



**T. C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**BOVİNE VİRAL DİARRHOEA VİRUS TÜRKİYE İZOLATLARININ SEROLOJİK
ÖZELLİKLERİ VE TÜRKİYE'DE KULLANILAN AŞILARIN YEREL SUŞLARA
KARŞI OLUŞTURDUĞU BAĞIŞIKLIK DÜZEYLERİNİN BELİRLENMESİ**

Gizem ALPAY

(DOKTORA TEZİ)

Bursa-2014



T. C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BOVİNE VİRAL DİARRHOEA VİRUS TÜRKİYE İZOLATLARININ SEROLOJİK
ÖZELLİKLERİ VE TÜRKİYE'DE KULLANILAN AŞILARIN YEREL SUŞLARA KARŞI
OLUŞTURDUĞU BAĞIŞIKLIK DÜZEYLERİNİN BELİRLENMESİ

Gizem ALPAY

(DOKTORA TEZİ)

Danışman: Prof. Dr. Kadir YEŞİLBAĞ

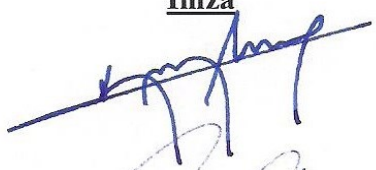

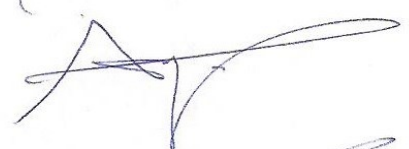


Bursa-2014



Bu tez, Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Komisyon Başkanlığı tarafından V-2010-42 numaralı proje ve Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından 109 O 762 numaralı proje ile desteklenmiştir.

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Doktora öğrencisi Araş. Gör. Gizem ALPAY tarafından hazırlanan 'Bovine Viral Diarrhoea Virus Türkiye İzolatlarının Serolojik Özellikleri ve Türkiye'de Kullanılan Aşıların Yerel Suşlara Karşı Oluşturduğu Bağışıklık Düzeylerinin Belirlenmesi' konulu doktora tezi 12/03/2014 Çarşamba günü, 10:00-12:00 saatleri arasında yapılan tez savunma sınavında jüri tarafından oy birliği ile kabul edilmiştir.

	<u>Adı-Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Tez Danışmanı	Prof. Dr. Kadir YEŞİLBAĞ	
Üye	Prof. Dr. Cengiz ÇETİN	
Üye	Prof. Dr. Ayşin ŞEN	
Üye	Prof. Dr. Feray ALKAN	
Üye	Yrd. Doç. Dr. İ. Taci CANGÜL	

Bu tez Enstitü Yönetim Kurulu'nun19.3.2014..... tarih ve
.2014/12.....sayılı toplantısında alınan1.....numaralı kararı ile kabul edilmiştir.



İÇİNDEKİLER

TÜRKÇE ÖZET	IV
İNGİLİZCE ÖZET	V
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	3
Tarihçe	3
Etiyoloji	4
Sınıflandırma ve Fizikokimyasal Özellikler	4
BVDV Genom Yapısı	4
BVDV Biyotipleri	7
BVDV Genotipleri	7
BVDV Alt Grupları ve Genetik Çeşitlilik	8
Epidemiyoloji	9
Patogenez	14
Akut Enfeksiyon	14
Transplasental Enfeksiyon	15
Mukozal Hastalık	17
Klinik Bulgular	17
Gebe Olmayan Hayvanlarda Klinik Bulgular	18
Subklinik Enfeksiyon	18
Akut Enfeksiyonlarda Klinik Bulgular	18
Şiddetli Akut Enfeksiyon (Hemorajik Sendrom)	19
Gebe Hayvanlarda Klinik Bulgular	20
Mukozal Hastalıkta Görülen Klinik Bulgular	20
Teşhis	21
Kontrol	23
Tezin Amacı	26
GEREÇ ve YÖNTEM	27
Serolojik Özelliklerin Belirlenmesine Yönelik Çalışmalar	27
Gereç	27
Hücre Kültürü	27
Viruslar	28

Monoklonal Antikor (mAb)	29
İkincil Antikor	29
Konjugat	29
İmmunizasyonda Kullanılan Hayvanlar	29
ELISA Kiti	30
İnaktivan	30
Yöntem	30
Antijen Hazırlama	33
Virusların Üretilmesi	33
İmmunoperoksidaz Testi (PLA) Standardizasyonu	33
Virus Üretiminin Kontrolü ve İmmunoperoksidaz Testi	34
Virusların Titrasyonu	35
Virusların Konsantrasyonu ve Diyalizi	35
Virus Varlığının Teyit Edilmesi	37
Protein Miktarının Belirlenmesi	38
Virus İnaktivasyonu	38
Virus İnaktivasyon İşleminin Kontrolü	39
İmmunize Edilecek Hayvanların Belirlenmesi	39
İmmunizasyon	40
Kan Alımı	41
Çalışılacak Serumların Belirlenmesi	41
Çapraz Nötralizasyon Testleri	42
Serolojik Yakınlık (R) Değerlerinin Hesaplanması	42
Aşı Etkinliği Çalışması	43
Gereç	43
Hücre Kültürü	43
Aşılar	43
Viruslar	44
Monoklonal Antikor, İkincil Antikor ve Konjugat	45
Araştırmada Kullanılan Hayvanlar	45
ELISA	46

Yöntem	46
Virusların Üretilmesi	48
Virus Üremesinin Kontrolü ve Virus Titrasyonu	48
Aşılama için Kullanılacak Hayvanların Belirlenmesi ve Gruplandırma	48
Aşılama	50
Kan Alımı	50
Nötralizan Antikor Titre Değerlerinin Belirlenmesi	50
Verilerin Analizi	51
BULGULAR	52
Serolojik Özelliklerin Belirlenmesine Yönelik Çalışmalar	52
İmmunoperoksidaz Testinin Standardizasyonu	52
Virus Üremesinin Teyidi ve Titrasyon Sonuçları	52
Virusların Konsantrasyonu ve Diyalizi	53
Virus Süspansiyonlarındaki Protein Miktarının Belirlenmesi	54
Virus Varlığının Teyit Edilmesi	54
İnaktivasyon İşleminin Kontrolü	54
İmmunize Edilecek Hayvanların Belirlenmesi	55
Çalışılacak Serum Örneklerinin Belirlenmesi	55
Çapraz Nötralizan Antikor Titreleleri	57
Serolojik Yakınlık (R) Değerlerinin Hesaplanması	58
Aşı Etkinliği Çalışması	58
Virus Üremesinin Teyidi ve Titrasyon Sonuçları	58
Nötralizan Antikor Titre Değerleri	59
TARTIŞMA ve SONUÇ	70
KAYNAKLAR	82
TEŞEKKÜR	96
ÖZGEÇMİŞ	97

ÖZET

Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) dünyada yaygın olarak görülen bir enfeksiyona neden olmaktadır. Çeşitli çalışmalarla farklı BVDV genotipleri içerisinde yer alan çok sayıda alt grup tanımlanmıştır. Ülkemizde gerçekleştirilen çalışmalarda en yaygın görülen alt grubun BVDV-1I'nin olduğunu gösterülmektedir. Tez çalışmasının amaçlarından biri Türkiye'de bulunan alt grupların serolojik ilişkilerinin belirlenmesidir. Bu amaçla farklı BVDV-1 (BVDV -1a, -1b, -1d, -1f, -1h, -1I) alt gruplarına ait inaktif virus suşları kullanılarak immunize edilen koyunlardan poliklonal antiserumlar elde edilmiş ve çapraz nötralizasyon çalışmalarında kullanılmıştır. Bu alt grupların antiserumlarıyla elde edilen nötralizan antikor yanıtlarının geometrik ortalamaları sırasıyla 1:320, 1:285, 1:320, 1:226, 1:1280, 1:1015 olarak değerlendirilmiştir. Test edilen alt gruplar arasında değişik düzeylerde serolojik farklılıklar saptanmıştır. BVDV-1f alt grubuyla diğer alt gruplar arasında önemli antijenik farklılıklar olduğu, buna karşı BVDV-1h ve BVDV-1I alt grupları ile söz konusu diğer alt gruplar arasında yakınlık olduğu belirlenmiştir.

Tez çalışmasının diğer bir amacı; Türkiye'de satışa sunulan BVDV aşılarının Türkiye'de görülen BVDV suşlarına karşı geliştirdiği nötralizan antikor yanıtlarının incelenmesidir. Bu amaçla 5 sığırdan oluşan 3 deneme grubunun her birine ayrı bir aşı uygulanmış ve 15 gün aralıklarla 6 defa kan örneği toplanarak 11 adet yerel BVDV suşuna karşı nötralizan antikor düzeyleri belirlenmiştir. Her üç aşının da yerel BVDV-1 suşlarının birçoğuna karşı belirgin bir nötralizan antikor yanıtı oluşturduğu (1:272 – 1:835) ancak yerel BVDV-2 suşuna karşı gelişen yanıtın düşük olduğu saptanmıştır. İlk deney düzeninde antijenik farklılığı saptanan BVDV-1f alt grubuna karşı tüm aşilarla, koruyucu olduğu öne sürülen titrelerden (1:256) daha yüksek nötralizan antikor titreleri geliştiği görülmüştür. Nötralizan antikor titreleri karşılaştırıldığında monovalan aşının multivalan aşılara kıyasla daha yüksek antikor yanıtı sağladığı belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: BVDV, alt grup, çapraz nötralizasyon, serolojik ilişki, aşı.

SUMMARY

Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) causes an infectious disease which is seen worldwide. By different studies many distinct subtypes were identified in both genotypes. Current studies showed that BVDV -1/ is predominant subtype in Turkey. The first aim of this study was to determine serological relations between the prevalent subtypes in Turkey. For that purpose polyclonal antiserums were obtained by immunization of sheep with 6 inactivated virus strains belonging to BVDV -1 subtypes (BVDV-1a, -1b, -1d, -1f, -1h -1i) and were used for cross-neutralization tests. Neutralizing antibody titers with using different antiserums are; 1:320, 1:285, 1:320, 1:226, 1:1280 and 1:1015 respectively. The degree of serologic diversity varied markedly between tested subtypes. However it is exhibited that subtype BVDV-1f was significantly diverse, BVDV -1h and BVDV-1i were closely related with the other tested subtypes especially subtypes found in common vaccines for BVDV.

The second goal of this study was to investigate the level of virus neutralizing (VN) serum antibodies raised against Turkish isolates by BVDV vaccines which is in the market in Turkey. For that purpose 3 experimental groups of cattle, each including 5 animals, were immunized with a separate BVDV vaccine. Blood samples were taken 6 times with 15 day intervals and used for determination of neutralizing antibody titers against 11 BVDV local strains. However all three vaccines induced neutralizing antibody titer against many of antigenically diverse BVDV-1 strains (1:272 – 1:835) seen in Turkey, antibody titers against BVDV-2 strain were lower. Although antigenic differences of BVDV-1f subtype was indicated in the first experimental scheme of this study, antibody titers generated by all three vaccines for this subtype were higher than recommended protection levels (1:256). When geometrical means of neutralizing antibody titers among three vaccine groups were compared, it was detected that the monovalent vaccine stimulated titers higher than multivalent BVDV vaccines.

Key words: BVDV, subtype, cross neutralization, serological relations, vaccine.



GİRİŞ

Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) tüm dünyada ve ülkemizde yaygın olarak görülen, başta sığırlar olmak üzere ruminantlar, domuzlar ve devegiller (deve, lama, alpaka vb) gibi pek çok hayvan türünde enfeksiyon oluşturan bir etkidir. BVD virus sığır yetiştiriciliğinin her aşamasında olumsuz etki gösteren pek çok klinik hastalığa yol açabilmektedir. Reprodüktif sorunlarla ilişkili üretim kayıpları, akut enfeksiyonlarda görülen immunosupresyon ile respiratorik ve enterik hastalıklar bu etkilerin başında gelmektedir. Dolayısıyla bu enfeksiyonun kontrolü sığır işletmelerinde ekonomik olarak önem taşımaktadır. BVDV ile ilişkili kayıpların engellenmesine yönelik tedbirler temel olarak fütal enfeksiyonun önlenmesine dayanmaktadır. Bu çerçevede uygulanmakta olan programlar; persiste enfekte hayvan oluşumunu engelleyerek saçılımın kısıtlanmasına ve immunizasyonla koruyucu bağışıklığın sağlanmasına dayanmaktadır. Kontrol programları geliştirilirken bölgedeki BVDV izolatlarının antijenik ve genetik çeşitliliğinin klinik görünümlere ve aşılama ile sağlanan korumaya etkisinin bilinmesi önemlidir.

İskandinav ülkelerinde gerçekleştirilen BVDV kontrol programları ile hastalık eradikasyon aşamasına gelmiş durumdadır (1). Ancak sığır haricindeki türlerde BVDV ile ilişkili hastalıkların bildirim gün geçtikçe artmaktadır (2-4). Uluslararası Virus Taksonomi Komitesi (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV) tarafından sınıflandırılmaları henüz kesinleştirilmese de son 10 yılda yapılan çalışmalar BVD virusunun da yer aldığı *Pestivirus* genusu içerisinde pek çok yeni virusun varlığını işaret etmektedir. Kenya sınırında zürafalarda görülen ve mukozal hastalık semptomlarına benzer bulgular oluşturan “Giraffe” izolatı (5), önce Brezilya daha sonra Güneydoğu Asya’da görülen “Hobi” izolatı (6), Amerika Birleşik Devletlerinde Amerikan antilobunda tanımlanan “Pronghorn” izolatı (7), Avustralya’daki domuzlarda neonatal ölüm veya ölü doğumlarla karakterize “Bungowannah” (8) virusları *pestivirus* genusunda yer aldığı öne sürülen yeni virus türleri arasındadır. Bu izolatlar içerisinde Hobi virusunun, tespitinden bu yana oldukça farklı coğrafyalarda varlığı bildirilmiş, hatta bir çalışma grubu tarafından BVDV-3 adıyla yeni bir genotip olarak tanımlanabileceği öne sürülmüştür (9).

BVDV genomunda yüksek oranda gerçekleşen değişiklikler birçok saha suşunun gelişimine yol açmaktadır. Bu konu üzerinde daha fazla veriye ihtiyaç duyulsa da BVDV alt gruplarının bölgesel dağılımları ve alt gruplar arasındaki çapraz bağışıklık varyasyonları

aşılamaıyla sağlanan korumayı etkilemektedir (10). Dolayısıyla hastalık kontrol stratejileri belirlenirken bölgede yaygın olan BVDV suşları ve bunların oluşturduğu bağışıklık yanıtı da dikkate alınmalıdır.

Bu tez çalışmasında Türkiye’de varlığı gösterilmiş olan BVDV alt grupları arasındaki serolojik ilişkilerin belirlenmesi; ve Türkiye’de kullanılan BVDV aşılarının yerel suşlara karşı oluşturduğu humoral yanıt düzeylerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.



GENEL BİLGİLER

Tarihçe

BVDV ilk olarak Olafson ve arkadaşları tarafından 1946 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nin New York eyaletinde sığırların yeni bir bulaşıcı hastalığı olarak tanımlanmıştır (11). Löykopeni, yüksek ateş, depresyon, ishal, gastrointestinal erozyonlar ve hemoraji ile karakterize olan hastalığa sebep olan etken Viral Diarrhea Virus ismini 1957 yılında almıştır. Kanada'da yine 1946 yılında Olafson'un tanımladığı hastalığa benzer ancak daha şiddetli bir hastalık tanımı yapılmıştır. Sürü başına daha az hayvanda rastlanan ama daha yüksek mortaliteyle seyreden bu hastalık başlangıçta "X-disease", daha sonra mukozal hastalık olarak adlandırılmıştır (12, 13). Nötralizasyon testleri her iki virus izolatının benzer olduğunu göstermiştir (14). Saha izolatlarının hücre kültüründe oluşturduğu etkilerin incelenmesi ile virusun sitopatojenik ve non-sitopatojenik formları belirlenmiştir. Yine aynı araştırmacılar tarafından bovine viral diarrhoea olgularından elde edilen izolatların non-sitopatojenik, mukozal hastalıkta elde edilenlerin ise sitopatojenik özellikte olduğu açıklanarak ilk sınıflandırma yapılmıştır (14). Söz konusu hastalık etkeni (BVDV) ile Avrupa domuz vebası ve sınır hastalığı virusları arasındaki immunolojik benzerliklerin ortaya konulması sonrasında (15) antijenik olarak ilişkili olan bu viruslar *Togaviridae* ailesi içerisinde *Pestivirus* genusunda sınıflandırılmışlardır (16). Moleküler karakterizasyon çalışmalarının geliştirilmesiyle genomik organizasyonları ve çoğalma stratejileri göz önüne alınarak bu genus 1991 yılında yeni oluşturulan *Flaviviridae* ailesi altında yeniden sınıflandırılmıştır (17, 18). Yapılan genomik incelemeler ve virus nötralizasyon testleri sonucu 1994 yılında bazı suşların önceden tanımlanan viruslardan farklı olduğu ve aralarında düşük serolojik ilişkilerin bulunduğu belirlenmiştir. Önceden tanımlanan suşlarla yeni bildirilen BVDV suşlarının ayrı gruplarda ele alınması önerilmiştir (19). BVDV olarak belirlenen izolatların filogenetik incelemelerinin yapılmasıyla klinik görünümleri ve konakçı dağılımı göz önüne alınarak BVDV-1 ve BVDV-2 genetik gruplandırması yapılmıştır (20).

Etiyoloji

Sınıflandırma ve Fizikokimyasal Özellikler

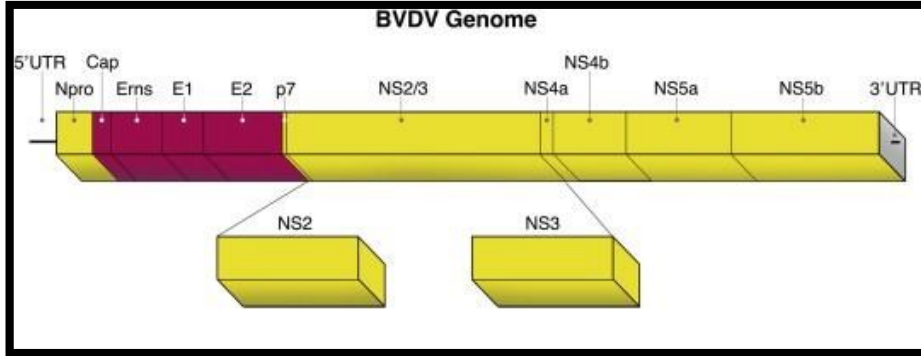
BVDV pozitif anlamlı, tek iplikçikli, ikozahedral simetrik ve zarflı bir RNA virusudur. *Pestivirus* genusunda yer alan ve veteriner hekimliğinde önemli olan diğer etkenler; Avrupa domuz vebası (hog cholera- classical swine fever) ve koyunların sınır hastalığı viruslarıdır (21).

Flaviviridae ailesi içerisinde yer alan viruslar 40-50 nm çapındadır. *Pestivirus* genusunu *Flaviviridae* ailesindeki diğer genuslardan ayıran bir özellik virionu çevreleyen lipid bilayer tabakasının pleomorfik olmasıdır (22). Söz konusu genus içinde yer alan viruslarda partikül büyüklüğündeki farklılıklar bu özellikten ileri gelmektedir. Ayrıca pestivirusların düşük pH ile inaktivasyona dirençli olmaları yine buldukları aile içerisinde farklılık yaratmaktadır. Geniş pH aralığında (pH 5,7-9,3) sabit kalabilen pestivirusların enfektivitesi dondurma işleminden etkilenmezken, 40°C'nin üstündeki sıcaklıklarda ise azalmaktadır (23).

BVDV Genom Yapısı

BVDV'nin tek iplikçikli RNA genomu yaklaşık 12,5 kb moleküler ağırlığa sahiptir ve tüm flaviviruslarda görüldüğü gibi 5' ve 3' uçlarında bilgi kodlamayan bölgelerle (UTR) çevrili tek bir "açık okunabilir bölgeden" (ORF) oluşmaktadır. 5'UTR bölgesi 360-390 nükleotidden oluşurken, 3'UTR bölgesi 200-240 nükleotidden oluşmaktadır (24). 5'UTR bölgesi pestiviruslar arasında oldukça korunan motifler içerdiği için PCR amplifikasyonlarında en çok kullanılan bölgedir. Bununla beraber pestiviruslara özgü olan N^{pro} ve E2 bölgeleri de aynı amaçla sıklıkla kullanılmaktadır (3, 25). Yaklaşık 4000 kodondan oluşan ORF'den sentezlenen tek bir uzun polipeptid, yapısal olmayan viral proteinler ve hücre proteazlarla bölünerek bağımsız viral proteinlere dönüşmektedir. Her biri farklı özelliklere sahip viral genler 5'→3' yönünde sırasıyla; N^{pro}, C, E^{ms}, E1, E2, p7, NS2/3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B'dir (Şekil 1). Virion içerisindeki nükleokapsid proteini (C) ve zarf glikoproteinleri olan E^{ms}, E1, E2 virusun yapısal proteinlerini oluştururken diğerleri yapısal olmayan proteinler arasında yer almaktadır. ORF'nin

translasyonu sonrasında ortaya çıkan poliprotein proteazlarla bölünmesiyle açığa çıkan proteinlerin özellikleri Tablo-1’de gösterilmiştir.



Şekil -1. Bovine Viral Diarrhoea Virus genom organizasyonu.

[Bu şekil Neill JD. ve arkadaşları 2013 (27) kaynağından alınmıştır.]

BVDV biyotiplerinin NS2/3 poliproteini yönünden farklılıklara sahip olduğu belirlenmiştir. Non-sitopatojenik BVDV suşlarında görülen NS2/3 proteinlerinin sitopatojenik suşlarda NS2 ve NS3 olarak 2 proteine ayrıldığı ve NS3 proteinin RNA replikasyonunda önemli olduğu bulunmuştur (26). Sitopatojenik suşlarda NS2/3 proteininin işlenmesi virus suşuna bağlı olarak farklı stratejilerle ilişkilendirilmiştir. Bu genomik değişimlerin; genom duplikasyonları, hücresel mRNA sekanslarının inzersiyonu ve nokta mutasyonlarından ileri geldiği bildirilmiştir (27). Viral genomda NS3 oluşumuyla ilişkilendirilen A ve B bölgeleri bulunmaktadır. Bunlar sırasıyla 1535. ve 1589. aminoasit pozisyonlarıdır. B bölgesindeki inzersiyonlar; bu bölgenin karboksi terminal ucuna yeni ayrılma bölgesinin tanımlanması ya da bu bölgeye oto-katalitik aktivitenin eklenmesi ile sonuçlanarak NS3 bölgesinin N-terminal ucunun NS2/3 prekürsöründen ayrılmasıyla sonuçlanmaktadır. A bölgesinde gerçekleşen inzersiyonlar ise konformasyonel değişimlerin şekillenmesine izin vererek, yine B bölgesinin ayrılmasına yol açmaktadır (23, 28).

Tablo-1. BVDV proteinleri ve bazı özellikleri*

Viral Protein	Sinonim	Büyükülüğü (Kilodalton)	Özellik	Fonksiyon
N ^{pro}	p20	20	Yapısal olmayan	Otoproteaz, (RNA replikasyonu için gerekli değildir)
C	p14	14	Yapısal	Virionun nükleokapsidini oluşturur
E ^{rns}	gp48	48	Yapısal	Zarf glikoproteini Ribonükleaz aktivitesi
E1		25	Yapısal	Zarf glikoproteini İntegral membran proteini
E2**	gp53	53	Yapısal	Zarf ilişkili glikoprotein İntegral membran proteini İmmunodominant yapısal protein
p7		7	Yapısal olmayan	Fonksiyonu kesin olarak bilinmiyor RNA replikasyonu için olmasa da enfektif virus üretimi için gerekli
NS2/3	gp125/80	125		NS2/3 ve NS3 RNA helikaz ve N terminal serin proteaz bölgeleri içererek kendini diğer yapısal olmayan proteinlerden ayırır
NS2	p54	54	Yapısal olmayan	
NS3	P80	80		
NS4A		7.2	Yapısal olmayan	Serin proteaz kofaktörü
NS4B		38-39	Yapısal olmayan	Replikaz bileşeni
NS5A		55-56	Yapısal olmayan	Replikaz bileşeni
NS5B		81-82	Yapısal olmayan	RNA bağımlı RNA polimeraz

* :Bu Tablo Ridpath J.F., 2005 (23) kaynağından alınmıştır.

** :Nötralizan epitoplarının önemli bir bölümü E2 glikoproteinleri üzerinde yer almaktadır.

Flaviviridae ailesi içerisinde yer alan diğer viruslarla karşılaştırıldıklarında pestivirusların iki özgün proteini bulunmaktadır. Bunlardan biri N^{pro}, diğeri E^{rns} glikoproteinleridir. N^{pro}; kendini viral polipeptidden ayırma özelliği taşıdığı gibi aynı zamanda amino terminal ucu konakçı immün sistemini baskılayıcı özellik de sergilemektedir. Değişik araştırmalar otoproteaz niteliğindeki N^{pro}'nun IRF-3 (interferon regülasyon faktörü) aktivitesini engelleyerek, uyarım antagonisti şeklinde çalıştığını ve tip I interferonun üretiminin engellendiğini göstermiştir (29, 30). Diğer bir özgün protein olan

E^{ms} glikoproteininin β interferon yanıtının tetiklenmesini engellediği düşünülmektedir. Enfekte hayvanlarda E^{ms}, E2 ve NS3 proteinlerine karşı gelişen etkili antikor yanıtı saptanabilirken, virus tarafından kodlanan diğer proteinlere karşı ya çok düşük miktarda antikor saptanabilmekte ya da hiç saptanamamaktadır. Virus replikasyonunda hücrede viral genomun serbest hale gelmesine olanak sağlayan reseptör aracılıklı endositosis ile ilişkilendirilen E^{ms}, E1, E2 glikoproteinleri nötralizan antikorların oluşumundan da sorumludur. Ancak nötralizasyon için immunodominant epitopları E2 glikoproteini sergilemektedir (31).

BVDV Biyotipleri

Hücre kültürlerinde oluşturdukları etkiye göre BVDV suşları sitopatojenik (cp) ya da non-sitopatojenik (ncp) olarak iki biyotipe ayrılmaktadır (24, 32). Sitopatojenik suşlar hücre kültürlerinde vakuolizasyon, hücre ölümü, vb değişikliklere neden olurken, non-sitopatojenik suşlarda hücre bütünlüğü ve morfolojisi korunmaktadır (33). BVDV biyotipik sınıflandırması *in vivo* şartlardaki virulensle ilişkilendirilmemektedir. Doğada cp suşlara nazaran ncp BVDV suşları daha yaygın olarak görülmektedir. Genellikle sahada cp suşlar mukozal hastalık (MD) olgularından ya da aşılama sonrası gelişen salgınlardan izole edilmektedir (23). MD olgularında sitopatojen biyotip ile enfeksiyon persiste enfekte hayvanın süper enfeksiyonuyla gerçekleşebileceği gibi nonsitopatojen biyotipin mutasyonu sonucunda da ortaya çıkabileceği bilinmektedir (34). Her iki biyotip de eşit patojeniteye sahip olabilir, şiddetli bulgulara yol açabilir. Ancak klinik olarak şiddetli akut BVDV enfeksiyonlarının büyük bir bölümü ncp viruslarla ilişkilendirilmiştir (35, 36). Daha da önemlisi persiste enfeksiyon sadece ncp biyotipteki suşlar tarafından oluşturulmaktadır (37, 38).

BVDV Genotipleri

Viral nükleik asit dizininde 5'UTR bölgesi baz alınarak yapılan karşılaştırmalar temel alınarak BVDV suşları BVDV-1 ve BVDV-2 olarak iki genotipe ayrılmıştır (19, 20). 1990'li yılların başlarında akut hemorajik sendrom olgularından izole edilen, yüksek

virülense sahip viruslar genotip -2 (BVDV-2) olarak, immunokompetans gelişen hayvanlarda orta şiddette enfeksiyon meydana getiren ve o güne kadar rutin aşılama programlarında ve diagnostik testlerde kullanılan izolatlar ise genotip -1 (BVDV-1) olarak sınıflandırılmıştır (19). Daha sonra yapılan çalışmalar ise iki genotip arasındaki filogenetik farklılığın sadece 5'UTR bölgesinden değil, tüm genom boyunca görülebilecek değişikliklerden ileri gelebileceğini göstermiştir (39). Ayrıca BVDV-2 suşlarının sadece şiddetli akut sendromlardan sorumlu olmayıp, her iki genotipin virulenslerinde de farklılık görülebileceği ortaya konulmuştur (40, 41).

Her ne kadar ilk yapılan sınıflandırma çalışmasında filogenetik analizler temel alınmış olsa da (19, 20), virus suşlarının karakterizasyonu için yapılan daha sonraki çalışmalar iki grup arasında antijenik ve serolojik farklılıklar olduğunu göstermiştir (42). BVDV genetik ve antijenik çeşitliliğinin, RNA viruslarında görülen yüksek mutasyon oranından kaynaklandığı düşünülmektedir. Diğer RNA viruslarında olduğu gibi BVDV'de de RNA polimeraz aktivitesinden dolayı genomik mutasyon ve antijenik varyasyonlar oldukça yaygındır (43). Pestiviruslarda E2 glikoproteinini kodlayan bölgede nokta mutasyonla ilişkili değişikliklere sık rastlanır. Bu sıklığın her virus çoğalma siklusunda 10 Kb'da 1 hata şeklinde gerçekleştiği gösterilmiştir (44). Bu veriye göre her bir virus çoğalma siklusu yeni bir varyant oluşumuna yol açabilmektedir. BVDV suşları arasında rekombinasyon şekillenebildiği (45) ve bu rekombinasyonun sadece cp virusun oluşumunda önemli olan NS3 gen bölgesinde değil, viral genomun farklı bölgelerinde de olabileceği gösterilmiştir (46).

BVDV Alt Grupları ve Genetik Çeşitlilik

BVDV genomundaki değişikliklerin suşlar arasında farklılıklara da yol açtığı gösterilmiş (47). Her iki genotip içerisinde monoklonal antikolar ve moleküler genetik yöntemler ile ortaya konulabilen alt gruplar tanımlanmıştır (48). Bugüne kadar BVDV-1 içerisinde 18 (BVDV 1a-1r) (25, 47, 49 - 53) ve BVDV -2 içerisinde 4 (BVDV 2a-2d) alt grup tanımlanmıştır (54).

Alt gruplar arasındaki antijenik farklılıklar çapraz nötralizasyon (43) ve monoklonal antikor reaksiyonları ile belirtilmiş (48); aşı etkinlikleri (55) ve diagnostik testler üzerine

etkileri gösterilmiştir (46). Monoklonal antikolar kullanılarak izolatlar arasında yüksek antijenik değişikliklerin gösterildiği bir çalışmada, antijenik varyasyonların hastalık oluşumu yanında şiddetli klinik görünümle de ilişkili olduğu öne sürülmüştür (56).

Söz konusu alt gruplar arasında klinik bulgular açısından ayırım yapılabilmeyeceği tartışma konusudur. Buzağuların BVDV-1d alt grubu ile deneysel olarak enfekte edildiği bir çalışmada, primer olarak solunum yolu hastalıkları gelişmiştir (57). Farklı bir çalışmada ise BVDV-1 ve ncp virusların solunum yolu hastalıklarında daha baskın olması fikri genetik olarak incelenmiş ve BVDV-1b alt grubunun solunum yolu ile ilişkili hastalıklarda daha sık görüldüğü belirlenmiştir (58). Bununla birlikte gebeliğin geç dönemlerinde gelişen fetal enfeksiyonlarda BVDV-1b yerine BVDV-1a'nın daha yaygın olduğu bulunmuştur (59). Bu çalışmalara karşın günümüzde klinik görünümünün temel alındığı bir genetik tiplendirme çalışması bulunmamaktadır. Klinik görümlere nazaran çapraz nötralizasyon yöntemiyle tespit edilen antijenik farklılıklar genotipik ayrımlar hakkında fikir verebilmektedir. Çapraz nötralizan antikor titreleri incelendiğinde; farklı genotipler arasında elde edilen titrelerin, aynı genotip içerisinde yer alan farklı alt gruplar arasında gelişen yanıtlara nazaran çok katlı artış gösterdiği belirlenmiştir (60, 61).

Epidemiyoloji

BVDV'nin doğal konakçısının sığırlar olduğu kabul edilmektedir. Sürü yönetim koşulları, aşılama durumu ve sürüde persiste enfekte (PI) hayvanların varlığı sürüde enfeksiyonun seyrini etkileyen faktörlerdir (62, 63).

BVDV enfeksiyonlarının büyük bir çoğunluğu ncp virus suşlarından kaynaklanır. Bulaşmada daha çok PI hayvanlar önemli görülürken, akut enfekte hayvanlardan horizontal bulaşma daha az görülmektedir (64, 65). Kontamine aşılar, semen ve hekimlerce kullanılan ekipmanlar iatrojenik bulaşmada etkilidir (66, 67). Sığır popülasyonlarında PI hayvanların prevalansının %1'den daha düşük olduğu gösterilmiştir (64).

Her ne kadar sığırlar BVDV enfeksiyonları için doğal konakçı olarak kabul edilse de domuz, koyun, keçi, bizon, geyik ve devegiller gibi diğer türlerin de virusa duyarlı

oldukları ve BVDV'nin bu hayvanlarda enfeksiyon oluşturduğu birçok çalışmada gösterilmiştir (69-72). Sığırlar dışındaki hayvan türlerinin enfekte olabilmesinin BVDV enfeksiyonunun epidemiyolojisinde kritik önemi olabileceği düşünülmektedir (69).

Türkiye'de yapılan çalışmalarda BVDV enfeksiyonunun muhtemelen enzootik bir hastalık olduğu gösterilmiştir (73, 74). Gün geçtikçe artan seroprevalans değerlerinin işletmeler arasında değerlendirildiğinde % 0.6 - %100 arasında (75-77), örneklenen popülasyon içerisinde ise % 31.7 – 96.8 arasında seyrettiği ortaya konulmuştur (78-80). Örneklenen popülasyonlarda persiste enfeksiyon oranlarının %0.07 – % 0.25 arasında seyrettiği bildirilmiştir (76, 77, 82).

Birçok ülkede BVDV-1'in predominant genotip olduğu belirlenmiştir (22, 83). Bazı BVDV alt gruplarının da farklı coğrafik lokalizasyonlarda ağırlıklı olarak görüldüğü belirlenmiştir. BVDV-1 alt gruplarının coğrafik dağılımları Tablo 2-6'da gösterilmiştir.

Benzer şekilde Türkiye'de yapılan çalışmalarda da BVDV-1'nin yaygınlığının BVDV-2 genotipine kıyasla daha fazla olduğu görülmüştür (25, 84, 85). Yeşilbağ ve arkadaşları (25), 7 bölgede 15 ilden izole edilen 30 virus izolatının dizi analizlerini incelemişlerdir. N^{pro} bölgesi temel alındığı bu çalışmada, 1 izolatın BVDV-2 genotipinde, 29 izolatın BVDV-1 genotipinde yer aldığı gösterilmiştir. BVDV-1 genotipi içerisinde yer alan izolatların 15'inin BVDV-1/ alt grubunda, diğerlerinin BVDV-1a (4 izolat), BVDV-1b (4 izolat), BVDV-1d (3 izolat), BVDV-1f (2 izolat), BVDV-1h (1 izolat) şeklinde dağıldığı belirtilmiştir. Oğuzoğlu ve arkadaşlarının (86) gerçekleştirdiği çalışmada 10 farklı ilden elde edilen izolatların 5'UTR ve N^{pro} bölgeleri baz alınarak yapılan karakterizasyonunda 40 izolattan 18 adeti BVDV-1/ , 10 adeti BVDV-1f, 7 adeti BVDV-1b, 3 adeti BVDV-1d ve 2 adeti BVDV-1a alt grubunda yer almıştır. Yılmaz ve arkadaşlarının (85) gerçekleştirdiği çalışmada ise Türkiye'nin 4 farklı bölgesinden temin edilen 19 izolatın E2 ve 5'UTR genomik bölgeleri temel alınarak yapılan filogenetik analizinde 2 örneğin BVDV-2 genotipinde, 17 örneğin ise BVDV-1 genotipinde olduğunu göstermişlerdir. BVDV-1 alt grupları arasındaki dağılımın BVDV-1f (8 izolat), BVDV-1i (1 izolat), BVDV-1d (1 izolat) olduğu, 7 örneğin ise daha önce tanımlanmamış yeni bir alt grupta yer aldığı bildirilmiştir. Bu çalışmalar ışığında Türkiye'de sirküle olan izolatlar arasında en yaygın genetik alt grupların BVDV-1/ ve BVDV-1f olduğu görülmektedir (Tablo- 6).

Tablo-2. BVDV-1 alt gruplarının Amerika kıtasındaki dağılımı

Ülke	Gen bölgesi	Yıl*	BVDV-1 alt grupları																	Kaynak
			a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	m	n	o	p	q	
ABD	E2	1998 - 2001	6	26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(87)
Arjantin	5'-UTR, Npro	1994 - 2004	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(88)
Brezilya	5'-UTR, Npro	1994 - 2004	4	2	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(88)
Brezilya	5'-UTR		8	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(89)
Peru ve Şili	5'-UTR, Npro	1994 - 2004	2	23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(90)
Toplam			21	54			1													

*Virus izolasyonunun yapıldığı yılı göstermektedir.

Tablo-3. BVDV-1 alt gruplarının Avustralya kıtasındaki dağılımı

Ülke	Gen bölgesi	Yıl*	BVDV-1 alt grupları																	Kaynak
			a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	m	n	o	p	q	
Avustralya	5'UTR	1989 - 2010	13	1	425	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(83, 91)
Toplam			13	1	425															

*Virus izolasyonunun yapıldığı yılı göstermektedir.

Tablo-4. BVDV-1 alt gruplarının Afrika kıtasındaki dağılımı

Ülke	Gen bölgesi	Yıl*	BVDV-1 alt grupları																Kaynak		
			a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	m	n	o	p		q	r
Mısır	5'-UTR, Npro	1994 - 2004	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(88)
Tunus	5'-UTR, Npro	2001 - 2002	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(92)
Toplam				2																	

*Virus izolasyonunun yapıldığı yılı göstermektedir.

Tablo-5. BVDV-1 alt gruplarının Asya kıtasındaki dağılımı

Ülke	Gen bölgesi	Yıl*	BVDV-1 alt grupları																	Kaynak		
			a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	m	n	o	p	q		r	?
Çin	5'-UTR, N ^{pro}	2005 - 2008	2	21	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14	-	1	6	2	-	-	(51, 52,93)
Hindistan	5'-UTR, N ^{pro}	2000 - 2008	7	34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(94, 95)
Japonya	5'-UTR	1975 - 2008	118	186	148	-	-	-	-	-	3	-	-	-	2	1	-	-	-	3	(49, 96-98)	
Kore	5'-UTR	2005 - 2008	20	6	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	(99, 100)	
Toplam			147	247	156	2					3			14	3	2	6	2		3		

*Virus izolasyonunun yapıldığı yılı göstermektedir.

Tablo-6. BVDV-1 alt gruplarının Avrupa kıtasındaki dağılımı

Ülke	Gen bölgesi	Yıl*	BVDV-1 alt grupları																	Kaynak		
			a	b	c	d	e	f	g	h	i	J	k	l	m	n	o	p	q		r	?
Almanya	5'UTR, E2	1960-2000	1	31	-	24	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(101)	
Avusturya	5'UTR, N ^{pro}	1997-2006	4	52	2	31	6	112	7	153	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	(47, 102, 103)	
Birleşik Krallık	5'UTR, N ^{pro}	1966- 2009	304	58	-	-	3	1	-	-	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(47, 106, 107)	
Çek Cumhuriyeti	5'UTR, N ^{pro}	2004-2007	-	16	-	16	2	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(104)	
Danimarka	5'UTR	1962-2002	-	6	-	29	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(105)	
Finlandiya	5'UTR, N ^{pro}	1994- 2004	-	-	-	5	-	1	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	(88)	
Fransa	5'UTR, N ^{pro}	1993-2005	3	15	-	3	46	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	(47, 50)	
İrlanda Cumhuriyeti	5'NCR	1968-1998	24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(108)	
İspanya	5'UTR, N ^{pro}	1989-2002	1	63	2	-	6	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(47, 109, 110)	
İsveç	5'NCR	2002-2004	7	42	-	77	57	-	-	61	-	-	38	-	-	-	-	-	-	-	(43, 88, 111)	
İsviçre	5'UTR, N ^{pro}	-	-	21	-	-	76	-	-	44	-	-	37	-	-	-	-	-	-	-	(88, 112)**	
İtalya	5'UTR	1995-2007	8	75	1	10	33	6	4	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	(47, 113- 115)	
Macaristan	5'UTR, N ^{pro}	1971-1998	-	2	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(47)	
Portekiz	5'UTR	1994 2001	6	19	-	3	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(116)	
Slovakya	5'UTR, N ^{pro}	1994- 2004	-	-	-	1	1	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(47,88)	
Slovenya	5'UTR, C-N ^{pro}	1997-2001	-	4	-	17	-	21	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(117)	
Türkiye	5'UTR, N ^{pro} , E2	1997-2011	7	11	-	7	-	20	-	1	1	-	-	34	-	-	-	-	-	3	7	(25, 53, 85, 86, 118)
Toplam			365	415	5	223	234	175	12	267	21	2	78	37						3	15	

* :Virus izolasyonunun yapıldığı yılı göstermektedir.

** :Oransal değerler rakamsal değerlere dönüştürülerek en yakın tam sayıya tamamlanmıştır.

Patogenez

BVDV solunum, sindirim, hematolojik, immünolojik, nörolojik ve reproduktif sistemler gibi pek çok farklı sistem üzerine patolojik etkiler doğurur.

Akut Enfeksiyon

Her yaştaki seronegatif, immunokompetant duyarlı sığırların etkenle ilk kez karşılaşması sonucu akut enfeksiyon gelişebilmektedir (119).

Akut enfeksiyonlarda primer olarak virus girişi genellikle nazal ya da oral yolla şekillenmektedir (120). Virus ilk olarak tonsiller, lenf dokusu, nazal ya da orofarengeal mukozada ürer (121). Virusun oro-nazal mukoza epitelyal hücrelerinde hızlı üremesi mukozal ülserasyonlara, salya ve burun akıntısına sebep olur (119). BVDV kan damarları aracılığıyla sistemik olarak yayılabileceği gibi virus ya da enfekte hücreler periferik lenfoid dokulara fagositler aracılığıyla da taşınabilmektedir. Her ne kadar yüksek virulense sahip suşlarda virus saçılımı uzun süre devam etse de, viremi enfeksiyon sonrasında 24 saat içerisinde başlayabilir ve genellikle bulaşmanın ardından kan ve nazal akıntılardan 3-10 gün süresince virus tespit edilebilir (119, 122, 123). Sistemik yayılım sırasında virus özellikle lenfoid dokularla birlikte pek çok dokuya girebilmektedir. Antikor yanıtının ise enfeksiyondan 2-3 hafta sonrasında tespit edilebilir seviyeye geldiği ve enfeksiyondan 10-12 hafta sonrasında en yüksek düzeye ulaştığı bildirilmiştir (123). Antikor düzeyinin yavaş gelişmesi etkenin oluşturduğu immunosupresif etkiden kaynaklanmaktadır (120).

Enfeksiyonun seyri etkenin virulensi ile yakından ilişkilidir. Gerek düşük, gerekse yüksek virulensli suşlarda enfeksiyon tonsil ve lenfoid dokuda başlar. Ancak yüksek virulense sahip suşların oluşturduğu kemik iliği enfeksiyonuna bağlı olarak dokulardaki antijen miktarının hızla artmasına ve trombosit sayısında düşümlere sebep olduğu değerlendirilmiştir. Düşük virulensli suşların enfeksiyonunda etken dokulardan elimine edilirken, yüksek virulensli suşlarla meydana gelen enfeksiyonlarda etken yayılmaya devam etmektedir. Bu durum şiddetli akut BVDV enfeksiyonlarında görülen doku hasarına yol açmaktadır (124, 125). Yüksek virulense sahip BVDV suşları başta lenfoid dokular olmak üzere endokrin sistem dokuları ile solunum ve sindirim yolu mukozalarında

bulunmaktadır. Sindirim kanalında, üst sindirim kanalı epitellerinin nekrozu ve barsak kriptlerinde erozyondan ülserasyona kadar değişen lezyonlar ile karşılaşmaktadır (124).

Hem lenfositler, hem de makrofajlar BVDV'nin hedef aldığı hücreler arasındadır. Akut enfeksiyonlarda gelişen immunosupresyon nekroz ve apoptoz aracılığıyla dolaşımdaki lenfositlerin sayısal olarak azalması (lenfopeni) ve lökosit fonksiyonunun bozulmasından ileri gelmektedir. Dolayısıyla, akut BVDV enfeksiyonlarında görülen B ve T hücre sayısındaki azalmanın şiddeti virulensin belirlenmesinde bir kriter olarak kullanılmaktadır (121). Lenfosit sayısındaki azalma yüksek virulense sahip suşlarda %60-90 arasında değişirken, düşük virulense sahip suşlarda %50'nin altında kalmaktadır (23).

Transplasental Enfeksiyon

Akut enfeksiyonda hayvanın gebe olması durumunda ağır sonuçlarla karşılaşmaktadır. Kontamine semen ya da venereal yolla, gebelikten kısa bir süre önce gerçekleşen akut enfeksiyonlar, gebelik süresinde annenin maruz kaldığı akut enfeksiyonlar veya annenin PI olması durumunda transplasental enfeksiyon şekillenebilmektedir.

BVDV plasentayı geçme ve intrauterin enfeksiyon geliştirme yeteneğine sahiptir. Gebelik sırasında gerçekleşen intrauterin enfeksiyonun sonuçları daha çok gebelik dönemiyle ya da etkenin özellikleriyle ilişkilendirilmektedir. Her iki BVDV genotipi de (BVDV-1, BVDV-2) transplasental enfeksiyon gerçekleştirebileceği gibi, her iki genotipin aynı anda yer aldığı enfeksiyonların da saptanabildiği bildirilmiştir (126). Bununla beraber her iki biyotip (cp ve ncp) de genital dokuyu enfekte edebilme, plasentayı geçebilme ve fötüsü enfekte edebilme yeteneğine sahiptir (127, 128). Ancak erken gebelik döneminde ncp virus varlığının “immunotolere persiste enfeksiyonu” şekillendirdiği, cp virusların ise sıklıkla fötal hasara yol açtığı bilinmektedir (129).

Preovülasyon ya da gebeliğin 45. gününden önceki dönemlerinde şekillenen genital kanal enfeksiyonlarında granuloza hücrelerinin nekrozu fertilite oranlarının azalması gibi reproduktif performans problemleriyle ilişkilendirilmektedir (130). Ovaryum enfeksiyonlarında gelişen nonpurulent intersitiasal yangı, granuloza hücreleri ve

folliküllerin nekrozu, vb lezyonların hormonal düzeylerde değişikliklere yol açtığı, dolayısıyla gebelik oranlarında azalmalara sebep olduğu bildirilmiştir (127, 130). Bununla birlikte gebeliğin 45. gününe kadar gelişen enfeksiyonlar embriyonik ölümlerle ve rezorbsiyonla sonuçlanmaktadır (131).

Gebeliğin 45. gününden sonra gerçekleşen fetal enfeksiyonlar; abort, ölü doğum, teratojenik etkiler, PI ya da seropozitif normal görünümlü buzağı doğumuyla sonuçlanabilmektedir (131). Gebeliğin I. trimesterinin geç dönemleri, II. trimester ve erken III. trimesterlerde gelişen fetal enfeksiyonlar farklı kongenital anomalilerin şekillenmesine sebep olabilmektedir. BVDV enfeksiyonlarında abort olgularının patogenezi tam olarak açıklanamamıştır. Ancak plasentadaki nekroz ya da non-spesifik lezyonların, birçok fetal dokuda virus ve mononükleer hücre infiltrasyonları varlığının (133, 134) abortu başlatan faktörler olduğu düşünülmektedir.

Organogenezin tamamlanmasından önce gerçekleşen süreçte BVDV teratojenik etkilere de yol açabilmektedir. Fötusta etkilenen dokular arasında beyin, timus, kaslar, kemik ve akciğerler sayılabilir (135). Gebeliğin 100. ve 150. günleri arasında, yani organogenezin son aşamalarında beyin ve göz gelişimi gerçekleştiği için bu dokularda gelişen lezyonlar en çok karşılaşılan teratojenik etkileri oluşturmaktadır. Serebellar hipoplazi, mikroensefali, hidrensefali, retinal displazi, retinada pigment kaybı ve retinal atrofi en sık karşılaşılan bulgulardır (138, 142, 143).

Yavruda immun sistemin gelişimi yaklaşık 180. günde tamamlanmaktadır. Ancak bu aşamaya ulaşamayan fötuslarda virusa karşı zayıf ya da hiç gelişmeyen antikor yanıtı görülmektedir (136, 137). Gebeliğin 125. gününe kadar, özellikle de 30-90. günleri arasında (132, 136) ncp BVDV ile enfeksiyon şekillenmesi PI yavru gelişimi ile sonuçlanmaktadır. Sonuçta, etkeni organizmaya yabancı olarak görmeyen, yaşamı boyunca akut enfeksiyonlara kıyasla oldukça yüksek düzeyde virus saçan ve klinik olarak normal görünümlü olan immunotoler PI yavru şekillenmektedir (138). Persiste enfeksiyonun tip-I interferon yanıtının etkilenmesiyle geliştiği düşünülmektedir (139). PI hayvanlar yavaş gelişim gösterebilmekte veya ölü doğabilmektedirler (132, 140). İmmunosupresyonla sonuçlanan bağışıklık sistemi hasarlarından dolayı bu hayvanlarda yaşamlarının ilk dönemlerinde daha yüksek oranda enfeksiyona maruz kalma durumu ve ölüm görülmektedir (141).

Gebeliğin II. trimesterinde ftal immun sistemin gelişmiş olması yavrunun enfeksiyona karşı immun yanıt şekillendirmesine yol açmaktadır. Dolayısıyla gebeliğin 90. ve sonrasındaki günlerinde gelişen enfeksiyonlarda, doğan buzağıların prekolostral kan örneklerinde nötralizan antikorlar tespit edilebilir (23). Ftal lenfoid dokunun ve immunokompetansın gelişiminin tamamlanmadığı bu hayvanlarda non-sitopatojen viruslarla gerçekleşen enfeksiyonlarda oluşan ftal hasar sınırlı düzeydedir ve gebelik devam edebilmektedir. Bu durum klinik olarak normal görünümlü, akut enfeksiyonu atlatabilen, sürekli viremik olmayan, seropozitif buzağı doğumlarıyla sonuçlanabilmektedir.

Mukozal Hastalık

Mukozal hastalık (MD) sadece ncp BVD virusla PI hayvanlarda, antijenik olarak homolog cp suşla süperenfeksiyon şekillenmesiyle gelişmektedir (144). MD olgularında enfeksiyonun seyri iki biyotip arasındaki benzerliğe bağlıdır. Süperenfeksiyon farklı stratejilerle gelişmektedir. Bu durum homolog bir cp virus suşunun horizontal bulaşmasının yanında, PI oluşturan ncp virusun mutasyonu ile da gelişebilmektedir. Bu mutasyonla antijenik yapıda değişim olmamakta, ancak cp virusun konakçı savunması tarafından tanınmadan replike olması sağlanmaktadır (46).

Enfeksiyon başlangıcıyla birlikte virus tonsiller epitel hücrelerinde çoğaldıktan sonra bölgesel lenf yumrularına, Peyer plaklarına, barsaklarda mukoza ilişkili lenfoid dokuya ve akciğer ya da nazal lenf follikllerine yayılmaktadır. Epitel dokuda enfeksiyon gelişimi ancak lenfoid dokunun enfeksiyonu sonrasında gerçekleşmekte ve artan apoptotik hücre ölümü her iki dokuda oluşan lezyonların temelini oluşurmaktadır. İntestinal mukozada ise enterositler luminal yüzeyden değil, bazolateral yüzeyden enfekte olmaktadır (135).

Klinik Bulgular

BVDV enfeksiyonu sonrasında, etiyolojik ajan ya da konakçıya bağlı faktörlerin etkisiyle değişik klinik bulgular görülmektedir. Biyotip (cp, ncp), genotip (BVDV-1, BVDV-2) ve suşa ait virulens farklılıkları enfeksiyonun klinik görünümünü etkileyen viral etiyolojik özelliklerdir. Bunun yanında immunokompetans gelişimi, bağışıklık ya da gebelik durumu ve dönemi (<45 gün, 45-125, 100-175, >150) gibi faktörler de klinik bulgulara etki eden konakçı faktörleridir.

Gebe Olmayan Hayvanlarda Klinik Bulgular

Subklinik Enfeksiyon

Gerek deneysel, gerekse saha çalışmalarında immunokompetans gelişmiş seronegatif hayvanlarda en çok gözlenen akut enfeksiyon formunun subklinik enfeksiyon olduğu gösterilmiştir. Klinik yansıma olmaksızın gelişen bu tip enfeksiyonların oranı %70-90 arasında değişmektedir (145). Subklinik enfeksiyonun hafif ateş, löykopeni ve antikor gelişimiyle seyrettiği görülmektedir. Ayrıca, sütçü sığırlarda süt üretiminde azalmanın subklinik enfeksiyonlarla ilişkili olabileceği bildirilmiştir (146).

Akut Enfeksiyonlarda Klinik Bulgular

Akut enfeksiyon tanımı serokonversiyon durumuna bakılmaksızın, PI olmayan, immunokompetan hayvanlarda görülen BVDV enfeksiyonları için kullanılmaktadır. Her iki biyotip de bu formu oluşturmakla beraber ncp virüslere daha sık rastlanmaktadır. Enfeksiyon yüksek morbidite, düşük mortalite ve minimal mukozal lezyonlarla karakterizedir. Klinik bulgular olarak farklı düzeylerde seyreden ateş, iştahsızlık, halsizlik, löykopeni, oküler ve nasal akıntı, oral erozyon ya da ülser, diş eti ve vulvada lezyonlar ile ishal sayılabilir. Neonatal buzağılarda enteritis, hızlı solunum ve pnömoni gözlenir (147). İntranasal yolla şekillendirilen deneysel bir enfeksiyonda klinik bulgular olarak iştahsızlık, ateş, kanlı ishal geliştiği, makroskopik patolojik bulgular olarak alt sindirim, solunum ve lenfatik sistemde lezyonlar görüldüğü, mediastinal ve mezenterik lenf nodüllerinde şişme, hemoraji ve ödem tespit edildiği bildirilmiştir. En belirgin postmortem bulgu olarak gastrointestinal sistemde şiddetli konjesyon ve multifokal hemoraji görünümü belirtilmiştir (148).

BVDV'nin immunosupresif etkisinin görülmesi halinde pek çok sistemi etkileyebilecek sekonder hastalıklarla da karşılaşılabilir. BVDV solunum yolu epitellerinde üreyebilmekte ve sığır solunum yolu hastalıklarına sebep olabilmektedir. Bununla birlikte etkenin nötrofil, monosit ve lenfositlerin fonksiyonlarını baskılamasından dolayı gelişen immunosupresyonun akut enfeksiyonlarda "sığır solunum yolu kompleksi- (BRDC)" gelişiminden sorumlu olduğu düşünülmektedir (149). Bu seyir şekli bovine

respiratory syncytial virus (BRSV) ve bovine herpes virus tip-1 (BHV-1) gibi etkenlerle komplike olgularda daha şiddetli klinik görünümle sonuçlanabilmektedir (149, 150).

Neonatal buzağılarda gelişen BVDV enfeksiyonları enteritis ile ilişkilendirilmektedir (151). Deneysel BVDV enfeksiyonlarında etkenin neonatal buzağılarda enteritise sebep olan direkt ve indirekt etkileri görülmüştür. Virus direkt olarak duodenumda villöz atrofi ve barsak mukozası yangısına yol açarken, rotavirus ile gerçekleşen kombine enfeksiyonların daha şiddetli sonuçlandığı belirtilmiştir (152).

Etken transplasental enfeksiyona yol açabileceği gibi genital sistemi etkileyerek verim kaybına da yol açabilmektedir. Dişi hayvanlarda akut BVDV enfeksiyonları ovaryum fonksiyonlarında değişikliklere yol açarak fertilité azalmasına neden olabilmektedir (127, 153). Virus aynı zamanda immunokompetan akut enfekte boğaların semenlerinde bulunmuş ve viremi görülemeyen aşamalara ulaşıldığında bile etkenin çok uzun süre semenle saçıldığı gösterilmiştir (154). Ayrıca enfekte semenlerle yapılan tohumlamalarda reproduktif performansın düştüğü gösterilmiştir (155).

Şiddetli Akut Enfeksiyon (Hemorajik Sendrom)

Akut BVDV enfeksiyonlarının bir diğer görünümü ncp BVDV-2 suşlarıyla ilişkilendirilen “Hemorajik Sendrom”dur. Etkilenen sığırlarda genellikle belirgin trombositopeni, mukozal yüzeylerde peteşi ve ekimozların oluşumu, epistaksis, kanlı ishal, ateş, lökopeni ve ölüm ortaya çıkmaktadır (120).

Yüksek morbidite ve mortaliteye sahip bir perakut BVDV formu 1990 ve sonrasında tanımlanmıştır. Her yaş grubundaki sığırlarda ateş, pnömoni, ani ölüm ve abort görülebilen bu formda aynı zamanda mukozal hastalığı andıran şiddetli lezyonların görüldüğü ve mortalite oranının %25 olduğu bildirilmiştir (18). Bu olgulardan elde edilen izolatlar nükleik asit çalışmalarıyla o dönemde bilinen klasik BVDV etkeninden farklı olduğu bildirilerek, BVDV-2 genotipinde sınıflandırılmıştır (20). Ancak günümüzde BVDV-2 genotipinde yer alan virusların tamamının şiddetli klinik görünüme yol açmadığı hatta her iki genotipin de şiddetli akut enfeksiyonlardan sorumlu olabileceği kabul edilmektedir.

Gebe Hayvanlarda Klinik Bulgular

İmmunokompetant gebe sığırlardaki enfeksiyonlarda klinik görünüm subklinik, akut, şiddetli akut ya da hemorajik sendromda görülen bulgularla aynıdır. Gebe hayvanlarda klinik bulguların görülmemesi fetal korunmanın sağlandığını ya da transplasental enfeksiyonun olmadığını göstermeyebilir. BVDV enfeksiyonlarının yaklaşık %100'ünde etkenin plasentayı geçebildiği deneysel olarak gösterilmiştir (156).

İmplantasyon öncesi dönemde gelişen enfeksiyonlarda embriyonik ve fetal ölümler görülürken, 40-125. günler arasında gelişen enfeksiyonlar fetal ölüm, mumifikasyon, abort, PI yavru doğumu ve düşük oranda teratojenik etkilerle sonuçlanmaktadır (132, 157, 158).

Gebeliğin orta dönemlerinde (125-180) gerçekleşen enfeksiyonlar yüksek oranda kongenital enfeksiyonlarla sonuçlanır. Daha ileriki dönemlerde (gebeliğin 210. gününe kadar) gerçekleşen transplasental enfeksiyonlarda da abort olgularına neden olabileceği bildirilmiştir (157).

Gebeliğin 100-180. günleri arasında gelişen BVDV enfeksiyonlarında görülebilen pek çok teratojenik etki mevcuttur. Bu süreçte fetus, bağışıklık sistemi gelişiminin ve sinir sistemi organogenezinin son aşamasındadır. BVDV enfeksiyonlarında karşılaşılan bozukluklar olarak merkezi sinir sistemi defektleri (serebellar hipoplazi, hidrensefalus), oküler defektler (retinal atrofi, retinal displazi, katarak), timik hipoplazi, gelişim geriliği, pulmoner hipoplazi, brahignati, artrogripozis ve diğer iskelet anomalileri sayılabilir (143, 159).

Mukozal Hastalıkda Görülen Klinik Bulgular

MD non-sitopatojen BVDV ile persiste enfekte buzağuların antijenik olarak benzer sitopatojen BVDV ile süperenfeksiyonunda şekillenen sporadik bir hastalık tablosudur. Deneysel olarak gerçekleştirilen MD olgularında 7-14 günde klinik bulguların geliştiği “erken MD” formu ve aylar sonra klinik bulguların görüldüğü “geç MD” formu tanımlanmıştır (160). Bu çalışmada (160) geç MD formunun süperenfeksiyonu oluşturan

sitopatojen virusun non-sitopatojen virusla rekombinasyonu sonucunda ortaya çıktığı, erken MD formunun ise homolog sitopatojen virusla süper-enfeksiyon sonucunda şekillendiği belirlenmiştir.

Mukozal hastalık görülen olgularda şekillenen klinik bulgular ateş, anoreksia, taşikardi, polipnoe, azalan süt verimi, mukoza ve fibrin içerikli kanlı, pis kokulu sulu ishal, dış eti, dil, damak ve deride oluşan, iyileşmeyen eroziv ya da ülseratif lezyonlar, interdigital bölge ve vulvada gelişen erozyonlar şeklinde sıralanabilir. Postmortem bulgularda gastrointestinal sistem ve solunum yollarında nekrotik ülserler ya da erozyonlar görülebilmektedir (161). Bu hayvanlarda ölüm oranı %100' dür. Görülen klinik bulgular hemorajik sendrom seyrine benzese de MD olgularında destekleyici tedaviden yanıt alınmamaktadır.

Teşhis

Çok değişken klinik görünümünün gelişimi sahada BVDV enfeksiyonlarının teşhisini güçleştirmektedir. Serum, kan, farklı dokular, sekret ve eksretlerden BVDV tespiti için bir çok metot geliştirilmiştir. Bunlar virus izolasyonu, floresan antikor testi, immuno-histokimyasal testler, ELISA, reverz transkriptaz-polimeraz zincir reaksiyonu ve modifikasyonları olarak sıralanabilir (162).

Biyolojik olarak aktif virus tespitine imkan sağlaması sebebiyle hücre kültürlerinde gerçekleştirilen virus izolasyonu standart yöntem olarak kabul edilmektedir (163). Virus tespiti için hücre kültürüne inokulasyon sonrasında uygulanan immunoperoksidaz testi (peroksidaz bağlı antikor testi - PLA), immunofloresan testleri ve ELISA, nükleik asit tespiti için reverz-transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu, antikor tespiti için ise virus nötralizasyon ve indirekt ELISA en yaygın kullanılan testler arasındadır (163, 164). Ancak bu yöntemlerden hiçbiri akut enfeksiyonla PI arasındaki farkı gösterememektedir. Bu sebepten PI hayvan tespiti için 3 hafta ara ile sağlanan örneklerde ardı ardına iki kez antijen pozitif test sonucu elde edilmesi gerekmektedir (162).

Doğal enfeksiyon ve modifiye canlı aşılama yapılan hayvanlarda NS2/3 – NS3 proteinine karşı yüksek antikor yanıtı gelişirken, inaktif aşı ile aşılama yapılan hayvanlarda

antikor yanıtı virus yüzeyinde bulunan yapısal proteinlere karşı gelişmekte, yapısal olmayan NS2/3 – NS3 proteinine karşı gelişmemektedir (23). Dolayısıyla NS2/3 – NS3 proteini ya da buna spesifik antikor varlığının tespit edilmesinin doğal enfeksiyonla inaktif aşılama arasındaki ayrımın yapılmasına imkan verebileceği düşünülmektedir. İnaktif virusla aşılama sığır serumlarında nötralizasyon testi ve farklı glikoproteinleri hedef alan ELISA tekniklerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada; ELISA yöntemi ile NS2/3 proteinine spesifik antikor yanıtının tespit edilememesi bu düşüncüyü desteklemektedir (165).

Virus izolasyon-immunoperoksidaz, immunoperoksidaz monolayer, indirekt immunoperoksidaz monolayer ve reverz transkriptaz-polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PZR) testlerinin BVDV tespitindeki etkinliklerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada RT-PZR testinde % 93,3; virus izolasyon- immunoperoksidaz testinde % 91,1; indirekt immunoperoksidaz monolayer testinde % 88,8 ve immunoperoksidaz monolayer testinde % 82,2 pozitif sonuç elde edilerek tekniklerin duyarlılıkları ortaya konulmuştur (166).

Günümüzde farklı duyarlılıklara sahip pek çok teşhis yöntemi bulunmasına rağmen BVDV'nin özellikleri göz önüne alındığında virus tespitini olumsuz etkileyen bir çok özel durum bildirilmiştir. Farklı 6 ülkeden orijin alan ve 5 farklı laboratuvarından temin edilen 23 pestivirus suşunun monoklonal antikorlarla karşılaştırıldığı bir çalışmada, aynı isimle farklı laboratuvarlarda kullanılan BVDV suşlarının farklılık gösterdiği bildirilmiştir. Sık gerçekleşen genomik değişikliklerin ve kesin olarak bilinmeyen epitopik varyasyonların buna sebep olduğu öne sürülmüştür (167). BVDV'nin DNA polimeraz enziminden yoksun olması sebebiyle proofreading mekanizması taşımayan RNA viruslarındaki yüksek mutasyon olasılığının laboratuvar çalışmalarındaki standardizasyonu etkilediği yine Türkiye'de gerçekleştirilen bir çalışmada desteklenmiştir (168).

Çok sayıda monoklonal antikorun kullanıldığı bir çalışmada, E2 proteinine spesifik 13 antikordan sadece 2'sinin tüm BVDV-2 suşlarını tanıdığı ve hiçbirinin BVDV-1 suşlarını tanımadığı belirtilmiştir (31). Daha sonra yapılan bir çalışmada ise E^{ns} proteinine karşı geliştirilmiş monoklonal antikorların kullanıldığı immunohistokimyasal boyama ve ELISA yöntemleriyle tespit edilemeyen bir viral varyant bildirilmiştir (169).

Birden fazla viral glikoproteini tanıyan poliklonal ya da monoklonal antikorlardan havuz oluşturulması gibi farklı test stratejilerinin geliştirilmesinin, tüm PI hayvanların tespit edilmesi ve eradikasyon programlarının kolaylaştırılması için önemli olabileceği

düşünülmektedir (22). Söz konusu çalışmalar pestivirus evrimine ışık tutması yanında, BVDV suşları arasındaki antijenik farklılıkların bu virusların tespitini zorlaştırdığını da ortaya koymaktadır (170).

Kontrol

BVDV özellikle sığırlarda oluşan hastalıklarla ilişkilendirilse de antijenik ve serolojik çalışmalar etkenin koyun, keçi, domuz, geyik, deve, vb farklı evcil ve yabani ruminantlarda da üreyebildiğini göstermektedir. Bu hayvanlarda oluşan klinik bulguların da sığırlardaki bulgulara benzer olduğu düşünülmektedir (134, 171-174). Doğada serbest dolaşan söz konusu yabani ruminant popülasyonu evcil sığırlarla temas kurabilmektedir. Dolayısıyla sığırlar arasında direk temas, hava, semen, iatrojenik bulaşma kadar, sığırlar dışında enfeksiyonun görüldüğü diğer hayvanlardan bulaşma da BVDV kontrol programları için önem taşımaktadır.

İskandinav ülkelerinde gerçekleştirilen kontrol çalışmalarının başarısı BVDV eradikasyonunun mümkün olabileceğini göstermiş (105, 111, 175) ve diğer bölgelerde kontrol programlarının gelişmesine öncülük etmiştir (176, 177). Ancak farklı bölgelerde uygulanacak eradikasyon programlarının sabit bir uygulamaya bağlı kalınarak gerçekleştirilemeyeceği bilinmektedir. Ülkedeki BVDV insidensi, hayvan popülasyonunun yoğunluğu, hayvan hareketleri, vahşi yaşamla temas sıklığı, sahada yaygın olarak bulunan işletme tipi ve sirküle olan BVDV suşları arasındaki varyasyonlar programın düzenlenmesinde dikkat edilmesi gereken unsurlardır. Her ne kadar düzenlenen kontrol programlarının detayları bölgeden bölgeye değişiklik gösterse de programın etkili olması için temel olarak; biyogüvenlik unsurlarını, PI hayvan tespit ve eliminasyonunu ve enfekte sürülerde aşılama uygulamalarını içermesi gerekmektedir.

Aşılama tek başına popülasyondan etkenin elemine edilmesini sağlayamamakta ancak BVDV yayılımının engellenmesinde etkili olmaktadır. Aşılamanın amacı, klinik görünümlerin engellenmesi ve PI dahil fötal enfeksiyonların oluşumunun engellenebilmesine dayanmaktadır. Ancak BVDV suşları arasında heterojenliğin saptanması, ayrıca aşılamanın fötal korumada ve en önemlisi de PI hayvanların popülasyondan uzaklaştırılmasında yetersiz kalması kullanılan aşılamanın sorgulamasına yol açmıştır. BVDV

aşılarının çok çeşitli antijenik varyantlara karşı sistemik koruma sağlaması gerekmektedir. Dolayısıyla aşı seçimi sırasında dikkat edilmesi gereken önemli faktörler bulunmaktadır. Bunlar immun yanıt oluşturma düzeyi, diğer suşlarla çapraz koruma düzeyi, fetal koruma sağlayıp sağlamadığı, oluşan bağışıklığın süresi, immunosupresyona neden olup olmadığı ve maternal antikor varlığı şeklinde sıralanabilir (120).

BVDV'den korunmaya yönelik pek çok ticari aşı bulunmaktadır. Bunların çoğunluğu BVDV-1 viruslarına karşı geliştirilmiş olmasına karşın, hem BVDV-1 hem de BVDV-2 suşlarını içeren “modifiye canlı” veya “inaktif” aşılar kullanıma sunulmuştur (10).

Modifiye aşılar genellikle çok sayıda hücre kültürü pasajlamalarıyla elde edilen attenüe cp BVD viruslarını içermektedir. Modifiye canlı aşı kullanımlarında virus replikasyonunun gerçekleşmesi antijen miktarını arttırmaktadır. Bu aşılar az miktarda verilen virus ile oldukça yüksek oranda ve uzun süren viral nötralizan antikor oluşumu avantaj sağlamaktadır (178). Modifiye canlı aşı kullanılan bir çalışmada nötralizan antikor yanıtının 18 ay sürdüğü gösterilmiştir (10). BVDV-1 içeren modifiye canlı aşı uygulanan 14 günlük buzağılarda aşılardan 4 ay sonrasında virulent BVDV-2 enfeksiyonuna karşı koruma sağladığı (179), benzer bir çalışmada antikor yanıtının 3,5 ay boyunca devam ettiği ve BVDV-2'ye karşı koruma sağladığı gösterilmiştir (61). Ancak bazı araştırmacılar tarafından modifiye aşı uygulamalarının mukozal hastalık, immunsupresyon, kongenital anomaliler ve abortla sonuçlanan fetal enfeksiyonlara sebep olduğu ya da aşının ncp virusla kontaminasyonu sonucu hastalık oluşturduğu bildirilmiştir (128). İnaktif aşılarda üretiminde uygulanan süreç hem etkenin, hem de olası kontaminasyonların inaktive edilmesini, böylece aşının canlı aşıya nazaran daha güvenli olmasını sağlamaktadır (10).

Modifiye canlı aşılarda inaktif aşılardan karşılaştırıldığı bir çalışmada, inaktif aşılarda modifiye aşılar nazaran daha geç antikor yanıtı geliştirdiği gösterilmiştir (180). Düşük miktarda ve kısa süren nötralizan antikor yanıtı oluştursalar da (165), inaktif BVDV aşılarda avantajlı güvenli olmalarıdır. Her ne kadar inaktif aşılarda etkinliklerinin düşük olduğu öne sürülse de 7 farklı inaktif aşı ile gerçekleştirilen bir çalışmada BVDV'ye karşı gelişen immunitenin antijen konsantrasyonu ile yakından ilişkili olduğu ve 10^7 TCID₅₀/ml antijen miktarının inaktif aşılar için kritik bir değer olduğu öne sürülmüştür (181).

Saha izolatlarına karşı aşılama ile koruma sağlanamaması koruma programları için önemli bir problemdir. İnaktif BVDV aşısı kullanılan ve gebeliklerinin 56-150.

günlerinde PI 4 hayvanla birlikte barındırılan düvelerden elde edilen 15 yavrudan 4'ünün beyin dokusundan virus izole edilmiştir (182). Farklı bir çalışmada 55 düveye BVDV-1 ve BVDV-2 kombine modifiye canlı aşı uygulamasıyla BVDV-1'e karşı %100 koruma sağlanırken BVDV-2'ye karşı %95 fütal koruma elde edildiği bildirilmiştir (183). Deneysel ya da doğal enfeksiyonlarda fütal/horizontal koruma oranlarının %60-100 arasında değiştiği bildirilse de (10), aşılama ile PI buzağı gelişiminin ya da reproduktif kayıpların önlenemeyeceği ancak ekonomik kayıpları azaltılabileceği kabul edilmektedir.

Yapılan çalışmalar aşılamanın pek çok BVDV alt grubuna karşı antikor oluşumu sağladığını göstermiştir. Ancak aşı suşuna ve aynı genotip ya da aynı alt grupta bulunan suşlara karşı oluşan antikor miktarı heterolog suşlara nazaran daha yüksek düzeyde gelişmektedir (10). Canlı ya da inaktif aşılarda fütal koruma ve klinik görünümü azaltmasına yönelik başarılı çalışmalar bulunmasına karşı sığır fütusunun saha izolatlarına karşı oldukça duyarlı olması sebebiyle heterolog BVDV alt gruplarının koruyuculuğuna yönelik daha fazla bilgiye ihtiyaç duyulmaktadır. BVDV izolatlarındaki çeşitlilik; persiste enfeksiyon tespitine yönelik testlerdeki duyarlılık kadar koruyucu immun yanıt geliştirilmesinde, dolayısıyla kontrol programlarının başarısını da etkileyecek bir unsurdur (46).

Tezin Amacı

Türkiye'nin farklı bölgelerinden elde edilen BVDV izolatlarının filogenetik analizi Yeşilbağ ve arkadaşları tarafından yapılmıştır (25). Bu çalışmada (25) BVDV- 1a, -1b, -1d, -1f ve -1h alt gruplarının ülkemizde sirküle olduğu gösterilirken, 29 BVDV izolatından 15 adetinin daha önce tanımlanmamış yeni bir alt grupta yer aldığı belirtilmiştir. BVDV-1/ olarak isimlendirilen ve Türkiye'de dominant olduğu daha sonraki çalışmalarda da (86) belirlenen bu alt grubun diğer alt gruplarla olan serolojik ilişkileri bilinmemektedir.

Türkiye'de BVDV ile mücadele amacıyla kullanılan ve yurtdışından ithal edilen aşılar genellikle BVDV-1 genotipini içerirken bazıları da hem BVDV-1, hem de BVDV-2 genotiplerini içermektedir. Bu aşılarda BVDV -1 virus suşu olarak genellikle BVDV-1a alt grubundan viruslar kullanılmaktadır.

Bu tez çalışması, farklı iki amaç üzerine odaklanmıştır.

1) Türkiye'de tespit edilen BVDV genetik alt grupları arasındaki serolojik ilişkilerin belirlenmesi ve özellikle BVDV-1/ alt grubunun diğer alt gruplarla serolojik ilişkilerinin ortaya konulması

2) Türkiye'de satışa sunulmuş bulunan BVDV aşılarının ülkemizde sirküle olan BVDV genetik alt gruplarına karşı oluşturduğu bağışıklık düzeylerinin belirlenmesi.

Söz konusu çalışma, ilgili serolojik özelliklerin ve bağışıklık düzeylerinin belirlenmesiyle uygulanmakta olan koruma-kontrol programlarının muhtemel etkinliklerinin aydınlatılması hedeflemekte, böylece hem ülkemizde hem de uluslararası düzeyde bilime katkı sağlamayı amaçlamaktadır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Tez çalışması kapsamında; serolojik ilişkilerin incelenmesi ve aşuların koruyuculuk düzeylerinin belirlenmesi amacıyla iki farklı deney düzeni gerçekleştirildi. Bu amaçla birinci deney düzeninde Türkiye’den tespit edilen 6 farklı BVDV-1 alt grubu (BVDV-1a, -1b, -1d, -1f, -1h, -1l) arasındaki çağraz nötralizasyon düzeyleri incelendi. İkinci deney düzeninde ise projenin başladığı dönemde Türkiye’de satışa sunulmuş olan farklı firmalara ait aşular ile sığırların aşılınması ve yerel izolatlarla karşı oluşturdukları humoral bağışıklık düzeylerinin belirlenmesi amaçlandı. Böylece farklı 3 inaktif ticari aşı kullanımı sonrasında hem BVDV-1 alt gruplarına hem de BVDV-2 izolatına karşı gelişen bağışıklık düzeyleri ortaya konuldu.

Serolojik Özelliklerin Belirlenmesine Yönelik Çalışmalar

Gereç

Hücre Kültürü

Koyunlarda gerçekleştirilecek immunizasyonda kullanılacak virusların üretilmesi amacıyla Sheep Fötal Thymus (SFT-R) hücre kültürü kullanıldı. Hücre kültürünün hazırlanması ve idame edilmesi aşamalarında %5 oranında fötal dana serumu (FDS, PAA A11-151), virus üretimi aşamasında ise %2 oranında serum ikamesi (serum replacement - Sigma S0638) kullanımı tercih edildi. Her iki aşamada da amfoterisin (250 mg/ml, PAA, p11-001) ve penisilin / streptomisin (100x, PAA, p11-010) ile zenginleştirilmiş Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Biochrom AG, T041-05) kullanıldı.

Çapraz nötralizasyon testlerinde ve yine bu testlerde kullanılacak virusların üretiminde kullanılan Madin-Darby Bovine Kidney (MDBK) hücre hattı da %5 fötal dana serumu, amfoterisin ve penisilin / streptomisin ile zenginleştirilmiş DMEM içerisinde çoğaltıldı. Kullanılan hücre hatları Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı hücre kültürü koleksiyonundan sağlandı.

Kullanılacak hücre kültürlerinin herhangi bir endojen kontaminant içermemesi gerekliliği göz önüne alınarak hücre hatları (SFT-R ve MDBK) ve FDS pestivirus

kontaminasyonu yönünden PLA testi ile kontrol edildi ve negatif olduğu belirlendikten sonra kullanıma alındı.

Viruslar

Tez çalışmasının bu bölümünde Türkiye’de tespit edilen 6 BVDV-1 alt grubundan (BVDV-1a, -1b, -1d, -1f, -1h, -1I) seçilen birer virus suşu kullanıldı (Tablo-7). Antijen hazırlamak amacıyla kullanılan bu viruslar; Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı’nda bulunan virus koleksiyonu içerisinde seçildi. Bu örneklerin filogenetik analizleri Yeşilbağ ve ark. (25) tarafından yapılmış, epitopik özellikleri ise Yeşilbağ ve Burgu tarafından (184) belirlenmiştir.

Anabilim dalı virus koleksiyonunda aynı alt grup içerisinde yer alan izolatlar arasından çalışmaya dahil edilenler, 2006 yılındaki çalışmada (184) 16 monoklonal antikora karşı en yüksek yanıtı veren örnekler arasından seçildi. Her biri farklı bölgelerden elde edilmiş olan söz konusu virusların tamamı ncp özelliktedir. Çalışmada kullanılması kararlaştırılan BVDV-1 alt grubunda yer alan izolatlar, biyotipik özellikleri ve izole edildikleri iller Tablo-7’de gösterildi.

Yapılan testlerde kontrol virus olarak yine Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı stoklarında bulunan BVDV– NADL (BVDV-1a referans suşu), BVDV– FLK (FLK hücre hattı kontaminantı olarak izole edilen bir ncp BVDV suşu) ve BVDV– TR 19 (ncp yerel BVDV suşu) virus suşları kullanıldı.

Tablo-7. Araştırmada kullanılan BVDV- 1 izolatları ve özellikleri (*).

BVDV-1 alt grubu	Virus İzolatları	Orijini	Biyotip özellikleri
BVDV-1a	TR2	Malatya	ncp
BVDV-1b	TR12	Kayseri	ncp
BVDV-1d	TR11	Şanlıurfa	ncp
BVDV-1f	TR38	Eskişehir	ncp
BVDV-1h	TR23	Konya	ncp
BVDV-1I	TR1	Muğla	ncp

*: Bu tablo Yeşilbağ ve arkadaşları, 2008 (25) kaynağından alınmıştır.

Monoklonal Antikor (mAb)

Araştırmada ncp virus üremesinin tespiti için gerçekleştirilen PLA testlerinde konjugatların virusa bağlanmasının tespiti için BVDV NS3 proteinine spesifik monoklonal fare antikorü süspansiyonu (mAb 1/4/7) kullanıldı. Bu monoklonal antikor süspansiyonu farklı 3 monoklonal antikor klonunun birleştirilmesiyle elde edilmiş bir havuz olup tüm pestivirusları tanımladığı teyit edilmiştir (185). Kullanılan antikor süspansiyonu Justus-Liebig-Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Enstitüsü - Almanya'dan temin edildi.

İkincil Antikor

BVDV spesifik fare monoklonal antikorunun bağlanmasını tespit edebilmek için biotin işaretili keçi- anti fare IgG (Pierce: 31800) antikorü kullanıldı.

Konjugat

İkincil antikorunun bağlanmasını gösterebilmek amacıyla streptoavidin-horse radish peroksidaz konjugatı (Pierce: 21114) kullanıldı.

İmmunizasyonda Kullanılan Hayvanlar

Araştırmada Adıyaman'da bulunan bir aşı ve biyolojik madde üretim tesisine ait araştırma ünitesinde bulunan (1,5 ile 5 arasında değişen yaşlara sahip) 21 adet İvesi koyunu kullanıldı. Çalışmada kullanılacak hayvanları belirlemek amacıyla öncelikle populasyondan serum örnekleri alınarak BVDV antijen ve antikorları yönünden test edildi. Her iki kriter bakımından negatif olduğu saptanan söz konusu hayvanlar yaşları göz önüne alınarak her birinde 3 hayvan olacak şekilde 7 gruba ayrıldı. Bir grup "kontrol grubu" olarak belirlenirken, kalan grupların her biri farklı virüslere yönelik hiperimmün serum elde etmek amacıyla kullanıldı. İnaktive edilmiş virus kullanılacak olması sebebiyle

işletmenin sağladığı barındırma ve besleme koşullarında değişiklik yapılmayarak, çalışma süresince tüm hayvanlar aynı şartlarda muhafaza edildi.

Tez çalışması sırasında hayvanlarda gerçekleştirilecek immunizasyonlar ve kan alımları için gerekli izin, Vetal Hayvan Sağlığı Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun 18.03.2011 tarihli ve 001/VET/2011 sayılı kararı ile sağlanmıştır.

ELISA Kiti

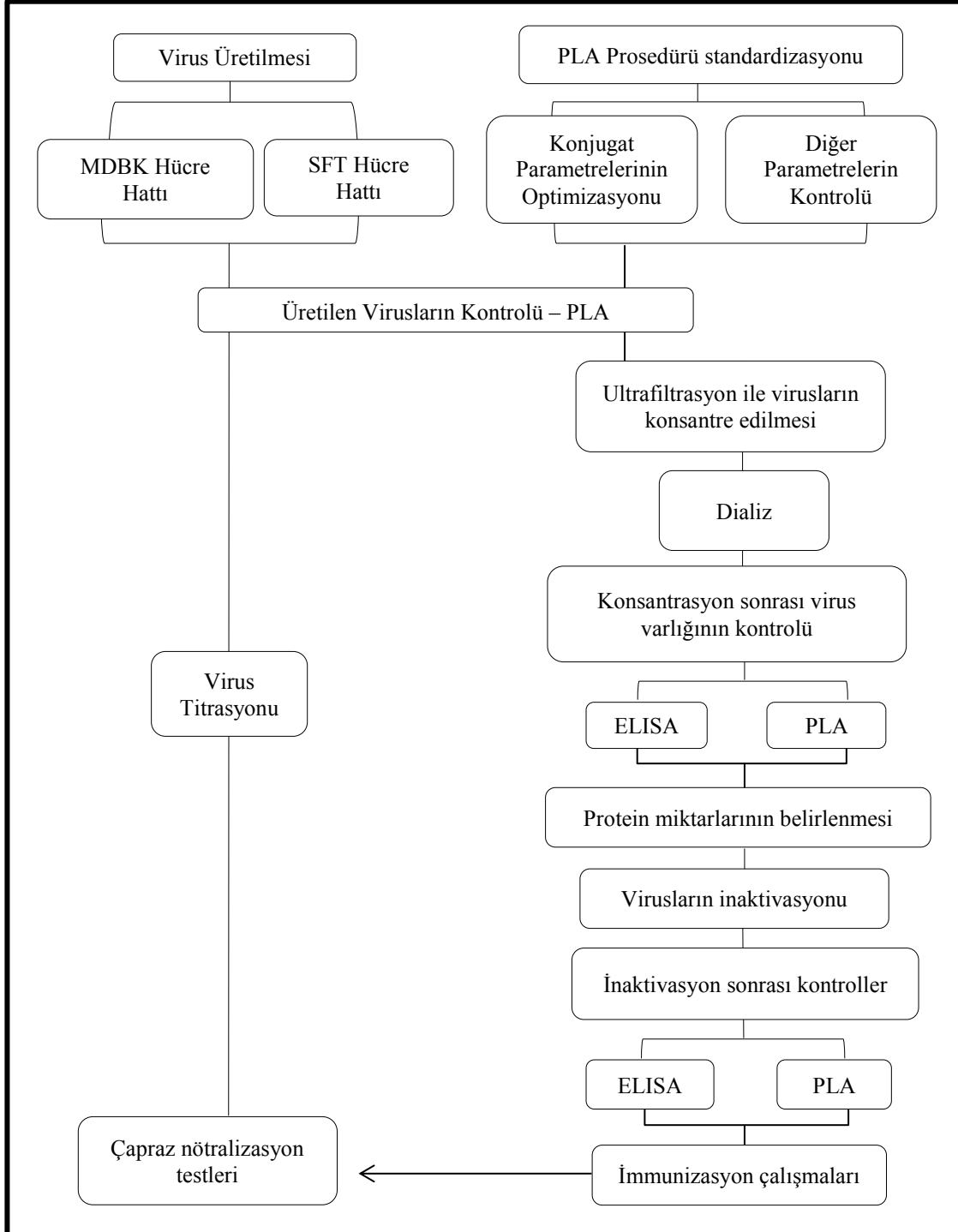
Araştırmada immunizasyon yapılacak hayvanların test edilmesi ve antijen hazırlama aşamalarında BVDV antijen varlığını tespit etmek amacıyla E^{ms} glikoproteinine spesifik ticari bir ELISA kiti (Herdcheck/Idexx, İsviçre) kullanıldı. Söz konusu kit, ultrafiltrasyon ile antijen konsantrasyonu sonrasında virus varlığının teyidinde ve sürü içerisinde barınan hayvanların BVDV antijeni yönünden negatif olduğunun belirlenmesinde kullanıldı.

İnaktifan

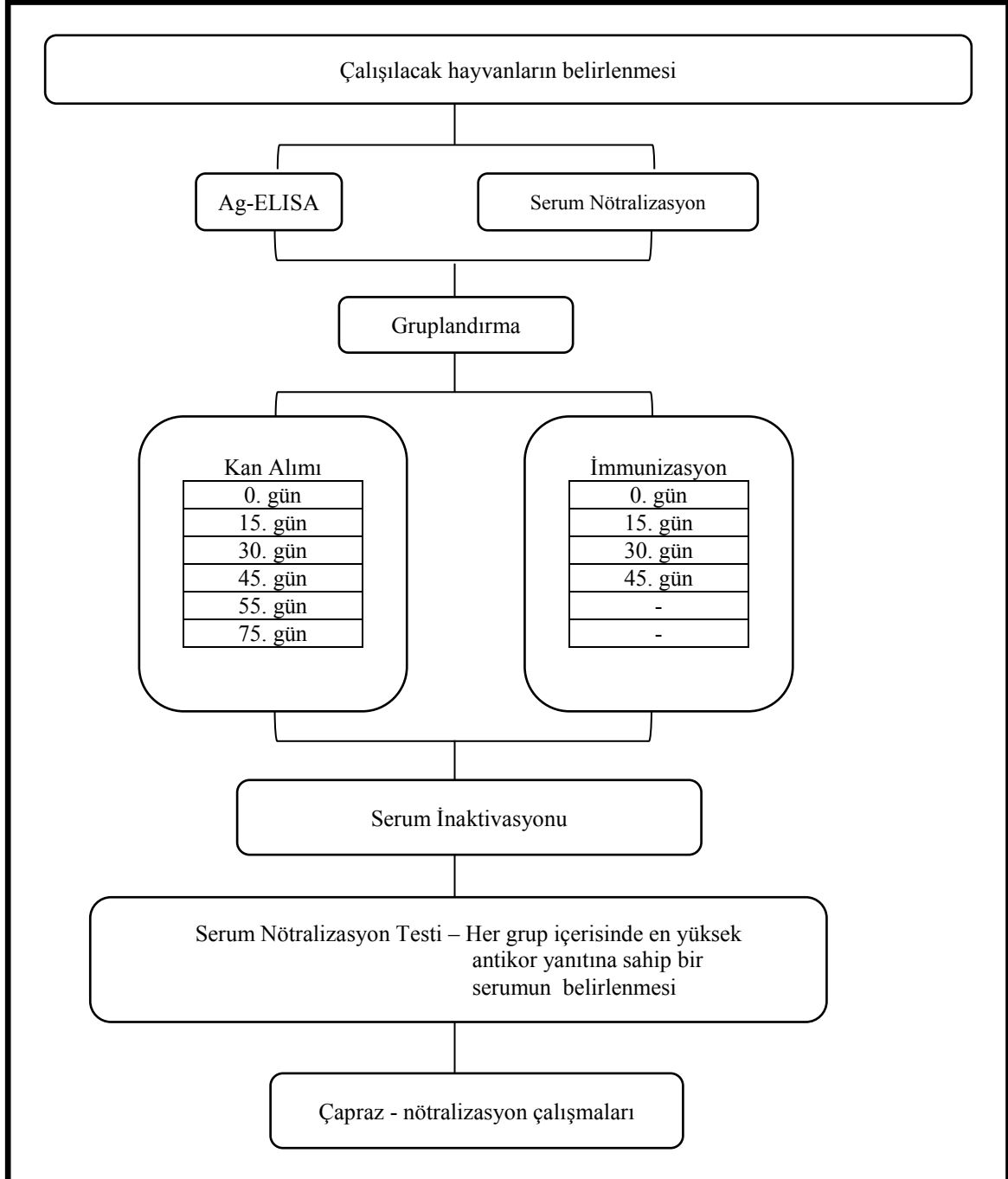
Üretilen virusların inaktive edilmesi amacıyla 2-bromoethlamonium bromide kullanıldı (Merck, 8.20176).

Yöntem

Türkiye’de bulunan BVDV izolatlarının serolojik özelliklerinin incelenmesi amaçlanan deney düzeninde immunizasyon öncesi laboratuvarında gerçekleştirilen hazırlık aşamaları ve ilgili araştırma ünitesinde seçilen hayvanlarla gerçekleştirilen uygulamaların tamamı Şekil -2.ve Şekil -3.’de gösterildi.



Şekil -2. Serolojik ilişkilerin belirlenmesine yönelik deney düzeninde hazırlık süreci uygulama aşamaları



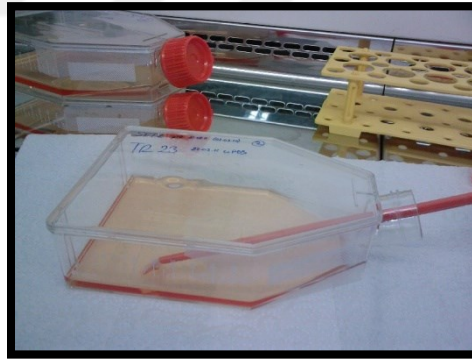
Şekil -3. Serolojik ilişkilerin belirlenmesine yönelik uygulama aşamaları

Antijen Hazırlama

Virusların Üretilmesi

İmmünizasyonda kullanılacak virusların üretilmesi amacıyla, 150 cm²'lik hücre kültür şişelerinde üretilen SFT-R hücre kültürlerinin vasatları dökülerek, hücre yüzeyi 37°C'lik su banyosunda ısıtılan PBS ile yıkandı. Ncp BVDV izolatlarından her biri ayrı hücre kültür şişesine %1 oranında inokule edilerek virusların adsorbsiyonu için 1 saat 37°C'lik inkübatörde bekletildi. Süre sonunda şişelere %2 serum ikamesi (serum replacement) içerikli DMEM eklendi. Adsorbsiyonlu yöntemle virus ekiminden 5 gün sonra hücreler kültür kabının tabanından scraper ile (Şekil-4) kürete edildikten sonra -80°C'de dondurma ve 37°C su banyosunda çözme işlemi iki kez tekrarlanarak viruslar toplandı.

Nötralizasyon testlerinde kullanılacak viruslar ise MDBK hücre hattına aynı yöntemle inokule edilerek üretilmelerinin ardından, yine iki kez dondurup çözme işlemleri ile toplandı. Üretilen virusların tamamı kullanılacakları süreye kadar -80°C'de muhafaza edildi.

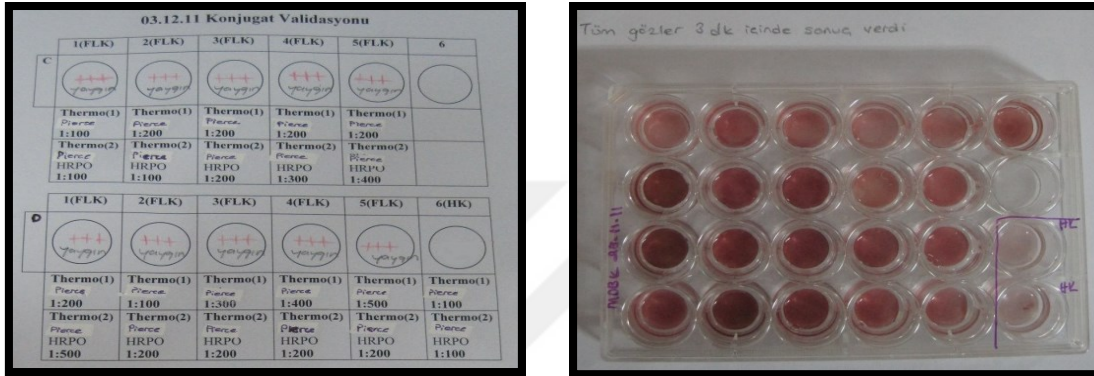


Şekil-4. Enfekte hücre hatlarının scraper aracılığıyla toplanması

İmmunoperoksidaz Testi (PLA) Standardizasyonu

Kontrol virus olarak kullanılan BVDV-FLK izolatının 24 gözlü tabletlerde hazırlanan MDBK hücre hattına inokule edilmesinden 72 saat sonra pleyt 80°C sıcaklıkta fikse edildi. Ticari olarak temin edilen ikincil antikor ve streptoavidin-horse radish peroksidaz

konjugatı 1:100-1:500 arasında değişen oranlarda sulandırılarak (Şekil-5) farklı kombinasyonların PLA testlerinde verdikleri sonuçlar değerlendirildi. Kullanılacak oranlar mikroskopik incelemeler sonucunda en yüksek dilüsyon/en yoğun boyanmanın sağlandığı gözlerin tespit edilmesiyle belirlendi. Kullanılması uygun görülen konsantrasyonlar üzerine farklı bekleme sürelerinin, antikor sulandırma solüsyonlarının ve substrat konsantrasyonlarının da etkileri incelenerek PLA testinin standardizasyonu gerçekleştirildi.



Şekil-5. İmmunoperoksidaz testi standardizasyonunda ticari antikor ve konjugatın farklı oranlarda sulandırılmasıyla test edilmesi

Virus Üretiminin Kontrolü ve İmmunoperoksidaz Testi

Üretilen virusların ncp karakterde olmaları sebebiyle üremelerinin kontrolü PLA testi ile yapıldı. Test Özkul ve arkadaşlarının (166) öngördüğü yöntemde bazı değişiklikler yapılarak uygulandı. Bu amaçla 24 gözlü tabletlerde 100.000 hücre/ml konsantrasyonunda hazırlanan MDBK hücre kültürlerine, üretilen virusların her birinden ayrı gözlerle 0.1 ml inoküle edildi ve 37°C'de %5 karbondioksitli inkübatörde 72 saat boyunca muhafaza edildi. Tabletlerin 80°C'de 3 saat süreyle fikse edilmelerinin ardından hücre yüzeyleri 1/3'lük beyaz PBS ile yıkandı ve her göze 0.2 ml, %0.5'lik O-D-glucopyranoside (Sigma 03757) eklenerek oda sıcaklığında 10 dk bekletildi. Yıkama işleminden sonra her göze T-PBS (1x PBS, %0.05 Tween 20: Merck, 822184) içerisinde hazırlanan sırayla primer monoklonal anti-BVDV fare antikoruna (MAb 1/4/7, 1:50), biyotin işaretli anti-fare keçi antikoruna (1:400) ve streptoavidin horse radish peroksidaz konjugatı (1:300) 0.2 ml miktarında eklendi. Her bir basamak arasında 3 kez 1/3 PBS ile yıkama işlemi

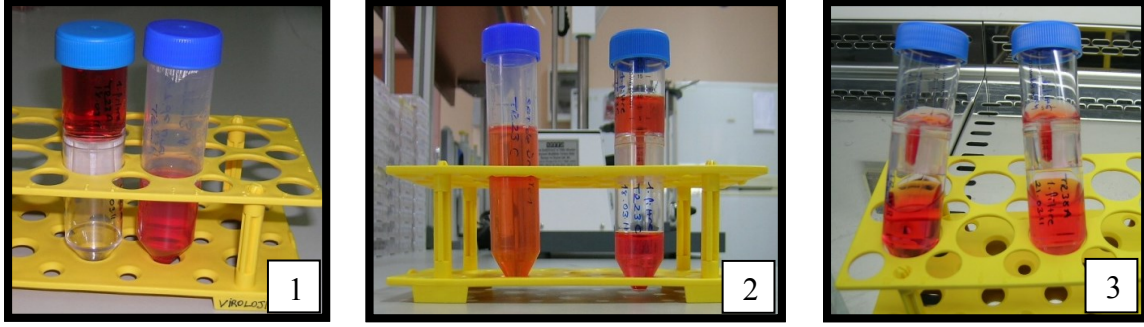
gerçekleştirildi ve her basamak 90 dk boyunca oda sıcaklığında bekletildi. Son aşamada 0.3 ml DMF (Di-methyl-formamid, Sigma-Aldrich, 40255) içerisinde 2 mg AEC (3-amino 9-etil karbazol, Sigma A5754) çözdürülmesi ve 4.7 ml sodyum asetat tamponu (pH 5.0) ile 0.025 ml H₂O₂ (%0.05) eklenmesiyle substrat hazırlandı. Her göze 0.2 ml eklenen substratın 30 dk inkübasyonu takiben uzaklaştırılmasının ardından invert mikroskopta (Nikon, TS100) hücre içi kırmızı-kahverengi boyanmaların görülmesiyle virus üremeleri teyit edildi.

Virusların Titrasyonu

Testlerde kullanılacak virusların titrelerinin belirlenmesi amacıyla uygulanan teknikte (166) öncelikle yoğunluğu 100.000 hücre/ml olacak şekilde hazırlanan MDBK hücre süspansiyonu 24 gözlü tabletlere dağıtıldı. Ertesi gün virus süspansiyonları logaritma 10 tabanına göre sulandırıldı. Tabletlerde bulunan hücre kültürü vasatları boşaltıldı ve her sulandırma basamağından 24 gözlü tabletlerde ayrılan 4 kuyucuğa 1 ml virus sulandırması eklendi. Virus kontrol gözlerine 0.5 ml saf virus ve 0.5 ml DMEM eklenirken hücre kontrol gözlerine sadece 1ml DMEM konuldu. 37°C’de %5 karbondioksitli inkübatörde 72 saat boyunca muhafaza edilmelerinin ardından ncp özelliğindeki virusların üremelerinin belirlenebilmesi için yukarıda açıklanan teknikle PLA testi uygulandı. Titre değerlerinin hesaplanmasında Spearman–Kaerber yöntemi kullanıldı.

Virusların Konsantrasyonu ve Diyalizi

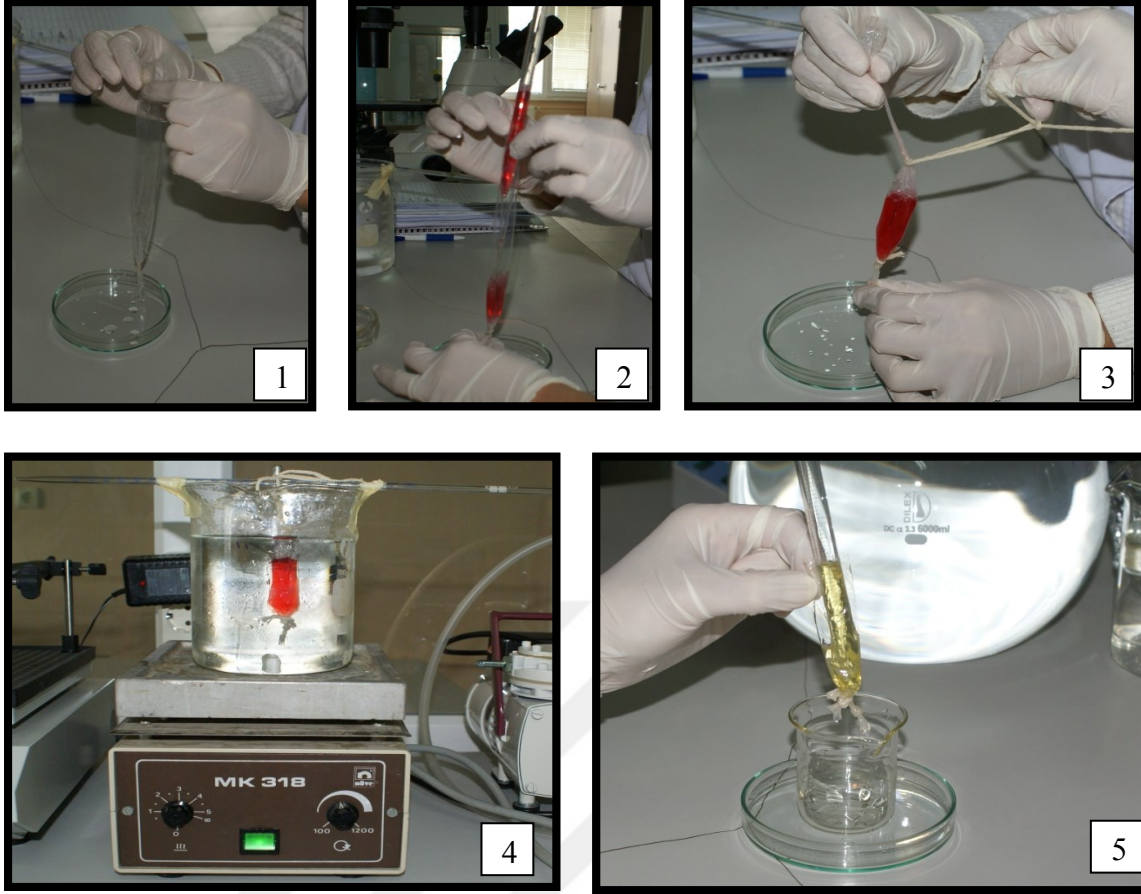
Virus üretimi gerçekleştirilen SFT-R hücre kültürlerinden toplanan süspansiyonlarda virus konsantrasyonunun artırılması için ticari ultrafiltrasyon tüpleri kullanıldı (100.000 Da, Vivaspın 20, Sartorius VS2041). Üretilen her bir virus ayrı bir ultrafiltrasyon tüpünün üst haznesine konuldu. Takiben 3000 rpm 4°C’de 20 dk periyotlarla santrifüj işlemi uygulandı. Tekrarlanan işlemler sonrasında üst kısımda kalan konsantre virus süpernatantları 15 ml’lik falkon tüplere aktarıldı (Şekil-6).



Şekil-6. Ultrafiltrasyon tüpleri kullanılarak virus konsantrasyonu.

(1): Ultrafiltrasyon tüplerinin üst haznesine virus süspansiyonlarının eklenmesi (soldaki tüp). (2): Santrifüj işlemi sırasında hücre üst sıvısı alt hazneye süzülürken virus içeren bölümün üst kısımda kalması. (3): Santrifüj işlemi sonucunda konsantre edilen viruslar.

Bir sonraki aşamada uygulanacak olan spektrofotometrik ölçümlerden daha iyi sonuç alınabilmesi amacıyla virus üretiminde kullanılan vasatlardan kaynaklanan ve süspansiyona kırmızı renk veren fenol kırmızısının uzaklaştırılması için diyaliz işlemi uygulandı (Şekil-7). Bu işlem hem virus üretimi sonucunda elde edilen süpernatantlar için, hem de her hangi bir patojen içermeyen SFT-R hücre hatlarının üst sıvılarına uygulandı. Bu amaçla konsantre edilen viruslar diyaliz torbalarının (Sigma-Aldrich, D9777) içerisine alındı ve 4°C’de steril beyaz PBS’e (8 gr NaCl, 0.2 gr KCl, 2.37 gr Na₂HPO₄, 0.2 gr KH₂PO₄, 1 lt distile su) karşı diyaliz edildi. İşlem süresince 3 kez 30 dk arayla, 7 kez 1 saat arayla beyaz PBS’in tamamı yenilenirken son aşamada eklenen PBS bir gece boyunca bekletildi.



Şekil-7. Konsantre edilmiş virus süspansiyonlarının diyaliz işlemi.

(1): Diyaliz torbasının hazırlanması. (2-3): Ultrafiltrasyonda elde edilen üst sıvının diyaliz torbasına aktarılması. (4): Konsantre virus süspansiyonlarının beyaz PBS'e karşı diyaliz edilmesi. (5): Diyaliz sonucunda fenol kırmızısı'nın uzaklaştırıldığı süspansiyon.

Virus Varlığının Teyit Edilmesi

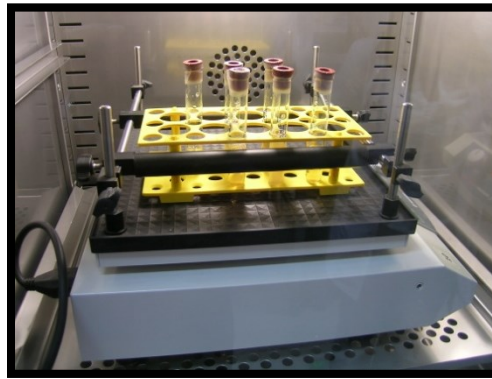
Konsantrasyon ve diyaliz işlemlerinin ardından elde edilen sıvıda virus varlığının teyidi BVDV Ag ELISA ve PLA yöntemleri ile yapıldı. Örneklerin 1:10 oranında distile su ile hazırlanan sulandırmaları ticari BVDV Ag ELISA ile incelendi. Test protokolü üretici ticari firmanın öngördüğü şekilde uygulandı. PLA yöntemi "Virus Üretiminin Kontrolü ve İmmunoperoksidaz Testi" başlığı altında açıklandığı gibi uygulandı. Bu amaçla 24 gözlü tablette hazırlanan MDBK hücre kültürüne ultrafiltrasyon tüplerinde santrifüj sonrasında alt kısma geçen sıvı konsantre dializ süspansiyonlarından ayrı ayrı 0.1ml ekildi.

Protein Miktarının Belirlenmesi

Dializ işlemi tamamlanan viruslar ve saf SFT-R hücre üst sıvıları 1:100 oranında distile su ile sulandırıldı. Sulandırılmış saf SFT-R hücre üst sıvısı blank olarak kullanılarak virus sulandırmaları spektrofotometrede (Thermo, Multiskan Ex) 260 nm ve 280 nm dalga boylarında okutuldu. Elde edilen optik dansite değerleri, protein konsantrasyon nomogramı kullanılarak hesaplandı ve elde edilen değerler 100 ile çarpılarak antijen süspansiyonlarının 1 ml'sindeki protein miktarları belirlendi.

Virus İnaktivasyonu

Virus inaktivasyonu işlemi Spilki ve arkadaşlarının (186) belirttiği yönteme göre gerçekleştirildi. Bu amaçla 10 ml filtre edilmiş deiyonize su içerisine 0.26 gr NaOH ilave edilerek 37°C'de 30 dk süreyle inkübe edildi. Süre sonunda 0.8 gr 2-bromoethlamonium bromide ile 1.5 ml β -naphthol violet (pH indikatörü) ilave edilerek 30 dk süresince tekrar aynı koşullar sağlandı. Oranları 1 lt virus süspansiyonu için hazırlanan inaktivan madde, diyaliz edilen her bir virus miktarına göre hesaplanarak eklenecek miktarlar belirlendi. İnaktivan madde eklenen süspansiyonlar orbital çalkalayıcıya yerleştirilerek 26°C'de 24 saat inkübe edildi (Şekil-8). İnaktivasyon işlemi final konsantrasyon miktarına göre hesaplanan sodyum tiyosülfatın (0.01 gr/lt) eklenmesiyle durduruldu.



Şekil-8. İnaktivasyon işeminde uygulanan inkübasyon koşulları

Virus İnaktivasyon İşleminin Kontrolü

İnaktivasyon işleminin başarısı PLA yöntemi ile kontrol edildi. Bu amaçla inaktive edilen virusların her biri 24 gözlü tablet gözlerinde hazırlanmış MDBK hücre kültürüne inokule edildi. 37°C’de %5 CO₂’li ortamda 72 saat inkübasyonu takiben gerçekleştirilen PLA ile aktif virus varlığı incelendi. Test “Virus Üretiminin Kontrolü ve İmmunoperoksidaz Testi” başlığı altında açıklandığı şekilde gerçekleştirildi. Testin negatif sonuç vermesi inaktivasyon işleminin başarıyla gerçekleştirildiğinin göstergesi olarak kaydedildi.

İmmunize Edilecek Hayvanların Belirlenmesi

İmmunizasyonda kullanılacak koyunların seçimi için araştırma ünitesinde bulunan koyunlardan katkısız vakumlu tüplere kan örnekleri alındı. Alınan kan örnekleri 1500 rpm’de 10 dk santrifüj edilerek serumlar elde edildi. Bu serumların yarısı ELISA aracılığıyla değerlendirmek üzere herhangi bir işlem görmeden -20°C’de derin dondurucuda saklanırken, nötralizasyon testlerinde kullanılacak miktarlar öncelikle 56°C’de 30 dk inaktive edilmelerinin ardından test edilecekleri süreye kadar -20°C’de muhafaza edildi.

İnaktive edilmeyen serum örnekleri BVDV antijen ELISA (Herdcheck/ Idexx, 99-43830, İsviçre) yöntemiyle test edilirken, inaktive edilen serum örneklerinde BVDV’ye karşı antikor varlığının incelenmesi standart serum mikronötralizasyon testi ile gerçekleştirildi. Bu amaçla, her serum örneğinin 1/5’lik sulandırmaları hazırlanarak 96 gözlü tabletlerde 2’şer göze 0.05 ml hacminde konuldu. Tüm serum örneklerinin üzerine 100 DKID₅₀ oranında hazırlanan sitopatojen özellikteki BVDV- NADL suşundan 0.05 ml eklendi. Nötralizasyonun gerçekleşmesi için tabletlerin 37°C’de %5 karbondioksitli inkübatörde 1 saat inkübe edilmelerinin ardından tüm gözlere 200.000 hücre/ml oranında hazırlanan MBDK hücre süspansiyonundan yine tüm gözlere 0.05 ml dağıtılarak tabletler 72 saat süreyle inkübe edildi. Test gözlerinde cp tespit edilmesine göre değerlendirme gerçekleştirildi ve bu gözlere konulan serum örneklerinin BVDV antikorları yönünden negatif olduğu değerlendirildi. BVDV enfeksiyonu yönünden negatif bulunan hayvanlar

yaşları göz önüne alınarak 7 gruba ayrıldı. Oluşturulan gruplarda yer alan hayvanlar ve yaş dağılımları Tablo-8’de gösterildi.

Tablo-8. İmmünizasyon gerçekleştirilecek hayvanlardan oluşturulan gruplar, hayvanların yaş dağılımları ve bu gruplarda immünizasyon için kullanılacak virus suşları

Grup No	Viruslar BVDV-1 alt grubu / Virus suşu	Hayvanın Kulak Numarası:	Hayvanın Yaşı
1	BVDV -1a / TR2	5631	4 yaş
		5636	1.5 yaş
		5630	1.5 yaş
2	BVDV -1b / TR12	5719	4 yaş
		5716	1.5 yaş
		5632	1.5 yaş
3	BVDV -1d / TR11	5627	4 yaş
		5715	1.5 yaş
		5718	1.5 yaş
4	BVDV -1f / TR38	5621	2 yaş
		5624	1.5 yaş
		5634	1.5 yaş
5	BVDV -1h / TR23	5622	3 yaş
		5639	1.5 yaş
		5781	1.5 yaş
6	BVDV -1i / TR1	5720	5 yaş
		5717	1.5 yaş
		5629	1 yaş
Kontrol grubu		5713	2 yaş
		5626	1.5 yaş
		5628	1.5 yaş

İmmünizasyon

Her bir immünizasyonda hayvan başına 1 mg protein enjekte edilecek şekilde antijen miktarları hesaplandı. İki hafta aralıklarla toplam 4 kez gerçekleştirilen immünizasyonların ilk üçünde inaktive edilen viruslar Freund’s complete adjuvant (Sigma, F5881) ile, son immünizasyonda ise Freund’s incomplete adjuvant (Sigma, F5506) ile eşit

hacimlerde karıştırıldı. Enjeksiyondan hemen önce hazırlanan bu karışımlar vorteks ile homojen hale getirilerek subkutan yolla koyunlara enjekte edildi. Kontrol grubunda yer alan hayvanlara ise eşit miktarda steril beyaz PBS enjekte edildi.

Kan Alımı

İmmünizasyonun başlatıldığı gün “0. gün” olarak kabul edildi ve tüm hayvanlardan 2 hafta ara ile 6 defa (0., 15., 30., 45., 60. ve 75. günlerde) vena jugularis’den steril katkısız kan tüpleri içerisine örnek alındı. İlk 4 uygulamada kan örnekleri, hayvanlara inaktif virus enjekte edilmeden hemen önce alındı. Elde edilen tüm kan örnekleri 4°C, 3000 rpm’ de 10 dk süresince santrifüj edilerek serumları ayrıldı. Nötralizasyon testlerinde kullanılmak üzere tüm serumlar 56°C’ de 30 dk bekletilerek inaktive edildi.

Çalışılacak Serumların Belirlenmesi

Her hayvana ait son iki örneklemede elde edilen (60. ve 75. günlerde alınan) serumlar kendilerine immünizasyon sırasında kullanılan virusa karşı nötralizasyon immunoperoksidaz testi (N-PLA) ile incelenerek homolog virusa karşı gelişen antikor titreleri belirlendi. N-PLA testleri daha önce bildirilen teknikte (79) bazı değişikliklerin uygulanmasıyla gerçekleştirildi. Bu amaçla serum örneklerinin iki katlı sulandırılmaları hazırlandı. Takiben 24 gözlü tabletlerde 2’ şer göze konulan 0.4 ml serum dilusyonlarının üzerine aynı miktarda 100 DKID₅₀ oranında sulandırılmış homolog virus ilave edilerek 1 saat 37°C’ de %5 karbondioksitli inkübatörde nötralizasyona bırakıldı. Süre sonunda 200.000 hücre/ml olacak şekilde hücre süspansiyonu eklendi. Yine aynı koşullarda 72 saat inkübasyona bırakılan tabletler 80°C’ de 3 saat süreyle fikze edildi. Hücre yüzeyleri 1/3’lük beyaz PBS ile yıkanan test gözlerine 0.2 ml O-D-glucopyranoside (Sigma 03757) eklenerek oda sıcaklığında 10 dk bekletildi. Yıkama işleminden sonra her göze T- PBS ile sulandırılan sırayla primer monoklonal anti-BVDV fare antikoruna, biyotin işaretli anti-fare keçi antikoruna ve streptoavidin-horse radish peroksidaz konjugatı 0.2 ml miktarında eklendi. Hücre yüzeyleri her işlem arasında 1/3’lük beyaz PBS ile yıkandı ve her işlem 90 dk boyunca oda sıcaklığında bekletildi. Testin değerlendirilmesi için 4,7 ml sodyum asetat tamponu içerisinde hazırlanan substrattan (0.3 ml DMF, 2 mg 3-amino 9-etil karbazol, 25 µl H₂O₂) 0.2 ml eklendi. Oda sıcaklığında 30 dk inkübasyonu takiben test invert

mikroskopta değerlendirildi. Hücre içi kırmızı-kahverengi boyanmalar görülen test gözleri BVDV antikorları yönünden negatif, boyanma gözlenmeyen test gözleri ise pozitif olarak değerlendirildi. Test sonuçlarına göre her grup içerisinde homolog virusa karşı en yüksek antikor yanıtı elde edilen serumlar belirlenerek ve çapraz nötralizasyon testlerinde kullanıldı.

Çapraz Nötralizasyon Testleri

BVDV-1 alt grupları arasındaki serolojik ilişkilerin belirlenmesin için, bir önceki bölümde yapılan çalışmalarla immunizasyonda kullanılan 6 grup içerisinde homolog virusa karşı en yüksek antikor düzeyi saptanan 6 hiperimmun serum kullanıldı. Bu hiperimmun serumlar immunizasyonda kullanılan virusların tamamına (TR1, TR2, TR11, TR12, TR23, TR38) karşı test edildi. Bu amaçla 6 serumun 1:2 sulandırmadan başlayarak 1:10240 değerine kadar hazırlanan iki katlı sulandırmaları MDBK hücre hattında üretilen ve titrasyonları yapılan viruslara karşı N-PLA ile incelendi. Söz konusu çapraz nötralizasyon testleri “Çalışılacak serumların belirlenmesi” başlığı altında açıklanan şekilde gerçekleştirildi. Test gözlerinin sayısal olarak en az yarısında virus üremesini durduran serum sulandırması nötralizan antikor titresi olarak değerlendirildi.

Serolojik Yakınlık (R) Değerlerinin Hesaplanması

Virus izolatları arasındaki serolojik yakınlık (R) değerleri nötralizasyon titreleri'nin Bachofen ve arkadaşlarının (43) bildirdiği aşağıdaki formüle yerleştirilmesiyle hesaplandı.

$$R = 100 \times \sqrt{\frac{AB \times BA}{AA \times BB}}$$

Bu formüle göre BA, A antiserumunun B suşuna karşı titresini, AB ise B antiserumunun A suşuna karşı antikor titresini ifade etmektedir. AA ve BB antiserumların kendi virus

suşlarına karşı gelişen homolog antikor titrelerini değerlerini göstermektedir. Bu formüle göre bir R değeri 100 ya da 100'e yakınsa söz konusu iki virus arasında antijenik farklılığın olmadığını ya da düşük miktarda olduğu anlaşılmaktadır.

Aşı Etkinliği Çalışması

Gereç

Hücre Kültürü

Aşı etkinliğine yönelik çalışmalarda uygulanan nötralizasyon testlerinde ve yine bu testlerde kullanılacak virusların üretiminde; %5 FDS (PAA, A11-151), amfoterisin (250 mg/ml, PAA, p11-001) ve penisilin / streptomisin (100x, PAA, p11-010) ile zenginleştirilmiş DMEM (DMEM, Biochrom AG, T041-05) içerisinde çoğaltılan MDBK hücre hattı kullanıldı. Hücre hattı, Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı hücre koleksiyonundan temin edildi. Kullanım öncesinde gerek FDS, gerekse hücre kültürünün pestivirus kontaminasyonu yönünden âri olduğu PLA tekniğiyle teyit edildi.

Aşılar

Aşı etkinliğine yönelik çalışmalarda araştırmanın başlatıldığı süreçte ülkemizde satışı sunulmuş bulunan 3 ticari BVDV aşısı kullanıldı. Farklı firmalar tarafından üretilen bu aşıların tamamı inaktif aşı olup ülkemize ithal edilmektedir. Çalışmada yer alan inaktif aşılar ve içeriklerine ilişkin bilgiler Tablo-9'da gösterilmiştir.

Tablo-9. Aşılamada kullanılan BVDV aşıları

Aşı No	Aşı İçeriği	BVDV suşları
1	BVDV	BVDV -1a
2	BVDV, BHV-1, BRSV, PI-3 <i>Hemofilus somnus</i>	BVDV -1a , BVDV-2
3	BVDV, BHV-1, BRSV, <i>Pastörella</i> , <i>Leptospiroz</i>	BVDV -1a

BHV-1: Bovine herpesvirus tip 1, BRSV: Bovine respiratory syncytial virus, PI-3: Parainfluenza virus tip 3

Virüsler

Tablo-5’de gösterildiği üzere Türkiye’de varlığı belirlenen 7 adet BVDV-1 alt grubu (BVDV -1a, -1b, -1d, -1f, -1h, -1i, -1l) bulunmaktadır. Bu alt gruplar arasından BVDV-1i bu çalışmanın başladığı tarihten sonra tanımlanmıştır (85). Dolayısıyla bu tez çalışmasında Türkiye’de bulunan 6 adet BVDV-1 alt grubu ve yine Türkiye’de varlığı gösterilmiş olan (25) BVDV-2b alt grubundan virüsler kullanıldı. Bu izolatlar Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı virus koleksiyonundan temin edildi. Kullanılan izolatlar ve genetik karakterizasyon sonuçları Tablo-10’da gösterilmiştir.

Tablo-10. Aşı etkinliklerinin değerlendirilmesinde kullanılan BVDV izolatları, genetik özellikleri ve orijin aldıkları bölgeler (**)

Genetik alt gruplar	Virüsler	Orijini
BVDV-1a	TR-2	Malatya
BVDV-1b	TR-12	Kayseri
BVDV-1d	TR-11	Şanlıurfa
BVDV-1f	TR-38	Eskişehir
BVDV-1h	TR-23	Konya
BVDV-1l	TR-1, TR-16, TR-21, TR-29	Muğla, Ankara, Samsun, Bursa
BVDV-2b	TR-15	Amasya
BVDV-1r	TR-73	Bursa

** : Bu tablo Yeşilbağ ve arkadaşları 2008 (25) kaynağından alınmıştır.

BVDV-1l alt grubunun Türkiye’de diğer alt gruplara kıyasla daha yaygın olması sebebiyle diğer gruplardan birer virus suşu kullanılırken, BVDV -1l alt grubunu temsil eden 4 suş kullanıldı.

Virus koleksiyonunda bulunan BVDV-1h ve BVDV-2b alt grubunda yer aldığı bilinen birer adet virus suşu direkt olarak çalışmaya alındı. Diğer suşların seçiminde Yeşilbağ ve

Burgu (184) tarafından gerçekleştirilen ve Türkiye izolatlarının epitopik özelliklerinin belirlendiği bir çalışmadan yararlanıldı. BVDV-1a, -1b, -1d ve -1f alt grubundaki viruslar arasından söz konusu çalışmada en fazla sayıda monoklonal antikor ile reaksiyon verdiği gösterilen birer suş seçildi. Yine aynı çalışmada BVDV -1l alt grubunda bulunan virusların 4 farklı coğrafik bölgeden köken aldığı gösterilmiştir. Her bölgeye ait viruslar arasından en fazla sayıda monoklonal antikorla reaksiyona giren bir virus suşu çalışmaya dahil edildi. Çalışmaya ayrıca aşı uygulanan işletmelerdeki klinik BVD vakalarından elde edilen bir izolat (TR 73) da dahil edildi. Bu izolatin genetik karakterizasyonu tez çalışmasının deney aşaması tamamlandıktan sonra Yeşilbağ ve arkadaşları tarafından belirlenmiş, böylece TR 73 izolatu yeni bir alt grup (BVDV-1r) olarak adlandırılmıştır (53).

Sonuç olarak ticari aşuların yerel izolatlarla karşı oluşturduğu bağışıklık düzeylerinin belirlenmesi amacıyla, BVDV-1 ve BVDV-2 alt gruplarında bulunan toplam 11 izolat kullanıldı. Yapılan testlerde kontrol virus olarak yine Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı stoklarında bulunan NADL (BVDV-1a referans suş), BVDV-FLK (FLK hücre kültürü kontaminantı olarak izole edilen bir ncp BVDV suşu) ve BVDV – TR 19 (ncp özelliğinde yerel suş) suşları kullanıldı.

Monoklonal Antikor, İkincil Antikor ve Konjugat

Araştırmada ncp virus üremesinin tespiti için gerçekleştirilen PLA testlerinde bir önceki deney düzeninde açıklanan monoklonal antikor (1/4/7), biotin işaretli keçi anti-mouse antikor (Pierce: 31800) ve streptavidin biotin horse radish peroksidaz konjugatı (Pierce 21114) kullanıldı.

Araştırmada Kullanılan Hayvanlar

Çalışmada kullanılan hayvanlar Bursa'da kurulu özel bir işletmede bulunan ve daha önce BVDV aşısı uygulanmamış olan genç sığırlar arasından seçildi. BVDV enfeksiyonları yönünden takip edilen ve ari olduğu bilinen işletmedeki hayvanların bakım ve besleme şartları işletmenin ön gördüğü sistemde gerçekleştirildi.

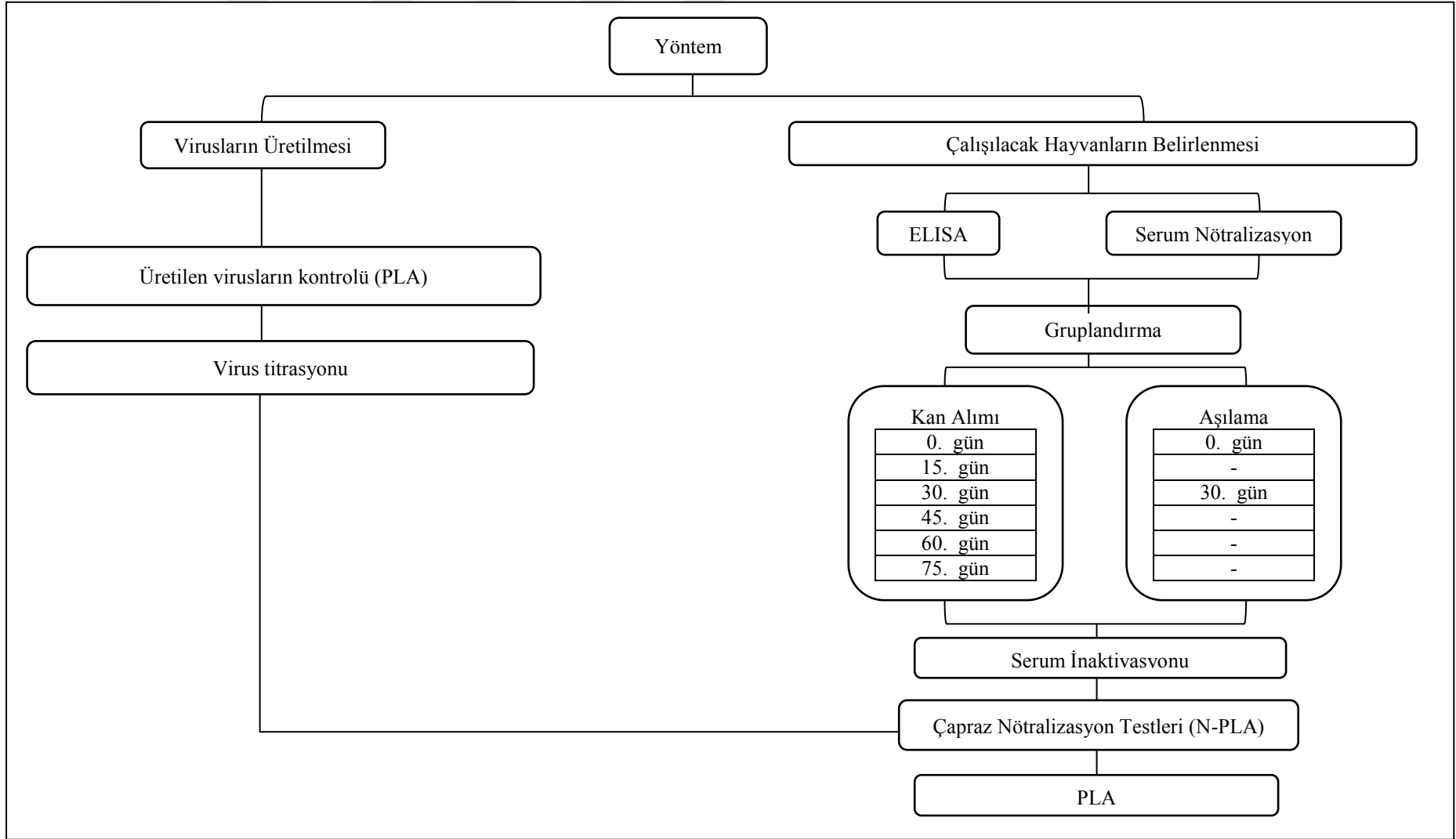
Bu deney düzeninde gerçekleştirilecek uygulamalar Uludağ Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun 11.03.2008 tarihli ve 2008-5/ 6 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

ELISA

Araştırmada kullanılan sığırların virolojik analizlerini gerçekleştirmek üzere E^{ns} proteinine spesifik ticari bir BVDV Ag-ELISA kiti (Herdcheck/ Idexx, 99-43830, İsviçre) kullanıldı.

Yöntem

Aşı etkinliklerinin incelenmesine yönelik gerçekleştirilen deney düzeninde uygulanan yöntemler Şekil-9' de şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil-9. Aşı etkinliğine yönelik çalışmaların uygulama aşamaları

Virusların Üretilmesi

Virusların üretilmesi amacıyla BVDV kontaminasyonu saptanmayan, 150 cm²'lik hücre kültür şişelerinde üretilmiş MDBK hücre hatları kullanıldı. Bu hücrelerin yüzeyleri 37°C' lik su banyosunda ısıtılan PBS ile yıkandı ve çalışmada kullanılması planlanan 11 izolatin herbiri ayrı hücre kültürüne, kültür şişesinin %1'i oranında adsorbsiyonlu yöntemle ekildi. Virus üretimi sırasında vasat olarak %5 FDS içeren DMEM kullanıldı. Takip eden 5 gün boyunca %5 karbondioksitli ortamda 37°C'de inkübe edildi. Hücreler kültür kabının tabanından scraper ile kürete edildikten sonra -80°C' de dondurma ve 37°C' de çözündürme işlemi iki kez tekrarlanarak viruslar toplandı. Üretilen virusların tamamı kullanılacakları zamana kadar -80°C' de muhafaza edildi.

Virus Üremesinin Kontrolü ve Virus Titrasyonu

Non-sitopatojenik karakterde olan virusların üremelerinin kontrolü ve titrelerinin belirlenmesine yönelik testler bir önceki deney düzeninde açıklandığı şekilde gerçekleştirildi. Bu amaçla 24 gözlü tabletlerde hazırlanan MDBK hücre kültürüne ekilen virusların üremeleri PLA yöntemi ile değerlendirildi. Titre değerleri Kaerber yöntemine göre hesaplandı.

Aşılama için Kullanılacak Hayvanların Belirlenmesi ve Gruplandırma

Çalışmanın gerçekleştirilmesi için işletmede bulunan 6 – 11 ay arasında değişen yaşlara sahip 34 adet genç sığırlardan örnek toplandı. Steril kan tüplerine alınan örnekler 1500 rpm 4°C' de 10 dk santrifüj edilerek serumları ayrıldı. Elde edilen her serum örneğinin yarısı ticari BVDV antijen ELISA kiti (Herdcheck/ Idexx, 99-43830, İsviçre) ile test edilmek üzere herhangi bir işlem görmeden -20°C' de derin dondurucuda saklanırken, kalan yarısı antikor varlığını araştırmak amacıyla 56°C' de 30 dk süresince inaktive edildi. İnaktive edilen serumlar test edilinceye kadar -20°C' de muhafaza edildi.

BVDV antijen ve antikorları yönünden test edilerek negatif oldukları belirlenen hayvanlar yaş dağılımları göz önüne alınarak, her grup içerisinde eşit koşullar sağlanacak şekilde gruplandırıldı. Toplam 20 hayvan, 3 adet “deney grubu” ve 1 adet “kontrol grubu” olmak üzere, herbiri 5 hayvandan oluşan 4 gruba ayrıldı. Oluşturulan gruplar ve bu gruplarda yer alan hayvanlara ilişkin bilgiler Tablo-11’de gösterilmiştir.

Tablo-11. Aşılama gerçekleştirilen deneme grupları ve hayvanların yaş dağılımları

Deneme Grubu	Aşı No	Aşı Uygulaması	Hayvan Kulak No	Hayvanın Yaşı (Ay)
Grup 1	1	2 ml, Subkutan, 30 gün arayla 2 kez	8001	10
			8006	9
			8010	8
			8038	7
			8050	6
Grup 2	2	5 ml, İntramüsküler, 30 gün arayla 2 kez	8002	10
			8007	9
			8014	8
			8040	7
			8048	6
Grup 3	3	5 ml, İntramüsküler, 30 gün arayla 2 kez	8003	10
			8009	9
			8012	8
			8042	7
			8046	6
Grup 4	Kontrol grubu		8004	10
			8008	9
			8016	8
			8044	7
			8066	6

Aşılama

Gruplara ayrılan hayvanlara aşı uygulaması üretici/ithalatçı firmaların prospektüslerinde belirtildiği şekilde gerçekleştirildi. Tüm aşıların inaktif olması sebebiyle 4 hafta arayla 2 doz aşılama yapıldı. İlk aşılama tarihi 0. gün olarak kabul edilirken ikinci aşılama 30. günde gerçekleştirildi. Aşıların üretici firmaları tarafından öngörülen uygulama şekilleri Tablo-11' de gösterilmiştir.

Kan Alımı

Aşılamamın gerçekleştirildiği günden itibaren tüm hayvanlardan 2 hafta ara ile 6 defa (0., 15., 30., 45., 60. ve 75. günlerde) vena jugularis'den steril kan tüpleri içerisine kan örneği toplandı. Aşılamamın yapıldığı günlere denk gelen örneklemelerde öncelikle kan alımı yapıldı ve takiben aşı uygulandı.

Nötralizan Antikor Titre Değerlerinin Belirlenmesi

Tüm hayvanlara ait serumlar araştırmanın bu bölümünde kullanılan ve Tablo-9'da sunulan 11 virusa karşı test edildi. Söz konusu virus suşlarının tamamı non-sitopatojen özellikte olmaları sebebiyle antikor titrelerinin belirlenmesi amacıyla N-PLA yöntemi kullanıldı. Test aşağıda açıklandığı şekilde uygulandı.

İnaktive edilmiş serum örneklerinin iki katlı sulandırmaları hazırlanarak her sulandırmadan 24 gözlü tabletlerde 2' şer göze 0.4 ml oranında dağıtıldı. Serumların üzerine aynı miktarda 100 DKID₅₀ oranında sulandırılarak hazırlanmış virus süspansiyonundan eklendi. Virus kontrol gözlerine 100 DKID₅₀ oranındaki virus sulandırmaları saf olarak eklendi. Tabletler 37°C' de %5 CO₂'li ortamda 1 saat süreyle inkübe edildi. Süre sonunda tüm gözlere 100.000 hücre/ml MDBK hücre süspansiyonundan 0.4 ml dağıtıldıktan sonra tabletler 72 saat boyunca aynı şartlarda muhafaza edildi.

İnkübasyon süresini tamamlayan tabletlerin içeriği boşaltıldı. Tabletlerin 80°C' de 3 saat süreyle fikse edilmelerinin ardından hücre yüzeyleri 1/3'lük PBS ile yıkandı ve her göze 0.2 ml O-D-glucopyranoside (%0.5, Sigma 03757) eklenerek oda sıcaklığında 10 dk bekletildi. Yıkama işleminden sonra her göze T-PBS (1xPBS, %0,05 Tween 20) içerisinde hazırlanan sırayla primer monoklonal anti-BVDV fare antikoru (1:50), biyotin işaretli anti-fare keçi antikoru (1:400) ve streptavidin horse radish peroksidaz konjugatı (1:300) 0.2 ml miktarında eklendi. Her bir basamak arasında 3 kez 1/3 PBS ile yıkama işlemi gerçekleştirildi ve her basamak 90 dk boyunca oda sıcaklığında bekletildi. Son aşamada 0.3 ml DMF (Di-methyl-formamid) içerisinde 2 mg AEC (3-amino 9-etil karbazol, Sigma A5754) çözdürülmesi ve 4,7 ml sodyum asetat tamponu (pH 5.0) ile 0.025 ml H₂O₂ (%0.05) eklenmesiyle substrat hazırlandı. Her göze 0.2 ml eklenen substratın 30 dk inkübasyonu takiben uzaklaştırılmasının ardından invert mikroskopta (Nikon, TS100) hücre içi kırmızı-kahverengi boyanmaların görülmesiyle virus üremeleri teyit edildi. Boyanma görülen gözlerdeki serum sulandırılmaları BVDV antikorumları yönünden negatif, boyanma görülmeyen gözlerdeki serumlar ise pozitif olarak değerlendirildi. Test gözlerinin en az yarısında virus üremesini engellendiği en yüksek serum sulandırması nötralizan antikor titresi olarak değerlendirildi.

Verilerin Analizi

Nötralizan antikor kinetiği aşılamadan sonra 15. günden itibaren 75. güne kadar takip edildi. Gerek deney grupları, gerekse BVDV alt grupları arasındaki farklılıkların belirlenmesinde elde edilen antikor titrelerinin geometrik ortalamaları dikkate alındı.

BULGULAR

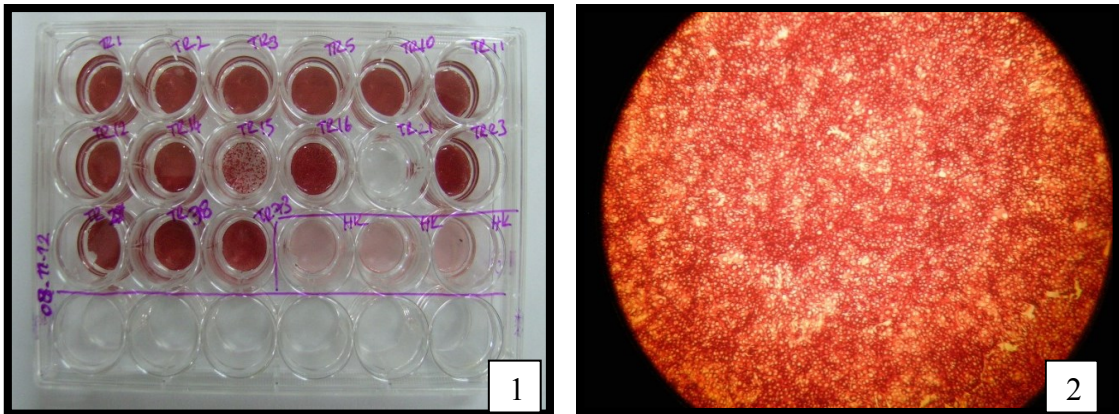
Serolojik Özelliklerin Belirlenmesine Yönelik Çalışmalar

İmmunoperoksidaz Testinin Standardizasyonu

Ticari olarak temin edilen ikincil antikor ve konjugatın farklı konsantrasyonları eşleştirilerek deney düzeni gerçekleştirildi. Farklı bekleme süreleri ya da farklı bekleme ortamlarında tekrarlanan bu deney düzeninde; 1:50 oranında primer monoklonal anti-BVDV fare antikor sulandırmasının, 1:400 oranında biyotin işaretli anti-fare keçi antikor sulandırmasının, 1:300 oranında streptavidin horse radish peroksidaz konjugat sulandırmasının ve her bir aşamanın oda sıcaklığında 90 dk boyunca bekletilmesinin en uygun kullanım şartları olduğu belirlendi.

Virus Üremesinin Teyidi ve Titrasyon Sonuçları

Serolojik ilişkilerin belirlenmesine yönelik testlerde kullanılacak virusların üremeleri MDBK hücre kültüründe uygulanan PLA yöntemiyle kontrol edildi. Hücre kültürlerinde inkübasyon süresince herhangi bir sitopatojenik etki görülmezken, PLA yöntemi sonucunda tüm virusların ekildiği gözlerde mikroskop altında kırmızı kahverengi hücre içi boyanma görülerek üremeleri teyit edildi (Şekil-10).



Şekil-10. Üretilen virusların PLA yöntemi ile kontrolü.

(1): PLA sonucu üreme odaklarının makroskobik görünümü ve (2): PLA yöntemiyle boyama sonuçlarının mikroskobik görüntüsü (x4).

Çapraz nötralizasyon testlerinde kullanılmak amacıyla MDBK hücre kültüründe üretilen virusların Kaerber yöntemi ile hesaplanan titre değerleri Tablo-12’de gösterilmiştir. SFT-R hücre kültüründe üretilen virusların titre değerleri belirlenmedi, bunun yerine konsantrasyon sonrası protein miktarları belirlenerek immunizasyonda kullanılacak dozları ayarlandı.

Tablo-12. Serolojik ilişkilerin belirlenmesine yönelik testlerde kullanılan virusların titre değerleri

BVDV alt grubu	Virus suşu	DKID₅₀/ 0,1 ml
BVDV-1a	TR 2	10 ^{-5.45}
BVDV-1b	TR 12	10 ^{-7.7}
BVDV-1d	TR 11	10 ^{-6.45}
BVDV-1f	TR 38	10 ^{-7.2}
BVDV-1h	TR 23	10 ^{-7.2}
BVDV-1i	TR 1	10 ^{-6.45}

Virusların Konsantrasyonu ve Diyalizi

Konsantrasyon ve diyaliz işlemlerinin sonunda elde edilen virus miktarları Tablo-13’de gösterildi.

Tablo-13. Virus üretimi, ultrafiltrasyon ve diyaliz işlemleri sonucunda elde edilen virus süspansiyonu miktarları

Virus Suşu	SFT-R hücre hattında üretimle elde edilen miktar	Ultrafiltrasyon sonucunda elde edilen miktar	Diyaliz sonucunda elde edilen miktar
TR 1	100 ml	6.0 ml	5.2 ml
TR 2	100 ml	7.0 ml	6.7 ml
TR 11	100 ml	5.0 ml	4.5 ml
TR 12	100 ml	3.4 ml	2.75 ml
TR 23	85 ml	7.0 ml	6.9 ml
TR 38	100 ml	4.5 ml	4.2 ml

Virus Süspansiyonlarındaki Protein Miktarının Belirlenmesi

Sulandırılmış virus süspansiyonlarının 260 ve 280 nm dalga boylarında ölçümleri sonucu elde edilen optik dansite değerleri ve protein konsantrasyon nomogramı kullanılarak hesaplanan her 1 ml hacmindeki protein miktarları Tablo-14' de gösterilmiştir.

Tablo-14. Virus sulandırmalarının optik dansite değerleri ve hesaplanan protein miktarları

Örnek	OD değerleri		Hesaplanan protein miktarı (mg/ml)	Toplam protein miktarları (mg)
	260nm	280nm		
BVDV-1a / TR2	0.103	0.092	10.0	67.00
BVDV-1b / TR12	0.120	0.143	10.8	29.70
BVDV-1d / TR11	0.120	0.132	10.8	48.60
BVDV-1f / TR38	0.171	0.239	18.0	75.60
BVDV-1h / TR23	0.064	0.070	7.8	53.82
BVDV-1i / TR1	0.120	0.126	10.2	53.04

Virus Varlığının Teyit Edilmesi

Ultrafiltrasyon tüplerinde üst haznede kalan ve antijen hazırlanmasında kullanılan virus süspansiyonu hem BVDV antijen ELISA, hem de PLA çalışmalarında pozitif sonuç verdi. Ultrafiltrasyon tüpünün alt haznesinde biriken sıvı da test edildi ve her iki yöntemle de BVDV yönünden negatif sonuç elde edildi. Böylece inaktivasyon işlemi öncesindeki basamakların başarıyla gerçekleştirildiği ve virusun korunarak inaktivasyon basamağına getirildiği teyit edildi.

İnaktivasyon İşleminin Kontrolü

Virus inaktivasyonu işleminin başarısı PLA yöntemi ile kontrol edildi. Bu amaçla MDBK hücre kültürlerine yapılan inokulasyonlarda herhangi bir sitotoksik etki

gözlenmedi. Diğer taraftan PLA yöntemiyle yapılan incelemelerde boyanma görülmemesi virusun başarıyla inaktive edildiğini gösterdi.

İmmunize Edilecek Hayvanların Belirlenmesi

İşletmede bulunan koyunlardan alınan kan örnekleri ile gerçekleştirilen ELISA ve serum nötralizasyon testleri sonucunda tüm hayvanların BVDV antijen ve antikorları yönünden negatif oldukları saptandı. Çalışmanın gerçekleştirilmesi amacıyla test edilen bu hayvanlar arasından yaşları göz önüne alınarak seçilen 21 koyun 7 gruba ayrılarak immunizasyon protokolü uygulandı.

Çalışılacak Serum Örneklerinin Belirlenmesi

Her grup içerisinde homolog virusa karşı en yüksek antikor yanıtının geliştiği serumların belirlenebilmesi için gerçekleştirilen N-PLA sonuçları Tablo-15’de gösterilmiştir. Bu değerlere göre en yüksek antikor yanıtlarının 60. günde alınan kan örneklerinde geliştiği belirlendi.

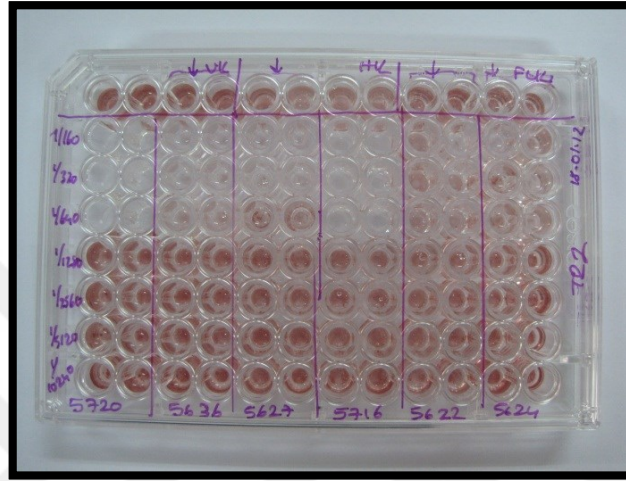
Tablo-15. Homolog virusa karşı elde edilen antikor titreleri

Virus suşu	Hayvan No	Örnekleme günü	Antikor titresi
TR1 (BVDV-1d)	5720	60. gün	≥1:640*
		75. gün	≥1:640
	5717	60. gün	≥1:640
		75. gün	1:640
	5629	60. gün	≥1:640
		75. gün	≥1:320
TR2 (BVDV-1a)	5631	60. gün	1:640
		75. gün	≥1:640
	5636	60. gün	≥1:640*
		75. gün	≥1:640
	5630	60. gün	≥1:640
		75. gün	≥1:320
TR11 (BVDV-1d)	5627	60. gün	≥1:640*
		75. gün	≥1:640
	5715	60. gün	≥1:640
		75. gün	≥1:640
	5718	60. gün	≥1:640
		75. gün	≥1:320
TR12 (BVDV-1b)	5719	60. gün	≥1:320
		75. gün	≥1:80
	5716	60. gün	≥1:640*
		75. gün	1:160
	5632	60. gün	1:320
		75. gün	1:160
TR23 (BVDV-1h)	5622	60. gün	≥1:640*
		75. gün	≥1:640
	5639	60. gün	≥1:640
		75. gün	≥1:640
	5781	60. gün	≥1:640
		75. gün	≥1:320
TR38 (BVDV-1f)	5621	60. gün	1:160
		75. gün	1:160
	5624	60. gün	≥1:640*
		75. gün	1:320
	5634	60. gün	≥1:640
		75. gün	≥1:320

*: Çapraz nötralizasyon çalışmasında kullanılması kararlaştırılan örnekler

Çapraz Nötralizan Antikor Titreleri

Belirlenen 6 serum örneği (Tablo-15) kullanılarak çapraz nötralizasyon çalışmaları gerçekleştirildi. Kontrol grubu ve söz konusu 6 serum örneğinin 6 farklı BVDV-1 alt grubuna karşı gerçekleştirilen N-PLA testleriyle elde edilen (Şekil-11) antikor titre değerleri Tablo-16'da sunulmuştur.



Şekil-11. Çapraz nötralizasyon testleri (Belirlenen serum örneklerinin BVDV TR 2 suşuna karşı N-PLA testi)

Tablo-16. BVDV-1 alt grupları arasındaki çapraz nötralizan antikor titreleri

BVDV-1 alt grupları	Antiserumlar						Kontrol grubu
	BVDV -1a	BVDV -1b	BVDV -1d	BVDV -1f	BVDV -1h	BVDV -1i	
BVDV -1a	1:1280	1:640	1:320	1:20	1:640	1:1280	<1:5
BVDV -1b	1:1280	1:2560	1:1280	1:20	1:2560	1:640	<1:5
BVDV -1d	1:1280	1:80	1:1280	1:1280	1:1280	1:640	<1:5
BVDV -1f	1:20	1:20	1:40	1:1280	1:320	1:1280	<1:5
BVDV -1h	1:320	1:1280	1:160	1:640	1:5120	1:1280	<1:5
BVDV -1i	1:80	1:160	1:320	1:320	1:1280	1:1280	<1:5
Geometrik ortalama	1:320	1:285	1:320	1:226	1:1280	1:1015	

Serolojik Yakınlık (R) Değerlerinin Hesaplanması

Yukarıda açıklandığı şekilde elde edilmiş olan antikor titrelerinin ilgili formüle uyarlanmasıyla alt gruplar arasındaki serolojik yakınlık ya da farklılıkları ifade eden R değerleri elde edildi. Söz konusu R değerleri Tablo-17’de gösterildi.

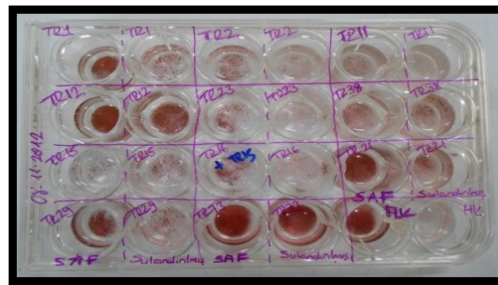
Tablo-17. BVDV-1 alt grupları arasındaki serolojik yakınlık düzeyleri (R) değerleri

	BVDV -1a	BVDV -1b	BVDV -1d	BVDV -1f	BVDV -1h	BVDV -1i
BVDV -1a	100	50	12.5	1.5	17.6	25
BVDV -1b		100	17.6	1.1	50	17.6
BVDV -1d			100	17.6	17.6	35.5
BVDV -1f				100	17.6	50
BVDV -1h					100	50
BVDV -1i						100

Aşı Etkinliği Çalışması

Virus Üremesinin Teyidi ve Titrasyon Sonuçları

MDBK hücre hattında üretimleri sırasında herhangi bir cp etki görülmeyen 11 adet BVDV suşunun kontrolleri PLA yöntemi ile gerçekleştirildi. MDBK hücre kültürünün hazırlandığı 24 gözlü tablete ekimleri sonrasında gerçekleştirilen PLA yöntemiyle tüm gözlerde ncp üreme odaklarının belirlenmesi virus üretimlerinin başarıyla gerçekleştiğini gösterdi (Şekil-12).



Şekil-12. PLA yöntemiyle virus üremesi kontrolü

Söz konusu virusların enfektivite değerlerini belirlemeye yönelik gerçekleştirilen test sonuçları yine immunoperoksidaz testi ile değerlendirildi. Üretilen viruslar için belirlenen 100 DKID₅₀ değerleri Tablo-18’de sunuldu.

Tablo-18. Aşı etkinliğinin değerlendirilmesinde kullanılan test viruslarının titre değerleri

Genetik alt gruplar	Virus Suşları	DKID ₅₀ / 0,1 ml
BVDV-1a	TR-2	10 ^{-4.7}
BVDV-1b	TR-12	10 ^{-4.45}
BVDV-1d	TR-11	10 ^{-4.2}
BVDV-1f	TR-38	10 ^{-2.45}
BVDV-1h	TR-23	10 ^{-4.95}
BVDV-1i	TR-1	10 ^{-4.95}
	TR-16	10 ^{-5.2}
	TR-21	10 ^{-3.7}
	TR-29	10 ^{-3.7}
BVDV-1r	TR-73	10 ^{-4.2}
BVDV-2b	TR-15	10 ^{-2.75}

Nötralizan Antikor Titre Değerleri

Gerçekleştirilen N-PLA testlerinin sonuçlarına göre çalışmanın başlangıcında BVDV antikorları yönünden seronegatif oldukları belirlenen hayvanların tamamında aşılama sonrasında antikor yanıtı geliştiği tespit edildi. Deney gruplarındaki tüm hayvanlardan 6 defa örnekleme gerçekleştirildi ve sağlanan tüm serum örnekleri 11 BVDV suşuna karşı test edildi. N-PLA ile elde edilen bireysel antikor yanıtları Tablo 19-21’ de gösterilmiştir. Gruplar arası karşılaştırmanın yapılabilmesi amacıyla grup içerisinde yer alan hayvanların aynı örnekleme tarihlerinde elde edilen nötralizan antikor titre değerlerinin geometrik ortalaması alındı (Tablo-22). Tez çalışmasında Türkiye’de yaygın olduğu gösterilen BVDV-1i alt grubuna ait 4 farklı izolatan kullanılmasından dolayı bu alt grubun değerlendirilmesinde 4 izolata karşı elde edilen antikor titrelerinin geometrik ortalamaları alındı (Tablo-23). Geometrik ortalama değerleri ele alındığında bu araştırmada test edilen

tüm BVDV alt gruplarına karşı 1 numaralı aşının diğerlerine kıyasla daha yüksek antikor titresini sağladığı görüldü (Şekil-13, Şekil-14). BVDV-1/ alt grubuna karşı elde edilen titre değerleri ise 1:630 – 1:861 arasında seyrettiği görüldü (Şekil-15). BVDV-1 içerisinde yer alan diğer alt gruplara karşı reaksiyonların bireysel incelemelerinde BVDV-1d, -1h ve -1/ alt grupları hariç, 1 numaralı aşı ile elde edilen yanıtın diğer aşılara göre daha yüksek olduğu görüldü (Şekil 15-21). Türkiye’den izole edilen BVDV-2 genotipinde yer alan TR15 izolatına karşı ise tüm aşılarda düşük bağışıklık yanıtı geliştirildiği görüldü (Şekil-22).



Tablo-19. Grup 1’de yer alan hayvanların 11 BVD virus suşuna karşı antikor titre değerleri

Aşı grubu	Hayvan no	Kan alım zamanı	<i>BVDV Şuşları</i>										
			<i>TR1</i> (-1l)	<i>TR2</i> (-1a)	<i>TR11</i> (-1d)	<i>TR12</i> (-1b)	<i>TR15</i> (-2b)	<i>TR16</i> (-1l)	<i>TR21</i> (-1l)	<i>TR23</i> (-1h)	<i>TR29</i> (-1l)	<i>TR38</i> (-1f)	<i>TR73</i> (-1r)
Grup 1 (BVDV -1a aşısı)	1.1	15. gün	1:16	1:512	1:32	1:64	1:16	1:256	1:32	1:64	1:512	1:64	1:16
		30 .gün	1:16	1:512	1:32	1:32	1:64	1:256	1:32	1:256	1:256	1:512	1:512
		45. gün	1:16	1:2048	1:32	1:32	1:64	1:32	1:32	1:64	1:256	1:256	1:256
		60. gün	1:16	1:512	1:64	1:64	1:64	1:256	1:2048	1:512	1:1024	1:64	1:512
		75. gün	1:16	1:512	1:64	1:64	1:32	1:1024	1:512	1:512	1:1024	1:1024	1:1024
	1.2	15. gün	1:512	1:512	1:128	1:128	1:64	1:2048	1:512	1:512	1:2048	1:512	1:512
		30 .gün	1:256	1:512	1:64	1:128	1:64	1:512	1:512	1:512	1:4096	1:512	1:512
		45. gün	1:256	1:2048	1:128	1:256	1:64	1:1024	1:512	1:1024	1:512	1:256	1:512
		60. gün	1:256	1:1024	1:64	1:2048	1:64	1:2048	1:512	1:512	1:512	1:512	1:1024
		75. gün	1:256	1:512	1:64	1:256	1:64	1:1024	1:512	1:256	1:1024	1:2048	1:1024
	1.3	15. gün	1:2048	1:2048	1:2048	1:512	1:256	1:512	1:64	1:512	1:2048	1:2048	1:2048
		30 .gün	1:1024	1:2048	1:512	1:512	1:256	1:2048	1:256	1:512	1:2048	1:2048	1:2048
		45. gün	1:2048	1:1024	1:1024	1:512	1:512	1:1024	1:64	1:4096	1:2048	1:2048	1:4096
		60. gün	1:2048	1:4096	1:2048	1:512	1:256	1:1024	1:256	1:1024	1:1024	1:4096	1:2048
		75. gün	1:2048	1:1024	1:4096	1:512	1:256	1:4096	1:128	1:256	1:1024	1:4096	1:2048
	1.4	15. gün	1:2048	1:2048	1:2048	1:512	1:1024	1:1024	1:2048	1:1024	1:2048	1:2048	1:2048
		30 .gün	1:1024	1:1024	1:1024	1:32	1:1024	1:2048	1:2048	1:512	1:2048	1:2048	1:2048
		45. gün	1:2048	1:2048	1:2048	1:512	1:1024	1:512	1:2048	1:256	1:2048	1:2048	1:2048
		60. gün	1:256	1:2048	1:4096	1:256	1:256	1:512	1:2048	1:256	1:2048	1:2048	1:2048
		75. gün	1:512	1:4096	1:2048	1:256	1:512	1:256	1:1024	1:256	1:2048	1:2048	1:2048
1.5	15. gün	1:256	1:2048	1:8192	1:2048	1:128	1:4096	1:512	1:1024	1:4096	1:2048	1:4096	
	30 .gün	1:256	1:4096	1:2048	1:32	1:256	1:1024	1:512	1:256	1:2048	1:2048	1:2048	
	45. gün	1:256	1:4096	1:4096	1:1024	1:1024	1:1024	1:1024	1:1024	1:2048	1:4096	1:4096	
	60. gün	1:512	1:2048	1:2048	1:2048	1:256	1:1024	1:1024	1:4096	1:1024	1:2048	1:2048	
	75. gün	1:4096	1:4096	1:2048	1:512	1:256	1:256	1:512	1:4096	1:1024	1:2048	1:2048	

Tablo-20. Grup 2’de yer alan hayvanların 11 BVD virus suşuna karşı antikor titre değerleri

Aşı grubu	Hayvan no	Kan alım zamanı	<i>BVDV Şuşları</i>										
			<i>TR1</i> (-1l)	<i>TR2</i> (-1a)	<i>TR11</i> (-1d)	<i>TR12</i> (-1b)	<i>TR15</i> (-2b)	<i>TR16</i> (-1l)	<i>TR21</i> (-1l)	<i>TR23</i> (-1h)	<i>TR29</i> (-1l)	<i>TR38</i> (-1f)	<i>TR73</i> (-1r)
Grup 2 (BVDV -1a, BVDV-2 aşısı)	2.1	15. gün	1:64	1:256	1:512	1:16	1:64	1:64	1:256	1:2048	1:1024	1:256	1:512
		30 .gün	1:256	1:256	1:1024	1:16	1:64	1:256	1:64	1:4096	1:2048	1:1024	1:512
		45. gün	1:64	1:32	1:512	1:16	1:64	1:64	1:256	1:512	1:2048	1:1024	1:512
		60. gün	1:512	1:512	1:256	1:256	1:64	1:256	1:64	1:512	1:4096	1:256	1:4096
		75. gün	1:512	1:512	1:64	1:4096	1:64	1:512	1:64	1:512	1:2048	1:256	1:2048
	2.2	15. gün	1:256	1:256	1:32	1:256	1:64	1:512	1:512	1:1024	1:1024	1:1024	1:64
		30 .gün	1:512	1:256	1:32	1:64	1:64	1:256	1:512	1:512	1:1024	1:1024	1:32
		45. gün	1:512	1:64	1:32	1:256	1:64	1:64	1:512	1:1024	1:512	1:64	1:64
		60. gün	1:256	1:256	1:256	1:64	1:64	1:256	1:256	1:512	1:512	1:256	1:256
		75. gün	1:512	1:256	1:256	1:32	1:32	1:256	1:256	1:512	1:256	1:64	1:16
	2.3	15. gün	1:256	1:512	1:1024	1:512	1:64	1:256	1:512	1:2048	1:1024	1:2048	1:128
		30 .gün	1:32	1:256	1:512	1:256	1:64	1:1024	1:512	1:256	1:256	1:2048	1:128
		45. gün	1:128	1:512	1:2048	1:256	1:64	1:1024	1:512	1:1024	1:1024	1:512	1:128
		60. gün	1:1024	1:512	1:512	1:64	1:64	1:1024	1:512	1:2048	1:256	1:512	1:128
		75. gün	1:2048	1:512	1:2048	1:512	1:64	1:512	1:512	1:2048	1:1024	1:512	1:512
	2.4	15. gün	1:512	1:2048	1:2048	1:1024	1:64	1:2048	1:512	1:4096	1:1024	1:1024	1:1024
		30 .gün	1:512	1:2048	1:2048	1:512	1:64	1:2048	1:512	1:1024	1:1024	1:1024	1:1024
		45. gün	1:1024	1:1024	1:2048	1:2048	1:64	1:2048	1:512	1:256	1:1024	1:2048	1:512
		60. gün	1:1024	1:256	1:2048	1:128	1:64	1:2048	1:512	1:2048	1:512	1:2048	1:1024
		75. gün	1:256	1:1024	1:2048	1:128	1:64	1:2048	1:512	1:4096	1:2048	1:1024	1:512
2.5	15. gün	1:512	1:1024	1:512	1:128	1:256	1:1024	1:512	1:4096	1:1024	1:2048	1:512	
	30 .gün	1:1024	1:1024	1:512	1:512	1:64	1:4096	1:512	1:4096	1:1024	1:2048	1:256	
	45. gün	1:2048	1:1024	1:1024	1:256	1:128	1:4096	1:1024	1:8192	1:1024	1:2048	1:1024	
	60. gün	1:1024	1:1024	1:1024	1:512	1:256	1:4096	1:1024	1:8192	1:256	1:2048	1:1024	
	75. gün	1:1024	1:2048	1:2048	1:64	1:64	1:4096	1:1024	1:8192	1:256	1:8192	1:1024	

Tablo-21. Grup 3’de yer alan hayvanların 11 BVD virus suşuna karşı antikor titre değerleri

Aşı grubu	Hayvan no	Kan alım zamanı	<i>BVDV Şuşları</i>										
			<i>TR1</i> (-1l)	<i>TR2</i> (-1a)	<i>TR11</i> (-1d)	<i>TR12</i> (-1b)	<i>TR15</i> (-2b)	<i>TR16</i> (-1l)	<i>TR21</i> (-1l)	<i>TR23</i> (-1h)	<i>TR29</i> (-1l)	<i>TR38</i> (-1f)	<i>TR73</i> (-1r)
Grup 3 (BVDV -1a aşısı)	3.1	15. gün	1:512	1:512	1:64	1:64	1:16	1:64	1:64	1:512	1:1024	1:512	1:64
		30 .gün	1:512	1:512	1:64	1:64	1:32	1:64	1:256	1:256	1:1024	1:1024	1:256
		45. gün	1:512	1:256	1:64	1:64	1:64	1:128	1:64	1:512	1:1024	1:1024	1:256
		60. gün	1:1024	1:4096	1:64	1:32	1:64	1:512	1:512	1:256	1:64	1:1024	1:256
		75. gün	1:1024	1:512	1:256	1:32	1:64	1:1024	1:512	1:64	1:64	1:1024	1:4096
	3.2	15. gün	1:512	1:512	1:32	1:8↓	1:64	1:512	1:512	1:256	1:512	1:256	1:16
		30 .gün	1:1024	1:512	1:64	1:16	1:64	1:512	1:256	1:512	1:512	1:512	1:32
		45. gün	1:512	1:512	1:32	1:8	1:64	1:512	1:256	1:512	1:512	1:512	1:16
		60. gün	1:1024	1:256	1:32	1:16	1:64	1:1024	1:512	1:512	1:512	1:256	1:64
		75. gün	1:1024	1:256	1:64	1:32	1:64	1:8192	1:512	1:512	1:512	1:512	1:32
	3.3	15. gün	1:2048	1:512	1:4096	1:512	1:64	1:2048	1:512	1:2048	1:1024	1:256	1:512
		30 .gün	1:2048	1:1024	1:4096	1:512	1:64	1:1024	1:512	1:4096	1:1024	1:256	1:512
		45. gün	1:2048	1:512	1:512	1:64	1:64	1:2048	1:256	1:2048	1:1024	1:256	1:512
		60. gün	1:2048	1:2048	1:4096	1:256	1:64	1:2048	1:512	1:2048	1:1024	1:256	1:128
		75. gün	1:1024	1:512	1:2048	1:64	1:64	1:2048	1:1024	1:1024	1:512	1:256	1:128
	3.4	15. gün	1:2048	1:1024	1:1024	1:64	1:32	1:2048	1:1024	1:4096	1:1024	1:512	1:1024
		30 .gün	1:256	1:1024	1:512	1:256	1:32	1:512	1:512	1:2048	1:1024	1:1024	1:1024
		45. gün	1:512	1:512	1:512	1:128	1:64	1:1024	1:256	1:2048	1:1024	1:512	1:512
		60. gün	1:512	1:512	1:512	1:64	1:64	1:512	1:256	1:1024	1:512	1:1024	1:4096
		75. gün	1:256	1:4096	1:512	1:64	1:32	1:512	1:1024	1:4096	1:512	1:512	1:512
	3.5	15. gün	1:512	1:256	1:64	1:32	1:16	1:512	1:512	1:2048	1:256	1:512	1:256
		30 .gün	1:256	1:256	1:256	1:32	1:8	1:512	1:512	1:512	1:128	1:512	1:64
		45. gün	1:256	1:256	1:512	1:256	1:8	1:512	1:1024	1:256	1:128	1:512	1:64
		60. gün	1:128	1:512	1:1024	1:256	1:64	1:2048	1:1024	1:2048	1:64	1:4096	1:1024
		75. gün	1:256	1:512	1:1024	1:128	1:64	1:2048	1:512	1:2048	1:128	1:1024	1:1024

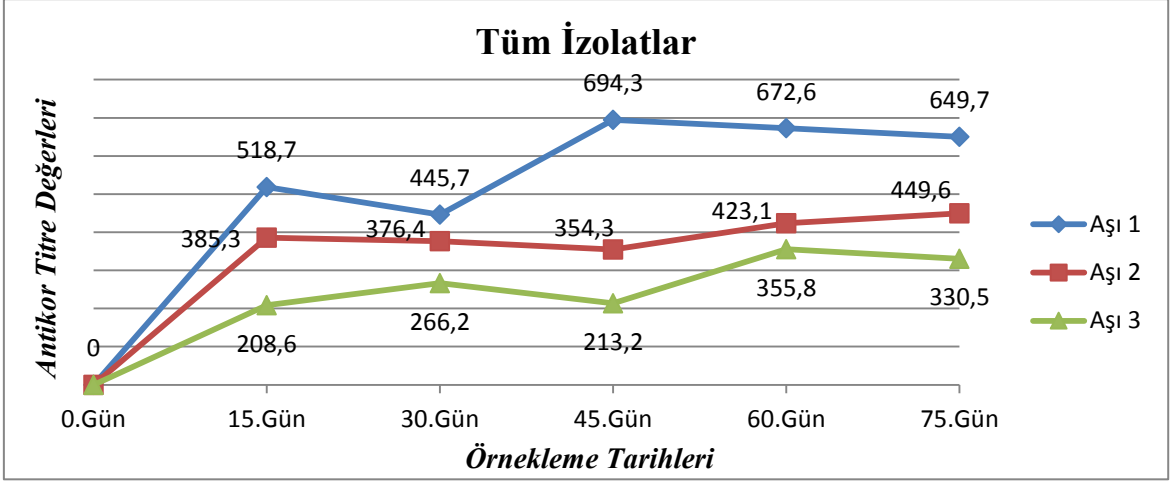
Tablo-22. BVDV suşlarına karşı elde edilen antikor titre değerlerin geometrik ortalamalarının gruplar arası dağılımı

Aşı grubu	Kan alım zamanı	BVDV-1a	BVDV-1b	BVDV-1d	BVDV-1f	BVDV-1h	BVDV-1i			BVDV-1r	BVDV-2b	
		<i>TR2</i>	<i>TR12</i>	<i>TR11</i>	<i>TR38</i>	<i>TR23</i>	<i>TR1</i>	<i>TR16</i>	<i>TR21</i>	<i>TR29</i>	<i>TR73</i>	<i>TR15</i>
1	15. gün	1176.3	337.8	675.6	776.0	445.7	388.0	1024.0	256.0	1782.9	675.6	128.0
	30 .gün	1176.3	73.5	294.1	1176.3	388.0	256.0	891.4	337.8	1552.1	1176.3	194.0
	45. gün	2048.0	294.1	512.0	1024.0	588.1	337.8	445.7	294.1	1024.0	1351.2	294.1
	60. gün	1552.1	512.0	588.1	891.4	776.0	256.0	776.0	891.4	1024.0	1351.2	147.0
	75. gün	1351.2	256.0	588.1	2048.0	512.0	445.7	776.0	445.7	1176.3	1552.1	147.0
2	15. gün	588.1	194.0	445.7	1024.0	2352.5	256.0	445.7	445.7	1024.0	294.1	84.4
	30 .gün	512.0	147.0	445.7	1351.2	1176.3	294.1	891.4	337.8	891.4	222.9	64.0
	45. gün	256.0	222.9	588.1	675.6	1024.0	388.0	512.0	512.0	1024.0	294.1	73.5
	60. gün	445.7	147.0	588.1	675.6	1552.1	675.6	891.4	337.8	588.1	675.6	84.4
	75. gün	675.6	222.9	675.6	588.1	1782.9	675.6	891.4	337.8	776.0	388.0	55.7
3	15. gün	512.0	55.7	222.9	388.0	1176.3	891.4	588.1	388.0	1024.0	168.9	32.0
	30 .gün	588.1	84.4	294.1	588.1	891.4	588.1	388.0	388.0	891.4	194.0	32.0
	45. gün	388.0	64.0	194.0	512.0	776.0	588.1	588.1	256.0	1024.0	147.0	42.2
	60. gün	891.4	73.5	337.8	776.0	891.4	675.6	1024.0	512.0	588.1	388.0	64.0
	75. gün	675.6	55.7	445.7	588.1	776.0	588.1	1782.9	675.6	776.0	388.0	55.7

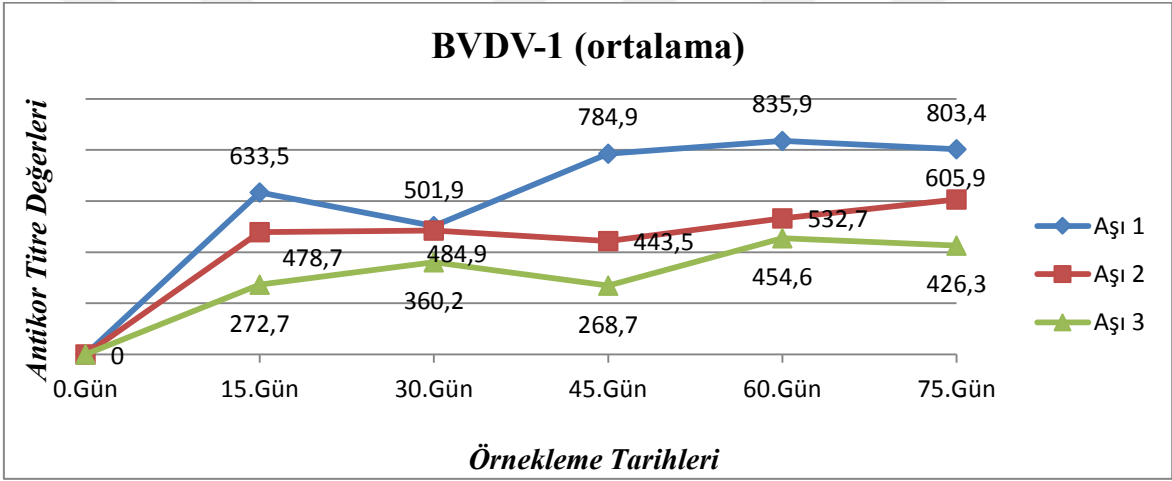
Tablo-23. BVDV-1 alt gruplarına karşı gelişen antikor titrelerinin geometrik ortalamaları

Aşı grubu	Kan alım zamanı	BVDV-1/*	Ortalama (BVDV-1 Virusları)	BVDV-2	Genel Ortalama (BVDV-1 + BVDV-2 Virusları)
1	15. gün	652.6	633.5	128.0	518.7
	30 .gün	588.1	501.9	194.0	445.7
	45. gün	461.4	784.9	294.1	694.3
	60. gün	652.6	835.9	147.0	672.6
	75. gün	652.6	803.4	147.0	649.7
2	15. gün	159.8	478.7	84.4	385.3
	30 .gün	530.1	484.9	64.0	376.4
	45. gün	568.1	443.5	73.5	354.3
	60. gün	588.1	532.7	84.4	423.1
	75. gün	630.3	605.9	55.7	449.6
3	15. gün	228.6	272.7	32.0	208.6
	30 .gün	530.0	360.2	32.0	266.2
	45. gün	548.7	268.7	42.2	213.2
	60. gün	675.6	454.6	64.0	355.8
	75. gün	861.1	426.3	55.7	330.5

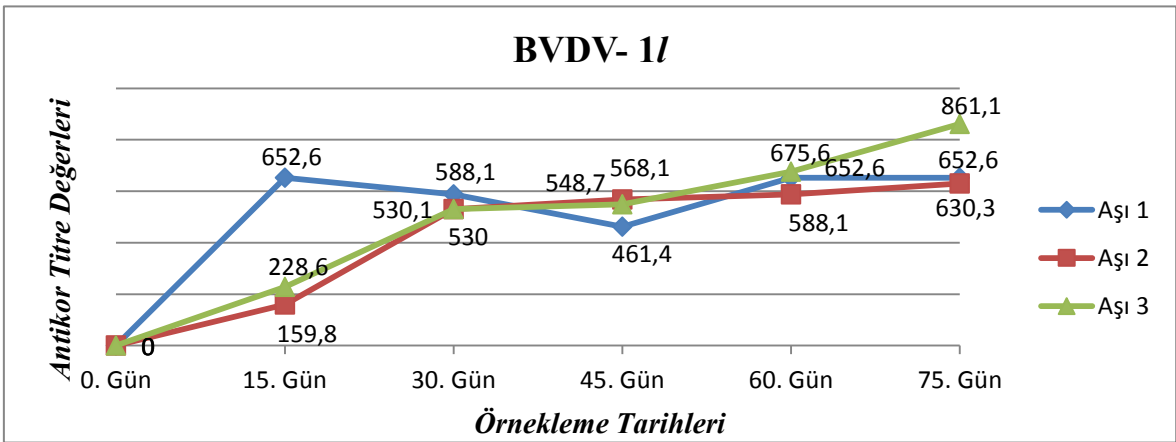
* : BVDV-1/ alt grubunda bulunan 4 virus suşuna karşı elde edilen değerlerin grup içi ortalaması.



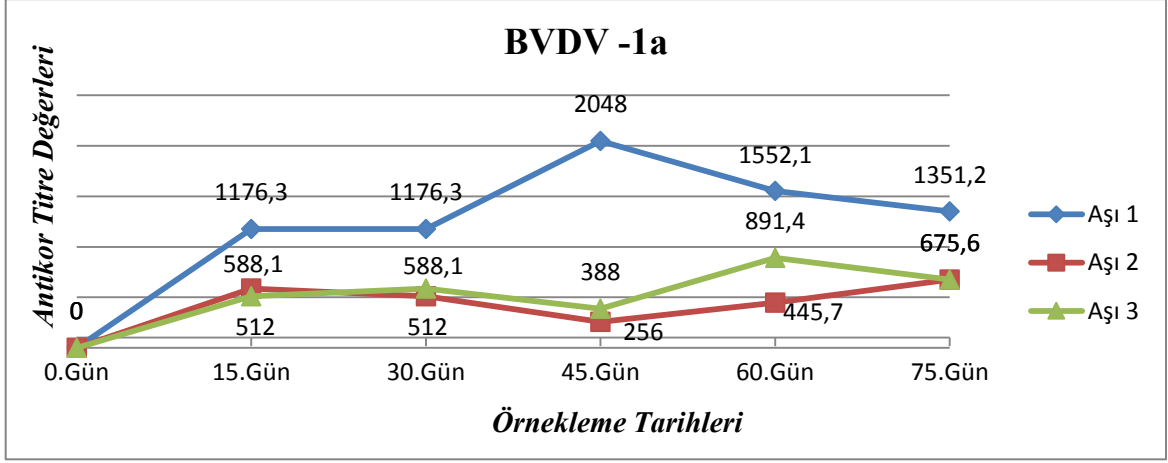
Şekil-13. Aşılama sonrasında BVDV Türkiye izolatlarına karşı gelişen antikor titre değerlerinin değişimi



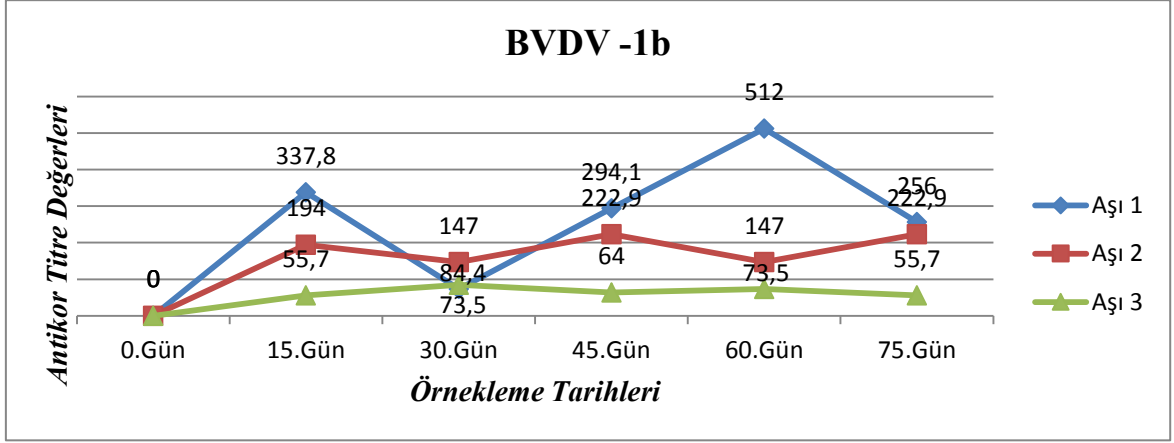
Şekil-14. BVDV-1 Türkiye izolatlarına karşı gelişen antikor titrelerinin (geometrik ortalamalarının) aşılama sonrası günlere göre değişimi



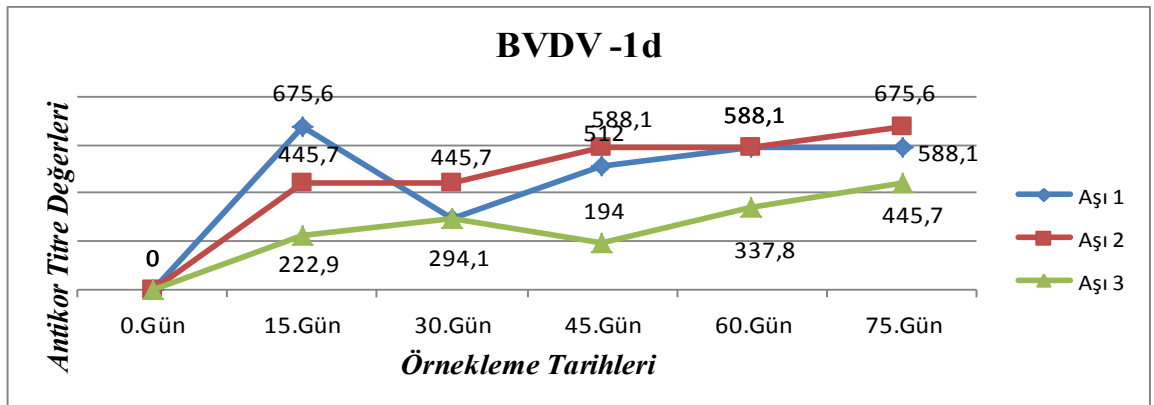
Şekil-15. BVDV-1/ alt grubuna karşı gelişen antikor titrelerinin (geometrik ortalamalarının) aşılama sonrası günlere göre değişimi



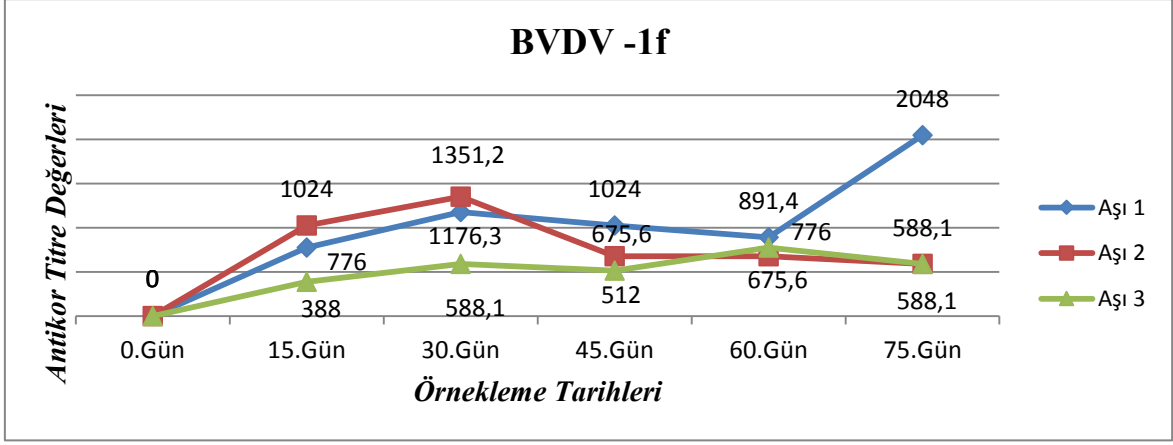
Şekil-16. BVDV-1a alt grubuna (BVDV TR2) karşı gelişen antikor titre değerlerinin aşılama sonrası günlere göre değişimi



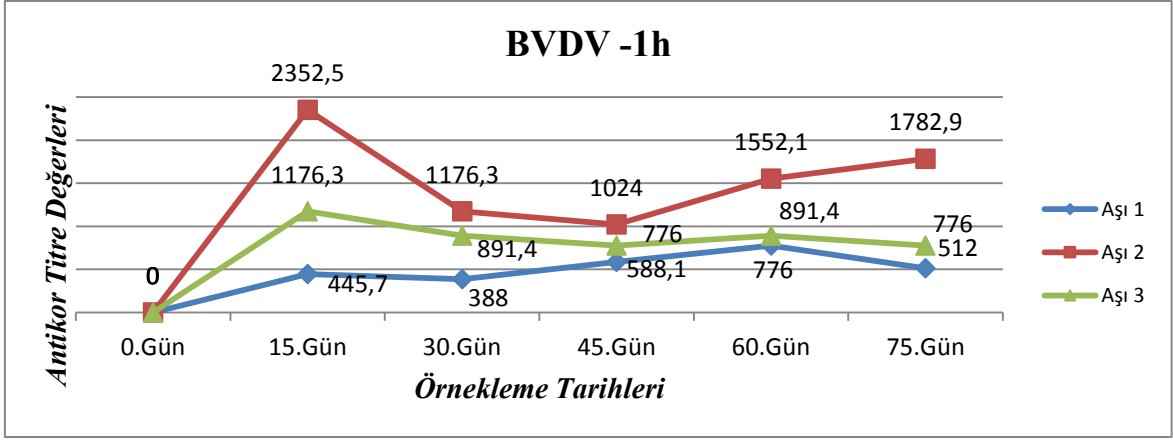
Şekil-17. BVDV-1b alt grubuna (BVDV TR12) karşı gelişen antikor titre değerlerinin aşılama sonrası günlere göre değişimi



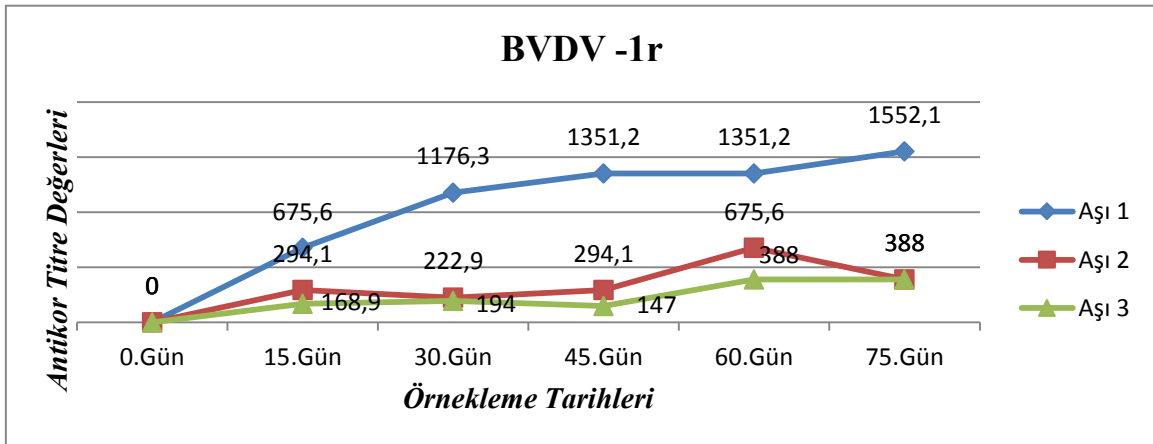
Şekil-18. BVDV-1d alt grubuna (BVDV TR11) karşı gelişen antikor titre değerlerinin aşılama sonrası günlere göre değişimi



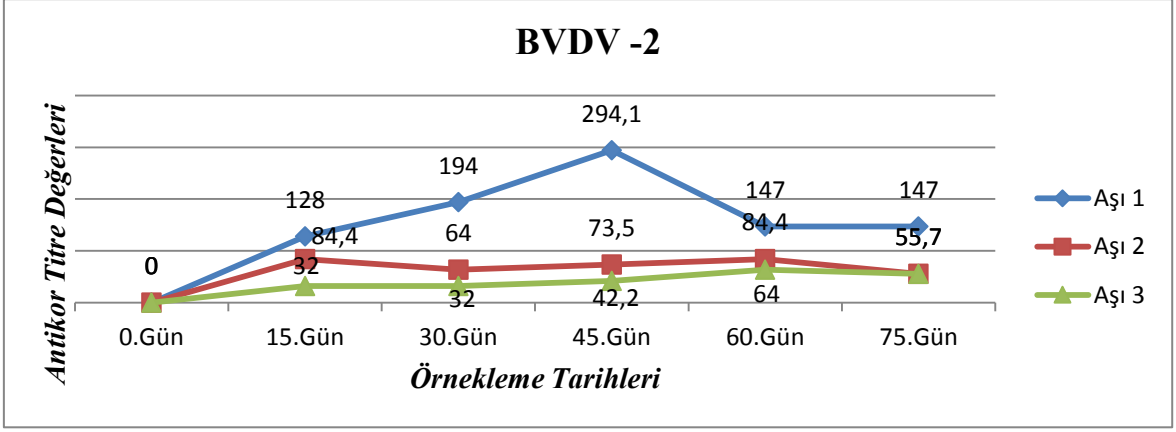
Şekil-19. BVDV-1f alt grubuna (BVDV TR38) karşı gelişen antikor titre değerlerinin aşılama sonrası günlere göre değişimi



Şekil-20. BVDV-1h alt grubuna (BVDV TR23) karşı gelişen antikor titre değerlerinin aşılama sonrası günlere göre değişimi



Şekil-21. BVDV-1r alt grubuna (BVDV TR73) karşı gelişen antikor titre değerlerinin aşılama sonrası günlere göre değişimi



Şekil-22. BVDV-2 alt grubuna (BVDV TR15) karşı gelişen antikor titre değerlerinin aşılama sonrası günlere göre değişimi

TARTIŞMA ve SONUÇ

Sığırcılık işletmelerinde üretimin her aşamasını olumsuz yönde etkilemesi sebebiyle BVDV enfeksiyonlarının kontrolü ekonomik olarak önem taşımaktadır. BVDV enfeksiyonların kontrolü genel olarak PI hayvanların belirlenmesi, eliminasyonu ve aşılarla oluşturulan bağışık yanıtı dayanmaktadır (181). BVDV kontrolünü etkileyen pek çok faktör bulunmakla birlikte izolatlar arasındaki genetik, antijenik ve serolojik farklılıkların potansiyel etkilerinin belirlenmesi önemli bir unsurdur.

BVDV izolatları arasında gelişen genetik farklılıklar ve genetik değişimlerin yansıması olarak ortaya çıkan antijenik farklılıkların bulunduğu gösterilmiştir (187). RNA bağımlı RNA polimeraz enziminin fonksiyonlarına ilişkin hatalar ve bu hatalara bağlı olarak ortaya çıkan mutasyonlarla ilişkili genetik, antijenik farklılıkların önemi pek çok çalışma ile vurgulanmıştır (189-200)

Reddy ve arkadaşlarının (189) gerçekleştirdiği çalışmada aşı suşu ile saha suşları arasında antijenik farklılıkların bulunduğu bildirilmiştir. Bu farklılıklardan dolayı virus nötralizasyon ve immunopresipitasyon testlerinde kullanılan monoklonal antikorların tüm BVDV suşlarını tanıma yeteneğine sahip olmayabileceği belirtilmiştir. Söz konusu araştırmada (189) antijenik farklılıkların monoklonal antikor kullanımına dayanan testlerde (ELISA, IFA, VN) yanlış negatif sonuçlar elde edilmesine yol açabildiği gösterilmiştir.

Zimmer ve arkadaşlarının (201) gerçekleştirdiği çalışmada düvelerde iki farklı inaktif ticari aşı uygulaması sonrasında gebeliğin 82. gününde antijenik olarak farklılık görülen 3 BVDV suşu kullanarak deneysel enfeksiyon şekillendirilmiştir. Bu çalışma sonucunda aşılanan hayvanlarda PI yavru gelişim oranının %60-78 arasında değiştiği bildirilmiştir. Bu deneysel enfeksiyon modeli aşılamalarda antijenik farklılığa dayanan koruma yetersizlikleriyle karşılaşılabileceğini göstermektedir (201).

Virus çeşitliliğinden ileri gelen sorunlar teşhis ve aşılama faaliyetlerinin etkinliğini sınırlandırmakta, böylece BVDV korunma ve kontrolüne yönelik çalışmaları olumsuz etkilemektedir.

BVDV-1 aşısıyla immunize edilmiş düvelerden doğan PI buzağılardan BVDV-2 virus suşu izole edilmesi sonucu sahada kullanılan aşılardan farklı genotip/alt genotiplere (alt gruplara) karşı korunmada yeterli olup olmadığı sorusu gündeme gelmiştir (24, 192, 193).

Kontrol stratejisi olarak gebe sığırlara canlı BVDV aşısı uygulamalarının riskli olması sebebiyle araştırmalar daha ziyade etkili bir inaktif aşı geliştirilmesi üzerine odaklanmıştır (195). İnaktif aşıların etkinliği direkt olarak antijen konsantrasyonu ile ilişkilendirilse de uygulama yolu, uygulama sıklığı, bireysel bağışıklık farklılıkları, tespit yöntemlerindeki duyarlılıklar, kullanılan adjuvan ve seçilen aşı suşunun da aşı etkinliğinde rol oynadığı bilinmektedir (22, 178, 181, 192, 195-197). BVDV suşları arasında görülen çeşitlilikten yola çıkarak, aşılarda yer alan suşlarla saha suşları arasında çapraz koruma sağlanması 2000’li yıllardan bu yana üzerinde önemle durulan bir konu haline gelmiştir (178, 194).

Bu tez çalışmasında Türkiye’de tespit edilen BVDV alt grupları (BVDV-1a, -1b, -1d, -1f, -1h, 1i) arasındaki serolojik benzerliklerin ya da farklılıkların incelenmesi ve ayrıca Türkiye’de kullanılan ticari BVDV aşılarının yerel BVDV alt gruplarına karşı koruyuculuklarının araştırılması hedeflenmiştir.

Serolojik Özelliklerin Belirlenmesine Yönelik Çalışmalar

Tezin bu bölümünde koyunlarda farklı 6 inaktif BVDV izolatu ile immunizasyon yapılmış ve elde edilen kan örnekleri homolog ve heterolog virüslere karşı çapraz nötralizasyon testleri ile incelenmiştir.

Kontrol grubundan elde edilen serumlarda hiçbir alt gruba karşı nötralizan antikor gelişmediği görülürken, tüm izolatlar için en yüksek nötralizan antikor yanıtları homolog eşleştirmelerde elde edilmiştir. Serum-virus eşleştirmelerinden elde edilen titrelere bakıldığında (Tablo-16) tüm serumların, değerlendirmeye alınan tüm BVDV izolatlarına karşı belirli bir nötralizan antikor yanıt gelişimine yol açtığı görülmüştür. Her ne kadar tüm serumlar her bir virüsü ayrı ayrı nötralize etse de elde edilen titre değerleri arasında belirgin farklılıklar olduğu da gözlenmiştir.

Minami ve arkadaşları, Japonya’da varlığı belirlenmiş BVDV alt grupları (BVDV-1a, -1b, -1c, -1n, -1o ve BVDV-2a) arasında antijenik ilişkilerin ortaya konulmasına yönelik bir çalışma gerçekteşirmiştir (198). Bu çalışmada çapraz serum nötralizasyon testi sonuçlarına dayanarak homolog virüslere karşı gelişen antikor titreleri ile diğer alt gruplara karşı gelişen antikor titreleri arasında en az 4 kat fark olduğu gösterilmiştir. Antikor titrelerindeki 4 katlı konsantrasyon farkının alt grup spesifik bir yanıt olduğu ileri

sürülmüştür. Araştırmacılar (198), daha az farka sahip antikor yanıtları elde edilmesinin muhtemel sebepleri olarak; (1) bir veya birden fazla alt grupta gerçekleşen enfeksiyon varlığını, (2) BVDV-1a, BVDV -1b, BVDV -1c, BVDV-2a dışında kalan alt gruplarla gerçekleşen enfeksiyon varlığını ya da (3) uzun süre önce farklı bir alt grupta geçirilen enfeksiyondan kalan düşük antikor yanıtların varlığını öne sürmüşlerdir. Ancak bu tez çalışmasında tek bir alt grup kullanılarak bağışıklığı sağlanan koyunların serum nötralizasyon testlerinde homolog virusa karşı gelişen yüksek antikor titre değerlerinin heterolog BVDV-1 alt gruplarına karşı da gelişebileceği görülmüştür. Özellikle de BVDV-1a antiserumu ile homolog virusa karşı elde edilmiş olan 1:1280 antikor titresinin BVDV-1b ve BVDV-1d viruslarına karşı da elde edilmesi Minami ve arkadaşlarının (198) hipotezinin her zaman geçerli olmadığını göstermektedir. Benzer şekilde Couvreur ve arkadaşlarının (60) gerçekleştirdiği çalışmada BVDV-1b antiserumu ile homolog virusa karşı elde edilen 1:640 titre değerlerinin BVDV-1a (NADL) suşuna karşı da elde edilmesi bu tez çalışmasında elde edilen verileri desteklemektedir.

Tez çalışmasında homolog antikor yanıtları ile heterolog BVDV-1 alt gruplarına karşı gelişen antikor yanıtları karşılaştırıldığında, benzer değerlerin saptanmasının yanında, yüksek oranda farklılıklar da belirlenmiştir. Homolog ve heterolog viruslara karşı elde edilen antikor titre değerleri arasında en az 2 kat fark görülürken (BVDV-1h antiserumu – BVDV-1b virus suşu), en yüksek farklılık 128 kat olarak saptanmıştır (BVDV-1b antiserumu – BVDV-1f virus suşu) saptanmıştır.

BVDV -1f antiserumu BVDV-1a ve BVDV-1b viruslarına karşı test edildiğinde oldukça düşük nötralizasyon yanıtı (1:20) geliştiği görülmüştür. Aynı şekilde BVDV-1a, -1b, ve -1d antiserumlarının BVDV-1f'ye karşı test edilmesinde de benzer düşük yanıtlarla (1:20 -1:40) karşılaşılmıştır (Tablo-16). Bu veriler BVDV-1f izolatının sahip olduğu nötralizasyonda etkili olan epitoplarla, test edilen diğer alt grupların, özellikle de BVDV-1a, -1b, ve -1d alt gruplarının sahip olduğu epitoplar arasında belirgin farklılıkların varlığını işaret etmektedir.

BVDV-1a serumu ile diğer alt gruplar arasındaki nötralizan antikor düzeyleri ele alındığında BVDV-1f (1:20) ve BVDV-1h (1:80) alt grupları haricinde diğer alt gruplara karşı yüksek antikor yanıtı elde edildiği görülmüştür. Bu yanıtlar BVDV-1b ve BVDV-1d reaksiyonlarında homolog antikor yanıtıyla aynı değerdeyken (1:1280), BVDV-1h için 1:320 titre değeri elde edilmiştir.

BVDV-1a, BVDV-1b, BVDV-1d ve BVDV-1f antiserumların nötralizasyon yanıtları incelendiğinde yüksek yanıtlar yanında her bir antiserumun en az bir alt gruba karşı düşük nötralizasyon sağladığı da görülmektedir. Özellikle bu antiserumların BVDV-1/ alt grubuna karşı geliştirdikleri nötralizasyon yanıtların 1:80–1:320 titre değerleri arasında değiştiği belirlenmiştir. Avrupa’da görülen BVDV-1h ve Türkiye’de yaygın olan BVDV-1/ viruslarıyla elde edilen antiserumların ise değerlendirmeye alınan tüm izolatlarla karşı yüksek (1:320–1:2560) nötralizan antikor yanıtı geliştirdiği görülmüştür. Bu durum bir kısım antiserumların BVDV-1/ alt grubu virusları nötralize etmekte yetersiz kalabileceğini, buna karşı BVDV-1/ ve BVDV-1h alt gruplarına ait serumların test edilen diğer alt gruplardaki virusları yüksek oranda nötralize etme yeteneğinin olduğunu göstermektedir.

Serolojik farklılıklar antijenik farklılıkların gösterilmesinde öncülük etmektedir. Her bir alt grup arasındaki bu ilişkilendirme serolojik benzerlik katsayısı (R) olarak ifade edilmiştir. R değerinin 25 ya da daha düşük olması önemli antijenik farklılıkları ifade etmektedir. Bu değer yükseldikçe karşılaştırılan iki grup arasındaki benzerliğin arttığı anlaşılmaktadır (199).

Bachofen ve arkadaşlarının (43) BVDV-1b, -1e, -1h ve -1k alt gruplarından viruslar ile gelişmiş doğal enfeksiyonlardan elde ettikleri serumlarla farklı BVDV alt gruplarını (BVDV-1a, BVDV-1b, BVDV-1h, BVDV-1k, BVDV-1e, BVDV-2a) çapraz nötralizasyon testleriyle karşılaştırdıkları bir çalışmada BVDV-1a ve BVDV-1b suşları arasında farklılıklar olduğu ortaya konulmuştur. Yine bu çalışmada antijenik yakınlık (R) değerlerinin BVDV-1a ile -1b arasında 35 ya da 42, BVDV-1h ile -1a arasında 33 ya da 40, BVDV-1h ile -1b arasında 50 olduğu bildirilmiştir.

Ridpath ve arkadaşlarının (83) poliklonal keçi antiserumlarıyla gerçekleştirdiği bir çalışmada BVDV -1a ile -1b arasındaki R değerinin 36 olduğu, Becher ve arkadaşlarının (5) gerçekleştirdiği bir çalışmada ise aynı alt gruplar (BVDV-1a ve -1b) arasındaki R değerinin 24.2 olduğu bildirilmiştir.

BVDV izolatları arasında çapraz nötralizasyon testlerinin gerçekleştirildiği farklı bir çalışmada ise BVDV-1a ile -1b arasında R değeri 9.9 bulunmuştur (198). Bu tez çalışmasında farklı BVDV-1 alt grupları arasında çapraz nötralizasyon sonuçları kullanılarak hesaplanan antijenik yakınlık (R) değerleri 1.1 ile 50 arasında değişmektedir. BVDV-1h alt grubu ile BVDV-1b alt grubu arasında saptanan antijenik yakınlık değerleri

(R=50) Bachofen ve arkadaşlarının tespit ettikleri R değeri ile benzerlik göstermektedir. Diğer yayınlardan farklı olarak bu çalışmada BVDV-1a ile BVDV-1b arasındaki antijenik yakınlık düzeyi daha yüksek (R=50) bulunmuştur (Tablo-17). Günümüzde virus pasajlama işlemleri sırasında meydana gelen genetik değişiklikler sebebiyle farklı laboratuvarlarda aynı isimle kullanılan BVDV virusları arasında bile antijenik farklılıkların gündeme gelebileceği bilinmektedir (168). Ayrıca saha şartlarında sınırsız olarak sirküle olan, hayvanlar arasındaki bulaşma ve yeni konakçıdaki çoğalma sürecinde BVD virus suşlarının yüksek oranda mutasyona uğraması da beklenen bir durumdur. Dolayısıyla bu mutasyonların etkisiyle farklı coğrafyalardaki BVDV suşları aynı genetik alt grupta olmalarına rağmen antijenik/serolojik farklılıklar ortaya çıkabilmektedir. Bu durum test edilen BVDV-1a ve BVDV-1b viruslarının diğer çalışmalara (5, 43, 83, 198) kıyasla serolojik olarak birbirine daha yakın bulunmasının muhtemel sebebi olabilir.

Çalışmada elde edilen en yüksek R değerleri BVDV-1a ile -1b (R=50), BVDV-1f ile -1f (R=50), BVDV-1f ile -1h (R=50) ve BVDV-1h ile -1b (R=50) alt grupları arasında saptanmıştır. Bu alt gruplar arasında benzer oranda serolojik farklılıkların bulunduğunu ve diğer alt gruplara nazaran daha yüksek antijenik benzerliklere sahip oldukları görülmektedir. Ancak elde edilen benzer sonuçlar gruplar arası serolojik ilişkilerin aynı antijenik farklılıklardan kaynaklanıp kaynaklanmadığını açıklamamaktadır.

Bu çalışmada en düşük R değerleri (diğer bir ifadeyle en yüksek serolojik farklılıklar) ise BVDV-1f ile -1b (R=1.1) ve BVDV-1f ile -1a (R=1.5) alt grupları arasında saptanmıştır. Bu veriler BVDV-1f alt grubu ile test edilen alt gruplar arasında, özellikle de ticari aşuların hazırlanmasında sıklıkla tercih edilebilen BVDV-1a ve BVDV-1b alt grupları arasında önemli antijenik farklılıkların bulunabileceğini göstermektedir. Bu düzeydeki bir farklılığın teşhis yöntemlerinin etkinliğinde ve BVDV enfeksiyonunun kontrolüne yönelik çalışmalarda olumsuzluklara yol açabileceği değerlendirilmektedir.

Günümüze kadar yapılan çalışmalarda (25, 86) Türkiye’de yaygın olduğu belirlenen BVDV-1f alt grubunun diğer alt gruplarla karşılaştırıldığında yüksek düzeyde serolojik yakınlıkların saptanması ise ilgi çekici bir bulgudur. Türkiye’de kullanılan aşular içerisinde sıklıkla kullanılan BVDV-1a alt grubu ile BVDV-1d, BVDV-1f alt grupları arasında belirgin düzeyde serolojik farklılıkların görülmesi teşhis ya da korunma programlarındaki eksikliklerin temelini oluşturabilir. Her ne kadar daha fazla veriye ihtiyaç duyulsa da, R

değerleri ele alındığında BVDV-1h ve özellikle BVDV-1l alt gruplarının bu yöndeki eksikliklerin giderilmesinde katkı sağlayabileceği söylenebilir.

Couvreur ve arkadaşlarının (60) saha izolatları ile gerçekleştirdikleri çapraz nötralizasyon çalışmalarının istatistiksel incelemeleri sonucu BVDV-1a, -1b, -1d ve -1f alt grupları arasında anlamlı bir farklılık olmadığı bildirilmiştir. Bu sonuca dayanarak aşılarda değişik BVDV alt grupların yer almasının gerekli olmadığı öne sürülmüştür. Bu tez çalışmasında gerçekleştirilen çapraz nötralizasyon testlerinde ise, pek çok çalışmada olduğu gibi (5, 43, 83, 198), bazı BVDV-1 alt grupları arasında zayıf çapraz nötralizasyon sonuçları saptanmış ve serolojik farklılıkların bulunduğu ortaya konulmuştur.

BVDV-1 alt grupları arasında saptanan zayıf antikor yanıtları, farklı araştırmacılar tarafından önerilen (1:256 ve 1:512) koruyucu titrelerin (194, 200) altında seyretmektedir. Bu çalışmada elde edilen veriler; saha enfeksiyonlarında bu farklılıkların koruyuculukta yetersizliklere yol açabileceğini ve hastalık kontrol programları için aşı virusu belirlerken bu kriterlerin göz önünde bulundurulması gerektiğini göstermektedir.

Aşı Etkinliği Çalışması

Tez çalışmasının diğer bir kısmı olarak Türkiye’de satışa sunulan farklı üç ticari inaktif aşının Türkiye’de tespit edilmiş olan ve antijenik farklılıklara sahip BVDV alt gruplarına karşı etkinliklerinin incelenmesi hedeflenmiştir.

Hamers ve arkadaşlarının (192) da belirttiği üzere aşılarda saha şartlarında koruyuculuğunun incelenmesinin en etkili yolu çok sayıda hayvanın aşılması ve antijenik farklılığa sahip çok sayıda izolatla gerçekleşen enfeksiyonların incelenmesidir. Ancak bu yöntemin etik ve ekonomik etkileri düşünüldüğünde uygulama alanı kısıtlı kalmaktadır.

Tez çalışmasında, gerçekleştirilen bu deney düzeninde her bir grupta 5 hayvan bulunan toplam üç gruba ayrı ayrı üç farklı aşı uygulanmıştır. Tüm hayvanlardan 15 gün ara ile 6 defa alınan kan örneklerinin her biri 11 farklı BVDV suşuna karşı nötralizasyon testi ile incelenmiştir.

Daha önce pek çok çalışmada ticari aşılarda saha izolatlarına karşı oluşturdukları koruyuculuk düzeyleri değerlendirilmiştir. Bu çalışmalardan önemli bir bölümü belirli

coğrafyalarda daha yaygın olarak görülen BVDV-1a, -1b ve BVDV-2 suşlarına karşı gerçekleştirilmiştir (10, 182, 193).

BVDV-1a ve BVDV-2a içerikli canlı aşı kullanılan bir çalışmada (38) ise BVDV-1b suşuna karşı gelişen 1:64 antikor yanıtının BVDV-1b ile persiste enfekte hayvanlarla karşılaştığında yeterli koruyuculukta olmadığı belirtilmiştir.

Fötal koruma etkinliğinin değerlendirildiği bir çalışmada (182) gebe sığırlar BVDV-1a ve BVDV-2a viruslarını içeren inaktif polivalan bir aşıyla bağışıklık sağlanmıştır. Sonuçta BVDV-1a nötralizan antikor titrelerinin geometrik ortalamaları 1:724, BVDV-2a nötralizan antikor titrelerinin ortalamaları ise 1:351 olmasına karşın yeni enfeksiyonlara karşı koruyuculuklarında yetersiz kaldığı bildirilmiştir. Bu hayvanların gebeliğin 90. gününde PI 4 hayvanla (2'si BVDV-1b suşuyla, 2'si BVDV-2a suşuyla enfekte) bir araya getirilmeleri sonrasında gebeliğin 150. gününde sezeryanla alınan fötusların %26.7'sinde BVDV-1 ve %13.3'ünde BVDV-2 virusunun izole edildiği bildirilmiştir. Bu çalışmalar BVDV-1a ya da BVDV-2a suşlarıyla elde edilen çapraz nötralizasyon düzeylerinin BVDV-1b suşu ile enfeksiyon gelişmesinin engellenmesinde yeterli olmadığını göstermektedir.

Deney gruplarında BVDV-1a aşılması gerçekleştirilmiş bir çalışmada (193) homolog virusa karşı gelişen yanıtla karşılaştırıldığında BVDV-1b virusuna karşı daha düşük (%43) nötralizasyon yanıtı olduğu belirlenmiştir. Ancak BVDV-1b virus epruvasyonu sonrasında kontrol grubu verilerine kıyasla aşı gruplarında klinik görünüm, viral saçılım ve lökosit sayısında azalmada önemli farklılıkların görülmesi ile BVDV -1a aşılmasının BVDV-1b alt grubu tarafından gerçekleştirilecek klinik görünlere karşı koruyucu olabileceği ileri sürülmüştür. Klinik görünümler kontrol grupları ile karşılaştırıldığında istatistiki olarak anlamlı bir azalış görülse de, bu çalışmada (193) epruvasyon öncesinde belirlenen antikor yanıtının epruvasyon sonrasında 4 katlı artması BVDV-1b enfeksiyon gelişimine karşı yeterli bir koruyuculuk sağlayıp sağlamadığı konusunda şüphe uyandırmaktadır.

Bu araştırmada aşılama ile elde edilen nötralizan antikor titre değerlerinin 1:8 ile 1:8192 arasında dağıldığı görülmüştür. Bu durum BVDV izolatları arasında antijenik farklılıkların önemini desteklemektedir. Ancak genç buzağular arasında bağışıklık sistemlerinin matürasyon seviyelerinin de farklı olabileceği ve bu farklılıkların nötralizan

antikor titrelerinde görülen grup içi bireysel farklılıkları etkileyebileceği değerlendirmeye alınmalıdır. Tüm gruplarda eşit yaş ortalaması dikkate alındığı için genel olarak gruplarda elde edilen ortalama antikor titrelerinin değerlendirmeye alınması daha sağlıklı yorum doğuracaktır.

Geometrik ortalama değerlerine bakıldığında (Tablo-22) BVDV-1b virusuna (TR 12) karşı oluşan antikor yanıtları 2 nolu aşı uygulanan grupta 1:147 – 1:222.9 aralığında, 3 nolu aşı uygulanan grupta 1:55.7- 1:84.4 arasında değiştiği görülmektedir. BVDV-2 alt grubuna (TR 15) karşı 3 aşı ile elde edilen geometrik ortalama değerleri sırasıyla 1:128 - 1:294.1; 1:64 - 1: 84.4 ve 1:32 – 1:64 arasında değişmektedir. Daha önce gerçekleştirilen bir çalışmada BVDV enfeksiyonlarında gerekli koruyucu titre değeri 1:256 olarak önerilmiştir (200). Bu değer göz önüne alındığında araştırmada uygulanan her üç aşı ile BVDV-2 virus suşuna karşı oldukça düşük antikor titresini oluşturduğu görülmüştür. Benzer şekilde 2 ve 3 nolu aşılar ile BVDV-1b alt grubuna karşı koruyucu olduğu önerilen titre değerinin (1:256) oldukça altında değerler elde edilmiştir. Bununla beraber farklı örnekleme tarihlerinde 2 ve 3 nolu aşılarla BVDV-1r alt grubuna karşı ve 3 nolu aşının kullanıldığı deney grubunda BVDV-1d alt grubuna karşı 1:256 titre değerinden daha düşük yanıtlar elde edildiği saptanmıştır. BVDV-1r alt grubunun, aşı uygulaması gerçekleştirilmiş bir işletmede gelişen BVDV salgınından izole edildiği göz önüne alındığında aşılarla elde edilen düşük yanıtların bu işletmede BVDV-1r enfeksiyonunun gelişmesinin muhtemel sebebi olduğu öngörülebilir.

BVDV-1a, -1b, -1h, -1k ve -1e arasında belirgin serolojik farklılıkların olduğunun saptandığı bir çalışmada (43) BVDV-1a ile aşılanan hayvanlarda yukarıda belirtilen BVDV-1 alt gruplarının tamamına karşı yüksek ($\geq 1:392$) antikor yanıtının geliştiği ancak BVDV-2' ye karşı düşük yanıt (1:43) geliştiği bildirilmiştir.

Fulton ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği bir çalışmada (55) 3 farklı ticari aşı uygulamasıyla elde edilen bağışıklık yanıtları BVDV-1a, BVDV-1b ve BVDV-2 suşlarına karşı karşılaştırılmıştır. Kullanılan 2 aşının sadece BVDV-1a, birinin ise hem BVDV-1a hem de BVDV-2 içerdiği belirtilmiştir. Her üç aşı ile elde edilen nötralizan antikor titre değerleri karşılaştırıldığında yalnız BVDV-1a içerikli aşılarda BVDV-2 suşuna karşı istatistiksel olarak düşük yanıt geliştirdiği, BVDV-2 içerikli aşılarda farklı bir BVDV-2 suşuna karşı gelişen antikor yanıtlarının geometrik ortalamasının 1: 215.3 olduğu saptanmıştır. Bununla beraber üç aşının BVDV-1a suşu yanıtına oranla BVDV-1b suşuna

karşı yine düşük yanıt oluşturduğu ve en yüksek nötralizan antikor yanıtlarının homolog suşlara karşı geliştiği bildirilmiştir.

Bu tez çalışmasında da aşılama ile elde edilen antikor yanıtlarında, genotipler arası farklılıkların alt gruplar arasında görülenlere nazaran daha yüksek olduğu saptanmıştır (Tablo-23). Yukarıda belirtilen çalışmalarda BVDV-1 alt grupları ile gerçekleştirilen aşılama sonucunda BVDV-2 suşlarına karşı elde edilen belirgin antikor yanıtlarının BVDV-1a alt grubu yanıtları ile karşılaştırıldığında daha düşük olduğu gösterilmiştir (43, 55). Bu çalışmada da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Oluşturulan gruplarda BVDV-2 virus suşuna karşı 1. aşı kullanımı ile gelişen antikor titrelerinin 1:128 ile 1:244 arasında, 3. aşı kullanımında ise gelişen antikor titre değerlerinin 1:32 ile 1:64 arasında değiştiği görülmüştür. Ancak dikkat çekici nokta 2. aşının BVDV-1a ile birlikte BVDV-2 alt grubundan da virus içermesi ve BVDV-2'ye karşı bu aşıyla elde edilen yanıtın ifade edilen koruyucu düzeylerden çok daha düşük (1:55.7 - 1:84.4) olmasıdır. İkinci aşının BVDV-2 suşu içermesine rağmen çapraz nötralizasyon testlerinde BVDV-2b Türkiye izolatına (TR-15) karşı saptanan antikor yanıtının düşük olması muhtemelen aşı virusu ile testlerde kullanılan virus suşu arasındaki antijenik farklılıklardan kaynaklanmaktadır. Bu durum BVDV-1 alt gruplarında olduğu gibi BVDV-2 alt grupları arasında da antijenik farklılıkların önemini işaret etmektedir.

Her BVDV-1 alt grubu tek başına ele alındığında, 3 aşıyla elde edilen yanıtların farklı dağılımlarda seyrettiği görülmektedir. Özellikle BVDV-1b alt grubu için yukarıda da belirtildiği gibi 2. ve 3. aşı ile elde edilen yanıtlar koruyucu titre değerinin (1:256) altında kalırken 1. aşı ile 1:73.5 – 1:337.8 arasında değişen antikor titreleri elde edilmiştir. Her üç aşının aynı virus suşuna (BVDV-1b, TR 12) karşı geliştirdikleri antikor titreleri karşılaştırılırken görülen bu farklılıklar her bir aşı içerisinde yer alan BVDV-1a virus suşunun farklı olmasından kaynaklanmış olabilir. Dolayısıyla aynı BVDV alt gruplarını içeren aşılarda farklı ülkelerde ve coğrafyalarda değişen düzeylerde etkili olabileceği değerlendirilmektedir.

Fulton ve arkadaşları (201) gerçekleştirdikleri bir çalışmada biri hem BVDV-1 hem de BVDV-2 suşu diğerleri sadece BVDV-1 suşu içeren toplam 8 ticari aşının oluşturduğu antikor yanıtları incelenmiştir. Farklı dönemlerde elde edilen örnekler 18 BVDV suşuna karşı virus nötralizasyon testi ile değerlendirilmiştir. Bu çalışma sonucunda aşılarda elde edilen en yüksek antikor yanıtlarının homolog virus suşlarına karşı geliştiği, ancak bu

yanıtların aynı alt grup içerisinde yer alan farklı suşlara karşı değişebildiği belirtilmiştir. Bu tez çalışmasında dikkat çekici diğer bir nokta da homolog virüslere karşı gelişen yanıtlar arasındaki farklılıklardır. Birinci aşıda elde edilen en yüksek antikor yanıtının homolog suşa karşı geliştiği görülürken, 2. ve 3. aşılarda en yüksek yanıtların BVDV-1h alt grubuna karşı geliştiği belirlenmiştir. Bu durum BVDV-1b yanıtlarındaki farklılıklarda önerilen fikirle açıklanabileceği gibi, tez çalışmasının 1. deney düzeninde BVDV-1h ile BVDV-1a alt grubu arasında gösterilen serolojik yakınlıkla da ilişkilendirilebilir.

Günümüzde nötralizan antikor yanıtlarında koruyuculuk düzeyi olarak önerilen farklı titre değerleri mevcuttur (194, 200). Ancak gerçek koruyucu düzeylerin belirlenebilmesi için daha fazla aşı çalışmasının gerçekleştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. İkinci doz uygulanan aşı sonrasında BVDV-1 alt grubunda yer alan virüslere karşı belirlenen titre değerleri karşılaştırıldığında her üç aşının test edilen suşların büyük bir kısmına karşı günümüzde önerilen koruyucu titre değerinden (1:256 ve 1:512) yüksek yanıt gelişimini sağladığı görülmüştür.

BVDV-1 alt gruplarına karşı her üç aşı ile elde edilen antikor yanıtlarının geometrik ortalama değerleri sırasıyla 501.9 - 835.9; 443.5 – 605.9; 272.7 - 454.6 arasında değişmektedir. Bu verilere göre birinci aşı ile elde edilen değerlerin diğerlerine nazaran daha yüksek olduğu görülmektedir.

Kurcubic ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği çalışmada çift doz kullanılan farklı içerikli inaktif BVDV aşıları karşılaştırılmıştır (202). Bir gruba BVDV-1a içerikli inaktif monovalan aşı, diğer gruba farklı 5 BVDV-1 suşunu içeren polivalan aşı uygulanmıştır. Aşılama sonunda alınan kan örneklerinin NADL suşuna karşı nötralizasyon testi ile incelenmesiyle monovalan aşı uygulamasıyla gelişen antikor yanıtlarının polivalan aşıya oranla yüksek bulunduğu bildirilmiştir. Bu farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğunun vurgulanmasının yanında monovalan aşılarda elde edilen antikor yanıtının (28. günde), polivalan aşılarda elde edilen antikor yanıtına (42. günde) nazaran daha hızlı geliştiği bildirilmiştir.

Bu tez çalışmasında 1. aşı monovalan 2. ve 3. aşılarda polivalan özelliğe sahiptir. Yukarıda da ifade edildiği üzere bu tez çalışmasında monovalan aşılarda elde edilen antikor yanıtlarının her iki polivalan aşıda gelişen yanıtlara oranla daha yüksek olması Kurcubic ve arkadaşlarının (202) sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir. Bahsedilen

çalışma verilerinden farklı olarak bu çalışmada elde edilen 15. gün antikor yanıtlarına bakıldığında her üç aşı kullanımı ile belirgin düzeyde nötralizan antikor titre değerinin saptandığı görülmüştür. BVDV-1h alt grubuna karşı 2. doz aşı uygulaması sonrasında oluşan yanıt dışında tüm suşlara karşı gelişen en yüksek nötralizan antikor titre değerlerinin 45. ve sonrasındaki günlerde geliştiği görülmüştür (Şekil 13-22).

BVDV-1a suşunun Amerika, BVDV-1b suşunun Avrupa orijinli olduğu ileri sürülmektedir (203). İtalya, Almanya ve Portekiz’de BVDV-1b suşunun yaygın olduğu bildirilmiştir (97, 113, 116, 185). Türkiye’de BVDV-1b alt grubunun varlığı da önceki çalışmalarla bildirilmiştir (25, 86). Bu tez çalışmasının aşısı ile ilgili bölümünde Avrupa’da yaygın olduğu ve Türkiye’de varlığı bilinen BVDV-1b alt grubuna ve ayrıca Türkiye’de varlığı belirlenen BVDV-2 suşuna karşı mevcut aşılardan düşük antikor titreleri elde edildiği görülmüştür. Aşılama sonrasında 60. güne kadar BVDV-1d ve BVDV-1r suşlarına karşı gelişen yanıtlarda da önerilen koruyucu antikor titre değerlerinden düşük değerlerle karşılaşılabileceği belirlenmiştir. Bununla beraber Türkiye’de en yaygın alt grup olduğu gösterilen BVDV-1l alt grubuna karşı her üç aşı ile yüksek antikor yanıt elde edilmiştir. Bu veriler ışığında söz konusu ticari aşılardan Türkiye’de görülen yerel BVDV suşlarının yer aldığı alt grupların bir bölümüne karşı yüksek nötralizan antikor yanıtı sağladığı görülmektedir.

Bir önceki bölümde açıklandığı üzere, çapraz nötralizasyon testleri kullanılarak BVDV-1a ve BVDV-1b arasında antijenik farklılıkların olduğu bazı çalışmalarda gösterilmiştir (5, 49, 83, 198). Her ne kadar alt gruplar arasındaki serolojik farklılıkların teşhis çalışmalarını ve aşılama ile sağlanan koruyuculuğu ne düzeyde etkiledikleri kesin olarak tanımlanmasa da BVDV-1a içerikli aşılardan BVDV-1b alt grubuna karşı daha düşük antikor yanıtı gelişimine sebep olduğu (55) ve BVDV-1b enfeksiyonlarının gelişimini önlemede yeterli olmayacağını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (73, 182).

Bu çalışmanın ilk deney düzeninde belirlenen antijenik farklılıklar göz önüne alınarak aşı çalışmasında elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında BVDV-1a içeren 3 aşından 2’sinin kullanımıyla BVDV-1b alt grubuna karşı beklenenden düşük yanıt geliştiği görülmüştür. Bu sonuç pek çok çalışma ile paralellik gösterse de, en yüksek serolojik farklılığın saptandığı BVDV-1f alt grubuna karşı her üç aşı ile gelişen yanıtların günümüzde koruyucu titre değeri olarak önerilen antikor titrelerinden daha yüksek olması dikkat çekici bir bulgudur.

Bir virus suşuna karşı gelişmiş bağışıklığın heterolog BVDV suşlarından kaynaklanacak enfeksiyonlara karşı çapraz koruma sağlaması önemli bir konudur. Son yıllarda yeni isimlendirilen pek çok BVDV genetik alt grubu bildirilmiştir. Günümüzde kullanılan BVDV aşılarının yeni bildirilen bu izolatlarla karşı oluşturdukları bağışıklığı inceleyen az sayıda çalışma bulunmaktadır. Söz konusu saha izolatları arasındaki varyasyonlar ve bu varyasyonların mevcut BVDV aşılarının koruyuculuklarını etkileyip etkilemediği tam olarak bilinmemektedir. Evrimsel süreç içerisinde viral çeşitliliğin artmasının BVDV kontrol programlarının başarısını etkilemeye devam edeceği bilinmektedir. BVDV suşlarındaki farklılık hem günümüzde hem de gelecekte ulusal ya da bireysel çiftlik bazında kontrol programlarının geliştirilmesinde dikkate alınması gereken bir unsurdur. Bu tez çalışması ise Türkiye’de bulunan izolatlar arasındaki serolojik özelliklerin gösterilmesi ve bu serolojik ilişkilerin kullanılan aşılardan etkinlikleriyle karşılaştırılması yönünden önem taşımaktadır.

KAYNAKLAR

1. LINDBERG A, BROWNLIE J, GUNN GJ, HOUE H, MOENNIG V, SAATKAMP HW, SANDVIK T, VALLE PS. The control of bovine viral diarrhoea virus in Europe: today and in the future. *Revue Scientifique et Technique Office of International Epizootics*, 25 (3): 961-979, 2006.
2. KİM SG, ANDERSON RR, YU JZ, ZYLICH NC, KINDE H, CARMAN S, BEDENICE D, DUBOVI EJ. Genotyping and phylogenetic analysis of bovine viral diarrhoea virus isolates from BVDV infected alpacas in North America. *Veterinary Microbiology*, 136 (3-4): 209-216, 2009.
3. MINGALA CN, KONNAI S, TAJIMA M, ONUMA M, OHASHI K. Classification of new BVDV isolates from Philippine water buffalo using the viral E2 region. *Journal of Basic Microbiology*, 49 (5): 495-500, 2009.
4. CHASE CC, BRAUN LJ, LESLIE-STEEN P, GRAHAM T, MISKIMINS D, RIDPATH JF. Bovine viral diarrhoea virus multiorgan infection in two white-tailed deer in southeastern South Dakota. *Journal of Wildlife Diseases*, 44 (3): 753-759, 2008.
5. BECHER P, AVALOS RAMIREZ R, ORLICH M, CEDILLO ROSALES S, KÖNIG M, SCHWEIZER M, STALDER H, SCHIRRMEIER H, THIEL HJ. Genetic and antigenic characterization of novel pestivirus genotypes: implications for classification. *Virology*, 311 (1): 96-104, 2003.
6. SCHIRRMEIER H, STREBELOW G, DEPNER K, HOFFMANN B, BEER M. Genetic and antigenic characterization of an atypical pestivirus isolate, a putative member of a novel pestivirus species. *Journal of General Virology*, 85(12): 3647-3652, 2004.
7. VILCEK S, RIDPATH JF, VAN CAMPEN H, CAVENDER JL, WARGE J. Characterization of a novel pestivirus originating from a pronghorn antelope. *Virus Research*, 108: 187-193, 2005.
8. PETERHANS E, BACHOFEN C, STALDER H, SCHWEIZER M. Cytopathic bovine viral diarrhoea viruses (BVDV): emerging pestiviruses doomed to extinction. *Veterinary Research*, 41 (6): 44-58, 2010.
9. LIU L, XIA H, WAHLBERG N, BELAK S, BAULE C. Phylogeny, classification and evolutionary insights into pestiviruses. *Virology*, 385 (2): 351-357, 2009.
10. FULTON RW. Vaccines. Editors: In: Goyal SM, Ridpath JA. *Bovine Viral Diarrhoea Virus: Diagnosis, Management and Control*. Blackwell Publishing, Ames, IA, page 209-222, 2005.
11. OLAFSON P, MACCALLUM AD, FOX FH. An apparently new transmissible disease of cattle. *Cornell Veterinarian*, 36: 205-213, 1946.
12. CHILDS T. X disease in cattle - Saskatchewan. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 10: 316-319, 1946.
13. GOENS SD. The evolution of bovine viral diarrhoea: a review. *The Canadian Veterinary Journal*, 43 (12): 946-954, 2002.

14. GILLESPIE JH, COGGINS L, THOMPSON J, BAKER JA. Comparison by neutralization tests of strains of virus isolated from virus diarrhoea and mucosal disease. *Cornell Veterinarian*, 51: 155-159, 1961.
15. PLANT JW, LITTLEJOHNS IE, GARDINER AC, VANTSIS JT, HUCK RA. Immunological relationship between border disease, mucosal disease and swine fever. *Veterinary Record*, 92 (17): 455, 1973.
16. FENNER F. Classification and nomenclature of viruses. Summary of results of meeting of the international committee on taxonomy of viruses in Madrid. *Intervirology. Journal of General Virology*, 31: 463-470, 1976.
17. BRINTON MA, FERNANDEZ AV, DISPOTO JH. The 3' nucleotides of flavivirus genomic RNA from a conserved secondary structure. *Virology*, 153: 113-121, 1986.
18. COLLETT MS, ANDERSON DK, RETZEL E. Comparisons of the pestivirus bovine viral diarrhoea virus with members of the flaviviridae. *Journal of General Virology*, 69: 2637-2643, 1988.
19. PELLERIN C, VAN DEN HURK J, LECOMTE J, TUSSEN P. Identification of a new group of bovine viral diarrhoea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. *Virology*, 203 (2): 260-268, 1994.
20. RIDPATH JF, BOLIN SR, DUBOVI EJ. Segregation of bovine viral diarrhoea virus into genotypes. *Virology*, 205 (1): 66-74, 1994.
21. ICTV, Virus Taxonomy:2012 <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2012>.
22. RIDPATH JF. Bovine viral diarrhoea virus: global status. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 26 (1): 105-21, 2010.
23. RIDPATH JF. Classification and molecular biology. Editors: GOYAL SM, RIDPATH JA, *Bovine Viral Diarrhoea Virus: Diagnosis, Management and Control*, Blackwell Publishing, Ames, IA, page 65-89, 2005.
24. RIDPATH JF. Practical significance of heterogeneity among BVDV strains: impact of biotype and genotype on U.S. control programs. *Preventive Veterinary Medicine*, 72 (1-2): 17-30, 2005.
25. YEŞİLBAĞ K, FÖRSTER C, BANK-WOLF B, YILMAZ Z, ALKAN F, OZKUL A, BURGU I, CEDILLO RS, THIEL HJ, KÖNIG M. Genetic heterogeneity of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates from Turkey: Identification of a new subgroup in BVDV-1. *Veterinary Microbiology*, 130: 258-267, 2008.
26. BEHRENS SE, GRASSMANN CW, THIEL HJ, MEYERS G, TAUTZ N. Characterization of an autonomous subgenomic pestivirus RNA replicon. *Journal of Virology*, 72 (3): 2364-2372, 1998.
27. NEILL JD. Molecular biology of bovine viral diarrhoea virus. *Biologicals*, 41(1): 2-7, 2013.
28. TAUTZ N, MEYERS G, THIEL HJ. Pathogenesis of mucosal disease, a deadly disease of cattle caused by pestivirus. *Clinical and Diagnostic Virology*, 10: 121-127, 1998.
29. SEAGO J, HILTON L, REID E, DOCEUL V, JEYATHEESAN J, MOGANERADJ K, MCCAULEY J, CHARLESTON B, GOODBOURN S. The Npro product of classical swine fever virus and bovine viral diarrhoea virus uses a conserved mechanism

- to target interferon regulatory factor-3. *Journal of General Virology*, 88 (11): 3002-3006, 2007.
30. HILTON L, MOGANERADJ K, ZHANG G, CHEN YH, RANDALL RE, MCCAULEY JW, GOODBOURN S. The NPro product of bovine viral diarrhoea virus inhibits DNA binding by interferon regulatory factor 3 and targets it for proteasomal degradation. *Journal of Virology*, 80 (23): 11723-11732, 2006.
 31. DEREGT D, VAN RIJN PA, WIENS TY, VAN DEN HURK J. Monoclonal antibodies to the E2 protein of a new genotype (type 2) of bovine viral diarrhoea virus define three antigenic domains involved in neutralization. *Virus Research*, 57 (2): 171-181, 1998.
 32. DEREGT D, LOEWEN KG. Bovine viral diarrhoea virus: Biotypes and disease. *The Canadian Veterinary Journal*, 36: 371-378, 1995.
 33. LEE KM, GILLESPIE JH. Propagation of virus diarrhoea virus of cattle in tissue culture. *American Journal of Veterinary Research*, 18 (69): 952-953, 1957.
 34. KÜMMERERA BM, TAUTZB N, BECHERB P, THIELB HJ, MEYERS G. The genetic basis for cytopathogenicity of pestiviruses. *Veterinary Microbiology*, 77 (1-2): 117-128, 2000.
 35. CARMAN S, VAN DREUMEL T, RIDPATH J, HAZLETT M, ALVES D, DUBOVI E, TREMBLAY R, BOLIN S, GODKIN A, ANDERSON N. Severe acute bovine viral diarrhoea in Ontario, 1993-1995. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 10: 27-35, 1998.
 36. CORAPI WV, FRENCH TW, DUBOVI EJ. Severe thrombocytopenia in young calves experimentally infected with noncytopathic bovine viral diarrhoea virus. *Journal of Virology*, 63 (9): 3934-3943, 1989.
 37. FULTON RW, SALIKI JT, CONFER AW, BURGE LJ, D'OFFAY JM, HELMAN RG, BOLIN SR, RIDPATH JF, PAYTON ME. Bovine viral diarrhoea virus cytopathic and noncytopathic biotypes and type 1 and 2 genotypes in diagnostic laboratory accessions: clinical and necropsy samples from cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 12 (1): 33-38, 2000.
 38. FULTON RW, BRIGGS RE, RIDPATH JF, SALIKI JT, CONFER AW, PAYTON ME, DUFF GC, STEP DL, WALKER DA. Transmission of bovine viral diarrhoea virus 1b to susceptible and vaccinated calves by exposure to persistently infected calves. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 69 (3): 161-169, 2005.
 39. RIDPATH JF, BOLIN SR. The genomic sequence of a virulent bovine viral diarrhoea virus (BVDV) from the type 2 genotype: detection of a large genomic insertion in a noncytopathic BVDV. *Virology*, 212 (1): 39-46, 1995.
 40. FLORES EF, GIL LH, BOTTON SA, WEIBLEN R, RIDPATH JF, KREUTZ LC, PILATI C, DRIEMEYER D, MOOJEN V, WENDELSTEIN AC. Clinical, pathological and antigenic aspects of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) type 2 isolates identified in Brazil. *Veterinary Microbiology*, 77 (1-2): 175-183, 2000.
 41. HAMERS C, COUVREUR B, DEHAN P, LETELLIER C, LEWALLE P, PASTORET PP, KERKHOF S. Differences in experimental virulence of bovine viral diarrhoea virus strains isolated from haemorrhagic syndromes. *The Veterinary Journal*, 160 (3): 250-258, 2000.

42. RIDPATH JF , FREY M, LANDGRAF JG. Phylogenetic, antigenic and clinical characterization of type 2 BVDV from North America. *Veterinary Microbiology*, 77 (1–2): 145–155, 2000.
43. BACHOFEN C, STALDER H, BRAUN U, HILBE M, EHRENSPERGER F, PETERHANS E. Co-existence of genetically and antigenically diverse bovine viral diarrhoea viruses in an endemic situation. *Veterinary Microbiology*, 131: 93–102, 2008.
44. DOMINGO E, MARTÍNEZ-SALAS E, SOBRINO F, DE LA TORRE JC, PORTELA A, ORTÍN J, LÓPEZ-GALINDEZ C, PÉREZ-BREÑA P, VILLANUEVA N, NÁJERA R, VANDEPOL S, STEINHAEUER D, DEPOLO N, HOLLAND J. The quasispecies (extremely heterogeneous) nature of viral RNA genome populations: biological relevance. *Gene*, 40 (1): 1-8, 1985.
45. BECHER P, ORLÍCH M, KÖNIG M, THIEL HJ. Nonhomologous RNA recombination in bovine viral diarrhoea virus: molecular characterization of a variety of subgenomic RNAs isolated during an outbreak of fatal mucosal disease. *Journal of Virology*, 73 (7): 5646-5653, 1999.
46. HAMERS C, DEHAN P, COUVREUR B, LETELLIER C, KERKHOFS P, PASTORET PP. Diversity among bovine pestiviruses. *The Veterinary Journal*, 161: 112-122, 2001.
47. VILCEK S, PATON DJ, DURKOVIC B, STROJNY L, IBATA G, MOUSSA A, LOITSCH A, ROSSMANITH W, VEGA S, SCICLUNA MT, PAIFI V. Bovine viral diarrhoea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups. *Archives of Virology*, 146 (1): 99-115, 2001.
48. BOLIN SR, RIDPATH JF. Prevalence of bovine viral diarrhoea virus genotypes and antibody against those viral genotypes in fetal bovine serum. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 10 (2): 135-139, 1998.
49. NAGAI M, HAYASHI M, ITOU M, FUKUTOMI T, AKASHI H, KIDA H, SAKODA Y. Identification of new genetic subtypes of bovine viral diarrhoea virus genotype 1 isolated in Japan. *Virus Genes*, 36(1): 135-139, 2008.
50. JACKOVA A, NOVACKOVA M, PELLETIER C, AUDEVAL C, GUENEAU E, HAFFAR A, PETIT E, REHBY L, VILCEK S. The extended genetic diversity of BVDV-1: typing of BVDV isolates from France. *Veterinary Research Communications*, 32 (1): 7-11, 2008.
51. XUE F, ZHU YM, LI J, ZHU LC, REN XG, FENG JK, SHI HF, GAO YR. Genotyping of bovine viral diarrhoea viruses from cattle in China between 2005 and 2008. *Veterinary Microbiology*, 143 (2–4): 379–383, 2010.
52. GAO S, LUO J, DU J, LANG Y, CONG G, SHAO J, LIN T, ZHAO F, BELAK S, LIU L, CHANG H, YIN H. Serological and molecular evidence for natural infection of Bactrian camels with multiple subgenotypes of bovine viral diarrhoea virus in Western China. *Vet Microbiology*, 163(1-2):172-6, 2013.
53. YESİLBAG K, FORSTER C, OZYIGIT MO, ALPAY G, TUNCER P, THIEL HJ, KONING M. Characterisation of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates from an outbreak with haemorrhagic enteritis and severe pneumonia. *Vet Microbiology*, 169 (1-2): 42-9, 2014.
54. GIANGASPERO M, HARASAWA R, WEBER L, BELLOLI A. Taxonomic and epidemiological aspect of the bovine viral diarrhoea virus 2 through the observation of

- the secondary structures in the 5' genomic untranslated region. *Veterinaria Italiana*, 44 (2): 319-345, 2008.
55. FULTON RW, RIDPATH JF, CONFER AW, SALIKI JT, BURGE LJ, PAYTON ME. Bovine viral diarrhoea virus antigenic diversity: impact on disease and vaccination programmes, 31 (2): 89-95, 2003.
 56. CORAPI WV, DONIS RO, DUBOVI EJ. Characterization of a panel of monoclonal antibodies and their use in the study of the antigenic diversity of bovine viral diarrhoea virus. *American Journal of Veterinary Research*, 51 (9): 1388-1394, 1990.
 57. BAULE C, KULCSAR G, BELAK K, ET AL. Pathogenesis of primary respiratory disease induced by isolates from a new genetic cluster of bovine viral diarrhoea virus type 1. *Journal of Clinical Microbiology*, 39: 146–153, 2001.
 58. FULTON RW, RIDPATH JF, SALIKI JT, BRIGGS RE, CONFER AW, BURGE LJ, PURDY CW, LOAN RW, DUFF GC, PAYTON ME. Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) 1b: predominant BVDV subtype in calves with respiratory disease. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 66 (3): 181-190, 2002.
 59. EVERMANN JF, RIDPATH JF. Clinical and epidemiologic observations of bovine viral diarrhoea virus in the northwestern United States. *Veterinary Microbiology*, 89 (2-3): 129-139, 2002.
 60. COUVREUR B, LETELLIER C, COLLARD A, QUENON P, DEHAN P, HAMERS C, PASTORET PP, KERKHOF P. Genetic and antigenic variability in bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates from Belgium. *Virus Research*, 85 (1): 17-28, 2002.
 61. DEAN HJ, LEYH R. Cross-protective efficacy of a bovine viral diarrhoea virus (BVDV) type 1 vaccine against BVDV type 2 challenge. *Vaccine*, 17 (9-10): 1117-1124, 1999.
 62. HOUE H. Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infections. *Veterinary Microbiology*, 64: 89-107, 1999.
 63. HOUE H. Epidemiology of bovine viral diarrhoea virus. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 11: 521-547, 1995.
 64. TRÅVÉN M, ALENIUS S, FOSSUM C, LARSSON B. Primary bovine viral diarrhoea virus infection in calves following direct contact with a persistently viraemic calf. *Zentralblatt für Veterinärmedizin B*, 38 (6): 453-62, 1991.
 65. NISKANEN R, LINDBERG A, LARSSON B, ALENIUS S. Lack of virus transmission from bovine viral diarrhoea virus infected calves to susceptible peers. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 41 (1): 93-99, 2000.
 66. NISKANEN R, LINDBERG A. Transmission of bovine viral diarrhoea virus by unhygienic vaccination procedures, ambient air, and from contaminated pens. *The Veterinary Journal*, 165 (2): 125-130, 2003.
 67. NISKANEN R, ALENIUS S, BELÁK K, BAULE C, BELÁK S, VOGES H, GUSTAFSSON H. Insemination of susceptible heifers with semen from a non-viraemic bull with persistent bovine virus diarrhoea virus infection localized in the testes. *Reproduction in Domestic Animals*, 37 (3): 171-175, 2002.

68. WITTUM TE, GROTELUESCHEN DM, BROCK KV, KVASNICKA WG, FLOYD JG, KELLING CL, ODDE KG. Persistent bovine viral diarrhoea virus infection in US beef herds. *Preventive Veterinary Medicine*, 49: 83-94, 2001.
69. PASSLER T, WALZ PH. Bovine viral diarrhoea virus infections in heterologous species. *Animal Health Research Reviews*, 11 (2):191-205, 2010.
70. FISCHER S, WEILAND E, FRÖLICH K. Characterization of a bovine viral diarrhoea virus isolated from roe deer in Germany. *Journal of Wildlife Diseases*, 34 (1): 47-55, 1998.
71. YEŞİLBAĞ K, GÜNGÖR B. Antibody prevalence against respiratory viruses in sheep and goats in north-western Turkey. *Tropical Animal Health and Production*, 41 (4): 421-425, 2009.
72. TAULESCU M, TĂBĂRAN F, GAL A, BOLFA P, CUC C, NAGY A, BORZA G, CATOI C. Bovine viral diarrhoea (BVD) in a european bison (*Bison Bonasus*) – anatomopathological findings and diagnosis. *Veterinary Medicine*, 68(1): 402, 2011
73. BURGU İ, ÖZKUL A. Detection by culturalisolation of bovine virus diarrhoea (BVD) virus following field infections in cattle and their fetuses in Turkey. *Dtsch Tierarztl Wochenschr*, 100 (9): 361-363, 1993
74. BURGU İ, ÖZTÜRK F, AKÇA Y, TOKER A, FREY HR, LIESS B. Türkiye’de koyunlarda Bovine Viral Diarrhoea (BVD) enfeksiyonlarının varlığı ve önemi. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 37 (1): 121-127, 1990.
75. ALKAN F, ÖZKUL A, KAROĞLU MT, BİLGE S, AKÇA Y, BURGU İ, YEŞİLBAĞ K, OĞUZOĞLU TÇ. Sığırlarda viral nedenli solunum sistemi enfeksiyonlarının seroepidemiolojisi, *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 44: 1-8, 1997.
76. BURGU İ, ALKAN F, YEŞİLBAĞ K. Türkiye’de sığırlarda persiste bvd virus enfeksiyonu, *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 46: 169-177, 1999.
77. BURGU İ, ALKAN F, ÖZKUL A, YEŞİLBAĞ K, KARAOĞLU T, GÜNGÖR B. Türkiye’de süt sığırcılığı işletmelerinde BVDV enfeksiyonunun epidemiyolojisi ve kontrolü. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 50: 127–133, 2003.
78. ALKAN F, BURGU İ. Investigation on the incidence of bovine viral diarrhoea virus in calves born with encephalopathy in Turkey. *Deutsche tierärztliche Wochenschrift*, 100 (3): 107-109, 1993.
79. ÇABALAR M, KARAOĞLU T. Sığırlarda bovine viral diarrhoea (BVD) virus enfeksiyonuna karşı antikor varlığının araştırılmasında nötralizasyon immunoperoksidaz (NPLA) ve serum nötralizasyon (SN) testlerinin karşılaştırılması. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 46: 249-255, 1999.
80. DUMAN R, YAVRU S, KALE M, AVCI O. Seroprevalence of viral upper respiratory infections in dairy cattle, *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 15 (4): 539-542, 2009.
81. ŞİMŞEK A, ÖZTÜRK F. Klinik olarak sağlıklı sığır sürülerinde persiste bovine viral diarrhoea virus enfeksiyonlarının araştırılması ve epizootiyolojik önemi. *Veteriner Bilimleri Dergisi*, 13 (2): 113-119, 1997.
82. BULUT O, YAVRU S, YAPKIÇ O, KALE M, AVCI O, HASIRCIOĞLU S. Sütçü sığırların bovine herpesvirus 1 (bhv-1) ve bovine viral diarrhoea virus (bvdv)

- enfeksiyonları yönünden elisa ile araştırılması. *Hayvancılık Araştırma Dergisi*, 16 (2): 18–24, 2006.
83. RIDPATH JF, FULTON RW, KIRKLAND PD, NEIL JD. Prevalence and antigenic differences observed between bovine viral diarrhoea virus subgenotypes isolated from cattle in Australia and feedlots in the southwestern United States. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 22: 184–191, 2010.
 84. OGUZOGLU TC, MUZ D, YILMAZ V, ALKAN F, AKÇA Y, BURGU İ. Molecular characterization of bovine virus diarrhoea viruses species 2 (BVDV-2) from cattle in Turkey. *Tropical Animal Health and Production*, 42 (6): 1175-1180, 2010.
 85. YILMAZ H, ALTAN E, RIDPATH J, TURAN N. Genetic diversity and frequency of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) detected in cattle in Turkey. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 35: 411–416, 2012.
 86. OĞUZOĞLU TC, MUZ D, YILMAZ V, TİMURKAN MÖ, ALKAN F, AKÇA Y, BURGU İ. Molecular characteristics of bovine virus diarrhoea virus 1 isolates from Turkey: approaches for an eradication programme. *Transboundary and Emerging Diseases*, 59 (4): 303-310, 2012.
 87. TAJIMA M, DUBOVI EJ. Genetic and clinical analyses of bovine viral diarrhoea virus isolates from dairy operations in the United States of America. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 17: 10–15, 2005.
 88. VILCEK S, DURKOVIC B, KOLESÁROVÁ M, GREISER-WILKE I, PATON D. Genetic diversity of international bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates: identification of a new BVDV-1 genetic group. *Veterinary Research*, 35: 609-615, 2004.
 89. CORTEZ A, HEINEMANN MB, DE CASTRO AM MG, SOARES RM, PINTO AMV, ALFIERI AA, FLORES EF, LEITE RC, RICHTZENHAIN LJ. Genetic characterization of Brazilian bovine viral diarrhoea virus isolates by partial nucleotide sequencing of the 5'-UTR region. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 26 (4): 211-216, 2006.
 90. STÅHL K, BENÍTO A, FELMER R, ZUÑIGA J, REINHARDT G, RIVERA H, BAULE C, MORENO-LÓPE J. Genetic diversity of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) from Peru and Chile. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 29 (1): 41-44, 2009.
 91. MAHONY TJ, MCCARTHY FM, GRAVEL JL, CORNEY B, YOUNG PL, VILCEK S. Genetic analysis of bovine viral diarrhoea viruses from Australia. *Veterinary Microbiology*, 106 (1–2): 1–6, 2005.
 92. THABTI F, BAKKALI KASSIMI L, M'ZAH A, BEN ROMDANE S, RUSSO P, BEN SAID MS, HAMMAMI S, PEPIN M. First detection and genetic characterization of bovine viral diarrhoea viruses (BVDV) types 1 and 2 in Tunisia. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 156 (8-9):419-422, 2005.
 93. ZHONG F, HUANG NLX, GUO Y, CHEN H, WANG X, SHI C, ZHANG X. Genetic typing and epidemiologic observation of bovine viral diarrhoea virus in Western China. *Virus Genes*, 42 (2): 204-207, 2011.
 94. MISHRA N, PATTNAIK B, VILCEK S, PATIL SS, JAIN P, SWAMY N, BHATIA S, PRADHAN HK. Genetic typing of bovine viral diarrhoea virus isolates from India. *Veterinary Microbiology*, 104: 207–212, 2004.

95. POGRANICHNIY RM, SCHNUR ME, RAIZMAN EA, MURPHY DA, NEGRON M, THACKER HL. Isolation and genetic analysis of bovine viral diarrhoea virus from infected cattle in Indiana. *Veterinary Medicine International*, 2011: 1-6, 2011.
96. MATSUNO K, SAKODA Y, KAMEYAMA K, TAMAI K, ITO A, KIDA H. Genetic and pathobiological characterization of bovine viral diarrhoea viruses recently isolated from cattle in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 68 (5): 515-520, 2007.
97. TAJIMA M. Bovine viral diarrhoea virus 1 is classified into different subgenotypes depending on the analyzed region within the viral genome. *Veterinary Microbiology*, 99 (2): 131–138, 2004.
98. YAMAMOTO T, KOZASA T, AOKI H, SEKIGUCHI H, MORINO S, NAKAMURA S. Genomic analyses of bovine viral diarrhoea viruses isolated from cattle imported into Japan between 1991 and 2005. *Veterinary Microbiology*, 127, (3–4): 386–391, 2008.
99. OEM JK, HYUN BH, CHA SH, LEE KK, KIM SH, KIM HR, PARK CK, JOO YS. Phylogenetic analysis and characterization of Korean bovine viral diarrhoea viruses. *Veterinary Microbiology*, 139 (3–4): 356–360, 2009.
100. YANG DK, KIM BH, KWEON CH, PARK JK, KIM HY, SO BJ, KIM IJ. Genetic typing of bovine viral diarrhoea viruses (BVDV) circulating in Korea. *Journal of Bacteriology and Virology*, 37 (3): 147-152, 2007.
101. TAJIMA M, FREY HR, YAMATO O, MAEDE Y, MOENNIG V, SCHOLZ H, GREISER-WILKE I. Prevalence of genotypes 1 and 2 of bovine viral diarrhoea virus in Lower Saxony, Germany. *Virus Research*, 76: 31–42, 2001.
102. HORNBERG A, FERNÁNDEZ SR, VOGL C, VILCEK S, MATT M, FINK M, KÖFER J, SCHÖPF K. Genetic diversity of pestivirus isolates in cattle from western Austria. *Veterinary Microbiology*, 135 (3–4): 205–213, 2009.
103. VILCEK S, GREISER-WILKE I, DURKOVIC B, OBRITZHAUSER W, DEUTZ A, KÖFER J. Genetic diversity of recent bovine viral diarrhoea viruses from the southeast of Austria (Styria). *Veterinary Microbiology*, 91: 285–291, 2003.
104. ROBESOVA B, KOVARCIK K, VILCEK S. Genotyping of bovine viral diarrhoea virus isolates from the Czech Republic. *Veterinarni Medicina*, 54, 2009 (9): 393–398.
105. UTTENTHAL Å, STADEJEK T, NYLIN B. Genetic diversity of bovine viral diarrhoea viruses (BVDV) in Denmark during a 10-year eradication period. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, 113(7-8): 536–541, 2005.
106. STRONG R, ERRINGTON J, COOK R, ROSS-SMITH N, WAKELEY P, STEINBACH F. Increased phylogenetic diversity of bovine viral diarrhoea virus type 1 isolates in England and Wales since 2001. *Veterinary Microbiology*, 162 (2-4): 315-320, 2013.
107. VILCEK S, DREW TW, MCGOLDRICK A, PATON DJ. Genetic typing of bovine pestiviruses from England and Wales. *Veterinary Microbiology*, 69 (4): 227–237, 1999.
108. GRAHAM DA, LARENA IEMC, BRITTAÏNA D, O'REILLY PJ. Genetic typing of ruminant pestivirus strains from Northern Ireland and the Republic of Ireland. *Research in Veterinary Science*. 71 (2): 127–134, 2001.

109. ARIAS P, ORLICH M, PRIETO M, CEDILLO ROSALES S, THIEL HJ, ALVAREZ M, BECHER P. Genetic heterogeneity of bovine viral diarrhoea viruses from Spain. *Veterinary Microbiology*, 96: 327–336, 2003.
110. HURTADO A, GARCIA-PEREZ AL, ADURIZ G, JUSTE RA. Genetic diversity of ruminant pestiviruses from Spain. *Virus Research*, 92 (1): 67–73, 2003.
111. STÅHL K, KAMPA J, BAULE C, ISAKSSON M, MORENO-LOPEZ J, BELAK S, ALENIUS S, LINDBERG A. Molecular epidemiology of bovine viral diarrhoea during the final phase of the Swedish BVD-eradication programme. *Preventive Veterinary Medicine*, 72 (1-2):103-108,2005.
112. STALDER HP, MEIER PH, PFAFFEN G, WAGECK-CANAL C, RÜFENACHT J, SCHALLER P, BACHOFEN C, MARTI S, VOGT HR, PETERHANS E. Genetic heterogeneity of pestiviruses of ruminants in Switzerland. *Preventive Veterinary Medicine*, 72: 37–41, 2005.
113. FALCONE E, CORDIOLI P, TARANTINO M, MUSCILLO M, ROSA GL, TOLLIS M. Genetic heterogeneity of bovine viral diarrhoea virus In Italy. *Veterinary Research Communications*, 27(6): 485-494, 2003.
114. LUZZAGO C, BANDI C, BRONZO V, RUFFO G, ZECCONI A. Distribution pattern of bovine viral diarrhoea virus strains in intensive cattle herds in Italy. *Veterinary Microbiology*, 83 (3): 265–274, 2001.
115. GIAMMARIOLI M, PELLEGRINI C, CASCIARI C, ROSSI E, MIA GM. Genetic diversity of bovine viral diarrhoea virus 1: Italian isolates clustered in at least seven subgenotypes. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 20: 783–788, 2008.
116. BARROS SC, RAMOS F, PAUPÉRIO S, THOMPSON G, FEVEREIRO M. Phylogenetic analysis of Portuguese bovine viral diarrhoea virus. *Virus Research*, 118 (1–2): 192–195, 2006.
117. TOPLAK I, SANDVIB T, BARLIČ-MAGANJA D, GROM J, PATON DJ. Genetic typing of bovine viral diarrhoea virus: most Slovenian isolates are of genotypes 1d and 1f. *Veterinary Microbiology*, 99 (3–4): 175–185, 2004.
118. SARIKAYA B, AZKUR AK, GAZYAGCI S, ASLAN ME. Genetic Variability of Bovine Viral Diarrhoea Virus in the 5'-UTR in the Central Anatolia of Turkey. *Acta Scientiae Veterinariae*, 40 (1): 1013, 2012.
119. BROWNLIE J. The pathways for bovine virus diarrhoea virus biotypes in the pathogenesis of disease. *Archives of Virology*, 3: 79-96,1991.
120. KELLING CL. Evolution of bovine viral diarrhoea virus vaccines. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 20 (1): 115-219, 2004.
121. LIEBLER-TENORIO EM, RIDPATH JF, NEILL JD. Distribution of viral antigen and development of lesions after experimental infection of calves with a BVDV 2 strain of low virulence. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 15 (3): 221-232, 2003.
122. BROWNLIE J, CLARKE MC, HOWARD CJ, POCOCK DH. Pathogenesis and epidemiology of bovine virus diarrhoea virus infection of cattle. *Annals of Veterinary Research*, 18: 157-166, 1987.
123. KAPIL S, WALZ P, WILKERSON M, MINOCHA H. Immunity and immunosuppression. Editors: GOYAL SM, RIDPATH JA. *Bovine Viral Diarrhoea*

- Virus: Diagnosis, Management and Control, Blackwell Publishing, Ames, IA, pages 157-170, 2005.
124. MARSHALL DJ, MOXLEY RA, KELLING CL. Distribution of virus and viral antigen in specific pathogen-free calves following inoculation with noncytopathic bovine viral diarrhea virus. *Veterinary Pathology*, 33 (3): 311-318, 1996.
 125. ELLIS JA, WEST KH, CORTESE VS, MYERS SL, CARMAN S, MARTIN KM, HAINES DM. Lesions and distribution of viral antigen following an experimental infection of young seronegative calves with virulent bovine virus diarrhea virus-type II. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 62 (3): 161–169, 1998.
 126. ARENHART S, BAUERMANN FV, VOGEL FSF, WEIBLEN R, FLORES EF. Evidence of mixed persistent infections in calves born to cows challenged with a pool of bovine viral diarrhea virus isolates. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 30 (12): 1053-1057, 2010.
 127. GROOMS DL, BROCK KV, PATE JL, DAY ML. Changes in ovarian follicles following acute infection with bovine viral diarrhea virus. *Theriogenology*, 49 (3): 595-605, 1998.
 128. GROOMS DL, BROCK KV, WARD LA. Detection of cytopathic bovine viral diarrhea virus in the ovaries of cattle following immunization with a modified live bovine viral diarrhea virus vaccine. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 10 (2):130-134,1998.
 129. VAN ROOSE G, NAUWYNCK H, VAN SOOM A, VAN OP DEN BOSCH E, DE KRUIF A. Replication of cytopathic and noncytopathic bovine viral diarrhea virus in zona-free and zona-intact in vitro-produced bovine embryos and the effect on embryo quality. *Biology of Reproduction*, 58 (3): 857-866, 1998.
 130. MCGOWAN MR, KAFI M, KIRKLAND PD, KELLY R, BIELEFELDT-OHMANN H, OCCHIO MD, JILLELLA D. Studies of the pathogenesis of bovine pestivirus-induced ovarian dysfunction in superovulated dairy cattle. *Theriogenology*, 59 (3-4): 1051-1066, 2003.
 131. GIVENS MD, MARLEY MS. Infectious causes of embryonic and fetal mortality. *Theriogenology*, 70 (3): 270-285, 2008.
 132. GROOMS DL. Reproductive consequences of infection with bovine viral diarrhea virus. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 20 (1): 5-19, 2004.
 133. BASZLER TV, EVERMANN JF, KAYLOR PS, BYINGTON TC, DILBECK PM. Diagnosis of naturally occurring bovine viral diarrhea virus infections in ruminants using monoclonal antibody-based immunohistochemistry. *Veterinary Pathology*, 32 (6): 609-618, 1995.
 134. LAMM CG, BROADDUS CC, HOLYOAK GR. Distribution of bovine viral diarrhea virus antigen in aborted fetal and neonatal goats by immunohistochemistry. *Veterinary Pathology*, 46: 54–58, 2009.
 135. TENORIO-LIEBLER EM. Pathogenesis. Editors: GOYAL SM, RĪDPATH JA. *Bovine Viral Diarrhea Virus: Diagnosis, Management and Control*. Blackwell Publishing, Ames, IA, page 121-143, 2005.

136. MOENNIG V, LIESS B. Pathogenesis of intrauterine infections with bovine viral diarrhoea virus. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 11 (3): 477-87, 1995.
137. ORBAN S, LIESS B, HAFEZ SM, FREY HR, BLINDOW H, SASSE-PATZER B. Studies on transplacental transmissibility of a bovine viral diarrhoea (BVD) vaccine virus. *Zentralblatt für Veterinar Medizin Reihe B*, 30: 619-634, 1983.
138. RADOSTITS OM, LITTLEJOHNS IR. New concepts in the pathogenesis, diagnosis and control of diseases caused by the bovine viral diarrhoea virus. *The Canadian Veterinary Journal*, 29 (6): 513-528, 1988.
139. CHARLESTON B, FRAY MD, BAIGENT S, CARR BV, MORRISON WI. Establishment of persistent infection with non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus in cattle is associated with a failure to induce type I interferon. *Journal of General Virology*, 82 (8): 1893-1897, 2001.
140. KELLING CL, STINE LC, RUMP KK, PARKER RE, KENNEDY JE, STONE RT, ROSS GS. Investigation of bovine viral diarrhoea virus infections in a range beef cattle herd. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 197 (5): 589-593, 1990.
141. STOKSTAD M, LOKEN T. Pestivirus in cattle: experimentally induced persistent infection in calves. *Journal of Veterinary Medicine Series B-Infectious Diseases and Veterinary Public Health*, 49 (10): 494-501, 2002.
142. AXTHEM MK, LEIPOLD HW, JAYASEKARA UM, PHILLIPS RM. Congenital microhydraencephalus in cattle. *The Cornell Veterinarian*, 71: 164-174, 1981.
143. OHMAN HB. An oculo-cerebellar syndrome caused by congenital bovine viral diarrhoea virus-infection. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 25: 36-49, 1984.
144. BROWNLIE J. The pathogenesis of bovine virus diarrhoea virus infections. *Revue Scientifique et Technique Office of International Epizootics*, 9 (1): 43-59, 1990.
145. SARRAZIN S, VELDHUIS A, MÉROC E, VANGEEL I, LAUREYNS J, DEWULF J, CAIJ AB, PIEPERS S, HOOYBERGHS J, RIBBENS S, VAN DER STEDE Y. Serological and virological BVDV prevalence and risk factor analysis for herds to be BVDV seropositive in Belgian cattle herds. *Preventive Veterinary Medicine*, 108(1), 28-37, 2013.
146. MOERMAN A, STRAVER PJ, DE JONG MC, QUAK J, BAANVINGER T, VAN OIRSCHOT JT. Clinical consequences of a bovine virus diarrhoea virus infection in a dairy herd: a longitudinal study. *Veterinary Quarterly*, 16 (2): 115-119, 1994.
147. EVERMANN JF, BARRINGTON GM. Clinical Features. Editors: GOYAL SM, RIDPATH JA, *Bovine Viral Diarrhoea Virus: Diagnosis, Management and Control*, Blackwell Publishing, Ames, IA, page 105-121, 2005.
148. ODEON AC, CL KELLING, MARSHAL DJ, ESTELA ES, DUBOVI EJ, DONIS RO. Experimental infection of calves with bovine viral diarrhoea virus genotype II (NY-93) *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 11: 221-228, 1999.
149. RIDPATH J. The contribution of infections with bovine viral diarrhoea viruses to bovine respiratory disease. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 26 (2): 335-348, 2010.

150. BRODERSEN BW, KELLING CL. Effect of concurrent experimentally induced bovine respiratory syncytial virus and bovine viral diarrhoea virus infection on respiratory tract and enteric diseases in calves. *American Journal of Veterinary Research*, 59 (11): 1423-1430, 1998.
151. MARSOLOIS G, ASSAF R, MONTPETIT C, MAROIS P. Diagnosis of viral agents associated with neonatal calf diarrhoea. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 42: 168-171, 1978.
152. KELLING CL, STEFFEN DJ, COOPER VL, HIGUCHI DS, ESKRIDGE KM. Effect of infection with bovine viral diarrhoea virus alone, bovine rotavirus alone, or concurrent infection with both on enteric disease in gnotobiotic neonatal calves. *American Journal of Veterinary Research*, 63 (8): 1179-1186, 2002.
153. KALE M, YAVRU S, ATA A, KOCAMÜFTÜOĞLU M, YAPICI O, HASIRCIOĞLU S. Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection in relation to fertility in heifers. *Journal of Veterinary Medical Science*, 73 (3): 331-336, 2011.
154. GIVENS MD, HEATH AM, BROCK KV, BRODERSEN BW, CARSON RL, STRINGFELLOW DA. Detection of bovine viral diarrhoea virus in semen obtained after inoculation of seronegative postpubertal bulls. *American Journal of Veterinary Research*, 64 (4): 428-434, 2003.
155. GONZÁLEZ ALTAMIRANDA EA, KAISER GG, WEBER N, LEUNDA MR, PECORA A, MALACARI DA, MORÁN O, CAMPERO CM, ODEÓN AC. Clinical and reproductive consequences of using BVDV-contaminated semen in artificial insemination in a beef herd in Argentina. *Animal Reproduction Science*, 133 (3-4): 146-152, 2012.
156. DUFFELL SJ, SHARP MW, WINKLER CE, TERLECKI S, RICHARDSON C, DONE JT, ROEDER PL, HEBERT CN. Bovine virus diarrhoea-mucosal disease virus-induced fetopathy in cattle: Efficacy of prophylactic maternal pre-exposure. *Veterinary Record*, 114: 558-561, 1984.
157. RÜFENACHT J, SCHALLER P, AUDIGE L, KNUTTI B, KÜPFER U, PETERHANS E. The effect of infection with bovine viral diarrhoea virus on the fertility of Swiss dairy cattle. *Theriogenology*, 56: 199-210, 2001.
158. FRAY MD, PATON DJ, ALENIUS S. The effects of bovine viral diarrhoea virus on cattle reproduction in relation to disease control. *Animal Reproduction Science*, 60: 615-627, 2000.
159. BLANCHARD PC, RIDPATH JF, WALKER JB, HIETALA SK. An outbreak of late-term abortions, premature births, and congenital deformities associated with a bovine viral diarrhoea virus 1 subtype b that induces thrombocytopenia. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 22 (1): 128-131, 2010.
160. FRITZEMEIER J, HAAS L, LIEBLER E, MOENNIG V, GREISER-WILKE I. The development of early vs. late onset mucosal disease is a consequence of two different pathogenic mechanisms. *Archives of Virology*, 142: 1335-1350, 1997.
161. LIEBLER-TENORIO EM, GREISER-WILKE I, POHLENZ JF. Organ and tissue distribution of the antigen of the cytopathogenic bovine virus diarrhoea virus in the early and advanced phase of experimental mucosal disease. *Archives of Virology*, 142: 1613-1634, 1997.

162. LARSON RL, BRODERSEN BW, GROTELUESCHEN DM, HUNSAKER BD, BURDETT W, BROCK KV, FULTON RW, GOEHL DR, SPROWLS RW, KENNEDY JA, LONERAGAN GH, DARGATZ DA. Considerations for bovine viral diarrhea (BVD) testing. *The Bovine Practitioner*, 39 (2): 96-100, 2005.
163. HOUE H, LINDBERG A, MOENNIG V. Test strategies in bovine viral diarrhea virus control and eradication campaigns in Europe. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 18 (5): 427-436, 2006.
164. EDMONDSON MA, GIVENS MD., WALZ PH Comparison of tests for detection of bovine viral diarrhea virus in diagnostic samples. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 19: 376–381, 2007.
165. GRAHAM DA, GERMAN A, MAWHINNEY K, GOODALL EA. Antibody responses of naive cattle to two inactivated bovine viral diarrhoea virus vaccines, measured by indirect and blocking ELISAs and virus neutralisation. *Veterinary Record*, 152: 795-800, 2003.
166. ÖZKUL A, YEŞİLBAĞ K, BURGU İ. Comparison of four diagnostic techniques for detecting bovine virus diarrhoea virus (BVDV) in buffy coat samples after long-term storage. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 26: 1043-1048, 2002.
167. CAY B, CHAPPUIS G, COULIBALY C, DINTER Z, EDWARDS S, GREISER-WILKE I, GUNN M, HAVE P, HESS G, JUNTTI N, LIESS B, MATEA A, MCHUGH P, MOENNIG V, NETTLETON P, WENSVOORT G. Comparative analysis of monoclonal antibodies against pestiviruses: report of an international workshop. *Veterinary Microbiology*. 20 (2): 123-129, 1989.
168. YEŞİLBAĞ K, ÖZKUL A, BURGU İ. Farklı laboratuvarlarda aynı adla kullanılan BVDV suşları arasında antijenik farklılıklar. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 411: 7-11, 2001.
169. GRIPSHOVER EM, GIVENS MD, RIDPATH JF, BROCK KV, WHITLEY EM, SARTIN EA. Variation in Erns viral glycoprotein associated with failure of immunohistochemistry and commercial antigen capture ELISA to detect a field strain of bovine viral diarrhea virus. *Veterinary Microbiology*, 125: 11–21, 2007.
170. YEŞİLBAĞ K., The use of monoclonal antibodies in the field of pestivirolgy. Editor: Simmons MA. *Trends in monoclonal antibody research*, Nova Science Publisher, New York, page 91-109, 2005.
171. GOYAL SM, BOULJIHAD M, HAUGERUD S, RIDPATH JF. Isolation of bovine viral diarrhea virus from an alpaca. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 14: 523–525, 2002.
172. SCHERER CF, FLORES EF, WEIBLEN R, CARON L, IRIGOYEN LF, NEVES JP, MACIEL MN. Experimental infection of pregnant ewes with bovine viral diarrhea virus type-2 (BVDV-2): effects on the pregnancy and fetus. *Veterinary Microbiology*, 79 (4): 285-299, 2001.
173. PASSLER T, WALZ HL, DITCHKOFF SS, VAN SANTENX E, BROCK KV, WALZ PH. Distribution of bovine viral diarrhoea virus antigen in persistently infected white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *Journal of Comparative Pathology*, 147: 533-541, 2012.

174. FERNELIUS AL, AMTOWER WC, LAMBERT G, MCCLURKIN AW, MATTHEWS PJ. Bovine viral diarrhoea virus in swine: characteristics of virus recovered from naturally and experimentally infected swine. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 37(1): 13-20, 1973.
175. VALLE PS, SKJERVE E, MARTIN SW, LARSEN RB, OSTERAS O, NYBERG O. Ten years of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) control in Norway: a cost-benefit analysis. *Preventive Veterinary Medicine*, 72 (1-2): 189-207, 2005.
176. GREISER-WILKE I, GRUMMER B, MOENNIG V. Bovine viral diarrhoea eradication and control programmes in Europe. *Biologicals*, 31 (2): 113-118, 2003.
177. SANDVIK T. Progress of control and prevention programs for bovine viral diarrhoea virus in Europe. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 20 (1): 151-169, 2004.
178. KALAYCIOGLU AT. Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) diversity and vaccination. *Veterinary Quarterly*, 29 (2): 60-67, 2007.
179. ELLIS J, WEST K, CORTESE V, KONOBY C, WEIGEL D. Effect of maternal antibodies on induction and persistence of vaccine-induced immune responses against bovine viral diarrhoea virus type II in young calves. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 219 (3): 351-356, 2001.
180. FULTON RW, CONFER AW, BURGE LJ, PERINO LJ, DOFFAY JM, PAYTON ME, MOCK RE. Antibody responses by cattle after vaccination with commercial viral vaccines containing bovine herpesvirus-1, bovine viral diarrhoea virus, parainfluenza-3 virus, and bovine respiratory syncytial virus immunogens and subsequent revaccination at day 140. *Vaccine*, 13 (8): 725-733, 1995,.
181. FERNÁNDEZ F, COSTANTINI V, BARRANDEGUY M, PARREÑO V. Evaluation of experimental vaccines for bovine viral diarrhoea in bovines, ovines and guinea pigs. *Revista Argentina de Microbiología*, 41: 86-91, 2009.
182. GROOMS DL, BOLÍN SR, COE PH, BORGES RJ, COUTU CE. Fetal protection against continual exposure to bovine viral diarrhoea virus following administration of a vaccine containing an inactivated bovine viral diarrhoea virus fraction to cattle. *American Journal of Veterinary Research*, 68 (12): 1417-1422, 2007.
183. FAIRBANKS KK, RINEHART CL, OHNESORGE WC, LOUGHIN MM, CHASE CC. Evaluation of fetal protection against experimental infection with type 1 and type 2 bovine viral diarrhoea virus after vaccination of the dam with a bivalent modified-live virus vaccine. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 225 (12): 1898-1904, 2004.
184. YEŞİLBAĞ K, BURGU İ. Antigenic diversity of bovine viral diarrhoea viruses (BVDV) isolated in Turkey. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 30: 571-576, 2006.
185. CEDILLO ROSALES S. Charakterisierung ruminanter pestiviren mittels polymerasekettenreaktion und monoklonaler antikörper. Justus Liebig University Giessen, GER [Dissertation], 2004.
186. SPILKI FR, ALMEIDA RS, ARNS CW. Antibody responses in mice after immunization with inactivated bovine respiratory syncytial virus using different adjuvants. *Ciência Rural*, 40 (11): 2332-2337, 2010.

187. PATON DJ. Pestivirus diversity. *Journal of Comparative Pathology*, 112: 215-236, 1995.
188. NAGAI M, HAYASHI M, SUGITA S, SAKODA Y, MORI M, MURAKAMI T, OZAWA T, YAMADA N, AKASHI H. Phylogenetic analysis of bovine viral diarrhoea viruses using five different genetic regions. *Virus Research*, 99 (2): 103–113, 2004.
189. REDDY JR, XUE W, RIVERA S, MINOCHA HC. Antigenic differences between a field isolate and vaccine strains of bovine viral diarrhoea virus. *Journal of Clinical Microbiology*, 33 (8): 2159-2161, 1995.
190. HAMERS C, DI VALENTIN E, LECOMTE C, LAMBOT M, JORIS E, GENICOT B, PASTORET PP. Virus neutralizing antibodies against a panel of 18 BVDV isolates in calves vaccinated with rispoval RS-BVD. *Journal of Veterinary Medicine Series B- infectious Diseases and Veterinary Public Health*, 47 (10):721-726, 2000.
191. ZIMMER GM, WENTINK GH, BRUSCHKE C, WESTENBRINK FJ, BRINKHOF J, GOEY I. Failure of foetal protection after vaccination against an experimental infection with bovine virus diarrhoea virus. *Veterinary Microbiology*, 89 (4): 255–265, 2002.
192. HAMERS C, VALENTIN ED, LECOMTE C, LAMBOT M, JORIS E, GENICOT B, PASTORET PP. Virus neutralising antibodies against 22 bovine viral diarrhoea virus isolates in vaccinated calves. *The Veterinary Journal*, 163 (1): 61-67, 2002.
193. XUE W, MATTICK D, SMITH L, UмбаUGH J, TRIGO E. Vaccination with a modified-live bovine viral diarrhoea virus (BVDV) type 1a vaccine completely protected calves against challenge with BVDV type 1b strains. *Vaccine*, 29 (1): 70–76, 2011.
194. BEER M, HEHNEN HR, WOLFMAYER A, POLL G, KAADEN OR, WOLF G. A new inactivated BVDV genotype I and II vaccine. An immunisation and challenge study with BVDV genotype I. *Veterinary Microbiology*, 77 (1-2): 195-208, 2000.
195. RIDPATH JF, DOMINOWSKI P, MANNAN R, YANCEY R JR, JACKSON JA, TAYLOR L, MEDIRATTA S, EVERSOLE R, MACKENZIE CD, NEILL JD. Evaluation of three experimental bovine viral diarrhoea virus killed vaccines adjuvanted with combinations of Quil A cholesterol and dimethyldioctadecylammonium (DDA) bromide. *Veterinary Research Communications*, 34 (8): 691-702, 2010.
196. RODNING SP, MARLEY MS, ZHANG Y, EASON AB, NUNLEY CL, WALZ PH, RIDDELL KP, GALIK PK, BRODERSEN BW, GIVENS MD. Comparison of three commercial vaccines for preventing persistent infection with bovine viral diarrhoea virus. *Theriogenology*, 73 (8): 1154-1163, 2010.
197. REBER AJ, TANNER M, OKINAGA T, WOOLUMS AR, WILLIAMS S, ENSLEY DT, HURLEY DJ. Evaluation of multiple immune parameters after vaccination with modified live or killed bovine viral diarrhoea virus vaccines. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 29 (1): 61-77, 2006.
198. MINAMI F, NAGAI M, ITO M, MATSUDA T, TAKAI H, JINKAWA Y, SHIMANO T, HAYASHI M, SEKI Y, SAKODA Y, SUGIURA K, AKASHI H. Reactivity and prevalence of neutralizing antibodies against Japanese strains of bovine viral diarrhoea virus subgenotypes. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 34 (1): 35–39, 2011.

199. HUBALEK Z. Numerical comparative serology—the methods. *Journal of Applied Bacteriology*, 52 (3): 307–318, 1982.
200. BOLIN SR, RIDPATH JF. Assessment of protection from systemic infection or disease afforded by low to intermediate titers of passively acquired neutralizing antibody against bovine viral diarrhea virus in calves. *American Journal of Veterinary Research*, 56 (6): 755-759, 1995.
201. FULTON RW, BURGE LJ. Bovine viral diarrhea virus types 1 and 2 antibody response in calves receiving modified live virus or inactivated vaccines. *Vaccine*. 19; 264-274, 2001.
202. KURCUBIC VS, MILIC NS, DJOKOVIC RD, ILIC ZZ. Evaluation of immunogenic properties of monovalent and polyvalent inactivated bovine virus diarrhea virus (BVDV) vaccines. *African Journal of Microbiology Research*, 5 (17): 2422-2427, 2011.
203. DEREGT D. Introduction and history. Editors: GOYAL SM, RIDPATH JF. *Bovine viral diarrhea virus: diagnosis, management and control*, Blackwell Publishing, Ames, IA, page 3–34, 2005.

TEŞEKKÜR

Bana bu konuda çalışma fırsatı veren, doktora eğitimim ve tez çalışmam süresince beni destekleyen, bilgi, tecrübe ve önerilerinden yararlandığım danışman hocam sayın Prof. Dr. Kadir YEŞİLBAĞ'a teşekkürlerimi sunarım.

Bu araştırmayı finansal açıdan destekleyen UÜ Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Komisyon Başkanlığına ve Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumuna (TÜBİTAK) teşekkür ederim. Saha çalışmalarının gerçekleştirilmesine olanak sağlayan ve örneklerin temininde yardımcı olan VETAL Hayvan Sağlığı Ürünleri A. Ş. genel müdürü sayın Abdullah Tutak ve diğer şirket çalışanlarına, İTİMAT Peynircilik Süt ve Süt Ürünleri Paz. San. Tic. A.Ş. yönetim kurulu başkanı sayın Sedat Kara'ya ve Veteriner Hekim Yiğit Gezer'e katkılarından dolayı teşekkür ederim. Eğitimim sırasında verdikleri maddi ve manevi desteklerinden dolayı sevgili eşime ve aileme, göstermiş olduğu anlayış ve desteğini eksik etmeyen çalışma arkadaşım Araş Gör Pelin TUNCER'e teşekkürü bir borç bilirim.

Gizem ALPAY

2014

ÖZGEÇMİŞ

07. 10. 1984 tarihinde İstanbulda doğdum. İlköğretimi İzmir Özel Çakabey Koleji, Ortaöğretimi İzmir Türk Koleji ve Lise öğrenimimi İzmir Aliğa TED Koleji'nde tamamladım. 2002 yılında başlamış olduğum üniversite eğitimimi 2007 yılında U. Ü. Veteriner Fakültesi'nden mezun olarak tamamladım. Aynı yıl evlendim ve U. Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı doktora programında eğitime başladım. Araştırma Görevlisi kadrosuna 2009 yılında atandım ve halen Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı'nda görevimi sürdürmekteyim.