



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**SIĞIR ENTEROVİRUSLARIN (BEV) MOLEKÜLER
EPİDEMİYOLOJİSİ, İZOLASYONU VE FARKLI
SEROTİP VİRUSLAR ARASINDAKİ ÇAPRAZ BAĞIŞIKLIK
DÜZEYLERİNİN İNCELENMESİ**

Nüvit COŞKUN

**VİROLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Feray ALKAN**

**ANKARA
2018**

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SİĞİR ENTEROVİRUSLARIN (BEV) MOLEKÜLER
EPİDEMİYOLOJİSİ, İZOLASYONU VE FARKLI SEROTİP
VİRUSLAR ARASINDAKİ ÇAPRAZ BAĞIŞIKLIK
DÜZEYLERİNİN İNCELENMESİ**

Nüvit COŞKUN

**VİROLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Feray ALKAN**

**Bu araştırma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü'nün
16H023903 proje numarası ile desteklenmiştir.**

**ANKARA
2018**

Etik Beyan

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Sığır enterovirusların (BEV) moleküler epidemiyolojisi, izolasyonu ve farklı serotip viruslar arasındaki çapraz bağışıklık düzeylerinin incelenmesi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Nüvit COŞKUN

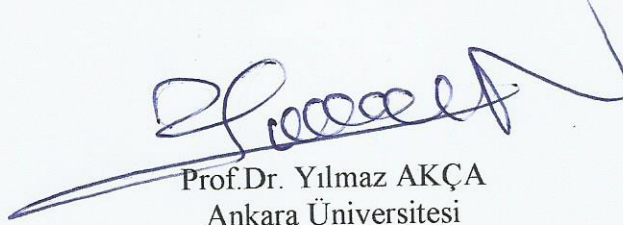
Tarih: 26.01.2018

İmza:

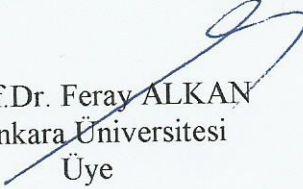
KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Viroloji Anabilim Dalında
Nüvit COŞKUN tarafından hazırlanan "Sığır Enterovirusların (BEV) Moleküler
Epidemiyolojisi, İzolasyonu ve Farklı Serotip Viruslar Arasındaki Çapraz Bağışıklık
Düzeylerinin İncelenmesi" adlı tez çalışması
aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak
OY BİRLİĞİ / OY ÇOKLUĞU ile kabul / red edilmiştir.

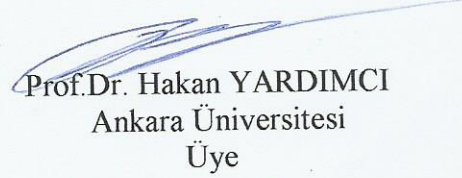
Tez Savunma Tarihi: 26.01.2018



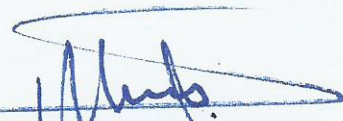
Prof.Dr. Yılmaz AKÇA
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı




Prof.Dr. Feray ALKAN
Ankara Üniversitesi
Üye



Prof.Dr. Hakan YARDIMCI
Ankara Üniversitesi
Üye



Prof.Dr. Mehmet ÇABALAR
Harran Üniversitesi
Üye



Prof.Dr. Yakup YILDIRIM
Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi
Raportör

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Prof.Dr. Mehmet AKAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdür V.

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Şekiller	x
Çizelgeler	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Etiyoloji	2
1.2. Epidemiyoloji	10
1.3. Bulaşma	12
1.4. Klinik Bulgular ve Patogenez	14
1.5. İmmunoloji	15
1.6. Tanı	18
1.7. Koruma ve Kontrol	20
2. GEREÇ VE YÖNTEM	22
2.1. Gereç	22
2.1.1. Örneklenen Hayvanlar ve Tanı Materyalleri	22
2.1.2. Deneysel Hayvanı	23
2.1.3. Hücre Kültürü	23
2.2. Yöntem	24
2.2.1. Örneklerin Hazırlanması	24
2.2.2. BEV Tanısı ve Serotiplerinin Belirlenmesi için PCR Uygulamaları	25
2.2.2.1. Viral Nükleik Asit İzolasyonu	25
2.2.2.2. BEV Tanısı için PCR Tekniği	26
2.2.2.3. BEV Kapsit Proteinlerini (VP1, VP2, VP3) Kodlayan Gen Bölgeleri için Uygulanan PCR Tekniği	27
2.2.2.4. PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi	28
2.2.2.5. Dizin Analizi	28
2.2.2.6. Dizin Analizi Sonuçlarının Değerlendirilmesi	29
2.2.2.7. Filogenetik Analiz	29
2.2.3. Virus İzolasyonu	29
2.2.3.1. Hücre Kültürünün Üretilmesi	29
2.2.3.2. Tanı Materyallerinin Hücre Kültürüne Ekimi	30
2.2.4. Hiperimmün Serum Elde Edilmesi	31
2.2.4.1. Virus Seçimi ve Üretimi	31
2.2.4.2. Virus Titrasyon Testi (VT)	31
2.2.4.3. Virusların İnaktivasyonu	32
2.2.4.4. Hiperimmunizasyon için Virusların Ultrasontrifüjü	32
2.2.4.5. İnaktivasyonun Kontrolü	32
2.2.4.6. Deneme Hayvanlarına İnokulasyon	33
2.2.4.7. Virus Nötralizasyon Testi (VNT)	33
3. BULGULAR	35
3.1. BEV Tanısı İçin RT-PCR Sonuçları	35

3.2.	Virus İzolasyonu	36
3.3.	BEV İzolatlarının Serotiplendirilmesi ve Dizin Analizi	39
3.4.	İzolatların Titrasyonu	51
3.5.	Hiperimmunizasyon ve Nötralizasyon Testi Sonuçları	51
3.5.1.	İnaktivasyon Kontrolü	51
3.5.2.	Deney Hayvanı İnokulasyonu	51
3.5.3.	Hiperimmun Serum Titrelerinin Belirlenmesi	52
4.	TARTIŞMA	53
5.	SONUÇ VE ÖNERİLER	59
	ÖZET	61
	SUMMARY	62
	KAYNAKLAR	63
	EKLER	68
	EK-1 Etik Kurul Kararı	68
	ÖZGEÇMİŞ	72



ÖNSÖZ

Bovine Enterovirus (BEV) ilk olarak 1950'li yıllarda izole edilmiş, çeşitli patolojilerde etken olarak bulunmuş olsa da, patogenezi mekanizmaları tam olarak açıklanamadığından sağlıklı hayvan yetiştiriciliğindeki önemi yeterince irdelenememiştir. Bununla birlikte çevre şartlarına dayanıklılığı, ishalleri hayvanlar tarafından fazla miktarda saçılması, mera ve çiftlik çevrelerindeki sulak alanlarda kontaminasyona neden olması, sindirim sistemi şartlarında enfeksiyözitesini yitirmeden kalarak mukozal immunitiyi uyarması ile aşı vektörü olarak kullanım avantajı son dönemlerde çalışma alanının gelişmesine neden olmuştur. Picornaviridae'nin Enterovirus genusu içerisinde EV-E ve EV-F türleri içerisinde sınıflandırılan bu viruslar moleküler çalışmaların artması ve viral taksonominin değişmesi ile beraber birkaç kez yeniden sınıflandırılmış, bu durum mevcut bilgilerin güncellenmesi sonucunu doğurmuştur. Ülkemizde konuyla ilgili çok sınırlı verinin bulunması nedeniyle, özellikle lokal virusların tespiti ve genetik özelliklerinin belirlenmesi üzerine yapılan çalışmaların artırılmasını gerektirmektedir.

Bu çalışmada da Türkiye'de farklı illerdeki işletmelerde BEV varlığının araştırılması, lokal izolatların elde edilmesi ile daha ileri çalışmalara materyal sağlanması, farklı serotiplere ait izolatların çapraz nötralizasyonu yapılarak serotipler arası immunolojik etkileşimlerin araştırılması ile elde edilen bilgilerle BEV konusundaki bilgi birikiminin artırılması hedeflenmiştir.

Doktora eğitimim ve tez çalışmam boyunca hiç bir konuda desteğini esirgemeyen, bilimsel bakışı ve yol gösterici deneyimleri ile araştırmacı kişiliğimizi geliştirmek için çabalayan, en zor durumlarda bile özveri ve sabrını esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Feray Alkan'a, lisansüstü eğitimim süresinde destek ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen Viroloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri başta Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Yılmaz Akça olmak üzere Prof. Dr. Aykut Özkul, Prof. Dr. Seval Bilge-Dağalp, Prof. Dr. M. Taner Karaoğlu ve Prof. Dr. T. Çiğdem Oğuzoğlu ile tez izleme komitesi üyesi Prof. Dr. Hakan Yardımcı'ya, tez numunelerimi sağlamam konusunda yardımcı olan veteriner hekim arkadaşlarıma,

Çalışmalarım boyunca uzun süre ayrı kalıp ihmal ettiğim aileme, laboratuvar ve mesai ortamında yardımlarını esirgemeyen tüm araştırma görevlisi ve doktora ğrencisi arkadaşlarıma teşekkürü borç bilirim.

Bu tez alışması Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Müdürlüğü'nün 16H0239003 proje numarası ile desteklenmiştir.



SİMGELER VE KISALTMALAR

BEI	Binary ethileneimine
BEV	Bovine Enterovirus
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Baz çift, Base Pair
cDNA	Komplementer Deoksiribo Nükleik Asit
cm	Santimetre
CPE	Cytopatological Effect (Sitopatik etki)
dk	Dakika
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	Deoksi Nükleotit Tri Phosphate
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
EM	Elektron Mikroskobi
EV	Enterovirus
g	Gram
IgA	İmmunoglobulin A
IgG	İmmunoglobulin G
IRES	Internal Ribosom Entry Site
kb	Kilo baz
kDa	Kilo Dalton
ml	Mililitre
MUSCLE	Multiple Sequence Comparison by Log- Expectation
NCBI	National Center Biotechnology Information
nm	Nanometre
NS	Non-Structural
nt	Nükleotit
°C	Santigrad
ORF	Open Reading Frame (Açık Okuma Çerçevesi)
PBS	Phosphate Buffer Saline
polyA	Poliadenil

qRT-PCR	Real-time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
RNA	Ribo Nükleik Asit
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
S	Sedimentasyon katsayısı
sn	Saniye
ssRNA	Tek iplikçikli RNA
TAE	Tris Asetat Ethylene Diamine Tetra Acetic acid
UTR	Untranslated Region (Çevrilmeyen Bölge)
VP	Viral Protein
VPg	Viral protein g
xg	G-force
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Picornaviridae ailesi içinde bulunan genuslar	3
Şekil 1.2. Enterovirusların genom organizasyonu	5
Şekil 1.3. Enterovirus kapsit yapısı	6
Şekil 1.4. İkosahedral kapsit yapısı ve eksenleri	7
Şekil 1.5. Enterovirusların replikasyon siklusu	9
Şekil 3.1. 5'UTR gen bölgesine göre yapılan PCR jel görüntüsü	35
Şekil 3.2. 5'UTR gen bölgesine göre hazırlanan filogenetik ağaç	37
Şekil 3.3. Hücre kontrol görüntüsü.	38
Şekil 3.4. Enterovirusun hücrede meydana getirmiş olduğu CPE görüntüsü (72 saat)	38
Şekil 3.5. BEV VP2 ve VP3 gen bölgelerine göre yapılan PCR sonrası jel görüntüleri	39
Şekil 3.6. BEV VP1 gen bölgesine göre yapılan PCR sonrası jel görüntüleri	39
Şekil 3.7. VP1 gen bölgesine göre hazırlanan filogenetik ağaç	40
Şekil 3.8. İzolatlar arası VP1 gen bölgesi yönünden nükleotit benzerlik oranları	43
Şekil 3.9. EV-E1 izolatlarının Gen Bankası'nda kayıtlı E1 serotip ile nükleotit düzeyindeki değişimler	44
Şekil 3.10. EV-E1 izolatlarının Gen Bankası'nda kayıtlı E1 serotip ile aminoasit düzeyindeki değişimler	46
Şekil 3.11. EV-E2 izolatlarının Gen Bankası'nda kayıtlı E2 serotip ile nükleotit düzeyindeki değişimler	47
Şekil 3.12. EV-E2 izolatlarının Gen Bankası'nda kayıtlı E2 serotip ile aminoasit düzeyindeki değişimler	48
Şekil 3.13. EV-E3 izolatlarının Gen Bankası'nda kayıtlı E3 serotip ile nükleotit düzeyindeki değişimler	49
Şekil 3.14. EV-E3 izolatlarının Gen Bankası'nda kayıtlı E3 serotip ile aminoasit düzeyindeki değişimler	50

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. BEV'lerin genom bölgelerinin yaklaşık yerleri ve büyüklükleri	4
Çizelge 2.1. Tanı materyallerinin dağılımı	23
Çizelge 2. 2. 5'UTR ve kapsit gen bölgeleri tespitinde kullanılan primerler	26
Çizelge 2.3. OneStep-RT-PCR miks bileşenleri ve programı	27
Çizelge 3.1. Örneklenen materyallere göre BEV pozitiflik dağılımı	36
Çizelge 3.2. Elde edilen izolatların illere göre dağılımı	38
Çizelge 3.3. 5'UTR ve VP1 gen bölgesi dizinlerinin Gen Bankası kayıt bilgileri	41
Çizelge 3.4. BEV serotiplerini temsilen seçilen izolatlar ve DKID ₅₀ oranları	51
Çizelge 3.5. Hiperimmün serumların BEV E1, E2 ve E3 serotip viruslar için antikor düzeyi (SN ₅₀)	52

1. GİRİŞ

Solunum sistemi, sindirim sistemi ve reproduktif sistem gibi farklı sistemlere ilgili klinik bulgulara sahip hayvanların yanı sıra, deniz kabuklularında ve sığır yetiştiriciliği işletmeleri yakınındaki sularda da saptanan sığır enterovirusları (BEV) *Picornaviridae* ailesinin *Enterovirus* genusunda yer almaktadır.

Halen yenileri keşfedilen picornavirusların veteriner ve insan virolojisinde girişi ilk olarak Friedrich Loeffler ve Paul Frosch tarafından şap virusunun tanımlanması ile 1898 yılında olmuştur. Sonrasında yeni virusların keşfi ile genişleyen bu ailede 1950'lerde keşfedilen sığır enterovirusları ilk keşfedildiklerinden itibaren hep tartışılan bir grup olmuştur. Gerek insanlardaki enteroviruslarla olan akrabalığı ve gerekse sığırlardaki göreceli olarak en patojen virus olan şap virusu ile aynı aile içinde olması ve de tek başına ciddi semptom oluşturduğunun bildirildiği vakaların bulunması stratejik bir öneme sahip olmasını gerektirirken, patojenite ile olan ilgisinin tam kurulamaması ve yapılan deneysel çalışmalarda hastalıklı hayvanlardan izole edilen virusların, deneysel çalışmalarda inokule edildiği hayvanlarda zaman zaman klinik tablo oluşturmasındaki yetersizlikler sebebiyle hayvan sağlığındaki riski düşük olarak kabul edilmiştir. Bu sebeple uzun süre önce keşfedilmiş olmasına rağmen, BEV üzerine yapılan çalışmalar da sınırlı sayıda kalmıştır. Ancak son yıllarda özellikle biyoloji alanında kullanılan laboratuvar tekniklerinin gelişmesi sonucunda tanı ve virusların genetik yapısına ilgili çalışmaların hız kazanması, enterovirusların biyoteknolojik aşuların hazırlanmasında vektör olarak kullanılabilme potansiyelleri, çevre kontaminasyonu üzerine yapılan değerlendirmeler ve “tek sağlık” konsepti içinde ele alınabilirlikleri konusundaki yaklaşımlar, BEV üzerine yapılan çalışmalara araştırmacıların ilgisini yönlendirmiştir.

1.1. Etiyoloji

Picornaviruslar modern virolojinin gelişmesinde önemli role sahiptirler. Şap virusunun keşfinin 10 sene sonrasında, bu familyanın önemli üyelerinden olan çocuk felci hastalığı etkeni poliovirus izole edilmiştir. Daha sonraları 1949'da poliovirusun kültüre edilen hücrelerde çoğaltılabildiğinin gösterilmesi, viral replikasyonla ilgili çalışmaların gelişmesine yol açmıştır. Viral enfektivitenin kantitasyonunda kullanılan plak test de poliovirus kullanılarak geliştirilmiştir (Knipe ve ark., 2013).

Picornaviridae ailesi 35 genus ve 80 türden oluşmaktadır (Şekil 1.1). *Enterovirus* genusu 10 enterovirus türü (*Enterovirus A, B, C, D, E, F, G, H, I, J*) yanısıra 3 rhinovirus (*Rhinovirus A, B, C*) ile birlikte toplam 13 türü içermektedir (International Committee on Taxonomy of Viruses, Erişim tarihi: 10.12.2017). Son zamanlarda Japonya'da Tsuchiaka ve ark. (2017) sığırlarda yaptıkları bir çalışmada genotipik düzeyde farklı dizilime sahip bir virus elde etmişler ve bunun yeni bir enterovirus türü (EV-K) olabileceğini bildirmişlerdir.

Sığır enterovirusları ilk olarak 1950'lerin sonlarında izole edilmiş; sonrasında farklı klinik olgular ya da sağlıklı hayvanlardan birçok enterovirus izolasyonu gerçekleştirilmiştir. (Zhang ve ark., 2014). Önceleri sığır enterovirusları 7 serotip olarak tanımlanmış; daha sonra yapılan serolojik çalışmalara dayanılarak BEV-1 ve BEV-2 olarak iki serotipe ayrılmıştır. Ancak zaman içinde moleküler tekniklerin gelişmesiyle artan dizin analiz verileri ile nükleotit/aminoasit dizilimlerinin karşılaştırılması sonucunda, sığır enterovirusları iki farklı tür olarak tanımlanmış; BEV-1 ve BEV-2 serotip adlandırması sırasıyla BEV-A ve BEV-B olarak yenilenmiştir (Chu ve ark., 2013 ve Zhu ve ark., 2014). Son olarak 9. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) raporuna göre sığır enterovirusları *Enterovirus E* (EV-E) ve *Enterovirus F* (EV-F) türleri olarak adlandırılmıştır. BEV üzerine yapılan çalışmaların en azından bir kısmının, BEV sınıflandırmasının zaman içinde değişmesi nedeniyle yeterince değerlendirilememiş olması ya da yapılan bazı tanımlamaların güncel bilimsel veriler ve sınıflandırma ile örtüşmemesi, BEV konusundaki bilgilerin eksikliğinde rol oynamıştır. Günümüzde enterovirusların VP1

gen bölgesi dizinleri dikkate alınarak yapılan sınıflandırmaya göre, *Enterovirus E* türünde 4 serotip (E1-E4 önceden A1-A4) ve *Enterovirus F* türünde ise 6 serotip (F1-F6 önceden B1-B6) bulunmaktadır.

<u>Ampivirus</u>	<u>Aphthovirus</u>	<u>Aquamavirus</u>	<u>Avihepatovirus</u>	<u>Avisivirus</u>
<u>Cardiovirus</u>	<u>Cosavirus</u>	<u>Dicpivirus</u>	<u>Enterovirus</u>	<u>Erbovirus</u>
<u>Gallivirus</u>	<u>Harkavirus</u>	<u>Hepatovirus</u>	<u>Hunnivirus</u>	<u>Kobovirus</u>
<u>Kunsagivirus</u>	<u>Limnipivirus</u>	<u>Megrivirus</u>	<u>Mischivirus</u>	<u>Mosavirus</u>
<u>Oscivirus</u>	<u>Parechovirus</u>	<u>Pasivirus</u>	<u>Passerivirus</u>	<u>Potamipivirus</u>
<u>Rabovirus</u>	<u>Rosavirus</u>	<u>Sakobuvirus</u>	<u>Salivirus</u>	<u>Sapelovirus</u>
<u>Senecavirus</u>	<u>Sicinivirus</u>	<u>Teschovirus</u>	<u>Torchivirus</u>	<u>Tremovirus</u>

Şekil 1.1. *Picornaviridae* ailesi içinde bulunan genuser (The Picornavirus Pages, Erişim: 25.01.2018)

Sığır enterovirusların genomu pozitif anlamlı RNA olup, küçük (27-30nm), zarsız ve ikosahedral kapside sahiptir. Kapsit 4 yapısal proteinden (VP1, VP2, VP3 ve VP4) oluşur (Zhang ve ark., 2014 ve Zhu ve ark., 2014).

Enterovirusların genomu diğer birçok picornavirusa nükleotit dizi analizi ve organizasyon yönünden benzerlik göstermektedir. Genom 7-8,8 kb arası değişmektedir. Viral RNA enfeksiyözdür ve hücreye girince viral replikasyon için gerekli tüm proteinleri sentezlemek üzere translasyona uğrar. Picornavirus genomik RNA'sı 5' ucunda VPg (virion proteini) adı verilen bir proteine kovalent olarak bağlıdır (Knipe ve ark., 2013 ve Kosoltanapiwat ve ark., 2016). VPg farklı türlerde farklı uzunluğa sahip olmakla birlikte, 22-24 aminoasit büyüklüğe sahiptir ve tek bir viral gen tarafından kodlanmaktadır. VPg'nin RNA sentezini başlattığı düşünülmektedir (Ehrenfeld ve ark., 2010). Picornavirusların 5' UTR bölgeleri uzun olup, 0,5-1,5 kb arasındadır. Bu bölge genom replikasyonu ve translasyonu için gereken dizileri içermektedir. Tüm enteroviruslarda 5'UTR bölgesinde bulunan yonca yaprağı yapısına ek olarak, sığır enteroviruslarında ikinci yonca yaprağı yapısı bulunur. Bu özellik BEV'lerin diğer enteroviruslardan ayrılmasını sağlar (Tsuchiaka ve ark., 2017). Enteroviruslarda 5'UTR bölgesi ribozoma bağlanarak mRNA

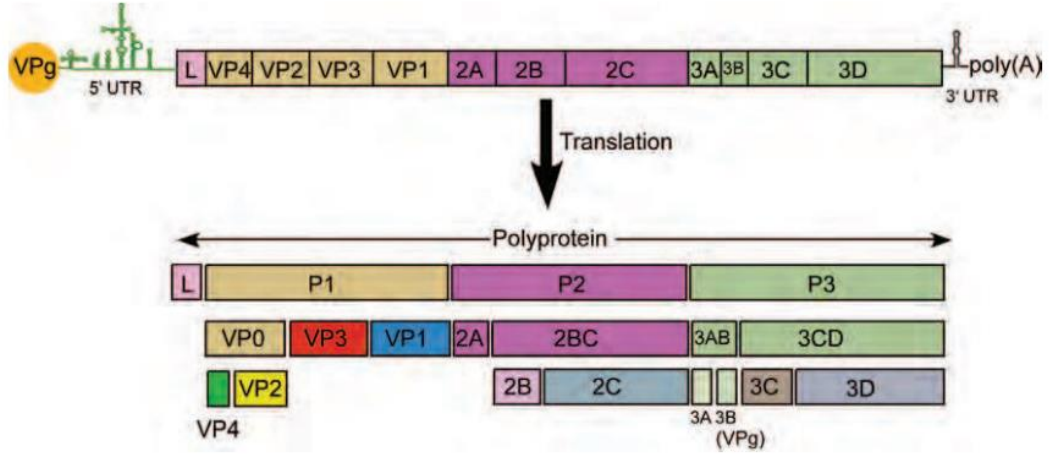
translasyonunu yöneten bir internal ribozom giriş bölgesi (IRES) içermektedir. Picornaviruslarda genel olarak 3'UTR kısadır ve 40-330 nükleotit uzunluğundadır, BEV'lerde bu uzunluk yaklaşık 100 nükleotittir (Sobhy ve ark., 2015). Ayrıca hem virion RNA'sı, hem de mRNA poly(A) kuyruk içermektedir. Bu kuyruğun uzunluğu 35-100 nükleotit arası değişkenlik gösterir. Poly(A) kuyruğu çıkarılan viral RNA enfeksiyöz özelliğini kaybeder (Knipe ve ark., 2013). Çizelge.1.1'de BEV genomu bölgelerinin yaklaşık başlangıç ve bitiş sıraları ile nükleotit uzunlukları gösterilmiştir.

Çizelge 1.1. BEV'lerin genom bölgelerinin yaklaşık yerleri ve büyüklükleri.

Bölge	Lokasyon	Büyükük (bp)
5'UTR	1-822	822
VP4	823-1029	207
VP2	1030-1767	738
VP3	1768-2496	729
VP1	2497-3318	822
2A	3319-3768	450
2B	3769-4065	297
2C	4066-5054	287
3A	5055-5319	267
3B	5320-5388	69
3C	5389-5937	549
3D	5938-7320	1383
3'UTR	7321-7417	97

Polioviruslarla enfekte hücrelerde yapılan çalışmalarda, picornaviruslarda viral RNA'da tüm viral proteinleri oluşturmak üzere bölünmeye uğrayacak tek poliprotein oluşturan yalnız bir tane uzun open reading frame (ORF) tespit edilmiştir. Sonradan yapılan moleküler dizileme teknikleriyle de bu hipotez doğrulanmıştır. Bu strateji tüm picornaviruslar için benzerdir. Bu poliprotein translasyon aşamasında bölünmeye uğrar ve bütün olarak gözlemlenmez. Bölünme viral kaynaklı proteazlarla gerçekleşir ve 11-15 protein arası bölünmüş son ürün oluşur. Bazı bölünmemiş prekürsörlerin de replikasyonda fonksiyonları bulunmaktadır. Tüm picornaviruslardaki nomenklatürü birleştirmek adına poliprotein üç bölgeye bölünmüştür: P1, P2 ve P3. Bazı picornaviruslarda P1 bölgesinden önce bir lider (L) protein sentezlenebilir. P1 bölgesi viral kapsit proteinlerini (VP1-4) kodlarken P2 ve

P3 bölgeleri protein işleme (2A^{pro}, 3C^{pro}, 3CD^{pro}) ve genom replikasyonu (2B, 2C, 3AB, 3B^{VPg}, 3CD^{pro}, 3D^{pol}) için gerekli olan proteinleri kodlar. (Şekil 1.2)



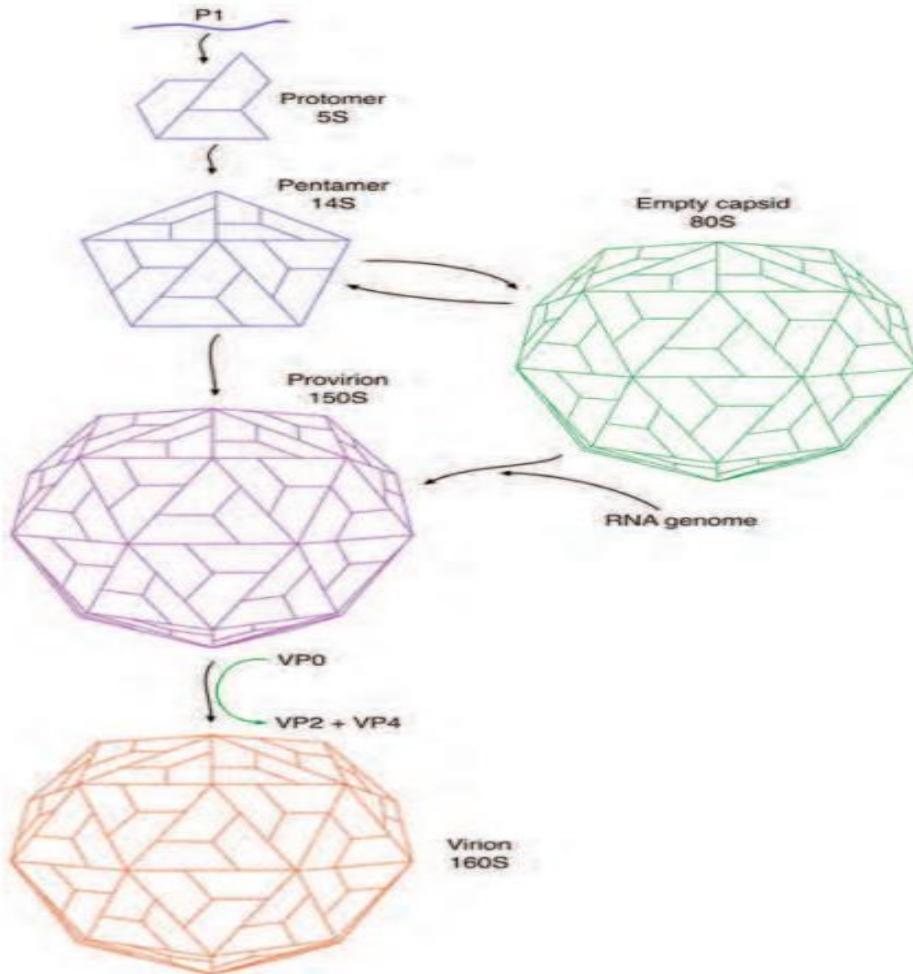
Şekil 1.2 Enterovirusların genom organizasyonu (Knipe ve ark., 2013).

Virus kapsidini oluşturan 4 yapısal protein (VP1-4) bulunmaktadır. X-ray ayırıştırma ve elektron mikroskopi çalışmaları picornavirus kapsidinin 60 yapısal proteinden ikosahedral bir yapıda örüldüğünü ortaya koymaktadır. (Smyth ve ark., 1992). VP1, VP2, VP3 dış yüzeyde bulunurken VP4 iç yüzeyde bulunmaktadır. VP1, VP2 ve VP3'ün dizin benzerlikleri bulunmamakla birlikte, yapıları benzer olup antiparalel β -tabakalarının oluşturduğu silindirlere meydana gelirler. Bu bölge iki antiparalel β tabakadan oluşan üçgen bir yapıdadır. Bir β tabaka üçgenin kenarlarını oluştururken ortadan bükülmüş olan diğeri duvarlar ve tabanı oluşturmaktadır (Şekil 1.3). Üçgen şekil yapısal birimlerin yoğun, sert bir protein kabuk olarak paketlenmesine yardımcı olur. β silindir bölgesinin paketlenmesi kapsidin içinde protein-protein temaslarıyla özellikle beşli eksen etrafında güçlendirilmektedir. Bu örüntü yani VP1, VP2, VP3 hatta VP4'ün N-terminal uzantıları virionun stabilitesini sağlar (Knipe ve ark., 2013).

VP1, VP2 ve VP3 arasındaki asıl yapısal farklılık β bağları ve β silindir bölgesinden uzanan N- ile C- terminal dizilerini bağlayan ilmeklerdedir. Bu aminoasit dizilimleri picornaviruslara tür bazında morfoloji ve antijenliğini

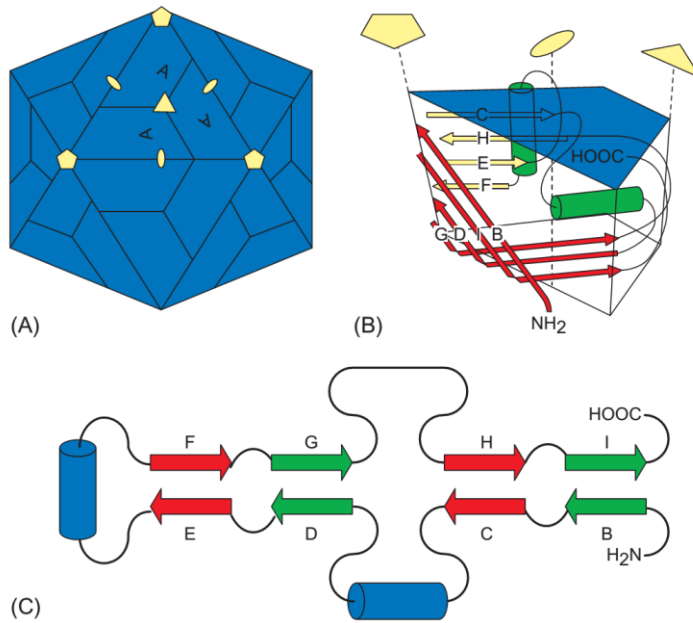
kazandırmaktadır. C-terminal uçlar virionun yüzeyinde yer alırken N-terminal uçlar iç tarafta yer almaktadır ve bu da P1 prekürsörün proteolitik ayrılımda önemli bir değişime uğradığını göstermektedir (Ehrenfeld ve ark., 2010 ve Knipe ve ark., 2013).

Enteroviruslardan poliovirus ve insan rhinovirusu ile yapılan çalışmalarda virion yüzeyinin girintili çıkıntılı olduğunu göstermiştir. Beş katlı simetri ekseninde belirgin yıldız şekilli bir düzlük bulunur ve bunu çevreleyen derin boşluklar (kanyon) ve üç katlı simetri ekseninde bir çıkıntı daha vardır. Kanyonun antijen bağlanan bölge olduğu öne sürülmüştür ki bu bir çok enterovirus için de doğrulanmıştır. Tüm picornaviruslarda kanyon yoktur. Örneğin cardioviruslarda reseptörlerin bağlanmasına yarayan bir seri boşluk ya da çukur varken, şap virusunda yüzey daha düzdür (Knipe ve ark., 2013).



Şekil 1.3. Enterovirus kapsit yapısı (Knipe ve ark., 2013).

Kapsidin iç tarafında bulunan N-terminal uçları tarafından oluşturulan bir örüntü, virionun stabilitesine önemli katkıda bulunur. Beş katlı simetri ekseninde VP3 moleküllerinin N-terminal uçları, silindirik bir paralel β tabakası oluşturur. Bu yapı VP4 ve VP1'in N-terminalleri tarafından oluşturulan 5 tane üç katlı β tabakası ile çevrilidir. Pentamerler arasındaki etkileşimler yedi katlı bir β tabaka tarafından stabilize edilir. Picornavirusların kapsitlerinin RNA genom ile olan etkileşimler sonucu stabilize olduğu düşünülmektedir. Nükleik asidin büyük bir kısmı kapsidin iç yüzeyine özellikle VP2 altında bulunan iki katlı eksen yakınlarına temas etmektedir. RNA hem VP2 hem de VP4 ile temas halindedir. Bu yerleşim kapsit kurulumunda bir iskele görevi yaparken virion dayanıklılığına katkıda bulunur (Filman ve ark., 1989). Kapsit yapısının bileşenleri Şekil 1.4'de gösterilmiştir.

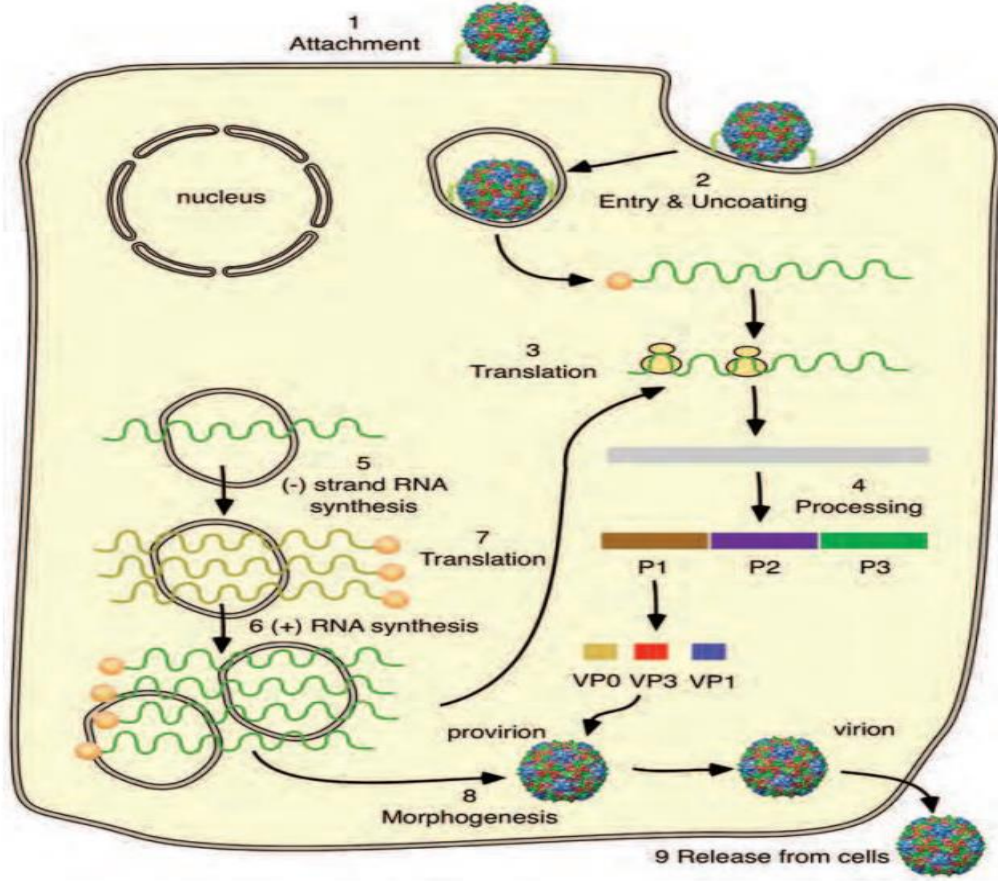


Şekil 1.4. İkosahedral kapsit yapısı ve eksenleri (Maclachlan ve Dubovi, 2010).

Picornavirusların replikasyonu hücre sitoplazmasında gerçekleşmektedir. İlk basamak hücre reseptörüne bağlanma, sonra RNA genomun kapsitten arınmasıdır. Pozitif anlamlı olan RNA sitoplazmaya girdikten sonra, genom replikasyonu için gerekli proteinleri sentezleyecek şekilde translasyona uğrar. Viral proteinler bir poliproteinin bölünmesiyle oluşmaktadır. Bu bölünme iki adet viral proteazın

yardımıyla meydana gelir. Bunlar 2A^{pro} ve 3C^{pro}/3CD^{pro}'dur. Sentezlenen proteinler arasında RNA-bağımlı RNA polimeraz; genom replikasyonu ve mRNA sentezi için gereken aksesuar proteinler bulunmaktadır. Genom replikasyonu için gereken ilk aşama, pozitif anlamlı RNA'nın negatif iplikçiğinin oluşturulmasıdır. Sonrasında çok sayıda pozitif iplikçik sentezlenerek viral genom kopyalanır. Bu olaylar birçok viral proteinin oluşturduğu ufak membranöz veziküller içerisinde gerçekleşir. Kapsit proteinlerini içeren havuz yeterince büyüdüğü zaman kapsitlenme başlar. Prekürsör P1, sonradan pentamere dönüşecek olan olgun olmayan bir protomeri oluşturmak üzere bölünür. Yeni sentezlenen pozitif iplikçikli RNA, pentamer ile birleşerek enfeksiyöz virüsü oluşturur. Enfekte hücrelerde rastlanan boş kapsitlerin pentamerlerin depo formu olduğu düşünülmektedir (Ehrenfeld ve ark., 2010).

Diğer viruslar gibi picornaviruslar da, konak hücre zarındaki reseptörlerden birine bağlanarak hücrede enfeksiyonu başlatır. Sığır enterovirusların bağlandığı reseptör karbonhidrat yapıda olan sialik asittir. Diğer picornaviruslar farklı reseptörlere bağlanmaktadır. Bazı picornavirusların enfeksiyonu için tek reseptör yeterli iken, bazıları için ikinci bir molekül yani yardımcı reseptör gerekmektedir. Örneğin coxsackievirus A21 CD55 reseptörlerine bağlanırken, hücre girişi için hücreler arası adezyon molekülü 1'e (ICAM-1) de ihtiyaç duymaktadır (Knipe ve ark., 2013). BEV'lerde böyle bir yardımcı reseptör bildirilmemiştir. Tek bir replikasyon siklusu için geçen süre 5-10 saat arasında değişebilir. Bu süre virus türü, sıcaklık, pH, konak hücre gibi değişkenlere bağlıdır. Picornavirusların çoğunluğu hücrenin bütünlüğünü yitirmesi ve lize olmasıyla hücreden çıkar ancak bazıları sitopatik etki oluşturmadan hücreden salınır (Şekil 1.5).



Şekil 1.5 Enterovirusların replikasyon siklusu (Knipe ve ark., 2013).

Picornavirusların neden olduğu enfeksiyonların epidemiyolojilerinde biyofiziksel özellikleri önemli rol oynar. Enfeksiyöz virus %70 etanol, izopropanol, sulandırılmış lizol ve kuarterner amonyum bileşikleri gibi genel laboratuvar dezenfektanlarına göreceli olarak dirençlidir. BEV'ler eter, kloroform gibi lipid çözücülere duyarsız olup, oda sıcaklığında birçok deterjan çözeltisinde stabilitesini koruyabilir. Formaldehit, glutraldehit, güçlü asitler, sodyum hipoklorid ve serbest rezidüel klorin enterovirusları inaktive eder. Bu bileşenlerle inaktivasyonun derecesi konsantrasyon, pH, temas zamanı gibi faktörlere bağlıdır. Virusu inaktive eden ajanlar genel olarak virionun aktif kimyasal modifikasyonuna neden olurlar. Virus pH 3,0 ve daha aşağıda stabildir. Picornavirusların sezyum klorürdeki yüzme dansiteleri farklılık göstermektedir. Cardiovirus ve enteroviruslar sezyum klorür içerisinde benzer yüzme dansitesine sahip olup, bu rakam 1,34 g/ml'dir; sediment katsayısı ise 160S'dir. Sezyum klorürdeki yüzme dansitesi ve zayıf asitlerdeki

stabilitesi gibi fiziksel özellikleri, enterovirusları picornaviruslardan ayıran temel özelliklerdir. Enteroviruslar genel anlamda termostabildirler. Çoğu 42°C'de inaktive olur fakat ortamda bulunan magnezyum katyonları virionu stabilize eder ve 50°C'ye kadar dayanıklılık gösterebilirler. Diğer ajanlarda olduğu gibi UV ışınları da, yüzeylerdeki enterovirusları inaktive etmek için kullanılabilir. Ayrıca yüzeylerin kurutulması virus titresinde azalmaya neden olur. Bu durumun sebebi olarak yüzeylerin gözenekli olması ve ortamda organik materyal bulunması gösterilmiştir. Hayvan ürünlerindeki kontaminasyon ısı işlem ile giderilebilir. Rigor mortis sırasında meydana gelen pH değişimi inaktivasyon için yetersizdir ve bu aşamadan sonra soğuk depolara alınan etlerdeki virus çok uzun süreler enfeksiyözitesini muhafaza eder. Bu durumdan sonra inaktivasyon aynı şekilde 60°C'de 1 saat ısı işlem ile sağlanabilir (Knowles ve Mann, 1990).

1.2. Epidemiyoloji

Her ne kadar BEV'lerin tüm dünyada yaygın olduğu bilinse de, klinik enfeksiyon oluşturma nitelikleri konusundaki farklı gözlemler ve özellikle virus sınıflandırması konusundaki gelişmeler nedeniyle bazı verilerin değerlendirilebilirliğinin azalması, vb. nedenlerle sığır enterovirusları araştırmacıların uzun yıllar ihmal ettiği bir konu olmuştur. Bununla birlikte son yıllarda teknolojik gelişmelere paralel olarak enterovirusların moleküler epidemiyoloji, moleküler patolojisi, vb. konulardaki çalışmalar hız kazanmıştır. Özellikle yeni nesil dizin analizi konusundaki olanaklar ve bilginin artışı sonucunda retrospektif örneklerin değerlendirilmesi ve metagenomik analize dayanan bildirimler artmaktadır.

Sığırlarda enterovirus varlığı Avustralya (McCarthy ve ark., 1999), Avrupa (Boros ve ark., 2012; Blas-Machado ve ark., 2011 ve Jimenez-Clavero ve ark., 2005), Amerika (McFerran, 1962) ve Asya'da bulunan bir çok ülkede (He ve ark., 2017; Li ve ark., 2012; Peng ve ark., 2014; Zhang ve ark., 2014 ve Zhu ve ark., 2014) genellikle virus tespiti ve identifikasyonuna dayanılarak bildirilmiştir. Son yıllarda Çin, Japonya ve Taiwan gibi daha önce BEV bildirimleri yapılmamış birçok

ülkede, yapılan çalışmalarda virus varlığı tanımlanmıştır (He ve ark., 2017; Kosoltanapiwat ve ark., 2016 ve Tsuchiaka ve ark., 2017).

Bu çalışmalarda temel hedef sıklıkla farklı klinik olgular ya da sağlıklı hayvanlarda tanımlanan sığır enterovirusların genetik yapılarının sorgulanmasıdır. Çin'de 2010 yılından bu yana yapılan çalışmalarda (He ve ark., 2017; Li ve ark., 2012; Peng ve ark., 2014; Zhang ve ark., 2014 ve Zhu ve ark., 2014) ishallerden sağlanan materyallerde EV-E ve EV-F türüne ait virusun varlığı saptanmış ve VP1 dizin analizine göre E2 (Zhang ve ark.,2014), E3 (Zhu ve ark.,2014) serotipleri tanımlanmıştır. Bu çalışmaların bazılarında (He ve ark., 2017; Li ve ark., 2012; Peng ve ark., 2014; Zhang ve ark., 2014 ve Zhu ve ark., 2014) yalnızca ishallerden örneklem yapılmış olmasına karşın, Li ve ark. (2012) tarafından bildirilen çalışmada ishallerden aynı ortamı paylaşan sağlıklı hayvanlardan da materyal sağlandığı bildirilmiştir.

Ayrıca Macaristan (Boros ve ark., 2012) ve İspanya'dan da bildirimler bulunmaktadır. (Blas-Machado ve ark., 2007 ve Jimenez-Clavero ve ark., 2005) Mısır'da yapılan bir araştırmada EV-F2 serotipi bildirilmiştir (Sobhy ve ark., 2015). Pakistan'da yapılan bir çalışmada EV-E bildirilerek, bunun serotipinin de E4 olduğu belirlenmiştir (Shaukat ve ark., 2012).

Türkiye'de ise, BEV'lerin farklı klinik olgulardaki yerinin sorgulanması ve saha viruslarının tanımlanması yönünde sadece bir bildirim bulunmaktadır (Alkan ve ark. 2014). Bu çalışmada şiddetli ishallerden izole edilen virus BEV-E olarak tanımlanmıştır. Bununla birlikte eski sınıflandırmaya göre BEV-1 ve BEV-2 olarak adlandırılmış viruslar kullanılarak 1997 yılından bu yana yapılan serolojik çalışmalarda (Alkan ve ark 1997 ve Gür ve ark., 2004) örneklenen sığır popülasyonlarında % 65'e varan pozitiflik oranları saptanmıştır. Ayrıca sığırların yanı sıra BEV-1 virusu kullanılarak mandalarda %3,9 (14/355) (Gür ve ark., 2006). insan, koyun, keçi, at ve köpeklerde sırasıyla %30,3, %29,8, %27,6, %12,8 ve %3,2 oranlarında pozitiflik saptandığı bildirilmiştir (Gür ve ark., 2008). Keçilerde yapılan

bir diğerk çalışmada ise, BEV-1 için seropozitiflik oranı %53,3 (736/1380) olarak bildirilmiştir (Acar ve Gür, 2009).

BEV moleküler epidemiyolojik verilerinin oluşturulması sadece sağlıklı hayvan yetiştiriciliği yönünden değil, aynı zamanda insan sağlığı, çevre ve biyolojik ürün geliştirilmesi konusunda da önem taşımaktadır. Bu nedenle farklı işletme/ülkelerin izolatlarının genetik/serotip özelliklerinin belirlenmesi önem taşımaktadır.

1.3. Bulaşma

Enteroviruslar genelde oral yolla alınırlar. Bunun yanısıra damlacık enfeksiyonu yolu ile de bulaşma mümkündür. Virusun pH'ya olan direnci sindirim sistemi ortamından etkilenmesine engel olur. Enfeksiyon genelde subklinik seyreder ki, bu durumda virus lokal lenf yumrularına yerleşerek, düşük seviyede antikor yanıtı uyarır. Virusun vücuda yayılımı sonrasında farklı sistemlere ilgili klinik semptomlar oluşur.

BEV ile enfekte sığır lar virusu sürekli olarak gaita ve nazal akıntı ile yayarlar; bu durum klinik semptomların ortadan kalkmasından sonra 5 ay kadar devam edebilir. Bu sürenin 15 aya kadar uzayabildiği yönünde bildirimler de vardır (Bovine Enterovirus Infection, Erişim: 25.10.2017). Virusun dış ortam koşullarına, özellikle de asit ortama olan direnci hastalığın bulaşını kolaylaştıran bir faktördür. Bir sürüde hastalık ortaya çıktıktan sonra komşu sürülere de kolaylıkla bulaşma şekillenebilir. Vektör aracılı bulaşma bildirilmemiştir. Virusun ahırlar çevresinde bulunan su birikintileri, ortak kullanımın olduğu yalaklar, vb. alanlarda varlığı bir yerleşim bölgesindeki sığır lar enfeksiyonun yayılmasında önemli kaynaklardır. Farklı hayvan türlerinde de BEV spesifik antikor varlığı tespit edilmiş olmakla birlikte, sığır lar bulaş konusunda bu türlerin önemine ilişkin detaylı bilgi bulunmamaktadır. Bununla birlikte bazı türlerde rekombinant virusların saptandığı yönündeki bildirimler, gerek

tür içinde ve gerekse türler arasındaki virus etkileşimlerinin olduğunu göstermektedir (Boros ve ark., 2012, Tsuchiaka ve ark., 2017 ve Zell ve ark., 2006).

Enteroviruslar gaita ile bol miktarda saçılmaktadır ve bu şekilde enfekte toprak ve su ile yayılabilmektedirler. Dış ortamlara dayanıklılıkları sebebiyle toprak, biyolojik örnekler, deniz ortamı da dahil olmak üzere su kaynaklarında enfektivitelerini uzun süre yitirmezler (Ley ve ark., 2002). BEV'lerin su ve topraktaki enfektiviteleri incelendiğinde, topraktaki enfektivitelerini su ve balçığa göre daha kolay kaybettikleri bildirilmiştir (Olszewska ve ark., 2008). Sıcaklığın inaktivasyonda önemli rol oynadığı bilinmekle beraber, enterik virusların içme sularında 200 güne kadar enfektif kaldığı bildirilmiştir (Keswik ve ark., 1984). Özellikle soğuk sularda enfektivitesini yitirmeyen virusların su canlılarında da enfeksiyon yapması muhtemeldir. Nitekim okyanus suyunun akışının serbest olduğu kıyı sularında sınırlanmış bir alanda bakılan yunusların dilindeki bir yarıdan, kaynağı bilinmemekle beraber sığır orijinli olduğu düşünülen EV izole edilmiş ve VP1 aminoasit dizin benzerliğine (%95) göre EV-E1 olarak sınıflandırılmıştır (Nollens ve ark., 2009). Su kaynaklarını süzerek yaşam döngüsünü suyun filtrasyonu ile devam ettiren canlılar olan midyelerin de sularda bulunan virusları tespit için değerlendirilebileceği düşünülerek, örneklenen midyelerde BEV varlığı yönünden sorgulanması sonucunda pozitiflik bulunmuştur (Ley ve ark., 2002). Ayrıca BEV tespit edilen çiftlik çevre materyalinden yapılan örneklemelerle de kontaminasyonun varlığı gösterilmiştir. Bu durum meralar için de geçerli olup, aynı merada otlayan sığır, geyik, koyun, keçi ve atların gaitaları ile sığır enterovirusları saçtığı ve bunun hayvan-mera-su kaynakları üçgeni içerisinde kontaminasyona neden olduğu düşünülmüştür (Jimenez-Clavero ve ark., 2005 ve Ley ve ark., 2002)

1.4. Klinik Bulgular ve Patogenez

Enteroviruslar ilk izole edildiklerinden itibaren 600'e yakın izolat elde edilmiş ve birçok ülkede hastalığın yaygınlığı gösterilmiştir. (Boros ve ark., 2012; Ley ve ark., 2005; Knowles ve Mann, 1990 ve Kosoltanapiwat ve ark., 2017). Birçok çalışmada klinik bulgulu sığırların yanısıra sağlıklı görünüme sahip sığırlardan da virus tespiti yapılması ya da yüksek oranda nötralizan antikor varlığının saptanmış olması (Granoff ve Webster, 1999 ve Jimenez-Clavero ve ark., 2005), sığır enterovirusların yaygınlığını göstermektedir.

BEV'ler sığırlarda çeşitli klinik semptomlara sebep olabilmektedir. Virusun sindirim sisteminde çok stabil olması ve dışkı ile yüksek miktarda saçılımı çok sayıda hayvanın enfeksiyonuna neden olmaktadır (Jimenez-Clavero ve ark., 2005). BEV başlıca sindirim sistemi enfeksiyonu bulguları olmak üzere, pnemoniye varan solunum sistemi enfeksiyonu bulguları ve hatta abort ile seyreden enfeksiyonlara yol açabilmektedir (Blas-Machado ve ve ark., 2007; Zhang ve ark., 2014 ve Zhu ve ark., 2014). Etken solunum ve sindirim sistemi enfeksiyonu gösteren sığırlar ile fertilitite bozuklukları olan sığırların gaitalarından; aborte fetusların fotal sıvılarından, sağlıklı görünüme sahip olan sığırların gaitalarından; lağım ve atık sulardan ayrıca çiftlik materyallerinden de izole edilmişlerdir (Granoff ve Webster, 1999; Jimenez-Clavero ve ark., 2005; Knowles ve Mann, 1990; Ley ve ark.,2002 ve McFerran, 1962).

Klinik olarak etkilenen sığırlarda lokal lenf yumrularının yanısıra birçok organda da yaygın olarak virus replikasyonu oluşması sonucunda reproduktif, solunum ve sindirim sistemi bulguları oluşur. Enfeksiyon sonucunda abort, ölü doğum, infertilite ve neonatal ölüm olguları bildirilmiştir. Bazı hayvanlarda süregelen ishale eşlik eden solunum sistemi bulguları dikkati çekmektedir ve bu hayvanlarda yapılan nekropside şiddetli enteritis ve pnemoniye ilgili patolojik bulgular saptanmaktadır. Sığır fetusunda tespit edilen BEV spesifik IgM antikorları intrauterin bulaşmaya işaret etmektedir (Knowles ve Mann, 1990). Fakat benzer semptom yaratan enfeksiyonlardan BEV'i ayıran bir patognomik bulgu yoktur.

BEV'lerin sıklıkla dışkı olmakla birlikte asites sıvısı, mide içeriği, aborte bir fetusun allantoik sıvısı, kan, semen, vajinal yıkantılar, karaciğer, plasenta, böbrek, pankreas, dalak, sert damak, enfekte hayvanların epitel doku ve lenf yumrularından, fetal sıvılardan ve fötuslardan izole edilmiş olmasına karşın, izolatların her zaman klinik tablonun oluşumunda primer neden olup olmadığı konusu tartışmalıdır. Bu olgulardan izole edilen viruslar kullanılarak yapılan deneysel çalışmalarda, hastalığın yeniden oluşturulmadığı bildirilmektedir. Ayrıca bildirilen olgularda sıklıkla başka etkenlerin de tespit edildiği ya da farklı etkenlerin sorgulanmamış olduğu görülmektedir. Bununla birlikte başka etken olmadan ciddi klinik vakalardan sorumlu olan enterovirus izolatları da bulunmaktadır. Fakat çoğu izolatin düşük patojeniteye sahip olduğu düşünülmektedir. Buna rağmen idiyopatik abort, orşitis, neonatal ishal ve kış dizanterisi olan vakalardan izolasyon gerçekleştirilebilmiştir (Blas-Machado ve ark., 2007; Bovine Enterovirus Infection, Erişim tarihi: 15.02.2017; Granoff ve Webster, 1999 ve Knowles ve Mann, 1990).

1.5. İmmunoloji

Diğer RNA viruslarında olduğu gibi enteroviruslarda zincir uzaması sırasındaki yanlış bağlanmalar ve RNA polimerazın proofreading aktivitesi olmaması nedeniyle büyük hata oranları vardır. Her 10^3 - 10^4 nükleotide bir kadar yüksek olan hata oranları ile RNA virus populasyonları quasispecies ya da birçok farklı genom dizisini içeren karışım olarak varoluşlarını sürdürürler.

Picornavirus ailesi genelinde 4 adet benzer diziye sahip kapsit proteini (VP1-VP4) bulunmasına rağmen yüzey yapıları farklılık göstermektedir. Bu farklılıklar hem farklı serotiplerin oluşumuna hem de reseptör düzeyinde farklı etkileşimlere neden olmaktadır. Enterovirusların kapsitlerinde beş katlı eksenin etrafını çevreleyen kanyon adı verilen boşluklar bulunmaktadır. Kanyonlar enterovirusların Ig benzeri hücre reseptörleriyle etkileşime girdikleri bölgelerdir. İlk başlarda kanyonların antikörlerin bağlanması için çok derin ve dar oldukları ve bunun immun sistemin bağlanması için gerekli aminoasitleri saklayan fiziksel bir bariyer olduğu

düşünölmüş ise de, daha sonra rhinovirus-antikör kompleksi ile yapılan çalışmalar, antikörlerin ve ICAM-1'in kanyonun derinliklerine bağlanabildiğini göstermiştir (Ehrenfeld ve ark., 2010). Dolayısıyla kanyon yapısının muhtemelen picornavirusların immun sistemden kaçması yönünde bir rolü bulunmamaktadır.

Enterovirusların sınırlı genetik materyali ve yapısal kısıtlamaları olmasına rağmen evrimleri şaşırtıcı şekilde gerçekleşmiştir ve birçok serotip oluşmuştur. Her serotip konaktaki farklı immun yanıt, reseptör kullanımı ve bir dereceye kadar klinik tablo ile ilişkilidir. Serotip fiziksel ve immunolojik olarak ayırmda bir kriterdir fakat keşfedilen virusların sayıları arttıkça serotiplendirme gittikçe daha zor bir hal almış ve moleküler tiplendirme çalışmaları arttıkça enterovirus cins ve türleri genom organizasyonları ve dizin benzerliklerine bakılarak sınıflandırılmaya başlanmıştır. Moleküler serotiplendirme çalışmaları VP1 bölgesinin nükleotid dizilerinin serolojik testlerle yapılan tiplendirmelere bir alternatif referans olabileceğini önermektedir. VP1 dizin benzerliği en az %75 olan (%88 aminoasit benzerliği) izolat ve referansın serolojik olarak aynı olduğu kabul edilmekte, yeni serotiplerin belirlenmesi için kabul gören yaklaşım ise, nükleotid ve aminoasit benzerliğinin sırasıyla %75 ve %88'den küçük olmasıdır (Oberste ve ark.,1999a; Oberste ve ark.,1999b; Shaukat ve ark., 2012; Tsuchiaka ve ark., 2017 ve Zell ve ark., 2006). Kapsit bölgesi proteinleri ile yapılan bu serotiplendirme diğer genom bölgelerinde sıklıkla meydana gelen rekombinasyonlardan dolayı güvenli bir şekilde yapılamamaktadır (Kosoltanapiwat ve ark.,2016 ve Oberste ve ark., 1999).

Viral serotip virionun dış yüzeyini kaplayan kapsit proteinlerinin C-terminalleri ve ilmeklerle birleşmesiyle ortaya çıkmaktadır. Bunlar virusun major antijenik bölgeleridir ve viral enfektiviteyi engelleyen antikörlerin tanıdıkları dizileri içermektedir. Bu bölgeler viral kapside karşı sentezlenen monoklonal antikörlerin nötralizasyon özelliğini engelleyen mutasyonlarla belirlenmektedir. Rhinovirus, poliovirus ve diğer picornavirusların kapsidleri dinamiktir, bu da gömülü olan VP1'in N-terminalinin geçici olarak yüzeye çıkmasına neden olur. Bu durumda VP1'in bu bölgedeki dizisine yönelik antikörler viral enfektiviteyi nötralize eder (Knipe ve ark., 2013).

Enterovirus izolatlarının serotip tespitinde, serotipler arasındaki çapraz bağışıklık nedeni ile serolojik metotlar kullanarak serotiplendirme göreceli olarak daha zor olmaktadır. Bununla birlikte moleküler çalışmalara dayalı izolatların serotiplendirme verileri ile serolojik testlere dayalı serotiplendirme çalışmalarının ne oranda örtüşebiliyor olduğu; hatta sığır enterovirus türlerinin (BEV-E ve BEV-F) antijenik yakınlıkları konusundaki bilgiler de çok sınırlıdır. Ancak son yıllarda aşı vektörü olarak kullanımlarının gündeme gelmesi, enteroviruslara ilgili bu bilgilerin oluşturulması ve sığır populasyonlarına ilgili prevalansın belirlenmesi gereğini ortaya koymaktadır.

Genel anlamda enteroviruslara karşı güçlü bir immun yanıt oluşur. İnsan kanında BEV ve domuz enterovirusları (PEV) nötralize eden antikorların varlığı saptanmış olmakla beraber, bunun nonspesifik bir reaksiyon olabileceği bildirilmektedir (Gür ve ark.,2008 ve Urasawa ve ark.,1973). Şap virusu SAT suşları ve BEV'in kobaylara inokulasyonu ile yapılan bir çalışmada plak redüksiyon testi ile 1:320 çapraz reaktif serum titresi elde edilmiş olup bu titrenin 35. güne kadar artış gösterdiği bildirilmiştir (Andersen, 1978). BEV'lerin en immunojen olan VP1 kapsit proteininin kapsidin dışında bulunması nedeniyle, bu bölge (1D/2A yani P1/P2 kesişim bölgesi) yabancı protein ekleme ve aynı zamanda antijenite özelliği ile de in vivo olarak antikor yanıtı oluşturma anlamında uygun bulunmuştur (Chu ve ark 2013).

Her bir enterovirusa karşı hayvanlarda oluşan antikorlar genel anlamda tip spesifiktir. Bununla birlikte, ısı ile inaktive edilen enteroviruslar özellikle de ortamda deterjan varsa farklı tiplerle etkileşen antikorlar oluşturabilir (Knipe ve ark., 2013). Bu antikorlar genelde nötralizan olmamakla beraber en azından bir epitopunun VP1'in amino terminal ucuna yönelik olduğu saptanmıştır. (Ehrenfeld ve ark., 2012).

1.6. Tanı

BEV enfeksiyonunu klinik olarak diğer enfeksiyonlardan ayıracak bir patognomik bulgu olmaması ve sıklıkla birçok olguda diğer bazı etkenlerle birlikte saptanıyor olmaları, laboratuvar tanı yöntemlerinin kullanımına mutlak ihtiyacı ortaya koymaktadır. Sığır yetiştiriciliğinde süreç içerisinde sıkça rastlanılan bazı bakteri ya da virusların genellikle olası etkenler olarak düşünülmesi, diğer bazı etkenler gibi enterovirusların da sıklıkla gözardı edilmesine neden olmuştur. Bu durum hem gerçek epidemiyolojik verilerin oluşturulmasında hem de tanı ve biyolojik ürün üretme konusundaki çalışmalarda eksikliğin önemli nedeni olmuştur.

BEV şüpheli olgularda tanı amacıyla elektron mikroskopi, virus izolasyonu, komplement fiksasyon, immunfloresan, hemaglutinasyon, hemaglutinasyon inhibisyon, PCR temelli yöntemlerin kullanımı bildirilmiştir (Boros ve ark., 2012; Knowles ve Mann, 1990). EM araştırmacıların virus tespitinde kullandığı temel araçlardan birisidir. Nitekim enterovirusların EM ile tespiti birçok çalışmada bildirilmiştir. Ancak, bu yöntemin yüksek miktarda virus yoğunluğuna ihtiyaç duyması duyarlılığı azaltan önemli bir faktördür. Ayrıca, bu konuda oldukça tecrübeli araştırmacılara ihtiyaç duyulmaktadır.

Virus izolasyonu enterovirus tanısında kullanılabilen en önemli yöntemlerdir. Enterovirusların karakteristik özelliklerinden biri de hücrede meydana getirdiği sitolitik değişimlerdir. Bu genelde mikroskopik seviyede 1-7 gün içinde meydana gelir; hücre yuvarlaklaşması, küçülmesi, piknoz ve hücre dejenerasyonu şeklinde tespit edilir. Eğer inokulumda çok yoğun enfektif partikül bulunuyorsa 24 saatten daha erken değişiklikler gözlenebilir. Genelde sınırlı bir sitopatik etkiyle başlayan enfeksiyon yayılarak tüm monolayer hücrelerin dökülmesine neden olabilir. BEV'lerin MDBK, BHK-21, MA-104, HRT-18, Vero, HeLA, RK, IB-RS2, Ehrlich asites tümör hücreleri (fare), L hücreleri (fare) devamlı hücre kültürü hatlarında üredikleri bildirilmiş olup, genel anlamda enterovirusların enfekte ettiği konağa spesifik primer böbrek hücre kültürlerinde üretilmesinin mümkün olduğu

belirtilmektedir. Ayrıca virus embriyolu tavuk yumurtasında ve buradan köken alan hücrelerde de üretilebilir (Knowles ve Mann., 1990).

Sığır enterovirusların farklı türlerin eritrositlerini hemaglutine ettiği bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda BEV-F türünde yer alan virusların kobay eritrositlerini, BEV-E türünde yer alan virusların ise kobayların yanısıra koyun, rhesus maymunu gibi farklı memeli eritrositlerini de aglutine ettiği saptanmıştır (Knowles ve Mann, 1990).

Günümüzde gerek virus tespiti ve gerekse serolojik çalışmalarda hızlı, çok sayıda materyalin test edilebilmesine imkan sağlayan ELISA kullanımı tercih edilebilmektedir. Ancak muhtemelen enterovirusların tanıda sıklıkla ihmal edilen etken olması nedeniyle ticari ELISA kiti geliştirildiği yönünde bir bilgi bulunmamaktadır. Bununla birlikte antijen tespitine yönelik ELISA sistemlerinin geliştirilmesi yönünde bir çalışma bulunmaktadır (Höfner ve ark., 1993).

Serolojik tanıda nötralizasyon ve plak redüksiyon nötralizasyon, immunodifüzyon ve hemagglutinasyon inhibisyon testleri kullanılabilir (Knowles ve Mann, 1990). BEV antikorlarının şap virusu ve veziküler stomatis ile çapraz reaksiyon vermesi nedeniyle tanı koyarken bu durum göz önüne alınmalıdır. Ticari dağıtımı olmamakla beraber BEV antikor tespiti için iki farklı (blocking ve capture) ELISA testi tanımlanmıştır (Zhang ve ark., 1989 ve Zhang ve ark., 1990).

Günümüzde hastalıkların hızlı tanısı ve virus genetiğinden hareketle moleküler epidemiyolojik ve patolojik değerlendirmelerin yapılabilmesi, korunma ve eradikasyon tedbirlerinin oluşturulabilmesi için PCR temelli tekniklerin kullanımı önemli bir yer almaktadır. Nitekim sığır enterovirusları üzerine son yıllarda yapılan çalışmalarda da hızlı tanı amacıyla 5'UTR gen bölgesine yönelik primerler kullanılarak uygulanan PCR sıklıkla kullanılmaya başlanılmıştır (Boros ve ark., 2012; Kosoltanapiwat ve ark., 2016; Shaukat ve ark., 2012 ve Zhu ve ark., 2014). Ayrıca özellikle çevre kontaminasyonu ve su ürünlerinin kontaminasyonu üzerine yapılan çalışmalarda, RT-PCR'in yerine daha hızlı ve duyarlı olan qRT-PCR

kullanımı tercih edilmeye başlanmıştır (Jimenez-Clavero ve ark., 2005). Enterovirusların serotip ayrımı için ise, günümüzde başlıca VP1 olmak üzere kapsit gen bölgesini esas alan RT-PCR uygulamaları kullanılmaktadır (Boros ve ark., 2012; Oberste ve ark., 1999a; Oberste ve ark., 1999b; Tsuchiaka ve ark., 2017 ve Zell ve ark., 2004).

1.7. Koruma ve Kontrol

Virus nedenli birçok enfeksiyonda olduğu gibi sığır enterovirus enfeksiyonları için spesifik bir tedavi bulunmamaktadır. Bu nedenle iyi bakım ve beslenme koşullarının sağlanması, hijyen kurallarına uyulması gibi yaklaşımlar enterovirus enfeksiyonlarından korunmak için de önem taşımaktadır. Ayrıca enterovirus enfeksiyonlarından korunmaya yönelik spesifik aşı uygulaması bulunmamaktadır. Bununla birlikte son yıllarda BEV virusun bazı yapısal özelliklerinden hareketle, farklı etkenler için aşı vektörü olarak kullanılabilmesi düşünülmüş ve birçok çalışma yapılmıştır (Chang ve ark., 2013; Chu ve ark., 2013; Smyth ve ark., 1990; Smyth ve ark., 1992 ve Wang ve ark., 2012).

BEV'in sınırlı patojenitesinin olması, bu virusun küçük moleküllere vektörlük yapabileceği düşüncesini doğurmuştur. Ayrıca BEV'in aşı vektörü olarak kullanılabilmesine izin veren bazı özellikleri vardır. Virusun fiziksel olarak dayanıklı olmasının yanısıra, hem lipit çözücülerine dirençli hem de değişken pH'larda stabil kalabiliyor olması en önemli özelliklerindedir. Ayrıca organizmaya oral yolla girmesi de, aşının oral olarak uygulanabilmesi kolaylığını beraberinde getirmektedir ki, bu durum da mukozal immunitenin uyarılması da mümkün olabilmektedir. Mukozal immunitenin uyarılması önemli olup, diğer bazı enteroviruslarda olduğu gibi BEV'ler sindirim sisteminin zorlu koşullarında inaktivasyona uğramadan bu görevi başarabilmektedirler. İnsan poliovirusunun insan immun yetmezlik virusu (HIV) epitopunu ifade edecek şekilde rekombine edilip yüksek miktarda antikor yanıtı alındığı bir çalışma ile picornavirusların epitop insersiyonuna uygun olduğu uzun yıllar önce ispatlanmıştır (Evans ve ark., 1989). Sonrasında yapılan çalışmalarla

da picornavirusların kapsit proteinlerini kodlayan gen bölgeleri içine yabancı proteinleri kodlayan genlerin eklenebildiği görülmüştür (Chang ve ark., 2013; Chu ve ark., 2013 ve Wang ve ark., 2012). Bu konuda BEV-F virusu ile gerçekleştirilen bir çalışmada, kapsit proteinlerini kodlayan gen bölgesi boyunca 22 muhtemel insersiyon bölgesi bulunduğu; ancak bunlardan ikisinin yabancı proteinleri kodlayan gen parçalarının insersiyonuna izin verdiği bildirilmiştir. (Chang ve ark., 2013).

Sığır enterovirusların aşı vektörü olarak kullanımlarının son yıllarda araştırmalara konu olması, enterovirus enfeksiyonlarının yaygınlığının belirlenmesi, tür ve serotiplerin tanımlanması ve bunlar arasındaki antijenik yakınlıkların irdelenmesi gereğini doğurmaktadır. Çünkü bir aşı vektörünün popülasyonda replike olmasına engel olan faktörlerin bulunmaması gereklidir. Dolayısıyla hedef popülasyonun maruz kaldığı ya da maruz kalma olasılığının bulunduğu yerel suşlar ve yaygınlıkları bilinmelidir. Bu noktada seroprevalans çalışmaları da önemli bir yer tutmaktadır. Özellikle serotipler arası antijenik yakınlığın ve dolayısıyla serotipler arasında meydana gelecek olan çapraz bağışıklık reaksiyonlarının bilinmesi gereklidir. Bununla beraber bazı picornavirusların vektör olarak kullanıldığı bazı aşılarda, in vivo ortamda antikor bulunmasına rağmen var olan immunitiyi aşp, hedef antikor yanıtı oluşturduğu gösterilmiştir (Chu ve ark., 2013 ve Mandl ve ark., 2001). Bu durum elbette aşılama stratejisi ile de yakından ilgili bir durumdur.

Bu çalışmada, tüm bu bilgiler göz önüne alınarak, Türkiye'deki farklı klinik olgularda BEV varlığını sorgulamak, moleküler tabanlı serotiplendirme ile sahada bulunan tür ve serotipleri belirlemek, tanı kitleri ve aşı vektörü gibi daha ileri çalışmalarda kullanmak amacı ile BEV izolatu kazanmak ve moleküler temelli sınıflandırma ile belirlenen farklı serotipli BEV izolatları arasında çapraz bağışıklık olup olmadığını sorgulamak amaçlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Örneklenen Hayvanlar ve Tanı Materyalleri

Bu çalışmada Ankara, Kars, İzmir, Hatay, Bursa, Manisa illerindeki devlet ve halk elindeki işletmelerden solunum ve sindirim sistemi bulguları gösteren sığırlar ile klinik olarak sağlıklı görümlü sığırlar ve aborte fötuslardan sağlanan materyaller (nazal swap, gaita, nekropsi örneği) yanı sıra Anabilim Dalımızda daha önceleri gerçekleştirilen araştırmalar sırasında temin edilen, ishalleri buzağılara ait retrospektif örnekler de değerlendirildi. Araştırmada retrospektif örneklemler de dahil olmak üzere toplam 185 gaita, 30 nazal swap ve 12 abort olmuş fetusa ait 48 organ örneği (karaciğer, dalak, akciğer, lenf yumrusu) olmak üzere toplam 227 hayvana ait 263 materyal kullanıldı (Çizelge 2.1).

Çalışma süresinde materyal temin edilen hayvanların yaş dağılımları genel olarak değerlendirildiğinde, büyük çoğunluğunun 2-4 yaş arası erişkin hayvanlardan oluştuğu görülmektedir. Retrospektif örnekler 0-2 aylık buzağılara aittir.

Çizelge 2.1. Tanı materyallerinin dağılımı

	Gaita		Nasal Swap		Nekropsi örneği	Yaş bilgisi
	Sağlıklı	İshalli	Sağlıklı	Solunum Problemlili		
Retrospektif	-	77	-	-	-	0-2 ay
Ankara	25	6	-	-	-	0-4 yaş
İzmir	-	3	-	4	-	2-4 yaş
Hatay	5	1	-	-	-	2-4 yaş
Bursa	22	-	10	-	-	8-12 ay
Manisa	8	-	-	3	-	2-4 yaş
Kars	38	-	13	-	12 (48)*	2-4 yaş
TOPLAM	185		30		12(48)*	

*: 12 Hayvana ait toplam 48 organ materyali.

2.1.2. Deney Hayvanı

İzole edilen farklı serotip sığır enterovirusları arasında çapraz nötralizasyonun araştırılması için kullanılacak tip spesifik hiperimmün serumların elde edilmesi amacıyla 6 adet Yeni Zelanda tavşanı kullanıldı. İmmünizasyon çalışmalarında kullanılan tavşanlar, Ankara Üniversitesi Deney Hayvanları ve Araştırma Laboratuvarı'ndan (DEHAL) temin edildi ve hiperimmünizasyon çalışması ilgili birimde yürütüldü (Ankara Üniversitesi Yerel Etik kurul kararı: 2015-4-85 ve 2017-8-68).

2.1.3. Hücre Kültürü

5'UTR gen bölgesi hedefli RT-PCR ile BEV yönünden pozitif olarak tespit edilen materyallerden virus izolasyonu, izole edilen virusların titrelerinin belirlenmesi, hiperimmünserum hazırlanması için kullanılacak virusun üretilmesi ve nötralizasyon testlerinde Anabilim Dalımız laboratuvarında mevcut MDBK (Madin-Darby Bovine Kidney) hücre hattı kullanıldı.

2.2. Yöntem

2.2.1. Örneklerin Hazırlanması

Gaita örnekleri, PBS (Phosphate Buffer Saline) ile %10-%20 oranında sulandırılarak, +4°C'de, 1200 xg'de, 20 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant steril bir stok tüpüne alındı. Santrifüj sonunda üst sıvıdan 250 µl alınarak RNAase free steril 1,5 ml'lik tüpe aktarıldı. Geriye kalan miktar ise, steril tüpler içerisinde -80°C'de saklandı.

Nazal swap örnekleri içlerine 2 ml PBS (Phosphate Buffer Saline) konularak, 30 saniye vortekslendi ve 1200 xg'de, 20 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant steril bir stok tüpüne alındı. Santrifüj sonunda üst sıvıdan 250 µl alınarak RNAase free steril 1,5 ml'lik tüpe aktarıldı. Geriye kalan miktar ise, steril tüpler içerisinde -80°C' de saklandı.

Aborte fetustan sağlanan organ örnekleri (1 g) bistüri yardımı ile iyice parçalanıp homojenize edildikten sonra 9 ml PBS (Phosphate Buffer Saline) eklenerek 15 ml santrifüj tüpüne aktarıldı. 30 saniye vortekslendi ve sonrasında 1200xg'de, 20 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant steril bir stok tüpüne alındı. Santrifüj sonunda üst sıvıdan 250 µl alınarak RNAase free steril 1,5 ml'lik tüpe aktarıldı. Geriye kalan miktar ise, steril tüpler içerisinde -80°C' de saklandı.

2.2.2. BEV Tanısı ve Serotiplerinin Belirlenmesi için PCR Uygulamaları

2.2.2.1. Viral Nükleik Asit İzolasyonu

BEV'lerin RNA'sını elde etmek amacıyla, RNA ekstraksiyonu TRIzol® LS Reagent (Thermo Fisher Scientific, 10296-028) ile yapıldı. Bu amaçla;

1. Hazırlanan tanı materyallerinden 250 µl alınarak steril 1,5 ml'lik polistiren tüplere aktarılarak üzerine 750 µl TRIzol® LS Reagent solüsyonu eklendi ve oda sıcaklığında 5 dakika beklendi.
2. Ardından üzerine 200 µl kloroform eklendi ve elle şiddetli bir şekilde yaklaşık 10 saniye çalkalandı ve oda sıcaklığında 2-15 dakika beklemeye bırakıldı.
3. Daha sonra örnekler 12000 xg'de 15 dk +4°C'de santrifüj edildi.
4. Santrifüj sonrası üstte oluşan sulu fazdan yaklaşık 525 µl yeni bir 1,5 ml'lik tüpe aktarıldıktan sonra üzerine %100'lük isopropanol eklendi ve oda sıcaklığında 10 dakika beklemeye bırakıldı.
5. Daha sonra örnekler 12000 xg'de 10 dk +4°C'de santrifüj edildi.
6. Santrifüj sonrası polistiren tüpün içerisindeki isopropanol, tüpün içerisinde sadece pellet kalacak şekilde, tamamen uzaklaştırıldı.
7. Daha sonra polistiren tüpün içerisine -20°C'de %75'lik etanol eklendi ve vortekslendi.
8. Daha sonra örnekler 7500 xg'de 5 dakika +4°C'de santrifüj edildi.
9. Tüplerin içerisindeki etanol tamamen uzaklaştırıldı ve tüplerin içinde kalan pellet kurumaya bırakıldı.
10. Kuruyan pellet 20-50 µl nükleaz free su ile sulandırıldıktan sonra ısı bloğunda 55°C'de 10-15 dakika inkübe edildi.

11. Son olarak tüpler PCR uygulamalarında kullanılmak üzere -20°C 'de muhafaza edildi.

2.2.2.2. BEV Tanısı için PCR Tekniği

Tanı materyallerinde BEV varlığının sorgulanması amacıyla, Çizelge 2.2'de bildirilen 5'UTR gen bölgesini hedef alan primerler kullanılarak Onestep-RT-PCR tekniği kullanıldı.

Ekstraksiyon sonrasında elde edilen viral RNA'nın revers transkripsiyonu amacıyla Thermo Scientific Verso 1-Step RT-PCR Reddy Miks (#AB-1454/LD/B) kullanıldı. Onestep-RT-PCR'in kullanılan miks bileşenleri ve döngülerine ait zaman/siklus bilgileri Çizelge 2.3'de gösterildi.

Çizelge 2. 2. 5'UTR ve kapsit gen bölgeleri tespitinde kullanılan primerler.

Primer	Dizin (5'→3')	Hedef bölge	Ürün Büyüklüğü	Genom Lokasyonu	Kaynak
5'UTR F	GGG AGT AGT CCG ACT CCG	5' UTR	276 bp	393-669	Boros ve ark. (2011)
5' UTR R	CRG AGC TAC CAC TGG GGT				
VP1-F	CCA TGT GGT AYC ARA CIA AYA TGGT	VP1	1084 bp	2354-3438	Zhang ve ark. (2014)
VP1-R	GAT TGC CAI ACT TCA TTY TCC CA				
VP2-F	TGA AGC TTG CGG GTA TAGT	VP2	714 bp	1041-1755	Bu çalışmada tasarlandı
VP2-R	CCG CCT CAA ACC CGT TGAA				Bu çalışmada tasarlandı
VP3-F	CCC TGT ATT CTG CCT AAGT	VP3	637 bp	1831-2468	Bu çalışmada tasarlandı
VP3-R	GGG CGG TCC TTC ATT ATG				Bu çalışmada tasarlandı

Çizelge 2.3. OneStep-RT-PCR miks bileşenleri ve programı

Bileşen	Konsantrasyon (µl)	
Verso Enzim Mix	0,5	42 °C’de 60 dk
2X 1-Step ReddyMiks	12,5	95 °C’de 5 dk
RT Enhancer	1,25	
Primer F(10 pmol/µl)	0,5	95 °C’de 30 sn
Primer R (10 pmol/µl)	0,5	
Nükleaz İçermeyen Su	6,75	(*) °C’de 30 sn
RNA	3	
Toplam	25	72 °C’de 1 dk
		72 °C’de 7 dk

* Farklı PCR uygulamalarında kullanılan annealing dereceleri metinde bildirilmiştir.

5’ UTR gen bölgesinin çoğaltılmasında uygulanan OneStep-RT-PCR için; cDNA sentez aşaması 42°C’de 60 dk, başlangıç denatürasyonu 95°C’de 5 dk, denatürasyon aşaması 95°C’de 30 sn, uzama aşaması 72 °C’de 1 dk ve son uzama aşaması 72°C’de 7 dk olarak, toplam her PCR döngüsü 35 siklustan oluştu (Çizelge 2.3). Bu uygulamada annealing derecesi 57°C olarak kullanıldı.

2.2.2.3. BEV Kapsit Proteinlerini (VP1, VP2, VP3) Kodlayan Gen Bölgeleri için Uygulanan PCR Tekniği

BEV tanısı amacıyla uygulanan PCR ve ardından yapılan virus izolasyonu sonrasında elde edilen BEV izolatlarına, serotiplerinin belirlenmesi amacıyla VP1, VP2 ve VP3 kapsit gen bölgelerini hedef alan primerler kullanılarak Onestep-RT-PCR tekniği kullanıldı (Çizelge 2.2). VP1 bölgesi için Zhang ve ark. (2014) tarafından bildirilen primer çifti kullanıldı. VP2 ve VP3 bölgelerine yönelik primerler ise CLC Main Workbench 6 (CLCbio-Qiagen, Aarhus, Denmark) yazılımı kullanılarak tasarlandı (Çizelge 2.2). Bunun için Gen Bankası’nda KM667941 numarası ile kayıtlı olan KM667941 EV-E izolatının dizin bilgisi kullanıldı.

Bu uygulamalarda tanı amacıyla uygulanan 5’UTR gen bölgesi hedefli PCR’da olduğu gibi Thermo Scientific Verso 1-Step RT-PCR Reddy Miks (#AB-1454/LD/B) kiti ve Çizelge 2.3’de bildirilen miks bileşenleri ve döngülerine ait zaman/siklus bilgileri kullanıldı. BEV tanısı ve VP1, VP2 ve VP3 gen bölgelerini hedef alan PCR

uygulamalarında pozitif kontrol olarak BEV-E (Alkan ve ark., 2014) kullanıldı. PCR optimizasyon çalışmaları sonunda, annealing derecesi VP1 gen bölgesi için 59°C, VP2 gen bölgesi için 57°C ve VP3 gen bölgesi için 59°C olarak uygulandı.

2.2.2.4. PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi

PCR sonucunda elde edilen amplifikasyon ürünlerini görüntülemek için, ethidium bromid içeren (Sigma, ABD) %1'lik agaroz jel (Prona, EU) hazırlandı. Hem tank tamponu olarak, hem de agaroz jelin hazırlanmasında TAE (Tris Asetat Ethylene Diamine Tetra Acetic acid) tampon solüsyonu kullanıldı. 0,5 x TAE solüsyonu içinde ısı yardımıyla (mikro dalga fırın) çözülen agaroz, bir miktar soğutulduktan sonra üzerine ethidium bromide (0,5 µg/ml, Sigma, ABD) solüsyonu eklendi. Soğutulan bu agaroz jel karışımı, jel tarakları yerleştirilmiş olan jel taşıyıcısına döküldü. Donan agaroz jeldeki taraklar çıkarılarak, elektroforez tankına yerleştirildi. Thermo Scientific Verso 1-Step RT-PCR Reddy Miks kullanılan PCR örnekleri doğrudan, diğer PCR ürünleri ise yükleme boyası (6x Loading Dye, Fermentas, Litvanya) ile 1 kısım boyaya 5 kısım PCR ürünü olmak üzere karıştırılarak tarakların çıkarılmasıyla oluşan kuyucuklara dikkatlice konuldu. Ürün büyüklüğünün yaklaşık olarak belirlenebilmesi için 100 bp'lik marker (Fermentas, Litvanya) solüsyonundan (1 kısım stok marker + 1 kısım yükleme boyası + 4 kısım su) her bir kuyucuğa 1 µl olarak yüklendi. Daha sonra ürünler elektrik akımına tabi tutularak (8 volt/cm) yaklaşık 30 dk sonra jel görüntüleme sistemi (Kodak, Gel Logic 100, ABD) kullanılarak, PCR sonucu oluşan DNA bantları görüntülendi.

2.2.2.5. Dizin Analizi

5'UTR ve VP1 gen bölgelerine ait PCR ampikonlarının dizin analizi ticari bir firmadan hizmet alımı şeklinde gerçekleştirildi.

2.2.2.6. Dizin Analizi Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Analiz sonrası elde edilen ham veriler, National Center Biotechnology Information (NCBI) servisinin Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) web sayfasında sağlanan (BankIt) hizmetinden yararlanılarak tanımlandı. Dizinler Aliview (Larsson, 2014) kullanılarak kendi aralarında karşılaştırıldı. Aynı programın çoklu hizalama (multiple alignment) özelliğinden yararlanılarak Gen Bankası'ndan elde edilen virusların dizinleri ile hizalandı. Nükleotit ve aminoasit benzerlik tabloları çevrimiçi SIAS sitesi (Sequence Identity and Similarity, Erişim: 25.10.2017) kullanılarak hazırlandı.

2.2.2.7. Filogenetik Analiz

Diğer ülkelerde tespit edilen saha suşlarının dizinleri ile, çalışmada elde edilen saha suşları arasındaki genetik yakınlığın ortaya konulması amacıyla nükleik asit dizinleri üzerinden gerçekleştirilen filogenetik analiz için MEGA versiyon 6.0 (Tamura ve ark., 2013) programı kullanıldı. Bu amaçla FASTA formatına çevrilen tüm verilere Neighbour-Joining metoduna göre bootstrap analizi (1000 replicates) yapıldı. Analizde p-distance parametresi kullanıldı.

2.2.3. Virus İzolasyonu

2.2.3.1. Hücre Kültürünün Üretilmesi

Anabilim Dalı stoklarında -80°C'lik derin dondurucu içerisinde bulunan MDBK hücreleri, 37°C'lik su banyosu içerisinde çözdürüldükten sonra 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj işlemine tabi tutuldu. Dipte kalan pellet 4,5 ml DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) ile sulandırılarak 50 ml'lik hücre kültürü şişelerine aktarıldı. Üzerine 0,5 ml inaktive edilmiş fetal dana serumu (FDS)

konuldu. 37°C'lik %5 CO₂'lik etüvlere kaldırılarak üremesi günlük olarak kontrol edildi. Hücreler buldukları kabın yüzeyi kapladıktan sonra pasajlanması amacıyla hücre kültürü şişesi içindeki sıvı dökülerek DMEM ile yıkandı. Daha sonra %0,25'lik Tripsin ile yıkandı. Hücre kültürü şişesi içerisindeki sıvı atılarak hücrelerin bağlarının çözülerek yüzeyden uzaklaştırılması amacıyla yeterli süre 37°C'lik etüvde bekletildi. Hücreler yüzeyden kalktıktan sonra sulandırmak amacıyla DMEM eklenerek pipete edildi. İstenilen yoğunlukta hücre kültürü şişesi içerisinde sulandırma solüsyonu bırakılarak, hücre kültürü şişesi içerisindeki sıvı DMEM kullanılarak 4,5 ml'ye tamamlandı. Üzerine 0,5 ml FDS katıldı. 37°C'lik %5 CO₂ içeren etüve kaldırıldı. Hücre kültürü şişesi üremesi açısından günlük olarak doku kültürü mikroskopunda kontrol edildi.

2.2.3.2. Tanı Materyallerinin Hücre Kültürüne Ekimi

RT-PCR ile BEV varlığı saptanmış olan gaita örnekleri 0,2 µm çapındaki filtrelerden geçirildi. Yüzeyi %80'ini kaplamış 50 ml'lik hücre kültürü şişesindeki MDBK hücre kültürleri içindeki vasat dökülüp DMEM ile yıkandıktan sonra 0,5 ml sıvı inokule edildi. Virus inokulasyonu yapılmış hücre kültürleri, %5 CO₂ içeren 37°C'lik etüve 1 saat süreyle virusun adsorbe olması amacıyla inkübasyona bırakıldı. Adsorbsiyon tamamlandıktan sonra üzerine 4,5 ml DMEM eklendi. Hücreler inkübasyon için %5 CO₂ içeren 37°C'lik etüve kaldırıldı ve CPE oluşumu yönünden günlük mikroskop kontrollerine tabi tutuldu. CPE oluşuktan sonra hücrelerin donarak parçalanması amacıyla derin dondurucuya (-80°C) konuldu. Hücre kültürü donduktan sonra 37°C'lik su banyosu içerisinde çözdürüldü. Bu işlem üç kere tekrarlandıktan sonra hücre kültürü şişesi içindeki sıvı tüpe alınarak 3000 rpm'de 30 dakika santrifüj edildi. Süpernatant alınarak 1,5 ml'lik tüplere konuldu ve -80°C'lik derin dondurucuya kaldırıldı. Her bir izolat 5 kez pasajlanarak her seferinde yukarıdaki işlemler tekrarlandı. Ayrıca herbir pasaj sonrasında, pasaj sıvılarına RT-PCR uygulanarak, virus üremesi doğrulandı.

2.2.4. Hiperimmün Serum Elde Edilmesi

2.2.4.1. Virus Seçimi ve Üretimi

Tanı materyallerinin 4. pasajından elde edilen pasaj sıvılarına bölüm 2.2.2’de detayları bildirildiği şekilde 5’UTR ve VP1 gen bölgesi hedefli PCR uygulaması ve dizin analizi verilerinin değerlendirilmesi sonucunda, tespit edilen 3 farklı serotipi temsilen seçilen 3 saha virusu (114-TR2016, K38-TR2016, 5471-TR2016), bölüm 2.2.3.2’de bildirilen yöntemle hiperimmunizasyon çalışmasında kullanılmak üzere üretildi. Çalışma sonunda her bir izolat için toplam 100 ml virus süspansiyonu elde edildi.

2.2.4.2. Virus Titrasyon Testi (VT)

Hiperimmunizasyon çalışması için 3 farklı serotipi temsilen seçilen izolatların 5. pasajlarının virus titreleri, hem nötralizasyon testinde kullanılmak için hem de virus miktarının konsantrasyon çalışması için uygunluğunu değerlendirebilmek için belirlendi. Bu amaçla;

Hücre kültürlerinde üretilen virus, polistren tüplerde \log_{10} tabanına göre sulandırıldı (900 μ l DMEM + 100 μ l virus). Her sulandırmadan 96 gözlü mikrotitrasyon pleytinin ayrılan 4 gözüne 100 μ l aktarıldı. Testin değerlendirilmesi için gerekli olan hücre kontrol (100 μ l serumlu DMEM) ve virus kontrol (100 μ l $\frac{1}{2}$ virus sulandırması) hazırlandı. Gözlerde bulunan sulandırmalar, hücre ve virus kontrol üzerine, 300.000 hücre/ml yoğunluğunda MBDK hücre kültürü süspansiyonundan 100 μ l eklendi. Tabletler 37°C’lik etüve kaldırıldı. Titre hesaplamak için Spearman-Kärber (Karber, 1931) formülü kullanıldı.

2.2.4.3. Virusların İnaktivasyonu

Her bir izolat için elde edilen virus süspansiyonları üzerine 0,1 M Binary ethileneimine (BEI) çözeltisi kullanılarak virusu inaktive etmek hedeflendi. Bunun için üretilen viruslar steril vidalı kapaklı cam şişelere 50'şer ml alınarak, üzerlerine toplam BEI hacmi %2 olacak şekilde 0,1 M'lik BEI çözeltisinden 1 ml eklendi. Cam şişelerin içerisine steril manyetik çubuk konularak 24 saat boyunca 37°C'ye ayarlanmış manyetik karıştırıcılar üzerine konuldu. Bu süre sonrasında BEI'nin nötralize edilmesi amacıyla 1 M steril sodyum thiosülfat çözeltisinden, virus süspansiyonuna konulan BEI hacminin %10'u oranında (100 µl) eklenerek 1 saat daha karışmaya bırakıldı.

2.2.4.4. Hiperimmunizasyon için Virusların Ultrasantrifüjü

İnaktive edilen viruslar konsantre edilmesi amacıyla Hitachi CP100NX ultrasantrifüj cihazında santrifüj işlemine alındı. Bunun için cihazın 30 ml hacimli tek kullanımlık tüpleri içerisine %40'luk steril sukroz çözeltisinden 5 ml konulduktan sonra inaktive edilen virus çözeltileri sukroz ile karışmayacak şekilde damla damla eklendi. Her bir 500 ml flask için 2 adet tüp konuldu. Tüplerin ucu kapatılarak ultrasantrifüj cihazı içerisine yerleştirildi ve 4°C'de 25.000 xg'de 4 saat çevrildi. Oluşan pellet 1 ml steril fizyolojik tuzlu su ile sulandırıldı. Enjektörle pipete edilen pelletin tam çözünmesi amacıyla 4°C'de bir gece beklendi ve sonra tekrar pipete edilen çözelti 0,2 µm çapındaki filtreden süzüldü.

2.2.4.5. İnaktivasyonun Kontrolü

İnaktivasyon ve ultrasantrifüj işlemi sonrasında elde edilen 3 farklı serotip virus süspansiyonları bölüm 2.2.3.2'de bildirilen yöntemle, MDBK hücre kültürlerine ekildi ve 5 gün süresince CPE oluşumu yönünden değerlendirildi. Ayrıca

inaktivasyon işlemi sonrasında elde edilen virus süspansiyonları BEV 5'UTR gen bölgesi PCR ile de kontrol edilerek, virus varlığı teyit edildi.

2.2.4.6. Deneme Hayvanlarına İnokulasyon

Deneme hayvanlarına izolatların verilmesi öncesinde, kan örnekleri alındı. Daha sonra hiperimmün serum elde edebilmek amacıyla 3 uygulama gerçekleştirildi.

İlk enjeksiyon için ultrasantrifüj sonrası elde edilen inaktive virus çözeltisinden 0,5 ml hacimde alınarak eşit hacimde Freund's complete adjuvanı (Sigma-Aldrich, USA) ile karıştırıldı. Elde edilen emülsiyon enjektörleri ile tavşanların sırt derisi altına (s.c.) inokule edildi. Onbeş gün ara ile tekrarlanan sonraki 2 inokulasyonda ise serotip izolatlarına ait inaktive virus çözeltileri Freund's incomplete (Sigma-Aldrich, USA) adjuvanı ile karıştırılarak enjeksiyonlar yapıldı. Kırkbeşinci gün alınan kan örneklerinin serum fraksiyonu ayrıldıktan sonra ısı ile inaktivasyonu yapıldı. Elde edilen serumlardaki serotip spesifik antikorların varlığı çapraz nötralizasyon testi ile araştırıldı.

2.2.4.7. Virus Nötralizasyon Testi (VNT)

Hiperimmunizasyon çalışmasının hemen öncesinde ve ilk immunizasyonu izleyen 45. günde alınan kan örnekleri, 3 farklı serotipe ait izolat için (114-TR2016, K38-TR2016, 5471-TR2016) antikor varlığını sorgulamak amacıyla nötralizasyon testine tabi tutuldu. Bu amaçla Frey ve Liess'in (1971) bildirdiği yöntemle nötralizasyon testi yapıldı.

Bu amaçla 96 gözlü mikronötralizasyon tabletinde, her bir serum örneği log₂ tabanına göre 6 basamak sulandırıldı (1:5, 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160) ve 4'er göze 50 µl olacak şekilde konuldu. Serum sulandırmaları üzerine 100DKID₅₀ oranında sulandırılmış virustan 50 µl eklenip, 1 saat 37°C'de inkubasyona bırakıldı. Hücre

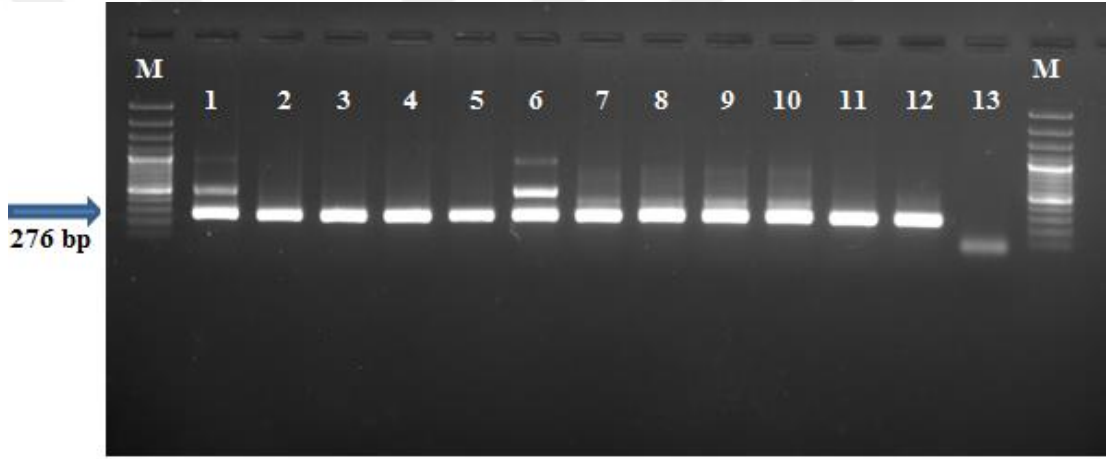
kontrol hazırlamak için 100 µl DMEM; virus kontrol hazırlamak için ise 50 µl DMEM ve 50 µl sulandırılmamış virus kullanıldı. Serum sulandırmaları, hücre ve virus kontrol üzerine, 300.000 hücre/ml olacak şekilde hazırlanmış olan MDBK hücre süspansiyonundan 50 µl eklendi ve test tabletleri 37°C'lik etüvde inkubasyona bırakıldı. Virus kontrol gözlerinde CPE gözleendiği 3. günün sonunda test değerlendirildi ve serum örneklerinin SN₅₀ değerleri hesaplandı.



3. BULGULAR

3.1. BEV Tanısı için RT-PCR Sonuçları

Örneklerin 5'UTR bölgesine yönelik tanı primerleri ile sorgusu için uygulanan RT-PCR sonrasında, toplam 263 materyalden 63'ünün beklenen büyüklükte (276 bp) ürün oluşturduğu belirlendi (Şekil 3.1). Elde edilen PCR ürünlerinden uygun olanlarının dizinleri hizmet alımı yoluyla elde edildi ve dizinlerin EV'lerin hedef gen bölgesiyle (5' UTR gen bölgesi) uyumlu oldukları görüldü.



Şekil 3.1. 5'UTR gen bölgesine göre yapılan PCR jel görüntüsü

M: DNA merdiveni (100 bp), 1-11:Pozitif örnekler, 12: Pozitif Kontrol, 13: Negatif Kontrol.

RT-PCR sonucunda BEV pozitif oldukları saptanan örneklerin çoğunluğunun gaita olduğu, nekropsi örneklerinin tümünün negatif sonuç verdiği görüldü. Dolayısıyla örneklenen hayvan bazında değerlendirildiğinde, pozitiflik oranı %28 (63/227) olarak belirlendi.

BEV pozitif örneklerin materyale göre dağılımı incelendiğinde; pozitif örneklerin 62 gaita ve 1 nazal swap örneği olduğu görüldü (Çizelge 3.1). Klinik bulgulu ve sağlıklı hayvanlar yönünden değerlendirildiğinde ise, BEV pozitifliğinin sağlıklı görünümlü sığırların gaitalarında %57,1 (56/98), ishalleri buzağılardan sağlanan gaitalarda % 6,8 (6/87) ve nazal swap örneklerinde %3,3 (1/30) şeklinde

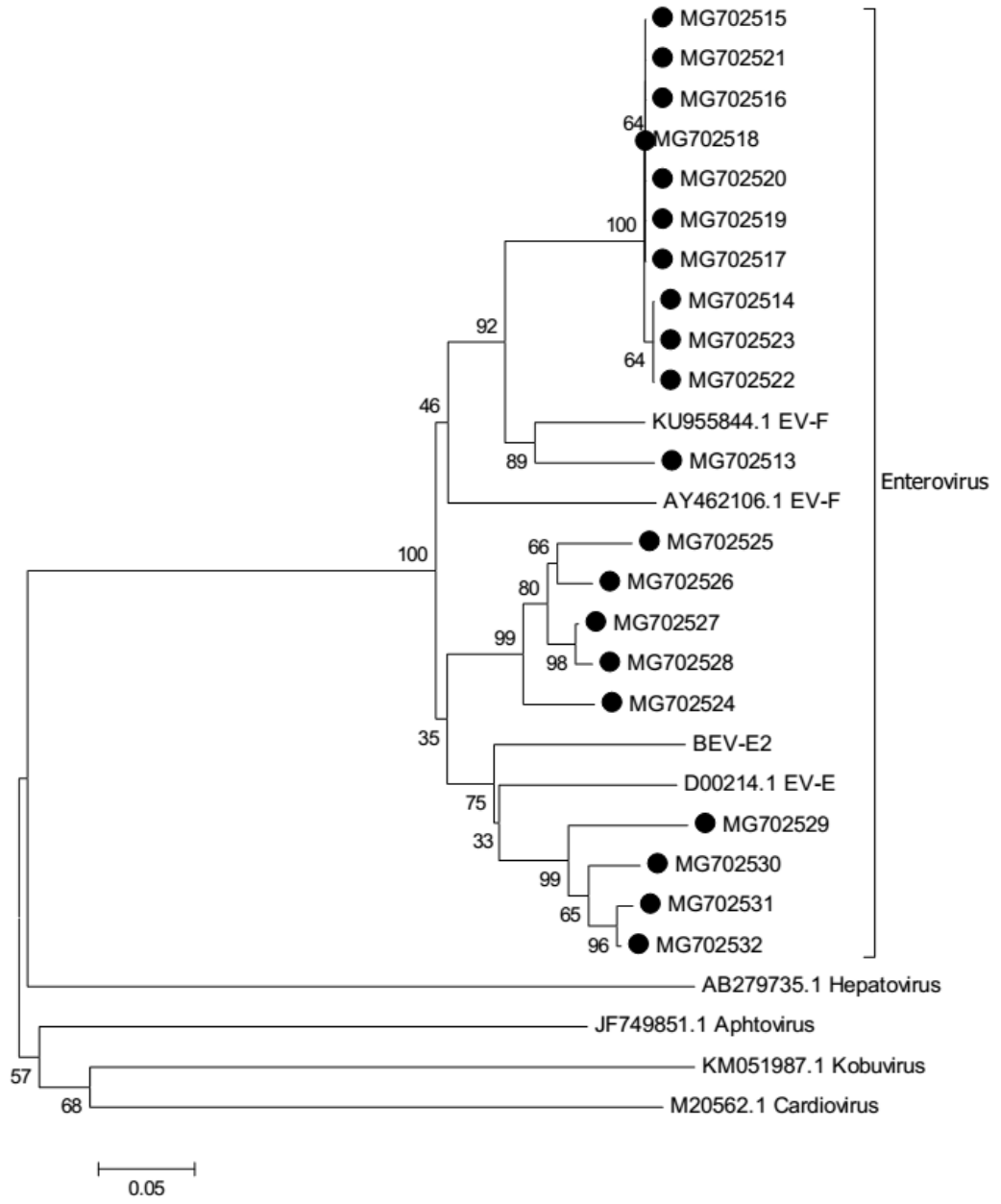
dağılım gösterdiği belirlendi. Araştırmada kullanılan gaita örneklerinin tümü dikkate alındığında, pozitiflik oranı %33,5 (62/185) olarak hesaplandı. Bununla birlikte retrospektif örnekler hariç tutularak bir değerlendirme yapıldığında, ishalleri ve sağlıklı hayvanlar için sırasıyla %50 (5/10) ve %57 (56/98) pozitiflik oranları olmak üzere, gaita örneklerinin tümü için %56 (61/108) oranında pozitiflik saptandı.

Çizelge 3.1. Örneklenen materyallere göre BEV pozitiflik dağılımı

	Gaita (n=185)				Nasal Swap (n=30)				Nekropsi Örneği (n=48)		İzolasyon
	Sağlıklı		İshalleri		Sağlıklı		Solunum Problemlili		Hayvan sayısı	BEV +	
	Hayvan sayısı	BEV + (%)	Hayvan sayısı	BEV + (%)	Hayvan sayısı	BEV + (%)	Hayvan sayısı	BEV + (%)			
Retrospektif	-	-	77	1	-	-	-	-	-	-	-
Ankara	25	21	6	1	-	-	-	-	-	-	5
İzmir	-	-	3	3	-	-	4	-	-	-	1
Hatay	5	5	1	1	-	-	-	-	-	-	1
Bursa	22	19	-	-	10	-	-	-	-	-	5
Manisa	8	4	-	-	-	-	3	-	-	-	3
Kars	38	7	-	-	13	1	-	-	12 (48)*	-	5
TOPLAM	98	56 (57,1)	87	6 (6,8)	23	1 (3,3)	7	-	12 (48)*	-	20

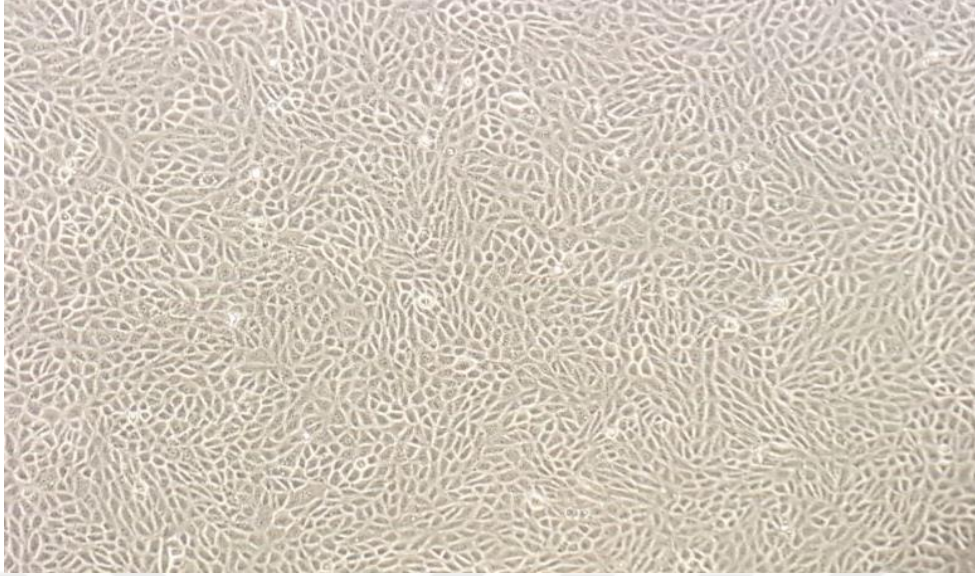
3.2. Virus İzolasyonu

5'UTR bölgesi RT-PCR sorgulamasından elde edilen sonuçlara göre, pozitif olarak belirlenen örneklerin MDBK hücre kültürüne inokulasyonu sonucunda 20 gaita örneğinin hücre kültüründe BEV üremesi ile uyumlu CPE oluşumuna neden olduğu saptandı. Normal hücrelerin görüntüsü ve oluşan sitopatolojik etkinin görüntüsü sırasıyla Şekil 3.3 ve Şekil 3.4'de gösterildi. Bu 20 izolat, 5 pasaj sonrasında 5'UTR gen bölgesi yönünden RT-PCR sorgulamasına alındı. Elde edilen ampliconların dizinleri Gen Bankası'nda yer alan BEV izolatlarına ilgili bilgiler kullanılarak yapılan BLAST analizi ve hazırlanan filogenetik ağaca göre izolatlar BEV olarak sınıflandırıldı (Şekil 3.2). Elde edilen izolatların ait olduğu materyallere ilgili bilgiler Çizelge 3.2'de gösterildi.



Şekil 3.2. 5'UTR gen bölgesine göre hazırlanan filogenetik ağaç

●: Bu çalışmada elde edilen izolatlardır.



Şekil 3.3. Hücre kontrol görüntüsü.



Şekil 3.4. Enterovirusun hücrede meydana getirmiş olduğu CPE görüntüsü (72 saat)

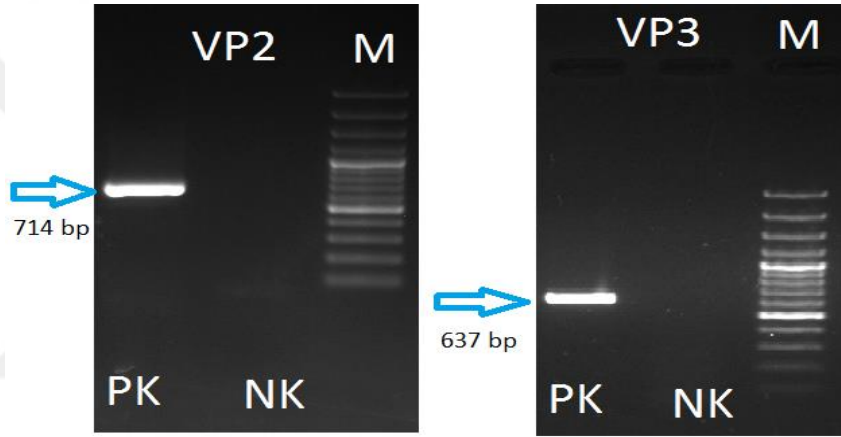
Çizelge 3.2. Elde edilen izolatların illere göre dağılımı

İller	BEV Pozitif örnek sayısı	İzolat
Retrospektif	1	-
Ankara	22	5
İzmir	3	1*
Hatay	6	1
Bursa	19	5
Manisa	4	3
Kars	7	5
TOPLAM	62	20

* Bu izolat ishalleri bir hayvandan elde edilmiştir.

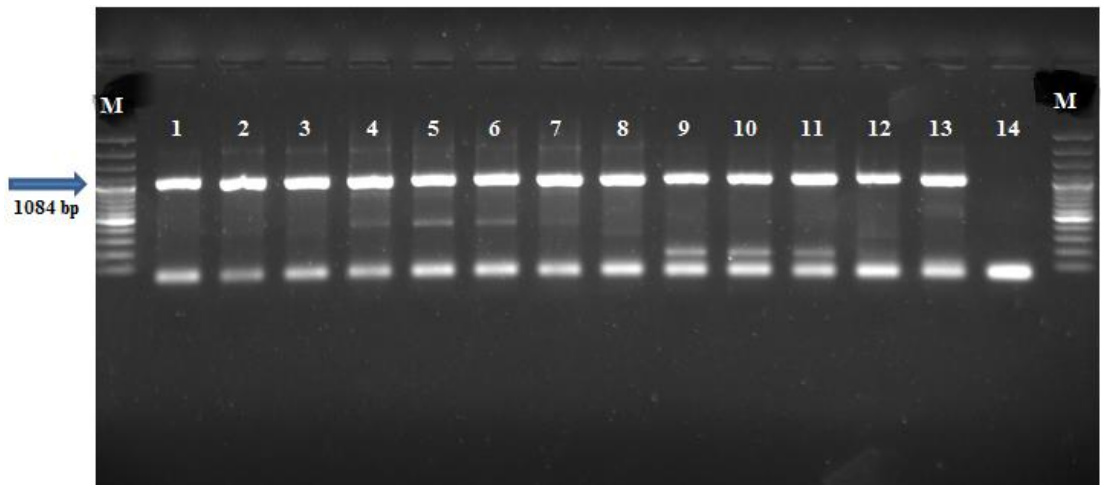
3.3. BEV İzolatlarının Serotiplendirilmesi ve Dizin Analizi

Bu amaçla VP1, VP2 ve VP3 kodlayan gen bölgelerini hedef alan PCR uygulamaları sonrasında kontrol olarak kullanılan virus ile VP2 ve VP3 proteinlerini kodlayan gen bölgelerine ilgili ürün elde edildi (Şekil 3.5) ve dizin analizi ile doğrulandı; ancak test örnekleri için yapılan çalışmalar sonucunda beklenen büyüklükte ürün elde edilemedi. VP1 gen bölgesi için ise BEV izolatlarının tümü beklenen büyüklükte (1084 bp) ürün oluşturdu (Şekil 3.6). Bununla birlikte sadece 10 izolat için dizin bilgisi elde edilebildi.



Şekil 3.5. BEV VP2 ve VP3 gen bölgelerine göre yapılan PCR sonrası jel görüntüleri

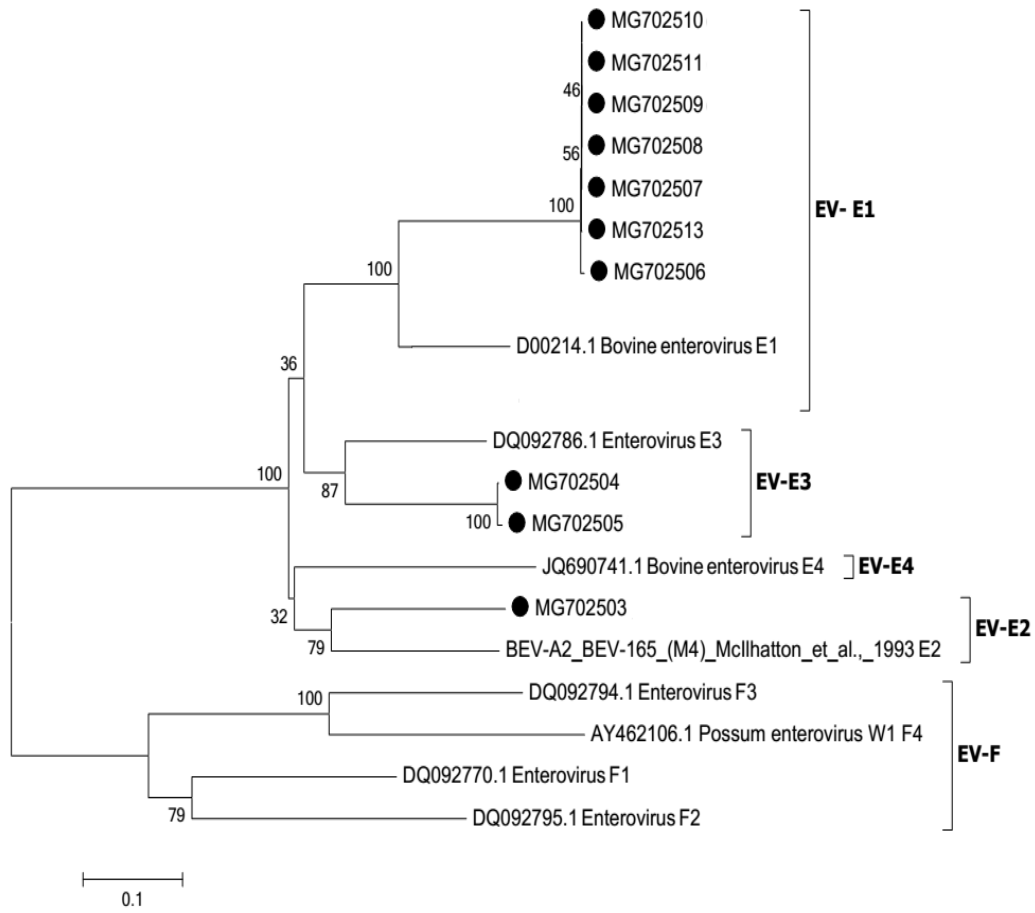
M: DNA merdiveni (100 bp), PK: Pozitif Kontrol, NK: Negatif Kontrol.



Şekil 3.6. BEV VP1 gen bölgesine göre yapılan PCR sonrası jel görüntüleri.

M: DNA merdiveni (100 bp), 1-12: Pozitif örnekler, 13: Pozitif Kontrol, 14: Negatif Kontrol.

VP1 kodlayan gen bölgesi ürünlerinden dizin analizi için uygun olduğu değerlendirilen 10 tanesinin dizinleri hizmet alımı yoluyla elde edildi ve dizinler Gen Bankası'nda yer alan BEV izolatlarına ilgili bilgiler kullanılarak BLAST programı ile analizi sonrasında, izolatların BEV-E türünde yer aldığı değerlendirildi ve filogenetik ağaç analizine göre E1 (n=7), E2 (n=1), E3 (n=2) serotipinde oldukları belirlendi (Şekil 3.7). Elde edilen izolatların 5'UTR ve VP1 gen bölgesine ait dizinleri Bankit servisi kullanılarak, Gen Bankası erişim numaraları temin edildi (Çizelge 3.3).



Şekil 3.7. VP1 gen bölgesine göre hazırlanan filogenetik ağaç

Çizelge 3.3. 5'UTR ve VP1 gen bölgesi dizinlerinin Gen Bankası kayıt bilgileri

No	İl	Suş Adı	Gen Bölgesi Accession No		Serotip
			5'-UTR	VP1	
1	Manisa	M6-TR2016	MG702513	MG702511	E1
2	Hatay	BOZ-TR2016	MG702515	MG702508	E1
3	Bursa	B1-TR2016	MG702516	MG702506	E1
4	İzmir	114-TR2016	MG702517	MG702507	E1
5	Manisa	M2-TR2016	MG702519	MG702509	E1
6	Kars	K2-TR2016	MG702520	MG702512	E1
7	Manisa	M1-TR2016	MG702521	MG702510	E1
8	Kars	K38-TR2016	MG702525	MG702503	E2
9	Ankara	3065-TR2016	MG702530	MG702505	E3
10	Ankara	5741-TR2016	MG702531	MG702504	E3
11	Bursa	B9-UTR-TR2016	MG702522	-	-
12	Bursa	B18-UTR-TR2016	MG702523	-	-
13	Kars	K36-UTR-TR2016	MG702524	-	-
14	Ankara	5061-UTR-TR2016	MG702526	-	-
15	Kars	K29-UTR-TR2016	MG702527	-	-
16	Kars	K22-UTR-TR2016	MG702528	-	-
17	Ankara	5027-UTR-TR2016	MG702529	-	-
18	Ankara	5720-UTR-TR2016	MG702532	-	-
19	Bursa	B8-UTR-TR2016	MG702514	-	-
20	Bursa	B15-UTR-TR2016	MG702518	-	-

Çalışmada izole edilen BEV izolatlarının kendi aralarında ve Gen Bankası'nda bulunan bazı BEV E izolatları ile benzerlik tablosu Şekil 3.8'de sunuldu. Elde edilen izolatların VP1 gen bölgesinin kısmi dizinleri bakımından kendi aralarındaki nükleotit benzerlik oranı %70,4-100 olarak bulundu. Bu oranlar farklı serotiplerin varlığını ortaya koydu (Zell ve ark., 2006 ve Shaukat ve ark., 2012). Nitekim filogenetik ağaca göre (Şekil 3.7) de izolatların E1, E2 ve E3 serotipinde olduğu belirlendi.

E1 serotipinde yer alan izolatların dizinleri kendi aralarında değerlendirildiğinde ise %99,4-100, Gen Bankası'nda yer alan dizinle (D00214) karşılaştırıldığında ise %79,3-79,5 benzerlik gösterdiği saptandı.

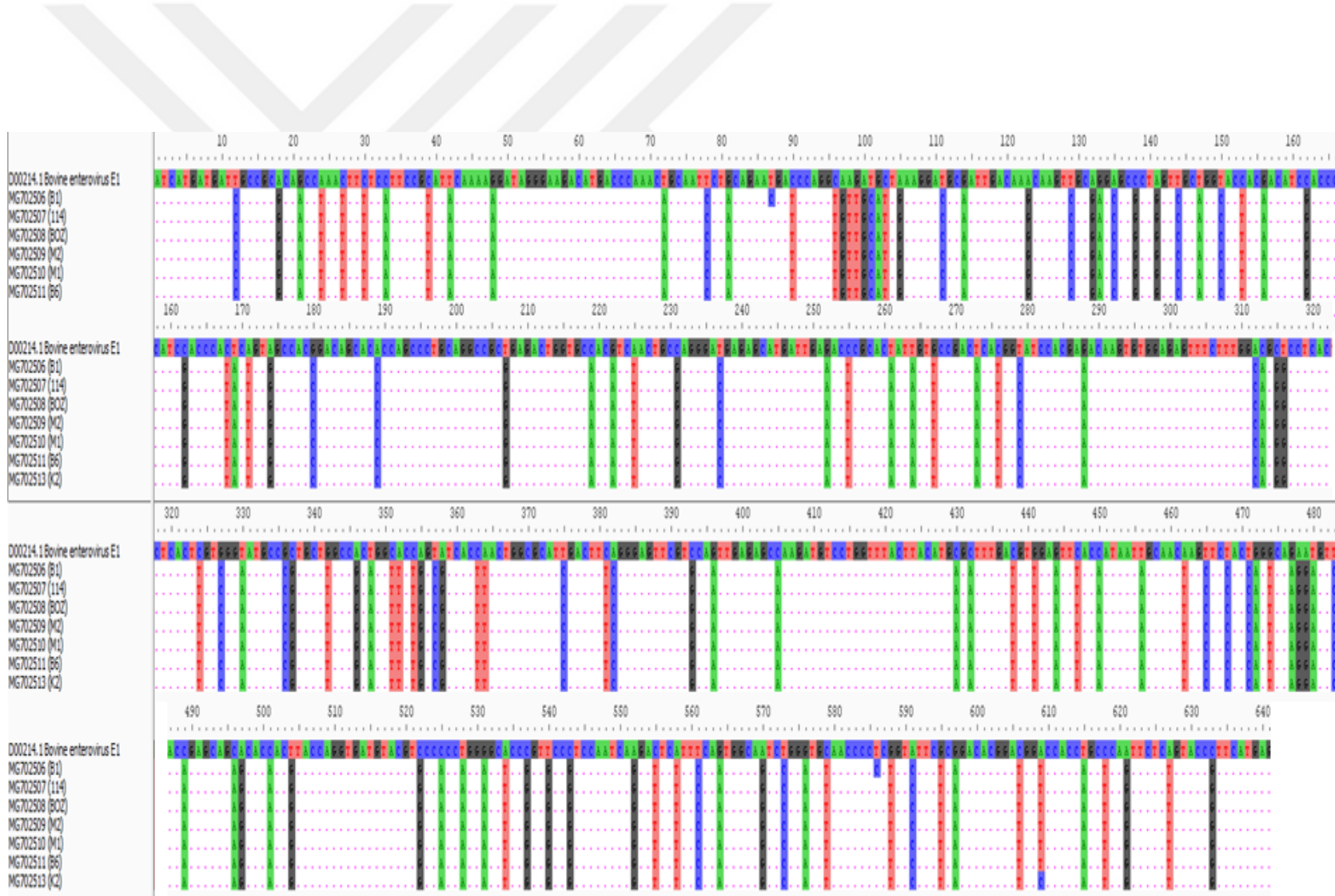
E3 serotipinde yer alan izolatların dizinleri kendi aralarında değerlendirildiğinde %99,4 benzerlik gösterdiği belirlendi. Gen Bankası'nda yer alan dizinle benzerlik oranları ise %78,7-79 olarak saptandı.

E2 serotipinde yalnızca bir izolat bulunduğundan Gen Bankası'nda bulunan diğer dizinlerle karşılaştırıldı ve %76,7-76,9 benzerlik oranlarına sahip olduğu bulundu. Nükleotit ve aminoasit değişimleri Şekil 3.9-3.14'de gösterildi.

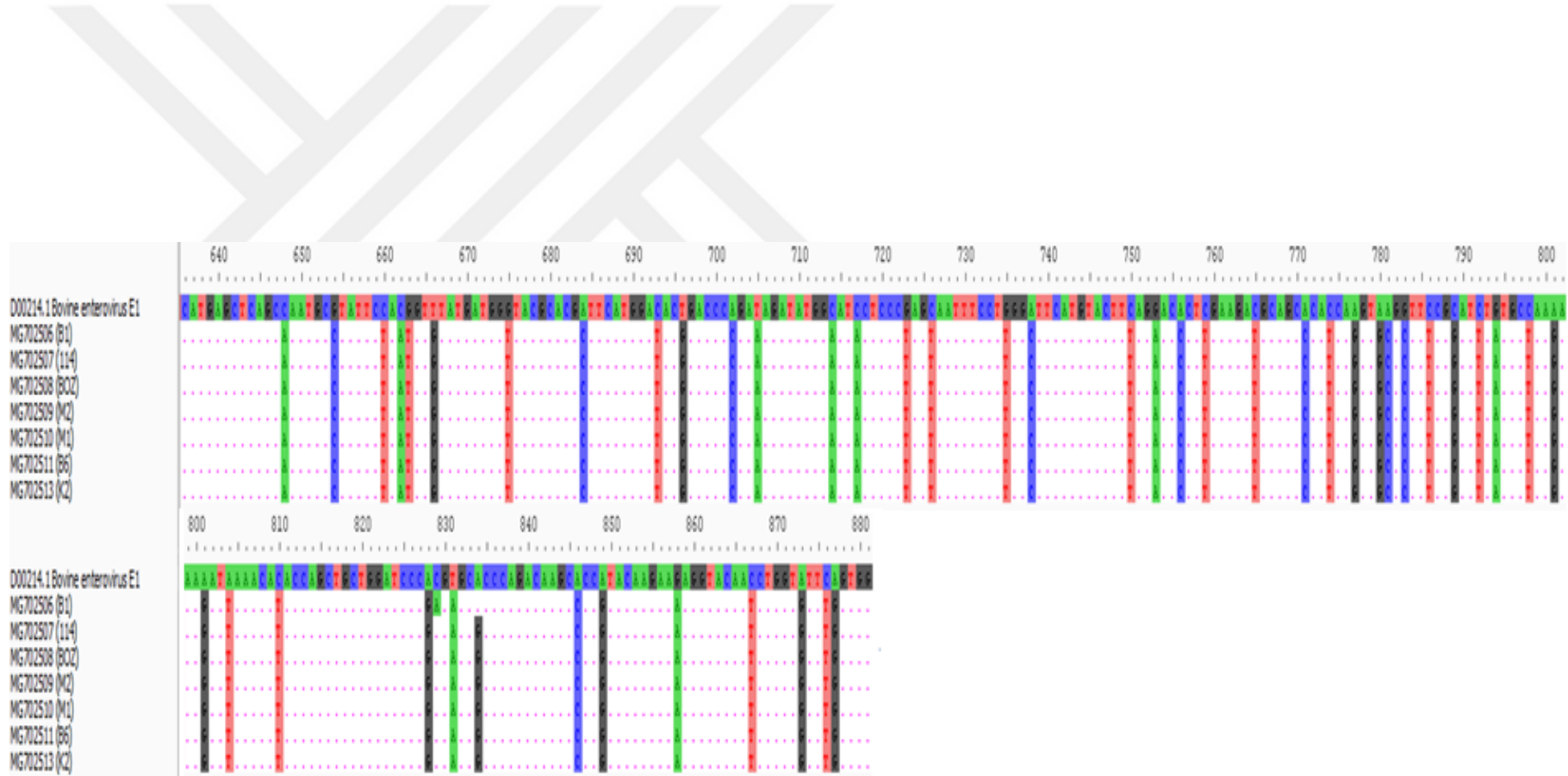


		E1							E2			E3		E4	F1	F2	F3	F4		
		D00214	MG702506	MG702507	MG702508	MG702509	MG702510	MG702511	MG702513	BEV-E2	AF123432	MG702503	DQ092786	MG702504	MG702505	JQ690741	DQ092770	DQ092795	DQ092794	AY462106
E1	D00214		79.3	79.5	79.5	79.5	79.5	79.5	79.5	73.3	71.3	72.5	73.3	72.8	72.9	65.1	59.2	58.0	58.8	57.6
	MG702506			99.5	99.5	99.5	99.5	99.5	99.4	69.9	70.7	70.5	71.8	71.6	71.4	62.4	58.1	57.3	56.7	55.0
	MG702507				100.0	100.0	100.0	100.0	99.9	69.9	70.8	70.4	72.0	71.6	71.4	62.6	57.8	57.1	56.8	55.4
	MG702508					100.0	100.0	100.0	99.9	69.9	70.8	70.4	72.0	71.6	71.4	62.6	57.8	57.1	56.8	55.4
	MG702509						100.0	100.0	99.9	69.9	70.8	70.4	72.0	71.6	71.4	62.6	57.8	57.1	56.8	55.4
	MG702510							100.0	99.9	69.9	70.8	70.4	72.0	71.6	71.4	62.6	57.8	57.1	56.8	55.4
	MG702511								99.9	69.9	70.8	70.4	72.0	71.6	71.4	62.6	57.8	57.1	56.8	55.4
	MG702513									70.0	70.8	70.5	72.0	71.6	71.4	62.6	57.7	57.2	56.8	55.4
E2	BEV-E2										79.5	76.9	73.1	73.1	72.8	66.9	58.6	57.3	57.8	57.2
	AF123432											76.7	73.2	74.7	74.7	66.1	59.9	57.7	58.9	56.0
	MG702503												74.5	74.4	74.4	65.0	60.3	58.2	58.0	56.1
E3	DQ092786													79.0	78.7	65.4	58.9	57.5	58.0	55.6
	MG702504														99.4	66.4	59.4	57.9	58.0	57.3
	MG702505															66.4	59.8	57.9	57.9	57.2
E4	JQ690741															50.5	49.8	52.0	52.8	
F1	DQ092770																	71.2	66.6	64.6
F2	DQ092795																		65.4	64.3
F3	DQ092794																			73.5
F4	AY462106																			

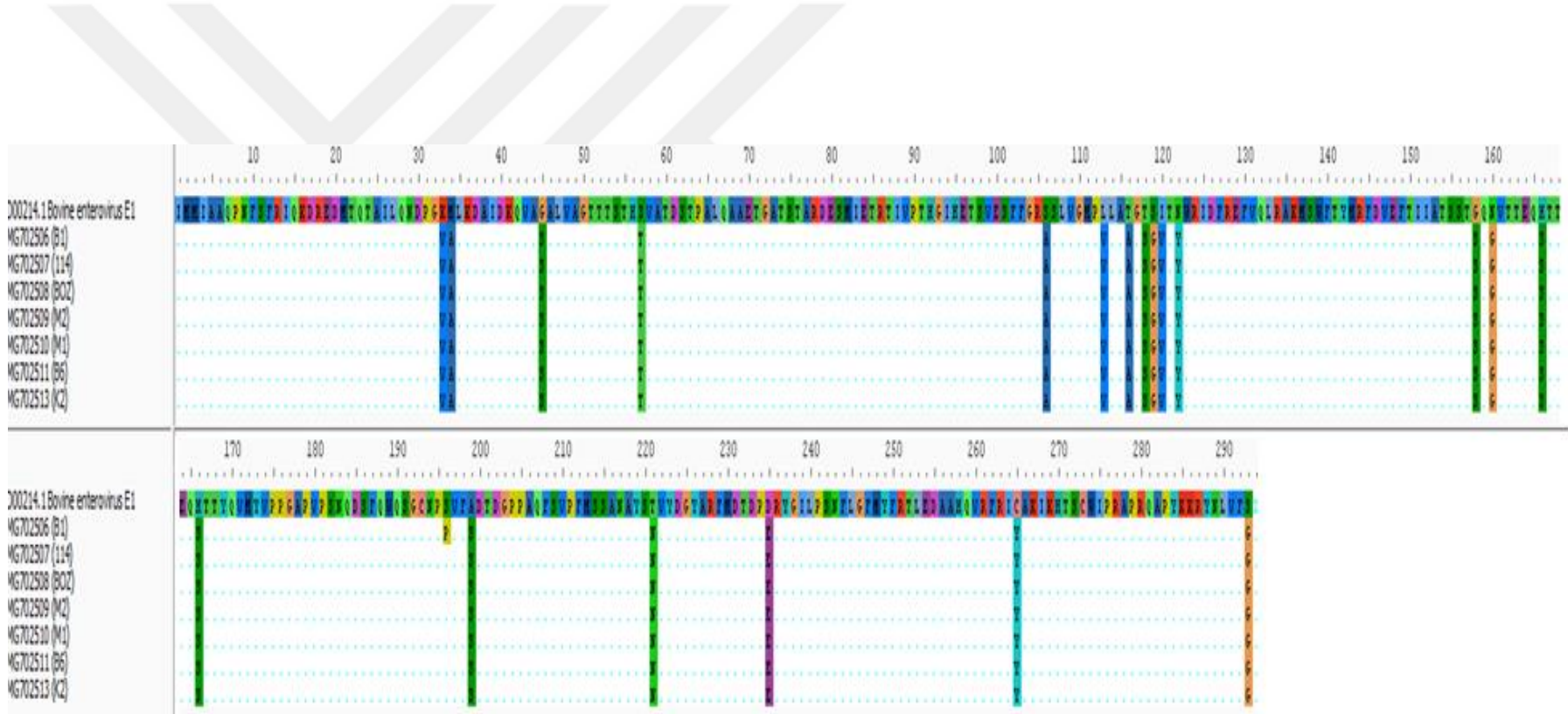
Şekil 3.8. İzolatlar arası VP1 gen bölgesi yönünden nükleotit benzerlik oranları



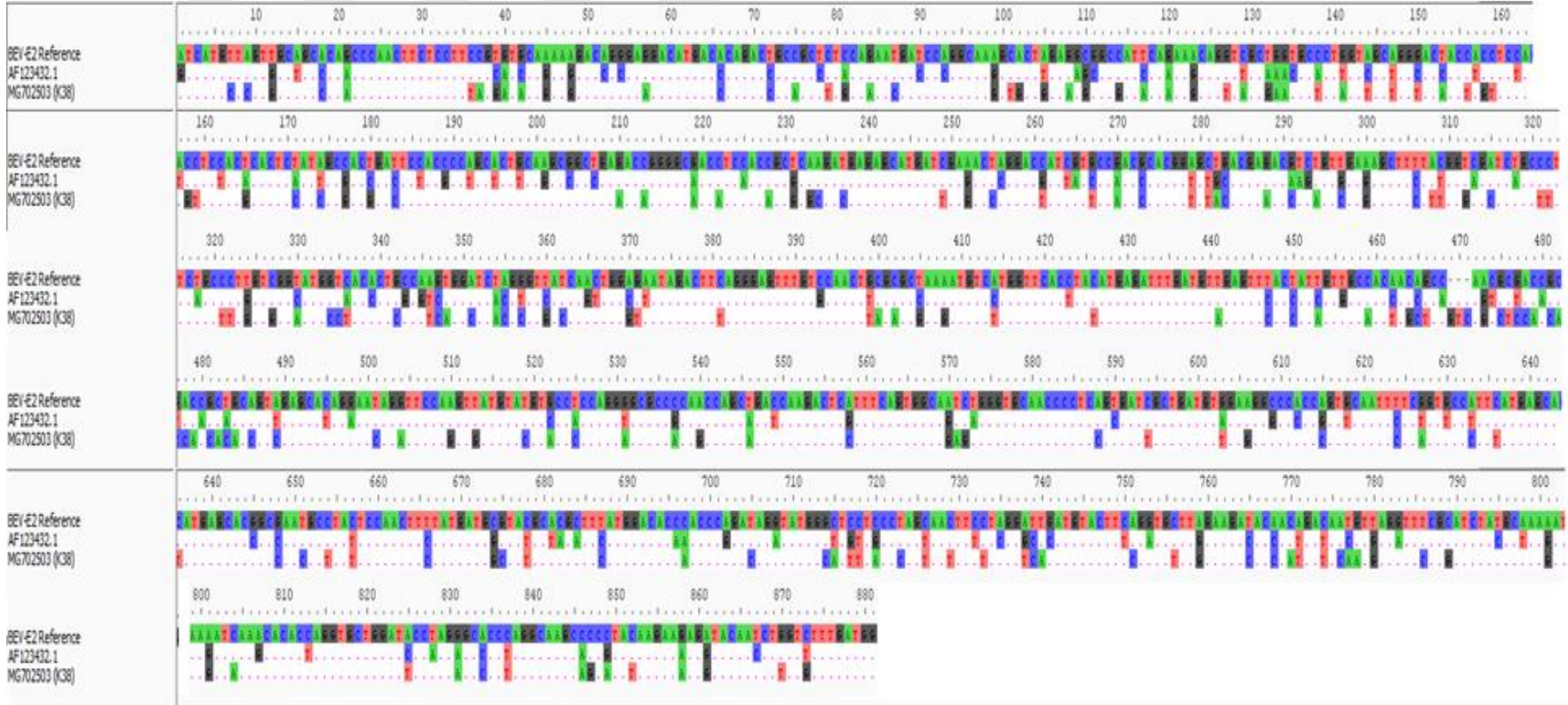
Şekil 3.9. EV-E1 izolatlarının Gen Bankası'nda kayıtlı E1 serotipi ile nükleotid düzeyindeki değişimler



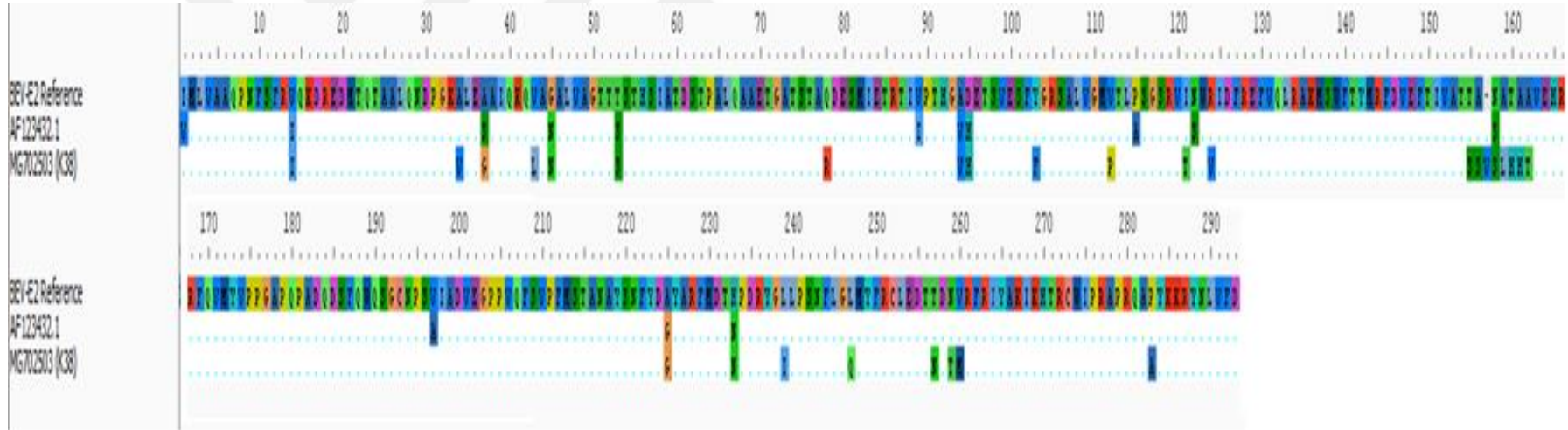
Şekil 3.9. (Devam)



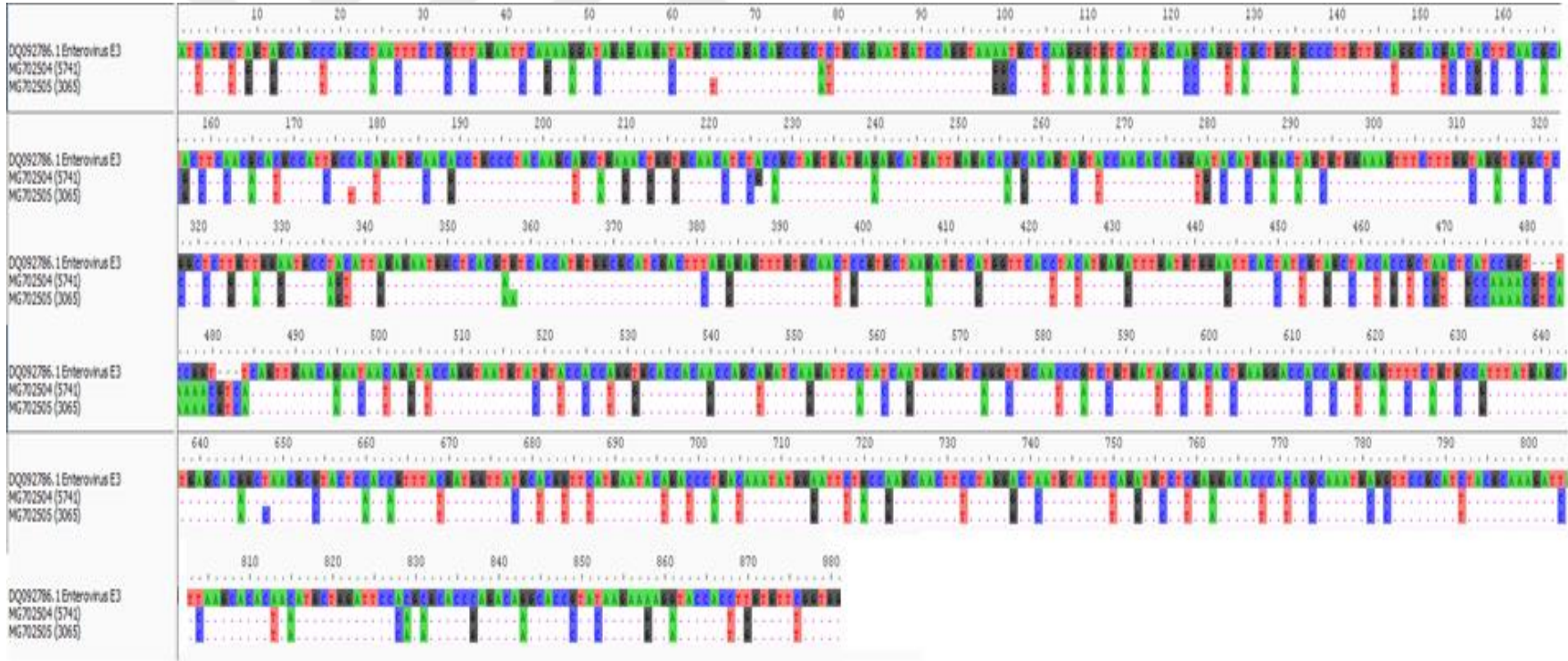
Şekil 3.10. EV-E1 izolatlarının Gen Bankası'nda kayıtlı E1 serotipi ile aminoasit düzeyindeki değişimler



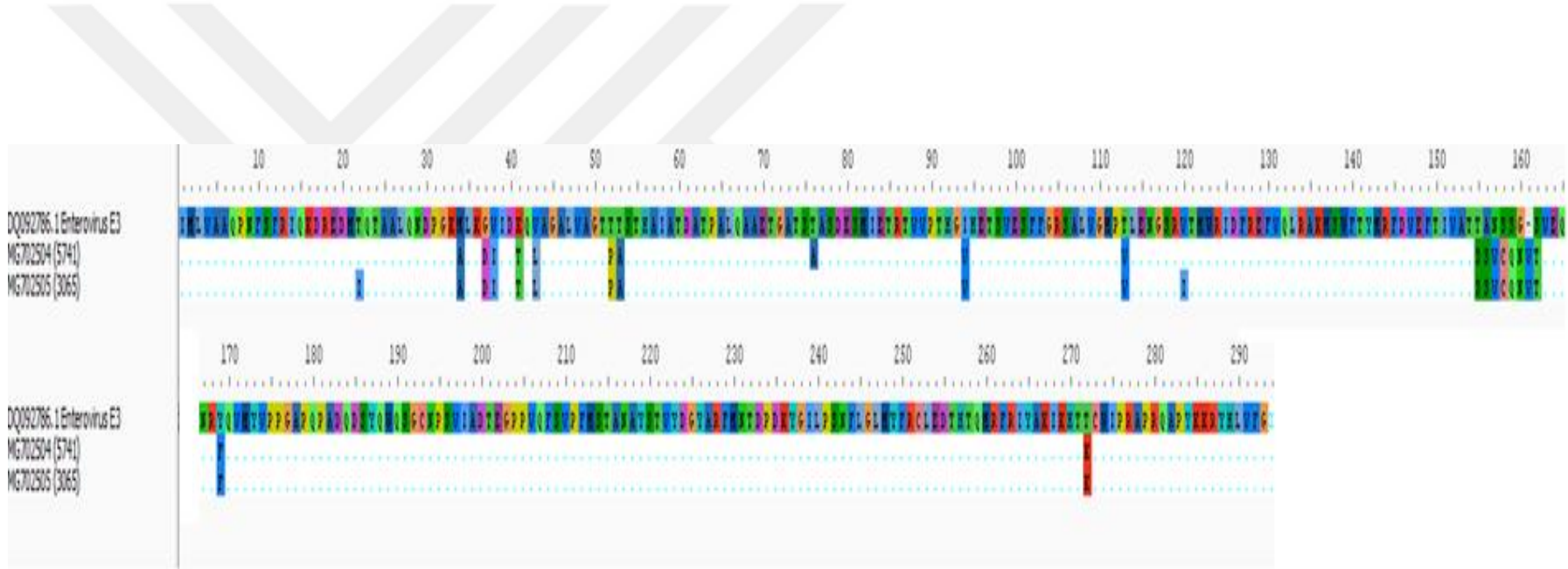
Şekil 3.11. EV-E2 izolatlarının Gen Bankası'nda kayıtlı E2 serotipi ile nükleotid düzeyindeki değişimler



Şekil 3.12. EV-E2 izolatlarının Gen Bankası'nda kayıtlı E2 serotipi ile aminoasit düzeyindeki değişimler



Şekil 3.13. EV-E3 izolatlarının Gen Bankası'nda kayıtlı E3 serotipi ile nükleotid düzeyindeki değişimler



Şekil 3.14. EV-E3 izolatlarının Gen Bankası'nda kayıtlı E3 serotipi ile aminoasit düzeyindeki değişimler

3.4. İzolatların Titrasyonu

Hiperimmünizasyon çalışmasında kullanılmak üzere üretilen, BEV E1, E2 ve E3 serotip izolatlarının titreleri Çizelge 3.4’de bildirildi.

Çizelge 3.4. BEV serotiplerini temsilen seçilen izolatlar ve DKID₅₀ oranları

Serotip	Suş Adı	DKID ₅₀ /0.1 ml
E1	114-TR2016	10 ^{-5.25}
E2	K38-TR2016	10 ^{-5.5}
E3	5741-TR2016	10 ⁻⁵

3.5. Hiperimmünizasyon ve Nötralizasyon Testi Sonuçları

3.5.1. İnaktivasyon Kontrolü

İnaktive edilen virusların inokulasyonu yapılan hücre kültürü şişeleri 7 gün boyunca her gün doku kültürü mikroskopunda incelenmiş olup, hücrelerde herhangi bir sitopatolojik etki gözlenmemiştir.

3.5.2. Deney Hayvanı İnokulasyonu

Deney hayvanları bakım ünitesinde gözlem altında tutulan tavşanlarda yapılan enjeksiyonlar neticesinde herhangi bir patolojik lezyon veya hastalık semptomu meydana gelmemiştir.

3.5.3. Hiperimmün Serum Titrelelerinin Belirlenmesi

Deney hayvanlarından 45. gün sağlanan kan örneklerinden ayırılan ve 56°C’de inaktive edilen kan serumlarının log₂ tabanına göre hazırlanan serum sulandırmalarının, sözkonusu BEV E1, E2 ve E3 serotip izolatları ile ayrı ayrı yapılan nötralizasyon testleri sonucunda belirlenen antikor titreleri Çizelge 3.5’de bildirildi.

Çizelge 3.5. Hiperimmün serumların BEV E1, E2 ve E3 serotip viruslar için antikor düzeyi (SN₅₀)

Deneme Hayvan No	Hiperimmünizasyon		Nötralizasyon Testi		
	Suş Adı	Serotip	114-TR2016	K38-TR2016	5741-TR2016
1	114-TR2016	(E1)	1:120	1:20	1:20
2			1:80	1:20	1:20
3	K38-TR2016	(E2)	1:40	1:80	1:30
4			1:30	1:60	1:20
5	5741-TR2016	(E3)	1:15	1:20	1:80
6			1:20	1:20	1:80

4. TARTIŞMA

Veteriner klinikteki yeri halen tartışmalı olan BEV'ler ile çalışmalar giderek artmaktadır. Bunun birincil sebebi yeni nesil sekanslama tekniklerinin yaygınlaşmasıyla beraber retrospektif örneklemelerin sorgulanması ve klinik tabloda daha önce düşünülmemiş olan BEV'lerin bu örneklerde ortaya çıkmasıdır. Son yıllardaki yayınlara bakıldığında (Sobhy ve ark., 2015; Tsuchiaka ve ark., 2017 ve Zhang ve ark., 2014) hemen hepsi geriye yönelik yapılan yeni nesil sekanslama yöntemleri ile elde edilen virusların dizinlerine yönelik çalışmalardır. Bu veriler de göstermektedir ki, aslında var olan ve araştırma konusu olmayan viruslar her zaman populasyon içerisinde bulunmakta ve geçirdikleri mutasyonlarla enfektif hale gelerek epidemiler yaratabilmektedirler. BEV'lerin tüm dünyada yaygın olarak varlıklarını sürdürdükleri bilinmektedir. Bu ülkeler arasında Çin, Japonya, Pakistan, Avustralya, Almanya, İspanya, İngiltere, Mısır, Tayland ve Amerika'da vardır. (Granoff ve Webster, 1999; Knowles ve Mann, 1990; Kosoltanapiwat ve ark., 2016 ve Sobhy ve ark., 2015). Bu bilgiler BEV'lerin yaygınlığını göz önüne koymakla beraber potansiyel aşı vektörü olarak değerlendirilmesi amacıyla önemli oranda bilgi sağlamamaktadır. Bu tür çalışmanın yapılacağı bölgede hem tür, hem de serotip bazında bilgiye ihtiyaç bulunmaktadır.

Bu çalışmada elde edilen veriler değerlendirildiğinde, farklı illerde yerleşik işletmelerde bulunan ishelli, solunum sistemi enfeksiyonu bulgulu sığırların yanısıra sağlıklı görünümlü sığırlarda da, daha önce yapılan birçok bildirim (Blas-Machado ve ark., 2007; Blas-Machado ve ark., 2011; Jimenez-Clavero ve ark., 2005; McFerran, 1962; Zhang ve ark., 2014 ve Zhu ve ark., 2014) benzer şekilde, BEV virus varlığı görülmüştür. Sığır enterovirusların yenidoğan buzağı ishallerinin en önemli patojenleri olan rota-coronavirüsler yanısıra tek başına ya da sözkonusu etkenlerle birlikte saptandığı bildirimlerin (Boros ve ark., 2012; Blas-Machado ve ark., 2011; Jimenez-Clavero ve ark., 2005; He ve ark., 2017; Li ve ark., 2012; Peng ve ark., 2014; Zhang ve ark., 2014 ve Zhu ve ark., 2014) varlığı dikkate alınarak, bu çalışmada ishelli hayvanlardan sağlanan örneklerdeki BEV oranı hesaplanmış ve

pozitiflik oranı %6,8 (6/87) olarak bulunmuştur. Retrospektif örneklerden sadece birisinde BEV tespit edilmiş olmasının, zamana bağlı RNA kaybı, vb. ile ilişkili olma olasılığı düşünülerek, çalışma sırasında toplanan ishalleri hayvanlara ait BEV pozitiflik oranı hesaplanmış ve %50 (5/10) olarak belirlenmiştir. Bununla birlikte sağlıklı hayvanlar ile karşılaştırıldığında, ishalleri hayvanlara ilgili pozitiflik oranlarının önemli bir farklılık göstermediği görülmektedir. Dolayısıyla bu çalışmada her ne kadar farklı klinik olgularda BEV etiyolojik rolünün sorgulanması amaçlanmamış ise de, ishal olguları ile BEV arasında önemli bir ilişki kurulamamıştır. Diğer yandan, retrospektif örnekler harici ishalleri hayvanlarda diğer olası patojenler yönünden bir sorgulama yapılmamış olması da, her durumda bu konuda kesin bir değerlendirme yapmayı olanaklı kılmamaktadır.

Enterovirus genomu viral poliproteini kodlayan tek bir ORF ve öncesinde 5'UTR sonrasında 3'UTR bölgelerinden oluşmaktadır. Poliprotein P1, P2 ve P3 olarak üç bölgeye ayrılmıştır. P1 bölgesi kapsit proteinleri olan VP4, VP2, VP3, VP1'den (yer alış sırasına göre) oluşmakta iken, P2 ve P3 bölgeleri yapısal olmayan 2A, 2B, 2C ve 3A, 3B, 3C proteinlerini kodlamaktadır. Enterovirusların 5'UTR bölgesi genel anlamda mutasyonu az olup, konservatif bölge olarak bilinmektedir (Oberste ve ark., 1999a ve Oberste ve ark., 1999b). Bununla birlikte enterovirus türleri arasında değişkenlik gösterdiği bilinmektedir (Kosoltanapiwat ve ark., 2016). Bu çalışmada kullanılan primerler ile elde edilen hedef ürün (276 bp) dizinleri, özgüllük yönünden uygun bulunmuştur. Elde edilen 5'UTR dizinlerine ilgili olarak hazırlanan filogenetik ağaç incelendiğinde (Şekil 3.2); gerek daha önce Gen Bankası'nda bildirilen ve gerekse bu çalışmada BEV VP1 kapsit gen bölgesine göre belirlenen serotiplerin, 5' UTR gen bölgesi dizinlerine göre sığır enterovirus tür (E veya F) ve serotipinin belirlenmesinin mümkün olmadığı görülmüştür. Nitekim Kosoltanapiwat ve ark. (2016)'da farklı türlerde tespit ettikleri BEV veya BEV benzeri enterovirusların 5'UTR gen bölgesi dizinlerine göre direk serotiplendirilebilmesi için 300 bp üzerinde ürün büyüklüğüne gereksinim duyulduğunu bildirmiştir.

Bu çalışmanın temel hedeflerinden birisi ülkemizde varolan BEV serotiplerinin sorgulanmasıdır. Enterovirusların serotiplendirmesinde bugün kabul gören kriter, VP1 kodlayan gen bölgesi dizinleridir. Bununla birlikte viral kapside ilgili diğer proteinleri (VP2 ve VP3) kodlayan gen bölgeleri bilgisi ve aminoasit bilgilerinin ya da mümkünse tüm genom bilgilerinin elde edilmesi, birçok araştırmacı tarafından hedeflenmiştir (Tsuchiaka ve ark., 2018 Woo ve ark., 2015). Bu bağlamda, bu çalışma da da izolatların VP2 ve VP3 kodlayan gen bölgelerinin çoğaltılması hedeflenmiş ise de, kullanılan primerler ve birçok optimizasyon çalışmasına rağmen sonuç alınamamıştır. Bu durumun en önemli nedeninin, sığır enteroviruslarının ilgili genom bölgelerinde sıklıkla oluşan mutasyonlardan kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.

VP1 hayvan ve insan enterovirusları arasında en çok değişkenlik gösteren bölgedir. Tüm kapsit proteinleri kapsidin β -silindir yapısını oluşturan bölümlerde daha stabil değişmeyen sekansa sahipken, arada kalan ilmek bölgelerinde değişkenlikler vardır. Bu ilmeklerin bir çoğu kapsidin yüzeyinde yer alır ve spesifik antijenik nötralizasyonda görev alır. VP1 picornavirus kapsidinin dışında yer alır ve en immunojen olan proteindir. VP1 bölgesi nötralizasyon için önemli alanlar içermektedir (Oberste ve ark., 1999a; Oberste ve ark., 1999b, Smyth ve ark., 1990 ve Smyth ve ark., 1992). Fakat serotip özgüllüğüne ilişkin epitoplara henüz tanımlanamamıştır. Önemli nötralizasyon bölgelerinin VP1 bölgesinde olması, bu bölgenin tamamı veya bir kısmının serotiple ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. VP2 bölgesi ile yapılan moleküler serotiplendirme çalışmaları da bulunmaktadır ancak tam serotiplendirme yapılamadığı için bazı serotipler birlikte sınıflandırılmıştır (Oberste ve ark., 1999a; Oberste ve ark., 1999b ve Kosoltanapiwat ve ark., 2016).

Bu çalışmada VP1 dizin bilgileri elde edilen izolatların, E1, E2 ya da E3 serotipli olduğu saptanmıştır. Bu veri Türkiye’de BEV serotiplerine ilgili olarak, Alkan ve ark. (2014) tarafından yapılan BEV E1 serotip bildirimini sonrasında, E1 dışındaki serotiplerin de varlığını ortaya koymaktadır. Serotiplerin örneklenen işletme/iller bazında değerlendirilmesi yapıldığında (Çizelge 3.3), daha fazla saptanmış olan E1 yönünden bir analiz mümkün olmuş ve farklı coğrafik bölgelerde

BEV E1 varlığı belirlenmiştir. Bu çalışmada BEV F türü virus varlığı ise saptanmamıştır.

Çalışmada izole edilen BEV izolatlarının kendi aralarında ve Gen Bankası'nda bulunan bazı BEV E izolatları ile benzerlik tablosu Şekil 3.6'da sunuldu. Çizelge incelendiğinde, E2 ve E3 serotipleri için çok az sayıda izolat elde edilmiş olduğundan kendi aralarında karşılaştırma yapılması olanaklı olmamasına karşın, E1 serotipinde yer alan 7 izolatın dizinlerinin kendi aralarında %99,4-100 benzerlik gösterdiğini ortaya koymuştur. Diğer yandan söz konusu E1 serotiplerinin farklı coğrafik bölgelerdeki illerden (Bursa, İzmir, Manisa, Hatay ve Kars) sağlanan materyallerde tespit edilmiş olması, Türkiye'de sığırlarda E1 serotipli virusların homojenitesine işaret etmektedir.

Elde edilen farklı serotiplere ilgili dizinler, her bir serotip için Gen Bankası'nda bildirilen viruslar (E1, E2, E3 için sırasıyla D00214, BEV-165-Gen Bankası dizin kaydı yoktur- ve DQ092787) referans alınarak incelendiğinde ise; yerel izolatların önemli farklılıklar gösterdiği görülmüştür. Tüm E1 serotip dizinleri değerlendirildiğinde; referans olarak kullanılan virusla %76,9-79,4 oranında nükleotit benzerliği gösterdikleri (Şekil 3.8) ve toplam 179 baz değişikliği ile 19 aminoasit değişikliği olduğu saptanmıştır (Şekil 3.9-3.10). E2 ve E3 olarak tiplendirilen yerel izolatların referans olarak kullanılan viruslarla benzerlik oranları ise sırasıyla %76,9 ve %78,7-79 olarak belirlenmiştir. Bu iki serotipe ait izolatların referans olarak kullanılan viruslara göre sırasıyla 204 baz, 28 aminoasit ve 196 baz, 22 aminoasit farklılığına sahip oldukları görülmüştür (Şekil 3.11-3.14). Özetle; bu çalışmada saptanan E1, E2 ve E3 serotip BEV'lerin Gen Bankası'nda bulunan ilgili serotiplerden yaklaşık en azından %20 oranında farklılık gösterdiği görülmüştür. Bununla birlikte bu farklılık nükleotit düzeyinde benzerlik oranına (>%75) dayalı serotiplendirme kriterine (Shaukat ve ark., 2012 ve Zell ve ark., 2006) göre yeni bir serotipe işaret edecek kadar yüksek değildir.

Serotip tespiti yapılan BEV izolatlarından sadece birisi (114-TR2016) klinik bulguya (ishal) sahip bir hayvandan izole edilmiş olup (Çizelge 3.2), izolat E1 olarak

identifiye edilmiştir (Şekil 3.7). Bu izolatın sağlıklı hayvanlardan saptanan diğer 6 E1 serotip BEV ile genetik düzeyde önemli bir farklılığı olmadığı görülmüştür (Şekil 3.8). Bu veri birçok deneysel çalışmada hasta hayvandan izole edilen virus ile klinik enfeksiyon tablosu meydana gelmemesi, sağlıklı hayvanlarda sıklıkla enterovirusların tespit edilebiliyor olması, vb gibi konular yanısıra klinik enfeksiyon oluşumu ile serotip ilişkisinin sorgulandığı viral patogenez mekanizmalarının açıklanmasına yönelik ileri çalışmalara ihtiyaç duyulduğunu göstermektedir.

BEV enfeksiyonlarının sığırlarda önemli verim kayıplarına neden olmadığı yönündeki değerlendirmeler, spesifik bir aşı hazırlanmasını gerektirmemiştir. Bununla birlikte aşı vektörü olarak BEV son zamanlarda dikkat çekmekte ve birçok çalışmaya (Chang ve ark., 2013; Chu ve ark., 2013 ve Evans ve ark., 1989) konu olmaktadır. Bu durum aşı vektörü olarak kullanım olanağının, BEV virus/farklı serotiplerin yaygınlığı ve populasyonun bağışıklık düzeyi konusunu önemli kılmaktadır. Ne yazık ki bilindiği kadarıyla BEV/farklı serotipler ile enfeksiyon sonucu bağışık olan popülasyon ve serotiplerin antijenik ilişkisine ilgili serolojik çalışma bildirilmemiştir. Bu nedenle izole edilen farklı serotip viruslar için elde edilen hiperimmun serumlar kullanılarak, dizin analizine dayanan serotiplendirme ile çapraz nötralizasyon temelli antijenik değerlendirmenin yapılması bu çalışmanın bir diğer önemli hedefi olmuştur.

Nötralizasyon testi gerek enfeksiyonların serolojik tanısında ve gerekse epidemiyolojik çalışmalarda sıklıkla kullanılan yöntemdir. Bununla birlikte özellikle aynı genus içinde yer alan bazı viruslar ve bir virusun farklı serotipleri / alttipleri arasındaki antijenik yakınlık nedeniyle, serolojik verilerin yorumlanmasında sorunlar oluşabilmektedir. Bu noktada genel yaklaşım, olası farklı alttip/serotip/viruslar kullanılarak yapılan nötralizasyon testleri sonucunda, sözkonusu etkenlerden hangisine karşı antikor titresinin daha yüksek olduğunun belirlenmesi ve saptanan antikor ile etkenin ilişkilendirilmesidir. Nitekim bu çalışmada da, farklı BEV E serotipleri (E1, E2 ve E3) kullanılarak immunize edilen tavşanlardan sağlanan serumlardaki antikor titreleri, immunizasyonda kullanılan serotip için diğer serotipler için olduğundan daha yüksek bulunmuştur. Her bir serotip için kullanılan hayvan

sayısının sınırlı olması, biyolojik varyasyona bağılı olarak immün yanıt farklılıklarının oluşmasının doğal olduğu ve antikor titrelerinin çok yüksek olmaması nedeniyle, titre farklılıklarının istatistiksel olarak değerlendirilerek belli bir oransal fark hesaplanmamıştır. Bununla birlikte genel bir değerlendirme yapılırsa, homolog serotip için heterolog serotiplerin yaklaşık 4 katına yakın antikor titresini oluşturduğu görülmektedir.

BEV tür ve serotipleri arasındaki antijenik ilişki/farklılıkların serolojik olarak ortaya konulması, hem epidemiyolojik çalışmalar hem de biyolojik ürün geliştirme çalışmaları bakımından önemlidir. Daha önceki yıllarda Türkiye’de serolojik çalışmalara dayalı BEV bildirimleri (Acar ve Gür, 2009; Alkan ve ark., 1997; Gür ve ark., 2004; Gür ve ark., 2006 ve Gür ve ark., 2008) incelendiğinde, yalnızca BEV 1 ya da BEV 2 , ya da her ikisi kullanılarak yapılan çalışmaların varlığı görülmektedir. Bununla birlikte söz konusu bildirimlerde her ne kadar BEV enfeksiyonlarının varlığı saptanmış ise de, bu çalışmada serotipler arasında saptanan antijenik yakınlığa ilgili sonuçlar dikkate alındığında, Türkiye’de farklı sığır enterovirus tür/serotipleri varlığı/yaygınlığına ilgili bilgilerin şimdiye kadar bulunmadığı anlaşılmaktadır. Bu çalışmada en azından farklı 3 E serotip varlığının saptanmış olması, serotiplere ilişkin moleküler çalışmaları destekleyecek ve bazı biyolojik ürün üretme hedefli çalışmalara yön gösterici olabilecek saha çalışmalarının yapılması gereğine işaret etmektedir. Diğer yandan henüz ülkemizde var olan sadece 3 serotipin saptanmış olduğu, olası diğer E serotip ya da F türü BEV bulunabileceği; bu çalışmada sadece 3 E serotip için çapraz reaksiyonlara ilgili bir değerlendirme yapıldığının gözönünde bulundurulması ve moleküler çalışmalar ile paralel yürütülecek serolojik çalışmalara ihtiyacı vurgulamakta yarar görmüştür.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada 6 farklı ildeki aile işletmelerinden toplanılan 108 ve Anabilim Dalımızdan temin edilen 77 retrospektif tanı materyali olmak üzere toplam 185 gaita, 30 nazal swap ve 48 organ örneği kullanılmış olup BEV'lerin varlığını sorgulamak, pozitif örneklerden izolasyon yaparak bunları moleküler olarak serotiplendirmek ve tespit edilen farklı serotipler arası çapraz nötralizasyon düzeyini belirlemek amaçlanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre;

1. Sakımlı bölge olan 5'UTR bölgesine yönelik RT-PCR sorgulaması yapılmış olup, sağlıklı görünümlü ve ishelli hayvanlardan olmak üzere toplam 62 gaita ve 1 nazal swap örneği BEV'ler yönünden pozitif olarak belirlenmiştir.
2. BEV varlığı saptanan örneklerin MDBK hücre kültürü inokulasyonu sonucunda 20 örnek başarılı biçimde hücre kültüründe çoğalması sağlanmış ve bunlar sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere kazanımı gerçekleşmiştir.
3. BEV izolatlarının VP1 kapsit bölgesine yönelik PCR sorgulamasından elde edilen ürünlerin dizin analizi, farklı 3 serotipin (E1, E2 ve E3) varlığını; E1 serotipinin diğer tiplere göre daha yüksek oranda bulunduğunu ortaya koymuştur.
4. Her bir BEV serotipine ait izolatlar kendi aralarında homojen bulunurken, Gen Bankası'nda yer alan virusların dizinleriyle önemli ölçüde farklılığa sahip oldukları saptanmıştır.
5. Serotipleri (E1, E2 ve E3) temsilen seçilen ve inaktive edilen izolatların in vivo ortamda immun yanıt oluşumunu uyardığı saptandı.
6. Farklı serotipe ait izolatlara karşı elde edilen hiperimmun serumlar ile yapılan çapraz nötralizasyon, serotipler arasında antijenik ilişkinin varlığını ortaya koymuştur.

Bu veriler ışığında;

- 1- Daha geniş populasyon örneklenerek BEV yaygınlığı/serotiplerinin dağılımının belirlenmesi,
- 2- BEV'lerin çevre ve su kaynaklarını kontaminasyon potansiyellerinin sorgulanması,
- 3- Farklı klinik olgularda diğer bazı enteropatojenler (Rotavirus, Coronavirus, E.Coli vb) yanısıra BEV varlığı/serotipinin sorgulanarak klinik tablo ve BEV ilişkisinin değerlendirilmesi,
- 4- Saha örneklerinde olası farklı serotip BEV enfeksiyonlarının tespite yönelik serolojik çalışmaların yapılması,
- 5- Türkiye'de saptanan BEV'lerin VP1 gen bölgesi dışındaki özellikle P1'e ilişkin diğer proteinleri (VP2, VP3 ve VP4) kodlayan gen bölgelerinin ve/veya tüm genomların elde edilmesi,
- 6- Biyolojik ürün hazırlanmasında vektör olarak BEV kullanılabilirliğine sorgulanması,

konularında yapılacak yeni çalışmaların BEV'lere ilgili yeni veriler ortaya koyacağı öngörülmektedir.

ÖZET

Sığır Enterovirusların (BEV) Moleküler Epidemiyolojisi, İzolasyonu ve Farklı Serotip Viruslar Arasındaki Çapraz Bağışıklık Düzeylerinin İncelenmesi

Bu çalışmada Türkiye'nin farklı illerinden temin edilen 185 gaita, 30 nazal swap ve 48 organ örneği sığır enteroviruslar yönünden 5'UTR bölgesine yönelik primerlerle Onestep-RT-PCR tekniği kullanılarak sorgulanmış olup 62 gaita ve 1 nazal swap örneği pozitif bulunmuştur. Pozitif bulunan örneklerin MDBK hücre kültürlerinde 5 kere pasajlanması sonrasında 20 izolat elde edilmiştir. İzolatların serotiplendirilmesi amacıyla VP1 kapsit bölgesine yönelik primer çifti kullanılarak yapılan Onestep-RT-PCR sonrasında elde edilen ürünlerin dizin ve filogenetik analizine göre farklı EV-E serotiplerinin (E1,E2 ve E3) varlığı saptanmıştır. Belirlenen serotipleri temsilen seçilen, BEI ile inaktive edilmiş ve ultrasantrifüj ile konsantre edilmiş BEV izolatları, hiperimmün serum elde etmek amacıyla tavşanlara inokule edilmiştir. Elde edilen hiperimmün serumlardaki antikor seviyelerinin, immunizasyonda kullanılan serotipler için diğer serotiplere göre daha yüksek olduğu saptanmıştır.

Sonuç olarak bu çalışmada Türkiye'de E1, E2 ve E3 serotipli BEV varlığı ve serotipler arasında çapraz bağışıklık bulunduğu ortaya konulmuştur.

Anahtar Sözcükler: Bovine Enterovirus, Çapraz Nötralizasyon, İzolasyon, Moleküler Serotiplendirme

SUMMARY

Molecular Epidemiology and Isolation of Bovine Enteroviruses (BEV) and Determining the Cross Immunity Antibody Titer of Different Serotypes

We investigated 185 feces, 30 nasal swabs and 48 organ samples for bovine enteroviruses provided from different provinces of Turkey. For this purpose a primer pair targeting 5'UTR region is used for Onestep-RT-PCR assay. As a result 62 feces and 1 nasal swab sample found to be positive. These positive samples were inoculated to MDBK cell cultures and subcultured 5 times. 20 of the samples inoculated to cell culture had consistent cytopathological effect pattern with enteroviruses. A onestep-RT-PCR targeting VP1 gene region was carried out for the isolates for molecular serotyping and after sequencing and phylogenetical analysis of the amplicons isolates were determined to belong to different EV-E serotypes (E1, E2, E3). One isolate was chosen to represent the corresponding serotype and inactivated with BEI, administered to rabbits to induce antibody response. In serum samples antibody levels belonging to immunizing viruses were found to be higher than other serotype viruses.

As a result we have obtained information about the presence of BEV serotypes E1, E2 and E3 and showed the existence of cross neutralizing immunity among these serotypes.

Keywords: Bovine Enterovirus, Cross Neutralization, Isolation, Molecular Serotyping

KAYNAKLAR

- ACAR A, GUR S (2009). Seroprevalance of bovine enterovirus type 1 (BEV1) in goats in Turkey. *Journal of Animal and Veterinary Advances* **8**(6): 1075-1078.
- ALKAN F, OZKUL A, KARAOGLU T, BILGE S, AKCA Y, BURGU I, OGUZOGLU TC (1997). Sığırlarda viral nedenli solunum sistemi enfeksiyonlarının seroepidemiolojisi. *Ankara Üniv Vet Fak Derg* **44**: 73-80.
- ALKAN F, KARAYEL I, LANAVE G, BUONAVOGLIA C, BANYAI K, MARTELLA V (2014). Isolation and Molecular Characterization of Bovine Enterovirus From Calves with diarrhea, Turkey, International meeting on emerging diseases and surveillance, Vienna, Austria.
- ANDERSEN AA (1978). Cross reaction between bovine enterovirus and South African Territories I5 foot-and-mouth disease virus. *American journal of veterinary research* **39**(1): 59-63.
- BOROS A, PANKOVICS P, KNOWLES NJ, REUTER G (2012). Natural interspecies recombinant bovine/porcine enterovirus in sheep. *Journal of General Virology* **93**(9): 1941-1951.
- Bovine Enterovirus Infection
Erişim: [<https://www.cabi.org/isc/datasheet/91707>], Erişim: 25.10.2017
- BLAS-MACHADO U, SALIKI JT, BOILEAU MJ, GOENS SD, CASELTINE SL, DUFFY JC, WELSH RD (2007). Fatal ulcerative and hemorrhagic typhlocolitis in a pregnant heifer associated with natural bovine enterovirus type-1 infection. *Veterinary pathology* **44**(1): 110-115.
- BLAS-MACHADO U, SALIKI JT, SANCHEZ S, BROWN CC, ZHANG J, KEYS D, HARVEY SB (2011). Pathogenesis of a bovine enterovirus-1 isolate in experimentally infected calves. *Veterinary pathology* **48**(6): 1075-1084.
- CHU JQ, LEE YJ, PARK JN, KIM SM, LEE KN, KO YJ, PARK JH (2013). Construction of a bovine enterovirus-based vector expressing a foot-and-mouth disease virus epitope. *Journal of virological methods* **189**(1): 101-104.
- CHANG J, LI Y, YANG D, WANG F, JIANG Z, YU L (2013). VP1 B–C and D–E loops of bovine enterovirus cluster B can effectively display foot-and-mouth disease virus type O-conserved neutralizing epitope. *Journal of General Virology* **94**(12): 2691-2699.
- EHRENFELD E, DOMINGO E, ROOS RP (2010). The Picornaviruses. *American Society for Microbiology Press, Washington*
- EVANS DJ, MCKEATING J, MEREDITH JM, BURKE KL, KATRAK K, JOHN A, ALMOND JW (1989). An engineered poliovirus chimaera elicits broadly reactive HIV-1 neutralizing antibodies. *Nature* **339**(6223): 385-388.

- FILMAN DJ, SYED R, CHOW M, MACADAM AJ, MINOR PD, HOGLE JM (1989). Structural factors that control conformational transitions and serotype specificity in type 3 poliovirus. *The EMBO journal*, **8**(5): 1567-1579.
- FREY HR, ve LIESS B (1971). Vermehrungskinetik und Verwendbarkeit eines stark zytopathogenen VD-MD-Virusstammes für diagnostische Untersuchungen mit der Mikrotiter-Methode. *Zoonoses and Public Health* **18**(1): 61-71.
- GRANOFF A, WEBSTER RG (1999). Encyclopedia of virology. *Academic Press* s.:461-468
- GUR S, TAN MT, OZGUNLUK I (2004). Aydın İlinde Sığırlarda Bovine Enterovirus BEV Tip 1 ve 2 nin Serolojik Olarak Araştırılması. *Pendik Vet Mikrobiyol Derg*
- GUR, S, AKCA Y, BURGU I (2006). Türkiye’de mandalarda bovine enterovirus tip-1’in serolojik olarak araştırılması. *Ankara Üniv. Vet Fak Derg* **53** (3): 191-194
- GUR S, YAPKIC O, YILMAZ A (2008). Serological survey of bovine enterovirus type 1 in different mammalian species in Turkey. *Zoonoses and public health* **55**(2): 106-111.
- HE H, TANG C, CHEN X, YUE H, REN Y, LIU Y, ZHANG B (2017). Isolation and characterization of a new enterovirus F in yak feces in the Qinghai-Tibetan Plateau. *Archives of virology* **162**(2): 523-527.
- HOFNER MC, CARPENTER WC, LYONS SA, HAMBLIN C (1993). An indirect sandwich ELISA for the identification of bovine enteroviruses. *Journal of virological methods* **41**(2): 239-243.
- International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)
Erişim: [<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>], Erişim tarihi: 10.12.2017
- JIMENEZ-CLAVERO MA, ESCRIBANO-ROMERO E, MANSILLA C, GOMEZ N, CORDOBA L, ROBLAS N, SAIZ JC (2005). Survey of bovine enterovirus in biological and environmental samples by a highly sensitive real-time reverse transcription-PCR. *Applied and environmental microbiology* **71**(7): 3536-3543.
- KARBER G (1931). Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Naunyn-Schmiedebergs Archiv für experimentelle pathologie und pharmakologie*, **162**(4): 480-483.
- KESWICK BH, GERBA CP, DUPONT HL, ROSE JB (1984). Detection of enteric viruses in treated drinking water. *Applied and environmental microbiology* **47**(6): 1290-1294.
- KNIFE DM, HOWLEY PM, GRIFFIN DE, LAMB RA, MARTIN MA, ROIZMAN B, STRAUS SE (2013). *Fields Virology*. *Lippincott Williams and Wilkins*

- KNOWLES NJ, MANN JA (1990). Bovine enteroviruses. *Virus infections of ruminants* (s: 513-516).
- KOSOLTANAPIWAT N, YINDEE M, CHAVEZ IF, LEAUNGWUTIWONG P, ADISAKWATTANA P, SINGHASIVANON P, PEARSIRIWUTTIPONG S (2016). Genetic variations in regions of bovine and bovine-like enteroviral 5'UTR from cattle, Indian bison and goat feces. *Virology journal* **13**(1), 13.
- LARSSON A (2014). AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets. *Bioinformatics* **30**(22): 3276-3278.
- LEY V, HIGGINS J, FAYER R (2002). Bovine enteroviruses as indicators of fecal contamination. *Applied and environmental microbiology* **68**(7): 3455-3461.
- LI Y, CHANG J, WANG Q, YU L (2012). Isolation of two Chinese bovine enteroviruses and sequence analysis of their complete genomes. *Archives of virology*, **157**(12): 2369-2375.
- MACLACHLAN NJ, DUBOVI EJ (2010). Fenner's veterinary virology. *Academic press*.
- MANDL S, HIX L, ANDINO R (2001). Preexisting immunity to poliovirus does not impair the efficacy of recombinant poliovirus vaccine vectors. *Journal of virology* **75**(2): 622-627
- MCCARTHY FM, SMITH GA, MATTICK JS (1999). Molecular characterisation of Australian bovine enteroviruses. *Veterinary microbiology* **68**(1): 71-81.
- MCFERRAN JB (1962). Bovine enteroviruses. *Annals of the New York Academy of Sciences* **101**(1): 436-443.
- NOLLENS HH, RIVERA R, PALACIOS G, WELLEHAN JF, SALIKI JT, CASELTINE SL, YOICHEM PK (2009). New recognition of Enterovirus infections in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Veterinary microbiology* **139**(1): 170-175.
- OBERSTE MS, MAHER K, KILPATRICK DR, FLEMISTER MR, BROWN BA, PALLANSCH MA (1999). Typing of human enteroviruses by partial sequencing of VP1. *Journal of clinical microbiology* **37**(5): 1288-1293.
- OBERSTE MS, MAHER K, KILPATRICK DR, PALLANSCH MA (1999). Molecular evolution of the human enteroviruses: correlation of serotype with VP1 sequence and application to picornavirus classification. *Journal of virology* **73**(3): 1941-1948.
- OLSZEWSKA HALINA, PALUSZAK ZBIGNIEW, JARZABEK, ZDZISLAW (2008). Survival of bovine enterovirus strain LCR-4 in water, slurry, and soil. *Bull Vet Inst Pulawy* (**52**): 205-209.

OMATSU T, TSUCHIAKA S, HIRATA T, SHIROMA Y, OKAZAKI S, KATAYAMA Y, NAGAI M (2014). Detection of enterovirus genome sequence from diarrheal feces of goat. *Virus genes* **48**(3): 550-552.

PENG XW, DONG H, WU QM, LU YL (2014). Full genome sequence of a bovine enterovirus isolated in China. *Genome announcements* **2**(3): e00620-14.

Sequence Identity and Similarity

Erişim: [<http://imed.med.ucm.es/Tools/sias.html>], Erişim: 25.10.2017

SHAUKAT S, ANGEZ M, ALAM MM, SHARIF S, KHURSHID A, MALIK F, ZAIDI SSZ (2012). Molecular identification and characterization of a new type of bovine enterovirus. *Applied and environmental microbiology* **78**(12): 4497-4500.

SMYTH MS, HOEY EM, TRUDGETT A, MARTIN SJ, BROWN F (1990). Chemically synthesized peptides elicit neutralizing antibody to bovine enterovirus. *Journal of general virology* **71**(1): 231-234.

SMYTH MS, TRUDGETT A, HOEY EM, MARTIN SJ, BROWN F (1992). Characterization of neutralizing antibodies to bovine enterovirus elicited by synthetic peptides. *Archives of virology* **126**(1): 21-33.

SOBHY NM, MOR SK, MOHAMMED MEM, BASTAWECY IM, FAKHRY HM, YOUSSEF CRB, GOYAL SM (2015). Isolation and molecular characterization of bovine enteroviruses in Egypt. *The Veterinary Journal* **206**(3): 317-321.

The Picornavirus Pages.

Erişim : [<http://www.picornaviridae.com>], Erişim tarihi: 15.02.2017.

TSUCHIAKA S, RAHPAYA SS, OTOMARU K, AOKI H, KISHIMOTO M, NAOI Y, OBA M (2017). Identification of a novel bovine enterovirus possessing highly divergent amino acid sequences in capsid protein. *BMC microbiology* **17**(1): 18.

TSUCHIAKA S, NAOI Y, IMAI R, MASUDA T, ITO M, AKAGAMI M, KATAYAMA Y (2018). Genetic diversity and recombination of enterovirus G strains in Japanese pigs: High prevalence of strains carrying a papain-like cysteine protease sequence in the enterovirus G population. *PloS one*, **13**(1): e0190819.

URASAWA S, URASAWA T, KANAMITSU M (1973). Properties of human serum factors precipitating bovine enterovirus. *Japanese Journal of Medical Science and Biology* **26**(2): 49-57.

WANG H, XUE M, YANG D, ZHOU G, WU D, YU L (2012). Insertion of type O-conserved neutralizing epitope into the foot-and-mouth disease virus type Asia1 VP1 GH loop: effect on viral replication and neutralization phenotype. *Journal of General Virology*, **93**(7): 1442-1448.

- WOO PC, LAU SK, LI T, JOSE S, YIP CC, HUANG Y, YUEN KY (2015). A novel dromedary camel enterovirus in the family Picornaviridae from dromedaries in the Middle East. *Journal of General Virology*, **96**(7): 1723-1731.
- ZELL R, KRUMBHOLZ A, DAUBER M, HOEY E, WUTZLER P (2006). Molecular-based reclassification of the bovine enteroviruses. *Journal of general virology* **87**(2): 375-385.
- ZHANG AQ, SMITH JR, BURGESS GW (1989). A capture antibody ELISA for detection of antibodies against bovine enterovirus. *Journal of virological methods* **24**(1-2), 223-226.
- ZHANG AQ, SMITH JR, BURGESS GW. (1990). Blocking enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies against bovine enterovirus. *Veterinary microbiology* **21**(3), 275-281.
- ZHANG G, HAYDON DT, KNOWLES NJ, MCCAULEY JW (1999). Molecular evolution of swine vesicular disease virus. *Journal of General virology* **80**(3): 639-651.
- ZHANG H, LIU H, BAO J, GUO Y, PENG T, ZHOU P, GAO M (2014). Characterization of an Enterovirus species E isolated from naturally infected bovine in China. *Virus research* **191**: 101-107.
- ZHU L, XING Z, GAI X, LI S, SAN Z, WANG X (2014). Identification of a novel enterovirus E isolates HY12 from cattle with severe respiratory and enteric diseases. *PloS one* **9**(5): e97730.

EKLER

EK-1 Etik Kurul Kararı



T.C.
ANKARA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan DeneYleri Yerel Etik Kurulu

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

TOPLANTI TARİHİ : 11/03/2015
TOPLANTI NO : 2015-4
DOSYA NO : 2015-24
KARAR NO : 2015-4-85

Yürütücülüğünü Üniversitemiz Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof.Dr.Feray Alkan'ın yaptığı ve araştırmacı olarak Araş.Gör.Nüvit Çoşkun'un katıldığı "Sığır Enterovirusların (BEV) Moleküler Epidemiyolojisi, İzolasyonu ve Farklı Serotipe Ait İzolatlar Arasındaki Çapraz Bağışıklık Düzeylerinin İncelenmesi" başlıklı araştırma projesinin içeriği Kurulumuzca incelenmiş olup, söz konusu çalışmanın Ankara Üniversitesi Hayvan DeneYleri Yerel Etik Kurulu Yönergesine göre aşağıda belirtilen kapsamda yapılmasına oy birliğiyle karar verilmiştir.

Hayvan Türü : Tavşan
Hayvan Sayısı : 20
Geçerlilik Süresi : 01/03/2015-01/03/2017

ETİK KURUL ÜYELERİ				
Ünvanı / Adı / Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İmza
Prof.Dr.Oğuz SARİMEHMETOĞLU (Başkan)	Parazitoloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	
Prof.Dr.Eyüp Sabri AKARSU (Başkan Vekili)	Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	E	
Prof.Dr.Tanju ÖZÇELİKAY (Üye)	Farmakoloji Anabilim Dalı	Eczacılık Fakültesi	E	
Prof.Dr.Nuri YİĞİT (Üye)	ZooJoloji Anabilim Dalı	Fen Fakültesi	E	
Prof.Dr.Fatın CEDDEN (Üye)	Hayvan Yetiştirme Anabilim Dalı	Ziraat Fakültesi	E	
Prof.Dr.Aydın YAĞMURLU (Üye)	Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	E	
Prof.Dr.Mine KIRKAĞAÇ (Üye)	Su Ürünler Anabilim Dalı	Ziraat Fakültesi	K	
Yrd.Doç.Dr.Mehmet SAĞLAM (Üye)	Cerrahi Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	

Adres: Ankara Üniversitesi Rektörlüğü 06100 - Tandoğan / ANKARA Tel: 0 (312) 212 60 40 / 2064 Faks: 0 (312) 212 60 49

Yrd.Doç.Dr.Atilla ÖZGÜR (Üye)	Veteriner Hekimliği Tarihi ve Deontoloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	
Uzm.Vet.Hek.Atilla İŞGÖREN (Üye)	Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Laboratuvarı	Tıp Fakültesi	E	
Vet.Hek.Dr.Akife KAYA (Üye)	Referans Veteriner Kliniği	Serbest	K	
Uzm.Vet.Hek.Hüseyin DEDE (Üye)	Veteriner Hekimler Derneği	Serbest	E	
Fatma Aysun ÇOSKUN (Üye)	İktisat	Serbest	K	



T.C.
ANKARA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

A.Ü. HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI



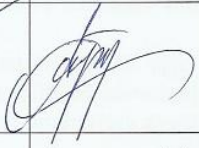
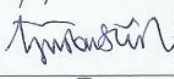

TOPLANTI TARİHİ : 12/04/2017
TOPLANTI NO : 2017-8
DOSYA NO : 2015-24
KARAR NO : 2017-8-68

Yürüttüğünü Üniversitemiz Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof.Dr.Feray Alkan'ın yaptığı; araştırmacı olarak Arş.Gör.Nüvit Coşkun'un katıldığı; "Sığır Enterovirusların (BEV) Moleküler Epidemiyolojisi, İzolasyonu ve Farklı Serotipe Ait İzolatlar Arasındaki Çapraz Bağışıklık Düzeylerinin İncelenmesi" başlıklı araştırma Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun 11/03/2015 tarih ve 2015-4-85 sayılı kararında onaylanmıştır.

Proje Yürütücüsü tarafından 30/03/2017 tarih ve 9006 sayılı Dilekçe ile Kurulumuza yapılan başvuruda, belirtilen gerekçelerden ötürü çalışmanın geçerlilik süresinin "01.03.2017-01.03.2018" olarak değiştirilmesi talep edilmiştir.

Söz konusu dilekçe Kurulumuzca incelenmiş, Üniversite senatosunun 12/2/2016 tarihli toplantısında 430/3642 sayılı kararı ile kabul edilen ve Hayvan Deneyleri Merkezi Etik Kurulu'nun 19/2/2016 tarih ve 42 sayılı kararı ile onaylanan "Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi"nin 11 (5) maddesi kapsamında değerlendirilerek çalışmanın geçerlilik süresinin "01.03.2017-01.03.2018" olarak değiştirilmesine oybirliği ile karar verilmiştir.

ETİK KURUL ÜYELERİ				
Ünvanı / Adı / Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İmza
Prof.Dr.M.Taner KARAOĞLU (Başkan)	Viroloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	
Prof.Dr.Tanju ÖZÇELİKAY (Başkan Vekili)	Farmakoloji Anabilim Dalı	Eczacılık Fakültesi	E	
Prof.Dr.Nuri YİĞİT (Üye)	Zooloji Anabilim Dalı	Fen Fakültesi	E	
Prof.Dr.Fatin CEDDEN (Üye)	Hayvan Yetiştirme Anabilim Dalı	Ziraat Fakültesi	E	
Prof.Dr.Mine KIRKAĞAÇ (Üye)	Su Ürünleri Mühendisliği Bölümü	Ziraat Fakültesi	K	-

Prof.Dr.Emine DEMİREL YILMAZ (Üye)	Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	K	
Yrd.Doç.Dr.Mehmet SAĞLAM (Üye)	Cerrahi Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	—
Yrd.Doç.Dr.Atilla ÖZGÜR (Üye)	Veteriner Hekimliği Tarihi ve Deontoloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	
Yrd.Doç.Dr.Gülnur GÖLLÜ BAHADIR (Üye)	Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	K	
Uzm.Vet.Hek.Atilla İŞGÖREN (Üye)	Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Laboratuvarı	Tıp Fakültesi	E	
Dr.Vet.Hek.Gürbüz ERTÜRK (Üye)	Active Veteriner Sağlık Merkezi	Serbest	E	
Uzm.Vet.Hek.Hüseyin DEDE (Üye)	Veteriner Hekimler Derneği	Serbest	E	
Fatma Aysun COŞKUN (Üye)	İktisat	Serbest	K	—

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı: Nüvit

Soyadı: COŞKUN

Doğum yeri ve tarihi: Kars 09.09.1981

Uyruğu: T.C.

Medeni durumu: Bekar

Askerlik durumu: Terhis, 2007

İletişim adresi ve telefonu: Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji

Anabilim Dalı, 0312 3170315

II- Eğitimi

1999-2005: İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Lisans/Yükseklisans Eğitimi İstanbul)

1995-1999: Pendik Lisesi (YDA) /İstanbul

1992-1995: Aydınlı İlköğretim Okulu İstanbul

1987-1992: Aydınlı İlkolulu/İstanbul

Yabancı dili: İngilizce (İleri Seviye)

III- Ünvanları

2005: Veteriner Hekim

IV- Mesleki Deneyimi

2006-2007 Türk Silahlı Kuvvetleri – Muayene Kontrol/Hijyen Denetim Subayı

2009-2011 Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı- Veteriner Hekim

V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

Veteriner Mikrobiyoloji Derneği

VI- Bilimsel İlgi Alanları

Yayınları

YILMAZ V, YILDIRIM Y, COSKUN N (2014). Molecular and serological investigation of Border Disease virus infection in sheep in the Kars district of Turkey. Acta Vet Brno, **83** (3): 175-179

YILMAZ V, YILDIRIM Y, COSKUN N (2015) Serological investigation of Bluetongue Virus and Rift Valley Fever Virus infections in sheep in Kars Province of Turkey. Van Vet J, **26**(3): 119-122.

YILMAZ V, COSKUN N, SAHIN M (2016). Molecular detection of Bovine Herpes Virus-1 (BoHV-1), Bovine Herpes Virus-4 (BoHV-4) and Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) in aborted ruminant fetuses from Kars province in Northeast Turkey. *Indian J Anim Res*, **50** (4)

YILMAZ V, COSKUN N (2016) Investigation of Bovine Herpes Virus Type 1 infection in sheep in the Kars Province of Turkey. *Harran Üniv Vet Fak Derg*, **5** (1): 40-43

COSKUN N, KARAYEL I, ALKAN F (2016). Comparison of Efficiency of Different Nucleic Acid Extraction Methods for Bovine Enteroviruses in Feces, *TABAD - Research Journal Of Agricultural Sciences*, Issue 1,p 054-057

YILMAZ V, TIMURKAN M O, COSKUN N, YILDIRIM Y (2016) Investigation of Rotavirus infection in sheep using serological and molecular techniques. *Indian J Anim Res*, **51** (3): 525-530.

ALKAN F, ALBAYRAK H, TIMURKAN M O, OZAN E, COSKUN N. (2017) Assessment of the molecular epidemiology of bovine ephemeral fever in Turkey. *Veterinarski Arhiv* **87** (6), 665-675.

KARAYEL I, FEHER E, MARTON S, COSKUN N, BANYAI K, ALKAN F (2017). Putative vaccine breakthrough event associated with heterotypic rotavirus infection in newborn calves, Turkey, 2015; *Veterinary Microbiology* **201**: 7-13.

ALKAN F, BILGE-DAGALP S, KARAPINAR Z, TIMURKAN MO, COSKUN N, BURGU I (2017). Long-term study (2005–2010) on the vaccination with BoHV-1 glycoprotein E-deleted marker vaccine *Tropical Animal Health and Production*, **50**(2) 353-363

YILMAZ V, COSKUN N, CELEBI O, BUYUK F (2017) Seroprevalence of Bovine Herpes Virus 1 (BoHV-1) in breeding bulls in Northeastern Anatolian Region of Turkey. *Indian J Anim Res* 10.18805/ijar.v0iOF.9182.

Bildiriler

ALKAN F, TIMURKAN M O, COSKUN N (2013). The epidemiology of bovine ephemeral fever in Turkey, 7th Epizone, Belçika, Bruksel, 1-4 Ekim 2013 (Poster Bildirisi)

YILMAZ V, YILDIRIM Y, COSKUN N (2014) Molecular and serological investigation of border disease virus infection in sheep in the Kars district of Turkey. *Uluslararası Katılımlı XI. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi, Kemer-Antalya, 21-24 Ekim 2014*, (Poster Bildirisi)

YILDIRIM Y, BILGE DAGALP S, YILMAZ V, FARAJI A, COSKUN N (2014). Molecular characterisation of ovine herpesvirus type 2 (OvHV-2) in Turkey . *International Meeting on Emerging Diseases and Surveillance, IMED, Vienna, Austria, 31 Ekim-3 Kasım 2014* (Poster Bildirisi)

COSKUN N, KARAYEL I, ALKAN F (2015). Serological Investigation of Bovine Enteroviruses in Cattle from Different Provinces. *International Congress on Applied Biological Sciences, Üsküp, Makedonya, 16-20 Eylül 2015*. (Poster Bildiri)

YILMAZ V, COSKUN N, DOGAN F, YILDIRIM Y, BILGE DAGALP S, OGUZOGLU TC, SAHIN M (2015). Investigation of some viral agents in aborted ruminant fetuses. International Congress on Applied Biological Sciences, Üsküp, Makedonya, 16-20 Eylül 2015. (Poster Bildiri)

YILMAZ V, YILDIRIM Y, COSKUN N, OTLU S (2015). Serological investigation of bluetongue virus and rift valley fever virus infections in sheep in the Kars district of Turkey. II International VETistanbul Group Congress, St. Petersburg, Russia, 7-9 Nisan 2015. (Poster Bildiri)

YILMAZ V, COSKUN N (2016). Molecular and serological survey of Bovine Herpes Virus 1 infection in breeding bulls in Northeastern Turkey. 2ND INTERNATIONAL CONGRESS ON APPLIED BIOLOGICAL SCIENCES, Saraybosna, 27-31 Mayıs 2016 (Sözlü Sunum)

COSKUN N, KARAYEL I, ALKAN F (2016). Comparison of Efficiency of Different Nucleic Acid Extraction Methods for Bovine Enteroviruses in feces. 2ND INTERNATIONAL CONGRESS ON APPLIED BIOLOGICAL SCIENCES, Saraybosna, 27-31 Mayıs 2016 (Sözlü Sunum)

ALKAN F, BILGE DAGALP S, DOGAN F, COSKUN N (2016). The molecular characterisation of akabane virus from severe outbreak in 2015 Turkey. 6th European Congress of Virology, Hamburg, Almanya, 19-22 Ekim 2016. (Poster Bildiri)

COSKUN N, ALKAN F (2017). Isolation and Molecular Characterization of Enteroviruses From Cattle. 8th Balkan Animal Science Conference Balnimalcon, Prizren, Kosova, 6-8 Eylül 2017. (Sözlü Sunum)

ALKAN F, KARAYEL I, COSKUN N, DURAN YELKEN S (2017). Detection of BRSV from Calves in a Herd With Severe Respiratory System Disease in Turkey. 8th Balkan Animal Science Conference Balnimalcon, 6-8 Eylül 2017. (Poster Bildiri)

Projeler

YILMAZ V, YILDIRIM Y, COSKUN N (2013). Kars yöresinde halk elinde yetiştirilen koyunlarda bazı Pestivirus enfeksiyonlarının seroprevalansının belirlenmesi. Kafkas Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri. Proje No:2012-VF-58 Başlangıç tarihi:2012- Bitiş Tarihi: 2013 (Yardımcı Araştırmacı)

ALKAN F, COSKUN N (2017) Sığır Enterovirusların (BEV) Moleküler Epidemiyolojisi, İzolasyonu ve Farklı Serotip Viruslar Arasındaki Çapraz Bağışıklık Düzeylerinin İncelenmesi, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (16H0239003). Başlangıç :2016 Bitiş :2017 (Yardımcı Araştırmacı)

VII- Diğer

Ankara Üniversitesi Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası (2015).