T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

SIĞIRLARDA İNFLUENZA D VİRUSUNUN SAPTANMASI, İZOLASYONU, MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU ve OLUŞAN İMMUN YANITIN ARAŞTIRILMASI

Hasan Emre TALİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Aysun YILMAZ

Veterinerlik Viroloji Anabilim Dalı

Veterinerlik Virolojisi, Doktora Programı

Haziran, 2024

Annem, babam ve ablama ithaf ediyorum.

BÜTÇE DESTEKLERİ

SIĞIRLARDA İNFLUENZA D VİRUSUNUN SAPTANMASI, İZOLASYONU, MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU ve OLUŞAN İMMUN YANITIN ARAŞTIRILMASI

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje numarası: 35137

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması sürecinde bilgi birikimi, tecrübe ve desteği ile her zaman yanımda olan danışman hocam Prof. Dr. Aysun YILMAZ başta olmak üzere, Anabilim Dalımızın öğretim üyeleri Prof. Dr. Hüseyin YILMAZ ve Prof. Dr. Nuri TURAN'a teşekkür ederim. Seroloji çalışmalarımdaki yardımları için Dr. Ana MORENO'ya teşekkür ederim. Laboratuvar çalışmalarımda destekleriyle yanımda olan Araş. Gör. Dr. Özge AYDIN, Araş. Gör. İsmail Egemen ÖZKAN ile Dr. Semaha Gül YILMAZ'a; örnek toplama sürecinde yardımcı olan doktora öğrencisi Gizem KARADAĞ'a teşekkürlerimi sunarım.

Eğitim hayatımda her zaman yanımda olan annem Melek TALİ, babam Bahittin TALİ ve ablam Esra TALİ'ye teşekkür ederim.

Tez çalışmamın bütçesini destekleyen İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederim.

Haziran 2024 Hasan Emre TALİ

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

İTHAF ..... **ii**
BÜTÇE DESTEKLERİ ..... **ii**
TEŞEKKÜR ..... **iiii**
İÇİNDEKİLER ..... **iv**
ŞEKİL LİSTESİ ..... **ix**
TABLO LİSTESİ ..... **xi**
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ ..... **xii**
ÖZET ..... **xvi**
ABSTRACT ..... **xviii**
1. GİRİŞ **1**
2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE **3**
2.1. TARİHÇE……...……3
2.2. ETKEN……....4
2.2.1. Virusun Sınıflandırılması.....4
2.2.2. İnfluenza Virusların Neden Olduğu İnfeksiyonlar.....5
2.2.3. Viral Genom, Proteinler ve Reseptörler……6
2.2.4. Yapısal Proteinler…….……8
2.2.4.1 PB2, PB1 ve P3 Proteinleri……8
2.2.4.2 Hemaglutinin-Esteraz Füzyon (HEF) Proteini……8
2.2.4.3 Nükleoprotein…….……9
2.2.4.4 Matriks Proteini……..…....9
2.2.5. Yapısal Olmayan Proteinler……..…...……...10
2.2.5.1 NS1 ve NS2 Proteinleri……...……..10
2.2.6 Viral Replikasyon…….....10
2.2.7. Antijenik Shift ve Antijenik Drift……...11
2.2.8. IDV'nin Kökeni ve IDV Genotipleri……...……...12
2.2.9. İnfluenza D Virusunun Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri……...…...…….....14

2.3. EPİDEMİYOLOJİ.....15
2.3.1. Konak Duyarlılığı.....15
2.3.2. Bulaşma.....16
2.3.3. Morbidite ve Mortalite.....17
2.3.4. Türkiye'de IDV Sıklığı ve Genotipleri.....18
2.3.5. Dünyada IDV Sıklığı ve Genotipleri.....18
2.4. PATOGENEZ.....21
2.5. İMMUNİTE.....23
2.5.1. Doğal Bağışıklık.....25
2.5.2. Kazanılmış Bağışıklık.....27
2.6. KLİNİK BELİRTİLER.....28
2.7. NEKROPSİ ve HİSTOPATOLOJİK BULGULAR.....29
2.8. TANI.....30
2.8.1. Virus İzolasyonu ve İdentifikasyonu.....31
2.8.1.1. Embriyolu Tavuk Yumurtasında İzolasyon.....31
2.8.1.2. Hücre Kültürlerinde İzolasyon.....32
2.8.1.3. Plak Assay.....32
2.8.2. Serolojik Yöntemler.....33
2.8.2.1. Hemaglütinasyon-İnhibisyon.....33
2.8.2.2. Virus Nötralizasyon.....33
2.8.2.3. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....33
2.8.2.4. Western İmmunobloting.....34
2.8.3. Moleküler Yöntemler.....34
2.8.3.1. RT-PCR.....34
2.8.3.2. Real time RT PCR.....35
2.8.3.3. Sekans ve Filogenetik Analizler.....35
2.8.4. İmmunohistokimyasal Yöntemler.....36
2.8.2. Ayırıcı Tanı.....36
2.9. KORUMA VE KONTROL.....36
2.9.1. Aşı Çalışmaları.....36
2.9.2. Yönetim ve Biyogüvenlik Uygulamaları.....37
3. YÖNTEM.....**39**
3.1. GEREÇ.....39

3.1.1. Çiftlikler ve Toplanan Örnekler....39
3.1.2. Moleküler Çalışmalarda Kullanılan Gereçler....39
3.1.2.1. Kitler, Primerler, Prob ve Kontroller……....39
3.1.2.2. Moleküler Testlerde Kullanılan Kimyasallar….....44
3.1.2.3. Moleküler Testlerde Kullanılan Malzemeler ve Cihazlar....45
3.1.3. Virus İzolasyonunda ve Titrasyonu için Kullanılan Kimyasallar ve Gereçler....45
3.1.3.1. Hücre Kültüründe Kullanılan Kimyasallar....45
3.1.3.2. Hücre Hattı....47
3.1.3.3. Hücre Kültürü Plastik Sarf Malzemeleri....48
3.1.3.4. Hücre Kültürü Çalışmalarında Kullanılan Cihazlar....48
3.1.3.5. Embriyolu Tavuk Yumurtası Temini ve Kullanılan Gereçler....48
3.1.3.6. Hemaglütinasyon Testinde Kullanılan Gereçler....48
3.1.4. SDS-PAGE Testinde Kullanılan Gereçler....49
3.1.4.1. SDS-PAGE'te Kullanılan Kimyasallar....49
3.1.4.2. SDS-PAGE'te Kullanılan Cihazlar....50
3.1.5. Serolojik Çalışmalarda Kullanılan Gereçler…….....50
3.1.5.1. ELISA'da Kullanılan Kimyasallar....50
3.1.5.2. Western Blot Testinde Kullanılan Kimyasallar....51
3.1.5.3. Serolojik Testlerde Kullanılan Malzemeler ve Cihazlar....51
3.2. YÖNTEM....52
3.2.1. Çiftlikler ve Örnek Toplanması....52
3.2.2. Moleküler Testler....53
3.2.2.1. RNA Ekstraksiyonu....53
3.2.2.2. RNA Ekstraksiyonun Değerlendirilmesi....53
3.2.2.3. Sekans Çalışmaları için RT-PCR....55
3.2.2.4. Horizontal Jel Elektroforez....56
3.2.2.5. Filogenetik Analizler ve Soyağacı Oluşturulması....56
3.2.3. Hücre Kültüründe Virus İzolasyonu....57
3.2.4. Embriyolu Tavuk Yumurtasında Virus İzolasyonu....57
3.2.5. Viral Proteinlerin Ayrıştırılması....58
3.2.5.1. Sodium Dodecyl Sulfate–Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)....58
3.2.6. Serolojik Çalışmalar....59
3.2.6.1. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)....59

3.2.6.2. Hemaglutinasyon ve Hemaglutinasyon İnhibisyon Testi…….....61
3.2.6.3. Western Blotting…….....62
3.2.7. İstatiksel Analizler.....63
4. BULGULAR…….…….....64
4.1. KLİNİK BULGULAR …….....64
4.2. RNA EKSTRAKSİYONUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ …….....65
4.2.1. RNA Konsantrasyonu.....65
4.2.2. RNA Saflığı Çalışması.....66
4.3. REAL TİME RT-PCR BULGULARI.....67
4.4. VİRUS İZOLASYONU…….....68
4.5. EMBRİYOLU TAVUK YUMURTASINA İNOKULASYON BULGULARI...…..69
4.6. HEMAGLUTİNASYON TESTİ BULGULARI.....71
4.7. SEKANS VE FİLOGENETİK ANALİZLER.....71
4.7.1. Kısmi HEF Geni Sekansı….....71
4.7.2. Tüm HEF Geni Sekansı.....78
4.8. SDS-PAGE BULGULARI….…….....82
4.9. SEROLOJİK BULGULAR….....82
4.9.1. ELISA Bulguları…….....82
4.9.2. Hemaglutinasyon İnhibisyon Testi Bulguları.....89
4.9.3. Western Blotting Bulguları.....90
4.10. İSTATİSTİK SONUÇLARI.....91
5. TARTIŞMA 93
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 101
KAYNAKLAR.....103
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI 114

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: IDV'nin tarihsel gelişimi (Sreenivasan ve diğ., 2021)……..….4
Şekil 2.2: *Orthomyxoviridae* familyası (Hao ve diğ., 2022; Vaira ve Milne, 2008)……...….5
Şekil 2.3: İnfluenza virusların hastalık oluşturabildiği türler (Skelton ve Huber, 2022)…….....6
Şekil 2.4: İnfluenza D virusu 7 segmenti ve genom organizasyonu (Su ve diğ., 2017)…….7
Şekil 2.5: İnfluenza virusların (A, B, C, D) yapısı ve bazı özellikleri (Yu ve diğ., 2021)…….8
Şekil 2.6: İnfluenza D virusunun yapısal proteinleri (Asha ve Kumar, 2019)…….....….9
Şekil 2.7: İnfluenza A ve D virusların viral ribonükleoprotein yapısı (Skelton ve Huber, 2022)…….....10
Şekil 2.8: İnfluenza viruslarda viral replikasyon (Nuwarda ve diğ., 2021)…….….11
Şekil 2.9: İnfluenza viruslarda antijenik shift ve antijenik drift (Yeo ve Gan, 2021)……..12
Şekil 2.10: IDV HEF geni temelinde oluşturulmuş filogenetik ağaç (Yu ve diğ., 2022)……..….....14
Şekil 2.11: İnfluenza A, B, C ve D virusların konak duyarlılığı (Sreenivasan ve diğ., 2019).16
Şekil 2.12: Dünyada IDV'nin kıtalara ve ülkelere yayılımı……..…..20
Şekil 2.13: Sağlıklı solunum ekosistemini etkileyen faktörler ve BRD oluşumu (Chai ve diğ., 2022)…….22
Şekil 2.14: IDV ve ICV'de konak ve organ tropizmi (Sreenivasan ve diğ., 2021)……..23
Şekil 2.15: Sığırların respiratör patojenlere maruz kaldığında konak savunması (Chai ve diğ., 2022)…….26
Şekil 2.16: İnfluenza viruslarda doğal immun yanıt (Skelton ve Huber, 2022)…...……...…26
Şekil 2.17: İnfluenza viruslarda kazanılmış bağışıklık ve infekte hücrelerin sitotoksik T hücreleri tarafından öldürülmesi (Xiang ve diğ., 2015)……..…….28
Şekil 2.18: IDV ile infekte edilmiş trakea dokularında epitelyal nötrofil infiltrasyonları ve epitelyal attenüasyon (Ferguson ve diğ., 2016)……..…….30
Şekil 2.19: Sığırları BRDC ve IDV infeksiyonlarından korumak için gereken uygulamalar (Cummings ve diğ., 2022)…….....38
Şekil 3.1: Projede tasarlanan primer çiftlerinin HEF geni içinde yerleşimi.....42
Şekil 3.1 (devam): Projede tasarlanan primer çiftlerinin HEF geni içinde yerleşimi.....43
Şekil 3.1 (devam): Projede tasarlanan primer çiftlerinin HEF geni içinde yerleşimi.....44
Şekil 3.2: HRT-18 hücrelerinin 10X mikroskop objektifinde monolayer görüntüsü……...47
Şekil 3.3: Tez örneklerinin toplandığı bölgeler, işlenmesi ve kullanılan yöntemler…….52
Şekil 3.4: Embriyolu yumurtaların farklı günlerdeki gelişimleri …….……..…..58
Şekil 3.5: ELISA plakasında örneklerin dizilimi.....60
Şekil 4.1: RNA saflık çalışması verileri ve hesabı …….…….…….....66
Şekil 4.2: RNA saflık çalışması real time RT-PCR amplifikasyon eğrileri ve meting curve…….…….66
Şekil 4.3: Pozitif kontrolün 10 katlı dilüsyonu…….67
Şekil 4.4: Trakya bölgesinden toplanan örneklerin ve pozitiflik görülen çiftliklerin sayısı ve coğrafik dağılımı……..…….68
Şekil 4.5: Real time RT-PCR ile pozitif saptanan örnekler……..…….…….....68

Şekil 4.6: Hücre kültüründe virus izolasyonu yapılan örneklerin ışık mikroskobu altındaki 4X objektifte görüntüleri…….....69
Şekil 4.7: Embriyolu yumurtalardan allontoik sıvının toplanması…….....70
Şekil 4.8: Real time RT-PCR sonrası allantoik sıvıların amplifikasyon eğrileri…..…….....70
Şekil 4.9: Allantoik sıvılardan yapılan hemaglutinasyon sonuçları……..……....71
Şekil 4.10: 4. pasaj sonrasında yapılan RT-PCR sonrasında jel yüklenen ürünlerin UV ışını altındaki görüntüsü.…….…….……..…...72
Şekil 4.11: Kısmi HEF geni sekans analizi sonucunda GenBank'a girişi yapılan sekansların filogenetik ağaçtaki yerleşimi.....73
Şekil 4.12: Kısmi HEF geni sekans analizi sonucunda GenBank'a giriş yapılan sekansların diğer araştırmacılar tarafından bildirilen sekanslarla yakınlıklarını gösteren heatmap.....74
Şekil 4.13: RT-PCR sonucu %1,5 agaroz jelde yürütülen 618bp, 498bp ve 623bp ürünlerin görüntüsü.....78
Şekil 4.14: Tüm HEF geni analizi sonucunda elde edilen sekansların filogenetik ağaçtaki yerleşimi.....79
Şekil 4.15: Sekans analizi sonucunda GenBank'a giriş yapılan tüm HEF geni sekanslarının diğer araştırmacılar tarafından bildirilen sekanslarla yakınlıkları gösteren heatmap. …..……...……..…..80
Şekil 4.16: Tüm HEF sekanslarının aminoasit dizilimlerindeki farklılıklar…….81
Şekil 4.17: 2202-15 nolu virusun SDS-PAGE jel görüntüsü…….....82
Şekil 4.18: Çiftlik bazında ELISA pozitiflik oranları…….....87
Şekil 4.18 (devam): Çiftlik bazında ELISA pozitiflik oranları…….....88
Şekil 4.19: Farklı çiftliklere ait serumların hemaglutinasyon inhibisyon titreleri……....89
Şekil 4.20: 403-11 nolu serum ve IDV virusu ile yapılan Western blotting membran görüntüsü……...91

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 3.1: Çalışmada kullanılan primerler ile primerlerin hedefledikleri bölge, dizimleri, ürün büyüklükleri ve gen dizilimindeki yerleri…….....40
Tablo 3.2: Çalışmada kullanılan Consensus primerler ile primerlerin hedefledikleri bölge, dizimleri, ürün büyüklükleri ve gen dizilimindeki yerleri……..……....41
Tablo 3.3: Beta aktin PCR karışımı bileşenleri ve konsantrasyonları…..…..…….....54
Tablo 3.4: Real time RT-PCR karışımı bileşenleri ve konsantrasyonları.....……...55
Tablo 3.5: Sekans RT-PCR karışımı bileşenleri ve konsantrasyonları...……....……..…55
Tablo 3.6: SDS-PAGE jele yüklenen örnek karışımı bileşenleri…….....…..59
Tablo 3.7: Western blot için hazırlanan SDS jelin düzeni ve uygulamalar…….……..62
Tablo 4.1: Çalışmada kullanılan örneklere ait çiftlik ve hayvan bilgileri.....64
Tablo 4.2: Ekstraksiyon etkinliğinde kullanılan örneklerin RNA miktar ve saflıkları…….....65
Tablo 4.3: Pasajlama sonrası yapılan real time RT-PCR her pasaj için Ct değerleri……..…69
Tablo 4.4: Allantoik sıvılardan yapılan real time RT-PCR sonucu sıcaklıklara göre Ct değerleri.....71
Tablo 4.5: GenBank'a bildirilen örneklerin kodu, türü, alındıkları şehir, yıl ve GenBank erişim numaraları…….....72
Tablo 4.6: ELISA çalışılan örneklerin kodları, OD değerleri ve % Inhibiton değerleri.....84
Tablo 4.6: ELISA çalışılan örneklerin kodları, OD değerleri ve % Inhibiton değerleri (devam).....85
Tablo 4.7: Çiftliklere göre ELISA ile seropozitiflik saptanan hayvanların sayısı.....86
Tablo 4.8: Serum örneklerinde saptanan HI titreleri…….……...90
Tablo 4.9: Sığırların demografik verileri ile IDV seropozitif oranları, %95 güven aralığı ve Fisher's exact test sonuçları.....92
Tablo 4.10: Sığırlarda görülen semptomlar ile IDV seropozitif ve seronegatif oranları, %95 güven aralığı ve Fisher's exact test sonuçları.....92

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
°C	: Santigrad Derece
ng	: Nanogram
nM	: Nanomolar
α	: Alfa
β	: Beta
µL	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar

Kısaltmalar	Açıklama
9-O-Ac-Sia	: 9-O-Acetylated Sialic Acid
ADCC	: Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity (Antikor Bağımlı Hücresel Sitotoksite)
BAV-3	: Bovine Adenovirus-3
BCoV	: Bovine Coronavirus
BHK-21	: Baby Hamster Kidney-21
BHV-1	: Bovine Herpes Virus-1
bp	: Basepair
BPIV-3	: Bovine Parainfluenza Virus-3
BRDC	: Bovine Respiratory Disease Complex
BRSV	: Bovine Respiratory Syncytial Virus
BVDV	: Bovine Viral Diarrhea Virus
CCL2	: Chemokine (C-C Motif) Ligand 2
CCL3	: Chemokine (C-C Motif) Ligand 3
CCL4	: Chemokine (C-C Motif) Ligand 4
CD4+	: Clusters of Differentiation 4+
CD8+	: Clusters of Differentiation 8+
cDNA	: Complementary DNA (Komplementer DNA)

CO_2 : Karbondioksit
CPE : Cytopathic Effect (Sitopatik Etki)
Ct : Cycle Treshold
CTL8 : Cytotoxic T Lymphocyte (Sitotoksik T Lenfosit)
DMEM F-12 : Dulbecco's Minimum Essential Medium F-12
DMSO : Dimethyl Sulfoxide (Dimetil Sülfoksit)
DNA : Deoxyribonucleic Acid (Deoksiribonükleik Asit)
dNTP : Deoxyribonucleotide Triphosphate
DPBS : Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
EDTA : Ethylenediamine Tetraacetic Acid
ELISA : Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FBS : Fetal Bovine Serum
GMT : Geometric Mean Titer (Geometrik Ortalama Titresi)
HA : Hemaglutinin
HAU : Hemagglutination Unit (Hemaglutinasyon Ünitesi)
HEF : Hemaglutinin-Esterase Fusion
HI : Hemagglutination Inhibition (Hemaglutinasyon İnhibisyon)
HIA : Hemagglutination Inhibition Assay (Hemaglutinasyon İnhibisyon Testi)
IAV : Influenza A Virus
IBV : Influenza B Virus
ICV : Influenza C Virus
IDV : Influenza D Virus
IFN : Interferon
IgA : Immunoglobulin A
IgG : Immunoglobulin G
IgM : Immunoglobulin M
Il-13 : Interleukin-13
IL-1β : Interleukin-1β
IL-2 : Interleukin-2
IL-4 : Interleukin-4
IL-6 : Interleukin-6
IRF : Interferon-Regulatory Factor
ISG : Interferon-Stimulated Gene
kDa : Kilodalton

M1 : Matrix 1

MAb : Monoclonal Antibody (Monoklonal Antikor)

MDCK : Madin-Darby Canine Kindey

MEM : Minimum Essential Medium

$MgCl_2$: Magnezyum Klorür

MHC : Major Histocompatibility Complex

ml : Mililitre

mRNA : Messenger RNA

NA : Neuraminidase

Neu5,9Ac2 : 5-N-Acetyl-9-O-Acetyl Neuraminic Acid

NF_KB : Nuclear Factor Kappa B

NK : Natural Killer (Doğal Öldürücü)

nm : Nanometre

NP : Nucleoprotein (Nükleoprotein)

NS1 : Non-Structural 1 (Yapısal Olmayan Protein 1)

NS2 : Non-Structural 2 (Yapısal Olmayan Protein 2)

OD : Optical Dansity (Optik Dansite)

OPD : *O*-Phenylenediamine Dihydrochloride

ORF : Open Reading Frame (Açık Okuma Kalıbı)

P3 : Polymerase 3

PB1 : Polymerase Basic 1

PB2 : Polymerase Basic 2

PBS : Phosphate Buffered Saline

PCR : Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

PFU : Plaque Forming Unit (Plak Oluşturan Ünite)

pH : Potential of Hydrogen

RBC : Red Blood Cell (Kırmızı Kan Hücresi)

RdRp : RNA-Dependent RNA Polymerase (RNA Bağımlı RNA Polimeraz)

RNA : Ribonucleic Acid (Ribonükleik Asit)

RNP : Ribonucleoprotein (Ribonükleoprotein)

rpm : Revolutions Per Minute

RT : Reverse Transcriptase (Ters Transkripsiyon)

RT-PCR : Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

RT-qPCR : Reverse Transcription-Quantitative Polymerase Chain Reaction (Ters Transkripsiyon Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulphate–Polyacrylamide Gel Electrophoresis

spp. : Species (Tür)

ST : Swine Testicular

TAE : Tris-Acetate-EDTA

Th1 : T Helper Type 1

Th2 : T Helper Type 2

Th17 : T Helper Type

TNF-α : Tumor Necrosis Factor-α

UV : Ultraviolet

Vero : Verda Reno

vRNP : Viral Ribonucleoprotein (Viral Ribonükleoprotein)

ÖZET

DOKTORA TEZİ

SIĞIRLARDA İNFLUENZA D VİRUSUNUN SAPTANMASI, İZOLASYONU, MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU ve OLUŞAN İMMUN YANITIN ARAŞTIRILMASI

Hasan Emre TALİ

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Veterinerlik Viroloji Anabilim Dalı

Veterinerlik Virolojisi, Doktora Programı

Danışman: Prof. Dr. Aysun YILMAZ

İnfluenza D virusu (IDV) sığırlarda solunum yolu infeksiyonlarına neden olmaktadır. Dünya çapında farklı ülkelerde ve ülkemizde tespit edilen IDV, farklı oranlarda morbidite göstermiş ve sığırlarda önemli ekonomik kayıplara neden olan sığırların kompleks solunum yolu hastalığı (Bovine Respiratory Disease Complex=BRDC) ile ilişkili bulunmuştur. Günümüzde henüz IDV aşısı yoktur ve bu nedenle IDV için uygulanan koruma ve kontrol stratejileri hijyen ve iyi yönetim uygulamaları şeklinde yapılmaktadır.

Bu tez çalışmasında IDV'nin saptanması, izolasyonu, moleküler karakterizasyonu ve immun yanıtının araştırılması amacıyla ülkemizde Marmara Bölgesi'nden örnekler toplandı. Solunum yolu hastalık belirtileri gösteren sığırlardan (n=279) alınan nazal svab ve kan örneklerinde moleküler ve serolojik yöntemler kullanılarak İnfluenza D virusu ve oluşan immun yanıt araştırıldı.

Real time RT-PCR ile IDV yönünden pozitif bulunan örneklerde HRT-18 hücreleri ve embriyolu tavuk yumurtaları kullanılarak virus izolasyon çalışmaları yapıldı. Virus izolasyonu sonrasında kısmi ve tüm HEF geni temelinde sekanslama yöntemi ile filogenetik analizler gerçekleştirildi. İzole edilen virusun hemaglutinasyon (HA) titresi belirlendi ve viral proteinleri SDS-PAGE ile ayrıştırıldı ve protein bantları görüntülendi. Alınan kan örneklerinde antikor taraması amacıyla ELISA testi yapıldı. Antikor tespiti yapılan serum örneklerinde hemaglütinasyon inhibisyon (HI) testi ile titre tespiti gerçekleştirildi. Yüksek HI titresi saptanan bir serumla, IDV infeksiyonu sonucu oluşan antikorların virusun hangi ağırlıktaki (kDa) proteinlerine karşı immun yanıt oluşturduğu Western blotting yöntemiyle araştırıldı.

Yapılan çalışmalar sonucunda, solunum sistemi belirtileri gösteren 279 sığırdan toplanan nazal svab örneklerin 5 tanesinde IDV-RNA'sı tespit edildi (%1,79). RT-PCR ile pozitif bulunan örneklerle HRT-18 hücre kültüründe ve embriyolu tavuk yumurtasında virus izolasyonu çalışması yapıldı. Beş (5) nazal svab örneğinden IDV izole edildi. Bu örneklerin hepsinde kısmi HEF geni ve 4 tanesinde tüm HEF geni sekanslandı. IDV'nin HEF genine ait farklı bölge ve ülkelerden araştırmacıların bildirdiği sekanslar GenBank'tan temin edildi ve bu tez çalışmasında elde edilen sekans dizileri ile filogentik analiz yapılarak soyağacı oluşturuldu. Pozitif saptanan örneklerden 2020-2021 yıllarında toplanan örnekler D/OK genogrubunda kümelenirken 2024 yılında toplanan örnekler D/Yama2019 genogrubunda kümelendiği bulundu.

ELISA ile yapılan antikor tarama çalışmalarında, 279 hayvana ait serumlardan 79 tanesinde IDV antikorları tespit edildi (%28,3). Antikor saptanan örneklerde hemaglutinasyon inhibisyon testi yapılarak bu serumların HI titreleri belirlendi. Serum örneklerinde HI değerleri 128-512 HI ünitesi arasında değişkenlik gösterdi. İzole edilen virusun SDS-PAGE yöntemiyle viral proteinleri ayrıştırıldı ve bantlar görüntülendi. Yüksek HI titresi saptanan bir serumla yapılan Western blotting ile antikorların virusun hangi kDa proteinlerine bağlandığı araştırıldı ve IDV'nin 100 kDa civarında bir proteinine bağlandığı tespit edildi.

Sonuç olarak, Marmara Bölgesi'nde sirküle olan IDV'lerin ülkemizde izolasyonu ilk kez yapıldı ve viruslara karşı oluşan serolojik yanıt ELISA, HI ve Western blotting ile ilk kez araştırıldı ve yüksek oranda (%28,3) seropozitiflik bulundu. Western immunobloting çalışmalarında saha infeksiyonu sonucu oluşan antikorların IDV'nin 100 kDa ağırlığındaki proteinine karşı reaksiyon verdiği görülmüş olması, aşı çalışmalarında bu proteinin dikkate alınması gerekliliğini ortaya koymuştur. Ayrıca, HEF geninin tüm genom çalışmaları sonucunda, virusun D/OK ve D/Yama2019 suşuna benzer olduğu tespit edildi. Bu nedenle, ülkemize özgün otojen aşı üretilmesi durumunda bu virusların kullanılması aşılama stratejileri açısından önem arz etmektedir.

Haziran 2024 , 140 sayfa.

Anahtar kelimeler: İnfluenza D virus, RT-PCR, ELISA, Filogenetik, Western Blotting

ABSTRACT

Ph.D. THESIS

DETECTION, ISOLATION, MOLECULAR CHARACTERISATION and IMMUNE RESPONSE to INFLUENZA D VIRUS in CATTLE

Hasan Emre TALİ

İstanbul University-Cerrahpaşa

Institute of Graduate Studies

Department of Virology

Virology PhD Programme

Supervisor : Prof. Dr. Aysun YILMAZ

Influenza D virus (IDV) causes respiratory system infections in cattle. IDV has been reported globally in several countries including Turkiye with various degrees of morbidity. It has been reported that IDV contributes to Bovine Respiratory Disease Complex (BRDC) in cattle which causes great economical loses. There are no vaccines available for IDV yet and hereby strategies for prevention and control of IDV include hygiene and good management pratices.

In this thesis, detection, isolation, molecular characterisation and immun response to IDV in cattle were aimed. For this purpose, samples (n=279) was collected from Marmara region of Turkiye. These samples were collected from animals with respiratory disease symptoms and include nasal swabs and blood. Virus isolation and antibody response were investigated using molecular and serological techniques.

Followed by IDV-RNA detection by real time RT-PCR, virus isolation on cell culture and embryonated eggs were performed. After virus isolation, positive samples were confirmed by RT-PCR and phylogenetic anaylses were carried out on partial and whole HEF gene. In addition, hemaglutination (HA) titers were determined and viral proteins were separated by SDS-PAGE. For antibody response, ELISA and hemagglutination inhibition (HI) tests were performed. A serum with high antibody titre was used in Western blotting to determine the molecular weight (kDa) of which viral proteins binds to antibodies produced by IDV post-infection.

According to the results, out of 279 nasal swabs, IDV-RNA was detected in five cattle (1,79%). These 5 samples found to be positive by real time RT-PCR were subjected to virus isolation on HRT-18 cell cultures and embryonated eggs. Sequences of partial HEF gene was

obtained from 5 samples and whole HEF gene of 4 samples. Sequences reported from different regions and countries in the world were provided from GenBank and these sequences were used for the phlogenetic analyses to generate phlogenetic trees with the sequences obtained in this thesis. Positive samples which were collected in 2020-2021 were aligned in D/OK lineage and samples collected in 2024 were aligned in D/Yama2019 lineage.

ELISA results indicated that IDV antibodies were detected in 79 (28,3%) of 279 cattle sera. Positive samples were also analysed by HI to determine hemagglutination inhibition titers and HI unites were found to be between 128 and 512. A serum with high HI titer was used for western blotting to investigate antibodies bind to which viral proteins and antibodies were reacted with a 100kDa protein of IDV.

In conclusion, IDV which has been circulating in Marmara region was isolated and the seroprevalance was investigated by ELISA, HI and Western blotting for the first time and antibodies to IDV were detected in 28,3% cattle. In Western immunoblotting studies, it was observed that antibodies formed as a result of field infection reacted with the 100 kDa protein of IDV, which indicate that this protein should be taken into consideration in vaccine studies. In addition, as a result of whole genome studies of the HEF gene, it was determined that the virus was similar to the D/OK and D/Yama2019 strains. Therefore, it is important to use these viruses in terms of vaccination strategies in case of production of autogenous vaccines specific to our country.

June 2024, 140 pages.

Keywords: Influenza D virus, RT-PCR, ELISA, Phlylogenetic, Western Blotting

This study was funded by Scientific Research Projects Coordination Unit of Istanbul University-Cerrahpasa Rectorate. Project number: 35137

1. GİRİŞ

İnfluenza D virusu (IDV) ilk olarak Amerika Birleşik Devletleri'nde 2011 yılında Hause ve diğ. (2013) tarafından domuzlarda izole edilmiş ve daha sonra yapılan moleküler ve serolojik çalışmalar sonucunda ana konağın sığır olduğu ortaya konulmuştur. İnfluenza D virusu *Orthomyxoviridae* familyasında *Deltainfluenzavirus* genusunda yer almaktadır.

IDV sığırlarda solunum güçlüğü, burun akıntısı, öksürük gibi solunum yolu belirtileriyle karakterize bir hastalık tablosu ile seyretmektedir. IDV tek başına infeksiyona neden olduğunda düşük mortalite ile seyretmekle beraber, sığırlarda önemli ekonomik kayıplara neden olan sığırların kompleks solunum yolu hastalığının (Bovine Respiratory Disease Complex=BRDC) oluşumuna katkıda bulunduğu bildirilmiştir.

IDV dünya çapında farklı ülkelerde ve ülkemizde bildirilmiştir. Solunum yolu belirtileri ile seyreden sığır popülasyonlarında morbidite farklılık göstermektedir. Henüz IDV'ye karşı bir aşı geliştirilmediği için dünyanın çeşitli bölgelerindeki hayvan topluluklarında sürveyans çalışmaları önem taşımaktadır. IDV aşısı olmadığı için sığırları IDV'den korumak amacıyla hijyen ve iyi yönetim uygulamaları önem taşımaktadır.

İnfluenza viruslar doğası gereği konak immun yanıtından kurtulma mekanizması ve çevresel faktörlerin etkisiyle antijenik shift ve drift sonucu genetik değişimlere uğrarlar. Bu mutasyon ve rekombinasyon sonucu influenza viruslar farklı türlere adapte olarak onları infekte etme yeteneği kazanabilmektedir. Bu nedenle, günümüzde doğal olarak sığır, domuz, koyun, keçi, at ve deve gibi türleri infekte edebilen IDV'nin zoonotik olma ihtimali olduğu vurgulanmaktadır. Bu bağlamda, IDV'nin HEF proteini reseptör bağlanma noktası olup söz konusu proteinin insanda trake epitellerine bağlanabilmesi IDV'nin ileride halk sağlığı için bir tehdit olabileceği görüşünü desteklemektedir.

Bu tez çalışmasında moleküler ve serolojik yöntemlerden yararlanılarak ülkemizde IDV varlığının saptanması, izolasyonu, moleküler karakterizasyonu ve virusun immun sistemde oluşturduğu yanıtın araştırılması hedeflendi. Bahsedilen amaçlarla Marmara Bölgesi'nde Kırklareli, Edirne, Tekirdağ ve İstanbul illerinde bulunan küçük aile ve entegre sığır çiftlikleri ziyaret edildi. Solunum yolu hastalık belirtisi gösteren <12 ay yaştaki hayvanlardan nazal svab ve kan örnekleri alındı. Nazal svablardan RNA ekstraksiyonu yapılarak cDNA elde edildi ve real time RT-PCR analizleri yapıldı. real time RT-PCR analizleri sonucunda pozitif çıkan örneklerden hücre kültüründe ve embriyolu tavuk yumurtalarında virus izolasyonu çalışmaları yürütüldü. Virus izolasyonunu takiben RT-PCR ile kısmi ve tüm HEF geni sekanslaması ile

filogenetik analizler gerçekleştirilerek IDV HEF geni için soyağacı oluşturuldu. Sığırlarda immun yanıtın araştırılması ve IDV antikorlarının tespitine yönelik, kan serumu örneklerinde ELISA yapıldı ve pozitif bulunan tüm örneklerde hemaglutinasyon inhibisyon testi ile pozitif serumların HI titresi belirlendi. İzole edilen virusun SDS-PAGE ile viral proteinleri ayrıştırıldı. Yüksek HI titreli bir serum örneği ve izole edilen virus kullanılarak western blotting ile IDV antikorunun virusun hangi kDa viral proteinine bağlandığı araştırıldı.

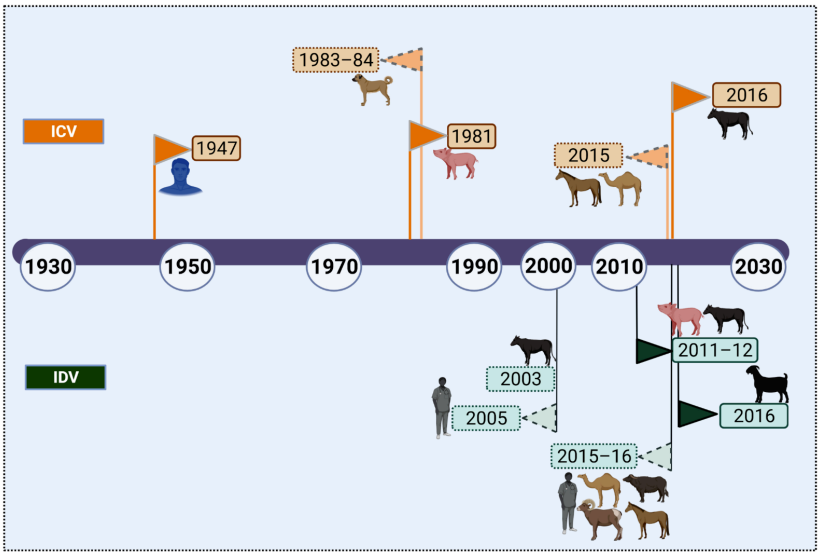
2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE

2.1 TARİHÇE

İnfluenza D virusu (IDV), ilk olarak, 2011 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nin Oklahoma Eyaleti'nde ciddi solunum sistemi hastalığı semptomları gösteren bir domuzdan izole edilmiş ve yapılan filogenetik çalışmalar sonucunda İnfluenza C virusu (ICV) ile %50 oranında benzerlik gösterdiği bulunmuştur (Hause ve diğ., 2013). Bu bağlamda yapılan antikor çalışmaları ve çapraz reaksiyonların incelenmesi ile iki virusun oluşturduğu immun yanıt arasında zayıf bir çapraz reaksiyon saptanmış olması nedeniyle IDV farklı bir genus içinde yer almıştır (Asha ve Kumar, 2019). IDV'nin detaylı genetik, biyolojik ve antijenik karakterizasyonu üzerine yapılan çalışmalarda sığır ve domuzlardan izole edilen IDV'nin, ICV'den ayrıştığı görülmüş ve tespit edilen yüksek antikor titreleri, yayılımı ve izolasyon kolaylığı üzerine IDV için ana konağın asıl olarak sığır olduğu bulunmuş ve sığırdan ilk olarak 2014 yılında izole edilmiştir (Hause ve diğ., 2014).

IDV'nin tarihsel (Şekil 2.1.) gelişimi ile ilgili özellikle 2011 yılından sonra yapılan çalışmalar sonucu sığırlarda görülen IDV infeksiyonları Japonya, Meksika, Fransa, İrlanda, İtalya, Lüksemburg, Kanada, Çin ve Türkiye dahil birçok ülkede rapor edilmiştir (Jiang ve diğ., 2014; Ducatez ve diğ., 2015; Flynn ve diğ., 2018; Nedland ve diğ., 2018; Zhang ve diğ., 2019a; Yilmaz ve diğ., 2020). IDV'nin, diğer ülkeler ve ülkemizde sığırlarda yüksek morbidite ve mortalite ile seyreden ve sık görülen sığırların kompleks solunum yolu hastalığının (Bovine Respiratory Disease Complex=BRDC) oluşumuna katkıda bulunduğu bildirilmiştir (Su ve diğ., 2017). BRDC, morbidite ve mortaliteye bağlı olarak meydana gelen kayıplar, tedavi masrafları ve karkas değerinde düşüşler nedeniyle, et ve süt endüstrisi için ekonomik açıdan önemli bir hastalıktır (Taylor ve diğ., 2010). Amerika Birleşik Devletleri'nde, Fransa'da ve Çin'de BRDC görülen sığırlarda yapılan çalışmalarda IDV pozitifliği saptanmış olması dikkat çekilmesi gereken bir noktadır (Collin ve diğ., 2015; Ducatez ve diğ., 2015; Jiang ve diğ., 2014). Ayrıca IDV'nin farklı sığır popülasyonlarında yüksek seroprevalans göstermesi BRD oluşumu için potansiyel bir risk oluşturduğu ve hastalığın şiddetini arttırabildiğini göstermiştir (Mitra ve diğ., 2016; Nedland ve diğ., 2018; Quast ve diğ., 2015). Bu nedenle ülkemizde de son yıllarda IDV

ile ilgili çalışmaların başlamış olması dikkat çekicidir (Yılmaz ve diğ., 2020; Yeşilbağ ve diğ., 2022).

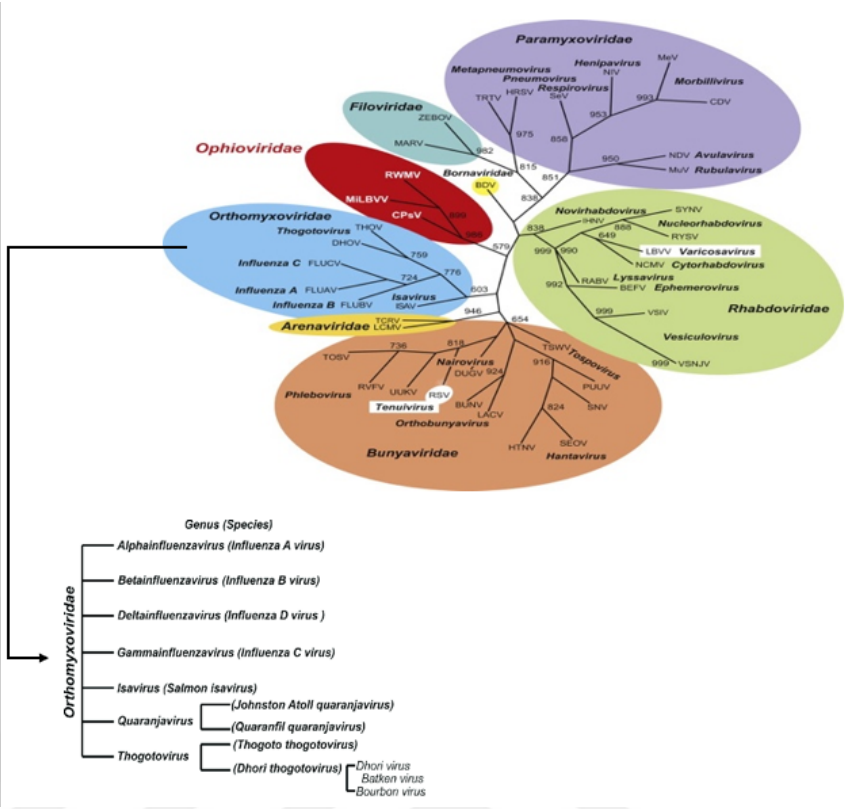


Şekil 2.1: IDV'nin tarihsel gelişimi (Sreenivasan ve diğ., 2021).

2.2. ETKEN

2.2.1. Virusun Sınıflandırılması

İnfluenza D virusu *Orthomyxoviridae* familyasında yer almaktadır. Filogenetik açıdan segmentli genoma sahip diğer RNA viruslardan *Bunyaviridae*, *Arenaviridae*, *Ophioviridae* ailelerine yakındır (Şekil 2.2). *Orthomyxoviridae* familyasında 7 genus bulunmakta ve bu genuslardan 4 tanesini influenza virusları oluşturmaktadır (Hause ve diğ., 2017). Bunlar, İnfluenza A (IAV), İnfluenza B (IBV), İnfluenza C (ICV) viruslarına ek olarak *Orthomyxoviridae* familyasının son üyesi İnfluenza D virusu'dur (Şekil 2.2) (Ferguson ve diğ., 2016; Hao ve diğ., 2022). IDV, tek zincirli, negatif polariteli ve hemaglutinin esteraz füzyon (hemaglutinin-esterase fusion=HEF) glikoproteini, PB2, PB1 ve P3 polimerazları, nükleoprotein, matriks proteinleri (M1 ve CM2) ve yapısal olmayan proteinler (NS1 ve NEP) olmak üzere dokuz tane protein kodlayan ve 7 genomik segmentten oluşan *Orthomyxoviridae* familyasında ve *Deltainfluenzavirus* genusunda bulunan RNA'lı bir virustur (Ferguson ve diğ., 2016; Asha ve Kumar, 2019). Segmentlerin büyüklüğü 0,76 ila 2,32 kb arasında değişmektedir. Genomun toplam büyüklüğü yaklaşık 10 Kb'dir. Virionlar yaklaşık 80-120 nm çapındadır. Yedi segmentli olması yönünden A ve B influenza viruslardan (8 segmentli) farklıdır.



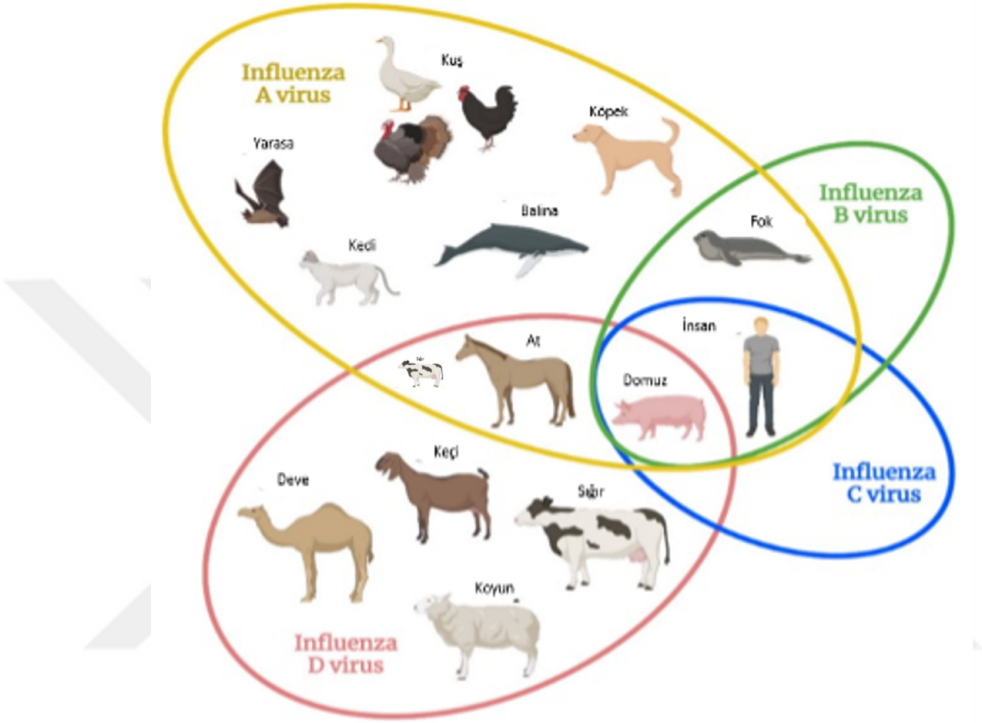
Şekil 2.2: *Orthomyxoviridae* familyası (Vaira ve Milne, 2008; Hao ve diğ., 2022)

2.2.2 İnfluenza Virusların Neden Olduğu İnfeksiyonlar

İnfluenza viruslar farklı türlerde solunum sistemi infeksiyonlarına neden olurlar (Şekil 2.3). İnfluenza A viruslar genellikle su kuşlarından köken alır ve başlıca kanatlı hayvanlarda solunum sistemi infksiyonlarına neden olurlar. IAV, IBV ve ICV insanlarda solunum sistemi hastalıklarına neden olmaktadır. IAV ve IBV, insanlarda şiddetli hastalık tablolarına ve mevsimsel influenza epidemilerine neden olurlar. ICV sağlıklı bireylerde hafif bir klinik tablo ile kendini gösterirken, iki yaş altındaki çocuklarda şiddetli alt solunum yolu infeksiyonları oluşturduğu bildirilmiştir (Sederdahl ve Williams, 2020). Günümüzde hem ICV hem IDV sığırlarda tespit edilen influenzalardır. IDV, *Orthomyxoviridae* ailesinin en son keşfedilen üyesi olup virusun ana konağının sığır olduğu tespit edilmiştir (Hause ve diğ., 2014). IDV, sığırlar üzerinde hafif bir solunum sistemi infeksiyonu tarzında seyreder fakat trakeada nötrofil birikimi ve epitel hücre atenüasyonu diğer patojenlerle sekonder infeksiyon oluşumuna neden olduğu için hayvanları solunum sistemi hastalıklarına karşı predispoze hale getirdiği bildirilmiştir (Ferguson ve diğ., 2016).

Ana konağı sığır olan IDV, Amerika Birleşik Devletleri ve Kanada'da at popülasyonları ile koyun ve keçi gibi küçük ruminantlarda da tespit edilmiş olup koyun ve keçilerde sırasıyla %5,2 ve %8,8 oranlarında IDV yönünden seropozitiflik saptanması bu hayvanların söz konusu

infeksiyon için potansiyel rezervuar olabileceğini ve diğer hayvanlara bulaştırabileceğini göstermektedir (Şekil 2.3). Kanatlı popülasyonlarında ise henüz IDV antikorları ve herhangi bir hastalık tablosu saptanmamıştır (Quast ve diğ., 2015; Nedland ve diğ., 2018). Bununla birlikte, Malezya'daki bir biyoaerosol sürveyans çalışmasında, bir kanatlı çiftliği ortamında IDV genomunun saptandığı rapor edilmiştir (Bailey ve diğ. 2020).

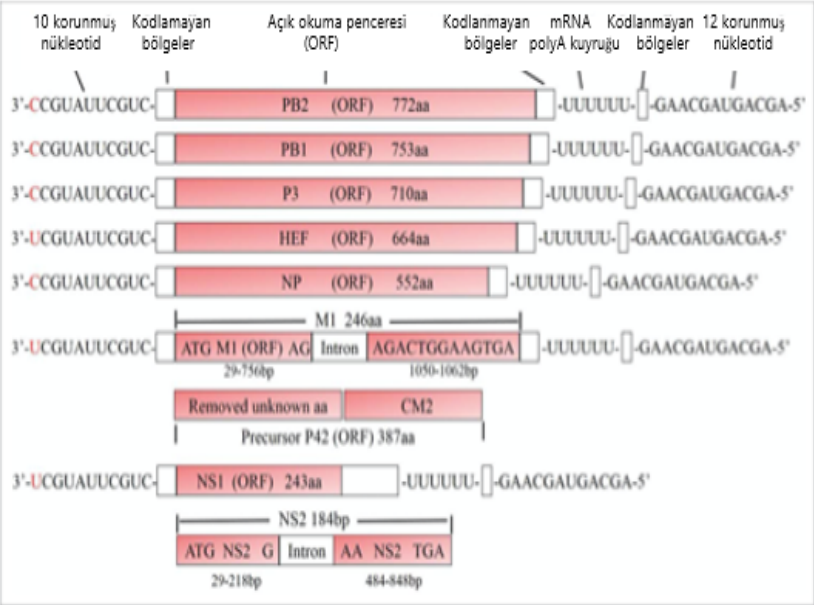


Şekil 2.3: İnfluenza virusların hastalık oluşturabildiği türler (Skelton ve Huber, 2022).

2.2.3 Viral Genom, Viral Proteinler ve Reseptörler

IDV'nin genomu 7 segmentlidir ve genom 9 adet proteini kodlamaktadır (Ferguson ve diğ., 2016). Genomun toplam büyüklüğü yaklaşık 10 Kb'dir. Virionlar 80-120 nm çapındadır. ICV genomu da 7 segmentten oluşmuştur. Buna karşın IAV ve IBV genomu 8 segmentlidir. En uzun üç segment viral replikasyon ve viral mRNA sentezinde görev alan PB2, PB1 ve P3 polimerazlarının genlerini kodlamaktadır. Dördüncü segment HEF glikoproteininin genini kodlar. Bu protein IDV ile ICV arasındaki yapısal benzerliğin de temeli olup virusun hücreye girişinde önemli rol oynamaktadır. IDV-HEF açık reseptör bağlayıcı boşluklu yapısıyla, çeşitli uzunluktaki glikan yapılı viral bölgeler için alan oluşturmakta ve bu özelliği de virusa geniş hücre tropizmi özelliği sağlamaktadır (Song ve diğ., 2016). Viral ribonükleoprotein kompleksinin kaynağı olan nükleoproteini (NP) genini kodlayan segment beşinci segmenttir (Noda ve Kawaoka, 2010). Altıncı segment, viral membranın iç yüzünü kaplayan DM1 proteini ile proton kanal aktivitesini yürüten DM2 matriks proteinlerinin genlerini kodlar (Kumar ve

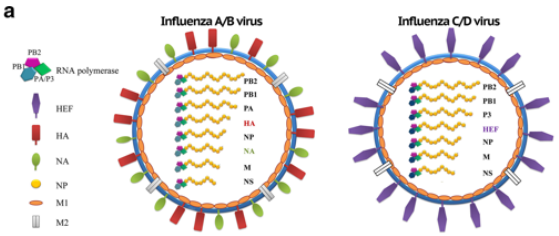
diğ., 2015). Yedinci ve son segment ise, hücresel interferon yanıtını nötralize etmekte görev alan ve ribonükleoproteinlerin hücreden çıkışını düzenleyen yapısal olmayan NS1 ve NEP proteinlerinin genlerini kodlanmasından sorumludur (Şekil 2.4) (Paterson ve Fodor, 2012).



Şekil 2.4: İnfluenza D virusunun 7 segmenti ve genom organizasyonu (Su ve diğ., 2017)

IDV ve ICV, IAV ve IBV'den farklı olarak 8 segment yerine 7 segmentli bir genom içerir ve glikoprotein olarak HA ve NA yerine HEF glikoproteini bulundurur. IAV hızlı bir şekilde evrimsel değişikliklere uğrayarak (antijenik shift) ve HA ve NA segmentlerinin farklı kombinasyonları ile çeşitli alttipler halinde bulunabilirler. Buna karşın IBV, ICV ve IDV daha yavaş evrimsel değişikliklere uğrayarak (antijenik drift) antijenik ve filogenetik özellikleri temelinde farklı suşlar halinde bulunurlar (Sreenivasan ve diğ. 2023). IAV ve IBV reseptör olarak α-2, 3 veya α-2, 6 bağlantılı sialik asit reseptörlerini kullanırlar. Buna karşın, ICV, Neu5,9Ac_2 reseptörünü kullanır. IDV ise Neu5,9Ac_2 reseptörüne ek olarak Neu5Gc9Ac de olmak üzere iki tür reseptör kullanmaktadır. IDV'nin HEF proteininin kristal yapıları hem serbest formda hem de kompleks halde ICV'nin HEF geni ile oldukça benzerlik göstermektedir. IDV HEF geni açık bir reseptör bağlayıcı boşluklara sahiptir ve böylece farklı glikan parçalara uyum sağlamaktadır. Bu yapısal farklılık IDV'nin geniş hücresel tropizmine sahip olmasını açıklamaktadır (Şekil 2.5) (Song ve diğ., 2016; Yu ve diğ., 2021).

a



b

Virus	IAV	IBV	ICV	IDV
Hastalığın şiddeti	++++	++	+	+
Rezervuar/Ana konak	Su kuşları	İnsan	İnsan	Sığır
İnsanda epidemi	Evet	Evet	Periyodik	Hayır
İnsanda pandemi	Evet	Hayır	Hayır	Hayır
Hayvan konakları	Kuş, at, domuz, köpek, deniz memelileri	Fok	Domuz ve köpek	Domuz, sığır, keçi, koyun, at, deve
Antijenik değişiklikler	Shift Drift	Drift	Drift	Drift
Genom	8 segment	8 segment	7 segment	7 segment
Glikoproteinler	HA, NA	HA, NA	HEF	HEF
Reseptörler	α-2, 3 veya α-2, 6 bağlantılı sialik asit	α-2, 3 veya α-2, 6 bağlantılı sialik asit	$Neu5,9Ac_2$	$Neu5Gc9Ac$ ve $Neu5,9Ac_2$

Şekil 2.5: İnfluenza virusların (A, B, C, D) yapısı ve bazı özellikleri (Yu ve diğ., 2021).

2.2.4. Yapısal Proteinler

2.2.4.1 PB2, PB1 ve P3 Proteinleri

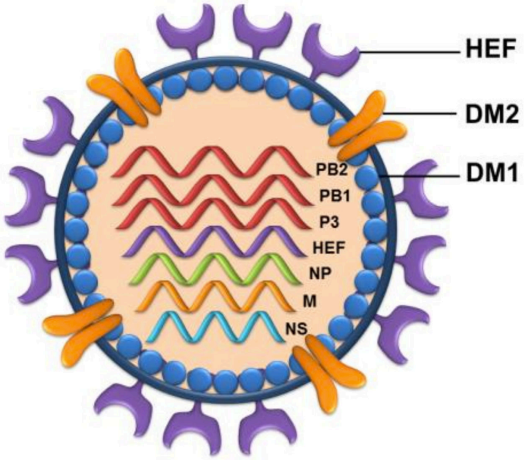
PB2, PB1 ve P3 polimerazları RNA bağımlı RNA polimeraz kompleksini oluşturan trimer proteinlerdir (Raegan ve Huber, 2022). Bu proteinler kompleks halinde RNP'lerin bir ucunu sınırlandırmaktadırlar. PB1, polimeraz aktif kısmı barındırmaktayken PB2 ve P3, sırasıyla, bağlanma ucu ve endonükleaz faaliyetinden sorumlu olup transkripsiyonun başlamasında rol alırlar (Wolff ve Veit, 2021). Endonükleaz aktif bölge olan P3, IDV ve diğer influenza viruslarda aynıdır. IDV'nin bağlanma ucu olan PB2'nin guanin bağlayan rezidüleri IAV ile birlikte korunmuş haldeyken fosfat bağlayan rezidüleri ise farklıdır (Su ve diğ., 2017).

2.2.4.2 Hemaglutinin-Esteraz Füzyon (HEF) Proteini

Virusun tomurcuklanma aşaması IAV ve IBV için neurominidaz (NA) aktivitesi ile gerçekleşmekteyken IDV'de ve ICV'de HEF proteinin esteraz aktivitesi ile gerçekleşmektedir. HEF proteini konak reseptörüne bağlanma, membran birleşimi, esteraz aktivitesi ve yeni virionların saçımı ile ilişkili bir proteindir (Şekil 2.6). HEF proteinin önemli bir özelliği, IAV ve IBV'de HA ve NA proteinlerinin görev aldığı bağlanma ve rezidü kümeleştiren fonksiyonlarını tek başına yapabilmesidir. Bu durum aynı zamanda IAV ve IBV'nin sekiz adet RNA segmenti barındırırken ICV ile birlikte IDV'nin sadece yedi adet RNA segmentine sahip olmasını da açıklamaktadır (Raegan ve Huber, 2022).

ICV'nin hafif bir hastalık tablosu oluşturması, konakların üst solunum yollarında (33°C'de) infekte olan hücrede bulunan ICV HEF proteininin bu düşük sıcaklığa çok duyarlı

olması ile ilgilidir. Söz konusu bu sıcaklık duyarlılığı daha yüksek ısıda olan alt solunum yollarında ICV'nin replike olmasını sınırlayabilmektedir. IDV'nin HEF proteini ICV'nin HEF proteininden farklı olarak, şaşırtıcı derecede sıcaklık ve asidik ortam direnci göstermektedir (Yu ve diğ., 2017). IDV'nin sahip olduğu HEF proteini, diğer tüm influenza virusları içerisinde en stabil kalan yüzey proteini olup çeşitli konak türlerini infekte edebilmesine ve yayılımına yardımcı bir unsurdur. Açıklanan sebeplerden dolayı IDV'nin HEF proteini, IDV'yi diğer üç influenza viruslarından ayırmakta ve etiyolojik açıdan araştırılmasına devam edilmesi gerekliliğini ortaya çıkarmaktadır (Wolff ve Veit, 2021; Raegan ve Huber, 2022).



Şekil 2.6: İnfluenza D virusunun yapısal proteinleri (Asha ve Kumar, 2019).

2.2.4.3 Nükleoprotein (NP)

IDV'nin nükleoproteini, vRNP'ler içerisinde RdRp komponentleri ile birlikte viral RNA'nın paketlenmesinde görev almaktadır (Raegan ve Huber, 2022). IDV genomu çeşitli miktarlarda NP kopyaları ile kaplı RNA segmentlerinde meydana gelir. Bu ribonükleoproteinler transkripsiyon ve replikasyon için mutlak olarak gereklidir. IDV infekte hücrelerin nükleuslarında transkripsiyona uğrar ve replike olur ve NP'ler ile polimeraz altüniteler hücrenin nükleer transport sistemleri etkileşim içerisinde kalmak zorundadırlar. Yapılan biyokimyasal immunofloresans çalışmasında saha virusu IDV'lerin NP'leri nükleus içerisinde kalırken, mutant viruslar sitoplazma içerisinde bulunmaktadır (Donchet ve diğ., 2019).

2.2.4.4 Matriks Proteini (M)

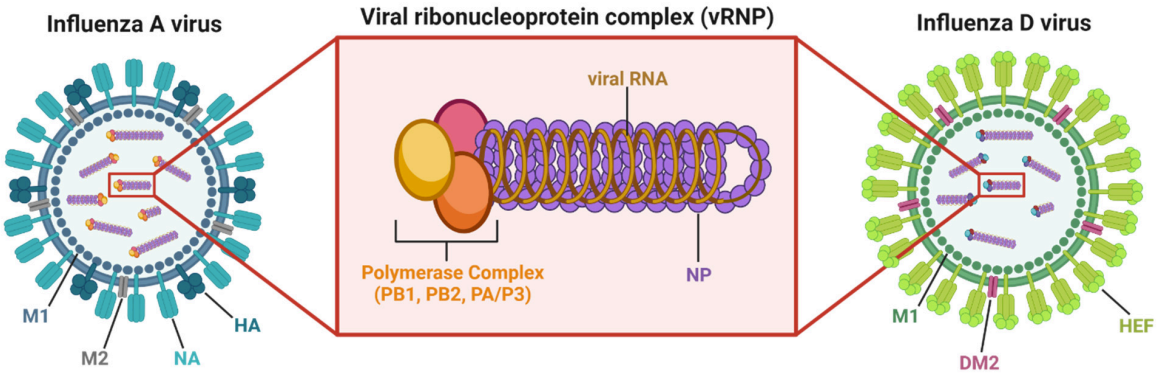
IDV'nin M1 proteini vRNP'lerin yeni oluşan virionlar içerisinde paketlenmesinde görev alırken DM2 proteini iyon kanalı olarak görev yaparak vRNP'lerin konak sitoplazmasına salınımına yardımcı olmaktadır (Raegan & Huber, 2022). DM2 proteini içeren IDV proteomunun ICV proteomu ile sekans benzerliği, IAV ve IBV proteoumuna oranla daha

fazladır (Kesinger ve diğ., 2018). M1 proteini ise primer transkripsiyonu takiben dört parçalı rezidülü peptitlere ayrılması ile ICV'den farklılık göstermektedir (Liu ve diğ., 2020).

2.2.5. Yapısal Olmayan Proteinler

2.2.5.1. NS1 ve NS2 Proteinleri

IDV'nin NS1 proteini konak immun yanıtında Tip-1 interferon için antagonist faaliyette görevliyken NS2 yeni sentezlenen vRNP'ler için kısaca NEP olarak da adlandırılan nükleer eksport proteinidir (Raegan ve Huber, 2022) (Şekil 2.7). Diğer influenza viruslar gibi NS segmenti transkripsiyon sonrası ayrılmamış mRNA'dan NS1 proteininin genini kodlarken birleşik haldeki mRNA'dan ise NS2 proteininin genini kodlamaktadır. NS1 ve NS2 proteinleri aminoasit temelinde benzerlik gösterirken son kısımlarında farklılıklar bulunmuştur (Ishida ve diğ., 2020).

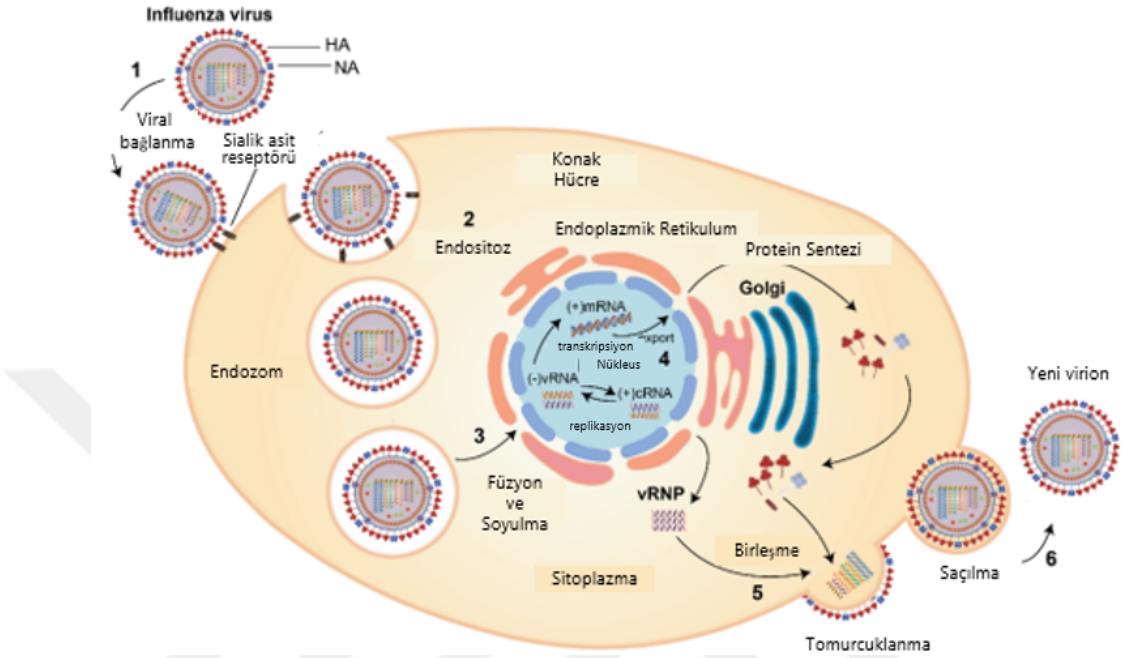


Şekil 2.7. Influenza A ve D virusların viral ribonükleoprotein yapısı (Skelton ve Huber, 2022)

2.2.6. Viral Replikasyon

HEF proteininin faaliyeti ile hücreye girişi takiben virus yüzeyinde bulunan DM2 proteini bir iyon kanalı oluşturarak, viral ve endozomal membranların füzyonunun gerçekleşmesi için endozomun asidifikasyonunu gerçekleştirir. Membranların birleşimi sonucunda RNA gen segmentleri salınır, viral ribonükleoprotein kompleksi formunda paketlenir ve hücre sitoplazması içerisine yerleşir. Her bir viral ribonükleoprotein kompleksi viral nükleoprotein (NP) ile sarılı segmentler içerir ve P3 içeren RNA-bağımlı RNA polymerase yapısına bağlanır. vRNP'ler nükleus içerisine girer ve çekirdek içerisinde viral RNA'nın replikasyon ve transkripsiyonunun gerçekleşmesi için RNA segmentlerine bağlanır. Negatif polariteli olarak nükleus içerisine giren vRNA, RdRp kompleksi tarafından pozitif polariteli mRNA olarak transkripsiyona uğrar ve mRNA konağın ribozomal sistemini kullanarak viral

proteinlere dönüşür. Yeni oluşan vRNP'ler NEP yardımıyla nükleus dışına çıkar ve viral proteinler hücre yüzeyine doğru ilerler. Bu viral proteinler, meydana gelecek virionlar için yeni proteinlerin ve genetik materyalin paketlenmesinde görev alır (Skelton ve Huber, 2022)



Şekil 2.8: İnfluenza viruslarda viral replikasyon (Nuwarda ve diğ., 2021).

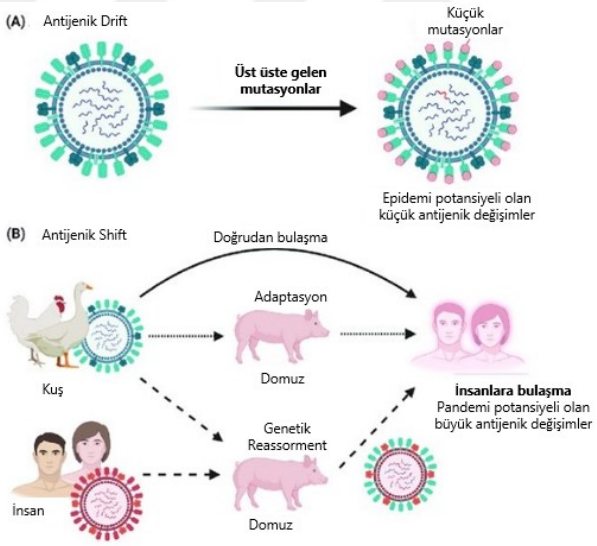
2.2.7. Antijenik Shift ve Antijenik Drift

İnfluenza viruslar, antijenik drift ve antijenik shift oluşumuna yatkın viruslardır (CDC , 2021). İnfluenza virusların yüzey proteinleri konak hücre immun yanıtından kaçmak için antijenik drift ile küçük çaplı değişikliklere uğrarlar ve üst üste gelen bu mutasyonlar epidemi potansiyeli olan antijenik açıdan farklı virusların ortaya çıkmasına neden olur (Taubenberger ve Kash 2010; Long ve diğ., 2019). Antijenik shift ise antijenik açıdan farklı iki influenza virusunun aynı hücreyi infekte ederek rekombinasyon (genetik reassortment) sonucu genom segmentlerini değiştirmesi ile yeni yüzey antijenlerinin kombinasyonu sonucu yeni subtipler meydana getirmesi ile oluşur (Şekil 2.9) (Yeo ve Gan, 2021).

İnfluenza virusları gibi segmentli viruslar farklı bir subtipteki influenza virusları ile antijenik shift meydana getirebilmektedir. Bu durum sonucunda oluşan yeni varyant viruslar farklı hayvan türlerine ve insan hücrelerine adaptasyon sonucu farklı türleri infekte edebilmekte ve tamamiyle yeni antijenik proteinlerin üretimi ile önceden oluşmuş influenza virusu antikorlarından kaçabilen bir infeksiyona neden olmaktadır. Bu duruma örnek olarak, 1918-1919 yıllarında yüksek mortalite ile seyreden İspanyol Gribi pandemisinde virusun HA, NA ve PB1 genlerinin antijenik shift sonucu yeniden yapılanması ile virusun yüksek oranda virulens

kazanmış olması gösterilebilir (Tumpey ve diğ., 2005;Bouvier ve Palese, 2008; Pappas ve diğ., 2008). Bu tarz bir değişimle oluşan epidemi ve pandemiler 5 kez farklı tarih ve ülkelerde yaşanmıştır. Çalışmalar IDV'nin yıllar içinde ciddi bir antijenik shift göstermediğini bildirmiş olsa da, influenza viruslarının öngörülemeyen sıklıkla mutasyona uğrama yetenekleri onları insan ve hayvan sağlığı açısından potansiyel bir tehdit haline getirmektedir (Ruiz ve diğ 2022).

İnfluenza A ve B viruslarında HA proteinine ve IDV'de HEF proteinine karşı oluşan antikorlar virusu nötralize etmektedir. Böylece virus suşları antijenik bölgelerde sıklıkla aminoasit değişikliklerine maruz kalmakta, fakat HA molekülünün ana yapısı suşlar ve subtipler arasında korunaklı olarak bulunmaktadır. Aminoasit temelinde meydana gelen bu küçük çaplı değişimler antijenik drift meydana getirmektedir. Sonuç olarak çeşitli antijenik bölgelerde meydana gelen bu mutasyonlar ilk virusa karşı oluşan antikorlar ile etkin bir nötralizasyon olayı gerçekleştirememektedir ve konak antijenik drift sonucu oluşan suşa karşı tekrar duyarlı hale gelmektedir (Pappas ve diğ., 2008).



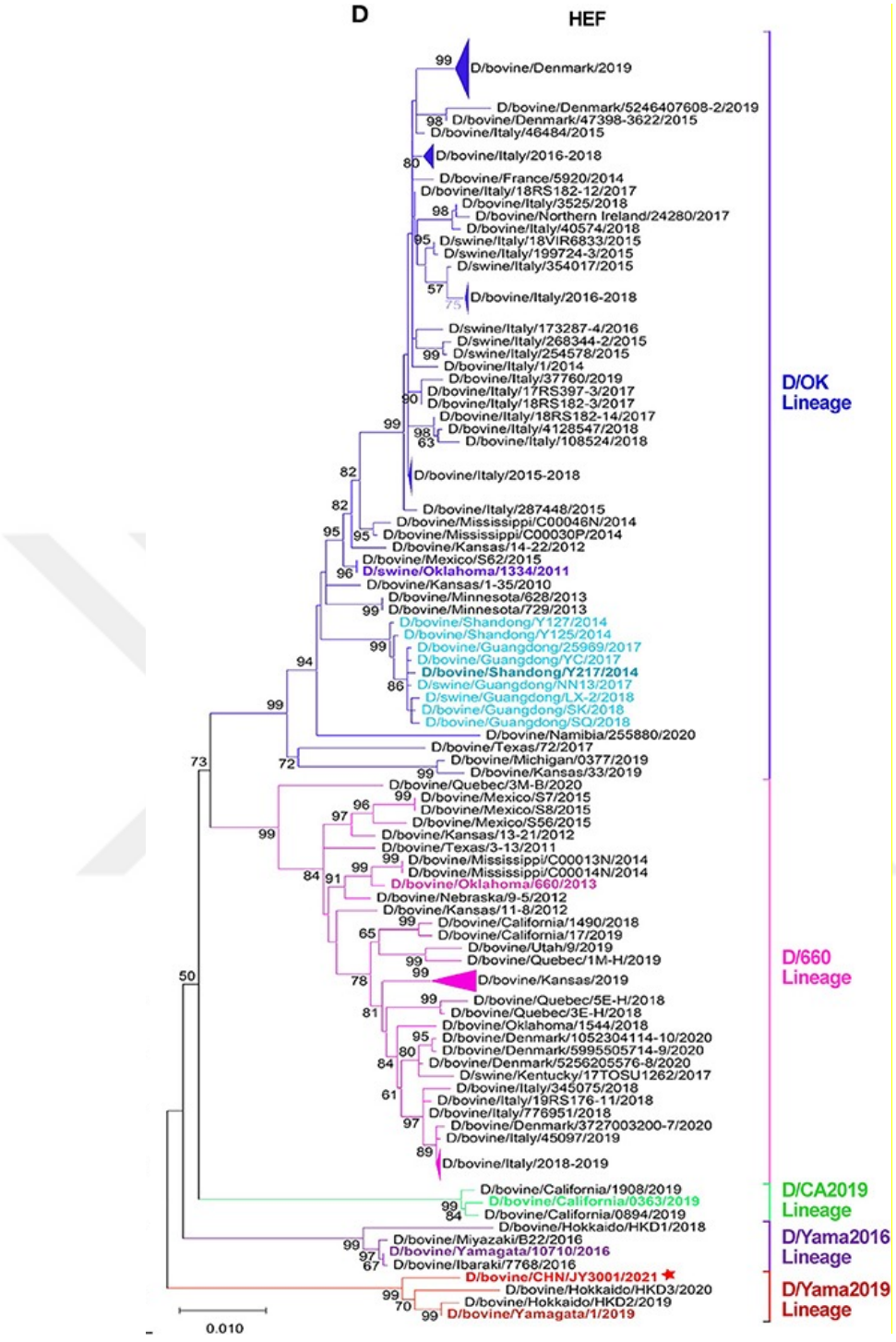
Şekil 2.9: İnfluenza viruslarda antijenik shift ve antijenik drift (Yeo ve Gan, 2021)

2.2.8. IDV'nin Kökeni ve IDV Genotipleri

Filogenetik analizler sonucu IDV'nin, ICV ile ortak bir kökenden geldiği ve PB2, P3, NP, M ile NS genlerinin sekans karşılaştırması sonucu IDV'nin insanda görülen ICV'den evrildiği düşünülmektedir (Hause ve diğ., 2013). Ayrıca, İnfluenza A, B, C ve D viruslarının PB1 geninin sekanslanması sonucu IDV'nin filogenetik olarak en fazla yakınlığı ICV ile gösterdiği rapor edilmiştir (Su ve diğ., 2017). Ek olarak, D/OK (D/swine/Oklahoma/1334/2011) ve D/660 (D/bovine/Oklahoma/660/2013) varyantları sıklıkla reassortment geçirdiği ve bu nedenle birbirleri ile antijenik çapraz reaksiyon gösterdiği

bildirilmiştir (Collin ve diğ., 2015). D/OK Avrupa (Fransa, İtalya, İrlanda, Danimarka), Amerika (ABD ve Meksika), Asya'da (Çin) ve Afrika'da (Nambiya) tespit edilmiş, D/660 Avrupa (İtalya, Danimarka) ve Amerika'da (ABD, Kanada ve Meksika) bildirilmiştir. D/Yama2016 Asya'da (Japonya), D/Yama2019 Asya'da (Japonya ve Çin) ve Türkiye'de saptanmıştır. D/CA2019 Amerika'da (ABD) rapor edilmiştir (Yılmaz ve diğ., 2020; Huang ve diğ., 2021; Yeşilbağ ve diğ., 2022; Yu ve diğ. 2022).

Amerika Birleşik Devletleri'nde 2004 yılında toplanan sığır serumlarında IDV antikorları tespit edilmiş olup bu durum IDV'nin uzun zamandan beri var olduğunu işaret etmektedir (Ferguson ve diğ., 2015; Liu ve diğ., 2020). Amerika Birleşik Devletleri'nde Kaliforniya eyaletindeki sığırlarda 2021 yılında D/OK ve D/660 varyantları ile sınırlı çapraz reaksiyon gösteren yeni bir suş bildirilmiş olup bu yeni varyant D/CA2019 olarak isimlendirilmiştir (Şekil 2.10) (Huang ve diğ., 2021).



Şekil 2.10: IDV HEF geni temelinde oluşturulmuş filogenetik ağaç (Yu ve diğ., 2022).

2.2.9. İnfluenza D Virusunun Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

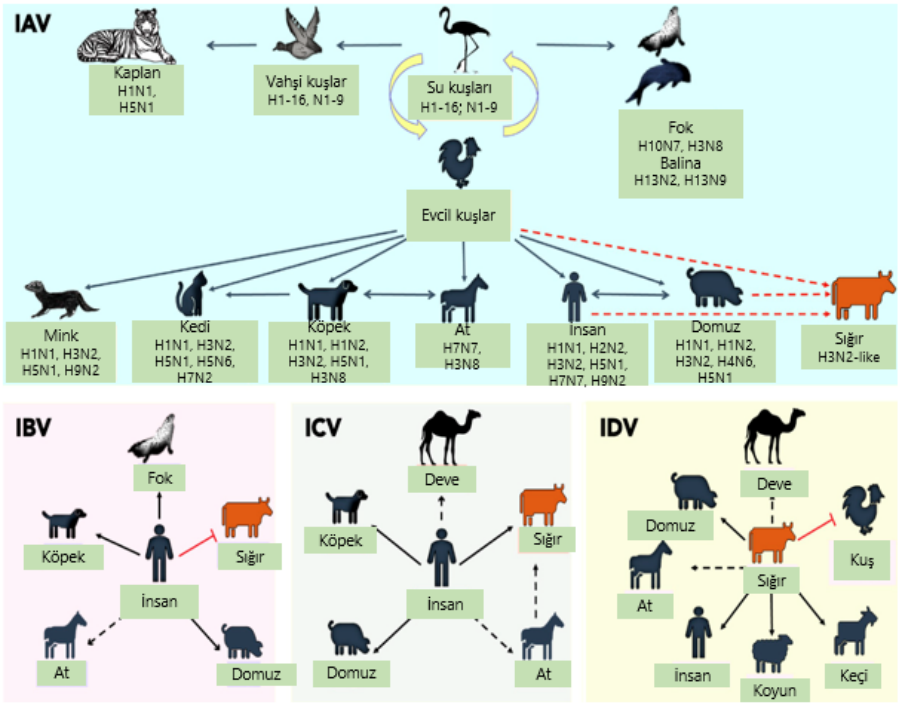
İnfluenza virusları sıcaklık, pH değişiklikleri ve nem gibi faktörlere duyarlı olup genel olarak çevre şartlarının değişmesinden etkilenirler. IDV, 53°C'de 120 dakikada inaktive olmaktadır. IAV, IBV ve ICV'ye kıyasla düşük pH değerlerinde inaktif olmamakta ve pH 3.0'da 30 dakika boyunca infektivitelerinin sadece %20'sini kaybetmektedirler. Bu durum

IDV'nin viral proteinlerinin yüksek derecelerde ve asidik ortamlarda canlı kalabilmek için evrime uğradığının göstergesi olarak kabul edilebilir (Yu ve diğ., 2017). Güneş ışınları, dezenfektanlar, sodyum deoksikolat ve sodyum dodesil sülfat gibi deterjanlar, formaldehit, glutaraldehit ve beta propiyolakton virusu inaktive etmektedir. Ayrıca fenol bileşikleri, kuarterner amonyum bileşikleri, sodyum hipoklorit, sodyum hidroksit, sodyum karbonatla seyreltik asitler ve hidroksilaminlerin de virusu inaktive ettiği saptanmıştır (Lade ve diğ., 2011; Kapoor ve Dhama, 2014).

2.3. EPİDEMİYOLOJİ

2.3.1. Konak Duyarlılığı

IDV ilk olarak solunum sistemi problemleri gösteren domuzlarda identifiye edilmiş olup sonrasında dünyada çeşitli bölgelerde sağlıklı ve hasta sığırlarda bildirilmiştir (Ferguson ve diğ., 2016). Sığırlar IDV için başlıca rezervuar olup genç, sütten kesilmiş ve bağışıklık sistemi zayıf buzağılar en duyarlı grubu oluşturmakta ve bu duruma maternal antikor seviyelerinin 4-6 aydan sonraki dönemde düşmesi neden olarak gösterilmektedir (Ferguson ve diğ., 2015). Amerika ve Kanada'da yapılmış olan serolojik çalışmalarda virusa karşı oluşmuş antikorlar sadece sığır ve domuzlarda değil aynı zamanda koyun, keçi, deve ve atlarda da tespit edilmiştir (Quast ve diğ., 2015; Su ve diğ., 2017; Asha ve Kumar, 2019). Ek olarak, IDV, kobay, yaban gelinciği ve fareleri de infekte edebilmektedir (Şekil 2.11) (Sreenivasan ve diğ., 2015; Liu ve diğ., 2020). Kanatlı çiftliklerinde 2020 yılında yapılan bir çalışmada alınan bioaerosol örneklerde çiftlik ortamında IDV genomu saptanmıştır (Bailey ve diğ., 2020). Namibya'da yapılan bir çalışmada ise zürafa ve antilopta pozitiflik tespit edilmiştir (Molini ve diğ., 2022). İskoçya'da 2016 yılında 3300 insandan alınan solunum sistemi örneklerinin IDV yönünden incelenmesi sonucu örneklerde herhangi bir pozitiflik saptanmamış fakat aynı yıl Amerika Birleşik Devletleri'nde sığır teması olan insanlardan alınan örneklerin %94-97'si IDV yönünden seropozitif bulunmuştur (Smith ve diğ., 2016; White ve diğ., 2016). Bu veriler insanların IDV ile infekte olabildiğini göstermektedir ve bu nedenle insanlarda IDV infeksiyonlarının detaylıca araştırılması önerilmiştir (Asha ve Kumar, 2019).



Şekil 2.11: İnfluenza A, B, C ve D virusların konak duyarlılığı (Sreenivasan ve diğ., 2019).

2.3.2. Bulaşma

IDV horizontal yolla bulaşmaktadır. Mevcut verilere göre vertikal bulaşma henüz bildirilmemiştir. IDV, sığırlarda daha çok üst ve alt solunum yollarında tespit edilmekte ve direkt temas ile diğer hayvanlara bulaşmaktadır. Nazal turbinatlarda çok sayıda bulunan virusun alt solunum yoluna doğru indikçe sayısının azaldığı bildirilmiştir (Su ve diğ., 2017). IDV ek olarak trakea, bronşlar ve medial akciğer lobunda da tespit edilmiştir (Ferguson ve diğ., 2016). Yapılan bir çalışmada şiddetli klinik tablo gösteren hayvanlardan alınan serum örneklerinde IDV genomu saptanmış ve bu durum konak hayvanın solunum sistemini kaplayan kapillar damarlardan dolaşım sistemine geçtiğini göstermektedir. Ek olarak bu durum virusun başka organlarda da bulunabileceğini ortaya çıkarmıştır (Zhai ve diğ., 2017). Yapılan RT-PCR analizi sonucunda hastalık tablosu gösteren hayvanlarda asemptomatik hayvanlara oranla daha yüksek pozitiflik rapor edilmiş ve hastalık şiddeti ile IDV varlığının tespiti arasında potansiyel bir korelasyon olabileceği ortaya konulmuştur (Ng ve diğ., 2015; Mitra ve diğ., 2016; Zhai ve diğ., 2017). Rektal svablarda saptanan IDV varlığı ise oral yol ile bulaşma ihtimali ve IAV ile IBV'de olduğu gibi IDV'nin de bağırsak yollarında replike olabileceğini işaret etmektedir (Hirose ve diğ., 2016; Zhai ve diğ., 2017).

IDV'nin potansiyel diğer bulaşma yolu damlacık infeksiyonu şeklinde aerosol yol ile olabileceği doğrultusundadır. Direkt olarak infekte edilen buzağılardan üç metre uzaklıkta

tutularak ayrılmış infekte olmayan buzağılar ile yapılan bir çalışmada, infekte edilen buzağılardan saçılan virus, 10 gün sonra infekte edilmemiş buzağıların nazal sekresyonlarında tespit edilmiştir (Salem ve diğ., 2019). Yine aynı çalışmada, inokülasyon grubunun bulunduğu ortamda, infekte edilmemiş hayvanların bulunduğu alanda ve bu iki alan arasında bulunan bölgeden toplanan hava örneklerinde IDV genomu saptanmıştır. Hause ve diğ. (2013) tarafından yapılan deneysel bir çalışmada, solunum sistemi damlacıklarına maruz bırakılan deney grubunun 1/3'lük popülasyonunda serokonversiyon oluşmasına rağmen virus tespit edilememiştir (Hause ve diğ., 2013). IDV'nin kontamine alet ve ekipman gibi aracılarla bulaştığına dair yeterli kanıt bulunmamakla beraber deneysel ortamlarda seronegatif bir buzağının aerosol yolla infekte olduğu bildirilmiştir (Salem ve diğ., 2019).

Laboratuvar hayvanları üzerinde yapılan deneysel bir çalışmada IDV'nin intranazal inokülasyonu sonucunda infeksiyonu takiben 3. günde nazal saçılım başlamış ve 7. gün sonrasında direkt temas sonucu bulaşma tespit edilmiştir (Sreenivasan ve diğ., 2021). Klinik olarak gözlemlenen vaka raporu henüz bulunmamasına rağmen seronegatif buzağılarda yürütülen bir çalışmada intranazal inokülasyon sonucu 1-6 gün arasında nazal svab örneklerinde virus saptanmış ve inokülasyon sonrası 6. günde yüksek titrelerde serokonversiyon oluştuğu bulunmuştur (Ferguson ve diğ., 2016).

Sığır, domuz, koyun ve keçide viral genomun tespit edilmesi ile at ve develerde antikor saptanması IDV'nin türler arası bulaşabildiğini göstermektedir. Buna ek olarak IDV'nin dünya çapında Amerika, Avrupa, Asya ve Afrika'daki çeşitli hayvan popülasyonlarında rapor edilmesi gelecekte insan sağlığı için de potansiyel risk olabileceğini işaret etmektedir (Liu ve diğ., 2020).

2.3.3. Morbidite ve Mortalite

IDV sığırlarda tek başına infeksiyona neden olduğunda bağışıklık sisteminde bir bozukluk yoksa genelde ölümcül bir tablo ile seyretmemektedir. Diğer solunum sistemi etkenleriyle birlikte olursa veya ilk önce IDV yerleşirse diğer etkenlerin girişi kolaylaşıp kompleks bir hastalık tablosunun oluşumuna neden olmaktadır. Özellikle sığırların kompleks solunum yolu hastalığında IDV'nin önemli rol oynadığı varsayılmaktadır (Mitra ve diğ., 2016). Bovine Herpesvirus 1 (BHV-1), Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV), Bovine Respiratory Syncytial Virus (BRSV), Bovine Parainfluenza Virus 3 (BPIV-3) ve Bovine Adenovirus 3 (BAV-3) viruslarının, *Mannheimia haemolytica, Pasteurella multocida, Histophilus somni, Micrococcus spp*. bakterilerinin ve çeşitli stres faktörlerinin neden olduğu BRDC sonucu

mortalitenin arttığı bildirilmiştir (Pardon ve diğ., 2011; Kurcubic ve diğ., 2019). BRDC 1960'lı yıllardan beri et ve süt endüstrisinde, özellikle süt buzağılarında, veteriner hekimler ve araştırmacılar için çözüm getirilmesi gereken zor bir hastalık olarak bulunmaktadır. BRDC süt sığırlarında ani süt kayıpları ve etçilerde karkas ağırlığında azalma gibi sonuçlar doğurmaktadır (Dubrovsky ve diğ., 2020; Studer ve diğ., 2021). Performans düşüklüğüne bağlı verim azalması ve ölüm sık görülen durumlardır. Avrupa'da süt sığırlarında %2.9-5.1 oranlarında mortalite bildirilmiştir (Bähler ve diğ., 2012; Lava ve diğ., 2016).

2.3.4. Türkiye'de IDV Sıklığı ve Genotipleri

IDV ülkemizde ilk olarak 2020 yılında, Yılmaz ve diğ. tarafından (2020) rapor edilmiştir. Bu çalışmada, Türkiye'nin Marmara, İç Anadolu ve Ege bölgelerinde bulunan çiftliklerden solunum sistemi hastalık tablosu gösteren ve yüksek mortalite görülen hayvan popülasyonlarından toplanan nazal svab ve doku örneklerinden yapılan çalışmada %4 oranında pozitiflik saptanmıştır (Yılmaz ve diğ., 2020). Sekanslama ve HEF genenin filogenetik analiz çalışmaları sonucunda Türkiye'de tespit edilen suşun (D/bovine/Turkey/IDV-1/2018) Avrupa ve Amerika Birleşik Devletleri'nde tespit edilen suşlar ile %95 oranında benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir (Yilmaz ve diğ., 2020). Yeşilbağ ve diğ. tarafından 2022 yılında yayınlanan bir çalışmada Avrupa'da raporlanan IDV sekansları ile kısmi benzerlikler taşıyan yeni bir suş (D/Bursa2013) ortaya konulmuştur. Ek olarak aynı çalışmada bir örnekte D/Yama2019 suşu tespit edilmiş olup Türkiye'de D/Yama2019 ve D/Bursa2013 suşlarının sirkülasyonda olduğu bildirilmiştir (Yeşilbağ ve diğ., 2022). Ülkemizde IDV çalışmaları yeni ve sınırlı sayıdadır. Daha sonraki çalışmalarla daha detaylı veriler elde edilebilecektir.

2.3.5. Dünyada IDV Sıklığı ve Genotipleri

IDV filogenetik olarak Avrupa ve Kuzey Amerika'da D/OK ve D/660 olmak üzere iki ana genogruba ayrılırken Japonya'da D/Yama2016 ve D/Yama2019 gibi farklı genogruplara ayrılmaktadır (Murakami ve diğ., 2020). 2018 yılına kadar Avrupa'da genogrup D/OK'nin sirküle olduğu fakat D/660'ın bulunmadığı rapor edilmemiştir (Chiapponi ve diğ., 2019). Daha sonra İtalya'da 2018-2019 yıllarında yapılan bir IDV çalışmasında hem D/OK hem de D/660 genogrupları tespit edilmiştir. Avrupa'da D/660 varyantının ilk tespiti Fransa'dan ithal edilip İtalya'ya getirilen bir sığırda 2018 yılında mart ayında gerçekleşmiştir. 2019 yılından itibaren D/660, D/OK'ye oranla daha sık raporlanmış ve bu durum genotipler açısından varyasyonu ortaya çıkarmıştır (Chiapponi ve diğ., 2019). IDV suşları genetik temelde bir reassortment

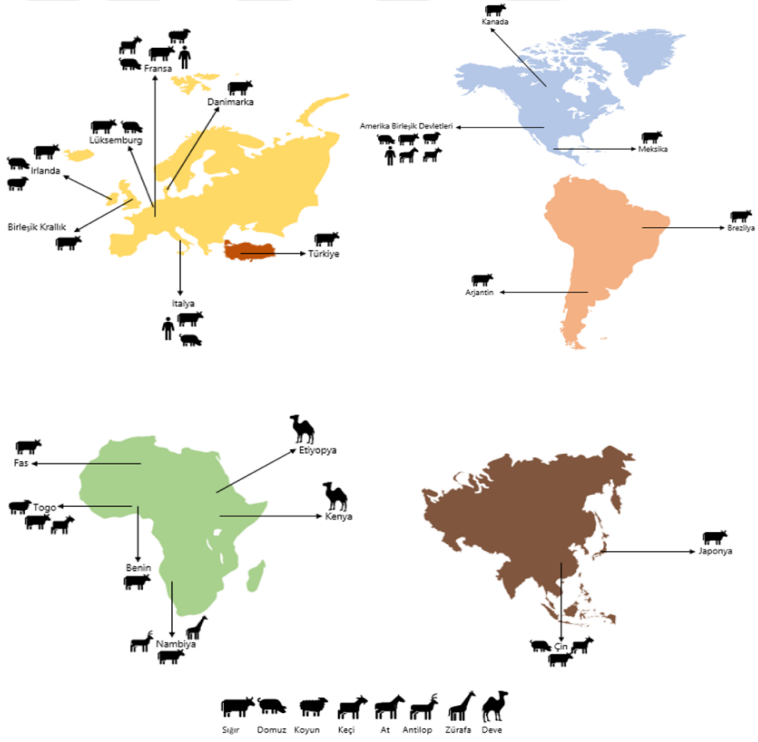
karakteri göstermiş olup İtalya ve Amerika Birleşik Devletleri'nde hem D/OK hem de D/660 içeren gen segmentleri rapor edilmiştir (Collin ve diğ., 2015; Chiapponi ve diğ., 2020). Avrupa'da D/OK ve D/660 sirkülasyonuna ek olarak, D/bovine/France/2986/2012 ve D/bovine/Ireland/007780/2014 suşlarını içeren genetik açıdan farklı bir genotip bildirilmiştir (Ducatez ve diğ., 2015; Flynn ve diğ., 2018). Avrupa dışında ise Kaliforniya'da farklı bir genogrup olan D/CA2019 identifiye edilmiştir (Huang ve diğ., 2021).

Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan serolojik çalışmalar sonucunda elde edilen geometrik ortalama antikor titresi (GMT) verileri IDV'nin domuzlara oranla sığır sürülerinde daha yüksek seroprevalans ile seyrettiğini göstermiştir (Hause ve diğ., 2014). Kuzey Amerika'da çeşitli bölgelerden toplanan solunum sistemi örnekleri RT-qPCR ile test edildiğinde pozitiflik vermiş ve farklı varyantlar izole edilmiştir. Yapılan bir retrospektif seroloji çalışmasında 2003-2004 yılları arasında toplanan sığır serumlarında IDV seropozitiflik tespit edilmiş ve yeni doğan buzağıların %98'inde IDV-spesifik maternal antikorlar saptanmıştır. Bu durum IDV'nin Amerika Birleşik Devletleri'nde 2011 yılından daha önce de var olma ihtimalini ortaya koymuştur (Luo ve diğ., 2017). Amerika Birleşik Devletler'inden yayınlanan ilk raporlardan sonra Fransa, Çin ve Japonya gibi dünyanın çeşitli yerlerinde de IDV infeksiyonları bildirilmiş ve IDV'nin kıtalar arası bir yayılım gösterdiği belirtilmiştir (Hause ve diğ., 2014; Kurćubić ve diğ., 2018). Japonya'da 2010-2016 yılları arasında ülke çapında yürütülen bir çalışmada çeşitli sığır çiftliklerinden toplanan serum örneklerinde %30,5 oranında seropozitiflik saptanmıştır. Lüksemburg'da 2012-2016 yılları arasında maternal antikorların kaybolduğu dönemden sonra 6 aylıktan büyük hayvanlardan alınan serum örnekleriyle yapılan bir çalışmada %80,2 oranında IDV antikorları rapor edilmiştir. Yapılan bu çalışmada çoğu hayvan Lüksemburg'da doğmuş olsa da deney grubunda komşu ülkeler olan Almanya, Fransa, Belçika ve İtalya'da doğmuş olan hayvanlar da bulunmaktadır (Snoeck ve diğ., 2018; Sreenivasan ve diğ., 2021).

IDV ile oluşan doğal infeksiyonlar sığır, domuz, yaban domuzu, koyun, keçi, deve, kuş ve atlarda olmak üzere; Amerika kıtasında Amerika Birleşik Devletleri (Hause ve diğ., 2013), Kanada (Zhang ve diğ., 2019), Brezilya (da Silva ve diğ., 2022), Meksika (Mitra ve diğ., 2016), Arjantin (Alvarez ve diğ., 2023); Avrupa'da İtalya (Foni ve diğ., 2017), Birleşik Krallık (Dane ve diğ., 2019), Fransa (Ducatez ve diğ., 2015), İrlanda (Flynn ve diğ., 2018), Lüksemburg (Snoeck ve diğ., 2018), Danimarka (Goecke ve diğ., 2022); Türkiye (Yılmaz ve diğ., 2020; Yesilbağ ve diğ., 2022), Asya kıtasında Çin (Zhai ve diğ., 2017), Japonya (Horimoto ve diğ., 2016); Afrika kıtasında Fas (Sanogo ve diğ., 2021), Nambiya (Molini ve diğ., 2022), Benin

(Salem ve diğ., 2017), Togo (Fusade-Boyer ve diğ., 2020), Etiyopya (Murakami ve diğ., 2019), ve Kenya'da (Salem ve diğ., 2017) tespit edilmiştir (Şekil 2.12).

BRD ile ilişkili virusları belirlemek için Kaliforniya'da (ABD) akut BRD'nin klinik belirtilerini gösteren 27-60 günlük süt buzağılarında (n=50) ve sağlıklı/asemptomatik buzağılarda (n=50) bir metagenomik analiz gerçekleştirilmiştir. Viral metagenomik sekanslama, IDV'nin yaygın olarak tanımlanan mikroorganizma olduğu ve BRD teşhisi konulan buzağılarla önemli ölçüde ilişkili olduğu belirlenmiştir (Ng ve diğ., 2015). Aynı şekilde, Meksika'da ve ABD'de toplam 10 çiftlikte akut BRD'li besi sığırlarından (n=47) ve sağlıklı/asemptomatik besi sığırlarından (n=46) alınan derin nazal svab örneklerinde viral metagenomik dizileme sonucu istatistiksel analizde, BRD ile orta derecede ilişkili tek virus IDV olmuştur (Mitra ve diğ 2016).



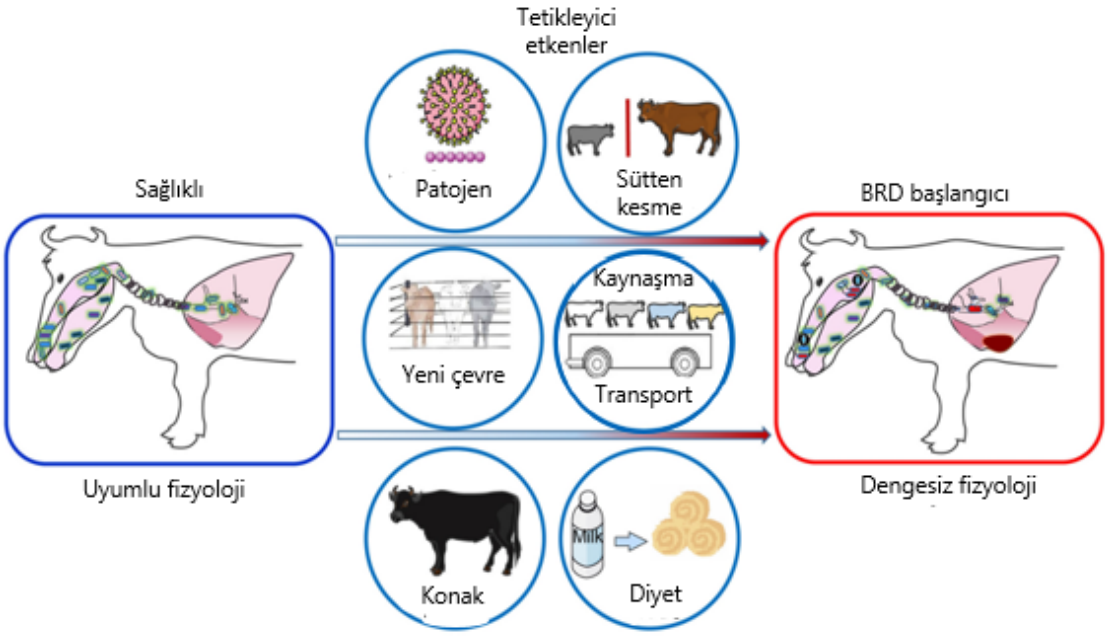
Şekil 2.12: Dünyada IDV'nin kıtalara ve ülkelere göre yayılımı (Görsel Powerpoint ile çizildi).

2.4. PATOGENEZ

IDV infeksiyonu, solunum sistemi epitellerinde yapısal bütünlüğün bozulmasına ve bunun sonucunda trakeada nötrofil aktivasyonu ve birikimine neden olmaktadır (Ferguson ve diğ., 2016). IDV ile infekte hayvanlarda akciğerlerde intersitisyel pnömoni ile sınırlı bölgelerde orta şiddette bir bronkopnömonin meydana gelmesiyle birlikte, patojen tanımlayıcı reseptörler ile CCL2, CCL3 ve CCL4 kemokinlerinin aktivasyonu gerçekleşmekte ve alt solunum yollarında Tip-1 interferon yanıtı engellenmektedir (Salem ve diğ., 2019). IDV'nin NS1 proteini, AIV, IBV ve ICV gibi diğer influenza türlerinde olduğu gibi konak IFN yanıtını baskılamaktadır (Nogales ve diğ., 2019).

IDV, sığırlarda ciddi bir solunum sistemi infeksiyonuna neden olmadığı fakat BRDC oluşumunda katkısı olduğu bildirilmiştir (Liu ve diğ., 2020). BRDC'nin üst ve alt solunum yollarında viral patojenlerin infeksiyonunu takiben bakteriyel kolonizasyonla meydana gelen multifaktoriyel bir solunum sistemi hastalığı olduğu bilinmekte ve bununla birlikte IDV'nin herhangi ikincil ya da primer başka bir infeksiyon yokluğunda tek başına bu hastalığa neden olmayacağı öngörülmektedir. Bunun yanında IDV infeksiyonu sonucu oluşan klinik ve patolojik bozukluklara yönelik araştırmalar devam etmektedir. IDV infeksiyonu sonucu trakeal epitelyumda meydana gelen nötrofil migrasyonu ve birikimi, infekte sığırların diğer patojenlerle koinfekte olmasına yardımcı olmaktadır (Ferguson ve diğ., 2016). Ek olarak buzağılarda yapılan tam kan sayımı verilerine göre segmentli nötrofil sayısında düşüşle birlikte nötrofili tespit edilmiştir (Ferguson ve diğ., 2016).

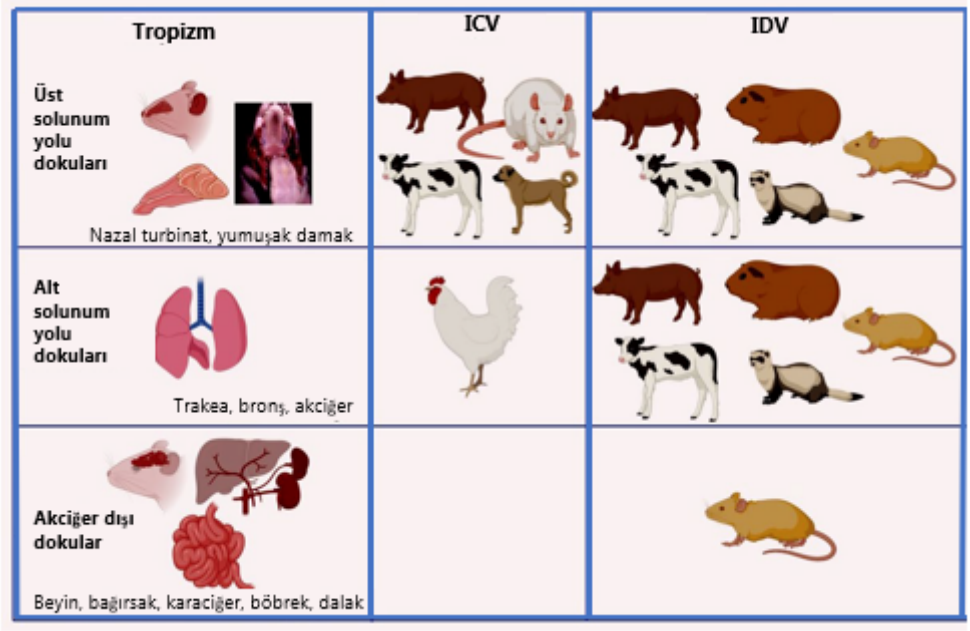
Sığırların solunum ekosistemi, konak patojen etkileşimleri ile sütten kesilme, kaynaşma, transportasyon, beslenme gibi çevresel ve bakım kaynaklı değişikler sonucunda fizyolojik olarak dengesiz bir hale gelir ve bu tablo BRD semptomlarının görülmesine yol açar. Sağlıklı sığırların hava yollarında mikrobiyom konakçı ile uyumlu bir şekilde yaşamını devam ettirir. Fakat patojen kaynaklı fizyolojik dengesizlikler, mukozal fonksiyon bozuklukları ve kronik yangı durumu BRD oluşumu için uygun ortamın oluşmasına neden olur. Stres kaynaklarına ek olarak bu patojen varlığı ve kolonizasyonu akciğerleri infekte eder (Şekil 2.13)



Şekil 2.13: Sağlıklı solunum ekosistemini etkileyen faktörler ve BRD oluşumu (Chai ve diğ., 2022)

Laboratuvar hayvanları üzerinde yapılan deneysel bir çalışmada IDV'nin intranazal inokülasyonu sonucunda infeksiyonu takiben 3. günde virusun burun mukozasında replike olduğu saptanmıştır (Sreenivasan ve diğ., 2021). Histopatolojik lezyonlar akciğerlerde alveol alanlarında diffüz nötrofilik infiltrasyonlar, hava yollarında plazmasitik hücre toplanmaları, bronşiyal epitelyumda erozyonlar ve bronşiyal lümende eksudat birikimi ve hücre ölümleri gözlemlenmiştir. Akciğer dışında ise bağırsaklar, karaciğer ve böbrek gibi organlarda virus replikasyonu rapor edilmiştir (Sreenivasan ve diğ., 2021).

ICV üst solunum yollarında sığır, domuz, fare ve köpekte nazal tubinat ve yumuşak damakta tropizm gösterirken alt solunum yollarında tavukta trakea, bronş ve akciğerlere tropizm göstermektedir. IDV ise daha geniş bir konak ve organ tropizmine sahiptir. IDV üst solunum yollarında sığır, domuz, kobay, gelincik ve farelerde nazal turbinat ve yumuşak damakta tropizm; alt solunum yollarında aynı hayvanlarda trakea, bronş ve akciğerde; farede ise beyin, bağırsak, karaciğer, böbrek ve dalakta tropizm bildirilmiştir (Şekil 2.14) (Sreenivasan ve diğ., 2021).



Şekil 2.14: IDV ve ICV'nin konak ve organ tropizmi (Sreenivasan ve diğ., 2021)**.**

2.5. İMMUNİTE

İmmun sistem; hızlı faaliyet gösteren, daha sınırlı ve evrimsel olarak daha korunaklı doğal bağışıklık ile yavaş faaliyet gösteren, daha kapsamlı ve spesifik yani kazanılmış bağışıklık olmak üzere iki ana bileşenden oluşmaktadır. Her iki bağışıklıkta humoral ve hücresel faktörler rol almaktadır (Nikolich-Žugich ve diğ., 2021). Yeni doğan buzağılar patojen etkenlere karşı maternal antikorları yoksa savunmasız bir immuniteye sahiptirler. Sığırlarda bağışıklık sisteminin büyük kısmının gelişimi yaşamın ilk 5-8 aylık döneminde tamamlanmaktadır. Komplement hücrelerinin yeni doğan buzağılarda yetişkin sığır seviyelerine ulaşması 6 ayı bulmaktayken, T hücreleri 8 aylık yaşa dek pik seviyeye ulaşamamaktadır (Barrington ve Parish, 2001; Cortese ve diğ., 2009).

Buzağılara hastalık etkenlerine karşı kendi bağışıklık ve savunma sistemlerini geliştirecekleri yaşa kadar annelerinden alacakları kolostruma muhtaç olup kolostrum ile aktarılan maternal antikorlar sayesinde pasif immunite ile çevresel patojen etkilere karşı korunaklı olabilmektedirler. Kolostrum kaynaklı olan pasif immuniteyi geliştiremeyen ve koruyucu bağışıklık komponentlerinden yoksun olan buzağılar infeksiyonlara daha açık olmaktadır. Kolostrum, vitaminler, kan proteinleri ve maternal antikorlardan zengin bir koruma materyalidir (Moran, 2002). Kolostrumda özellikle immunglobulin G başta olmak üzere

immunglobulinler, nötrofil, makrofaj, sitokinler, laktoferrin, defensin ve kathelisidinler gibi antimikrobiyal proteinler ve peptidler bulunmaktadır. (Stelwagen ve diğ., 2009).

Buzağılarda maternal bağışıklık oluşabilmesi için yaşamlarının ilk 6 saatinde kolostrum almak zorundadırlar. Kolostrum ile gelişen bu pasif bağışıklık buzağıları anneden gelen antikorlar sayesinde yaklaşık 3-4 ay kadar koruyabilmektedir. Buna rağmen maternal antikorların koruyuculuğu patojenlerin virulensi, çeşitliliği ve etkinliğine göre değişiklik göstermektedir (Fulton ve diğ., 2002; Quigley ve diğ., 2002; Ferguson ve diğ., 2015). Yeni doğanlarda yüksek seviyelerde IDV'ye karşı maternal antikorlar tespit edilmiş, fakat 6. ay sonrasında bu seviyenin düştüğü ve IDV'ye karşı duyarlılığın arttığı bildirilmiştir (Ferguson ve diğ., 2015; Luo ve diğ., 2017). Altıncı aydan sonra duyarlı hale gelen hayvanlara virus bulaşabilmekte ve duyarlı sığır popülasyonlarında bu hayvanların virusu saçmasına ve yayılmasına neden olmaktadır (Su ve diğ., 2017).

Genç buzağılar daha az gelişmiş bir bağışıklık sistemine sahip olduklarından ve sürüye geçişte daha fazla strese maruz kaldıkları için, yaşlı sığırlara oranla solunum sistemi patojenlerine daha duyarlı olup immunolojik açıdan daha zayıf yanıt vermektedirler (Kurcubic ve diğ., 2019). Stres altındaki ve uygun olmayan çevresel koşullarda bulunan sığırlarda konak immunitesi daha zayıf olmakta ve viral infeksiyon ile komplike ikincil bakteriyel infeksiyonlar ile solunum yolu invazyonu sonucunda şiddetli bir hastalık tablosu ve ölümler meydana gelebilmektedir (Yu ve diğ., 2020). Primer viral infeksiyona maruz kalan konakta şiddetli bakteriyel pnömoni tablosu çeşitli faktörler sayesinde meydana gelir. Bu faktörler; nazal mukozal epitelde meydana gelen hasar sonucu ilgili bölgede bakteriyel invazyona elverişli bir ortam oluşması, trakea mukozasında ve mukosiliyer yapıda meydana gelen hasar ile ilgili bölgede bakteriyel invazyona uygun bir ortam oluşması, hava yolları ve akciğerdeki doğal savunma mekanizmasının bozulması ile viral infeksiyona bağlı hasarla doğrudan ilgili olarak nötrofil ve makrofaj birikiminin gerçekleşmesi ve immun yanıt sırasında T hücreleri (hücresel) ile B hücrelerinin (humoral) yeterli yanıt verememesidir (Fulton, 2009).

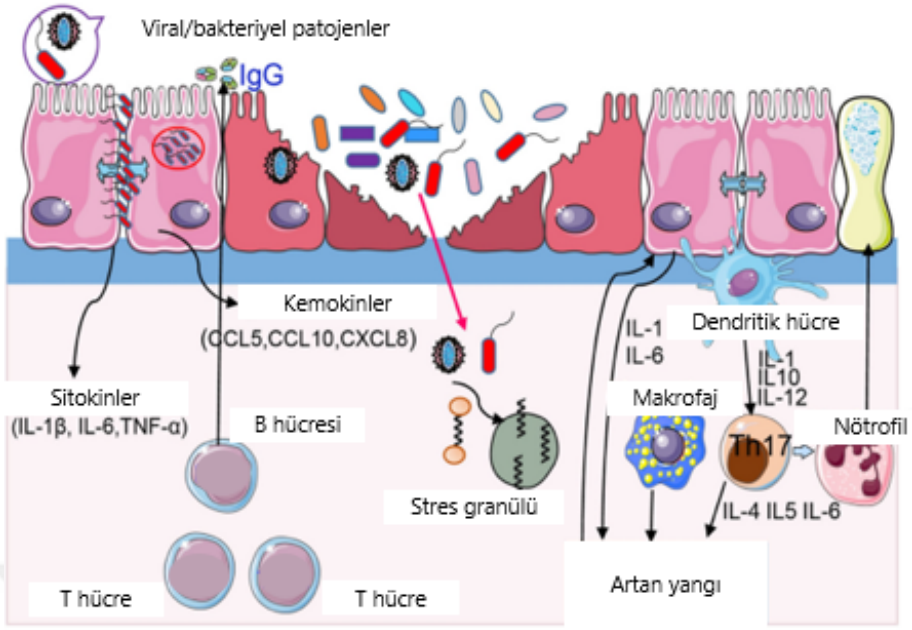
Sığırlarda solunum sistemi infeksiyonu prevalansında anneden kaynaklı faktörler rol oynamaktadır. Kolostrumlarında daha az antikor seviyesine sahip sığırların buzağıları infeksiyonlara karşı daha duyarlı olmaktayken daha dirençli sığırlar daha uzun süreli pasif immunite geliştirebilmekte ve bu pasif immuniteyi takiben gerekli bağışıklık oluşabilmektedir (Taylor ve diğ., 2010). Yeni doğan buzağılarda yapılan çalışmalarda IDV'ye karşı oluşan antikorların seroprevalans oranı yüksek değerlerde gözlenmiş olup bu durum maternal antikorların önemini ortaya koymaktadır (Ferguson ve diğ., 2015; Horimoto ve diğ., 2016; Su

ve diğ., 2017; Dane ve diğ., 2019). Maternal antikor seviyesi düşmeye başladığında ise buzağılar IDV infeksiyonuna daha açık hale gelmekte ve bu durum saçım, yayılma ve rezervuar olma riskini artırmaktadır (Trombetta ve diğ., 2019).

2.5.1. Doğal Bağışıklık

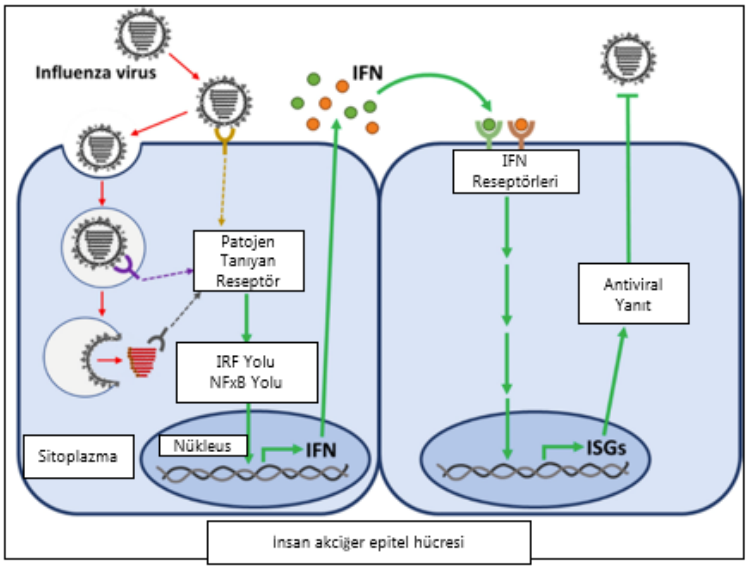
İnfluenza D virusu ile ilgili gelişen doğal ve kazanılmış bağışıklıkla ilgili çalışmalar yeni ve sınırlıdır. Bu nedenle daha çok diğer influenza viruslardakine benzer doğal savunma sisteminin rol aldığı öngörülmektedir. Sığırlar solunum istemi viruslarıyla karşılaştığında etken epitel hücrelerine tutunmaya ve replike olmaya çalışır. Konağın mevcut bakteri florasının değişimi veya değişmiş olması bu aşamada tutunmayı ve savunmayı etkiler. Bu sırada doğal immun yanıt devreye girer. Proinflamatuvar sitokinlerden IL-1β, IL-6, IL-8 ve TNF-α ve kemokinler salınarak immun sistem uyarılır ve yangı başlar. Yangının başlamasıyla nötrofil aktivasyonu sonucu öksürük, ateş ve sıvılarla virusun dışarı atılmaya çalışılmasının yanında interferon aktivitesi başlatılır. Ek olarak kazanılmış bağışıklıkta rol alan diğer hücreler de uyarılmış olur (Şekil 2.15) (Chai ve ark, 2022).

Patojenlere spesifik antikorların oluşumundan önce infeksiyona karşı ilk savunma doğal bağışıklık yanıtı ile gerçekleşir. Bu savunma mekanizması viral infeksiyonun ilk saatlerinde başlar ve interferon düzenleyici faktör (IRF) ile aktive edilmiş B hücrelerinin nükleer faktör kappa-light-chain-enchancer'ı (NF_KB) ile meydana gelir. IRF ve NF_KB yolakları konak hücrelerden sitokin salımını başlatır. Bu sitokinler ise immun yanıtta anahtar rol oynarlar. Viral infeksiyonlarda üretilen en önemli ajanlar interferon (IFN) olarak bilinen sitokinlerdir ve bu interferonlar yüzlerce IFN-stimulated gen (ISG) üretirler. ISG'ler ve sitokinlerin aktive olmasıyla IFN'ler şu şekilde çalışmaya başlarlar: 1. İnfekte olan komşu hücrelerin apoptozisinin başlangıcının sağlanması; 2. Bölgedeki bağışıklık hücreleri tarafından tanınmayı ve yıkımı artırmak için infekte olmuş hücrelerin yüzeyindeki reseptör ekspresyonunu değiştirilmesi; 3. RNA'yı parçalamak ve protein sentezini durdurmak için infekte olmamış komşu hücreleri uyararak viral infeksiyonun sınırlandırılması; 4. Doğal bağışıklık yanıtı hücrelerinin aktivasyonunun sağlanmasıdır (Skelton ve Huber, 2022).



Şekil 2.15: Sığırların respiratörik patojenlere maruz kaldığında konak savunması (Chai ve diğ., 2022).

İnfluenza viruslara karşı doğal savunma sistemlerinin başında sıvısal faktörlerden Tip-1 interferonlar (alfa ve beta) gelmektedir. İnterferon sayesinde infekte hücrenin NK hücreleri tarafından öldürülmesi ve komşu hücrelerin korunması önemli bir doğal savunma sistemidir (Şekil 2.16) (Skelton ve Huber, 2022). Eğer virus interferon sisteminden kaçış mekanizması geliştirmiş ise doğal savunma sisteminden kurtuluyor demektir. Bu durum daha çok influenza viruslarda görülen antijenik drift ve shift sonucu şekillenmektedir.



Şekil 2.16: İnfluenza viruslarda doğal immun yanıt (Skelton ve Huber, 2022).

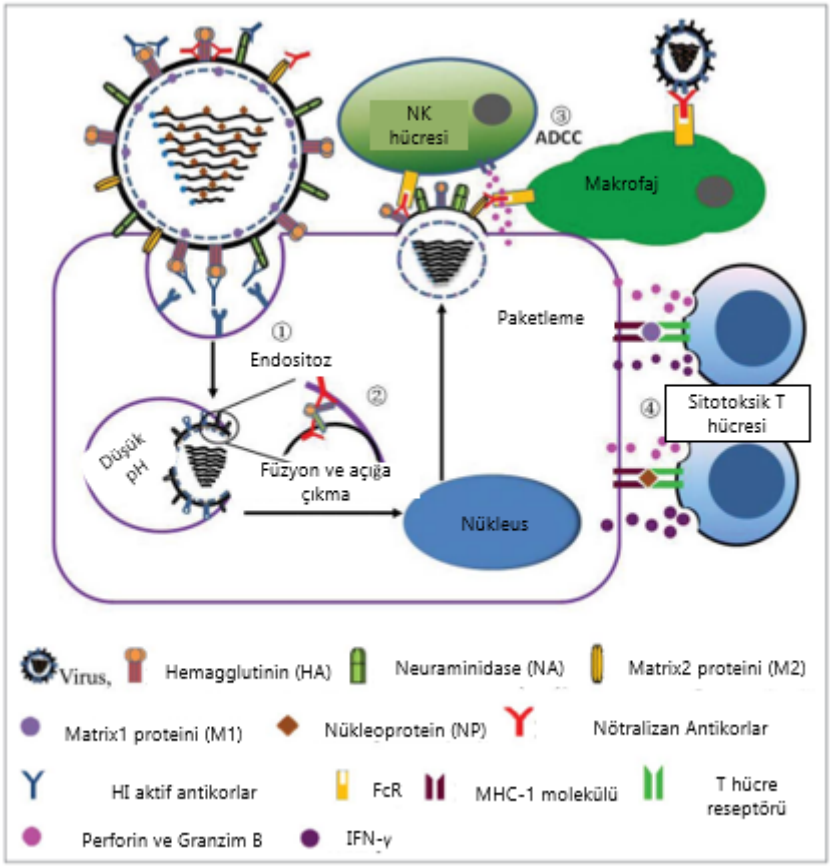
2.5.2. Kazanılmış Bağışıklık

İnfluenza D virusuna karşı henüz aşı geliştirilemediği için kazanılmış bağışıklık ya pasif olarak kolostrum ile ya da infeksiyonun doğal olarak geçirilmesiyle sağlanmaktadır. Doğal infeksiyonlara karşı humoral immun yanıt, B hücreleri tarafından üretilen antikorlar ile yönetilmekte ve virusa karşı nötralizan etki göstermektedir (Lam ve Baumgarth, 2019). Hücresel immun yanıt ise özellikle sitotoksik T lenfositlerin (CTL8) infekte hücrelere hücumu sonucu infekte hücrelerin yok edilmesi ile sonlanmaktadır (Şekil 2.17) (Xiang ve diğ., 2015). Kazanılmış bağışıklık sonrası oluşan IgA'ların mukozal bağışıklıkta IgG'lerin ise sistem ve organların korunmasında önemli olduğu bildirilmiştir (Skelton ve Huber, 2022).

Humoral immun yanıt farklı influenza antijenlerine karşı antikor üretir. İnfluenza viruslar için HA spesifik antikorlar infeksiyonun önlenmesi için oldukça önemlidir. NA'ya karşı üretilen antikorlar enzimatik aktiviteyi engelleyerek ve antikor bağımlı hücre tarafından yönetilen sitotoksisiteyi (ADCC) başlatarak virusun yayılmasını önler (Bahadoran ve diğ., 2016). M2 infekte hücrelerde düşük titrelerde bulunduğundan M2 spesifik antikorlar daha az miktarda üretilir. Bu proteinlere karşı üretilen antikorlara ek olarak NP spesifik antikorlar da immun yanıtın oluşumunda rol oynar (LaMere ve diğ., 2011). Bahsedilen bu antikorlar komplement tarafından yönetilen infekte hücre lizisini tetiklerler. İnfluenza virusların vücuda ana giriş yolu mukozal hücrelerdir. IgA ve bazı durumlarda IgM mukozalarda lokal olarak üretilebilir ve mukozal patojenleri nötralize ederler. Bu antikorlar devamlı olarak patojen girişini ve virus replikasyonunu engelleyici görev yaparlar. Birincil immun yanıt lenfoid dokularda başlar ve IgM baskınlığında gerçekleşirken ikincil immun yanıt periferde IgG baskınlığında meydana gelir. Yüksek IgM seviyeleri virusun daha kısa sürede elimine edilmesi ile bağlantılı olup erken dönemde iyi bir IgM yanıtı daha sonra oluşacak iyi bir IgG yanıtı için de gereklidir (Kerijtz ve diğ., 2011; Bahadoran ve diğ., 2016).

Hücresel immunitede influenza viruslara karşı $CD4^+$ ve $CD8^+$ T hücreleri üretilir. Virus spesifik CD4+ yardımcı T hücrelerinin, Th1 ve Th2 hücreleri, aktivasyonu antijen sunan hücrelerdeki virustan üretilmiş MHC sınıf II bağımlı peptitleri tanır. T yardımcı 17 (Th17) ve regülatör T hücreleri (Tregs) de influenza viruslara karşı hücresel immun yanıtı kontrol eder. Tregs hücreleri $CD8^+$ T hücreleri ve yardımcı T hücrelerin yanıtını kontrol ederler (Campbell ve Koch, 2011). Yardımcı T hücreleri Th1 ve Th2 olmak üzere farklı sitokin aktivitelerine sahip iki tipe ayrılır. Th1 hücreleri IFN-gama ve IL-2 üreterek hücresel immun yanıtta baskın rol oynarken Th2 hücreleri IL-4 ve IL-13 üreterek B hücre yanıtını stimüle eder (Kreijtz ve diğ., 2011). İnfluenza virusun infeksiyonunu takiben MHC-I molekülleri $CD8^+$ T hücrelerini aktive

eder. Bu hücrelerin aktivasyonu ile influenza virus ile infekte hücreler tespit edilir, litik aktivite ile eliminasyon başlar ve böyle virus üretimi engellenmiş olur. Litik aktivite perforin ve granzimlerle gösterilmektedir (Metkar ve diğ., 2008). İnfekte hücrenin perforin ile permeabilitesi değişir ve granzimler hücreye girerek apoptozisi başlatır. Apoptoziste ek olarak sitotoksik T hücreleri de rol almaktadır. İnfeksiyon sonrası oluşan sitotoksik T hücreleri kan dolaşımında, lenfoid organlarda ve infeksiyon bölgesinde lokalize olmuşlardır (Rangel-Moreno ve diğ., 2011; Bahadoran ve diğ., 2016).



Şekil 2.17: İnfluenza viruslarda kazanılmış bağışıklık ve infekte hücrelerin sitotoksik T hücreleri tarafından öldürülmesi (Xiang ve diğ., 2015).

2.6. KLİNİK BELİRTİLER

IDV ile infekte hayvanlarda klinik tablo genellikle kuru öksürük, burun akıntısı ve solunum sistemi rahatsızlığı şeklindedir. Buzağılarda yapılan bir çalışmada klinik olarak kuru öksürük, ateş, mukoid nazal akıntı, seröz göz akıntısı, uyku hali gibi bulgular elde edilmiştir (Ferguson ve diğ., 2016). Hastalık asemptomatik olarak da seyredebilir fakat infekte hayvanlar bu dönemde virus saçmaya devam etmektedir (Ferguson ve diğ., 2016; Yilmaz ve diğ., 2020).

IDV hafif bir klinik tablo oluşturmasına karşın, bu tablonun virusun yükü, virulensi, konağın bağışıklık durumu, diğer respiratorik etkenlerin varlığı ve bakım-besleme koşullarına bağlı olarak değişebileceği bildirilmiştir (Su ve diğ., 2017). Daha önce yapılan çalışmalarda IDV'nin sağlıklı hayvanlara oranla klinik olarak hastalık tablosu gösteren hayvanlarda görülme oranının daha fazla olduğu rapor edilmiş ve bu durumun BRDC ile ilşkili olduğu vurgulanmıştır (Hause ve diğ., 2014; Ferguson ve diğ., 2016; Mitra ve diğ., 2016). Bu kapsamda yapılan bir diğer çalışmada, IDV'nin, solunum sistemi infeksiyonlarında tek başına belirli bir semptom oluşumuna neden olmadığı buna karşın diğer solunum sistemi patojenlerine daha önce maruz kalan hayvanda semptomların oluşumuna katkı sağladığı bildirilmiştir (Nissly ve diğ., 2020).

Kobaylarda yapılan deneysel infeksiyonlarda belirli bir klinik tablo gözlenmemiş, fakat IDV'ye karşı serokonversiyon oluştuğu rapor edilmiştir (Sreenivasan ve diğ., 2015). Dağ gelinciği modelinde, IDV infeksiyonu sonrası klinik tablo gelişmemiş, IDV nazal türbinatlarda replike olmuş fakat alt solunum yolunda tespit edilmemiştir. Fare modelinde yapılan çalışmalarda ise yine klinik tablo oluşmamış ve virus büyük oranda üst solunum yolunda replike olmuş, daha az bir oranda da alt solunum yolunda saptanmıştır (Hause ve diğ., 2013; Sreenivasan ve diğ., 2015; Oliva ve diğ., 2019; Yu ve diğ., 2020).

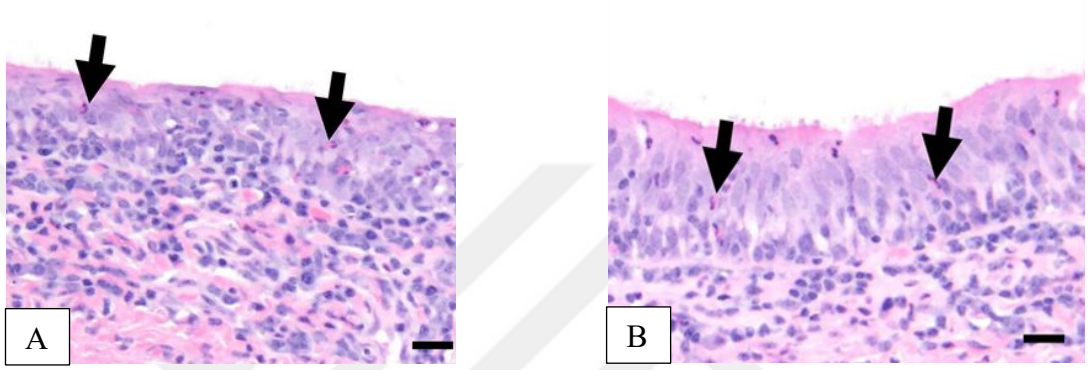
2.7. NEKROPSİ VE HİSTOPATOLOJİK BULGULAR

IDV ile infekte hayvanlarda trakeada yangı ve epitelyumda nötrofil infiltrasyonlu multifokal bölgeler ve hafif epitelyal attenüasyon gözlenmiştir. Akciğerde ise hava yollarında az sayıda dejenere nötrofil ve lümende mukus görüldüğü rapor edilmiştir (Ferguson ve diğ., 2016). BRDC ilişkili yapılan bir çalışmada, IDV pozitif çıkan örneklerde bakteriyel koinfeksiyonu takiben akciğerlerde koagulatif nekroz, bronşlarda hücre odakları ile bronş, bronşiyol ve alveolar boşluklarda belirgin nötrofil infiltrasyonu görülmüştür (Dane ve diğ., 2019).

Deneysel olarak yapılan bazı IDV infeksiyonlarında nötrofil infiltrasyonu ve hafif derecede epitelyal atenüasyon sonucu meydana gelen trakea yangısı rapor edilmiştir (Şekil 2.18) (Ferguson ve diğ., 2016; Hause ve diğ., 2017; Zhang ve diğ., 2019). Ek olarak, daha az bir oranda akciğer dokusunda lezyon bildiren çalışmalar da mevcuttur (Hause ve diğ., 2017; Salem ve diğ., 2019; Zhang ve diğ., 2019; Nissly ve diğ., 2020).

IDV'nin sığırlarda görülen BRDC'deki patolojisinin bu hastalık kompleksi ile ilgili diğer patojenlerin başlattığı etkileri artırıcı bir şekilde ilerlediği bildirilmiştir (Ng ve diğ., 2015;

Ferguson ve diğ., 2016; Flynn ve diğ., 2018). IDV, doğrudan BRDC oluşumuna neden olmazken BRDC varlığında replike olma potansiyeli artmaktadır. Bu durumun nedeni koinfeksiyonları da kapsayan çeşitli predispoze edici faktörlerin, solunum yollarında immunosupresyon oluşturmasıdır (Nissly ve diğ., 2020). Yukarıda açıklandığı kadarıyla, IDV patolojisi ile ilgili veriler sınırlıdır. İleride BRDC ve IDV ilişkisine yönelik yapılacak çalışmalar sayesinde IDV patolojisi ile ilgili daha fazla bilgi edinilebilecektir.



Şekil 2.18: IDV ile infekte edilmiş trakea dokularında epitelyal nötrofil infiltrasyonları **(A)** ve epitelyal attenüasyon **(B)** (Ferguson ve diğ., 2016).

2.8. TANI

İnfluenza virusu infeksiyonlarının tanısında virus izolasyonu, elektron mikroskopi, immunohistokimya, serolojik ve moleküler yöntemlerden yararlanılmaktadır. İnfluenza viruslarının izolasyonu tanısal çalışmalara ek olarak sürveyans programlarında sahada hangi virusun bulunduğunun bilinmesi ve dolayısıyla pandemi programlarına ve aşı üretim çalışmalarına katkı sağlaması açısından önemlidir (Krauss ve diğ., 2012). Elektron mikroskopi çalışmaları tanıdan çok araştırma amaçlı kullanılır. İmmunohistokimyasal yöntemler de patogenez çalışmalarında virusun hangi dokularda lokalize oluğunun gösterilmesi açısından değerlidir.

Tanıda virus saptamaya yönelik moleküler ve anikor saptamaya yönelik serolojik yöntemler daha sık kullanılmaktadır. Serolojik tanıda en sık kullanılan testler hemaglutinasyon inhibisyon, ELISA, virus nötralizasyon ve daha az sıklıkla olmak üzere Western immunoblotting yöntemleridir. Moleküler yöntemlerden RT-PCR ve real time RT-PCR IDV'nin tespit edilmesinde yaygın olarak kullanılan yöntemlerdir. Özellikle real time RT-PCR

tercih edilmekte ve tercih nedeni olarak, reaksiyonun gerçek zamanlı takip edilebilmesi ve kısa zamanda sonuç alınması gibi avantajlarının olmasıdır. Spesifik primer seçimi ve prob kullanılarak testin spesifitesi de artırılabilmektedir (Henritzi ve diğ., 2019; Yilmaz ve diğ., 2020). Real time RT-PCR ile pozitif bulunan örneklerde, RT-PCR ile IDV'nin hemaglutinin esterase fusion (HEF) geninin çoğaltılması prensibiyle sekanslama yapılmaktadır (Yilmaz ve diğ., 2020). Sekanslama verilerinin sonucunda filogenetik analizler yapılarak hayvan popülasyonlarında sirküle olan IDV genotipleri belirlenebilmektedir (Ducatez ve diğ., 2015). Virus titresi ölçümünde "gold standart" olarak kabul edilen plak assay ise, virusun sitopatik etki oluşturma yeteneğinden yararlanarak titrenin değerlendirilmesine dayanan bir testtir (Tse ve diğ., 2013).

2.8.1. Virus İzolasyonu ve İdentifikasyonu

İnfluenza viruslarının izolasyonu primer veya devamlı hücre kültürlerine ya da embriyolu tavuk yumurtalarına inokulasyon yöntemleriyle yapılmaktadır. Başarılı bir izolasyon için örneklerin doğru zamanda, uygun bir şekilde alınması, taşınması ve örnek türüne uygun kültürlerin kullanılması önemlidir. Memeli türlerinde izolasyon için nazal svab, orofaringeal svab, trakeal sıvı ve svab, rektal ve fekal svab; mezbahada ya da yeni ölmüş hayvanlardan solunum yolu ve akciğer organ örnekleri kullanılabilmektedir (Krauss ve diğ., 2012, Liu ve diğ., 2020).

2.8.1.1. Embriyolu Tavuk Yumurtasında İzolasyon

İnfluenza viruslarının izolasyonu antijenik karakterizasyon, patogenez araştırmaları ve aşı üretiminde canlı ve infekte virus elde etmek için kullanılan bir prosedürdür. Geleneksel olarak embriyolu tavuk yumurtasında izolasyon, influenza virusları için "gold standart" olarak kabul edilmiştir (Zhang ve Gauger, 2014). IDV için de embriyolu tavuk yumurtaları virus izolasyonunda kullanılmaktadır (Liu ve diğ., 2020; Sreenivasan ve diğ. 2022). Fertil yumurtalar 9-11 günlük oluncaya kadar, 37°C'de ve %44-45 nemli bir ortamda inkübasyona bırakıldıktan sonra yumurta muayene lambası ile embriyonik dönemleri kontrol edilir ve uygun olanlar hava kesesi ile ana damarlarının bağlantı noktası kabuk üzerinde işaretlenir. Memeli influenza virusları amniyon kesesinde daha iyi replike olmaktayken, başlangıç izolasyonu için allantoik boşluk da kullanılabilmektedir. Allantoik boşluğa inokulasyon amniyon kesesine oranla daha kolaydır. Amniyon kesesine inokülasyonun teyit edilmesi amacıyla Coomassie Brillant Blue

Stain (%5) kullanılabilir (Krauss ve diğ., 2012). İnokule edilen yumurtalar influenza virusuna bağlı olarak 33°C- 37°C arasında 14 günlük olana kadar inkübe edilir.

2.8.1.2. Hücre Kültürlerinde İzolasyon

IDV, Human Rectal Tumor (HRT-18), Swine Testicle (ST), Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) ve Human Lung Adenocarcinoma (A549) gibi çeşitli hücre hatlarında izole edilmiş olup IDV izolasyonunda sıklıkla kullanılan hücre hatları HRT-18 ve ST hücreleridir (Holwerda ve diğ, 2019; Salem ve diğ., 2019; Kwasnik ve diğ., 2023). HRT-18 hücreleri 67 yaşında bir adenokarsinom hastasının kalın bağırsağından izole edilmiş olup epitelyal özellikte bir hücre hattıdır (Vermeulen ve diğ., 1998). HRT-18 hücrelerinin DMEM'e eklenen çeşitli oranlarda FBS ve antibiyotik solüsyonları ile 37°C ve %5 CO_2'li ortamda devamlılığı sağlanmaktadır (Probst ve diğ., 2023, Ishida ve diğ. 2023). IDV'nin izolasyonu için HRT-18 hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmada 33°C ve 37°C'de inkübasyona bırakılan hücrelerde virus üreme kinetiği benzer şekilde seyretmiştir (Wan ve diğ., 2020). IDV'nin HRT-18 hücreleri üzerinde belirgin bir CPE oluşturmadığı gözlemlenmiş olup HRT-18 hücrelerinin kullanıldığı virus izolasyonu çalışmalarında virus izolasyonu RT-PCR, HA ve ELISA testlerinin kombine ya da tekli olarak kullanımlarıyla doğrulanmıştır (Collin ve diğ., 2014; Ferguson ve diğ., 2015; Foni ve diğ., 2017; Moreno ve diğ., 2019). Diğer yandan ST hücreleri ile yapılan virus izolasyonu çalışmalarında CPE tespiti açısından HRT-18 hücrelerine göre daha iyi sonuçlar alınmıştır (Jiang ve diğ., 2014; Hause ve diğ, 2014; Collin ve diğ, 2015).

2.8.1.3. Plak Assay

Plak assay, influenza virusunun monolayer hücrelerde agar veya agaroz ile plak formu oluşturma yeteneği prensibine dayanmaktadır (Tobita ve diğ., 1975; Klimov ve diğ., 2012). Plaklar virusun neden olduğu sitopatik etkiye bağlı olarak ve infekte hücrelerin monolayer tabanda lize olarak dairesel alanlar oluşturması ile meydana gelmektedir. Yalnızca infekte virus partikülleri konak hücresini infekte etmekte ve plak oluşturmaktadır. Mevcut örnekteki infekte virus miktarının kantitatif ölçümü, genellikle MDCK hücrelerinin kullanıldığı monolayer hücrelerde oluşan plakların sayısını gösteren plak oluşturma ünitesi (plaque forming unit-PFU) ile ifade edilir. Böylece her mililitredeki virus titresi PFU ile hesaplanabilir (Klimov ve diğ., 2012; Ishida ve diğ., 2021). Plak assay yıllar önce geliştirilmiş olmasına rağmen virolojide hala virus titresi ölçümünde "gold standart" olarak kabul edilmektedir (Tse ve diğ., 2013).

2.8.2. Serolojik Yöntemler

Virus saçımının olmadığı dönemde bir başka deyişle hastalıktan iyileştikten sonra serolojik yöntemlerle antikorların saptanması, hayvanların virusla karşılaştığının ve antikor düzeylerinin ölçülmesi açısından oldukça önemlidir (World Health Organization, 2011). IDV antikorlarının saptanmasında en sık kullanılan iki yöntem hemaglutinasyon inhibisyon (HIA) ve virus nötralizasyon (VNT) testleridir. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), influenza viruslarının serolojik tanısında geniş kullanım alanı bulan diğer bir test yöntemidir (Moreno ve diğ., 2019).

2.8.2.1. Hemaglütinasyon-İnhibisyon

Hemaglütinasyon-inhibisyon yöntemi, influenza viruslarının tavuk-hindi kırmızı kan hücrelerine (RBC) bağlanarak bu hücreleri aglütine etme prensibine dayanmaktadır (Spackman, 2020). Spesifik olarak IDV-HEF proteinine karşı oluşan antikorlar, HEF proteini üzerindeki antijenik bölgelere bağlanıp bu bölgeleri bloke etmekte ve böylece RBC'lere bağlanmayı imkânsız hale getirmektedir. HEF antijeninin standardize edilmiş miktarları seri dilüe edilmiş antiserumlar ile karıştırılmakta ve bu karışıma RBC eklenerek antikorların HA molekülüne bağlanma düzeyi değerlendirilmektedir (Ishida ve diğ, 2023).

2.8.2.2. Virus Nötralizasyon

Virus nötralizasyon testi (VNT), serumdaki virus spesifik nötralizan antikorları tespit etme açısından sensitivitesi ve spesifitesi yüksek bir yöntemdir (World Health Organization, 2011). Retrospektif tanısal değerine ek olarak VNT, epidemiyolojik ve immunolojik çalışmalar ile aşılamalar sonucu elde edilen VN titrelerinin ölçülmesimnde önemli bir testtir. VNT, yakın zamanda geçirilmiş bir influenza infeksiyonunun tanısını koymak açısından da oldukça yararlı bir yöntemdir (Klimov ve diğ., 2012; Lanave ve diğ., 2024).

2.8.2.3. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Bu yöntemle influenza virusu antijenleri ve influenza virusuna karşı oluşan anikorlar saptanabilmektedir. Hem sığırların virusla karşılaşıp karşılaşmadığı hem de aşı sonrası oluşan antikor düzeylerinin araştırılmasında kullanım kolaylığı, düşük maliyeti ve daha az iş gücü gerektirmesi nedeniyle tercih edilen bir yöntemdir (Crowther, 1995). Ancak IDV antijenleri ve antikorlarının saptanmasına yönelik ticari bir kit henüz geliştirilmemiştir. Monoklonal antikor temelli *in house* ELISA testinin yüksek spesifite ve sensitivite ile başarılı bir şekilde farklı hayvan türlerinde anti-IDV antikorlarının tespitinde kullanılabildiği rapor edilmiştir (Moreno ve diğ., 2019).

2.8.2.4. Western İmmunobloting

Western blotting proteinlerin ayrıştırılması ve identifiye edilmesi için kullanılan bir yöntemdir (Mahmood ve Yang, 2012). SDS-PAGE yöntemi ile ayrıştırılır ve Coomassie Blue ile boyanarak viral glikoproteinlerin görünmesi ve kDa olarak ağırlıklarının belirlenmesi sağlanır (Shaw ve diğ., 2008). SDS-PAGE viral proteinlerin ayrıştırılmasını ve kDa olarak büyüklüğünün gösterilmesini sağlar. Viral proteinlerin nitroselüloz membrana transfer edilmesi sonucu immunobloting yapılarak canlıda IDV'ye karşı oluşan antikorların veya geliştirilen monoklonal antikorların hangi proteine immunoreaksiyon gösterdiği ve spesifiklik çalışmaları yapılmasında oldukça yararlıdır (Rosenberg, 2005). Purifiye virus içindeki proteinler bu yöntemle IDV pozitif serumlar kullanılarak IDV-HEF proteini identifikasyonu çalışmaları yapılmıştır (Okda ve diğ., 2020). Ayrıca**,** IDV HEF geninin yapısı ve reseptör bağlanma noktalarının tespiti, gelecekte potansiyel antiviral ürün geliştirilmesinde hedef nokta olarak kullanılabilme ihtimalini güçlendirmektedir (Song ve diğ., 2016).

2.8.3. Moleküler Yöntemler

RT-PCR ve real time RT-PCR IDV-RNA'sını saptamada ve dolayısıyla IDV tanısında sık kullanılan moleküler yöntemlerdir. Özellikle real time RT-PCR'ın reaksiyonun eş zamanlı takip edilebilmesi ve kısa zamanda sonuç alınması gibi avantajları mevcuttur. Bu testlerin sensitivite ve spesifiteleri yüksektir. Bu nedenlerden dolayı diğer testlere göre daha çok tercih edilmektedir (Hause ve diğ., 2014; Okda ve diğ., 2020). IDV'nin BRDC ile olan ilişkisinin daha iyi anlaşılması için ve sığırlarda solunum sistemi hastalıklarının takibi ve tanısı ile sağlıklı hayvanlarda sürveyans çalışmaları için moleküler yöntemlerin kullanıldığı epidemiyolojik çalışmalar literatüre önemli veriler sağlamıştır (Wagner, 2013; Mekata ve diğ., 2018; Henritzi ve diğ., 2019; Yilmaz ve diğ., 2020).

2.8.3.1. RT-PCR

Reverse-transcription PCR viral genomun saptanmasına yardımcı olan bir teknik olup tanıda oldukça yüksek duyarlılığa sahiptir (Okda ve diğ., 2020). RT-PCR tekniği, solunum sistemi hastalığı görülen veya asemptomatik hayvanlardan alınan solunum yolu (nazal veya orofarinegeal sürüntü ve sıvılar) ile alt solunum yolu (bronkoalveolar lavaj, akciğer biyopsisi) örneklerinde IDV varlığını araştırmak için kullanılmaktadır (Hause ve diğ., 2013; Faccini ve diğ., 2017; Chiapponi ve diğ., 2020). IDV'yi saptamaya yönelik ilk RT-PCR, IDV'nin ilk izolatının PB1 sekansını temel alarak ilk defa 2013'te gerçekleştirilmiştir (Hause ve diğ., 2013). PB1 geni, IDV'nin en stabil gen bölgelerinden biri olduğundan birçok araştırıcı tarafından RT-

PCR için primer tasarımında hedef bölge olarak seçilmiştir (Faccini ve diğ., 2017; Zhang ve diğ., 2019). BRD görülen hayvanlarda, IDV'nin D/OK suşunun PB1 geni hedef alınarak gerçekleştirilen RT-PCR testlerinde pozitiflikler saptanmıştır (Collin ve diğ., 2015). IDV izolatlarında primer tasarımı için kullanılan diğer hedef genler ise PB2, P3, HEF, NP, M ve NS gen segmentleridir (Ferguson ve diğ., 2015).

2.8.3.2. Real time RT-PCR

Real time RT-PCR diğer virusların saptanmasında olduğu gibi IDV saptanması ve tanıda en sık kullanılan bir yöntemdir (Nissly ve diğ., 2020). Gerçek zamanlı olarak izlenebilmesi, viral yük hakkında bilgi edinilmesi gibi oldukça faydalı özellikleri vardır. IDV'nin diğer BRDC etkenleri ile birlikte moleküler epidemiyolojisinin anlaşılması için BRDC vakası görülen hayvan örneklerinde real time RT-PCR ile tarama yapılabilmektedir (Collin ve diğ., 2015). BRDC vakası görülen popülasyonlarda IDV spesifik prob temelli real time RT-PCR tekniği ile yapılan taramalarda pozitiflikler saptanmıştır (Ng ve diğ., 2015; Hayakawa ve diğ., 2020). Solunum sistemi semptomları gösteren hayvanlarda yapılan real time RT PCR analizlerinde BRDC oluşturan diğer viruslarla koinfekte şekilde IDV infeksiyonları saptanabilmiştir (Nissly ve diğ., 2020). Real time RT-PCR ile analiz edilen örneklerde düşük Ct değerine sahip örnekler seçilerek yeni nesil dizileme ve tüm genom analizleri yapılabilmektedir (Ducatez ve diğ., 2015; Zhang ve diğ., 2019). Aslında real time RT-PCR sadece tanı için değil tanı sonrası pozitif bulunan örneklerin ileri analizlerine ve sahada sirküle olan virusların identifikasyonuna destek olmaktadır.

2.8.3.3. Sekans ve Filogenetik Analizler

Sekans analizi çalışmalardan elde edilen verilerle filogentik analizler yapılıp virusun kökeni, varyasyonlar ve sahada sirküle olan IDV genotipleri ve genogrupları saptanabilmektedir. IDV genotipleri 2011 yılından itibaren sığır ve domuzlarda Amerika Birleşik Devletleri, Çin, Fransa, İtalya, İrlanda ve Japonya olmak üzere 6 ülkede tüm genom olarak sekanslanmıştır (Yu ve diğ., 2020). Filogenetik analizler için genellikle IDV'nin HEF geni hedef alınmıştır (Collin ve diğ., 2015; Hayakawa ve diğ., 2020). Filogenenetik çalışmalar sonucunda beş farklı genotip tespit edilmiş olup bunlar D/OK, D/660, D/Yama2016, D/Yama2019 ve D/CA2019'dur (Collin ve diğ., 2015; Murakami ve diğ., 2016; Yu ve diğ., 2020). Ayrıca, Türkiye ve Nambiya'dan farklı viruslar rapor edilmiştir (Yeşilbağ ve diğ., 2022; Molini ve diğ., 2022).

2.8.4. İmmunohistokimyasal Yöntemler

İmmunohistokimya, doku preparatlarında antijen-antikor reaksiyonunun görüntülenmesine dayalı spesifik antikorlar kanalıyla dokularda antijen saptayan bir yöntemdir (Ramos-Vara ve Miller, 2014). İmmunohistokimya için IDV ile infekte hayvanın trakea ve akciğer dokularından hazırlanan örneklerde analiz yapılabilmektedir. Bu yöntemle trakeal epitelyumda immunoreaktif hücreler ve infekte epitel hücreler görüntülenebilmektedir (Ferguson ve diğ., 2016).

2.8.5. Ayırıcı Tanı

IDV infeksiyonu sığırlarda hafiften orta şiddete kadar solunum sistemi semptomları göstermekte ve BRDC için potansiyel etkenlerden biri olarak düşünülmektedir (Ferguson ve diğ., 2016; Su ve diğ., 2017). IDV infeksiyonunu diğer BRDC etkenlerinden klinik olarak ayırmak oldukça zordur. Sığırlarda ateş solunum güçlüğü ve öksürük gibi klinik tablo oluşturan viral solunum yolu infeksiyonlarından BHV-1, BRSV, BPI3V, BAV histopatolojik incelemelerde, IDV infeksiyonundan farklı olarak inklüzyon cisimcikleri göstermektedirler. Ek olarak BHV-1 infeksiyonunda gözde bilateral hiperemi ve akıntı ile karakterize konjunktivit ve abort ve BRSV infeksiyonunda gelişen diffüz intersitisyel pnömoniye bağlı ağızdan soluma IDV infeksiyonunda gözlemlenmeyen klinik belirtilerdir (Fulton, 2009; Ferguson ve diğ., 2016). BRDC ve IDV infeksiyonunda kesin tanıya RT-PCR veya real time RT-PCR tekniği kullanılarak viral genomun saptanmasıyla gidilmektedir (Yu ve diğ., 2020).

2.9. KORUMA VE KONTROL

2.9.1. Aşı Çalışmaları

BRDC Dünya çapında sığır endüstrisinde büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır. IDV'nin BRDC oluşumundaki rolünün her geçen gün daha iyi anlaşılması ile sığırlarda IDV infeksiyonuna karşı etkili ve güvenli bir aşıya ihtiyaç olduğu dikkat çekilmesi gereken bir noktadır. Günümüzde sığırlara uygun spesifik, etkin ve güvenli bir IDV aşısı henüz üretilmemiştir (Ishida ve diğ., 2020; Liu ve diğ., 2020). IDV'nin BRDC'deki rolü ile ilgili daha fazla verilerin elde edilmesi ve sığırlardaki IDV'ye ilişkin klinik tabloların kötüleşmesi ile aşı üretimi konusundaki çalışmaların hızlanacağı öngörülmektedir.

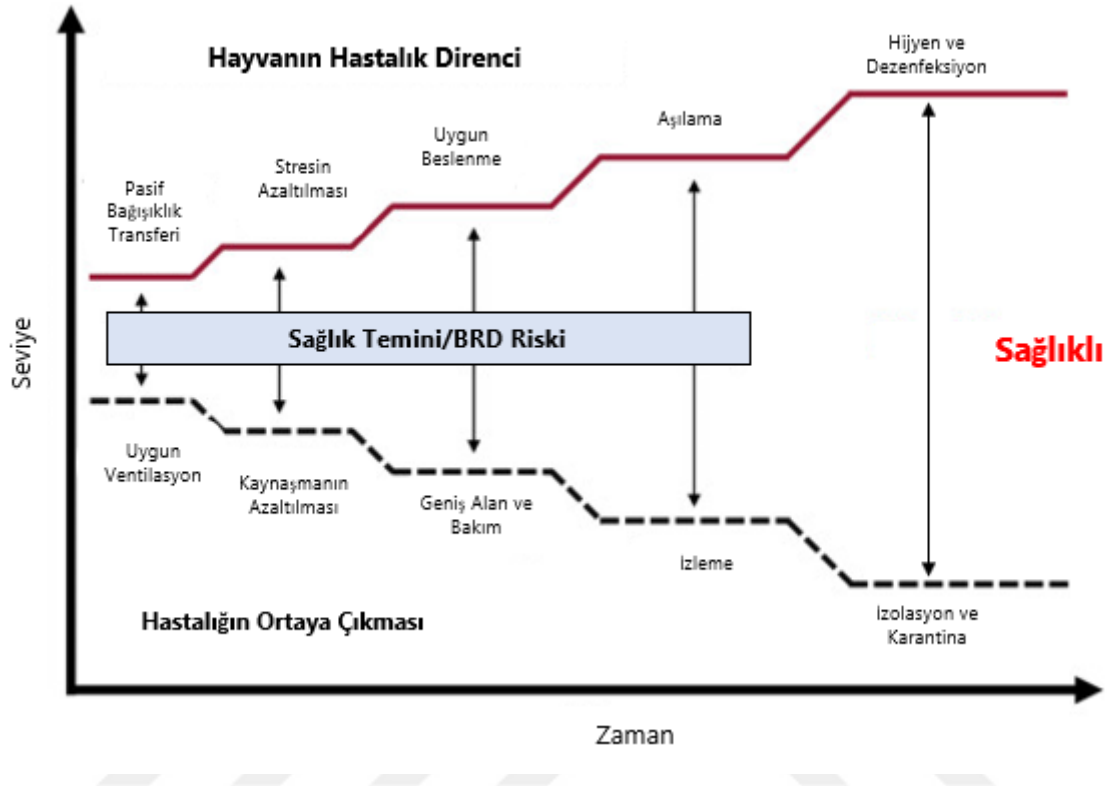
Hause ve diğ. 2017 yılında IDV için yaptıkları aşı çalışmasında tüm virus partikülünün kimyasal inaktivasyonu sonucu kısmi bir koruyuculuk sağladığı bildirilmiştir (Hause ve diğ., 2017). Çalışmada kullanılan sığırlarda aşı virusuna karşı spesifik immun yanıt oluşturmuş ve IDV saçımını kısmen engellemiştir. Bu sonuçlar kısmi bir bağışıklık olarak değerlendirilmiş ve aşı etkinliği tartışmalı bulunmuştur (Hause ve diğ., 2017). Son yıllarda revers genetik sistemi temel alınarak çeşitli mekanizmalar ile geliştirilen, IDV'ye karşı attenüe aşı çalışmaları güvenli ve etkili IDV aşılarının üretimi için alternatif bir teknik olarak göze çarpmaktadır (Yu ve diğ., 2017; Ishida ve diğ., 2020; Liu ve diğ., 2020).

2.9.2. Yönetim ve Biyogüvenlik Uygulamaları

Sığırları IDV infeksiyonundan korumak için henüz bir rehber veya mevzuat bulunmamaktadır. Sığırları IDV'den korumak için iyi bir yönetim ve biyogüvenlik uygulamalarına ihtiyaç vardır. IDV genellikle BRDC ile beraber seyrettiği için yönetim ve biyogüvenlik ön planda gelmektedir. İyi bir yönetim, sığırlarda görülen solunum sistemi infeksiyonları sonucu gelişen pnömoni tablolarını viral, bakteriyel, fungal ve mycoplasma açısından değerlendirmeli ve bu doğrultuda koruma ve kontrol uygulamaları yapmalıdır. Bu kapsamda sığırlarda görülen pnömoni vakaları, morbidite ve mortalite verileri, mevsimsel değişimler, sağlık durumu, işletme koşulları, barınma, hayvan sayısı, beslenme, yapılan analizler, aşılama ve tedavi protokolleri gibi verilerin izlenmesi ve raporlanması gerekmektedir (Lago ve diğ., 2006; McGuirk, 2008).

Biyogüvenlik terimi kısaca "bir sürüde ortaya çıkan infeksiyöz hastalık riskinin azaltılmasını amaçlayan idari uygulamalar" olarak tanımlanabilmektedir (Brenna ve Christley, 2012). Sığırlarda solunum yolu hastalıklarını önleme amaçlı biyogüvenlik uygulamaları izolasyon ve karantina başta olmak üzere, hayvanların test edilmesi, stresin azaltılması, hayvan transportu ve sürüye kabul standartlarının geliştirilmesi, transport öncesi ve stres döneminden önce aşılama, hayvan beslenmesini iyileştirme, kalabalık sürülerde havalandırma uygulamaları şeklinde sıralanabilmektedir (Şekil 2.19) (Callan ve Garry, 2002). Test edilmeyen infekte hayvan hareketleri patojen etkenlerin uzun mesafelere taşınmasına ve hastalık görülmeyen popülasyonlarda infeksiyonlar oluşması sonucu kontrol ve eradikasyon çalışmalarında zorluklara neden olabilmektedir (Brown ve diğ., 2019). Bu kapsamda hasta hayvanları daha doğrusu patojen taşıyan ve saçan hayvanın ortaya çıkarılması için tanısal analizler yapılmalı ve pozitifler ayrılarak virusun yayılması engellenmelidir (Lestari ve diğ., 2019). Sonuç olarak

henüz aşısı olmayan IDV gibi bir virusla mücadele edebilmek için iyi bir yönetim ve biyogüvenlik uygulamaları gereklidir.



Şekil 2.19: Sığırları BRDC ve IDV infeksiyonlarından korumak için gereken uygulamalar (Cummings ve diğ., 2022).

Sığırları BRDC'den ve dolayısıyla IDV'den korumak için patojen etkenlere karşı aşılamak ve maternal antikor düzeylerinin yüksek tutulması, bakım, besleme ve havalandırma koşullarının iyileştirilmesi, stresin azaltılması, sürüye yeni katılan hayvanların test edilmesi ve grektiğinde izolasyon ve karantina uygulanması ve hijyen-dezenfeksiyon işlemlerinin iyi yapılması gerekmektedir (Cummings ve diğ., 2022).

3. YÖNTEM

3.1. GEREÇ

3.1.1. Çiftlikler ve Toplanan Örnekler

Bu çalışmada Marmara Bölgesi'nde bulunan 19 adet sığır çiftliğinden toplanan örnekler kullanıldı. Solunum sistemi belirtisi gösteren toplam 279 hayvandan nazal svab ve kan örneği (BD Vacutainer, Kat. No: 367896) alındı. Moleküler analizler için alınan svablar RNALater stabilizasyon solüsyonu içerisinde (Invitrogen, Kat. No: AM7020), izolasyon için kullanılacak svab örnekleri hücre vasatı içerisinde (Gibco MEM, Kat. No: 11095080) soğuk koşullarda (4-8°C) laboratuvara ulaştırıldı.

3.1.2. Moleküler Çalışmalarda Kullanılan Gereçler

3.1.2.1. Kitler, Primerler, Prob ve Kontroller

RNA Ekstraksiyon Kiti

Çalışma için toplanan nazal svablarda RNA ekstraksiyonu için PureLink RNA Mini Kit (Invitrogen, Kat. No: 12183020) kullanıldı. PureLink RNA Mini Kit içinde lysis buffer, wash buffer I, wash buffer II, RNase-free water, spin kolonlar, toplama tüpleri ve recovery tüpleri bulunmaktadır. Elde edilen RNA miktarları ve saflıkları NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Kat. No: ND1000) cihazı ile ölçüldü. RNA örnekleri kısa süreli olarak 4°C de ve uzun süreli olarak -80ºC'de muhafaza edildi.

cDNA Kiti

Elde edilen RNA örneklerinden komplementer DNA (cDNA) elde edilmesi aşamasında High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems-Thermo Fisher, Kat. No: 4368814) kullanıldı. Elde edilen cDNA örnekleri kısa süreli olarak 4°C ve -20ºC'de muhafaza edildi.

Master Mix

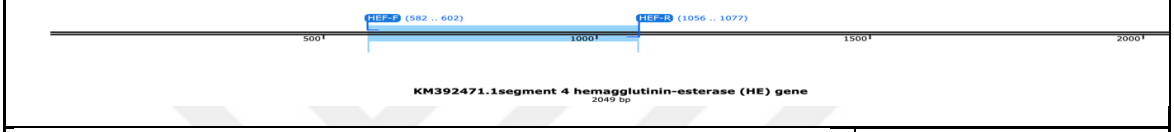
Real time RT-PCR için FluoCycle II Master Mix for Probe (Euroclone, Kat. No: ERD001100BIM) ve RT-PCR için Platinum Hot Start PCR Master Mix (Invitrogen, Kat. No: 13000012) kullanıldı.

Primerler ve Prob

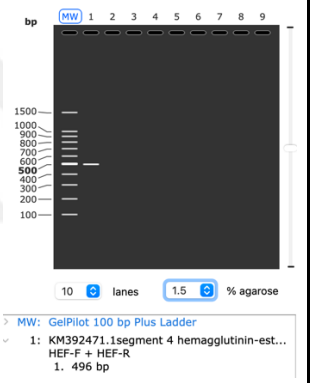
Real time RT-PCR için Faccini ve diğ. tarafından (2017) tasarlanan primer ve prob seti, HEF geni kısmi sekans analizi için yapılan RT-PCR'da ise Zhai ve diğ. (2017) tarafından tasarlanan primer çifti kullanıldı (Tablo 3.1).

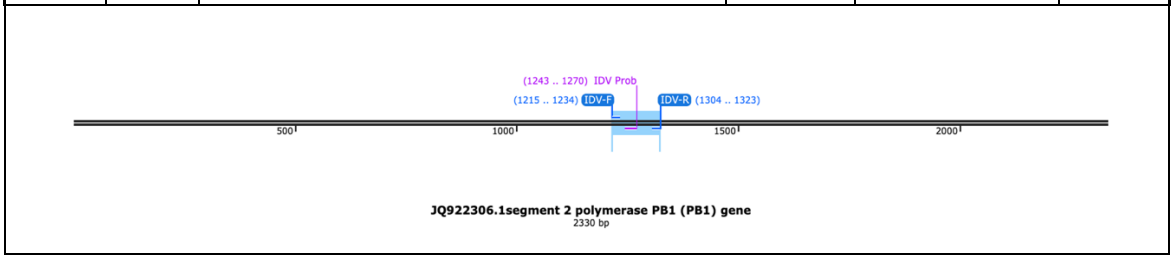
Tablo 3.1: Çalışmada kullanılan primerler ile primerlerin hedefledikleri bölge, dizimleri, ürün büyüklükleri ve gen dizilimindeki yerleri (primerlerin yerleşimi için SnapGene V7.2 programı kullanıldı)

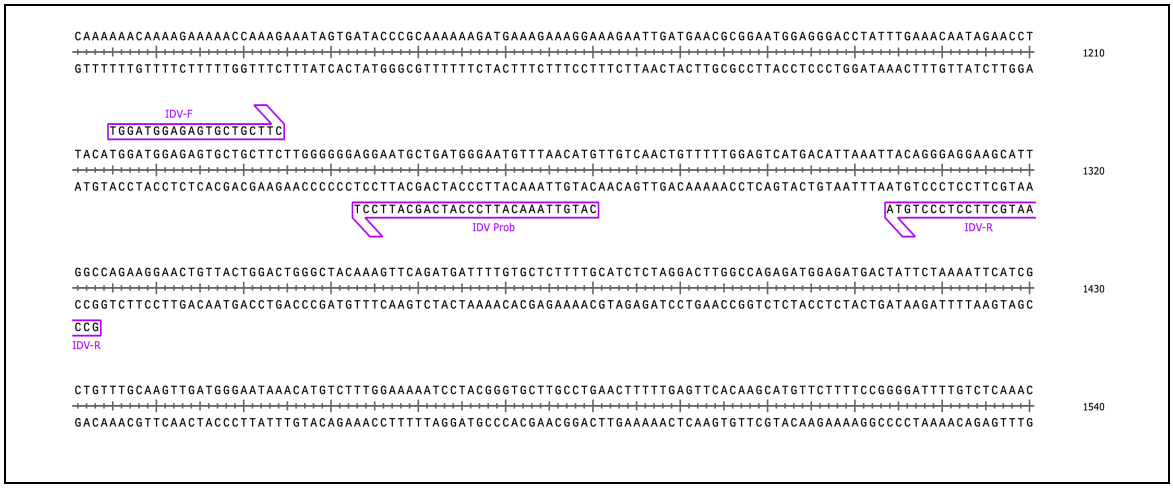
Primer ve Prob	Hedef Bölge	Primer Dizilimi	Ürün Büyüklüğü	Gen Dizilimindeki Yeri	Kaynak
HEF-F	HEF	5'-AAC CRC ATC TTC TTG TTC TTC A-3'	496 bp	582-1077	Zhai ve diğ., 2017
HEF-R		5'-TGC TTC TTC WGT GGC ATT ATC T-3'			
IDV-F	PB1	5'-TGG ATG GAG AGT GCT GCT TC-3'	109 bp	1215-1234	Faccini ve diğ., 2017
IDV-R		5'-GCC AAT GCT TCC TCC CTG TA-3'		1304-1323	
IDV Probe		5'-FAM- CAT GTT AAA CAT TCC CAT CAG CAT TCC T−BHQ1-3'		1270-1243	







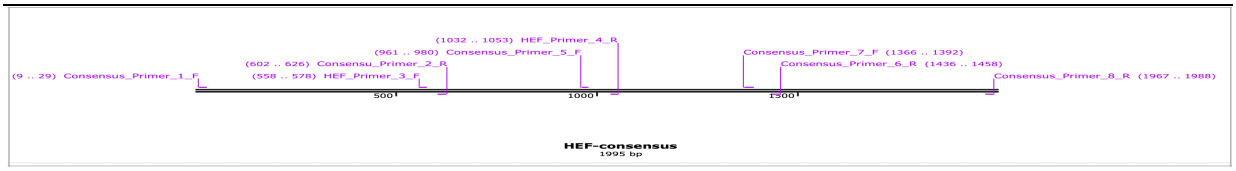


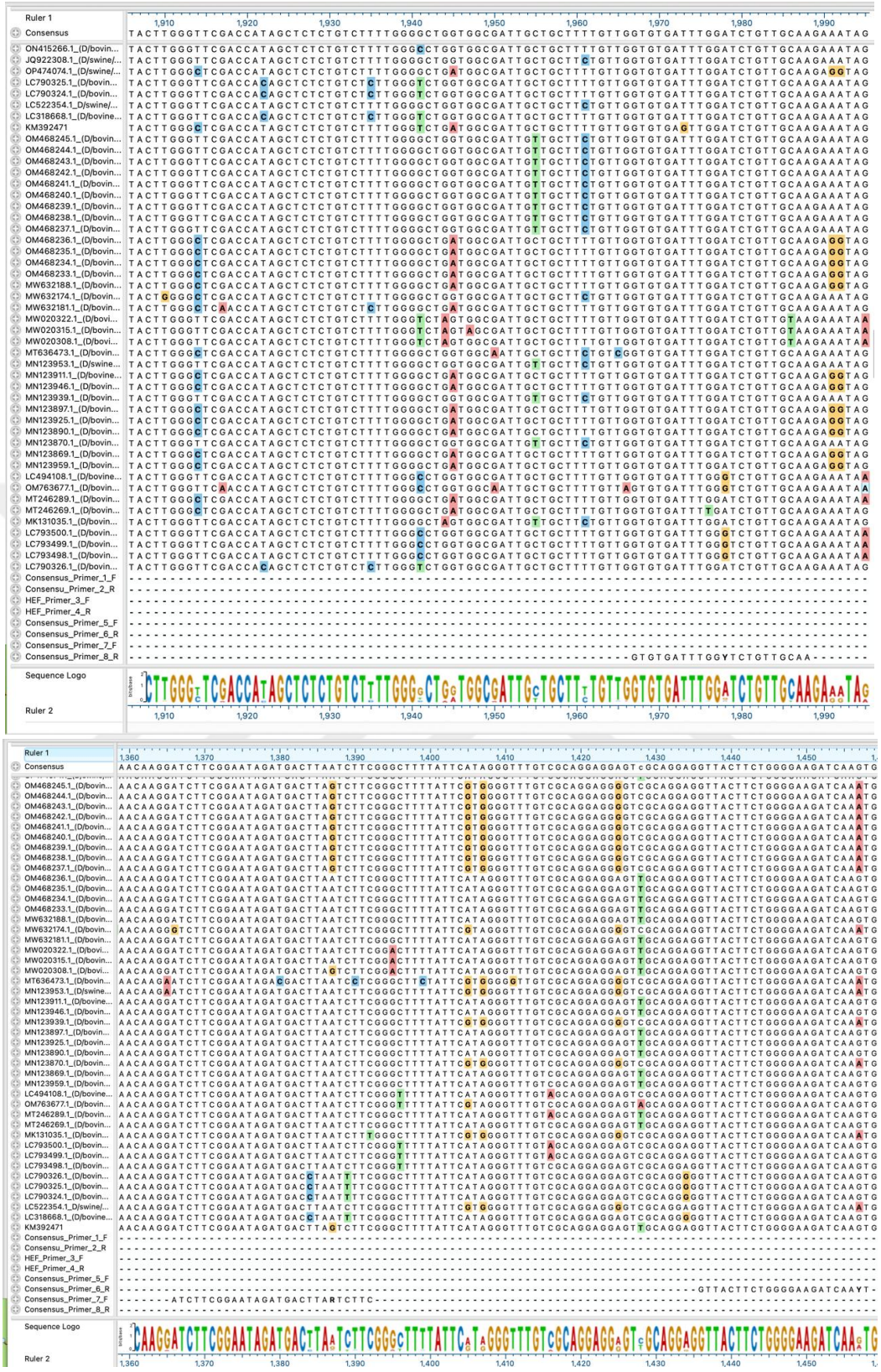


Çalışmada Zhai ve diğ. tarafından tasarlanan (2017) primerler ile pozitif tespit edilen örneklerde tüm HEF geninin sekanslanabilmesi için Gen Bankasına giriş yapılmış tüm HEF gen sekansları MegAlign Pro 17.6.1 (DNAStar) ve SnapGene V7.2 programları kullanılarak align edildi ve konsensus sekans belirlendi. Konsensus sekansa göre tüm HEF geninin kapsayacak şekilde 3 adet dejenere primer seti oluşturuldu. Primer setleri ve align edilen sekanslar üzerindeki yerleşimi Tablo 3.2 ve Şekil 3.2 de verildi.

Tablo 3.2: Çalışmada kullanılan konsensus primerler ile primerlerin hedefledikleri bölge, dizimleri, ürün büyüklükleri ve gen dizilimindeki yerleri

Primerler	Hedef Bölge	Primer Dizilimi	Ürün Büyüklüğü	Gen Dizilimindeki Yeri
Consensus_Primer_1_F	HEF	5'-GCTTCTAGCAACAATYACAGC-3'	618 bp	9-29
Consensus_Primer_2_R		5'-GGATTAACAGAAGATTCTGCATACC-3'		602-626
Consensus_Primer_5_F	HEF	5'-TAYTGCTTCGACACTGATGG-3'	498 bp	961-980
Consensus_Primer_6_R		5'-AYTTGATCTTCCCCAGAAGTAAC-3'		1436-1458
Consensus_Primer_7_F	HEF	5'-ATCTTCGGAATAGATGACTTARTCTTC-3'	623 bp	1366-1392
Consensus_Primer_8_R		5'-TTGCAACAGAYCCAAATCACAC-3'		1967-1988

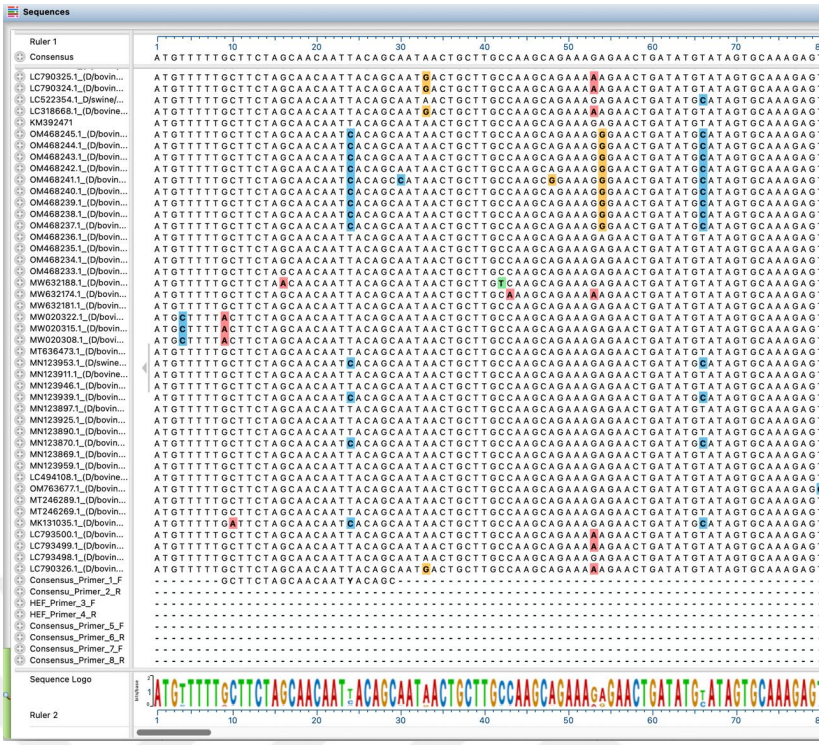




Şekil 3.1: Projede tasarlanan primer çiftlerinin HEF geni içinde yerleşimi



Şekil 3.1 (devam): Projede tasarlanan primer çiftlerinin HEF geni içinde yerleşimi



Şekil 3.1 (devam): Projede tasarlanan primer çiftlerinin HEF geni içinde yerleşimi

Pozitif Kontrol

Çalışmada pozitif kontrol olarak anabilim dalımızda daha önceki çalışmada saptanan ve sekans analizi ile teyit edilen örnek ekstraktı kullanıldı (Yılmaz ve diğ., 2020).

3.1.2.2. Moleküler Testlerde Kullanılan Kimyasallar

Agaroz Jel

RT-PCR sonucu PCR ürünlerinin jelde görüntülenmesi amacıyla yapılan agaroz jel elektroforez için UltraPure TAE Buffer, 10X (Invitrogen, Kat. No: 15558042) ve UltraPure Agarose (Invitrogen, Kat. No: 16500500) kullanıldı.

10X TAE Solüsyonu

Çalışmada kullanılan 10X TAE solüsyonu 400 mM Tris-asetat ve 10mM EDTA içermektedir. pH değeri 8.2 olarak ölçüldü.

Nükleik Asit Boyama Solüsyonu

Çalışmada kullanılan GelGreen® Nucleic Acid Stain 10000X DMSO (Millipore, Kat. No: SCT124) 250-300 nm arasında UV absorbsiyonu yaparak 500 nm'de güçlü bir absorbsiyon pikine ulaşmaktadır.

DNA Yükleme Solüsyonu

Çalışmada kullanılan TriTrack DNA Loading Dye (6X) (Thermo Scientific, Kat. No: R1161) bromfenol mavisi, xtlene cyanol FF ve orange G olmak üzere üç farklı boya içermektedir. Bu boyalar elektroforez sırasında DNA'nın jel içerisinde ilerlemesinin görüntülenmesinde görev almaktadır. İçerisinde bulunan EDTA divalent metal iyonlarını bağlar ve metal bağımlı nükleazları inhibe etmektedir ve 6X konsantrasyonundadır.

DNA Ladder

Çalışmada GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific, Kat. No: SM1331) 75-20000 bp aralığında DNA kullanıldı. Ladder bromfenol mavisi, xtlene cyanol FF ve orange G olmak üzere üç farklı boya ve 15 adet DNA fragmenti içermektedir.

3.1.2.3. Moleküler Testlerde Kullanılan Malzemeler ve Cihazlar

Ekstraksiyon işlemi sonucu elde edilen RNA'ların miktarını ölçmek için NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Kat. No: ND-1000) cihazı kullanıldı. Çalışılan örneklerden elde edilen RNA'lardan cDNA sentez edilmesi, kullanılan primerlerin ve ısı koşullarının optimizasyonu ile RT-PCR aşamaları için SimpliAmp Thermal Cycler (Applied Biosystems, Kat. No: A24811) ve StepOnePlus Real Time PCR System (Applied Biosystems, Kat. No: 4376600) cihazları kullanıldı.

Sekans çalışmaları için yapılan konvansiyonel RT-PCR çalışmaları sonucunda elde edilen PCR ürünlerinin jelde yürütülmesi şeklinde gerçekleştirilen Agaroz Jel Elektroforez çalışmasında yatay jel elektroforez tankı (Cleaver Scientific, Kat. No: MSMIDI), elektroforez işlemi sonucu jel üzerindeki bantların görüntülenmesi için iBright CL1500 Imaging System (Invitrogen, Kat. No: A44114) kullanıldı.

3.1.3. Virus İzolasyonunda ve Titrasyonu için Kullanılan Kimyasallar ve Gereçler

3.1.3.1. Hücre Kültüründe Kullanılan Kimyasallar

Dulbecco's Minimum Essential Medium F-12

DMEM F-12, glukoz, aminoasit ve vitaminlere ek olarak çinko, putresin, hiposkantin ve timidin içeren Ham's F-12 komponentlerini içermektedir. Ek olarak L-glutamin ve indikatör olarak fenol kırmızısı bulundurur. DMEM F-12 içerisinde bulunan sodyum bikarbonat fizyolojik pH'ın temin edilmesinde gerekli olan %5-10'luk CO_2 ortamını da sağlamaktadır. Çalışmada ticari olarak temin edilen DMEM-F12 (Gibco, Kat. No: 11320033) kullanıldı.

Dulbecco's Minimum Essential Medium (DMEM)

Çalışmada kullanılan DMEM (Gibco, Kat. No:11965092) glukoz, L-glutamine ve fenol kırmızısı içermektedir. İçerdiği sodyum bikarbonat (3.9 g/L) ile %5-10'luk CO_2 ortamını sağlamaktadır.

Minimum Essential Medium (MEM)

Çalışmada kullanılan MEM (Gibco, Kat. No: 11090081) L-glutamin içermemektedir. pH indikatörü olarak fenol kırmızı içermektedir. İçerdiği sodyum bikarbonat (2.2 g/L) ile %5-10'luk CO_2 ortamını sağlamaktadır.

L-glutamin

Çalışmada kullanılan L-glutamin (Gibco, Kat. No: 25030081) 200 mM kstok solüsyon halinde bulunmaktadır. pH 5-6 değerlerindedir.

Fetal Sığır Serumu (Fetal Bovine Serum-FBS)

Çalışmada kullanılan FBS (Gibco, Kat. No: 10270-106) büyüme faktörleri içermektedir. Kullanmadan önce 56 °C'de 30 dakika boyunca inaktif edilmiştir.

Antibiyotik Solüsyonu

Çalışmada kullanılan antibiyotik solüsyonu (Gibco, Kat. No: 15140122) 10,000 units/mL penisilin ve 10,000 μg/mL streptomisin kombinasyonundan oluşmaktadır.

Tripsin-EDTA (%0,25) Solüsyonu

Çalışmada kullanılan 2500 mg/L tripsin, 380 mg/L EDTA-4Na $2H_2O$, 10 mg/L fenol kırmızısı ve 1000 mg/L D-glikoz içermektedir (Gibco, Kat. No: 25200).

Dulbecco's Fosfat Tampon Solüsyonu (DPBS)

Çalışmada kullanılan Dulbecco'nun fosfat tampon solüsyonu (Dulbecco's phosphate buffered saline - DPBS) 137.9 mM sodyum klorür, 1.47 mM potasyum fosfat monobazik, 2.67 mM potasyum klorür, 8.09 mM sodyum fosfat dibazik içermektedir (Gibco, Kat. No: 14190).

Taşıma Besiyeri

IDV'nin hücre kültüründe izolasyonu için kullanılacak nazal svab örnekleri %1 penisilin-streptomisin (Gibco, Kat. No: 15140122) içeren DMEM (Gibco, Kat. No: 11965092) içerisinde laboratuvara getirildi.

İnokulum Hazırlama Besiyeri

Sahadan elde edilen örneklerin hücre kültürlerine inokulasyona hazır hale getirilmesi 100 ml DMEM içerisine %1 penisilin-streptomisin çözeltisi (Gibco, Kat. No: 15140122) eklendi.

Hücre Kültürü Besiyeri

Hücre kültürü çalışmalarında DMEM/F12 (Gibco, Kat. No: 11320074) besiyeri kullanıldı. Kullanılacak besiyeri öncelikle tamamlanmış besiyeri (complete medium) haline getirildi. Bu amaçla, 500 ml besiyerine %10 oranında FBS (Gibco, Kat. No: 10270-106) ve antibiyotik solüsyonu olarak %1 oranında penisilin-streptomisin kombinasyonu (Gibco, Kat. No: 15140122) eklendi.

Virus Üretim Besiyeri

İnokulasyon sonrasında virus üretimi için 100 ml MEM (Gibco, Kat. No: 11095080) içerisine %1 L-glutamin (Sigma, Kat. No: G71513) ve %1 penisilin-streptomisin çözeltisi Gibco, Kat. No: 15140122) içeren beisyeri kullanıldı.

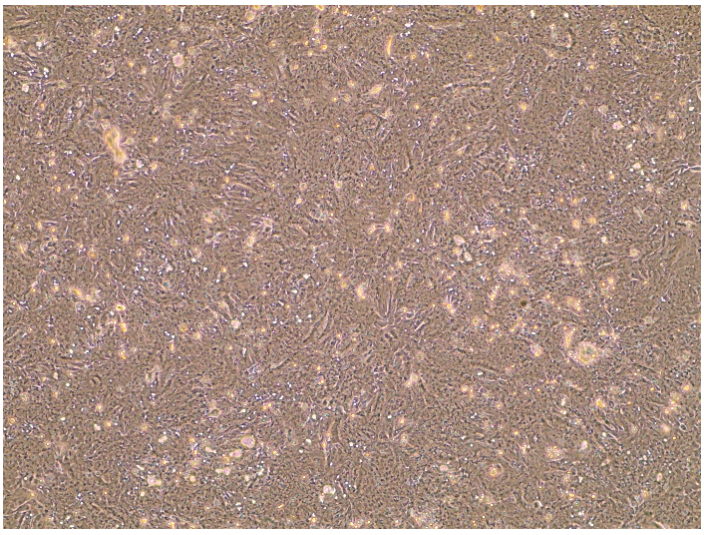
Hücre Dondurma Besiyeri

Çalışmada kullanılan hücrelerin dondurulup saklanması amacıyla %10 dimetil sülfoksit (DMSO) (Bioshop, Kat. No: 0B64749) içeren Hücre Kültürü Besiyeri kullanıldı.

3.1.3.2. Hücre Hattı

Bu çalışmada IDV izolasyonu için kullanılan HRT-18 (Human Rectal Tumor-18) hücre hattı Dr. Mariette Ducatez (École Nationale Vétérinaire de Toulouse, Toulouse, Fransa) tarafından temin edildi (Şekil 3.3).

Hücreler tamamlanmış DMEM/F12 besiyerinde geliştirildi. Bu amaçla, 500 ml DMEM/F12 (Gibco, Kat. No: 11320074) besiyerine %10 oranında FBS (Gibco, Kat. No: 10270106) ve antibiyotik solüsyonu olarak %1 oranında penisilin-streptomisin (Gibco, Kat. No: 15140122) ilave edildi.



Şekil 3.2: HRT-18 hücrelerinin 10X mikroskop objektifinde monolayer görüntüsü

3.1.3.3. Hücre Kültürü Plastik Sarf Malzemeleri

Hücre kültüründe izolasyon için T25 hücre kültürü flaskı (Thermo Fisher Scientific, Kat. No: 156367), T75 hücre kültürü flaskı (Thermo Fisher Scientific, Kat. No: 156472), 24'lü plaka (TPP, Kat. No: Z707791), 5 ml'lik serolojik pipet (İsolab, Kat. No: 083.03.005), 10 ml'lik serolojik pipet (İsolab, Kat. No: 083.03.010) ve 25 ml'lik serolojik pipet (İsolab, Kat. No: 083.03.025) kullanıldı.

3.1.3.4. Hücre Kültürü Çalışmalarında Kullanılan Cihazlar

Ters Işık Mikroskobu (Inverted Mikroskop)

Hücrelerin günlük kontrolü, hücrelerin sayımı, pasajlanması, her pasaj sonrası hücrelerin takibi ve monolayer hücre hattı oluşumunun kontrolü, hücrelere virus inokulasyonu sonrası hücrelerde oluşan değişikliklerin takibi ve CPE izlenmesi amacıyla EVOS XL Core ters ışık mikroskobu (Invitrogen, Kat. No: AMEX1000) kullanıldı.

Karbondioksit (CO_2) İnkübatörü

HRT-18 hücreleri pasajlanarak T25, T75 flasklara ve 24 kuyulu hücre kültürü plakalarına alındı. Hücrelerin in vitro ortamda çoğalarak monolayer hücre kültürünün elde edilmesinde %5 CO_2 içeren 37°C'lik karbondioksit (CO_2) inkübatörü kullanıldı (Memmert, Kat. No: INCO108). Kontaminasyon riskinin önlenmesi amacıyla, inokulasyon için hazır hale gelen (%80-%90 monolayer) T25'lik flasklar ve 24 kuyulu hücre kültürü plakalarındaki hücrelere inokulasyonlar yapıldı ve ardından virusun çoğalması için %5 CO_2 içeren 37°C'lik ikinci bir karbondioksit (CO_2) inkübatör kullanıldı (Sanyo, Kat. No: MCO-5AC).

3.1.3.5. Embriyolu Tavuk Yumurtası Temini ve Kullanılan Gereçler

Çalışmada kullanılan embriyolu tavuk yumurtaları İzmir Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü'nden temin edildi. Embriyolu yumurtaların inkübasyon süreci 33°C ve 37°C olmak üzere iki ayrı sıcaklık değerinde ve %45 nem oranına ayarlı Ova-Easy 100 (Brinsea, Kat. No: MJ1023C) ve Octagon 40 Advance (Brinsea, Kat. No: USAD42C) cihazlarında gerçekleştirildi. Yumurtaların canlılık muayenesi için OvaScope görüntüleme cihazı (Brinsea, Kat. No: USF210) kullanıldı.

3.1.3.6. Hemaglütinasyon Testinde Kullanılan Gereçler

Hemaglütinasyon testi için 96 kuyulu, V tabanlı plakalar (Nest, Kat. No: 701211) kullanıldı. Eritrosit solüsyonu hazırlanması için kullanılacak kan EDTA'lı tüplere (BD Vacutainer, Kat. No: 367863) alındı.

3.1.4. SDS-PAGE Testinde Kullanılan Gereçler

3.1.4.1. SDS-PAGE'te Kullanılan Kimyasallar

29 Acrylamide/1 Bisacrylamid (%30 solüsyon)

SDS-PAGE'te toplayıcı ve ayrıcı jellerin hazırlanmasında kullanılan solüsyon 29:1 oranında Acrylamid/Bisacrylamide içermektedir (Bioshop, Kat. No: ACR009).

Tris-HCl Çözeltisi

SDS-PAGE'te toplayıcı jel için 1.5 M Tris-HCl çözeltisi hazırlandı. Bu amaçla 181,5 gr Tris Base (Bioshop, Kat. No: TRS001.1) ultra saf suda çözündürüldü ve pH değeri HCl (Sigma, Kat. No: 320331) ile 8,8'e ayarlandı. Ayırıcı jel için 1 M Tris HCl çözeltisi hazırlandı. Bu amaçla 121 gr Tris Base (Bioshop, Kat. No: TRS001.1) ultra saf suda çözündürüldü ve pH değeri HCl (Sigma, Kat. No: 320331) ile 6,8'e ayarlandı. TBST solüsyonu için 1M Tris-HCL çözeltisi hazırlandı. Bu amaçka 121 gr Tris Base (Bioshop, Kat. No: TRS001.1) 1lt ultra saf suda çözündürüldü ve pH değeri HCl (Sigma, Kat. No: 320331) ile 7,5'e ayarlandı.

%10 SDS Çözeltisi

SDS-PAGE'te toplayıcı ve ayrıcı jeller için %10'luk SDS çözeltisi hazırlandı. Bunun için 1 g SDS (Sigma, Kat. No: 436143) 10 ml ultra saf suda çözündürüldü.

%10 Amonyum Persülfat Çözeltisi

SDS-PAGE'te toplayıcı ve ayrıcı jeller için %10'luk amonyum persülfat çözeltisi hazırlandı. Bunun için 1 g amonyum persülfat (Sigma, Kat. No: A3678) 10 ml ultra saf suda çözündürüldü.

TEMED

SDS-PAGE'te toplayıcı ve ayrıcı jellerde Acrylamid/Bisacrylamide monomerlerinin polimerizasyonu için TEMED (Bioshop, Kat. No: TEM001) kullanıldı.

Protein Boyama Solüsyonu

SDS-PAGE jelinin boyanması için PageBlue Protein Staining Solution (Thermo Scientific, Kat. No: 24620) kullanıldı.

Tris-Glycine-SDS Solüsyonu

SDS jelin elektroforezi için 10X Tris-Glycine-SDS Buffer (Thermo Scientific, Kat. No: 28262) ultra saf su ile 1X konsantrasyona getirilerek kullanıldı.

Ladder

SDS-PAGE jelinde ladder olarak PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, Kat. No: 26620) kullanıldı. 10-250 kDa aralığında tespit özelliğine sahiptir.

İndirgeme Solüsyonu

Çalışmada kullanılan indirgeme solüsyonu (NuPAGE™ Sample Reducing Agent) (Invitrogen, Kat. No: NP0004) 500 mM konsantrasyonunda dithiothreitol içermektedir.

Örnek Hazırlama Solüsyonu

Çalışmada kullanılan örnek hazırlama solüsyonu (Novex Tris-Glycine SDS Sample Buffer) (Invitrogen, Kat. No: LC2676) hizalama boyası olarak bromophenol blue içermekte ve pH değeri 6.8'dir.

3.1.4.2. SDS-PAGE'te Kullanılan Cihazlar

SDS-PAGE jelinin hazırlanmasında kalıp olarak SureCast Handcast System (Invitrogen, Kat. No: HC1000), jel yükleme haznelerin oluşturulması için SureCast Multi-Use Tool (Invitrogen, Kat. No: HC1010) jel tarağı, jel tankı olarak Mini Gel Tank (Invitrogen, Kat. No: A25977), elektroforez işlemi için PowerPac HC güç kaynağı (Biorad, Kat. No: 1645052) ve jelin boyanmasını takiben çalkalayıcı platformda inkübasyonu için Yellowline çalkalayıcı platform (Ika-Werke, Kat. No: RS10B) kullanıldı. Jelin görüntülenmesi iBright CL1500 Imaging System (Invitrogen, Kat. No: A44114) ile yapıldı.

3.1.5. Serolojik Çalışmalarda Kullanılan Gereçler

3.1.5.1. ELISA'da Kullanılan Kimyasallar

Karbonat-Bikarbonat Tamponu

Tampon hazırlanması için 2,93 g susuz sodyum karbonat (Sigma, Kat. No: 900504-500G) ve 1,59 g sodyum bikarbonat (Sigma, Kat. No: S6014) 1 litre ultra saf su içerisinde çözündürüldü.

Yıkama Solüsyonu

Yıkama solüsyonu için 1 litre PBS (Gibco, Kat. No: 10010023) içerisine 0,5 ml Tween 20 (Bioshop, Kat. No: TWN510.500) eklendi.

Dilüsyon Solüsyonu

Dilüsyon solüsyonu için 1 g yeast extract (Sigma, Kat. No: Y1625-250G) 100 ml yıkama solüsyonu içerisinde çözündürüldü.

Kromojen/Substrat Solüsyonu

OPD (*O*-Phenylenediamine dihydrochloride) tableti (Sigma, Kat. No: P9187) 20 ml ultra saf su içerisinde çözündürüldü.

Durdurma Solüsyonu

Durdurma solüsyonu için 5,6 ml sülfirik asit (%96) (Merck, Kat. No: 100731) 100 ml ultra saf su içerisine eklendi.

Antijen, Monoklonal Antikor, Pozitif ve Negatif Serum

ELISA çalışmasında kullanılan, β-propiolactone (1:2000) ile inkative edilmiş IDV antijeni (D/Swine/Italy/199724-3/2015), konjuge anti-IDV MAb (2E12), pozitif ve negatif kontrol serumları Dr. Ana Moreno'dan temin edildi.

3.1.5.2. Western Blot Testinde Kullanılan Kimyasallar

Yıkama Solüsyonu (TBST)

Western blotting transfer membranı yıkanması için 1 M Tris-HCl hazırlandı. Bu amaçla 121 g Tris Base (Bioshop, Kat. No: TRS001.1), 9 g sodyum klorür (Sigma, Kat. No: 31434) ve Tween 20 (ChemCruz, Kat. No: 29113) 1 lt ultra saf su içerisinde çözündürüldü.

Blocking Solüsyonu

Membrandaki nonspesifik bağlanmaların engellenmesi için 5 g süt tozu (Bioshop, Kat. No: SKI500) 100 ml yıkama solüsyonu içerisinde çözündürüldü.

Antikor Sulandırma Solüsyonu

Primer (1°) ve sekonder (2°) antikorların sulandırma solüsyonu için 1g süt tozu (Bioshop, Kat. No: SKI500) 100 ml yıkama solüsyonu içerisinde çözündürüldü.

Migrasyon Solüsyonu (Tris-Glycine-Methanol /TGM)

SDS jelin elektroforez işleminde western blotting transfer mebranına migrasyonun sağlanması için 3,03 g Tris Base (Bioshop, Kat. No: TRS001.1), 14,4 g Glycine (Bioshop, Kat. No: GLN001.500) ve metanol (Merck, Kat. No: 1.06009) 1lt ultra saf su içerisinde çözündürüldü.

3.1.5.3. Serolojik Testlerde Kullanılan Malzemeler ve Cihazlar

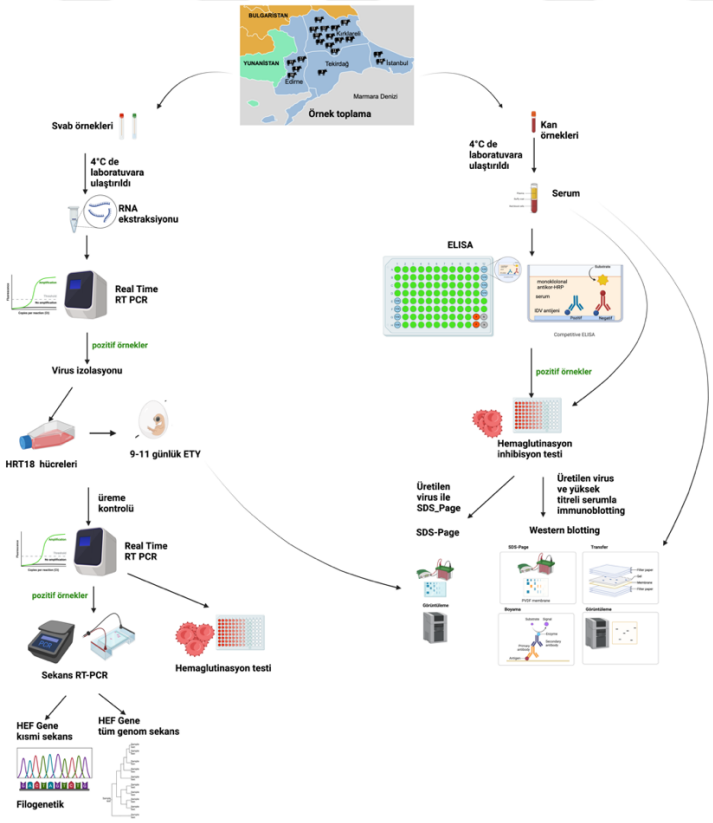
Çalışmada kullanılan serum örnekleri separatör içeren serum tüplerine (BD Vacutainer, Kat. No: 360213) alındı. ELISA uygulamasında 96 hazneli düz tabanlı plakalar (Thermo Scientific, Kat. No: 167008) ve ELISA plakalarının yıkanmasında Tri Continent Scientific StatMatic I (Thermo Scientific, Kat. No: NC0654011) kullanıldı. ELISA plakaların okuması için Spectra Classic ELISA okuma cihazı (SLT Instruments, Kat. No: F039002) ile testin değerlendirilmesi için gerekli olan 490nm ve 650nm optik dansite (OD) değerleri elde edildi. Hemaglutinasyon-inhibisyon testlerinde 96 hazneli V tabanlı plakalar kullanıldı (Wuxi Nest Biotechnology, Kat. No: 701211). Western blotting transfer blot kaseti için Bolt Mini Blot Module (Novex, Kat. No: B1000) ve elektroforez tankı olarak Mini Gel Tank (Invitrogen, Kat.

No: A25977) kullanıldı. Transfer membranı için nitroselüloz membran (Thermo Scientific, Kat. No: 88018) ve filtre kağıdı olarak Whatman (Thermo Scientific, Kat. No: 84783) kullanıldı.

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Çiftlikler ve Örnek Toplanması

Bu çalışmada Marmara Bölgesi'nde, Kırklareli, Tekirdağ, Edirne ve İstanbul'da lokalize olan 19 adet sığır çiftliği 2020, 2021 ve 2024 yıllarında Eylül – Nisan ayları arasında ziyaret edildi. Solunum sistemi belirtisi gösteren 12 aylıktan küçük toplam 279 hayvandan örnekleme yapıldı. Örnek alınan çiftlik bilgileri, hayvanların ırk, yaş, cinsiyet ve klinik belirtileri kaydedildi. Her hayvandan moleküler analizler ve virus izolasyonu için, ikişer adet nazal svab, serolojik testler için kuru tüp içinde kan örneği alındı. Moleküler analizler için alınan svablar RNALater stabilizasyon solüsyonu içerisinde (Invitrogen, Kat. No: AM7020), izolasyon için kullanılacak svablar hücre vasatı içerisinde (Gibco MEM, Kat. No: 11095080) soğuk koşullarda (4-8°C) laboratuvara ulaştırıldı. Örneklerin toplandığı bölgeler, örneklerin işlenmesi ve yöntemler Şekil 3.3.'de sunuldu.



Şekil 3.3: Tez örneklerinin toplandığı bölgeler, işlenmesi ve kullanılan yöntemler (BioRender programı kullanılarak çizildi)

3.2.2. Moleküler Testler

3.2.2.1. RNA Ekstraksiyonu

Moleküler analizler için toplanan nazal svablardan RNA ekstraksiyonu için PureLink RNA Mini Kit kullanıldı ve firma tarafından bildirilen yöntem takip edildi. RNALater solüsyonu (500 µL) içinde toplanan nazal svablar vorteksleme işlemi sonrasında 4°C'de 15 dakika boyunca inkübasyona bırakıldı. Hazırlanan nazal svap örneklerinden 200 µL ekstraksiyonda kullanıldı. Bir mikrosantrifüj tüpüne alınan 200 µL örnek üzerine 400 µL lysis buffer ve 4 µL beta-merkaptoetanol eklendi. Bu karışım vorteksleme ve pipetleme işlemi ile karıştırıldı. Bu aşamadan sonra kitte belirtilen protokol izlendi.

Yapılan bu işlemlerden sonra 50µL RNA ekstraktı elde edildi. Elde edilen RNA ekstraktlarındaki RNA miktarının ölçülmesi için 2 µL RNA alınıp nanodrop spektrofotometre cihazında ölçüldü. Ekstraksiyon sonucu elde edilen RNA'lar cDNA sentezi yapılana kadar kısa süreli olarak 4°C de uzun süreli olarak da -80°C'de depolandı.

3.2.2.2. RNA Ekstraksiyonun Değerlendirilmesi

Analiz için toplanan örneklerde kullanılan RNA ekstraksiyon kitinin örnekler için uygunluğunun değerlendirilmesi amacıyla iki aşamadan oluşan bir çalışma planlandı.

RNA Konsantrasyonu

Svab örneklerinden elde edilen ekstraktlardan tesadüfü olarak 6 adet ekstrakt seçildi. Tüm ekstraktların konsantrasyonu ve saflıkları nanodrop ile ölçüldü ve A260/A280 oranları ve RNA miktarları kaydedildi. Saflık değerinin 2.0 ve miktarının 100ng altında kalan örnekler belirlendi.

RNA Saflığı Çalışması ve RNA Ekstraksiyon Kontrolü

PCR aşaması için izole edilen RNA'nın saflığının belirlenebilmesi ve negatif örneklerde RNA izole edilip edilemediğinin kontrolü amacıyla beta aktin analiz SYBR-Green real time RT-PCR metodu ile çalışıldı (Seçkin ve diğ., 2018) (Tablo 3.3)

Tablo 3.3: Beta aktin PCR karışımı bileşenleri ve konsantrasyonları

Bileşen	Başlangıç Konsantrasyonu	Son konsantrasyon	Hacim (µl)
Maxima Probe/ROX qPCR Master Mix (2X)	1X	1X	12,5
Beta aktin-Forward Primer	10µM	400nM	1
Beta aktin-Reverse Primer	10µM	400nM	1
SYBR-Green			0,5
$MgCl_2$			0,25
Nükleaz İçermeyen Su			6,75
cDNA			3
Toplam			25

Elde edilen karışım 95°C'de 10 dakika takiben 45 siklus 95°C'de 15 saniye, 63°C'de 15 saniye ve 72°C'de 15 saniye olmak üzere programlanan PCR cihazına konuldu. Sonrasında melting curve 60°C - 99°C, her 10 saniyede 1°C artışla oluşturuldu. Çalışma sonuçları değerlendirme kriterleri olarak; kalibrasyon eğrisinin eğiminin -3,6 ile -3,1 arasında olması, linear regresyon değerinin 0.98 den büyük olması ve delta Ct değerinin 0,5'in altında olması yönünde değerlendirildi. Elde edilen sonuçlara göre PCR analizinde negatif olan örneklerde beta aktin analiz yapılarak RNA ekstraksiyonu sonucunda PCR için gerekli miktar ve kalitede ürün elde edilip edilmediği kontrol edildi.

cDNA Sentezi

Ekstrakte edilen RNA örneklerinden cDNA elde edilmesi amacıyla High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems-Thermo Fisher) kullanıldı. Bu amaçla 0.2 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine, 2µL 10X RT Buffer, 2µL 10X RT random primerler, 0.8µL 25X dNTP Mix (100 mM), 1µL multiscribe reverse transcriptase (50U/µL) ve 4.2µL nükleaz içermeyen su eklendi. Bu karışım üzerine 10 µL RNA ekstraktı ilave edildi. Elde edilen karışım 25°C'de 10 dakika, 37°C'de 2 saat ve 85°C'de 5 dakika olmak üzere programlanan PCR cihazına konuldu. Son ürün RT-PCR için kullanılmak üzere kısa süreli olarak 4°C ve uzun süreli olarak -20°C de saklandı.

Real time RT-PCR

Real time RT-PCR çalışması Faccini ve diğ. (2017) tarafından bildirilen primlerler ve yönteme göre yapıldı. PCR karışımı, 12,5µl FluoCycle II Probe Master Mix (Euroclone, Kat. No: ERD001100BIM), 0,75µl IDV F primeri (10µM), 0,75µl IDV R primeri (10µM), 0,625µl

IDV Probe (10µM) ve 5,375µl nükleaz içermeyen su olmak üzere toplam 20µl olacak şekilde hazırlandı. Daha sonra tüplere dağıtılan PCR karşımı üzerine 5µl cDNA eklendi (Tablo 3.4).

Tablo 3.4: Real time RT-PCR karışımı bileşenleri ve konsantrasyonları

Bileşen	Başlangıç Konsantrasyonu	Son Konsantrasyon	Hacim (µl)
FluoCycle II™ Probe Master Mix	2X	1X	12,5
IDV-Forward Primer	10µM	300nM	0,75
IDV-Reverse Primer	10µM	300nM	0,75
IDV Prob	10µM	250nM	0,625
Nükleaz İçermeyen Su			5,375
cDNA			5
Toplam			**25**

Elde edilen karışım DNA polimeraz enziminin aktivasyonu amacıyla 95°C'de 5 dakikayı takiben, toplam 45 siklus olacak şekilde 95°C'de 15 saniye denatürasyon aşaması ve 60°C'de 1 dakika bağlanma aşaması olacak şekilde real time RT-PCR cihazına konuldu.

3.2.2.3. Sekans Çalışmaları için RT-PCR

Sekans analizi amacıyla IDV'nin HEF geni hedef alındı. Zhai ve diğ. (2017) bildirdiği HEF-F ile HEF-R primerleri yanında tüm HEF geninin sekanslanabilmesi için ve çalışmada tasarlanan Konsensus Primer 1F, 2R, 5F, 6R, 7F ve 8R primerleri kullandı. Adı geçen primerler kullanılarak, Zhai ve diğerlerinin (2017) bildirdiği yönteme göre RT-PCR yapıldı. Bu amaçla 12,5µl Platinum™ Hot Start PCR Master Mix (2X) (Invitrogen™, Kat. No: 13000012), 0,5µl forward primer (10µM), 0,5µl reverse primer (10µM), 5µl GC Enhancer, 1,5µl nükleaz içermeyen su ve 5µL cDNA olmak üzere toplam 25µl'lik PCR karışımı hazırlandı (Tablo 3.5).

Tablo 3.5: Sekans RT-PCR karışımı bileşenleri ve konsantrasyonları

Bileşen	Başlangıç Konsantrasyonu	Son Konsantrasyon	Hacim (µl)
Platinum™ Hot Start PCR Master Mix	2X	1X	12,5
IDV-Forward Primer	10µM	200nM	0,5
IDV-Reverse Primer	10µM	200nM	0,5
GC Enhancer	5X		5
Nükleaz İçermeyen Su			1,5
cDNA			5
Toplam			25

Elde edilen karışım DNA polimeraz enziminin aktivasyonu için 95ºC'de 5 dakika, daha sonrasında ise 35 siklus olacak şekilde denatürasyon için 95ºC'de 30 saniye, bağlanma için 55ºC'de 30 saniye, uzama için 72ºC'de 30 saniye ve ek olarak 35 siklusun sonunda ek uzama için 72ºC'de 10 dakika olmak üzere programlanan PCR cihazına konuldu. Yapılan RT-PCR çalışmalarında, pozitif kontrol ve nükleaz içermeyen su negatif kontrol olarak kullanıldı.

3.2.2.4. Horizontal Jel Elektroforez

RT-PCR sonrası çoğaltılan DNA'ların görüntülenebilmesi için agaroz jel hazırlandı. Bu amaçla %1,5 agaroz jel hazırlamak için 50ml 1X TAE buffer ve 0,75g agaroz, 250ml'lik shot şişe içerisinde karıştırıldı ve agaroz partikülleri tamamen eriyene kadar mikrodalgada kaynatıldı. Daha sonra sıvı halde olan jel, soğuması için 5 dakika bekletildi ve 2.5µl GelGreen® Nucleic Acid Stain 10000X DMSO (Millipore, Kat. No: SCT124) ilave edilerek jel elektroforez tankına döküldü ve katılaşıp donması için oda ısısında bekletildi.

Jelin donmasının ardından yükleme tarağı çıkarılarak 1µl TriTrack DNA Loading Dye (6X) (Thermo Scientific, Kat. No: R1161) ve 5µl DNA karıştırılarak jele yüklendi. PCR ürünü büyüklüğünün saptanması için ilk kuyuya 2,5µl GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific, Kat. No: SM1331) eklendi. Jel yüklemesi tamamlandıktan sonra 30 dakika boyunca 100 volt elektrik akımında elektroforez gerçekleştirildi. Elektroforez işlemi sonunda jel üzerindeki bantların görüntülenmesi için iBright™ CL1500 Imaging System (Invitrogen, Kat. No: A44114) kullanıldı. Güçlü bantlara sahip örneklerin RT-PCR ürünleri sekans analizi için ticari firmaya (MedSanTek) gönderildi.

3.2.2.5. Filogenetik Analizler ve Soyağacı Oluşturulması

RT-PCR sonucu çoğaltılan HEF geni dizilimleri ile soyağacı oluşturulması için reverse ve forward sanger dizilerinin uçlarındaki düşük kaliteli olan kısımlar kesildi ve forward ve reverse diziler Chromas Pro (Technelysium Sürüm 2.1.10.1) programı ile birleştirildi. Nucleotide Blast ve GenBank kullanılarak geno-gruplandırma yapabilmek için pozitif örnek sekansları fasta formunda toplandıktan sonra tüm diziler MAFFT (https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/ Sürüm 7) ile hizalanıp, MegAlign Pro (DNASTAR-Sürüm 17.6) ile Maximum Likelihood, RAxML metodu ve Bootstrap 1000 replikasyon kullanılarak filogenetik ağaç oluşturuldu. Filogenetik ağaçta kullanılan referans genler için Ducatez ve diğ. (2015) ile Yılmaz ve diğ. (2020), Yu ve diğ. (2024) tarafından bildirilen yöntemlerden yararlanıldı.

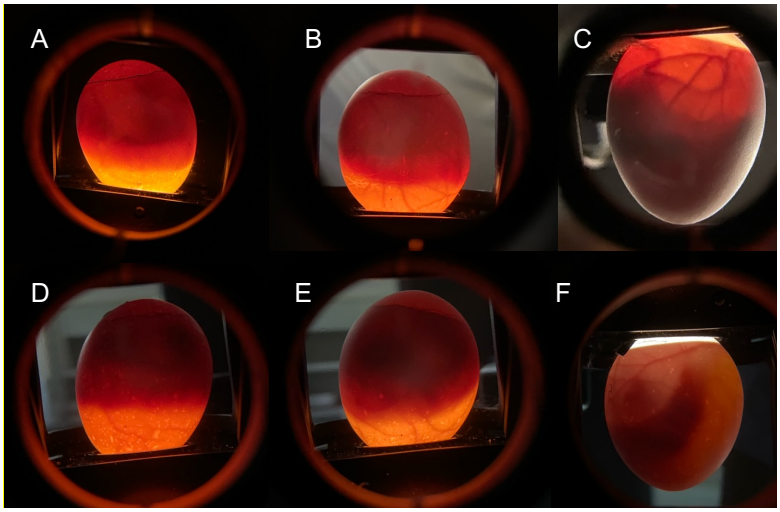
3.2.3. Hücre Kültüründe Virus İzolasyonu

IDV izolasyonu amacıyla Dr. Mariette Ducatez (École Nationale Vétérinaire de Toulouse, Toulouse, Fransa) tarafından temin edilen HRT-18 (Human Rectal Tumor-18) hücreleri kullanıldı. Hücreler pasajlandıktan sonra günlük olarak ters ışık mikroskobu altında izlendi ve hücreler %80-90 yoğunlukta monolayer olana kadar inkübasyona devam edildi. Monolayer olan ve pasajlanmaya hazır hale gelen hücrelerden 24'lü hücre kültürü plakalarına tekrar pasaj yapıldı.

Real time RT-PCR ile IDV yönünden pozitif bulunan 2202-15, 5950, 403-10, 5882, 2202-4 kodlu nazal svab örneklerinden yapılan virus izolasyon çalışmalarında 7 günlük periyotlarla toplam 4 pasaj yapıldı. İnokulasyon için 24'lü plakadaki supernatant alındı ve hücreler 500µL DPBS ile yıkandı. Yıkama sonrası haznelere 200µL virus eklendi. Plakalar 37°C'de %5 CO_2 değerlerine ayarlı etüvde 1 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında hücreler üzerindeki virus alındı ve hücreler üzerine 1ml virus üretim besiyeri eklendi. Plakalar bahsedilen değerlere ayarlı inkübatörde 7 gün boyunca inkübasyona bırakıldı. Hücrelerdeki değişim günlük olarak ters ışık mikroskobu altında incelendi.

3.2.4. Embriyolu Tavuk Yumurtasında Virus İzolasyonu

Embriyolu tavuk yumurtalarının 10. gününde 2202-4, 5882, 5950 ve 403-10 hücre kültüründeki son pasaj hücre sıvılarında 1:10 ve 2202-15 için 1:10 ve 1:100 dilüsyonlar halinde hazırlandı. İnokulasyon bölgesi %70 etanol çözeltisiyle dezenfekte edildi ve hazırlanan dilüsyonlardan embriyolu yumurtalarının allantoik boşluğuna 100µL inokulasyon yapıldı. Her örnek için 3 yumurta kullanıldı ve yumurtaların 2 tanesi 33°C'ye, 1 tanesi 37°C'ye kaldırıldı. Yumurtalar 13. gün sonunda 4°C'ye kaldırıldı ve sonraki gün hava keselerinin bulunduğu bölgeden açılarak allantoik sıvılar toplandı. Toplanan sıvılar 4°C'de 3000 rpm'de 20 dakika boyunca santrifüj edildi ve supernatant 0.45µm'lik filtrelerden geçirildikten sonra bir adet 1ml vial 4°C'ye kalan vialler -80°C'ye kaldırıldı.



Şekil 3.4: Embriyolu yumurtaların farklı günlerdeki gelişimleri (A: 8. gün, B: 10. gün (inokülasyon yapıldı), C: 11. gün, D: 12. gün, E: 13. gün, F: 14. gün sabahı 4°C den alınmış yumurta)

3.2.5. Viral Proteinlerin Ayrıştırılması

İzole edilen viruslardan yüksek HA ünitesi olan 2202-15'in viral proteinleri SDS-PAGE ile ayrıştırılarak incelendi.

3.2.5.1. Sodium Dodecyl Sulfate–Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-Page)

SDS-Page için öncelikle %10'luk ayırıcı (resolving) ve toplayıcı (stacking) jeller hazırlandı. Ayırıcı jel için 4 ml distile su, 3.3 ml akrilamid solüsyonu (%30), 2.5 ml Tris (1.5 M, pH: 8.8), 100µl SDS (%10), 100µl amonyum persülfat (%10) ve 10µl TEMED karıştırıldı ve cam plakalara yüklendi. Üzerine 1ml isopropanol konularak jelin donması beklendi. Donduktan sonra isopropanol filtre kağıdı ile uzaklaştırıldıktan sonra toplayıcı jel 2.1 µl distile su, 500µl akrilamid solüsyonu (%30), 380µl Tris (1.0 M, pH: 6.8), 30µl SDS (%10), 30µl amonyum persülfat (%10) ve 3µl TEMED karıştırılarak hazırlandı. Ayırıcı jel üzerine taraklar yerleştirildi ve toplayıcı jel döküldü. Toplayıcı jel donduktan sonra cam plaklar yürütme tankının içine yerleştirildi ve 1X Tris-Glycine SDS buffer ile tank doldurulduktan sonra taraklar çıkarıldı.

Jele yüklenecek örnekler için Tablo 3.6'da verilen oranlarda karışımlar hazırlandı ve jele yüklendi. İlk kuyuya 5µl PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder yüklendi. Örneklerin konulduğu tüm karışımlar Novex Tris-Glycine SDS Sample Buffer (Invitrogen, Kat. No: LC2676) içerisinde hazırlandı. İkinci kuyuya yüklenen örneğe herhangi bir ön işlem yapılmadı. Üçüncü kuyuya yüklenen örneğe10 µg/ml TPCK Trypsin (Sigma, Kat. No: T1426) eklendi ve 1 saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Beşinci kuyudaki örneğe 2,5 µl NuPAGE Sample

Reducing Agent (Invitrogen, Kat. No: NP0009) eklendi. Dördüncü ve beşinci kuyulara yüklenen örnekler 95 °C'de 5 dakika inkübasyona bırakıldı.

Tablo 3.6: SDS-PAGE jele yüklenen örnek karışımı bileşenleri

Karışım	1. kuyu	2. kuyu	3. kuyu	4.kuyu	5. kuyu
	µl	µl	µl	µl	µl
Ladder	5				
Tris-Glycine SDS Sample Buffer (2X)		15	15	15	12.5
NuPAGE Sample Reducing Agent (10X)					2.5
#2202_15 IDV izolat		10 (=51,2HAU)	10 (=51,2HAU)	10 (=51,2HAU)	10 (=51,2HAU)
Uygulanan ön işlem		Ön işlem yapılmadı	10µg/ml tripsin ile 1 saat inkübasyon	95°C de 5 dakika	95°C de 5 dakika

Güç kaynağı çalıştırıldı ve toplayıcı jel boyunca 80V/cm, ayırıcı jel için 150V/cm olacak şekilde voltaj ayarlandı. Yürütme işlemi bromfenol mavisi jelin alt kısmına gelene kadar devam edildi. Jel kaseti çıkarıldıktan sonra kurutma kâğıdı üzerine koyuldu ve iki cam tabakayı ayırarak jel çıkartıldı. Toplayıcı jel kısmı uzaklaştırıldı. Jel içinde Coomasie Brillant Blue bulunan kaba konuldu ve bir gece boyunca çalkalayıcı bir platformda bekletildi. Ertesi gün jel, boya solüsyonundan çıkarıldı, distile su ile 3-5 kez yıkandı ve bantlar iBright CL1500 Imaging System (Invitrogen, Kat. No: A44114) kullanılarak görüntülendi.

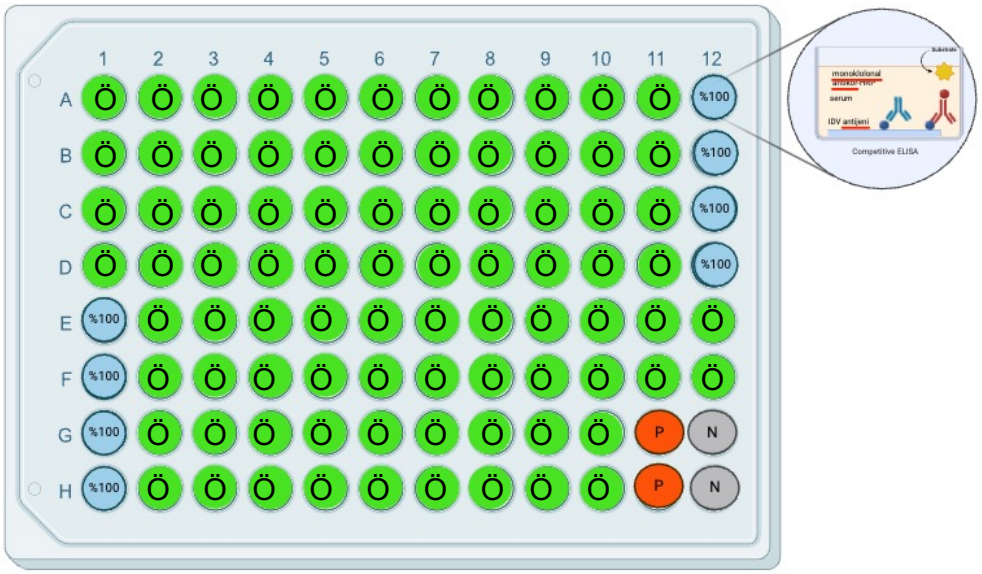
3.2.6. Serolojik Çalışmalar

3.2.6.1. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

ELISA çalışmasında, Moreno ve diğ., (2019) belirttiği şekilde, IDV'ye spesifik anti-IDV monoklonal antikorları (MAb) kullanılarak, yarışmalı ELISA temeline dayanan ve IDV ile infekte hayvan serumlarında antikorları tespit etmeyi amaçlayan bir test kullanıldı. Bu amaçla saflaştırılmış inaktif IDV antijeni ile plakalar kaplandı. Dilüe edilmiş serumlar antijen ile inkübasyona bırakıldı ve bu şekilde varsa spesifik antikorların antijene bağlanması için ortam yaratıldı. Sonrasında peroksidaz ile konjuge haldeki anti-IDV MAb ortama eklendi ve pozitif olgularda daha önce virusa bağlanmış pozitif serumun antikorları tarafından inhibe

edilmesi beklenirken; negatif olgularda konjuge MAb'lerin IDV inative antijenine bağlanması beklendi. İnkübasyon sonrası serbest konjugat, yıkama aşamaları ve substrat/kromojen ile ortamdan uzaklaştırıldı. Konjuge MAb'lerin virusa bağlandığı ve test serumu negatif durumda kolorimetrik bir reaksiyonun meydana gelmesi beklenirken, pozitif test serumda renk reaksiyonu inhibe edildiği için kolorimetrik bir değişim oluşumu gözlenmedi.

Plakanın antijenle kaplanması aşaması için dilüsyon faktörü 1:80 oranında olan IDV antijeni için hesaplama yapıldı. Bir plaka için 5 ml karbonat-bikarbonat tamponu içerisine 62,5µl antijen eklendi. Hazırlanan antijen karışımı plakanın her kuyusuna 50µl olacak şekilde konuldu. Plaka 1 gece boyunca 4°C bekletildi. Ertesi gün plaka kuyu başına 200µl yıkama solüsyonu ile üç kez yıkandı. Yıkanan plaka kuyularına 50µl 1:20 oranında dilüe edilen serumlar eklendi. Plakadaki E1, F1, G1, H1 ile A12, B12, C12, D12 kuyularına serum eklenmedi ve kontrol olarak kullanıldı. Plakadaki G11 ve H11 kuyularına sırasıyla pozitif kontrol serumunun 1:20 dilüsyonu ve G12 ve H12 kuyularına sırasıyla negatif kontrol serumunun 1:20 dilüsyonu eklendi. (Şekil 3.5).



Şekil 3.5: ELISA plakasında örneklerin dizilimi (Ö: örnek, P: Pozitif Kontrol, N: Negatif Kontrol, %100: %100 Kontrol) (Şekil Biorender uygulaması ile oluşturulmuştur.)

Plaka 37°C'de 1 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun son 10 dakikasında konjugat hazırlandı. Bu amaçla bir plaka için 5 ml dilüsyon solüsyonu içerisinde dilüsyon faktörü 1:800 olan konjuge anti-IDV MAb'ten 6,25µl eklendi. İnkübasyon bittikten sonra plaka kuyu başına 200µl yıkama solüsyonu ile üç kez yıkandı. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra tüm kuyulara 50µl konjugat solüsyonu eklendi. Plaka 37°C'de 1 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun son 10 dakikasında substrat hazırlandı. Bu amaçla OPD tabletleri

demineralize su içerisinde çözündürüldü. İnkübasyon bittikten plaka kuyu başına 200µl yıkama solüsyonu ile üç kez yıkandı. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra her kuyuya 50µl olacak şekilde substrat eklendi. Plaka 10 dakika boyunca karanlık ortamda oda sıcaklığında bekletildi. Sonrasında her kuyuya 50µl stop solüsyonu (2M H_2SO_4) eklendi ve spektrofotometrede 490 nm'de okuma yapıldı. Kontrol amacıyla 650 nm kullanıldı.

Test sonuçlarının değerlendirilmesi aşağıdaki formüle göre yapıldı:

% inhibisyon = 100 – (serum OD 490-OD650 / %100 kontrol OD490 - OD650) x 100

Spektrofotometre okuması sonrasında testin validasyonu için %100 kontrol kuyularında OD değeri ≥ 1 olması dikkate alındı. İnhibisyon değeri ≥ % 80 olan test serumları pozitif olarak kabul edildi.

3.2.6.2. Hemaglutinasyon ve Hemaglutinasyon İnhibisyon Testi

Hemaglutinasyon ve Hemaglutinasyon İnhibisyon (HI) testlerinde kullanılmak üzere 5 ml tavuk kanı alındı. EDTA'lı tüpe alınan kanın öncelikle yıkaması yapıldı. Alınan kan steril 15ml'lik falkon tüpüne aktarıldı ve 4°C'de 1500 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında supernatant atıldı ve tüpteki kanın üzerine 10 ml PBS eklendi. Tüp 3-4 kez alt üst etme şeklinde yavaşça karıştırılarak tekrar 4°C'de 1500 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Bu işlem 3 kez tekrarlandı. Son santrifüj aşaması 1800 rpm'de 10 dakika boyunca devam ettirildi. Santrifüj sonrası supernatant atıldı ve PBS ile stok %10'luk kan solüsyonu hazırlandı. Çalışmada stok kan solüsyonunda PBS ile %1'lik çalışma solüsyonu hazırlanarak kullanıldı.

Hemaglutinasyon testi için plakadaki A1, B1 kuyularına 50µl virus (2202-15) eklendi. Plakadaki F1, E1 kuyularına 50µl PBS eklendi, kontrol olarak kullanılacak sıra bu şekilde oluşturuldu. A2'den A12'ye kadar ve B2'den B12'ye kadar her kuyuya 25µl PBS eklendi. A1 ve B1'den 25µl virus alındı ve ardışık olarak 2 katlı dilüsyonlar yapıldı. En son sırada dilüsyon yapıldıktan sonra 25µl alınarak atıldı. Her kuyuya 25µl kan solüsyonu eklendi ve 30 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Eritrositler tamamen çöktükten sonra okuma yapıldı. Plaka yere dik bir açıyla tutularak çöken eritrositlerin akması beklendi. Hemaglutinasyon titresi, RBC'lerin tamamen aglutine olduğu dilüsyon olarak kabul edildi. Bu titre dilüsyonun HA/50µl tiresi olarak kaydedildi.

HI testi için öncelikle 1-12 arasında tüm kuyulara 25µl PBS eklendi. Plakadaki A1, B1, C1, D1, E1, F1, G1 kuyularına 25µl serum eklendi. A1, B1, C1, D1, E1, F1, G1 kuyularında 25µl serum alındı ve G2, F2, E2, D2, C2, B2 ve A2 kuyularına eklendi. Bu şekilde G12, F12,

E12, D12, C12, B12 ve A12 kuyularına kadar 2 katlı seri dilüsyon yapıldı. H sırası negatif kontrol serumu için ayrıldı ve bu serumunda aynı şekilde 2 katlı seri dilüsyonları yapıldı. Tüm kuyulara 4HA/25µl olarak şekilde dilüe edilen virus (2202-15) dilüsyonundan 25µl eklendi ve 30 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında tüm kuyulara 25µl eritrosit solüsyonu eklendi ve 30 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası değerlendirme yapıldı.

3.2.6.3. Western Blotting

ELISA testi ile yüksek titrede pozitiflik saptanan serum (403-11) ile bu proteinlere karşı oluşan immun yanıt ve yanıtın hangi kDa viral proteine karşı oluştuğu immunoblotting ile incelendi. Bu amaçla, viral proteinler nitroselülöz membrana aktarılarak sığır serumu ile inkübe edildi. Daha sonra membran anti-sığır IgG ile muamele edilerek, reaksiyon konjugat ve substrat ilavesi ile görünür hale getirildi. Bu çalışmada Mahmood ve Yang (2012) tarafından kullanılan yöntemlerden yararlanıldı. Kısaca SDS-Page başlığında anlatıldığı şekilde jel hazırlandı.

Tablo 3.7: Western blot için hazırlanan SDS jelin düzeni ve uygulamalar

	1	2	3
	L	32 HAU	18 HAU
Ladder	5		
Tris-Glycine SDS Sample Buffer		20 µl	20 µl
NuPAGE Sample Reducing Agent		4 µl	4 µl
2202-15		7 µl	3.5 µl
H2O		9 µl	12.5 µl
Toplam		40 µl	40 µl
	95 °C'de 5 dakika inkübasyon		
Primer antikor 1° serum	403-11 serum 1:100 dilüsyon		
Anti bovine 2° IgG-HRP	1:2000 dilüsyon		

Proteinlerin jelde yürütülmesi tamamlandıktan sonra kasetten çıkarılan jel TGM solüsyonu içerisinde 15 dakika bekletildi. Jel boyutunda kesilen nitroselüloz membran ultra saf su içerisinde 2 dakika şartlandırıldıktan sonra TGM solüsyonu içerisinde dengelenmesi için 10 dakika bırakıldı. İki adet Whatman filtre kağıdı ve transfer blot kaseti pad'leri TGM solüsyonu içerisinde ıslatıldı. Bekleme süreleri tamamlandıktan sonra transfer blot kasetinin negatif katotuna ait parçanın üzerine sırasıyla pad, Whatman filtre kağıdı, SDS jel, transfer membran, Whatman filtre kağıdı ve pad konulduktan sonra roller yardımıyla bu katmanların üzerinden 3

kez geçilerek hava kabarcıkları uzaklaştırıldı. Son olarak pozitif katotun bulunduğu parça bu katmanların üzerine kapatıldı. Elektroforez tankına TGM solüsyonu eklendi. Transfer blot kaseti tank içerisine yerleştirildi ve 20V'ta 60 dakika boyunca blotting işlemi gerçekleştirildi. Blotting işlemi tamamlandıktan sonra transfer blot kaseti açıldı ve membran kaset içerisinden çıkarılarak 20 ml blocking buffer içerisinde 1 gece boyunca 4°C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası primer antikor (1°) solüsyonu hazırlandı. Primer antikor solüsyonu 403-11 nolu serum örneğinden dilüsyon faktörü 1:100 olacak şekilde antikor sulandırma solüsyonu kullanılarak 20 ml hazırlandı. İnkübasyonu biten membran TBST ile bir kez yıkandı ve hazırlanan primer antikor solüsyonu içerisinde 1 saat, oda sıcaklığında çalkalayıcı platform üzerinde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında membran 6 kez 5'er dakikalık aralarla TBST ile yıkandı. Sekonder antikor solüsyonu için Goat anti-Bovine IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP (Invitrogen, Kat. No: A18751) kullanıldı. Dilüsyon faktörü 1:2000 olacak şekilde antikor sulandırma solüsyonu kullanılarak 20 ml sekonder antikor solüsyonu hazırlandı ve membran bu solüsyon içerisinde 1 saat, oda sıcaklığında çalkalayıcı platform üzerinde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası membran 6 kez 5'er dakikalık aralarla TBST ile yıkandı. Substrat için SuperSignal West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, Kat. No: 34579) kullanıldı. Yıkama işlemleri sonrasında membran 5 dakika boyunca oda sıcaklığında substrat içerisinde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası kemilüminesans görüntüleme iBright CL1500 Imaging System (Invitrogen, Kat. No: A44114) kullanılarak yapıldı.

3.2.7. İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler GaphPad Prism 10 yazılımı kullanılarak yapıldı. Sığırların demografik verileri ve IDV seropozitif oranları ile görülen semptomların IDV seropozitif ve seronegatif sığırların oranlarını karşılaştırmak için Fisher's exact testi kullanıldı.

4. BULGULAR

4.1. KLİNİK BULGULAR

Bu çalışmada incelenen örneklere ait çiftlik bilgileri, örnek alınan hayvanlarla ile ilgili bilgiler ve klinik bulgular Tablo 4.1'de verildi. İncelenen 279 adet hayvanda klinik bulgu olarak solunum güçlüğü, burun akıntısı, öksürük, halsizlik ve ateş gibi belirtilerden bir veya birkaç tanesinin bulunduğu gözlendi (Tablo 4.1).

Tablo 4.1: Çalışmada kullanılan örneklere ait çiftlik ve hayvan bilgileri

					Örnek Türü		**Klinik Bulgular**				
Örnek Alma Tarihi	**Örnek Alınan Yer**	**Yaş Grubu**	**İşletme Tipi**	**Yetiştirme Tipi**	**Kan**	**Nazal Svab**	**Solunum Güçlüğü**	**Burun Akıntısı**	**Öksürük**	**Halsizlik**	**Ateş**
13.02.2020	İstanbul	6-12 ay	Küçük aile işletmesi	N/A	13	13	13	13	13	13	0
4.03.2020	Kırklareli	3-6 ay	Küçük aile işletmesi	N/A	12	12	12	12	12	12	0
13.01.2021	Tekirdağ	3-6 ay	Küçük aile işletmesi	Sütçü/Etçi	17	17	17	17	17	17	17
14.01.2021	Kırklareli	0-3 ay	Entegre	Sütçü/Etçi	9	9	0	9	9	9	0
26.01.2021	Kırklareli	3-6 ay	Entegre	Sütçü/Etçi	40	40	40	40	40	40	0
5.02.2021	Kırklareli	3-6 ay	Entegre	Sütçü/Etçi	18	18	18	18	18	18	0
10.02.2021	Edirne	0-3 ay	Küçük aile işletmesi	Sütçü/Etçi	15	15	0	15	15	15	0
22.02.2021	Kırklareli	3-6 ay	Entegre	Sütçü/Etçi	23	23	23	23	23	23	0
23.02.2021	Kırklareli	6-12 ay	Küçük aile işletmesi	Etçi	3	3	3	3	3	3	0
24.02.2021	Kırklareli	3-6 ay	Entegre	Sütçü/Etçi	12	12	12	12	12	12	0
9.03.2021	Kırklareli	3-6 ay	Entegre	Sütçü	14	14	14	14	14	14	0
18.03.2021	Kırklareli	3-6 ay	Entegre	Sütçü/Etçi	9	9	9	9	9	9	0
2.04.2021	Kırklareli	3-6 ay	Entegre	Sütçü/Etçi	20	20	20	20	20	20	0
7.04.2021	İstanbul	6-12 ay	Küçük aile işletmesi	Sütçü/Etçi	7	7	0	0	7	0	7
19.04.2021	Edirne	6-12 ay	Küçük aile işletmesi	N/A	10	10	0	10	10	10	0
4.11.2021	Edirne	3-6 ay	Küçük aile işletmesi	N/A	6	6	0	6	6	6	0
17.12.2021	Edirne	3-6 ay	Küçük aile işletmesi	N/A	11	11	0	11	11	11	0
7.03.2021	Kırklareli	0-3 ay	Entegre	Sütçü	20	20	0	20	10	20	10
21.09.2024	Kırklareli	0-12 ay	Entegre	Sütçü	20	20	0	20	0	20	0
					279	**279**					
					TOPLAM						

4.2. RNA EKSTRAKSİYONUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ

4.2.1. RNA Konsantrasyonu

Tez örneklerinde matriks etkisinin belirlenebilmesi için tesadüfü seçilen 6 adet örnekte RNA ekstraksiyonu sonrasında RNA konsantrasyonları ölçüldü (Tablo 4.2). Svab örneklerinde 1.51 ile 2.27 arasında A_{260}/A_{280} RNA saflık oranı tespit edildi. Bu nedenle saflık oranı 2,0 'den düşük olan ve 100 ng/µl altında tüm örneklerde beta aktin geni (housekeeping gene) SYBR-Green real time RT-PCR metodu ile IDV PCR'ı öncesinde veya paralelinde, ekstraksiyon etkinliğinin kontrolü için analiz edildi (Tablo 4.2).

Tablo 4.2: Ekstraksiyon etkinliğinde kullanılan örneklerin RNA miktar ve saflıkları (NS: Nazal svab)

Örnek Türü	RNA Saflık Oranı A_{260}/A_{280} Oranı	RNA Miktarı (ng/µl)
2601-2 NS	1,51	24.,5
1712-2 NS	2,27	330,9
1712-3 NS	2,03	353,44
411-3 NS	1,7	9,22
411-2 NS	1,85	14,4
1712-5 NS	2,16	415,06

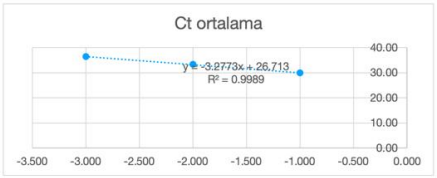
4.2.2. RNA Saflığı Çalışması

RNA saflığı çalışmasında nazal svab örneklerinden birinde 10 katlı dilüsyonlar yapılarak, beta aktin SYBR-Green real time RT-PCR ile analiz edildi ve kalibrasyon eğrisi çizildi. Eğrinin eğimi, kesimi ve regresyon katsayısı hesaplandı. Eğim -3,277 olarak ve R2 değeri 0,999 olarak elde edildi. Değerlendirme kriteri olan Extrapo-Ct değeri limit değeri 0,5'in altında -0,488 olarak hesaplandı (Şekil 4.1, Şekil 4.2).

Kıyaslama Kriterleri

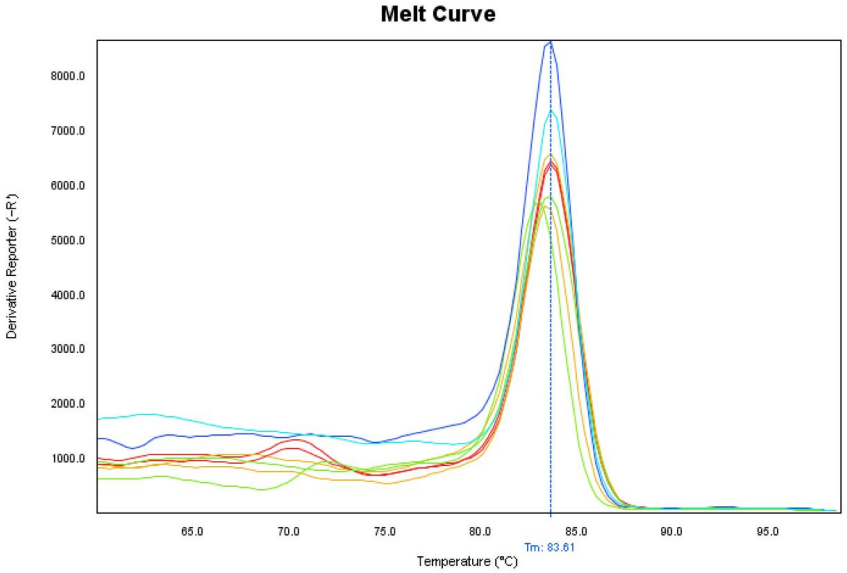
1. Elde edilen kalibrasyon eğrisinin eğim değeri -3.6 ile -3.1 arasında olmalıdır. (1,9-2,1)
2. Kalibrasyon doğrusundan elde edilen linear regresyon (R^2) değeri ≥0.98 olmalıdır.
3. Çalışma solusyonuna ait beklenen Ct değeri ile elde edilen Ct değeri arasındaki fark 0.5 in altında olmalıdır.

Dilution Factor	Measured Ct	Ct ortalama	Δ Ct	Beklenen Δ Ct	Log	Ct ortalama
1.0E-01	29.9305	29.93	3.70	3.32	-1.000	29.93
	29.9221					
1.0E-02	33.3373	33.39	3.47	3.32	-2.000	33.39
	33.4509					
1.0E-03	35.9966	36.4808	3.09	3.32	-3.000	36.48
	36.965					



	Measured Ct	Ct ortalama	Extrapol Ct	Extrapo-Ct	
Direk	26.3048	26.22435	26.712567	0.488	OK
Direk	26.1439				
Slope	-3.277				
R^2	0.999				

Şekil 4.1: RNA saflık çalışması verileri ve hesabı



Experiment: Beta Actin IDV

Experiment Results Report

Applied Biosystems
StepOnePlus™ Instrument

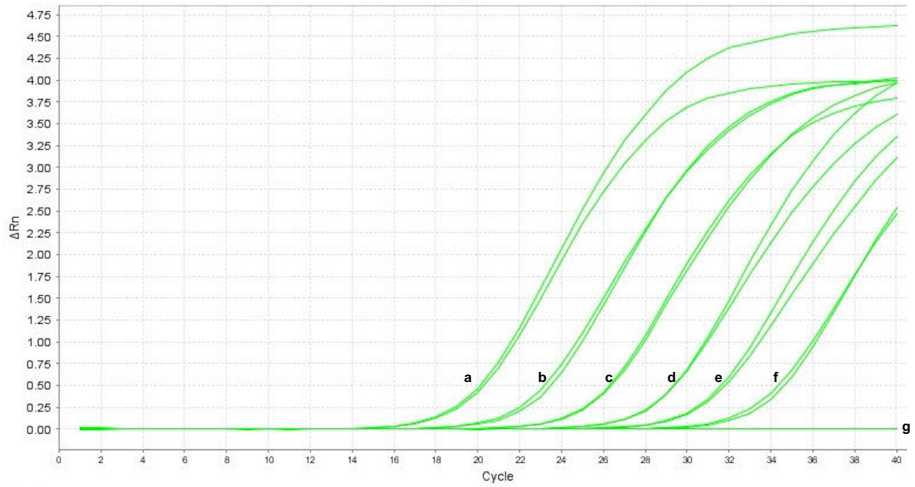
Results Table

Well	Sample	Target	Task	Quantity	Cт	Tm1	Tm2	Tm3
A1	D 1	Beta Actin	UNKNOWN		26.3048	83.6096		
A2	D 2	Beta Actin	UNKNOWN		26.1439	83.6096		
B1	-1 1	Beta Actin	UNKNOWN		29.9305	83.4602		
B2	-1 2	Beta Actin	UNKNOWN		29.9221	83.6096		
C1	-2 1	Beta Actin	UNKNOWN		33.3373	83.012		
C2	-2 2	Beta Actin	UNKNOWN		33.4509	83.4602		
E1	-3 1	Beta Actin	UNKNOWN		35.9966	83.6096		
F2	-3 2	Beta Actin	UNKNOWN		36.9650	83.4602		

Şekil 4.2: RNA saflık çalışması real time RT-PCR amplifikasyon eğrileri ve meting curve

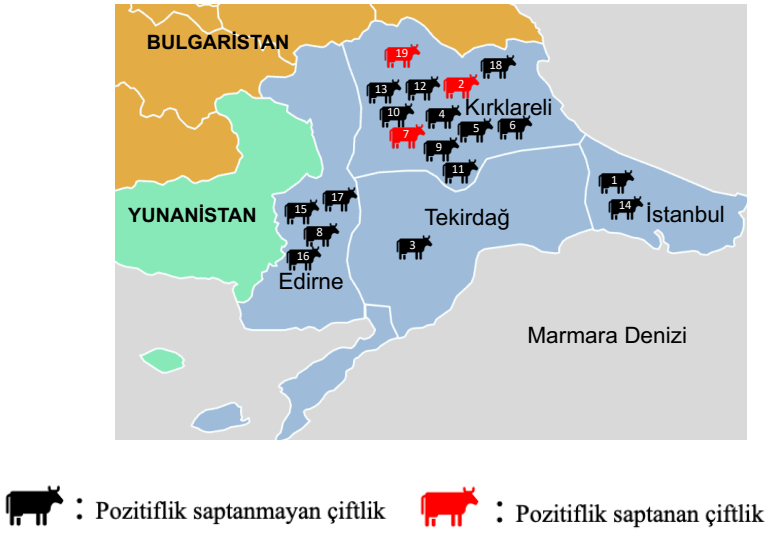
4.3. REAL TİME RT-PCR BULGULARI

Çalışmada kullanılan real time RT-PCR metodunu etkinliğinin kontrolü için pozitif kontrolün 10 katlı dilüsyonları hazırlandı. Direkt, 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4} ve 10^{-5} olmak üzere hazırlanan dilüsyonlar real time RT-PCR ile analiz edildi. Çalışmalar sonucunda dilüsyonlar arasında beklenen 3 log'luk azalma gözlendi (Şekil 4.3).

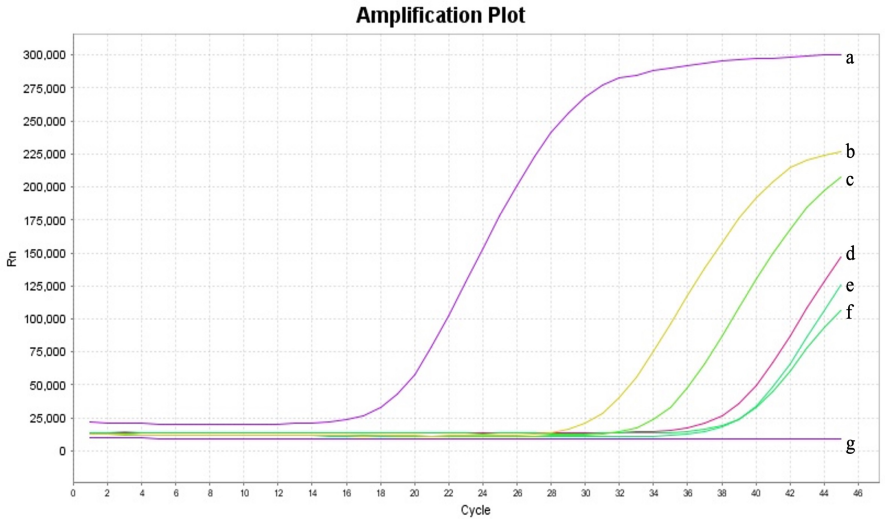


Şekil 4.3: Pozitif kontrolün 10 katlı dilüsyonu (a: Direkt, b: 10^{-1}dilüsyon, c: 10^{-2} dilüsyon, d: 10^{-3} dilüsyon, e: 10^{-4}dilüsyon, f: 10^{-5} dilüsyon, g: Negatif kontrol)

Bu çalışmada 279 nazal svab örneğinden yapılan real time RT-PCR sonucunda toplam 5 örnek IDV yönünden pozitif bulundu. Pozitiflik saptanan örneklerin tamamı Kırklareli bölgesinden lokalize olan çiftliklerden alındığı tespit edildi (Şekil 4.5). Bu örneklerin 3 farklı çiftlikten köken aldığı görüldü. Bu çiftliklerden bir tanesi küçük aile çiftliği olup diğer iki çiftlik entegre çiftliklerdir. 2020 yılında küçük aile işletmesinden alınan örneğin ait olduğu hayvanın <6 aylık yaşta olduğu ve solunum güçlüğü, burun akıntısı, öksürük ve halsizlik semptomları gösterdiği tespit edildi. 2021 yılında entegre çiftlikten alınan örneklerin ait olduğu hayvanlar <6 aylık yaşta, sütçü tipte olup hayvanların solunum güçlüğü, burun akıntısı, öksürük ve halsizlik semptomları gösterdiği tespit edildi. 2024 yılında entegre çiftlikten alınan örneklerin ait olduğu hayvanlar ise 6-12 aylık yaşta, etçi tipte olup hayvanlarda ise sadece ateş semptomunun belirgin olduğu tespit edildi. Pozitif örneklerin Ct değerleri 25-34 arasında değişiklik gösterdi (Şekil 4.4).



Şekil 4.4: Trakya bölgesinden toplanan örneklerin ve pozitiflik görülen çiftliklerin sayısı ve coğrafik dağılımı

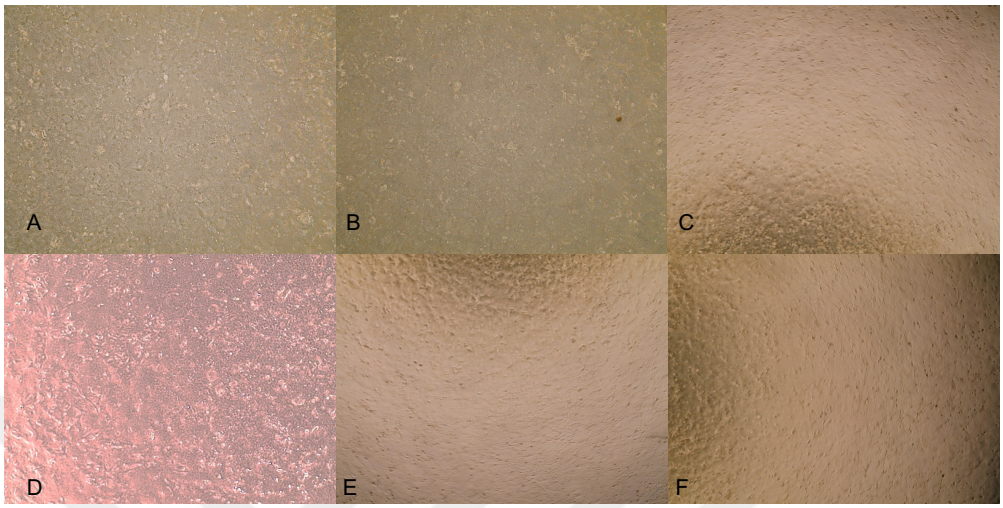


Şekil 4.5: Real time RT-PCR ile pozitif saptanan örnekler (a: Pozitif kontrol, b: 5882-2 kodlu örnek c: 5950-1 kodlu örnek, d: 403-10 kodlu örnek, e: 2202-15 kodlu örnek, f: 2202-4 kodlu örnek, g: negatif kontrol).

4.4. VİRUS İZOLASYONU

Real time RT-PCR ile pozitif bulunan Ct değerleri sırasıyla 25,34, 28,64, 33,39, 33,80, 34,30 olan 2202-15, 5950-1, 403-10, 5882-1, 2202-4 kodlu ve besiyeri içerisinde alınan svab örneklerinden hücre kültüründe yapılan virus izolasyonu çalışmalarında her yeni pasaja geçmeden önce hücre sıvılarından Real time RT-PCR analizi yapılarak virus varlığı kontrol edildi. Örneklerin 2202-4 nolu olanı haricindeki tüm örneklerde her yeni pasajda bir öncekinden

daha düşük Ct değeri tespit edildi. Bu pasajlarda örneklerde ve negatif kontrol kuyularında CPE gözlenmedi (Şekil 4.6, Tablo 4.3). Hücre kültüründe virus izolasyon sonuçlarına göre 5 örnekten 4 virus (403-10, 2202-15, 5950-1 ve 5882-2) izole edildi.



Şekil 4.6: Hücre kültüründe virus izolasyonu yapılan örneklerin ışık mikroskobu altındaki 4X objektifte görüntüleri (A: 403-10, B: 2202-15, C: 5950-1, D: 5882-2, E: 2202-4, F: Hücre kontrol)

Tablo 4.3: Pasajlama sonrası yapılan real time RT-PCR'ın her pasaj için Ct değerleri

Örnek Kodu	Yıl	Pasaj 1	Pasaj 2	Pasaj 3	Pasaj 4
403-10	2020	Ct yok	34,37	33,4	30,3
2202-4	2021	Ct yok	Ct yok	Ct yok	Ct yok
2202-15	2021	31,23	18,28	15,84	11,76
5950-1	2024	34,78	31,62	30,77	25,24
5882-2	2024	30,98	35,96	33,67	26,21

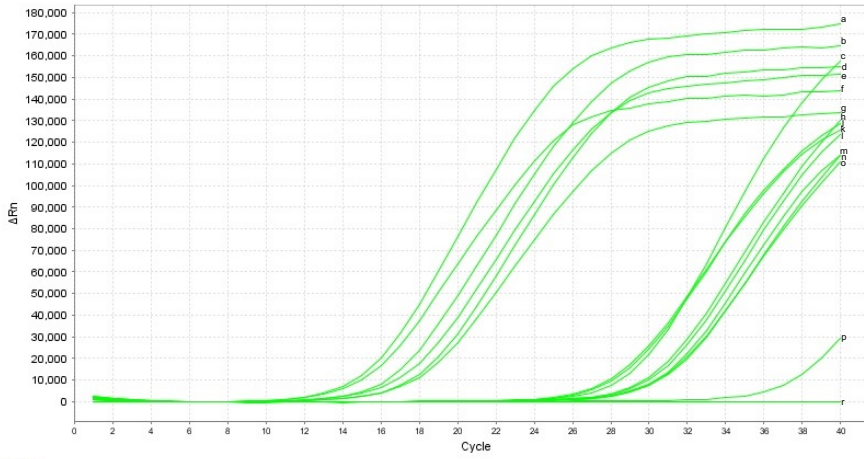
4.5. EMBRİYOLU TAVUK YUMURTASINA İNOKULASYON BULGULARI

Hücre kültüründe üretimi yapılamayan bir örnek ve hücre kültüründe üretilen 4 örneğin embriyolu tavuk yumurtasında da daha fazla üretilip üremeyeceğinin belirlenmesi amacıyla 10 günlük embriyolu tavuk yumurtalarına hücre kültüründeki son pasaj hücre sıvılarından ekimler yapıldı.



Şekil 4.7: Embriyolu yumurtalardan allontoik sıvının toplanması (A: Hava kesesinden açılan yumurta ve yumurta membranı, B: Yumurta membranın altındaki allantoik sıvı, C: Allantoik sıvının drenajı)

Ekimler sonunda allantoik sıvıları toplandıktan sonra bu sıvılardan hemaglutinasyon testi ve real time RT-PCR yapıldı. İnkübe edilen (33°C ve 37°C) yumurtalardan real time RT PCR sonucunda elde edilen Ct değerleri Tablo 4.4'da verildi. Bu verilere göre; 2202-4 örneğinde 33°C ve 37°C'de inkübasyonu sonucu alınan allantoik sıvıda 37°C de 7.51 değerinde daha düşük bir Ct farkı tespit edildi. Aynı şekilde 2202-15 örneğinin 1:10 dilüsyonunda ve 5950-1 örneğinde sırasıyla 0,29 ve 0,18 değeri daha düşük Ct tespit edildi. Tam tersi olarak 2202-15 örneğinin 1:100 dilüsyonu, 5882-2 ve 403-10 örneklerinde ise 33°C'de sırasıyla 12,19, 2,43 ve 1,88 değerinde daha düşük Ct değerleri elde edildi. ETY'da virusların üretilmesi sonucunda 2202-4 nolu örneğin 4. pasaj hücre sıvısından yapılan ekimde virus üretimi real time RT-PCR ile teyit edildi. Elde edilen veriler her iki yöntemle de virusların üretimi yapılabildiğini ancak herhangi bir yöntemin üstülüğünü göstermedi (Şekil 4.8).



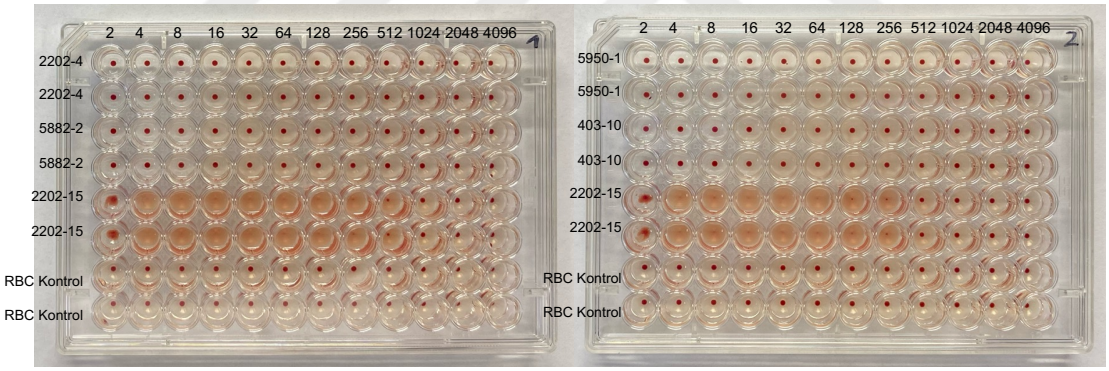
Şekil 4.8: Real time RT-PCR sonrası allantoik sıvıların amplifikasyon eğrileri (a: pozitif kontrol, b: 2202-15 1:10 (37°C), c: 2202-15 1:100 (33°C), d: 2202-15 1:100 (37°C) e: Pozitif Kontrol, f: 2202-15 1:10 (33°C), g: Pozitif Kontrol, h: 403-10 (37°C), j: 5882-2 (33°C), k: 403-10 (33°C), l: 2202-4 (37°C), m: 5950-1 (37°C), n: 5950-1 (33°C), o: 5882-2 (37°C), p: 2202-4 (33°C), r: Negatif Kontrol)

Tablo 4.4: Allantoik sıvılardan yapılan real time RT-PCR sonucu sıcaklıklara göre Ct değerleri

Örnek Kodu	Yıl	İnkübasyon Sıcaklığı ve Ct Değeri	
		33°C	37°C
403-10	2020	27,39	29,27
2202-4	2021	36,98	29,47
2202-15 1:10	2021	14,45	14,16
2202-15 1:100		15,83	28,02
5882-2	2024	27,55	29,98
5950-1	2024	30,03	29,85

4.6. HEMAGLUTİNASYON TESTİ BULGULARI

Toplanan allantoik sıvılar ile hemaglutinasyon testi yapıldı. Sadece 2202-15 nolu örnekte 256 HAU/50µl değerinde hemaglütinasyon gözlendi. Diğer örneklerde hemaglutinasyon gözlenmedi (Şekil 4.9).

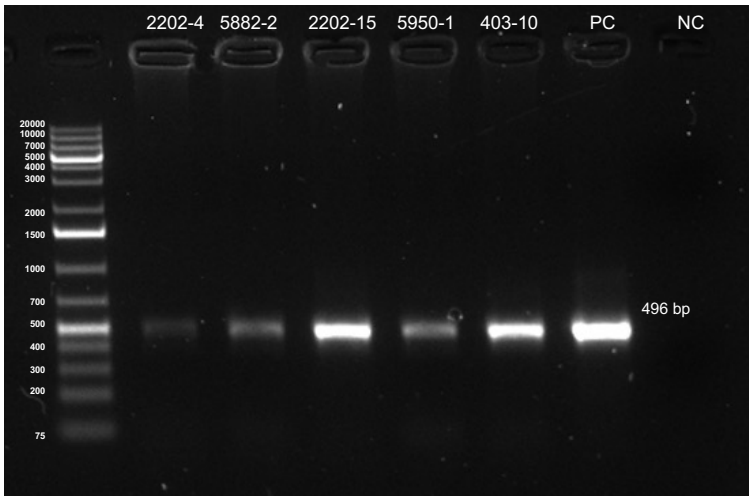


Şekil 4.9: Allantoik sıvılardan yapılan hemaglutinasyon sonuçları

4.7. SEKANS VE FİLOGENETİK ANALİZLER

4.7.1. Kısmi HEF Geni Sekansı

Virus izolasyonunu takiben HEF genin kısmi sekanslanması amacıyla izole edilen viruslardan 2202-4 toplanan allantoik sıvıdan diğer viruslar 4. pasaj hücre sıvısından, RNA ekstraksiyonu sonrasında yapılan RT-PCR çalışmaları ile 403-10, 2202-4, 2202-15, 5950-1, 5882-2 nolu örneklerde 496 bp hizasında bant görüntülendi (Şekil 4.10).

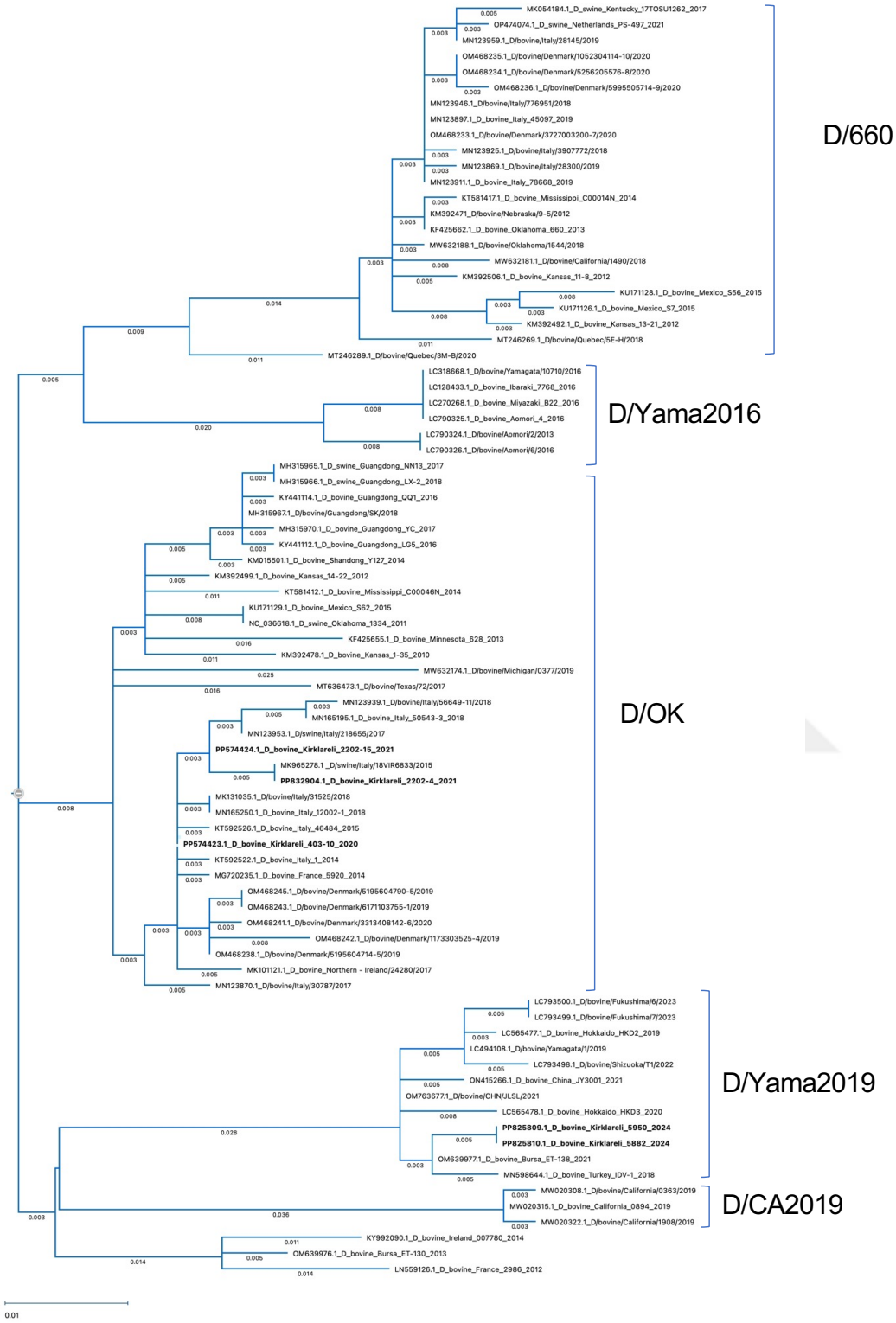


Şekil 4.10: 4. pasaj sonrasında yapılan RT-PCR sonrasında jel yüklenen ürünlerin UV ışını altındaki görüntüsü (PC: Pozitif Kontrol, NC: Negatif Kontrol)

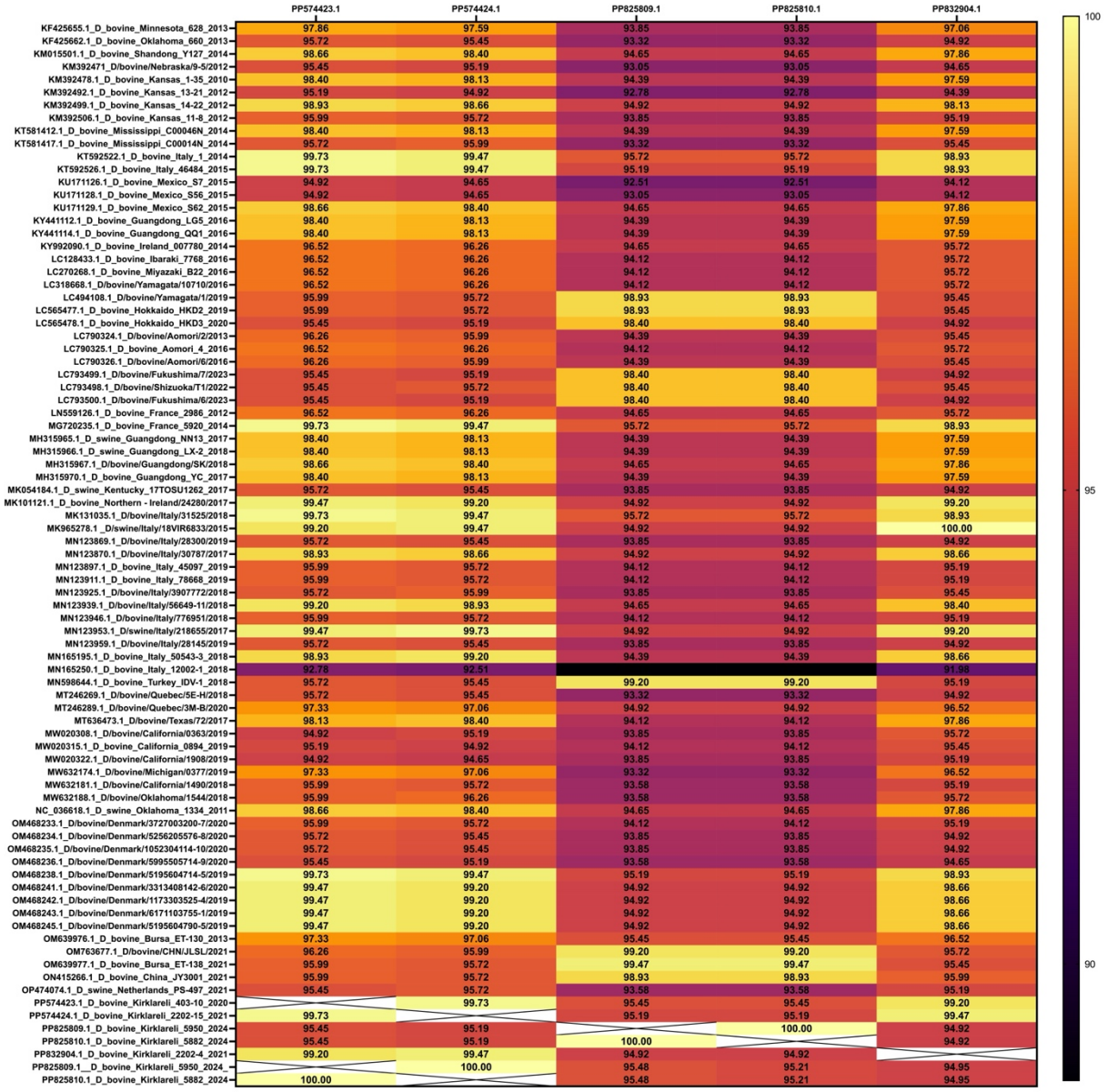
Sanger dizilerinin uçlarındaki düşük kaliteli olan kısımlar kesildikten sonra Chromas Pro (Technelysium Sürüm 2.1.10.1) programı ile birleştirildi. Elde edilen dizilerin GenBankasına girişi yapıldı ve erişim (accesion) numaraları alındı. (Tablo 4.3) Tüm diziler MAFFT (https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/ Sürüm 7) ile hizalanıp, MegAlign Pro (DNASTAR- Sürüm 17.6) ile Maximum Likelihood, RAxML metodu ve Bootstrap 1000 replikasyon kullanılarak filogenetik ağaç oluşturuldu (Şekil 4.11).

Tablo 4.5: GenBank'a bildirilen örneklerin kodu, türü, alındıkları şehir, yıl ve GenBank erişim numaraları

Örnek Kodu	Örnek Türü	Örneğin Alındığı Şehir	Örneğin Alındığı Yıl	GenBank Erişim Numarası
403-10	Nazal Svab	Kırklareli	2020	PP574423.1
2202-15	Nazal Svab	Kırklareli	2021	PP574424.1
2202-4	Nazal Svab	Kırklareli	2021	PP832904.1
5882-2	Nazal Svab	Kırklareli	2024	PP825810.1
5950-1	Nazal Svab	Kırklareli	2024	PP825809.1



Şekil 4.11: Kısmi HEF geni sekans analizi sonucunda GenBank'a girişi yapılan sekansların filogenetik ağaçtaki yerleşimi



Şekil 4.12: Kısmi HEF geni sekans analizi sonucunda GenBank'a giriş yapılan sekansların diğer araştırmacılar tarafından bildirilen sekanslarla yakınlıklarını gösteren heatmap

Elde edilen sekans verilerine göre bu tez çalışmasında pozitif bulunan 403-10 kodlu örnek (GenBank Erişim Numarası: PP574423.1) en yüksek benzerliği %99.73 oranıyla İtalya (GenBank Erişim Numarası: KT592522.1, KT592526.1, MK131035.1) Fransa (GenBank Erişim Numarası: MG720235.1), Danimarka (GenBank Erişim Numarası: OM468238.1); %99.47 - %99.20 oranları ile İrlanda (GenBank Erişim Numarası: MK101121.1), İtalya (GenBank Erişim Numarası: MN123953.1, MK965278.1, MN123939.1), Danimarka (GenBank Erişim Numarası: OM468241.1, OM468242.1, OM468243.1, OM468245.1); %98.93 - %98.13 oranları ile İtalya (GenBank Erişim Numarası: MN123870.1, MN165195.1), Çin (GenBank Erişim Numarası: KM015501, MH315967.1, KY441112.1, KY441114.1, MH315965.1, MH315966.1, MH315970.1), Amerika Birleşik Devletleri (GenBank Erişim Numarası: KM392499.1, NC036618, KT581412.1, MT636473.1), Meksika (GenBank Erişim Numarası: KU171129.1), %97.33 ile Türkiye (GenBank Erişim Numarası: OM639976.1), Amerika Birleşik Devletleri (GenBank Erişim Numarası: KF425655.1, MW632174.1), Kanada (GenBank Erişim Numarası: MT246289.1); %96.52 - %96.26 oranları ile İrlanda (GenBank Erişim Numarası: KY992090.1), Japonya (GenBank Erişim Numarası: LC128433.1, LC270268.1, LC318668.1, LC790324.1, LC7790325.1, LC790326.1), Fransa (GenBank Erişim Numarası: LN559126.1), Çin (GenBank Erişim Numarası: OM763677.1); %95.99 – 95.19 oranları ile Türkiye (GenBank Erişim Numarası: MN598644.1, OM639977.1), İtalya (GenBank Erişim Numarası: MN123897.1, MN123911.1, MN123946.1, MN123869.1, MN123959.1, MN123959.1), Japonya (GenBank Erişim Numarası: LC494108.1, LC565477.1, LC565478.1, LC565499.1, LC793498.1, LC793500.1), Amerika Birleşik Devletleri (GenBank Erişim Numarası: MW632181.1, MW632188.1, MK054184.1, KT581417.1, KM392471.1, KM392492.1, MW020315.1), Danimarka (GenBank Erişim Numarası: OM468233.1, OM468234.1, OM468235.1, OM436236.1), Hollanda (GenBank Erişim Numarası: OP474074.1), Kanada (GenBank Erişim Numarası: MT246269.1); %94.92 oranında Meksika (GenBank Erişim Numarası: KU171126.1, KU171128.1), Amerika Birleşik Devletleri (GenBank Erişim Numarası: MW020308.1, MW020322.1) ve %92.78 ile (GenBank Erişim Numarası: MN165250.1) ile gösterdi.

2202-15 kodlu örnek (GenBank Erişim Numarası: PP574424.1) en yüksek benzerliği %99.73 oranıyla İtalya (GenBank Erişim Numarası: MN123953.1); %99.47 - %99.20 oranları ile İrlanda (GenBank Erişim Numarası: MK101121.1), İtalya (GenBank Erişim Numarası:KT592526.1, MK965278.1, MN165195.1), Danimarka (GenBank Erişim Numarası: OM468241.1, OM468242.1, OM468243.1, OM468245.1, OM468238.1), Fransa (GenBank

Erişim Numarası: MG720235.1); %98.93 - %98.13 oranları ile İtalya (GenBank Erişim Numarası: MN123939.1, MN123870.1), Amerika Birleşik Devletleri (GenBank Erişim Numarası: KM392499.1, NC036618.1, KM392478.1, KM392478.1, KT581412.1), Çin (GenBank Erişim Numarası: KM015501, MH315967.1, KY441112.1, KY441114.1, MH315965.1, MH315966.1, MH315970.1); %97.59 – 97.06 ile Türkiye (GenBank Erişim Numarası: OM639976.1), Amerika Birleşik Devletleri (GenBank Erişim Numarası: KF425655.1, MW632174.1), Kanada (GenBank Erişim Numarası: MT246289.1); %96.26 oranında İrlanda (GenBank Erişim Numarası: KY992090.1), Japonya (GenBank Erişim Numarası: LC128433.1, LC270268.1, LC318668.1, LC790324.1), Fransa (GenBank Erişim Numarası: LN559126.1), Amerika Birleşik Devletleri (GenBank Erişim Numarası: MW123925.1); %95.99 – 95.19 oranları ile Türkiye (GenBank Erişim Numarası: MN598644.1, OM639977.1), Japonya (GenBank Erişim Numarası: LC790324.1, LC790326.1, LC494108.1, LC565477.1, LC565478.1, LC565499.1, LC793498.1, LC793500.1), Amerika Birleşik Devletleri Amerika Birleşik Devletleri (GenBank Erişim Numarası: MW632181.1, MW632188.1, MK054184.1, KT581417.1, KM392471.1, KT581417.1), Danimarka (GenBank Erişim Numarası: OM468233.1, OM468234.1, OM468235.1, OM436236.1), Hollanda (GenBank Erişim Numarası: OP474074.1), Kanada (GenBank Erişim Numarası: MT246269.1); %94.92 – 94.65 ile Amerika Birleşik Devletleri (GenBank Erişim Numarası: KM392492.1, MW020315.1), Meksika (GenBank Erişim Numarası: KU171126.1, KU171128.1) ve %92.51 ile (GenBank Erişim Numarası: MN165250.1) ile gösterdi.

2202-4 kodlu örnek (GenBank Erişim Numarası: PP832904.1) en yüksek benzerliği %100 oranında İtalya (GenBank Erişim Numarası: MK965278.1); %99.20 oranında İtalya (GenBank Erişim Numarası: MN123953.1) ve İrlanda (GenBank Erişim Numarası: MK101121.1); %98.93 – 98.13 oranlarında Danimarka (GenBank Erişim Numarası: OM468241.1, OM468242.1, OM468243.1, OM468245.1, OM468238.1), Fransa (GenBank Erişim Numarası: MG720235.1), İtalya (GenBank Erişim Numarası: KT592522.1, MK131035.1, KT592526.1, MN123870.1, MN165195.1, MN123939.1), Amerika Birleşik Devletleri (GenBank Erişim Numarası: KM392499.1); %97.86 – 97.06 oranları ile Çin (GenBank Erişim Numarası: KM015501.1, KY441112.1, KY441114.1, MH315965.1, MH315966.1, MH315970.1), Meksika (GenBank Erişim Numarası: KU171129.1), Amerika Birleşik Devletleri (GenBank Erişim Numarası: MT636473.1, NC036618.1, MT392478.1, KF425655.1); %96.52 oranında Türkiye (GenBank Erişim Numarası: OM639976.1), Kanada (GenBank Erişim Numarası: MT246289.1), Amerika Birleşik Devletleri (GenBank Erişim

Numarası: MW632174.1); %95.99 – 95.19 oranları ile Türkiye (GenBank Erişim Numarası: MN598644.1, OM639977.1), Japonya (GenBank Erişim Numarası: LC128433.1, LC270268.1, LC318668.1, LC790325.1, LC494108.1, LC565477.1, LC793498.1, LC790324.1, LC790326.1), Amerika Birleşik Devletleri (GenBank Erişim Numarası: MW020308.1, MW632188.1, MW020315.1, MW020322.1, MW632181.1), İtalya (GenBank Erişim Numarası: MN123925.1, MN123897.1, MN123946.1), Danimarka (GenBank Erişim Numarası: OM468233.1), Hollanda (GenBank Erişim Numarası: OP474074.1); %94.92 – 94.12 oranları ile Japonya (GenBank Erişim Numarası: LC565478.1, LC793499.1, LC793500.1), Amerika Birleşik Devletleri (GenBank Erişim Numarası: MK054184.1, KF425662.1, KM392492.1, KM392492.1), İtalya (GenBank Erişim Numarası: MN123869.1, MN123959.1), Danimarka (GenBank Erişim Numarası: OM468234.1, OM468235.1, OM468236.1), Kanada Amerika Birleşik Devletleri (GenBank Erişim Numarası: MT246269.1), Meksika (GenBank Erişim Numarası: KU171128.1, KU171126.1) ve %91.98 oranında İtalya (GenBank Erişim Numarası: MN165250.1) ile gösterdi.

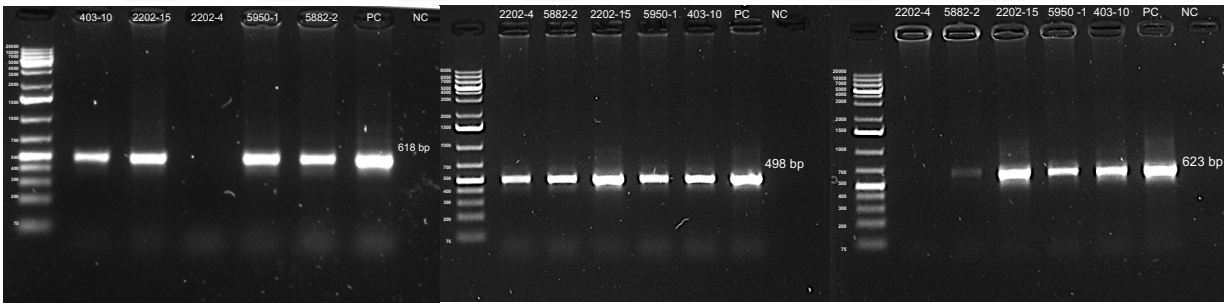
5950-1 kodlu ve 5882-2 kodlu örnekler (GenBank Erişim Numarası: PP825810.1 ve PP825809.1) en yüksek benzerliği %99.47 – 99.20 oranları ile Türkiye (GenBank Erişim Numarası: MN598644.1, OM763677.1); %98.93 – 98.40 ile Çin (GenBank Erişim Numarası: OM763677.1), Japonya (GenBank Erişim Numarası: LC565477.1, LC494108.1, LC793500.1, LC793499.1, LC793498.1 ve LC565478.1), %95.72 – 95.19 oranları ile Türkiye (GenBank Erişim Numarası: OM399976.1), İtalya (GenBank Erişim Numarası: MK131035.1, KT574526.1, KT592522.1), Fransa (GenBank Erişim Numarası: MG720235.1), Danimarka (GenBank Erişim Numarası: OM468238.1); %94.92 – 94.12 oranları ile İrlanda (GenBank Erişim Numarası:MK101121.1, KY992090.1), İtalya (GenBank Erişim Numarası: MN123953.1, MN123870.1, KT592533.1, MN123939.1), Danimarka (GenBank Erişim Numarası: OM468245.1, OM468243.1, OM468242.1 ve OM468241.1), Amerika Birleşik Devletleri (GenBank Erişim Numarası: KM392499.1, NC036618.1), Kanada (GenBank Erişim Numarası: MT246289.1), Çin (GenBank Erişim Numarası: KM015501.1, MH315967.1, MH315970.1, KY441112.1, KY441114.1, MH315966.1 ve MH315965.1), Fransa (GenBank Erişim Numarası: LN559126.1), Meksika (GenBank Erişim Numarası: KU171129.1), Japonya (GenBank Erişim Numarası: LC790324.1, LC790326.1, LC790325.1, LC318668.1, LC128433.1 ve LC 270268.1); %93.85 – 93.05 oranları ile Amerika Birleşik Devletleri (GenBank Erişim Numarası: KM392506.1, KF425655.1, MW020322.1, MW020308.1 ve MK054184.1, MW632188.1, MW632181.1), Danimarka (GenBank Erişim Numarası:

OM468235.1, OM468234.1), İtalya (GenBank Erişim Numarası: MN123925.1, MN123869.1, MN123959.1), Hollanda (GenBank Erişim Numarası: OP474074.1), Kanada (GenBank Erişim Numarası: MT246269.1), Meksika (GenBank Erişim Numarası: KU171128.1); %92.78 – 92.51 oranlarında Amerika Birleşik Devletleri (GenBank Erişim Numarası: KM392492.1), Meksika (GenBank Erişim Numarası: KU171126.1) ve %88.77 ile İtalya (GenBank Erişim Numarası: MN165250.1).

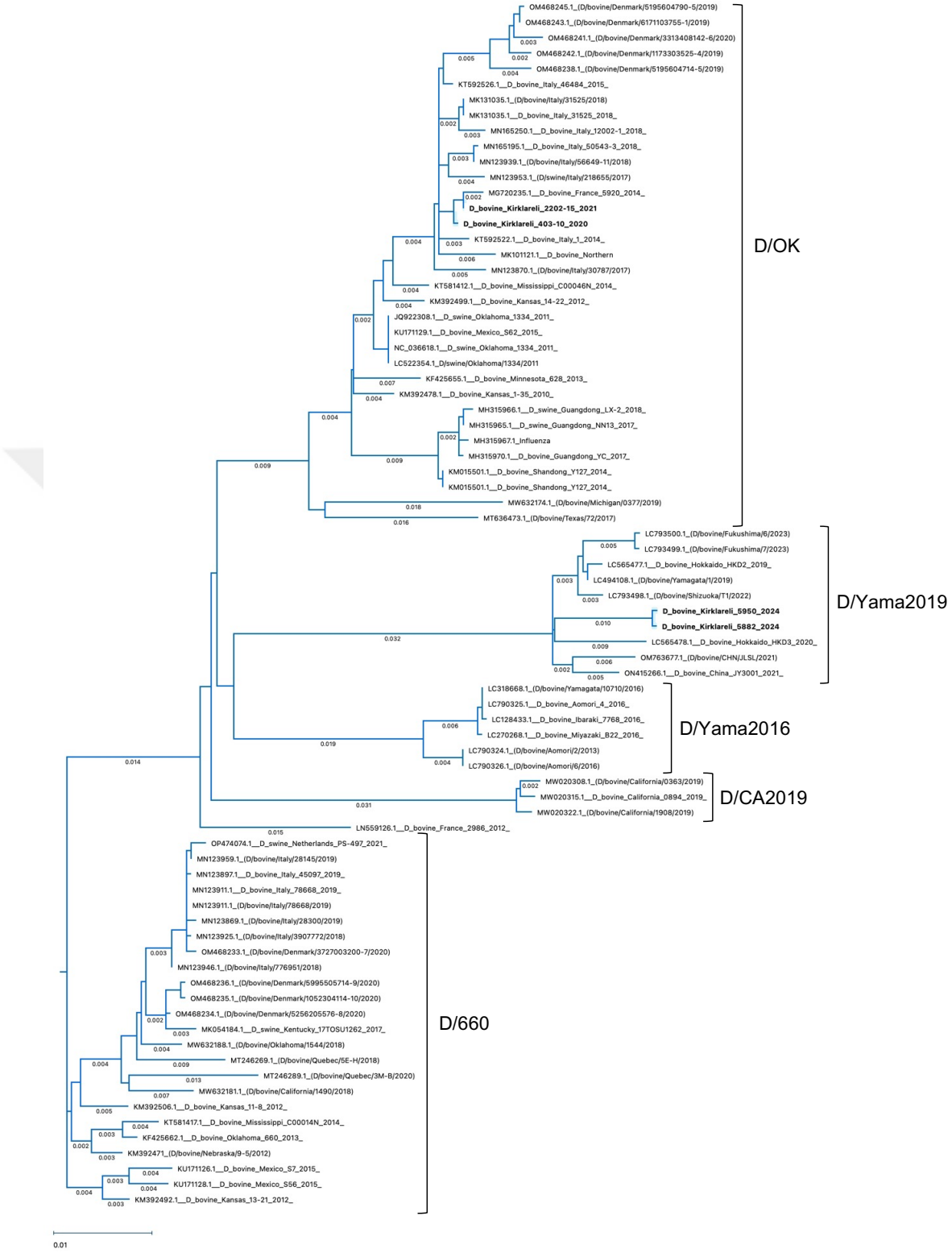
Bu veriler sonucunda 5950-1 ve 5882-2 kodlu örneklerin filogenetik ağaçta D/Yama2019 genogrubunda hizalandığı tespit edildi. 403-10, 2202-15 ve 2202-4 kodlu örnekler ise D/OK genogrubunda hizalandığı tespit edildi.

4.7.2. Tüm HEF Geni Sekansı

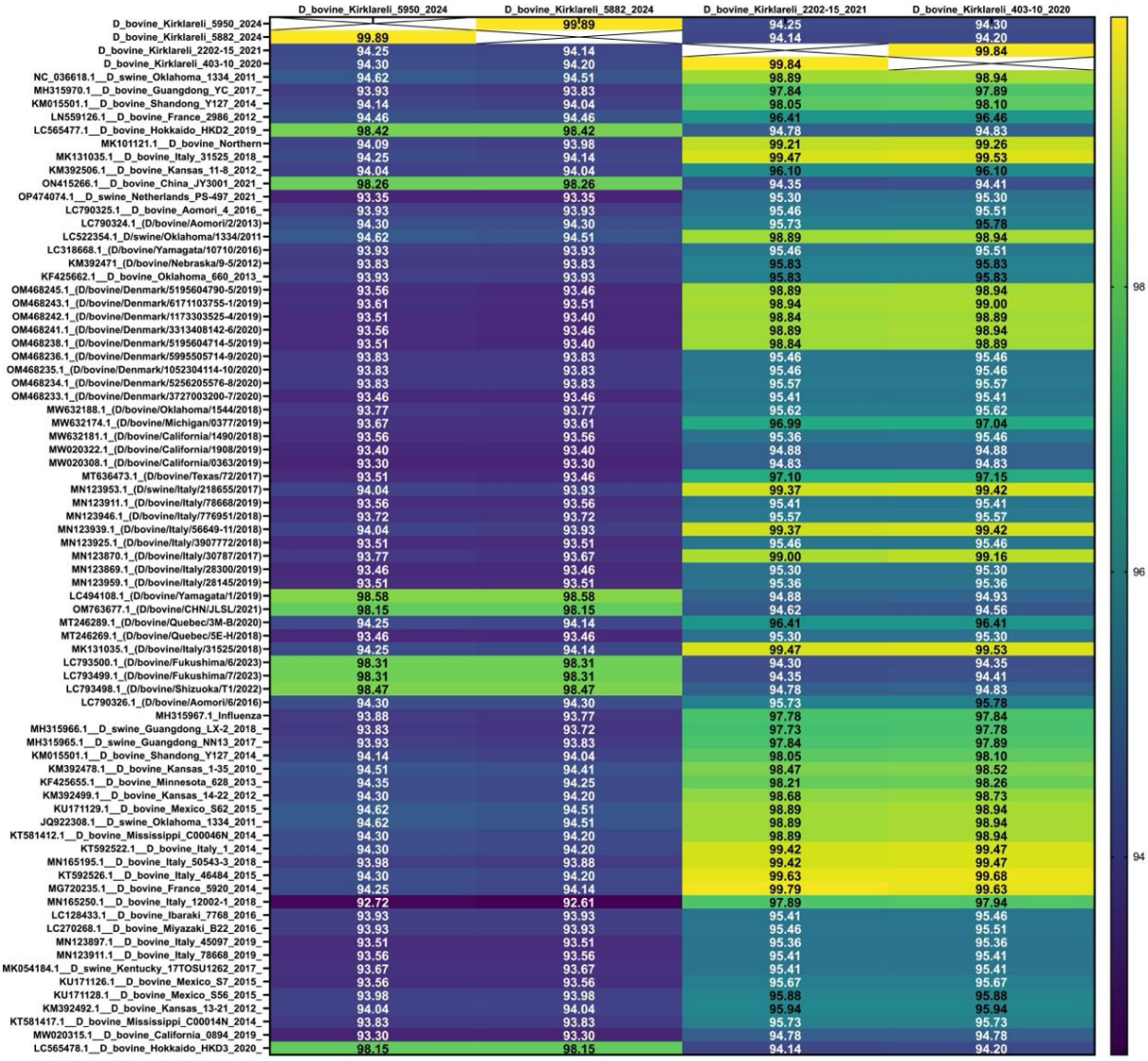
Tüm HEF genin sekanslanması amacıyla, izole edilen viruslardan HEF geninin kalan kısımlarını sekanslamak için 3 primer seti ile yapılan RT-PCR çalışmaları sonucunda 403-10, 2202-15, 5950-1, 5882-2 nolu örneklerde sırasıyla 618bp, 498bp, 623bp'lik bantlar görüntülendi (Şekil 4.13). Sanger sekans sonuçları ile tüm HEF geninin yukarıda anlatıldığı şekilde filogenetik ağacı oluşturuldu (Şekil 4.14). 2202-4 ile sadece 498 bp'lik bant görüntülendi.



Şekil 4.13: RT-PCR sonucu %1,5 agaroz jelde yürütülen 618bp, 498bp ve 623bp ürünlerin görüntüsü



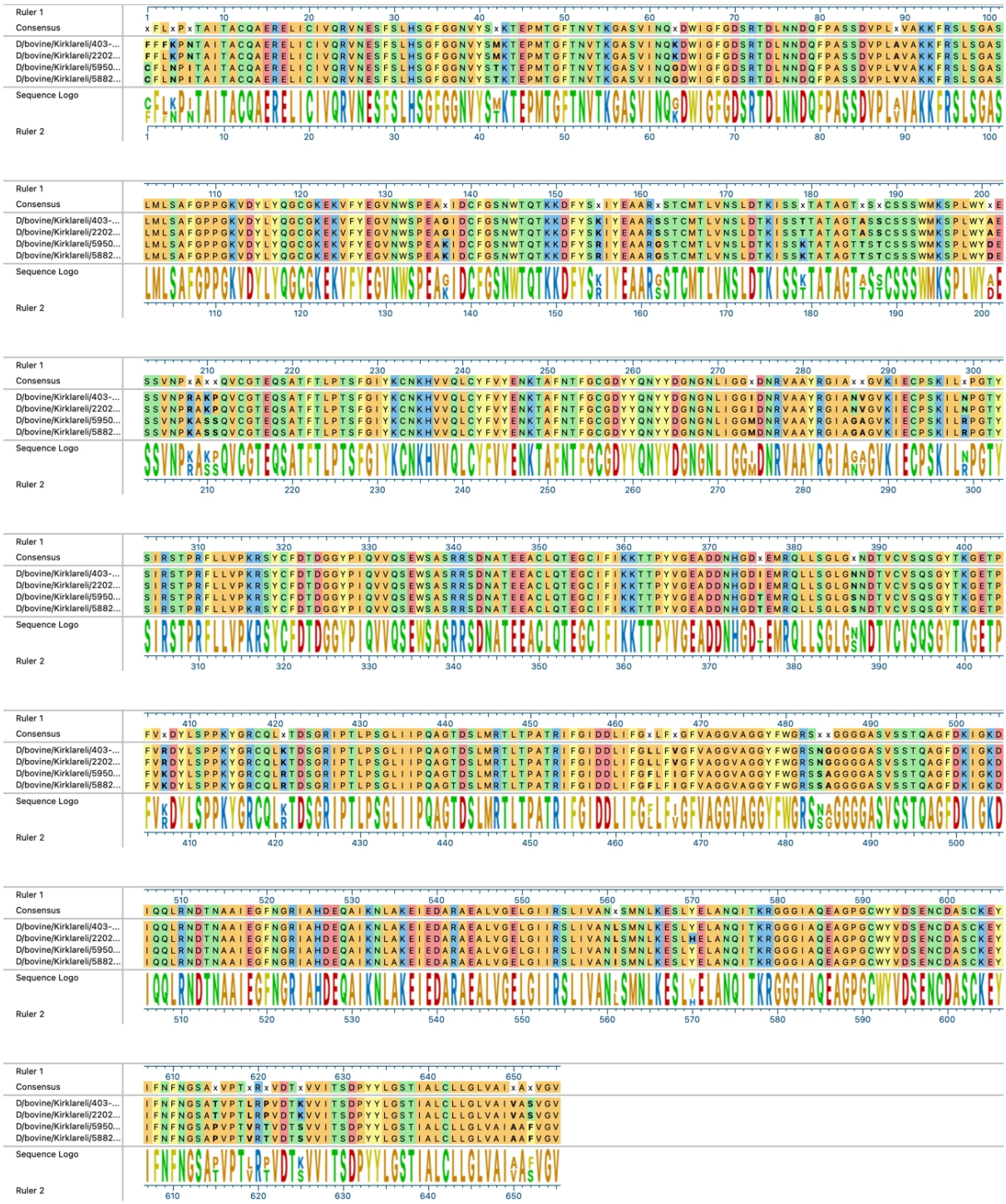
Şekil 4.14: Tüm HEF geni analizi sonucunda elde edilen sekansların filogenetik ağaçtaki yerleşimi



Şekil 4.15: Sekans analizi sonucunda GenBank'a giriş yapılan tüm HEF geni sekanslarının diğer araştırmacılar tarafından bildirilen sekanslarla yakınlıkları gösteren heatmap

Bu verilere göre 5950-1 ve 5882-2 kodlu örneklerin tüm HEF gen sekansları en yakın benzerliği %98.58 ile Japonya'da bildirilen bir sekansla (GenBank Erişim Numarası: LC7494108.1) ve en düşük benzerliği %92.72 ile İtalya'da bildirilen bir sekansla (GenBank Erişim Numarası: MN165250.1) gösterdiği tespit edildi. 2202-15 kodlu örneğin tüm HEF gen sekansı en yakın benzerliği %99.47 ile İtalya (GenBank Erişim Numarası: MK131035.1) ve en düşük benzerliği %94.14 ile Japonya (GenBank Erişim Numarası: LC565478.1) sekansları ile gösterdiği tespit edildi. 403-10 kodlu örneğin tüm HEF gen sekansının en yakın benzerliği %99.53 ile İtalya (GenBank Erişim Numarası: MK131035.1) ve en düşük benzerliği %94.20 ile Japonya (GenBank Erişim Numarası: LC565478.1) sekansları ile gösterdiği tespit edildi.

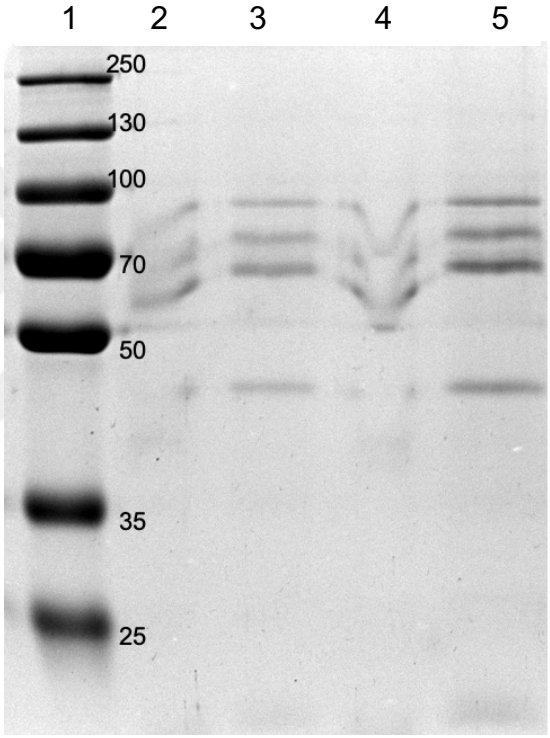
HEF genlerinin amino asit dizilimleri MegAlign Pro (DNASTAR- Sürüm 17.6) programı ile karşılaştırıldığında 655 amino asit üzerinden 2020 ve 2021 yıllarında alınan örneklerden 403-10 ile 2202-15 arasında bir amino asit fark bulunurken, 403-10 ile 2024 yılında alınan 5950-1, 5882-2 nolu örnekler arasında 25 ve 2202-15 ile aralarında 24 amino asit fark bulundu (Şekil 4.16).



Şekil 4.16: Tüm HEF sekanslarının aminoasit dizilimlerindeki farklılıklar

4.8. SDS-Page BULGULARI

Ct değeri en düşük olan izolat (2202-15) ile yapılan SDS-Page çalışmalarında, sırasıyla tripsinle ön işlem yapılan ve virusa reducing agent eklendikten sonra 95°C de 5 dakikalık işlem gördüğü 3 ve 5 nolu kuyularda 100kDa, 80kDa, 70kDa ve 45kDa civarında bantlar görüldü. Virusun herhangi bir işleme tabi tutulmadığı ikinci kuyuda 100kDa, 80kDa ve 70kDa civarında bantlar gözlendi. Virusa hiçbir ön işlem yapılmayan ve sadece 95°C de 5 dakikalık ısıl işlem uygulandığı sırasıyla 2 ve 4 nolu kuyuda değerlendirilebilecek netlikte bantlar elde edilmedi (Şekil 4.17)



Şekil 4.17: 2202-15 nolu virusun SDS-PAGE jel görüntüsü. (Soldan sağa, Birinci kuyu:Ladder; İkinci kuyu: Herhangi bir işleme tabi tutulmamış 51.2HAU virus; Üçüncü kuyu: Tripsinle muamele edilmiş 51.2HAU virus; Dördüncü kuyu: 95°C de 5 dakika ısıl işlem görmüş 51.2HAU virus, Beşinci kuyu: NuPAGE Sample Reducing Agent (10X) eklendikten sonra 95°C de 5 dakika ısıl işlem görmüş 51.2HAU virus)

4.9. SEROLOJİK BULGULAR

4.9.1. ELISA Bulguları

Bu çalışmada ELISA ile incelenen, 10 adet entegre sığır çiftliği, 9 adet küçük aile işletmesi olmak üzere toplam 19 farklı işletmeden alınan toplam 279 kan serumu örneğinden 14 çiftlikte bulunan 79 hayvanda (%28,3) IDV seropozitifliği saptandı (Tablo 4.6.) Pozitif bulunan kan serumlarının 9 tanesi küçük aile işletmesinde bulunan hayvanlara, 70 tanesi ise

entegre sığır çiftliklerinde yetiştirilen hayvanlara ait olduğu görüldü. Seropozitiflik saptanan hayvanların yaşı ≤12 ay olduğu saptandı.

ELISA testi sonucu hesaplanan inhibisyon sonuçları değerlendirildiğinde 131 serumda %0-59 arasında inhibisyon, 69 serumda %60-79 inhibisyon ve 79 serumda >%80 inhibisyon belirlendi. ELISA testi sonucunda real time RT-PCR ile pozitif bulunan 5 örneğin (403-10, 2202-4, 2202-15, 5950-1, 5882-1) alındığı hayvanların serumlarından sadece iki tanesinde (2202-4 ve 2202-15) sırasıyla %89,64 ve %84,32 düzeyinde inhibisyon gözlendi. Kalan 3 örnekte (403-10, 5950-1, 5882-1) pozitif cut off değeri olan %80'nin altında sırasıyla %69,44, %7,40 ve %2.58 düzeyinde inhibisyon tespit edildi (Tablo 4.7). Çiftlik bazında seropozitif hayvan sayıları Tablo 4.6 ve Şekil 4.18'de sunuldu.

Tablo 4.6: ELISA çalışılan örneklerin kodları, OD değerleri ve % Inhibition değerleri

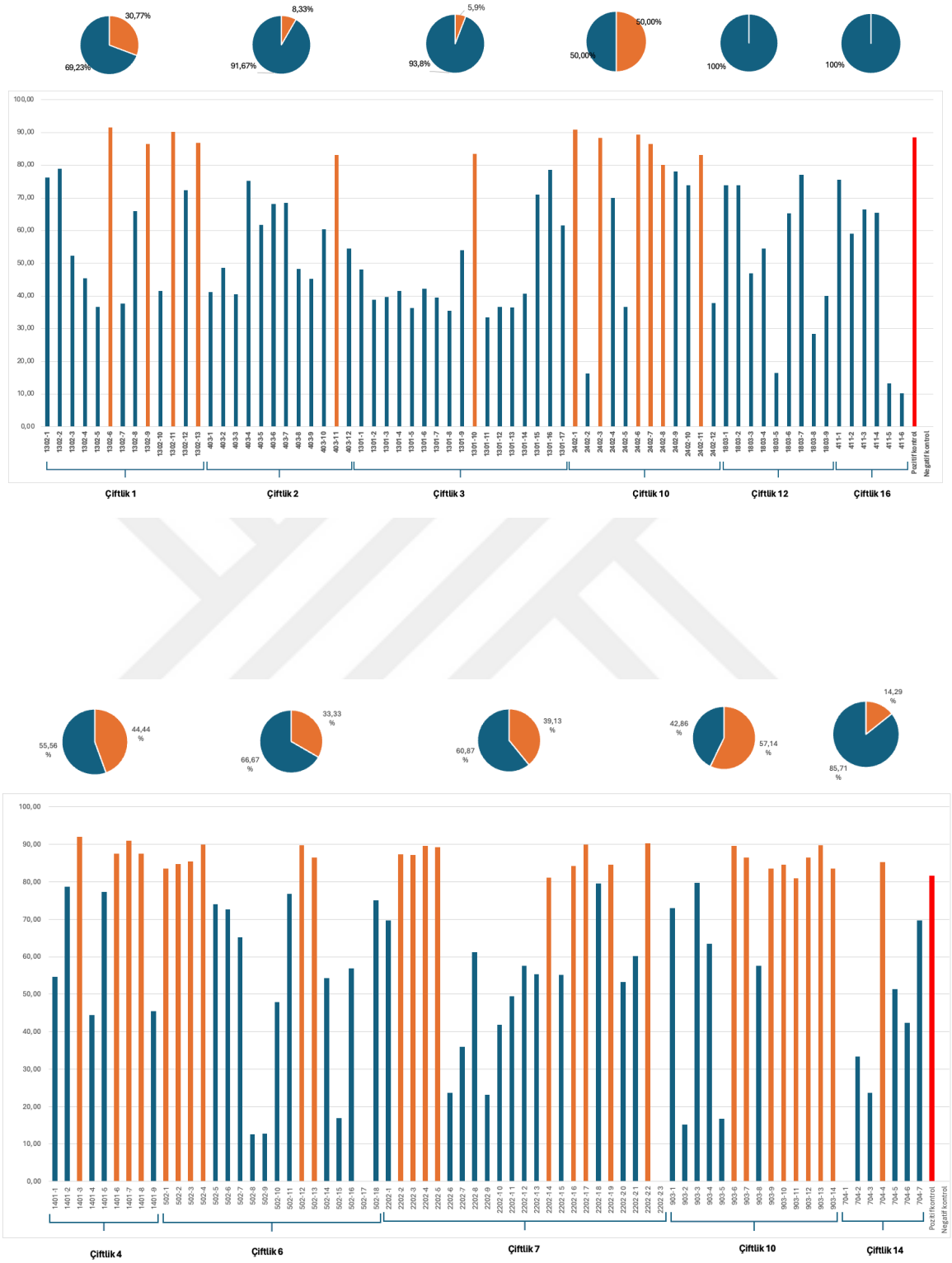
Örnek Kodu	OD 490-650	% İnhibisyon	Örnek Kodu	OD 490-650	% İnhibisyon	Örnek Kodu	OD 490-650	% İnhibisyon	Örnek Kodu	OD 490-650	% İnhibisyon
1302-1	0,263	76,31	1401-1	0,504	53,12	2601-34	0,256	77,6	2202-18	0,226	78,98
1302-2	0,234	78,92	1401-2	0,237	77,95	2601-35	1,05	8,14	2202-19	0,171	84,09
1302-3	0,529	52,34	1401-3	0,088	91,81	2601-36	0,274	76,03	2202-20	0,519	51,72
1302-4	0,606	45,41	1401-4	0,617	42,6	2601-37	0,191	83,29	2202-21	0,441	58,98
1302-5	0,703	36,67	1401-5	0,252	76,56	2601-38	0,205	82,06	2202-22	0,108	89,95
1302-6	0,094	91,53	1401-6	0,139	87,07	2601-39	0,49	57,13	2202-23	1,167	-8,56
1302-7	0,692	37,66	1401-7	0,099	90,79	2601-40	1,048	8,31	1002-1	0,399	65,09
1302-8	0,377	66,04	1401-8	0,138	87,16	502-1	0,183	82,98	1002-2	0,958	16,19
1302-9	0,15	86,49	1401-9	0,606	43,63	502-2	0,17	84,19	1002-3	0,967	15,4
1302-10	0,649	41,53	2601-1	0,564	50,66	502-3	0,162	84,93	1002-4	0,371	67,54
1302-11	0,109	90,18	2601-2	0,152	86,7	502-4	0,112	89,58	1002-5	0,372	67,45
1302-12	0,306	72,43	2601-3	0,136	88,1	502-5	0,288	73,21	1002-6	0,248	78,3
1302-13	0,146	86,85	2601-4	0,664	41,91	502-6	0,304	71,72	1002-7	0,39	65,88
403-1	0,652	41,26	2601-5	0,529	53,72	502-7	0,387	64	1002-8	0,392	65,7
403-2	0,57	48,65	2601-6	0,116	89,85	502-8	0,971	9,67	1002-9	0,566	50,48
403-3	0,66	40,54	2601-7	0,599	47,59	502-9	0,969	9,86	1002-10	0,196	82,85
403-4	0,275	75,23	2601-8	0,516	54,86	502-10	0,579	46,14	1002-11	0,777	32,02
403-5	0,424	61,8	2601-9	0,145	87,31	502-11	0,257	76,09	1002-12	0,922	19,34
403-6	0,354	68,11	2601-10	0,208	81,8	502-12	0,113	89,49	1002-13	0,159	86,09
403-7	0,349	68,56	2601-11	0,671	41,29	502-13	0,15	86,05	1002-14	0,638	44,18
403-8	0,574	48,29	2601-12	0,673	41,12	502-14	0,508	52,74	1002-15	0,501	56,17
403-9	0,607	45,32	2601-13	0,48	58,01	502-15	0,923	14,14	2402-1	0,101	91,06
403-10	0,44	69,44	2601-14	0,339	70,34	502-16	0,479	55,44	2402-2	0,929	17,79
403-11	0,188	83,06	2601-15	0,577	49,52	502-17	1,14	-6,05	2402-3	0,129	88,58
403-12	0,505	54,5	2601-16	0,412	63,95	502-18	0,276	74,33	2402-4	0,333	70,53
1301-1	0,576	48,11	2601-17	0,092	91,95	2202-1	0,336	68,74	2402-5	0,702	37,88
1301-2	0,679	38,83	2601-18	0,169	85,21	2202-2	0,14	86,98	2402-6	0,118	89,56
1301-3	0,67	39,64	2601-19	0,478	58,18	2202-3	0,143	86,7	2402-7	0,149	86,81
1301-4	0,648	41,62	2601-20	0,112	90,2	2202-4	0,115	89,3	2402-8	0,221	80,44
1301-5	0,706	36,4	2601-21	0,6	47,51	2202-5	0,12	88,84	2402-9	0,244	78,41
1301-6	0,642	42,16	2601-22	0,502	56,08	2202-6	0,847	21,21	2402-10	0,29	74,34
1301-7	0,671	39,55	2601-23	0,216	81,1	2202-7	0,71	33,95	2402-11	0,187	79,82
1301-8	0,716	35,5	2601-24	0,18	84,25	2202-8	0,431	59,91	2402-12	0,689	39,03
1301-9	0,511	53,96	2601-25	0,105	90,81	2202-9	0,853	20,65	903-1	0,299	72,19
1301-10	0,184	83,42	2601-26	0,103	90,99	2202-10	0,645	40	903-2	0,942	12,37
1301-11	0,739	33,42	2601-27	0,135	88,19	2202-11	0,561	47,81	903-3	0,224	79,16
1301-12	0,703	36,67	2601-28	0,132	88,45	2202-12	0,47	56,28	903-4	0,406	62,23
1301-13	0,705	36,49	2601-29	0,079	93,09	2202-13	0,495	53,95	903-5	0,924	14,05
1301-14	0,658	40,72	2601-30	0,6	47,51	2202-14	0,209	80,56	903-6	0,116	89,21
1301-15	0,322	70,99	2601-31	0,169	85,21	2202-15	0,498	53,67	903-7	0,15	86,05
1301-16	0,237	78,65	2601-32	0,143	87,49	2202-16	0,174	83,81	903-8	0,47	56,28
1301-17	0,426	61,62	2601-33	0,503	55,99	2202-17	0,112	89,58	903-9	0,182	83,07

Tablo 4.6 (devam): ELISA çalışılan örneklerin kodları, OD değerleri ve % Inhibition değerleri

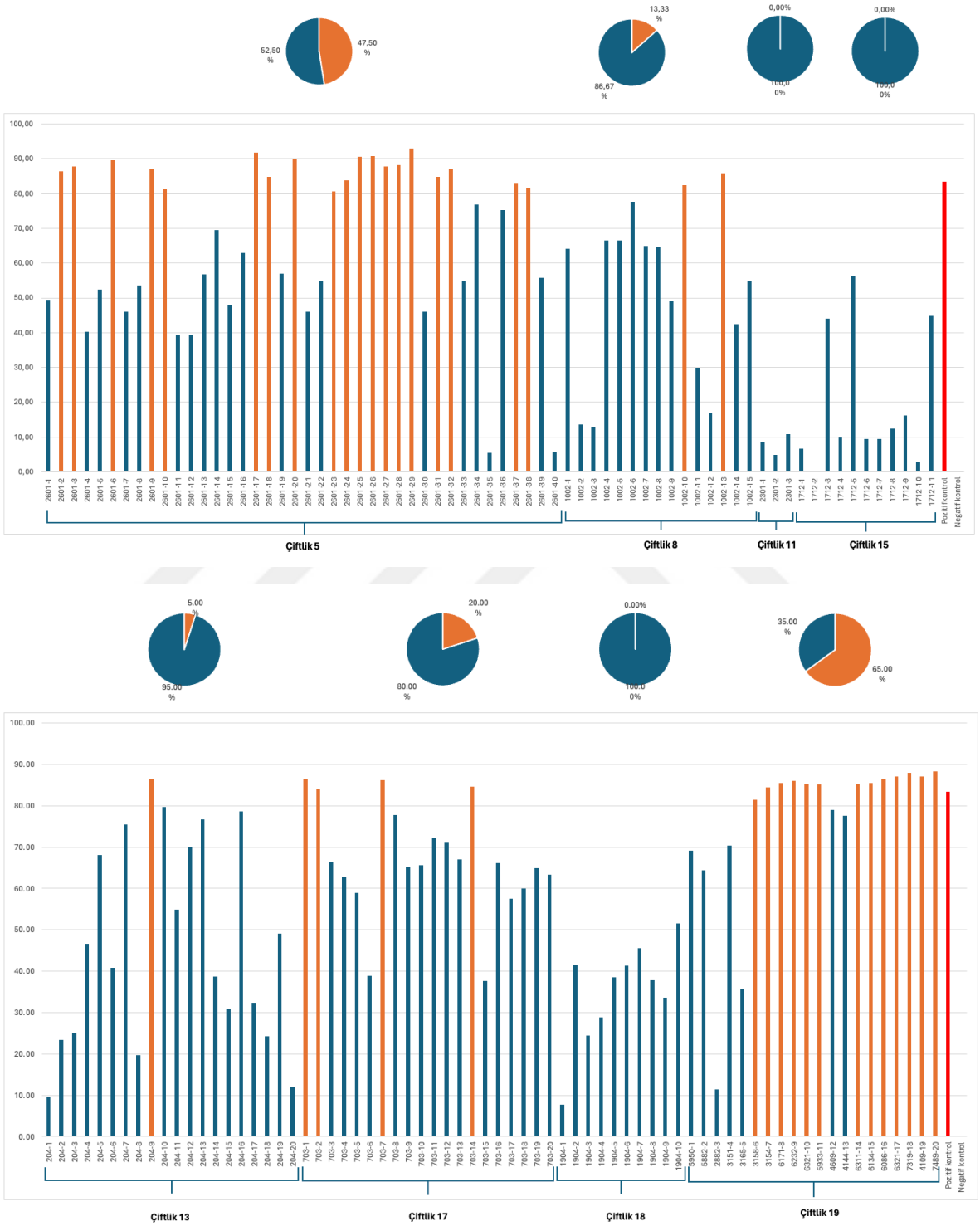
Örnek Kodu	OD 490-650	% İnhibisyon	Örnek Kodu	OD 490-650	% İnhibisyon	Örnek Kodu	OD 490-650	% İnhibisyon	Örnek Kodu	OD 490-650	% İnhibisyon
903-10	0,171	84,09	204-13	0,258	75,12	411-4	0,383	65,50	1904-7	0,604	41,76
903-11	0,211	80,37	204-14	0,68	34,43	411-5	0,963	13,24	1904-8	0,69	33,46
903-12	0,149	86,14	204-15	0,769	25,84	411-6	0,997	10,18	1904-9	0,737	28,93
903-13	0,113	89,49	204-16	0,238	77,05	703-1	0,151	86,40	1904-10	0,538	48,12
903-14	0,182	83,07	204-17	0,75	27,68	703-2	0,176	84,14	5950-1	0,358	69,03
2301-1	1,017	10	204-18	0,841	18,9	703-3	0,375	66,22	5882-2	0,411	64,45
2301-2	1,055	6,64	204-19	0,566	45,42	703-4	0,413	62,79	2882-3	1,024	11,42
2301-3	0,99	12,39	204-20	0,978	5,69	703-5	0,456	58,92	3151-4	0,342	70,42
1803-1	0,289	75,92	704-1	1,149	-6,88	703-6	0,679	38,83	3165-5	0,743	35,73
1803-2	0,289	75,92	704-2	0,739	31,26	703-7	0,154	86,13	3158-6	0,214	81,49
1803-3	0,589	50,92	704-3	0,848	21,12	703-8	0,248	76,08	3154-7	0,18	84,43
1803-4	0,505	57,92	704-4	0,163	84,84	703-9	0,385	62,87	6171-8	0,169	85,38
1803-5	0,927	22,75	704-5	0,54	49,77	703-10	0,381	63,26	6232-9	0,161	86,07
1803-6	0,385	67,92	704-6	0,64	40,47	703-11	0,309	70,2	6321-10	0,17	85,29
1803-7	0,254	78,83	704-7	0,337	68,65	703-12	0,319	69,24	5933-11	0,173	85,03
1803-8	0,794	33,83	1712-1	1,035	6,76	703-13	0,367	64,61	4609-12	0,244	78,89
1803-9	0,665	44,58	1712-2	1,267	-14,14	703-14	0,172	83,41	4144-13	0,26	77,51
204-1	1,002	3,38	1712-3	0,621	44,05	703-15	0,692	33,27	6311-14	0,171	85,21
204-2	0,851	17,94	1712-4	1,001	9,82	703-16	0,376	63,74	6134-15	0,168	85,47
204-3	0,831	19,86	1712-5	0,484	56,40	703-17	0,471	54,58	6086-16	0,155	86,59
204-4	0,592	42,91	1712-6	1,006	9,37	703-18	0,445	57,09	6321-17	0,15	87,02
204-5	0,354	65,86	1712-7	1,005	9,46	703-19	0,389	62,49	7319-18	0,14	87,89
204-6	0,658	36,55	1712-8	0,972	12,43	703-20	0,407	60,75	4109-19	0,15	87,02
204-7	0,273	73,67	1712-9	0,931	16,13	1904-1	1,024	1,25	7489-20	0,136	88,24
204-8	0,891	14,08	1712-10	1,078	2,88	1904-2	0,65	37,32			
204-9	0,15	85,54	1712-11	0,612	44,86	1904-3	0,838	19,19			
204-10	0,225	78,3	411-1	0,272	75,50	1904-4	0,789	23,92			
204-11	0,501	51,69	411-2	0,455	59,01	1904-5	0,683	34,14			
204-12	0,334	67,79	411-3	0,372	66,49	1904-6	0,651	37,22			

Tablo 4.7: Çiftliklere göre ELISA ile seropozitiflik saptanan hayvanların sayısı

Çiftlik Numarası	Yıl	Seropozitif/ Toplam	Çiftlik Numarası	Yıl	Seropozitif/ Toplam	Çiftlik Numarası	Yıl	Seropozitif/ Toplam
Çiftlik 1	2020	4/13	Çiftlik 8	2021	2/15	Çiftlik 15	2021	0/11
Çiftlik 2	2020	1/12	Çiftlik 9	2021	6/12	Çiftlik 16	2021	0/6
Çiftlik 3	2021	1/17	Çiftlik 10	2021	8/14	Çiftlik 17	2021	4/20
Çiftlik 4	2021	4/9	Çiftlik 11	2021	0/3	Çiftlik 18	2021	0/10
Çiftlik 5	2021	19/40	Çiftlik 12	2021	0/9	Çiftlik 19	2024	13/20
Çiftlik 6	2021	6/18	Çiftlik 13	2021	1/20			
Çiftlik 7	2021	9/23	Çiftlik 14	2021	1/7			



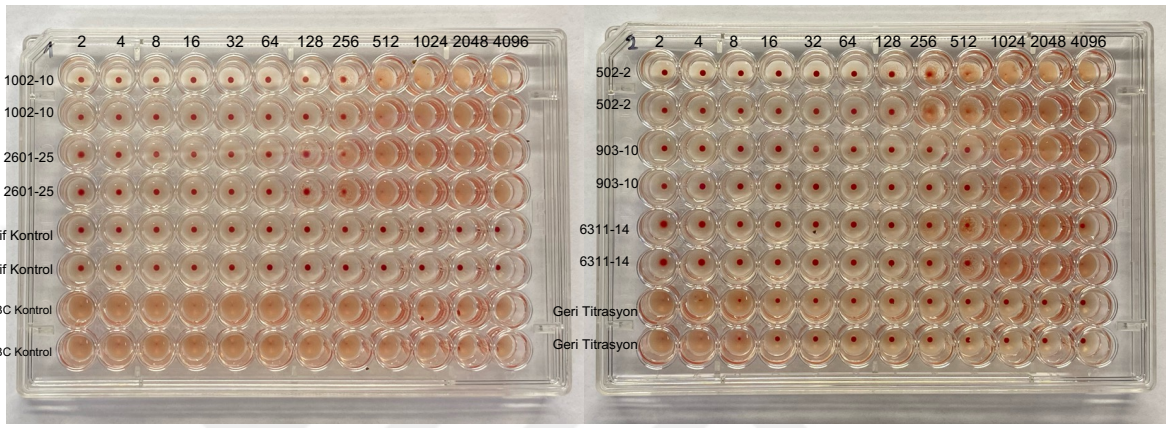
Şekil 4.18: Çiftlik bazında ELISA pozitiflik oranları



Şekil 4.18 (devam): Çiftlik bazında ELISA pozitiflik oranları

4.9.2. Hemaglutinasyon İnhibisyon Testi Bulguları

Yapılan Hemaglutinasyon testi sonucunda 2202-15 koldu örnekten üretilen virusun hemaglutinasyon titresi 256 HAU/50µl olarak tespit edildi ve HI testinde kullanılmak üzere virus 4HAU/25µl olacak şekilde dilüe edildi. Virus 1/32 oranında dilüe edilerek PBS içerisine eklendi. Projede 79 örnek için yeterli miktarda virus dilüe edildi ve toplanan serumlarda HI titreleri 1/128 – 1/512 arasında değişen değerlerde gözlendi (Şekil 4.19) (Tablo 4.8).



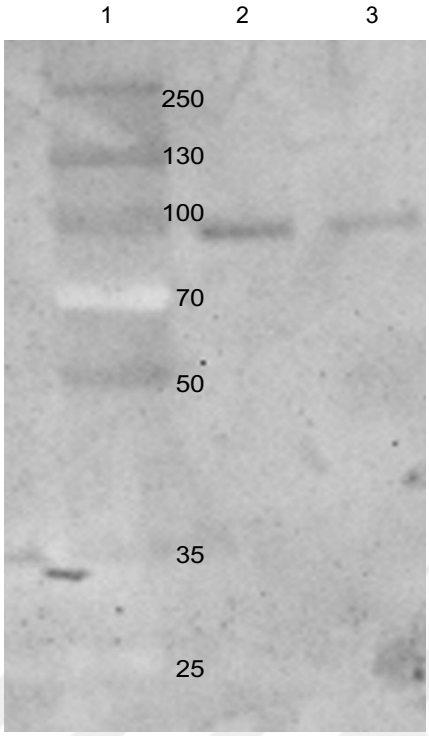
Şekil 4.19: Pozitif örnekleri temsilen farklı çiftliklere ait serumların HI titreleri görüntüsü

Tablo 4.8: Serum örneklerinde saptanan HI titreleri

Örnek Kodu	Log2	HI	Örnek Kodu	Log2	HI	Örnek Kodu	Log2	HI	Örnek Kodu	Log2	HI
1302-6	7	128	2601-25	7	128	2202-16	7	128	204-9	8	256
1302-9	7	128	2601-26	7	128	2202-17	8	256	704-4	8	256
1302-11	8	256	2601-27	8	256	2202-19	8	256	703-1	8	256
1302-13	7	128	2601-28	7	128	2202-22	8	256	703-2	8	256
403-11	8	256	2601-29	7	128	1002-10	8	256	703-7	8	256
1301-10	7	128	2601-32	7	128	1002-13	8	256	703-14	8	256
1401-3	7	128	2601-33	7	128	2402-1	8	256	3158-6	8	256
1401-6	8	256	2601-37	7	128	2402-3	8	256	3154-7	8	256
1401-7	7	128	2601-28	7	128	2402-6	8	256	6171-8	8	256
1401-8	8	256	502-1	7	128	2402-7	8	256	6321-10	8	256
2601-2	7	128	502-2	7	128	2402-8	7	128	6232-9	8	256
2601-3	7	128	502-3	7	128	2402-11	8	256	5933-11	8	256
2601-6	7	128	502-4	7	128	903-6	8	256	6311-14	9	512
2601-9	7	128	502-12	7	128	903-7	8	256	6134-15	7	128
2601-10	7	128	502-13	8	256	903-9	8	256	6086-16	8	256
2601-17	7	128	2202-2	8	256	903-10	9	512	6321-17	8	256
2601-18	8	128	2202-3	7	128	903-11	9	512	7319-18	8	256
2601-20	7	128	2202-4	7	128	903-12	9	512	4109-19	8	256
2601-23	7	128	2202-5	8	256	903-13	9	512	7489-20	9	512
2601-24	7	128	2202-14	8	256	903-14	8	256			

4.9.3. Western Blotting Bulguları

ELISA sonucunda pozitif bulunan 403-11 nolu serum ile yapılan western blotting uygulamasında 2202-15 nolu virus örneği kullanıldı. Yukarıda belirtilen SDS-Page sonuçlarına göre en güçlü bantların beşinci kuyu olan ve NuPAGE Sample Reducing Agent (10X) eklendikten sonra 95°C de 5 dakika ısıl işlem görmüş virus ile elde edildiği tespit edildiğinden bu oranlarda 32HAU ve 18HAU titresinde virus (2202-15) ile karışımlar hazırlanıp kuyulara yüklendi ve elektroforez ile jel üzerinde migrasyonu sağlandı. Viral proteinlerine ayrılan virus ile primer antikor olarak kullanılan 403-11 nolu serumun IDV'nin 100 kDa civarındaki bir protein ile reaksiyon verdiği gözlendi (Şekil 4.20).



Şekil 4.20: 403-11 nolu serum ve IDV virusu ile yapılan Western blotting membran görüntüsü (Soldan sağa, Birinci kuyu:Ladder; İkinci kuyu: NuPAGE Sample Reducing Agent (10X) eklendikten sonra 95°C de 5 dakika ısıl işlem görmüş 32HAU virus ile 1:100 dilüe edilmiş pozitif serum (403-11). Üçüncü kuyu: NuPAGE Sample Reducing Agent (10X) eklendikten sonra 95°C de 5 dakika ısıl işlem görmüş 18HAU virus ile 1:100 dilüe edilmiş pozitif serum (403-11))

4.10. İSTATİSTİK SONUÇLARI

Fisher's exact test sonuçlarına göre yıllar arasında 2020 yılı örneklerinde %20, 2021 yılında %32 ve 2024 yılında %65 seropozitiflik oranları görüldüğü ve yıllar arası karşılaştırıldığında fark anlamlı bulundu. Örneklerin toplandığı bölgelerde seropozitiflik Kırklareli'nde %36, İstanbul'da %25, Tekirdağ'da %6 ve Edirne'de %5 olarak saptandı ve yöresel fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu. İşletme tipi değerlendirildiğinde entegre işletmelerde seropozitiflik %38, küçük aile işletmelerinde ise %10 olduğu görüldü ve farkın anlamlı olduğu tespit edildi. Sığırların yaşlarının 3 gruba ayrıldığında <3 ay'da seropozitifliğin %28, 3-6 ay arasında %37 ve 6-12 arasında %71 oranında bulunduğu ve farkın anlamlı olduğu tespit edildi. Değişkenler, seropozitif oranları, güven aralıkları ve testin p değeri Tablo 4.9 da verildi.

Tablo 4.9: Sığırların demografik verileri ile IDV seropozitif oranları, %95 güven aralığı ve Fisher's exact test sonuçları

Değişkenler	Seviye	N	Seronegatif	Seropozitif	%Pozitif	95%CI		Fisher's Testi	İstatistiksel Anlamlılık
						Alt	Üst	p Değeri	(P < 0.05)
Yıl	2020	25	20	5	20	4	36	0,0014	Evet
	2021	234	173	61	26	20	32		
	2024	20	7	13	65	44	86		
Yer	İstanbul	20	15	5	25	6	44	0,0001	Evet
	Edirne	42	40	2	5	0	11		
	Kırklareli	200	129	71	36	29	42		
	Tekirdağ	17	16	1	6	0	17		
İşletme Tipi	Küçük aile işletmesi	94	85	9	10	4	16	<0.0001	Evet
	Entegre	185	115	70	38	31	45		
Yaş (ay)	1 =0,-<3	29	21	8	28	11	44	0,0194	Evet
	2 =3-<6	142	90	52	37	29	45		
	3 =6-<12	14	4	10	71	48	95		

Örnek toplanan sığırlarda görülen semptomların hastalık ile ilişkisinin değerlendirilmesi amacıyla seropozitif ve seronegatif hayvanlarda bu semptomların karşılaştırılması sonucunda solunum güçlüğü görülen hayvanlarda seropozitif %84, seronegatiflik %63 olarak farkın anlamlı olduğu, burun akıntısı, öksürük, halsizlik ve ateş görülen hayvanlarda ise farkın anlamlı olmadığı tespit edildi.

Tablo 4.10: Sığırlarda görülen semptomlar ile IDV seropozitif ve seronegatif oranları, %95 güven aralığı ve Fisher's exact test sonuçları

Değişkenler	IDV Seropozitif					IDV Seronegatif					p Değeri	İstatistiksel Anlamlılık (P < 0.05)
	N	Etkilenen Sayısı	%95CI	%95CI		N	Etkilenen Sayısı	%95CI	%95CI			
				Alt	Üst				Alt	Üst		
Solunum Güçlüğü	79	66	84	82	85	200	129	65	63	66	0,0022	Evet
Burun Akıntısı	79	70	89	87	90	200	189	95	94	95	0,1193	Hayır
Öksürük	79	66	84	82	85	200	182	91	90	92	0,0906	Hayır
Halsizlik	79	69	87	86	89	200	189	95	94	95	0,074	Hayır
Ateş	79	6	8	7	8	200	23	12	11	12	0,3911	Hayır

5. TARTIŞMA

İnfluenza viruslar mutasyon ve rekombinasyona yatkın olup evrimleşen viruslardır. Evrim sonucu oluşan antijenik değişimler ve varyasyonlar sonucunda immun sistemden kaçış, mevcut aşılara yeterli immun yanıt alınamaması ve tanısal problemler gibi önemli sorunlarla karşılaşılmaktadır. Antijenik değişime uğrayan yeni influenza viruslar farklı türlere de adapte olarak bu türlerde yaşamlarını devam ettirebilmektedir. Bu nedenle influenza viruslar tüm canlılar için sürekli bir tehdit oluşturmakta, sağlık nedeniyle ölümler ve ekonomik kayıplara neden olmakta ve pandemi oluşturma potansiyeli taşımaktadır (Kim ve diğ., 2018; Zhu ve diğ., 2023). İnfluenza ile ilişkili olarak dünya çapında her yıl yaklaşık 1 milyar infeksiyon, 54,5 milyon hospitalizasyon, 200.000 ölüm meydana gelmekte, dünya popülasyonunun %10'u influenzadan etkilenmektedir (Skelton ve diğ., 2022).

İnfluenza viruslar birçok türde infeksiyonlara neden olmaktadır. IAV kuş, insan, domuz, kemirgen, kedi, at ve balinalar olmak üzere doğada en geniş konak duyarlılığına sahip olup konaklarında mevsimsel infeksiyon ve epidemiler meydana getirmektedir (Kuchipudi ve diğ., 2018). Geçmişe bakıldığında influenza pandemilerinin ana kaynağı IAV'lardır (Saunders-Hastings ve Krewski, 2016). Buna karşın, IBV ve ICV daha sınırlı bir konak duyarlılığına sahip olup hafif bir klinik tablo veya asemptomatik vakalarla seyreden infeksiyonlar oluşturdukları görülmüştür (Skelton ve diğ., 2022). IDV ise diğer üç influenza tipi ile karşılaştırıldığında IAV gibi geniş bir konak duyarlılığına sahiptir ve virion özellikleri ile konak duyarlılığı ve rezervuar temelinde farklılık göstermektedir (Kwasnik ve diğ., 2023). İnfluenza D virus ilk kez 2011 yılında izole edildikten sonra ana konağı sığır olmak üzere farklı türlerde tespit edilmiş olup dünya çapında sığır endüstrisinde büyük ekonomik kayıplara neden olan BRDC'nin oluşumunda rol alan etkenlerden biridir (Yu ve diğ., 2020; Ishida ve diğ., 2021; Katayama ve diğ., 2024).

BRDC bir çok ülkede sığır endüstrisinde çok yaygın görülen ve büyük kayıplara yol açan hastalıktır (Kurcibic, 2018). Amerika Birleşik Devletleri'nde hayvan ve üretim kayıpları, koruma, kontrol ve tedavi masrafları göz önünde bulundurulduğunda BRDC'nin neden olduğu yıllık kayıp yaklaşık 4 milyon dolar civarında seyretmektedir (Griffin, 1997). Kuzey Amerika'da BRDC morbidite seviyeleri %70-80, mortalite seviyeleri ise %40-50 değerlerinde seyretmektedir (USDA, 1999). Avrupa Birliği ülkelerinde üretim kayıpları yıllık olarak 576

milyon Euro olarak rapor edilmiştir (Barrett, 2000). Birleşik Krallık'ta BRDC sığır endüstrisine yıllık 60 milyon Euro kayba neden olmuştur (NADIS, 2007, Kurcibic, 2019). IDV ile birlikte BoHV-1, BVDV, BRSV, BCoV ve BIPV3 gibi virusların neden olduğu BRDC dünya çapında sığırlarda serolojik ve moleküler sürveyans çalışmalarında sığır örneklerinde test edilmektedir. Bu amaçla daha çok ELISA ve PCR testlerinden yararlanılmaktadır (Kwasnik ve diğ., 2023).

IDV son yıllarda özellikle Amerika, Avrupa ve Çin'de sık araştırılan bir virus olmasına karşın ülkemizde sınırlı sayıda çalışma yapılmıştır (Yılmaz ve diğ., 2020; Yeşilbağ ve diğ., 2022). Ülkemizde yapılan bu çalışmalarda IDV'ye karşı oluşan immun yanıt henüz araştırılmadığı gibi oluşan immun yanıtın virusun hangi proteinine karşı geliştiği saptanmamıştır. Bu nedenle bu çalışmada Marmara Bölgesi'nde lokalize olmuş çiftliklerde bulunan sığırlarda IDV prevalansı, tanısı, izolasyonu, moleküler karakterizasyonu ve oluşan immun yanıtın araştırılması planlandı. Bu plan dahilinde bahsedilen hedeflerin gerçekleştirilmesi için diğer çalışmalarda olduğu gibi moleküler ve serolojik yöntemler, virus izolasyonu, sekans ve filogenetik analizlerden yararlanıldı. Söz konusu yöntemler dünyada IDV varlığının araştırılması ve tespiti için çeşitli bilim insanları tarafından sık kullanılan yöntemlerdir (Faccini ve diğ., 2017; Zhai ve diğ., 2017; Moreno ve diğ., 2019). Belirlenen hedefler temelinde bu çalışmada Marmara Bölgesi'nde lokalize olmuş entegre çiftlikler ile küçük aile işletmelerindeki hayvan popülasyonları ziyaret edildi, solunum sistemi hastalık belirtisi gösteren hayvanlardan nazal svab ve kan (serum) örnekleri alındı. IDV'nin araştırılması için moleküler ve serolojik yöntemlerden yararlanıldı. Ayrıca virus izolasyonu için hücre kültürü, embriyolu tavuk yumurtası kullanıldı. Üreyen virusların hemaglutinasyon yeteneği tavuk eritrositleri ile, IDV'ye karşı oluşan immun yanıt ve yanıtın virusun hangi kDa proteinine karşı geliştiği Western blotting ile araştırıldı.

Dünya çapında IDV tanısında ve moleküler epidemiyolojik çalışmalarda moleküler testler sıklıkla kullanılmaktadır. Bu teslerden Real time RT-PCR ve PCR testi en sık kullanılan testlerdir (Faccini ve diğ, 2017; Yu ve diğ., 2020; Kwasnik ve diğ., 2023). PCR kullanılarak farklı ülkelerde yapılan moleküler epidemiyolojiye yönelik çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmiştir. Amerika Birleşik Devletleri'nde 2014 yılında 12 farklı eyaletten toplanan 208 akciğer, nazal ve orofaringeal svab örneklerinde %4,8'lik pozitiflik bildirilmiştir (Collin ve diğ., 2015). Kanada'da 2017-2020 yılları arasında toplanan 883 adet nazal ve orofaringeal svab örneklerinde %5,3 oranında pozitiflik saptanmıştır (Saegerman ve diğ., 2022). Meksika'da solunum sistemi hastalık tablosu gösteren 27 hayvandan alınan nazal svab örneklerinde %29,6, asemptomatik 26 hayvanın nazal svab örneklerinde ise %3,8 oranlarında pozitiflik bildirilmiştir

(Mitra ve diğ., 2016). Güney Amerika'da IDV ilk kez 2022 yılında Brezilya'da BoHV-1 salgını tespit edilen bir sığır çiftliğindeki 9 sığırdan alınan nazal svab örneklerinin 1 tanesinde tespit edilmiştir (da Silva ve diğ., 2022).

IDV Avrupa'da ilk kez Fransa'da 2010-2013 yılları arasında toplanan 134 adet akciğer, nazal svab ve trakeal aspirat sıvı örneklerinde yapılan moleküler analizler sonucunda %4,5 oranında pozitiflik tespit edilmiştir (Ducatez ve diğ., 2015). İtalya'da 2018-2019 yıllarında 664 nazal svab, 250 akciğer dokusu ve 22 bronkoalveolar sıvı örneğinde yapılan bir çalışmada nazal svablarda %13, akciğer dokularında ise %28'lik IDV pozitifliği saptanmıştır (Chiapponi ve diğ., 2019). Danimarka'da 2022 yılında yapılan bir çalışmada 100 nazal svab örneğinde %12'lik pozitiflik bulunmuştur (Goecke ve diğ., 2022). İrlanda'da 2018 yılında 320 nazal svab örneğinde yapılan analizlerde %5,6 değerinde pozitiflik tespit edilmiştir (Flynn ve diğ., 2018). 2021 yılında Studer ve diğ. tarafından 764 nazofaringeal svab örneğinde yapılan bir çalışmada çalışmada İsviçre'de %4,1 değerinde pozitiflik bulunmuştur (Studer ve diğ., 2021). İngiltere'de 104 nazal svab, trakea ve akciğer örneklerinden oluşan bir örnek havuzunda %8.7 prevalans bildirilmiştir (Dane ve diğ., 2019).

Asya kıtasında 2014 yılında Çin'de yapılan bir çalışmada solunum sistemi hastalık tablosu gösteren 230 hayvandan alınan nazal svab örneklerinin %10,4'ünde IDV saptanmıştır (Zhai ve diğ., 2017). Lim ve diğ., (2023) tarafından yürütülen bir çalışmada nazal svab ve akciğer dokularından oluşan 999 örnek içerisinde nazal svablarda %1,4 oranında pozitiflik bildirilmiştir (Lim ve diğ., 2023). Afrika kıtasında ise IDV ilk kez 2023 yılında Nijerya'da 80 hayvan üzerinde tespit edilmiş ve %35,2'lik pozitiflik saptanmıştır (Anjorin ve diğ., 2023).

IDV ülkemizde ilk kez 2020 yılında Yılmaz ve diğ. tarafından tespit edilmiş olup 76 örneği kapsayan çalışmada pozitiflik oranı %4 olarak rapor edilmiştir (Yılmaz ve diğ., 2020). Türkiye'de yapılan bir diğer çalışmada 2012-2021 yılları arasında toplanmış olan 219 nazal svab örneğinde %0,9 oranında pozitiflik bildirilmiştir (Yeşilbağ ve diğ., 2022). Bu verilere göre, ülkemizde IDV ile ilgili fazla sayıda çalışma bulunmamaktadır. Bu tez çalışmasında solunum güçlüğü, burun akıntısı, öksürük, halsizlik ve ateş bulguları ile seyreden solunum yolu hastalık tablosu gösteren sığırlardan alınan 279 adet nazal svab örneğinde yapılan RT-PCR analizleri sonucunda %1,79 oranında (n= 5/279) IDV-RNA'sı saptandı. Bu sonuçlarla ülkemizde Yılmaz ve diğ. tarafından daha önce yapılan sonuçları karşılaştırıldığında düşük fakat Yeşilbağ ve diğ. tarafından (2022) yapılan çalışma sonuçlarına göre daha yüksek olduğu görülmektedir. Bunun nedeni Yılmaz ve diğ. (2020) tarafından yapılan çalışmada toplanan

örnek sayısının 76 olması ve Yeşilbağ ve diğ. (2022) tarafından yapılan çalışmada ise arşiv örneklerinde kullanılmış ve RNA'nın bazı örneklerde yıkımlanmış olabileceğine bağlı olabilir.

Filogenetik analiz için yapılan sekans çalışmaları sonunda 2020 ve 2021 yılında toplanan ve pozitiflik saptanan 3 örnek D/OK genogrubunda, 2024 yılında toplanan ve pozitiflik saptanan 2 örnek ise D/Yama2019 genogrubunda kümelendi. Bu tablo Türkiye'de D/OK ve D/Yama2019 suşlarının sirküle olduğunu göstermektedir. D/OK genogrubunda kümelenen örnekler İtalya, Fransa, Danimarka ve İrlanda'da bildirilen infleunza D viruslarla %99.20-100 arasında benzerlik gösterdiği tespit edildi. D/Yama2019 genogrubunda kümelenen örnekler ise Türkiye, Çin ve Japonya'da bildirilen influenza D viruslarla %95.48 - 99.7 arasında benzerlik gösterdiği bulundu. Bu çalışmada ülkemizde daha önce yapılan moleküler prevalans çalışmalarında örnek sayısı bakımından daha fazla örnek taraması yapılmış olup 2020 yılında yapılan çalışmaya oranla daha düşük pozitiflik oranı saptanırken 2022 yılında yapılan çalışmaya oranla daha yüksek pozitiflik saptanmıştır. Bu tez çalışmasında yürütülen filogenetik analizler kapsamında tüm HEF geni sekanslaması yapıldı. Bu sonuçlara göre 2020 ve 2021 yıllarında pozitif saptanan örneklerde %99.47 oranında İtalya'da bildirilen IDV ile; 2024 yılında pozitif saptanan örneklerde %98.58 oranında Japonya'da bildirilen IDV ile benzerlik tespit edildi. Ülkemizde daha önce yapılan çalışmalarda D/Yama2019 suşları tespit edilirken bu tez çalışmasında yapılan analizlerle 2020-2021 yılları arasında D/OK suşunun sirküle olduğunu gösteren veriler elde edilmiştir. 2024 yılında alınan örneklerde D/Yama2019 suşunun tespit edilmesi ülkemizde her iki suşun da sirküle olduğunu işaret etmektedir. Her iki suşun da sirküle olmasının nedenleri arasında canlı sığır ve sığır ürünlerinin ithal edilmesi olabilir. Ayrıca çalışmamızda saptanan PP832904.1 nolu IDV'nin İtalya'da saptanan domuz kökenli MK965278.1 ile benzer bulunması bu çalışmada saptanan IDV'nin vahşi yaşam kökenli olabileceğini düşündürmektedir. Türkiye'de diğer IDV suşlarının sirküle olma ihtimali araştırmaya açık bir konudur.

IDV'nin hücre kültürlerinde izolasyonu için genellikle HRT-18 ve bazen ST, Vero, MDCK, MDBK hücreleri kullanılmaktadır (Hause ve diğ., 2014; Sreenivasan ve diğ., 2015; Holwerda ve diğ., 2019). Farklı ülkelerde HRT-18 ve ST hücrelerinde yapılan IDV izolasyonu çalışmalarında HRT-18 hücrelerinde CPE gözlenmezken ST hücrelerinde CPE gözlenmiş, virus izolasyonunun doğrulanması için real time RT-PCR, RT-PCR ve Hemaglütinasyon testlerinden yararlanılmıştır (Hause ve diğ., 2014; Collin ve diğ., 2015). Sadece HRT-18 hücrelerinde yapılan virus izolasyon çalışmalarında araştırmacılar tarafından CPE oluşumu görülmemiş ve virus izolasyonu RT-PCR ve/veya Hemaglutinasyon testleri ile doğrulanmıştır

(Ferguson ve diğ., 2015; Murakami ve diğ., 2016; Foni ve diğ., 2017). MDCK, MDBK ve Vero hücreleri kullanılarak da bazı virus izolasyonu araştırmaları yapılmıştır. Jiang ve diğ. tarafından yapılan bir çalışmada Vero ve MDBK hücrelerinde CPE gözlenmiş, MDCK hücrelerinde ise herhangi bir CPE bulgusuna rastlanmamıştır (Jiang ve diğ., 2014). Bu kapsamda 2017 yılında yapılan bir virus izolasyonu çalışmasında, real time RT-PCR sonucunda 29-36 Ct veren örneklerin HRT-18 hücre kültürlerinde yüksek Ct saptanmasına rağmen virus izolasyonunun başarısız olabileceği konusuna dikkat çekilmiştir (Ducatez ve diğ., 2015; Mekata ve diğ., 2018). Bu tez çalışmasında bu konuya dikkat edilmiş ve Ct değerleri 4. Pasaj sonuna kadar takip edilmiş düşük Ct'ler (11-30) saptanmıştır. Ayrıca bu örneklerle embriyolu tavuk yumurtasında da üretim çalışmaları yapılmıştır.

Duyarlı buzağıların üst solunum yollarında virusu saçma süreleri 4-6 günlük bir periyotta gerçekleşmektedir. Bu nedenle virus izolasyonunda örnekleme zamanının da önemli olduğu bildirilmiştir (Ferguson ve diğ., 2015; Mekata ve diğ., 2018). 2019 yılında yapılan bir çalışmada HRT-18 hücrelerinde bu tez çalışmasında olduğu gibi 4 pasaj sonunda virus izolasyonu tespit edilmiş olup pasaj sayısının arttırılması ile virusun konağa uyum sağlamasının daha kolay olacağı ve başarılı bir virus izolasyonu yapılabileceği önerilmiştir (Salem ve diğ., 2019).

IDV izolasyonu için embriyolu tavuk yumurtaları da kullanılmaktadır. (Liu ve diğ., 2020; Sreenivasan ve diğ. 2022). Bu tez çalışmasında IDV izolasyonu için HRT-18 hücrelerinin yanında embriyolu tavuk yumurtalarından da yararlanıldı. Real time RT-PCR ile pozitif bulunan ve Ct değerleri 25-34 arasında değişen 5 nazal svab örneğinden inokulum hazırlandı ve bu örneklerden 4 tanesinde başarılı bir şekilde hücre kültüründe virus izolasyonu gerçekleştirildi. Her pasaj sonrasında hücre supernatantları real time RT-PCR ile doğrulandı. Hücre kültürü çalışmalarına ek olarak 4. pasaj sonrası hücre sıvıları embriyolu tavuk yumurtasına inokule edildi. Hücre kültüründe izole edilemeyen bir örneğin embriyolu tavuk yumurtasında izole edilmesi hücre sıvısında virusun var olduğunu ancak sayısının real time RT-PCR ile tespit edilebilecek seviyenin altında kalmasından kaynaklanabileceği ve bir pasaj daha yapılması durumunda hücre kültüründe de pozitif sonuç elde edilme olasılığı bulunduğunu göstermiştir. Elde edilen veriler her iki yöntemle de virusların üretimi yapılabildiğini ancak bu yöntemlerden herhangi birinin yapılan çalışmalarda üstülüğü olduğunu göstermemektedir. Bu konuda daha detaylı olarak karşılaştırma çalışmaları sonucunda değerlendirme yapılması uygun olacaktır.

Farklı ülkelerde yapılan IDV seroprevalansı çalışmalarında farklı oranlarda sonuçlar bildirilmiştir. Amerika Birleşik Devletleri'nde 2014 ve 2015'te yapılan bir çalışmada, 41 eyaletten toplanan 1992 adet sığır serumunda yapılan bir çalışmada seroprevalans %77,5 olarak tespit edilmiştir (Silveira ve diğ., 2019). Arjantin'de 165 adet serumda yapılan çalışmada seroprevalans %68 olarak kaydedilmiştir (Alvarez ve diğ., 2023). Avrupa kıtasında IDV ilk olarak 2014 yılında Fransa'da bildirilmiş ve sonrasında İtalya, Danimarka, Lüksemburg, İrlanda, İsveç, İsviçre ve Birleşik Krallık'ta çeşitli çalışmalar yapılmıştır (Kwasnik ve diğ., 2023). Avrupa'da en yüksek IDV seroprevalansı bildiren ülkelerde saptanan değerleri sırasıyla %94,6, %92,4 ve %82,5 olmak üzere İrlanda, İtalya ve Lüksemburg'ta raporlanmıştır (Flynn ve diğ., 2018; Rosignoli ve diğ., 2017; Snoeck ve diğ., 2018). Fransa'da 3000 adet serum örneğinde yapılan seroprevalans çalışmalarında %47,2 pozitiflik saptanmıştır (Oliva ve diğ., 2019). İsveç'te 2019'da 461 adet ve 2020'de 338 süt örneğinde yapılan ELISA çalışmasında sırasıyla %32 ve %40 oranlarında pozitiflik bulunmuştur (Alvarez ve diğ., 2023).

Asya kıtasında yapılan seroloji temelli çalışmalar ilk olarak 2014 yılında Çin'de yapılmış ve 193 adet serum örneğinde %5,9'luk seroprevalans bildirilmiştir (Zhai ve diğ., 2017). Japonya'da ise 2010-2016 yılları arasında alınmış 1927 adet serumda yapılan seroloji çalışmalarında IDV pozitifliği %30,5 olarak tespit edilmiştir (Horimoto ve diğ., 2016). Kore'de 742 adet serum örneğindeki seroprevalans %54.7 olarak bildirilmiştir (Lim ve diğ., 2023).

Afrika kıtasında en yüksek seroprevalans 200 serum örneğinde yapılan bir çalışmada %35 olmak üzere Fas'ta, sonrasında 201 serum örneğinde %10,4 pozitiflik saptanan Togo'da ve 201 serum örneğinde %1,9 pozitiflik bulunan Benin'de bildirilmiştir (Salem ve diğ., 2017).

Ülkemizde IDV seroprevalansı daha önce çalışılmamıştır ve sığırlarda antikor yanıtını ölçen ticari bir serolojik test henüz bulunmamaktadır. Bu tez çalışmasında sığır serum örneklerinde IDV antikor tespiti için *in house* ELISA ve Hemaglütinasyon İnhibisyon testlerinden yararlanıldı. ELISA çalışmasında, 279 adet sığır serum örneğinde %28,31 oranında (n= 79/279) seropozitiflik tespit edildi. ELISA sonucunda pozitif çıkan serum örneklerinde HI testi ile titre tespiti yapıldı. Bu test sonucunda ELISA ile pozitif çıkan örneklerde 128-512 HI titresi görüldü. Seropozitif iki hayvanda aynı zamanda RT-PCR ile de pozitiflik saptandı. Bu tez çalışmasında yapılan ELISA ve hemaglutinasyon inhibisyon çalışmalarında yukarıda bahsedilen ve daha önce yapılan çalışmalarla karşılaştırıldığında Avrupa kıtasına oranla daha düşük değerler, Amerika Birleşik Devletleri'nde bildirilen seroprevalansa oranla düşük değerler, Asya'da Japonya ile yakın, Çin'den yüksek, Kore'den ise düşük değerler; Afrika kıtasında ise Fas'taki değerlere yakın, diğer ülkelerde bildirilen seroprevalansa oranla ise daha

yüksek değerler elde edilmiştir. Ayrıca ileriki çalışmalarda bütün serumların hem ELISA hem de hemaglutinasyon inhibisyon testi ile incelenerek değerlendirildikten sonra bir tek test ile incelenmesinde yarar vardır.

Günümüzde IDV tespitine yönelik ticari bir ELISA kiti mevcut değildir. Bu nedenle bu tez çalışmasında *in house* ELISA sisteminden yararlanıldı. ELISA ile elde edilen veriler IDV'nin Türkiye'deki seroprevalansını gösteren ilk sonuçlardır. Bahsedilen serolojik çalışmalar gelecekte IDV saptanmasına yönelik bir ELISA kiti sisteminin oluşturulmasına fayda sağlayacak veriler sunmaktadır.

Bu tez çalışmasında yapılan SDS-Page çalışmasında 100, 80, 70, ve 40kDA viral proteinler görüldü. Yüksek HI titreli bir serum örneği ile yapılan Western blot çalışmasında IDV antikorlarının 100 kDa civarında virusa bağlandığı tespit edildi. Bu bulgu bu proteinin karakterize edildikten sonra aşı çalışmaları ve tanısal testlerde kullanılmak üzere değerlendirilebileceğini göstermektedir. Bu kapsamda yapılan fazla çalışma bulunmamaktadır ve bu nedenle oluşan immun yanıtın virusun hangi proteinlerine karşı oluştuğunun anlaşılması için SDS-Page ve Western blot çalışmalarına önem verilmesinde yarar vardır.

IDV'nin insanlarda da infeksiyon oluşturabileceği ve zoonotik karakteri yönünde bazı raporlar vardır . 2019 yılında 2005-2017 yılları arasında toplanmış 1281 adet insan serumunda yapılan Hemaglutinasyon İnhibisiyon ve Virus Nötralizasyon testleri temelinde yapılan bir çalışmada en yüksek olarak 2014 yılında alınan örneklerde %46 oranında seroprevalans bildirilmiştir (Trombetta ve diğ., 2019). 2016 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan bir çalışmada daha önce sığırla yetiştirme yoluyla teması olan 35 insan ve daha önce hayvan yetiştiriciliği yapmamış 11 insandan alınan serum örnekleriyle yapılan Hemaglutinasyon İnhibisyon ve Mikronötralizasyon çalışması sonucunda sığırla teması olan örnek grubunda %94-97 oranında seroprevalans tespit edilmiştir (White ve diğ., 2016). 2023 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde 5 farklı çiftliğin dahil edildiği bir çalışmada, 31 çiftlik çalışanından farklı periyotlarla alınan 123 örnek üzerinde yapılan RT-PCR analizi sonucunda %29,3 oranında pozitiflik saptanmıştır (Leibler ve diğ., 2023). İnfluenza virusların antijenik olarak mutasyon yetenekleri göz önünde bulundurulduğunda geniş konak duyarlılığı ile birlikte insanlar üzerindeki etkisi araştırılmaya açık bir alandır.

IDV için geliştirilmiş bir aşı henüz olmadığı için, koruma ve kontrol uygulamaları sürveyans, risk değerlendirmesi ve biyogüvenlik kapsamında ilerlemektedir. Hayvan hareketlerinin takibi, düzenli hijyen ve dezenfeksiyon uygulamaları, bakım şartlarının iyileştirilmesi ve biyogüvenlik koruma kontrolde önemlidir (Asha ve Kumar, 2019; Gaudino

ve diğ., 2020). Henüz aşısı bulunmadığından acilen güvenli ve etkin bir aşının geliştirilmesinde yarar vardır.

Kilbourne 1980 yılında şöyle demiştir: “Eğer influenza bir enigma içinde gizemle sarılmış bir sır ise, o zaman viral genler sır, influenza virusların kodladıkları değişken yüzey antijenleri gizem, salgınların seyri ve nedeni ise en büyük enigma olacaktır.” (Kilbourne, 1980). Günümüzde gelişen teknoloji ile birlikte influenza virusların genetik özellikleri ve viral proteinlerinin araştırılması, antijenik drift ve shift sonucu oluşan mutasyonlarla türler arası geçişin ortaya koyulması, popülasyonlar temelinde seroprevalans çalışmaları yürütülmesi ve halk sağlığında potansiyel tehditler ile pandemi senaryolarına karşın aksiyon planı yapılması adına yapılan çalışmalar gelecek için önem teşkil etmektedir.

SONUÇ VE ÖNERİLER

- Bu tez çalışmasının ve diğer çalışmaların PCR verilerine göre IDV ülkemiz sığırlarında sirküle olmaktadır ve BRDC oluşumuna katkı sağlama riski olan bir virustur. BRDC sonucu oluşan tedavi ve buzağı ölümlerine bağlı ekonomik kayıplara dikkat çekilmesi ve bu konuda koruma ve kontrol çalışmalarının yapılmasında yarar vardır.
- Bu çalışmayla ilk kez elde edilen serolojik veriler IDV seroprevalansının yüksek (%28.31) olduğunu göstermektedir. Bu nedenle infeksiyonla mücadele edilmesi gerektiği ve sürveyans çalışmalarında diğer hayvanların ve insanların da dikkate alınmasında yarar vardır.
- Serosurvey çalışmalarında bu çalışmada *in house* ELISA kullanılmış ve bu veriler ülkemizde kullanılabilecek bir ELISA kiti geliştirilmesine katkı sağlayacaktır.
- Çalışmada viral proteinler SDS-Page ile ayrıştırılmış ve Western blot çalışması sonucuna göre sığırlarda IDV'ye karşı oluşan antikorların 100kDa civarında bir viral proteinle reaksiyon verdiği görülmüştür. Bu sonuca göre, Western blot çalışmalarının arttırılması ve antikorların bağlandığı bu tür proteinlerin karakterize edilerek gerek tanı gerek aşı çalışmalarında kullanılmak üzere değerlendirilmesinde fayda vardır.
- Moleküler epidemiyolojik çalışmalarda real time RT-PCR, RT-PCR sekans ve filogenetik analizlerin kullanılmasında yarar vardır. Bu yöntemlerle sahadaki sirküle olan viruslardaki antijenik değişiklikler ve varyant virusların araştırılması gerekmektedir.
- Sekans çalışmalarında sadece kısmi sekans değil tüm HEF geninin sekanslanmasında yarar vardır.
- HEF geninin tüm genom çalışmaları sonucunda, virusun D/OK ve D/Yama2019 suşuna benzer olduğu tespit edildiği için ülkemize özgün otojen aşı üretilmesi durumunda bu virusların kullanılması aşılama stratejileri açısıdan önem arz etmektedir.

- Hastalıkla mücadele ve korumak için sıkı biyogüvenlik önlemleri ve ülkemizde sirküle olan IDV virusları kullanılarak aşı geliştirilmesine gerek vardır.
- Annelerin aşılanarak maternal antikorlarla buzağıların erken yaşlarda IDV'den korunmasına destek olunmalıdır.
- Devlet tarafından koruma ve kontrole yönelik aşı geliştirme programının oluşturulmasında yarar vardır.

KAYNAKLAR

Alvarez, I., Hägglund, S., Näslund, K., Eriksson, A., Ahlgren, E., Ohlson, A., Ducatez, M.F., Meyer, G., Valarcher, J.F. ve Zohari, S., 2023, Detection of influenza D-specific antibodies in bulk tank milk from swedish dairy farms. *Viruses,* 15(4), 829.

Anjorin, A.A., Moronkeji, G.O., Temenu, G.O., Maiyegun, O.A., Fakorede, C.O., Ajoseh, S.O., Salami, W.O., Abegunrin, R.O., Amisu, K.O. ve Akinyemi, K.O., 2023, First molecular detection of influenza D virus in cattle from commercial farm in Nigeria, Sub-Saharan Africa. *One Health Bulletin*, 3(1), 19.

Asha, K. ve Kumar, B., 2019, Emerging influenza D virus threat: what we know so far!. *Journal of Clinical Medicine*, 8(2), 192.

Bahadoran, A., Lee, S.H., Wang, S.M., Manikam, R., Rajarajeswaran, J., Raju, C.S. ve Sekaran, S.D., 2016, Immune responses to influenza virus and its correlation to age and inherited factors. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1841.

Bähler, C., Steiner, A., Luginbühl, A., Ewy, A., Posthaus, H., Strabel, D., Kaufmann, T. ve Regula, G., 2012, Risk factors for death and unwanted early slaughter in Swiss veal calves kept at a specific animal welfare standard. *Research in Veterinary Science,* 92(1), 162–168.

Bailey, E.S., Fieldhouse, J.K., Alarja, N.A., Chen, D.D., Kovalik, M.E., Zemke, J.N., Choi, J.Y., Borkenhagen, L.K., Toh, T.H., Lee, J.S.Y., Chong, K.S. ve Gray, G.C., 2020, First sequence of influenza D virus identified in poultry farm bioaerosols in Sarawak, Malaysia. *Tropical Diseases, Travel Medicine and Vaccines.* 12(6), 5.

Barrett D.C., 2000, The calf pneumonia complex - treatment decisions. *Cattle Practise*, 8, 135-138.

Barrington, G.M. ve Parish, S.M., 2001, Bovine neonatal immunology.The Veterinary clinics of North America. *Food Animal Practice,* 17(3), 463–476.

Bouvier, N.M. ve Palese, P., 2008. The biology of influenza viruses. *Vaccine,* 26(4),49–53.

Brown, E., Marshall, A.H., Mitchell, H.J. ve Byrne, A.W., 2019, Cattle movements in Northern Ireland form a robust network: implications for disease management. *Preventive Veterinary Medicine,* 170, 104740.

Callan, R.J. ve Garry, F.B., 2002, Biosecurity and bovine respiratory disease.The Veterinary clinics of North America. *Food Animal Practice,* 18(1), 57–77.

Campbell, D.J. ve Koch, M.A., 2011, Phenotypical and functional specialization of FOXP3+ regulatory T cells. *Immunology,* 11(2), 119–130.

CDC. 2021. How flu viruses can change: 'drift' and 'shift.' understanding influenza viruses. https://www.cdc.gov/flu/about/viruses/change.htm. [Ziyaret Tarihi: 8 Nisan 2023]

Chai, J., Capik, S., Kegley, B., Richeson, J., Powell, J ve Zhao, J., 2022, Bovine respiratory microbiota of feedlot cattle and its association with disease. *Veterinary Research,* 53.

Chiapponi, C., Ducatez, M., Faccini, S., Foni, E., Gaudino, M., Hägglund, S., Luppi, A., Meyer, G., Moreno, A., Näslund, K., Nemanichvili, N., Oliva, J., Prosperi, A., Rosignoli, C., Renault, V., Saegerman, C., Sausy, A., Snoeck, C., Valarcher, J.F. Verheije, H. ve Siamak Zohari S., 2020. Risk assessment for influenza D in europe. *EFSA Supporting Publication* 17(6), 17.

Chiapponi, C., Faccini, S., Fusaro, A., Moreno, A., Prosperi, A., Merenda, M., Baioni, L., Gabbi, V., Rosignoli, C., Alborali, G.L., Cavicchio, L., Monne, I., Torreggiani, C., Luppi, A. ve Foni, E., 2019, Detection of a new genetic cluster of influenza D virus in italian cattle. *Viruses,* 11(12), 1110.

Collin, E.A., Sheng, Z., Lang, Y., Ma, W., Hause, B.M. ve Li, F., 2015, Cocirculation of two distinct genetic and antigenic lineages of proposed influenza D virus in cattle. *Journal of Virology,* 89(2), 1036–1042.

Cortese, V.S., 2009, Neonatal immunology. *Food Animal Practice,* 25(1), 221–227.

Crowther, J.R., 1995, Basic immunology. In: Crowther, J.R.(eds) ELISA. *Methods in Molecular Biology*, vol 42. Humana Press.

da Silva, M.S., Mosena, A.C.S., Baumbach, L., Demoliner, M., Gularte, J.S., Pavarini, S.P., Driemeier, D., Weber, M.N., Spilki, F.R. ve Canal, C.W., 2022. Cattle influenza D virus in Brazil is divergent from established lineages. *Archives of Virology*, 167(4), 1181–1184.

Dane, H., Duffy, C., Guelbenzu, M., Hause, B., Fee, S., Forster, F., McMenamy, M.J ve Lemon, K., 2019, Detection of influenza D virus in bovine respiratory disease samples, UK. *Transboundary and Emerging Diseases,* 66(5), 2184–2187.

Dubrovsky, S.A., Van Eenennaam, A.L., Aly, S.S., Karle, B.M., Rossitto, P.V., Overton, M.W., Lehenbauer, T.W ve Fadel, J.G., 2020, Preweaning cost of bovine respiratory disease (BRD) and cost-benefit of implementation of preventative measures in calves on California dairies: The BRD 10K study. *Journal of Dairy Sscience,* 103(2), 1583–1597.

Ducatez, M.F., Pelletier, C ve Meyer, G., 2015, Influenza D virus in cattle, France, 2011-2014.*Emerging Infectious Diseases,* 21(2), 368–371.

Faccini, S., De Mattia, A., Chiapponi, C., Barbieri, I., Boniotti, M.B., Rosignoli, C., Franzini, G., Moreno, A., Foni, E. ve Nigrelli, A.D., 2017, Development and evaluation of a new real time RT-PCR assay for detection of proposed influenza D virus. *Journal of Virological Methods,* 243, 31–34.

Ferguson, L., Eckard, L., Epperson, W.B., Long, L.P., Smith, D., Huston, C., Genova, S., Webby, R. ve Wan, X.F., 2015, Influenza D virus infection in Mississippi beef cattle. *Virology,* 486, 28–34.

Ferguson, L., Olivier, A.K., Genova, S., Epperson, W.B., Smith, D.R., Schneider, L., Barton, K., McCuan, K., Webby, R.J. ve Wan, X.F., 2016, pathogenesis of ınfluenza d virus in cattle. *Journal of Virology,* 90(12), 5636–5642.

Flynn, O., Gallagher, C., Mooney, J., Irvine, C., Ducatez, M., Hause, B., McGrath, G. ve Ryan, E., 2018, Influenza D virus in cattle, ıreland. *Emerging Infectious Diseases,* 24(2), 389–391.

Foni, E., Chiapponi, C., Baioni, L., Zanni, I., Merenda, M., Rosignoli, C., Kyriakis, C.S., Luini, M.V., Mandola, M.L., Bolzoni, L., Nigrelli, A.D ve Faccini, S., 2017, Influenza D in Italy: towards a better understanding of an emerging viral infection in swine. *Scientific Reports,* 7(1), 11660.

Fulton, R.W., 2009, Viral diseases of the bovine respiratory tract. *Food Animal Practice,* 171–191.

Fulton, R.W., Cook, B.J., Step, D.L., Confer, A.W., Saliki, J.T., Payton, M.E., Burge, L.J., Welsh, R.D. ve Blood, K.S., 2002, Evaluation of health status of calves and the impact on feedlot performance: assessment of a retained ownership program for postweaning calves. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 66(3), 173–180.

Fusade-Boyer, M., Pato, P.S., Komlan, M., Dogno, K., Batawui, K., Go-Maro, E., McKenzie, P., Guinat, C., Secula, A., Paul, M., Webby, R.J., Tran, A., Waret-Szkuta, A. ve Ducatez, M.F., 2020, Risk mapping of ınfluenza D virus occurrence in ruminants and swine in togo using a spatial multicriteria decision analysis approach. *Viruses,* 12(2), 128.

Goecke, N.B., Liang, Y., Otten, N.D., Hjulsager, C.K. ve Larsen, L.E., 2022, characterization of ınfluenza D virus in danish calves. *Viruses,* 14(2), 423.

Hao, S., Ning, K., Küz, Ç.A., McFarlin, S., Cheng, F. ve Qiu, J., 2022, Eight years' advances on Bourbon virus, a tick-born Thogotovirus of the Orthomyxovirus family. *Zoonoses*, 2(1), 18.

Hause, B.M., Ducatez, M., Collin, E.A., Ran, Z., Liu, R., Sheng, Z., Armien, A., Kaplan, B., Chakravarty, S., Hoppe, A.D., Webby, R.J., Simonson, R.R. ve Li, F., 2013, Isolation of a novel swine influenza virus from Oklahoma in 2011 which is distantly related to human influenza C viruses. *PLoS Pathogens,* 9(2), e1003176.

Hause, B.M., Collin, E.A., Liu, R., Huang, B., Sheng, Z., Lu, W., Wang, D., Nelson, E.A. ve Li, F., 2014, Characterization of a novel influenza virus in cattle and Swine: proposal for a new genus in the Orthomyxoviridae family. *mBio,* 5(2), e00031–e14.

Hause, B.M., Huntimer, L., Falkenberg, S., Henningson, J., Lechtenberg, K. ve Halbur, T., 2017, An inactivated influenza D virus vaccine partially protects cattle from respiratory disease caused by homologous challenge. *Veterinary Microbiology,* 199, 47–53.

Hayakawa, J., Masuko, T., Takehana, T ve Suzuki, T., 2020, Genetic and antigenic characterization and retrospective surveillance of bovine influenza d viruses identified in hokkaido, japan from 2018 to 2020. *Viruses,* 12(8), 877.

Henritzi, D., Hoffmann, B., Wacheck, S., Pesch, S., Herrler, G., Beer, M ve Harder, T.C. (2019) A newly developed tetraplex real time RT-PCR for simultaneous screening of influenza virus types A, B, C and D. *Influenza and Other Respiratory Viruses,* 13(1), 71–82.

Hirose, R., Daidoji, T., Naito, Y., Watanabe, Y., Arai, Y., Oda, T., Konishi, H., Yamawaki, M., Itoh, Y ve Nakaya, T., 2016, Long-term detection of seasonal influenza RNA in faeces and intestine. *Clinical Microbiology and Infection,* 22(9), 813.

Holwerda, M., Kelly, J., Laloli, L., Stürmer, I., Portmann, J., Stalder, H ve Dijkman, R., 2019, Determining the replication kinetics and cellular tropism of influenza D virus on primary well-differentiated human airway epithelial cells. *Viruses,* 11(4). 377.

Horimoto, T., Hiono, T., Mekata, H., Odagiri, T., Lei, Z., Kobayashi, T., Norimine, J., Inoshima, Y., Hikono, H., Murakami, K., Sato, R., Murakami, H., Sakaguchi, M., Ishii, K., Ando, T., Otomaru, K., Ozawa, M., Sakoda, Y ve Murakami, S., 2016, Nationwide distribution of bovine influenza d virus infection in Japan. *PloS One,* 11(9), e0163828.

Huang, C., Yu, J., Hause, B.M., Park, J.Y., Sreenivasan, C., Uprety, T., Sheng, Z., Wang, D. ve Li, F., 2021, Emergence of new phylogenetic lineage of influenza D virus with broad antigenicity in California, United States. *Emerging Microbes and Infections*, 10(1), 739–742.

Ishida, H., Murakami, S., Kamiki, H., Matsugo, H., Katayama, M., Sekine, W., Ohira, K., Takenaka-Uema, A. ve Horimoto, T., 2021, Construction of an influenza d virus with an eight-segmented genome. *Viruses,* 13(11), 2166.

Ishida, H., Murakami, S., Kamiki, H., Matsugo, H., Takenaka-Uema, A ve Horimoto, T., 2020, Establishment of a reverse genetics system for influenza d virus. *Journal of Virology,* 94(10), e01767-19.

Jiang, W.M., Wang, S.C., Peng, C., Yu, J.M., Zhuang, Q.Y., Hou, G.Y., Liu, S., Li, J.P ve Chen, J.M., 2014, Identification of a potential novel type of influenza virus in bovine in China. *Virus Genes,* 49(3), 493–496.

Kapoor, S. ve Dhama, K., 2014, Role of migratory birds in spreading influenza viruses.In: Insight into influenza viruses of animals and humans. Springer International Publishing, 87–101.

Katayama, M., Murakami, S., Ishida, H., Matsugo, H., Sekine, W., Ohira, K., Takenaka-Uema, A ve Horimoto, T., 2024, Antigenic commonality and divergence of hemagglutinin-esterase-fusion protein among influenza D virus lineages revealed using epitope mapping. *Journal of Virology.* 98(3), e0190823.

Kilbourne, E.D., 1980, Influenza: viral determinants of the pathogenicity and epidemicity of an invariant disease of variable occurrence. Philosophical transactions of the Royal Society of London. *Biological Sciences,* 288(1029), 291–297.

Kim, H., Webster, R.G ve Webby, R.J., 2018, Influenza virus: dealing with a drifting and shifting pathogen. *Viral Immunology,* 31(2), 174–183.

Klimov, A., Balish, A veguilla, V., Sun, H., Schiffer, J., Lu, X., Katz, J.M ve Hancock, K., 2012, Influenza virus titration, antigenic characterization, and serological methods for antibody detection. *Methods in Molecular*, 865, 25–51.

Krauss, S., Walker, D., Webster, R.G., 2012, Influenza Virus Isolation.In: Kawaoka, Y., Neumann, G.(eds) *Influenza Virus.Methods in Molecular Biology*, vol 865. Humana Press.

Kreijtz, J.H., Fouchier, R.A ve Rimmelzwaan, G.F., 2011, Immune responses to influenza virus infection. *Virus Research,* 162(1-2), 19–30.

Kuchipudi, S.V. ve Nissly, R.H., 2018, Novel flu viruses in bats and cattle: "Pushing the envelope" of influenza infection. *Veterinary Sciences*, 5(3), 71.

Kumar, B., Rajput, R., Pati, D.R. ve Khanna, M., 2015, Potent intracellular knock-down of ınfluenza a virus m2 gene transcript by dnazymes considerably reduces viral replication in host cells. *Molecular Biotechnology*, 57(9), 836–845.

Kurcubic, V., Djokovic, R., Ilic, Z., Vaskovic, N. ve Petrovic, M., 2019, Bovine respiratory disease complex (brdc): a review of lung lesions and reducing of quality of carcasses. *Biotechnology in Animal Husbandry*. 35, 209–217.

Kwasnik, M., Rola, J. ve Rozek, W., 2023, Influenza d in domestic and wild animals. *Viruses*, 15(12), 2433.

Lade, K.S., Sawant, S.D. ve Singh, M.C., 2011., Review on influenza with special emphasis on swine flu., *International Journal of Current Pharmaceutical Research*, 3(1), 97–107.

Lago, A., McGuirk, S.M., Bennett, T.B., Cook, N.B. ve Nordlund, K.V., 2006, Calf respiratory disease and pen microenvironments in naturally ventilated calf barns in winter. *Journal of Dairy Science,* 89(10), 4014–4025.

Lam, J.H. ve Baumgarth, N., 2019, The multifaceted b cell response to influenza virus. *Journal of Immunology,* 202(2), 351–359.

Lamere, M.W., Moquin, A., Lee, F.E., Misra, R.S., Blair, P.J., Haynes, L., Randall, T.D., Lund, F.E. ve Kaminski, D.A., 2011, Regulation of antinucleoprotein IgG by systemic vaccination and its effect on influenza virus clearance. *Journal of Virology,* 85(10), 5027–5035.

Lanave, G., Camero, M., Coppola, C., Marchi, S., Cascone, G., Salina, F., Coltraro, M., Odigie, A. E., Montomoli, E., Chiapponi, C., Cicirelli, V., Martella, V. ve Trombetta, C.M., 2024, Serological evidence for circulation of influenza d virus in the ovine population in italy. *Pathogens,* 13(2), 162.

Lava, M., Pardon, B., Schüpbach-Regula, G., Keckeis, K., Deprez, P., Steiner, A. ve Meylan, M., 2016, Effect of calf purchase and other herd-level risk factors on mortality, unwanted early slaughter, and use of antimicrobial group treatments in Swiss veal calf operations. *Preventive Veterinary Medicine,* 126, 81–88.

Leibler, J.H., Abdelgadir, A., Seidel, J., White, R.F., Johnson, W.E., Reynolds, S.J., Gray, G.C. ve Schaeffer, J.W., 2023, Influenza D virus exposure among US cattle workers: A call for surveillance. *Zoonoses and Public Health*, 70(2), 166–170.

Lestari, V.S., Rahardja, D.P. ve Sirajuddin, S.N., 2019, Identification of biosecurity on beef cattle farms. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 247(1)

Lim, E.H., Lim, S.I., Kim, M.J., Kwon, M.J., Kim, M.J., Lee, K.B., Choe, S.E., An, D.J., Hyun, B.H., Park, J.Y., Bae, Y.C., Jeoung, H.Y., Lee, K.K. ve Lee, Y.H., 2023, First detection of influenza d virus infection in cattle and pigs in the republic of korea. *Microorganisms,* 11(7), 1751.

Liu, R., Sheng, Z., Huang, C., Wang, D ve Li, F., 2020, Influenza D virus. *Current Opinion in Virology*, 44, 154–161.

Long, J.S., Mistry, B., Haslam, S.M ve Barclay, W.S., 2019, Host and viral determinants of influenza A virus species specificity.Nature reviews. *Microbiology,* 17(2), 67–81.

Luo, J., Ferguson, L., Smith, D.R., Woolums, A.R., Epperson, W.B. ve Wan, X.F., 2017, Serological evidence for high prevalence of influenza d viruses in cattle, Nebraska, United States, 2003-2004. *Virology,* 501, 88–91.

McGuirk, S.M., 2008, Disease management of dairy calves and heifers. The Veterinary clinics of North America. *Food Animal Practice,* 24(1), 139–153.

Mekata, H., Yamamoto, M., Hamabe, S., Tanaka, H., Omatsu, T., Mizutani, T., Hause, B.M ve Okabayashi, T., 2018, Molecular epidemiological survey and phylogenetic analysis of bovine influenza D virus in Japan. *Transboundary and Emerging Diseases,* 65(2), 355–360.

Metkar, S.S., Menaa, C., Pardo, J., Wang, B., Wallich, R., Freudenberg, M., Kim, S., Raja, S.M., Shi, L., Simon, M.M. ve Froelich, C.J., 2008, Human and mouse granzyme A induce a proinflammatory cytokine response. *Immunity,* 29(5), 720–733.

Mitra, N., Cernicchiaro, N., Torres, S., Li, F ve Hause, B.M., 2016, Metagenomic characterization of the virome associated with bovine respiratory disease in feedlot cattle identified novel viruses and suggests an etiologic role for influenza D virus. *The Journal of General Virology,* 97(8), 1771–1784.

Molini, U., Curini, V., Jacobs, E., Tongo, E., Berjaoui, S., Hemberger, M.Y., Puglia, I., Jago, M., Khaiseb, S., Cattoli, G., Dundon, W.G., Lorusso, A ve Di Giallonardo, F., 2022, First influenza D virus full-genome sequence retrieved from livestock in namibia, Africa. *Acta Tropica,* 232, 106482.

Moran, J., 2002, Calf rearing: a practical guide, second edition calf rearing. Second Edi.ed. John Moran. Melbourne: Landlinks Press.

Moreno, A., Lelli, D., Lavazza, A., Sozzi, E., Zanni, I., Chiapponi, C., Foni, E., Capucci, L. ve Brocchi, E., 2019, MAb-based competitive ELISA for the detection of antibodies against influenza D virus. *Transboundary and Emerging Diseases,* 66(1), 268–276.

Murakami, S., Endoh, M., Kobayashi, T., Takenaka-Uema, A., Chambers, J.K., Uchida, K., Nishihara, M., Hause, B. ve Horimoto, T., 2016, Influenza d virus infection in herd of cattle, Japan. *Emerging Infectious Diseases*, 22(8), 1517–1519.

Murakami, S., Odagiri, T., Melaku, S.K., Bazartseren, B., Ishida, H., Takenaka-Uema, A., Muraki, Y., Sentsui, H. ve Horimoto, T., 2019, Influenza d virus infection in dromedary camels, ethiopia. *Emerging Infectious Diseases,* 25(6), 1224–1226.

Murakami, S., Sato, R., Ishida, H., Katayama, M., Takenaka-Uema, A. ve Horimoto, T., 2020, Influenza d virus of new phylogenetic lineage, japan. *Emerging Infectious Diseases*, 26(1), 168–171.

NADIS., 2007, Health bulletin: respiratory disease in cattle. *UK, NADIS*, 1-3.

Nedland, H., Wollman, J., Sreenivasan, C., Quast, M., Singrey, A., Fawcett, L., Christopher-Hennings, J., Nelson, E., Kaushik, R.S., Wang, D. ve Li, F., 2018, Serological evidence for the co-circulation of two lineages of influenza D viruses in equine populations of the midwest united states. *Zoonoses and Public Health,* 65(1), 148–154.

Ng, T.F., Kondov, N.O., Deng, X., Van Eenennaam, A., Neibergs, H.L. ve Delwart, E., 2015, A metagenomics and case-control study to identify viruses associated with bovine respiratory disease. *Journal of Virology*, 89(10), 5340–5349.

Nikolich-Žugich, J., Bradshaw, C.M., Uhrlaub, J.L. ve Watanabe, M., 2021, Immunity to acute virus infections with advanced age. *Current Opinion in Virology,* 46, 45–58.

Nissly, R.H., Zaman, N., Ibrahim, P.A.S., McDaniel, K., Lim, L., Kiser, J.N., Bird, I., Chothe, S.K., Bhushan, G.L., Vandegrift, K., Neibergs, H.L. ve Kuchipudi, S.V., 2020, Influenza c and d viral load in cattle correlates with bovine respiratory disease (BRD): emerging role of orthomyxoviruses in the pathogenesis of BRD. *Virology,* 551, 10–15.

Noda, T. ve Kawaoka, Y., 2010, Structure of influenza virus ribonucleoprotein complexes and their packaging into virions. *Reviews in Medical Virology*, 20(6), 380–391.

Nogales, A., Aydillo, T., Ávila-Pérez, G., Escalera, A., Chiem, K., Cadagan, R., DeDiego, M.L., Li, F., García-Sastre, A. ve Martínez-Sobrido, L., 2019, Functional characterization and direct comparison of influenza a, b, c, and d ns1 proteins in vitro and in vivo. *Frontiers in Microbiology,* 10, 2862.

Nuwarda, R.F., Alharbi, A.A. ve Kayser, V., 2021, An overview of influenza viruses and vaccines. *Vaccines,* 9(9), 1032.

Okda, F.A., Griffith, E., Sakr, A., Nelson, E. ve Webby, R., 2020, New diagnostic assays for differential diagnosis between the two distinct lineages of bovine influenza d viruses and human influenza c viruses. *Frontiers in Veterinary Science,* 7, 605704.

Oliva, J., Eichenbaum, A., Belin, J., Gaudino, M., Guillotin, J., Alzieu, J.P., Nicollet, P., Brugidou, R., Gueneau, E., Michel, E., Meyer, G. ve Ducatez, M.F., 2019, Serological evidence of influenza d virus circulation among cattle and small ruminants in france. *Viruses,* 11(6), 516

Pappas, C., Aguilar, P.V., Basler, C.F., Solórzano, A., Zeng, H., Perrone, L.A., Palese, P., García-Sastre, A., Katz, J.M. ve Tumpey, T.M., 2008, Single gene reassortants identify a critical role for PB1, HA, and NA in the high virulence of the 1918 pandemic influenza virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(8), 3064–3069.

Pardon, B., De Bleecker, K., Dewulf, J., Callens, J., Boyen, F., Catry, B. ve Deprez, P., 2011, Prevalence of respiratory pathogens in diseased, non-vaccinated, routinely medicated veal calves. *The Veterinary Record*, 169(11), 278.

Paterson, D. ve Fodor, E., 2012, Emerging roles for the influenza A virus nuclear export protein (NEP), *PLoS Pathogens*, 8(12), e1003019.

Quast, M., Sreenivasan, C., Sexton, G., Nedland, H., Singrey, A., Fawcett, L., Miller, G., Lauer, D., Voss, S., Pollock, S., Cunha, C.W., Christopher-Hennings, J., Nelson, E. ve Li, F., 2015,

Serological evidence for the presence of influenza D virus in small ruminants. *Veterinary Microbiology,* 180(3-4), 281–285.

Quigley, J.D., Kost, C.J. ve Wolfe, T.M., 2002, Absorption of protein and IgG in calves fed a colostrum supplement or replacer. *Journal of Dairy Science,* 85(5), 1243–1248.

Ramos-Vara, J.A ve Miller, M.A., 2014, When tissue antigens and antibodies get along: revisiting the technical aspects of immunohistochemistry--the red, brown, and blue technique. *Veterinary Pathology*, 51(1), 42–87.

Rangel-Moreno, J., Carragher, D.M., de la Luz Garcia-Hernandez, M., Hwang, J.Y., Kusser, K., Hartson, L., Kolls, J.K., Khader, S.A. ve Randall, T.D., 2011, The development of inducible bronchus-associated lymphoid tissue depends on IL-17. *Nature Immunology*, 12(7), 639–646.

Rosenberg, I.M., 2005, Protein analysis and purification: benchtop techniques: second Edition protein analysis and purification: benchtop techniques: second edition. Boston, MA: Birkhäuser Boston.

Rosignoli C., Faccini S., Merenda M., Chiapponi C., De Mattia A., Bufalo G., Garbarino C., Baioni L., Bolzoni L., Nigrelli A. ve Foni, E., 2017, Influenza D virus infection in cattle in italy. *Large Animal Review.* 23, 123–128.

Ruiz, M., Puig, A., Bassols, M., Fraile, L. ve Armengol, R., 2022, Influenza d virus: a review and update of its role in bovine respiratory syndrome, *Viruses*, 14(12), 2717.

Saegerman, C., Gaudino, M., Savard, C., Broes, A., Ariel, O., Meyer, G. ve Ducatez, M.F., 2022, Influenza D virus in respiratory disease in Canadian, province of québec, cattle: relative importance and evidence of new reassortment between different clades. *Transboundary and Emerging Diseases,* 69(3), 1227–1245.

Salem, E., Cook, E.A.J., Lbacha, H.A., Oliva, J., Awoume, F., Aplogan, G.L., Hymann, E.C., Muloi, D., Deem, S.L., Alali, S., Zouagui, Z., Fèvre, E.M., Meyer, G. ve Ducatez, M.F., 2017, serologic evidence for ınfluenza c and d virus among ruminants and camelids, africa, 1991-2015. *Emerging Infectious Diseases,* 23(9), 1556–1559.

Salem, E., Hägglund, S., Cassard, H., Corre, T., Näslund, K., Foret, C., Gauthier, D., Pinard, A., Delverdier, M., Zohari, S., Valarcher, J.F., Ducatez, M. ve Meyer, G., 2019, Pathogenesis, host innate immune response, and aerosol transmission of influenza d virus in Cattle. *Journal of Virology,* 93(7), e01853-18.

Sanogo, I.N., Kouakou, C., Batawui, K., Djegui, F., Byarugaba, D.K., Adjin, R., Adjabli, K., Wabwire-Mangen, F., Erima, B., Atim, G., Ukuli, Q.A., Tugume, T., Dogno, K., Go-Maro, W., Couacy-Hymann, E., Kayali, G., McKenzie, P., Webby, R.J. ve Ducatez, M.F., 2021, Serological surveillance of influenza virus in ruminants and swine in west and east africa, 2017-2020. *Viruses,* 13(9), 1749.

Saunders-Hastings, P.R. ve Krewski, D., 2016, Reviewing the history of pandemic influenza: understanding patterns of emergence and transmission. *Pathogens*, 5(4), 66.

Seçkin, C., Alpun Kalaycı, G., Turan, N., Yılmaz, A., Çizmecigil, U.Y., Aydın, O., Richt, J.A. ve Yılmaz, H., 2018, Immunomodulatory effects of echinacea and pelargonium on the innate and adoptive immunity in calves. *Food and Agricultural Immunology*, 29(1), 744–761.

Shaw, M.L., Stone, K.L., Colangelo, C.M., Gulcicek, E.E. ve Palese, P., 2008, Cellular proteins in influenza virus particles. *PLoS Pathogens*, 4(6), e1000085.

Silveira, S., Falkenberg, S.M., Kaplan, B.S., Crossley, B., Ridpath, J.F., Bauermann, F.B., Fossler, C.P., Dargatz, D.A., Dassanayake, R.P., Vincent, A.L., Canal, C.W. ve Neill, J.D., 2019, Serosurvey for influenza D virus exposure in cattle, united states, 2014-2015. *Emerging Infectious Diseases,* 25(11), 2074–2080.

Skelton, R.M. ve Huber, V.C., 2022, Comparing influenza virus biology for understanding influenza d virus. *Viruses,* 14(5), 1036.

Smith, D.B., Gaunt, E.R., Digard, P., Templeton, K. ve Simmonds, P., 2016, Detection of influenza C virus but not influenza D virus in scottish respiratory samples. *Journal of Clinical Virology,* 74, 50–53.

Snoeck, C.J., Oliva, J., Pauly, M., Losch, S., Wildschutz, F., Muller, C.P., Hübschen, J.M. ve Ducatez, M.F., 2018, Influenza D virus circulation in cattle and swine, luxembourg, 2012-2016. *Emerging Infectious Diseases,* 24(7), 1388–1389.

Song, H., Qi, J., Khedri, Z., Diaz, S., Yu, H., Chen, X., Varki, A., Shi, Y. ve Gao, G.F., 2016, An Open Receptor-Binding Cavity of Hemagglutinin-Esterase-Fusion Glycoprotein from Newly-Identified Influenza D Virus: Basis for Its Broad Cell Tropism. *PLoS Pathogens*, 12(1), e1005411.

Spackman, E., 2020, Animal Influenza Virus.ed.Erica Spackman. New York, *Springer,* 53-66.

Sreenivasan, C., Thomas, M., Sheng, Z., Hause, B.M., Collin, E.A., Knudsen, D.E., Pillatzki, A., Nelson, E., Wang, D., Kaushik, R.S. ve Li, F., 2015, Replication and transmission of the novel bovine influenza d virus in a guinea pig model. *Journal of Virology*, 89(23), 11990–12001.

Sreenivasan, C.C., Thomas, M., Kaushik, R.S., Wang, D. ve Li, F., 2019, Influenza a in bovine species: a narrative literature review. *Viruses*, 11, 561

Sreenivasan, C.C., Sheng, Z., Wang, D. ve Li, F., 2021, Host range, biology, and species specificity of seven-segmented influenza viruses-a comparative review on influenza c and d. *Pathogens,* 10(12), 1583.

Sreenivasan, C.C., Uprety, T., Reedy, S.E., Temeeyasen, G., Hause, B.M., Wang, D., Li, F. ve Chambers, T.M., 2022, Experimental infection of horses with influenza d virus. *Viruses*, 14(4), 661.

Sreenivasan, C.C., Liu, R., Gao, R., Guo, Y., Hause, B.M., Thomas, M., Naveed, A., Clement, T., Rausch, D., Christopher-Hennings, J., Nelson, E., Druce, J., Zhao, M., Kaushik, R.S., Li, Q., Sheng, Z., Wang, D. ve Li, F., 2023, Influenza c and d viruses demonstrated a differential respiratory tissue tropism in a comparative pathogenesis study in guinea pigs. *Journal of Virology,* 97(6), e0035623.

Stelwagen, K., Carpenter, E., Haigh, B., Hodgkinson, A. ve Wheeler, T.T., 2009, Immune components of bovine colostrum and milk. *Journal of Animal Science,* 87(13), 3–9.

Studer, E., Schönecker, L., Meylan, M., Stucki, D., Dijkman, R., Holwerda, M., Glaus, A. ve Becker, J., 2021, Prevalence of brd-related viral pathogens in the upper respiratory tract of swiss veal calves. *Animals,* 11(7), 1940

Su, S., Fu, X., Li, G., Kerlin, F. ve Veit, M., 2017, Novel Influenza D virus: Epidemiology, pathology, evolution and biological characteristics. *Virulence,* 8(8), 1580–1591.

Taubenberger, J.K. ve Kash, J.C., 2010, Influenza virus evolution, host adaptation, and pandemic formation. *Cell Host ve Microbe*, 7(6), 440–451.

Taylor, J.D., Fulton, R.W., Lehenbauer, T.W., Step, D.L. ve Confer, A.W., 2010, The epidemiology of bovine respiratory disease: What is the evidence for predisposing factors? *The Canadian Veterinary Journal,* 51(10), 1095–1102.

Tobita, K., Sugiura, A., Enomote, C. ve Furuyama, M., 1975, Plaque assay and primary isolation of influenza A viruses in an established line of canine kidney cells (MDCK) in the presence of trypsin. *Medical Microbiology and Immunology*, 162(1), 9–14.

Trombetta, C.M., Marchi, S., Manini, I., Kistner, O., Li, F., Piu, P., Manenti, A., Biuso, F., Sreenivasan, C., Druce, J. ve Montomoli, E., 2019, Influenza d virus: serological evidence in the italian population from 2005 to 2017. *Viruses*, 12(1), 30.

Tse, L.V., Zhang, Y. ve Whittaker, G.R., 2013, Immunoplaque assay (Influenza Virus). *Bio-Protocol,* 3(21), e959.

Tumpey, T.M., Basler, C.F., Aguilar, P.V., Zeng, H., Solórzano, A., Swayne, D.E., Cox, N.J., Katz, J.M., Taubenberger, J.K., Palese, P. ve García-Sastre, A., 2005, Characterization of the reconstructed 1918 Spanish influenza pandemic virus. *Science*, 310(5745), 77–80.

USDA. Feedlot 99, part III: health management and biosecurity in U.S. feedlots, 1999, *United States Department of Agriculture, National Animal HealthMonitoring System* 2000:1/10/2013.

Vaira, A.M. ve Milne, R.G., 2008, Ophiovirus.In Encyclopedia of Virology (Third Edition) Edited by B.W.J.Mahy ve M.H.Van Regenmortel. Oxford: Academic Press.

Vermeulen, S.J., Chen, T.R., Speleman, F., Nollet, F., Van Roy, F.M. ve Mareel, M.M., 1998, Did the four human cancer cell lines DLD-1, HCT-15, HCT-8, and HRT-18 originate from one and the same patient? *Cancer Genetics and Cytogenetics,* 107(1), 76–79.

Wagner, E.M., 2013, Monitoring gene expression: quantitative real time rt-pcr. In Lipoproteins and cardiovascular disease: methods and protocols, ed. Lita A Freeman.Totowa, NJ: Humana Press, 19–45.

Wan, X.F., Ferguson, L., Oliva, J., Rubrum, A., Eckard, L., Zhang, X., Woolums, A.R., Lion, A., Meyer, G., Murakami, S., Ma, W., Horimoto, T., Webby, R., Ducatez, M.F. ve Epperson, W., 2020, Limited cross-protection provided by prior infection contributes to high prevalence of influenza d viruses in cattle. *Journal of Virology,* 94(18), e00240-20.

White, S.K., Ma, W., McDaniel, C.J., Gray, G.C. ve Lednicky, J.A., 2016, Serologic evidence of exposure to influenza D virus among persons with occupational contact with cattle. *Journal of Clinical Virology,* 81, 31–33.

Wolff, T. ve Veit, M., 2021, *Encyclopedia of Virology.* 4th ed. Volume 2 Elsevier; Cambridge, MA, USA, Influenza b, c and d viruses (Orthomyxoviridae).

World Health Organization., 2011, Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza. (https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/44518/9789241548090_eng.pdf?sequence=1) [Erişim Tarihi: 21 Mart 2022].

Xiang, K., Ying, G., Yan, Z., Shanshan, Y., Lei, Z., Hongjun, L. ve Maosheng, S., 2015, Progress on adenovirus-vectored universal influenza vaccines. *Human Vaccines Immunotherapeutics,* 11(5), 1209–1222.

Yeo, J.Y. ve Gan, S.K., 2021, Peering into avian influenza A(H5N8) for a Framework towards Pandemic Preparedness. *Viruses,* 13(11), 2276.

Yeşilbağ, K., Toker, E.B. ve Ates, O., 2022, Recent strains of influenza D virus create a new genetic cluster for European strains. *Microbial Pathogenesis*, 172, 105769.

Yılmaz, A., Umar, S., Turan, N., Aydın, O., Tali, H.E., Oğuzoğlu, T.C., Yılmaz, H., Richt, J.A. ve Ducatez, M.F., 2020, First report of influenza d virus infection in turkish cattle with respiratory disease. *Research in Veterinary Science*, 130, 98–102.

Yu, J., Hika, B., Liu, R., Sheng, Z., Hause, B.M., Li, F., Yu, J., Li, F. ve Wang, D., 2020, The first decade of research advances in influenza D virus. *Journal of General Virology,* 102(1)

Yu, J., Hika, B., Liu, R., Sheng, Z., Hause, B.M., Li, F. ve Wang, D., 2017, the hemagglutinin-esterase fusion glycoprotein is a primary determinant of the exceptional thermal and acid stability of influenza d virus. *mSphere*, 2(4), e00254-17.

Yu, J., Li, T., Wen, Z., Wu, S., Wang, Z., Zheng, J., Chen, M., Chen, F., Wei, W. K., Zhai, S. L. ve Liao, M., 2022, Identification of d/yama2019 lineage-like influenza d virus in chinese cattle. *Frontiers in Veterinary Science*, 9, 939456.

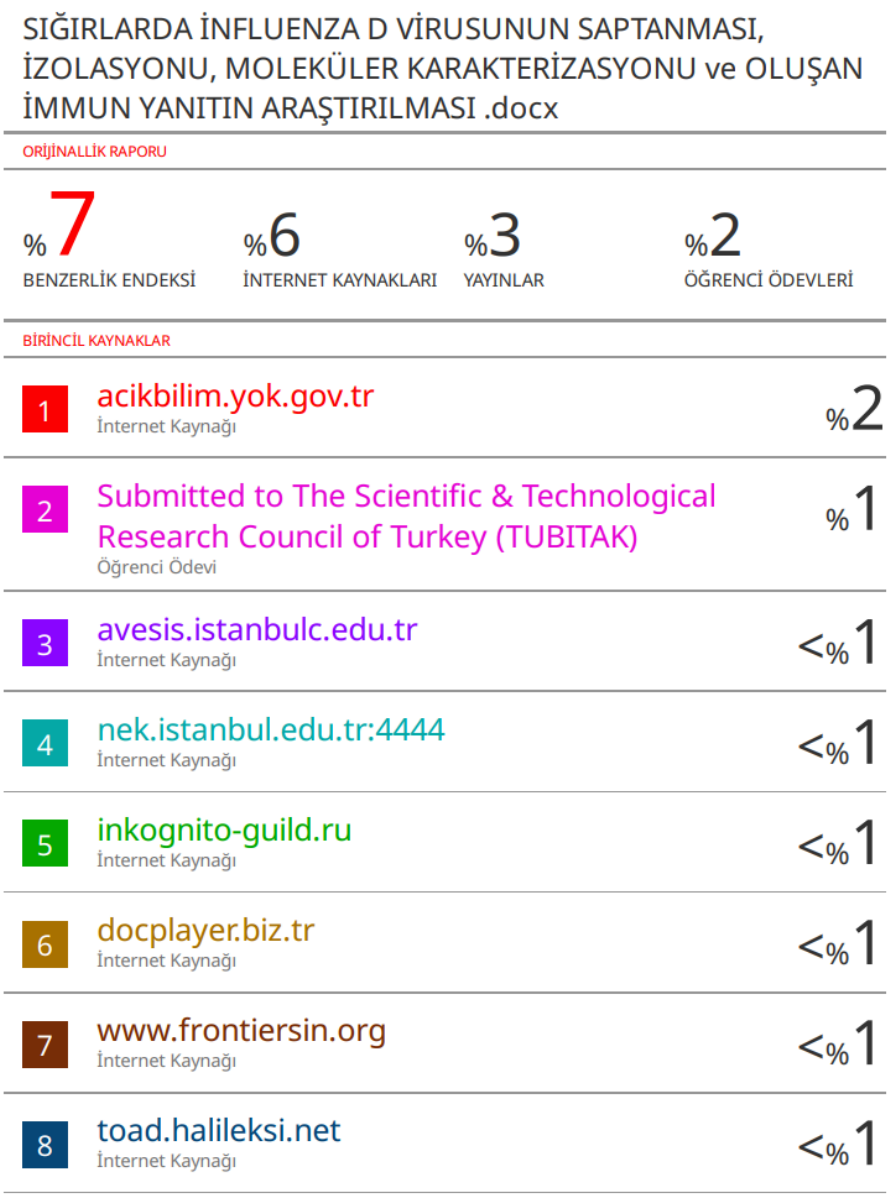
Zhai, S.L., Zhang, H., Chen, S.N., Zhou, X., Lin, T., Liu, R., Lv, D.H., Wen, X.H., Wei, W.K., Wang, D. ve Li, F., 2017, Influenza d virus in animal species in guangdong province, southern china. *Emerging Infectious Diseases*, 23(8), 1392–1396.

Zhang, H., Wang, Y., Porter, E., Lu, N., Li, Y., Yuan, F., Lohman, M., Noll, L., Zheng, W., Stoy, C., Lang, Y., Huber, V.C., Ma, W., Peddireddi, L., Fang, Y., Shi, J., Anderson, G., Liu, X. ve Bai, J., 2019, Development of a multiplex real time RT-PCR assay for simultaneous detection and differentiation of influenza A, B, C, and D viruses. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease,* 95(1), 59–66.

Zhang, J. ve Gauger, P.C., 2014, Isolation of swine influenza virus in cell cultures and embryonated chicken eggs. *Methods in Molecular Biology,* 1161, 265–276.

Zhu, M., Anirudhan, V., Du, R., Rong, L. ve Cui, Q., 2023, Influenza virus cell entry and targeted antiviral development. *Journal of Medical Virology*, 95(11), e29181.

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI



SIĞIRLARDA İNFLUENZA D VİRUSUNUN SAPTANMASI, İZOLASYONU, MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU ve OLUŞAN İMMUN YANITIN ARAŞTIRILMASI .docx

ORİJİNALLİK RAPORU

%7	%6	%3	%2
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	%2
2	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	%1
3	avesis.istanbulc.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
4	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	<%1
5	inkognito-guild.ru İnternet Kaynağı	<%1
6	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	<%1
7	www.frontiersin.org İnternet Kaynağı	<%1
8	toad.halileksi.net İnternet Kaynağı	<%1