



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



**KLİNİK VE NEKROPSİ ÖRNEKLERİNDE  
SIĞIR SOLUNUM SİSTEMİ VİRUSLARININ  
MOLEKÜLER TEŞHİSİ**

**EDA BALDAN TOKER**

**(DOKTORA TEZİ)**

**BURSA-2019**



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



**KLİNİK VE NEKROPSİ ÖRNEKLERİNDE  
SIĞIR SOLUNUM SİSTEMİ VİRUSLARININ  
MOLEKÜLER TEŞHİSİ**

**Eda Baldan TOKER**

**(DOKTORA TEZİ)**

**DANIŞMAN:**

**Prof. Dr. Kadir YEŞİLBAĞ**

**DDP(V)2016/09 – BUÜ BAP**

**BURSA-2019**

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

**ETİK BEYANI**

Doktora tezi olarak sunduğum “Klinik ve Nekropsi Örneklerinde Sığır Solunum Sistemi Viruslarının Moleküler Teşhisi” 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.

Eda Baldan TOKER

08.02.2019

## SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Veteriner-Viroloji Anabilim Dalı Doktora öğrencisi Eda Baldan TOKER tarafından hazırlanan “Klinik ve Nekropsi Örneklerinde Sığır Solunum Sistemi Viruslarının Moleküler Teşhisi” konulu Doktora tezi 08.02.2019 günü, 10.00-12.00 saatleri arasında yapılan tez savunma sınavında jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

	<u>Adı-Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Tez Danışmanı	Prof. Dr. Kadir YEŞİLBAĞ	
Üye	Prof. Dr. Mustafa HASÖKSÜZ	
Üye	Prof. Dr. Seval Bilge DAĞALP	
Üye	Prof. Dr. H. Barbaros ORAL	
Üye	Doç. Dr. M. Özgür ÖZYİĞİT	

Bu tez Enstitü Yönetim Kurulu'nun ..... tarih ve ..... sayılı toplantısında alınan ..... numaralı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Ali AYDOĞDU  
Enstitü Müdürü

## TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU

08/02/2019

Adı Soyadı: Eda Baldan TOKER

Anabilim Dalı: Veteriner – Viroloji Tez Konusu: Klinik ve Nekropsi Örneklerinde  
Sığır Solunum Sistemi Viruslarının Moleküler Teşhisi

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

DANIŞMAN ONAYI

Unvanı Adı Soyadı: Prof. Dr. Kadir YEŞİLBAĞ

İmza:

## İÇİNDEKİLER

<b>Dış Kapak</b>	
<b>İç Kapak</b>	
<b>ETİK BEYAN</b>	II
<b>KABUL ONAY</b>	III
<b>TEZ KONTROL BEYAN FORMU</b>	IV
<b>İÇİNDEKİLER</b>	V
<b>TÜRKÇE ÖZET</b>	VII
<b>İNGİLİZCE ÖZET</b>	VIII
<b>1. GİRİŞ</b>	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	4
2.1. Bovine Respiratorik Sinsityal Virus (BRSV)	4
2.2. Bovine ParainfluenzaVirus-3 (BPIV-3)	7
2.3. BovineViral DiarrheaVirus (BVDV)	11
2.4. Bovine Herpesvirus-1 (BoHV-1)	14
<b>3. GEREÇ ve YÖNTEM</b>	19
3.1. Gereç	19
3.1.1. Örneklenen Hayvanlar	19
3.1.2. Nazal Svab Örnekleri	19
3.1.3. Akciğer Örnekleri	20
3.1.4. Etik Kurul İzin Belgesi	21
3.1.5. Hücre Kültürü	21
3.1.6. Testlerde Kullanılan Kontrol Virusları	22
3.1.7. Eritrosit Süspansiyonu	22
3.1.8. Alsever's Solüsyonu	22
3.1.9. Monoklonal Antikor	23
3.1.10. Konjugatlar	23
3.1.11. Antijen-ELISA Kitleri	23
3.1.12. Nükleik Asit Ekstraksiyon Kiti	23
3.1.13. Komplementer DNA (cDNA) Sentez Kiti	24
3.1.14. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Bileşenleri	24
3.2. Yöntem	24
3.2.1. Nazal Svab Örneklerinin Hazırlanması	24
3.2.2. Akciğer Doku Örneklerinin Hazırlanması	25
3.2.3. Kontrol Viruslarının Üretimi	25
3.2.4. Konvansiyonel Virolojik Yöntemler	26
3.2.4.1. Virus İzolasyonu	26
3.2.4.2. İmmunoperoksidaz Testi (İmmunoperoksidaz Monolayer Assay, IPMA)	26
3.2.4.3. Hemadsorbsiyon (HAd) Testi	27
3.2.4.4. ELISA ile Antijen Tespiti	27
3.2.5. Moleküler Yöntemler	28
3.2.5.1. Nükleik Asit İzolasyonu	28
3.2.5.2. Komplementer DNA (cDNA) Elde Edilmesi	28
3.2.5.3. BRSV Nested RT-PCR Protokolü	28
3.2.5.4. BPIV-3 RT-PCR Protokolü	29
3.2.5.5. Panpestivirus RT-PCR Protokolü	29
3.2.5.6. BoHV-1 PCR Protokolü	30
3.2.5.7. Elektroforez ve PCR Ürünlerinin Görüntülenmesi	31

3.2.5.8. Dizi Analizi ve Filogenetik Ağaç Oluşturulması	31
3.2.6. İstatistiksel Analiz	32
<b>4. BULGULAR</b>	<b>33</b>
4.1. Konvansiyonel Virolojik Yöntemlerle Elde Edilen Bulgular	33
4.1.1. Virus İzolasyonu Sonuçları	33
4.1.2. Hemadsorbsiyon Testi Sonucu	36
4.1.3. İmmunoperoksidaz Testi Sonuçları	37
4.1.4. ELISA ile BVDV Antijen Tespiti Sonuçları	37
4.1.5. ELISA ile BoHV-1 Antijen Tespiti Sonuçları	38
4.2. Moleküler Yöntemlerle Elde Edilen Bulgular	39
4.2.1. BRSV Nested RT-PCR Sonuçları	39
4.2.2. BPIV-3 RT-PCR Sonuçları	40
4.2.3. Panpestivirus RT-PCR Sonuçları	40
4.2.4. BoHV-1 PCR Sonuçları	41
4.3. Konvansiyonel Virolojik Yöntemler ve Moleküler Yöntemlerle Elde Edilen Bulgularının Karşılaştırılması	42
4.4. Dizi Analizi ve Filogenetik Ağaç Oluşturulması	46
4.4.1. BRSV Nested RT-PCR Pozitif Örneklerle İlişkin Filogenetik Ağaç	48
4.4.2. BPIV-3 Pozitif Örneğe İlişkin Filogenetik Ağaç	49
4.4.3. Panpestivirus RT-PCR Pozitif Örneklerle İlişkin Filogenetik Ağaç	50
4.4.4. BoHV-1 PCR Pozitif Örneğe İlişkin Filogenetik Ağaç	52
4.5. İstatistiksel Analiz Sonuçları	53
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	54
5.1. BRSV Tespitine Yönelik Çalışmaların Değerlendirilmesi	56
5.2. BPIV-3 Tespitine Yönelik Çalışmaların Değerlendirilmesi	60
5.3. Pestivirus Tespitine Yönelik Çalışmaların Değerlendirilmesi	64
5.4. BoHV-1 Tespitine Yönelik Çalışmaların Değerlendirilmesi	68
5.5. Sonuç	72
<b>6. KAYNAKLAR</b>	<b>74</b>
<b>7. SİMGELER VE KISALTMALAR</b>	<b>89</b>
<b>8. EKLER</b>	<b>91</b>
<b>9. TEŞEKKÜR</b>	<b>92</b>
<b>10. ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>93</b>

## TÜRKÇE ÖZET

Bu tez çalışmasında Bursa ve komşu illerde bulunan sığırlarda solunum sistemi enfeksiyonlarına neden olan önemli viral patojenlerden bovine respiratorik sinsityal virus (BRSV), bovine parainfluenza virus-3 (BPIV-3), bovine viral diarrhoea virus (BVDV) ve bovine herpesvirus-1 (BoHV-1) etkenlerinin konvansiyonel virolojik yöntemler ve moleküler yöntemler aracılığıyla tespit edilmesi, genetik karakterizasyonunun yapılması ve saha izolatlarının elde edilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla solunum sistemi bulguları gösteren sığırlarda 133 nazal svab ve 60 akciğer doku örneği olmak üzere toplam 193 örnek değerlendirildi. Tüm örnekler MDBK hücre hattında virus izolasyonuna tâbi tutuldu. Ayrıca örneklere BRSV varlığını tespit etmek için nested RT-PCR; BPIV-3 için hemadsorbsiyon testi ve RT-PCR; BVDV için immunoperoksidaz testi, antijen-ELISA ve RT-PCR; BoHV-1 için antijen-ELISA ve PCR yöntemleri uygulandı.

Virus izolasyonu çalışmalarında 1 BPIV-3 (ET-81) ve 2 non-sitopatojen BVDV saha izolatı (DO-48 ve ET-94) elde edildi. Antijen-ELISA testleri sonucunda 10 örnek BVDV antijen pozitif olarak saptanırken; BoHV-1 antijeni tespit edilemedi. RT-PCR ve PCR aracılığıyla hayvanların %6,74'ünde (13/193) solunum sistemi enfeksiyonu saptanırken, BRSV, BPIV-3, BVDV ve BoHV-1 prevalansı sırasıyla %2,59 (5/193); %0,52 (1/193); %2,59 (5/193) ve %1,04 (2/193) olarak tespit edildi. Elde edilen PCR ürünlerinin dizi analizleri ve sonrasında filogenetik analizleri yapıldı. Bunun sonucunda DO-7, ET-63 ve ET-124 kodlu dizinlerin BRSV'nin F gen bölgesine göre birbirleriyle yakın ilişkili olduğu; ET-81 kodlu dizinin HN proteini gen bölgesine göre BPIV-3c genotipinde; DO-48, ET-64 ve ET-94 kodlu dizinlerin 5'UTR gen bölgesine göre sırasıyla BVDV-1f, BVDV-1a ve BVDV-1l alt gruplarında; ET-121 kodlu dizinin ise gC gen bölgesine göre BoHV-1.1 alt grubunda yer aldığı belirlendi. Örneklerde çoklu enfeksiyon tespit edilemedi.

**Anahtar Kelimeler:** BRSV, BPIV-3, BVDV, BoHV-1, PCR, Moleküler karakterizasyon, Virus izolasyonu



## SUMMARY

### “Molecular Diagnosis of Bovine Respiratory Viruses in Clinical and Necropsy Samples”

The aim of this PhD thesis is to determine the presence of bovine respiratory syncytial virus (BRSV), bovine parainfluenza virus type 3 (BPIV-3), bovine viral diarrhoea virus (BVDV) and bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1), which are important viral pathogens of bovine respiratory disease. For that purpose, conventional virologic methods and molecular methods were employed. A total of 193 samples (133 nasal swabs and 60 lung tissue samples) from the cattle showing respiratory system findings were examined in Bursa and neighboring provinces. For virus isolation, all the samples were inoculated onto MDBK cell culture for 3 blind passages. In addition, the samples were tested by nested RT-PCR for BRSV; hemadsorption test and RT-PCR for BPIV-3; immunoperoxidase monolayer assay, antigen-ELISA and RT-PCR for BVDV; antigen-ELISA and PCR methods for BoHV-1.

During virus isolation, 1 BPIV-3 (ET-81) and 2 non-cytopathogenic BVDV (DO-48 and ET-94) isolates were obtained. By antigen-ELISA tests, 10 samples were found to be positive for BVDV antigen, while there was no positive sample for BoHV-1 antigens. By RT-PCR and PCR, the prevalence of BRSV, BPIV-3, BVDV and BoHV-1 was determined as 2,59% (5/193); 0,52% (1/193); 2,59% (5/193) and 1,04% (2/193), respectively. 6,74% (13/193) of the animals tested were found to have respiratory infection caused by these viruses. Sequence analysis was performed on PCR products from selected samples. According to phylogenetic analyses, DO-7, ET-63 and ET-124 sequences were closely related to each other according to the F gene region of BRSV. ET-81 was found in the genotype of BPIV-3c according to HN protein gene region. DO-48, ET-64 and ET-94 sequences that were identified as BVDV-1 and 5'UTR-based analysis demonstrated the existence of BVDV-1f, BVDV-1a, and BVDV-1l subgenotypes, respectively. ET-121 sequence was found to take part in BoHV-1.1 subgroup according to gC gene region. No multiple infections could be detected in the samples.

**Keywords:** BRSV, BPIV-3, BVDV, BoHV-1, PCR, Molecular Characterization, Virus isolation.

## 1. GİRİŞ

Sığır solunum sistemi enfeksiyonları tüm dünyada sık rastlanan ve enfeksiyon sonrası büyüme geriliği, kondüsyon kaybı, hayvan ölümleri, pnömoni ve sekonder enfeksiyon oluşumuna neden olan bir problemdir. Hastalığın ortaya çıkmasında hayvanların kötü bakım şartları ve kalabalık ortamda barındırma gibi stres yaratan koşullara maruz kalması önemli bir faktördür. Buna bağlı olarak immunsupresyon şekillenmesi ile birlikte anneden buzağıya kolostrumla geçen antikorların yeterli düzeyde olmaması da solunum sistemi enfeksiyonlarının oluşumunda önemli bir rol oynamaktadır (Gulliksen ve ark., 2009a; Smith, 2000; Urban-Chmiel ve Grooms, 2012).

Sığır solunum sistemi enfeksiyonları ciddi ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Örneğin; Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) her yıl yaklaşık 300.000 süt sığırı akciğer problemleri nedeniyle ölmekte veya itlaf edilmektedir. Sığırların süt veriminde azalma, tedavi masrafları, ölüm ve itlaf nedeniyle 2013 yılında ABD'de tespit edilen solunum sistemi enfeksiyonu kaynaklı ekonomik kayıp yaklaşık 30 milyon Amerikan doları (USD) olarak hesaplanmıştır (Guterbock, 2014). Yine ABD'de yapılan bir çalışmada, solunum sistemi enfeksiyonuna sahip bir sığırın ortalama tedavi masrafı 15,60 USD olarak bulunmuştur. Bu ücrete, günlük süt verimi, yemden yararlanmanın azalması ve karkas kalitesindeki düşme gibi indirekt maliyetler de eklendiğinde hayvan başına öngörülen kayıp 92,30 USD'ye kadar yükselmektedir (Schneider ve ark., 2009).

Akciğerlerinin yapısal özellikleri nedeniyle sığırlar diğer çiftlik hayvanlarına oranla solunum sistemi enfeksiyonlarına daha yatkındır. Genel olarak sığırların akciğeri etkili çalışan bir klirens mekanizmasına sahip değildir. Sığırlar yüksek rakım ya da yüksek metabolik aktiviteye maruz kalma durumunda daha düşük alveolar oksijen seviyesi ve daha küçük gaz değişim kapasitesi sergilemektedir. Düşük

oksijen seviyesi makrofaj aktivitesini yavaşlatabilmekteve buna bağlı olarak akciğerde meydana gelen hücresele döküntülerin ve patojenlerin uzaklaştırılmasında aksamlar olabilmektedir. Azalan fagositik aktiviteye bağlı olarak solunum yollarının tıkanması yanı sıra, sığır akciğerinin anatomik olarak bölümlenmiş yapıda olması dasığırları bölgesel hipoksiye daha meyilli bir hale getirmektedir. Bu durum, akciğerlerde patojenlerin çoğalması için elverişli bir ortam oluşmasına neden olmaktadır (Flöck, 2004).

Sığırkların solunum yolu enfeksiyonlarının etiolojisinde birçok viral etken rol oynayabilir. Bu etkenler arasında bovine respiratorik sinsityal virus (BRSV), bovine parainfluenza virus-3 (BPIV-3), bovine viral diarrhea virus (BVDV) ve bovine herpesvirus-1 (BoHV-1) önemli yer tutmaktadır (Autio ve ark., 2007; Gulliksen ve ark., 2009b; Hägglund ve ark., 2006; Härtel ve ark., 2004; Moreno-Lopez, 1990; Urban-Chmiel ve Grooms, 2012; Valarcher ve Hagglung, 2006). Ayrıca bovine coronavirus, bovine adenovirus ve bovine rhinovirus gibi viral etkenler de solunum sistemi enfeksiyonlarına neden olabilmektedir (Hasöksüz ve ark., 2005; Richer ve ark., 1988) Solunum sistemi enfeksiyonlarının primer nedeni genellikle viral etkenlerdir. Örneğin BPIV-3'ün hücresele immunitiyi baskılaması ve BVDV'nin lenfosit ve nötrofilleri hedef alarak immunsupresyona neden olması prognozun daha kötü sonuçlanmasına ve hayvanların sekonder bakteriyel enfeksiyonlaradaha yatkın olmasına neden olmaktadır (Moreno-Lopez, 1990). Söz konusu sekonder etkenler arasında en önemlileri olarak *Mycoplasma bovis*, *Mannheimia haemolytica*, *Histophilus somni* ve *Pasteurella multocida* sayılabilir (Autio ve ark., 2007; Dabo ve ark., 2008; Hägglund ve ark., 2006; Rice ve ark., 2008).

Sığırkların viral solunum yolu enfeksiyonlarına bağlı klinik tablolar çoğunlukla birbirine benzemekte, bu etkenlerin özellikle bir arada bulunması durumunda oldukça şiddetli seyreden klinik olgular ve ölümler görölmektedir. Bu nedenle, bu tür enfeksiyonların kesin ve güvenilir tanısı, hem alınacak kontrol önlemlerinin belirlenmesi hem de enfeksiyonların izlenmesi açısından önem taşımaktadır. Sığır solunum sistemi enfeksiyonlarının tanısında test süresi, duyarlılık ve özgünlük açısından farklılıkları olan etken izolasyonu ve Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) gibi konvansiyonel yöntemler veya polimeraz zincir

reaksiyonu (PCR) gibi moleküler testler kullanılmaktadır. Rutin teşhis çalışmalarında genel olarak etkene spesifik antijenlerin tespitine dayanan ELISA tekniği öncelikli olarak kullanılmakta, sonrasında ise etkenin hücre kültürlerinde izolasyonu ve PCR gibi yöntemlerle belirlenmesi ile tanıya gidilmektedir (Caswell ve ark., 2012; Cockcroft, 2015; Cooper ve Brodersen, 2010).

Bu doktora tez çalışmasında Bursa ve çevre illerde (Balıkesir, Kütahya, Bilecik ve Kocaeli) solunum sistemi enfeksiyonu belirtisi gösteren sığırlardan sağlanan nazal svab ve akciğer doku örneklerinde,

- En önemli solunum sistem virusları olan BRSV, BPIV-3, BVDV ve BoHV-1 etkenlerinin konvansiyonel virolojik yöntemler ve genetik tabanlı moleküler teşhis yöntemi olan PCR metoduyla saptanması,
- BRSV, BPIV-3, BVDV ve BoHV-1 etkenlerinin moleküler düzeyde tiplendirme çalışmaları yapılarak çeşitlilik ve genetik yakınlığının belirlenmesi,
- Virus izolasyonu yapılarak saha izolatlarının elde edilmesi,
- Virus izolasyonu, antijen ELISA ve PCR sonuçları arasındaki uyumluluğun karşılaştırılması,
- Elde edilen veriler ışığında solunum yolu enfeksiyonlarına neden olan virusların ülkemizdeki durumuyla ilgili güncel verilerin elde edilmesi amaçlanmıştır.

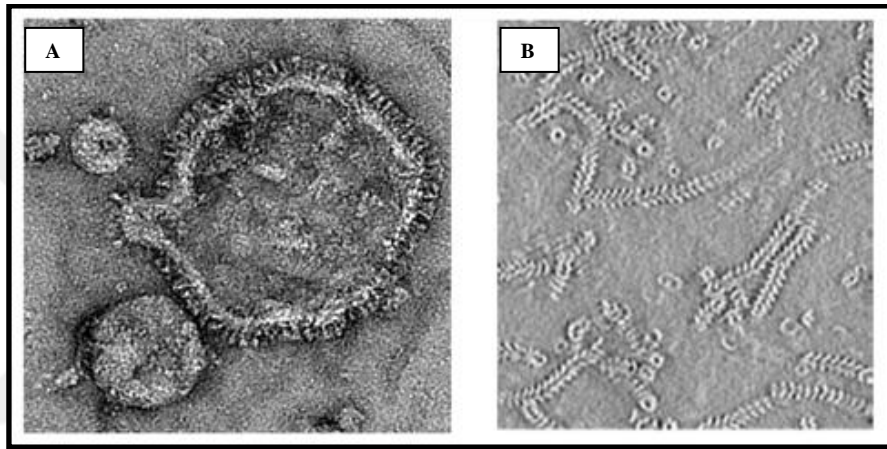
## 2. GENEL BİLGİLER

Sığırların solunum yolu enfeksiyonlarının etiolojisinde en sık karşılaşılan viral etkenler bovine respiratorik sinsityal virus (BRSV), bovine parainfluenza virus-3 (BPIV-3), bovine viral diarrhea virus (BVDV) ve bovine herpesvirus-1 (BoHV-1)'dir. Söz konusu virusların solunum sistemi enfeksiyonlarındaki rolüyle ilgili genel bilgiler aşağıda sunulmuştur.

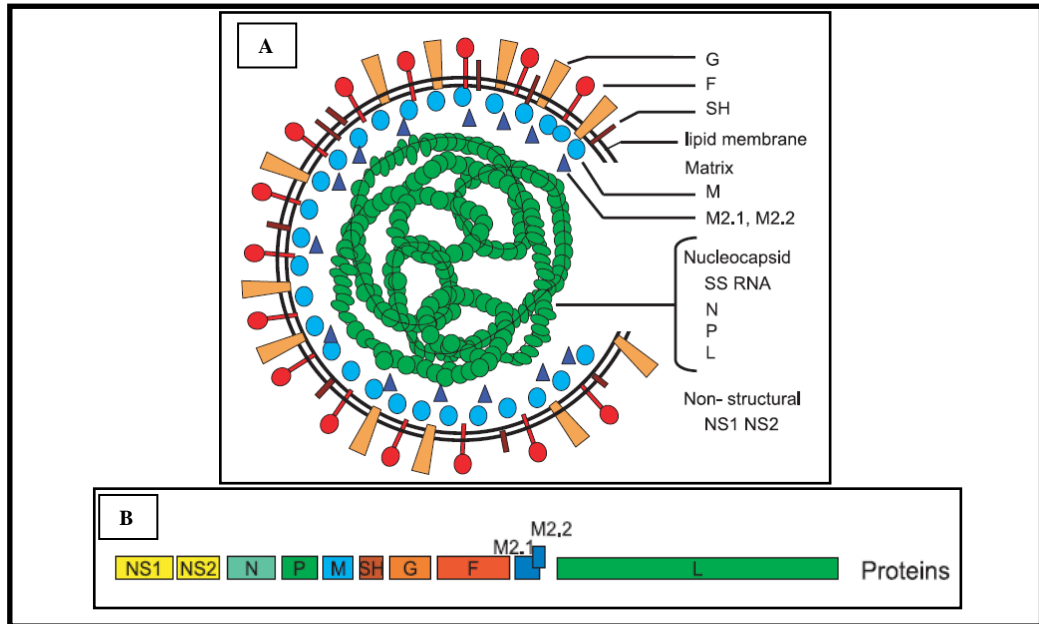
### 2.1. Bovine Respiratorik Sinsityal Virus (BRSV)

Bovine respiratorik sinsityal virus, *Monjiviricetes* sınıfındaki *Mononegavirales* dizini, *Pneumoviridae* ailesi, *Orthopneumovirus* cinsinde yer almakta ve bovine orthopneumovirus olarak adlandırılmaktadır (ICTV, 2018). Etken zarflı ve helikal simetriye sahiptir. Virion yapısı için iki temel form tanımlanmıştır: 35-150 nm çapında kabaca yuvarlak şekilli pleomorfik yapıda ya da 60-110 nm çapında 5 µm uzunluğunda filamentöz yapıda olabilmektedir (Trudel ve ark., 1989; Valarcher ve Taylor, 2007). Etkenin elektron mikroskop ve tomogram görüntüleri Resim 1'de, virion ve viral genomu ait özellikler Şekil 1'de verilmiştir. Viral genom yaklaşık 15,2 kb uzunluğunda ve toplamda 11 adet protein kodlayan RNA yapısındadır. Virionu çevreleyen zarf, konak hücre plazma membranından köken almış ve spike olarak da adlandırılan üç adet transmembran glikoproteini içermektedir. Bu glikoproteinler konak hücreye adsorbsiyondan sorumlu büyük glikoprotein (G), membran füzyonunda rol alan füzyon (F) proteini ve fonksiyonu henüz bilinmeyen küçük hidrofobik (SH) proteindir. Pneumovirusların G proteini ile paramyxovirusların HN proteini aynı görevi üstlenmesine karşın G proteininin hemagglütinasyon aktivitesi bulunmamaktadır. Ayrıca virion yapısında nükleokapsid (N), fosfoprotein (P), viral RNA bağımlı polimeraz proteini (L) ve nükleik asidi kapsayan helikal bir nükleokapsid yer almaktadır. Bu proteinlere ek olarak üç formdan oluşan matriks proteinine (M, M2.1 ve M2.2) sahiptir. M proteini, zarf ile

nükleokapsid arasında bağlantı kurarak virionun stabilitesini sağlamakta görev alır. BRSV genomunda kodlanan iki adet yapısal olmayan protein (NS1 ve NS2) interferon  $\alpha$  ve  $\beta$ 'ya karşı direnç oluşumunda görevlidir (Maclachlan ve Dubovi, 2017; Sacco ve ark., 2014; Valarcher ve Taylor, 2007; Van Vuuren, 2004; Yeşilbağ, 2017). Viral partiküller söz konusu proteinler dışında aktin, kaveolin-1 ve majör histokompatibilite kompleksi-I (MHC-I) molekülü gibi hücresel proteinleri de içerebilmektedir. Böylece sığır hücrelerinde çoğalan BRSV, sığır MHC-I molekülüne spesifik monoklonal antikolar tarafından nötralize edilebilmektedir (Valarcher ve Taylor 2007).



**Resim 1. A:** İnsan respiratorik sinsityal virusunun (HRSV) elektron mikroskobu görüntüsü. **B:**HRSV nükleokapsidinin tomogram görüntüsü (ICTV, 2017).



**Şekil 1. A:** BRSV'nin virion yapısı; **B:** BRSV'nin genom organizasyonu (Valarcher ve Taylor, 2007).

İlk kez 1970 yılında İsviçre’de izole edilmiş olan (Paccaud ve Jacquier, 1970) BRSV’nin insan respiratorik sinsityal virusu (HRSV) ile antijenik benzerlik gösterdiği bildirilse de (Van Der Poel ve ark., 1994), yapısal ve antijenik olarak en çok caprine respiratorik sinsityal virus (CRSV) ile yakınlık göstermektedir (Trudel ve ark., 1989; Valarcher ve Taylor 2007).

BRSV kaynaklı enfeksiyonlarda sığırlar doğal konakçısıdır. Koyun ve keçiler de enfeksiyona duyarlıdır ve deneysel olarak enfekte edilebilmektedir. Ancak bu türlerin hastalık epidemiyolojisindeki rolleri tam olarak anlaşılamamıştır. Virus nazal sekresyonla saçılmakta ve solunum yoluyla organizmaya giriş yapmaktadır. Hassas popülasyonlarda yayılma çok hızlıdır. Çoğunlukla BVDV, BPIV-3, Pasteurella ve adenoviruslarla kombine enfeksiyonlar meydana getirmektedir. BRSV kaynaklı solunum sistemi enfeksiyonları genellikle 3-12 aylık yaştaki buzağılarda görülmesine karşın yetişkin sığırlarda da enfeksiyon oluşmaktadır (Van Vuuren, 2004).

BRSV enfeksiyonu buzağılarda burun ve gözyaşı akıntısı, yüksek ateş, hırıltılı solunum ve solunum güçlüğüyle karakterize klinik bulgularla seyretmektedir. Nekropsi bulgularında akciğerin çoğunlukla kraniyal, kraniyo-dorsal ve ventral loblarında koyu kırmızı renkli, karaciğer kıvamında (hepatize) alanlar ile birlikte kesit yüzünde ödem ve atelektazik alanlar görülür. Sekonder enfeksiyonlarla kombine olması durumunda bronş, bronşiol ve alveollerde irinli ve nekrotik bölgeler oluşabilir (Van Vuuren, 2004; Özyıldız ve ark., 2017).

Enfeksiyon teşhisi amacıyla sığır kökenli hücre hatları kullanılarak svab ve akciğer dokularından virus izolasyonu yapılabilir. Etken hücre kültüründe sinsityum, intrasitoplazmik inklüzyon cisimciği ve nekrozla karakterize sitopatolojik etki göstermektedir (Van Vuuren, 2004; Urban-Chmiel ve ark., 2014). Hücre duyarlılığını araştırmak amacıyla yapılan bir çalışmada sığır böbrek, sığır trakea ve tavuk embriyo hücre hattında virus izolasyonu çalışması yapılmış ve en duyarlı hücre hattı olarak sığır trakea hücre hattı tespit edilmiştir (Urban-Chmiel ve ark., 2014). Ancak virusun çevre şartlarına karşı çok duyarlı olması virus izolasyonu şansını azaltmaktadır. Bu nedenle svab ve akciğer dokularında immunofloresan boyama tekniğiyle antijen tespiti yapılabilir. Viral genom tespiti amacıyla reverz-transkripsiyon PCR (RT-PCR) tekniğinden yararlanılabilir (Brodersen, 2010). RT-PCR çalışmalarında

virusun genetik ve antijenik heterojenitesinden dolayı G, N ve F proteinleri, BRSV suşlarının sınıflandırılması için en kullanışlı hedef bölgeler olarak bildirilmektedir (Valarcher ve ark., 2000). One step real-time RT-PCR tekniğinin, virus izolasyonu ve immunofloresan tekniğine göre daha duyarlı olduğu tespit edilmiştir (Thonur ve ark., 2012).

BRSV enfeksiyonlarına karşı maternal antikörlerin koruyuculuğunun yetersiz olduğu bilinmektedir. Kolostrum alan ve almayan buzağuların karşılaştırılmasının yapıldığı bir çalışmada kolostrumla beslenen buzağularda lokal ve sistemik immün yanıtlarının baskılandığı ve her iki grubun akciğer lavaj sıvılarında eşit titrede BRSV varlığı tespit edilmiştir. Bu durum maternal antikör aracılığıyla koruyuculuğun çok etkili olmadığını göstermektedir (Kimman ve ark., 1987). Buna karşın deneysel olarak BRSV inokulasyonu sonrası kolostrum almamış buzağulara kıyasla kolostrum almış buzağularda, hastalık bulgularının daha hafif seyrettiğini bildiren çalışma da bulunmaktadır (Belknap ve ark., 1991).

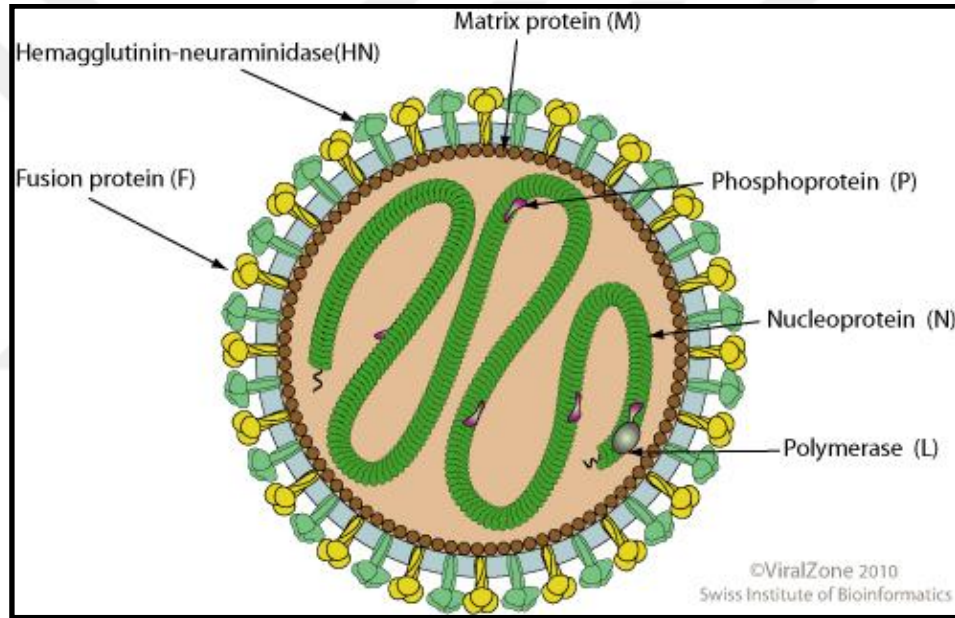
BRSV enfeksiyonlarından korunma amacıyla aşılama önerilse de, koruyuculuk düzeyleriyle ilgili farklı değerlendirmeler bulunmaktadır. Ticari olarak modifiye canlı aşılar ve inaktif BRSV içeren aşılar üretilmektedir. Yapılan çalışmalarda inaktif aşuların canlı aşılara kıyasla daha düşük antikör yanıtı oluşturduğu ve yeterli koruyuculuk sağlamadığı bildirilmektedir (Ellis ve ark., 1995; Ellis ve ark., 2001). Diğer taraftan maternal antikör almış buzağularda inaktif aşularla aşılamanın korumada etkili olduğunu bildiren çalışmalarda bulunmaktadır (Patel ve Didlick, 2004). Ayrıca modifiye canlı aşuların intranazal yolla uygulamalarıyla etkili bir korunma elde edildiği bildirilmiştir (Divers, 2007). BRSV aşuları çoğunlukla diğer viruslarla (BPIV-3, BRSV, BoHV-1) ve bakterilerle kombine aşılar şeklinde kullanılmaktadır.

## **2.2. Bovine Parainfluenza Virus-3 (BPIV-3)**

Bovine parainfluenza virus-3 etkeni *Monjiviricetes* sınıfı, *Mononegavirales* dizini, *Paramyxoviridae* ailesi, *Respirovirus* cinsinde yer almakta ve son taksonomi verilerinde bovine respirovirus-3 olarak adlandırılmaktadır (ICTV, 2018). Virion zarflı, helikal simetrik ve yaklaşık 150 nm büyüklüğünde olup morfolojik olarak

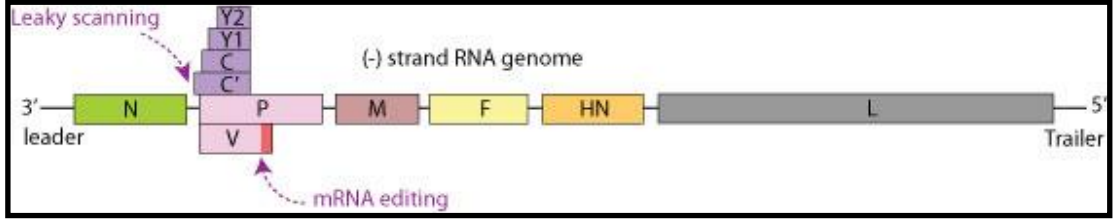


pleomorfik özellik göstermektedir (Fauquet ve Mayo, 2005). Virion üzerinde hemaglütinin-nöyraminidaz (HN) ve füzyon (F) glikoproteinlerinin oluşturduğu 8-14 nanometre (nm) uzunluğunda peplomerler bulunmaktadır (Şekil 2). Virus hemaglütinin glikoproteini aracılığıyla konak hücre yüzeyindeki siyalik asit reseptörlerine bağlanır. Nöyraminidaz aktivitesi, hücrede çoğalan yeni nesil virionların konak hücreden ayrılması sürecinde muköz membranlardaki müsin inhibitörlerinin yıkılmasında rol alır. Füzyon proteini ise virusun hücreler arasında nakledilmesi, virusun penetrasyonu, enfekte hücrelerin birleşerek dev hücre oluşumu ve koruyucu immün yanıt oluşumundan sorumludur. (Maclachlan ve Dubovi, 2017; Yeşilbağ, 2017).



Şekil 2. Respiroviruslarda virion yapısı (Viralzone, 2018).

Viral genom, negatif anlamlı tek iplikçikli yaklaşık 15 kb uzunluğunda linear RNA yapısındadır. Viral RNA 5' cap bölgesi içermez ve 3' ucunda poliadenilasyon gerçekleşmez; ancak fonksiyonel 5' ve 3' uçlarında bilgi kodlamayan bölgeler (non-coding region) bulunur. Viral genom RNA genomunu korumada rol alan nükleoprotein (N), viral genom transkripsiyonunda görev alan fosfoprotein (P) ve polimeraz proteini (L), virion stabilitesini sağlayan membran ilişkili matriks proteini (M), hücreye penetrasyon ve sinsityum oluşumunda rol alan füzyon proteini (F), adsorbsiyondan sorumlu hemaglütinin-nöyraminidaz proteini (HN) ve yapısal olmayan proteinleri (C) kodlamaktadır (Şekil 3) (Maclachlan ve Dubovi, 2017).



Şekil 3. Respiroviruslarda genom organizasyonu (Viralzone, 2018).

BPIV-3, ilk olarak 1959 yılında ABD’de ‘‘Shipping fever’’ vakası olarak yüksek ateş, öksürük, burun akıntısı, gözyaşı akıntısı ve konjunktivitis gibi klinik bulgu gösteren sığırların nazal svab örneklerinden izole edilmiştir (Ellis, 2010; Hoerlein ve ark., 1959; Reisinger ve ark., 1959). Hastalık tüm dünyada yaygın olarak görülmektedir. BPIV-3 enfeksiyonları insan, sığır, koyun, keçi, deve, kobay gibi farklı türlerde tespit edilmiştir. Etken saçılımı nazal ve oküler sekresyonlar aracılığıyla olur. Deneysel olarak enfekte edilmiş sığırlarda 8-10 gün boyunca virus saçılımının gerçekleştiği tespit edilmiştir. Duyarlı türler arasında bulaşma aerosoller veya nazal akıntıyla kontamine yemler aracılığıyla olmaktadır (Maclachlan ve Dubovi, 2017; Van Vuuren, 2004).

BPIV- 3, solunum yoluyla vücuda girdikten sonra ilk olarak trakea, bronşlar ve alveollerdeki epitel hücrelerini enfekte etmektedir. Daha sonra etken mukosilier sistemi tahrip ederek diğer enfeksiyonlar için predispozisyon yaratır. Ayrıca alveoler makrofajları enfekte ederek; bu hücrelerin bakterileri öldürme, fagozom ve lizozom füzyonunun kısıtlanmasına ve immunsupresyona neden olabilmektedir (Van Vuuren, 2004).

Hastalık sığırlarda genellikle subklinik olarak seyretse de ateş, gözyaşı akıntısı, seröz burun akıntısı, depresyon, dispne ve öksürük görülebilmektedir. Enfekte hayvanlarda akciğerin antero-ventral kısımlarının etkilenmesi sonucu bronkointerstisyel pnömoni gelişebilir. Hastalık, komplike olmadığı durumlarda 3-4 gün içinde kendiliğinden iyileşmektedir. Ancak stres durumlarında diğer viral etkenler (bovine adenovirus, bovine coronavirus, BRSV, BVDV, BoHV-1 gibi) ya da sekonder bakteriyel enfeksiyonlarla (özellikle *Mannheimia haemolytica*) kombine olabilmektedir. Bu durumda purulent burun akıntısı, öksürük, hızlı solunum, iştahsızlık, ateş, genel halsizlik ve akut fibröz bronkopnömoni kaynaklı ciddi

mortaliteyle karakterize ağır seyirli bir hastalık tablosu oluşmaktadır. Kötü hijyen, aşırı kalabalık barındırma, nakil, sert iklim koşulları gibi stres yaratan durumlar, hayvanların hastalığa karşı daha yatkın hale gelmesine neden olmaktadır (Maclachlan ve Dubovi, 2017; Taylor ve ark., 2010).

Enfeksiyon tanısı, virus izolasyonuna ilave olarak antijen, antikor ve viral nükleik asit tespiti yöntemleriyle yapılabilmektedir. Virus canlı hayvanlarda nazal svab, bronko-alveolar lavaj sıvısı, ölen hayvanlarda ise akciğer ve trakeadan izole edilebilmektedir (Van Vuuren, 2004). Etkenin çevre şartlarına aşırı duyarlı olması ve virion yapısının dondurup-çözdürme işleminde zarar görecektir hassasiyette olması virus izolasyonu şansını olumsuz etkilemektedir (Yeşilbağ, 2017). Virus izolasyonu sığır ve koyun fetal akciğer, testis ve böbrek gibi primer veya devamlı hücre kültürleri kullanılarak yapılabilir. Enfekte hücre kültürlerinde sınırsız, intrasitoplazmik inklüzyon cisimciği ve hücre tahribatıyla karakterize sitopatolojik etkiler olduğu görülmektedir. Enfekte hücrelerde tavuk, sığır yada kobay eritrositleri kullanılarak gerçekleştirilen hemadsorbsiyon testi ile viral antijen tespiti yapılabilmektedir. Viral antijen tespiti için ELISA, immunofloresan ve immunoperoksidaz yöntemlerinden de yararlanılmaktadır. Serolojik teşhis amacıyla hemagglütinasyon inhibisyon, plak redüksiyon veya virus nötralizasyon yöntemleri kullanılabilir. Etken izolasyon şansının düşük olduğu durumlarda hücre bağımlı testlere alternatif olarak viral nükleik asit tespiti için RT-PCR tekniği uygulanabilir. RT-PCR tekniğinde genellikle yapısal proteinleri kodlayan gen bölgeleri olan HN, P ya da F genine spesifik primerler tercih edilmektedir (Ellis, 2010; Van Vuuren, 2004; Vaucher ve ark., 2008).

Enfeksiyondan korunmada aşı uygulamaları yaygın olarak kullanılmaktadır. BPIV-3 için ilk aşı geliştirilmesine 1960'lı yıllarda başlanmıştır. Günümüzde BPIV-3 aşısı parenteral yolla uygulanmaktadır. Aşı uygulamalarında inaktive edilmiş virusları ve bazı bakterileri de içeren multivalan aşılar kullanılmaktadır. Parenteral aşılardan dışında intranasal canlı aşı uygulamaları da bulunmaktadır. İntranasal aşılardan alt solunum yollarında virus replikasyonunu kısıtlayacak sıcaklığa duyarlı mutantlar kullanılarak geliştirilmiştir. Her iki aşı tipinin de hem lokal hem de sistemik antikor yanıtını uyardığı gösterilmiştir. Ancak bu durum aşılama sırasındaki lokal ve

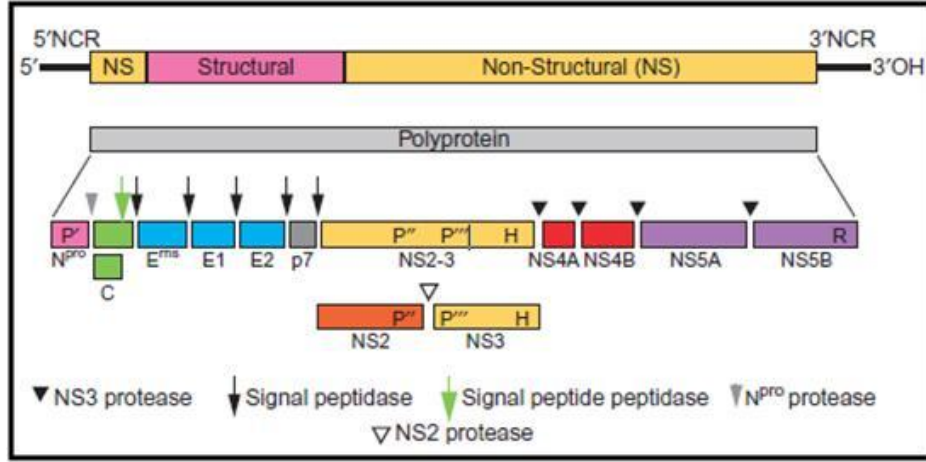
sistemik antikor konsantrasyonuna bağlı olarak değişiklik gösterebilmektedir (Ellis, 2010; Van Vuuren, 2004).

### 2.3. Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV)

*Flaviviridae* ailesi, *Pestivirus* cinsinde yer alan BVDV etkeni, son taksonomi verilerinde *Pestivirus A* ve *Pestivirus B* olarak yeniden adlandırılmıştır (ICTV, 2018). Etken zarflı, kübik simetrlili ve yaklaşık 45-60 nm boyutunda bir viriona sahiptir. Viral genom linear, pozitif polariteli, tek iplikçikli RNA yapısındadır. Yaklaşık 12,3 kb uzunluğundaki pestivirus genomu tek bir ORF (open reading frame, okuma bölgesi) içerir. ORF'den sentezlenen poliprotein, translasyon sonrası enzimatik yolla parçalanarak 11 adet proteine ayrılır. Bu proteinlerin 4 tanesi olgun virionda bulunan ve yapısal proteinler olan C, E<sup>ms</sup>, E1 ve E2'yi kapsarken; 7 tanesi yapısal olmayan P7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A ve NS5B proteinlerini içermektedir (Şekil 4) (Maclachlan ve Dubovi, 2017; Yeşilbağ, 2017). Yapısal proteinlerden biri olan E2 glikoproteini nötralizan epitoplara önemli bir bölümünü taşımaktadır. Bu nedenle enfeksiyon sonrasında nötralize edici antikorların büyük bölümü bu proteine karşı oluşur. Ancak E2 proteininde sık gerçekleşen mutasyonlar virusun antijenik yapısını değiştirmekte ve dolayısıyla sahada enfeksiyon oluşturan suşlar arasında önemli antijenik ya da serolojik farklılıkların ortaya çıkmasına neden olabilmektedir (Yeşilbağ ve Burgu, 2003). Viral genomda ORF bölgesinin 5' ve 3' uçlarında bilgi kodlamayan bölgeler (UTR) bulunmaktadır (Şekil 4). Pestiviruslar arasında iyi korunan motifler içermesi nedeniyle 5' UTR bölgesi PCR uygulamalarında primer seçimi için en çok tercih edilen bölgedir (Poole ve ark., 1995).

BVDV suşları hücre kültüründe oluşturdıkları etkiye göre sitopatojenik (cp) ve non-sitopatojenik (ncp) olmak üzere iki biyotipe ayrılmaktadır (Deregt ve Loewen, 1995). Doğada ncp biyotipler cp biyotiplere oranla daha yaygın olarak görülmektedir. Cp biyotipler daha çok mukoza hastalığı yada aşılama sonrası salgınlarda izole edilirken; ncp biyotipler persiste enfeksiyon gelişimden de sorumludur (Fulton ve ark., 2000a; Fulton ve ark., 2005a; Ridpath, 2005). Yapısal olmayan proteinlerden NS2 ve NS3 proteinleri, cp ve ncp BVDV biyotipleri arasında farklılık göstermektedir. Ncp BVDV suşlarında NS2/3 (p125) öncü proteini halinde

bir bütün olarak bulunurken; cp BVDV suşlarında NS2 (p54) ve NS3 (p80) olarak ikiye ayrılmıştır (Donis ve Dubovi, 1987; Potgieter, 2004).



Şekil 4. Pestiviruslarda genom organizasyonu (Maclachlan ve Dubovi, 2017).

Virus viral genom dizininde 5'UTR bölgesinin sekans analizleri temeline dayanarak BVDV-1 ve BVDV-2 olmak üzere iki genotipe ayrılmış (Pellerin ve ark., 1994; Ridpath ve ark., 1994) daha sonra yapılan filogenetik analizler sonucunda farklılıkların yalnızca 5'UTR bölgesinde değil, tüm genomda da görülebileceği bildirilmiştir (Ridpath ve Bolin, 1995). Bu genotipler ilerleyen dönemde ayrı birer virus türü olarak (Pestivirus A ve Pestivirus B) klasifiye edilmiştir (ICTV, 2018). Bugüne kadar BVDV-1'in 21 adet (1a-1u), BVDV-2'nin 4 adet (2a-2d) alt genotipi olduğu tespit edilmiştir (Yeşilbağ ve ark., 2017). Solunum sistemi enfeksiyonlarında her iki türünde varlığı bildirilmiştir (Deregt, 2005). Yapılan deneysel bir çalışmada BVDV-1d'nin buzağılarda primer olarak solunum sistemi enfeksiyonu başlattığı belirlense de (Baule ve ark., 2001), BVDV-1b'nin solunum sistemi ilişkili enfeksiyonlarda daha baskın olduğu bildirilmiştir (Fulton ve ark., 2002).

BVDV ilk olarak 1946 yılında sığırların yeni bir bulaşıcı hastalığı olarak tespit edilmiştir (Olafson, 1946). Daha sonra 1957 yılında hücre kültüründe ilk kez izolasyonu yapılmış (Lee ve Gillespie, 1957) ve lökopeni, yüksek ateş, depresyon, ishal, gastrointestinal lezyonlar ve hemoraji ile karakterize bir enfeksiyon şekillendirmesi nedeniyle "Viral Diarrhea Virus" ismini almıştır (Childs, 1946; Goens, 2002). Gebe olmayan hayvanlardaki akut seyirli olgularda ateş, diyare, ağız ve mermede ülserler, burun ve gözyaşı akıntısı, öksürük, süt veriminde düşme ve

abart ile karakterizedir (Moerman ve ark., 1994). BVDV'nin solunum sistemi enfeksiyonlarında etkin olarak rol aldığı deneysel enfeksiyonlar, virus izolasyonu, antijen tespit ve PCR teknikleriyle ortaya konmuştur (Baker, 1995 Fulton ve ark., 2000b; Fulton ve ark., 2002; Pellerin ve ark., 1994). BVDV'nin solunum sistemi enfeksiyonuna neden olduğu durumlarda solunum sistemi enfeksiyonu klinik bulgularına ek olarak, fibrinöz pleuropnömoni, interstiyel pnömoni, alveolar epitellerde nekroz ve hemoraji gibi patolojik bulgular görülmektedir (Potgieter, 2004; Potgieter, 1997). Gebe hayvanların enfeksiyonu sonucunda transplasental yolla fetusa bulaşma şekillenebilmektedir. Gebe ineklerde fötusun yaşına ve virusun biyotipine bağlı olarak persiste enfekte yavru doğumları, anomalili yavru doğumları ve abortlar oluşabilmektedir (Maclachlan ve Dubovi, 2017). Persiste enfekte hayvanlar sürekli virus saçıcısı olarak sürü içerisinde önemli bir enfeksiyon kaynağı rolü oynamaktadır (Deregt, 2005). BVDV, doğal konakçısı olan sığırlar dışında koyun, keçi, domuz, devegiller ve vahşi çift tırnaklı hayvanlarda da enfeksiyon oluşturabilmektedir (Passler ve Walz, 2010; Yeşilbağ ve Güngör, 2009). Duyarlı hayvanlar arasında virus bulaşması direkt temasla, tüm sekret ve ekskretlerle ve konjenital yolla olabilmektedir (Thurmond, 2005).

BVDV enfeksiyonlarında, Fc ve komplement reseptörlerinin üretiminin azalması ve alveolar makrofajların fagositoz aktivitesini olumsuz etkilemesine bağlı olarak immun sistem baskılanır (Chase ve ark., 2004). Bu durum, BVDV'nin diğer solunum sistemi viruslarıyla sinerji göstermesine, diğer virusların patojenitesinde artışa ve dolayısıyla enfeksiyon şiddetinin de artmasına neden olmaktadır (Elvander ve ark., 1998; Hay ve ark., 2016; Richer, 1988).

BVDV tanısında virus izolasyonu, viral antijenlerin tespiti, nükleik asit tespiti, immunoperoksidaz veya immunofloresan teknikleri ve serolojik testlerden yararlanılabilir (Edmondson ve ark., 2007; Houe ve ark., 2006). Virus izolasyonu amacıyla duyarlı hücre kültürlerine inokulasyonu takiben cp suşlar hücrelerde vakuolizasyon ve sitolizis gibi değişikliklere sebep olurken, ncp suşlarda hücre bütünlüğü korunmaktadır (Lee ve Gillespie, 1957). Bu nedenle virus izolasyonu sırasında ncp biyotiplerin tespiti amacıyla immunoperoksidaz veya immunofloresan gibi testlere ihtiyaç duyulmaktadır (Edmondson ve ark., 2007; Houe ve ark., 2006).

Söz konusu testlerde akut enfeksiyon ve persiste enfekte hayvanların ayrımının yapılması söz konusu değildir. Persiste enfekte hayvanların ayırt edilebilmesi için yaklaşık üç hafta arayla alınan örneklerin virolojik olarak pozitif tespit edilmesi gerekmektedir (Larson ve ark., 2005).

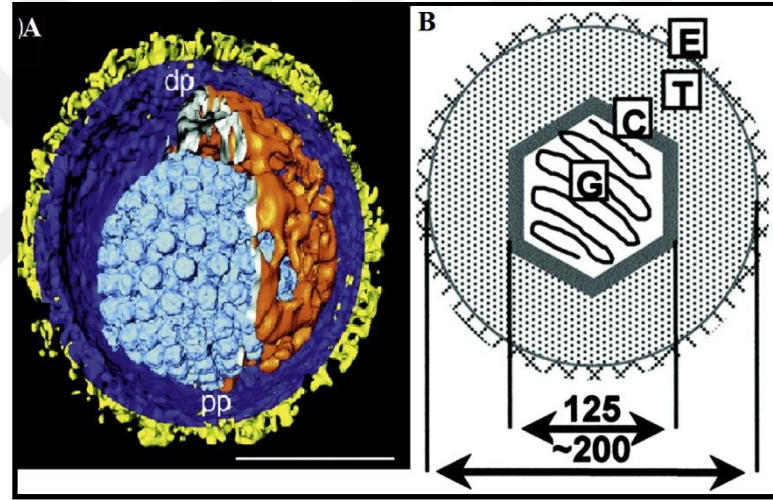
BVDV'ye yönelik kontrol programlarında (i) persiste enfekte hayvanların tespit edilmesi ve sürüden uzaklaştırılması, (ii) doğru virus suşunun seçimiyle enfekte sürülerde aşı uygulamaları ve (iii) biyogüvenlik kurallarına uyulması olmak üzere üç temel unsur bulunmaktadır. Aşı uygulamaları tek başına etkenin kontrol altına alınmasını sağlayamaz; ancak virusun yayılımını sınırlandırabilmektedir (Dubovi, 2013). Aşılama için modifiye canlı veya inaktif virus içeren ticari aşılar bulunmaktadır. Bu aşıların birçoğu BVDV-1 genotiplerine karşı geliştirilmiş olsa da hem BVDV-1 hem de BVDV-2 genotiplerini içeren aşılar da mevcuttur (Fulton, 2005)

#### **2.4. Bovine Herpesvirus-1 (BoHV-1)**

ABD'de sığır yetiştiriciliğinin 1950'lerde hızla yaygınlaşması, rinotrakeitis ile seyreden BoHV-1'in de izole edildiği birçok yeni hastalığın ortaya çıkmasına neden olmuştur (Maclachlan ve Dubovi, 2017).

İnfeksiyöz bovine rinotrakeitis (IBR) enfeksiyonuna neden olan BoHV-1 etkeni *Herpesvirales* dizini, *Herpesviridae* ailesi, *Alphaherpesvirinae* alt ailesi, *Varicellovirus* cinsinde yer almaktadır. Son taksonomi verilerine göre bovine alphaherpesvirus-1 olarak adlandırılmaktadır (ICTV, 2018). Virion yaklaşık 150 nm boyutunda, zarflı, kübik simetrik ve pleomorfik yapıya sahiptir. Virion yapısı içten dışa doğru sırasıyla viral genomu içine alan kor bölgesi, kapsid tegument ve zarf yapılarından oluşur (Şekil 5). Yaklaşık 125 nm boyutunda olan nükleokapsid toplam 162 adet kapsomerden oluşmaktadır (Maclachlan ve Dubovi, 2017; Yeşilbağ, 2017). Viral genom linear ds-DNA formundadır. Herpesviruslarda genom uzunluğu 125-290 kb arasında değişmekle birlikte BoHV-1 genomu yaklaşık 135 kb uzunluğunda ve %72 G+C oranına sahiptir. Viral genom, en az 76 ORF bölgesine sahiptir (Maclachlan ve Dubovi, 2017; Studdert, 2010). Herpesvirus virionları yaklaşık 70 adet protein içermektedir. Bunların 33 tanesi yapısal proteinler olup, iki tanesi DNA

ilişkiliyken, altı tanesi nükleokapsid üzerinde bulunur (Barber ve ark., 2017; Maclachlan ve Dubovi, 2017; Yeşilbağ, 2017; Schwyzer ve Ackermann, 1996). Zarf üzerinde bulunan toplam 10 adet glikoproteinden 6 tanesi UL (unique long) segmentinde [gB (UL27), gC (UL44), gH (UL22), gK (UL53), gL (UL1) ve gM (UL10)]; 4 tanesi ise US (unique short) segmentinde [(gD (US6), gE (US8), gG (US4) ve gI (US7))] yer alır (Muylkens ve ark., 2007). Glikoprotein C (gC) heparan sülfat reseptörlerine tutunarak virusun hücreye bağlanmasında görev alır. Ayrıca C3b komplement faktörüne bağlandığı da gösterilmiştir. Virusun hücreden hücreye yayılmasında rol alan gE ve gI glikoproteinleri, aynı zamanda Fc reseptörlerinin bağlanma bölgelerine de sahip olup, IgG molekülünün bağlanmasına uygundur (Schwyzer ve Ackermann, 1996).



**Şekil 5.** Herpesvirus morfolojisi. **A:** Virionun kesit görüntüsü (Sarı: glikoprotein peplomerleri; Mavi: zarf; Turuncu: tegument; Açık mavi: kapsid); **B:** Virion yapısının şematize gösterimi (G: genom; C: kapsid; T: tegument; E: zarf) (Maclachlan ve Dubovi, 2017).

Etken, viral peptid modelleri ve genomik analizler temel alınarak BoHV-1.1, BoHV-1.2a ve BoHV-1.2b olmak üzere üç alt gruba ayrılmıştır (Muylkens ve ark., 2007). Nöropatolojik bozukluklara neden olan ve daha önceden BoHV-1.3 olarak adlandırılan alt grup, günümüzde BoHV-5 olarak yeniden adlandırılmıştır (Edwards ve ark., 1990; Schudel ve ark., 1986). BoHV-1.1 çoğunlukla solunum sistemi enfeksiyonlarıyla ilişkili iken, BoHV-1.2 genital sistem enfeksiyonlarıyla ilişkili bulunmuştur (Muylkens ve ark., 2007). BoHV-1.1 ve BoHV-1.2 alt tipleri gC epitoplarında farklılıklar içermektedir (Rijsewijk ve ark., 1999). BoHV-1.1 ve BoHV-1.2a ateş, süt veriminde düşüş ve abortla seyreden IBR enfeksiyonuna neden



olur (Edwards ve ark.,1990; Miller ve ark., 1991). BoHV-1.2b izolatlarının virülensinin BoHV-1.1 izolatlarından daha düşük olduğu bildirilmiştir. Ayrıca BoHV-1.2b izolatları bugüne kadar abort olgularında tespit edilememiştir (Nandi ve ark., 2009).

BoHV-1 sığırlarda rinotrakeitis, konjunktivitis, vulvovaginitis, balanopostitis, enteritis, abortus, ensefalitis ve yeni doğanlarda multisistemik hastalık gibi birçok bozukluğa neden olmaktadır (Nandi ve ark., 2009). BoHV-1 kaynaklı IBR enfeksiyonlarında bulaşma damlacık enfeksiyonu ve direkt temas yoluyla oluşmaktadır. IBR enfeksiyonları subklinik, hafif veya şiddetli hastalık tabloları oluşturabilmektedir. Morbidite %100'e, mortalite % 10'a kadar ulaşabilmektedir. Hafif seyirli vakalarda klinik bulgular seröz burun ve gözyaşı akıntısı ile sınırlı kalabilir. Klasik IBR enfeksiyonu, ateş (40,5-42,0°C), dispne, halsizlik, artan solunum sayısı, şiddetli kuru öksürük, depresyon ve süt veriminde azalma ile karakterizedir. Burun akıntısı başlangıçta seröz daha sonra muko-purulent karakterdedir. Burun mukozası hiperemiktir ve geniş hemorajiden pustüler nekrozise doğru ilerleyen lezyonlar görülür (Murphy ve ark., 1999). BoHV-1 ile enfekte hayvanlarda BRSV, BPIV-3, BVDV ve adenovirus enfeksiyonları da eş zamanlı olarak görülebilir. Söz konusu virusların birlikte bulunması sekonder bakteriyel enfeksiyonların oluşması için anahtar görevi görerek klinik bulguların şiddetinin artmasına neden olmaktadır (Babiuk ve ark., 2004). Neonatal buzağılardaki enfeksiyonlarda klinik bulgular buzağının maternal antikor seviyesiyle ilişkilidir. Herhangi bir immuniteye sahip olmayan buzağılarda virus, tüm vücuda yayılarak ölüme sebep olabilir (Mechor ve ark., 1987).

BoHV-1, akut enfeksiyonu takiben trigeminal ganglionun duyuşal nöronlarına ve farengeal tonsillerin germinal merkezlerine yerleşerek latent enfeksiyon oluşturur. Latent enfeksiyon stres koşullarında reaktif olur ve virus vücut dışına saçılarak bulaşmaya öncülük eder. Latent enfeksiyonun reaktivasyon süreci, enfekte nöronlarda çok miktarda eksprese olan latentlikle ilişkili (LR) protein tarafından yönetilmektedir. Latent enfeksiyonun reaktivasyonunu takiben virusun duyuşal nöronlardan periferel sinirler yoluyla mukozal yüzeylere aktarımı ve

permisiv hücrelere girişi ise farklı birkaç viral glikoprotein tarafından düzenlenmektedir (Jones ve Chowdhury, 2010).

BoHV-1, konakçının bağışıklık sisteminin spesifik noktalarını inhibe edebilen en az 3 adet protein (UL49.5 protein, bICP0 ve glikoprotein G) kodlamaktadır. Ayrıca CD4<sup>+</sup> T hücrelerini enfekte ederek bu hücrelerde apoptozisi hızlandırmaktadır. Bu etki immun sistemin baskılanmasına neden olmaktadır (Jones ve Chowdhury, 2010).

BoHV-1'in teşhisinde direkt olarak etken tespiti veya virusla enfekte konakçıda antikor tespiti olmak üzere iki temel yol izlenmektedir. Virus izolasyonu amacıyla primer ya da sekonder sığır böbrek, akciğer, testis, türbinata ya da trakea hücre hatları kullanılabilir. Virus svab örnekleri (burun, göz, vaginal), abort olgularında kotiledonlar, fetal karaciğer, akciğer, böbrek, dalak ve solunum sistemi mukozal membranlarından izole edilebilir (Homan ve Easterday, 1980). Duyarlı hücre kültürlerinde yapılan ekimlerde virus üremesine bağlı sitopatolojik etkiler görülmektedir. İnokulasyondan sonraki yaklaşık 3 gün içinde hücrelerde üzüm salkımı benzeri sitopatolojik etkiler görülürken, inkübasyon süresinin uzaması durumunda virus sitolitik etki gösterebilir (Straub, 1990; Turin ve Russo, 2003). PCR, diagnostik çalışmalarda virus izolasyonundan daha hassas sonuç verir ve virusun hızlı tespiti için pratik bir alternatiftir. Yapılan deneysel bir çalışmada BoHV-1'in PCR yöntemiyle serum ve sperma örneklerinde saptanabilmesinin yanı sıra inokulasyon sonrasındaki 14 güne kadar burun svablarında da tespit edilebildiği bildirilmiştir (Fuchs ve ark., 1999). Virusun erken teşhisinde elektron mikroskopi yöntemi de kullanılabilir (Gibbs ve Rweyemamu, 1977). Virus nötralizasyon (VNT) ve antikor-ELISA BoHV-1'e karşı oluşan antikorların tespitinde güvenle kullanılan yöntemlerdir. Spesifik, duyarlı ve pratik olması nedeniyle ELISA'nın VNT'ye göre avantajlı olduğu düşünülmektedir (Kaashoek ve ark., 1995; Van Oirschot ve ark., 1997). Deneysel enfeksiyonlarda sığırlara virus inokulasyonu sonrası yaklaşık 7. günde BoHV-1'e karşı primer olarak özgün IgM ve IgG antikorları gelişmektedir (Nandi ve ark., 2009).

BoHV-1 enfeksiyonuna karşı sığırlarda modifiye canlı aşılar, inaktif aşılar, subünit aşılar veya marker aşılar kullanılmaktadır. Söz konusu aşılar arasında bir veya daha fazla virus proteininin değiştirildiği ve aşılı hayvanların enfekte hayvanlardan ayırımının yapılmasına olanak veren marker aşılar hastalıkla mücadelede ve BoHV-1'den arı sürülerin oluşturulmasında güvenle kullanılmaktadır (Nandi ve ark., 2009).



### **3. GEREÇ ve YÖNTEM**

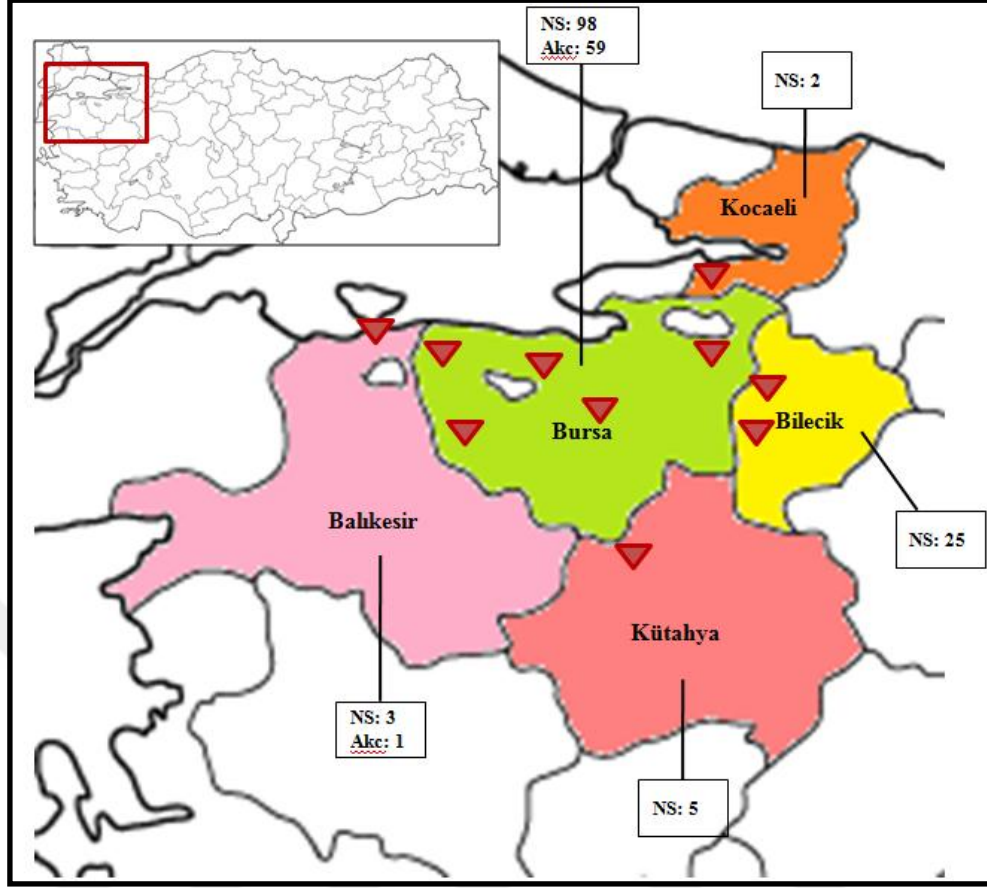
#### **3.1. Gereç**

##### **3.1.1. Örneklenen Hayvanlar**

Çalışma kapsamında Bursa ve çevre illerde (Balıkesir, Kütahya, Bilecik, Kocaeli) bulunan farklı yetiştirme koşullarına sahip işletmelerde öksürük, hırıltılı solunum, artmış akciğer oskültasyon sesi, göz ve burun akıntısı, yüksek ateş gibi solunum sistemi bulguları gösteren sığırlardan elde edilen örnekler kullanıldı (Şekil 6). Solunum sistemi virusları yönünden analiz edilmek üzere canlı sığırlardan nazal svab, ölen ya da kesime sevk edilen sığırlarından akciğer doku örnekleri değerlendirildi. Bu kapsamda Ocak 2011 tarihinden itibaren Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı'na gönderilen nazal svab ve akciğer örnekleri kullanılırken, ayrıca saha çalışması yapılarak kesime gönderilmiş ve pnömoni şikayeti olan hayvanlar belirlenerek lezyonlu akciğerlerinden örnekler alındı. Çalışma kapsamındaki hayvanlara ve örnek sayılarına ait bilgiler Tablo 1'de sunulmuştur.

##### **3.1.2. Nazal Svab Örnekleri**

Klinik olarak solunum sistemi problemlili sığırlardan elde edilen ve steril svab çubuğu yardımıyla toplanan nazal svab örnekleri soğuk zincir altında laboratuvara ulaştırılmıştır. Toplam 133 adet nazal svab örneği solunum sistemi virusları yönünden test edilmek üzere değerlendirildi. Nazal svab örnekleri "ET" kodu verilerek kayıt altına alındı.



**Şekil 6.** Örneklemeye yapılan iller (Kırmızı üçgenler örneklerin orijin aldığı işletmelerin konumunu göstermektedir).

**Akc:** Akciğer doku örneklerinin sayısı; **NS:** Nazal svab örneklerinin sayısı

### 3.1.3. Akciğer Örnekleri

Klinik olarak solunum sistemi problemi göstererek ölen sığır ve buzağılardan elde edilen ve rutin analiz için Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı'na gönderilen toplamda 11 adet akciğer doku örneği tez çalışması kapsamında kullanıldı. Ayrıca mezbaha çalışmaları yürütülerek Bursa ili Yıldırım ilçesinde bulunan mezbahada kesilen ve pnömoni şikayeti olan toplam 10 adet sığırın lezyonlu akciğerlerinden yaklaşık 5-10 cm<sup>3</sup> büyüklüğünde doku örnekleri alındı.

Mevcut örneklere ilave olarak daha önce başka bir tez çalışması (Tuncer, 2013) için örneklenen ve yalnızca BVDV ve BoHV-1 yönünden virolojik incelemeleri yapılmış olan 39 adet akciğer doku örneği de solunum sistemi virusları yönünden kapsamlı olarak incelenmek üzere tez çalışmasına dahil edildi.

Genel olarak değerlendirildiğinde toplam 60 adet akciğer doku örneği solunum sistemi virusları yönünden test edilmek üzere değerlendirildi. Kullanılan akciğer örnekleri “DO” kodu verilerek kayıt altına alındı.

**Tablo 1.** Değerlendirilen örneklere ilişkin veriler

İl/ İlçe	Nazal Svab Örnekleri		Akciğer Örnekleri	
	Örnek sayısı	Hayvanların Yaş Aralığı	Örnek sayısı	Hayvanların Yaş Aralığı
Bursa / Nilüfer	13	2 – 6 yaş	38 <sup>a</sup>	*
Bursa / Yenişehir	73	1 ay – 6 yaş	5	10 gün – 6 ay
Bursa / Yıldırım	-	-	10	12 – 17 ay
Bursa / Mustafakemalpaşa	-	-	1 <sup>a</sup>	*
Bursa / Karacabey	12	1 – 6 ay	5	1 ay – 2 yaş
Balıkesir/ Bandırma	3	8 ay	1	8 ay
Kütahya / Tavşanlı	5	4 – 5 yaş	-	-
Bilecik/ Merkez	17	1 – 3 yaş	-	-
Bilecik/ Pazaryeri	8	1 ay – 2 yaş	-	-
Kocaeli/ Karamürsel	2	1 – 3 ay	-	-
<b>TOPLAM</b>	<b>133</b>		<b>60</b>	

**a:** Anabilim dalında bulunan ve daha önce yalnızca BVDV ve BoHV-1 yönünden virolojik taraması yapılmış akciğer örnekleri (Tuncer, 2013).

(-): Örnek alınmamış ilçeler.

\*: Veri sağlanamadı.

### 3.1.4. Etik Kurul İzin Belgesi

Bu tez çalışması için gerekli olan etik kurul izni, Bursa Uludağ Üniversitesi Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulu (HADYEEK) tarafından 05.04.2016 tarihli ve 2016-05/03 nolu karar ile onaylanmıştır.

### 3.1.5. Hücre Kültürü

Çalışma kapsamında kullanılacak olan kontrol viruslarının üretilmesi, çalışma süresince elde edilecek örneklerde virus izolasyonu ve immunoperoksidaz testi aşamalarında Justus-Liebig Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Enstitüsü’nden daha önce temin edilmiş olan Madin Darby Bovine Kidney (MDBK) hücre hattı kullanıldı. MDBK hücre kültürlerinin hazırlama aşamasında %10 fetal dana serumu (FDS) (PAA, A11-151, Avusturya) ilave edilen Dulbecco’s Modified Eagle’s

Medium (DMEM) (Sigma, D7777, ABD) kullanıldı. Ayrıca hücre kültürlerinde olası bakteri ve mantar kontaminasyonunu önlemek amacıyla 100 UI/ml Penisilin/Streptomisin (PAA, p11-010, Avusturya) ve 250 µl/ml Amfoterisin B solüsyonu (PAA, p11-001, Avusturya) eklendi.

Hücre kültürü ve FDS kullanım öncesinde RT-PCR ve immunoperoksidaz yöntemleriyle test edilerek pestivirus kontaminasyonundan arı olduğu gösterildi. Ayrıca söz konusu hücre kültürü mikoplazma kontaminasyonu yönünden periyodik olarak test edildi.

### **3.1.6. Testlerde Kullanılan Kontrol Virusları**

Çalışma kapsamındaki immunoperoksidaz testi ve PCR tekniğinde pozitif kontrol virüsü olarak kullanılan BRSV-Atue suşu, BPIV-3 SF-4 suşu, BVDV-NADL referans suşu, BVDV-FLK (FLK hücre hattı kontaminantı olarak izole edilen bir ncp BVDV suşu), BVDV-TR 12 (yerel ncp BVDV suşu) ve BoHV-1 Cooper suşu Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı virus koleksiyonundan temin edildi.

### **3.1.7. Eritrosit Süspansiyonu**

Hemadsorbsiyon testinde kullanılmak üzere %0,5'lik sığır eritrositi süspansiyonu hazırlandı. Bu amaçla antikoagülanlı tüplere alınan sığır kan örneği santrifüj edilerek eritrosit katmanı alınıp steril PBS ile 3 defa yıkama işlemi uygulandı. Elde edilen sığır eritrositlerinin pıhtılaşmasını önlemek ve uzun süre muhafaza edebilmek için Alsever's solüsyonu içinde nihai kullanım konsantrasyonu hazırlandı.

### **3.1.8. Alsever's Solüsyonu**

Alsever's solüsyonu hazırlamak için 100 ml distile su içine 0,055 g sitrik asit (Carlo Erba Reagent, 403727, İtalya), 0,8 g sodyum sitrat (Merck, 1.06448.1000, ABD), 2,05 g D-glikoz (Merck, 1.08337.0250, ABD) ve 0,42 g sodyum klorid (Merck, 1.06404.1000, ABD) eklenerek manyetik karıştırıcıda (Velp Scientifica,

ZX3, İtalya) çözdürüldü. Daha sonra solüsyon 116 °C'de 15 dakika otoklavlandı, oda sıcaklığına soğutulduktan sonra kullanım zamanına kadar 2-8°C'de saklandı.

### **3.1.9. Monoklonal Antikor**

Elde edilen nazal svab ve akciğer doku örneklerinde 3 kör pasaj işlemini takiben non-sitopatojenik pestivirus tespiti amacıyla uygulanan immunoperoksidaz testinde kullanılmak üzere, Justus-Liebig Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Enstitüsü'nden daha önce temin edilmiş olan, panpestivirus spesifik monoklonal antikor süspansiyonu (pool 1/4/7) kullanıldı (Cedillio-Rosales, 2004).

### **3.1.10. Konjugatlar**

İmmunoperoksidaz testinde (IPMA) 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 bağlanmasını gösterebilmek amacıyla streptavidin-horse radish peroksidaz (HRPO) konjugatı (ikincil konjugat) (Pierce, 21124, ABD) kullanıldı. Her iki konjugat da ticari olarak temin edildi.

### **3.1.11. Antijen-ELISA Kitleri**

Klinik ve nekropsi materyallerinden hazırlanan nazal svab ve akciğer doku örneklerinde viral antijen tespiti amacıyla Pestivirus (IDEXX, 99-43810, İsviçre) ve BoHV-1 (Biox Diagnostics, BioK 335/1, Belçika) tespitine yönelik ticari antijen ELISA kitleri kullanıldı.

### **3.1.12. Nükleik Asit Ekstraksiyon Kiti**

Tüm örneklerde nükleik asit ekstraksiyonu amacıyla 100 bp-50 kbp fragment boyutları arasındaki viral RNA ve DNA'nın ekstraksiyonuna olanak sağlayan ticari bir nükleik asit izolasyon kiti (Macherey-Nagel Nucleospin Virus, Almanya) kullanıldı.



### **3.1.13. Komplementer DNA (cDNA) Sentez Kiti**

Nükleik asit ekstraksiyonu yapılan tüm örneklerde, tez kapsamında ele alınan RNA viruslarının (BRSV, BPIV-3 ve BVDV) PCR metodu ile moleküler teşhislerinin yapılabilmesi amacıyla cDNA sentezi gerçekleştirildi. Bu amaçla ticari olarak temin edilen bir cDNA sentez kiti (Biorad iScript cDNA synthesis kit, 170-8891, ABD) kullanıldı.

### **3.1.14. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Bileşenleri**

Çalışma süresince uygulanan PCR metodu için hazırlanan ana karışım (master mix) içeriği, nükleaz ari su (Wisent, 809-115-EL, Kanada), MgCl<sub>2</sub> (25 Mm, Thermo scientific, ABD), MgSO<sub>4</sub> (25 Mm, abm, Kanada) 10xPCR buffer (Thermo scientific, ABD), dNTPs (10Mm, NEB, N0447S, ABD), Taq DNA polimeraz (5U/μl, abm, G009, Kanada), primerler ve cDNA/DNA karışımından oluşmaktadır. Ayrıca primerlerin optimizasyonu sırasında ticari olarak kullanıma hazır Maxima Hot Start Green PCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific, K1062, ABD)'den yararlanıldı.

## **3.2. Yöntem**

### **3.2.1. Nazal Svab Örneklerinin Hazırlanması**

Toplanan nazal svab örnekleri 2 ml steril phosphate buffered saline (PBS) ya da fizyolojik tuzlu su (FTS) içeren tüplere konularak soğuk zincir altında laboratuvara gönderilmiştir. Svab örnekleri tüp çalkalayıcıda (vorteks) karıştırıldıktan sonra soğutmalı santrifüjde (Nüve, NF 800R, Türkiye) +4°C'de, 3000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi. Süpernatant alınarak 220 nm filtreden (Aisimo, İngiltere) geçirilip stok tüpü içine ayrıldı. Ele alınan bazı solunum viruslarının (BRSV, BPIV-3) dondurup-çözdürme işlemine dayanıksız olması nedeniyle %10 oranında dimetilsülfoksit (DMSO) eklenen örnekler test aşamasına kadar -80°C sıcaklıktaki derin dondurucuda (Panasonic, MDF-US386S, Japonya) muhafaza edildi.

### 3.2.2. Akciğer Doku Örneklerinin Hazırlanması

Soğuk zincir altında laboratuvara ulaştırılmış olan akciğer örneklerinin lezyonlu bölgelerinden alınan 1 gram doku materyali 9 ml steril PBS içerisinde homojenizatörde (Sartorius, Potter S, Almanya) homojenize edildi. Hazırlanan homojenat +4°C'de, 3000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi. Süpernatant ayrılarak 220 nm filtreden geçirilip stok tüpüne aktarıldı. Üzerine %10 (v/v) DMSO eklenerek test aşamasına kadar -80°C sıcaklıktaki derin dondurucuda muhafaza edildi.

### 3.2.3. Kontrol Viruslarının Üretimi

IPMA ve PCR yöntemlerinde kullanılacak kontrol viruslarının üretimi 150 cm<sup>2</sup>'lik tek kullanımlık hücre kültür şişelerinde (Orange scientific, Belçika) adsorbsiyona bağlı yöntem kullanılarak yapıldı. Bu amaçla kültür şişesine 100.000 hücre/ml oranında olacak şekilde MDBK hücre kültürü hazırlandı. Monolayer olarak üreyen hücre, ertesi gün kültür şişesinin %70-80'ini kapladığı düzeydeyken vasatı boşaltıldı ve hücreler steril PBS ile yıkandı. Daha sonra şişe hacminin %1'i oranında virus ekildi. Kültürler 37°C'ye ayarlı ve %5 CO<sub>2</sub> ihtiva eden inkübatöre (Jouan, TGO 150, Fransa) kaldırıldı. Kültür şişeleri her 15 dakikada bir hareket ettirilerek inokulumun yayılması sağlandı ve toplamda bir saat boyunca bekletildi. Süre sonunda inokulum uzaklaştırılarak 35 ml vasat (DMEM) ilave edilip inkübatöre kaldırıldı. Virus üremesine bağlı oluşan sitopatolojik etkiler günlük olarak invert ışık mikroskobu (Nikon Eclipse, TS100, Japonya) aracılığıyla takip edildi. Monolayer hücrede gözlenen sitopatolojik etki >%70-80 düzeyine ulaştığında kültürler -80°C sıcaklıktaki derin dondurucuda dondurulup, takiben 37°C'ye ayarlanmış su banyosunda çözdürülerek parçalanmış hücrelerden virus partikülleri açığa çıkarıldı. Elde edilen kültür sıvısına +4°C'de, 3000 rpm'de 20 dakika santrifüjleme işlemi uygulandı ve süpernatant stok tüplerine (LP Italiana, İtalya) porsiyonlanarak -80°C sıcaklıktaki derin dondurucuda muhafaza edildi.

### **3.2.4. Konvansiyonel Virolojik Yöntemler**

#### **3.2.4.1. Virus İzolasyonu**

Virus izolasyonu çalışmaları Yeşilbağ ve ark. (2014) tarafından belirtilen şekilde yapıldı. Bu amaçla 24 gözlü hücre kültür pleytlerinin (Corning, ABD) her gözüne 100.000 hücre/ml oranında olacak şekilde MDBK hücre kültürü süspansiyonundan 1 ml konuldu. Ertesi gün pleyt yüzeyinin >%80'ini kaplayan hücre tabakasının üzerindeki üst sıvı uzaklaştırıldı ve adsorbsiyona bağlı virus ekimi yöntemiyle svab ve akciğer örnekleri ekildi. Bu amaçla her örnekten pleytin bir gözüne 200 µl süpernatant ekilerek 37°C'deki %5 CO<sub>2</sub> ihtiva eden inkübatörde bir saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda içerik uzaklaştırılarak 1 ml DMEM ilave edildi ve tekrar 37°C'deki %5 CO<sub>2</sub> ihtiva eden inkübatöre kaldırıldı. Gözlerdeki üst sıvı 24 saat sonra değiştirildi ve pleytler 7 gün boyunca hücrelerdeki sitopatolojik değişimleri saptayabilmek için invert mikroskop (Nikon, TS100) yardımıyla incelendi. Yedi günün sonunda pleytler -80°C'ye kaldırılarak donduruldu ve daha sonra 37°C'de çözündürüldü. Söz konusu işlem ekim için üst sıvıların kullanılması yoluyla iki defa daha tekrarlanarak toplamda üç kör pasaj yapıldı. Ayrıca 3. kör pasaj sonunda immunoperoksidaz testi uygulanarak muhtemel non-sitopatojenik BVDV suşlarının tespitine yönelik izolasyon çalışması sonuçlandırıldı.

#### **3.2.4.2. İmmunoperoksidaz Testi (İmmunoperoksidaz Monolayer Assay, IPMA)**

İzolasyon çalışmalarında, muhtemel non-sitopatojen pestivirus suşlarının tespit edilebilmesi amacıyla immunoperoksidaz testi kullanıldı. Test protokolü, Alpay ve Yeşilbağ (2015) tarafından bildirilen şekilde uygulandı. Bu doğrultuda, 100.000 hücre/ml olacak şekilde 24 gözlü pleytte hazırlanan MDBK hücre kültürüne ertesi gün 3. kör pasaj üst sıvılarından 200 µl ekim yapıldı. 37°C'de %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde 72 saat inkübasyonu takiben vasat uzaklaştırıldı. Hücreler, 80°C'ye ayarlanmış inkübatörde üç saat bekletilerek fikzasyonu gerçekleştirildi. Hücrelerin 1:3'lük PBS ile yıkanma işleminden sonra tüm gözlere 200 µl O-D-glikopyranosid (Sigma, 03757, ABD) eklendi ve pleytler 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra Tween-PBS (Tween 20, %0,05) içinde sulandırılan sırasıyla anti-pestivirus monoklonal antikoru (1:50), birincil konjugat (1:400) ve ikincil konjugat (1:300) tüm

gözlere 200 µl miktarında eklendi. Her bir basamak arasında pleytler 90 dakika 37°C’de inkübe edildikten sonra dört defa yıkandı. Son basamakta 0,3 ml di-methyl-formamid (DMF, Sigma-Aldrich, 40255, ABD) içine 2 mg AEC (Sigma, A5754, ABD) çözdürülmesi ve 4,7 ml sodyum asetat (pH 5.0) ile 0,025 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (%0.05) eklenmesi ile hazırlanan substrat çözeltisinden her göze 200 µl miktarında eklendi. Pleytler 30 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra reaksiyonu durdurmak için substrat uzaklaştırdı ve tüm gözlere PBS konuldu. İnvirt mikroskop altında yapılan incelemede hücre içi kırmızı-kahverengi boyanma tespit edilen test gözleri non-sitopatojen pestivirus yönünden pozitif olarak değerlendirildi.

#### **3.2.4.3. Hemadsorbsiyon (HAd) Testi**

Virus üremesi yönünden pozitif veya şüpheli pozitif sonuç veren örneklerde hemaglutinasyon yeteneğine sahip muhtemel virusların (BPIV-3) identifikasyonu amacıyla hemadsorbsiyon testi uygulandı. Bu amaçla, 24 gözlü pleytte 100.000 hücre/ml yoğunluğundaki MDBK hücre süspansiyonunda her göze 1 ml konuldu. Ertesi gün test gözlerine 100 µl şüpheli örnek ekilirken, virus kontrol gözüne 100 µl BPIV-3 (SF-4) ekimi yapıldı. Hücre kontrol gözüne ise 100 µl PBS eklendi. Takiben, 24 saat sonra tüm gözlerdeki üst sıvı çekildi ve hücreler steril PBS ile yıkandı. Tüm gözlere %0,5’lik sıgır eritrosit süspansiyonundan 200 µl konuldu. Pleyt, 1 saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Daha sonra gözlerdeki sıvı çekilerek 3 defa steril PBS ile yıkandı. İnvirt mikroskoptaki incelemede yıkama sonrasında monolayer hücreler üzerine tutunmuş/bağlanmış eritrositlerin bulunması pozitif reaksiyon, hücre-eritrosit bağlanması görülmeyen gözler ise negatif reaksiyon olarak değerlendirildi.

#### **3.2.4.4. ELISA ile Antijen Tespiti**

Viral antijenleri saptamak ve PCR yöntemi sonuçlarıyla karşılaştırmak amacıyla tüm örnekler BVDV ve BoHV-1 antijen ELISA kitleriyle test edildi. Test protokolü üretici firmaların önerdiği şekilde uygulandı. Test pleytleri ELISA okuyucuda (Thermo-Multiskan EX, Finlandiya) 450 nm dalga boyunda okutulmuş sonuçlar değerlendirildi.

### **3.2.5. Moleküler Yöntemler**

#### **3.2.5.1. Nükleik Asit İzolasyonu**

Viral RNA ve DNA'nın ekstraksiyon işlemi ticari olarak temin edilen nükleik asit izolasyon kitinde (Macherey-Nagel Nucleospin Virus, Almanya) üretici firmanın önerdiği şekilde uygulandı. Takip edilen protokolle elde edilen yaklaşık 30 µl hacmindeki nükleik asit PCR metodu/cDNA elde edilmesi aşamasına kadar -80°C sıcaklıktaki derin dondurucuda saklandı.

#### **3.2.5.2. Komplementer DNA (cDNA) Elde Edilmesi**

Ticari olarak temin edilen cDNA kiti, üretici firmanın önerdiği şekilde uygulandı. Bu amaçla her bir örneğin cDNA'sını elde etmek amacıyla tüp içerisine 10 µl nükleaz ari su, 4 µl 5x reaksiyon buffer, 1 µl reverz transkriptaz ve 5 µl nükleik asit eklenerek cDNA reaksiyon karışımı elde edildi. Daha sonra thermal-cycler cihazı aracılığıyla 30 dakika süreyle 42°C ve 5 dakika 85°C sıcaklık uygulandı. Sonuç olarak 20 µl hacimde cDNA elde edildi.

#### **3.2.5.3. BRSV Nested RT-PCR Protokolü**

Çalışma kapsamında değerlendirilen örneklere Tablo 2'de özellikleri verilen BRSV primerleri ile nested RT-PCR protokolü uygulandı (Vilcek ve ark., 1994). Test protokolü Vilcek (1994) tarafından bildirilen yöntemde bazı modifikasyonlar yapılarak gerçekleştirildi. Özet olarak: Reaksiyonun birinci evresi için PCR karışımı toplamda 50 µl olacak şekilde 33,3 µl nükleaz ari su, 5 µl MgCl<sub>2</sub> (25mM), 5 µl 10x PCR buffer, 0,25 µl B1 primeri (100 pmol), 0,25 µl B2A primeri (100 pmol), 1 µl dNTPs (10mM), 0,2 µl Taq DNA polimeraz (5 U/µl) ve 5 µl cDNA eklenerek hazırlandı. Elde edilen PCR karışımı 94°C'de 4 dk ön denatürasyon; 25 siklus (94°C 45 sn, 52,5°C 45 sn, 72°C 90 sn) ve 72°C'de 7 dk son uzama olacak şekilde thermal-cycler programına tâbi tutuldu. Elde edilen birinci evre ürününden 5 µl alınarak, PCR karışım oranlarında değişiklik olmaksızın B3 ve B4A primerleri ile PCR protokolünün ikinci evresi hazırlandı ve aynı thermal-cycler programında 35 siklus olacak şekilde uygulandı.

**Tablo 2.** Çalışmada kullanılan BRSV primerleri (Vilcek ve ark., 1994)

Hedef Gen	Primerler	Pozisyon	Dizin (5'→3')	Beklenen ürün uzunluğu (bp)
F geni	B1	114 – 135	AAT CAA CAT GCA GTG CAG TTA G	711
	B2A	824 – 803	TTT GGT CAT TCG TTA TAG GCAT	
	B3	126 – 151	GTG CAG TTA GTA GAG GTT ATC TTA GT	481
	B4A	606 – 581	TAG TTC TTT AGA TCA AGT ACT TTG CT	

#### 3.2.5.4. BPIV-3 RT-PCR Protokolü

Çalışma süresince elde edilen örnekler Tablo 3'te özellikleri verilen primerler kullanılarak BPIV-3 RT-PCR protokolü (Zhu, 2011) uygulandı.

PCR karışımı toplamda 50 µl olacak şekilde 30,95 µl nükleaz ari su, 5 µl MgCl<sub>2</sub> (25mM), 1 µl MgSO<sub>4</sub> (25mM), 5 µl 10x PCR buffer, 1 µl HNfwd primeri (25 pmol), 1 µl HNseq1 primeri (25 pmol), 1 µl dNTPs (10mM), 0,05 µl Taq DNA polimeraz (5 U/µl) ve 5 µl cDNA eklenerek hazırlandı.

Thermal-cycler programı 93°C'de 3 dk ön denatürasyon; 30 siklus (94°C 45 sn, 49°C 45 sn, 72°C 1 dk) ve 72°C'de 10 dk son uzama olacak şekilde uygulandı.

**Tablo 3.** Çalışmada kullanılan BPIV-3 primerleri (Zhu, 2011)

Hedef Gen	Primerler	Pozisyon	Dizin (5'→3')	Beklenen ürün uzunluğu (bp)
HN geni	HNfwd	7221 – 7242	GAA TGA CTC ATG ATA GAG GTA T	647
	HNseq1	7867 – 7846	AGG ACA ACC AGT TGT ATT ACA T	

#### 3.2.5.5. Panpestivirus RT-PCR Protokolü

Tüm örnekler pestivirus tespiti için Tablo 4'te özellikleri verilen panpestivirus primerleri aracılığıyla RT-PCR protokolüne tâbi tutuldu.

PCR karışımı toplamda 50 µl olacak şekilde 31,8 µl nükleaz ari su, 5 µl MgCl<sub>2</sub> (25mM), 5 µl 10x PCR buffer, 1,5 µl p324 primeri (10 pmol), 1,5 µl p326 primeri (10 pmol), 1 µl dNTPs (10mM), 0,2 µl Taq DNA polimeraz (5 U/ µl) ve 4 µl

cDNA eklenerek hazırlandı. Elde edilen PCR karışımı 94°C’de 2 dk ön denatürasyon; 35 siklus (94°C 1 dk, 56°C 1 dk, 72°C 1 dk) ve 72°C’de 7 dk son uzama olacak şekilde thermal-cycler programına tâbi tutuldu.

**Tablo 4.**Çalışmada kullanılan panpestivirus primerleri(Vilcek ve ark., 1997)

Hedef Gen	Primerler	Pozisyon	Dizin (5’→3’)	Beklenen ürün uzunluğu (bp)
5’UTR	p324	108 – 128	ATG CCC WTA GTA GGA CTA GCA	288
	p326	395 – 375	TCA ACT CCA TGT GCC ATG TAC	

### 3.2.5.6. BoHV-1 PCR Protokolü

Çalışma kapsamında Tablo 5’te özellikleri verilen ve viral genomun gB ve gC bölgesine spesifik iki farklı BoHV-1 primer çifti ile PCR protokolü uygulandı.

**Tablo 5.** BoHV-1 primerleri ve gen dizini (Esteves ve ark., 2008; Vilcek, 1993)

Hedef Gen	Primerler	Pozisyon	Dizin (5’→3’)	Beklenen ürün uzunluğu (bp)
gB*	P1	624 – 645	CAC GGA CCT GGT GGA CAA GAA	468
	P2	1091 – 1070	CTA CCG TCA CGT GAG TGG TAC G	
gC	PF	873 – 890	CGG CCA CGA CGC TGA CGA	575
	PR	1430 – 1447	CGC CGC CGA GTA CTA CCC	

\* Kaynak alınan makalede kullanılan primerlerin BoHV-1’in gI (g1) bölgesine spesifik olduğu belirtilmektedir. Daha sonraki yıllarda BoHV-1 glikoproteinlerinin yeniden sınıflandırılması sonucunda g1 yeniden adlandırılarak gB olarak tanımlanmıştır (Schwyzer ve Ackermann, 1996).

BoHV-1 gB gen bölgesine spesifik primerler kullanılarak yapılan PCR protokolü Vilcek (1993) tarafından bildirilen şekilde uygulandı. PCR karışımı toplamda 50 µl olacak şekilde 38,8 µl nükleaz ari su, 2 µl MgCl<sub>2</sub> (25mM), 5 µl 10x PCR buffer, 1 µl P1 forward primer (50 pmol), 1 µl P2 reverz primer (50 pmol), 1 µl dNTPs (10mM), 0,2 µl Taq DNA polimeraz (5 U/µl) ve 1 µl DNA eklenerek hazırlandı. Elde edilen PCR karışımı 94°C’de 5 dk ön denatürasyon; 35 siklus (94°C 1 dk, 61°C 1 dk, 72°C 1 dk) ve 72°C’de 10 dk son uzama olacak şekilde thermal-cycler programına tâbi tutuldu.

Viral genomun gB gen bölgesine spesifik primerler aracılığı ile çoğaltılarak pozitif bulunan örneklerin dizi analizlerinin yapılması amacıyla, pozitif örnekler gC gen bölgesine spesifik primerlerle (Esteves ve ark., 2008) bir kez daha PCR protokolüne tâbi tutuldu. PCR karışımı toplamda 50 µl olacak şekilde 25 µl Maxima Hot Start Green PCR Master Mix (2x), 22 µl nükleaz ari su, 1 µl PF forward primer (50 pmol), 1 µl PR reverse primer (50 pmol) ve 1 µl DNA eklenerek hazırlandı. Elde edilen PCR karışımı 95°C’de 4 dk ön denatürasyon; 35 siklus (95°C 30 sn, 58°C 30 sn, 72°C 35 sn) ve 72°C’de 10 dk son uzama olacak şekilde thermal-cycler programına tâbi tutuldu.

### **3.2.5.7. Elektroforez ve PCR Ürünlerinin Görüntülenmesi**

PCR uygulamalarıyla elde edilen ürünleri görüntülemek amacıyla 1x TAE buffer (Fermantas, B49, Litvanya) içinde hazırlanan % 1,5’luk agaroz jel (peQLab Biotechnologic GmbH, 35-1010, Almanya) elektroforezi (Thermo scientific, EC320, USA) kullanıldı. Ayrıca ürünlerin jelde görüntülenmesi amacıyla 0,05 µl/ml olacak şekilde Safeview (abm, G108, Kanada) eklendi. İşlem sürecinde 8 µl PCR ürünü ve 1 µl DNA ladder (GeneAll, GA-010, Kore), 1,5 µl loading dye (Metis, 0601, Türkiye) ile karıştırılarak jele yüklendi ve 30 dakika boyunca 200 volt elektrik uygulanarak yürütüldü. Ürünlerin molekül boyutları, 100 bp’lik açılma aralıklarına sahip DNA ladder ile karşılaştırılarak değerlendirildi. Yürütme işlemi sonunda jel görüntüleme sistemi (Vilber, 09200439, Fransa) aracılığıyla PCR ürünleri görüntülendi ve kayıt altına alındı.

### **3.2.5.8. Dizi Analizi ve Filogenetik Ağaç Oluşturulması**

PCR uygulaması sonucunda BRSV, BPIV-3, Panpestivirus ve BoHV-1 etkenlerine ait nükleik asit varlığı tespit edilen PCR ürünlerinin dizi analizleri hizmet alımı (BM Labosis, Türkiye) yoluyla yapıldı. Elde edilen dizin verileri, BioEdit programı kullanılarak ClustalW çoklu hizalama (ClustalW multiple alignment) fonksiyonu aracılığıyla hizalandı (Hall, 1999). Hizalanarak kesilen dizilerin, MEGA7 programı kullanılarak 1000 bootstrap replikasyonu ile maksimum olasılık analizi (Maximum likelihood analysis) yapıldı (Kumar ve ark., 2016). Her bir virus için ayrı



olarak oluşturulan filogenetik ağacın tasarlanmasında kullanılan referans dizinler ilgili gen bölgelerine göre GenBank'tan (GenBank, 2018) sağlandı.

Ayrıca, dizi analizi sonucu baz dizimlerini elde edilen örneklerin nükleotid BLAST veri tabanı kullanılarak GenBank'a daha önce girişi yapılmış dizinlerle benzerlikleri değerlendirildi (BLASTn, 2018).

### **3.2.6. İstatistiksel Analiz**

Tez çalışması kapsamında elde edilen verileri hem viral enfeksiyonlar hem de teşhis materyalleri (nazal svab ve akciğer doku örneği) yönünden istatistiksel olarak değerlendirmek için Ki-Kare testi uygulandı. Bu amaçla, IBM SPSS İstatistik 20 (Chicago, IL, ABD) paket programı kullanıldı. Tüm değerlendirmelerde istatistiksel önem sınırı olarak  $P < 0,05$  kabul edildi.

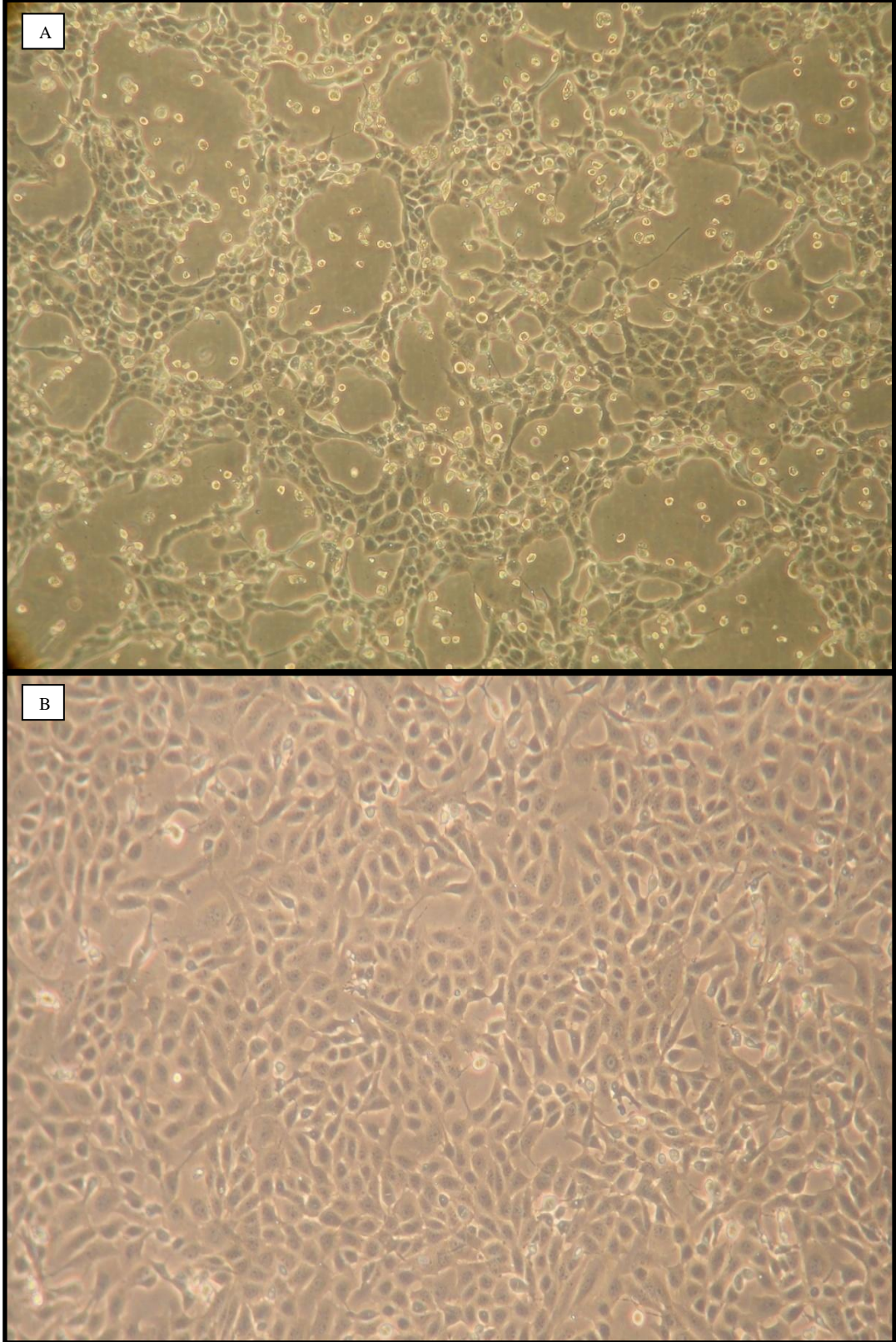
## 4. BULGULAR

### 4.1. Konvansiyonel Virolojik Yöntemlerle Elde Edilen Bulgular

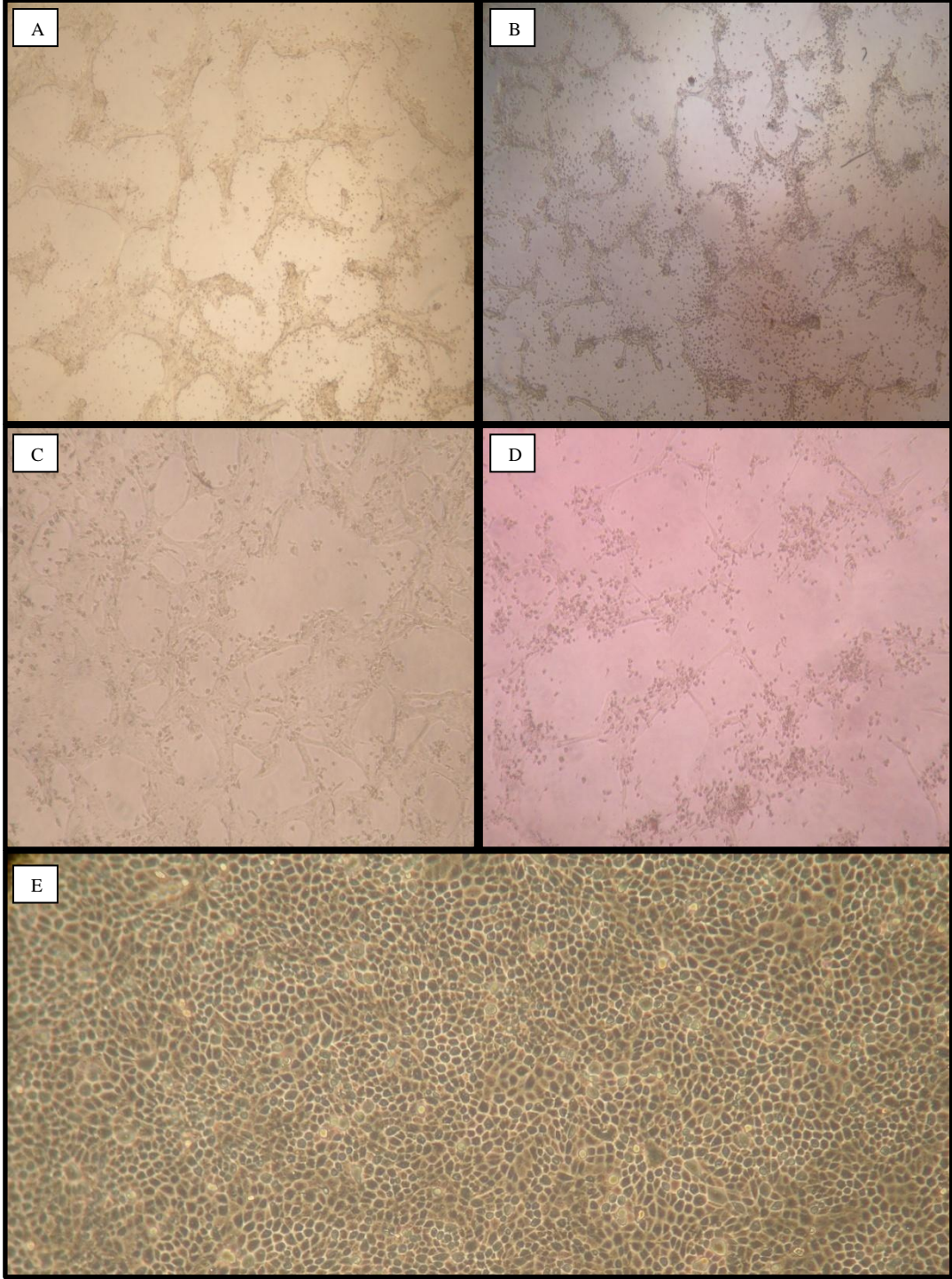
#### 4.1.1. Virus İzolasyonu Sonuçları

Tez kapsamında değerlendirilen 133 nazal svab ve 60 akciğer doku örneği olmak üzere toplam 193 adet örnek MDBK hücre kültürüne ekilerek birbirini takip eden üç kör pasaj işlemine tâbi tutuldu. Süreç sonunda toplamda 5 adet nazal svab örneğinin (Örnek no: ET-81, ET-92, ET-109, ET-115 ve ET-133) ekildiği hücre kültüründe sitopatolojik etki (CPE) saptandı. Geriye kalan 188 adet nazal svab ve akciğer doku örneklerinin ekildiği kültürlerde sitopatolojik değişiklik gözlenmedi.

CPE oluşturan örnekler arasında ET-81 numaralı örnekte dördüncü pasajından itibaren CPE saptanırken (Resim 2), diğer 4 örneğin yalnızca birinci pasajında CPE görüldü (Resim 3). Bu örneklerin ilerleyen pasajlarında herhangi bir CPE görülmedi. Olası virus varlığının değerlendirilebilmesi ve tiplendirme yapılabilmesi amacıyla söz konusu 5 örneğe hemadsorbsiyon testi uygulandı.



**Resim 2.** ET-81 numaralı nazal svab örneğinin ekildiği hücre kültürünün mikroskop görüntüsü.  
**A:** İnokulasyon yapılanMDBK hücre kültüründe 5. pasaj seviyesinde 2. gün görüntüsü (x20 büyütme)  
**B:** MDBK hücre kontrol görüntüsü (x20 büyütme)

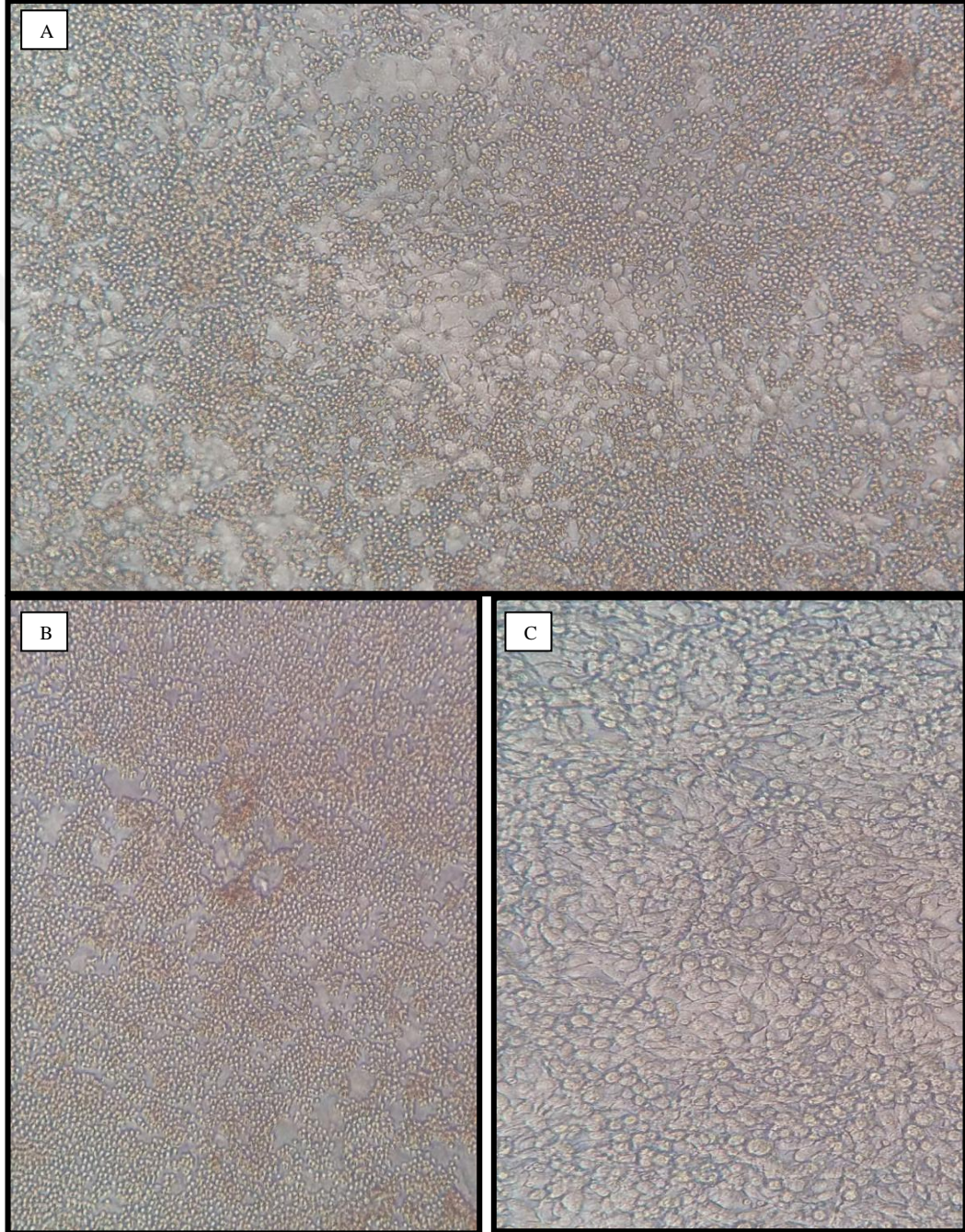


**Resim 3.** MDBK hücre hattındaki kör pasaj sürecinde yalnızca 1. pasaj inokulasyonunda sitopatolojik değişiklik görülen örnekler.

**A:** ET-92 numaralı nazal svab örneği 5. gün (x4 büyütme); **B:** ET-109 numaralı nazal svab örneği 4. gün (x4 büyütme); **C:** ET-115 numaralı nazal svab örneği 3. gün (x10 büyütme); **D:** ET-133 numaralı nazal svab örneği 5. gün (x10 büyütme); **E:** MDBK hücre kontrol görüntüsü (x10 büyütme)

#### 4.1.2. Hemadsorbsiyon testi sonucu

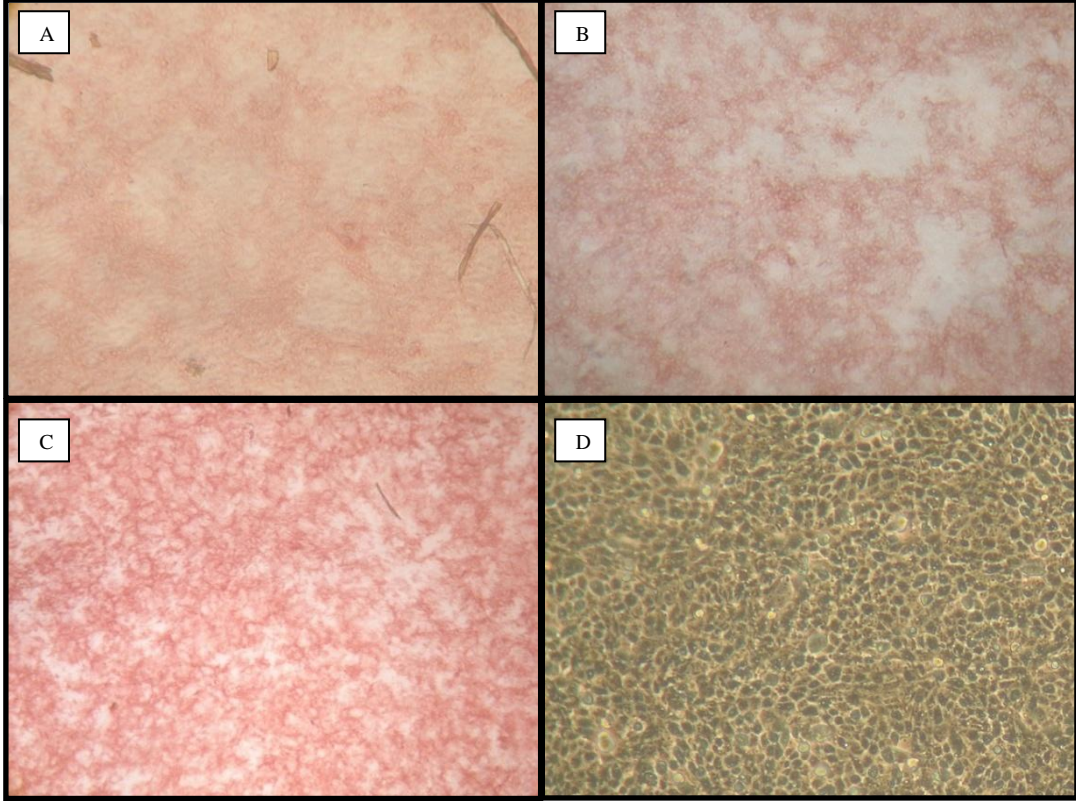
Sitopatolojik etki görülen toplam 5 örnekte virus tiplendirmesi çalışmalarını desteklemek amacıyla uygulanan hemadsorbsiyon testi sonucunda 1 adet nazal svab örneğinin (ET-81) pozitif sonuç verdiği saptandı (Resim 4).



**Resim 4.** MDBK hücre hattında uygulanan HAd testinde elde edilen mikroskop görüntüsü. **A:** ET-81 numaralı nazal svab örneği 4. pasaj (x20 büyütme) **B:** Pozitif virus kontrol (BPIV-3 SF-4 referans suşu) (x20 büyütme) **C:** Negatif kontrol (Enfekte edilmemiş MDBK hücre kültürü) (x20 büyütme)

#### 4.1.3. İmmunoperoksidaz (IPMA) Testi Sonuçları

Toplam 3 kör pasaj işlemine tâbi tutulmuş olan 193 örneğin ncp pestivirus varlığı yönünden incelenmesi amacıyla IPMA testi uygulandı. Test sonucunda 1 nazal svab (Örnek no: ET-94) ve 1 akciğer doku örneği (Örnek no: DO-48) olmak üzere toplam 2 adet örnek ncp pestivirus yönünden pozitif olarak tespit edildi (Resim 5).

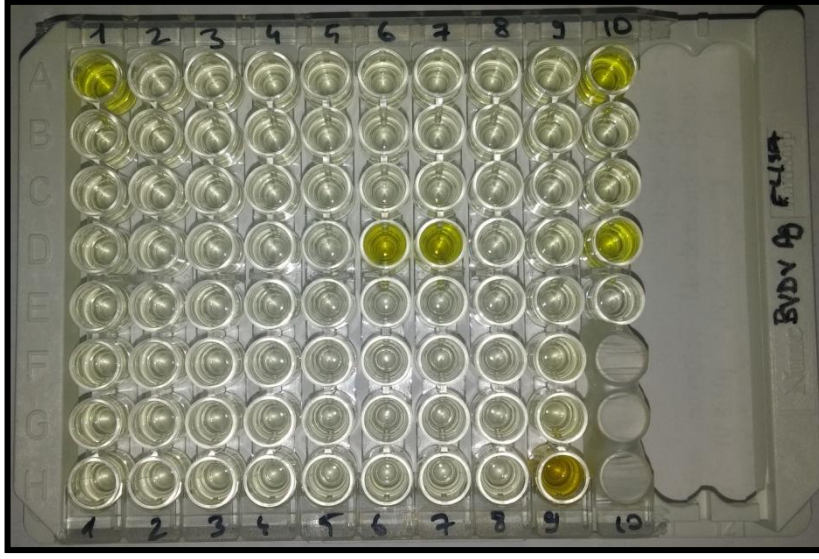


**Resim 5.** İmmunoperoksidaz testinde elde edilen mikroskop görüntüleri.

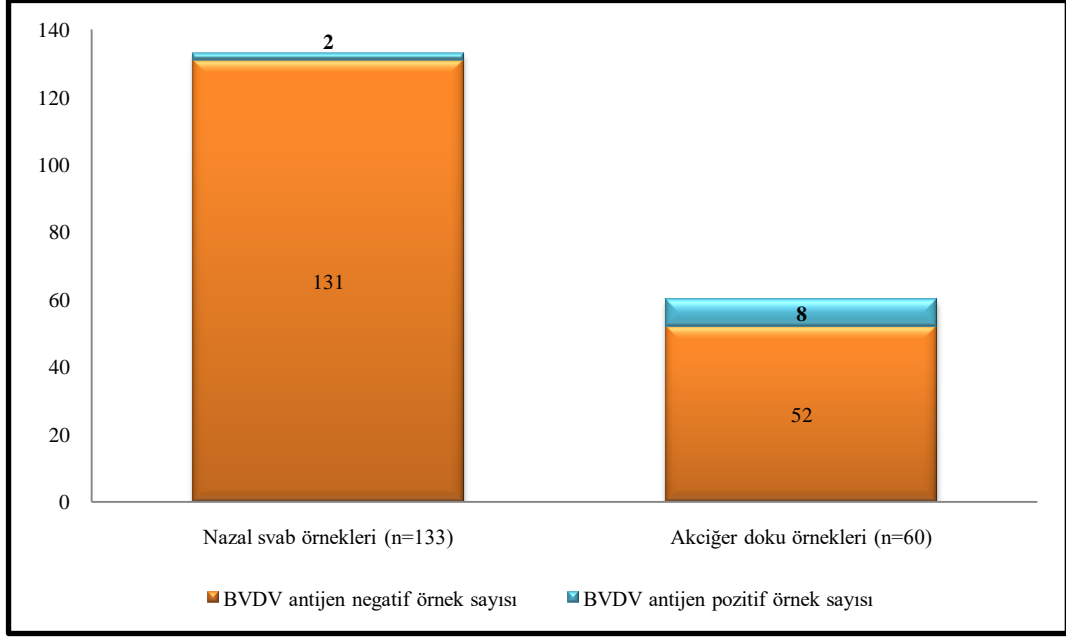
**A:** ET-94 numaralı nazal svab örneği (x10 büyütme); **B:** DO-48 numaralı akciğer dokusu örneği (x10 büyütme); **C:** Pozitif virus kontrol (BVDV-FLK)(x10 büyütme); **D:** Negatif kontrol (Enfekte edilmemiş MDBK hücre kültürü)(x10 büyütme)

#### 4.1.4. ELISA ile BVDV Antijen Tespiti Sonuçları

Çalışma kapsamında değerlendirilen 133 nazal svab ve 60 akciğer doku örneği olmak üzere toplam 193 adet örnek BVDV ticari antijen ELISA kiti ile test edildi (Resim 6). Sonuç olarak 2 nazal svab örneği (Örnek no: ET-94 ve ET-109) ve 8 akciğer örneğinde (Örnek no: DO-1, DO-2, DO-14, DO-15, DO-16, DO-48, DO-49 ve DO-60) BVDV antijen varlığı belirlendi (Şekil 7).



**Resim 6.** Nazal svab ve akciğer doku örnekleriyle gerçekleştirilen BVDV antijen ELISA testi.



**Şekil 7.** BVDV antijen ELISA'da pozitif bulunan örnek sayıları.

#### 4.1.5. ELISA ile BoHV-1 Antijen Tespiti Sonuçları

BoHV-1 antijen ELISA kiti ile test edilen 133 nazal svab ve 60 akciğer doku örneği olmak üzere toplam 193 adet örnekten hiçbirinde pozitif sonuç alınmadı.

## 4.2. Moleküler Yöntemlerle Elde Edilen Bulgular

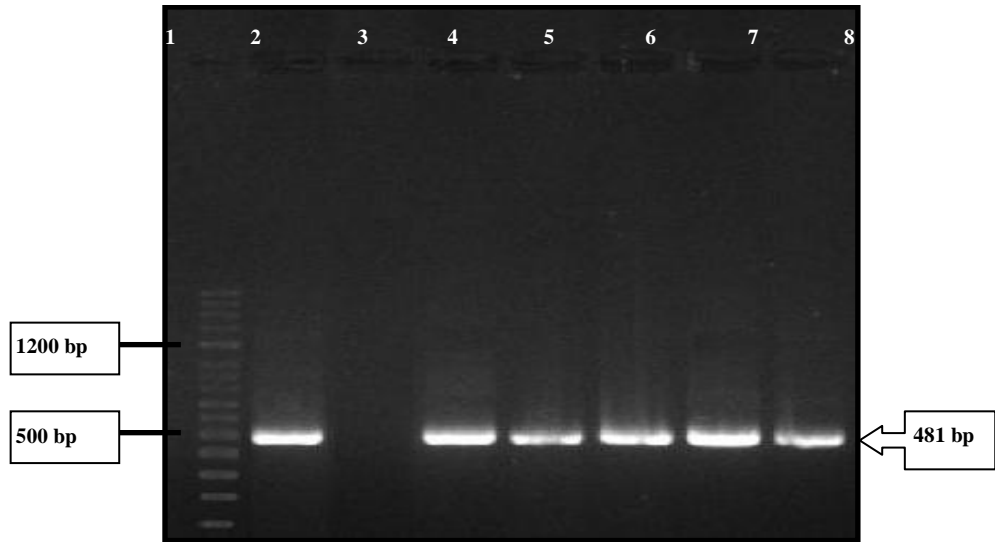
Tez çalışması için değerlendirilen toplam 193 adet örnekte çalışma kapsamındaki virüslere ait nükleik asitlerin tespitine yönelik PCR uygulamalarının bulguları aşağıda sunulmuştur (Tablo 6).

**Tablo 6.** PCR sonuçlarına göre pozitif bulunan örnek sayıları.

Alınan Örnekler	Toplam Sayı	BRSV	BPIV-3	Pestivirus	BoHV-1	Toplam Pozitiflik Değeri
Nazal Svab Örneği	133	2	1	4	2	9
Akciğer Doku Örneği	60	3	0	1	0	4
<b>Toplam</b>	<b>193</b>	<b>5</b> (%2,59)	<b>1</b> (%0,52)	<b>5</b> (%2,59)	<b>2</b> (%1,04)	<b>13</b> (%6,74)

### 4.2.1. BRSV Nested RT-PCR Sonuçları

Nested RT-PCR yöntemi ile test edilen örneklerden 2 nazal svab (Örnek no: ET-63 ve ET-124) ve 3 akciğer doku örneği (Örnek No: DO-7, DO-18 ve DO-19) BRSV yönünden pozitif olarak saptandı (Resim 7).

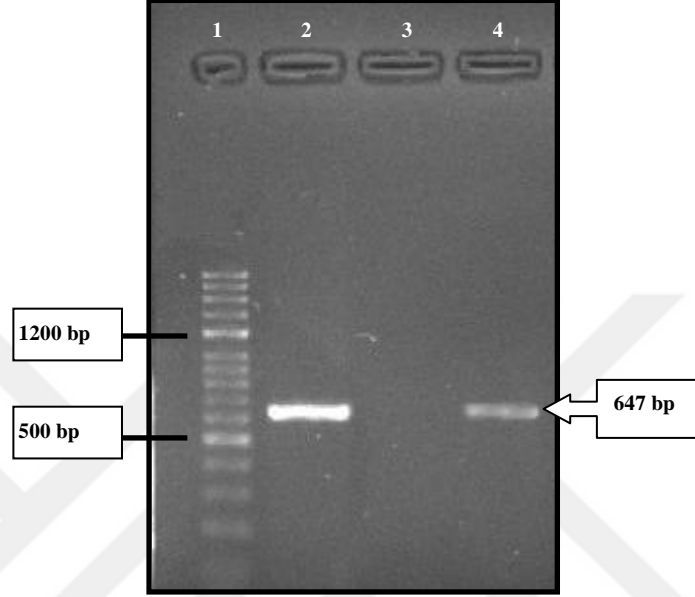


**Resim 7.** BRSV nested RT-PCR (2. aşama) ürünlerinin agaroz jel elektroforezindeki görüntüleri. **1:** DNA ladder (100 bp aralıklı); **2:** Pozitif kontrol (BRSV-Atue); **3:** Negatif kontrol; **4-8:** BRSV pozitif olan örnekler (Sırasıyla DO-7, DO-18, DO-19, ET-63, ET-124).



#### 4.2.2. BPIV-3 RT-PCR Sonuçları

RT-PCR yöntemi ile test edilen 60 akciğer örneğinin tümü BPIV-3 yönünden negatif olarak saptanırken, 133 nazal svab örneğinden 1 tanesi (ET-81) pozitif olarak tespit edildi (Resim 8).

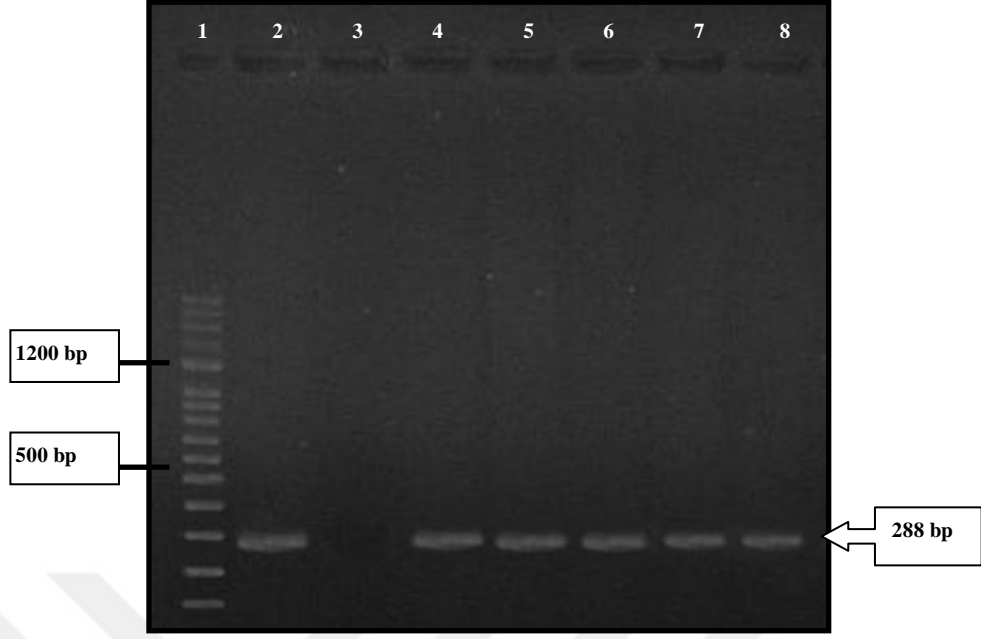


**Resim 8.** BPIV-3 RT-PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezindeki görüntüleri.

**1:** DNA ladder (100 bp aralıklı); **2:** Pozitif kontrol (BPIV-3 SF-4); **3:** Negatif kontrol; **4:** BPIV-3 pozitif örnek (ET-81).

#### 4.2.3. Panpestivirus RT-PCR Sonuçları

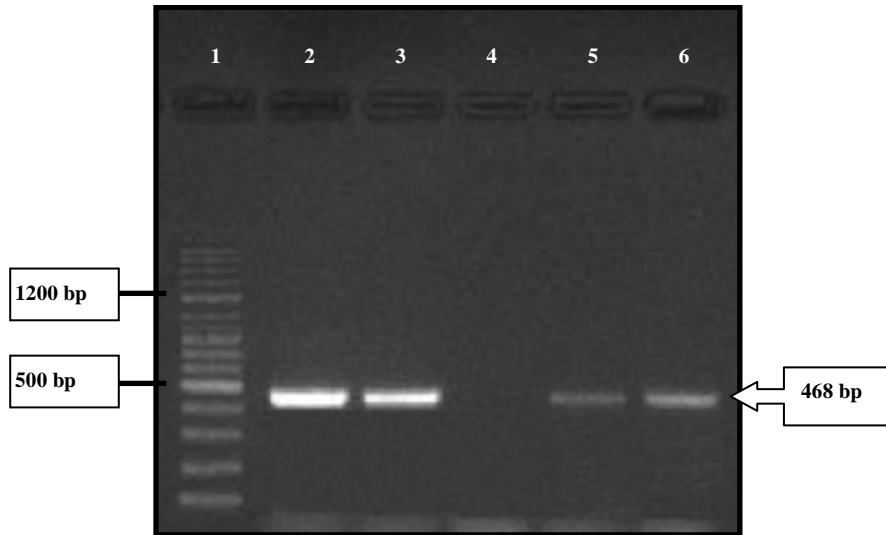
Pestivirus viral RNA varlığı yönünden değerlendirilen örneklerin RT-PCR sonucunda 4 nazal svab (Örnek no: ET-64, ET-84, ET-101 ve ET-102) ve 1 akciğer doku örneği (Örnek no: DO-48) pozitif olarak bulundu (Resim 9).



**Resim 9.** Panpestivirus RT-PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezindeki görüntüleri. **1:** DNA ladder(100 bp aralıklı); **2:** Pozitif kontrol (BVDV-NADL); **3:** Negatif kontrol; **4-8:** Panpestivirus pozitif olan örnekler (Sırasıyla ET-64, ET-94, ET-101, ET-102, DO-48).

#### 4.2.4. BoHV-1 PCR Sonuçları

PCR yöntemi ile test edilen 60 akciğer örneğinin tümü BoHV-1 yönünden negatif olarak saptanırken, 133 nazal svab örneğinden 2 tanesi (ET-120 ve ET-121) pozitif olarak tespit edildi (Resim 10).



**Resim 10.** BoHV-1 PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezindeki görüntüleri. **1:** DNA ladder (100 bp aralıklı); **2-3:** Pozitif kontrol (BoHV-1 Cooper); **4:** Negatif kontrol; **4-5:** BoHV-1 pozitif örnekler (Sırasıyla ET-120, ET-121).

### 4.3. Konvansiyonel Virolojik Yöntemler ve Moleküler Yöntemlerle Elde Edilen Bulgularının Karşılaştırılması

Tez kapsamında nazal svab ve akciğer doku örneklerinde BRSV, BPIV-3, BVDV ve BoHV-1 etkenlerin tespitine yönelik uygulanan testler sonucunda pozitif saptanan örnek sayılarına ilişkin veriler Tablo 7’de sunuldu. Bu bilgiler ışığında uygulanan yöntemlerden en az biri aracılığıyla 5 örnekte (3 nazal svab ve 2 akciğer doku örneği) BRSV, 1 nazal svab örneğinde BPIV-3, 13 örnekte (5 nazal svab ve 8 akciğer doku örneği) pestivirus ve 2 nazal svab örneğindeki BoHV-1 pozitifliği saptandı.

**Tablo 7.** Tez kapsamındaki virusların tespitine yönelik uygulanan testler ve saptanan pozitif örnek sayıları

Virus	Uygulanan Yöntem	Nazal Svab Örneği (n=133)	Akciğer Doku Örneği (n=60)	Toplam (%) (n=193)
BRSV	Virus İzolasyonu	0	0	0 (%0)
	Nested RT- PCR	3	2	5 (%2,59)
BPIV-3	Virus İzolasyonu	1	0	1 (%0,52)
	Hemadsorbsiyon Testi	1	0	1 (%0,52)
	RT- PCR	1	0	1 (%0,52)
Pestivirus	Virus İzolasyonu	0	0	0 (%0)
	İmmunoperoksidaz Testi	1	1	2 (%1,04)
	Antijen ELISA	2	8	10 (%5,18)
	RT- PCR	4	1	5 (%2,59)
BoHV-1	Virus İzolasyonu	0	0	0 (%0)
	Antijen ELISA	0	0	0 (%0)
	PCR	2	0	2 (%1,04)

BRSV varlığını tespit etmek için örnekler virus izolasyonu ve RT-PCR yöntemleriyle test edildi. Bu doğrultuda 5 (%2,59; 5/193) örnek BRSV nükleik asit varlığı yönünden pozitif bulunurken (Tablo 6), hiçbirisinden virus izolasyonu yöntemiyle BRSV izolatı elde edilemedi. Geriye kalan 188 adet örnek BRSV varlığı açısından negatif olarak bulundu.

BPIV-3 varlığını tespit etmek için virus izolasyonu ve RT-PCR yöntemlerine ek olarak şüpheli örnekler hemadsorbsiyon testi uygulandı. RT-PCR sonucunda 1 (%0,52; 1/193) nazal svab örneği BPIV-3 viral genom varlığı açısından pozitif bulunurken (Tablo 6), geriye kalan 192 adet örnek negatif olarak değerlendirildi. Aynı örnek (ET-81) hemadsorbsiyon testi sonucunda da pozitif bulundu ve 4. pasaj seviyesinde sitopatojenik virus izolatı elde edildi. Böylece yapılan üç teste ilişkin sonuçların birbirleriyle paralel olduğu belirlendi (Tablo 9).

BVDV varlığı yönünden toplamda 193 adet örnek BVDV antijen-ELISA, virus izolasyonu-IPMA ve RT-PCR yöntemleriyle test edildi. Örneklerin hiçbirinde cp BVDV biyotipi saptanamadı. Toplamda 13 (%6,74; 13/193) örnek en az bir test yöntemiyle BVDV yönünden pozitif bulundu. Virus izolasyonunu takiben yapılan IPMA testi sonucunda 2 adet örnek ELISA ve RT-PCR ile uyumlu sonuç verirken, 3 adet örnek yalnızca RT-PCR pozitif ve 8 adet örnek yalnızca ELISA pozitif olarak sonuç verdi (Tablo 8).

**Tablo 8.** Pestivirus tespitine yönelik uygulanan testler sonucunda pozitif saptanan örnekler

Uygulanan Yöntemler	Pozitif Örnek Sayıları
IPMA (+), Ag-ELISA (+), RT-PCR (+)	2
IPMA (-), Ag-ELISA (+), RT-PCR (-)	8
IPMA (-), Ag-ELISA (-), RT-PCR (+)	3
<b>TOPLAM (n=193)</b>	<b>13 (%6,74)</b>

BoHV-1 varlığı yönünden örnekler antijen-ELISA kiti, virus izolasyonu ve PCR yöntemleriyle incelendi. Örneklerin tümünde virus izolasyonu ve ELISA sonuçları negatif olarak saptanırken, 2 (%1,04; 2/193) örnek BoHV-1 viral nükleik asit varlığı yönünden pozitif olarak bulundu (Tablo 7).

Yapılan konvansiyonel ve moleküler yöntemler sonucunda test edilen örneklerde çoklu enfeksiyon saptanamadı. Bu örneklerden 21'i (%10,88; 21/193) [10 adet nazal svab (%7,52; 10/133) ve 11 adet akciğer doku örneği (%18,33; 11/60)] uygulanan yöntemlerin en az birinde BRSV, BPIV-3, BVDV ve BoHV-1 etkenlerinden biri için pozitif olarak belirlendi. Söz konusu etkenlerin teşhisinde kullanılan konvansiyonel virolojik yöntemler ve moleküler yöntemlerin karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesine ilişkin veriler Tablo 9'da sunuldu.

**Tablo 9.** Pozitif sonuç alınan örneklerin test sonuçlarına ilişkin veriler

Sıra No	Pozitif Bulunan Viruslar	Örnek No	Konvansiyonel Virolojik Yöntemlere İlişkin Sonuçlar				Moleküler Yöntemlere İlişkin Sonuçlar				
			Virus izolasyonu (CPE)	HAd Testi	IPMA	BVDV Ag ELISA	BoHV-1 Ag ELISA	BRSV RT-PCR	BPIV-3 RT-PCR	Panpestivirus RT-PCR	BoHV-1 PCR
1.	BRSV	ET-63	-	te	-	-	-	+	-	-	-
2.	BRSV	ET-124	-	te	-	-	-	+	-	-	-
3.	BRSV	DO-7	-	te	-	-	-	+	-	-	-
4.	BRSV	DO-18	-	te	-	-	-	+	-	-	-
5.	BRSV	DO-19	-	te	-	-	-	+	-	-	-
6.	BPIV-3	ET-81	+	+	-	-	-	-	+	-	-
7.	BVDV	ET-64	-	te	-	-	-	-	-	+	-
8.	BVDV	ET-94	-	te	+	+	-	-	-	+	-
9.	BVDV	ET-101	-	te	-	-	-	-	-	+	-
10.	BVDV	ET-102	-	te	-	-	-	-	-	+	-
11.	BVDV	ET-109	-	-	-	+	-	-	-	-	-
12.	BVDV	DO-1	-	te	-	+	-	-	-	-	-
13.	BVDV	DO-2	-	te	-	+	-	-	-	-	-
14.	BVDV	DO-14	-	te	-	+	-	-	-	-	-
15.	BVDV	DO-15	-	te	-	+	-	-	-	-	-
16.	BVDV	DO-16	-	te	-	+	-	-	-	-	-
17.	BVDV	DO-48	-	te	+	+	-	-	-	+	-
18.	BVDV	DO-49	-	te	-	+	-	-	-	-	-
19.	BVDV	DO-60	-	te	-	+	-	-	-	-	-
20.	BoHV-1	ET-120	-	te	-	-	-	-	-	-	+
21.	BoHV-1	ET-121	-	te	-	-	-	-	-	-	+
<b>TOPLAM POZİTİF</b>			<b>1</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>10</b>	<b>0</b>	<b>5</b>	<b>1</b>	<b>5</b>	<b>2</b>

**ET:** Nazal svab örneği; **DO:** Akciğer doku örneği; **CPE:** Sitopatojenik etki; **HAd:** Hemadsorbsiyon; **te:** Test edilmedi; **IPMA:** İmmunoperoksidaz Monolayer Assay; **Ag:** Antijen; (+): Pozitif sonuç; (-): Negatif sonuç

#### 4.4. Dizi Analizi ve Filogenetik Ağaç Oluşturulması

Tez çalışması sonucunda pozitif olarak saptanan PCR ürünlerinin dizi analizleri sonucunda elde edilen veriler Tablo 10'da gösterilmektedir.

**Tablo 10.** Tez çalışmasında elde edilen dizinlere ilişkin veriler

Virus	Örnek No	Dizin (5'→3')	Ürün uzunluğu (bp)
	DO-7	CTTAGTGCCTAAGAAGTGGATGGTATACAAGCGTGGTAACAATAGAGT TGAGCAAAATCCAAAAAGATGTGTGTAAGTACTGATTCAAAAGTGAA ATTAATAAAGCAAGAAGTACAGAAAGATACAACAATGCAGTAACAGAATTG CAGTCACTTATGCAAAATGTACCGCCTCCTTTAATAGAGCAAAAAGAG GAATACCAGAGTTGATGCATTATACAAGAACTCTACAAAAGGTTTTA TGGACTAATGGGCAAGAAGAGAAAAAGGAGATTTTTAGGATCTTGCTA GGCATTGGATCTGCTATTGCAAGTGGTGTAGCAGTGTCCAAAGTACTACA CCTGGAGGGAGAGGTGAACAAAATTAAGTGCAGTCTATCCACAAAT AAAGCGGTAGTTAGTCTATCCAATGGAGTTAGTGTCTTACTAGCAAAAGT ACTTGATCAAAAGAACT	460
BRSV	ET-63	TAGAGGTTATCTTAGTGCATTAAGAAGTGGATGGTATACAAGTGTGGTA ACAATAGAGTTGAGCAAAATACAGAAAGATGTGTGTAAGTACTGATT CAAAAGTGAAATTAATAAAGCAAGAAGTACAGAAAGATACAACAATGCAG TAACAGAATTGCAGTCACTTATGCAAAATGTACCGCCTCCTTTAATAGA GCAAAAAGAGGAATACCAGAGTTGATGCATTATACAAGAACTCTACAA AAAGGTTTTATGGACTAATGGGCAAGAAGAGAAAAAGGAGATTTTTAGG ATTCTTGCTAGGCATTGGGTCTGCTATTGCAAGTGGTGTAGCAGTGTCCA AAGTACTACACCTGGAGGGAGAGGTGAACAAAATTAAGTGCAGTCTGCT AACCACAAATAAAGCAGTAGTTAGTCTATCCAATGGAGTTAGTGTCTT CTAGCAAAAGTACTTGATC	461
	ET-124	GTGCAGTTAGTAGTGGTTATCTTAGTGCATTAAGAAGTGGATGGTATACA AGTGTGGTAACAATAGAGTTGAGCAAAATACAGAAAGATGTGTGTAAGT GTACTGATTCAAAAGTGAAATTAATAAAGCAAGAAGTACAGAAAGATACA CAATGCAGTAACAGAAATGCAGTCACTTATGCAAAATGTACCGCCTCCT TTAATAGAGCAAAAAGAGGAATACCAGAGTTGATGCATTATACAAGAAA CTCTACAAAAGGTTTTATGGACTAATGGGCAAGAAGAGAAAAAGGAG ATTTTTAGGATCTTGCTAGGCATTGGGTCTGCTATTGCAAGTGGTGTAG CAGTGTCCAAGTACTACACCTGGAGGGAGAGGTGAACAAAATTAAGT TGCAGTCTAACCACAAATAAAGCAGTAGTTAGTCTATCCAATGGAGTT AGTGTCTTACTAGCAAAAGTACTTGATCTAAAGAACT	480
BPIV-3	ET-81	GAATGACTTCATGATAGAGGTATTGAGCCTCTAAACCCTGACAAATCTG GAGATGTACCTCTGGCAATCCATCCTTAGCAAGTAACCCAAAGATAAGA CTAATACCAGGTCTAGTCTGTTAGCAGCATCTACCACTGTAATGGTTG TATAAGGATCCCGTCTTTCGTAATCAACAATCTAATATATGCTTACACTT CCAACCTTATTGTTCAAGGTTGCCAGGATATAGGGAAGTCTTATCAGGTG TTACAAATCGGGATCATCACTATAAATTCAGACCTGGTACCTGACCTAAA TCCTAGAGTTACACATACTTTAATATTGATGATAATAGAAGGTCTGTT CTTTAGCACTACTAAATACAGATGTATATCAGTTGTGCTCAACTCCGAAA GTTGACGAAAAGATCAGACTATGCATCAATAGGGATTGAAGACATCGTAC TTGATATTACTAACAATGGATTAATCATCACAACAAGATTTACCAAT GATAATATAACATTTGACAAACCATATGCAGCACTGTACCCATCAGTAG GACCGGGGATTTATTATAAAGGTAAGATTATTTTTCTCGGGTATGGTGA TTAGAACATGCAGAGAATGGTGTGATGTAATACTAAGT	637
BVDV	DO-48	TATGCCCTTAGTAGGACTAGCATATTGGGGAGGGTAGCAACAGTGGTGA GTTAGTTGGATGGCTGAAGCCCTGAGTACAGGGTAGTCGTGAGTGGTTC GACGCTTAGAATATGAGCCTCGAGATGCCACGTGGACGAGGGCATGCC CACAGCACATCTTAACCTGAGCAGGGGTCGCCAGGTGAAAAGCGGGTAA ACCGTTACTAACACAGCCTGATAGGGTGTGCAGAGGCCACTGCACTG CTACTAAAATCTCTGCTGTACATGG	271

**Tablo 10.** Tez çalışmasında elde edilen dizinlere ilişkin veriler (Devam)

Virus	Örnek No	Dizin (5'→3')	Ürün uzunluğu (bp)
<b>BVDV</b>	ET-64	TGCCCTTAGTAGGACTAGCATAATGAGGGGGGTAGCAACAGTGGTGAGT TCGTTGGATGGCTTAAGCCCTGAGTACAGGGTAGTCGTCAGTGGTTCGAC GCCTTGGAAATAAAGGTCTCGAGATGCCACGTGGACGAGGGCATGCCCAA AGCACATCTTAACCTGAGCGGGGGTCGCCAGGTAAAAGCAGTTTTTAA CCGACTGTTACGAATACAGCCTGATAGGGTGCTGCAGAGGCCACTGTA TGGCTACTAAAAATCTCTGCTGTACATGGCACATGGAGTT	286
	ET-94	GTAGGACTAGCAAAATGGGGGGGTAGCAACAGTGGTGAGTTCGTTGGA TGGCTGAAGCCCTGAGTACAGGGTAGTCGTCAGTGGTTCGACACCTAGG ACATTAGGTCTCGAGATGCCACGTGGACGAGGGCATGCCACAGCACAT CTTAGCCTGTGCAGGGGTGCGACAGGTGAAAGCGGTCTTAACCCACCGC TATGAACACAGCCTGATAGGGTGCTGCAGAGGCCACTGTATTGCTACT AAAAATCTCTGCTGTACATGGCACATGGAGTTG	278
<b>BoHV-1</b>	ET-121	GGCCACGACGCTGACGAGGACGGGGCTTCCGATTAGGCCGGGCGAGGCG TCGTACGTGGCGGTGCGGGAGAACTCGGGCAGCGGTGCCGGGTAGCCAG TGGCGGTGCAGGTGTAGTCGACGGGCCCCGTCGGTTGTAGAAAGCAGGCG CACGCCGCGCAGGTTTACCAGCCCCGGCCGCTCGGCGCAGACGCCGGTC TGCTCAGTGCGCGACGGGGCGATGCCGTGCGGCACCGTCCAGCGCAGGG AGACGCGCCCCCTCGGGACGCAGCGCGCCTCGCAGACGGCCTCGCCGCC CTCGAAGTACACGCGCAGCTCGGGCGGGCGGTAACGGCCGGCGTGCCA GCCGCGTAAAAGCGGCGCTCCATGTTAGCGCTCTGGAACCAGGAGACGT CGCAGCGCAGGTTGGGCGGGTGGGCGGTTGGCGTTCGCGTCTCGAGCGT AAGGACGGACGTGCGCGAAAAGAGCCCGGAGTCGTGACCGTAAAGAC GTCGCGCGCGTGCCGAGCCTCCACGGGGTAGCCGTTGCGGAACCAGTGC AGGCGCGTGGAGCGCGGGGTAGTACTCGGCGGC	573



Elde edilen dizinlerin nükleotid BLAST veri tabanında (BLASTn, 2018) en yakın saptanan kayıtlar ve benzerlik yüzdeleri Tablo 11’de özetlenmiştir.

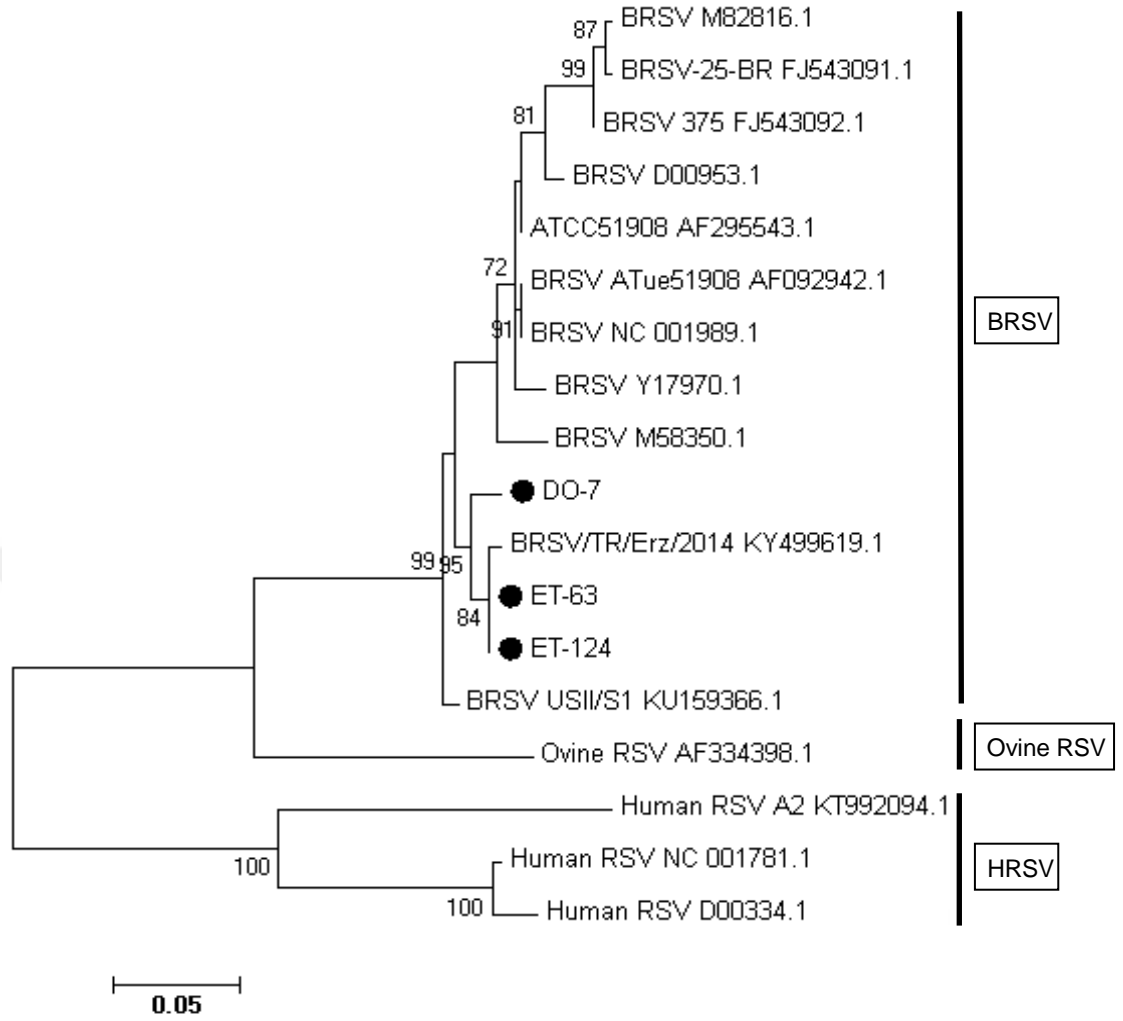
**Tablo 11.** Tez çalışmasında elde edilen dizinler ve GenBank’tan referans alınan dizinlerin BLAST sonuçları

<b>Virus</b>	<b>Örnek No (Bu çalışma)</b>	<b>GenBank referans dizin (Accession no)</b>	<b>Benzerlik Yüzdesi</b>
<b>BRSV</b>	DO-7	BRSV/TR/Erz/2014 (KY499619.1)	%98
		USII/S1 (KU159366.1)	%97
	ET-63	BRSV/TR/Erz/2014 (KY499619.1)	%99
		USII/S1 (KU159366.1)	%98
	ET-124	BRSV/TR/Erz/2014 (KY499619.1)	%99
		USII/S1 (KU159366.1)	%98
<b>BPIV-3</b>	ET-81	SD0805 (HQ530154.1)	%98
		HS9 (LC000638.1)	%97
	DO-48	TR-2007-B-AG2 (EU716137.1)	%99
<b>BVDV</b>	ET-64	TR80 (MH753468.1)	%98
		NADL (AJ133739.1)	%99
	ET-94	Singer Arj (DQ088995.2)	%97
		TR84 (MH753470.1)	%99
	ET-94	TR-2007-Gu-175454-4695 (EU716150.1)	%98
		TR16 (MG670546.1)	%96
<b>BoHV-1</b>	ET-121	Cooper (DQ173733.1)	%100
		KON-133-NS-TR2017 (MF458855.1)	%100

PCR uygulamasıyla pozitif olduğu belirlenen örneklerin dizi analizi verilerine MEGA7 programıyla uygulanan filogenetik analiz sonuçları aşağıda sunulmuştur.

#### **4.4.1. BRSV Nested RT-PCR Pozitif Örneklerle İlişkin Filogenetik Ağaç**

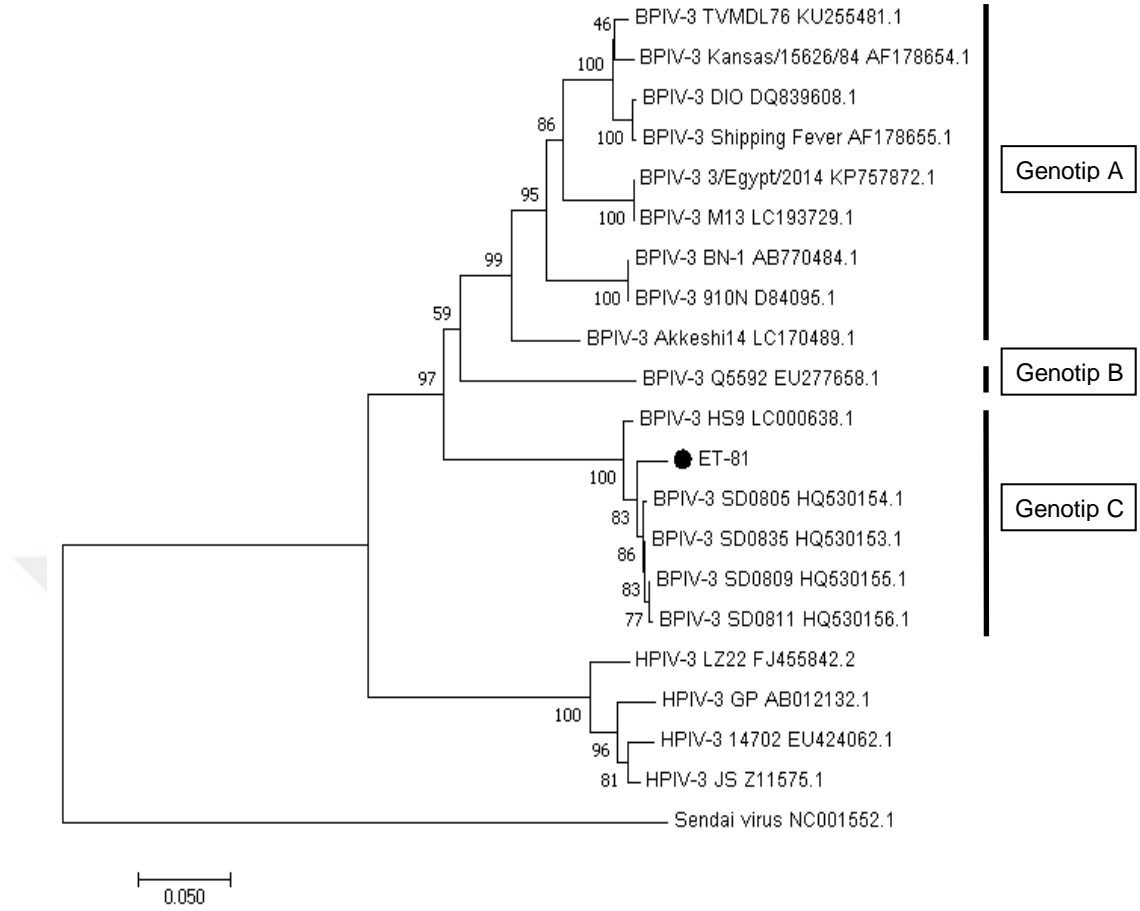
BRSV kısmi F gen bölgesine spesifik primerler aracılığıyla uygulanan RT-PCR metodu sonucunda pozitif bulunan toplam 5 adet örnekten 3 tanesi (DO-7, ET-63 ve ET-124) dizi analizi için seçildi. Yapılan filogenetik analiz sonucunda, bu çalışmada elde edilen DO-7, ET-63 ve ET-124 kodlu dizinlerin birbirleriyle yakın ilişkili olduğu belirlendi (Şekil 8).



**Şekil 8.** DO-7, ET-63 ve ET-124 kodlu örneklerin F gen bölgesine ait dizinlerle oluşturulan filogenetik ağacı.  
 “●” işaretli dizinler bu çalışmada elde edilmiştir.

#### 4.4.2. BPIV-3 Pozitif Örneğe İlişkin Filogenetik Ağaç

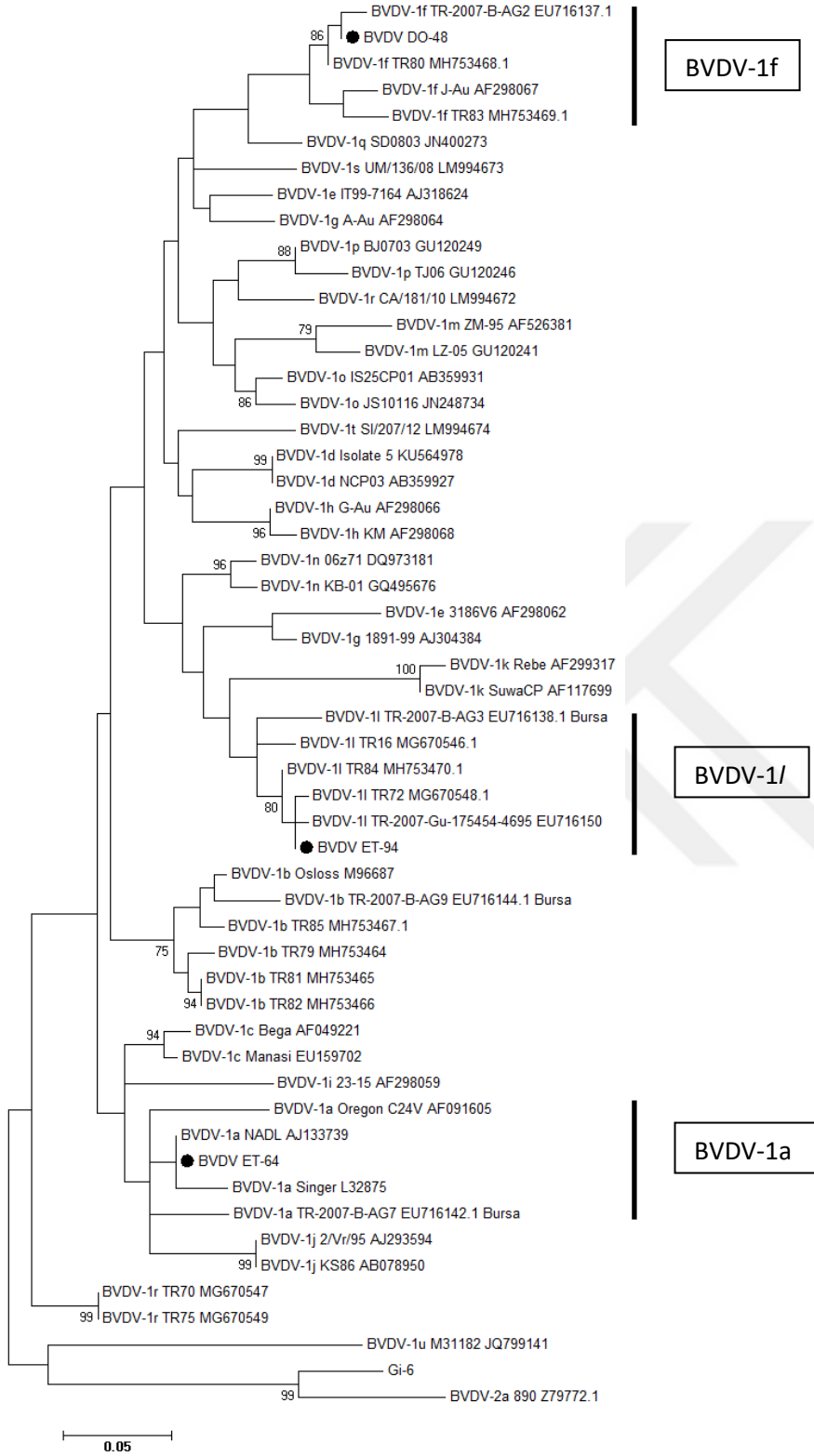
HN proteinini kodlayan gen bölgesine spesifik primerler aracılığıyla yapılan RT-PCR’la pozitif olduğu saptanan ET-81 kodlu izolatın filogenetik analizi sonucunda BPIV-3 genotip C’de yer aldığı tespit edildi (Şekil 9).



**Şekil 9.** ET-81 kodlu izolatinHN proteini gen bölgesine ait dizinle oluşturulan filogenetik ağacı. “●” işaretli dizin bu çalışmada elde edilmiştir.

#### 4.4.3. Panpestivirus RT-PCR Pozitif Örneklerle İlişkin Filogenetik Ağaç

Pestivirus 5'UTR gen bölgesine spesifik primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR sonucunda nükleik asit varlığı tespit edilen 5 adet örnekten 3 tanesi (DO-48, ET-64 ve ET-94 ) dizi analizi için seçildi. Yapılan filogenetik analiz sonucunda DO-48 kodlu dizinin BVDV-1f, ET-64 kodlu dizinin BVDV-1a ve ET-94 kodlu dizinin ise BVDV-1l alt gruplarında yer aldığı belirlendi (Şekil 10).

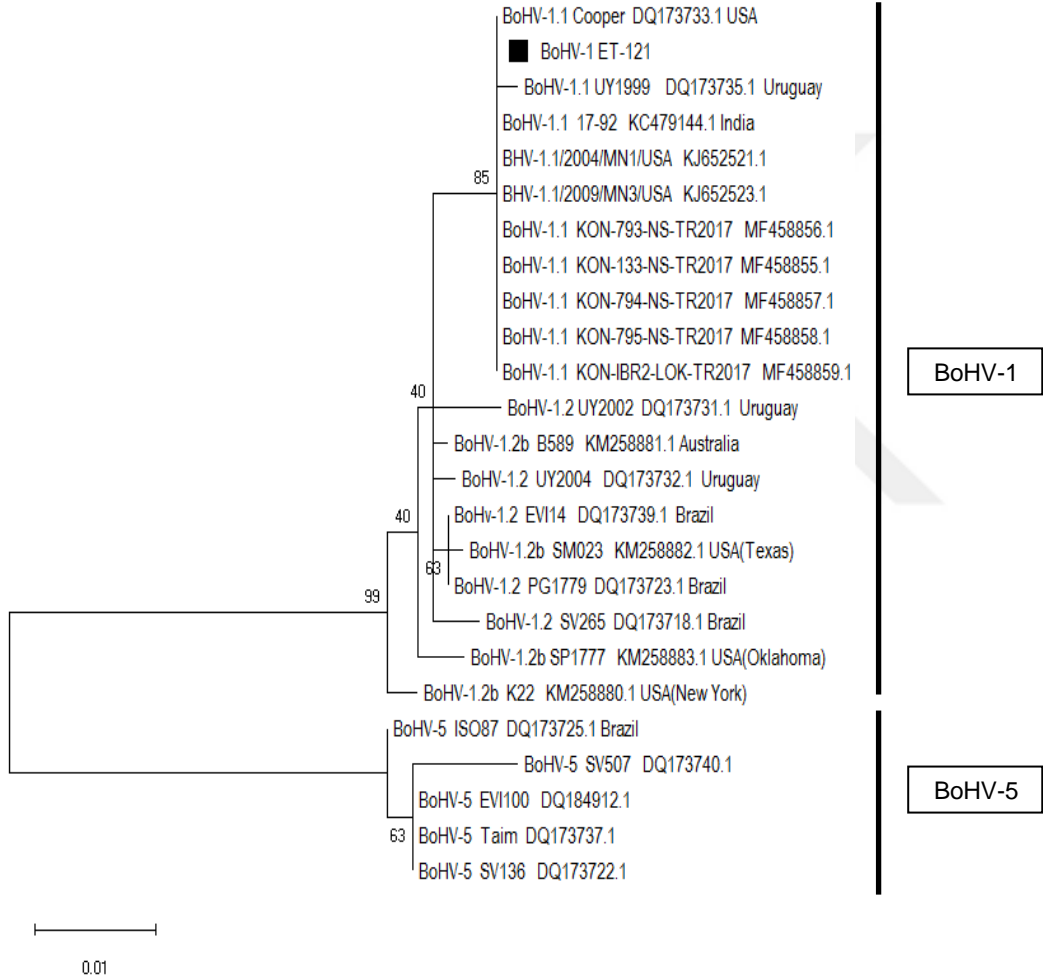


**Şekil 10.** DO-48, ET-64 ve ET-94 kodlu pestivirus pozitif örneklerin 5'UTR gen bölgesine ait dizinlerle oluşturulan filogenetik ağacı.

“●” işaretli dizinler bu çalışmada elde edilmiştir.

#### 4.4.4. BoHV-1 PCR Pozitif Örneğe İlişkin Filogenetik Ağaç

PCR sonucunda BoHV-1 nükleik asit varlığı tespit edilen ve aynı işletmeden elde edilen 2 adet örnekten güçlü bant veren 1 tanesi (ET-121) dizi analizi için seçildi. Elde edilen dizin verileri kullanılarak yapılan BoHV-1 gC gen bölgesine ait filogenetik analiz sonucunda ET-121 kodlu örneğin BoHV-1.1 alt grubunda yer aldığı tespit edildi (Şekil 11).



Şekil 11. ET-121 kodlu örneğin gC gen bölgesine ait dizinle oluşturulan filogenetik ağaç. "■" işaretli dizin bu çalışmada elde edilmiştir.

#### 4.5. İstatistiksel Analiz Sonuçları

Test edilen örneklerin pozitifliği bakımından, yalnızca BVDV ile BPIV-3 verileri ( $P=0,001$ ) ve BVDV ile BoHV-1 verileri ( $P=0.008$ ) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu saptandı ( $P<0,05$ ). Ayrıca tez çalışması kapsamında uygulanan test yöntemleriyle taranan viral etkenlerin en az birinin tespit edilebilmesi dikkate alındığında, akciğer örneklerinde saptanan pozitiflik oranı (11/60) nazal svab örneklerine (10/133) oranla istatistiki olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ( $P=0,026$ ;  $P<0,05$ ).



## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Yüksek ateş, hırıltılı solunum, öksürük, burun ve gözyaşı akıntısı ve kondüsyon kaybıyla seyreden sığırların solunum sistemi enfeksiyonları, sığır sürülerinde en sık rastlanan problemlerden biridir. Hastalık hafif seyreden klinik bulgularla başlasa bile enfeksiyona sebep olan solunum sistemi virusları immun sistemi baskılamakta ve etkilenen sığırlar sekonder bakteriyel enfeksiyonlara yatkın hale gelmektedir. Bu durum enfekte hayvanlarda hastalığın şiddetlenmesine ve ölümlerle sonuçlanmasına neden olabilmektedir. Solunum sistemi problemlerine bağlı olarak sığırlarda verim düşüklüğü, kondüsyon kaybı, karkas kalitesinde azalma, süt veriminde düşüş yanı sıra morbidite, mortalite, tedavi ve koruma maliyetleri nedeniyle önemli ekonomik kayıplar ortaya çıkmaktadır (Grifin, 1997; Irsik ve ark., 2006; Smith, 2000). Solunum sistemi problemlerinden kaynaklanan ekonomik kayıpları önlemek ve enfeksiyonları kontrol altında tutmak amacıyla hasta bireylerin zamanında ve doğru teşhisi önem taşımaktadır. Bu doğrultuda, hastalıktan korunma ve kontrol programlarının önemli basamaklarından biri olan “enfeksiyona neden olan etkenin belirlenerek elimine edilmesi” için laboratuvar testlerinden yararlanılır (Fulton ve Confer, 2012). Özellikle BRSV ve BPIV-3 gibi solunum sistemi viral etkenlerin enfeksiyonun erken dönemlerinde saçılması sebebiyle sığır solunum sistemi enfeksiyonlarında, tanısal testlerin klinik bulguların başlangıç evresinde uygulanması başarı şansını arttırmaktadır. Viral etkenlerin tespiti amacıyla virus izolasyonu yöntemi, moleküler tabanlı testlerin geliştirilmesine kadar geleneksel tanı yöntemi olarak yaygın bir kullanım alanı bulmuştur. Ancak virus izolasyonunda, test sonuçlarının değerlendirme sürecinin 2-3 haftaya kadar uzaması durumunda, hasta hayvanda miks enfeksiyonların oluşması ve hastalık seyrinin ağırlaşması söz konusu olabilmektedir (Montgomery, 2009). Günümüzde ise hızlı ve güvenilir sonuçlar veren PCR tabanlı testler ve ELISA gibi antijen tespitine yönelik yöntemler geleneksel tanı yöntemlerinin yerini almaktadır (Fulton ve Confer, 2012; Montgomery, 2009).

Tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de sığır solunum sistemi enfeksiyonları yaygın olarak görülmektedir. Örneğin, Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Klinikleri'ne 1990-2000 yılları arasında 1646 adet sığır tedavi için getirilmiş ve %25,46'sında solunum sistemi hastalıkları saptanmıştır (Kennerman ve ark., 2003). Sığır solunum sistemi enfeksiyonlarının Türkiye'deki durumu birçok serolojik ve virolojik çalışma ile ortaya konulmuştur (Alkan ve ark., 1997; Alkan ve ark., 2000; Çabalar ve Can Şahna, 2000; Çabalar ve Karaoğlu, 1999; Gencay ve ark., 2009; Okur ve ark., 2007; Öner ve Yeşilbağ, 2018; Yavru ve ark., 2005; Yeşilbağ ve Güngör, 2008; Yeşilbağ ve ark., 2014; Yıldırım ve Burgu, 2005). Söz konusu çalışmalarda BRSV, BPIV-3, BVDV ve BoHV-1 etkenlerinin seroprevalansı sırasıyla %40-100, %18-99, %41-86, %17-98 değerleri arasında tespit edilmiştir.

Bu tez çalışmasında temel olarak, daha önceki çalışmalarda ülkemizdeki varlığı bildirilmiş olan BRSV, BPIV-3, BVDV ve BoHV-1 etkenlerinin, moleküler yöntemlerle tespitinin yapılması ve elde edilen ürünlerin genetik olarak karakterize edilmesi amaçlanmıştır. Ayrıca moleküler çalışmalara paralel olarak söz konusu etkenlerin konvansiyonel virolojik yöntemler aracılığıyla da tespit edilerek, klinik ve nekropsi örneklerinden saha izolatlarının elde edilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçlar doğrultusunda Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı'na gönderilen toplamda 133 burun svabı örneği değerlendirildi. Ayrıca Viroloji Anabilim Dalı'na rutin teşhis için gönderilen sığır akciğerlerine ek olarak, kesim için mezbahaya sevk edilen ve solunum sistemi klinik bulguları gösteren sığırlardan elde edilen toplamda 60 akciğer doku örneği de test edildi. Elde edilen örnekler moleküler çalışmalar kapsamında BRSV, BPIV-3, BVDV ve BoHV-1 etkenleri yönünden PCR; konvansiyonel virolojik yöntemler kapsamında ise virus izolasyonu, immunoperoksidaz testi, ELISA ve hemadsorbsiyon testiyle incelenmiştir.

Uygulanan testler doğrultusunda, en az bir test yöntemi ile pozitif bulunan örneklerle ilişkin sonuçlar Tablo 7 ve Tablo 9'da ayrıntılı olarak verilmiştir. Bu bilgiler doğrultusunda uygulanan teşhis yöntemlerinden en az biri aracılığıyla toplamda değerlendirilen 193 adet örnekten 5'i (%2,59) BRSV, 1 (%0,52) nazal svab örneği BPIV-3, 13'ü (%6,74) pestivirus ve 2 (%1,04) nazal svab örneği BoHV-



1 pozitif olarak saptanmıştır. Ayrıca 193 adet hayvanın PCR sonuçlarına göre %6,7'sinde (n=13) kontrol edilen viruslardan kaynaklanan solunum sistemi enfeksiyonu varlığı tespit edilmiştir (Tablo 6). Avustralya'da yürütülen bir çalışmada, 1484 adet nazal svab örneğinin %6,5'i (n=97) kantitatif RT-PCR yöntemiyle BRSV, BPIV-3, BVDV ve BoHV-1 varlığı yönünden pozitif olarak tespit edilmiştir (Moore ve ark., 2015). Söz konusu çalışma ile bu tez çalışmasından elde edilen veriler birbiriyle uyumlu görülmektedir. Türkiye'de Alkan ve ark. (2000) tarafından yürütülen bir çalışmada 95 adet solunum sistemi problemlisi sığırdan toplanan nazal svab örnekleri BRSV, BPIV-3, BVDV ve BoHV-1 varlığı yönünden direkt immunofloresan tekniğiyle incelenmiş ve %20,0'si (n=19) en az bir viral antijen varlığı yönünden pozitif olarak saptanmıştır. İrlanda'da sığırların solunum sistemi enfeksiyonu salgınında toplanan 1364 adet nazal svab örneğine uygulanan real-time PCR metodu sonucunda, örneklerin %29,7'si BRSV, BPIV-3, BVDV ve BoHV-1 varlığı yönünden pozitif olarak bildirilmiştir (O'Neill ve ark., 2014). Yapılan çalışmalarda belirlenen prevalans değerlerindeki farklılıklar örneklenen hayvanlardaki yaş aralıkları, örnekleme dönemleri ve/veya uygulanan teşhis yöntemlerinin duyarlılıklarına bağlı olarak farklılık gösterebilmektedir. Ayrıca farklı ülkelerdeki yetiştirme sistemleri, hayvan hareketleri ve sağlık uygulamalarındaki değişiklikler de önemli bir etken olarak göz önünde bulundurulmalıdır.

### **5.1. BRSV Tespitine Yönelik Çalışmaların Değerlendirilmesi**

Tüm dünyada ve Türkiye'de sığırların solunum sistemi enfeksiyonlarında, BRSV'in etkin bir rol oynadığı farklı teşhis metotları kullanılarak ortaya konulmuştur (Alkan ve ark., 2000; Falsey ve ark., 2002; Fulton ve ark., 2016; Kimman ve ark., 1986; Öner ve Yeşilbağ, 2018; Roshtkhari ve ark., 2012; Valarcher ve ark., 2000; Yavru ve ark., 2005; Yeşilbağ ve Güngör, 2008). Bu tez çalışmasında Bursa ve komşu illerdeki solunum sistemi problemlisi 193 adet sığırdan sağlanan 133 nazal svab ve 60 akciğer dokusu örneğinden MDBK hücre kültüründe yapılan virus izolasyonu çalışmalarında BRSV saha izolatu elde edilememiştir.

Fulton ve ark. (2016), solunum sistemi problemlisi sığırlardan topladıkları toplam 121 nazal svab ve akciğer doku örneğinde PCR metodu ile BRSV varlığını saptarken, örneklerden virus izolasyonu yapamamışlardır. Smith ve ark. (1975),

klirik 6rneklerde BRSV izolasyonu ve karakterizasyonu amacıyla yaptığı bir çalışmada, 5 nazal svab 6rneğinden 2'sinde CPE saptamıştır. Bu 6rneklerden birinde inokulasyon sonrası 5. g6nde (1. pasaj) CPE belirlenirken, diğerinin 5. pasaj seviyesinde ve inokulasyonunun 12. g6n6nde CPE oluşturduğu tespit edilmiştir. Virus çoğalmasının yavaş olması nedeniyle BRSV için virus izolasyon çalışmaları zahmetlidir ve h6cre k6lt6r6nde CPE saptanması için uzun pasajlama işlemlerine t6bi tutulması gerekmektedir. Ayrıca izolasyon çalışmaları virusun aşırı labil olması nedeniyle çoğunlukla başarısız olmaktadır (Smith ve ark., 1975; Kimman ve ark., 1986). Bu durum, mevcut tez çalışmasında BRSV izolasyonunda başarısız olunmasını açıklar niteliktedir.

BRSV izolasyonunun, farklı tespit y6ntemleri ile karşılaştırmasının yapıldığı birçok çalışma bulunmaktadır. Kimman ve ark. (1986) tarafından yapılan bir çalışmada, solunum sistemi bulguları g6steren 32 adet buzağının akciğer lavaj sıvıları test edilmiş ve 21 tanesi immunofloresan testi aracılığıyla BRSV pozitif olarak saptanmış, s6z konusu 21 6rnekten 17'sinde ise h6cre k6lt6r6ndeki virus izolasyonu çalışmaları başarılı sonuç vermiştir. West ve ark. (1998) deneysel olarak enfekte edilen sığırılarda BRSV tespiti için ELISA ve RT-PCR y6ntemlerinin virus izolasyonuna iyi bir alternatif ve oldukça duyarlı olduğunu bildirmiştir. Valarcher ve ark. (1999) deneysel enfeksiyonlarda BRSV etkeninin enfeksiyon başlangıcını takiben virus izolasyonu y6ntemiyle 5. g6ne kadar, RT-PCR tekniği ile 13. g6ne kadar tespit edilebildiğini belirlemişlerdir. Yine aynı çalışmada 132 adet doğal enfekte buzağı da test edilerek; RT-PCR y6nteminin ELISA, indirekt immunofloresan ve virus izolasyon y6ntemlerine g6re daha duyarlı olduğu ve en az bu testler kadar 6zg6l olduğu tespit edilmiştir. BRSV ile yakın antijenik ilişki içinde olan HRSV etkeni için teşhis y6ntemlerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada, akut enfekte yetişkin bireylerde RT-PCR y6nteminin virus izolasyonuna g6re daha duyarlı olduğu ve en iyi tespit y6ntemi olduğu bildirilmiştir (Falsey ve ark., 2002). S6z konusu alışmalar BRSV etkeni için virus izolasyonun zorluğunu ve diğer y6ntemlere kıyasla daha az duyarlı olduğunu g6stermektedir.

RT-PCR yöntemi kullanılarak BRSV suşlarını daha iyi sınıflandırabilmek için, genetik ve antijenik heterojenite nedeniyle G proteini, nükleoprotein (N protein) ve füzyon (F) proteini hedef olarak kullanılabilir (Valarcher ve ark., 2000). Almeida ve ark. (2005) tarafından, F (B3 ve B4A primer çifti) ve G (B7A ve B8 primer çifti) gen bölgesine spesifik primerlerin kıyaslaması yapılmış ve G genine spesifik primerlerinin nested RT-PCR'daki duyarlılığı 100 kat daha fazla olarak bulunmuştur. G (B7-B8), F (B1-B2) ve N (N4F-N4R; NNR) gen bölgelerinin karşılaştırmasının yapıldığı başka bir çalışmada, F ve N gen bölgelerine spesifik primerlerin G gen bölgesine göre daha az duyarlı olduğu ve HRSV etkeni ile çapraz reaksiyon verdiği tespit edilmiştir (Socha ve Rola, 2011). Ancak bu çalışmada (Socha ve Rola, 2011), F gen bölgesine spesifik olarak seçilen primerler Vilcek ve ark. (1994) tarafından bildirilen nested RT-PCR'ın birinci evre primeri (B1 ve B2)'dir. Söz konusu primerlerin HRSV ile çapraz reaksiyon verdiği daha öncede bildirilmiş bir veridir (Vilcek ve ark., 1994).

Oberst ve ark. (1993a), F gen bölgesine spesifik primerler kullanarak RT-PCR metodu ile BRSV ve keçilerin RSV etkenleri arasında çapraz reaksiyon saptarken, BRSV F geni primerlerinin HRSV ve koyunların RSV genomunu tespit etmediğini saptamıştır. Farklı bir çalışmada (Oberst ve ark., 1993b) yine F gen bölgesine spesifik primer çiftinin BRSV'nin birçok suşunu (Nedrasca, Kuzey Karolina, Kuzey ve Güney Dakota, Colorado, Newyork) tespit etmesinin yanı sıra, HRSV ile BRSV ayrımını da başarılı bir şekilde gerçekleştirdiği belirlenmiştir. Eleraky ve ark. (2003) tarafından yapılan bir çalışmada, BRSV etkeninin F gen bölgesinin daha az değişken olduğu ve bu nedenle tanısal testlerin tasarımı için daha uygun bir hedef olacağı değerlendirilmektedir. Bu bilgiler göz önüne alınarak tez çalışmasında BRSV teşhisi için Tablo 2'de ayrıntıları verilen ve F gen bölgesine spesifik olan primerler kullanılarak nested RT-PCR metodu uygulanmıştır.

Bu tez çalışmasında toplamda 193 adet nazal svab ve akciğer dokusu örneğine uygulanan nested RT-PCR metodu sonucuna göre örneklerin %2,59'unda (n=5; 2 nazal svab ve 3 akciğer örneği) BRSV varlığı tespit edilmiştir.

BRSV-F genine spesifik primerler kullanılarak yapılan RT-PCR metodu aracılığıyla birçok ülkede BRSV'nin moleküler olarak varlığı saptanmıştır. Çek

Cumhuriyeti'nde yapılan bir çalışmada iki farklı sürüden farklı zamanlarda test edilen toplam 14 adet nazal svab örneğinin tümü RT-PCR'da BRSV yönünden pozitif bulunmuştur (Valentova ve ark., 2003). Vilcek ve ark. (1994) tarafından İsveç'te yapılan bir çalışmada, hem F geni hem de G gen bölgesi primerleri ile 35 adet nazal svab örneği test edilmiş ve örneklerin %89'u (n=31) her iki primer çiftiyle de pozitif olarak saptanmıştır. Danimarka'daki sığırlarda yapılan bir çalışmada 135 adet akciğer dokusu örneği BRSV varlığını tespit etmek amacıyla antijen-ELISA yöntemiyle test edilmiş ve %17,04'ü(n=23) pozitif bulunmuştur. Aynı örnekler RT-PCR metoduyla da taranmış ve ELISA'da pozitif bulunan 23 örneğe ek olarak 10 örnek daha (%24; n=33) pozitif olarak saptanmıştır (Larsen ve ark., 1999). Söz konusu çalışmalar ile sunulan tez çalışması sonuçları karşılaştırıldığında, mevcut çalışmada saptanan BRSV prevalansının düşük olduğu görülmektedir.

O'Neill ve ark. (2014) tarafından İrlanda'da yürütülen bir çalışmada, 2008-2012 yılları arasındaki solunum sistemi salgını vakalarında 1364 nazal svab örneği, RT-PCR (F geni) metodu ile incelenmiş ve örneklerin %11,6'sında BRSV nükleik asiti tespit edilmiştir. Sürülerde respiratorik hastalıkların etiyolojisinin araştırıldığı bir çalışmada 40 farklı sürüdeki buzağılardan toplamda 396 trakeabronşial lavaj örneği toplanmış ve örneklerin %9'u (n=34) nested RT-PCR'la BRSV pozitif olarak saptanmıştır (Autio ve ark., 2007). Solunum sistemi tedavisinin başlangıç aşamasında olan sığırlardan toplanan 114 nazal svab ve 7 akciğer doku örneği olmak üzere toplam 121 örnekte BRSV prevalansı %8,3 (n=10; 9 nazal svab ve 1 akciğer örneği) olarak belirlenmiştir (Fulton ve ark., 2016). Avustralya'dan Orta Asya ve Rusya'ya ihraç edilen 1484 sığırın nazal svab örneklerine uygulanan kantitatif RT-PCR sonucunda, %1,2'sinde BRSV nükleik asiti varlığı tespit edilmiştir (Moore ve ark., 2015). Türkiye'de yapılan bir moleküler çalışmada, Erzurum bölgesinde toplanan 155 örneğin (127 nazal svab ve 28 akciğer dokusu) %1,29'unda (n=2) BRSV varlığı saptanmıştır (Timurkan ve ark., 2016). Türkiye'nin birçok farklı ilinden toplanan 95 nazal svab örneğinin direkt immunofloresan tekniğiyle BRSV varlığı yönünden test edildiği bir çalışmada (Alkan ve ark., 2000) ise, örneklerin %2,15'inde (n=2) pozitiflik bildirilmiştir. Türkiye'de yapılan bu çalışmalarda elde edilen veriler, tez çalışmasının verileriyle daha yakın değere sahiptir.

Tez çalışması kapsamında elde edilen DO-7, ET-63 ve ET-124 kodlu dizinlerin filogenetik analizleri sonucunda tamamının aynı dalda (cluster) yer aldığı belirlenmiştir. Ayrıca daha önce Timurkan ve ark. (2016) tarafından Erzurum ilinde bildirilmiş dizinle yakın olduğu görülmüştür (Şekil 8). Elde edilen dizinlerin nükleotid BLAST veri tabanında incelenmesi sonucunda (Tablo 11) daha önce veri girişi yapılmış Türkiye diziniyle %98-99 oranında benzerlik göstermesi ülkemizde sahada sirküle olan BRSV etkenlerinin birbirine yakın olduğunu destekler niteliktedir.

## **5.2. BPIV-3 Tespitine Yönelik Çalışmaların Değerlendirilmesi**

Sığır solunum sistemi enfeksiyonlarında BPIV-3'ün etkin olarak rol aldığı bilinmektedir (Autio ve ark., 2007; Fulton ve ark., 2016; Moore ve ark., 2015; O'Neill ve ark., 2014; Thanthrige-Don ve ark., 2018). Son yıllarda tüm dünyada BPIV-3'ün moleküler teşhis yöntemleriyle tespiti ve genotipik sınıflandırmasının yapıldığı çalışmalar önem kazanmaktadır (Horwood ve ark., 2008; Ohkura ve ark., 2013; Wen ve ark., 2012; Zhu ve ark., 2011). Türkiye'deki parainfluenza-3 virus enfeksiyonlarının varlığı seroprevalans çalışmalarıyla (Alkan ve ark., 1997; Çabalar ve Can Şahna, 2000; Okur ve ark., 2007; Öner ve Yeşilbağ, 2018; Yavru ve ark., 2005; Yeşilbağ ve Güngör, 2008; Yıldırım ve Burgu, 2005), immunofloresan tekniği aracılığıyla virolojik olarak (Alkan ve ark., 2000) ve histopatolojik olarak (Çeribaşı ve ark., 2012; Yener ve ark., 2005; Yüzbaşıgil 2010) ortaya konulmuştur.

BPIV-3 için geliştirilen RT-PCR yöntemlerinde kullanılan primerler genellikle virusun korunmuş gen bölgelerine spesifik olarak tasarlanmaktadır. Monoklonal antikorlar kullanılarak insan (HPIV-3) ve sığır parainfluenza-3 virusları arasındaki antijenik farkların araştırıldığı bir çalışmada, HN proteinin 5 epitopunda farklılık görülürken, F ve N proteinlerinin ise birer epitopunda antijenik farklılık saptanmıştır (Klippmark ve ark., 1990). Vaucher ve ark. (2008), HN proteinine spesifik primerler kullanarak RT-PCR metoduyla 3 adet Brazilya izolatı ve SF-4 suşunu başarılı bir şekilde tespit etmiş ve primerlerin HPIV-3 ile çapraz reaksiyon vermediğini göstermiştir. Bu nedenle BPIV-3'ün RT-PCR aracılığıyla tespiti için korunmuş gen bölgelerinden biri olan HN proteinine spesifik primerler tercih edilmektedir.

Bu tez çalışmasında 133 nazal svab ve 60 akciğer dokusu örneği olmak üzere toplamda 193 örnek, Tablo 3'te ayrıntıları verilen HN gen bölgesine spesifik primer çifti kullanılarak RT-PCR protokolüne tâbi tutulmuş ve örneklerin %0,52'si (1 nazal svab) pozitif olarak saptanmıştır. Söz konusu örnekten MDBK hücre hattında yapılan virus izolasyonu çalışmasıyla viral izolat elde edilmiştir (Resim 2). Ayrıca virus identifikasyonu için yapılan hemadsorbsiyon testinde de pozitif sonuç saptanmıştır (Resim 4).

BPIV-3 enfeksiyonunun laboratuvar teşhisinde klasik olarak hücre kültüründe virus izolasyonu yöntemi uygulanmaktadır. Virus tipik olarak sınırsız oluşumu, lizis ve sitoplazmik inklüzyon oluşumu ile karakterize sitopatolojik etkiler göstererek üremektedir (Waner, 1999). Virus identifikasyonunun doğrulanması hemagglütinasyon (Minnich ve Ray, 1987) veya immunofloresan testleri (McFerran ve McNulty, 1981) ile de yapılabilmektedir. İndirekt floresan antikor ve hemadsorbsiyon testinin karşılaştırıldığı bir çalışmada, sığır embriyonik akciğer (BEL) hücre kültürüne inokulasyonu takiben 16. saatten itibaren hücre yüzeyine yerleşen antijenlerin her iki testle de tespit edildiği ve testlerin birbirine yakın sonuçlar verdiği gösterilmiştir (Toth ve Jankura, 1990). Thonur ve ark. (2012) tarafından yapılan bir çalışmada nazal svab, bronkoalveolar lavaj ve akciğer doku örneklerinde BPIV-3 varlığının tespiti için one-step multipleks real time RT-PCR sonuçlarının, indirekt immunofloresan tekniği ve virus izolasyonuna kıyasla daha duyarlı olduğu tespit edilmiştir.

Maidana ve ark. (2012), Arjantin'deki asya mandalarından (*Bubalus bubalis*) toplanan 12 nazal svab örneğinde, M proteinini kodlayan gen bölgesine spesifik primerler aracılığıyla yaptığı RT-PCR sonucunda 1 örnekte (%8,3) pozitiflik saptamıştır. Ayrıca MDBK hücre kültüründe yapılan virus izolasyonu sonucunda örneklerin ikinci pasajının üçüncü gününde ilk sitopatolojik etkileri tespit etmişlerdir. Sobhy ve ark. (2017) tarafından Mısır'daki sığırlar üzerinde yürütülen bir çalışmada 12 adet sporadik vakadan elde edilen nazal svab örneklerinin 8'inde (%66,7) hem MDBK hücre kültüründe virus izolasyonu yapılmış, hem de one-step RT-PCR aracılığıyla BPIV-3 nükleik asiti varlığı tespit edilmiştir. Bu çalışmada elde edilen veriler, daha önce yapılan çalışmalar ile karşılaştırıldığında prevalans değerleri

arasında farklılık olsa da, RT-PCR ile pozitif saptanan örneklerden virus izolasyonunda başarılı sonuçlar alınması açısından benzerlik göstermektedir.

Kanada'da sığır solunum ve sindirim sistemi viruslarının eş zamanlı olarak araştırılmasını amaçlayan bir çalışmada, 12 nazal svab ve 2 akciğer dokusu olmak üzere toplam 14 örneğin %21'inde (n=3) M proteini spesifik primerlerle BPIV-3 varlığı tespit edilmiştir (Thanthrige-Don ve ark., 2018). İrlanda'da solunum sistemi salgını vakalarında toplanan 1364 nazal svab örneğinin real time RT-PCR metoduyla incelenmesi sonucunda %7'sinde BPIV-3 pozitifliği saptanmıştır (O'Neill ve ark., 2014). Autio ve ark. (2007), sürülerde respiratorik hastalıkların etiyojisini araştırmak için 40 farklı sürüden toplamda 396 trakeabronşial lavaj örneği toplamış ve örneklerin yaklaşık %4'ünü (n=15) BPIV-3 nükleik asidi açısından pozitif olarak belirlemiştir. Thonur ve ark. (2012) tarafından, 2009-2012 yılları arasında toplanan örneklerde, one-step multipleks real time RT-PCR metodu uygulanarak 136 nazal svab örneğinin 4'ünde (%2,94), 106 akciğer örneğinin 7'sinde (%6,60) ve 19 bronkoalveolar lavaj örneğinin 2'sinde (%10,53) BPIV-3 varlığı tespit edilmiştir. BPIV-3 prevalansı açısından söz konusu çalışmalar sonucunda elde edilen verilerin, tez çalışması sonuçlarına kıyasla daha yüksek olduğu görülmektedir. Timurkan ve ark. (2016) tarafından Erzurum'da yürütülen bir çalışmada, 155 örnek (127 nazal svab ve 28 akciğer doku örneği) BPIV-3 yönünden RT-PCR yöntemiyle incelenmiş ve 3'ünde (%1,93) pozitiflik belirlenmiştir. Bu tez çalışmasında elde edilen veriler ve Timurkan ve ark. (2016)'ın verileri birlikte ele alındığında BPIV-3 prevalans sonuçlarının birbirine yakın olduğu değerlendirilmektedir.

Moore ve ark. (2015) tarafından Avustralya'dan ihraç edilen 1484 adet sığır, solunum sistemi etkenleri açısından kantitatif RT-PCR'la taranmıştır. Test sonucunda BPIV-3 (M proteini) etkeninin nazal örneklerdeki prevalansı %1,4 olarak saptanmıştır. Fulton ve ark. (2016) solunum sistemi tedavisinin başlangıç aşamasında olan sığırlardan 114 nazal ve 7 akciğer örneği toplamış ve BPIV-3'ün F geni spesifik primerleri aracılığıyla yaptığı RT-PCR sonucunda yalnızca 1 adet nazal svab örneğini (%0,82) pozitif olarak saptamıştır. Tez çalışması kapsamında değerlendirilen nazal svab ve akciğer dokusu örneklerinden yalnızca 1 adet nazal

svab örneğinde pozitiflik saptanmasına karşın, akciğer dokus örneklerinde BPIV-3 tespit edilememesi, Fulton ve ark. (2016)'ın çalışması ile benzerlik göstermektedir.

Günümüzde BPIV-3'ün BPIV-3a, BPIV-3b ve BPIV-3c olmak üzere üç farklı genotipi tanımlanmıştır. BPIV-3a suşları, ilk olarak Kuzey Amerika'da (Bailly ve ark., 2000; Qian ve ark., 2009; Reisinger ve ark., 1959) daha sonra Çin (Wen ve ark., 2012), Japonya (Ohkura ve ark., 2013) ve Mısır'da (Sobhy ve ark., 2017) bildirilmiştir. BPIV-3b, ilk olarak Avustralya'da tespit edilmiştir (Horwood ve ark., 2008). BPIV-3c'nin izolasyonu ise ilk olarak Çin'de (Zhu ve ark., 2011) daha sonra Güney Kore (Oem ve ark., 2013) ve Japonya'da (Konishi ve ark., 2014) yapılmıştır. Ayrıca Maidana ve ark. (2012) tarafından Arjantin'deki Asya mandalarında (*Bubalus bubalis*) yapılan bir çalışmada, BPIV-3'ün üç genotipi de rapor edilmiştir. Neill ve ark. (2015) tarafından yapılan bir çalışmada ise, ABD'de yalnızca BPIV-3a genotipinin değil, BPIV-3b ve 3c genotiplerinin de sirkülasyonda olduğu tespit edilmiştir.

Zhu ve ark. (2011) tarafında Çin'de gerçekleştirilen çalışmada sığırlardan 63 adet nazal svab toplanmış ve HN proteinine spesifik BPIV-3 primerleri aracılığıyla %6,35'inde (n=4) viral nükleik asit varlığı tespit edilmiştir. Wen ve ark. (2012), 100 adet nazal svab örneğinde HN spesifik primerleri kullanarak yaptığı RT-PCR sonucunda bir adet örnekte BPIV-3 varlığı saptamıştır. Bu iki çalışma sonucunda Çin'de BPIV-3'ün iki farklı genotipinin (genotip A ve C) sirkülasyonda olduğu gösterilmiştir.

Bu tez çalışmasında elde edilen ET-81 numaralı izolatin filogenetik analizi sonucunda Japonya ve Çin izolatları ile yakın ilişkili olduğu ve BPIV-3c genotipinde yer aldığı saptanmıştır (Şekil 9). Türkiye'de saha örneklerinde BPIV-3 viral nükleik asiti tespiti Timurkan ve ark. (2016) ve Albayrak ve ark. (2018) olmak üzere iki farklı araştırma grubu tarafından bildirilmiştir. Her iki çalışmanın verileri bu tez çalışması ile benzerlik göstermekte ve Türkiye'de BPIV-3c genotipinin sirkülasyonda olduğunu desteklemektedir.



### 5.3. Pestivirus Tespitine Yönelik Çalışmaların Değerlendirilmesi

BVDV, sığırlarda akut enfeksiyon yanı sıra persiste enfeksiyon ve mukoza hastalığı gibi önemli problemlere neden olan bir etkidir. BVDV pnöymopatojenik bir etkidir ve immunsupresyon oluşturma özelliğinden dolayı sığırlarda solunum sistemi enfeksiyonlarının şiddetinin artmasına neden olmaktadır (Hay ve ark., 2016; Potgieter ve ark., 1995). Türkiye’de BVDV enfeksiyonlarının durumu serolojik ve virolojik olarak birçok çalışma ile ortaya konulmuştur (Alkan ve ark., 1997; Alkan ve ark., 2000; Alpay ve ark., 2014; Aslan ve ark., 2015; Burgu ve ark., 1999; Burgu ve ark., 2003; Okur ve ark., 2007; Öner ve Yeşilbağ, 2018; Özgünlük ve Yıldırım, 2017; Özkul ve ark., 2002; Tan ve ark., 2006; Tuncer-Göktuna ve ark., 2016; Tuncer-Göktuna ve Yeşilbağ, 2017; Yavru ve ark., 2005; Yeşilbağ ve Güngör, 2008). Ayrıca ülkemizde BVDV’nin solunum sistemi enfeksiyonlarındaki rolüne ilişkin birçok araştırma da bulunmaktadır (Alkan ve ark., 2000; Özkaraca ve Timurkan, 2016; Yeşilbağ ve ark., 2014).

Tez çalışması kapsamında solunum sistemi enfeksiyonu bulgularına sahip toplam 193 sığıra ait nazal svab ve akciğer doku örneklerine BVDV antijen ELISA, panpestivirus RT-PCR, virus izolasyonu ve immunoperoksidaz testleri uygulanmıştır. Yapılan testler sonucunda 10 örnek BVDV antijen ELISA pozitif, 5 örnek RT-PCR pozitif ve 2 örnek virus izolasyonunda pozitif olarak tespit edilmiştir. Genel olarak değerlendirildiğinde ise, toplam 13 (%6,74; 13/193) örnek (5 nazal svab ve 8 akciğer örneği) en az bir tespit yöntemiyle BVDV pozitif olarak belirlenmiştir. Ayrıca BVDV’ye ilişkin verilerle tez çalışması kapsamında taranan diğer virüslere ilişkin veriler arasında anlamlı düzeyde istatistiksel fark saptanması ( $P<0,05$ ), sığırlarda solunum sistemi enfeksiyonuna sebep olan etkenler arasında BVDV’nin önemli bir yer tuttuğunu göstermektedir.

BVDV’nin tespitinde kullanılan yöntemlerin birbirlerine göre duyarlılığı ve özgüllüğünü karşılaştıran birçok çalışma mevcuttur. BVDV tespiti için virus izolasyonunu “altın standart” olarak bildiren çalışmalar (Saliki ve Dubovi, 2004) olmasına rağmen, günümüzde RT-PCR kullanımının yaygınlaşması ve daha ucuz, az zahmetli, hızlı ve güvenilir sonuçlar vermesi nedeniyle moleküler yöntemler daha çok tercih edilmeye başlanmıştır. Sığır kan örneklerinde BVDV varlığını tespit

etmek için virus izolasyonu ve PCR metotlarının kıyaslandığı çalışmalarda paralel ya da PCR metodunun daha duyarlı olduğuna yönelik sonuçlar elde edilmiştir (Deregt ve ark., 2002; Laamanen ve ark., 1997; Özkul ve ark., 2002; Renshaw ve ark., 2000). Deri ve kan serumu örneklerinde BVDV tespiti için yapılan karşılaştırmalı bir çalışmada immunohistokimya, iki farklı ticari antijen ELISA kiti ve real time RT-PCR birbiriyle paralel sonuçlar verdiği bildirilmiştir (Hilbe ve ark., 2007). RT-PCR, ELISA ve immunoperoksidaz yöntemlerinin karşılaştırıldığı başka bir çalışmada ise, 169 klinik örnekten RT-PCR yöntemiyle 42'si, ELISA yöntemiyle 32'si ve immunoperoksidaz yöntemiyle de 20'si BVDV pozitif olarak bulunmuştur (Horner ve ark., 1995). Farklı teşhis materyallerinin (serum, tam kan, deri) farklı test yöntemleriyle karşılaştırılmalı olarak incelendiği bir araştırmada, serum örneklerinde ELISA'nın virus izolasyonu ve RT-PCR metodundan; tam kan örneklerinde RT-PCR'in virus izolasyonundan; deri örneklerinde ise ELISA'nın immunohistokimyasal tespit yönteminden daha duyarlı olduğu bildirilmiştir (Edmondson ve ark., 2007). VanderLey ve ark. (2011) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, persiste enfekte hayvanlarda BVDV'nin tespitinde kulak çentiği, nazal svab ve kuyruk derisi biyopsi örneklerinin serum, göz, ağız, rektal ve vajinal svab örneklerine kıyasla daha güvenli ve duyarlı sonuçlar verdiği tespit edilmiştir. Bu durum, BVDV tespiti için kullanılan yöntemler yanı sıra kullanılan test materyallerinin de sonuçları etkileyebileceğini göstermektedir. Tez çalışması kapsamında uygulanan BVDV teşhis metotları aracılığıyla svab örneklerine kıyasla akciğer doku örneklerinde daha yüksek virus varlığı tespit edilsede, alınan svab ve doku örneklerinin aynı hayvandan olmaması nedeniyle kesin bir değerlendirme yapılamayacağı düşünülmektedir.

Tuncer-Göktuna ve Yeşilbağ (2017) tarafından yürütülen bir çalışmada 246 adet klinik örnekten (11 serum, 100 nazal svab, 19 okuler svab, 39 akciğer örneği ve 77 abort materyali) ELISA yöntemiyle 70'i, immunoperoksidaz yöntemiyle 28'si, RT-PCR yöntemiyle de 19'u BVDV pozitif olarak saptanmıştır. Bu tez çalışmasında ise 193 örneğin (133 nazal svab ve 60 akciğer örneği) 10'u ELISA, 5'i RT-PCR ve 2'i de immunoperoksidaz yöntemleriyle BVDV pozitif olarak tespit edilmiştir. Test sonuçlarındaki bu farklılıkların nedeni; örneklerdeki olası virus inhibitörlerinin varlığına ve RNase aktivitelerine bağlı olabilmektedir (Özkul ve ark., 2002).

Birbirleriyle paralel olmayan sonuçların bir başka nedeni de, seçilen primerlerle ilişkili olabilmektedir. Pestivirusların 5'UTR bölgesinin korunmuş nükleotid sekanslarına sahip olması nedeniyle spesifik primer seçimi için ideal bölgeler olduğu bildirilmektedir (Sandvik, 1999). Ancak tek bir baz değişiminin bile PCR protokolünde primerin bağlanma başarısını etkileyebilme ihtimalinin olması ve bu nedenle yeni varyantların tespit edilememesi olasılığı da göz ardı edilmemelidir.

Antijen ELISA yöntemi aracılığıyla solunum sistemi bulgularına sahip sığırlarda BVDV varlığının tespiti için Fulton ve ark. (2000b) monolayer-ELISA yöntemini kullanmış ve ABD'de yürütülen çalışmada solunum sistemi problemlili sığır aıt 16 adet akciğer doku örneğinden 2'sinde (%12,5) antijen varlığını tespit etmişlerdir. Türkiye'de sığır akciğer dokularında direkt ELISA yöntemi aracılığıyla solunum sistemi viral antijenlerinin araştırıldığı bir çalışmada ise, BVDV antijeni saptanamamıştır (Avcı ve ark., 2014). Bu tez çalışmasında uygulanan BVDV antijen ELISA sonucunda, 193 klinik ve nekropsi örneğinin %5,18'i (n=10; 2 nazal svab örneği ve 8 akciğer örneği) antijen pozitif olarak belirlenmiştir.

BVDV'nin solunum sistemi problemine sahip sığırlardaki prevalansını araştırmak için RT-PCR yöntemi tüm dünyada yaygın olarak kullanılmaktadır. Thanthrige ve ark. (2018) Kanada'da yürüttüğü bir çalışmada, toplam 14 nazal svab ve akciğer doku örneğinin 8'inde 5'UTR gen bölgesine spesifik primerler aracılığıyla BVDV nükleik asit varlığını tespit etmiştir. Fulton ve ark. (2016), ABD'de solunum sistemi problemine sahip ve tedavi başlangıcında olan sığırlardan toplanan 114 nazal svabtan 6'sını (%5,26) ve 7 akciğer örneğinden 3'ünü (%42,85) NS5B gen bölgesine spesifik primerler kullanarak BVDV pozitif olarak saptamıştır. O'Neill ve ark. (2014), Kanada'da 3 aylık yaştan küçük buzağılardan topladığı 1364 burun svabı örneğinde BVDV prevalansını %5 olarak bildirmiştir. Moore ve ark. (2015) tarafından Avustralya'dan canlı ihraç edilen sığırlarda solunum sistemi viruslarının araştırıldığı bir çalışmada, RT-PCR aracılığıyla 1484 nazal svab örneğinde BVDV prevalansı diğer viral etkenlere kıyasla daha yüksek oranda (%3) bildirilmiştir. Bu tez çalışmasında ise panpestivirus RT-PCR sonucunda, 193 adet örneğin %2,59'unda (n=5; 4 nazal svab örneği ve 1 akciğer örneği) viral nükleik asit varlığı tespit edilmiştir. Bu veriler ışığında solunum sistemi bulgularına sahip sığırlarda nazal svab

ve akciğer doku örneklerinin test edilmesinde, RT-PCR yönteminin hızlı sonuç veren bir yöntem olarak kullanılabileceği değerlendirilmektedir.

BVDV'nin tespitinde kullanılan virus izolasyonu ve sonrasında uygulanan boyama yöntemleri, özellikle sitopatojen ve non-sitopatojen biyotiplerin ayrımının yapılması için altın standart olan bir uygulamadır. Birçok çalışmada solunum sistemi problemlili sığırlarda non-sitopatojen BVDV biyotiplerinin, sitopatojen biyotiplere kıyasla daha yüksek oranda tespit edildiği bildirilirken (Fulton ve ark., 2000a; Fulton ve ark., 2005b; Pogranichniy ve ark., 2011); nazal svab örneklerinde sitopatojen biyotiplerin daha çok izole edildiği bazı çalışmalar da mevcuttur (Aly ve ark., 2003). Tez çalışmasında BVDV izolatu elde etmek amacıyla uygulanan virus izolasyonu ve immunoperoksidaz testleri sonucunda sitopatojen BVDV biyotipi saptanamazken, 2 (%1,04) örnekte (1 nazal svab örneği ve 1 akciğer örneği) non-sitopatojen biyotipte BVDV izolatu elde edilmiştir.

Tez çalışmasının BVDV tespitine yönelik verileri değerlendirildiğinde, virus izolasyonu, ELISA ve RT-PCR yöntemleri arasında uyumsuzluk dikkat çekmektedir (Tablo 8 ve Tablo 9). ELISA ve RT-PCR yöntemleri arasındaki uyumsuzluğun nedeni, doku örneklerinde RNase aktivitesinin yüksek olması ve bunun sonucunda RNA'nın degrade olmasından kaynaklanabilmektedir. ELISA ve RT-PCR yöntemleriyle daha yüksek oranda pozitiflik saptanması ise örneklerde var olan BVDV etkeninin inaktif olabileceğini ve bu nedenle hücrede üreme yeteneğini kaybettiğini düşündürmektedir. Her üç testte pozitif olduğu belirlenen 2 örneğin ise, daha yüksek miktarda enfektif virion içerdiği değerlendirilebilir.

Bu veriler ışığında, bu çalışmada solunum sistemi problemlili sığırlarda BVDV'nin tespitinde moleküler yöntemler yanı sıra, antijen-ELISA ve immunoperoksidaz tekniğinin kullanımı daha başarılı sonuçlar alınmasını sağlayabileceğinden, enfeksiyon teşhisinde söz konusu tekniklerin birlikte kullanılması önerilmektedir.

Solunum sistemi problemlili sığırlardan toplanan nazal svab ve akciğer örneklerinde BVDV-1 genotipinin BVDV-2 genotipine oranla daha çok görüldüğü Fulton ve ark. (2000b) tarafından bildirilmiştir. Dünya genelinde solunum sisteminde

tespit edilen BVDV alt genotiplerine bakıldığında ise ABD, Hindistan, Arjantin ve Güney Amerika'da BVDV-1b alt grubunun, Afrika'da ise BVDV-1d alt grubunun dominant olarak saptandığı tespit edilmiştir (Baule, 1997; Fulton ve ark., 2002; Obando ve ark., 1999; Pecora ve ark., 2014; Pogranichniy ve ark., 2011). Türkiye'de Yeşilbağ ve ark. (2014) tarafından yürütülen bir araştırmada, hemorajik enteritis ve şiddetli pnömoni salgınından elde edilen 4 izolatın 1'i BVDV-1/ alt grubunda yer alırken, 3'ünün BVDV-1r olarak adlandırılan yeni bir grup oluşturduğu bildirilmiştir. Bu tez çalışmasında, pestivirus 5'UTR gen bölgesine spesifik primerler aracılığıyla pozitif olarak saptanan 5 örnekte elde edilen dizinlerden 3'üne (DO-48, ET-64 ve ET-94) dizi analizi uygulanmıştır. Filogenetik analizler sonucunda DO-48 kodlu dizinin BVDV-1f, ET-64 kodlu dizinin BVDV-1a ve ET-94 kodlu dizinin BVDV-1/ alt grubunda yer aldığı saptanmıştır (Şekil 10). Söz konusu BVDV-1 alt gruplarının daha önce ülkemizde saptanan alt gruplarla benzer olduğu görülmektedir (Oğuzoğlu ve ark., 2012; Sarıkaya ve ark., 2012; Yeşilbağ ve ark., 2008; Yeşilbağ ve ark., 2014).

#### **5.4. BoHV-1 Tespitine Yönelik Çalışmaların Değerlendirilmesi**

BoHV-1, primer enfeksiyonu takiben sensorik ganglionlara yerleşerek latent hale geçer ve hayvanların yaşamı boyunca seropozitif kalmasına sebep olur. Akut BoHV-1 enfeksiyonunun tespit edilme şansının düşük olması nedeniyle, BoHV-1 teşhisinde serolojik yöntemlerden daha çok yararlanılmaktadır (OIE, 2017). IBR, Türkiye'de ilk kez 1987 yılında Burgu ve Akça (1987) tarafından bir sığırdan alınan nazal svab örneğinden izole edilmiştir. Takip eden yıllarda BoHV-1'in Türkiye'deki varlığı birçok araştırmacı tarafından ortaya konulmuştur (Alkan ve ark., 1997; Bilge, 1996; Çabalar ve Can Şahna, 2000; Gencay ve ark., 2009; Okur ve ark., 2007; Öner ve Yeşilbağ, 2018; Tuncer-Göktuna ve ark., 2016; Yavru ve ark., 2005; Yeşilbağ ve Güngör, 2008; Yıldırım ve Burgu, 2005).

Tez çalışmasında, sığırlardan toplanan 133 nazal svab ve 60 akciğer örneği olmak üzere toplam 193 örnek, BoHV-1 varlığını tespit etmek amacıyla virus izolasyonu, antijen ELISA ve PCR yöntemleriyle incelenmiştir. Bu doğrultuda MDBK hücre hattında yapılan virus izolasyonu çalışması sonucunda saha izolatı elde edilemezken; antijen ELISA ile de viral antijen varlığı tespit edilememiştir.

Viral nükleik asit varlığını tespit amacıyla yapılan PCR uygulaması sonrasında toplam 193 örneğin %1,04'ü (2 nazal svab örneği) pozitif olarak saptanmıştır.

Collins ve ark. (1985) tarafından nazal svab örneklerinde BoHV-1'in antijen varlığını tespit etmek amacıyla geliştirilen ELISA yöntemiyle, deneysel olarak enfekte edilmiş 129 sığırdan toplanan nazal svab örneklerinin 100'ünde virus izolasyonu sırasında sitopatolojik etki görülürken; 67'sinin antijen ELISA ile pozitif olarak saptandığı belirtilmiştir. Çalışma sonucunda ELISA'nın virus izolasyonu ile kombine olarak kullanılması gerektiğini ve yüksek oranda virus içeren örneklerin ELISA aracılığıyla daha başarılı olarak tespit edilebileceği bildirilmiştir. İşcan (2010) tarafından yapılan bir çalışmada, BoHV-1'in İskilip (Çorum) yöresinde prevalans ve seroprevalansının belirlenmesi için 250 hayvandan toplanan nazal svab örneklerinde antijen-ELISA ile prevalans %0,8 olarak bulunurken; kan serumu örneklerinde antikor-ELISA ile seroprevalans %21,1 olarak saptanmıştır. Bu durum örneklenen hayvanlarda akut enfeksiyonun yaygın olmadığını ya da antijen-ELISA'nın diğer tespit yöntemlerine (virus izolasyonu ve PCR) oranla düşük duyarlılık ve özgüllüğe sahip olabileceğini göstermektedir. Bu tez çalışmasında, 2 nazal svab örneği BoHV-1 yönünden PCR'da pozitif tespit edilirken; antijen-ELISA'da negatif bulunması BoHV-1 antijen-ELISA tekniğinin PCR tekniğine oranla daha düşük duyarlılık ve özgüllüğe sahip olabileceğini destekler niteliktedir.

BoHV-1 tespitinde virus izolasyonu ve PCR yöntemlerinin birbirleriyle uyumlu veya PCR'in daha duyarlı olduğunu gösteren birçok çalışma mevcuttur (Chandranaik ve ark., 2010; El-Kholy, 2005; Fulton ve ark., 2016; Peshev ve Christova, 2010; Rola ve ark., 2005; Santurde ve ark., 1996; Thonur ve ark., 2012; Xia ve ark., 1995). Peshev ve Christova (2010), farklı yıllarda izole edilmiş toplam 16 solunum ve genital sistem izolatını, BoHV-1'in üç farklı gen bölgesine (gB, gC ve gE gen bölgeleri) spesifik primerler aracılığıyla PCR metoduyla test etmiş ve tüm izolatlar pozitif olarak saptanmıştır. El-Kholy (2005) tarafından Mısır'da yürütülen bir çalışmada 43 nazal svab örneğinin 11'i gB gen bölgesine spesifik primerler aracılığıyla PCR pozitif bulunurken, 10'unda virus izolasyonu sonucu sitopatolojik etkiler saptanmıştır. Virus izolasyonu, PCR ve nested-PCR'in karşılaştırıldığı bir çalışmada, 25 nazal svab örneğinden 1'inde sitopatolojik etki saptanırken, 11'i PCR

pozitif ve 20'si nested-PCR pozitif olarak saptanmış ve PCR yöntemi virus izolasyonuna kıyasla daha duyarlı bulunmuştur (Rola ve ark., 2005). Mevcut tez çalışmasında virus izolasyonu aracılığıyla BoHV-1 izolatı elde edilemezken, PCR metoduyla 2 nazal svab örneğinde pozitiflik saptanması PCR'in daha duyarlı olduğu yönündeki verileri desteklemektedir.

PCR metodu, sığır solunum sistemi enfeksiyonlarında BoHV-1 tespiti için tüm dünyada yaygın olarak kullanılmaktadır. Hindistan'da IBR klinik bulguları gösteren 22 sığırdan toplanan nazal svab örneklerinin %63,6'sı (n=14) PCR'da BoHV-1 pozitif olarak saptanmıştır (Chandranaiik ve ark., 2010). Bağdat'ta seropozitif olduğu tespit edilen 18 adet sığırdan toplanan nazal svab örneğinden %55,5'i (n=10) gB gen bölgesine spesifik primerler kullanılarak gerçekleştirilen PCR sonucunda BoHV-1 pozitif olarak belirlenmiştir (Nezzal ve ark., 2017). Thanthrige ve ark. (2018) tarafından Kanada'da solunum sistemi viruslarının eş zamanlı olarak tespiti amacıyla geliştirilen one step RT-PCR metodu ile toplamda 14 nazal svab ve akciğer örneğinin 7'sinde BoHV-1 pozitifliği saptanmıştır. İskoçya'da 2009-2012 yılları arasında toplanan örneklerde, one-step multipleks real time RT-PCR metodu uygulanarak 136 nazal svab örneğinin 27'sinde (%19,85), 106 akciğer doku örneğinin 5'inde (%4,72) ve 19 bronkoalveolar lavaj örneğinin 4'ünde (%21,05) BoHV-1 varlığı tespit edilmiştir (Thonur ve ark., 2012). Hindistan'da 65 sığırdan alınan nazal svab örneklerinden 10'unda BoHV-1 izolatı elde edilmiş ve bunlar PCR aracılığıyla da doğrulanmıştır (Patil ve ark., 2016). Solunum sistemi viruslarının varlığını tespit etmek için yapılan benzer çalışmalarda BoHV-1'in PCR metodu aracılığıyla prevalansı İrlanda'da %6,1 (O'Neill ve ark., 2014), Avustralya'da %1.0 (Moore ve ark., 2015) olarak tespit edilmiştir. Türkiye'de ise Aslan ve ark. (2015) tarafından, BoHV-1 seropozitif olarak saptanan 254 sığırdan toplanan tam kan örneklerinden 1'i, gB gen bölgesine spesifik primerler aracılığıyla PCR pozitif olarak saptanmıştır. Söz konusu çalışmalar ile bu çalışmada elde edilen veriler birlikte değerlendirildiğinde, BoHV-1'in dünyada ve Türkiye'de prevalansının belirlenmesi için PCR metodunun güvenli bir şekilde kullanılabileceği görülmektedir.

Tez çalışması kapsamında gB geni spesifik primerler aracılığıyla pozitif olarak saptanan 2 adet nazal svab örneğinden yalnızca birine (ET-121) dizi analizi uygulanmıştır. Claus ve ark. (2005) tarafından yapılan bir çalışmada, BoHV-1 ve BoHV-5'in gC aminoasit dizinleri arasında önemli farklılıklar olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle gC geni, moleküler teknikler için önemli bir hedef noktası olarak değerlendirilmektedir. Bu veri ışığında ET-121 kodlu nazal svab örneğindeki BoHV-1 genomu gC gen bölgesine spesifik primerler aracılığıyla çoğaltılarak dizi analizleri yapılmış ve filogenetik analiz sonucunda BoHV-1.1 alttipinde yer aldığı belirlenmiştir (Şekil 11). Bugüne kadar, sığır solunum yolu hastalıkları ve abort olgularından elde edilen çoğu BoHV-1 izolatlarının büyük bir kısmı BoHV-1.1 olarak tiplendirilirken, genital sistem enfeksiyonlarından izole edilenler BoHV-1.2 grubunda yer almıştır (d'Offay ve ark., 2016; Edwards ve ark., 1990; Engels ve ark., 1981; Fulton ve ark., 2015; Metzler ve ark., 1985; Muylkens ve ark., 2007). Ancak, ABD, Avrupa ve Avustralya'da BoHV-1.2'nin neden olduğu solunum sistemi salgınları da bildirilmiştir (Edwards ve ark., 1990; Engels ve ark., 1981; Fulton ve ark., 2015; Metzler ve ark., 1985; Misra ve ark., 1983; Muylkens ve ark., 2007; Saha ve ark., 2010; Smith ve ark., 1995). Türkiye'de Bilge-Dağalp ve ark. (2017) tarafından yürütülen bir çalışmada farklı klinik bulgular gösteren hayvanlardan 1992-2014 yılları arasında BoHV-1 pozitif olduğu tespit edilmiş 8 örneğin, gC gen bölgesine spesifik primerler kullanılarak yapılan filogenetik analizleri sonucunda izolatların BoHV-1.1 ve BoHV-1.2 alttiplerinde yer aldığı bildirilmiştir. Yine Türkiye'de Yeşilbağ ve ark. (2018) tarafından BoHV-1 pozitif olduğu tespit edilen nazal svab örneğinin moleküler karakterizasyon çalışması sonucunda BoHV-1.2 alttipinde yer aldığı belirlenmiştir. Mevcut tez çalışması kapsamında ise, filogenetik analizi yapılan ET-121 kodlu dizinin, BoHV-1.1 alttipinde bulunan Cooper (Amerika), UY1999 (Uruguay) ve Bilge-Dağalp ve ark. (2017) tarafından bildirilmiş Türkiye dizinleriyle birlikte ayrı bir dalda yer aldığı görülmektedir (Şekil 11). Sonuç olarak bu verilerle Türkiye'de solunum sistemi bulguları gösteren sığırlardan elde edilen nazal svab örneklerinde BoHV1.1 varlığı gösterilmiştir.



## 5.5. Sonuç

Sığırlarda akciğerlerin etkili bir klirens mekanizmasının olmaması ve anatomik olarak bölümlenmiş yapıda olması gibi yapısal ve fizyolojik nedenlerden dolayı solunum sistemi enfeksiyonları için predispozisyon yaratmaktadır. Sığır solunum sistemi enfeksiyonlarında genellikle primer nedenin viral etkenler olması immunsupresyon meydana getirerek prognozun daha da kötü sonuçlanmasına ve ekonomik kaybın artmasına neden olmaktadır. Bu sebeple solunum sistemi enfeksiyonuna neden olan etkenlerin güvenilir ve hızlı bir şekilde tespit edilmesi büyük önem taşımaktadır.

Tez çalışması sürecinde elde edilen veriler ışığında ulaşılan sonuçları genel bir yaklaşımla aşağıdaki şekilde özetlemek mümkündür:

- BRSV, BPIV-3, BVDV ve BoHV-1 etkenlerinin Bursa ve komşu illerde (Balıkesir, Kütahya, Bilecik ve Kocaeli) görülen solunum sistemi enfeksiyonlarındaki varlığı tespit edilmiştir.
- Değerlendirilen etkenler arasında örneklenen popülasyon için özellikle BVDV'nin solunum sistemi problemlili hayvanlarda daha yaygın bulunduğu saptanmıştır.
- Solunum sistemi problemlili sığırlarda BRSV teşhisi için virus izolasyonuna oranla nested RT-PCR yöntemiyle daha hızlı ve güvenilir sonuçlar elde edilebilmektedir.
- BPIV-3 teşhisi için uygulanan virus izolasyonu, hemadsorbsiyon testi ve RT-PCR yöntemlerinin birbirleriyle paralel sonuçlar verdiği saptanmıştır.
- Değerlendirilen örneklerden 1 nazal svab örneğinde BPIV-3 saha izolatı elde edilmiştir.
- BVDV teşhis çalışmaları yapılırken uygulanan virus izolasyonu-IPMA, antijen-ELISA ve RT-PCR sonuçları arasındaki farklılıklar nedeniyle etkenin birden fazla teşhis yöntemi kullanılarak tespit edilmesi daha başarılı sonuçlar elde edileceğini göstermektedir.
- Değerlendirilen örnekler arasında 1 nazal svab ve 1 akciğer doku örneğinde IPMA testi sonucunda non-sitopatojen biyotipte BVDV saha izolatları elde edilmiştir.

- BoHV-1 teşhisi için uygulanan virus izolasyonu, antijen-ELISA ve PCR yöntemleri sonucunda yalnızca PCR yöntemi ile pozitiflik saptanmıştır. Bu nedenle diğer yöntemlere kıyasla PCR yöntemiyle daha başarılı sonuçlar elde edildiği değerlendirilmektedir.
- Genel olarak değerlendirildiğinde, sığırlarda viral nedenli solunum sistemi enfeksiyonlarının teşhis çalışmalarında birden fazla teşhis yönteminin birlikte kullanılmasıyla daha güvenilir sonuçlar elde edilebileceği gösterilmiştir.
- Moleküler yöntemler aracılığıyla elde edilen dizinlerin karakterizasyonu sonucunda BRSV pozitif olan DO-7, ET-63 ve ET-124 kodlu dizinlerin birbirleriyle yakın ilişkili olduğu; ET-81 kodlu dizinin BPIV-3c genotipinde yer aldığı; DO-48, ET-64 ve ET-94 kodlu dizinlerin sırasıyla BVDV-1f, BVDV-1a ve BVDV-1l alt gruplarında yer aldığı; ET-121 kodlu dizinin ise BoHV-1.1 alt grubunda yer aldığı belirlenmiştir.
- Sığır solunum sistemi enfeksiyonlarının etiyolojisinde rol oynayan enfeksiyöz ajanlar arasında söz konusu virusların önemli bir yeri olduğu belirlenmiş olup, ileride yapılacak daha geniş kapsamlı çalışmalarla diğer enfeksiyöz ajanların rolü de değerlendirilebilecektir.

## 6. KAYNAKLAR

1. Albayrak H, Yazıcı Z, Ozan E et al (2018) Characterisation of a first bovine parainfluenza virus 3 isolate detected in cattle in Turkey. 11th International Congress for Veterinary Virology – 12th Annual Meeting of EPIZONE, Vienna, pp:7.
2. Alkan F, Özkul A, Bilge-Dagalp S et al (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: 193–195.
3. Alkan F, Özkul A, Karaoğlu MT et al (1997) Sığırlarda viral nedenli solunum sistemi enfeksiyonlarının seroepidemiolojisi. *Ankara Üniv Vet Fak Derg* 44: 73-80.
4. Almeida RS, Spilki FR, Roehe PM et al (2005) Detection of Brazilian bovine respiratory syncytial virus strain by a reverse transcriptase-nested-polymerase chain reaction in experimentally infected calves. *Veterinary Microbiology* 105(2): 131–135.
5. Alpay G, Tuncer P, Yeşilbağ K (2014) Bir ada ekosistemindeki sığır, koyun ve keçilerde bazı viral enfeksiyonların serolojik olarak araştırılması. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 61: 43-48.
6. Alpay G, Yeşilbağ K (2015) Serological relationships among subgroups in bovine viral diarrhoea virus genotype 1 (BVDV-1). *Veterinary Microbiology* 175: 1-6.
7. Aly NM, Shehab GG, Abd El-Rahim IHA (2003) Bovine Viral diarrhoea, bovine herpesvirus and parainfluenza-3 virus infection in three cattle herds in egypt in 2000. *Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties* 22(3): 879-892.
8. Aslan ME, Azkur AK, Gazyagcı S (2015) Epidemiology and genetic characterization of BVDV, BHV-1, BHV-4, BHV-5 and Brucella Spp. infections in cattle in Turkey. *Journal of Veterinary Medical Science* 77(11): 1371-1377.
9. Avcı O, Yavru S, Ekik M (2014) Detection of respiratory viral antigens in cattle lung tissues by direct ELISA. *Animal and Veterinary Sciences* 2(5): 146-149.
10. Autio T, Pohjanvirta T, Holopainen R et al (2007) Etiology of respiratory disease in non-vaccinated, non-medicated calves in rearing herds. *Veterinary Microbiology* 119: 256-265.
11. Babiuk LA, Van Drunen Little S, Tikoo SK (2004) Infectious bovine rhinotracheitis/ infectious pustular vulvovaginitis and infectious pustular balanoposthitis. Editors: COETZER JAW, TUSTIN RC, *Infectious Diseases of Livestock*-Volume 2, 2nd edition, Oxford Press, Cape Town, pp: 875-886.

12. Bailly JE, McAuliffe JM, Skiadopoulos MH et al (2000) Sequence determination and molecular analysis of two strains of bovine parainfluenza virus type 3 that are attenuated for primates. *Virus Genes* 20(2): 173–182.
13. Baker JC (1995) The clinical manifestations of bovine viral diarrhoea infection. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 11(3): 425–445.
14. Barber KA, Daugherty HC, Ander SE et al (2017) Protein composition of the bovine herpesvirus 1.1 virion. *Veterinary Sciences* 4:11-26.
15. Baule C, Kulcsar G, Belak K et al (2001) Pathogenesis of primary respiratory disease induced by isolates from a new genetic cluster of bovine viral diarrhoea virus type I. *Journal of Clinical Microbiology* 39(1): 146-153.
16. Baule C, Van Vewren M, Lowings JR et al (1997) Genetic heterogeneity of bovine viral diarrhoea viruses isolated in South Africa. *Virus Research* 52: 205–220.
17. Belknap EB, Baker JC, Patterson JS et al (1991) The role of passive immunity in bovine respiratory syncytial virus-infected calves. *Journal of Infectious Diseases* 163(3): 470-476.
18. Bilge S (1996) Kan ve süt serumlarında IBR-IPV antikorlarının nötralizasyon testi ile saptanması ve süt örneklerinden virus izolasyonu. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
19. Bilge-Dağalp S, Farzani TA, Doğan F (2017) The molecular and antigenic characterization of Turkish Bovine Herpesvirus Type 1 (BoHV-1) isolates. 5th Veterinary Herpesvirus Symposium of the European Society For Veterinary Virology, Belgium, pp: 22.
20. BLASTn (2018) Nucleotide databases using a nucleotide query. [https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE\\_TYPE=BlastSearch](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch) (25.12.2018).
21. Brodersen BW (2010) Bovine Respiratory Syncytial Virus. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice* 26: 323-333.
22. Burgu I, Akca Y (1987) First isolation of IBR virus in Turkey. *Tropical Animal Health and Production* 19(1): 56-56.
23. Burgu İ, Alkan F, Özkül A et al (2003) Türkiye’de süt sığırcılığı işletmelerinde bovine viral diarrhoea virus (BVDV) enfeksiyonunun epidemiyolojisi ve kontrolü. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 50: 127-130.
24. Burgu İ, Alkan F, Yesilbag K (1999) Prevalence of persistent BVD virus infection in cattle in Turkey. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 46:196-177.
25. Caswell JL, Hewson J, Slavić D et al (2012) Laboratory and postmortem diagnosis of bovine respiratory disease. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice* 28(3): 419–441.
26. Cedillo-Rosales S (2004) Charakterisierung Ruminanter Pestiviren Mittels Polymerasekettenreaktion und Monoklonaler Antikörper. Justus Liebig University Giessen, Germany.
27. Chandranaik BM, Chethana S, Renukprasad C (2010) Isolation of BHV-1 from bovine semen and application of real time PCR for diagnosis of IBR / IPV from clinical samples. *Veterinarski Arhiv* 80(4): 467–475.

28. Chase CCL, Elmowalid G, Yousif AAA (2004) The immune response to bovine viral diarrhoea virus: a constantly changing picture. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice* 20:95-114.
29. Childs T (1946) X disease of Cattle-Saskatchewan. *Canadian Journal of Comparative Medicine and Veterinary Science* 10(11): 316.
30. Claus MP, Alfieri AF, Folgueras-Flatschart AV et al (2005) Rapid Detection and Differentiation of Bovine Herpesvirus 1 and 5 Glycoprotein C gene in clinical specimens by multiplex-PCR. *Journal of Virological Methods* 128: 183-188.
31. Cockcroft PD (2015) *Bovine Respiratory Disease (BRD): Diagnosis, Prevention and Control*. Editor: COCKCROFT PD, *Bovine Medicine*. Third Edition, John Wiley & Sons, UK, pp: 525-530.
32. Collins JK, Butcher AC, Teramoto YA et al (1985) Rapid detection of bovine herpesvirus type 1 antigens in nasal swab specimens with an antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Clinical Microbiology* 21(3): 375-380.
33. Cooper VL, Brodersen BW (2010) Respiratory disease diagnostics of cattle. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice* 26: 409-416.
34. Çabalar M, Can Şahna K (2000) Doğu ve güneydoğu anadolu bölgesinde süt sığırlarında parainfluenza virus-3, bovine herpesvirus-1 ve respiratory syncytial virus enfeksiyonlarının seroepidemiolojisi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 11: 101-105.
35. Çabalar M, Karaoğlu T (1999) Sığırlarda bovine viral diarrhoea (BVD) virus enfeksiyonuna karşı antikor varlığının araştırılmasında nötralizasyon immunperoksidaz (NPLA) ve serum nötralizasyon (SN) testlerinin karşılaştırılması. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 46: 249-255.
36. Çeribas S, Özkaraca M, Özer H et al (2012) Prevalence of parainfluenza type 3 virus antigens in pneumonic caprine lungs by direct immunofluorescence and immunoperoxidase techniques. *Small Ruminant Research* 108(1-3): 127-132.
37. Dabo SM, Taylor JD, Confer AW (2008) *Pasteurella multocida* and bovine respiratory disease. *Animal Health Research Review* 8: 129-150.
38. Deregt D (2005) Introduction and history. Editors: GOYAL SM, RIDPATH JF, *Bovine Viral Diarrhoea Virus Diagnosis Management and Control*, Blackwell Publishing, USA, pp:3-34.
39. Deregt D, Carman PS, Clark RM et al (2002) A comparison of polymerase chain reaction with and without rna extraction and virus isolation for detection of bovine viral diarrhoea virus in young calves. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 14(5): 433-437.
40. Deregt D, Loewen LG (1995) Bovine viral diarrhoea virus: biotypes and disease. *Canadian Veterinary Journal* 36: 371-378.
41. Divers TJ (2007) *Respiratory Disease*. Editors: DIVERS TJ, PEEK SF, *Rebhun's Diseases of Dairy Cattle*. 2nd edition, Saunders Elsevier Press, USA, pp: 79-105.

42. d'Offay JM, Eberle R, Fulton RW et al (2016) Complete genomic sequence and comparative analysis of four genital and respiratory isolates of bovine herpesvirus subtype 1.2b (BoHV-1.2b), including the prototype virus strain K22. *Archives of Virology* 161(11): 3269–3274.
43. Donis RO, Dubovi EJ (1987) Differences in Virus-induced polypeptides in cells infected by cytopathic and noncytopathic biotypes of bovine virus diarrhea-mucosal disease virus. *Virology* 158(1): 168–173.
44. Dubovi EJ (2013) Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhea virus. *Biologicals* 41: 8-13.
45. Edmondson MA, Given MD, Wlaz PH et al (2007) Comparison of tests for detection of bovine viral diarrhea virus in diagnostic samples. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 19(4): 376–381.
46. Edwards S, White H, Nixon P (1990) A study of the predominant genotypes of BHV-1 found in UK. *Veterinary Microbiology* 22: 213–223.
47. Eleraky NZ, Kania SA, Evermann JF et al (2003) Comparison of targeting f and g protein genes to detect bovine and ovine respiratory syncytial viruses. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 15(3): 277–280.
48. Ellis JA (2010) Bovine parainfluenza-3 virus. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice* 26(3): 575–593.
49. Ellis JA, Hassard LE, Morley PS (1995) Bovine respiratory syncytial virus-specific immune responses in calves after inoculation with commercially available vaccines. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 206(3): 354-361.
50. Ellis JA, West K, Konoby C et al (2001) Efficacy of an inactivated respiratory syncytial virus vaccine in calves. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 218(12):1973–1980.
51. El-Kholy AA (2005) Molecular and immunological detection of bovine herpesvirus-1 in clinical specimens. *The Egyptian Journal of Immunology / Egyptian Association of Immunologists* 12(2): 125–136.
52. Elvander M, Baule C, Persson M et al (1998) An experimental study of a concurrent primary infection with bovine respiratory syncytial virus (BRSV) and bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in calves. *ACTA Veterinaria Scandinavica* 39: 251-264.
53. Engels M, Steck F, Wyler R (1981) Comparison of the genomes of infectious bovine rhinotracheitis and infectious pustular vulvovaginitis virus strains by restriction endonuclease analysis. *Archives of Virology* 67: 169–174.
54. Esteves P, Dellagostin O, Pinto L et al (2008) Phylogenetic comparison of the carboxy-terminal region of glycoprotein C (GC) of Bovine herpesviruses (BoHV) 1.1, 1.2 and 5 from South America (SA). *Virus Research* 131: 16-22.
55. Falsey A, Formica M, Walsh E (2002) Diagnosis of respiratory syncytial virus infection: comparison of reverse transcription-PCR to viral culture and serology in adults with respiratory illness. *Journal of Clinical Microbiology* 40 (3): 817–820.
56. Fauquet CM, Mayo MA (2005) The negative sense single stranded RNA viruses. *Virus Taxonomy Classification and Nomenclature of Viruses Eighth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses*. Elsevier Academic Press, Hong Kong, pp:664-671.

57. Flöck M (2004) Diagnostic ultrasonography in cattle with thoracic disease. *Veterinary Journal* 167(3): 272–280.
58. Fuchs M, Hübert P, Detterer J et al (1999) Detection of bovine herpesvirus type 1 in blood from naturally infected cattle by using a sensitive PCR that discriminates between wild-type virus and virus lacking glycoprotein E. *Journal of Clinical Microbiology* 37(8): 2498-2507
59. Fulton RW (2005) Vaccines. Editor: GOYAL SM, RIDPATH JF, *Bovine Viral Diarrhea Virus Diagnosis, Management, and Control*. Blackwell Publishing, USA, pp: 209-222.
60. Fulton RW, Briggs RE, Ridpath JF et al (2005a) Transmission of bovine viral diarrhoea virus 1b to susceptible and vaccinated calves by exposure to persistently infected calves. *Canadian Journal of Veterinary Research* 69(3): 161–169.
61. Fulton RW, Confer AW (2012) Laboratory test descriptions for bovine respiratory disease diagnosis and their strengths and weaknesses: gold standards for diagnosis, do they exist?. *Canadian Veterinary Journal* 53(7): 754–761.
62. Fulton RW, d'Offay J, Eberle R et al (2015) Bovine herpesvirus-1: Evaluation of genetic diversity of subtypes derived from field strains of varied clinical syndromes and their relationship to vaccine strains. *Vaccine* 33(4): 549–558.
63. Fulton RW, d'Offay JM, Landis C et al (2016) Detection and characterization of viruses as field and vaccine strains in feedlot cattle with bovine respiratory disease. *Vaccine* 34: 3478–3492.
64. Fulton RW, Ridpath JF, Saliki JT et al (2002) Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) 1b: predominant BVDV subtype in calves with respiratory disease. *Canadian Journal of Veterinary Research* 66: 181-190.
65. Fulton RW, Ridpath JF, Ore S et al (2005b) Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) subgenotypes in diagnostic laboratory accessions: distribution of BVDV1a, 1b, and 2a subgenotypes. *Veterinary Microbiology* 111: 35-40.
66. Fulton RW, Saliki JT, Confer AW et al (2000a) Bovine viral diarrhoea virus cytopathic and noncytopathic biotypes and type 1 and 2 genotypes in diagnostic laboratory accessions: clinical and necropsy samples from cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 12(1): 33–38.
67. Fulton RW, Purdy JW, Confer AW et al (2000b) 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.
68. GenBank (2018) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> (20.12.2018)
69. Gencay A, Bilge-Doğal S, Şahna KC et al (2009) Kayseri bölgesindeki sığırlarda bovine herpesvirus tip 1 (BHV-1) enfeksiyonunun seroprevalansı. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi* 23: 47-52.
70. Gibbs EPJ, Rweyemamu MM (1977) Bovine herpesviruses. Part I. Bovine herpesvirus-1. *Veterinary Bulletin* 47: 317–18.
71. Goens SD (2002) The evolution of bovine viral diarrhoea: a review. *Canadian Veterinary Journal* 43: 946-954.
72. Griffin D (1997) Economic impact associated with respiratory disease in beef cattle. *Veterinary Clinics of North America-Food Animal Practice* 13: 367–377.

73. Gulliksen SM, Lie K, Løken T et al (2009a) Calf mortality in Norwegian dairy herds. *Journal of Dairy Science* 92: 2782-2795.
74. Gulliksen SM, Jor E, Lie KI et al (2009b) Respiratory infections in norwegian dairy calves. *Journal of Dairy Science* 92(10): 5139–5146.
75. Guterbock WM (2014) The impact of BRD: The current dairy experience. *Animal Health Research Reviews* 15(2): 130–134.
76. Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*.
77. Hasöksüz M, Kayar A, Dodurka T et al (2005) Detection of respiratory and enteric shedding of bovine coronaviruses in cattle in Northwestern Turkey. *Acta Veterinaria Hungarica* 53: 137-146.
78. Hay KE, Ambrose RCK, Morton JM et al (2016) Effects of exposure to bovine viral diarrhoea virus 1 on risk of bovine respiratory disease in Australian feedlot cattle. *Preventive Veterinary Medicine* 126:159–169.
79. Hägglund S, Svensson C, Emanuelson U et al (2006) Dynamics of virus infections involved in the bovine respiratory disease complex in Swedish dairy herds. *Veterinary Journal* 172:320-328.
80. Härtel H, Nikunen S, Neuvonen E et al (2004) Viral and bacterial pathogens in bovine respiratory disease in Finland. *ACTA Veterinaria Scandinavica* 45(45): 193–200.
81. Hilbe M, Stalder H, Peterhans E et al (2007) Comparison of five diagnostic methods for detecting bovine viral diarrhoea virus infection in calves. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 19: 28-34.
82. Hoerlein AB, Mansfield ME, Abinatti FR et al (1959) Studies of shipping fever of cattle. I. Para-influenza 3 virus antibodies in feeder calves. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 135:153–60.
83. Homan EJ, Easterday BC (1980) Isolation of bovine herpesvirus 1 from trigeminal ganglia of clinically normal cattle. *American Journal of Veterinary Research* 41: 1212– 1213.
84. Horner GW, Tham KM, Orr D et al (1995) Comparison of an antigen capture enzyme-linked assay with reverse transcription - polymerase chain reaction and cell culture immunoperoxidase tests for the diagnosis of ruminant pestivirus infections. *Veterinary Microbiology* 43: 75-84.
85. Horwood PF, Gravel JL, Mahony TJ (2008) Identification of Two distinct bovine parainfluenza virus type 3 genotypes. *Journal of General Virology* 89(7): 1643–1648.
86. 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(5): 427-436.
87. ICTV (2018) Virus taxonomy, <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> (20.12.2018).
88. ICTV (2017) Pneumoviridae, [https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_online\\_report/negative-sense-rna-viruses/mononegavirales/w/pneumoviridae](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/negative-sense-rna-viruses/mononegavirales/w/pneumoviridae) (20.12.2018)
89. Irsik M, Langemeier M, Schroeder T et al (2006) Estimating the effects of animal health on the performance of feedlot cattle. *Bovine Practitioner* 40: 65–74.



90. İçcan UT (2010) İskilip (Çorum) yöresindeki süt sığırlarında BHV-1'in prevalansı. Yüksek lisans tezi, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya.
91. Jones C, Chowdhury S (2010) Bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) is an important cofactor in the bovine respiratory disease complex. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice* 26: 303-321.
92. Kaashoek MJ, Moerman A, Madic J et al (1995) An inactivated vaccine based on a glycoprotein E-negative strain of bovine herpesvirus 1 induces protective immunity and allows serological differentiation. *Vaccine* 13(4): 342-346.
93. Kennerman E, Yilmaz Z, Şentürk S et al (2003) Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Kliniğine getirilen sığır ve koyunların değerlendirilmesi (1990-2000). *Uludag University Journal of the Faculty of Veterinary Medicine* 22: 19-25.
94. Kimman TG, Westenbrink F, Schreuder BEC et al (1987) Local and Systemic Antibody Response to Bovine Respiratory Syncytial Virus Infection and Reinfection in Calves with and without Maternal Antibodies. *Journal of Clinical Microbiology* 25(6): 1097-1106.
95. Kimman TG, Zimmer GM, Straver PJ et al (1986). Diagnosis of bovine respiratory syncytial virus infections improved by virus detection in lung lavage samples. *American Journal of Veterinary Research* 47:143-147.
96. Klippmark E, Rydbeck R, Shibuta H et al (1990) Antigenic Variation of human and bovine parainfluenza virus type 3 strains. *Journal of General Virology* 71(7): 1577-1580.
97. Konishi M, Ohkura T, Shimizu M et al (2014) Complete genome sequence of the first isolate of genotype C bovine parainfluenza virus type 3 in Japan. *Genome announcements* 2(6): DOI: 10.1128/genomeA.01215-14.
98. Kumar S, Stecher G, Tamura K (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33:1870-1874.
99. Laamanen UI, Neuvonen EP, Yliviuhkola EM et al (1997) Comparison of RT-PCR Assay and virus isolation in cell cultures for the detection of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in field samples. *Research in Veterinary Science* 63(3): 199-203.
100. Larsen LE, Tjørnehøj K, Viuff B et al (1999) Diagnosis of enzootic pneumonia in danish cattle: reverse transcription-polymerase chain reaction assay for detection of bovine respiratory syncytial virus in naturally and experimentally infected cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 11(5): 416-422.
101. Larson RL, Brodersen BW, Grotelueschen DM et al (2005) Considerations for bovine viral diarrhoea (BVD) testing. *The Bovine Practitioner* 39(2): 96-100.
102. Lee KM, Gillespie JH (1957) Propagation of virus diarrhoea virus of cattle in tissue culture. *American Journal of Veterinary Research* 18(69): 952.
103. Maclachlan NJ, Dubovi EJ (2017) *Fenner's Veterinary Virology*, 5th edition, Academic Press, ABD, pp: 190-216, 327-356; 525-545.

104. Maidana SS, Lomonaco PM, Combessies G et al (2012) Isolation and characterization of bovine parainfluenza virus type 3 from water buffaloes (*bubalus bubalis*) in Argentina. *BMC Veterinary Research* 8: 83–91.
105. McFerran JB, McNulty MS (1981) Aids to diagnosis of virological diseases. *British Veterinary Journal* 137: 455–463.
106. Mechor GD, Rousseaux CG, Radostits OM et al (1987) Protection of newborn calves against fatal multisystemic infectious bovine rhinotracheitis by feeding colostrum from vaccinated cows. *Canadian Journal of Veterinary Research* 51: 452-459.
107. Metzler AE, Matile H, Gassmann U et al (1985) European isolates of bovine herpesvirus 1: a comparison of restriction endonuclease sites, polypeptides, and reactivity with monoclonal antibodies. *Archives of Virology* 85: 57–69.
108. Miller JM, Whetstone CA, Maarten VMJ (1991) Abortifacient property of BHV-1 isolates that represent three subtypes of determined by RE analysis of viral DNA. *American Journal of Veterinary Research* 52: 458–461.
109. Minnich LL, Ray CG (1987) Early testing of cell cultures for detection of hemadsorbing viruses. *Journal of Clinical Virology* 25:421–422.
110. Misra V, Babiuk LA, Darcel CLQ (1983) Analysis of bovine herpes virus-type 1 isolates by restriction endonuclease fingerprinting. *Archives of virology* 76(4): 341-354.
111. Moerman A, Straver PJ, De Jong MCM et al (1994) Clinical consequences of a bovine virus diarrhoea virus infection in a dairy herd: a longitudinal study. *The Veterinary Quarterly* 16(2): 115-119.
112. Montgomery D (2009) Bovine Respiratory Disease & Diagnostic Veterinary Medicine (Managing Respiratory Diseases in the Herd). *The Range Beef Cow Symposium XXI*, Casper, pp:1.
113. Moore SJ, O’Dea MA, Perkins N et al (2015) Estimation of nasal shedding and seroprevalence of organisms known to be associated with bovine respiratory disease in Australian live export cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 27: 6-17.
114. Moreno-Lopez J (1990) Acute Respiratory Disease in Cattle. Editor: DINTER Z, MOREIN B. *Virus Infections of Ruminants*. Volume 3, Elsevier, Netherlands, pp: 551-553.
115. Murphy FA, Gibbs EPJ, Hornizek MC et al (1999) *Veterinary Virology*, 3rd Edition, Academic Press, USA, pp: 119-566.
116. Muylkens B, Thiry J, Kirten P et al (2007) Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. *Veterinary Research* 38: 181-209.
117. Nandi S, Kumar M, Manohar M et al (2009) Bovine herpes virus infections in cattle. *Animal Health Research Reviews* 10(1): 85-98.
118. Neill JD, Ridpath JF, Valayudhan BT (2015) Identification and genome characterization of genotype B and genotype C bovine parainfluenza type 3 viruses isolated in the United States. *BMC Veterinary Research* 11: 112 DOI:10.1186/s12917-015-0431-8.
119. Nezzal AF, Hassan IQ, Ali RM (2017) Serosurveillance and molecular detection of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) in cattle and buffaloes in Baghdad. *Advances in Animal and Veterinary Sciences* 5(7): 283-288.

120. Obando C, Baule C, Pedrique C et al (1999) Serological and molecular diagnosis of bovine viral diarrhoea virus and evidence of other viral infections in dairy calves with respiratory disease in Venezuela. *ACTA Veterinaria Scandinavica* 40: 253–262.
121. Oberst RD, Hays MP, Evermann JF et al (1993a) Characteristic Differences in reverse transcription-polymerase chain reaction products of ovine, bovine, and human respiratory syncytial viruses. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 5(3): 322–328.
122. Oberst RD, Hays MP, Hennessy KJ et al (1993b) Identifying bovine respiratory syncytial virus by reverse transcription- polymerase chain reaction and oligonucleotide hybridizations. *Journal of Clinical Microbiology* 31(5): 1237–1240.
123. Oem JK, Lee EY, Lee KK et al (2013) Molecular characterization of a Korean bovine parainfluenza virus type 3 isolate. *Veterinary Microbiology* 162(1): 224–227.
124. Oğuzoğlu TC, Muz D, Yılmaz V et al (2012) Molecular characteristics of bovine virus diarrhoea virus 1 isolates from Turkey: Approaches for an eradication programme. *Transboundary and Emerging Diseases* 59(4): 303-310.
125. Ohkura T, Kokuho T, Konishi M et al (2013) Complete genome sequences of bovine parainfluenza virus type 3 strain BN-1 and vaccine strain BN-CE. *Genome announcements*, 1(1): e00247-12.
126. OİE (2017) Infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis. OİE Terrestrial Manual, Chapter 2.4.12. pp: 1-19.
127. Okur Gumusova S, Yazici Z, Albayrak H et al (2007) Seroprevalence of bovine viral respiratory diseases. *Acta Vet Beograd* 57: 11-16.
128. Olafson P (1946) An apparently new transmissible disease of cattle. *Cornell Vet* 36: 205-213.
129. O'Neill R, J Mooney, E Connaghan et al (2014) Patterns of detection of respiratory viruses in nasal swabs from calves in Ireland: A retrospective study. *Veterinary Record* 175(14): 351.
130. Öner EB, Yeşilbağ K (2018) Besi sığırlarında solunum sistemi virüslerinin seroprevalansı ve persiste BVD virüs enfeksiyonu tespiti. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 65: 1–7.
131. Özgünlük İ, Yıldırım Y (2017) güneydoğu anadolu bölgesindeki sığırlarda bovine herpes virus 1 (BHV 1) ve bovine viral diarrhea virus (BVDV) enfeksiyonlarının serolojik olarak araştırılması. *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 6(2): 152-157.
132. Özkaraca M, Timurkan MÖ (2016) Erzurum yöresinde pnömonili sığırlarda BVDV' nin teşhisinde immunohistokimya ve PCR yöntemleri. *Van Veterinary Journal* 27(2): 85–89.
133. Özkul 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: 1043-1048.
134. Özyıldız Z, Özmen Ö, Dolu H (2017) Buzağılarda respiratuar sinsityal virus (BRSV) enfeksiyonlarında patolojik ve immunohistokimyasal incelemeler. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2(2): 131–138.

135. Paccaud MF, Jacquier CL (1970) A respiratory syncytial virus of bovine origin. *Archiv für die Gesamte Virusforschung* 30: 327-342.
136. Passler T, Walz PH (2010) Bovine viral diarrhoea virus infections in heterologous species. *Animal Health Research Reviews* 11(2): 191-205.
137. Patel JR, Didlick SA (2004) Evaluation of efficacy of an inactivated vaccine against bovine respiratory syncytial virus in calves with maternal antibodies. *American Journal of Veterinary Research* 65: 417-421.
138. Patil SS, Prajapati A, Hemadri KP et al (2016) Phylogenetic analysis of glycoprotein B gene sequences of bovine herpesvirus 1 isolates from India reveals the predominance of subtype 1.1. *Veterinary World* 9(12): 1364–1369.
139. Pecora A, Malacari DA, Ridpath JF et al (2014) First finding of genetic and antigenic diversity in 1b-BVDV isolates from Argentina. *Research in Veterinary Science* 96(1): 204–212.
140. Pellerin C, Van Den Hurk J, Lecomte J et al (1994) Identification of a new group of bovine viral diarrhoea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. *Virology* 203(2): 260–268.
141. Peshev R, Cristova L (2010) Diagnostic and molecular epidemiological investigation of Bulgarian bovine herpes virus 1 strains by PCR and restriction enzyme analysis. *Revue de Médecine Vétérinaire* 161(8–9): 381–386.
142. Pogranichniy RM, Schnur ME, Raizman EA et al (2011) Isolation and genetic analysis of bovine viral diarrhoea virus from infected cattle in Indiana. *Veterinary Medicine International* 2011: 1-6.
143. Poole TL, Wang C, Popp RA et al (1995) Pestivirus translation initiation occurs by internal ribosome entry. *Virology* 206: 750-754.
144. Potgieter LND (1995) Immunology of bovine viral diarrhoea virus. *The Veterinary Clinics of North America—Food Animal Practice*, 11: 501-520.
145. Potgieter LND (1997) Bovine respiratory tract disease caused by bovine viral diarrhoea virus. *The Veterinary Clinics Of North America: Food Animal Practice* 13(3): 471-481.
146. Potgieter LND (2004). Bovine viral diarrhoea virus. Editors: TUSTIN RC, COETZER JAW, *Infectious Diseases of Livestock*. Oxford University Press, Cape Town, pp: 946-969.
147. Qiao D, Janke BH, Elankumaran S (2009) Molecular characterization of glycoprotein genes and phylogenetic analysis of two swine paramyxoviruses isolated from United States. *Virus Genes* 39(1): 53–65.
148. Reisinger RC, Heddleston KL, Manthei CA (1959) A myxovirus (SF-4) associated with shipping fever of cattle. *of the American Veterinary Medical Association* 135(3): 147-152.
149. Renshaw RW, Ray R, Dubovi EJ (2000) Comparison of virus isolation and reverse transcription polymerase chain reaction assay for detection of bovine viral diarrhoea virus in bulk milk tank samples. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 12(2): 184–186.
150. Rice JA, Carrasco-Medina L, Hodgins DC et al (2008) Mannheimia haemolytica and bovine respiratory disease. *Animal Health Research Reviews*, 8: 117-128.

151. Richer L, Marois P, Lamontagne P (1988) Association of bovine viral diarrhoea virus with multiple viral infections in bovine respiratory disease outbreaks. *The Canadian Veterinary Journal* 29(9): 713–717.
152. Ridpath JF (2005) Classification and molecular biology. Editors: GOYAL SM, RIDPATH JF, *Bovine Viral Diarrhoea Virus: Diagnosis, Management, and Control*. Blackwell Publishing, USA, pp: 65-80.
153. Ridpath JF, Bolin SR (1995) The genomic sequence of a virulent bovine viral diarrhoea virus (BVDV) from the type 2 genotype: detection of a large genomic insertion in a noncytopathic BVDV. *Virology* 212(1): 39-46.
154. Ridpath JF, Bolin SR, Dubovi EJ (1994) Segregation of bovine viral diarrhoea virus into genotypes. *Virology* 205: 66-74.
155. Rijsewijk FAM, Kaashoek MJ, Langeved JPM et al (1999) Epitopes on glycoprotein C of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) that allow differentiation between BHV-1.1 and BHV-1.2 strains. *Journal of General Virology* 80(6):1477–1483.
156. Rola J, Larska M, Polak MP (2005) Detection of bovine herpesvirus 1 from an outbreak of infectious bovine rhinotracheitis. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* 49: 267–271.
157. Roshtkhari F, Mohammadi G, Mayameei A (2012) Serological Evaluation of relationship between viral pathogens (BHV-1, BVDV, BRSV, PI-3V, and Adeno3) and dairy calf pneumonia by indirect ELISA. *Tropical Animal Health and Production* 44 (5): 1105–1110.
158. Saliki JT, Dubovi EJ (2004) Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhoea virus infections. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice* 20: 69-83.
159. Sandvik T (1999) Laboratory diagnostic investigations for bovine viral diarrhoea virus infections in cattle. *Veterinary Microbiology* 64: 123-134.
160. Sarikaya B, Azkur AK, Gazyagci S (2012) Genetic variability of bovine viral diarrhoea virus in the 5'-UTR in the central anatolia of Turkey. *Acta Scientiae Veterinariae* 40(1): 1013.
161. Sacco RE, McGill JL, Pillatzki AE et al (2014) Respiratory Syncytial Virus Infection in Cattle. *Veterinary Pathology* 51(2): 427-436.
162. Saha T, Guha C, Chakraborty D et al (2010) Isolation and characterization of BoHV-1 from cattle in West Bengal, India. *Iranian Journal of Veterinary Science and Technology* 2(1): 1-8.
163. Santurde G, Silva ND, Villares R et al (1996) Rapid and high sensitivity test for direct detection of bovine herpesvirus - 1 genome in clinical samples. *Veterinary Microbiology* 49 (1–2): 81–92.
164. Schneider MJ, Tait RG, Busby WD et al (2009) An evaluation of bovine respiratory disease complex in feedlot cattle: Impact on performance and carcass traits using treatment records and lung lesion scores. *Journal of Animal Science* 87(5): 1821–1827.
165. Schudel AA, Carillo BJ, Wyler R et al (1986) Infections of calves with antigenic variants of BHV-1 and neurological disease. *Journal of Veterinary Medicine* 33B: 303–310.
166. Schwyzer M, Ackermann M (1996) Molecular virology of ruminant herpesviruses. *Veterinary Microbiology* 53: 17-29.

167. Smith GA, Young PL, Reed KC (1995) Emergence of a new bovine herpesvirus 1 strain in Australian feedlots. *Archives of Virology* 140: 599–603
168. Smith MH, Frey ML, Dierks RE (1975) Isolation, characterization, and pathogenicity studies of a bovine respiratory syncytial virus. *Archives of Virology* 47 (3): 237–247.
169. Smith RA (2000) Effects of feedlot disease on economics, production and carcass value. *Bovine Practitioner* 33: 125-128.
170. Sobhy NM, Mor SK, Bastawecy IM et al (2017) Surveillance, isolation and complete genome sequence of bovine parainfluenza virus type 3 in Egyptian cattle. *International Journal of Veterinary Science and Medicine* 5(1): 8–13.
171. Socha W, Rola J (2011) Comparison of four RT-PCR assays for detection of bovine respiratory syncytial virus. *Polish Journal of Veterinary Sciences* 14(3): 449–451..
172. Straub OC (1990) Infectious bovine rhinotracheitis virus. Editor: DİNTER Z, MOREİN B, *Virus Infections of Ruminants*. Oxford: Elsevier Science Publishers BV, pp: 71–108.
173. Studdert MJ (2010) Bovine herpesviruses. Editors: MAHY BWJ, VAN REGENMORTELM MHV, *Desk Encyclopedia of Animal and Bacterial Virology*. Academic Press, Oxford, pp: 65-71.
174. Tan TM, Karaoglu T, Erol N et al (2006) Serological and virological investigations of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection in dairy cattle herds in Aydın. *Turkish Journal Of Veterinary And Animal Sciences* 30: 299–304.
175. Taylor JD, Fulton RW, Lehenbauer TW et al (2010) The epidemiology of bovine respiratory disease: What is the evidence for predisposing factors? *The Canadian Veterinary Journal* 51: 1095–1102.
176. Thantrige-Don N, Lung O, Furukawa-Stoffer T et al (2018) A novel multiplex PCR-electronic microarray assay for rapid and simultaneous detection of bovine respiratory and enteric pathogens. *Journal of Virological Methods* 261. 51-62.
177. Thonur L, Maley M, Gilray J et al (2012) One-step multiplex real time RT-PCR for the detection of bovine respiratory syncytial virus, bovine herpesvirus 1 and bovine parainfluenza virus 3. *BMC Veterinary Research* 8(1): 37.
178. Thurmond MC (2005) Virus transmission. Editor: GOYAL SM, RIDPATH JF, *Bovine Viral Diarrhea Virus Diagnosis, Management, and Control*. Blackwell Publishing, USA, pp: 91-104.
179. Timurkan MO, Sait A, Aydın H (2016) Solunum sistemi enfeksiyonlarına sebep olan önemli viral etkenlerin (Bovine Parainfluenza Virus - 3 (BPIV3) ve Bovine Respiratory Syncytial Virus (BRSV) araştırılması: Moleküler karakterizasyon çalışması. XII. Ulusal Veteriner Hekimleri Mikrobiyoloji Kongresi, Nevşehir, s: 39-40.
180. Toth TE, Jankura D (1990) Analysis of Bovine parainfluenza-3 virus replication in bovine embryonic lung cells by indirect fluorescent antibody and hemadsorption assays. *Journal of Virological Methods* 27: 113-120.

181. Trudel M, Nadon F, Simard C et al (1989) Comparison of caprine, human and bovine strains of respiratory syncytial virus. *Archives of Virology* 107: 141-149.
182. Tuncer-Göktuna P, Alpay G, Öner EB et al (2016) The role of herpesviruses (BoHV-1 and BoHV-4) and pestiviruses (BVDV and BDV) in ruminant abortion cases in western turkey. *Tropical Animal Health and Production* 48(5): 175-179.
183. Tuncer-Göktuna P, Yeşilbağ K (2017) Evaluation of diagnostic methods for the detection of pestiviruses in clinical samples. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 41: 175-179.
184. Tuncer P (2013) Sığır sürülerinde solunum sistemi viruslarının enfeksiyon dinamiğinin serolojik takibi ve klinik olgulardan virus tespiti, Doktora tezi, Uludağ Üniversitesi, Bursa.
185. Turin L, Russo S (2003) BHV-1 infection in cattle: an update. *Veterinary Bulletin* 73: 16–21.
186. Urban-Chmiel R, Grooms DL (2012) Prevention and control of bovine respiratory disease. *Journal of Livestock Science* 3(3): 27–36.
187. Urban-Chmiel R, Wernicki A, Majer-Dziedzic B et al (2014) Use of different cell lines for in vitro cultures of bovine respiratory syncytial virus. *Journal of Virological Methods* 204: 62-64.
188. Valarcher JF, Bourhy H, Gelfi J et al (1999) Evaluation of a Nested reverse transcription-PCR assay based on the nucleoprotein gene for diagnosis of spontaneous and experimental bovine respiratory syncytial virus infections. *Journal of Clinical Microbiology* 37(6): 1858-1862.
189. Valarcher JF, Hägglund S (2006) Viral Respiratory Infections in Cattle. XXIV. World Buiatrics Congress, France, pp: 1-14.
190. Valarcher JF, Schelcher F, Bourhy H (2000) Evolution of bovine respiratory syncytial virus. *Journal of Virology* 74(22): 10714–10728.
191. Valarcher JF, Taylor G (2007) Bovine respiratory syncytial virus infection. *Veterinary Research*, 38: 153-180.
192. Valentova V, Kovarcik K, Psikal I (2003) detection of bovine respiratory syncytial virus in cell cultures by nested RT-PCR and use of the method for virus identification in clinical samples. *Acta Veterinaria Brno* 72: 115–122.
193. VanderLey B, Ridpath J, Sweiger S (2011) Comparison of detection of bovine virus diarrhoea virus antigen in various types of tissue and fluid samples collected from persistently infected cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 23: 84-86.
194. Van der Poel WHM, Brand A, Kramps JA et al (1994) Respiratory syncytial virus infections in human beings and in cattle. *Journal of Infection* 29(2): 215–228.
195. Van Oirschot JT, Kaashoek MJ, Maris-Veldhuis MA et al (1997) An Enzyme-Linked Immunosorbent Assay to detect antibodies against glycoprotein gE of bovine herpesvirus 1 allows differentiation between infected and vaccinated cattle. *Journal of Virological Methods* 67: 23-34.
196. Van Vuuren M (2004) Bovine respiratory syncytial virus infection. *Infectious Diseases of Livestock*. Oxford University Press, Cape Town, pp: 677-680.

197. Vaucher RA, Simonetti AB, Roehe PA (2008) RT-PCR for detection of bovine parainfluenza virus type 3 (BPIV-3). *Acta Scientiae Veterinariae* 36 (3): 215–220
198. Vilcek S (1993) Detection of the bovine herpesvirus-1 (BHV-1) genome by PCR. *Journal of Virological Methods* 41:245–248.
199. Vilcek S, Elvander M, Ballagi-Pordany A et al (1994) Development of nested PCR assays for detection of bovine respiratory syncytial virus in clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology* 32(9): 2225–2231.
200. Vilcek S, Nettleton P, Paton D et al (1997) Molecular characterization of ovine pestiviruses. *Journal of General Virology* 78: 725–735.
201. ViralZone (2018) Respirivirus, [https://viralzone.expasy.org/87?outline=all\\_by\\_species](https://viralzone.expasy.org/87?outline=all_by_species) (20.12.2018).
202. Waner JL (1999) Parainfluenza Viruses. Editor: MURRAY PR *Manual of Clinical Microbiology*. American Society for Microbiology, 7th edition, New York, pp: 1157-1197.
203. Wen YJ, Shi XC, Wang FX et al (2012) Phylogenetic analysis of the bovine parainfluenza virus type 3 from cattle herds revealing the existence of a genotype a strain in China. *Virus Genes* 45:542-547.
204. West K, Bogdan J, Hamel A et al (1998) A Comparison of diagnostic methods for the detection of bovine respiratory syncytial virus in experimental clinical specimens. *Canadian Journal of Veterinary Research* 62: 245–250.
205. Xia JQ, Yason CV, Kibenge FS (1995) Comparison of dot blot hybridization, polymerase chain reaction, and virus isolation for detection of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) in artificially infected bovine semen. *Canadian Journal of Veterinary Research* 59(2): 102–109.
206. Yavru S, Şimşek A, Yapkiç O et al (2005) Serological evaluation of viral infections in bovine respiratory tract. *Acta Veterinaria Belgrade* 55: 219-226.
207. Yener Z, Sağlam YS, Timurkaan N et al (2005) Immunohistochemical detection of parainfluenza type 3 virus antigens in paraffin sections of pneumonic caprine lungs. *Journal of Veterinary Medicine Series A: Physiology Pathology Clinical Medicine* 52(6): 268–271.
208. Yeşilbağ K (2017) Genel Viroloji, Genişletilmiş 2. Baskı, Medyay Kitabevi, Bursa, s: 61-104.
209. Yeşilbağ K, Alpay G, Becher P (2017) Variability and global distribution of subgenotypes of bovine viral diarrhoea virus. *Viruses* 9(6): 128.
210. Yeşilbağ K, Alpay G, Öner EB et al (2018) Isolation and characterization of BoHV-1.2 in Turkish cattle. 11th International Congress for Veterinary Virology – 12th Annual Meeting of EPIZONE, Vienna, pp:33.
211. Yeşilbağ K, Burgu İ (2003) Epitopic characterisation of Turkish bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates using monoclonal antibodies. *Acta Veterinaria Hungarica* 51(2): 237–244.
212. Yeşilbağ K, Güngör B (2008) Seroprevalence of bovine respiratory viruses in North-Western Turkey. *Tropical Animal Health and Production*, 40, 55-60.
213. Yeşilbağ K, Güngör B (2009) Antibody prevalence against respiratory viruses in sheep and goats in north-western Turkey. *Tropical Animal Health and Production* 41: 421-425.



214. Yeşilbağ K, Förster C, Bank-Wolf B et al (2008) Genetic heterogeneity of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates from Turkey: identification of a New subgroup in BVDV-1. *Veterinary Microbiology* 130: 258-267.
215. Yeşilbağ K, Förster C, Özyiğit MO et al (2014) Characterisation of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates from an outbreak with haemorrhagic enteritis and severe pneumonia. *Veterinary Microbiology* 169: 42-49.
216. Yıldırım Y, Burgu İ (2005) Kuzeydoğu Anadolu bölgesindeki sığırlarda mavidil (BT), IBR, PI-3, EBL ve BVD enfeksiyonlarının seroprevalansı. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 52: 113-117.
217. Yüzbaşıgil AF (2010) Kuzu pnömonilerinde patolojik ve bakteriyolojik incelemeler ile parainfluenza 3 (PI-3) virusunun etiyolojideki rolü. Doktora tezi, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya.
218. Zhu YM, Shi HF, Gao YR et al (2011) Isolation and genetic characterization of bovine parainfluenza virus type 3 from cattle in China. *Veterinary Microbiology* 149: 446-451.

## 7. SİMGELER ve KISALTMALAR

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
BoHV-1	: Bovine herpesvirus-1
bp	: Baz çifti (basepair)
BPIV-3	: Bovineparainfluenza virus-3
BRSV	: Bovinerespiratoriksinsityalvirus
BVDV	: Bovineviraldiarrheavirus
C veya NS	: Yapısal olmayan protein
cm <sup>2</sup>	: Santimetre kare
cp	: Sitopatojen
cpe	: Sitopatojenik etki
CRSV	: Caprinerespiratoriksinsityalvirus
dk	: Dakika
DMEM	: Dulbecco'sModifiedEagle'sMedium
DMF	: Di-metil-formamid
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
ELISA	: EnzymeLinkedImmunsorbentAssay
F	: Füzyon proteini
FDS	: Fötal dana serumu
G	: Glikoprotein
HAd	: Hemadsorbsiyon
HADYEK	: Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
HN	: Hemaglütinin-Nöyrominidaz proteini
HRSV	: İnsan respiratoriksinsityalvirusu
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	: Hidrojen peroksit
IBR	: İnfeksiyözbovinerhinotracheitis
Ig	: İmmunglobulin
IPMA	: İmmunoperoksidazmonolayerassay
IU	: İnternasyonel ünite
kb	: Kilobaz
L	: RNA bağımlı polimeraz proteini
M	: Matriks proteini
MDBK	: Madin Darby Bovine Kidney
MHC	: Majör histokompatibilitekompleksi
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
N	: Nükleokapsid proteini
nep	: Non-sitopatojen
nm	: Nanometre

ORF	: Open readingframe (okuma bölgesi)
P	: Fosfoprotein
PBS	: Phosphatebufferedsaline
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
pmol	: Pikomol
RNA	: Ribonükleik asit
RT-PCR	: Revers transkripsiyon-Polimeraz zincir reaksiyonu
SH	: Küçük hidrofobik protein
sn	: Saniye
USD	: Amerikan doları
UTR	: Untranslatedregion (Bilgi kodlamayan bölge)
VI	: Virus izolasyonu
VNT	: Virus nötralizasyon testi
%	: Yüzde
$\mu$ l	: Mikrolitre



## 8. EKLER

### EK1. Etik Kurul Kararı

T.C. ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU Görükle Yerleşkesi, 16059 Nilüfer/ BURSA-TÜRKİYE ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYI						
<b>BAŞVURU BİLGİLERİ</b>	ARAŞTIRMANIN ADI	Klinik ve Nekropsi Örneklerinde Sığır Solunum Sistemi Viruslarının Moleküler Teşhisi				
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ	Prof. Dr. Kadir YEŞİLBAĞ				
	KURUMU	UÜ Veteriner Fakültesi Viroloji AD				
	YARDIMCI ARAŞTIRICILAR	Doktora Öğrencisi Eda Baldan ÖNER				
	ARAŞTIRMANIN NİTELİĞİ	Eda Baldan ÖNER'in Doktora Tez Projesi				
	ARAŞTIRMANIN SÜRESİ	2016 - 2019				
	KULLANILACAK HAYVAN TÜRÜ VE SAYISI	150 Adet Sığırın Mezbaha Materyalleri				
DESTEKLEYİCİ KURULUŞ	UÜ - BAPK'na Başvurulacak					
<b>DEĞERLENDİRİLEN İLGİLİ BELGELER</b>	<b>Belge Adı</b>		<b>Tarihi</b>			
	ARAŞTIRMA BAŞVURU FORMU		15.03.2016			
<b>KARAR BİLGİLERİ</b>	<b>Karar No : 2016 - 05 / 03</b>		<b>Tarih : 05.04.2016</b>			
	Uludağ Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (HADYEK) Yönergesi 12 / h maddesi uyanınca HADYEK onayına gerek bulunmamaktadır.					
<b>ETİK KURUL BİLGİLERİ</b>						
<b>ÜYELER</b>						
Unvanı / Adı / Soyadı EK Üyeliği	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 BÜYÜKUYSAL 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. Müfit 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- Zootečni	Ziraat Fakültesi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H			
Prof. Dr. Sibel TAŞ IŞIK 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 KÜÇÜKYILDIZ Üye	Veteriner Hekim	UÜ-DEHYUAM	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H			

## 9. TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince sayısız deneyim kazanmamı sağlayan, desteğini, ilgisini ve en önemlisi değerli bilgisini hiçbir zaman esirgemeyen ve bana her daim güvenerek beni cesaretlendiren danışman hocam sayın Prof. Dr. Kadir YEŞİLBAĞ'a sonsuz teşekkür ederim.

Tez çalışmamın örneklerinin temininde her daim yardımcı olan Vet. Hek. Okan COŞ'a ve Vet. Hek. Ozan KURTARAN'a teşekkürü borç bilirim.

Bu süreçte hep yanımda olan, deneyimleri ve bilgilerini benimle paylaşan ve yoluma ışık tutan değerli ablalarım ve iş arkadaşlarım Dr. Pelin TUNCER-GÖKTUNA'ya ve Araş. Gör. Dr. Gizem ALPAY'a, lisans eğitimimden bu yana her daim yanımda olan çok sevgili arkadaşım Araş. Gör. Özge ARDIÇLI'ya, doktora eğitimimin bilgi ve tecrübe katkıları yanı sıra çok güzel arkadaşlar kazandırdığımın da kanıtı olan, iyi ve kötü gün ayırmadan her zaman yanımda olan Araş. Gör. Dr. Deniz DİNÇEL'e, Araş. Gör. Dr. Sena ARDIÇLI'ya, Dokt. Öğr. Üyesi Ali SORUCU'ya, Araş. Gör. Dr. Muhammed DUMAN'a, Araş. Gör. Dr. Ender UZABACI'ya, Araş. Gör. Elif GÖKÇE'ye, Dokt. Öğr. Nail Tekin ÖNDER'e ve Doç. Dr. Selim ALÇAY'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ben bu yolda ilerlerken beni hep destekleyen, anlayışını, ilgisini ve sabrını benden esirgemeyen, o güzel ve sıcacık kalbini bana açan sevgili eşim Dr. Berk TOKER'e sonsuz minnetimi sunuyorum. Beni kendi kızları gibi seven, bu süreçte her zaman yanımda olan ve en önemlisi böyle güzel bir evlat yetiştirdikleri için kayınvalidem Şerife TOKER ve kayınpederim Hakan TOKER'e çok teşekkür ederim.

Son olarak beni bu günlere getiren, büyüten, meslek sahibi olmam için beni destekleyen, başarılarımla gurur duyan, korktuğum ya da tökezlediğim anlarda beni cesaretlendiren aileme, canım anneannem ve kıymetlim Mürşide YAMAN'a, merhum dedem ve kıymetlim Şinasi YAMAN'a, biricik annem Gaye Sevil ÖNER'e, biricik babam Mehmet ÖNER'e ve bir yanımın çocuk kalmasını sağlayan minik kardeşim Hayal Melek ÖNER'e sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

## 10. ÖZGEÇMİŞ

20.01.1989 tarihinde Bandırma’da doğmuştur. İlköğretim ve ortaöğretimi Denizli Hürriyet İlköğretim Okulu’nda ve lise öğrenimini Antalya Lisesi’nde tamamlamıştır. 2006 yılında Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesinde başlamış olduğu üniversite eğitimini 2012 yılında tamamlayarak Veteriner Hekim ünvanı alarak mezun olmuştur. Daha sonra 2014 yılında Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı doktora öğrencisi olarak lisansüstü eğitimine başlamıştır. Anabilim dalında yürütülen birçok proje ve çalışmada görev alarak doktora eğitimini 2018 yılında tamamlamıştır. Doktora eğitimi sürecinde yer aldığı araştırmalar kapsamında, yurt içi ve uluslararası indekslerde taranan dergilerde yer alan derleme ve araştırma makaleleri bulunmaktadır. Evli ve Bursa’da ikamet etmektedir.

ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ

TEZ ÇOĞALTMA VE ELEKTRONİK YAYIMLAMA İZİN FORMU

Yazar Adı Soyadı	Eda Baldan TOKER
Tez Adı	Klinik Ve Nekropsi Örneklerinde Sığır Solunum Sistemi Viruslarının Moleküler Teşhisi
Enstitü	Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Veteriner – Viroloji Anabilim Dalı
Bilim Dalı	
Tez Türü	Doktora
Tez Danışman(lar)ı	Prof. Dr. Kadir YEŞİLBAĞ
Çoğaltma (Fotokopi Çekim) İzni	<input type="checkbox"/> Tezimden fotokopi çekilmesine izin veriyorum <input type="checkbox"/> Tezimin sadece içindikiler, özet, kaynakça ve içeriğinin % 10 bölümünün fotokopi çekilmesine izin veriyorum <input checked="" type="checkbox"/> Tezimden fotokopi çekilmesine izin vermiyorum
Yayımlama İzni	<input checked="" type="checkbox"/> Tezimin elektronik ortamda yayımlanmasına izin veriyorum <input type="checkbox"/> Tezimin elektronik ortamda yayımlanmasının ertelenmesini istiyorum 1 yıl <input type="checkbox"/> 2 yıl <input type="checkbox"/> 3 yıl <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Tezimin elektronik ortamda yayımlanmasına izin vermiyorum

Hazırlamış olduğum tezimin yukarıda belirttiğim hususlar dikkate alınarak, fikri mülkiyet haklarım saklı kalmak üzere Uludağ Üniversitesi Kütüphane ve Dokümantasyon Daire Başkanlığı tarafından hizmete sunulmasına izin verdiğimi beyan ederim.

Tarih: 08.02.2019

İmza: