosal Disease-MD*) tablosu gelişir. Mukozal Hastalık, koyunlarda doğal enfeksiyonu takiben bildirilmiş olmasına karşın , keçilerde bildirilmemiştir (Monies ve ark., 2004).

Pestivirüsler’de ekonomik kayıplar esas olarak 3 başlık altında kategorize edilir:

- Fertilité kaybı; gebeliğin tüm aşamalarında reproduktif kayıp ve koçlarda infertilite
- Prodüktivite kaybı ; besi işletmelerindeki koyunlarda ağırlık kaybı ve pnömoni
- Pİ koyunlar ; Pİ koyunların % 50’in 2 yaşına kadar ölmesi (Thiel ve ark.,1996).

Postnatal dönemde kuzu ya da koyunlarda her iki biyotipe ait pestivirus ile oluşan enfeksiyon genellikle subklinik ya da hafif klinik bulgular ile gelişen akut enfeksiyona neden olur. Bu durumda geçici viremi tablosu gözlenir ve etkene spesifik antikor yanıtının gelişmesini takiben virus vücuttan elimine edilir (Nettleton, 1990).

Gebeliğin 80. gününden sonra meydana gelen enfeksiyonlarda fötüs immün yanıt oluşturma yeteneğine sahiptir. İmmün sistemi gelişmiş fetüsün enfeksiyonunda immün yanıt sonucu konakçıdan virusün eliminasyonu şekillenir (Van Oirschot.,1983; Nettleton, 1990).

Son yıllarda BDV enfeksiyonunun küçük ruminant sürülerinde varlığı, yaygınlığı ve izole edilen etkenlerin moleküler karakterizasyonlarına yönelik birçok çalışma bildirilmiştir. Bu çalışmalarda Amerika (Ridpath ve Bolin., 1997), Yeni Zelanda (Vilcek ve ark., 1997), Avustralya (Becher, 1994), İspanya (Hurdato ve ark.,2004) , İtalya (De Mia, 2005), İsviçre (Schaller ve ark.,2000) ve Tunus (Thabti ve ark., 2005) gibi birçok ülkede enfeksiyonun varlığı ve yaygınlığı ortaya konulmuştur.

Türkiye’de pestiviruslerin varlığı ve ruminantlar için enfeksiyon riski oluşturdukları birçok çalışma ile ortaya konulmuştur (Burgu ve ark., 1987; Alkan ve Burgu., 1993; Burgu ve Özkul., 1993; Burgu ve ark., 1997; Yapkiç, 1999). Türkiye’de koyunlarda pestivirus enfeksiyonları ilgili ilk araştırmada, abort yapan koyunlardan sağlanan kan örneklerinde %3, abort olan fötüslerde ise %10 oranında pestivirus varlığı bildirilmiştir (Burgu ve ark., 1987). Yine koyunlarda pestivirus enfeksiyonlarıyla ilgili yapılan bir diğer çalışmada, doğum yaptığı zaman örneklenen 661 koyunun 142 adedinde (% 21,5) pestivirus antikor varlığı saptanmıştır (Burgu ve ark. , 2001).

Ülkemizde küçük ruminantlarda pestivirusların neden olduğu ekonomik kayıpların araştırılması üzerine yapılan çalışmalarda örneklenen sürülerde % 0,06-3 arasında değişen oranlarda etken varlığı tespit edilmiştir (Burgu ve ark., 1987 ; Burgu ve ark.,2001). Doğu ve Güneydoğu Anadolu’da yer alan keçi sürülerinde yapılan seroepidemiolojik bir çalışmada ise BDV için %63.6, BVDV için %30.2 oranlarda seropozitiflik belirlenmiş ve araştırma sonucunda Türkiye’de keçilerde pestivirus

nedenli BDV enfeksiyonunun varlığı serolojik veriler ile ilk kez bildirilmiştir (Ataseven ve ark., 2006).

2.1 Etiyoloji

BDV enfeksiyonuna neden olan etken, "Flaviviridae" ailesinin "Pestivirus" cinsine aittir ve pestivirus cinsinde yer alan diğer viruslar ile (özellikle BVDV) benzer özellikler göstermektedir (Becher ve ark.,1996; Marco ve ark.,2006).

Etken tek iplikçikli, pozitif duyarlı, RNA genomuna sahiptir ve zarf içermektedir. Genom 12500 nükleotitten meydana gelir. Virus, 12.3 kb ölçüsünde ve virion 40-60 nm büyüklüktedir (Thiel ve ark.,1996).

Viral genom yapısal ve yapısal olmayan proteinleri kodlar. Virionlar bir adedi nükleokapsitte olan glikoprotein C, diğerleri zarf üzerinde yer alan glikoprotein E, E1, E2 olmak üzere 4 adet yapısal protein (S) içerir (Thiel ve ark., 1996). Pestiviruslar 7-8 adet yapısal olmayan protein (NS) kodlamaktadır. Bunlardan, NSp7 maturasyondan sorumludur. NSp 2 ve 3 çok fonksiyonlu proteinlerdir ve NSp5 ile birlikte replikasyon döngüsünde rol alırlar. NSp4A, NSp3' ün proteinaz aktivitesine yardımcı olurken, NSp4B' nin fonksiyonu tam bilinmemektedir.

BDV dış ortam koşullarına karşı oldukça duyarlıdır ve konakçı dışında çok uzun süre aktif formda kalamaz. Virus pH 5,7-9,3 arası değerlere stabildir. Çeşitli dezenfektanlar güneş ışığı eter, kloroform ve tripsin ile muamelede ve 56 °C'lik ısıda 20 dakikada inaktive olur (Thiel ve ark.,1996).

Pestiviruslar, doku kültürü hücrelerinde sadece düşük titrelerde gelişir ve hücreden zayıf bir şekilde salınırlar. Salınan virionlar kırılabilir özelliktedir, serum ve hücrelerden orijin alan komponentler ile ilişkilidirler. Virionların zayıf çökme özelliği, onların zor santrifüj edilmesine neden olur. Yinede konsantre edilmiş virionların süspansiyonunda, küresel ve 40-60 nm çapında olan zarf partiküllerine rastlanmıştır. İmmünoelektron mikroskopu, virionun yüzeyinde en azından üçte bir oranında yapısal

glikoproteinlerin lokalize olduğunu göstermiştir. Zarf, heksagonal şekilli olup, yoğun elektron tabakası içerir ve yaklaşık olarak 30 nm çapındadır. Virionlar, endoplazmik retikuluma ait intrasitoplazmik membranda olgunlaşır. Virusun salınması virus içeren membran vezikülleri ile ekzositoz yoluyla olur (Thiel ve ark.,1996).

Pestiviruslar, primer kültürlerde ve kendi geçişli özel konak türlerinde çoğalırlar. Ayrıca farklı türlerden hazırlanan hücre tiplerine de kolayca adapte olurlar. Hayvan türlerindeki enfeksiyon ile kıyaslanırsa pestivirusların, in-vitro konak çeşitliliği daha geniştir. Buna rağmen insan ve rodent hücre kültürleri, pestivirusların replikasyonu için kullanışlı değildir. Ayrıca hücre kültürlerindeki kontaminasyon ya da antikorların varlığı, virusun diagnostik teşhisini zorlaştırmaktadır (Thiel ve ark.,1996).

Pestiviruslar biyotipik olarak iki farklı karakter sergiler. Bunlar; hücre kültüründe morfolojik değişimler oluşturarak üreyen sitopatojen (cytopathogen, cp) biyotip ve herhangi bir değişiklik oluşturmadan üreyen sitopatojen olmayan (noncytopathogen, ncp) biyotiplerdir (Barlow ve ark., 1983; Anderson ve ark ., 1987; Nettleton ., 1990). Sitopatojen olmayan biyotipler, doğada % 95 oranında yaygındır.

2.2 Epidemiyoloji

Virusun enfeksiyon spektrumunda öncelikle koyun, keçi başta olmak üzere, sığırlar yer almaktadır (Thiel ve ark.,1996). Ayrıca virus, vahşi ruminantlar arasında değişik geyik türlerinden de izole edilmiştir (Burgu ve Akça, 2004).

BDV enfeksiyonun doğal bulaşma yolları, enfekte hayvanlarla, kontamine besin ve dışkı, insanlar ve ekipmanlarla kurulan temastır. Ancak BDV'nin en önemli rezervuarları diğer ruminant pestiviruslarında olduğu gibi persiste enfekte (PI) hayvanlardır. Bunların sekret ve eksretleri ile virus uzun süre saçılabilir.

Enfeksiyonun epidemiyolojisinde vertikal nakil oldukça önemli bir rol oynamaktadır. Özellikle koyunlarda fötusun enfeksiyonu sonucunda, virusla persiste enfekte kuzu doğumları oluşabilmektedir ve ömür boyu viremik yavrular dünyaya

gelmektedir. Keçilerde persiste enfekte yavru doğumuna ilişkin bildirim bulunmamaktadır.

Horizontal bulaşmada, BDV ile geçici viremik olan ya da Pİ hayvanların sekret ve ekskretleri ile etkenin nakli söz konusudur. Koyunlarla yakın temasta bulunan sığırlar da bulaşmada rol oynayabilmektedir. Sığır ve koyunlarda türler arasında karşılıklı etken nakli gözlenmesine rağmen, genellikle akut enfekte keçilerden diğer hayvan türlerine enfeksiyonun aktarımı söz konusu olmamaktadır. Bununla birlikte keçiler, Pİ hayvanlarla aynı ortamı paylaşırlarsa, kolaylıkla enfekte olabilmektedirler. (Meyling , 1990; Löken ve ark., 1991).

Genel olarak bulaşma direkt ve indirekt olarak gerçekleşmektedir. Virus gözyaşı, burun akıntısı, gaita, idrar, uterus akıntısı, amniyotik sıvı, placentaya ve sperma ile direkt olarak bulaşmaktadır. İndirect bulaşmada ahır materyali, enfekte yem ve sular rol oynamaktadır.

Diğer bir önemli enfeksiyon kaynağı ise pestiviruslerle kontamine canlı virus aşılardır. Bu aşılarda koyun, sığır ve domuz hücre kültürlerinde ve bu türlerden elde edilen (pestivirusle kontamine olma riski) serum eklenmiş vasatlarda üretilir (Burgu ve Akça, 2004). Tunus’ da pestivirusle kontamine koyun çiçeği aşısı ile aşılama takiben çıkan enfeksiyonun etkeninin Sınır Hastalığı Virusunu (BDV) olduğu bildirilmiştir (Thabti ve ark., 2005).

2.3 Patogenezi

Pestiviruslar, enfeksiyonun patogeneziinde oldukça önemli rolü olan iki biyotipe sahiptirler. Bunlar; hücre kültüründe morfolojik bozukluk oluşturan (sitopatojen-cp) ve hücre kültürlerinde morfolojik bozukluk yapmadan (nonsitopatojen-ncp) çoğalabilen biyotiplerdir. Sitopatojen olmayan biyotipler, doğada %95 oranında yaygındır. Eğer gebelik sırasında oluşan bir pestivirus enfeksiyonu immun sistemi henüz gelişmemiş (immature) olan yavruya transplental olarak aktarılırsa (koyunlarda gebeliğin 60-80.

gününe kadar, keçilerde 80-100. gününe kadar), yavruda immuntolerans gelişir. Persiste enfekte (PI) olarak doğan bu yavrular, ömürleri boyu virus rezervuarı olarak enfeksiyonun devamlılığında sorumludurlar. PI koyunların yaşam süresi maksimum 5 yıl olarak bildirilmiştir (Hewicker-Trautwein, 1994).

Yaşamlarının bir döneminde sitopatojen biyotiple karşılaşan PI hayvanlarda, ölümle sonuçlanan Mukozal Hastalık (Mucosal Disease - MD) tablosu gelişir. Mukozal Hastalık koyunlarda doğal enfeksiyonu takiben bildirilmiş olmasına karşın, keçilerde bildirilmemiştir (Monies ve ark., 2004).

Fötal yaşamın 60-80. günlerinde oluşan enfeksiyon, beyinde geriye dönüşümsüz bir takım değişikliklere neden olmaktadır. Bu değişiklikler, Barlow tarafından “alternatif efekt/alternatif patoloji” olarak tanımlanmıştır. Gebe koyunlarda yapılan deneysel enfeksiyonlarda; gebeliğin 14-31. günlerinde enfekte edilen koyunların fötüslerinde poranşefali, hidranşefali, beyin ve beyincikte nekrozlar ile beyincik hipoplazisi geliştiği tespit edilmiştir. Böyle olgularda virusun; hem kan-beyin hem de kan-beyin-omurilik sıvısı bariyerini aştığı belirlenmiştir. Virusun, tropismusunu mitotik aktivitesi devam eden fötal beyinin endotel hücrelerine gösterdiği; damar duvarlarında nekrozlar, trombozlar veya emboliler gibi bozukluklar meydana getirdiği ifade edilmiştir (Barlow, 1983).

Koyunlarda oro-nazal enfeksiyonu takiben gelişen akut enfeksiyonda erişkin hayvanlarda hafif ateş dışında bir klinik semptom görülmez. Buna karşın plasenta bariyerini aşan etken fötal enfeksiyona neden olur ve gebeliğin dönemine göre fötusta farklı sonuçlara yol açar. Koyun blastosistleri, embriyonun uterusu transplantasyonu öncesinde (16 günlük süreç), pestivirus enfeksiyonuna karşı koyabilecek yapıdadırlar (Evermann ve ark.,1981; Sawyer ve ark.,1991). Embriyo bu pre-implantasyon periyodunda, uterus mukozasına tam anlamıyla tutunmamıştır. Bu dönemde henüz zona pellucida bozulmadığından fötal enfeksiyonun oluşmadığı düşünülmektedir. Koyun fötüslerinde immun sistemin gelişimi yaklaşık 60–80. günler olarak bildirilmiştir. Bu dönem sonunda fötusun immun sistemi, virusu yabancı olarak algılayabilme ve ona karşı immun yanıt geliştirme yeteneği kazanmaktadır. Gebeliğin erken döneminde

henüz fötal immun sistem gelişimini tamamlamadan oluşabilecek enfeksiyonda, virus fötusta persistens (kalıcılık) kazanabilmekte ve bunun sonucu olarak Pİ yavru doğumları oluşabilmektedir (Terpstra,1981., Depner ve ark.,1991).

İmmunkompetens ncesi oluşabilecek transplasental enfeksiyon, embriyonun resorbsiyonu sonucu erken ölümler, corpus luteumun gerilemesi nedeniyle gebelikte östrus başlangıcı, fötusun mumifikasyonu veya ikizlerden birinin rezorbsiyonu, kongenital anomalili yavru doğumları ve normal görünümlü yavru doğumları ile sonuçlanabilmektedir. Transplasental enfeksiyon, kuzu ftuslarında tiroid hipofonksiyonuna neden olabilmekte ve bu etki sebebiyle çeşitli organlarda fonksiyon bozuklukları ortaya çıkabilmektedir (Sawyer, 1992).

İmmun sistemin gelişimini tamamlaması sonrasında oluşan fötal enfeksiyonlar ise, immun yanıt oluşumu ile sonuçlanır. Bu durumda doğan kuzuların prekolostral kan rneklelerinde BDV spesifik antikor varlığı saptanır.

Persiste enfekte kuzuların sitopatojen suşlar ile enfeksiyonunun, sığır ların Mukozal Hastalık enfeksiyonuna benzer bulgulara neden olduğu bildirilmiştir (Monies ve ark., 2004).

2.4 Klinik Bulgular

BDV enfeksiyonlarında semptomlar bireye, yaşa ve gebeliğe göre değişir. Gebe olmayan koyunlarda virusla karşılaştıktan 1-2 gün sonra hafif bir ateş ve orta Őiddette bir lökopeni görülür. Klinik tabloda anoreksi, sulu ishal ve erosiv stomatitis, nasal ve okuler akıntılar dikkati çekmektedir. Genel anlamda bakıldığında koyunlarda BDV enfeksiyonunu  önemli devrede açıklanabilir.

Gebe hayvanlarda enfeksiyon: Gebe koyunlarda nonsitopatojen virusla oluşan transplasental enfeksiyonda gebeliğin dönemine göre değişen etkiler dikkati çeker. Bu dönemde; görülen klinik semptomlar dl tutmama veya erken embriyonik ölümler, rezorbsiyon, abortlar (erken veya geç dönem), zayıf/yaşama gücü düşük yavru

doğumları (ilk yaşam haftasında ölümler), büyüme ve gelişme geriliği gösteren yavru doğumları, yapağı kalitesinde bozukluk gösteren yavru doğumları (Tiroid hipofonksiyonu ve kıl folliküllerinde anormallik sonucu köpek kılı görünümü ya da yağlı yapağı sendromu, yapağıda anormal pigmentasyon sonucu kahve veya siyah renkli tüyler) karakteristik bulgulardandır (Anderson ve ark.,1987; Nettleton,1990; Hewicker-Trautwein, 1994; Walvogel ve ark., 1995).

Enfekte yavrularda sıklıkla karşılaşılan merkezi sinir sistemi bulguları olarak; ataksi/tremor (kuzularda), devamlı diş gıcırdatma, inkoordinasyon (sallantılı yürüyüş), körlük, AH sendromu (arthrogripozis, hidranensefali) beyincik hipoplazisi, beyinde beyaz bölgede perivasküler hücre infiltrasyonu, gliozis, vaskulitis, hipomyeli-nasyon (Miyelinizasyondan sorumlu tiroid hormonlarının salınımına bağlı fosfo diesteraz-CNP enzimlerinin aktivitesinde düşme sonucu oluşur), timusta lenfoid hücre deplesyonu, persiste enfekte yavru doğumları ve Pİ doğan yavruların homolog ya da heterolog suşlarla süper enfeksiyonu/ya da virusun mutasyonu ile gelişen Mukozal Hastalık bulguları (bronkopnömoni ve sindirim kanalında ülserler) gözlenebilmektedir (Hewicker-Trautwein,1994; Monies ve ark., 2004).

Gebe hayvanlarda akut enfeksiyon sırasında BDV, plasentayı geçerek fötusa ulaşır. Koyunlarda gebelik yaklaşık 150 gün sürmektedir. Fötusta immun sistem gebeliğin 64-82. günler arasında gelişmektedir. Gebeliğin 16. gününden önce zigot ya da embriyo, enfeksiyona karşı duyarlı değildir. Uterustaki enfeksiyon, plasenta yangısına yol açar ve keçilerde bu durum fötal ölüm ve abortlarla ilişkilendirilir. Koyunlarda erken transplasental enfeksiyonlar, resorbsiyonla sonuçlanan fötal ölümlere, mumifikasyon, ölü doğum ve abortlara sebep olur. İntrauterin enfeksiyonlarla yaşayan kuzular, hairy shaker gibi çeşitli anomalilikler gösterir. Gebeliğin 50-63. günlerinde yapılan deneysel enfeksiyonlar kuzularda, hairy shaker, zayıf kilolu doğum, ataksi ve tonik-klonik tremor gibi belirtilerin oluşmasına yol açmıştır (Thiel ve ark.,1996).

Fötal Enfeksiyon: Transplasental enfeksiyonların fötusa olan etkisini belirleyen en önemli faktör enfeksiyon sırasında fötusun yaşıdır. Koyun fötusu yaklaşık olarak gebeliğin 60-80. günleri arasında bir antijenik uyarıya yanıt verebilme yeteneği

kazanır. Fötusun bu periyottan önceki, bu periyot boyunca ve sonrasındaki dönemlerdeki enfeksiyonu farklı klinik ve laboratuvar bulgularının oluşumuna neden olur (Anderson ve ark.,1987; Nettleton,1990; Terpstra , 1992). Gebeliğin ilk 60 gününde oluşan enfeksiyonlarda, en olası sonuç virusün replikasyonu sonucu fötusun ölümüdür. Ancak, bu dönemde enfekte olan fötuslardan bazıları ise hayatta kalarak yaşamlarını devam ettirebilirler. İmmun sistem gelişimini henüz tamamlamamış, pestivirus ile enfekte olan bu fötüs, virusü yabancı olarak tanımaz ve dolayısıyla viruse karşı immün toleranttır (Persiste enfekte). Bu nedenle gebeliğin ilk yarısında, özellikle 16-80. günlerde oluşan enfeksiyon, “persiste viremik kuzu” doğumu ile sonuçlanabilir. Bu kuzular sürekli olarak virus saçıcısı olup, sürüde virusün sirkülasyonunda potansiyel kaynaktır (Anderson ve ark.,1987; Nettleton, 1990; Terpstra ,1992). Gebeliğin 80. gününden sonra meydana gelen enfeksiyonlarda fötüs, immün sistem gelişimine bağlı olarak immün yanıt oluşturma yeteneğine sahiptir. İmmün sistemi gelişmiş fötusun enfeksiyonunda immün yanıt konakçıdan virusün eliminasyonu esasına dayanır. Bu dönemde enfekte olan ve daha sonra doğan kuzular virus taşımazlar, ancak kan örneklerinde antikor tespit edilebilir. Gebeliğin 60-80. günlerinde oluşan fötüs enfeksiyonlarında ise sonucu önceden tahmin etmek zordur. Çünkü fötusun immün sisteminin bireysel farklılıklara bağlı olarak bahsedilen tarihlerden önce ya da sonra gelişimi söz konusu olabilir. Bu dönemde enfeksiyon, persiste viremik kuzu doğumları yada serebral kavitasyon ve serebellar displasi'ye neden olan merkezi sinir sisteminde yaygın yangısal lezyonların oluşumu yanı sıra prekolostral kanlarında antikor taşıyan kuzu doğumları ile sonuçlanabilir (Van Oirschot., 1983; Nettleton ., 1990).

Postnatal enfeksiyon: Doğum sonrası dönemde koyunlarda ve kuzularda her iki biyotipe ait pestivirusler ile oluşan enfeksiyonlar genellikle subklinik veya hafif klinik bulgular ile seyreden akut enfeksiyona neden olurlar (Thiel ve Ark.,1996; Nettleton., 1990). Sağlıklı yeni doğanlar veya erişkin koyunlarda, hafif veya subklinik seyirli gelişen enfeksiyonda, yaklaşık 4-11 gün arasında değişen bir viremi döneminin ardından etkene spesifik antikor yanıtının gelişimi ile sonuçlanır ve virus vücuttan elimine edilir (Nettleton, 1990).

Enfekte olan hayvana ait yaş, bakım, virusün suşu, virulensi gibi faktörlere bağlı olarak daha ağır seyirli seyreden enfeksiyonlarda yüksek ateş, uzun süreli lökopeni, anoreksi, konjunktivitis, nasal akıntı, dispne, ishal ve genç hayvanlarda %50 oranına ulaşan ölümler gözlenebilmektedir (Hewicker-Trautwein, 1994).

Gebe keçilerde, abort ve embriyonal ölüm oranı yüksektir. Virus, nekrotik plasentitise yol açmaktadır.

2.5 Teşhis

Enfeksiyonun tanısında klinik bulgular önemlidir. Özellikle sürüde gözlenen değişiklikler (abort, kongenital anomalili yavru doğumu, ölümler, döl tutmama vb.), canlı doğan yavrularda gelişme geriliği ve merkezi sinir sistemi bulguları, yaşama gücü zayıf yavrular ve Mukozal Hastalık benzeri semptomların görülmesi pestivirus enfeksiyonundan şüphe edilmesine yol açabilir. Bununla birlikte enfeksiyonun kesin tanısı laboratuvar yöntemleri ile yapılabilmektedir.

2.5.1 Direkt Tanı:

Bu amaçla virus izolasyonu ve viral nükleik asit tespitini hedefleyen yöntemler kullanılır. Hücre kültüründen virus izolasyonu ve identifikasyonu amacıyla kullanılan immunperoksidaz ve immunfloresan testleri “gold” yöntem olarak bildirilmektedir. Bundan başka özellikle son yıllarda Reverse Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR), enfeksiyonun tanısında duyarlı bir yöntem olarak tanımlanmaktadır (Schaller ve ark., 2000; Valdozo-Gonzales ve ark.,2006). Sığırlardaki pestivirus enfeksiyonlarının (BVDV) tanısına yönelik ticari antijen-ELISA kitleri başarıyla kullanılmasına karşın, koyun ve keçilerde BDV’ ün direkt teşhisi için geliştirilmiş bir ELISA sistemi yoktur. Ayrıca sürülerin değişen büyüklükte oluşu, hayvanların kulak numarasının olmayışı, sürü genelindeki antikor varlığı gibi faktörler, Pİ hayvanların tespitini zorlaştırabilmektedir. Özellikle iki aydan küçük kuzularda, mevcut kolostral antikorlar etken tespitini engelleyebilmektedir (OIE., 2008).

Persiste enfekte koyunların tespitinde nested ve real time RT-PCR tekniklerinin kullanımı hızlı genotiplendirme ve ayırıcı teşhis için avantaj sağlamaktadır (Willoughby ve ark., 2006).

Ayrıca Pİ hayvanların tespiti için; çifleşmeden 60 gün önce bütün hayvanlar serolojik olarak kontrol edilmelidir. Çünkü alınan ilk kan örneklerinde virüs pozitif, antikor negatif olduğu durumlarda 30-60 gün sonra tekrar alınan kan örneklerinin analizi ile enfeksiyonun akut bir enfeksiyonmu, yoksa persiste bir enfeksiyonmu olduğu tespit edilebilir. İkinci alına kan örneğinde virüs pozitif, antikor negatif çikarsa enfeksiyonun persiste bir enfeksiyon olduğuna karar verilir (Burgu ve Akça,2004).

2.5.2 İndirekt Tanı:

Kan serumunda BDV spesifik antikorların tespiti için virus nötralizasyon testi ve ticari ELISA kitleri kullanılmaktadır (OIE., 2008).

2.6 Mücadele

Mücadele; PI hayvanların tespiti ve sürüden uzaklaştırılmasının ardından, gebelik öncesi damızlık hayvanların aşılınması prensibine dayanır.

Koyunların Sınır Hastalığı enfeksiyonunun kontrolünde BVDV enfeksiyonuna benzer olarak Pİ hayvanların tespiti ve sürüden çıkartılması önerilmektedir (OIE., 2008).

Koçlarda persiste enfeksiyonlar az görülmesine rağmen, bu hayvanlar enfeksiyonun naklinde semenleri ile yüksek miktarda virus saçarak önemli rol oynar ve düşük fertilitite oranına neden olurlar. Bu nedenle doğal aşım için kullanılacak olan ya da sperma donörü olan koçlar, BDV yönünden kontrol edilmelidirler. Bu amaçla, kan ve/veya sperma örnekleri kullanılarak virus izolasyonu ya da RT-PCR tekniği uygulanabilir. Bununla birlikte sperma örneklerinin duyarlı hücre kültürlerinde sıklıkla toksik etkiye neden olabildiği hatırdta bulundurulması gereken bir noktadır.

BDV enfeksiyonunun mücadelesinde aşı kullanımı ise, bilindiği kadarıyla Avrupa'da üretilen bir ticari aşı dışında BDV aşılarının bulunmaması ve BVDV aşıları ile aşılanan koyunlarda kısmi bir korunma sağlanabilmesi nedeniyle henüz üzerinde çalışılması gereken bir konudur. Aşılanmanın amacı, gebelik öncesi dişilerin immun kılınması sayesinde transplasental enfeksiyonun önüne geçilebilmesini sağlamaktır. Mücadelede BVDV aşılarının da kullanılabilceği bazı araştırmacılar tarafından önerilmekle beraber, yörede seyreden immun dominant virusun niteliği ile Sınır Hastalığı viruslarının antijenik çeşitliliğinin de hesaba katılması gerekmektedir. Ayrıca, koyun hücreleri veya koyun serumları kullanılarak üretilen ve veteriner sahada kullanılan canlı virus aşılarının, pestivirusun ncp şuşları ile kontaminasyonu nedeniyle enfeksiyon oluşturma riski her zaman vardır (Brun ve ark., 1993; ValdazGonzales ve ark., 2006; Thabti ve ark., 2005).

3. MATERYAL VE METOT

3.1 Materyal

3.1.1 Hücre Kültürü

Araştırmalarda Ondokuz Mayıs Üniversitesi Viroloji Anabilim dalından temin edilen Madin Darby Bovine Kidney (MDBK) hücre kültürü kullanıldı. Hücrelerin üretilmesinde hücre üretme vasatı olarak, %10 oranında fötal serum ve %1 oranında antibiyotik solüsyonu (Biological Industries, Cat. No:03-033-1B, Israel) içeren DMEM (Biological Industries, Cat. No:01-050-1A, Israel) kullanıldı.

3.1.2 Virus

Virolojik çalışmalarda Ondokuz Mayıs Üniversitesi Viroloji Anabilim dalından temin edilen sitopatojen (çp) BVDV/NADL suşu kullanıldı.

3.1.3 Dana Serumu

Virolojik çalışmalarda ve hücrelerin üretilmesinde ticari olarak temin edilen Fetal Bovine Serum (FBS, Biological Industries-cat-04007-1A) kullanıldı.

3.1.4 ELISA Kiti

BDV' e karşı spesifik antikorları tespit etmek amacıyla ticari olarak temin edilen c- ELISA kiti (Pourquer, P00645/03, France) kullanıldı.

3.1.5 RT-PCR Kiti

Çalışmalarda ticari olarak temin edilen cDNA sentez kiti (Biological Industries), Taq polimeraz enzim (Fermentaz), 100 bp DNA ladder (Fermentaz), primerler (İontek)

kullanıldı. RT-PCR tekniği için kullanılan primerlerin dizini ve büyüklükleri Tablo 3,1’de sunuldu.

Testte pozitif referans kontrol olarak daha önce BDV pozitif olarak tespit edilen numune, negatif kontrol olarak da distile su kullanıldı.

Tablo 3.1: Araştırmada kullanılan primer dizinleri

| Primer Dizini | Ürün Büyüklüğü (bp) | Referans |
|--|--------------------------------|--------------------------|
| PBD1 5’- TCG TGG TGA GAT CCC TGA G -3’ | 225 bp | (Vilcek ve Paton , 2000) |
| PBD2 5’- GCA GAG ATT TTT TAT ACT AGC CTA TRC -3’ | 225 bp | (Vilcek ve Paton , 2000) |

3.1.5 Serum Numuneleri

Bu araştırmada serolojik çalışmalar için Orta Karadeniz Bölgesinde yer alan 4 il (Samsun, Amasya, Tokat, Giresun) ve bu illere bağlı ilçelerden toplam 401 koyundan alınan kan serumu örnekleri kullanıldı. Serum örneklerinin dağılımı Tablo 3.2’ de gösterilmiştir.

Tablo 3.2: Serolojik çalışmalar için örneklenen işletmeler

| İL ADI | İLÇE ADI | SERUM SAYISI |
|---------------------|-----------------|---------------------|
| SAMSUN | İNCESU | 83 |
| AMASYA | MERKEZ | 123 |
| TOKAT | MERKEZ | 121 |
| GİRESUN | ŞEBİNKARAHİSAR | 74 |
| GENEL TOPLAM | | 401 |

3.1.6 RT-PCR İçin Kullanılan Materyaller

BDV' den şüphe edilen toplam 13 kuzu atığından sağlanan 12 beyin, 13 akciğer, 13 karaciğer, 2 dalak olmak üzere toplam 40 materyal kullanıldı. Materyallerin sağlandığı odaklara göre materyal sayısı Tablo:3,3'de belirtildi.

Tablo 3.3: Virolojik çalışmalar için örneklenen enfeksiyon odakları ve örnekleme zamanları

| No | Geldiği Yer | Hayvan Türü | Marazi Madde | Örnekleme Zamanı |
|----|-----------------|-------------|---------------------|------------------|
| 1 | SİNOP/ Boyabat | Kuzu | Byn, Kc, Ac | Ocak-2008 |
| 2 | SİNOP/ Merkez | Kuzu | Byn, Kc, Ac | Ocak-2008 |
| 3 | SAMSUN / Merkez | Kuzu | Byn, Kc, Ac, Dlk | Ocak-2008 |
| 4 | AMASYA/ Suluova | Kuzu | Byn, Kc, Ac | Ocak-2008 |
| 5 | AMASYA/Suluova | Kuzu | Byn, Kc, Ac | Ocak-2008 |
| 6 | TRABZON/Merkez | Kuzu | Byn, Kc, Ac | Ocak-2008 |
| 7 | TRABZON/Merkez | Kuzu | Byn, Kc, Ac | Ocak-2008 |
| 8 | RİZE / İyidere | Kuzu | Byn, Kc, Ac | Ocak-2008 |
| 9 | ÇORUM/ Osmancık | Kuzu | Kc, Ac | Ocak-2008 |
| 10 | TOKAT/ Niksar | Kuzu | Byn, Kc, Ac | Şubat-2008 |
| 11 | AMASYA/Hamamözü | Kuzu | Byn, Kc, Ac | Şubat-2008 |
| 12 | SİVAS/ Merkez | Kuzu | Byn, Kc, Ac | Şubat-2008 |
| 13 | SAMSUN/Çarşamba | Kuzu | Byn, Kc, Ac, Dlk | Şubat-2008 |

Ac: Akciğer, **Kc:** Karaciğer, **Dlk:** Dalak, **Byn:** Beyin

3.2 Metot

3.2.1 Kan Serum Örneklerinin Hazırlanması

Tüplere alınan kan örnekleri pıhtılaştıktan sonra, 10 dakika 2000 devirde santrifüj edilerek serumlar ayrılarak stok tüplere aktarıldı ve test yapılincaya kadar -20 °C‘ de saklandı.

3.2.2 RT-PCR için kullanılan materyallerin hazırlanması

RT-PCR amacıyla 13 kuzu atığından alınan 12 beyin, 13 akciğer, 13 karaciğer, 2 dalak toplam 40 izolasyon materyali 1/10 oranında % 1 ‘lik 10 000 IU (İnternational Unit) penisilin / ml, 10 mg streptomisin / ml ve 0.025 mg /ml Amphoteresin içeren PBS içinde doku parçalayıcıda buz içerisinde homojenize edildikten sonra + 4°C ‘ de 3000 rpm de santrifüj edildi. Daha sonra süpernatant steril kabin içerisinde 0,45 µm çaplı enjektör filtreden geçirilerek her bir örnek 2 ml steril hacimli 3 cryo tüpe porsiyonlandı. RT-PCR testi yapılincaya kadar – 80°C ‘ de muhafaza edildi.

3.2.3 Kompetatif ELISA (C-ELISA) Testi

Serum örneklerinde BDV antikorların tespit edilmesi için c-ELISA testinden yararlanıldı. Bu amaçla ticari olarak üretilmiş c-ELISA (Pourquer, P00645/03, France) kiti kullanıldı.

Serum örneklerinde BDV antikorlarını tespit etmek amacı ile p80 antijeni ile kaplanmış 96 kuyucuklu düztabanlı ELISA tabletlerinde her bir kuyucuk, bir serum numunesi için kullanıldı.

- Örneklerin İşlenmesi

Kontroller (Pozitif kontrol ve negatif kontrol) 1/2 oranında sulandırıldı. Sulandırma ELISA kiti içerisinde yer alan “Dilution buffer 9“ ile yapıldı. Her bir kontrol (Pozitif kontrol ve negatif kontrol) için 50 µl “Dilution Buffer 9“ ELISA

tabletlerinde kontrollerin koyulacağı kuyucuklara (A1 ve B1 ve C1) konuldu. A1 kuyucuğuna 50 µl ELISA kitinde bulunan “pozitif kontrol“, B1 ve C1 kuyucuklarına 50 µl ELISA kitinde bulunan “negatif kontrol” konuldu.

Serum örnekleri ELISA kiti içerisinde yer alan “Dilution Buffer 9” ile 1/4 oranında sulandırıldı. ELISA tabletlerinde serum örneklerinin konulacağı kuyucuklar içerisine 75 µl “Dilution Buffer 9“ konuldu. Her kuyucuğa sulandırılmamış serum örneklerinden 25 µl konuldu. ELISA tabletlerindeki her bir kuyucuk bir serum numunesi için kullanıldı.

Tablo 3.4: ELISA tablet tasarımı

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|----------|---|----|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| A | P | 6 | | | | | | | | | | |
| B | N | .. | | | | | | | | | | |
| C | N | .. | | | | | | | | | | |
| D | 1 | | | | | | | | | | | |
| E | 2 | | | | | | | | | | | |
| F | 3 | | | | | | | | | | | |
| G | 4 | | | | | | | | | | | |
| H | 5 | | | | | | | | | | | |

P = Pozitif kontrol

N = Negatif Kontrol

1 = 1. Serum örneği

2 = 2. Serum Örneği

3 =

- Örneklerin İnkübasyonu

Kontroller (pozitif kontrol ve negatif kontrol) ve serum örnekleri ELISA tabletlerindeki kuyucuklara konulduktan sonra kuyucuklarda içerikleri homojenleştirmek için tabletleri hafifçe çalkalandı. Daha sonra tabletler bantla örtüldü ve bir gece + 5 °C ‘ de (± 3°C) inkübasyona bırakıldı.

- Yıkama

İnkübasyon periyodunun sonunda; ELISA kiti içerisinde yer alan konsantre (X 20) solüsyon distile su ile sulandırılarak yıkama solüsyonu olarak hazırlandı. Manüel metotla tabletlerdeki içerikleri boşaltıldı. Yıkama solüsyonu ile 3 defa yıkandı ve kurulandı.

- Konjugat

Monoklonal anti-P80 / Peroksidaz konjugat olarak kullanıldı. Konjugatı ELISA Kiti içerisinde yer alan ' Dilüsyon Buffer 1' ile 1/100 oranında sulandırıldı. Bu işlem ışıkla temasın az olması ve konjugatın özelliğini kaybetmemesi amacı ile inkübasyon periyodunun bitimine yakın bir zamanda yapıldı. ELISA tabletlerindeki her bir kuyucuğa sulandırılmış konjugattan 100 µl konuldu ve tabletlerin üzeri steril kuyu bantları ile kapatılarak ve 30 dk (± 5 dk) oda ısısında inkübasyona bırakıldı.

- Yıkama

Manüel metotla ELISA tabletlerindeki içerikler boşaltıldı. Yıkama solüsyonu ile 3 defa yıkandı ve kurulandı.

- Substrat ve ortaya Çıkarma

Substrat olarak Tetra Metil Benzidin kullanıldı. ELISA tabletlerindeki kuyucukların her birine 100 µl substrat konuldu. Tabletler 20 dk 21 °C'de inkübasyona bırakıldı ve her kuyucuğa 100 µl durdurma solüsyonu (H₂ SO₄) ilave edilerek reaksiyon durduruldu.

- Okuma

ELISA test tabletlerinin OD değerleri 450 nm' de ELISA okuyucu da saptandı. Test serumlarının Percentage inhibition (PI) değerleri negatif kontrolle karşılaştırarak hesaplandı. PI değerlerinin saptanmasında aşağıdaki formül kullanıldı.

$$P_1 = (450 \text{ nm'de örneklerin OD değeri} / 450 \text{ nm'de negatif kontrol OD değeri}) \times 100$$

PI \geq % 50 olan örnekler negatif , % 40 ile % 50 arasında olan örnekler şüpheli, PI \leq % 40 olan örnekler pozitif olarak değerlendirildi.

3.2.4 Serum Nötralizasyon Testi (SNT)

Bu test kan serumunda BVDV spesifik antikorların tespiti amacıyla Frey ve Liess (1971) tarafından bildirilen mikronötralizasyon yöntemine göre yapıldı. Kan serumu örneklerinin her biri için 96 gözlü mikronötralizasyon tablası (Greiner, Germany) üzerinde iki kuyucuk seçildi. Antikor araması yapılan serumlar 1/5 oranında sulandırıldı. Bu amaçla serum örnekleri için seçilen kuyucukların hepsine öncelikle 40 μ l vasat konuldu. Daha sonra her bir kuyucuğa serum numunlerinden 10 μ l eklendi. Tüm gözlere titresi oranında sulandırılmış (100 DIKD₅₀) BVDV' in NADL suşundan 50 μ l konulup, 37 °C'de 1 saat etüvde (Nüve, Türkiye) inkubasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda tüm gözlere otomatik dispanser (Eppendorf, Germany) 300 000 hücre/ml olacak şekilde sulandırılmış MDBK hücre süspansiyonundan 50 μ l ilave edildi. Mikronötralizasyon tablalarının üzeri steril bantla kapatılarak 37 °C lik etüve kaldırıldı. Her gün invert mikroskop (Kruss, Germany) ile CPE yönünden değerlendirilip antikor taşıyan ve taşımayan serum örnekleri belirlendi.

3.2.5 RT-PCR

BDV şüpheli odaklarda, ölen hayvanların nekropsi materyallerinde BDV'e ait nükleik asitlerin saptanması amacıyla RT- PCR tekniğinden yararlanıldı.

3.2.5.1 RNA Ekstrasyonu

Bu amaçla Chomczynski ve Sacchi, (1987) tarafından bildirilen yöntem kullanıldı. Öncelikle -80°C'de tüpler içerisinde saklanan örnekler, derin dondurucudan çıkarılarak 37 °C' de çözüldü. Örneklerden 400 μ l alındı ve buz içinde bulunan 1,5 ml hacimli kapaklı mikro santrifüj tüplerine konuldu. Üzerine eşit hacimde (400 μ l) denatürasyon solüsyonu konuldu ve 10–15 saniye vorteks ile karıştırıldı. Daha sonra mikro santrifüj tüpleri buz içerisine konuldu ve tüp içerisindeki karışımın üzerine

sırasıyla 300 µl asit fenol (su ile equilibre edilmiş), 300 µl kloroform/izoamilalkol (49:1) ve 100 µl 3 M sodyum asetat (pH 4,2) konuldu ve 10–15 saniye vorteks ile karıştırıldı.

Karışım 8000–10000 devirde mikro santrifuj (Sigma, USA) kullanılarak santrifuj edildi. Santrifuj sonrası, tüpünün üstündeki fazdan 700 µl alındı ve buz içindeki yeni tüplere konuldu. Üzerine 700 µl izopropil alkol (-20°C’de soğutulmuş) ilave edildi ve vorteks ile karıştırıldı. Karışım nükleik asitlerin presipitasyonu için - 80°C ‘ de 1 saat bekletildi. Süre sonunda karışım oda ısısında çözülmesi için bekletildi ve karışım 12000 devirde 10 dk santrifuj edildi. Santrifuj tüpünün üst kısmında kalan etanol vakum pompası ile aspire edildi. Dip kısımda kalan pellet 37 °C ‘de kurutuldu. Steril distile su ile sulandırılan pellet cDNA elde etmek için kalıp olarak kullanıldı.

3.2.5.2 cDNA Sentezi

Ekstrasyonu yapılan RNA’ lar içerisinde Random Hexamer ve Reverse-Transkriptase enzimi bulunduran First stranded cDNA sentez kiti (Biological Industries, 2007) üretice firma protokolüne göre kullanıldı. Tüm reaksiyon bileşenleri çözüldü ve vorteks ile karıştırılarak buz aküsü içerisine yerleştirildi. Buz üzerindeki PCR mikro santrifuj tüplerinin içerisine 3 µl steril dionize su, 0,5 µl Random Hexamer Primer ve 3 µl RNA konuldu ve karışım vortekslendikten sonra kısa bir süre santrifuj edildi. Tüpler termal cyclere yerleştirilerek + 70 ° C de 10 dk inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon sonunda, tüpler hemen buz aküsüne yerleştirilerek soğuması sağlandı. Her tüpün üzerine 8 µl Reaction Mix (2,5 X) ve 2 µl DTT (100mM) eklendi. Tüpler tekrar thermal cyclere (THERMO) yerleştirilerek 25 C ° ‘de 10 dk, 42’ C ° ‘ de 60 dk ve 70 C ° ‘de 10 dk’dan oluşan program süresince inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda cDNA elde edildi.

3.2.5.3 PCR Ürün Eldesi

PCR ürünü elde etmek için, 0,2 ml hacimli PCR tüpleri içerisine aşağıdaki karışım hazırlandı.

| | | |
|------------------------|-------|----|
| Taq DNA Polymerase | 0,25 | µl |
| 10 X Reaksiyon Buffer | 3 | µl |
| 25nM MgCl ₂ | 2,4 | µl |
| 10 mM dNTP Mix | 0,5 | µl |
| Primer 1 | 0,5 | µl |
| Primer 2 | 0,5 | µl |
| Distile Su | 19,85 | µl |
| cDNA | 3 | µl |
| Toplam | 27,0 | µl |

Hazırlanan karışım üzerine 3 µl cDNA ilave edilerek, thermal cyclerde 94 C ° 'de 6 dk'ı takiben, 62 C °de 1 dk, 72 C °de 2 dk, 94 C °de 1 dk süren program 40 defa tekrarlandıktan sonra 50 C °de 1 dk, 72 C °de 10 dk süren programlarda inkubasyona bırakıldı.

3.2.5.4 PCR Ürünlerinin Görüntülenmesi

PCR ürünlerini görüntülemek için agoroz jel kullanıldı. Agoroz %1 yoğunlukta olacak şekilde 0,5 TBE (Tris Borat EDTA) ile erlenmayer içerisinde sulandırıldı ve mikrodalga fırında eritildi. Mikrodalga fırından çıkan agoroz 60°C'ye kadar soğutuldu. Bu arada jel taşıyıcısına taraklar takılarak hazır hale getirildi. Soğutulmuş olan agorozun üzerine 5µl ethidium bromide (500µg/m-Sigma) eklendi ve tarakları takılı olan jel taşıyıcısı üzerine döküldü. Agorozun donması 30 dk beklendi.

Jel donduktan sonra taraklar çıkartıldı jel taşıyıcısı ile birlikte elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforez tankına, jelin üzerinde 2–3 mm yüksekliğe ulaşana kadar 0,5 TBE buffer ilave edildi. Jeldeki ilk göze 1 µl DNA merdiveni konuldu. Diğer

gözlere 5 µl PCR ürünü 1µl boya ile karıştırılarak ilave edildi. Daha sonra güç kaynağından elektrik akımı uygulandı. Elektroforez 40–50 dk arası çalıştırıldı.

Jel, süre sonunda UV transmilatöre nakledildi ve DNA merdiveni paralelinde 225 bp ürün yönünden incelendi.

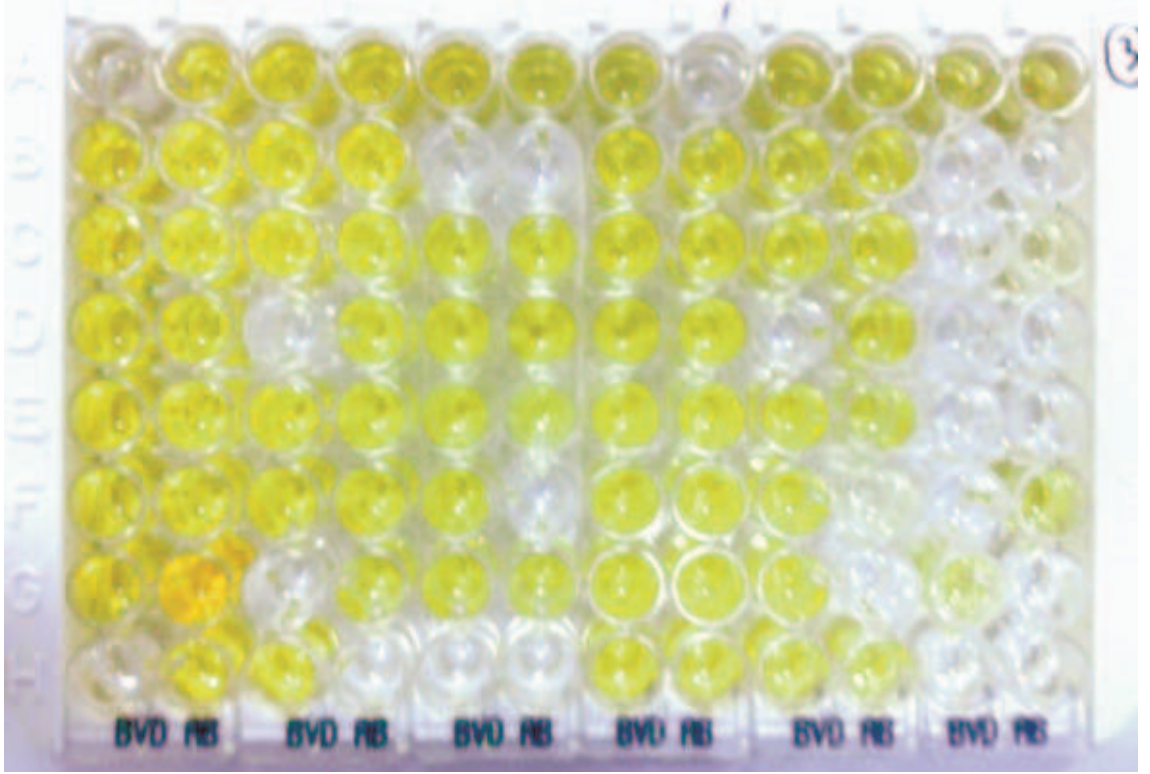
4. BULGULAR

4.1 C-ELISA

Orta ve Doğu Karadeniz bölgesinde yer alan 4 ilde (Samsun, Amasya, Tokat, Giresun) rastgele seçilen 401 koyundan alınan kan serum örneklerinde BDV-ELISA yöntemi ile BDV antikoru saptanmaya çalışıldı. BDV-ELISA sonucunda, 401 koyundan alınan kan serum örneklerinden 193 serum örneğinde (%48,12) BDV antikoru saptandı. Materyal sağlanan illerin hepsinde BDV enfeksiyonu serolojik olarak belirlendi. Bu illerde seropozitiflik oranı %7,22–74,38 arasında saptandı (Tablo: 4.1).

Tablo4.1: İllere göre BDV-ELISA sonuçları

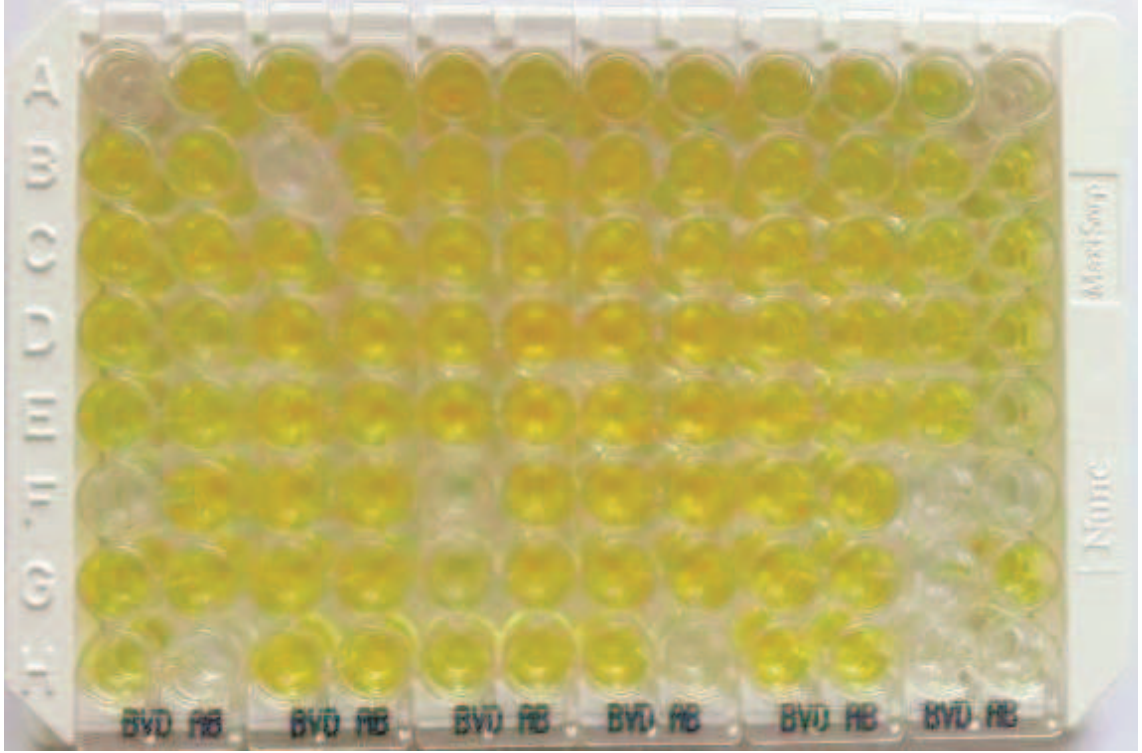
| İL ADI | Serum Sayısı | (+) Serum Sayısı | Prevalansı |
|---------|--------------|------------------|------------|
| SAMSUN | 83 | 11 | % 7,22 |
| TOKAT | 121 | 90 | % 74,38 |
| AMASYA | 123 | 86 | % 69,91 |
| GİRESUN | 74 | 11 | % 14,86 |
| TOPLAM | 401 | 193 | % 48,12 |



Şekil 4,1: ELISA uygulanan serum örneklerinde BDV antikor pozitif sonuçlarının pleyt üzerinde görünümü

A1: Negatif kontrol

B1 ve C1: Pozitif kontrol



Şekil 4,2: ELISA uygulanan serum örneklerinde BDV antikor pozitif sonuçlarının pleyt üzerinde görünümü

A1: Negatif kontrol

B1 ve C1: Pozitif kontrol

4.2 Serum Nötralizasyon Testi

Orta ve Doğu Karadeniz bölgesinde yer alan 4 ilde (Samsun, Amasya, Tokat, Giresun) rastgele seçilen 401 koyundan alınan kan serum örneklerinde Serum Nötralizasyon Testi ile BVDV antikoru saptanmaya çalışıldı. Serum Nötralizasyon testi sonucunda 401 koyundan alınan kan serum örneklerinden 172 serum örneğinde (%42,89) BVDV antikoru saptandı. Materyal sağlanan İllerin hepsinde BVDV enfeksiyonu serolojik olarak belirlendi. Bu illerde seropozitiflik oranı % 4,81–67,76 arasında gözlemlendi.

Tablo 4.2: İllere göre Serum nötralizasyon testi sonuçları

| İL ADI | Serum Sayısı | (+) Serum Sayısı | Prevalansı |
|---------|--------------|------------------|------------|
| SAMSUN | 83 | 4 | % 4,81 |
| TOKAT | 121 | 82 | % 67,76 |
| AMASYA | 123 | 78 | % 63,41 |
| GİRESUN | 74 | 8 | % 10,81 |
| TOPLAM | 401 | 172 | % 42,89 |

4.3 RT-PCR

BDV şüpheli 13 atık kuzudan elde edilen 40 izolasyon materyalinin (12 beyin, 13 akciğer, 13 karaciğer, 2 dalak) 24'ünde BDV nükleik asiti tespit edildi. Test sonuçlarına göre izolasyon materyalleri değerlendirildiğinde %60 ' 1 (24 / 40) pozitif olduğu saptandı (Tablo:4.3). RT- PCR sonucuna ait jel görüntüsü şekil 4.3'de gösterildi.



Şekil 4.3: RT- PCR sonucuna ait jel görüntüsü

M: 100 bp DNA merdiveni

1: Pozitif kontrol;

2, 3, 4, 5, 6, 7: Pozitif saha örneği

8: Negatif kontrol

Tablo 4.3: RT- PCR sonuçları

| Atık No | Akc | Kc | Byn | Dlk |
|---------------------|--------------|-------------|-------------|------------|
| 1 | + | + | - | |
| 2 | + | + | + | |
| 3 | + | - | + | - |
| 4 | + | - | + | |
| 5 | - | - | + | |
| 6 | + | + | + | |
| 7 | - | + | + | |
| 8 | + | + | + | |
| 9 | + | + | | |
| 10 | + | + | + | |
| 11 | - | + | - | |
| 12 | - | - | - | |
| 13 | - | - | - | - |
| Toplam | 8/13 | 8/13 | 8/12 | 0/2 |
| Genel Toplam | 24/40 | | | |

Ac: Akciğer, **Kc:** Karaciğer, **Byn:** Beyin, **Dlk:** Dalak

RT- PCR sonuçlarına göre atık hayvanlardan elde edilen akciğer örneklerinde % 61,53 (8/13), karaciğer örneklerinde %61,53 (8/13), beyin örneklerinde %61,53 (8/13) nükleik asit pozitifliği saptandı. Dalak örneklerinin tamamı negatif olarak tespit edildi. Test materyallerinin türüne göre RT-PCR sonuçları Tablo 4.4'de gösterilmiştir.

Tablo 4.4: Materyal türüne göre RT-PCR sonuçları

| Materyaller | Adet | (+) Sayısı | Pozitiflik Oranı |
|--------------------|-------------|-------------------|-------------------------|
| Akciğer | 13 | 8 | %61,53 |
| Karaciğer | 13 | 8 | %61,53 |
| Beyin | 12 | 8 | %66,66 |
| Dalak | 2 | 0 | % 0 |

5. TARTIŞMA

Orta Karadeniz bölgesinde özellikle gebe koyunların transplasental enfeksiyonu sonucunda abortlar, ölü doğum, mumifiye olmuş fötüs, büyüme geriliği, merkezi sinir sistemi bozuklukları ile karakterize defektleri içeren kongenital anomalili ve kör kuzu doğumlarına rastlanmaktadır. Bu tür olaylarda ilk olarak bakteriyel veya protozoer nedenler çağrışım yapmaktadır. Ancak bu tür semptomlara neden olan çok önemli viral etkenler vardır. Bu etkenler arasında en önemli yeri bir pestivirus olan Border Disease Virus (BDV) tutmaktadır.

Bu araştırma, iki aşamalı olarak planlanmıştır. Birinci aşamada BVD enfeksiyonu benzeri klinik semptomları gösteren koyunlardan materyal toplanarak enfeksiyonun RT-PCR yöntemiyle moleküler tanısı, ikinci aşamada ise bölgesel ağırlıklı olmak üzere BDV enfeksiyonunun seroprevalansı iki önemli yöntem (ELISA ve SNT) kullanılarak ortaya konması hedeflenmiştir.

Birinci aşamada 13 atık kuzundan 40 adet organ materyali (13 akciğer, 2 dalak, 13 karaciğer ve 12 beyin) kullanılmıştır. Bu organ materyalleri daha önce birçok araştırmacı tarafından kullanılmış ve uygunluğu bildirilmiştir (Vilcek ve ark., 1997; Becher ve ark., 2003; Willoughby ve ark., 2006; Dubois ve ark., 2008). Araştırmamızda uygulanan RT-PCR testi sonucundan toplanan 40 materyalden 24 (%60) adedinde BDV-RNA identifiye edilmiştir. Bu veri BDV enfeksiyonunun tanısında RT-PCR testinin duyarlı olduğu bildirilen birçok çalışma ile paralellik göstermiştir (Vilcek ve ark., 2000; Willoughby ve ark., 2006; Oguzoglu ve ark., 2009).

BDV enfeksiyonunun tanısında kan, doku ve organ örnekleri gibi farklı materyaller kullanılabilir. Enfekte hayvanlardan alınan bu materyallerde virus/viral nükleik asit saptanması ile ilgili birçok araştırma bulunmaktadır. Dubois ve ark.(2008) yapmış oldukları çalışmada RT-PCR testi ile 32 klinik materyalin 23 (%71.87) adedinde BDV nükleik asiti tespit etmişlerdir. Bu tekniği kullanarak test edilen örneklerde BDV-RNA pozitifliği, dalakta %58,3 (7/12) , akciğerde %50 (1/2) , karaciğerde %100 (1/1) , bağırsakta %100 (1/1), kan örneklerinde %81 (13/16)

oranındadır. Araştırmamızda elde edilen sonuçlara göre, ise şüpheli 13 kuzu atıktan elde edilen 40 organ materyalinin 24 (%60) adedinde BDV RNA tespit edilmiştir. Test edine organ materyallerinde BDV RNA pozitifliği akciğer örneklerinde % 61,53'ü (8/13) , karaciğer örneklerinde % 61,53'ü (8/13) , beyin örneklerinde %61,53'ü (8/13) olarak tespit edilirken dalak örneklerinin tamamı negatif olarak tespit edilmiştir. Willoughby ve ark., (2006), İngiltere'de çiftliklerde bulunan koyunlardan sağladıkları toplam 50 materyal (plazma , serum , doku örnekleri) kullandıkları çalışmada, RT-PCR testiyle koyun izolatlarının büyük kısmında BDV, BVDV-1 nükleik asiti tespit etmişlerdir. Kullanmış oldukları 50 materyalin 28'inde (%56) BDV-RNA, 5'inde (%10) BVDV- RNA tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Dubois ve ark (2008) , Willoughby ve ark.(2006) araştırmamızdan farklı olarak dalak'ta BDV RNA pozitifliği tespit etmişlerdir. İki araştırmacı grubunun Akciğer ve karaciğer örneklerinde elde ettikleri pozitiflik oranları araştırmamızda elde edilen verilere yakın değerlerdedir.

Oğuzoğlu ve ark.(2009) bir keçi ve bir koyundan elde edilen pestivirus izolatlarında, BDV karakterizasyonu yapmış ve sınıflandırmıştır. Türkiye'de küçük ruminantlarda BDV enfeksiyonunun kısmi karakterizasyonu ve varlığı ilk olarak bu araştırma ile saptanmıştır. Araştırmacı ve ekibi, antijen c-ELISA testi yardımıyla pestivirus yönünden pozitif olduğu tespit edilen lökosit/serum örneklerini, PLA testi ile pozitif olduğunu tespit ettikleri hücre kültür pasaj sıvılarını ve organ numunelerini pestivirus izolatı olarak kullanmışlardır. ELISA testi ile BDV pozitif olarak tespit etmiş oldukları altı izolatı panpesti generik primerlerini kullanarak RT-PCR testine tabi tutmuşlar ve pestiviruslar için spesifik olan 288bp büyüklüğündeki DNA ürünleri elde etmişlerdir. Daha sonra iki BDV izolatını (BDV/Aydın/04/ncp ve BDV/Burdur/05/cp) BDV, spesifik primerleriyle ve ayırıcı teşhis amacıyla BVDV-2 için spesifik primerler ile RT-PCR reaksiyonuna tabi tutmuşlardır. Testin sonucunda BDV primerler ile BDV için spesifik olan 225 bp DNA ürünleri lede edilirken BVDV-2 primerleri ile uygun ürünler elde edilmemiştir. Araştırmamızda da organ numunelerinden elde ettiğimiz homojenatları BDV spesifik primerleri ile RT-PCR reaksiyonuna tabi tuttuk ve 13 atık kuzudan elde edilen 40 izolasyon materyalinin 24'ünde 225 bp büyüklüğündeki DNA ürünlerini tespit ettik. Bu sonuçlara göre çalışmamız, Oğuzoğlu ve ark. (2009) yapmış

oldukları çalışmada BDV'e spesifik primerlerle elde ettikleri 225bp büyüklüğündeki DNA ürünleri bakımından paralellik göstermektedir.

Garcia-Perez ve ark. (2009) yapmış oldukları çalışmada ELISA testi ile kan ve fötal sıvılarda; RT-PCR testi ile dokularda, BDV enfeksiyonunun varlığını araştırmışlardır. Araştırmacılar, abort, fötüs, ölü doğum görülen şüpheli sürülerde bulunan kuzulardan elde ettikleri materyallerde ve deneysel olarak kendilerinin enfekte ettikleri kuzulardan sağladıkları materyallerde RT-PCR yöntemiyle BDV varlığını araştırmışlardır. Elde edilen RT-PCR sonuçlarına göre fötüslarda %7,9, ölü doğanlarda %50 sürülerdeki kuzularda %50 oranında BDV RNA identifiye tespit etmişlerdir. Deneysel enfeksiyon sonucu ölü doğan kuzulardaki doku örneklerinde %54,5 oranında pozitiflik tespit etmişlerdir ve doğal enfekte ölü doğan kuzulardaki doku örneklerinde tespit ettikleri RT-PCR testi sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir. Doku örneklerinden lenf nodülü, tiroid bezi ve böbrekte daha yüksek oranda pozitiflik tespit etmişlerdir. Çalışmamızda elde edilen sonuçlara göre BDV şüpheli 13 kuzu atıktan BDV nükleik asiti tespit edilmiş ve test sonuçlarına göre izolasyon materyalleri değerlendirildiğinde %60 oranında pozitif olduğu saptanmıştır. Araştırmamızda elde edilen sonuçlar, Garcia-Perez ve ark. RT-PCR testiyle akciğer karaciğer ve beyinde elde ettiği sonuçlarla benzerlik göstermektedir. Garcia-Perez ve ark. ayrıca lenf nodülü, tiroit bezi ve böbrek de daha yüksek oranda pozitiflik tespit etmişlerdir.

Araştırmamızın ikinci aşamasında Orta Karadeniz bölgesinde koyunlarda BDV seroprevalansı iki önemli teşhis metodu ile araştırılmıştır. Bu amaçla Orta Karadeniz bölgesinde yer alan 4 ilde (Samsun, Amasya, Tokat, Giresun), rastgele seçilen 401 koyundan alınan kan serum örneklerinde ticari kompetatif ELISA (c-ELISA) yöntemi ile BDV seroprevalansı araştırılmıştır. ELISA testi sonucunda, 401 koyundan alınan kan serum örneklerinin 193 adedinde BDV'e spesifik antikor tespit edilmiş ve seropozitiflik oranı %48,12 olarak belirlenmiştir. Materyal toplanan illerin hepsinde BDV enfeksiyonu serolojik olarak teşhis edilmiştir. Aynı kan serumlarında BVDV/NADL şusu kullanılarak SNT ile pestivirus taraması yapılmış ve %42,89 (172/401) oranında seropozitiflik göstermiştir. Bu verilerin ışığında c-ELISA testinin SNT'den daha duyarlı bir test olduğunu göstermektedir.

Son yıllarda, koyunlarda pestivirus enfeksiyonları üzerine bir çok serolojik araştırma yapılmış ve çeşitli ülkelerde bir pestivirus olan BDV nin varlığı bildirilmiştir. Yapılan bu serolojik çalışmalarda pestivirus seropozitivitesinin %5-50 arasında değişen oranlarda olduğu gösterilmiştir (Nettleton, 2000).

İspanya (Hurdato ve ark., 2003), İtalya (De Mia ve ark., 2005), İsviçre (Stalder ve ark.,2005), Tunus (Thabti ve ark., 2005) gibi çeşitli ülkelerde BDV enfeksiyonunun varlığı serolojik ortaya konulmuştur.

Türkiye’de pestiviruslerin varlığı ve ruminantlar için önemli enfeksiyon riski oluşturdukları birçok çalışma ile ortaya konulmuştur (Burgu ve ark., 1987; Alkan ve Burgu, 1993; Burgu ve Özkul,1993; Burgu ve ark, 1997).

Türkiye’de koyunlarda pestivirus enfeksiyonlarına ilgili ilk araştırma 1987 yılında yapılmıştır. Araştırmada abort yapan koyunlardan sağlanan kan örneklerinin %3 ‘ünde ve abort olan fötüslerin %10’ unda pestivirus varlığı bildirilmiştir (Burgu ve ark., 1987).

Burgu ve ark. (2001), yapmış oldukları bir araştırmada dokuz koyunculuk işletmesindeki koç, koyun ve kuzulardan toplanan kan örneklerinde mikronötralizasyon testi (Referans suş BVDV/NADL) ile pestivirus varlığını serolojik olarak araştırmışlardır. Bu araştırma sonucunda. koçlarda %20,6 (6/29) oranında bir seropozitiflik sağlanırken örneklenen gebe koyunlarda %21,5 (142/661) oranında seropozitiflik tespit edilmiştir.

Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgesinde bulunan keçi sürülerinde yapılan seroepidemiolojik bir araştırmada pestivirus seropozitivitesi BDV için %63.6, BVDV için %30.2 tespit edilmiştir (Ataseven ve ark., 2006).

Ege bölgesi, Akdeniz Bölgesi ve İç Anadolu Bölgesinde koyun ve keçiler üzerinde yapılan bir çalışmada; çoğunluğu halk elinde bulunan küçükbaş (koyun ve keçi) hayvancılık işletmelerinde 1036 (705 koyun ve 331 keçi) kan örneği rastgele

örneklenmiştir. Toplanan kan serumlarında BDV antikorlarının tespiti için spesifik ticari ELISA kiti kullanarak, %77,67 oranında Border Disease Antikorları tespit etmişlerdir (Oğuzoğlu ve ark., 2009).

Gümüşova ve ark. (2006), Türkiye’de kıyı ve iç bölgelerdeki koyunlardan rastgele seçilerek toplanan kan serumlarında pestivirus seropozitifliğini BVDV’ün referans suşu olan NADL’ı kullanarak, SNT’i ile araştırmışlardır. Bu araştırma sonucunda pestivirus seropozitifliği %18,94 (463/2444) olarak tespit edilmiştir.

Araştırmamızda, Orta Karadeniz bölgesinde bulunan koyunlardan sağlanan kan serumu örneklerinde c-ELISA yöntemi ile seropozitiflik %48,12 olarak belirlenmiştir. Aynı kan serum örneklerinde BVDV /NADL suşu ile SNT ile pestivirus seropozitifliği araştırılmış ve % 42,89 oranında seropozitiflik tespit edilmiştir. Araştırma sonucunda Karadeniz bölgesinde koyunlarda c-ELISA yöntemi ile tespit edilen seropozitiflik oranı (% 48,12); Ege Bölgesi, Akdeniz Bölgesi ve İç Anadolu Bölgesinde ELISA yöntemi ile küçükbaş hayvanlarda tespit edilen seropozitiflik oranından (%77,67) daha düşük bulunmuştur. Ayrıca araştırmamızda Karadeniz Bölgesinde koyunlarda SNT yöntemi ile tespit edilen pestivirus seropozitifliği (%42,89); Burgu ve ark.,(2001) yapmış olduğu bir araştırmada tespit ettikleri koyunlardaki pestivirus seropozitifliğinden (%21,5) ve Gümüşova ve ark. (2006) tarafından yapılan araştırmada koyunlarda bildirdikleri %18.94 oranındaki pestivirus seroprevalansından daha yüksek bulunmuştur. Geçmiş yıllarda yapılan çalışmalarda elde edilen seropozitiflik oranları araştırmamızda elde edilen oranlarda düşük oranlarda olması küçükbaş hayvanlarda pestivirus enfeksiyonlarının geçmişten günümüze giderek fazlaştığını göstermektedir (Burgu ve ark., 2001; Gümüşova ve ark., 2006).

Elde ettiğimiz sonuçlar dünyanın diğer ülkelerinden yapılan pestivirus seroprevalans çalışmalarında elde edilen verilere göre yüksektir. Örneğin Danuser ve ark. (2009), İsviçre’de 5059 koyun serumunda gerçekleştirdikleri bir çalışmada ELISA testi ile seropozitiflik oranını %16,32 (829 /5059) olarak bildirmişlerdir. Araştırmacı grubu yine aynı örnekleme grubunda BVDV ve BDV kullanılarak yapılan SNT ile seropozitiflik oranı sırası ile %13,9 ve %14,8 olarak tespit etmiştir (Danuser ve ark.,

2009). İspanya’da yapılan bir çalışmada kuzularda BDV seropozitifliği %17,6 olarak tespit edilmiştir (Valdazo ve ark., 2008). İsveç de koyun sürülerinde %20-65 oranında BDV seropozitivitesi bildirilmiştir (Schaller ve ark.,2000). İspanya’da koyunlarda BDV-yaş-spesifik seroprevalans çalışmasında, 5-6 aylık toklularda, %29-33, 1 yaşındaki koyunlarda %67-88 ,1 yaşın üzerindeki koyunlarda %86’ ın üzerinde seroprevalans tespit edilmiştir (Berriatua ve ark.,2004).Kuzey ispanya da serolojik bir çalışmada BDV seroprevalansının %4-21 arasında olduğu bildirilmiştir (Berriatua ve ark., 2006). Kanada da yapılan bir çalışmada hayvan çiftliklerinden toplanan 540 koyun kan serumu SN testi ile BDV antikoru kontrolü sonucunda seroprevalansı (5/540) %0.9 olarak bulunmuştur (Heckert ve ark., 1994).

BDV enfeksiyonun epidemiyolojisinde birçok faktör rol oynamaktadır. Enfeksiyonun yayılmasında vertikal nakil önemlidir. Özellikle gebe transplasental geçiş sonucu şekillen fetal enfeksiyon sonucunda, Pİ kuzu doğumları oluşabilmektedir. Pİ hayvanlar sekret ve eksretleri (nazal akıntı, gaita, süt, semen) ile etkenin nakledilmesinde önemli bir kaynaktır ve sürü için her zaman bir risk teşkil etmektedirler (Löken ve ark., 1991). Ayrıca enfeksiyonun epidemiyolojisinde kuzulama zamanı ve kontrolsüz hayvan hareketleri de önemlidir. Karadeniz Bölgesinde dağların kıyıya paralel uzanması, yeşil bitki örtüsü ve orman bakımından zengin olmasından dolayı ülkenin en fazla yağış alan bölgesidir. İç bölgelerde çok sert olmayan karasal iklim hüküm sürmektedir. Sahil kısmında hayvan sayısı ve kontrolsüz hayvan hareketleri az olmasına karşılık iç bölgelerde hayvan hareketleri ve hayvan sayısı daha fazladır. Mevsime bağlı çiftleşme arzusu gösteren koyunlar poliöstrik hayvanlar olduğundan çoğu koyun ırkları günlerin kısaltmaya başladığı dönemlerde kızgınlık göstermeye başlamaktadır. Bu nedenle bölgede doğumlar aralık ayında başlamakta ve mart ayına kadar uzanmaktadır. Karadeniz bölgesinde yaptığımız çalışmada materyal sağlanan 13 abort vakasının yağışlı alan ocak-şubat ayında gerçekleştiği bildirilmiştir. Bu çalışmada BDV enfeksiyonunun seroprevalans çalışması 4 il (Samsun, Amasya, Tokat, Giresun)‘ de gerçekleştirilmiştir. Seroprevalans çalışması sonuçları, iç kesimlerde yer alan illerdeki enfeksiyon oranının diğer illere oranla daha yüksek düzeyde olduğunu ortaya koymuştur. Bu sonuçlara göre enfeksiyon oranının yüksek olduğu illerde koyun

varlığının ve hayvan hareketlerinin diğer illerden daha yoğun olduğu kanaatine varılmıştır.

Diğer bir tehlikede, kontrolü yapılmamış ve persiste enfekte koyun hücreleri veya koyun serumları kullanılarak üretilen canlı virus aşılarının bir sahada kullanılmasıdır. Bu durum pestivirus enfeksiyonlarının oluşumuna ve yayılmasına neden olabilir (Thabti ve ark.,2005).

Bu sonuçlar ışığında araştırmamız, Burgu ve ark. (1987) tarafından 22 yıl önce gerçekleştirilen, koyunlarda pestivirus üzerine yapılan ve bu virus grubunun Türkiye’de varlığı serolojik olarak ortaya koyan ilk araştırmadan sonra yapılan birçok çalışmadan biridir. İlk bildirimden bugüne kadar geçen zamanda yapılan araştırmalar büyük ivme kazanmış; koyunlarda önemli bir pestivirus olan “sınır hastalığı” etkeni BDV açık olarak tanımlanmıştır. Ataseven ve ark. (2006), yılında keçilerde BDV’nin varlığını serolojik olarak bildirmişlerdir. Oğuzoğlu ve ark. (2008) yılında yaptıkları çalışmada koyunlarda BDV üzerine virolojik, patolojik ve serolojik anlamda kapsamlı bir çalışma gerçekleştirilerek BDV’ nin Türkiye’deki moleküler karakterizasyonu gerçekleştirmişlerdir.

Yapmış olduğumuz çalışmada Orta ve Doğu Karadeniz Bölgesinde BDV enfeksiyonunun varlığı moleküler teknikler kullanılarak virolojik olarak tanımlanmış ve araştırma serolojik olarak da desteklenmiştir. Araştırma sonucunda BDV tanımlanmasında kullanılan RT-PCR yönteminin yüksek duyarlılığa sahip olduğu ortaya konulmuştur. Serolojik çalışmalarda kullanılan iki yöntemde (c-ELISA ve konvensiyonel yöntemlerden SNT) çok duyarlı yöntemler olduğu bir kez daha ortaya konulmuştur. Enfeksiyonun yayılmasında en önemli etkenlerden bir tanesi olan sürü içerisinde yer alan Pİ hayvanların tespit edilmesinden tüm bu yöntemler başarı ile uygulanabilir.

Araştırma sonucunda elde edilen veriler BDV enfeksiyonunun Orta ve Doğu Karadenizde Bölgesinde artan bir seroprevalansa sahip olduğunu göstermiştir. Bu artışta en önemli etkenlerden birisi kontrolsüz hayvan hareketleridir. Diğer önemli etkenlerden

biride gerek kırsal kesimlerde bulunan yetiştiricilerin gerekse büyük çaplı besicilerin pestivirus enfeksiyonları ve vereceği ekonomik zararlar konusunda yeterli düzeyde aydınlatılmamasıdır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Pestivirus enfeksiyonları ruminantlarda büyük ekonomik kayıplara neden olan önemli bir viral patojendir. Türkiye ekonomisinde tarım ve hayvancılık önemli bir yer tutmaktadır. Ülkemiz hayvancılığında koyun varlığı et üretimi, süt üretimi yapağı/kıl üretimi yönünden ekonomik olarak önemli olduğu kadar kültürel ve geleneksel bir öneme de sahiptir.

Türkiye’de varlığı 22 yıl önce ortaya konulan BDV enfeksiyonu pestivirular içinde önemli yer tutmaktadır. BDV enfeksiyonu, hayvanda kilo kaybına, süt veriminde düşüğe ve yapağı kalitesinde bozulmalara neden olmasından dolayı ekonomik açıdan büyük kayıplar meydana getirmektedir. Ayrıca gebe hayvanlarda neden olduğu abortlar, ölü doğumlar, kongenital anomali defektli hayvanlarda ekonomik kayıpların artışının diğer bir yönüdür.

Yapılan bu araştırmada BDV enfeksiyonunun ülkemizde ilk bildiriminden bu güne kadar artarak yayılma eğilimi gösterdiği tespit edilmiştir. Yayılmada en önemli etkenlerden birisi bölgeler arası kontrolsüz hayvan naklidir. Bölgemizde enfeksiyonun yayılmasında özellikle kurban bayramı sırasında yapılan büyük çaplı kontrolsüz hayvan hareketleri etkili rol oynamaktadır. Hayvan nakilleri sırasında sürü içinde yer alan Pİ hayvanlar enfeksiyonun bölgeler arasında yayılmasına öncülük etmektedir. Ayrıca bölgemizde ilkbaharda hayvanların yaylalara çıkarılmasıyla beraber yaylalar arasında persiste enfekte hayvanların nakli enfeksiyonun bölgede yayılmasının başka bir nedenidir.

Pestivirus enfeksiyonları Avrupa Birliği içerisinde yer alan birçok ülkede uygulanan ulusal eradikasyon programları ile yokedilmeye çalışılmaktadır. Ülkemizde de bu enfeksiyonu yoketmeye yönelik ilgili kurumların koordineli olarak yürüteceği bir ulusal eradikasyon programının hazırlanması ve uygulanmaya konması gereklidir. Eradikasyon programı için hastalıkla ilgili bir referans teşhis merkezi oluşturulması ve bu merkez öncülüğünde ülke genelinde gerek küçük baş gerekse de büyük baş

hayvanlarda pestivirus enfeksiyonlarının profilinin çıkarılması ve elde edilen veriler doğrultusunda eradikasyon stratejileri oluşturulması gerekmektedir.

Enfeksiyonun yayılımının önlemek amacı ile aşılama kampanyalarının başlatılması gereklidir. Aşılama daha çok klinik semptomların görüldüğü akut enfeksiyonlarda daha faydalı olsada günümüzde bazı canlı modifiye aşılar fötüs enfeksiyonuna engel olmaktadır.

Süratli ve ucuz maliyetli teşhis metotlarının tedarik edilmesi, sürülerin bu metotlarla taranarak PI hayvanların ortaya çıkarılarak sürüden uzaklaştırılması gereklidir. Üreticiye ucuz maliyetli teşhis metotlarının sunulması hastalığın kontrolü açısından çok önemlidir. Maliyet hesapları yüksek olduğu zaman üretici rutin kontrollerden kaçınmakta ve hastalık sürü içinde yayılımını sürdürmektedir.

Kontrolsüz hayvan hareketlerinin mutlaka önüne geçilmelidir.

İl ve İlçe müdürlüklerinden görev yapan Veteriner Hekimler ile serbest Veteriner hekimlerin ve yetiştiricilerin pestivirus enfeksiyonları açısından bilgilendirilmesi gereklidir. Bu amaçla sempozyum veya kurslar düzenlenmesi bu konu ile ilgili olarak Tarım Bakanlığı ve Veteriner Fakültelerinin koordineli olarak çalışması gereklidir.

KAYNAKLAR

- Ataseven, V.S., Ataseven, L., Tan, T., Badür, C., Oğuzoğlu, Ç.T. (2006). Seropositivity of agents causing abortion goat breeds in Eastern and South-eastern Anatolia, Turkey. *Revue Med. Vet*, **157**, 545-550
- Anderson, C.A., Sawyer, M., Higgins, R.D, East, N., Osburn, B.L.(1987).Extensive hypomyelination vith minimal viral antigen in neonatal spinal cord.*Am J Vet Res.*, **48(3)** , 499-503
- Alkan, F., Burgu, İ. (1993). İnstigation on the incidince of Bovine Viral diarrhoea Virus in calves born with encephalopathy in Turkey. *DTW.*, **100**, 107-109
- Barlow, R.M.; Gardiner, A.C; Nettleton, P.F.(1983). The pathology of aspontaneous and experimental mucosal disease-like syndrome insheep recovered from clinical border disease. *J Comp Pathol*, **93**,451-461.
- Becher B, Avalos Ramires R, Orlich M, Cedillo Rosales S, König M, Schweizer M, Stalder H, Schirrmeier H, Tiel H-J (2003). Genetic and antigenic characterization of novel pestivirus genotypes: implications for classification. *Virology*, **311**, 96-104.
- Becher, P., Orlich, M., Thiel, H.J.(1998).Complete genomic sequence of Border Disease Virus, a Pestivirus from Sheep.*Journal of Virology*, 5165-5173
- Becher, P., Meyers, G., Shannon, A.D., Thiel, H.J.(1996).Ctopathogenicity of Border Disease Virus Is Correlated With Integration of Cellular Sequence into the Viral Genome. *Journal of Virology*,2992-2998
- Berriatua, E., Barandika, J.F., Aduriz, G., Atxaerandio, R., Garrido, J.,Garcia- Perez, A.L.(2006).Age-spesific seroprevalance of Border disease virus and presence of persistently infected sheep in Basque dairy-sheep flocks.*Veterinary Journal.*,168 ,336-342
- Burgu, İ., Öztürk, F., Akça, Y., Toker, A., Frey, H-R., Liess, B.(1987).Investigations on the occurrence and impact of bovine viral diarrhea (BVD) virus infections in sheep in Turkey. *DTW*, **94**, 292-294.
- Burgu, İ., Özkul,A.(1993) Detection by cultural isolation of bovine virus diarrhea (BVD) virus following field infections in cattle and their fetuses. *DTW*,100, 361-363.
- Burgu, İ.,Akça, Y., Alkan, F., Özkul, A.,Karaoglu,t., Bilge-Dağalp, S.,Oguzoglu, Ç., Yeşilbağ, K.(2001). Koyunlarda Doğum öncesi ve Sonrası Dönemlerde Bovine Viral Diarrhea (BVD) Virus Enfeksiyonunun Serolojik, Virolojik ve Patogenez Yönünden Araştırılması. *Turk J Vet Anim Sci* ,**25**,551-557

- Burgu,İ.,Akça,Y. (2004).Viroloji-II.Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim dalı
- Brun ,A; Lacoste, F; Reynaud, G, Kato ,F and Saint-Marc ,B. (1993). Evaluation of the potency of an inactivated vaccine against border disease pestivirus infection in sheep.*Proceedings of the Second Symposium on Pestiviruses, Edwards S, ed. Fondation Marcel Merieux, Annecy, France. 257-259.*
- Danuser,R; Vogt, H.-R; Kaufmann,Th; Peterhans,E;Zanoni,R.(2009). Seroprevalence and characterization of pestivirus infections in small ruminants and new world camelids in Switzerland. *Schweiz. Arch. Tierheilk,109-117.*
- De Mia, G.M., Greiser-wilke, I., Feliziani, F., Giammarioli, M., De Giuseppe, A.(2005).Genetic characterization of a caprine pestivirus as the first member of a putative novel pestivirus subgroup.*J.Vet. Med. B,52,206-210*
- Depner K, Hubschle OJ and Liess B (1991): BVD-virus infection in goats: experimental studies on transplacental transmissibility of the virus and its effect on reproduction. *Arch Virol Supp, 3, 253-256.*
- Dubois, E., Russo, P., Prigent, M., Thiery, R.,(2008).Genetic characterization of ovine pestiviruses isolated in France , 1985 and 2006.*Veterinary Microbiolgy, 130 ,69-79*
- Evermann, J.F., Faris, M.A., Niemi, S.M. ve ark. (1981): Pestivirus persistence and pathogenesis: comparative diagnostic aspects of Border disease virus of sheep and bovine viral diarrhea virus. 407-426. In: Proceedings of the 24th Meeting Am Assoc Vet Lab Diagnost, Cited from Löken T (2000): Border Disease in goat.
- Frey, H.R., Liess, B.(1971). Vermehrungskinetik und verwendbarkeit einesstark zytopatogenen VD-MD virus-stammes f.r diagnostische untersuchungen mit der mikrotiter-methode. *Zentbl Vet Med B,18, 61-71.*
- Garcia-Perez,L.,Minguijon,E.,Barandika,J.F.,Aduriz,G.,Povedano,I.,Juste,R.A., Hurdato,A.(2009).Detection of Border disease virus in fetuses, stillbirths, and newborn lambs from natural and experimental infections.*Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.,21 (3) , 331-337*
- Gumuşova-Okur,S;Yazıcı,Z;Albayrak,H.(2006).Pestivirus seroprevalence in sheep populations from inland and coastal zones of Turkey. *Revue Méd. Vét.,157,12, 595-598*
- Heckert, R.A.,Dubuc,C.,Briscae,M.R.,Ranger,M.(1994).Prevalance of Border Disease Virus infection in a small group of Canadian sheep.*Can Vet J ; 35 ;379-381*
- Heinz, F.X., Collett, M.S., Purcell, R.H., Gould, E.A., Howard, C.R., Houghton M., Moormann, R.J.M., Rice, C.M., Tiehl, H-J. (2000). ‘Family Flaviviridae’ Virus Taxonomy, Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Pres, San Diego, pp. 859–878.

- Hughes, L.E., Kerschaw, G.P., Shaw, I.G.(1959). B'' or Border disease. *Vet. Rec* , 71, 313–317.
- Hurdato, A., Garcia-Perez, A.L., Aduriz, G., Juste, R.A.(2003).Genetic diversity of ruminant pestiviruses from Spain.*Virus Res*,92,67-73
- Hurdato, A., Aduriz, G., Nieves, G., Oporto, B., Juste, R.A., Lavin, S.,Lopez-Olvera, J.R., Ignasi, M.(2004).Molecular identification of a new pestivirus associated with increased mortality in the pyrenean chamois in Spain.*J. Wild D*,**40**,796-800,
- Garcia-Perez, A.L., Minguinjon, E., Estevez, L., Barandika, J.F., Aduriz, G., Juste, A., Hurdato, A.(2008).Clinical and laboratorial findings in pregnant ewes their progeny infected with Border disease virus (BDV-4 genotype).*Research in Veterinary Science*, **10** , 1016
- Golemba M.D., Parreno, V., Jones, R.L., (2008).Simple procedures to obtain exogenous internal controls for use in RT-PCR detection of bovine Pestiviruses.*Molecular and Cellular Probes*, 22, 212-214
- Löken T, Krogsrud J and Bjerkås I (1991): Outbreaks of border disease in goats induced by a pestivirus- contaminated orf vaccine, with virus transmission to sheep and cattle. *J Comp Pathol*, **104**, 195-209.
- Monies, R.J., Paton, D.J., Vilcek, S. (2004). Mucosal disease-like lesions in sheep infected with Border disease virus. *Vet. Rec*, **155**, 765–769.
- Mishra, N., Vilcek, S., Rajukumar, K., Dubey, R., Tiwari, R., Galav, V., Pradhan, H.K.(2008).Identification of bovine viral diarrhea virus type 1 in yaks (*Bos poepagus Grunniens*) in the Himalayan region.*Research in Veterinary Science* ,84,507-510
- Marco, I., Rosell, R., Cabezon, O., Mentaberre, G., Casas, E., Velarde,R., Lopez-Olvera, J.R., Hurtado, A., Lavin, S.(2008).Epidemiological study of border disease virus infection Southern chamois (*Rupicapra Pyrenaica*) after an outbreak of disease in Pyrenees(NE Spain).*Veterinary Microbiology*,127,29-38
- Nettleton, P.F.(1990) Pestivirus infections in ruminants other than cattle.*Revue Scientifique et Technique del office International des Epizooties*,**9**,131-150.
- Office International Epizooties.(OIE).(2009) : Manual of diagnostic tests and vaccines terrestrial animals.
ERİŞİM:
[http://www.oie.int/eng/normers/mmanual/2008/pdf/2.07.01_BORDER_DIS.pdf]
Erişim tarihi:27.07.2009

- Oguzoglu, T.C., Tan, M.T., Toplu, N., Demir, A.B., Bilge-Dagalp, S., Karaoglu, T Ozkul, A., Alkan, F., Burgu, I., Haas, L., Greiser-Wilke, I. (2009). Border disease virus (BDV) infections of small ruminants in Turkey: a new BDV subgroup? *Veterinary Microbiology*, **135**(3-4) :374-379 ,
- Rasmussen, T.B., Rimann, I., Hoffmann, B., Depner, K., Uttenthal, A., Beer, M. (2008). *Journal of Virological Methods*, 149, 330-333
- Stalder, H.P., Meier, P., Pfaffen, G., Wageck-Canal, C., Rüfenacht, J., Schaller, P., Bachofen, C., Marti, S., Vogt, H.R., Peterhans, E. (2005). Genetic heterogeneity of pestiviruses of ruminants in Switzerland. *Prev. Vet. Med.*, 72, 37-41.
- Terpstra, C. (1981) Border disease: Virus persistence, antibody response and transmission studies. *Res Vet Sci.*; **30**:185-191
- Thabti, F., Letellier, C., Hammami, S., Pepin, M., Ribiere, M., Mesplede, A., Kerkhofs, P., Russo, P. (2005). Detection of a novel border disease virus subgroup in Tunisian sheep. *Arch. Virol.*, **150**, 215-229.
- Thabti, F., Fronzaroli, L., Dlissi, E., Guibert, J.M., Hamami, S., Pepin, M., Russo, P. (2002). Experimental model of Border Disease Virus infection in Lambs: comparative pathogenicity of pestivirus isolated in France and Tunisia. *Vet. RES.*, 33, 35-45
- Thiel, H.J., Plagemann, P.G.W., Moennig, W. (1996). Pestiviruses. In: *Virology, Third Edition*, Ed(s), Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.W., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, New York, 1059-1073
- Valdazo-Gonzalez, B., Alvarez-Martinez, M., Sandvik, T. (2007). Genetic and antigenic typing of border disease virus isolates in sheep from the Iberian Peninsula. *Vet. J.*, **174**, 316-324.
- Valdazo-Gonzalez, B., Alvarez-Martinez, M., Greiser-Wilke, I. (2006). Genetic typing and prevalence of Border disease virus (BDV) in small ruminant flocks in Spain. *Vet. Microbiol.*, 117, 141-153.
- Valdazo-Gonzalez, B., Alvarez, M., Sandvik. (2008). Prevalence of Border Disease virus in Spanish Lambs. *Vet Microbiol.*, **128**, 269-278
- Van Oirschot, J.T. (1983) Congenital infections with non-arboviruses. *Vet Microbiol.*, **8**: 321- 361.
- Vilcek, S., Nettleton, P.F., Paton, D.J., Belak, S. (1997). Molecular characterization of ovine pestiviruses. *J. Gen. Virol.*, 78, 725-735.
- Waldvogel, A.S.; Ehrensperger, F.; Straub, O.C.; Pospisil, A. (1995) An immunohistochemical study of the distribution of border disease virus in persistently infected sheep. *J Comp Pathol.*; **113** (2):191-200.

Willoughby, K., Valdazo-Gonzalez, B., Mlaey, M., Gilray, J., Nettleton, P.F. (2006).
Journal of Virological Methods, **132**, 187-194

Yapkiç, O., Gebe sığırlarda ve bunların buzağlarında bovine viral diarrhoea virus enfeksiyonlarının immunfloresans ve immunperoksidaz testleri ile araştırılması. S. Sağ. Bil. Enst. Doktora Tezi, Konya, (1999).

EKLER



T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
SAMSUN

Sayı : HADYEK/40
Konu : Araştırma projeniz hk.

28/12/2007

Yrd. Doç. Dr. Zafer YAZICI
Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı

2007/35 numaralı "Koyunlarda Pestiviruslerin Moleküler Tanısı ve Seroepidemiolojisi üzerine." konu başlıklı Projeniz; Hayvan Etik Kurulu'nun 27.12.2007 tarihli toplantısında görüşülmüş, Hayvan Hakları ve Deney Etiği açılarından uygun olduğuna oy çokluğu karar verilmiştir.

Araştırmanın yürütüldüğü süreç içinde etik kurallar ve hayvan haklarına uygunluk yönünden sorumluluk araştırmacılara ait olmak kaydıyla 6 aylık Rapor verilmesi şartıyla çalışmanıza başlamanız uygun görülmüştür.

Prof. Dr. Muhlise ALVUR
Hayvan Etik Kurulu Başkanı

ÖZGEÇMİŞ

1982 yılında Samsun ilinde doğdum. İlköğrenimimi Samsun Mustafa Kemal İlköğretim Okulu, ortaöğrenimimi Samsun Atatürk Lisesinde Lise öğrenimimi ise Samsun Ondokuzmayıs Lisesinde tamamladım. 2000 yılında Samsun Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünü kazandım ve 2004 yılında Biyolog ünvanı ve lisans diploması ile fakülteden mezun oldum. Eylül 2005’de Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim dalında yüksek lisans programına başladım.