



T.C.  
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
VETERİNER FAKÜLTESİ  
VİROLOJİ ANABİLİM DALI



**AŞI ADAYI YEREL BVD VİRUS SUŞLARINDA İNAKTİVASYON  
KİNETİĞİNİN BELİRLENMESİ VE DENEY HAYVANLARINDA  
İMMUNİZASYON ÇALIŞMALARI**

**BERFİN KADIROĞLU**

**(DOKTORA TEZİ)**

**BURSA-2022**





T.C.  
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
VETERİNER FAKÜLTESİ  
VİROLOJİ ANABİLİM DALI



**AŞI ADAYI YEREL BVD VİRUS SUŞLARINDA İNAKTİVASYON  
KİNETİĞİNİN BELİRLENMESİ VE DENEY HAYVANLARINDA  
İMMUNİZASYON ÇALIŞMALARI**

**Berfin KADİROĞLU**

**(DOKTORA TEZİ)**

**DANIŞMAN:**

**Prof.Dr. Kadir YEŞİLBAĞ**

Bu tez çalışması Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından  
119 O 571 nolu proje kapsamında desteklenmiştir.

**BURSA-2022**

**T.C.  
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ETİK BEYANI**

Doktora tezi olarak sunduğum ‘‘Aşı adayı yerel BVD virus suşlarında inaktivasyon kinetiğinin belirlenmesi ve deney hayvanlarında immunizasyon çalışmaları’’ adlı çalışmanın, proje safhasından sonuçlanmasına kadar geçen bütün süreçlerde bilimsel etik kurallarına uygun bir şekilde hazırlandığını ve yararlandığım eserlerin kaynaklar bölümünde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir ve beyan ederim.

**Berfin KADİROĞLU**

**22.06.2022**

## TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU

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

**Adı Soyadı:** Berfin Kadiroğlu

**Anabilim Dalı:** Veteriner-Viroloji

**Tez Konusu:** Aşı adayı yerel BVD virus suşlarında inaktivasyon kinetiğinin belirlenmesi ve deney hayvanlarında immunizasyon çalışmaları

<b><u>ÖZELLİKLER</u></b>	<b><u>UYGUNDUR</u></b>	<b><u>UYGUN DEĞİLDİR</u></b>	<b><u>AÇIKLAMA</u></b>
Tezin Boyutları	✓	<input type="checkbox"/>	
Dış Kapak Sayfası	✓	<input type="checkbox"/>	
İç Kapak Sayfası	✓	<input type="checkbox"/>	
Kabul Onay Sayfası	✓	<input type="checkbox"/>	
Sayfa Düzeni	✓	<input type="checkbox"/>	
İçindekiler Sayfası	✓	<input type="checkbox"/>	
Yazı Karakteri	✓	<input type="checkbox"/>	
Satır Aralıkları	✓	<input type="checkbox"/>	
Başlıklar	✓	<input type="checkbox"/>	
Sayfa Numaraları	✓	<input type="checkbox"/>	
Eklerin Yerleştirilmesi	✓	<input type="checkbox"/>	
Tabloların Yerleştirilmesi	✓	<input type="checkbox"/>	
Kaynaklar	✓	<input type="checkbox"/>	

### DANIŞMAN ONAYI

**Unvanı Adı Soyadı:** Prof. Dr. Kadir YEŞİLBAĞ

**İmza:**

## İÇİNDEKİLER

**Dış Kapak**

**İç Kapak**

<b>ETİK BEYAN</b> .....	<b>II</b>
<b>TEZ KONTROL BEYAN FORMU</b> .....	<b>IV</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>V</b>
<b>TÜRKÇE ÖZET</b> .....	<b>VIII</b>
<b>İNGİLİZCE ÖZET</b> .....	<b>IX</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>3</b>
2.1. Etiyoloji .....	3
2.1.1. Taksonomi .....	3
2.1.2. Fizikokimyasal, Biyolojik ve Genomik Özellikleri .....	4
2.1.3. Genotipler, Genetik Çeşitlilik ve Subgenotiplerin Serolojik İlişkisi .....	7
2.2. Epidemiyoloji .....	10
2.3. Patogenez .....	12
2.3.1. Prenatal Dönemde BVDV Enfeksiyonu .....	12
2.3.2. Postnatal Dönemde BVDV Enfeksiyonu .....	13
2.4. Klinik Bulgular .....	15
2.4.1. İmmunokompetan ve Gebe Olmayan Sığırlarda Akut BVDV Enfeksiyonları .....	15
2.4.2. İmmunokompetan Gebe Sığırlarda BVDV Enfeksiyonları .....	16
2.4.3. İmmunotolere Persiste Enfekte Sığırlarda BVDV Enfeksiyonları .....	17
2.4.4. Mukoza Hastalığı (MD) .....	17
2.5. İmmun Yanıt .....	18
2.6. Teşhis Yöntemleri .....	20
2.6.1. Antikor Tespiti .....	20
2.6.2. Antijen/Virus Tespiti .....	21
2.7. Koruma Kontrol .....	22
2.7.1. Aşılama İçermeyen BVD Kontrol Programları .....	23
2.7.2. Kombine Kontrol Programları .....	24
2.7.3. Mevcut BVDV Aşıları .....	25
2.7.3.1. Modifiye Canlı Virus Aşıları (MCA) .....	25
2.7.3.2. İnaktif Aşılar (İA) .....	26
2.7.3.3. Subünit ve Yeni Nesil Aşılar .....	27

<b>3. GEREÇ ve YÖNTEM</b> .....	<b>29</b>
3.1. Gereç .....	29
3.1.1. Hücre Kültürleri ve İdamesi .....	29
3.1.2. Viruslar .....	30
3.1.3. Deney Hayvanları.....	30
3.1.4. Monoklonal Antikor (mAb).....	31
3.1.5. Konjugatlar .....	31
3.1.6. İnaktivan Madde.....	31
3.1.7. Eritrosit Süspansiyonu.....	32
3.1.8. Alsever's Solüsyonu .....	32
3.1.9. ELISA Kiti.....	32
3.1.10. Adjuvantlar .....	32
3.2. Yöntem .....	33
3.2.1. Upstream Proses Aşaması.....	33
3.2.1.1. Virus Üretimi .....	33
3.2.1.2. Mikrotitrasyon Testi.....	33
3.2.1.3. İndirekt İmmunoperoksidaz Monolayer Assay (IIPMA) .....	33
3.2.1.4. Multiplicity of Infection (MOI) Değerlerinin Belirlenmesi .....	34
3.2.1.5. Çoğalma Eğrisinin Belirlenmesi .....	35
3.2.1.6. Tohum Stoklarının Oluşturulması.....	35
3.2.1.7. Aşı Antijeninin Üretilmesi.....	36
3.2.2. Downstream Proses Aşaması.....	36
3.2.2.1. İnaktivasyon Kinetiğinin Belirlenmesi.....	36
3.2.2.2. İnaktivasyon Kontrolü .....	37
3.2.2.3. Viral Antijenlerin İnaktivasyonu .....	37
3.2.2.4. Virus Konsantrasyonu İşlemi ve Diyaliz.....	38
3.2.2.5. ELISA ile Antijen Tespiti.....	40
3.2.2.6. Protein Ölçümü .....	40
3.2.2.7. Hemadsorbsiyon Testi.....	40
3.2.2.8. Bakteriyolojik Kontrol.....	40
3.2.2.9. Aşı Bileşenleri ve Formülasyon.....	41
3.2.3. İmmunizasyon Süreci ve Serolojik Çalışmalar .....	42
3.2.3.1. Deney Hayvanlarına Aşı Uygulamaları.....	42
3.2.3.2. Nötralizasyon Testi .....	44

3.2.3.3. In-house ELISA .....	45
3.3. İstatistik Analiz .....	46
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>47</b>
4.1. Upstream Proses Aşamasında Elde Edilen Sonuçlar.....	47
4.1.1. Virusların IIPMA Testiyle Teyidi ve Titrasyon Sonuçları .....	47
4.1.2. Multiplicity of Infection (MOI) Değerleri .....	48
4.1.3. BVDV TR-21, TR-26 ve TR-15 Suşlarının Çoğalma Eğrileri .....	48
4.2. Downstream Proses Aşamasında Elde Edilen Sonuçlar .....	50
4.2.1. İnaktivasyon Kinetiği ve İnaktivasyon Kontrolü .....	50
4.2.2. Aşı Formülasyonunda Kullanılacak Antijenlerin İnaktivasyonu .....	51
4.2.3. Antijenlerin Konsantrasyon Sonuçları.....	51
4.2.4. Hemadsorbsiyon ve Bakteriyolojik Test Sonuçları.....	52
4.3. İmmünizasyon Çalışmasında Elde Edilen Veriler.....	53
4.3.1. Aday Aşılarda Güvenlik Testi Sonuçları .....	53
4.3.2. In-house ELISA Standardizasyon Sonuçları.....	54
4.3.3. In-house ELISA Test Sonuçları .....	56
4.3.4. Nötralizasyon Testi (SN <sub>50</sub> ) sonuçları.....	57
4.3.4.1. Fare Serumlarında Nötralizasyon Testi Sonuçları.....	57
4.3.4.2. Kobay Serumlarında Nötralizasyon Testi Sonuçları .....	61
4.4. İstatistiksel Analiz Sonuçları .....	70
<b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ .....</b>	<b>77</b>
5.1. Aşı Adayı Viruslarının Üreme Karakterizasyonuna ve İnaktivasyon Kinetiğine Yönelik Çalışmalar .....	78
5.2. Deney Hayvanlarında İmmünizasyona Yönelik Çalışmalar .....	82
5.3. Sonuç .....	88
<b>6. KAYNAKLAR .....</b>	<b>90</b>
<b>7. SİMGELER ve KISALTMALAR .....</b>	<b>107</b>
<b>8. EKLER.....</b>	<b>111</b>
<b>9. TEŞEKKÜR.....</b>	<b>112</b>
<b>10. ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>113</b>

## TÜRKÇE ÖZET

Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) ülkemizde ve dünyada yaygın olarak görülmekle birlikte hastalığa karşı koruma ve kontrol stratejileri geliştirilmektedir. Koruma kontrol programlarında ön plana çıkan önlemlerden biri de aşılama olarak görülmektedir. Tez çalışmasında aşı adayı yerel BVDV suşlarının çoğalma karakterizasyonlarının, inaktivasyon kinetiğinin ve farklı adjuvantlarla hazırlanan inaktif BVDV aşı formülasyonlarının deney hayvanlarındaki serolojik yanıtlarının belirlenmesi amaçlandı. BVDV TR-21, TR-26 ve TR-15 suşlarının optimum MOI değerleri sırasıyla 1, 0,1 ve 0,1 MOI olarak tespit edildi. Ayrıca TR-21, TR-26 ve TR-15 suşlarının çoğalma eğrileri oluşturularak virus ekimini takiben en yüksek titrelere sırasıyla 48., 12., ve 36. saatlerde ulaştığı saptandı. Kimyasal olarak BEI maddesi kullanılarak yapılan inaktivasyon kinetiği çalışmasında TR-21, TR-26 ve TR-15 suşları sırasıyla 16., 10., ve 10. saatte tamamen inaktif olduğu tespit edilmiştir. Yağ bazlı, AlOH<sub>3</sub> bazlı ve saponin adjuvantları kullanılarak oluşturulan formülasyonlarla kobay ve farelere immunizasyon işlemi gerçekleştirildi. Aşı sonrası gelişen humoral immun yanıtı belirlemek için in-house ELISA ve nötralizasyon testi uygulanarak verilerin birbirini teyit ettiği gösterildi. AlOH<sub>3</sub> bazlı adjuvant gruplarına nazaran yağ bazlı adjuvant gruplarının aşıda etkili şekilde çalıştığı belirlendi.

Yağ bazlı adjuvant gruplarında F-3 formülasyonunun 21. ve 51. günlerdeki antikor titreleri yüksek olsa da 81. ve 111. günlerde F-4 grubunun aşağısında kaldığı tespit edilmiştir. Aynı zamanda F-4 grubunda kullanılan adjuvantın yapısı gereği (w/o/w) aşı formülasyonu aşamasında kullanımının daha rahat olması açısından kolaylık sağlayacağı düşünülmektedir. Aşılarda bulunan yerel suşların önemiyle beraber homolog ve heterolog suşlara karşı etkinlikleri ortaya koyulmuştur. İleriki süreçlerde inaktif yerel aşı üretimi için uygulanabilir güncel veriler elde edilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** BVDV, İnaktivasyon kinetiği, İnaktif aşı, İmmunizasyon



## İNGİLİZCE ÖZET

Determination of inactivation kinetics in vaccine candidate local BVD virus strains and immunization studies in experimental animals

Although bovine viral diarrhea virus (BVDV) is common in our country and in the world, protection and control strategies are being developed against the disease. One of the prominent measures in protection control programs is seen as vaccination. In the thesis study, it was aimed to determine the proliferation characteristics, inactivation kinetics of vaccine candidate local BVDV strains and the serological responses of inactive BVDV vaccine formulations prepared with different adjuvants in experimental animals. Optimum MOI values of BVDV TR-21, TR-26 and TR-15 strains were determined as 1, 0,1 and 0,1, respectively. In addition, growth curves of TR-21, TR-26 and TR-15 strains were created and it was determined that they reached the highest titers at 48, 12, and 36 hours, respectively, after virus cultivation. In the inactivation kinetic study using BEI as a chemical, it was determined that the TR-21, TR-26 and TR-15 strains were completely inactivated at the 16th, 10th and 10th hours, respectively. Guinea pigs and mice were immunized with formulations using oil-based (ISA 50 and 206), AlOH<sub>3</sub>-based and saponin adjuvants. In-house ELISA and neutralization test were applied to determine the humoral immune response developed after vaccination, and it was shown that the data confirmed each other. It was determined that oil-based adjuvant groups worked effectively in the vaccine compared to AlOH<sub>3</sub>-based adjuvant groups.

Although the antibody titers of the F-3 formulation on the 21st and 51st days were high in the oil-based adjuvant groups, it was found to be below the F-4 group on the 81st and 111th days. At the same time, due to the nature of the adjuvant used in the F-4 group (w/o/w), it is thought that it will provide convenience in terms of being more comfortable to use in the vaccine formulation stage. The importance of local strains in vaccines and their effectiveness against homologous and heterologous strains have been demonstrated. Applicable up-to-date data were obtained for the production of inactivated local vaccines in the future.

**Keywords:** BVDV, Inactivation kinetics, Inactivated vaccine, Immunization

## 1. GİRİŞ

Bovine viral diyare (BVD) başta sığırlar olmak birçok çift tırnaklı hayvanı etkileyen ve ülkemiz dahil olmak üzere tüm dünyada yaygın olarak görülen viral bir hastalıktır (Smith, 2000). BVD virusu (BVDV) ilk kez 1946 yılında New York şehrinde sığırların bir virusu olarak tespit edilmiştir (Olafson, 1946). Aynı virusun neden olduğu daha şiddetli klinik formu olan mukozal hastalık ise 1953 yılında tanımlanmıştır (Bolin, & Ridpath, 1995). BVD virusu solunum ve sindirim sistemi enfeksiyonlarına, fetal enfeksiyonlara, döl verimi düşüklüğüne, reproduktif problemlere ve süt veriminde azalmalara sebep olabilmektedir. Aynı zamanda virusun immun supresif etkisi sonucunda sekonder enfeksiyonlara duyarlılığın arttığı, bu sebeple virusun sığırların solunum sistemi hastalık kompleksi (BRDC) enfeksiyonunun oluşumunda önemli rolü olduğu da bildirilmiştir (Moerman ve ark, 1994). BVDV, *Pasteurella multocida*, *Histophilus somni*, *Mannheimia haemolytica* ve *Mycoplasma bovis* gibi bakteriyel etkenler ve Bovine herpesvirus-1 (BoHV-1), Bovine parainfluenzavirus-3 (BPIV-3), Bovine respiratory syncytial virus (BRSV) ve Bovine coronavirus (BCoV) gibi birçok viral etkenle birlikte çoklu enfeksiyon şeklinde seyredilmektedir (Alkan ve ark, 2000).

Bütün bu önemli klinik bulgular besi ve süt sığırı işletmeciliğinde ciddi ölçüde ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Yapılan bir çalışmada rapor edilen ekonomik etkinin sığır başına yılda 30-60 €'ya kadar ulaşabildiği gösterilmiştir (Houe, 2003). BVDV dünya genelinde yaygın olarak görülmekle birlikte Türkiye'de de enzootik bir hastalık olarak değerlendirilmektedir (Burgu, 1990). Hastalığın ekonomik öneminden dolayı birçok ülke kontrol ve eradikasyon programları uygulamaktadır. Hastalığın kontrol ve korumasındaki temel unsurlar; persiste enfekte hayvanların belirlenip elimine edilmesi ve aşılama yoluyla bağışıklık geliştirilmesidir. Ayrıca duyarlı hayvanlara yayılımın engellenmesi için biyogüvenlik kurallarının uygulanması ve yeni enfeksiyonların takip edilmesi gerekmektedir (Yeşilbağ, Alpay, & Tuncer, 2012). Türkiye'de kullanılan BVDV aşuları inaktif virus aşuları olup BVDV-1a, 1b suşu ve daha az sıklıkla BVDV-2 içermektedir (Altuğ, Ozdemir, & Cantekin, 2013).

BVDV-1 ile aşılardan dvelerden doğan persiste enfekte buzağılardan BVDV-2 suşunun izole edilmesi sonucunda aşı suşlarıyla saha suşları arasında antijenik farkların olabileceği ve aşının koruma etkinliğini olumsuz yönde etkileyeceği ortaya konulmuştur (Hamers ve ark., 2002). Ülkemizde yapılan bir çalışmada şiddetli pnymoni ve hemorajik enterit bulguları olan aşılı sürüden BVDV-1 izolasyonu yapılmış olması (Yeşilbağ ve ark., 2014), hastalığın eradikasyonu için temel unsur olan yerel aşı çalışmalarının gereğini ortaya koymuştur. Bu sebeple hastalığın koruma ve kontrolünü sağlamadaki temel unsur olan aşı suşunu seçerken, ülkede epidemiyolojik olarak baskın olan antijenik yapıdaki suşların belirlenmesi gerekmektedir. Ülkemizde yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen izolatların moleküler epidemiyolojisi ortaya konulmuş ve dominant alt grupların BVDV-1/ ve BVDV-1f olduğu tespit edilmiştir (Yeşilbağ, Alpay, & Becher, 2017). Alt gruplar arasında serolojik benzerlik ve çapraz reaksiyonlar dikkate alındığında en uygun aşı suşlarının BVDV-1/ ve -1f olabileceği değerlendirilmiştir (Alpay, & Yeşilbağ, 2015).

Bu doktora tez çalışmasında Türkiye'nin farklı bölgelerinden izole edilen suşlar kullanılarak,

- Aşı adayı suşların belirlenmesi,
- Belirlenen suşların inaktivasyon kinetiğinin ve diğer özelliklerinin saptanması,
- Aşı formülasyonlarında kullanılan farklı adjuvantların değerlendirilmesi,
- Deney hayvanlarında immunolojik yanıtlarının serolojik olarak belirlenmesi,
- İlerleyen süreçte geliştirilmesi mümkün olan inaktif yerel aşı üretimi için güncel verilerin elde edilmesi amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Etiyoloji

#### 2.1.1. Taksonomi

Pestiviruslar ilk zamanlarda *Togaviridae* ailesi içinde sınıflandırılmıştır (Westaway ve ark., 1985). Zamanla moleküler karakterizasyon, genom organizasyonu ve gen ekspresyon stratejisinin *Flaviviridae* ailesine çok daha yakın olduğunu gösterilmiş, böylece pestiviruslar *Flavivirus* ve *Hepacivirus* cinslerini de içeren *Flaviviridae* ailesinde yer almaya başlamıştır (Wengler ve ark., 1995). Pestiviruslar başlangıçta konak özgüllüğüne göre sınıflandırılmış ancak sığırlar, koyunlar (Carlsson, Alenius, & Sundqvist, 1991), domuzlar ve diğer geviş getirenler (Becher ve ark., 1999; Vilcek, & Belák, 1996) arasında bulaştığının gösterilmesi ve serolojik analizler (Paton, 1995; van Rijn ve ark., 1997) neticesinde antijenik ve genetik ilişkiye dayalı bir sınıflandırma gerçekleştirilmiştir. Yakın zamana kadar, *Pestivirus* cinsinde BVDV, CSFV, BDV ve atipik pestiviruslar (Zerbini ve ark., 2017) dahil olmak üzere dört tür bulunmaktaydı. Son zamanlarda, bu türler için konakçıdan bağımsız olarak Pestivirus A-K olacak şekilde isimlendirme sistematığı oluşturulmuştur (Tablo 1) (Smith ve ark., 2017).

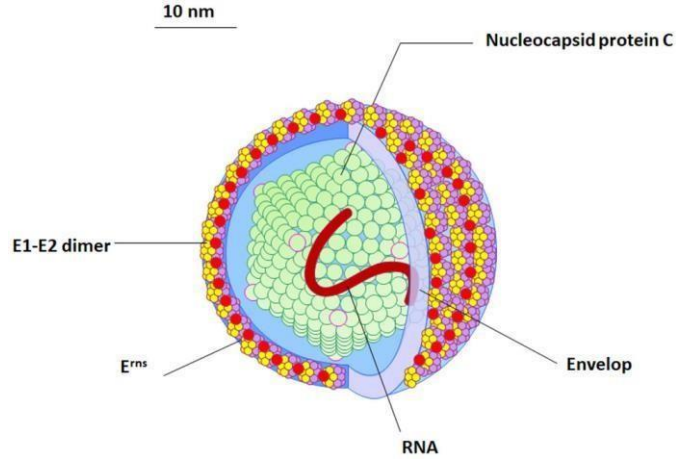
**Tablo 1:** Pestivirus cinsinin üyeleri ve konakçıları (Smith ve ark., 2017)

Tür	Bilinen İsmi	Konakçı
Pestivirus A	Bovine viral diarrhea virus 1	Sığır, diğer ruminantlar ve domuz
Pestivirus B	Bovine viral diarrhea virus 2	Sığır, diğer ruminantlar ve domuz
Pestivirus C	Classical swine fever virus	Domuz
Pestivirus D	Border disease virus	Koyun, diğer ruminantlar ve domuz
Pestivirus E	Pronghorn Pestivirus	Antilop
Pestivirus F	Bungowannah virus	Domuz
Pestivirus G	Giraffe Pestivirus	Zürafa, sığır
Pestivirus H	Hobi-Like Pestivirus	Sığır, manda
Pestivirus I	Aydin-Like Pestivirus	Koyun, keçi
Pestivirus J	Rat Pestivirus	Rat
Pestivirus K	Atypical porcine Pestivirus	Domuz

Daha önce tanımlanan türler arasında bovine viral diarrhoea virus-1 (BVDV-1, Pestivirus A), BVDV-2 (Pestivirus B), Avrupa domuz vebası virusu (CSFV, Pestivirus C) ve koyunların sınırlı hastalığı virusu (BDV, Pestivirus D) yer almaktaydı. Ek olarak, 7 ayrı tür daha Pestivirus E-K olarak belirlenmiştir. Söz konusu türler Pestivirus E (pronghorn antilop pestivirusu), Pestivirus F (Bungowannah-domuz pestivirusu), Pestivirus G (Giraffe-zürafa pestivirusu), Pestivirus H (Hobi-like pestivirus, atipik ruminant pestivirus, BVDV-3), Pestivirus I (Aydın-like pestivirus, koyun pestivirus), Pestivirus J (rat pestivirus) ve Pestivirus K (atipik domuz pestivirus) olarak sıralanmaktadır.

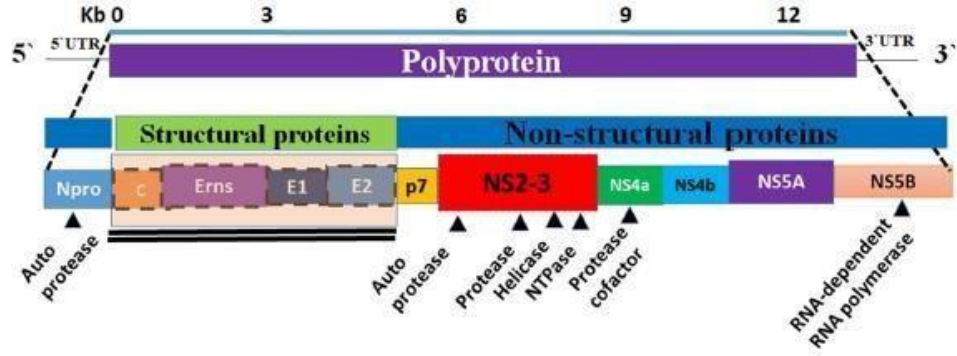
### **2.1.2. Fizikokimyasal, Biyolojik ve Genomik Özellikleri**

Etken RNA genomuna sahip olup pozitif anlamlı, 12.3 kb ve linear tek iplikçikli yapıdadır. Virion zarflı olup 40-60 nm büyüklükte ve ikozahedral simetridir (Al-Kubati, Hussien, Kandeel, Al-Mubarak, & Hemida, 2021) (Şekil 1). Virus lipid çözücüler ve tripsin ile inaktive olup pH 5,7-9,3 arasında stabildir (Hafez, & Liess, 1972). Dondurulmuş olarak uzun yıllar saklanabilmekle beraber sığırcı ve koyun kökenli primer, diploid ve devamlı hücre hatlarında üretilebilmektedir (Liang ve ark, 2003). Virusun genomunda 5' ve 3' uçlarında bilgi kodlanmayan bölgelerle (UTR) sınırlanmış tek ve uzun bir ORF (açık okunabilir bölge) bulunmaktadır. Oluşan tek bir uzun poliprotein yapının ayrılması sonucu yapısal ve yapısal olmayan proteinler açığa çıkar. Genom organizasyonu sırasıyla NH<sub>2</sub>-5'UTR-N<sub>pro</sub>/C/Erns/E1/E2/p7/NS2/NS3/NS4A/NS4B/NS5A/NS5B-3'UTR-COOH şeklindedir (Neill, 2013) (Şekil 2). BVDV, translasyon sonrası dört yapısal proteine (C, E<sup>ms</sup>, E1 ve E2) ve 8 yapısal olmayan proteine (N<sup>pro</sup>, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B) bölünecek olan tek bir poliproteini kodlar.



**Şekil 1:** BVDV virusunun morfolojisi ve yapısı. Dört yapısal protein (Protein C, Erns, E1 ve E2) genomu (kırmızı) çevreler. Dışta viral proteinler, virus girişi için gerekli olan önemli E1-E2 heterodimerlerini içerir (Al-Kubati ve ark, 2021).

Yapısal proteinler, üç zarf proteini ( $E^{ms}$ , E1 ve E2) ve bir kapsid proteini (nükleokapsid protein C) olarak sınıflandırılır (Tautz, Tews, & Meyers, 2015). Yapısal proteinler arasında C en çok bulunan proteindir. Bunu Erns proteini takip ederken, E1 ve E2 sınırlı olarak bulunur. Bununla birlikte, virion yüzeyinde E2 en çok bulunan yüzey proteindir (Rümenapf, Unger, Strauss, & Thiel, 1993). BVDV'ye karşı oluşan immun yanıtını ağırlıklı olarak E2 proteini uyarmaktadır. Ayrıca  $E^{ms}$ , E1, NS3 proteinleri de immunojenik karakterde olup nötralizan antikorların gelişiminde rol oynar (Donis, 1995). BVDV'nin yüzeyi esas olarak E2-E2 homodimerlerinden ve E1-E2 heterodimerlerinden oluşur (Weiland ve ark., 1990) (Şekil 1). Söz konusu heterodimerler, konakçı hücrelerle virus füzyonu için en önemli proteinlerdir. E2 glikoproteininin (55 kDa) ana işlevi, E1 ile bahsedilen heterodimerizasyonun yanında homodimerleri oluşturarak konak hücreye tutunmasıdır (Wang, Nie, Wang, Ding, & Deng, 2004).



**Şekil 2:** BVD virusunun genom organizasyonu. BVDV genomu, tek bir RNA dizisinden (alt panel) oluşur. Viral genom bir polipeptini (üst panel) kodlar. Sekiz yapısal olmayan protein ( $N^{pro}$ , p7, NS2, NS3, NS4a, NS4b ve NS5b) ve dört yapısal protein (C,  $E^{ms}$ , E1 ve E2) polipeptin (orta ve alt paneller) tarafından kodlanır. Yapısal olmayan proteinler viral proteazlar, helikaz, nükleosit- trifosfataz (NTPaz) ve RNA bağımlı RNA polimerazı (RdRP) kodlamaktadır (Al-Kubati ve ark, 2021).

Enfekte hücrelerde üretilen  $E^{ms}$  proteininin çoğunluğu hücre kültürü ortamına salınır. Aynı zamanda endoribonükleaz görevi gören  $E^{ms}$ , birkaç N-asetil glukozamin molekülü taşıyan glikozile olmuş bir protein olup hücre içindeki ssRNA'yı parçalayarak dirençli Patojen ile İlişkili Moleküler Patern (Pathogen Associated Molecular Pattern, PAMP) sistemini bozar. İnterferon üretimini engelleyerek persiste enfeksiyon için uygun ortam oluşturur (Zürcher, Sauter, & Schweizer, 2014).  $N^{pro}$  kendi C terminalini üreten yapısal olmayan viral otoproteaz olup İnterferon Regülasyon Faktörü-3 (IRF-3) aktivitesini engelleyerek tip I interferonu baskılar (Darweesh, Rajput, Braun, Rohila, & Chase, 2018). P7 proteini virusun enfektif virus partikülü oluşumunda etkiliyken, NS2-3, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A ve NS5B bölgelerinden kodlanan sistein oto-proteaz, serin proteaz, RNA helikaz, NTPaz, replikaz ve RdRP gibi enzimler virus çoğalma sürecinde rol oynarlar (Tautz ve ark, 2015). Ayrıca NS2-3 ve NS4A virion morfogenezine katkıda bulunmaktadır (Isken ve ark., 2019).

BVDV'nin 5'-UTR'si, tek bir polipeptinin translasyonunu başlatma işlevigören İnternal Ribozomal Giriş Bölgesi (IRES) içerir. IRES, oldukça değişken iki bölge içeren 3 sarmaldan oluşur (Burks, Zwieb, Müller, Wower, & Wower, 2011). 3'-UTR konakçı hücre mikroRNA'sı için bağlanma bölgelerine sahiptir (Scheel ve ark., 2016). Pestivirusların genotiplendirilmesinde genellikle üç bölge hedeflenir; bunlar,

türler arası korunmuş motifleri içeren 5'UTR, Pestiviruslara özgü bir bölge olan N<sup>pro</sup> bölgesi ve E2 proteindir (Bauermann, Ridpath, Weiblen, & Flores, 2013). 5'UTR ve N<sup>pro</sup> bölgesi genotiplendirme için sıklıkla kullanılmaktadır.

Sahadan elde edilen BVDV izolatları, virusun p80 (NS3) / p125 (NS2-3) genindeki nokta mutasyonlarına, genom duplikasyonlarına ve heterolog RNA rekombinasyonuna bağlı olarak sitopatojen (cp) veya sitopatojen olmayan biyotipler (ncp) olarak ikiye ayrılmıştır (Greiser-Wilke, Dittmar, Liess, & Moennig, 1992). cp BVDV suşlarının ncp BVDV ile persiste enfekte sığırlarda RNA rekombinasyonu ile evrimleştiği düşünülmektedir (Bálint ve ark., 2005). Hücrelerin cp suşlarla enfeksiyonundan sonra NS3 ve NS2-3 proteini birlikte eksprese edilirken, ncp suşlarda NS3 eksprese edilmemektedir (Nakamura ve ark., 1997). Tanımlanan bu iki biyotip hücre kültüründe farklı etkilere sahiptir. Sitopatojen biyotipler hücrelerde yuvarlaklaşmaya, vakuolizasyona, lizise ve ölüme sebep olurken, ncp biyotiplerde hücre bütünlüğü korunmaktadır (Greiser-Wilke ve ark., 1992). Hem BVDV-1 hem de BVDV-2 genotipine ait suşlarda sitopatojenik ve sitopatojenik olmayan biyotip suşlar bulunmaktadır. Sahadan izole edilen BVDV suşlarının büyük bir kısmını ncp biyotipler oluşturur. Sitopatojen olmayan BVDV suşuyla enfekte olan persiste enfekte hayvanların dışardan aldığı cp suşlarla süper enfeksiyonu ya da ncp suşunun mutasyonu ile ortaya çıkan cp suşla süper enfeksiyonu sonucunda ölümcül mukoza hastalığı (Mucosal disease, MD) meydana gelmektedir (Ridpath, 2005).

### **2.1.3. Genotipler, Genetik Çeşitlilik ve Subgenotiplerin Serolojik İlişkisi**

BVDV genetik ve antijenik olarak ayrılmış BVDV-1 ve BVDV-2 olmak üzere 2 genotipe sahiptir. Ancak son yıllarda tanımlanan “HoBi-like” veya “atipik pestivirus” BVDV'nin üçüncü genotipi olarak kabul edilip BVDV-3 şeklinde adlandırılmıştır (Riitho, Strong, Larska, Graham, & Steinbach, 2020). BVD virus suşları heterojen olup genetik ve antijenik değişiklikler gözlenir. Bunun başlıca sebeplerinden biri RNA viruslarında viral RNA'ya bağımlı RNA polimerazın proofreading mekanizması olmadığı için genomda yüksek sıklıkla mutasyonların meydana gelmesidir (Steinhauer, Domingo, & Holland, 1992). Bu sayede virus yeni konakçılara ve ortamlara hızlı bir şekilde adapte olmaktadır (Domingo, Sheldon, & Perales, 2012). BVDV alt genotiplerinin giderek artması, genetik drift olarak da bilinen nokta mutasyonlarının bir sonucu olarak gösterilir. Homolog ve heterolog rekombinasyonlarda genomda değişikliklere neden olmaktadır. Bu değişiklikler



5'UTR ve E1–E2 gen bölgeleri için sırasıyla  $5,9 \times 10^{-4}$  ve  $1,26 \times 10^{-3}$  nükleotid substitüsyonu/yer/yıl aralığındadır (Chernick, Godson, & van der Meer, 2014). Analiz edilen genler içinde oldukça değişken ve korunmuş bölgeler bulunmaktadır. Viral genomdaki yapısal proteinleri kodlayan genlerin, yapısal olmayan proteinleri kodlayan genlerden daha değişken olduğu gösterilmiştir (Chernick ve ark., 2018). Pestiviruslar arasındaki serolojik ve genomik farklılıklar, viral bağlanmaya aracılık eden ve nötralizan antikorların selektif baskısı altında olan E2 glikoproteininde en yüksektir. Pestivirus A'ya ait E2 aminoasit dizinleri arasındaki benzerlik oranı %68-78 ve Pestivirus A ile B arasındaki benzerlik %61-66 iken, Pestivirus A ve H arasında sadece %57-63'tür (Riitho ve ark., 2020). Buna göre, pestiviruslar arasında T hücresi çapraz reaksiyonunun olmamasının ve sınırlı çapraz nötralizasyon yeteneğinin E2 proteinleri arasındaki farklılıklardan kaynaklandığı düşünülmektedir. Yapısal olmayan proteinleri kodlayan genlerdeki değişken bölgelerin BVDV suşlarının virulansındaki farklılıklarda etkili olup olmadığına dair çalışmalar devam etmektedir.

Homolog olmayan RNA rekombinasyonu çeşitli sitopatojen virus varyantlarının ortaya çıkmasına neden olurken, homolog rekombinasyonlar BVDV-1 ve -2 dahil olmak üzere Pestivirus cinsinde doğal olarak meydana gelmektedir (Weber ve ark., 2015). Bu durum BVDV'nin genetik çeşitliliğine katkı sağlamaktadır. Rekombinant pestivirusların varlığı, virus izolatlarının filogenetik analizi ve sınıflandırılması için zorluk teşkil etmektedir. Bu nedenle pestivirus izolatlarının genotiplendirilmesinin tek bir genomik fragmanın analizine dayanmaması önerilir (Weber ve ark., 2015). BVDV suşlarının genotiplendirme ve sınıflandırılması genellikle 5'UTR, Npro ve E2 bölgesinden genomik sekansların karşılaştırılmasına dayanılarak yapılmaktadır (Yeşilbağ ve ark., 2017). Son yıllarda yapılan bir çalışmada tam genom ve gen/UTR'ler arasındaki karşılaştırmalı filogenetik analizleri ve bunların arasındaki jeodezik mesafesine dayanarak BVDV-1 ve -2 alt tiplendirmesi için en uygun bölgenin NS4B ve NS5A olduğu öne sürülmüştür (de Oliveira, Júnior, Weiblen, & Flores, 2021). BVDV-1 ve BVDV-2, taksonomik ve epidemiyolojik çalışmalarda sıklıkla kullanılan 5'UTR bölgesine göre

ayrılmış olup, yapılan filogenetik analizler sonucunda BVDV-1 genotipinde 22 (1a-1v) ve BVDV-2 genotipinde 4 (2a-2d) alt grup olduğu tespit edilmiştir (Tian ve ark., 2021). Dünya çapında baskın genotip BVDV-1 olmakla birlikte, BVDV-1b en sık bildirilen alt genotip olup bunu BVDV-1a ve BVDV-1c takip etmektedir. Türkiye’de ise izole edilen BVDV-1 alt genotipleri -1f ve 1l’de yoğunlaşmış olup, daha az oranlarda -1a, -1b, -1d, -1h, -1i, -1r ve -1c görülmektedir. Genel olarak dünyada ve ülkemizde daha az sıklıkla görülen BVDV-2 genotipinde baskın alt genotipin BVDV-2a olduğu gösterilmiştir (Yeşilbağ ve ark., 2017). Ülkemizde son yıllarda yapılan çalışmalarda BVDV-3 genotipinde izole edildiği bildirilmiştir (Timurkan, & Aydın, 2019).

**Tablo 2:** BVDV-1 alt gruplarına karşı hiperimmünize antiserumların virus nötralizasyon titreleri (Alpay, & Yeşilbağ, 2015)

Viruslar	Antiserumlar					
	BVDV-1a	BVDV-1b	BVDV-1d	BVDV-1f	BVDV-1h	BVDV-1l
BVDV-1a	<b>1:1280</b>	1:640	1:320	1:20	1:640	1:1280
BVDV-1b	1:1280	<b>1:2560</b>	1:1280	1:20	1:2560	1:640
BVDV-1d	1:1280	1:80	<b>1:1280</b>	1:1280	1:1280	1:640
BVDV-1f	1:20	1:20	1:40	<b>1:1280</b>	1:320	1:1280
BVDV-1h	1:320	1:1280	1:160	1:640	<b>1:5120</b>	1:1280
BVDV-1l	1:80	1:160	1:320	1:320	1:1280	<b>1:1280</b>

Genetik farklılıklar genellikle BVDV türleri ve alt grupları arasındaki antijenik ilişkilerle paralellik gösterir. BVDV suşları arasındaki antijenik varyasyonlar, monoklonal antikor analizi ile tanımlanabilmesine rağmen, çapraz nötralizasyon deneyleri, alt gruplar arasındaki serolojik ilişkileri tanımlamak için değerli sonuçlar ortaya koymaktadır. BVDV enfeksiyonlarına karşı belirgin bir koruma için gereken nötralizan antikor titresi >1:512 olarak, klinik semptomların önlenmesi için ise 1:256 nötralizasyon titresinin kritik olduğunu öne süren çalışmalar mevcuttur (Bolin, & Ridpath, 1995). Buzağılarda yapılan bir çalışmada homolog alt genotiplerine karşı yüksek titrelerde çapraz nötralizan antikorun (1:256 ila 1:1024) geliştiği, ancak heterolog alt genotiplere karşı düşük seviyelerde (1:4 ila 1:128) çapraz nötralizan antikor titreleri gösterilmiştir (Fulton ve ark., 1997). BVDV-1 ve BVDV-2 suşları arasında zayıf aşı korumasına yol açabilecek antijenik varyasyonlar

ve yüksek düzeyde serolojik farklılıklar ortaya koyulmuştur (Alpay, & Yeşilbağ, 2015; Becher ve ark., 2003). Yapılan çalışmalarda BVDV-1a antiserumu, dünya çapında yaygın olarak bulunan BVDV-1a, -1b ve -1d'ye karşı yüksek düzeyde nötralizan antikor titresini gösterirken, BVDV-1f ve BVDV-1l'ye (sırasıyla 1:20 ve 1:80) karşı önerilen koruyucu titrelerden oldukça düşük olduğu bildirilmiştir (Alpay, & Yeşilbağ, 2015) (Tablo 2). Bu durum BVDV suşları arasındaki epitop farklılığının varlığına işaret etmektedir. Serolojik ilişkilerin ve çapraz nötralizasyon seviyelerinin gösterilmesi, hastalık kontrol ve önleme politikaları için oldukça önemlidir. Farklı ülkelerde hali hazırda uygulanan BVDV kontrol ve eradikasyon programları bulunmaktadır. Bu programlardan birçoğu aşılama stratejilerini de kapsadığından, aşı suşu ve yukarıda bahsedilen saha suşları arasındaki serolojik farklılıklar dikkate alınmalıdır.

## 2.2. Epidemiyoloji

BVDV, sığırlar başta olmak üzere koyun, keçi, geyik, bizon, vahşi ruminantlar, devegiller ve domuz gibi diğer evcil hayvan türlerini de enfekte etmektedir (Evans ve ark., 2019) (Tablo 1). Dünyada yaygın olmakla beraber Türkiye'de 1980'li yıllardan itibaren virusun varlığı tespit edilmeye başlanmıştır (Burgu ve ark., 1990). Ülkemizdeki seroprevalans dağılımlarının %24,8-96,04 arasında değiştiği gösterilmiştir (Alkan ve ark., 2000; Alpay, Tuncer, & Yeşilbağ, 2014; Özan, Turan, Albayrak, & Cavunt, 2012). Türkiye'deki süt sığırları işletmelerinde persiste enfeksiyon oranlarının %0,07-0,5 arasında olduğu saptanmıştır (Burgu ve ark., 2003; Yılmaz, Altan, Ridpath, & Turan, 2012). Hastalık epidemiyolojisi açısından önemli olan persiste enfeksiyon sadece non-sitopatojen BVDV suşları tarafından oluşturulmaktadır (Grooms, 2004).

BVDV'nin bir sürüde devamlılığı ve yayılması, horizontal veya vertikal bulaşma yoluyla sağlanır. Horizontal bulaşma nazal-oral yol veya genital yolla direkt temas ile olurken; virus saçılımı vücut salgıları, atık materyali, kontamine aşılar ve biyolojik maddeler ile gerçekleşir. Persiste enfekte (PE) hayvanlar, yaşamları boyunca neredeyse tüm vücut sekret ve ekstremleriyle yüksek miktarda virus saçtıkları için sığır pestiviruslarının ana rezervuarı olarak kabul edilmektedir (Van Campen, & Frolich, 2001). Duyarlı sığırların enfeksiyonunun, PE hayvanla 1 saat süreyle temas ettikten sonra gelişebildiği rapor edilmiştir (Trávén, Alenius, Fossum, & Larsson, 1991). PE hayvanlar dışında akut enfekte sığırların da kısa bir süre için

duyarlı hayvanlara virüsü bulaştırdığı ve PE hayvanların yokluğunda bir sürü için enfeksiyonu sürdürmede yeterli olduğu düşünülmektedir (Van Campen, & Frolich, 2001). Akut enfekte hayvanların bulaştırıcı olduğu süre hayvanın sağlığına, stres düzeyine, yaşına ve diğer patojenlerin varlığına bağlı olarak değişmektedir (Fulton ve ark., 2000). Maternal antikorların varlığının, PE buzağılarda doğumdan itibaren ilk birkaç ay süreyle viral saçılım oranlarını geçici olarak azaltabileceği düşünülmektedir (Meyling, Houe, & Jensen, 1990). Ayrıca maternal antikorların varlığından kaynaklanan “kolostral tanı boşluğu” nedeniyle genç PE hayvanların belirlenmesinde yanlış negatif sonuç alınabilmektedir (Fux, & Wolf, 2012). PE buzağuları taşıyan gebe düveler genellikle “Truva düveleri” olarak anılır ve bu bireylerin teşhisi zordur. Sürüler arasında enfeksiyonu yaymasıyla alakalı yapılan bir çalışmada, etkili kontrol önlemlerinin yokluğunda PE doğumların yaklaşık %10'unun Truva düvelerinden kaynaklanabileceği gösterilmiştir (Reardon ve ark., 2018). Sığır pestiviruslarının sürüler arasında yayılmasını sağlayan durumlar arasında hayvancılık, ortak otlatma, farklı kaynaklardan hayvanların gruplandırılması, evcil ve yabani türler arasındaki temas ve sürüler arası temas olasılığını artıran diğer sığır yönetim stratejileri bulunmaktadır. Sığır pestiviruslarının kontamine altlıklar, fomitler, ekipman, makineler ve veteriner hekimler de dahil olmak üzere personel aracılığıyla enfekte hayvanlarla indirek temasla bulaşabileceği gösterilmiştir. Ayrıca virüsün semen, aşılardan veya FDS gibi kontamine biyolojik ürünlerin kullanımı ve sığır dışı rezervuar konakçılar nedeniyle yayıldığı da gösterilmiştir (Gunn, 1993). BVD yönünden pozitif çiftlikleri ziyaret ettikten sonra personel, araç ve ekipmanın kontaminasyon oranları hakkında çok az bilgi bulunmaktadır. Bununla birlikte, bu virüslerin konak dışında kısa bir süre için bile enfektif kalması, fomitlerin daha fazla dikkat gerektiren potansiyel bir bulaşma kaynağı olduğunu düşündürmektedir. Sinekler ve diğer kan emen böcekler gibi vektörlerin BVD virüsünün bulaştırılmasında rol oynadığını gösteren sınırlı düzeyde kanıt vardır (Chamorro ve ark., 2011). Sığır pestiviruslarının sıcaklık değerlerine göre değişikliklerle beraber çevresel şartlarda 3 günden 3 haftaya kadar aktif kalabileceği öne sürülmektedir (Botner, & Belsham, 2012).

### 2.3. Patogenez

BVD virusu hücreye giriş sırasında sığır CD46 molekülünü reseptör olarak kullanır. Hücre yüzeyine tutunmak için E<sup>tns</sup> proteini heparan sülfatla etkileşime girer. Daha sonra E2 proteini klattrin aracılı endositoz ile hücresel reseptör olan sığır CD46 molekülüne bağlanarak konakçı hücreye giriş yapar ve endozomal asitleşmeyle füzyon meydana gelir (Krey ve ark., 2006). Fakat yapılan bazı çalışmalarda, NADL- BVDV suşunun CD46'dan bağımsız bir mekanizma yoluyla enfekte hücrelerden duyarlı hücrelere yayılabildiği gösterilmiştir. Ayrıca CD46 reseptörüne E2 proteininin bağlanması için diğer hücresel proteinlerin de gerekli olduğu tespit edilmiştir (Riedel ve ark., 2020). Bununla birlikte viral zarfta bulunan kolesterol ve sfingomyelin BVDV girişi için önem arz etmektedir (Callens ve ark., 2016). Sığırların BVDV enfeksiyonlarına duyarlılığı esas olarak sığırların hücresel kromozom 2 (BTA2) ve 26 (BTA26) üzerindeki bazı lokuslarla ilişkilendirilmiştir. Bu bölgelerin PE-BVDV enfeksiyonlarına karşı hayvanları duyarlı hale getirdiği düşünülmektedir (Al-Kubati ve ark., 2021). Duyarlı hayvanlarda BVDV enfeksiyonunun sonuçları, esas olarak hayvanların gebelik durumu, yaşı, fizyolojik durumu, virus suşunun virülensine ve biyotipine bağlı olarak değişmektedir.

#### 2.3.1. Prenatal Dönemde BVDV Enfeksiyonu

Gebe sığırların BVDV enfeksiyonlarında erken embriyonik ölüm, fötüs üzerinde teratojenik etkiler ve PE hayvanların gelişimi gibi çeşitli klinik tablolar görülür. Hayvanın gebelik süresinde gerçekleşen intrauterin enfeksiyon gebelik dönemine ve viral biyotipe bağlı olarak farklı sonuçlanmaktadır (Oguejiofor, Thomas, Cheng, & Wathes, 2019). Gebe hayvanların akut enfeksiyonu sonucunda virus transplasental yolla plasentayı geçerek fötüsü enfekte eder. BVD virusunun her üç genotipinde (BVDV-1, BVDV-2 ve BVDV-3) bulunan cp ve ncp virus suşları plasentayı geçebilmektedir (Arenhart, Bauermann, Vogel, Weiblen, & Flores, 2010). Bununla birlikte immunotolere PE hayvanların doğumundan sorumlu virus suşları sadece ncp BVDV suşları olup, cp suşlar ise sıklıkla fötal hasara yol açar (Vanroose, Nauwynck, Soom, Vanopdenbosch, & Kruif, 1998). Gebeliğin erken dönemlerinde (45. günden önce) gerçekleşen enfeksiyonlar embriyonik ölümlerle ve rezorbsiyonla sonuçlanmaktadır (Oguejiofor ve ark., 2019). Gebeliğin 45. gününden sonra gerçekleşen fötal enfeksiyonlar abort, ölü doğum, teratojenik etkiler, PE ya da

seropozitif normal görünümlü buzağı doğumuyla sonuçlanır. Gebeliğin birinci trimesterinde (0-90. günler) fötusun immun yanıt oluşturma yeteneği henüz tamolarak gelişmediği için virusun antijen olarak algılanmadığı durumlar gelişebilmektedir. Böyle bir durumda fötusun immunokompetansı geliştiğinde (90-120. günler) virusu kendi yapısı gibi tanımlayıp virusa karşı immun yanıt gelişmemekte ve immunotolerans oluşmaktadır. İmmunotolerans persiste hayvanların doğumu söz konusu mekanizmayla meydana gelmektedir. Bu hayvanların immunosupresyondan dolayı yaşamlarının ilk dönemlerinde sekonder enfeksiyonlara yatkın olduğu görülür (Grooms, 2004).

Gebeliğin ikinci trimesterinde (90-180. günler) gelişen fetal enfeksiyonlar kongenital anomalilerin şekillenmesine neden olabilmektedir. Organogenezin tamamlanmasından önce gerçekleşen süreçte BVDV teratojenik etkilere sebep olur. Fötusta beyin, timus, kaslar, kemik ve akciğer gibi organlar etkilenir (Ridpath, 2005). Virus merkezi sinir sistemi vasıtasıyla beyin ve beyinciğe geçerek bu dokularda replike olur. Serebellar hipoplazi, mikroensefali, üst damakta yarıklık, retinal displazi, retinada pigment kaybı, retinal atrofi ve ekstremitelerdeki gelişme anomalileri en sık karşılaşılan bulgulardır. Söz konusu bulgular aynı zamanda *Artrogriposahidranensefali* (A&H sendromu) olarak adlandırılmaktadır. Gebeliğin üçüncü trimesterinde ise fötusun immun yanıt mekanizması gelişmiş olduğu için meydana gelen enfeksiyonu atlatabilmektedir (Blanchard, Ridpath, Walker, & Hietala, 2010). Doğan buzağılar BVDV yönünden (-), BVDV antikorları yönünden (+) tespit edilebilir (Yeşilbağ, 2021).

### **2.3.2. Postnatal Dönemde BVDV Enfeksiyonu**

Postnatal dönemde BVD virusunun organizmaya girişi genellikle damlacık yoluyla veya genital kanal yoluyla gerçekleşir. Virus nazal veya orofarengeal mukozal epitelde ve ilişkili lenfoid dokularda çoğalır. Ardından viremi safhasıyla virus akciğer, karaciğer, dalak, pankreas, böbrek, ovaryum ve testis gibi farklı dokulara yayılarak sistemik enfeksiyonlara neden olur (Marshall, Moxley, & Kelling, 1996). Enfeksiyöz virus, enfeksiyondan 4-15 gün sonra kandan veya nazalakıntılardan izole edilebilir. Bununla birlikte, virus fagositler aracılığıyla da periferik lenfoid dokulara geçebilmektedir. Enfekte hayvanlarda B ve T lenfosit sayıları azalarak immun supresyona neden olur ve bu hayvanlar sekonder enfeksiyonlara karşı predispoze hale gelir. Spesifik nötralizan antikorlar, enfeksiyondan 10-14 gün sonra düşük bir seviyede

ortaya çıkar, ancak titreleri 8-10 hafta boyunca virusun immun supresif etkisinden dolayı yavaş yavaş artmaya devam eder (Strong ve ark., 2015).

Enfeksiyonu oluşturan virus suşunun virülensinin düşük ya da yüksek olması virus saçılımını, afinite gösterdiği dokuları, virusun dokulardan eliminasyonunu, lenfosit sayısındaki azalma oranını ve enfeksiyonun seyrini etkilemektedir. BVDV-2 genotipinde yüksek virulense sahip bazı ncp suşlar kemik iliği enfeksiyonuna yol açarak trombosit yıkımlanmasına neden olur. Trombosit sayısının azalmasına bağlı olarak kanamalarla ve yüksek mortaliteyle ilişkili BVD'nin farklı bir klinik tablosu olan *hemorajik-trombositopenik formu* meydana gelir (Kelling, 2004).

Ncp BVDV ile persiste enfekte olan buzağuların cp virus suşu ile süper- enfekte olmasıyla gelişen patojenik mekanizmalar sonucunda *Mukoza hastalık formu* (Mukoza hastalığı, MD) gelişmektedir. Hastalığın gelişmesindeki önemli nokta süper-enfekte edici cp BVDV'nin, antijenik olarak benzer veya ncp suş ile yakından ilişkili olmasıdır. Hayvanlar süper-enfeksiyona sebep olan cp virusu horizontal yolla dışardan alabilirler. Ancak daha yüksek olasılıkla persiste enfeksiyona sebep olan ncp virusunun mutasyon sonucunda cp virusa dönüşmesiyle ortaya çıkar. Deneysel koşullar altında, MD 2 ile 3 haftalık kısa bir inkübasyon süresinden sonra meydana gelir (erken başlangıçlı MD) ve hücrel immun yanıt gelişmeden kısa sürede ölüm gerçekleşir (Fritzemeier, Haas, Liebler, Moennig, & Greiser-Wilke, 1997). Söz konusu cp BVDV suşu, bağırsakla ilişkili lenfoid dokular ve Peyer plaklarına özel bir tropizme sahiptir (Ohmann, 1988). Peyer plaklarındaki lenfoid dokunun yıkımlanması ve cp BVDV'nin doğrudan etkisine bağlı olarak bağırsak mukozasında lezyonlar gelişir (Liebler, Waschbüsch, Pohlenz, Moennig, & Liess, 1991). Süperenfekte edici cp BVDV suşu, ncp BVDV suşundan antijenik olarak farklı olduğunda, persiste ncp ve süper-enfekte eden cp virusu arasında rekombinasyon olayını içeren farklı bir patojenik mekanizma gelişir. Bu durumda, inkübasyon periyodu birkaç aya kadar uzayabilir (late onset, geç başlangıçlı MD) ve süperenfekte edici cp BVDV'ye karşı yüksek titrelerde nötralizan antikor üretilir. Virusun immunosupresif etkisinden dolayı enfekte hücrelerde elimine edilemeyen cp

virüsler, persiste ncp virüsler ile rekombinasyona uğrayarak antijenik olarak birbirine yakın yeni alt gruplar ortaya çıkabilir. Bu alt gruplar, MD'yi yayabilir ve indükleyebilir (Fricke, Gunn, & Meyers, 2001). Geç başlangıçlı MD'ye özgü lezyonlar sadece cp BVDV'nin doğrudan cp etkisinin sonucu değil, aynı zamanda virusa özgü immun komplekslerin lenfosit göçünü ve diğer immunolojik reaksiyonları indüklemesiyle ortaya çıkar (Sentsui, Nishimori, Kirisawa, & Morooka, 2001).

## **2.4. Klinik Bulgular**

BVD olguları, subklinik enfeksiyonlardan mukozal hastalık olarak bilinen oldukça ölümcül enfeksiyona kadar uzanan geniş bir klinik form yelpazesi ile sonuçlanabilir. BVDV enfeksiyonunda klinik bulgular, birçok faktöre bağlı olarak değişir. BVDV enfeksiyonunun klinik sonucunu etkileyen konakçı faktörleri arasında BVDV'ye karşı bağışıklık veya immun toleransı, gebelik durumu, fötusun yaşı, bağışıklık durumu ve çevresel stres düzeyi yer alır. İzolatlar arasındaki virülens ve sitopatojenite farklılıkları kadar genetik çeşitlilik de enfeksiyonun sonucunu etkiler (Fulton ve ark., 2003).

### **2.4.1. İmmunokompetan ve Gebe Olmayan Sığırlarda Akut BVDV Enfeksiyonları**

BVDV'ye karşı seronegatif ve immun sistemi gelişmiş sığırlarda, BVDV enfeksiyonlarının çoğunluğu (%70-90) subkliniklidir. Bu enfeksiyonların muhtemel kaynağı persiste enfekte sığırlardır. Subklinik enfeksiyonlu sığırlarda lökopeni ve hafif ateşin yanısıra süt üretiminde düşüş gözlemlenir (Moerman ve ark., 1994). BVDV'ye özgü antikor yanıtı gelişir. Akut enfeksiyon formu yüksek morbidite ve düşük mortaliteyle karakterize olup cp veya ncp virüs suşları tarafından meydana gelmektedir. İnkübasyon süresi yaklaşık 5-12 gün arasında olup bunu geçici bir ateş (40° C) ve lökopeni izler. Viremi enfeksiyondan 4-5 gün sonra ortaya çıkar ve 15 güne kadar devam edebilir (Brownlie, Clarke, Howard, & Pocock, 1987). Klinik semptomlar arasında depresyon, anoreksi, okulonazal akıntı, bazen erozyonlar ve ülserasyonlar ile karakterize oral lezyonlar, ishal ve süt veriminde azalma bulunur. Akut enfekte hayvanlarda PE hayvanlara nazaran daha düşük virus saçılımı bulunmaktadır.



BVDV akut enfeksiyonunun diğeri bir formu ilk olarak Kuzey Amerika'da bildirilen (Rebhun ve ark., 1989) ve diğeri ÷lkere yayılan akut ncp BVDV-2 ile ilişkili hemorajik sendromdur. Hastalık kanlı ishal, ateş, burun kanaması, mukoz membranlarda peteşiyal ve ekimotik kanamalar, lökopeni, süt veriminde azalma ve enjeksiyon yerlerinden kanama ile sonuçlanan belirgin trombositopeni ile karakterizedir. BVDV-2 izolatlarının tümü klinik olarak şiddetli hastalığa neden olmamaktadır. Düşük virülensli BVDV-2 izolatlarının doğada virulent BVDV-2'ye göre baskın olduğu bildirilmiştir. Düşük virülensli BVDV-2 suşlarıyla enfeksiyon, hafif bir ateş yükselmesinin eşlik ettiği lökopeniye neden olmaktadır (Ridpath, Neill, Frey, & Landgraf, 2000).

#### **2.4.2. İmmunokompetan Gebe Sığırlarda BVDV Enfeksiyonları**

BVDV, gebe sığırlarda fötusa transplasental yolla geçerek enfeksiyona neden olur. Fötal enfeksiyon sonucunun temel belirleyicisi, transplasental enfeksiyonunmeydana geldiği gebelik dönemidir (Houe, 1993). Hem cp hem de ncp BVDV, transplasental enfeksiyona ve fötal kayıplara neden olabilir, ancak ncp enfeksiyonu daha yaygındır (Dubovi, 1992). Sığır popülasyonunda virusun baskın suşlarının biyotipi ncp karakterdedir ve sadece ncp suşlar immunotoleransa neden olur. Fötusun0-100 günlük dönemdeki transplasental enfeksiyonu, erken embriyonik ölüm ve rezorpsiyona neden olabilir. Fötusun atılması süreci, fötal enfeksiyondan sonraki günlerden birkaç aya kadar değişir. İmmunokompedans gelişmeden (90-120. günler) önce ncp BVDV enfeksiyonu, PE buzağuların doğmasıyla sonuçlanır. İmmunotolerans gebeliğin 100. gününden sonra nadir olarak gelişmekle birlikte, gebeliğin 125. gününde de ortaya çıkabilir (Liess ve ark., 1984). Bu hayvanlar yaşamları boyunca BVDV antijen testlerinde (+) sonuç verirler (Yeşilbağ, 2021).

Fötal immunotolerans gelişmeden 100-150 günler arasında fötusun transplasental enfeksiyonu BVD virusunun hücreli gelişme inhibisyonu, hücre farklılaşması veya hücre lizisi üzerindeki etkisinden dolayı farklı konjenital defektlerle sonuçlanabilir (Houe, 1993). BVDV ile ilişkili konjenital defektler arasında mikroensefalopati, serebellar hipoplazi, hipomiyelinogenez, retinal atrofi ve displazi, mikroftalmi, timik hipoplazi, alopesi, brakignatizm ve iskelet kusurları bulunur (Blanchard ve ark.,2010). Fötusun immunokompetan hale geldiği gebeliğin son aşamalarında konjenital

defektler nadirdir. Gebeliğin 150. gününden sonra BVDV ile enfekte olan buzağular seropozitif olarak doğar. Gebeliğin geç dönemindeki fetal enfeksiyonlar abortlarda sonuçlanabilir fakat enfeksiyona bağlı abort oranı düşüktür (%2-7) (Liess ve ark., 1984).

### **2.4.3. İmmunotolere Persiste Enfekte Sığırlarda BVDV Enfeksiyonları**

BVDV'ye karşı immunitoleranslı ve persiste enfekte doğan sığırlar sürekli viremik durumdadır. Sağlıklı görünümlü olabilen bu hayvanlar yaşamları boyunca devamlı olarak virus saçarlar ve duyarlı hayvanlar için risk oluştururlar. PE buzağular yaşamlarının ilk yılında yaklaşık %50 ölüm oranına sahiptirler. Bazı PE buzağular cılız doğar ve daha yavaş büyüme hızına sahiptirler (McClurkin ve ark., 1984). Bununla birlikte PE hayvanlarda glomerülonefrit ve ensefalit gibi subklinik hastalıklar tanımlanmıştır (Hewicker, Trautwein, Stah, & Liess, 1987). Virusun immunosupresif etkisinden dolayı bakteriyel, paraziter ve viral etkenlere bağlı enfeksiyonlara yatkın olup sıklıkla pnömoni ve enterit tablosu gelişir. PE sığırlar, BVDV'nin heterolog suşlarına karşı immün yanıt geliştirebilir (Houe, 1993).

### **2.4.4. Mukoza Hastalığı (MD)**

MD, BVDV enfeksiyonunun sporadik bir formudur ve genellikle 6 ay ile 2 yaş arasındaki sığırlarda görülür. Morbidite %5'in altındadır, ancak letalite oranı %100'e yaklaşmaktadır. Akut MD ateş, depresyon, halsizlik ve anoreksi ile karakterizedir. Kalp ve solunum hızları yüksektir ve hastalık ilerledikçe asidozlu dehidrasyon gelişir. Laktasyondaki süt sığırlarında süt üretimi azalır. Ölüm süresi 2-3 gün ile 3 hafta arasında değişmektedir. Ağız boşluğundaki lezyonlar dudaklar, dişeti kenarları, dil ve arka damakta gelişir. Dış burun deliklerinde ve burun boşluğunda, vulva ve meme başlarında eroziv lezyonlar gelişebilir. Mukopurulan oküler akıntı sıklıkla aşırı lakrimasyon ve kornea ödemi ile gözlenir. Bol, sulu ishal genellikle klinik belirtilerin başlamasından 2-3 gün sonra meydana gelir. Perakut vakalarda, ishalin başlamasından önce ölüm meydana gelebilir. Şiddetli lökopeni, hastalığın erken evrelerinde fark edilir (Fricke ve ark., 2001).

Kronik MD, iştahsızlık ve kilo kaybı ile karakterizedir. İshal sürekli veya aralıklı olabilir. Burun akıntısı ve persiste oküler akıntı sık görülür. Alopesi ve hiperkeratinizasyon gelişebilir. Ağızda ve ciltte uzun süreli eroziv lezyonlar bulunur.

Laminitis, interdigital nekroz ve ayak deformiteleri nedeniyle uzun süreli topallık gelişebilir. Anemi, lökopeni, nötropeni ve lenfopeni ile sonuçlanan pansitopeni gelişir. Sekonder bakteriyel enfeksiyonlar yaygın olarak görülür. Kronik MD'li sığırlar genellikle yaklaşık 18 aylıkken ciddi komplikasyonlar neticesinde ölür. Bununla birlikte bazı hayvanların iyileşebildiği tespit edilmiştir (Edwards, Wood, Brockman, & Ibata, 1991).

## 2.5. İmmun Yanıt

BVDV enfeksiyonunun önemli sonuçlarından biri persiste enfeksiyon, diğeri ise düzensiz immün yanıt (Chase, 2013). BVDV ile doğal enfeksiyondan sonra virusa özgü humoral ve hücreli immün yanıt aktive olur (Collen, & Morrison, 2000). Humoral ve hücre aracılı immün yanıtları yönlendirmedeki merkezi rolleri nedeniyle NS3 ve E2 proteinlerini hedefleyen CD4+ yardımcı T hücreleri, virusa karşı koruyucu bağışıklığın geliştirilmesinde kilit hücrelerdir. CD4+ T yardımcı hücrelerinin azalması, kanda daha yüksek viral yük, uzun süreli viremi ve nazal yoldan virus saçılımı ile ilişkilendirilmiştir (Howard, Clarke, Sopp, & Brownlie, 1992). B hücresi aktivasyonundan sonra, enfeksiyonun 14. gününden itibaren nötralizan antikorlar saptanabilir (Collen, & Morrison, 2000). Nötralizan antikorlar esas olarak yüzey proteini E2'yi hedeflerken, Erns'e özgü antikorlar daha az nötralizan aktiviteye sahiptir. Yapısal proteinlerden E1 ve yapısal olmayan protein NS2-3 güçlü şekilde antikor yanıtını indüklerken, C yapısal proteini B hücresi aktivasyonunu ve antikor üretimini indüklememektedir (Donis, 1995). Virus biyotipinin BVD virusuna karşı immün yanıtının seyri üzerindeki etkisini araştıran çalışmalarda ncp-BVDV'nin humoral bağışıklığı indükleme potansiyelinin daha yüksek olduğunu gösterirken, cp-BVDV ile enfeksiyonda ise daha etkili bir hücre aracılı immün yanıtın geliştiği gösterilmiştir (Maldonado ve ark., 2020). Kolostrum alımı, yeni doğan buzağılara doğumdan sonraki ilk haftalarda BVDV enfeksiyonundan koruyucu nitelikte maternal antikor sağlar. Bununla birlikte, maternal antikorların aracılık ettiği koruma 9 aya kadar sürebilir. Yeni doğan hayvanda koruma süresi, esas olarak kolostrumun maternal antikorlarının titresindeki azalmaya bağlıdır. Maternal antikorlar pasif bağışıklık ve erken koruma için önemli olsa da, aşılanmış yeni doğan buzağılarda aktif bağışıklık yanıtlarının oluşmasını engelleyebilirler (Al-Kubati ve ark, 2021).

BVDV dahil birçok virus, başarılı viral replikasyon ve konakçıdan yayılmayı sağlamak amacıyla konakçı immun sistemini baskılayarak immun sistemden kaçış stratejisi kullanır. Bu stratejiler virusun çoğalmasını, yayılmasını, virusun yeni varyantlarının ve suşlarının ortaya çıkmasını desteklemektedir. Öte yandan bu durum virusun yeni ortaya çıkan suşlarını tanımlamak için güncel olarak kullanılan testlerin güvenilirliğini olumsuz etkilemektedir (Abdelsalam ve ark., 2020).

BVDV'nin immunosupresif etkileri, bağışıklık hücrelerinin dağılımındaki değişiklikleri, lökositlerin immunofenotipinin değişmesini ve bağışıklık hücre fonksiyonundaki çeşitli yetersizlikleri içerir. Lenfatik dokulardaki ve periferik dolaşımdaki T ve B lenfositlerinin azalması, hücresel ve humoral immun yanıtıninhibe etmektedir. Deneysel olarak BVDV ile enfekte edilen sığırların lökogramında toplam lökosit, nötrofil, lenfosit ve trombosit sayısında azalma ile karakterize önemli değişiklikler meydana gelir (Kelling ve ark., 2002). BVDV'nun ayrıca hem miyeloid hem de lenfoid hücre fonksiyonları üzerinde inhibitör etkisi bulunmaktadır. BVDV ile doğal olarak enfekte olmuş hayvanlardan elde edilen sığır periferik mononükleer kan hücreleri, enfekte olmamış hayvanlardan alınan hücrelere kıyasla daha yüksek bir apoptoz yanıtı göstermiştir (Risalde ve ark., 2020).

BVDV'nin nötrofiller üzerindeki inhibitör etkisi suşa özgü bulunmuştur (Thakur ve ark., 2020). Farklı BVDV suşları ile enfekte olmuş makrofajlardan toplanan süpernatantın, makrofaj inflamatuvar yanıtı ve lenfosit apoptozu üzerindeki etkisini araştıran bir çalışmada yüksek derecede virülent ncp-BVDV ile ilişkili immun disfonksiyonda makrofajlar tarafından salgılanan aracılardan rolü ortaya konulmuştur (Abdelsalam ve ark., 2020).

Daha önce yapılan çalışmalarda, ncp suşların interferon yanıtı üzerindeki baskılayıcı etkisinin persiste enfeksiyon oluşumunda bir rolü olduğu öne sürülmüştür (Peterhans, Jungi, & Schweizer, 2003). Ancak son çalışmalar, ncp-BVDV ile transplasental enfeksiyondan sonra PE fötüslerde önemli bir IFN-alfa (IFN- $\alpha$ ), IFN-beta (IFN- $\beta$ ) ve IFN-gama (IFN- $\gamma$ ) yanıtının indüklendiğini ve kontrol grubu fötüslerine kıyasla PE fötüslerinden alınan karaciğer dokularında MHC sınıf I ve II moleküllerini eksprese eden hücrelerin daha yüksek sayıda olduğu gösterilmiştir (Nilson ve ark., 2020; Smirnova ve ark., 2014). İmmun yanıtın virüsü elimine

etmedeki başarısızlığının ardındaki neden ve immunotolere persiste enfeksiyon oluşma mekanizması üzere çalışmalar devam etmektedir.

Doğal immun sistem hücreleri tarafından salgılanan önemli bir sitokin olan Tip I IFN'ler, enfekte olmamış hücreleri korumakla birlikte makrofajları, dendritik hücreleri, doğal ve edinsel immun sistemde yer alan diğer hücreleri aktive ederek viral replikasyonu önlemektedir. Bu sitokinler ayrıca virusa özgü sitotoksik T hücrelerinin farklılaşmasını artırarak edinsel immun yanıt için anahtar bir rol üstlenir (Stetson, & Medzhitov, 2006). Yakın tarihli bir çalışmada BVDV Npro proteininin doğal bağışıklığı uyaran bir hücre proteini olan S100A9 aktivitesini baskıladığı ve bunun da tip I IFN üretiminin azalmasına neden olduğu bildirilmiştir (Darweesh ve ark., 2018). Diğer taraftan hem cp hem de ncp BVDV enfeksiyonu, sığır hücrelerindedoğal immun yanıtı bozabilen ve BVDV replikasyonunu kolaylaştırabilen otofajiyi uyarmaktadır (Zhou ve ark., 2017).

## **2.6. Teşhis Yöntemleri**

BVDV enfeksiyonunda akut ve persiste enfekte hayvanlar arasında etkili birayırım yapmak, sığır pestiviruslarının teşhisi kontrolünde kritik öneme sahiptir. Sığır pestivirusları için mevcut tanı testleri virusa özgü antikorları (Ab), virusa özgü antijenleri (Ag), viral RNA'yı veya virusun kendisini tanımlamak için kullanılır. Fakat RNA viruslarının tabiatı gereği mutasyonlara açık olması nedeniyle BVDV suşlarının antijenik yapısı değişmekte, dolayısıyla hem antikor hem de antijen tespit yöntemlerinde farklı sonuçlar alınabilmektedir (Yeşilbağ, 2001)

### **2.6.1. Antikor Tespiti**

Virusa özgü antikor tespit yöntemleri, ağırlıklı olarak daha önce virusla enfekte olan veya aşılama nedeniyle dolaşımda antikora sahip hayvanları belirlemek için kullanılır. Sığır pestiviruslarına spesifik antikorları tanımlamaya yönelik tanı testleri arasında enzim linked immunosorbent testi (ELISA), virus nötralizasyon testi (VNT) veya daha az sıklıkla agaroz jel immunodifüzyon (AGID), indirekt immunofloresan testi (IFAT) ve indirekt immunoperoksidaz testi bulunur. VNT yöntemiyle yapılan testler, çapraz nötralizasyon sonuçlarına dayalı olarak pestivirus türleri arasında ayırım yapabilme özelliğinden dolayı, sığır pestivirusu antikor tespiti için altın standart olarak kabul edilmektedir. Ancak virus nötralizasyon testinde kullanılan

biyolojik ürünlerin ve hücrelerin pestivirus kontaminasyonu yönünden kontrol gereksiniminin olması ve zaman alıcı olması sebebiyle antikor tespiti yönelik testlerde yarışmalı veya indirekt ELISA uygulamaları ticari olarak daha erişilebilir hale gelmiştir. Bu teknikler son derece duyarlı ve spesifik olmaları ve çok sayıda numuneyi kısa sürede test etme olanağı sayesinde rutinde daha yaygın olarak kullanılmaktadır. Antikor ELISA protokollerinin tek tek veya havuz halinde serum, plazma ve süt numunelerinde kullanılması mümkündür. Bununla birlikte, ELISA'lar aşılama ve doğal enfeksiyon sonucunda gelişen antikorlar arasında ayırım yapamaz (Bauermann, Flores, & Ridpath, 2012). AGID'nin aşılanmış ve doğal antikorlar arasında ayırım yaptığı gösterilmiştir (Kirkland, & Mackintosh, 2006). BVD'ye ve ilgili pestiviruslara karşı antikor negatif tespit edilen hayvanlar genellikle BVD enfeksiyonlarına duyarlı olarak kabul edilir. Fakat BVD ile persiste enfekte hayvanlarda da tipik olarak immun yanıt gelişmediği için antikor negatif olarak tespit edilir. Bununla birlikte antikor pozitif tespit edilen hayvanlar genellikle PE olarak kabul edilmez. Çünkü kolostral antikor alan genç PE hayvanlarda veya heterolog pestivirusla enfekte PE hayvanlarda antikor saptanabilir (Fulton ve ark., 2003). Bu nedenle, aktif olarak enfekte olmuş sürülerden alınan bireysel antikor sonuçları yorumlanırken dikkatli olunması gerekir ve sürü taraması yapılırken sonuçlar antijen testlerine dayandırılmalıdır.

### **2.6.2. Antijen/Virus Tespiti**

Sığır pestiviruslarıyla enfekte olmuş hayvanlar viral antijen ve RNA tespiti veya virus izolasyon çalışmalarıyla belirlenebilir. Bu amaçla virus izolasyonu (Vİ) altın standart olarak kabul edilmektedir. Genel olarak tam kan, serum, lökosit ve dalak gibi çok çeşitli biyolojik numuneler kullanılarak virus izolasyonu gerçekleştirilebilir. Virus izolasyonu gerçekleştirmek için daha yüksek maliyet, zaman ve uzmanlığa gereksinim duyulduğundan kontrol programlarında nadiren kullanılır. Bu yüzden yaygın olarak kullanılan yöntemler arasında kan, süt ve doku örneklerini test etmek için kullanılabilen antijen ELISA protokolleri ve kan, süt, sperma ve doku örneklerini test etmek için kullanılan reverz transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (real time RT-PCR) protokolleri bulunmaktadır. Kulak çentikleri gibi doku örneklerini test etmek için kullanılan ELISA veya immunohistokimyasal (immunoperoksidaz testi-IIPMA) yöntemleri geliştirilmiştir (Hilbe ve ark., 2007).

Akut ve PE hayvanlar arasında doğru bir şekilde ayırım yapabilmek için takip testlerinin yapılması gereklidir. İlk testten en az 3 hafta sonra alınan pozitif sonuç, persiste enfeksiyonu doğrulayacaktır. Post-mortem doku numunelerinde BVDV pozitif test edilen hayvanların PE olma olasılığı yüksek olsa da, tek bir numuneye dayalı antijen testleri persiste ve akut enfeksiyon arasında ayırım yapmak için yeterli değildir (Fulton ve ark., 2006).

## 2.7. Koruma Kontrol

BVD kontrol ve eradikasyon programının temel ilkesi, bir popülasyonda PE hayvanların prevalansını azaltmak ve yeni PE hayvanların doğmasını önlemektir. Bu programlar; (a) PE hayvanları belirlemek için test et ve ayıkla; (b) Bir popülasyona virus bulaşmasını azaltmak için biyogüvenlik önlemleri ve/veya (c) Aşılama gibi yöntemleri içermektedir (Lindberg ve ark., 2006). BVD'ye karşı aşılamanın ilk zamanlardaki asıl amacı, fütal korunmaya bakılmaksızın virusun neden olduğu klinik bulguların ve geçici immunosupresyonun önlenmesiydi. Bu nedenle aşılama, yeni PE sığırlarının ortaya çıkmasını etkin bir şekilde engelleyememiştir. PE hayvanların rolü anlaşıldığında ise aşılama birincil hedef fütusun korunması olmuştur. Özetle sığır pestiviruslarına karşı aşılama viral bulaşmayı azaltmayı, sürü bağışıklığını oluşturmayı, antikor titrelerinin düşmesiyle doğum sonrası buzağuları enfeksiyona karşı korunmasını, fütal kayıpları ve sürekli devam eden PE buzağuların doğumuna neden olabilecek fütal enfeksiyonların önlenmesini amaçlar (Moennig, & Becher, 2018). Bir enfeksiyonun elimine edilmesi temel olarak Bulaştırma Katsayısı ( $R_0$ ) < 1 olduğunda gerçekleşebilir (Lindberg, & Houe, 2005). Fakat yoğun aşılama çalışmalarına rağmen BVD prevalansını değiştirmedeği görülmüştür (Moennig ve ark., 2005). Bu başarısızlığın nedeni, BVD enfeksiyonlarının yol açtığı persiste enfeksiyon mekanizmasına dayanmaktadır. Virus rezervuarı oldukları için, sürüde PE sığırların varlığında sadece %100'lük bir popülasyon bağışıklığının yeni PE buzağuların ortaya çıkmasını engelleyeceği kabul edilir. Bu durum, bir veya birkaç PE hayvanlı küçük sürülerde uygulanabilir olsada saha koşullar altında büyük sürülerde %100 bağışıklığın elde edilmesi neredeyse imkansız olduğundan ülke bazında sürdürülebilir BVD kontrolü için “sadece aşılama” stratejisi yeterli olmamaktadır (Ståhl, & Alenius, 2012).

BVD'nin sığır üreticiliğinde neden olduğu önemli ekonomik kayıplar nedeniyle Norveç, İsveç, Danimarka, Finlandiya, Avusturya, İsviçre, İrlanda, İskoçya, İngiltere, Galler, Almanya, Kuzey İrlanda, Belçika, Hollanda ve ABD dahil olmak üzere birçok ülke BVDV enfeksiyonlarını kontrol etmeyi veya elimine etmeyi amaçlayan zorunlu veya gönüllü kontrol programları uygulamışlardır. Kontrol programları, hastalık prevalansını nispeten düşük ve yönetilebilir bir düzeye indirmeyi amaçlarken, eradikasyon programları sürülerde hastalığın devamlı olarak ari olmasını amaçlar (Houe, Lindberg, & Moennig, 2006). BVD ile ilgili olarak her iki hedefin de ulusal, bölgesel veya bireysel çiftlik düzeyinde gerçekleştirilebilir olduğu gösterilmiştir. En yüksek BVD prevalansları, herhangi bir BVD mücadele programı uygulamayan ülkelerde belirlenmiştir (Scharnböck ve ark., 2018).

### **2.7.1. Aşılama İçermeyen BVD Kontrol Programları**

BVDV tespiti için ELISA ve PCR gibi tanı yöntemleri kullanılarak PE hayvanların belirlenmesiyle ve sığır popülasyonlarındaki BVDV rezervuarları elimine edilmektedir. Eradikasyon programı için tanı yöntemlerinden ilk yararlananlar İskandinav ülkeleri olmuştur (Moennig, & Becher, 2018). Bu ülkelerde BVD aşısı hiç kullanılmadığından, serolojik yöntemlerle aktif BVD enfeksiyonu bulunan sürüler belirlenmiştir. Rastgele kan veya ortak süt numuneleriyle tespit edilen PE hayvanlar sürüden çıkarılmış ve virusun daha fazla yayılmasını önlemek için enfekte sürülerin hareketleri kısıtlama altında tutulmuştur. Sürüler, virus elimine edilene kadar gözlemlenmiş ve sürü bazında PE hayvanlardan temizledikten sonra sığırlar düzenli olarak takip edilmiştir (Valle ve ark., 2005). İsveç, Norveç, Danimarka, Finlandiya gibi İskandinav ülkelerindeki zorunlu eradikasyon programları başarılı olmuş ve birkaç yıl içinde ülkeler BVDV'den büyük ölçüde arındırılmıştır. İskandinav programlarının başarısından sonra Avusturya, 2004 yılında benzer bir zorunlu kontrol programı başlatmıştır (Schoepf ve ark., 2016). Yüksek prevalansa (>% 80 BVD antikor pozitif sığır) sahip olan İsviçre ise BVD zorunlu kontrol programına 2008'de başlamıştır. 2013'ten itibaren serolojik sörvelans programı başlatılmıştır (Bachofen ve ark., 2013). İskandinavya ve Avusturya'da olduğu gibi, İsviçre'de de BVD'ye karşı aşılama yasaklanmıştır. Öte taraftan BVD'yi aşılama olmadan kontrol etmeye çalışmak büyük bir problem ortaya çıkarmıştır. Genelde endemik BVD enfeksiyonuna sahip sığır popülasyonlarında seroprevalans



yüksektir ve hayvanların yaklaşık %90 seropozitifdir. Nispeten az sayıda duyarlı sığır bulunduğu için sürülerde oluşacak yeni enfeksiyonların olumsuz etkisi sınırlıdır. PE hayvanlarının sistematik olarak çıkarılmasıyla, bulaşıcılık büyük ölçüde azalır ve sığır popülasyonu zaman içinde seronegatif hale gelir. Fakat BVDV'nin duyarlı sürülere yeniden bulaşmasıyla gelişecek akut klinik hastalık tablosu maksimum hasarla sonuçlanır. Bu etki, aşılama içermeyen sistematik kontrol programlarına sahip hemen hemen tüm ülkelerden bildirilmiştir (Bitsch, Hansen, & Rønsholt, 2000). Sonuç olarak, bu bölgelerde epidemiyolojik araştırmalar yoğunlaştırılmıştır (Stalder ve ark., 2016). Söz konusu programlar pahalı, yoğun ve uygulanması uzun zaman almaktadır. Aşı programlarının eklenmesi, hastalık kontrolü için uygun maliyetli bir önlem olmaya devam etmektedir (Scharnböck ve ark., 2018; Van Oirschot, Brusckke, & Van Rijn, 1999).

### **2.7.2. Kombine Kontrol Programları**

Başarılı bir BVD kontrol programının temel aşaması PE hayvanların elimine edilmesidir. Bu hipoteze dayalı olarak, 1980'lerin başında Almanya'daki ilk gönüllü kontrol programıyla PE ve viremik hayvanlar sürüden çıkarılmıştır (Stahl, Liess, Dahle, Frey, & Grunert, 1987). Bununla beraber tüm PE hayvanların çıkarılmasıyla sürüler seronegatif hale geldiği için yeni enfeksiyonlara karşı tamamen açık konuma gelmiştir. Hastalık kontrol programı zorunlu olmadığı için, programa katılmayan komşu sürülerin bulaştırma riski yüksek olduğundan ciddi ekonomik sonuçları olan yeni enfeksiyonlar meydana gelmiştir. Yeniden enfeksiyonu önlemek için var olan politika değiştirilmiş ve PE sığırların temizlenmesinden sonra sürülerin aşılmasına karar verilmiştir (Greiser-Wilke, Grummer, & Moennig, 2003). Kuzey Amerika, Almanya, İskoçya, İrlanda ve Belçika gibi ülkeler sürü taraması, itlaf ve isteğe bağlı aşılama gibi kombine bir stratejiyle programı uygulamaktadır (Scharnböck ve ark., 2018). Bu programa göre yeni doğan buzağular BVDV yönünden test edildikten sonra akut enfeksiyonu tespit etmek için pozitif hayvanlar en az 40 gün sonra tekrar teste tabi tutulmaktadır. Ardından PE hayvanlar itlaf edilmektedir. Almanya'da uygulanan program oldukça başarılı olmuş ve PE hayvanların prevalansı %0,48'den 2016'da %0,02'ye düşmüştür (Wernike ve ark., 2017). Avrupa'da BVD için gönüllü aşılama oranı %20-75 arasında değişmektedir (Moennig, & Brownlie, 2006).

Bununla birlikte Türkiye’de zorunlu bir eradikasyon programı bulunmamakla birlikte gönüllü aşı programları uygulanmaktadır (Yeşilbağ ve ark., 2012).

### **2.7.3. Mevcut BVDV Aşıları**

BVDV aşıları ilk olarak yaklaşık altmış yıl önce, BVDV-1a Oregon C24V suşunun atenüe edilmesiyle üretilmiştir (Van Oirschot ve ark., 1999). O zamandan beri, ticari olarak satılan modifiye canlı virus aşıları (MCA) ve inaktif virus aşıları (İA) kullanılmaktadır (Newcomer, Chamorro, & Walz, 2017). Multivalan MCA ve İA, yaygın alt genotiplere dayalı olarak iki veya daha fazla BVDV suşu içerecek şekilde formüle edilmektedir (Fulton, Cook, Payton, Burge, & Step, 2020). Endemik suşların çeşitliliği ve mevcut aşıların suş kompozisyonu, mevcut BVDV aşılarının genel etkinliğini etkilemektedir (Sozzi ve ark., 2020). Lisanslı veteriner aşıları veri tabanı olan VeVax'a göre şu anda dünya çapında ve çoğunlukla Kuzey ve Güney Amerika'da kullanımda olan 129 tane kayıtlı BVD aşısı bulunmaktadır. Bunlar, Pestivirus A ve/veya B (BVDV-1 ve/veya -2) kullanılarak formüle edilmiş konvansiyonel MCA, inaktif virus aşıları veya sığır solunum yolu hastalığı kompleksinde yer alan diğer patojenleri (*Mannheimia haemolytica*, *Pasturella multocoda* ve *Haemophilus somni*, *Bovine herpesvirus-1*, *Parainfluenza tip 3 virus* ve *Bovine respiratorik sinsityal virus*) içeren aşılardır ('Vevax: Licensed Veterinary Vaccines', 2022).

#### **2.7.3.1. Modifiye Canlı Virus Aşıları (MCA)**

BVD'ye karşı ilk modifiye canlı aşı 1960'ların başında geliştirilmiştir (Coggins ve ark., 1961). Sıklıkla diğer ajanlarda dahil edilerek yaygın olarak kullanılmıştır (Van Oirschot ve ark., 1999). Fötuste persiste enfeksiyon oluşturmaması nedeniyle modern MCA'ların çoğu cp BVDV suşlarıyla hazırlanır. MCA aşıları, aşılanmış hayvanlarda hızla BVDV nötralizan antikorları ve BVDV'ye özgü IFN-y salgılayan CD4+ ve CD8+ T hücreleri üreterek etkili bir fötal koruma sağlar (Bittar ve ark., 2020). Avrupa'da, gebeliğin ilk altı ayında aşılanmamış hayvanlarda MCA kullanımını önerilmemektedir. Bununla birlikte, MCA'lardaki virusun virülent bir forma dönüşme veya saha viruslarıyla yeniden rekombine olarak hastalığa neden olma riski bulunmaktadır. Ayrıca aşılanmış hayvanların geçici viremi geliştirdiği ve aşı virusunu saçtığı bildirilmiştir (Fulton, Saliki, Burge, & Payton, 2003; Grooms,

Brock, & Ward, 1998). Canlı aşı virusunun immunosupresif etkisi bulunmakla birlikte, gebe hayvanların aşı virusu veya aşığı kontamine eden BVDV saha virusu ile vertikal bulaşma sonucunda intrauterin enfeksiyonuna bağlı PE buzağuların doğumuna neden olabileceği bildirilmiştir (Ficken, Ellsworth, Tucker, & Cortese, 2006). Kontaminasyonun kaynağı genellikle aşı virusu üretiminde kullanılan hücreleri çoğaltmak için gerekli olan fetal buzağı serumlarıdır (Bolin, Matthews, & Ridpath, 1991). Ayrıca PE hayvanların sitopatik BVDV içeren MCA aşılarıyla aşılmasından sonra mukozal hastalık gelişebilmektedir (Becher, Orlich, & Thiel, 2001). Bu güvenlik endişeleri nedeniyle, MCA'lara bazı ülkelerde lisans verilmemektedir.

### **2.7.3.2. İnaktif Aşılar (İA)**

MCA aşılarına bağlı oluşabilecek riskler nedeniyle, gebeliğin her döneminde uygulanabilen inaktif aşılar geliştirilmiştir (Newcomer, Walz, Givens, & Wilson, 2015). BVD için ilk inaktif aşı uygulamaları 1970'li yıllarda beta-propiolakton ve kloroform gibi inaktivan kimyasallar kullanılarak başlamıştır (Classick, 1970). Günümüzde mevcut inaktif aşılar, genellikle iki veya daha fazla BVDV suşu içerir (Sozzi ve ark., 2020). MCA'lara kıyasla, koruma sağlamak için İA'ların birden fazla doz uygulanması gerekmekte ve bağışıklığın başlaması en az üç ile dört hafta sürmektedir. Fetal koruma seviyesi aşının içeriği, kullanılan adjuvan ve hayvanın bireysel faktörlerine göre değişkenlik göstermektedir (Rodning ve ark., 2010). İnaktif aşıların neden olduğu bağışıklık yanıtları yalnızca yapısal BVDV antijenlerine yöneliktir (Griebel, 2015). İnaktif aşılarla karşı immun yanıt, son yıllarda güçlü adjuvantlar eklenerek artırılmıştır (Riitho ve ark., 2020). İA'ların uygulanmasından sonra humoral bağışıklık genellikle güçlüdür fakat hücrel bağışıklık farklılık göstermektedir (Stevens ve ark., 2009). Avrupa'da piyasada ağırlıklı olarak inaktif BVD aşıları bulunmaktadır. İnaktif aşıların güvenli olması sebebiyle damızlık sığırların aşılmasında da tercih edilmektedir. Bununla beraber Bovine Neonatal Pansitopeni (BNP) gibi sorunların da ortaya çıkabileceğinin altı çizilmiştir. BNP, başlangıçta Avrupa'da tanımlanmış olan pansitopeni, şiddetli kanama ve yüksek mortalite ile karakterize, yaşamlarının ilk ayında buzağuları etkileyen sığır hücre hatlarında üretilmiş inaktif BVD aşısı ile ilişkili bir sendromdur (Deutskens ve ark., 2011). Bu sorunu ortadan kaldırmak için aşı üretimlerinde downstream process

aşamasında virus süspansiyonu ultrasantrifüjün yanısıra ultrafiltrasyon yöntemi kullanılarak istenmeyen hücresel proteinlerden arındırılmaktadır (Wickramasinghe, Kalbfuss, Zimmermann, Thom, & Reichl, 2005)

### **2.7.3.3. Subünit ve Yeni Nesil Aşılar**

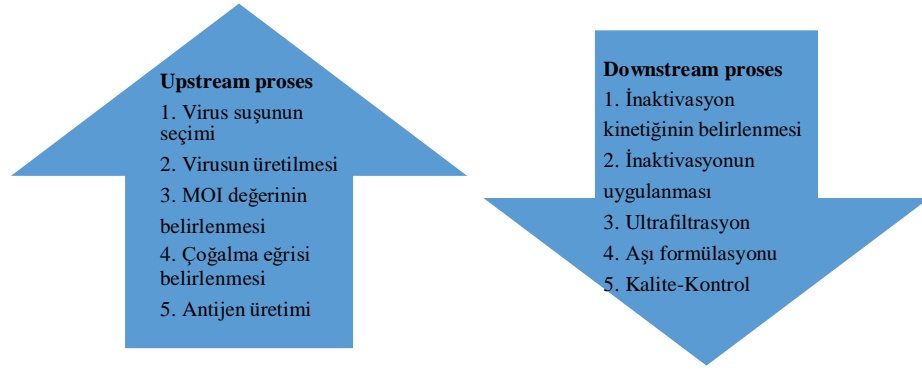
Son yıllarda BVD aşısı geliştirmelerine, mevcut aşılarda eksikliklerini giderme amacıyla başlanmıştır. İdeal bir aşı, vertikal ve horizontal virus bulaşmasını önlemeli, gebe hayvanlarda güvenli olmalı, geriye virülans kazanmamalı, virus çeşitliliğini hesaba katacak geniş etkinliğe sahip olmalı ve mümkünse marker aşı teknolojilerine uygun olmalıdır (Fulton, 2008). Yeni nesil BVD aşılarının geliştirilmesine yönelik çalışmalar yapılmaya devam etmektedir. Genel olarak güçlü şekilde hücresel ve humoral immün yanıtı uyaran bu aşılarda bazıları hali hazırda sığırlarda değerlendirilmiştir (Bolin, & Ridpath, 1996; Liang ve ark., 2005). BVDV E2 antijeni kodlayan DNA plazmidini fare veya kobaylar gibi küçük hayvanlarda güçlü bir immün yanıt oluşturmuştur, ancak büyük hayvanlarda daha az etkili olduğu bildirilmiştir (Cui, 2005). Bu nedenle, potenslerini arttırmak için elektroporasyon yoluyla aşının verilmesi veya interleukin 2 (IL-2) veya granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktörü (GM-CSF) kodlayan bir DNA plazmidinin dahil edilmesi gibi farklı yaklaşımlar gerekmektedir. Ayrıca plazmid DNA aşılarının en az iki doz yapılması önerilmiştir (Cai ve ark., 2018). Rekombinant subünit protein kullanımının, özellikle E2 proteinine odaklanıldığında etkili koruma sağlamak için yetersiz olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Bolin, & Ridpath, 1996; Chimeno Zoth, Leunda, Odeón, & Taboga, 2007). Antijen sunan hücreleri uyarmak için moleküler adjuvanlarla formülasyonlarda farklı antijenlerin (örn., E2 ve NS3) kombinasyonu daha başarılı bulunmuş, ancak daha fazla sayıda hayvanda daha çeşitli BVDV suşlarına karşı koruyucu etkinliği henüz belirlenmemiştir (Riitho ve ark., 2017). BVDV-1a, -1b ve -2a suşlarından E2 antijenlerini içeren subünit aşısı 2017 yılında Arjantin'de saha uygulaması için onaylanmış olup BVD'nin ilk lisanslı rekombinant aşısıdır (Bellido ve ark., 2021). Defektif viral vektörlü replikonlar, sentetik atenü enfeksiyöz cDNA klonları ve kimerik pestivirus marker aşılarının hepsinin MCA aşılarının başarısı üzerine kurgulanmaktadır. Ancak genetiği değiştirilmiş mikroorganizmalar olduklarından ve rekombinant pestiviruslar kullanıldığından MCA ile benzer kısıtlarlasahiptirler (Riitho ve ark., 2020). Sahada aşı uygulama pratiğini oluşturmak ve

hayvanlara en az sayıda invaziv müdahaleye imkan sağlamak üzere yeni aşı çalışmalarında endemik/yerel suşlara karşı çapraz koruma sağlayan, üretimi ve uygulaması ucuz, güvenli ve etkili aşuların geliştirilmesi önem arz etmektedir.

Tez çalışmasında, daha önce sahadan izole edilen ve tiplendirilen aşı adayı yerel BVDV suşlarının inaktivasyon kinetiğinin belirlenmesi ve farklı adjuvantlar kullanılarak hazırlanan inaktif aşı formülasyonlarının deney hayvanlarındaki serolojik yanıtlarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

Aşı hazırlığı öncelikle uygun hücre ve virusların belirlenmesini, belirlenen virusların optimum üretim özelliklerinin tespitini, formülasyon ve kalite-kontrollerin yapıldığı önemli bir süreci içerir. Bu süreçler Upstream proses (Yukarı akış süreci) ve Downstream proses (Aşağı akış süreci) olarak iki başlıkta özetlenebilir (Genzel, Rödig, Rapp, & Reichl, 2014; Nayak, Lehmann, & Reichl, 2005). Bu çalışmada da yerel suşlarla hazırlanan aşının hazırlık aşamaları Şekil 3'te verilen işlemleri kapsamaktadır.



**Şekil 3:** Araştırma sürecinde izlenen aşamalar; upstream proses (Yukarı akış süreci) ve downstream proses (Aşağı akış süreci) ile ilişkili süreçleri

#### 3.1. Gereç

##### 3.1.1. Hücre Kültürleri ve İdamesi

Çalışma kapsamında virus üretimi, virus titrasyonu ve indirekt immunoperoksidaz monolayer assay (IIPMA) testleri için Madin-Darby bovine kidney (MDBK) ve sheep fetal thymus (SFT-R) devamlı hücre hatları kullanıldı. Hücre kültürlerinin devamlılığı %10 fetal dana serumu (FDS) (Hyclone, SV30160.03) ilave edilmiş Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma, D7777, ABD) ile sağlandı. DMEM içerisine hücre kültürlerinde bakteri ve mantar kontaminasyonunu engellemek amacıyla 100 UI/µg/ml Penisilin/Streptomisin (BI, 03-031-1B) ve 250 µl/ml Amfoterisin B solüsyonu (BI, 03-029-1B) eklendi. Hücre kültürleri ve FDS, pestivirus kontaminasyonu yönünden RT-PCR ve immunoperoksidaz testleriyle negatif olarak teyit edildikten sonra deneylerde kullanıldı. Ayrıca, FDS'nin BVDV antikorları yönünden negatif olduğu kullanım öncesinde indirekt ELISA yöntemiyle teyit edildi. Hücre hatları Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı hücre kültürü koleksiyonundan sağlandı.

### 3.1.2. Viruslar

Tez kapsamında aşı adayı olarak kullanılacak olan virus suşları Yeşilbağ ve ark., (2008) tarafından karakterizasyonu yapılan suşlar arasından seçildi. Filogenetik analizlerle genetik karakterizasyonu yapılan bu suşların seçiminde daha önce belirlenmiş olan monoklonal antikor reaksiyonları temel alındı (Yeşilbağ, & Burgu, 2006) BVDV-1/ alt grubundan 4 adet, BVDV-1f grubundan 2 adet ve BVDV-2b alt grubundan 1 adet olmak üzere toplam 7 adet yerel suş seçildi. Yapılan testlerde kontrol virus olarak BVDV- FLK (FLK hücre hattı kontaminantı olarak izole edilen bir ncp BVDV suşu) ve heterolog suş olarak BVDV- NADL (BVDV-1a referans suşu) ve BVDV-Gi-II (BVDV-2b) virusları kullanıldı. Aşı adayı BVDV suşlarının tamamı ncp karakterde olup Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı virus koleksiyonundan seçildi (Tablo 3).

**Tablo 3:** Aşı adayı olarak kullanılacak BVDV suşlarının özellikleri (Yeşilbağ ve ark., 2008)

BVDV-1 ve 2 alt grubu	Virus İzolatları	Orijini	Biyotip Özellikleri
BVDV-1f	TR-26	Edirne	ncp
BVDV-1f	TR-38	Eskişehir	ncp
BVDV-1/	TR-1	Muğla	ncp
BVDV-1/	TR-16	Ankara	ncp
BVDV-1/	TR-21	Samsun	ncp
BVDV-1/	TR-29	Bursa	ncp
BVDV-2b	TR-15	Amasya	ncp

### 3.1.3. Deney Hayvanları

Tez çalışmasında deney hayvanı olarak kobay (guinea pig) ve Balb/c fareler kullanıldı. İmmunizasyon çalışmalarında >400 gr ağırlığında erişkin dişi kobaylar ve

25-40 gr ağırlığında erişkin dişi Balb/c fareler kullanıldı. Kobaylar, sertifikalı üretim yapan bir dış merkezden temin edilirken, Balb/c fareleri Bursa Uludağ Üniversitesi Deneysel Hayvanları Yetiştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edildi. Aynı merkezde oluşturulan deney ortamına alınan kobaylar deneye başlamadan önce 2 hafta süreyle gözlem ve adaptasyon sürecine tabi tutuldu. Çalışma kapsamında uygulanan her bir formülasyon grubunda ve kontrol grubunda 6'şar adet kobay ve 12 adet fare olacak şekilde kafes düzenlemeleri yapıldı. Bu çalışmada deney hayvanlarında gerçekleştirilecek olan immunizasyon ve kan alımları için gerekli izin B.U.Ü. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (HADYEK) (Karar no: 2018 – 08/03, Kabul tarihi: 30/05/2018)'ndan sağlanmıştır.

#### **3.1.4. Monoklonal Antikor (mAb)**

Araştırmada IIPMA testlerinde primer antikor olarak BVDV NS3 proteinine spesifik olan monoklonal fare antikorunu süspansiyonu (mAb 1/4/7) kullanıldı (Cedillo, 2004). Kullanılan antikor süspansiyonu Justus-Liebig-Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Enstitüsü - Almanya'dan temin edilmiştir.

#### **3.1.5. Konjugatlar**

İmmunoperoksidaz testinde (IIPMA) pestivirus spesifik monoklonal antikorun bağlanmasını tespit edebilmek için keçide elde edilmiş ve biotinle işaretlenmiş anti-fare IgG konjugatı (birincil konjugat) (Pierce, 31800, ABD) kullanıldı. Birincil konjugatın antijen-antikor kompleksine bağlanması streptavidin- horse radish peroksidaz (HRPO) konjugatı (ikincil konjugat) (Pierce, 21124, ABD) ile gösterildi. Aynı zamanda in-house ELISA testlerinde antijen-antikor kompleksinin tespiti için peroksidazla konjuge keçi anti-guinea pig IgG (Invitrogen, A18775, ABD) ve peroksidazla konjuge keçi anti-mouse IgG (Pierce, 31430, ABD) konjugatlarından yararlanıldı. Tüm konjugatlar ticari olarak temin edildi.

#### **3.1.6. İnaktif Madde**

Virusların kimyasal inaktivasyonu için 2-bromoethylamonium bromide (BEA-Br) kullanıldı (Merck, 8.20176). Daha önceki verilere uygun olarak (Alpay, & Yeşilbağ, 2015) inaktif maddeyi hazırlamak için 10 ml steril distile suya 0,26 gr NaOH ilave edip 37 °C'de 30 dk inkübe edildi. Süre sonunda 0,8 gr BEA-Br ve 1,5 µl beta-naftol-viole ilave edilerek aynı koşullarda 30 dk inkübe edildi. Başlangıçta



mor renkli olan inaktivan solüsyonu süre sonunda turuncu rengine döndü. Bu reaksiyonda BEA'nın alkali çözeltide siklizasyon sonucunda 'ikili' etilenimine dönüşmesiyle Binary etilenimin (BEI) ortaya çıkmaktadır. İşlem bitiminde inaktivasyon işlemini durdurmak için kullanılacak olan sodyum tiyosülfat (0,01 gr/lt) PBS içerisinde çözdürdüktan sonra virus süspansiyonuna eklendi. Hazırlanan inaktivan madde ve sodyum tiyosülfat 0,2 µm filtreden geçirildi.

### **3.1.7. Eritrosit Süspansiyonu**

Hemadsorbsiyon testinde kullanılmak üzere %0,1'lik kobay eritrositi süspansiyonu hazırlandı. Bu amaçla antikoagülanlı (EDTA) tüplere alınan kobay kan örneği 1500 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek eritrosit katmanı alınıp steril PBS ile 3 defa yıkama işlemine tabi tutuldu. Elde edilen kobay eritrositlerinin uzun süre muhafaza edebilmek ve pıhtılaşmasını önlemek için Alsever's solüsyonu kullanıldı.

### **3.1.8. Alsever's Solüsyonu**

Alsever's solüsyonu için 100 ml distile su içine 2,05 g D-glikoz (Merck, 1.08337.0250, ABD), 0,055 g sitrik asit (Carlo Erba Reagent, 403727, İtalya), 0,8 g sodyum sitrat (Merck, 1.06448.1000, ABD) ve 0,42 g sodyum klorid (Merck, 1.06404.1000, ABD) eklenerek manyetik karıştırıcıda (Velp Scientifica, ZX3, İtalya) çözdürüldü. Hazırlanan solüsyon 116 °C'de 15 dk otoklavda steril edildi. Solüsyon oda sıcaklığına soğutulduktan sonra kullanıma kadar 2-8 °C'de muhafaza edildi.

### **3.1.9. ELISA Kiti**

Araştırmada aşı hazırlama aşamalarında BVDV antijen varlığını tespit etmek amacıyla E<sup>ms</sup> glikoproteinine spesifik ticari bir ELISA kiti (Herdcheck/Idexx, İsviçre) kullanıldı.

### **3.1.10. Adjuvantlar**

Tez çalışmasındaki deney düzeneklerinde farklı 4 adet adjuvant sisteminden yararlanıldı. Bu amaçla yağ bazlı adjuvantlar olarak SEPPIC markasının Montanide ISA 206 w/o/w (su/yağ/su) ve Montanide ISA 50 w/o (su/yağ) adjuvantları kullanıldı. Ayrıca, Alüminyum hidroksit (Rehydragel, SEPPIC) ve saponin (SERVA, 8047-15-2) adjuvantları da ticari olarak temin edildi.

## **3.2. Yöntem**

### **3.2.1. Upstream Proses Aşaması**

#### **3.2.1.1. Virus Üretimi**

Virusların üretimi için MDBK hücre hattından 25 cm<sup>2</sup> hücre kültür şişesinde (Orange scientific, Belçika) 100.000 hücre/ml olacak şekilde hücre kültürü hazırlandı. Ertesi gün hücre kültür şişesinin yüzeyini en az %80 kaplayan hücrelerin üzerindeki vasat uzaklaştırıldı. Üzerine 500 µl virus eklenerek 37 °C'lik %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde (Jouan, TGO 150, Fransa) 1 saat adsorbsiyonlu yöntemle inokule edildi. Süre sonunda hücre kültür şişesinin hacminin %10'u kadar vasat eklendi. Virus ekimini takiben her gün invert mikroskopta hücre morfolojisi incelenen kültürler 5. günün sonunda -80 °C'lik dondurucuya kaldırıldı. Dondurulan hücre kültür şişelerindeki viruslar 37 °C'lik su banyosunda çözdürüldü. Ardından hücre ve virus karışımisantrifüj tüpüne alınarak +4 °C'de, 3000 rpm hızda 10 dk süreyle santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Süpernatant farklı bir şişeye alınarak -80 °C dondurucuda (Panasonic, MDF-US386S, Japonya) muhafaza edildi.

#### **3.2.1.2. Mikrotitrasyon Testi**

Üremeleri teyit edilen ncp karakterdeki virusların mikrotitrasyon yöntemi ile enfektivite güçleri daha önce belirlendiği şekilde sulandırma yöntemiyle belirlendi (Özkul, Yeşilbağ, & Burgu, 2002). Öncelikle virusun DMEM içerisinde 10 basamaklı olarak 10 katlı (log<sub>10</sub>) sulandırması yapıldı. Hazırlanan sulandırmalar 96 gözlü pleytte ilgili basamaklara 4'er göz olacak şekilde 100 µl dağıtıldı. Ayrıca hücre kontrol gözlerine 100 µl DMEM; virus kontrol gözlerine 50 µl DMEM ve 50 µl sulandırılmamış virus eklendi. Her gözün üzerine 200.000 hücre/ml olacak şekilde hazırlanan MDBK hücre süspansiyonundan 50 µl ilave edildi. Pleytler 37 °C'lik %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde inkübasyona bırakıldı. Virusların titre değerleri hesaplanmasında Spearman-Kaerber yöntemiyle belirlendi.

#### **3.2.1.3. İndirekt İmmunoperoksidaz Monolayer Assay (IIPMA)**

Test protokolü Alpay, & Yeşilbağ, (2015) tarafından belirtildiği şekilde gerçekleştirildi. Nonsitopatojen karakterdeki virus üremelerinin teyidi için 100.000 hücre/ml oranındaki MDBK hücre süspansiyonundan 24 gözlü makro pleytlerdeki

(Corning, ABD) her bir göze 1 ml aktarıldı ve daha önceden üretilen viruslardan (Tablo 3) her bir göze 100 µl inokule edildi. Ardından 37 °C'lik %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde 3 gün süreyle inkübasyona bırakılan pleytler 80 °C'ye ayarlanmış etüvde 3 saat boyunca fikzasyona tabi tutuldu. Fikse edilen hücrelerde permeabilite artışını sağlamak için gözlere 200 µl D-glikopyranosid (Sigma, 03757, ABD) eklenip, oda sıcaklığında 10 dk bekletildi. Ardından tüm gözler 1 kez PBS ile yıkandı. Her göze 200 µl olmak üzere Tween-PBS (1x PBS, %0,05 Tween 20 Merck, 822184) içerisinde 1:300 oranında sulandırması yapılan monoklonal antikor (1/4/7) eklenerek 90 dk 37 °C'de inkübasyona bırakıldı. Aynı koşullar altında sırasıyla 1:300'lük sulandırması yapılan biotinle işaretli anti-BVDV fare konjugatı (Pierce, 31800, ABD) eklendi. İnkübasyon ve tüm gözleri 4 kez PBS ile yıkamayı takiben 1:400'lük sulandırması yapılan strepto-avidinle işaretli HRPO konjugatı (Pierce, 21124, ABD) eklendi ve 90 dk inkübe edildi. Süre sonunda 4 kez PBS ile yıkama yapıldıktan sonra substrat solüsyonu (%0,05 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 2 mg AEC (Sigma, A5754, ABD) / 3 ml di-metil-formamid (DMF) (Sigma-Aldrich, 40255, ABD), 4,7 ml Na asetat buffer) ilave edildi. Sonuçlar, substrat ilavesini takip eden 30 dk içerisinde invert mikroskopta (Nikon Eclipse, TS100, Japonya) kırmızı kahverengi hücre içi boyanma görülmesine göre değerlendirildi.

#### **3.2.1.4. Multiplicity of Infection (MOI) Değerlerinin Belirlenmesi**

Her bir hücreyi enfekte eden virus partikül sayısının belirlendiği MOI (multiplicity of infection) testleriyle, aşı içeriğindeki virusların üretilmesinde en uygun MOI değerlerinin belirlenmesi amaçlandı. Test edilecek MOI değerleri için ayrı ayrı 25 cm<sup>2</sup> hücre kültür şişelerine 100.000 hücre/ml yoğunluğunda MDBK hücre hattı oluşturuldu. Daha önce titre değerleri belirlenmiş olan virusların enfektif partikül sayısına göre 1, 0,1 ve 0,01 MOI değerlerinde sulandırmaları hazırlandı. MOI değeri küçüldükçe gereken enfektif viral partikül sayısı azaldığından tüm hücre kültür şişelerine eşit hacimde virus inokulasyonu amacıyla total hacim steril PBS ile tamamlandı. Adsorbsiyonlu yöntemle virus ekimleri tamamlanan hücreler 5 gün boyunca 37 °C'de %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde inkübe edildi. Süre sonunda -80 °C'de dondurulan hücreler 37 °C'ye ayarlanmış su banyosunda çözdürülerek santrüfuj işlemine (3000 rpm/10 dk) tabi tutuldu. Elde edilen süpernantlara mikrotitrasyon testi

yapıldı. Virus üremeleri IIPMA testiyle belirlendi. MOI hesaplamalarında aşağıda belirtilen formül kullanıldı (Abedon, & Bartom, 2013).

$$\text{MOI} = \frac{\text{Hacim (Ekilecek miktar)} \times \text{Virus Titresi (log}_{10} \text{DKID}_{50}/ \text{ml)}}{\text{Kültürdeki Hücre Sayısı}}$$

### 3.2.1.5. Çoğalma Eğrisinin Belirlenmesi

Öncelikle 100.000 hücre/ml oranındaki MDBK hücre hattı hazırlanmış 24 gözlü pleytlere optimum MOI değerinde eşit hacimlerde virus ekimleri gerçekleştirildi. Aşı adayı virusların zamana bağlı titre değişimlerini belirlemek amacıyla daha önce bildirilen protokoller uygulandı (Gong ve ark., 1996). Bu amaçla inokulasyon sonrası 5 gün süresince belirli aralıklarla sadece üst sıvıdan ve hücre+üst sıvı örnekleri toplandı. Virus titrelerini belirlemek üzere hücre ekimini takiben ilk iki gün 6 saat aralıklarla, sonraki 3 gün 8 saat aralıklarla örnekler toplanarak mikrotitrasyon testi uygulandı. Bu süreçte elde edilen üst sıvıları işlem bittikten sonra -80 °C’de muhafaza edildi. Mikropleytlerdeki virus üremelerini teyit etmek amacıyla IIPMA testleri gerçekleştirildi. BVDV TR-21 suşu için yapılan deney sonucunda üst sıvı ve üst sıvı+hücre örneklerinde titre farklılığı gözlenmediği için diğer viruslarda sadece üst sıvı toplandı.

### 3.2.1.6. Tohum Stoklarının Oluşturulması

Aşı adayı olarak belirlenen suşların Ana tohum stoğunu (master virus seed) oluşturmak amacıyla 175 cm<sup>2</sup> hücre ekim kaplarına 100.000 hücre/ml yoğunluğunda MDBK hücresi hazırlandı. Her virus için belirlenen optimum MOI değerinde virus ekimleri gerçekleştirildi. Viruslar çoğalma eğrisinde tespit edilen en yüksek titre verdiği saate göre toplandı. Daha önce bahsedilen şekilde dondurup-çözdürme işleminin ardından hücrelerden klarifiye (3000 rpm, 30 dk) edilen üst sıvılardan mikrotitrasyon testi yapıldı. Elde edilen üst sıvı kriyotüplere porsiyonlanarak – 80°C’de muhafaza edildi. Ardından buradan alınan kriyotüplerden tekrardan benzer koşullarda ekim yapılarak Çalışma Tohum stoğu (Working virus seed) oluşturuldu. Tohum suşlarının saflığının teyidi virolojik ve bakteriyolojik testlerle gerçekleştirildi. Tohum stoklarında titre belirlenmesi yukarıda açıklandığı şekilde mikrotitrasyon testiyle yapıldı.

### **3.2.1.7. Aşı Antijeninin Üretilmesi**

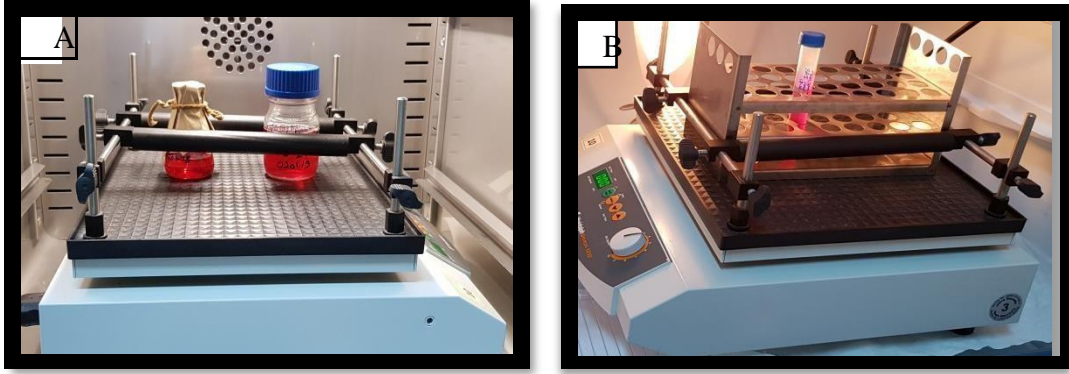
Aşı formülasyonunda kullanılmak üzere belirlenen virusların yüksek hacimlerde (>500 ml) üretimleri gerçekleştirildi. Bu amaçla roller hücre kültür şişelerine 100.000 hücre/ml oranında MDBK hücre kültürü oluşturuldu. Kültür şişeleri roller sistemde (Thermo Scientific, 88881004) 37 °C'lik etüvde inkübe edildi. Tohum stoğundan alınan virusların benzer şekilde optimum MOI değerinde ekimleri gerçekleştirildi ve çoğalma eğrisi verileri göz önüne alınarak toplandı. Santrifüj işlemiyle (+4 °C, 3000 rpm, 30 dk) hücrelerden arındırılan üst sıvıda mikrotitrasyon testi yapıldı. Virus titresini belirlemek amacıyla IIPMA testi gerçekleştirildi.

### **3.2.2. Downstream Proses Aşaması**

#### **3.2.2.1. İnaktivasyon Kinetiğinin Belirlenmesi**

Virusları inaktive etmek için kimyasal bir madde olan Binary etilenimin (Binary ethylenimine, BEI) kullanıldı. Deneye başlarken adsorbsiyonlu virus ekimi için bir gün önceden 96 gözlü mikroplyetlerde MDBK hücre hattı hazırlandı. Deneye başlamadan önce virus stoğundan kullanım öncesi mikrotitrasyon testi yapıldı.

Her bir virus stoğundan 20 ml alınıp 2 adet 50 ml'lik beherlere aktarıldı. Bir beherde 20 ml virus stoğuyla 200 µl inaktivan madde karıştırılıp orbital çalkalayıcıya yerleştirildi ve 26 °C'de inkübasyona bırakıldı (Şekil 4). Diğer beherdeki kontrol virus stoğuna inaktivan madde eklenmeyip aynı koşullarda inkübe edildi. Aşı aday viruslar için en uygun inaktivasyon süresini tespit etmek amacıyla deney başlangıcını takiben 6. saatte inaktivanlı ve inaktivansız virus süspansiyonundan 2'şer ml alarak stok tüplerine aktarıldı. İnaktivasyonu durdurmak için 2 ml virus stoğuna 6 µl sodyum tiyosülfat ilave edilerek 4 °C'de 1 saat süreyle manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Alınan test ve kontrol virus süspansiyonlarında mikrotitrasyon testi yapıldı. Bu amaçla log<sub>10</sub> tabanında sulandırılan virus süspansiyonları daha önce hazırlanan mikroplyet gözlerine aktarıldı. Bu uygulama inaktivasyon sürecinin 8., 10., 12., 14., 16., 18., 20., 22. ve 24. saatlerinde alınan örneklerle aynı şekilde tekrar edildi. Virus üremesinin tespiti amacıyla indirekt immunperoksidaz monolayer assay (IIPMA) testi gerçekleştirildi.



**Şekil 4:** İnaktivasyon kinetiği deney düzeneği.

**A:** İnaktivanlı ve inaktivansız virus süspansiyonlarının etüvde inkübasyonu, **B:** İnaktivasyon işleminin +4 °C’de sonlandırılması

### 3.2.2.2. İnaktivasyon Kontrolü

Virusların inaktivasyonunu teyit etmek amacıyla inaktive edilmiş virus örneği (200 µl) 24 gözlü mikropleytte hazırlanmış MDBK hücre kültürüne (100.000 hücre/ml) inokule edildi. Testte pozitif kontrol virusu olarak nonsitopatojen BVDV-FLK suşu kullanıldı. Ekilen viruslar 7 gün takip edildikten sonra toplanıp tekrar hücre kültürüne ekimleri sağlandı. Böylelikle 3 kör pasajın ardından IIPMA testiyle virusların inaktivasyonu teyit edildi.

### 3.2.2.3. Viral Antijenlerin İnaktivasyonu

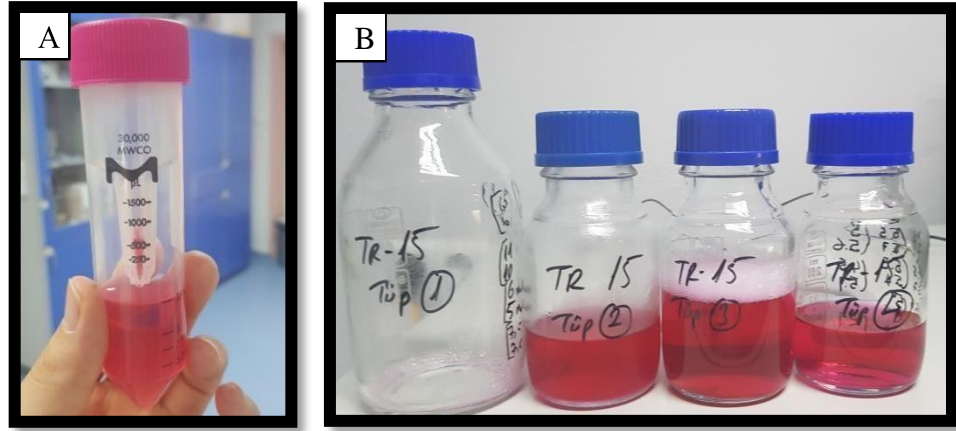
İnaktivasyon kinetiği belirlenen BVDV TR-21, TR-26 ve TR-15 suşları aşı formülasyonuna katılmak üzere inaktivasyon işlemine tabi tutuldu (Şekil 5). Bu amaçla daha önce belirtildiği şekilde inaktivan madde (Bölüm: 3.1.6.) hazırlandı. Bu işlem için yeterli titreye sahip BVDV TR-21, TR-26 ve TR-15 suşları inaktivasyon işleminden önce 3000 rpm, 30 dk ve +4 °C’de santrifüj edildi. Süpernatantlar farklı bir şişeye aktarıldı. Herbir suşa ait süpernatantın üzerine %1 oranında inaktivan madde eklendi. Yukarıda bahsedilen inaktivasyon koşulları (Bölüm: 3.2.2.1.) benzer şekilde uygulandı. İnaktivasyon kinetiği sonucunda belirlenen inaktivasyon saatleri dikkate alınarak inaktivasyon işlemi durduruldu. İnaktivasyon sonucunda elde edilen örneklerde inaktivasyon işlemini teyit etmek amacıyla inaktivasyon kontrolü gerçekleştirildi.



**Şekil 5:** Aşı formülasyonunun kullanılacak olan virusların (BVDV TR-21, TR-26 ve TR-15) BEI ile inaktivasyon işlemi

#### **3.2.2.4. Virus Konsantrasyonu İşlemi ve Diyaliz**

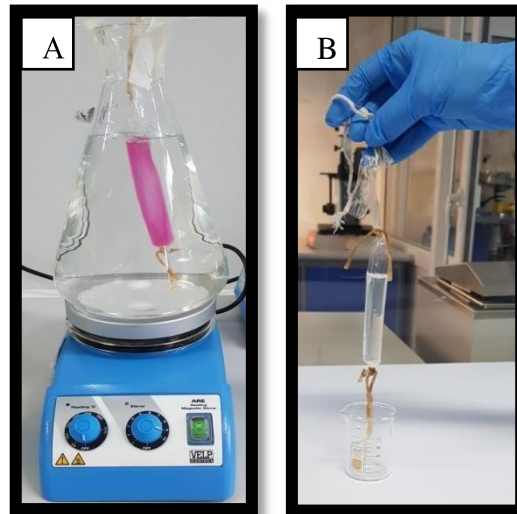
Aşı antijeni olarak üretilen virusları konsantre etmek ve hücrel mikromoleküllerden arındırmak amacıyla 30.000 Nominal Moleküler Ağırlık Limit (NMWL) (Vivaspin 20, Sartorius Z614629) özelliğine sahip ultrafiltrelerle konsantrasyon işlemi gerçekleştirildi. İnaktive edilen BVDV TR-21, TR-26 ve TR-15 suşları konsantrasyon işleminden önce 3000 rpm, 30 dk ve +4 °C’de santrifüj edildi. Her bir virus için filtreli santrifüj tüplerine ilgili virusun isimlendirilmesi yapıldı. Üst hazneye 16 ml virus stoğu eklendi. Tüpler +4 °C’de 4100 rpm hızda 10 dk boyunca santrifüj edildi. Üstte kalan miktar ‘1’ olarak numaralandırılan şişeye aktarıldı. Filtrenin altında kalan kısım ise ‘2’ olarak numaralandırılan şişeye aktarıldı. Bu işlem virus stokları bitene kadar tekrar edildi. İşlem sonunda 1.şişedeki konsantre virus stoğuna başlangıç hacmine tamamlamak için steril PBS eklendi. Hücrel proteinlerden arınmış ‘1’ nolu şişedeki virus stoğu ikinci kez aynı koşullar altında ultrafiltrasyona tabi tutuldu. Bu filtrasyon sonucunda üstte kalan miktar ‘3’ nolu şişeye, altta kalan miktar ise ‘4’ nolu farklı bir şişeye aktarıldı (Şekil 6). İşlem sonunda ‘1’, ‘2’, ‘3’ ve ‘4’ nolu şişelerden örnek alınarak BVDV Ag ELISA testleri yapıldı.



**Şekil 6:** Antijen hazırlama sırasında ultrafiltrasyon işlemleri (Örnek olarak TR-15 suşunun görselleri sunulmuştur.)

**A:** Ultrafiltrasyon işlemi sonrası üstteki konsantré virus ve alttaki filtrat, **B:** Konsantrasyon işleminde tekrarlanan işlemler sırasında konsantré virusun ve filtratın belli olduğu numaralandırılmış şişeler

Ultrafiltrasyon yöntemiyle konsantré edilmiş olan virus antijenleri spektrofotometrik ölçümlerden daha iyi sonuç alınabilmesi amacıyla ve in-house ELISA testinde antijen hazırlığında kullanılmak üzere diyaliz işlemine tabi tutuldu. Vasattaki fenol kırmızısı steril beyaz PBS'e (8 gr NaCl, 0,2 gr KCl, 2,37 gr Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,2 gr KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 lt distile su) karşı diyaliz edilerek giderildi. Diyaliz için virus süspansiyonları diyaliz tüpüne (Sigma-Aldrich, D9777) aktarıldı (Şekil 7).



**Şekil 7:** Antijen stoğunda diyaliz işlemi

**A:** Konsantré edilen virus antijenlerinin PBS'e karşı diyaliz işlemi, **B:** Diyaliz işlemi sonrası elde edilen süspansiyon



Diyaliz tüpü, 1 lt steril beyaz PBS içerisine yerleştirilerek manyetik karıştırıcıda döndürüldü. Yarım saat sonra PBS döküldü ve tekrardan aynı miktarda PBS eklendi. Bu işlem 5 kez tekrar edildi. Ardından son kez erlen içerisindeki PBS değiştirilerek +4 °C'de gece boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırıldı.

#### **3.2.2.5. ELISA ile Antijen Tespiti**

Virus konsantrasyon işlemi sonrasında elde edilen konsantre virus süspansiyonunun tespiti ve ultrafiltreden geçen sıvının antijen yönünden negatif olduğunu teyit etmek amacıyla BVDV antijen ELISA kitleriyle (Herdcheck/Idexx, İsviçre) test edildi. Üretici firmanın önerdiği şekilde test protokolü uygulandı. Test pleytleri ELISA okuyucuda (Thermo-Multiskan EX, Finlandiya) 450 nm dalga boyunda okutulduktan sonra değerlendirmeye alındı.

#### **3.2.2.6. Protein Ölçümü**

Aşı içeriğinde kullanılmak üzere konsantre edilen antijen süspansiyonlarındaki protein miktarları UV spektrometresi ile 280 nm ve 260 nm ölçümü neticesinde ortaya çıkan değerler ile hesaplandı.

#### **3.2.2.7. Hemadsorbsiyon Testi**

Aşı hazırlığı kapsamında aşı içeriğinde kullanılacak olan virus stoklarının hemaglutine edici viruslar yönünden arı olduğunu göstermek amacıyla hemadsorbsiyon testi gerçekleştirildi. Test için 24 gözlü hücre kültür pleytlerine MDBK hücre hattı (100.000 hücre/ml) hazırlandı. Her bir virus için pleytte toplam 8 adet göz hazırlanarak 4 tanesine pozitif kontrol (2 göze 1/10 ve 2 göze 1/100 sulandırılmış PI-3 virusu) ve 2 tanesine test edilecek örnek (tohum stoğu) 200 µl ekildi. Kalan 2 kültür negatif kontrol olarak takip edildi. Ekimi takiben ertesi gündün gözler 37 °C'ye ısıtılmış PBS ile 3 kez yıkandı ve test gözlerine 1'er ml % 0,1' lik kobay eritrositi eklendi. Pleyt +4 °C'de 30 dk inkubasyona bırakıldı. Ardından test gözleri 3 kez PBS ile yıkanarak hemadsorbsiyon oluşumu yönünden invert mikroskop altında kontrol edildi.

#### **3.2.2.8. Bakteriyolojik Kontrol**

Ana tohum stokların, aşı formülasyonlarının (F-1, F-2, F-3 ve F-4) bakteriyolojik yönden kontrolü amacıyla blood base agara ekimleri gerçekleştirildi.

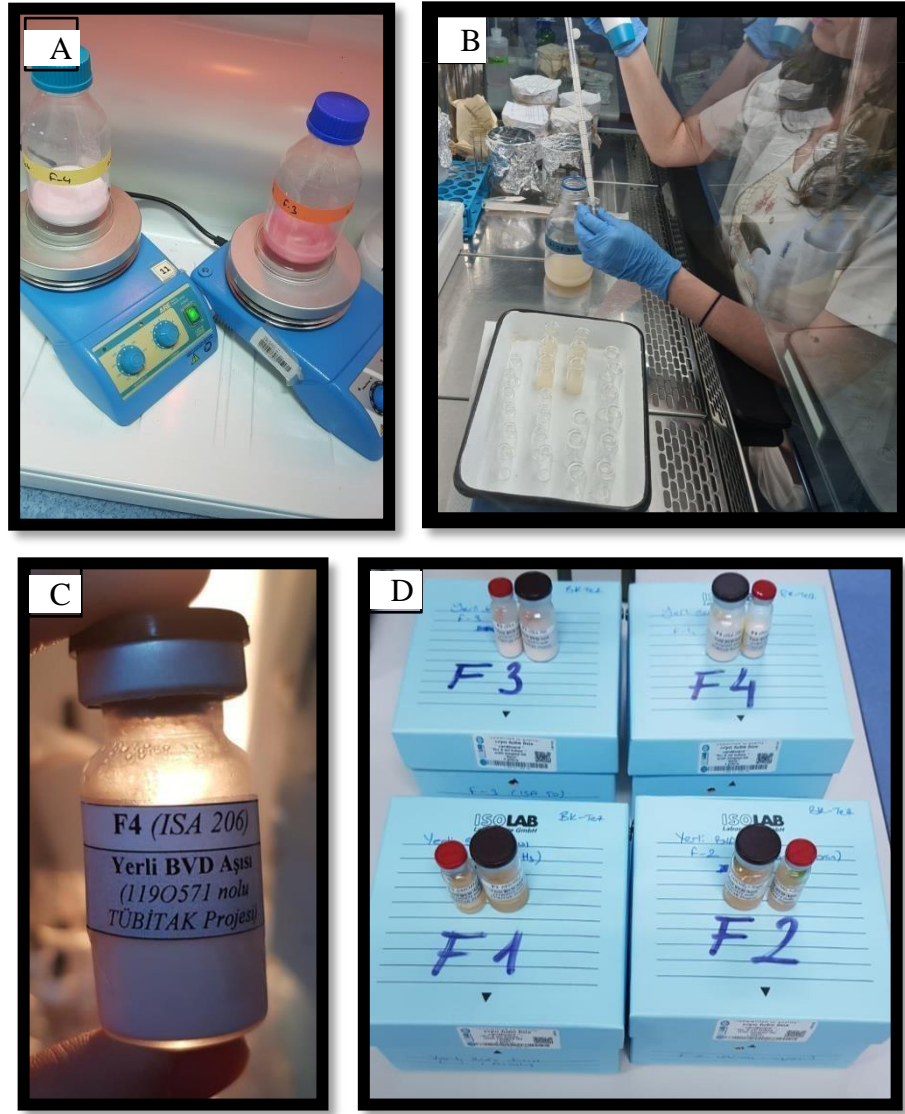
### 3.2.2.9. Aşı Bileşenleri ve Formülasyon

Aşı içeriğinde kullanılmak üzere 4 farklı adjuvant sistemi (yağ bazlı, su bazlı ve saponin içeren) seçildi. Su bazlı adjuvant olarak Alimünyum hidroksit jel ( $AlOH_3$ ) ve  $AlOH_3$ +Saponin kombinasyonları kullanılırken, yağlı adjuvant olarak Montanide ISA 206 ve ISA 50 kullanıldı. Çalışma kapsamında 4 farklı aşı kombinasyonu oluşturuldu. Aşı hazırlığı öncesinde  $AlOH_3$  otoklavda 120 °C’de 15 dk’da steril hale getirildi. Saponin 100 mg/ml olacak şekilde PBS içerisinde çözdürüldükten sonra 0,22 nm enjektör filtreden geçirildi. Aynı zamanda ISA 50 ve ISA 206 adjuvantlarında 0,22 nm enjektör filtreden geçirilerek steril hale getirildi. Her bir formül için gereken antijen, adjuvant ve PBS miktarları hesaplandı (Tablo 4).

**Tablo 4:** Aşı formülasyonlarının içeriği

Formülasyon	Adjuvant tipi	Adjuvant kullanım oranı	Her bir antijen konsantrasyonu (1 doz aşı)
F-1	Aliminyum hidroksit jel ( $AlOH_3$ )	%20	$10^{5-6}$
F-2	Alimünyum hidroksit jel ( $AlOH_3$ ) +Saponin	%20+0,25 mg/ml	$10^{5-6}$
F-3	Yağlı adjuvant (ISA50)	%50	$10^{5-6}$
F-4	Yağlı adjuvant (ISA206)	%50	$10^{5-6}$

Antijenler formülasyonda belirlendiği miktarda karışım şişelerine aktarıldı. Ardından belirlenen oranlarda adjuvantlar ve PBS eklendi. Yağ bazlı olan ISA 50 ve ISA 206 adjuvantlarının karışımında homojen olması için 10 saat aralıklarla kademeli olarak aktarıldı. Şişelerin içine steril manyetik çubuk eklenerek +4 °C’de manyetik karıştırıcılarda 72 saat boyunca karıştırıldı. Süre sonunda formülasyonlar flakonlara dağıtılarak kapaklandı ve ilgili etiketlendirme yapıldıktan sonra +4 °C’de muhafaza edildi (Şekil 8).



Şekil 8: Aşı hazırlığı süreci

A: Aşı antijenleriyle adjuvantların +4 °C’de manyetik karıştırıcıda homojen hale getirilmesi, B: Hazırlanan aşı formülasyonlarının aşı flakonlarına porsiyonlanması, C: Aşı flakonlarının üzerine ilgili formülasyona ait bilgileri etiketlendirme, D: Hazırlanan aşı formülasyonlarının ilgili kutulara dağıtılıp +4 °C’de depolanması

### 3.2.3. İmmünizasyon Süreci ve Serolojik Çalışmalar

#### 3.2.3.1. Deney Hayvanlarına Aşı Uygulamaları

Kobay ve fare deneylerine başlamadan önce deney hayvanlarının BVDV antikorları yönünden negatif olduklarını teyit etmek amacıyla BVDV-NADL suşuyla virus nötralizasyon testi gerçekleştirildi. Antikor yönünden negatif olduğu teyit edilen kobaylara 21 gün arayla 2 kez immunizasyon işlemi gerçekleştirildi. Öncelikle aşı ve kontrol gruplarındaki her hayvandan isofluran aneztezisi altında vena cava’dan 0. gün kan örneği alındı. Belirlenen gruplara ilgili formülasyonlardan 0,6 ml aşı

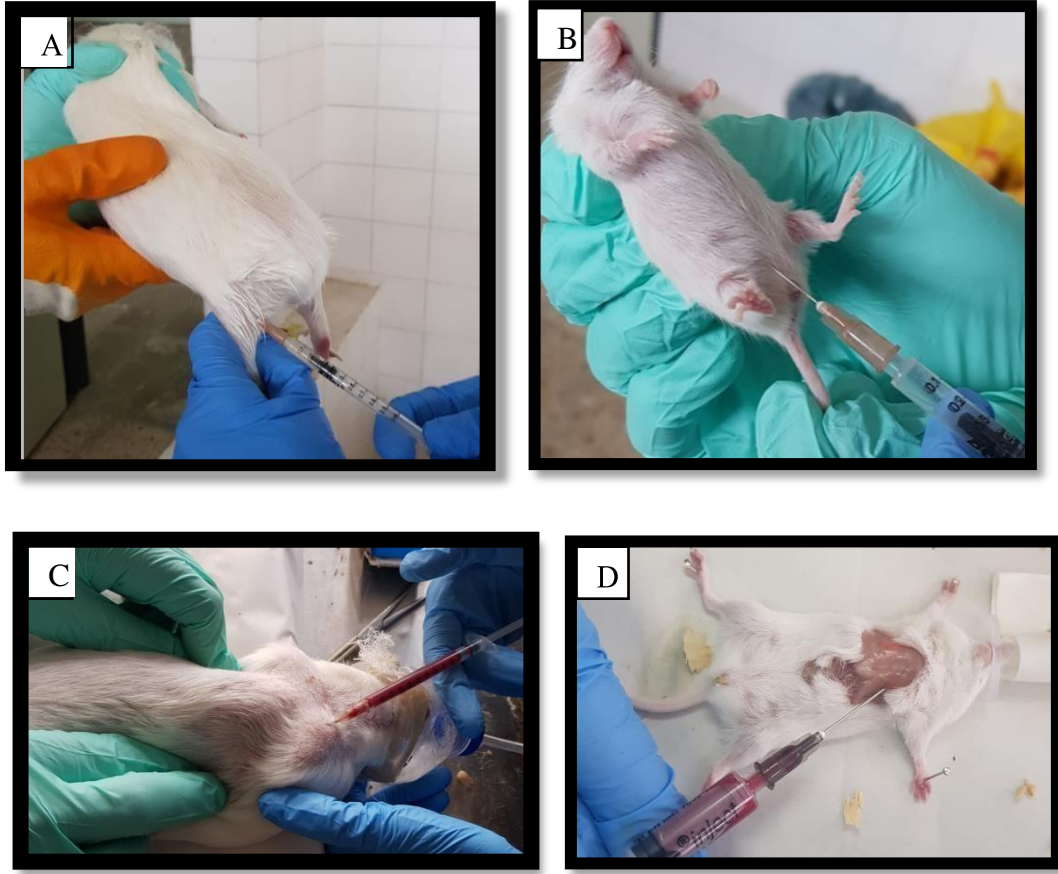
intramuskuler enjeksiyon yoluyla verildi. Kontrol grubuna 0,6 ml steril PBS yapıldı. İkinci immunizasyonun ardından (21. gün), 30 gün aralıklarla (51., 81. ve 111. gün) kan alımları gerçekleştirildi (Tablo 5, Şekil 9). Aşı güvenirliliği açısından ilk doz aşından itibaren hayvanlar 21 gün süreyle klinik bulgular yönünden takip edildi. Alınan kan örneklerinden +4 °C’de 3000 rpm’de 10 dk santrifüj edilerek serum elde edildi ve 56 °C’de 30 dk inaktivasyon işlemi uygulandı. Serum örnekleri homolog ve heterolog suşlarla nötralizasyon testlerinde kullanıldı.

Farelere ise 14 gün arayla immunizasyon işlemi uygulandı. Belirlenen gruplara ilgili formülasyonlardan 0,3 ml intraperitoneal enjeksiyon uygulaması yapıldı. Kontrol grubuna 0,3 ml steril PBS yapıldı. Farelere 0. günden itibaren 28., 35., 42. ve 49. gün her gruptan 3 hayvan seçilerek isofluran anestezi altında kalpten kan alınarak sakrifiye edildi (Tablo 5, Şekil 9). Farelere de ilk doz aşından itibaren 14 gün boyunca hayvanlar klinik bulgular yönünden incelendi. Alınan kanlar kobay kanlarına benzer şekilde işlendi.

**Tablo 5:** Kobay ve farelere uygulanan immunizasyon ve takip aşamaları

<b>Deney hayvanı</b>	<b>Zaman (gün, pi)</b>					
<b>Kobay</b>	0.	21.	51.	81.	111.	
Aşı uygulaması	+	+	-	-	-	
Kan alımı	+	+	+	+	+	
			<b>Zaman (gün, pi)</b>			
<b>Fare</b>	0.	14.	28.	35.	42.	49.
Aşı uygulaması	+	+	-	-	-	-
Kan alımı	+	-	+	+	+	+

pi: post-immunizasyon



**Şekil 9:** Deney hayvanlarında immunizasyon ve kan alımı işlemleri

**A:** Kobaylarda intramuskuler aşı uygulaması, **B:** Farelerde intraperitoneal aşı uygulaması, **C:** Kobaylarda vena cava'dan kan alımı, **D:** Farelerde kalpten kan alımı

### 3.2.3.2. Nötralizasyon Testi

Kobay ve farelerde yapılan aşı immunizasyon çalışmasıyla elde edilen serumların hem homolog (BVDV-1I, BVDV-1f, BVDV-2) hem de heterolog (BVDV-1a, NADL suşu; BVDV-2b, Gi-II suşu) suşlara karşı gelişen nötralizan antikor düzeyleri belirlenerek aşının in-vitro potens testleri gerçekleştirildi. Bu amaçla 2 katlı ( $\log_2$ ) sulandırılan örnekler Standart Serum Nötralizasyon-50 ( $SN_{50}$ ) yönteminden yararlanılarak test edildi. Aşı antijeni hazırlanması sırasında virus üretiminde kullanılan MDBK hücre hattı kaynaklı non-spesifik reaksiyonların önüne geçilebilmesi amacıyla  $SN_{50}$  testlerinde SFT-R hücre hattı kullanıldı. SFT-R hücre hattı bir gün önceden 200.000 hücre/ml yoğunluğunda hazırlandı ve 96 gözülü mikroplyttteki gözlerine 60  $\mu$ l olacak şekilde dağıtıldı. İnaktive edilmiş serum örnekleri  $\log_2$  tabanına göre sulandırıldı. Bu amaçla mikrotitrasyon pleytindeki her

göze 50 µl vasat (DMEM) dağıtıldı. Serumlar ilk sırada ilgili kuyucuklara ikişer göz olacak şekilde 50 µl eklenerek ½ oranında sulandırıldı. Çok kanallı pipet yardımıyla ilk sıradaki gözlerden 50'şer µl alındıktan sonra ikinci göze aktarıldı ve son basamağa (1:2048) kadar işlem tekrar edildi. Hücre ve virus kontrol gözleri hazırlandıktan sonra, 100DKID<sub>50</sub> oranında sulandırılmış virustan hücre kontrol dışındaki tüm gözlere 50 µl ilave edildi. Test pleyti inkübatöre kaldırılarak 37 °C'de 1 saat süreyle nötralizasyona bırakıldı. Serumların hücreler üzerindeki toksik etkisinden sakınmak amacıyla üst sıvı uzaklaştırıldı ve her göze 150 µl serumsuz vasat ilave edildi. Sitopatojen virusların üretilmesi mikroskop altında her gün değerlendirildi. Non-sitopatojen viruslarla yapılan testlerin değerlendirilmesi için mikropleyt 5. gün fikze edilerek indirekt immunoperoksidaz monolayer assay (IIPMA) testi uygulandı.

### **3.2.3.3. In-house ELISA**

Nötralizasyon testine ilave olarak hem komfirme edici bir yöntem olarak hem de hücre üzerinde serumlardan kaynaklı toksik etki riskini bertaraf etmek üzere alternatif bir yöntem olarak In-house ELISA protokolü uygulandı. Bu amaçla öncelikle standardizasyon işlemleri gerçekleştirildi. Hazırlanan 3 farklı antijen hem ayrı ayrı hem de karıştırılmış (mix) halde, karbonat-bikarbonat tamponunda (pH 9,6) 250 ng/w, 500 ng/w, 750 ng/w ve 1000 ng/w konsantrasyona hazırlanarak 96 gözlü ELISA pleytlere (MaxiSorp, NUNC) 100 µl/w miktarında dağıtılarak gece boyunca 4 °C'de inkübasyona bırakıldı. Pleytlerde gerekli işaretlemelere yapılarak 8 gözü konjugat kontrol ve negatif kontrol gözleri olarak ayrıldı. Pleytler % 0,05 Tween 20 (PBS-T) içeren PBS ile beş kez yıkandı ve daha sonra bloklama işlemi amacıyla gözlere PBS içinde %3 oranında sulandırılmış süt tozu ilave edildi. Pleytler, 37 °C'de 1 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. PBS-T ile beş kez yıkandıktan sonra serum dilüsyonlarının standardizasyonu amacıyla PBS içinde 1:10, 1:20, 1:40 ve 1:80 oranlarında seyreltilmiş 100 µl serum örneği ilgili gözlere aktarıldı. Konjugat ve substrat kontrolü için test kontrol gözlerine 100 µl PBS dağıtıldı. Pleytler 37 °C'de 1 saat inkübe edildi, yıkama işleminin ardından kobaylar için konjugat sulandırmaları olarak 1:500, 1:1000 ve 1:2000 oranında sulandırılmış peroksidazla konjuge keçi anti-guinea pig IgG (A18775, Invitrogen) ve fareler için 1:5000, 1:10.000, 1:15.000 ve 1:20.000 oranında sulandırılmış peroksidazla konjuge keçi anti-mouse IgG (31430, Invitrogen) her göze (substrat kontrol gözleri dışında) 100 µl dağıtılarak

37 °C'de 1 saat inkübe edildi (Şekil 10). Sekiz kez yıkadıktan sonra, her kuyuya 100 µl O-Phenylenediamine Dihydrochloride (OPD, Sigma, P9187) substratı eklendi. Oda sıcaklığında 30 dk inkübasyonun ardından, 0,18 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ilavesiyle reaksiyon durduruldu. Optik dansite (OD) değerleri, ELISA okuyucu ile 450 nm'de (OD<sub>450</sub>) belirlendi. Standardizasyon işleminde tespit edilen antijen, serum ve konjugat sulandırma oranları kullanılarak kobay ve fare serum örneklerinin testine geçildi.



Şekil 10: In-house ELISA standardizasyon çalışmasında antijen sulandırmalarının dağıtılması

### 3.3. İstatistik Analiz

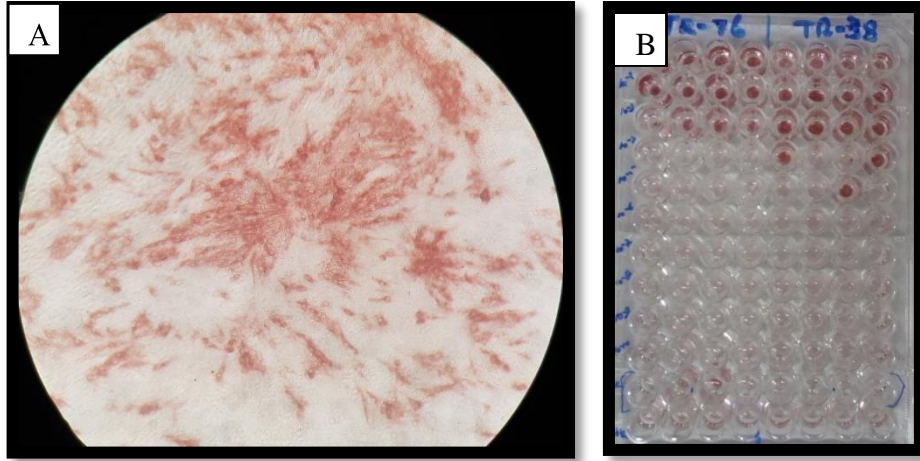
Tez çalışması sonucunda değişik viruslara karşı gelişen antikor titre değerleri arasındaki istatistiksel farklar için Mann-Whitney U testi ve aynı grup içerisindeki zamana bağlı değişimler için ise Paired Sample T testi uygulandı. İstatistiksel verileri değerlendirmek amacıyla IBM SPSS İstatistik 23 (Chicago, IL, ABD) programı kullanıldı. Kobay serumlarından elde edilen SN<sub>50</sub> değerlerinin log<sub>2</sub> tabanına karşılık gelen değerleri hesaplanarak istatistiksel analiz gerçekleştirildi. Fare serumlarında ileri serum sulandırmaları testlere dahil olmadığından istatistiksel verileri değerlendirilmedi. Bağımsız grupların karşılaştırmasında istatistiksel önem P<0,05 alınırken, aynı grup içindeki zamanlar karşılaştırıldığında 6 kez analiz olduğu için zamana bağlı değişimlerde istatistiksel önem P<0,016 ( $\alpha/k$ ,  $\alpha$  sabit sayı;  $0,1/6=0,016$ ) dikkate alındı.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Upstream Proses Aşamasında Elde Edilen Sonuçlar

#### 4.1.1. Virusların IIPMA Testiyle Teyidi ve Titrasyon Sonuçları

Aşı adayı olarak seçilen virusların birinci pasajlarındaki üremeleri IIPMA testiyle teyit edildi. Ardından viruslar ikinci pasaja tabi tutuldu ve mikrotitrasyon yöntemi ile enfektivite güçleri belirlendi (Şekil 11).



**Şekil 11:** Nonsitopatojen karakterdeki virus üremelerinin IIPMA ile tespiti

**A:** İnvirt mikroskopla tespit edilen virus üreme alanları (10x büyütme), **B:** Üretilen virusların mikrotitrasyonu

Çalışmalar sonunda üreme karakteri ve titre gibi (Doku enfektif doz 50, DKID<sub>50</sub>) kriterler yönünden en iyi sonucu veren BVDV-1l (TR-21) ve BVDV-1f (TR-26) suşları ile BVDV-2b grubunda yer alan tek izolat olan (TR-15) suşu aşı virusları olarak belirlendi (Tablo 6).



**Tablo 6:** Aşı içeriğinde kullanılacak olan aday virusların titre değerleri

BVDV-1 ve 2 alt grubu	Virus İzolatları	Enfektif titre (DKID <sub>50</sub> )
BVDV-1f	TR-26	10 <sup>-4,75</sup>
BVDV-1f	TR-38	10 <sup>-4,50</sup>
BVDV-1f	TR-1	10 <sup>-4,75</sup>
BVDV-1f	TR-16	10 <sup>-4,00</sup>
BVDV-1f	TR-21	10 <sup>-6,25</sup>
BVDV-1f	TR-29	10 <sup>-5,00</sup>
BVDV-2b	TR-15	10 <sup>-4,75</sup>

#### 4.1.2. Multiplicity of Infection (MOI) Değerleri

Aşı adayı virusların sonraki testlerde kullanmak üzere optimum titreyi veren MOI değerleri mikrotitrasyon testiyle belirlendi (Tablo 7). Buna göre test edilen 1, 0,1 ve 0,01 MOI değerleri arasından TR-21 için 1 MOI, TR-26 ve TR-15 için 0,1 MOI en yüksek titreyi veren optimum değer olarak tespit edildi.

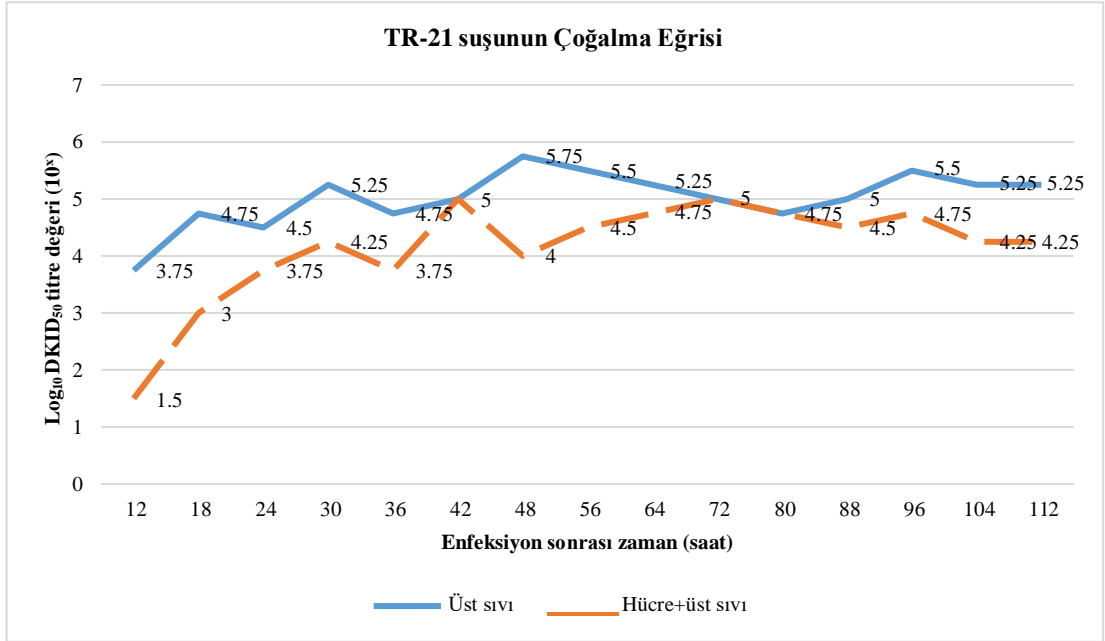
**Tablo 7:** Farklı MOI değerlerinde ekilen TR-21, TR-26 ve TR-15 viruslarının log<sub>10</sub> DKID<sub>50</sub> titreleri

MOI değeri	Titre (Log <sub>10</sub> DKID <sub>50</sub> )		
	TR-21	TR-26	TR-15
1	10 <sup>-6,25</sup>	10 <sup>-5,5</sup>	10 <sup>-3,5</sup>
0,1	10 <sup>-5,5</sup>	10 <sup>-5,75</sup>	10 <sup>-4</sup>
0,01	10 <sup>-5,25</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-3,5</sup>

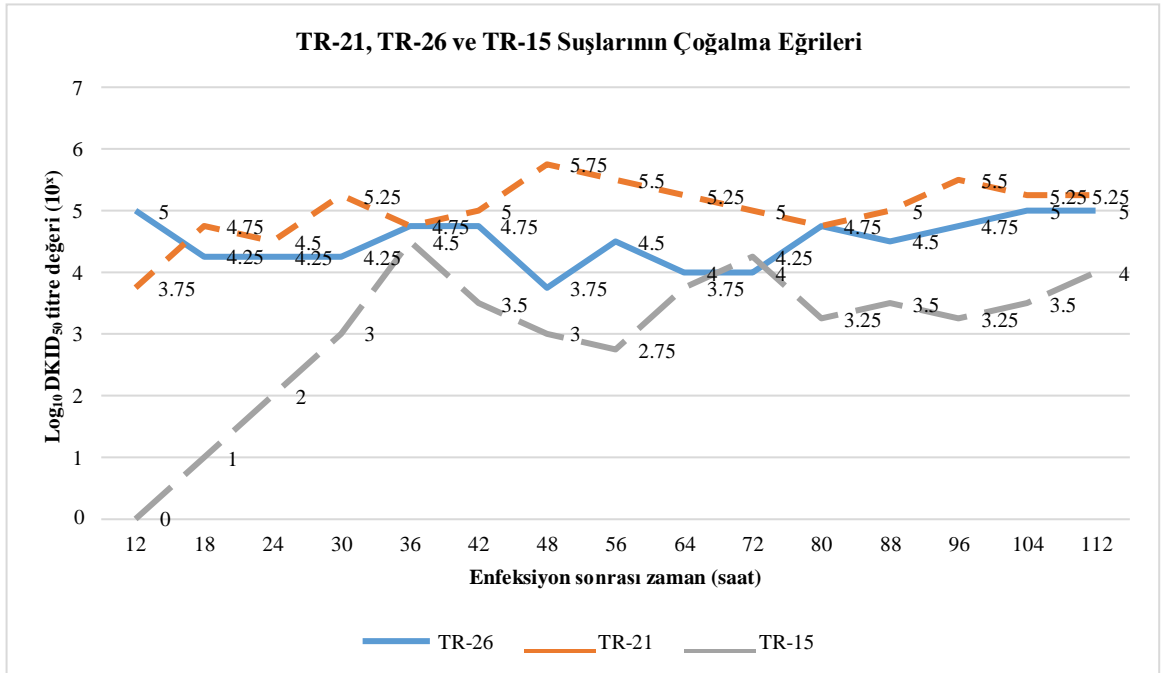
#### 4.1.3. BVDV TR-21, TR-26 ve TR-15 Suşlarının Çoğalma Eğrileri

MOI hesaplaması tamamlanmış olan virusların çoğalma eğrisi oluşturulup, en yüksek titrelere kaçınıcı günde ve hangi saat aralıklarında ulaştığı tespit edildi. TR-21 suşunda üst sıvı ve monolayer hücre+üst sıvı örneklerinde zamana bağlı önemli bir titre farklılığı tespit edilmedi (Şekil 12). Çoğalma eğrisi verilerine göre TR-21 suşunun hücre kültürüne virus ekimini takiben 48. saatte (DKID<sub>50</sub> değeri 10<sup>-5,75</sup>), TR-26 suşunun 12. saatte (DKID<sub>50</sub> değeri 10<sup>-5</sup>) ve TR-15 suşunun ise 36. saatte (DKID<sub>50</sub>

değeri  $10^{4,5}$ ) en yüksek titre değerlerine ulaştığı gösterildi (Şekil 13). TR-26 suşu 112. ve 114. saatlerde de  $10^5$  titre değerinde olduğu saptandı.



**Şekil 12:** TR-21 suşunun hücre kültür üst sıvısı ve hücre monolayeri + kültür üst sıvısında saptanan zamana bağlı titredeğişimleri

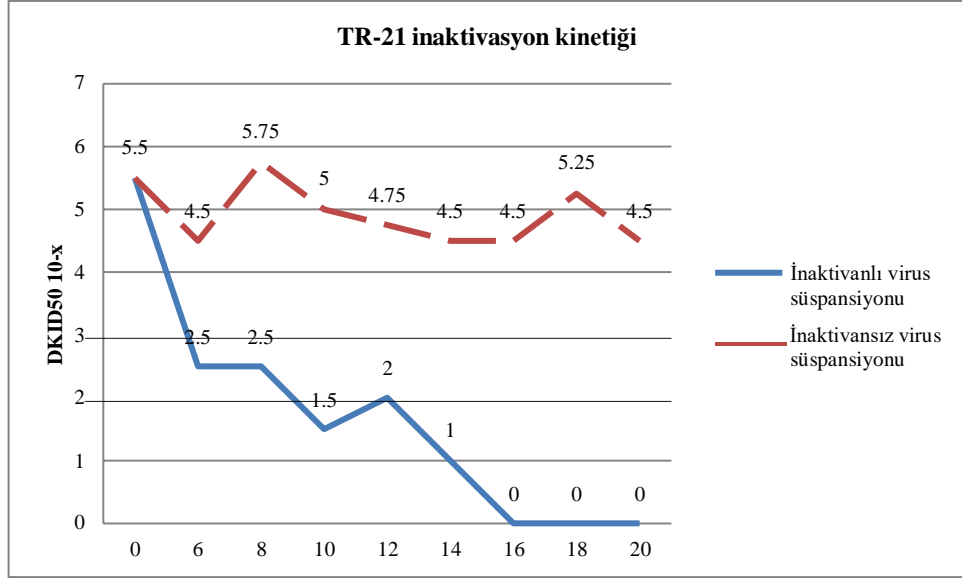


**Şekil 13:** BVDV TR-21, TR-26 ve TR-15 suşlarının zamana göre Log<sub>10</sub> DKID<sub>50</sub> titre değerleri

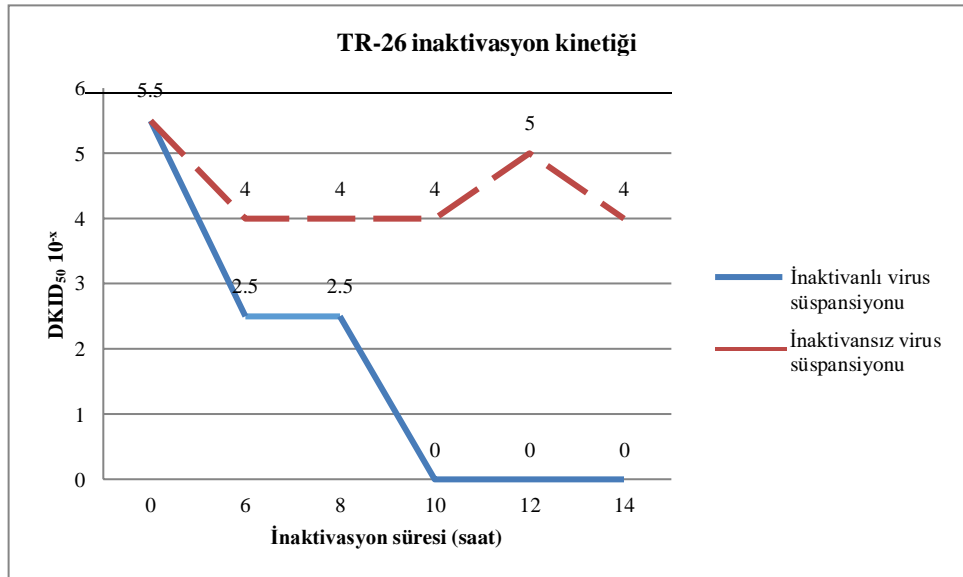
## 4.2. Downstream Proses Aşamasında Elde Edilen Sonuçlar

### 4.2.1. İnaktivasyon Kinetiği ve İnaktivasyon Kontrolü

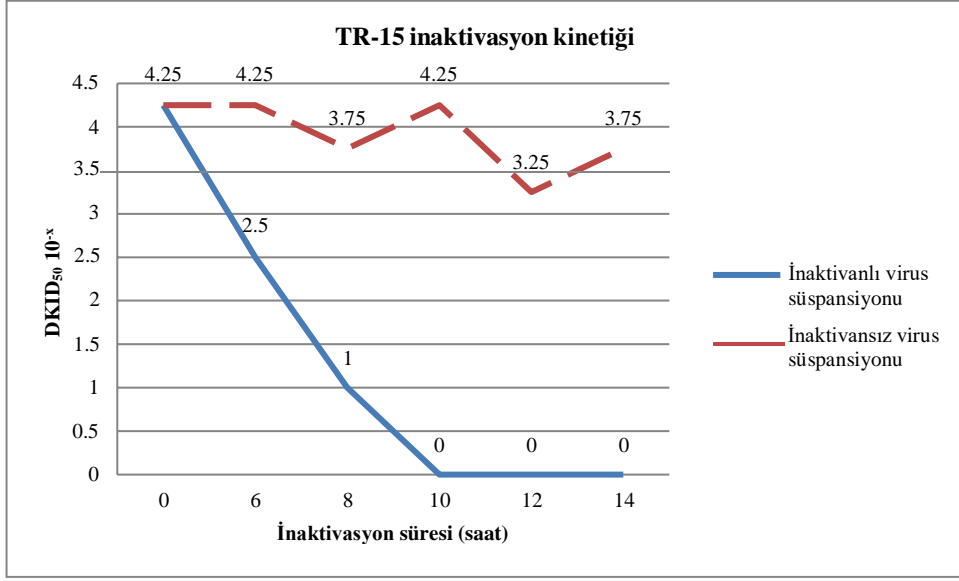
BEI ile kimyasal inaktivasyon işlemine tabi tutulan aşı viruslarının inaktivasyon kinetiği verileri Şekil 14-16'da gösterilmiştir. Buna göre TR-21 suşunun inaktivasyon işlemi takiben 16. saatte, TR-26 ve TR-15 suşlarının ise 10. saatte tamamen inaktive olduğu tespit edildi.



Şekil 14: BEI ile inaktivasyona tabi tutulan BVDV TR-21 virusunun zamana bağlı olarak değişen titreleri



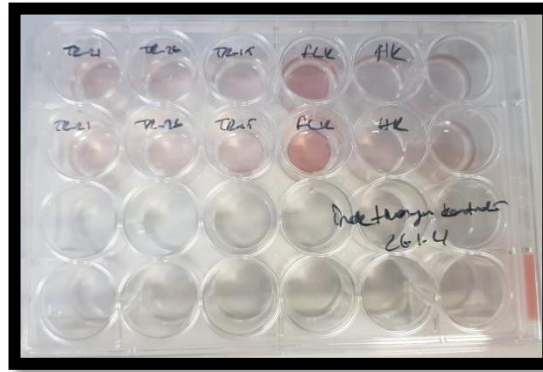
Şekil 15: BEI ile inaktivasyona tabi tutulan BVDV TR-26 virusunun zamana bağlı olarak değişen titreleri



**Şekil 16:** BEI ile inaktivasyona tabi tutulan BVDV TR-15 virusunun zamana bağılı olarak değişen titreleri

#### 4.2.2. Aşı Formülasyonunda Kullanılacak Antijenlerin İnaktivasyonu

İnaktivasyon kontrolü amacıyla 24 gözlü makro pleytte yapılan IIPMA testine göre (Şekil 17) virus kontrol olarak inokule edilen FLK suşunun boyandığı, inaktive edilen virüslerde ve hücre kontrol gözünde boyanma olmadığı görüldü. Böylelikle inaktivasyon işleminin başarıyla gerçekleştiği gösterildi.



**Şekil 17:** İnaktive edilen virüslerin 3 kör pasajın ardından IIPMA testiyle teyidi

#### 4.2.3. Antijenlerin Konsantrasyon Sonuçları

Ultrafiltrasyon yöntemiyle konsantrasyon işleminin ardından konsantre edilen süspansiyonun (konsantrat) (Tablo 8) ve filtreden geçen süspansiyonun (filtrat) BVDV Ag ELISA ile tespit edilen OD değerleri Tablo 9'da sunuldu. Buna göre

konsantraların oldukça yüksek OD'lere sahip olduğu belirlendi. Filtratların ise antijen yönünden negatif olduğu belirlendi.

**Tablo 8:** Ultrafiltrasyon sırasında aşı suşlarından elde edilen konsantrat miktarları

Aşı suşları	Başlangıç hacmi	1.konsantrasyon	2.konsantrasyon (Final hacim)
TR-21	257 ml	10,3 ml	7 ml*
TR-26	236 ml	138,5 ml	150 ml
TR-15	235,5 ml	135 ml	150 ml

\*: TR-21 suşunun final hacmi 7 ml'ye düştüğü için steril PBS ile 80 ml'ye tamamlandı.

**Tablo 9:** Antijen hazırlama aşamasında konsantre edilen virusların ve filtratların BVDV Ag ELISA ile elde edilen OD değerleri

BVD virus suşu	Test materyali	OD değerleri
TR-21	Konsantrat	3,120
	Filtrat	0,275
TR-26	Konsantrat	3,025
	Filtrat	0,404
TR-15	Konsantrat	3,048
	Filtrat	0,376

Onda bir (1:10) oranında sulandırılmış virus süspansiyonlarının 260 ve 280 nm dalga boylarında ölçümleri sonucunda elde edilen optik dansite değerleri protein konsantrasyon nomogramı kullanılarak hesaplandı (Tablo 10). Üretilen virus süspansiyonlarında her 1 ml hacmindeki protein miktarları Tablo 10'da gösterilmiştir.

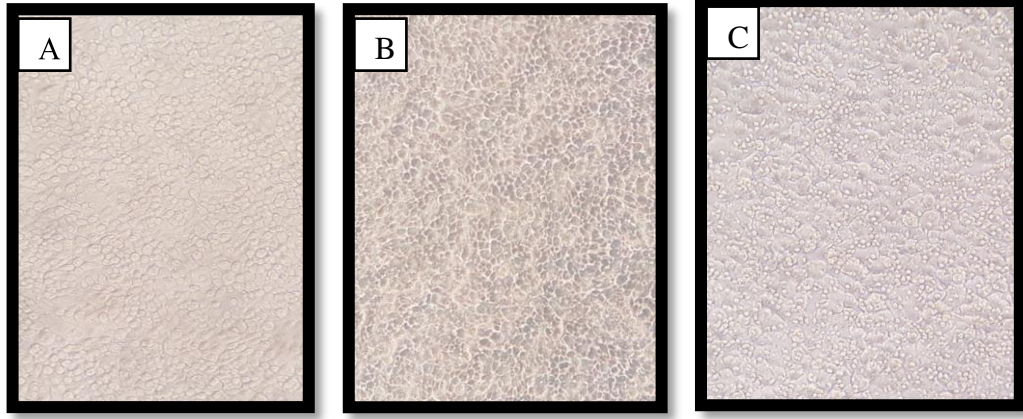
**Tablo 10:** BVDV TR-21, TR-26 ve TR-15 antijenleri için hesaplanan protein miktarları

Ölçüm	Protein miktarı (1:10 dilüsyon, mg/ml)	Protein miktarı (ana stok, mg/ml)
TR-21	2,516	25,16
TR-26	2,3609	23,60
TR-15	2,3058	23,05

#### 4.2.4. Hemadsorbsiyon ve Bakteriyolojik Test Sonuçları

Ana tohum stoklarına yapılan hemadsorbsiyon testine göre PI-3 virusuyla enfekte pozitif kontrol gözlerinde hemadsorbsiyon gerçekleşmiş olup TR-21, TR-26

ve TR-15 ile enfekte gözlerde hemadsorbsiyon reaksiyonu negatif olarak saptandı (Şekil 18). Böylelikle tohum stok viruslarının hemaglutine edici viruslardan arı olduğu teyit edildi. Aynı zamanda tohum stok virus süspansiyonundan ve formülasyondan ekim yapılan blood base agar besiyerinde 37 °C’de 7 günlük inkübasyonun sonunda bakteriyel üreme tespit edilmedi.



**Şekil 18:** Hemadsorbsiyon testi sonuçları

A: Virus ana tohum stoğu (TR-21, TR-26 ve TR-15), B: Hücre kontrol, C: Pozitif kontrol

### 4.3. İmmünizasyon Çalışmasında Elde Edilen Veriler

#### 4.3.1. Aday Aşılarda Güvenlik Testi Sonuçları

Hazırlanan formülasyonların deney hayvanları üzerindeki etkileri klinik bulgular yönünden incelendi. Bu süreçte ilk (prime) doz aşından sonra ikinci (booster) doz aşıya kadar olan sürede hayvanlarda sıradışı herhangi bir klinik bulgu gözlenmedi (Tablo 11).

**Tablo 11:** İmmünizasyondan sonra deney hayvanlarındaki klinik bulgular

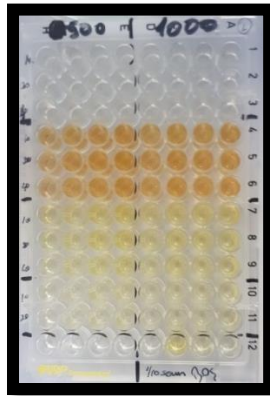
Bulgular	F-1		F-2		F-3		F-4	
	Kobay	Fare	Kobay	Fare	Kobay	Fare	Kobay	Fare
Lokal reaksiyon	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok
Sistemik reaksiyon	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok
Ölüm	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok

#### 4.3.2. In-house ELISA Standardizasyon Sonuçları

In-house ELISA standardizasyon işleminde veriler karşılaştırılarak yüksek OD değerleri dikkate alındı. Antijenin ayrı ayrı hazırlandığı pleytler ile miks antijenli pleytlerin kullanıldığı test sonuçları karşılaştırıldığında aralarında OD değeri bakımından önemli fark olmadığı tespit edildi (Tablo 12). Bu sonuçlara göre miks antijenle hazırlanan pleytlerle testlere devam edildi. Standardizasyon işleminde 750 ng/w oranında sulandırılan antijen gözleri en uygun sulandırma oranı olarak belirlendi (Tablo 13, Şekil 19). Ayrıca kobaylar için serum sulandırması 1:20, konjugat sulandırması 1:500 ve fareler için serum sulandırma oranı 1:20, konjugat sulandırma oranı ise 1:10.000 olarak tespit edildi (Tablo 12-14).

**Tablo 12:** Kontrol ve aşı gruplarından seçilen örneklerle miks antijenli pleyt ve tek antijenli pleyt karşılaştırması (OD<sub>450</sub>)

Deney grubu	Miks	Kaplanan Antijen		
		TR-21	TR-26	TR-15
Kontrol	0,485	0,516	0,515	0,522
F-1	0,652	0,615	0,670	0,674
F-2	0,648	0,634	0,685	0,655
F-3	0,748	0,726	0,789	0,748
F-4	0,704	0,674	0,709	0,722



**Şekil 19:** Kobay In-house ELISA çalışmasında serum ve konjugat standardizasyonu

**Tablo 13:** Farklı formülasyon gruplarından seçilen kobay serumlarında In-house ELISA antijen, serum ve konjugat standardizasyonu (OD<sub>450</sub>) değerleri

Serum sulandırması	Konjugat sulandırması	Kaplanan Antijen Miktarı							
		750 ng/w				1000 ng/w			
		F-1-1	F-1-5	F-3-1	F-3-5	F-1-1	F-1-5	F-3-1	F-3-5
1:10	1:500	0,328	0,435	0,496	0,532	0,376	0,468	0,432	0,516
1:20		0,296	0,462	0,506	0,541	0,379	0,496	0,459	0,482
1:40		0,257	0,382	0,434	0,514	0,349	0,463	0,411	0,450
1:10	1:1000	0,224	0,217	0,295	0,327	0,225	0,266	0,274	0,286
1:20		0,199	0,208	0,300	0,326	0,209	0,281	0,277	0,277
1:40		0,164	0,205	0,285	0,295	0,179	0,254	0,235	0,250
1:10	1:2000	0,133	0,135	0,189	0,192	0,161	0,176	0,176	0,177
1:20		0,110	0,182	0,172	0,186	0,130	0,152	0,154	0,167
Konjugat kontrol		0,054*	0,071*	0,072*	0,073*	0,082*	0,292 (1:500)**	0,163 (1:1000)**	0,098 (1:2000)**

\*: Antijenle kaplı olmayan negatif kontrol gözleri

\*\*: Konjugat kontrol için konjugat sulandırmaları

**Tablo 14:** In-house ELISA protokolünde fare serumu ve anti-fare konjugatı sulandırmalarının standardizasyon sonuçları (OD<sub>450</sub>)

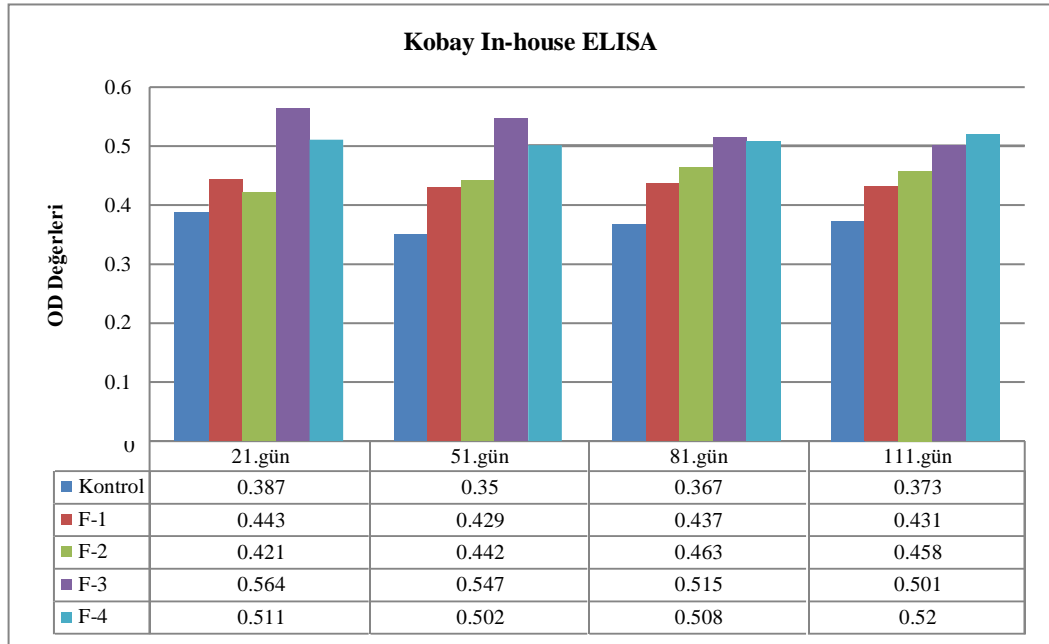
Deney grubu	Serum Sulandırması	Konjugat sulandırması			
		1:5.000	1:10.000	1:15.000	1:20.000
<b>Kontrol</b>	1:10	1,289	0,982	0,865	0,616
	1:20	1,407	1,096	0,915	0,708
<b>F-1</b>	1:10	1,785	1,550	1,298	1,018
	1:20	1,817	1,604	1,298	1,037
<b>F-2</b>	1:10	1,776	1,531	1,199	0,944
	1:20	1,785	1,561	1,248	0,979
<b>F-3</b>	1:10	1,695	1,453	1,131	0,884
	1:20	1,757	1,494	1,187	0,917
<b>F-4</b>	1:10	1,693	1,406	1,118	0,973
	1:20	1,681	1,409	1,107	0,833
	Positif Kontrol	1,511	1,191	0,817	0,656
	Negaif Kontrol	0,060	0,059	0,061	0,050



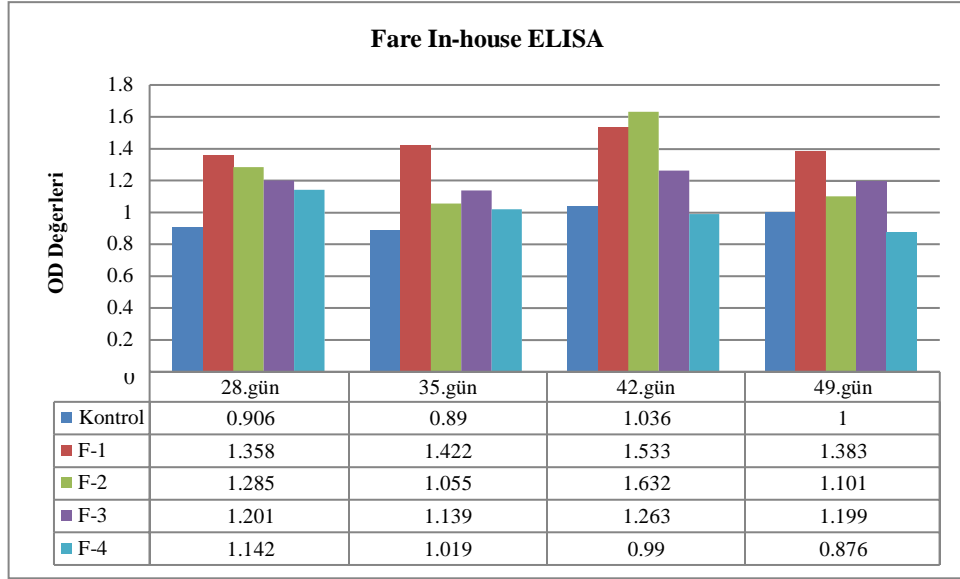
### 4.3.3. In-house ELISA Test Sonuçları

Kobay farelerde aşı uygulaması sonrasındaki dört örnekleme döneminde elde edilen In-house ELISA sonuçları Şekil 20 ve Şekil 21’de sunulmuştur. Kobaylardan alınan 21., 51., 81. ve 111. gün serumlarında kontrol grubundaki hayvanların OD değerlerinin grup ortalamaları 0,350-0,387 arasında seyrederken, F-1 grubu 0,429-0,443, F-2 grubu 0,421-0,463, F-3 grubu 0,501-0,564 ve F-4 grubu 0,502-0,520 arasında tespit edildi (Şekil 20). Yağ bazlı adjuvant gruplarının (F-3, F-4) OD değerlerinin diğer gruplara oranla daha yüksek olduğu belirlendi. Yağ bazlı adjuvant içeren bu iki formülasyon arasında ilk 3 örnekleme döneminde F-3 grubunun kısmen daha yüksek görünmesine karşın, bu grupta devamlı bir azalışla 111. gün F-4’ün altına düştüğü tespit edildi.

Aynı şekilde farelerden 28., 35., 42. ve 49. günlerde alınan serumlarda kontrol grubundaki hayvanların OD değerlerinin grup ortalamaları 0,890-1,036, F-1 grubu 1,358-1,533, F-2 grubu 1,101-1,632, F-3 grubu 1,139-1,263 ve F-4 grubunda ise 0,876-1,142 arasında tespit edildi (Şekil 21). Elde edilen verilere göre alüminyum bazlı adjuvant içeren F-1 ve F-2 grupları ön plana çıkarken, F-3 ve F-4 grupları arasında F-3 grubunun daha yüksek değere sahip olduğu belirlendi.



**Şekil 20:** İmmunize edilen kobayların kan serumlarından In-house ELISA ile elde edilen OD değerleri



**Şekil 21:** İmmunize edilen farelerin kan serumlarından In-house ELISA ile elde edilen OD değerleri

#### 4.3.4. Nötralizasyon Testi (SN<sub>50</sub>) sonuçları

Serumlara uygulanan SN<sub>50</sub> testleri (Nötralizasyon-IIPMA testi) Tablo 15'te belirtilen kriterlere göre değerlendirildi.

**Tablo 15:** Uygulanan nötralizasyon-IIPMA protokolünde değerlendirme kriterleri

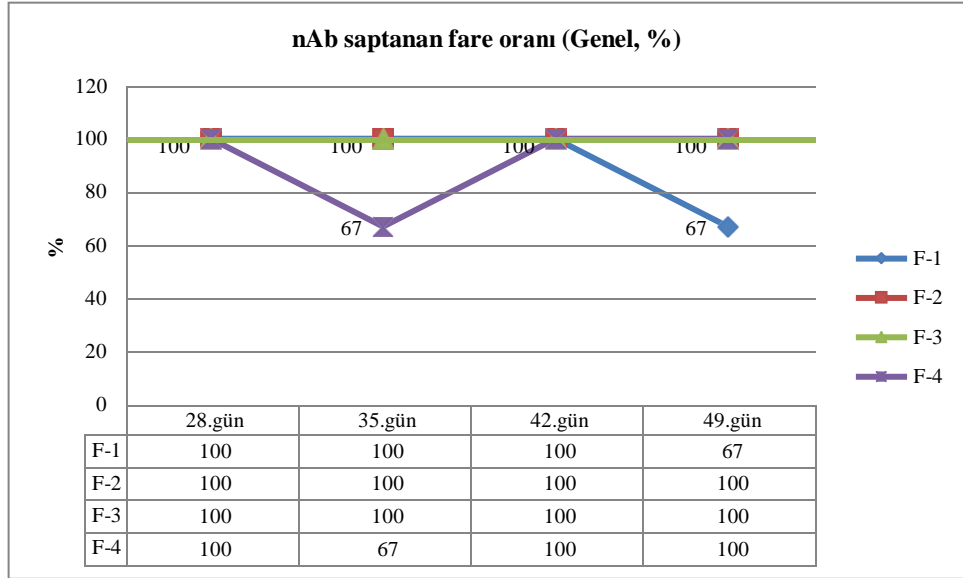
Boyanma	Virus üremesi	Virus nötralizasyonu	Antikor varlığı
+	+	-	-
-	-	+	+

##### 4.3.4.1. Fare Serumlarında Nötralizasyon Testi Sonuçları

Farelerden elde edilen serumlarla nötralizasyon testi çalışmaları homolog suşlara karşı gerçekleştirildi. Farelerden elde edilen verileri teyit etmek amacıyla immunize edilmiş kobay kan serumlarına da nötralizasyon testi gerçekleştirildi. Fare serumlarında aşı formülasyonlarının (F-1, F-2, F-3 ve F-4) 28., 35., 42. ve 49.günlerde nötralizan antikor gelişimini sağladığı tespit edilmiştir (Tablo 16).Çalışmada her grup için toplam 12 fare deneye alınmış olmasına rağmen kan alımı sırasında sakrifiye edildiği için her örnekleme zamanında 3 fareden örnek alınması mümkün olmuştur. Alınan kan miktarının sınırlı olması ve hücre üzerindeki toksik etkilerinden dolayı uygulama sürecinde 1:10 serum sulandırması üzerinden nötralizan antikor pozitif/negatif değerlendirmesi yapıldı. Fare deney gruplarında 49.

gün F-1 grubunda bir hayvanda ve 35. gün F-4 grubunda bir hayvanda antikor tespit edilemediği gözlemlendi (Şekil 22).

Her grupta yer alan hayvan sayıları düşük olmasına karşın testlerde kullanılan BVDV suşlarına karşı nötralizan antikor pozitiflik oranlarına bakıldığında TR-15 suşuna karşı pozitiflik oranlarının ön plana çıktığı tespit edildi. Bunu TR-21 ve TR-26'nın takip ettiği belirlendi. Aynı zamanda farelerde deney sonuçlarına göre 28. günden itibaren alınan kan örneklerinin tamamında testlerde kullanılan BVDV suşlarından en az birine karşı nötralizan antikor varlığı tespit edildi (Tablo 16). Farelerden elde edilen verilere göre TR-26 suşuna karşı oluşan nötralizan antikor yanıtının diğer iki suşa kıyasla düşük kaldığı belirlendi (Şekil 23). Bu suşa karşı elde edilen yanıtın özellikle alüminyum adjuvant bazlı F-1 ve F-2 gruplarında belirgin şekilde geride kaldığı görüldü (Şekil 23). F-3 ve F-4 gruplarında yüksek seyreden antikor pozitiflik oranının deneyin ilerleyen döneminde F-4 grubunda devam ettiği tespit edildi (Tablo 16).



**Şekil 22:** Fare deney gruplarında takip süresince saptanan nötralizan antikor pozitiflik oranları (nAb (+) hayvan sayısı / deneye alınan hayvan sayısı x 100), (En az bir virus suşuna karşı pozitif sonuç veren hayvan sayıları dikkate alınmıştır.)

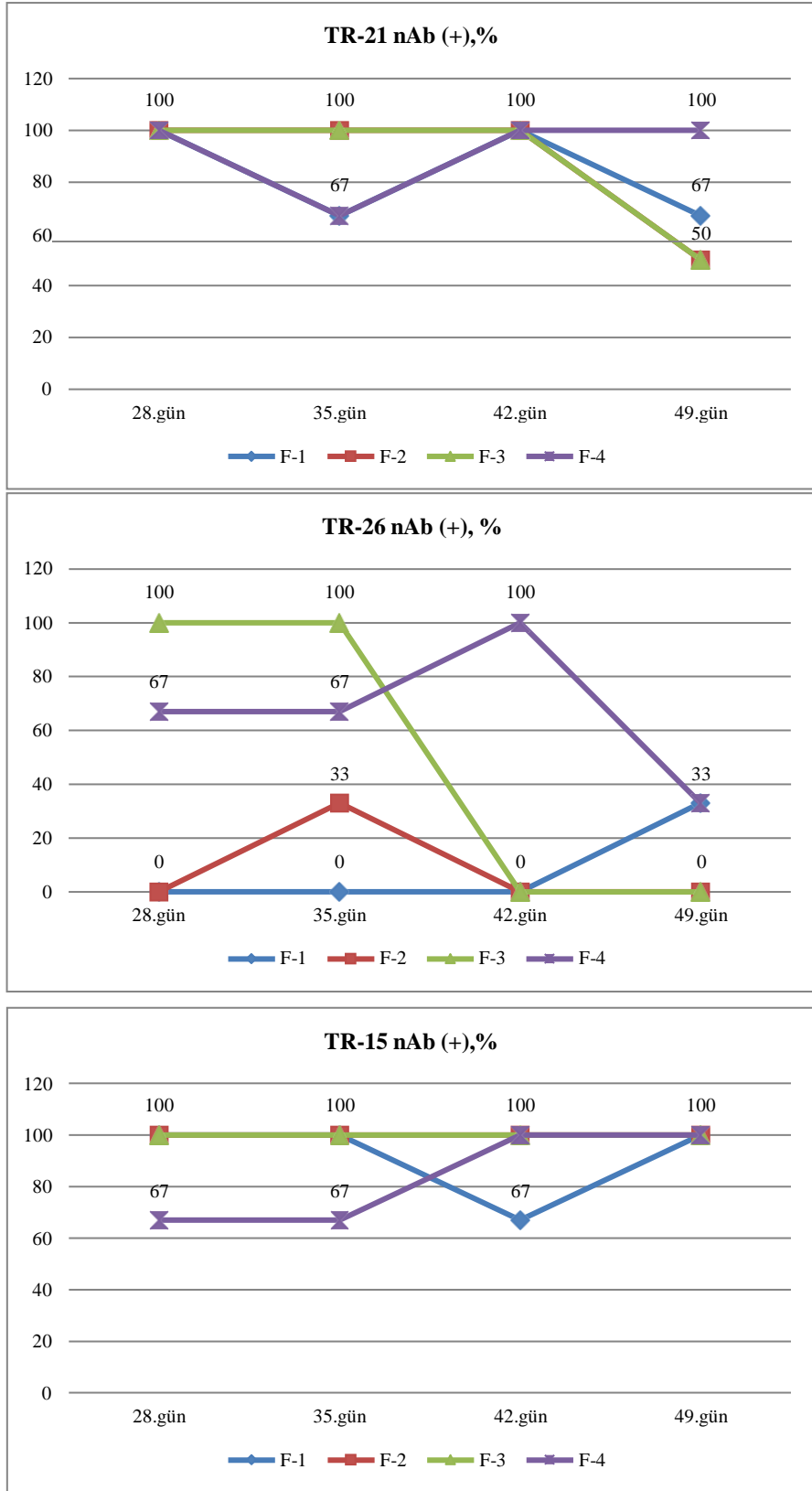
**Tablo 16:** Deney gruplarına göre nötralizan antikor (nAb) saptanan fare sayıları (%)

Örnekleme Dönemi	Grup	Deneye alınan fare sayısı	nAb gelişen fare sayısı*	Değişik Viruslara Karşı nAb (+) Fare Sayısı		
				TR-21	TR-26	TR-15
<b>(0+gün)</b>			(%)			
<b>28. gün</b>	F-1	3	3* (%100)	3/3 (%100)	0/3 (%0)	3/3 (%100)
	F-2	3	3 (%100)	3/3 (%100)	0/3 (%0)	3/3 (%100)
	F-3	3	3 (%100)	3/3 (%100)	3/3 (%100)	3/3 (%100)
	F-4	3	3 (%100)	3/3 (%100)	2/3 (%67)	2/3 (%67)
<b>35. gün</b>	F-1	3	3 (%100)	2/3 (%67)	0/3 (%0)	3/3 (%100)
	F-2	3	3 (%100)	3/3 (%100)	1/3 (%33)	3/3 (%100)
	F-3	3	3 (%100)	3/3 (%100)	3/3 (%100)	3/3 (%100)
	F-4	3	2 (%67)	2/3 (%67)	2/3 (%67)	2/3 (%67)
<b>42. gün</b>	F-1	3	3 (%100)	3/3 (%100)	0/3 (%0)	2/3 (%67)
	F-2	2**	2 (%100)	2/2 (%100)	0/2 (%0)	2/2 (%100)
	F-3	3	3 (%100)	3/3 (%100)	0/3 (%0)	3/3 (%100)
	F-4	3	3 (%100)	3/3 (%100)	3/3 (%100)	3/3 (%100)
<b>49. gün</b>	F-1	3	2 (%67)	2/3 (%67)	1/3 (%33)	3/3 (%100)
	F-2	2**	2 (%100)	1/2 (%50)	0/2 (%0)	2/2 (%100)
	F-3	2**	2 (%100)	1/2 (%50)	0/2 (%0)	2/2 (%100)
	F-4	3	3 (%100)	3/3 (%100)	1/3 (%33)	3/3 (%100)

nAb: Nötralizan antikor

\*Test edilen homolog ve heterolog BVDV suşlarına karşı nötralizan antikor taşıyan fare sayısı

\*\*Yetersiz serum miktarı ve deney dışı nedenlerle ölüm olması nedeniyle hayvan sayısı azalmıştır



**Şekil 23:** Farelerde homolog BVDV suşlarına karşı elde edilen nötralizan antikor pozitiflik oranları

#### 4.3.4.2. Kobay Serumlarında Nötralizasyon Testi Sonuçları

Kobay serumlarında saptanan bireysel antikor titre değerleri Tablo 17-20' de gösterildi.

**Tablo 17:** Bireysel kobay serumlarında 21.gün nötralizan antikor titre değerleri (SN<sub>50</sub>)

Nötralizan Antikor Titre Değerleri					
Grup/Deney hayvanı*	TR-21	TR-26	TR-15	NADL	Gi-II
F1-1	1:2	1:2	1:64	1:2↓**	1:2↓
F1-2	1:2	1:2↓	1:128	1:2↓	1:2↓
F1-3	1:2↓	1:128	1:2	1:2↓	1:2↓
F1-4	1:2↓	1:2↓	1:128	1:4	1:128
F1-5	1:128	1:2	1:2	1:2↓	1:2↓
F2-1	1:2↓	1:2	1:2	1:2↓	1:4
F2-3	1:2	1:2	1:32	1:2↓	1:4
F2-4	1:16	1:128	1:2	1:2↓	1:2↓
F2-5	1:2048	1:4	1:128	1:2↓	1:2
F2-6	1:2↓	1:2	1:128	1:2↓	1:2↓
F3-1	1:128	1:2	1:2048	1:2↓	1:2↓
F3-2	1:128	1:2	1:2048	1:2↓	1:2↓
F3-3	1:128	1:4	1:64	1:2↓	1:2↓
F3-4	1:2048	1:2	1:2048	1:2↓	1:2↓
F3-5	1:128	1:2	1:128	1:2	1:2↓
F3-6	1:16	1:128	1:64	1:8	1:2
F4-1	1:2048	1:2	1:2↓	1:2↓	1:2↓
F4-2	1:2	1:128	1:128	1:2↓	1:2↓
F4-3	1:1024	1:2↓	1:2↓	1:2↓	1:2↓
F4-4	1:512	1:128	1:128	1:2↓	1:32
F4-5	1:128	1:128	1:512	1:2↓	1:2
F4-6	1:2	1:2↓	1:2048	1:2↓	1:32

\*: Her gruptaki hayvanlar sıra numarasıyla gösterilmiştir.

\*\* : Titre değeri 1:2↓ olan hayvanlar antikor yönünden negatif olarak değerlendirilmiştir.

**Tablo 18:** Bireysel kobay serumlarında 51.gün nötralizan antikor titre değerleri (SN<sub>50</sub>)

Nötralizan Antikor Titre Değerleri					
Grup/Deney	TR-21	TR-26	TR-15	NADL	Gi-II
hayvanı*					
F1-1	1:2↓**	1:2↓	1:2	1:2↓	1:2↓
F1-2	1:2↓	1:2↓	1:2048	1:2↓	1:2↓
F1-3	1:2↓	1:2↓	1:2	1:2↓	1:2↓
F1-4	1:2↓	1:2↓	1:2	1:2↓	1:2↓
F1-5	1:2↓	1:2↓	1:2	1:2↓	1:2
F2-1	1:2↓	1:2↓	1:2	1:2↓	1:2↓
F2-3	1:2↓	1:2↓	1:2	1:2↓	1:2↓
F2-4	1:2↓	1:2↓	1:2	1:2↓	1:2↓
F2-5	1:8	1:2↓	1:2048	1:4	1:8
F2-6	1:2↓	1:2↓	1:128	1:2↓	1:16
F-3-1	1:64	1:2↓	1:128	1:2↓	1:64
F-3-2	1:2	1:2↓	1:128	1:2↓	1:32
F-3-3	1:2	1:2↓	1:2048	1:4	1:16
F-3-4	1:2	1:2↓	1:2048	1:4	1:16
F-3-5	1:2	1:2↓	1:2048	1:2	1:16
F-3-6	1:2↓	1:2↓	1:2048	1:2↓	1:16
F-4-1	1:2048	1:2↓	1:2048	1:2↓	1:2↓
F-4-2	1:64	1:2↓	1:128	1:2↓	1:2↓
F-4-3	1:128	1:2↓	1:2048	1:16	1:2
F-4-4	1:2048	1:2↓	1:2048	1:8	1:2
F-4-5	1:2	1:2↓	1:2	1:8	1:2↓
F-4-6	1:2	1:2↓	1:2048	1:2↓	1:2↓

\*: Her gruptaki hayvanlar sıra numarasıyla gösterilmiştir.

\*\*:: Titre değeri 1:2↓ olan hayvanlar antikor yönünden negatif olarak değerlendirilmiştir.

**Tablo 19:** Bireysel kobay serumlarında 81.gün nötralizan antikor titre değerleri (SN<sub>50</sub>)

Nötralizan Antikor Titre Değerleri					
Grup/Deney	TR-21	TR-26	TR-15	NADL	Gi-II
hayvan*					
F1-1	1:2↓**	1:2↓	1:2	1:2↓	1:4
F1-2	1:2↓	1:2↓	1:8	1:2↓	1:2↓
F1-3	1:2↓	1:2↓	1:16	1:2↓	1:2↓
F1-4	1:2↓	1:2↓	1:2	1:2↓	1:2↓
F1-5	1:2↓	1:2↓	1:64	1:2↓	1:2↓
F2-1	1:2↓	1:2↓	1:2	1:2↓	1:2
F2-3	1:2↓	1:2↓	1:2	1:2↓	1:2
F2-4	1:2	1:2↓	1:64	1:2↓	1:8
F2-5	1:2	1:2↓	1:1024	1:2↓	1:128
F2-6	1:2↓	1:2↓	1:128	1:2↓	1:32
F3-1	1:128	1:2↓	1:128	1:2↓	1:16
F3-2	1:32	1:2↓	1:2048	1:4	1:16
F3-3	1:4	1:2↓	1:16	1:2	1:32
F3-4	1:2	1:2↓	1:16	1:2	1:32
F3-5	1:2	1:2↓	1:16	1:2↓	1:2
F3-6	1:2	1:2↓	1:4	1:2	1:2
F4-1	1:8	1:2↓	1:128	1:2↓	1:128
F4-2	1:2	1:2↓	1:2048	1:2↓	1:64
F4-3	1:256	1:2↓	1:512	1:2	1:128
F4-4	1:256	1:4	1:512	1:2↓	1:128
F4-5	1:256	1:2↓	1:128	1:32	1:128
F4-6	1:512	1:2↓	1:16	1:2↓	1:64

\*: Her gruptaki hayvanlar sıra numarasıyla gösterilmiştir.

\*\* : Titre değeri 1:2↓ olan hayvanlar antikor yönünden negatif olarak değerlendirilmiştir.



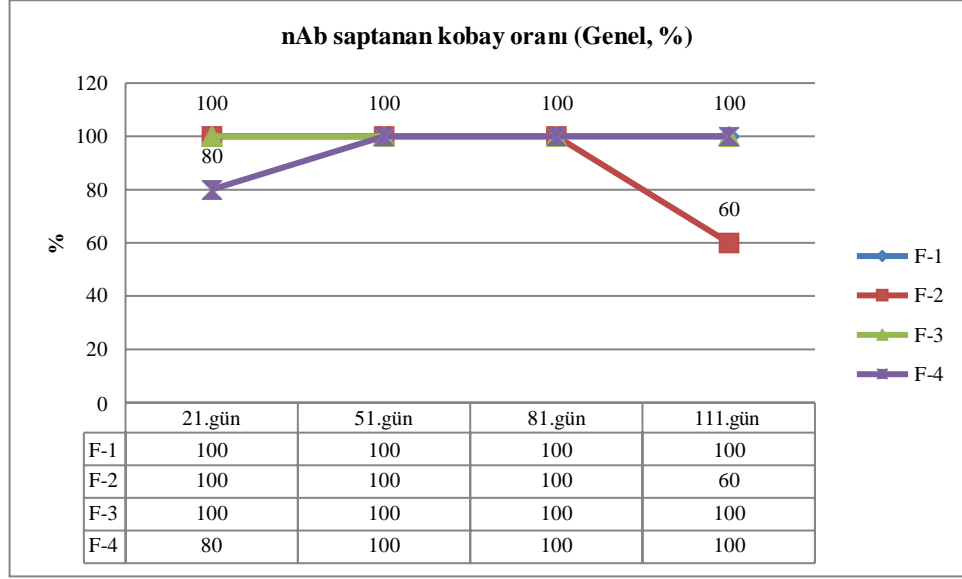
**Tablo 20:** Bireysel kobay serumlarında 111.gün nötralizan antikor titre değerleri (SN<sub>50</sub>)

Nötralizan Antikor Titre Değeri					
Grup/Deney	TR-21	TR-26	TR-15	NADL	Gi-II
hayvan*					
F1-1	1:2↓**	1:2↓	1:2	1:2↓	1:2↓
F1-2	1:2↓	1:2↓	1:16	1:2↓	1:2↓
F1-3	1:2↓	1:2↓	1:2	1:2↓	1:2↓
F1-4	1:2↓	1:2↓	1:4	1:2↓	1:4
F1-5	1:2↓	1:2↓	1:2	1:2↓	1:2↓
F2-1	1:2↓	1:2↓	1:2↓	1:2↓	1:2↓
F2-3	1:2↓	1:2↓	1:128	1:2↓	1:2↓
F2-4	1:4	1:2↓	1:128	1:2↓	1:4
F2-5	1:64	1:2↓	1:16	1:2↓	1:32
F2-6	1:2↓	1:2↓	1:2↓	1:2↓	1:2↓
F3-1	1:32	1:2↓	1:128	1:2↓	1:16
F3-2	1:16	1:2↓	1:2	1:2	1:16
F3-3	1:128	1:2↓	1:128	1:2	1:32
F3-4	1:2	1:2↓	1:64	1:2↓	1:32
F3-6	1:2	1:2	1:128	1:2	1:32
F4-1	1:2	1:2↓	1:512	1:2	1:32
F4-2	1:2↓	1:2↓	1:32	1:2↓	1:32
F4-3	1:2	1:2↓	1:64	1:2	1:32
F4-4	1:2	1:2↓	1:128	1:4	1:32
F4-5	1:2048	1:2↓	1:512	1:2↓	1:2↓
F4-6	1:2048	1:2	1:1024	1:2↓	1:4

\*: Her gruptaki hayvanlar sıra numarasıyla gösterilmiştir.

\*\* : Titre değeri 1:2↓ olan hayvanlar antikor yönünden negatif olarak değerlendirilmiştir.

F-1, F-2, F-3 ve F-4 gruplarında bulunan kobay serumlarında farklı günlerdeki nötralizan antikor (nAb) pozitiflik oranları Şekil 24'te sunulmuştur. F-4 grubunda 21. günde 1 (%20) hayvanın, F-2 grubunda 111. günde ise 2 (%40) hayvanın seronegatif konumda olduğu belirlendi.



**Şekil 24:** Deney gruplarında takip sürecinde saptanan nötralizan antikor pozitiflik oranları (nAb (+) hayvan sayısı / deneye alınan hayvan sayısı x100)

Kobayların farklı aşu formülasyonlarında homolog ve heterolog suşların en az birine karşı geliştirdikleri nötralizan antikor oranları Tablo 21'de sunuldu. Kobay serumlarında homolog ve heterolog suşlara karşı saptanan nötralizan antikor oranları ise Şekil 25'te sunuldu. Antikor yönünden pozitif sonuç veren kobay sayılarının değerlendirildiği bu verilere göre, TR-21 suşuna karşı F-1 ve F-2 gruplarında düşük düzeyde elde edilen pozitiflik değerlerinin % 60 düzeyinde başladıktan sonra gerileyerek F-1 grubu için % 0, F-2 grubu için % 40 düzeyine gerilediği görüldü (Şekil 25).

F-3 ve F-4 gruplarında tüm hayvanlarda (% 100) nAb tespit edildi. TR-26 suşuyla yapılan çalışmalarda ilk örnekleme döneminde tüm gruplarda belirli ölçülerde yanıt alınmasına rağmen sonrasında hızlı bir gerileme olduğu görüldü. TR- 15 ile yapılan nötralizasyon testlerinde tüm deneme sürecinde farelerde elde edilen verilere paralel olarak nAb pozitiflik oranlarının oldukça yüksek olduğu tespit edildi (Tablo 21). Gi-II suşuyla yapılan değerlendirmelerde kısmen daha düşük pozitiflik alındı.

Genel olarak bakıldığında alüminyum hidroksit bazlı adjuvant içeren gruplarda (F-1 ve F-2), yağ bazlı adjuvant kullanılan gruplara (F-3 ve F-4) kıyasla daha düşük pozitiflik oranları belirlendi. Testlerde elde edilen nötralizan antikor titre değerleri deneme grupları (F-1, F-2, F-3, F-4) bazında geometrik ortalaması alınarak Tablo 22’de sunuldu. Yağ adjuvantlı grupların ön plana çıktığı, deneyin ilk aşamalarında (21. ve 51. gün) F-3 grubunda belirlenen titre değerleri daha yüksek iken, ilerleyen günlerde (81. ve 111. gün) F-4 grubundaki değerlerin daha yüksek seyrettiği belirlendi. Ayrıca grup bazında seropozitif hayvanların antikor titrelerinin geometrik ortalama değerlerine bakıldığında diğer gruplara nazaran F-4 grubunun deney süresince ön planda olduğu belirlendi (Şekil 26).

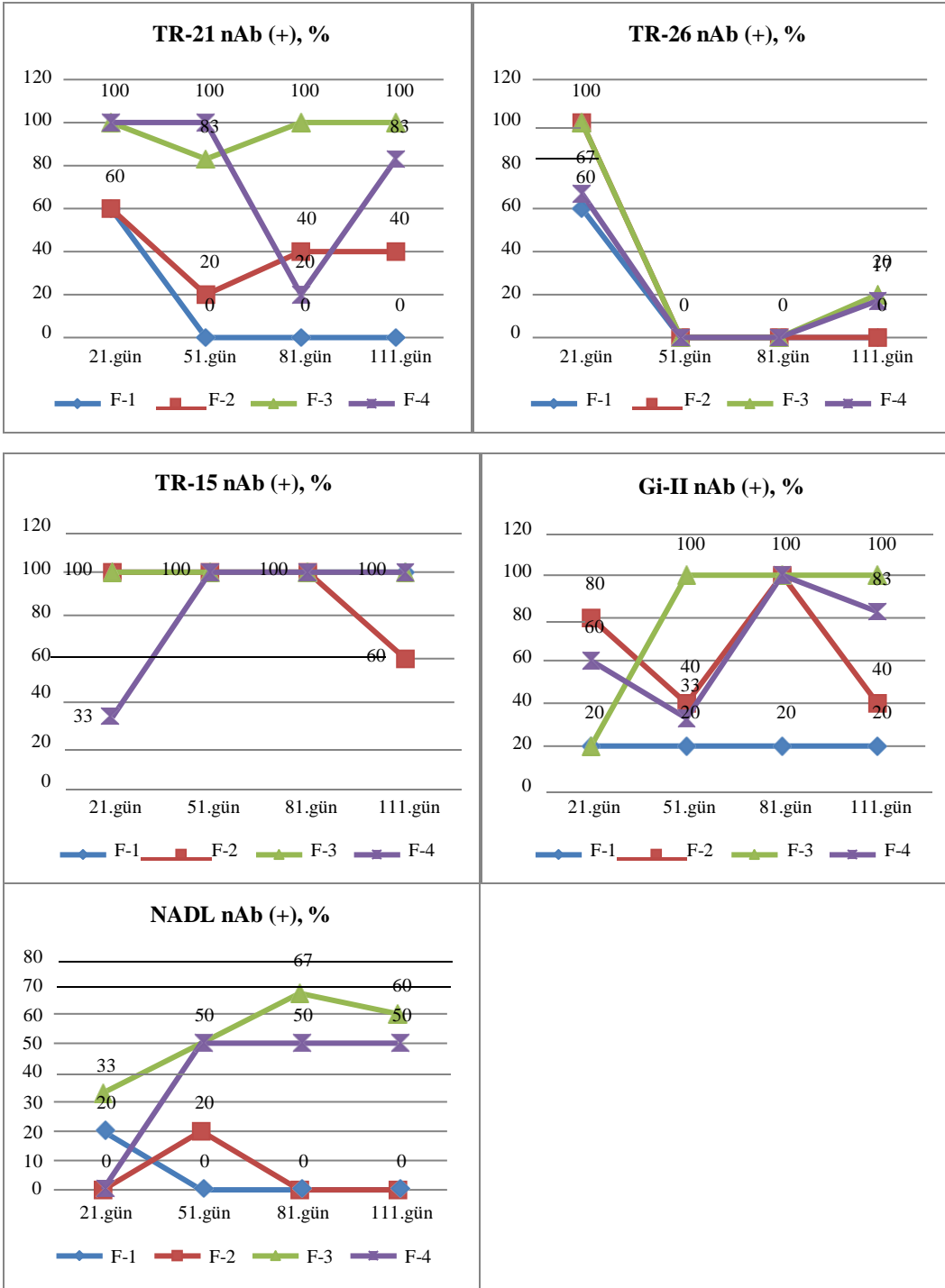
F-1 ve F-2 grubunda 51. gün birer hayvanda yüksek titre (1:2048) saptandı (Tablo-17-20). F-2 grubundaki hayvanın 81. günde de yüksek antikor titresinin devam ettiği fakat ilerleyen örneklem gününde titrenin düştüğü tespit edildi. F-3 ve F-4 gruplarındaki hayvanlarda yüksek antikor seviyelerinin 21. günden itibaren başlayıp deney süresince devam ettiği, fakat F-4 grubunda 111.günde daha yüksek olduğu belirlendi.

**Tablo 21:** Deney gruplarına göre nötralizan antikor (nAb) saptanan kobay sayıları (%)

Örnekleme Dönemi	Grup	Deneye alınan kobay sayısı	nAb gelişen kobay sayısı* (%)	Değişik Viruslara Karşı nAb (+) Kobay Sayısı				
				TR-21	TR-26	TR-15	Gi-II	NADL
21. gün	F-1	5	5 (%100)	3/5 (%60)	3/5 (%60)	5/5 (%100)	1/5 (%20)	1/5 (%20)
	F-2	5	5(%100)	3/5 (%60)	5/5 (%100)	5/5 (%100)	4/5 (%80)	0/5 (%0)
	F-3	6	6(%100)	6/6 (%100)	6/6 (%100)	6/6 (%100)	1/5 (%20)	2/6 (%33)
	F-4	6	5(%80)	6/6 (%100)	4/6(%67)	4/6(%67)	2/5(%40)	0/6 (%0)
51. gün	F-1	5	5 (%100)	0/5 (%0)	0/5 (%0)	5/5 (%100)	1/5 (%20)	0/5 (%0)
	F-2	5	5(%100)	1/5 (%20)	0/5 (%0)	5/5 (%100)	2/5 (%40)	1/5 (%20)
	F-3	6	6(%100)	5/6 (%83)	0/6 (%0)	6/6 (%100)	6/6 (%100)	3/6 (%50)
	F-4	6	6(%100)	6/6 (%100)	0/6 (%0)	6/6 (%100)	2/6 (%33)	3/6 (%50)
81. gün	F-1	5	5(%100)	0/5 (%0)	0/5 (%0)	5/5 (%100)	1/5 (%20)	0/5 (%0)
	F-2	5	5(%100)	2/5 (%40)	0/5 (%0)	5/5 (%100)	6/6 (%100)	0/5 (%0)
	F-3	6	6(%100)	6/6 (%100)	0/6 (%0)	6/6 (%100)	6/6 (%100)	4/6 (%67)
	F-4	6	6(%100)	6/6 (%20)	0/6 (%0)	6/6 (%100)	6/6 (%100)	3/6 (%50)
111. gün	F-1	5	5(%100)	0/5 (%0)	0/5 (%0)	5/5 (%100)	1/5 (%20)	0/5 (%0)
	F-2	5	3(%60)	2/5 (%40)	0/5 (%0)	3/5 (%60)	2/5 (%40)	0/5 (%0)
	F-3	5**	5(%100)	5/5 (%100)	1/5 (%20)	5/5 (%100)	5/5 (%100)	3/5 (%60)
	F-4	6	6(%100)	5/6 (%83)	1/6 (%17)	6/6 (%100)	5/6 (%83)	3/6 (%50)

\* Test viruslarından en az birine karşı nAb (+) olan

\*\*1 kobay deney sürecinde doğal nedenlerle ölmüştür

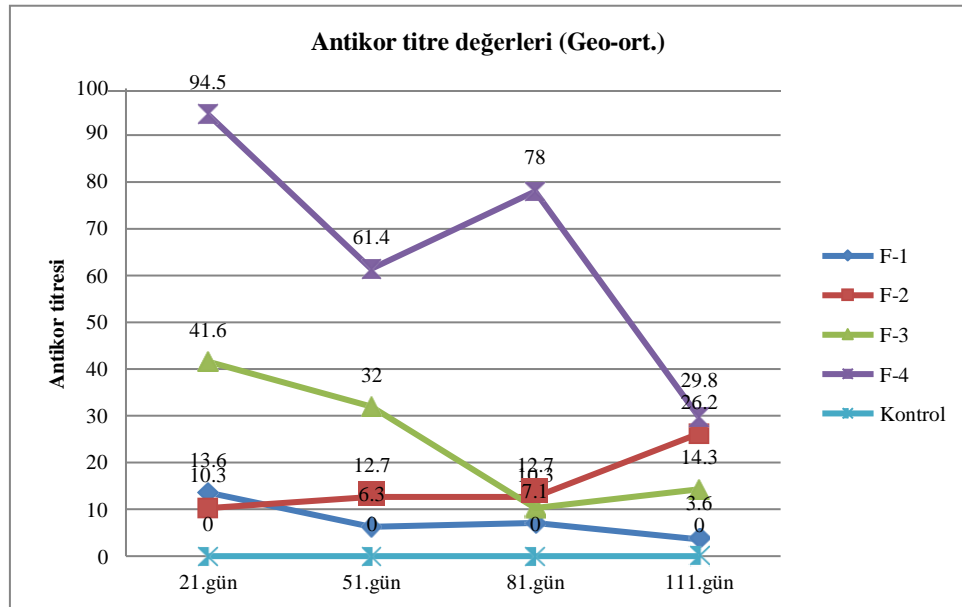


Şekil 25: Kobaylarda değişik BVDV suşların karşı elde edilen nötralizan antikor pozitiflik oranları (%)

**Tablo 22:** Kobay serumlarının değişik virüslere karşı gelişen antikor titrelerinin geometrik ortalamaları

Örnekleme Dönemi (0+gün)	Grup	nAb Titre Değeri (Grup ortalaması)*	Değişik Virüslere Karşı nAb (+) Titre değeri				
			TR-21	TR-26	TR-15	Gi-II	NADL
21. gün	F-1	13,6	3,5	3,5	21,1	2,6	1,3
	F-2	10,3	9,2	5,3	18,3	2	-
	F-3	41,6	143,7	4,5	406,4	1,1	1,6
	F-4	94,5	90,5	12,7	50,8	3,6	-
51. gün	F-1	6,3	-	-	8	1,1	-
	F-2	12,7	1,5	-	18,3	2,6	1,3
	F-3	32	3,1	-	812,7	22,6	1,8
	F-4	61,4	71,8	-	406,4	1,2	3,2
81. gün	F-1	7,1	-	-	8	1,3	-
	F-2	12,7	1,3	-	32	10,5	-
	F-3	10,3	7,1	-	40,3	10,0	1,8
	F-4	78	71,8	1,2	228	101,5	2
111. gün	F-1	3,6	-	-	3,5	1,3	-
	F-2	26,2	3	-	12,1	2,6	-
	F-3	14,3	12,1	1,1	48,5	24,2	1,5
	F-4	29,8	17,9	1,1	203,2	12,7	1,6

\* Tüm BVDV suşlarına karşı elde edilen bireysel verilerin geometrik ortalaması (Tablo 17-21 verileriyle hesaplanmıştır.)



**Şekil 26:** Kobay deneyinde grupların ortalama nötralizan antikor titre değerlerinin zamana bağlı değişimi

#### 4.4. İstatistiksel Analiz Sonuçları

İstatistiksel verilere bakıldığında kobayların immunizasyon sürecindeki 21., 51., 81. ve 111. günler içinde her bir virus için formülasyon grupları arasında anlamlı farklılık tespit edildi (Tablo 23-27,  $p<0,05$ ). Aynı şekilde her bir formülasyon gruplarındaki günler arasında da istatistiksel önemlilik belirlendi (Tablo 23-27,  $p<0,016$ ).

Kobaylarda TR-21 suşu için 21. gün alınan antikor titre değerlerinde kontrol grubuyla F3 ve F4 grubu arasında önemli farklılık görüldü ( $p<0,05$ ). Aynı zamanda 21. günde F-1 ve F-3 grupları arasındaki fark anlamlı bulundu ( $p<0,05$ ). TR-21 suşunda 51. gün yine kontrol grubuyla F-3 ve F-4 grupları arasında istatistiksel fark saptandı ( $p<0,05$ ). Antikor titre ölçümlerinin 51. gününde F-1 grubuyla F-3 ve F-4 grubu arasında, F-2 grubuyla ise F-4 grubu arasında anlamlı farklılık tespit edildi ( $p<0,05$ ). Kobaylarda 81. gün kontrol grubu, F-1 ve F-2 grupları dışında diğer gruplar arasında anlamlı farklılık bulundu ( $p<0,05$ ). Bununla birlikte 111. gün F-3 ve F-4 arasındaki fark önemli bulundu ( $p<0,05$ ). Aynı grup içindeki günler arasındaki farklı zaman dilimlerinde F-3 grubunda 21. günle diğer örnekleme günleri arasında önemli fark saptandı (Tablo 23,  $p<0,016$ ).

TR-26 suşu için 21. gün F-2 ile F-4 grupları arasında ve F-3 ile F-4 grupları arasında anlamlı farklılık bulundu ( $p<0,05$ ). 51. 81. ve 111. günlerde formülasyonlar arasında ve aynı formülasyon içindeki farklı günlerde önemli istatistiksel fark saptanmadı (Tablo 24,  $p>0,05$ ).

TR-15 suşuna karşı oluşan pozitiflik açısından 21. gün F-1 ile F-4 grupları arasında anlamlı farklılık bulunmaktadır ( $p<0,05$ ). Formülasyonlar arasında 51. gün ve 81. gün fark tespit edilmedi. Bununla beraber 111. gün F-1 ile F-3 ve F-4 grupları arasında anlamlı fark bulundu ( $p<0,05$ ). Aynı formülasyon içinde F-3 grubunda 21. ile 81. günler ve 51. ile 111. günler arasında anlamlı düzeyde farklılık tespit edildi (Tablo 25,  $p<0,016$ ).

BVDV-NADL suşunda formülasyonlar arasında 21., 51., 81. ve 111. günler için istatistiksel fark saptanmadığı ( $p>0,05$ ) gibi her bir formülasyon gruplarındaki günler arasında da anlamlı fark görülmedi (Tablo 26,  $p>0,05$ ).

Gi-II suşu için 51. gün F-2 ile F-3 grupları arasında anlamlı fark saptandı ( $p<0,05$ ). Yine 81. gün F-1 ile F-2 grubu, F-1 ile F-3 grubu, F-1 ile F-4 grubu ve F-3 ile F-4 grupları arasında istatistiksel fark tespit edildi ( $p<0,05$ ). Bununla birlikte 111. gün F-1 ile F-3 grupları, F-1 ile F-4 grupları ve F-3 ile F-4 grupları arasındaki fark önemlidir ( $p<0,05$ ). Aynı formülasyon içerisinde farklı zaman dilimleri arasında tespit edilen farklılıklar F-2 grubunda 81. ve 111. günler arasında bulundu ( $p<0,01$ ). F-3 grubunda 21. günler ve diğer günler arasında istatistiksel fark bulundu ( $p<0,01$ ). Aynı zamanda F-4 grubunda 21. gün ile 81. günler, 81. gün ile 111. günler ve 51. gün ile 81. ve 111. günler arasındaki farklılıklar önemlidir (Tablo 27,  $p<0,01$ ).



**Tablo 23:** Kobaylarda BVDV TR-21 suşuna karşı oluşan ortalama antikor titre değerlerinin istatistik analizi (Log<sub>2</sub>).

Gün	Kontrol	F1	F2	F3	F4
21.	0,000±0,000Aa	1,800±2,949ACa	3,200±4,658ABa	7,166±2,228Ba	6,500±4,460BCa
51.	0,000±0,000Aa	0,000±0,000Aa	0,600±1,341ABa	1,666±2,160BCbc	6,166±4,490Ca
81.	0,000±0,000Aa	0,000±0,000Aa	0,400±0,547Aa	2,833±2,562Bbc	7,000±2,966Ca
111.	0,000±0,000Aa	0,000±0,000Aa	1,600±2,607ABa	3,666±2,338Bac	4,166±5,307Ba

Titre değerleri log<sub>2</sub> tabanında sunulmuştur.

A, B,C; Aynı satırdaki farklı harfler formülasyon grupları arasındaki istatistiki olarak önemli düzeyde fark olduğunu gösterir (p<0,05).

a, b, c; Aynı sütundaki farklı harfler söz konusu formülasyondaki günler arasında istatistiki önemliliği gösterir (p<0,016).

**Tablo 24:** Kobaylarda BVDV TR-26 suşuna karşı oluşan ortalama antikor titre değerlerinin istatistik analizi (Log<sub>2</sub>).

Gün	Kontrol	F1	F2	F3	F4
21.	0,000±0,000Aa	1,8±2,949ABa	2,4±2,607Ba	2,166±2,401Ba	3,666±3,669Aba
51.	0,000±0,000Aa	0,000±0,000Aa	0,000±0,000Aa	0,000±0,000Aa	0,000±0,000Aa
81.	0,000±0,000Aa	0,000±0,000Aa	0,000±0,000Aa	0,000±0,000Aa	0,333±0,816Aa
111.	0,000±0,000Aa	0,000±0,000Aa	0,000±0,000Aa	0,166±0,408Aa	0,166±0,408Aa

Titre değerleri log<sub>2</sub> tabanında sunulmuştur.

A, B,C; Aynı satırdaki farklı harfler formülasyon grupları arasındaki istatistik olarak önemli düzeyde fark olduğunu gösterir (p<0,05).

a, b, c; Aynı sütundaki farklı harfler söz konusu formülasyondaki günler arasında istatistik olarak önemli olduğunu gösterir (p<0,016).

**Tablo 25:** Kobaylarda BVDV TR-15 suşuna karşı oluşan ortalama antikor titre değerlerinin istatistik analizi (Log<sub>2</sub>).

Gün	Kontrol	F1	F2	F3	F4
21.	0,000±0,000Aa	4,4±3,130Ba	4,2±3,033BCa	8,666±2,581BCac	5,666±4,633ACa
51.	0,000±0,000Aa	3±4,472Ba	4,2±4,604Ba	9,666±2,065Bab	8,666±4,082Ba
81.	0,000±0,000Aa	4±3,082Ba	5±3,937Ba	5,333±3,204Bbd	7,833±2,401Ba
111.	0,000±0,000Aa	1,8±1,303Ba	3,6±3,507ABCa	5,666±2,338Ccd	7,666±1,966Ca

Titre değerleri log<sub>2</sub> tabanında sunulmuştur.

A, B,C; Aynı satırdaki farklı harfler formülasyon grupları arasındaki istatistik olarak önemli düzeyde fark olduğunu gösterir (p<0,05).

a, b, c; Aynı sütundaki farklı harfler söz konusu formülasyondaki günler arasında istatistikî önemliliği gösterir (p<0,016).

**Tablo 26:** Kobaylarda BVDV NADL suşuna karşı oluşan ortalama antikor titre değerlerinin istatistik analizi (Log<sub>2</sub>).

Gün	Kontrol	F1	F2	F3	F4
21.	0,000±0,000Aa	0,4±0,894Aa	0,000±0,000Aa	0,666±1,211Aa	0,000±0,000Aa
51.	0,000±0,000Aa	0,000±0,000Aa	0,8±1,788Aa	1,5±1,974Aa	1,666±1,861Aa
81.	0,000±0,000Aa	0,000±0,000Aa	0,000±0,000Aa	0,833±0,752Aa	1±2Aa
111.	0,000±0,000Aa	0,000±0,000Aa	0,000±0,000Aa	0,5±0,547Aa	0,666±0,816Aa

Titre değerleri log<sub>2</sub> tabanında sunulmuştur.

A, B,C; Aynı satırdaki farklı harfler formülasyon grupları arasındaki istatistik olarak önemli düzeyde fark olduğunu gösterir (p<0,05).

a, b, c; Aynı sütundaki farklı harfler söz konusu formülasyondaki günler arasında istatistik olarak önemli olduğunu gösterir (p<0,016).

**Tablo 27:** Kobaylarda BVDV Gi-II suşuna karşı oluşan ortalama antikor titre değerlerinin istatistik analizi (Log<sub>2</sub>).

Gün	Kontrol	F1	F2	F3	F4
21.	0,000±0,000Aa	1,4±3,130Aa	1±1Aab	0,166±0,408Aa	1,833±2,483Aac
51.	0,000±0,000Aa	0,2±0,447Aa	2,4±3,577Aab	4,5±0,836Bb	0,333±0,516Aa
81.	0,000±0,000Aa	0,4±0,894Aa	4,4±3,286BCa	3,333±1,861Bb	6,666±0,516Cb
111.	0,000±0,000Aa	0,4±0,894Aa	1,4±2,190ACb	4,5±0,547Bb	3,666±2,160BCc

Titre değerleri log<sub>2</sub> tabanında sunulmuştur.

A, B,C; Aynı satırdaki farklı harfler formülasyon grupları arasındaki istatistik olarak önemli düzeyde fark olduğunu gösterir (p<0,05).

a, b, c; Aynı sütundaki farklı harfler söz konusu formülasyondaki günler arasında istatistiksel önemliliği gösterir (p<0,016).

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Dünya çapında yaygın olarak görülen ve sığırların önemli patojenlerinden biri olan Bovine viral diyare virus-1 ve -2 (Bovine Pestiviruses A ve B) ülkemizde de ekonomik kayıplara sebep olmaktadır. Tek zincirli RNA genomuna sahip olan BVD virusu antijenite, sitopatoloji ve virülens özellikleri bakımından değişkenlik gösteren farklı genotiplere ve çeşitli alt genotiplere sahiptir. Etken her bir replikasyon döngüsü sırasında yüksek oranda mutasyon riskine maruz kalır.

BVDV salgınlarını kontrol etmek ve önlemek için devam eden büyük çabalara rağmen hala dünya çapında salgınlar rapor edilmektedir (Chang ve ark., 2021). BVDV'nin kontrolünde duyarlı hayvanların aşılınması profilaksi için ana stratejilerden biridir. BVD dahil birçok viral hastalığın kontrolüne ve eradikasyonuna katkıda bulunur. Hastalığı kontrol altına alma girişimlerinde, canlı atenüe veya inaktif BVDV aşılı rutinde sıklıkla kullanılan aşılardır. BVDV aşısının en önemli amacı, düveleri ve inekleri PE hayvanların oluşumuna yol açan transplasental enfeksiyona karşı korumaktır. Ancak buzağuların klinik enfeksiyondan korunmasını sağlamak için aşılınması da BVDV enfeksiyonundan kaynaklanan ekonomik kayıpları en aza indirmek için gereklidir.

Yeni suşların ve varyantların ortaya çıkması, geleneksel aşuların etkinliğine karşı önemli bir kısıt oluşturur. Antijenik çeşitlilik nedeniyle ticari BVDV aşuları genellikle iki (BVDV-1a ve -2a) veya üç (BVDV-1a, -1b ve -2a) farklı suşu içerir (Walz ve ark., 2020). Suş bileşimine bağlı olarak, ticari BVDV aşuları homolog ve heterolog suşlara karşı da değişen titrelerde nötralizan antikor oluşturmaktadır (Fulton ve ark., 1997; Fulton ve ark., 2020; Sozzi ve ark., 2020; Xue, Mattick, Smith, Umbaugh & Trigo, 2010). Yapılan çalışmalarda tek bir serum kullanılarak alt gruplar arasında yüksek veya düşük antikor titrelerinin saptanması, genetik farklılıkların serolojik yansımaları açıkça göstermektedir.

BVDV'nin eradikasyonu esas olarak, virus suşlarının ve varyantlarının titizlikle ve sürekli izlenmesi, çeşitli suşları ve varyantları tespit etmek için yüksek etkinliğine sahip en güncel teşhis yöntemlerinin geliştirilmesi ve virusa karşı etkin homolog aşuların geliştirilmesine bağlıdır. BVDV kontrol programları birçok ülkede

yürütülmekte olmasına karşın, genellikle düşük ve orta gelir düzeyindeki ülkelerde kontrol programı uygulanmamaktadır.

Bu tez çalışmasında, yerel aşı adayları BVDV suşlarının inaktivasyon kinetiği belirlenerek farklı adjuvantlarla inaktif aşı formülasyonları oluşturulmuştur. İmmünizasyon sonrası aşılardan potansiyel çalışmalarını deney hayvanlarından elde edilen serumlarla gerçekleştirilmiştir. Böylelikle homolog ve heterolog suşlara karşı en iyi yanıtı veren aşı formülasyonunun belirlenmesi amaçlanmıştır.

### **5.1. Aşı Adayı Viruslarının Üreme Karakterizasyonuna ve İnaktivasyon Kinetiğine Yönelik Çalışmalar**

MOI, ortamdaki enfeksiyöz etken sayısının enfeksiyon hedefi olan konak hücre sayısına oranıdır. Bu oran, etken ve konakçının bağıl konsantrasyonunun yaklaşık olarak ayarlanmasıyla kontrol edilebilmektedir. Her bir konak hücre için tam olarak belirlenemese de hemen hemen tüm konakçı hücrelerin enfekte olduğundan emin olmak için ortalama MOI değeri hesaplanabilmesi önemlidir. MOI optimizasyonu, bir virusun çoğalma eğrisinin araştırılmasında, aşı geliştirmede virus ana tohum stok oluşturulması ve konvansiyonel temel teşhis yöntemlerinde yüksek virus veriminin elde edilmesinde kullanılmaktadır (Abdoli, Soleimanjahi, Kheiri, Jamali, & Jamaati 2013; Wang ve ark., 2021). Primer makrofaj hücre kültüründe BVD virusunun MOI optimizasyonu yapılan bir çalışmada 200, 38, 10 ve 2 MOI değerlerinden elde edilen titre değerleri karşılaştırılmıştır. Buna göre 4. gün alınan üst sıvılardan elde edilen verilere göre 200, 38, 10 ve 2 MOI değeriyle ekilen virusun titreleri sırasıyla 0,6, 2,0,  $0,2 \times 10^{-7}$  ve  $2,5 \times 10^{-4}$  olarak tespit edilmiştir (Truitt, & Shechmeister, 1973). İnfluenza virusuyla yapılan benzer bir çalışmada 1, 0,1, 0,01, 0,001 ve 0,0001 MOI değerleriyle test yapılmıştır. Yüksek MOI'de (1 ve 0,1) enfeksiyondan hemen sonra (1.saat) enfektivitesinin pozitif olduğu, virusun süpernatantta kaldığı ortaya koyulmuştur. Bu durumda yapılan  $DKID_{50}$  analizlerinde yanlış pozitif sonuçların elde edileceği gösterilmiştir. Hücre kültüründe influenza virusu için en iyi MOI değerini 0,01 olduğu, progeni virusun enfeksiyon sonrası 8. saatten itibaren üretilmeye başladığı tespit edilmiştir (Abdoli ve ark., 2013).

Wang ve ark., (2021) tarafından yapılan bir çalışmada farklı hücre yoğunlukları kullanılarak değişen MOI değerlerindeki Bovine alfaherpesvirus-1 (BoHV-1) titreleri

karşılaştırılmıştır. Deneyin sonucuna göre hücre konsantrasyonu ve virus üretimi arasında pozitif bir ilişki olduğu gösterilmiştir. Bu tez çalışmasında sabit hücre yoğunluğunda 1, 0,1 ve 0,01 MOI değerlerindeki ekimlerine göre TR-21 için 1 ve TR-26 ve TR-15 için 0,1 MOI değerleri en yüksek titreyi veren optimum değer olarak saptanmıştır (Tablo 7). Elde edilen farklı sonuçlar MOI değerlerinin virus suşlarına ve hücrel faktörlere göre değişebileceğini göstermektedir. Dolayısıyla virus üretimlerinde MOI değerinin dikkatle uygulanmasının önemi ön plana çıkmaktadır.

BVD virusu hücreye reseptör aracılı endositoz aracılığıyla penetre olmaktadır. Virus penetrasyonundan sonra viral nükleik asit örtücü katmanlarından arınarak sitoplazmada çoğalmaya başlar. Sitoplazmada eklips ve matürasyon aşamalarını takiben yeni nesil virionlar oluşur. Bu aşamalarda ekstrasellüler ortamda viral partikül sayısı oldukça sınırlıdır. Hücreye tutunduktan sonra yeni nesil virion oluşuncaya kadar geçen süre her virus için değişmektedir. Aslında bu süre aynı virus ailesinin virus türünün suşları arasında dahi farklılık göstermektedir (Johnson, & Rosenbusch, 1990). BVD virusunun iki farklı suşuyla yapılan çoğalma eğrisi çalışmasında sitopatojenik NADL suşunun 6. saat, ncp FCS suşunun 8. saatten itibaren hücre dışına saçılmaya başladığı tespit edilmiştir. İlk 20 saatlik replikasyon sürecinin incelendiği bu çalışmada lag fazını takiben 12. saatte virionların pik seviyesine ulaştığı gösterilmiştir (Nuttall, 1980). İki farklı biyotipin karşılaştırıldığı benzer bir çalışmada virus salınımının 8-12. saatler arasında maksimum olduğu saptanmıştır. Bununla birlikte aynı suşların endotelial hücre hattında ve primer hücre hatlarındaki titrelerinde de değişkenlik gösterdiği belirlenmiştir (Johnson, & Rosenbusch, 1990).

Gong ve ark., (1996) tarafından yapılan bir çalışmada ekstrasellüler ncp BVD virusu ilk olarak 4-6. saatler arasında tespit edilmiş ve virus titresi esasen 10-16. saatler arasında yükselmeye başlamıştır. Söz konusu çalışmada daha erken saatlerde enfeksiyöz virus tespiti yapılmasının yüksek MOI değeriyle (20 MOI) ekimden kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Özetle virusun çoğalma siklusu incelenirken aslında hücre tipi, suşlar arasındaki farklılık, ortamın pH'sı ve MOI değeri gibi birçok faktörden etkilendiği görülmektedir. BVDV ile ilgili yapılan çoğalma eğrisi çalışmalarında genellikle virusun ilk 24 saat içerisindeki replikasyon döngüsü



incelenmiştir. Bu tez çalışmasında ele alınan virus suşlarının çoğalma eğrisi verilerinin değerlendirilmesi virus ekilmesini takiben 12. saatten başlanarak değerlendirilmiştir. Elde edilen çoğalma eğrisi verilerine göre TR-21 suşu ekimtakiben 48. saatte, TR-26 suşu 12. saatte ve TR-15 suşu ise 36. saatte en yüksek titre değerlerine ulaştığı belirlenmiştir. Bu verilere göre virusun alt genotipleri arasında en yüksek titre değerlerinin saat bazında farklılık gösterdiği değerlendirilebilir. Elde edilen sonuçlar yüksek titre değerlerine ihtiyaç duyulan çalışmalarda her virus için çoğalma eğrisi belirlenmesinin gerekliliğini göstermektedir.

İnaktif virus aşılarda önemli noktalardan biri inaktivasyon prosedürlerinden viral antijenin immünojenitesinin etkilenmemesidir. BEI inaktivanı, 2-bromoetilamin HBr (BEA) ve NaOH'dan hazırlandığı için binary etilenimin (ikili etilenimin) olarak adlandırılmaktadır. Etken madde tüm aziridin bileşiklerinde olduğu gibi etilenimin halkasıdır (Bahnemann, 1990). Fakat etilenimin miktar olarak elde edilmesi zor ve oldukça toksik olduğundan daha güvenli olması ve kullanım kolaylığı nedeniyle BEI tercih edilmektedir (Bahnemann, 1975). BEI'nin viral proteinler üzerinde çok az veya hiç etkisi olmaksızın nükleik asit üzerinde etki gösterdiği bilinmektedir. Bununla birlikte, bazı çalışmalar BEI'nin viral epitoplara konformasyonunu ve erişilebilirliğini formaldehit ve beta-propiyolaktan'dan daha iyi koruyabildiğini göstermiştir (Fan, Chiu, Chen, Chang, & Chiou, 2015; Race ve ark., 1995; Salk ve ark., 1954). BEI ile Newcastle virusunun inaktivasyonu çalışmasında virusun hemagglütinasyon aktivitesi üzerinde olumsuz bir etki yaratmadığı saptanmıştır (King, 1991). Viroloji çalışmalarında BVDV dahil birçok virus BEI kullanılarak kimyasal yolla inaktif hale getirilebilmektedir (Bahnemann, 1990).

Zhao ve ark., (2020) tarafından  $10^{-8}$  DKID<sub>50</sub>/ml oranına sahip coronavirus (Transmissible gastroenteritis virus) kullanarak 0,03, 0,04 ve 0,05 mM BEI ile inaktivasyon kinetiği çalışılmıştır. Elde edilen verilere göre 0,03 mM hazırlanan BEI inaktivanı virusu 12. saatte, 0,04 ve 0,05 mM oranında hazırlanan inaktivan konsantrasyonları ise 6. saatten itibaren inaktive ettiği gösterilmiştir. Söz konusu çalışmada oldukça düşük konsantrasyonlarda kullanılan inaktivan madde virusu kısa sürelerde inaktive etmektedir. Ayrıca konsantrasyon oranı arttıkça inaktivasyon süresinin kısaldığı görülmektedir.

Şap virusuyla ( $10^{-5}$  DKID<sub>50</sub>/ml) yapılan inaktivasyon kinetiği çalışmasında 0,4, 0,8, 1,2, 1,6 ve 2,0 mM BEI konsantrasyonları karşılaştırılmıştır (Aarthi, Rao, Robinson, & Srinivasan, 2004). Tam inaktivasyon için öngörülen sürenin, en düşük BEI konsantrasyonu (0,4 mM) ile 22-29 saat ve 0,4 mM'den yüksek BEI konsantrasyonlarında tam inaktivasyon için tahmin edilen sürenin ise 8-10 saat aralığına düştüğü gösterilmiştir (Aarthi ve ark., 2004). Bununla birlikte, inaktivasyon için BEI'de belirli bir konsantrasyondan (>1,6 mM) sonrasının inaktivasyon süresini etkilemediği belirtilmiştir. Ek olarak değişen oranlardaki BEI konsantrasyonunun antijen kütlesi üzerinde zararlı bir etkisinin olmadığı ve inaktivasyon kinetiği açısından çeşitli serotipler arasında fark bulunmadığı belirtilmiştir. Bu tez çalışmasında TR-26 ve TR-15 suşlarının inaktivasyon süresinin birbirine yakın olduğu (10. saat), TR-21 suşunun tamamen inaktive olması için biraz daha fazla süreye (~16 saat) ihtiyaç duyduğu tespit edilmiştir.

Abd El Fadıl, El Hawary, & El-sayed, (2017) tarafından yapılan bir çalışmada  $10^{-5.5}$  DKID<sub>50</sub>/ml titreye sahip cp BVD virusu 1 mM BEI inaktivasyonu ile 37 °C'de muamele edildikten sonra 6.saatten itibaren inaktive olduğu gösterilmiştir.

Yapılan farklı bir çalışmada 1 mM BEI ile hazırlanan inaktivasyon deneyinde  $10^{-7.75}$  DKID<sub>50</sub>/ml titreye sahip BVD virusunun 37 °C'deki inkübasyonu takiben 8. saatte inaktive olduğu gösterilmiştir (Refaie, Esmat, Mohamed, & Mohamed, 2004). Tez çalışmasında da 1mM BEI konsantrasyon oranıyla çalışılmış olup elde edilen veriler literatür verileriyle uyumlu görünmektedir. Önceki çalışmalarda 37 °C sıcaklık değeri uygulanmış olsa da, bu tez çalışmasında daha düşük (26 °C) sıcaklık değerlerinde BEI inaktivasyonunun başarıyla gerçekleştiği teyit edilmiştir. Bununla birlikte virus titre değerlerinin (TR-21, TR-26 ve TR-15 için sırasıyla  $10^{-5.5}$ ,  $10^{-5.5}$  ve  $10^{-4.5}$  DKID<sub>50</sub>/ml) inaktivasyon süresiyle (sırasıyla 16-10-10 saat) doğrudan orantılı olmadığı görülmüştür. Yapılan çalışmalarda da yüksek titreli virusların benzer ve hatta daha düşük BEI konsantrasyonlarında kısa sürede inaktive olması bu düşüncüyü desteklemektedir (Refaie ve ark., 2004; Zhao ve ark., 2020) .

Virus inaktivasyonu inaktif virus aşısı üretimine yönelik en kritik aşamadır. Özellikle aşı üretimde güvenlik testleriyle birlikte aşıda yer alan etkenlerin hangi saat aralıklarında tamamen inaktif hale geldiğini tespit edebilmek amacıyla inaktivasyon kinetiği çalışmaları dikkatle gerçekleştirilmelidir.

## 5.2. Deney Hayvanlarında İmmünizasyona Yönelik Çalışmalar

BVDV antikorlarının saptanmasında çeşitli serolojik yöntemler kullanılmaktadır. Bunlar arasında virus nötralizasyonu ve indirekt ELISA yöntemi sık kullanılan yöntemler arasındadır. ELISA testlerinin çok sayıdaki örnekleri kısa sürede test etmek için virus nötralizasyon testine göre birçok avantaja sahiptir. Hücre kültürlerine gereksinim duymaması, birkaç saat içinde sonuç vermesi, yüksek duyarlılığı ve nispeten maliyeti düşük olması avantajlarından bazılarıdır. Bu testte tüm viral partiküller (Chu, Zee, Ardans, & Dai, 1985), BVDV ile enfekte olmuş hücre kültürü sıvısı (Howard, Clarke, & Brownlie, 1985), monoklonal antikorlarla immobilize viral antijenler (Cho, Masri, Deregt, Yeo, & Thomas, 1991; Nelson, Marconi, Periolo, La Torre, & Alvarez, 2012) veya bakterilerde üretilen rekombinant proteinler (Kwang, Bolin, & Littledike, 1995) gibi farklı antijen formları kullanılabilir.

Tez çalışmasında serumlardan kaynaklı toksisitenin önüne geçmek için ve nötralizasyon testinden elde edilen verileri teyit etmek amacıyla alternatif olarak indirekt in-house ELISA testi gerçekleştirilmiştir. Bu tip testlerde doğru tanıya gidebilmek için hem test protokolünün hem de ürünlerin standardizasyonu gerekmektedir. Chu ve ark., (1985) tarafından yapılan çalışmada ELISA yöntemiyle sığır serumlarından BVDV antikorlarının tespitinde standardizasyon sonucunda optimal antijen miktarı 1 µg/w, optimal konjugat konsantrasyonu 1/2000 oranında ve optimal serum sulandırma oranını ise 1:10 olarak tespit edilmiştir. Tez çalışmasında in-house ELISA standardizasyon işleminin ardından 750 ng/w oranında sulandırılan antijen gözleri en uygun sulandırma olarak belirlenmiştir. Kobaylar ve fareler için serum sulandırması 1:20, konjugat sulandırması ise kobaylarda 1:500 ve fareler için 1:10,000 olarak belirlenmiştir. Standardizasyon aşamasında antijen saflığı ve oranı, doğru blokaj ajanının seçimi, kullanılan enzimin substrat spesifitesi ve miktarı gibi ELISA sonuçlarını etkileyen birçok faktör bulunmaktadır (Bayraktar, Bayraktar,

Dağıstan, & Demiralay, 1995). Standardizasyon neticesinde elde edilen veriler testlerin kolay ve güvenli şekilde uygulanmasına olanak sağlamaktadır.

Tez çalışmasında indirekt in-house ELISA testi ve SN<sub>50</sub> testiyle elde edilen sonuçlar arasında benzerlik tespit edilmiştir. Kobaylarda SN<sub>50</sub> testiyle tüm örneklem günlerinde yağ bazlı adjuvant gruplarının alüminyum bazlı adjuvant gruplarından daha yüksek antikor titreleri gösterdiği ortaya koyulmuştur. Bu durum ELISA testiyle alınan sonuçlarla benzerdir. Aynı zamanda alüminyum bazlı adjuvant grupları arasında F-2'nin ve yağ bazlı adjuvant grupları arasında uzayan örneklem döneminde F-4'ün yüksek antikor düzeylerine sahip olduğu ELISA testiyle de gösterilmiştir. ELISA testi inaktif aşı uygulaması sonrasında BVD virusuna karşı hayvanlarda gelişen IgG antikorlarının tespiti için kısa sürede sonuç vermesi avantajıyla birlikte alternatif bir test olarak değere sahiptir. Bu varsayım benzerşekilde BVDV-Ab tanısı için ELISA yöntemini ile SN<sub>50</sub> testinin sonuçlarını karşılaştıran diğer çalışmaların sonuçlarıyla da uyumludur (Howard ve ark., 1985; Juntti, Larsson, & Fossum, 1987; Marzocca ve ark., 2007).

İnaktif aşuların uygulandığı bireylerde virus çoğalamadığından koruyucu yanıtı antikor düzeyi elde etmek için belirli bir titrenin üzerinde virusa, tekrarlayan aşı dozlarına ve immunojenitelerini arttırmak için adjuvanta gereksinim duyulur. Yağlı adjuvantlar insan ve hayvanlarda en sık kullanılan adjuvantlardır. Bu grupta yağ içinde su (water in oil, w/o; örn; ISA 50), su içinde yağ (oil in water, o/w) veya su/su içinde yağ (water/oil/water, w/o/w, örn; ISA 206) gibi farklı formlarda emülsiyonlar bulunmaktadır. Yağ bazlı adjuvantların enjeksiyon yerinde depo oluşturma ve buradan antijenin yavaş salınımı yolu ile plazma hücrelerinde antikor üretimini stimüle ederek etki ettikleri düşünülmektedir (Aguilar, & Rodriguez, 2007). Diğer bir adjuvant olan alüminyum tuzları enjeksiyon yerinde yüksek konsantrasyonda antijen bulunmasına ve böylece antijenin, antijen sunan hücreler tarafından alınımının (endositozun) artmasına yol açmaktadır. Ayrıca alüminyumbileşikleri doğrudan veya dolaylı yollarla dendritik hücrelerin stimülasyonu, kompleman aktivasyonu ya da kemokin salınımını uyatarak da etki etmektedir. Ancak antijenlerin çoğunun intertisyel sıvıyla karşılaşır karşılaşmaz alüminyumdan ayrıldıklarının gösterilmesi yavaş ve sürekli salınımın etkili olmayabileceğini düşündürmektedir (HogenEsch, 2002). Saponinler, birçok farklı biyolojik ve

farmakolojik aktivite sergileyen steroidin doğal glikozitleridir. Özellikle aşı adjuvantları olarak kullanılan saponinlerin en yaygını sabun ağacı kabuğundan (*Quillaja saponaria*) elde edilen Quil A ve türevleridir. Saponinler IgG-1 ve IgG-2 üretimini ve hücre aracılı immun yanıt sistemini uyarmaktadır (Kensil, Patel, Lennick, & Marciani, 1991).

Tez çalışmasında BVDV-1 ve BVDV-2 genotiplerine ait suşlardan aşı formülasyonları geliştirilmiş olup, immunizasyondan sonra deney hayvanlarında elde edilen serumlarla homolog ve heterolog suşlara karşı immun yanıt değerlendirilmiştir. Sığırlarda kullanılacak aday aşılarını test etmek için üç farklı deney hayvanı modelinin (koyun, kobay, sığır) kullanıldığı bir çalışmada homolog ve heterolog suşlara karşı immun yanıt araştırılmıştır (Fernandez ve ark., 2009). İmmunizasyondan sonra sığır serumlarının en yüksek 60. günde homolog ve heterolog suşlara karşı antikor yanıtının geliştiği belirtilmiştir. Ayrıca çalışmaya göre kobaylarda BVDV-2 ve VS-115 suşu içeren aşılarda serokonversiyon oluşturmadığı gösterilmiştir. Tez çalışmasında kobaylarda ilk örnekleme döneminde TR-26 suşuna karşı belirli ölçülerde yanıt alınsa da ilerleyen dönemlerde gelişen yanıtın oldukça gerilediği belirlenmiştir (Tablo 22). Bu verilere göre BVDV suşlarının antijenitelerinin birbirinden farklı olabileceği ve aşı formülasyonu oluşturma aşamasında göz ardı edilmemesi gereken bir konu olduğu görülmektedir. Benzer şekilde immunizasyondan sonraki 51. günde özellikle yağ bazlı adjuvant gruplarının yüksek antikor titrelerine ulaştığı saptanmıştır (Tablo 18). Bununla birlikte, farelerde yapılan çalışmada TR-26 suşunun yağ bazlı adjuvant gruplarında alüminyum bazlı adjuvantlara göre daha iyi yanıt verdiği görülmektedir. Böylelikle düşük antijeniteye sahip bir suşun uygun adjuvant seçimiyle immunojenitesinin artırılabilirliği değerlendirilebilir. Ayrıca yapılan çalışmada (Fernandez ve ark., 2009) sığır serumlarının heterolog suşa (yerel suş) karşı düşük seviyede antikor yanıtı geliştirdiği de tespit edilmiştir. Bu tez çalışmasında kobaylarda heterolog NADL ve Gi-II suşlarına karşı düşük düzeylerde antikor yanıtı saptanmıştır. Bu sonuçların BVDV suşları arasındaki serolojik farklılıklardan ileri gelebileceği öngörülmektedir. Özellikle heterolog suşlara karşı gelişen düşük antikor yanıtını destekleyen birçok çalışma bulunmaktadır (Alpay, & Yeşilbağ, 2015; Fulton ve ark., 1997; Hamers ve ark., 2002; Yeşilbağ ve ark., 2014).

İnaktif aşı formülasyonlarında kullanılan adjuvantlardan bağımsız olarak virus titresinin önemi yapılan çalışmalarla ortaya koyulmuştur. Alüminyum hidroksit adjuvantının kullanıldığı bir çalışmada titre değeri  $10^5$  DKID<sub>50</sub>/ml olan BVDV-1a virus titresinin kobaylarda antikor yanıtı oluşturmadığı, aynı koşullarda hazırlanan titre değeri  $10^6$  DKID<sub>50</sub>/ml olan formülasyonun antikor yanıtı oluşturduğu belirlenmiştir (Chen, Johnson, & Muscoplat, 1985). Fakat belirli bir miktardan sonra artan virus konsantrasyonunun ( $>10^8$  DKID<sub>50</sub>/ml) daha yüksek bir immunojenite ile sonuçlanmadığı da bildirilmiştir (Fernandez ve ark., 2009). Bu tez çalışmasında 3 farklı yerel suşun karıştırılmasıyla mevcut titreleri logaritmik olarak azalacağı için bir doz aşıda bulunan her bir suşun antijen konsantrasyonları  $10^5$  ve  $10^6$  arasında olacak şekilde formülize edilmiştir. Aşıda bulunan TR-21 ve TR-15 suşlarına karşı gelişen immun yanıt benzer titrelerle sahip olmasına rağmen TR-26 için aynı şekilde sonuçlanmamıştır. Hayvanlarda immun yanıtın gelişmesinde sadece virus titresinin değil aynı zamanda bireysel olarak virus suşuna ilişkin antijenitenin de önemli olduğu görülmektedir.

Yapılan bazı çalışmalar multivalan içerikli aşılar yerine daha yüksek titreye sahip tek bir suş içeren aşılarda da etkili olabileceğini gösterse de büyük antijenik farklılıkların bulunduğu durumlarda aşı formülasyonuna birden fazla suşun dahil edilmesi gerektiğini göstermektedir (Chen ve ark., 1985; Fernandez ve ark., 2009).

Brezilya'da yapılan bir çalışmada kobay kullanılarak tek bir endemik suşla farklı adjuvantlar denenmiştir (Jordão ve ark., 2011). ISA 50 ve AlOH<sub>3</sub> adjuvantlarının kullanıldığı çalışmada üç doz yağlı formülasyonun en yüksek antikor titrelerine ulaştığı ve antikor titrelerindeki düşüşün alüminyum hidroksit adjuvantlı aşı grubundaki hayvanlarda hızlı olduğu gösterilmiştir. Benzer şekilde tez çalışmasında ISA 50 adjuvantı kullanılan grubun AlOH<sub>3</sub> adjuvantlı gruplara oranla daha yüksek antikor titrelerine ulaştığı gösterilmiştir (Tablo 17-21). Aynı zamanda yağ bazlı adjuvant grubuyla alüminyum bazlı gruplar arasındaki anlamlı farklılıklar istatistiki olarak ortaya koyulmuştur (Tablo 23-24-25-27).

EL-Hawary, & Mostafa, (2017) tarafından yapılan bir çalışmada DKID<sub>50</sub>/ml değeri  $10^{-6,5}$  olan BVDV-1 genotipiyle (yerel Mısır suşu) inaktif polivalan aşı formülasyonu geliştirilmiş. Adjuvant olarak ISA 206'nın tercih edildiği bu çalışmada

sığırların antikor titrelerinin çift doz uygulamadan sonra 60-90. gün pik yaptığı saptanmıştır. Ayrıca hayvanlarda 9 ay boyunca koruyucu antikor titrelerinin devam ettiği tespit edilmiştir. Benzer bir inaktif polivalan aşı çalışmasında alüminyum hidroksit adjuvantı ve ISA 206 adjuvantı karşılaştırılmıştır (El-Bagoury, Mansour, & Kassem, 2019). Yağ adjuvantlı aşının alüminyum hidroksitli aşıya kıyasla daha erken sürede koruyucu immun yanıtı indüklediği, antikor üretiminin daha uzun süreli olduğu ve özellikle etkili antikor titrelerine ulaştığı bildirilmiştir. Mevcut tez çalışmasında söz konusu araştırmayla uyumlu şekilde kobaylarda nötralizan antikor titre değerlerinin 21. günden itibaren yağ adjuvantlı gruplarda daha yüksek olduğu ve bu durumu 111. güne kadar koruduğu tespit edilmiştir (Şekil 26).

Bakteriyel ve viral aşılarda adjuvant olarak saponin hem tek başına hem de  $AlHO_3$  bazlı aşılarla kombine bir şekilde kullanılmaktadır. Cibulski ve ark., (2016) tarafından yapılan bir çalışmada farelerde inaktif BVDV aşısında saponin ve alüminyum hidroksit adjuvantları karşılaştırılmış olup alüminyum hidroksit adjuvant ile hazırlanan aşının, humoral immun yanıtı uyardığı, ancak hücrel immun yanıtın gelişmediği saptanmıştır. Fakat saponin adjuvantlı aşının hem hücrel hem de humoral immun yanıtı uyarabildiği ortaya koyulmuştur.

Farklı bir çalışmada saponin ve alüminyum adjuvantlarının beraber kullanımında farelerde alüminyum bazlı peptit-konjugat aşıya karşı oluşan immun yanıtı artırdığı gösterilmiştir (Montaraz, Novotny, & Ivanyi, 1985). Sığırlarda bovine ephemeral fever aşısında farklı adjuvantların değerlendirildiği çalışmada sadece saponin adjuvantı içeren aşıya karşı gelişen serolojik yanıtın,  $AlHO_3$  ve saponin kombinasyonlarını içeren aşıdan daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Vanselow, Abetz, & Trenfield, 1985). Tez çalışması kapsamında kobay ve farelerde  $AlHO_3$  (F- 1) ve  $AlHO_3$  + saponin (F-2) adjuvantları içeren aşı grupları karşılaştırılmış olup saponin içeren grupların nötralizan antikor oranlarının daha yüksek olduğu saptanmıştır (Şekil 22 ve 26). F-1 ve F-2 grupları arasındaki anlamlı fark kobaylarda

81. günde istatistiki olarak da ortaya koyulmuştur (Tablo 27). BVD inaktif aşı çalışmasında sığır ve farelerde saponin adjuvantının 1 ve 1,5 mg/doz oranları karşılaştırılmıştır (Abd El Fadeel, El-Dakhly, Allam, Farag, & El-Kholy, 2020). Her iki dozun da hayvanlar için güvenli olduğu ve koruyucu düzeyde immun yanıt oluşturduğu bildirilmiştir. Tez çalışmasında kobaylar için 0,25 mg/doz ve fareler için

0,125 mg/doz oranında saponin kullanılmış olup hayvanlar için güvenli dozlarda olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca kobaylarda F-2 grubunun antikor titresinin ortalaması yağ bazlı adjuvant gruplarından düşük olsa da bireysel olarak birkaç hayvanda 51. ve 81. günlerde koruyucu seviyelerde antikor titrelerine ulaştığı saptanmıştır (Tablo 17-18). Fakat bu titrelerin 111. günlerde düştüğü görülmüş olup alüminyum bazlı adjuvantın mekanizmasından kaynaklı bir azalma olduğu düşünülmektedir.



### 5.3. Sonuç

BVD virusu RNA genomuna sahip olması nedeniyle mutasyonlara oldukça açık bir yapıya sahiptir. Özellikle de immun yanıtı büyük ölçüde uyaran E2 proteininde gelişen mutasyonlara bağlı olarak suşlar arasında antijenik farklılıklar meydana gelmektedir. Bu durum hem hastalık teşhisinde zorluğa hem de aşı etkinliklerinin azalmasına neden olmaktadır. BVDV saha suşlarını tanımlamak ve karakterize etmek için düzenli şekilde sürvelans çalışmalarının yürütülmesi gerekmektedir. Bu nedenle sahada sirküle olan endemik suşlarla oluşturulan aşuların değeri ön plana çıkmaktadır.

Tez çalışması kapsamında yapılan deneyler sonucunda elde edilen verileri aşağıdaki gibi özetlemek mümkündür;

- Aşı adayları yerel suşların çoğalma karakterleri belirlenerek aşı üretim sürecinde yüksek verimlilik sağlamak açısından özellikle virus titresi gibi öne çıkan kriterlerin belirlenmesinin önemi gösterilmiştir.
- Yerel aşı suşu olarak belirlenen 3 adet BVDV suşunun inaktivasyon koşulları detaylarıyla ortaya koyulmuştur.
- İmmünizasyon sonrası gelişen humoral yanıtın tespitinde in-house ELISA testinin nötralizasyon testini teyit etmek için alternatif bir yöntem olarak kullanılabileceği gösterilmiştir. Ayrıca nötralizasyon testinden daha hızlı sonuç vermesi ve hücre kültürünün kullanılmaması da avantajları arasındadır.
- Aşı formülasyonlarında bulunan adjuvant oranlarının ve aşı içeriğinin güvenilirliği deney hayvanları çalışması sonucunda ortaya koyulmuştur.
- Aşı içerisinde bulunan BVD suşlarının immunojenitelerinin araştırılmasında deney hayvanı olarak fare ve kobay modellerinin güvenilir şekilde kullanılabileceği gösterilmiştir.
- AIOH<sub>3</sub> bazlı adjuvant gruplarına nazaran yağ bazlı adjuvant gruplarının aşıda etkili şekilde çalıştığı belirlenmiştir.

- Yağ bazlı adjuvant gruplarında F-3 formülasyonunun 21. ve 51. günlerdeki antikor titreleri yüksek olsa da 81. ve 111. günlerde F-4 grubunun aşağısında kaldığı tespit edilmiştir. Aynı zamanda F-4 grubundakullanılan adjuvantın yapısı gereği (w/o/w) aşı formülasyonu aşamasında kullanımının daha rahat olması açısından kolaylık sağlayacağı düşünülmektedir.
- F-2 grubunda kullanılan saponinin  $AlOH_3$  adjuvantının etkinliğini arttırdığı belirlenmiştir. İleriki aşamalarda tek başına saponin adjuvantının etkinliğinin araştırılmasıyla kayda değer verilerin ortaya çıkabileceği öngörülmektedir.
- TR-21 (BVDV-1/) ve TR-15 (BVDV-2b) antijenlerinin güçlü immunojenik özellik taşıdığı gösterilmiştir.
- Aşı formülasyonunda bulunan BVDV TR-26 suşunun antijenik/immunojenik özellikleriyle ilgili detaylı çalışmalar gerekmektedir.
- Aşılarda bulunan yerel suşların önemiyle beraber homolog ve heterolog suşlara karşı etkinlikleri ortaya koyulmuştur.
- İleriki süreçlerde inaktif yerel aşı üretimi için uygulanabilir güncel veriler elde edilmiştir.
- Yerel suşlarla hazırlanan aşı formülasyonları arasında daha etkin olan bir formülasyon (F-4) belirlenerek hedef hayvan türünde test edilecek aşamaya gelinmiştir.

## 6. KAYNAKLAR

- Aarthi, D., Rao, K. A., Robinson, R., & Srinivasan, V. A. (2004). Validation of binary ethyleneimine (BEI) used as an inactivant for foot and mouth disease tissue culture vaccine. *Biologicals*, 32(3), 153-156.
- Abd El Fadeel, M. R., El-Dakhly, A. T., Allam, A. M., Farag, T. K., & El-Kholy, A. A. M. (2020). Preparation and efficacy of freeze-dried inactivated vaccine against bovine viral diarrhoea virus genotypes 1 and 2, bovine herpes virus type 1.1, bovine parainfluenza-3 virus, and bovine respiratory syncytial virus. *Clinical and Experimental Vaccine Research*, 9(2), 119.
- Abd El Fadıl, M. R., El Hawary, R. İ., & El-sayed, E. L. (2017). Validity of ascorbic acid as viral inactivant for infectious bovine rhinotracheitis virus and bovine viral diarrhoea virus. *Egyptian Journal of Agricultural Research*, 95(3), 1349-1356.
- Abdelsalam, K., Rajput, M., Elmowalid, G., Sobraske, J., Thakur, N., Abdallah, H., ... & Chase, C. C. (2020). The effect of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) strains and the corresponding infected-macrophages' supernatant on macrophage inflammatory function and lymphocyte apoptosis. *Viruses*, 12(7), 701.
- Abdoli, A., Soleimanjahi, H., Kheiri, M. T., Jamali, A., & Jamaati, A. (2013). Determining influenza virus shedding at different time points in Madin-Darby canine kidney cell line. *Cell Journal (Yakhteh)*, 15(2), 130.
- Abedon, S. T., & Bartom, E. (2013). Multiplicity of Infection. In *Brenner's Encyclopedia of Genetics: Second Edition* (pp. 509-510). Ipswich: Elsevier Inc.
- Aguilar, J. C., & Rodriguez, E. G. (2007). Vaccine adjuvants revisited. *Vaccine*, 25(19), 3752-3762.
- Alkan, F., Ozkul, A., Bilge-Dagalp, S., Yesilbag, K., Oguzoglu, T. C., Akca, Y., & Burgu, I. (2000). Virological and serological studies on the role of PI-3 virus, BRSV, BVDV and BHV-1 on respiratory infections of cattle. I. The detection of etiological agents by direct immunofluorescence technique. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, 107(5), 193-195.
- Al-Kubati, A. A., Hussien, J., Kandeel, M., Al-Mubarak, A. I., & Hemida, M. G. (2021). Recent advances on the bovine viral diarrhoea virus molecular pathogenesis, immune response, and vaccines development. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, 475.
- Alpay, G., & Yeşilbağ, K. (2015). Serological relationships among subgroups in bovine viral diarrhoea virus genotype 1 (BVDV-1). *Veterinary Microbiology*, 175(1), 1-6.
- Alpay, G., Tuncer, P., & Yeşilbağ, K. (2014). Bir ada ekosistemindeki sığır, koyun ve keçilerde bazı viral enfeksiyonların seroprevalansı. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 61(1), 43-48.
- Altuğ, A., Ozdemir, R., & Cantekin, Z. (2013). Ruminantlarda Koruyucu Hekimlik: I. Aşı Uygulamaları. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 10(1), 33-44.

- Arenhart, S., Bauermann, F. V., Vogel, F. S., Weiblen, R., & Flores, E. F. (2010). Evidence of mixed persistent infections in calves born to cows challenged with a pool of bovine viral diarrhoea virus isolates. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 30(12), 1053-1057.
- Bachofen, C., Stalder, H., Vogt, H. R., Wegmueller, M., Schweizer, M., Zanoni, R., & Peterhans, E. (2013). Bovine viral diarrhoea (BVD): from biology to control. *Berliner und Munchener tierärztliche Wochenschrift*, 126(11-12), 452-461.
- Bahnemann, H. G. (1975). Binary ethylenimine as an inactivant for foot-and-mouth disease virus and its application for vaccine production. *Archives of Virology*, 47(1), 47-56.
- Bahnemann, H. G. (1990). Inactivation of viral antigens for vaccine preparation with particular reference to the application of binary ethylenimine. *Vaccine*, 8(4), 299-303.
- Bálint, Á., Baule, C., Pálfi, V., Dencsö, L., Hornyák, Á., & Belák, S. (2005). A 45-nucleotide insertion in the NS2 gene is responsible for the cytopathogenicity of a bovine viral diarrhoea virus strain. *Virus Genes*, 31(2), 135-144.
- Bauermann, F. V., Flores, E. F., & Ridpath, J. F. (2012). Antigenic relationships between Bovine viral diarrhoea virus 1 and 2 and HoBi virus: Possible impacts on diagnosis and control. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 24, 253-261.
- Bauermann, F. V., Ridpath, J. F., Weiblen, R., & Flores, E. F. (2013). HoBi-likeviruses: an emerging group of pestiviruses. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 25(1), 6-15.
- Bayraktar, R., Bayraktar, L., Dağistan, M., & Demiralay, O. (1995). ELİSA Tekniğinde Kullanılacak Reagentlerin Hazırlanması. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 8(1), 238-253.
- Becher, P., Orlich, M., Kosmidou, A., König, M., Baroth, M., & Thiel, H. J. (1999). Genetic diversity of pestiviruses: identification of novel groups and implications for classification. *Virology*, 262(1), 64-71.
- Becher, P., Orlich, M., & Thiel, H. J. (2001). RNA recombination between persisting pestivirus and a vaccine strain: generation of cytopathogenic virus and induction of lethal disease. *Journal of Virology*, 75(14), 6256-6264.
- Becher, P., Ramirez, R. A., Orlich, M., Rosales, S. C., König, M., Schweizer, M., ... & Thiel, H. J. (2003). Genetic and antigenic characterization of novel pestivirus genotypes: implications for classification. *Virology*, 311(1), 96-104.
- Bellido, D., Baztarrica, J., Rocha, L., Pecora, A., Acosta, M., Escribano, J. M., ... & Wigdorovitz, A. (2021). A novel MHC-II targeted BVDV subunit vaccine induces a neutralizing immunological response in guinea pigs and cattle. *Transboundary and Emerging Diseases*, 68(6), 3474-3481.

- Bitsch, V., Hansen, K. E., & Rønsholt, L. (2000). Experiences from the Danish programme for eradication of bovine virus diarrhoea (BVD) 1994–1998 with special reference to legislation and causes of infection. *Veterinary Microbiology*, 77(1-2), 137-143.
- Bittar, J. H., Palomares, R. A., Hurley, D. J., Hoyos-Jaramillo, A., Rodriguez, A., Stoskute, A., ... & Lauber, K. (2020). Immune response and onset of protection from Bovine viral diarrhoea virus 2 infection induced by modified-live virus vaccination concurrent with injectable trace minerals administration in newly received beef calves. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 225, 110055.
- Blanchard, P. C., Ridpath, J. F., Walker, J. B., & Hietala, S. K. (2010). 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.
- Bolin, S. R., Matthews, P. J., & Ridpath, J. F. (1991). Methods for detection and frequency of contamination of fetal calf serum with bovine viral diarrhoea virus and antibodies against bovine viral diarrhoea virus. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 3(3), 199-203.
- Bolin, S. R., & Ridpath, J. F. (1995). Assessment of protection from systemic infection or disease afforded by low to intermediate titers of passively acquired neutralizing antibody against bovine viral diarrhoea virus in calves. *American Journal of Veterinary Research*, 56(6), 755-759.
- Bolin, S. R., & Ridpath, J. F. (1996). Glycoprotein E2 of bovine viral diarrhoea virus expressed in insect cells provides calves limited protection from systemic infection and disease. *Archives of Virology*, 141(8), 1463-1477.
- Botner, A., & Belsham, G. J. (2012). Virus survival in slurry: Analysis of the stability of foot-and-mouth disease, classical swine fever, bovine viral diarrhoea and swine influenza viruses. *Veterinary Microbiology*, 157, 41–49.
- Brownlie, J., Clarke, Mc., Howard Cj., & Pocock Dh. (1987). Pathogenesis and epidemiology of bovine virus diarrhoea virus infection of cattle. In *Annales de Recherches Veterinaires*, 18(2), 157-166.
- Burgu, İ. (1990). Türkiye’de koyunlarda Bovine Viral Diarrhoea (BVD) enfeksiyonlarının varlığı ve önemi. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 37 (1), 121-127.
- Burgu, İ., Alkan, F., Özkul, A., Yeşilbag, K., Karaoglu, T., & Güngör, B. (2003). Türkiye’de süt sığırcılığı işletmelerinde bovine viral diarrhoea virus (BVDV) enfeksiyonunun epidemiyolojisi ve kontrolü. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 50(2), 127-133.
- Burgu, İ., Öztürk, F., Akça, Y., Toker, A., Frey, R. H., & Liess, B. (1990). Occurrence and importance on bovine diarrhoea virus infections in sheep in Turkey. *Veterinary Journal of Ankara University*, 37(1), 121-127.

- Burks, J. M., Zwiebe, C., Müller, F., Wower, I. K., & Wower, J. (2011). Comparative structural studies of bovine viral diarrhoea virus IRES RNA. *Virus Research*, 160(1- 2), 136-142.
- Cai, D., Song, Q., Duan, C., Wang, S., Wang, J., & Zhu, Y. (2018). Enhanced immune responses to E2 protein and DNA formulated with ISA 61 VG administered as a DNA prime–protein boost regimen against bovine viral diarrhoea virus. *Vaccine*, 36(37), 5591-5599.
- Callens, N., Brügger, B., Bonnaïfous, P., Drobecq, H., Gerl, M. J., Krey, T., ... & Rouillé, Y. (2016). Morphology and molecular composition of purified bovine viral diarrhoea virus envelope. *PLoS Pathogens*, 12(3), e1005476.
- Carlsson, U., Alenius, S., & Sundquist, B. (1991). Protective effect of an ISCOM bovine virus diarrhoea virus (BVDV) vaccine against an experimental BVDV infection in vaccinated and non-vaccinated pregnant ewes. *Vaccine*, 9(8), 577-580.
- Cedillo R. S. (2004). *Charakterisierung ruminanter Pestiviren mittels Polymerasekettenreaktion und monoklonaler Antikörper* (Doctoral dissertation, Zugl.: Justus Liebig University Giessen).
- Chamorro, M. F., Passler, T., Givens, M. D., Edmondson, M. A., Wolfe, D. F., & Walz, P. H. (2011). Evaluation of transmission of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) between persistently infected and naive cattle by the horn fly (*Haematobia irritans*). *Veterinary Research Communications*, 35, 123–129.
- Chang, L., Qi, Y., Liu, D., Du, Q., Zhao, X., & Tong, D. (2021). Molecular detection and genotyping of bovine viral diarrhoea virus in Western China. *BMC Veterinary Research*, 17(1), 1-7.
- Chase, C. C. (2013). The impact of BVDV infection on adaptive immunity. *Biologicals*, 41(1), 52-60.
- Chen, K. S., Johnson, D. W., & Muscoplat, C. C. (1985). Adjuvant enhancement of humoral immune response to chemically inactivated bovine viral diarrhoea virus. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 49(1), 91.
- Chernick, A., Ambagala, A., Orsel, K., Wasmuth, J. D., van Marle, G., & van der Meer, F. (2018). Bovine viral diarrhoea virus genomic variation within persistently infected cattle. *Infection, Genetics and Evolution*, 58, 218-223.
- Chernick, A., Godson, D. L., & van der Meer, F. (2014). Metadata beyond the sequence enables the phylodynamic inference of bovine viral diarrhoea virus type 1a isolates from Western Canada. *Infection, Genetics and Evolution*, 28, 367-374.
- Chimeno Zoth, S., Leunda, M. R., Odeón, A., & Taboga, O. (2007). Recombinant E2 glycoprotein of bovine viral diarrhoea virus induces a solid humoral neutralizing immune response but fails to confer total protection in cattle. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 40(6), 813-818.

- Cho, H. J., Masri, S. A., Deregt, D., Yeo, S. G., & Thomas, E. J. (1991). Sensitivity and specificity of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of bovine viral diarrhoea virus antibody in cattle. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 55(1), 56.
- Chu, H. J., Zee, Y. C., Ardans, A. A., & Dai, K. (1985). Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to bovine viral diarrhoea virus in bovine sera. *Veterinary Microbiology*, 10(4), 325-333.
- Cibulski, S. P., Silveira, F., Mourglia-Ettlin, G., Teixeira, T. F., dos Santos, H. F., Yendo, A. C., ... & Roehe, P. M. (2016). Quillaja brasiliensis saponins induce robust humoral and cellular responses in a bovine viral diarrhoea virus vaccine in mice. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 45, 1-8.
- Classick, L. G. (1970). *The preparation and evaluation of three experimental inactivated bovine viral diarrhoea vaccines* (Master's thesis, Iowa State University).
- Coggins, L., Gillespie, J.H., Robson, D.S., Thompson, J.D., Phillips, W.V., Wagner, W.C., & Baker, J.A. (1961). Attenuation of virus diarrhoea virus (strain OregonC24V) for vaccine purposes. *The Cornell Veterinarian*, 51, 539-545.
- Collen, T., & Morrison, W. I. (2000). CD4+ T-cell responses to bovine viral diarrhoea virus in cattle. *Virus Research*, 67(1), 67-80.
- Cui, Z. (2005). DNA Vaccine. *In Advances in Genetics*. 54, 257-289.
- Darweesh, M. F., Rajput, M. K., Braun, L. J., Rohila, J. S., & Chase, C. C. (2018). BVDV Npro protein mediates the BVDV induced immunosuppression through interaction with cellular S100A9 protein. *Microbial Pathogenesis*, 121, 341-349.
- De Oliveira, P. S. B., Júnior, J. V. J. S., Weiblen, R., & Flores, E. F. (2021). Subtyping bovine viral diarrhoea virus (BVDV): Which viral gene to choose?. *Infection, Genetics and Evolution*, 92, 104891.
- Deutskens, F., Lamp, B., Riedel, C. M., Wentz, E., Lochnit, G., Doll, K., ... & Rümenapf, T. (2011). Vaccine-induced antibodies linked to bovine neonatal pancytopenia (BNP) recognize cattle major histocompatibility complex class I (MHC I). *Veterinary Research*, 42(1), 1-10.
- Domingo, E., Sheldon, J., & Perales, C. (2012). Viral quasispecies evolution. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76(2), 159-216.
- Donis, R. O. (1995). Molecular biology of bovine viral diarrhoea virus and its interactions with the host. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 11(3), 393-423.
- Dubovi, E. J. (1992). Genetic diversity and BVD virus. *Comparative immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 15(3), 155-162.
- Edwards, S., Wood, L., Brockman, S., & Ibata, G. (1991). Clinical and virological observations of a mucosal disease outbreak with persistently-infected seropositive survivors. *In Ruminant Pestivirus Infections*. 125-132, Vienna, Springer.

- El-Bagoury, G. F., Mansour, M., & Kassem, I. (2019). Enhancement of Immunogenicity and Protective Efficacy against Bovine Respiratory Disease Viruses (BVD, BoHV1, PI3, and BRS) Vaccine. *Benha Veterinary Medical Journal*, 36(1), 429-436.
- El-Hawary, R., & A Mostafa, H. (2017). Immunological response of locally prepared oil adjuvanted pneumo-5 vaccine in calves. *Journal of Veterinary Medical Research*, 24(1), 41-47.
- Evans, C. A., Pinior, B., Larska, M., Graham, D., Schweizer, M., Guidarini, C., ... & Gates, M. C. (2019). Global knowledge gaps in the prevention and control of bovine viral diarrhoea (BVD) virus. *Transboundary and Emerging Diseases*, 66(2), 640-652.
- Fan, Y. C., Chiu, H. C., Chen, L. K., Chang, G. J. J., & Chiou, S. S. (2015). Formalin inactivation of Japanese encephalitis virus vaccine alters the antigenicity and immunogenicity of a neutralization epitope in envelope protein domain III. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(10), 41-67.
- Fernandez, F., Costantini, V., Barrandeguy, M., Parreno, V., Schiappacassi, G., Maliandi, F., ... & Odeon, A. (2009). Evaluation of experimental vaccines for bovine viral diarrhoea in bovines, ovines and guinea pigs. *Revista Argentina de Microbiología*, 41(2), 86-91.
- Ficken, M. D., Ellsworth, M. A., Tucker, C. M., & Cortese, V. S. (2006). Effects of modified-live bovine viral diarrhoea virus vaccines containing either type 1 or types 1 and 2 BVDV on heifers and their offspring after challenge with noncytopathic type 2 BVDV during gestation. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 228(10), 1559-1564.
- Fricke, J., Gunn, M., & Meyers, G. (2001). A family of closely related bovine viral diarrhoea virus recombinants identified in an animal suffering from mucosal disease: new insights into the development of a lethal disease in cattle. *Virology*, 291(1), 77-90.
- Fritzemeier, J., Haas, L., Liebler, E., Moennig, V., & Greiser-Wilke, I. (1997). The development of early vs. late onset mucosal disease is a consequence of two different pathogenic mechanisms. *Archives of Virology*, 142(7), 1335-1350.
- Fulton, R.W. (2008). Vaccines. In *Bovine Viral Diarrhoea Virus* (pp. 209–222). Hoboken, NJ, USA: Blackwell Publishing.
- Fulton, R. W., Cook, B. J., Payton, M. E., Burge, L. J., & Step, D. L. (2020). Immune response to bovine viral diarrhoea virus (BVDV) vaccines detecting antibodies to BVDV subtypes 1a, 1b, 2a, and 2c. *Vaccine*, 38(24), 4032-4037.
- Fulton, R. W., Hessman, B., Johnson, B. J., Ridpath, J. F., Saliki, J. T., Burge, L. J., ... & Payton, M. E. (2006). Evaluation of diagnostic tests used for detection of bovine viral diarrhoea virus and prevalence of subtypes 1a, 1b, and 2a in persistently infected cattle entering a feedlot. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 228(4), 578-584.
- Fulton, R. W., Purdy, C. W., Confer, A. W., Saliki, J. T., Loan, R. W., Briggs, R. E., &



- Burge, L. J. (2000). Bovine viral diarrhoea viral infections in feeder calves with respiratory disease: Interactions with *Pasteurella* spp., parainfluenza-3 virus, and bovine respiratory syncytial virus. *Canadian Journal of Veterinary Research*, (64), 151–159.
- Fulton, R. W., Saliki, J. T., Burge, L. J., d'Offay, J. M., Bolin, S. R., Maes, R. K., ... & Frey, M. L. (1997). Neutralizing antibodies to type 1 and 2 bovine viral diarrhoea viruses: detection by inhibition of viral cytopathology and infectivity by immunoperoxidase assay. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology*, 4(3), 380-383.
- Fulton, R. W., Saliki, J. T., Burge, L. J., & Payton, M. E. (2003). Humoral immune response and assessment of vaccine virus shedding in calves receiving modified live virus vaccines containing bovine herpesvirus-1 and bovine viral diarrhoea virus 1a. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 50(1), 31-37.
- Fulton, R. W., Step, D. L., Ridpath, J. F., Saliki, J. T., Confer, A. W., Johnson, B. J., ... & Payton, M. E. (2003). Response of calves persistently infected with noncytopathic bovine viral diarrhoea virus (BVDV) subtype 1b after vaccination with heterologous BVDV strains in modified live virus vaccines and *Mannheimia haemolytica* bacterin-toxoid. *Vaccine*, 21(21-22), 2980-2985.
- Fux, R., & Wolf, G. (2012). Transient elimination of circulating bovine viral diarrhoea virus by colostral antibodies in persistently infected calves: A pitfall for BVDV-eradication programs? *Veterinary Microbiology*, 161, 13–19.
- Genzel, Y., Rödig, J., Rapp, E., & Reichl, U. (2014). Vaccine production: upstream processing with adherent or suspension cell lines. In *Animal Cell Biotechnology*. Totowa, NJ, (pp. 371-393), Humana Press.
- Gong, Y., Trowbridge, R., Macnaughton, T. B., Westaway, E. G., Shannon, A. D., & Gowans, E. J. (1996). Characterization of RNA synthesis during a one-step growth curve and of the replication mechanism of bovine viral diarrhoea virus. *Journal of General Virology*, 77(11), 2729-2736.
- Greiser-Wilke, I., Dittmar, K. E., Liess, B., & Moennig, V. (1992). Heterogeneous expression of the non-structural protein p80/p125 in cells infected with different pestiviruses. *Journal of General Virology*, 73(1), 47-52.
- Greiser-Wilke, I., Grummer, B., & Moennig, V. (2003). Bovine viral diarrhoea eradication and control programmes in Europe. *Biologicals*, 31(2), 113-118.
- Griebel, P. J. (2015). BVDV vaccination in North America: risks versus benefits. *Animal Health Research Reviews*, 16(1), 27-32.
- Grooms, D. L. (2004). Reproductive consequences of infection with bovine viral diarrhoea virus. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 20, 5– 19.

- Grooms, D. L., Brock, K. V., & Ward, L. A. (1998). Detection of cytopathic bovine viral diarrhoea virus in the ovaries of cattle following immunization with a modified live bovine viral diarrhoea virus vaccine. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 10(2), 130-134.
- Gunn, H. M. (1993). Role of fomites and flies in the transmission of bovine viral diarrhoea virus. *The Veterinary Record*, 132, 584–585.
- Hafez, S.M., & Liess, B. (1972). Studies on bovine viral diarrhoea-mucosal disease virus. II. Stability and some physico-chemical properties. *Acta Virologica*, 16, 399- 408.
- Hamers, C., Lecomte, C., Lambot, M., Joris, E., Genicot, B., & Pastoret, P. (2002). Virus neutralising antibodies against 22 bovine viral diarrhoea virus isolates in vaccinated calves. *The Veterinary Journal*, 163(1), 61-67.
- Hewicker, M., Trautwein, G., Stah, C., & Liess, B. (1987). Kidney lesions in cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 34(1-10), 1-12.
- Hilbe, M., Stalder, H., Peterhans, E., Haessig, M., Nussbaumer, M., Egli, C., ... & Ehrensperger, F. (2007). Comparison of five diagnostic methods for detecting bovine viral diarrhoea virus infection in calves. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 19(1), 28-34.
- HogenEsch, H. (2002). Mechanisms of stimulation of the immune response by aluminum adjuvants. *Vaccine*, 20, 34-39.
- Houe, H. (1993). Survivorship of animals persistently infected with bovine virus diarrhoea virus (BVDV). *Preventive Veterinary Medicine*, 15(4), 275-283.
- Houe, H. (2003). Economic impact of BVDV infection in dairies. *Biologicals*, 31(2), 137-143.
- Houe, H., Lindberg, A., & Moennig, V. (2006). Test strategies in bovine viral diarrhoea virus control and eradication campaigns in Europe. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 18, 427–436.
- Howard, C. J., Clarke, M. C., & Brownlie, J. (1985). An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in cattle sera. *Veterinary Microbiology*, 10(4), 359-369.
- Howard, C. J., Clarke, M. C., Sopp, P., & Brownlie, J. (1992). Immunity to bovine virus diarrhoea virus in calves: the role of different T-cell subpopulations analysed by specific depletion in vivo with monoclonal antibodies. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 32(3-4), 303-314.
- Isken, O., Postel, A., Bruhn, B., Lattwein, E., Becher, P., & Tautz, N. (2019). CRISPR/Cas9-mediated knockout of DNAJC14 verifies this chaperone as a pivotal host factor for RNA replication of pestiviruses. *Journal of Virology*, 93(5), 1714-18.

- Johnson, J. C., & Rosenbusch, R. F. (1990). Effect of host cell on the in vitro characteristics expressed by two bovine viral diarrhoea virus strains. *Veterinary Microbiology*, 21(4), 319-328.
- Jordão, R. S., Ribeiro, C. P., Pituco, E. M., Okuda, L. H., Del Fava, C., de Stefano, E., ... & Mehnert, D. U. (2011). Serological response of guinea pigs to oily and aqueous inactivated vaccines containing a Brazilian isolate of the Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV). *Research in Veterinary Science*, 91(2), 311-315.
- Juntti, N., Larsson, B., & Fossum, C. (1987). The use of monoclonal antibodies in enzyme linked immunosorbent assays for detection of antibodies to bovine viral diarrhoea virus. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 34(1-10), 356-363.
- Kelling, C. L. (2004). Evolution of bovine viral diarrhoea virus vaccines. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 20(1), 115-129.
- Kelling, C. L., Steffen, D. J., Topliff, C. L., Eskridge, K. M., Donis, R. O., & Higuchi, D. S. (2002). Comparative virulence of isolates of bovine viral diarrhoea virus type II in experimentally inoculated six-to nine-month-old calves. *American Journal of Veterinary Research*, 63(10), 1379-1384.
- Kensil, C. R., Patel, U., Lennick, M., & Marciani, D. (1991). Separation and characterization of saponins with adjuvant activity from *Quillaja saponaria* Molina cortex. *The Journal of Immunology*, 146(2), 431-437.
- King, D. J. (1991). Evaluation of different methods of inactivation of Newcastle disease virus and avian influenza virus in egg fluids and serum. *Avian Diseases*, 35, 505-514.
- Kirkland, P. D., & Mackintosh, S. G. (2006) Ruminant pestivirus infections. *Australia and New Zealand Standard Diagnostic Procedures April 2006* (pp. 1–30). Camden, NSW: Elizabeth Macarthur Agricultural Institute.
- Krey, T., Himmelreich, A., Heimann, M., Menge, C., Thiel, H. J., Maurer, K., & Rümenapf, T. (2006). Function of bovine CD46 as a cellular receptor for bovine viral diarrhoea virus is determined by complement control protein 1. *Journal of Virology*, 80(8), 3912-3922.
- Kwang, J., Bolin, S. R., & Littledike, E. T. (1995). Bovine viral diarrhoea serologic diagnostic reagents prepared from bacterially expressed recombinant proteins. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 7(1), 143-145.
- Liang, D., Sainz, I. F., Ansari, I. H., Gil, L. H., Vassilev, V., & Donis, R. O. (2003). The envelope glycoprotein E2 is a determinant of cell culture tropism in ruminant pestiviruses. *Journal of General Virology*, 84(5), 1269-1274.
- Liang, R., Van den Hurk, J. V., Zheng, C., Yu, H., Pontarollo, R. A., & Babiuk, L. A. (2005). Immunization with plasmid DNA encoding a truncated, secreted form of the bovine viral diarrhoea virus E2 protein elicits strong humoral and cellular immune responses. *Vaccine*, 23(45), 5252-5262.

- Liebler, E. M., Waschbüsch, J., Pohlenz, J. F., Moennig, V., & Liess, B. (1991). Distribution of antigen of noncytopathogenic and cytopathogenic bovine virus diarrhoea virus biotypes in the intestinal tract of calves following experimental production of mucosal disease. *In Ruminant Pestivirus Infections* (pp. 109-124). Springer, Vienna.
- Liess, B., Orban, S., Frey, H. R., Trautwein, G., Wiefel, W., & Blindow, H. (1984). Studies on transplacental transmissibility of a Bovine Virus Diarrhoea (BVD) vaccine virus in cattle 1: II. Inoculation of pregnant cows without detectable neutralizing antibodies to BVD virus 90–229 days before parturition (51st to 190th day of gestation). *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B*, 31(1-10), 669-681.
- Lindberg, A., & Houe, H. (2005). Characteristics in the epidemiology of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) of relevance to control. *Preventive Veterinary Medicine*, 72(1-2), 55-73.
- Lindberg, A., Brownlie, J., Gunn, G., Houe, H., Moening, V., Saatkamp, H. W., ... & Valle, P. S. (2006). The control of bovine viral diarrhoea virus in Europe: today and in the future. *Plurithematic Issue of the Scientific and Technical Review*, 25(3), 961- 979.
- Maldonado, N., Fredericksen, F., Espiñeira, C., Toledo, C., Oltra, J., de la Barra, V., ... & Olavarría, V. H. (2020). BVDV-1 induces interferon-beta gene expression through a pathway involving IRF1, IRF7, and NF- $\kappa$ B activation. *Molecular Immunology*, 128, 33-40.
- Marshall, D. J., Moxley, R. A., & Kelling, C. L. (1996). Distribution of virus and viral antigen in specific pathogen-free calves following inoculation with noncytopathic bovine viral diarrhoea virus. *Veterinary Pathology*, 33(3), 311-318.
- Marzocca, M. P., Seki, C., Giambiagi, S. M., Robiolo, B., Schauer, R., Santos, M. D., ... & Grigera, P. R. (2007). Truncated E2 of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) expressed in *Drosophila melanogaster* cells: a candidate antigen for a BVDV ELISA. *Journal of Virological Methods*, 144(1-2), 49-56.
- McClurkin, A. W., Littledike, E. T., Cutlip, R. C., Frank, G. H., Coria, M. F., & Bolin, S. R. (1984). Production of cattle immunotolerant to bovine viral diarrhoea virus. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 48(2), 156.
- Meyling, A., Houe, H., & Jensen, A. M. (1990). Epidemiology of bovine virus diarrhoea virus. *Revue Scientifique et Technique*, 9, 75–93.
- Moennig, V., & Becher, P. (2018). Control of bovine viral diarrhoea. *Pathogens*, 7(1), 29.
- Moennig, V., & Brownlie, J. (2006). *Vaccines and vaccination strategies. EU Thematic network on control of bovine viral diarrhoea virus: position paper* (QLRT–2001-01573). Edited online (<http://www.afbini.gov.uk/chs-thematicnetwork-position-paper-on-bvd-control.pdf>), 73-98.

- Moennig, V., Eicken, K., Flebbe, U., Frey, H. R., Grummer, B., Haas, L., ... & Liess, B. (2005). Implementation of two-step vaccination in the control of bovine viral diarrhoea (BVD). *Preventive Veterinary Medicine*, 72(1-2), 109-114.
- Moerman, A., Straver, P. J., De Jong, M. C. M., Quak, J., Baanvinger, T. H., & Van Oirschot, J. T. (1994). Clinical consequences of a bovine virus diarrhoea virusinfection in a dairy herd: a longitudinal study. *Veterinary Quarterly*, 16(2), 115-119.
- Montaraz, J. A., Novotny, P., & Ivanyi, J. (1985). Identification of a 68-kilodalton protective protein antigen from Bordetella bronchiseptica. *Infection and Immunity*, 47(3), 744-751.
- Nakamura, S., Sakamoto, S., Sakoda, Y., Shimazaki, T., Inoue, Y., Ogawa, N., & Fukusho, A. (1997). Variation from cytopathogenic biotype to non-cytopathogenic biotype is correlated with the deletion of cellular sequence from bovine viral diarrhea viruses. *Journal of Veterinary Medical Science*, 59(5), 361-370.
- Nayak, D. P., Lehmann, S., & Reichl, U. (2005). Downstream processing of MDCK cell-derived equine influenza virus. *Journal of Chromatography B*, 823(2), 75-81.
- Neill, J. D. (2013). Molecular biology of bovine viral diarrhea virus. *Biologicals*, 41(1), 2-7.
- Nelson, G., Marconi, P., Periolo, O., La Torre, J., & Alvarez, M. A. (2012). Immunocompetent truncated E2 glycoprotein of bovine viral diarrhea virus (BVDV) expressed in *Nicotiana tabacum* plants: a candidate antigen for new generation of veterinary vaccines. *Vaccine*, 30(30), 4499-4504.
- Newcomer, B. W., Chamorro, M. F., & Walz, P. H. (2017). Vaccination of cattle against bovine viral diarrhea virus. *Veterinary Microbiology*, 206, 78-83.
- Newcomer, B. W., Walz, P. H., Givens, M. D., & Wilson, A. E. (2015). Efficacy of bovine viral diarrhea virus vaccination to prevent reproductive disease: a meta-analysis. *Theriogenology*, 83(3), 360-365.
- Nilson, S. M., Workman, A. M., Sjeklocha, D., Brodersen, B., Grotelueschen, D. M., & Petersen, J. L. (2020). Upregulation of the type I interferon pathway in feedlot cattle persistently infected with bovine viral diarrhea virus. *Virus Research*, 278, 197862.
- Nuttall, P. A. (1980). Growth characteristics of two strains of bovine virus diarrhoea virus. *Archives of Virology*, 66(4), 365-369.
- Oguejiofor, C. F., Thomas, C., Cheng, Z., & Wathes, D. C. (2019). Mechanisms linking bovine viral diarrhea virus (BVDV) infection with infertility in cattle. *Animal Health Research Reviews*, 20(1), 72-85.
- Ohmann, H. B. (1988). BVD virus antigens in tissues of persistently viraemic, clinically normal cattle: implications for the pathogenesis of clinically fatal disease. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 29(1), 77-84.
- Olafson, P. (1946). An apparently new transmissible disease of cattle. *The Cornell Veterinarian*, (36), 205-213.

- Özan, E., Turan, H. M., Albayrak, H., & Cavunt, A. (2012). Serological determination of pestivirus, bluetongue virus and peste des petits ruminants virus in small ruminants in Samsun province of Turkey. *Atatürk University Journal of Veterinary Sciences*, 7(1), 27-33.
- Özkuş, A., Yeşilbağ, K., & Burgu, İ. (2002). 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(5), 1043- 1048.
- Paton, D. J. (1995). Pestivirus diversity. *Journal of Comparative Pathology*, 112(3), 215-236.
- Peterhans, E., Jungi, T. W., & Schweizer, M. (2003). BVDV and innate immunity. *Biologicals*, 31(2), 107-112.
- Race, E., Stein, C. A., Wigg, M. D., Baksh, A., Addawe, M., Frezza, P., & Oxford, J. S. (1995). A multistep procedure for the chemical inactivation of human immunodeficiency virus for use as an experimental vaccine. *Vaccine*, 13(16), 1567-1575.
- Reardon, F., Graham, D. A., Clegg, T. A., Tratalos, J. A., O'Sullivan, P., & More, S. J. (2018). Quantifying the role of Trojan dams in the between-herd spread of bovine viral diarrhoea virus (BVDv) in Ireland. *Preventive Veterinary Medicine*, 152, 65-73.
- Rebhun, W. C., French, T. W., Perdrizet, J. A., Dubovi, E. J., Dill, S. G., & Karcher, L. F. (1989). Thrombocytopenia associated with acute bovine virus diarrhea infection in cattle. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 3(1), 42-46.
- Refaie, F. M., Esmat, A. Y., Mohamed, A. F., & Mohamed, W. A. (2004). The effect of chemical inactivation of bovine viral diarrhoea virus with beta-propiolactone and binary ethyleneimine on plasma proteins and coagulation factors. *The Egyptian Journal of Immunology*, 11(2), 9-20.
- Ridpath, J. F. (2005). Classification and molecular biology. *Bovine Viral Diarrhoea Virus: Diagnosis, Management and Control* (pp. 65-89). New Jersey: Blackwell Publishing.
- Ridpath, J. F., Neill, J. D., Frey, M., & Landgraf, J. G. (2000). Phylogenetic, antigenic and clinical characterization of type 2 BVDV from North America. *Veterinary Microbiology*, 77(1-2), 145-155.
- Riedel, C., Chen, H. W., Reichart, U., Lamp, B., Laketa, V., & Rumenapf, T. (2020). Real time analysis of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection and its dependence on bovine CD46. *Viruses*, 12(1), 116.
- Riitho, V., Strong, R., Larska, M., Graham, S. P., & Steinbach, F. (2020). Bovine pestivirus heterogeneity and its potential impact on vaccination and diagnosis. *Viruses*, 12(10), 1134.

- Riitho, V., Walters, A. A., Somavarapu, S., Lamp, B., Rügenapf, T., Krey, T., ... & Graham, S. P. (2017). Design and evaluation of the immunogenicity and efficacy of a biomimetic particulate formulation of viral antigens. *Scientific Reports*, 7(1), 1-10.
- Risalde, M. A., Romero-Palomo, F., Lecchi, C., Cecilian, F., Bazzocchi, C., Comazzi, S., ... & Luzzago, C. (2020). BVDV permissiveness and lack of expression of co-stimulatory molecules on PBMCs from calves pre-infected with BVDV. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 68, 101388.
- Rodning, S. P., Marley, M. S. D., Zhang, Y., Eason, A. B., Nunley, C. L., Walz, P. H., ... & Givens, M. D. (2010). Comparison of three commercial vaccines for preventing persistent infection with bovine viral diarrhoea virus. *Theriogenology*, 73(8), 1154-1163.
- Rügenapf, T., Unger, G., Strauss, J. H., & Thiel, H. J. (1993). Processing of the envelope glycoproteins of pestiviruses. *Journal of Virology*, 67(6), 3288-3294.
- Salk, J. E., Krech, U., Youngner, J. S., Bennett, B. L., Lewis, L. J., & Bazeley, P. L. (1954). Formaldehyde treatment and safety testing of experimental poliomyelitis vaccines. *American Journal of Public Health and the Nations Health*, 44(5), 563- 570.
- Scharnböck, B., Roch, F. F., Richter, V., Funke, C., Firth, C. L., Obritzhauser, W., ... & Pinior, B. (2018). A meta-analysis of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) prevalences in the global cattle population. *Scientific Reports*, 8(1), 1-15.
- Scheel, T. K., Luna, J. M., Liniger, M., Nishiuchi, E., Rozen-Gagnon, K., Shlomai, A., ... & Rice, C. M. (2016). A broad RNA virus survey reveals both miRNA dependence and functional sequestration. *Cell host & Microbe*, 19(3), 409-423.
- Schoepf, K., Revilla-Fernández, S., Steinrigl, A., Fuchs, R., Sailer, A., Weikel, J., & Schmoll, F. (2016). Retrospective epidemiological evaluation of molecular and animal husbandry data within the bovine viral diarrhoea virus (BVDV) control programme in Western Austria during 2009–2014. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, 129(5-6), 196-201.
- Sentsui, H., Nishimori, T., Kirisawa, R., & Morooka, A. (2001). Mucosal disease-induced in cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus by antigenically different cytopathic virus. *Archives of Virology*, 146(5), 993-1006.
- Smirnova, N. P., Webb, B. T., McGill, J. L., Schaut, R. G., Bielefeldt-Ohmann, H., Van Campen, H., ... & Hansen, T. R. (2014). Induction of interferon-gamma and downstream pathways during establishment of fetal persistent infection with bovine viral diarrhoea virus. *Virus Research*, 183, 95-106.
- Smith, D. B., Meyers, G., Bukh, J., Gould, E. A., Monath, T., Muerhoff, A. S., ... & Becher, P. (2017). Proposed revision to the taxonomy of the genus Pestivirus, family Flaviviridae. *The Journal of General Virology*, 98(8), 2106.

- Smith, R. A. (2000). Effects of feedlot disease on economics, production and carcass value. In *American Association of Bovine Practitioners Proceedings of the Annual Conference* (pp. 125-128). USA: Frontier Printers, Inc.
- Sozzi, E., Righi, C., Boldini, M., Bazzucchi, M., Pezzoni, G., Gradassi, M., ... & De Mia, G. M. (2020). Cross-reactivity antibody response after vaccination with modified live and killed bovine viral diarrhoea virus (BVD) vaccines. *Vaccines*, 8(3),374.
- Ståhl, K., & Alenius, S. (2012). BVDV control and eradication in Europe—an update. *Japanese Journal of Veterinary Research*, 60(Supplement), 31-39.
- Stahl, C., Liess, B., Dahle, J., Frey, H. R., & Grunert, E. (1987). Control measures for BVD virus infections in cattle breeding herds. DTW. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, 94(10), 594-596.
- Stalder, H., Hug, C., Zanoni, R., Vogt, H. R., Peterhans, E., Schweizer, M., & Bachofen, C. (2016). A nationwide database linking information on the hosts with sequence data of their virus strains: A useful tool for the eradication of bovine viral diarrhea (BVD) in Switzerland. *Virus Research*, 218, 49-56.
- Steinhauer, D. A., Domingo, E., & Holland, J. J. (1992). Lack of evidence for proofreading mechanisms associated with an RNA virus polymerase. *Gene*, 122(2), 281-288.
- Stetson, D. B., & Medzhitov, R. (2006). Type I interferons in host defense. *Immunity*, 25(3), 373-381.
- Stevens, E. T., Zimmerman, A. D., Butterbaugh, R. E., Barling, K., Scholz, D., Rhoades, J., & Chase, C. C. (2009). The induction of a cell-mediated immuneresponse to bovine viral diarrhea virus with an adjuvanted inactivated vaccine. *Veterinary Therapeutics: Research in Applied Veterinary Medicine*, 10(4), 1-8.
- Strong, R., La Rocca, S. A., Paton, D., Bensaude, E., Sandvik, T., Davis, L., ... & Steinbach, F. (2015). Viral dose and immunosuppression modulate the progression of acute BVDV-1 infection in calves: evidence of long term persistence after intra-nasal infection. *PloS One*, 10(5), 1246-89.
- Tautz, N., Tews, B.A., Meyers, G. (2015). The molecular biology of pestiviruses. *Advances in Virus Research*, 93, 47–160.
- Thakur, N., Evans, H., Abdelsalam, K., Farr, A., Rajput, M. K., Young, A. J., & Chase, C. C. (2020). Bovine viral diarrhoea virus compromises neutrophil's functions in strain dependent manner. *Microbial Pathogenesis*, 149, 104515.
- Tian, B., Cai, D., Li, W., Bu, Q., Wang, M., Ye, G., ... & Zuo, Z. (2021). Identification and genotyping of a new subtype of bovine viral diarrhoea virus 1 isolated from cattle with diarrhoea. *Archives of Virology*, 166(4), 1259-1262.



- Timurkan, M. Ö., & Aydın, H. (2019). Increased genetic diversity of BVDV strains circulating in Eastern Anatolia, Turkey: first detection of BVDV-3 in Turkey. *Tropical Animal Health and Production*, 51(7), 1953-1961.
- Tråvén, M., Alenius, S., Fossum, C., & Larsson, B. (1991). Primary bovine viral diarrhoea virus infection in calves following direct contact with a persistently viraemic calf. *Journal of Veterinary Medicine*, 38, 453-462.
- Truitt, R. L., & Shechmeister, I. L. (1973). The replication of bovine viral diarrhoea-mucosal disease virus in bovine leukocytes in vitro. *Archiv für die gesamte Virusforschung*, 42(1), 78-87.
- Valle, P. S., Skjerve, E., Martin, S. W., Larssen, R. B., Østerås, O., & Nyberg, O. (2005). Ten years of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) control in Norway: a cost-benefit analysis. *Preventive Veterinary Medicine*, 72(1-2), 189-207.
- Van Campen, H., & Frolich, K. (2001). Pestivirus infections. In E. S. Williams, & I. K. Barker (Eds.), *Infectious diseases of wild mammals* (pp.232-244). Ames, IA: Iowa State University Press.
- Van Oirschot, J. T., Brusckhe, C. J. M., & Van Rijn, P. A. (1999). Vaccination of cattle against bovine viral diarrhoea. *Veterinary Microbiology*, 64(2-3), 169-183.
- Van Rijn, P. A., Van Gennip, H. G. P., Leendertse, C. H., Brusckhe, C. J. M., Paton, D. J., Moormann, R. J. M., & Van Oirschot, J. T. (1997). Subdivision of the Pestivirus Genus Based on Envelope Glycoprotein E2. *Virology*, 237(2), 337-348.
- Vanroose, G., Nauwynck, H., Soom, A. V., Vanopdenbosch, E., & Kruif, A. D. (1998). 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.
- Vanselow, B. A., Abetz, I., & Trenfield, K. (1985). A bovine ephemeral fever vaccine incorporating adjuvant Quil A: a comparative study using adjuvants Quil A, aluminium hydroxide gel and dextran sulphate. *The Veterinary Record*, 117(2), 37-43.
- Vevax: Licensed Veterinary Vaccines (2022, 23 Şubat). Erişim adresi: [http://www.violinet.org/vaxquery/vaxquery\\_results.php?searchEngine=vaxquery&keywords=bovine%20viral%20diarrhea](http://www.violinet.org/vaxquery/vaxquery_results.php?searchEngine=vaxquery&keywords=bovine%20viral%20diarrhea)
- Vilček, S., & Belák, S. (1996). Genetic identification of pestivirus strain Frijters as a border disease virus from pigs. *Journal of Virological Methods*, 60(1), 103-108.
- Walz, P. H., Chamorro, M. F., Falkenberg, S., Passler, T., van der Meer, F., & Woolums, A. (2020). Bovine viral diarrhoea virus: An updated American College of Veterinary Internal Medicine consensus statement with focus on virus biology, hosts, immunosuppression, and vaccination. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 34(5), 1690-1706.

- Wang, P., Huang, S., Hao, C., Wang, Z., Zhao, H., Liu, M., ... & Peng, C. (2021). Establishment of a Suspension MDBK Cell Line in Serum-Free Medium for Production of Bovine Alphaherpesvirus-1. *Vaccines*, 9(9), 1006.
- Wang, Z., Nie, Y., Wang, P., Ding, M., & Deng, H. (2004). Characterization of classical swine fever virus entry by using pseudotyped viruses: E1 and E2 are sufficient to mediate viral entry. *Virology*, 330(1), 332-341.
- Weber, M. N., Streck, A. F., Silveira, S., Mósena, A. C. S., da Silva, M. S., & Canal, C. W. (2015). Homologous recombination in pestiviruses: identification of three putative novel events between different subtypes/genogroups. *Infection, Genetics and Evolution*, (30), 219-224.
- Weiland, E., Stark, R., Haas, B., Rügenapf, T., Meyers, G., Thiel, J. (1990) Pestivirus glycoprotein which induces neutralizing antibodies forms part of a disulfide-linked heterodimer. *Journal of Virology*. (64), 3563–9.
- Wengler, G., Bradley, D.W., Collett, M.S., Heinz, F.X., Schlesinger, R.W., and Strauss, J.H., in Murphy, F.A., Faquet, C.M., Bishop, D.H.L., Ghabrial, S.A., Jarvis, A.W., Martelli, G.P., Mayo, M.A., & Summers, M.D. (1995). Virus taxonomy. *Sixth International report of the Committee on the Taxonomy of Viruses* (pp. 415-427), Vienna and New York: Springer-Verlag.
- Wernike, K., Gethmann, J., Schirrmeyer, H., Schröder, R., Conraths, F. J., & Beer, M. (2017). Six years (2011–2016) of mandatory nationwide bovine viral diarrhoea control in Germany—a success story. *Pathogens*, 6(4), 50.
- Westaway, E. G., Brinton, M. A., Gaidamovich, S. Y., Horzinek, M. C., Igarashi, A., Kääriäinen, L., ... & Trent, D. W. (1985). Flaviviridae. *Intervirology*, 24(4), 183-192.
- Wickramasinghe, S. R., Kalbfuss, B., Zimmermann, A., Thom, V., & Reichl, U. (2005). Tangential flow microfiltration and ultrafiltration for human influenza A virus concentration and purification. *Biotechnology and Bioengineering*, 92(2), 199-208.
- Xue, W., Mattick, D., Smith, L., Umbaugh, J., & Trigo, E. (2010). 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.
- Yang, M. R., Ko, Y. J., Lee, H. S., Shin, Y. K., Seo, M. G., & Han Kim, B. (2012). Inactivation Kinetics of Foot-and-Mouth Disease Virus Using Binary Ethyleneimine. *Korean Veterinary Association Conference Presentation*, 87-88.
- Yeşilbağ, K. (2001). Farklı laboratuvarlarda aynı adla kullanılan BVDV suşları arasında antijenik farklılıklar. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 48(01), 7-11.
- Yeşilbağ K. (2021). *Veteriner Viroloji, Hayvanların Viral Hastalıkları*. Flaviviridae (1.baskı) içinde (s.314-320). Malatya: Medipres yayınevi
- Yeşilbağ, K., Alpay, G., & Becher, P. (2017). Variability and global distribution of subgenotypes of bovine viral diarrhoea virus. *Viruses*, 9(6), 128.

- Yeşilbağ, K., Alpay, G., & Tuncer, P. (2012). Bir Süt Sığırcılığı İşletmesinde Bovine Viral Diarrhoea (BVD) Virus Enfeksiyonunun Kontrol ve Eliminasyonu. *Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 31(1), 11-17.
- Yeşilbağ, K., & Burgu, İ. (2006). Antigenic diversity of bovine viral diarrhoea viruses (BVDV) isolated in Turkey. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 30(6), 571-576.
- Yeşilbağ, K., Förster, C., Bank-wolf, B., Yılmaz, Z., Alkan, F., Ozkul, A., Burgu, I., Cedillo, RS., Thiel, HJ., König, M. (2008). Genetic heterogeneity of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates from Turkey: identification of a new subgroup in BVDV-1. *Veterinary Microbiology*, 130(3-4), 258-267.
- Yeşilbağ, K., Förster, C., Ozyiğit, M. O., Alpay, G., Tuncer, P., Thiel, H. J., & König, M. (2014). Characterisation of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates from an outbreak with haemorrhagic enteritis and severe pneumonia. *Veterinary microbiology*, 169(1-2), 42-49.
- Yılmaz, H., Altan, E., Ridpath, J., & Turan, N. (2012). Genetic diversity and frequency of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) detected in cattle in Turkey. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 35(5), 411-416.
- Zerbini, F. M., Briddon, R. W., Idris, A., Martin, D. P., Moriones, E., Navas-Castillo, J., ... & Consortium, I. R. (2017). ICTV virus taxonomy profile: Geminiviridae. *The Journal of General Virology*, 98(2), 131.
- Zhao, F., Liu, L., Xu, M., Shu, X., Zheng, L., & Wei, Z. (2020). Assessments of different inactivating reagents in formulating transmissible gastroenteritis virus vaccine. *Virology Journal*, 17(1), 1-9.
- Zhou, Y., Ren, Y., Cong, Y., Mu, Y., Yin, R., & Ding, Z. (2017) Autophagy induced by bovine viral diarrhoea virus infection counteracts apoptosis and innate immune activation. *Archives of Virology*, 162, 3103–3118.
- Zürcher, C., Sauter, K. S., & Schweizer, M. (2014). Pestiviral Erns blocks TLR-3-dependent IFN synthesis by LL37 complexed RNA. *Veterinary Microbiology*, 174(3-4), 399-408.

## 7. SİMGELER ve KISALTMALAR

Ab: Antikor

ABD: Amerika Birleşik Devletleri

Ag: Antijen

AGID: Agaroz Jel İmmunodifüzyon

BCoV: Bovine Coronavirus

BDV: Border Disease Virus (Sınır Hastalığı Virusu)

BEA-Br: 2-bromoethylamonium

BEI: Binary Etilenimin

BNP: Bovine Neonatal Pansitopeni

BPIV-3: Bovine Parainfluenzavirus-3

BRDC: Bovine Respiratory Disease Complex (Sığırların Solunum Sistemi Hastalık Kompleksi)

BRSV: Bovine Respiratory Syncytial Virus

BoHV-1: Bovine Herpesvirus-1

BVDV: Bovine Viral Diarrhea Virus

cm<sup>2</sup>: Santimetre Kare

CSFV: Classical Swine Fever Virus (Avrupa Domuz Vebası Virusu)

cp: Sitopatojen

cpe: Sitopatojenik etki

DKID<sub>50</sub>: Doku Enfektif Doz-50

dk: Dakika

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DNA: Deoksiribonükleik Asit

ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay

FDS: Fötal Dana Serumu

GM-CSF: Granülosit Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktörü

Gr: Gram

HAd: Hemadsorbsiyon

HADYEK: Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

IFAT: İndirect Fluorescent Antibody Test (İndirek Floresan Antikor Testi)

IFN: İnterferon

Ig: İmmunglobulin

IIPMA: İndirect İmmunoperoxidase Monolayer Assay (İndirek İmmunoperoksidaz Monolayer Testi)

IL: İnterlökin

IRES: Internal Ribosome Entry Site (İnternal Ribozom Giriş Bölgesi)

IRF-3: İnterferon Regulatory Transcription Factor-3 (İnterferon Düzenleyici Transkripsiyon Faktör-3)

IU: İnternasyonal Ünite

İA: İnaktif Aşı

Lt: Litr

mAb: Monoklonal Antikor

MCA: Modifiye Canlı Aşı

MD: Mucosal Disease (Mukozal Hastalık)

MDBK: Madin Darby Bovine Kidney

MHC: Majör Histokompatibilite Kompleksi

ml: Mililitre

mM: Milimolar

MOI: Multiplicity of Infection

nAb: Nötralizan Antikor

npc: Non-sitopatojen

ng: Nanogram

nm: Nanometre

NMWL: Nominal Molecular Weight Limit (Nominal Moleküler Ağırlık Limit)

OD: Optik Dansite

ORF: Open Reading Frame (Okuma Bölgesi)

PAMP: Pathogen Associated Molecular Pattern (Patojen ile İlişkili Moleküler Patern)

PE: Persiste Enfekte

PBS: Phosphate Buffered Saline

PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

pH: Potansiyel Hidrojen

RNA: Ribonükleik Asit

Rpm: Revolutions per Minute (Dakikadaki Devir Sayısı)

RT-PCR: Revers Transkripsiyon-Polimeraz zincir Reaksiyonu

SFT-R: Sheep Fötal Thymus-R

sn: Saniye

SN<sub>50</sub>: Serum Nötralizasyon-50

ssRNA: Tek Zincirli RNA

UTR: Untranslated Region (Bilgi Kodlamayan Bölge)

VI: Virus İzolasyonu

VNT: Virus Nötralizasyon Testi

W: Well (Kuyucuk/Göz)

%: Yüzde

µl: Mikrolitre

µg: Mikrogram

€: Euro

## 8. EKLER

T.C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU  
Görükle Yerleşkesi, 16059 Nilüfer/ BURSA-TÜRKİYE  
ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYI

<b>BAŞVURU BİLGİLERİ</b>	ARAŞTIRMANIN ADI	<i>Aşı Adayı Yerel BVD Virus Suşlarında İnaktivasyon Kinetiğinin Belirlenmesi ve Deneysel Hayvanlarında İmmünizasyon Çalışmaları</i>
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ	Prof. Dr. Kadir YEŞİLBAĞ
	KURUMU	UU Veteriner Fakültesi Viroloji AD
	YARDIMCI ARAŞTIRICILAR	Araş. Gör. Berfin KADIROĞLU
	ARAŞTIRMANIN NİTELİĞİ	Berfin KADIROĞLU'nun Doktora Tez Projesi
	ARAŞTIRMANIN SÜRESİ	01 Temmuz 2018 – 30 Haziran 2021
KULLANILACAK HAYVAN TURU VE SAYISI	UU-HADYEK tarafından verilen 05.04.2016 tarih ve 2016-05/02 nolu kararda yer alan 50 Adet Kobay kullanılacaktır.	

<b>DEĞERLENDİRİLEN İLGİLİ BELGELER</b>	Belge Adı	Tarihi
	ARAŞTIRMA BAŞVURU FORMU	25.05.2018

<b>KARAR BİLGİLERİ</b>	Karar No : 2018 - 08 / 03	Tarih : 30.05.2018
	Yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma projesi gerekçe, amaç ve yöntemler dikkate alınarak görüldü ve ilgili belgeler incelendi. Projenin etik açıdan uygun olduğuna, çalışmanın aşağıdaki hususlar dikkate alınarak yürütülmesine ve sorumlu araştırmacıya iletilmesine oy birliğiyle çoğunluğu ile karar verildi. 1) Projede herhangi bir değişiklik gerektiğinde kurulumuzdan onay alınması, 2) Projede çalışacağı bildiren araştırmacılar değişikliği olduğunda kurulumuzdan onay alınması, 3) Deneysel hayvanları üzerinde yapılacak girişim başlangıç ve bitiş tarihini bildirmesi, 4) Çalışma süresinde tamamlanamaz ise ek süre talebinde bulunulması, 5) Çalışma tamamlandığında sonuç raporunun gönderilmesi.	

### ETİK KURUL BİLGİLERİ

#### ÜYELER

Unvanı / Adı / Soyadı EK Üyeligi	Uzmanlık Dalı	Kurumu	İlişki (*)	İmza		Düşünceler
				Kabul	Ret	
Prof. Dr. Kasım ÖZLÜK Başkan	Tıp- Fizyoloji	Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H			
Prof. Dr. Levent BÜYÜKÜYSAL Başkan Yardımcısı	Tıp- Farmakoloji	Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H			
Prof. Dr. Erdoğan ŞENDEMİR Üye	Tıp - Anatomi	Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H			
Prof. Dr. M. Müftü KAHRAMAN Üye	Vet- Patoloji	Veteriner Fakültesi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H			
Prof. Dr. Ayşe TOPAL Üye	Vet- Cerrahi	Veteriner Fakültesi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H			
Prof. Dr. Aydın İPEK Üye	Ziraat- Zootekni	Ziraat Fakültesi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H			
Prof. Dr. Sibel TAŞ Üye	Fen Edebiyat - Biyoloji	Fen Edebiyat Fakültesi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H			
Sema ÖZKAN Üye	Sivil Toplum Kuruluş Üyesi	Makine Mühendisi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H			
Taner GÜLER Üye	Sivil Toplum Kuruluş Üyesi	Ziraat Yüksek Mühendisi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H			
Faruk KUÇUKYILDIZ Üye	Veteriner Hekim	UU-DEHYUAM	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H			

\* Araştırma ile İlişkisi



## 9. TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve tez çalışmam süresince beni destekleyen, bilgi, tecrübe ve önerilerini eksik etmeyen değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. Kadir YEŞİLBAĞ'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam sırasında bana yardımcı olan değerli meslektaş arkadaşlarım Araş. Gör. Dr. Recep Hakkı KOCA'ya ve Vet. Hek. Orhun YAVUZ'a sonsuz teşekkür ederim.

Bu zorlu süreçte yardımlarını esirgemeyen, iyi günde ve kötü günde yanımda olan sevgili dostum Araş. Gör. Özer ATEŞ'e, aynı zamanda tecrübelerini ve bilgilerini her daim aktaran sevgili ablam Dokt. Öğr. Üyesi Gizem AYTOĞU'a, sevgili bölüm arkadaşım Öğr. Gör. Dr. Eda Baldan TOKER'e teşekkür ederim.

Son olarak beni büyüten, okutan, yol gösteren ve tüm zorluklara beraber göğüs gerdiğim canım annem Fatma KADİROĞLU'na, canım babam Ali Kemal KADİROĞLU'na, canım kardeşlerime ve diğer tüm aile üyelerine teşekkürü bir borç bilirim.

Berfin KADİROĞLU

2022

## 10. ÖZGEÇMİŞ

İlköğretimi Diyarbakır Özel Nil Koleji, Ortaöğretimi Diyarbakır Mustafa Kemal Ortaokulu ve Lise öğrenimini Diyarbakır Selahattin Eyyubi Anadolu Lisesi'nde tamamlamıştır. Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nde 2009 yılında başlamış olduğu üniversite eğitimini 2014 yılında tamamlayarak mezun olmuştur. Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı kapsamında 2015 yılında Araştırma Görevlisi olarak Dicle Üniversitesi Viroloji Anabilim Dalı'na atanmıştır. 2016 yılından itibaren Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı'nda doktora eğitimi almak üzere göreve başlamıştır.