



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**KOYUN PESTİVİRUSLARININ
(BORDER DISEASE VIRUS, BOVINE VIRUS
DIARRHOEA VIRUS) ANTİJENİK YAKINLIKLARININ
SERUM NÖTRALİZASYON TESTİ İLE
ARAŞTIRILMASI**

Çağlar ERGÜN

**VİROLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Tuba Çiğdem OĞUZOĞLU**

2012-ANKARA

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KOYUN PESTİVİRUSLARININ
(BORDER DISEASE VIRUS, BOVINE VIRUS
DIARRHOEA VIRUS) ANTİJENİK YAKINLIKLARININ
SERUM NÖTRALİZASYON TESTİ İLE
ARAŞTIRILMASI**

Çağlar ERGÜN

**VİROLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Tuba Çiğdem OĞUZOĞLU**

2012-ANKARA

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Viroloji Yüksek Lisans Programı

Çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından

Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 20/03/2012

Prof.Dr.Yılmaz AKÇA
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı

Prof.Dr. Hakan YARDIMCI
Ankara Üniversitesi
Raportör

Prof.Dr. Feray ALKAN
Ankara Üniversitesi

Prof.Dr. Aykut ÖZKUL
Ankara Üniversitesi

Doç.Dr. Tuba Çiğdem OĞUZOĞLU
Ankara Üniversitesi

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	i
İçindekiler	ii
Önsöz	iv
Simgeler ve Kısaltmalar	vi
Şekiller	vii
Çizelgeler	viii
1. GİRİŞ	
1.1. Tarihçe	1
1.2. Etiyoloji ve Pestivirusların Genel Özellikleri	2
1.3. Pestivirus Enfeksiyonlarında Konakçı Spektrumu	5
1.4. BVDV ve BDV Enfeksiyonlarında Klinik Bulgular	8
1.5. Pestivirus Enfeksiyonlarında Kros (Çapraz) Nötralizasyon	11
2. GEREÇ VE YÖNTEM	
2.1. GEREÇ	
2.1.1. Serum Örnekleri	15
2.1.2. Virus ve Hücre Kültürleri	15
2.1.3. Fötal Dana Serumumu	16
2.1.4. Konjugat	16
2.2. YÖNTEM	
2.2.1. Referenz Virusların Üretimi	17
2.2.2. Titrasyon	17
2.2.3. Peroksidaz Bağlı Antikor Boyama (PLA) Tekniği	18
2.2.4. Nötralizasyon	18
2.2.4.1. Virus Nötralizasyon Testi	18
2.2.4.2. Nötralizasyon İmmun Peroksidaz (NPLA) Tekniği	19
2.2.5. Pozitif Serumlarda Serum Nötralizasyon ₅₀ (SN ₅₀) Değerinin Tespiti	19
2.2.6. İstatistik Analiz	20
3. BULGULAR	
3.1. Viruslarının Uygun Hücre Kültürlerinde Üretilmesi ve Enfeksiyözite Güçlerinin Tespiti	22
3.2. Serolojik Bulgular	25
3.2.1. VNT ve NPLA Testi ile Koyun Serumlarının Seropozitiflik Oranının Tespiti	25
3.2.2. Pozitif Koyun Serumlarında SN ₅₀ Testi Bulguları	25
3.3. İşletmeler bazında pozitiflik oranlarının değerlendirilmesi	31

4. TARTIŞMA	35
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	40
ÖZET	41
SUMMARY	42
KAYNAKLAR	43
EKLER	50
Ek-1. Test edilen örneklerin VNT ve SN₅₀ değerleri.	50
ÖZGEÇMİŞ	56

ÖNSÖZ

Küçük ruminant (koyun ve keçi) türlerinde reproduktif sisteme yönelik bulgularla karakterize enfeksiyonlara neden olan *Pestiviruslar*, *Flaviviridae* ailesinin aynı isimli genusunda bulunmaktadır.

Her ne kadar Pestivirusların konakçı hayvan türüne göre yapılan taksonomisinde; sığırların esas konakçı olduğu Bovine Virus Diarrhoea Virus (BVDV), koyun ve keçilerde enfeksiyon oluşturan Border Disease Virus (BDV) yer almakta ise de her iki virusun söz konusu türlerde enfeksiyona neden oluşu sebebiyle bu viruslar “ruminant pestivirusları” olarak da adlandırılmaktadır.

Son yıllarda, Border Disease (BD) enfeksiyonunun küçük ruminant sürülerinde varlığı/yaygınlığı ve izole edilen etkenlerin moleküler karakterizasyonlarına yönelik birçok çalışma bildirilmiştir. Bu çalışmalarda Amerika, Yeni Zelanda, Avustralya ve İspanya, İtalya, İsviçre, İsveç gibi bazı Avrupa ülkelerinde enfeksiyonun varlığı/yaygınlığının yanısıra etkenlerin çeşitliliği de ortaya konulmuştur. Ayrıca Tunus'ta pestivirusla kontamine koyun çiçeği aşısı ile aşılamaı takiben ortaya çıkan enfeksiyonun etkeninin de bir BDV olduğu bildirilmiştir. Pestivirusların yaban hayattaki yaygınlığı da dikkat çekici bir olgudur. Özellikle İspanya'daki bazı geyik türlerinde gözlenen salgınlarda etken identifikasyonu yapıldığında, BD viruslarının yeni subgruplarının ortaya çıkmasının yanısıra, bu etkenlerin çiftlik hayvanlarında görülen Pestivirus enfeksiyonlarına da bir kaynak oluşturduğu düşünülmektedir. Ülkemizde de koyun ve keçilerde pestivirus ve BD enfeksiyonlarının varlığı tespit edilmiştir.

Pestivirus enfeksiyonları, sığır ve domuz yetiştiriciliği yapılan tüm ülkelerde sebep olduğu ağır ekonomik kayıplar nedeniyle; eski adıyla Office Internationale des Epizootie (OIE), yeni adıyla World Organization of Animal Health (WOAH)

listesinde bildirim mecburi hastalıklar grubunda yer almaktadır. Ekonomik kayıplara önemli bir örnek olarak; Hollanda'da yaşanan 1997-1998 Klasik Domuz Vebası (CSFV) salgını sırasında 6,5 milyon yetişkin domuz ve 2,6 milyon yavru domuzun itlaf edilmesi verilebilir. Domuz yetiştiriciliğinde CSFV yanı sıra özellikle BVDV ve BDV nedeniyle oluşan enfeksiyonların da varlığı, CSFV için Avrupa Birliği ülkelerinde getirilen itlaf yükümlülüğü noktasında, pestivirus enfeksiyonlarında ayırıcı teşhisi önemli kılmıştır. Ülkemizde yasal düzenlemeye dayalı halen sürdürülmekte olan Pestivirus enfeksiyonlarına ilişkin bir mücadele programı bulunmamasına rağmen, sözkonusu enfeksiyonların gerçek seroprevalanslarının saptanması ileride yürütülmesi muhtemel araştırmalar, zorunlu/isteğe bağlı kontrol programları geliştirilmesi yönünden büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle Pestivirus enfeksiyonlarında ayırıcı teşhis büyük önem kazanmaktadır.

Bu noktadan hareketle, planlanan bu çalışmada koyunculuk işletmelerinden alınan 300 adet kan serumu örneğinde, BVDV ve BDV referenz virusları kullanılarak yapılan nötralizasyon testi temeline dayalı Pestivirus enfeksiyonlarının ayırıcı teşhisi hedeflenmiştir.

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalında yüksek lisans tezimi yapmak üzere araştırma imkanı sağlayan Anabilim Dalı Başkanları Prof.Dr. Yılmaz AKÇA'ya ve Prof.Dr. İbrahim BURGU'ya (emekli), bu konuyu araştırmamı öneren, mesleki ve bilimsel yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Doç.Dr. T. Çiğdem OĞUZOĞLU'na, özellikle uyumlu bir ortamda birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum Viroloji Anabilim Dalının tüm öğretim üyelerine (Prof.Dr. Feray ALKAN, Prof.Dr. Aykut ÖZKUL, Prof.Dr. Seval BİLGE DAĞALP ve Doç.Dr. Taner KARAOĞLU), ayrıca çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen Araş.Gör. M. Özkan TİMURKAN ve doktora öğrencisi Sepandar GARGARİ'ye ve manevi desteğini her zaman yanımda hissettiğim aileme ve nişanlım Fulya YILMAZ'a teşekkürü bir borç bilirim.

SİMGELER ve KISALTMALAR

AEC :	Amino etil karbazol
BDV :	Border disease virus
BVDV :	Bovine virus diarrhoea virus
CPE :	Sitopatik etki
CSFV :	Klasik domuz vebası virusu
DKID ₅₀ :	Doku kültürü infektif doz 50
DMF :	Dimetil formamid
EDULB :	Dulbecco Mem
FDS :	Fötal dana serumu
HCV :	Hog cholera virus
Kb :	Kilobaz
MD :	Mucosal disease
MDBK:	Madine Derby Bovine Kidney
ml:	Mililitre
µl:	Mikrolitre
NCP:	Sitopatik olmayan etki
nm :	Nanometre
NPLA :	Nötralizasyon peroksidaz bağlı boyama
NS :	Non-structural (yapısal olmayan)
ORF :	Open reading frame
PLA :	Peroksidaz bağlı boyama
SN ₅₀ :	Serum nötralizasyon ₅₀
UTR :	Untranslated region

ŞEKİLLER

Şekil 3.1.1 NADL suşunun üretildiği MDBK hücre kültürü görüntüsü.	23
Şekil 3.1.2 NADL suşunun meydana getirdiği cpe görüntüsü.	23
Şekil 3.1.3 Moredun suşunun üretildiği SFT-R hücre kültürü görüntüsü.	24
Şekil 3.1.4 Moredun suşu için yapılan PLA boyama görüntüsü.	24
Şekil 3.2.1 Çizelge 3.2.3’de verilen değerlerin grafik olarak gösterilmesi.	28
Şekil 3.3.1 Birinci işletmedeki antikor pozitif serum örneklerinin SN ₅₀ değerlerinin BDV ve BVDV enfeksiyonu yönünden dağılımı.	32
Şekil 3.3.2 Birinci işletmede pozitiflik tespit edilen koyun serumlarında SN ₅₀ antikor titrelerine göre NPLA/VNT testi sonuçlarının sayısal olarak dağılımı.	33
Şekil 3.3.3 İkinci işletmedeki antikor pozitif serum örneklerinin SN ₅₀ değerlerinin BDV ve BVDV enfeksiyonu yönünden dağılımı.	34
Şekil 3.3.4 Birinci işletmede pozitiflik tespit edilen koyun serumlarında SN ₅₀ antikor titrelerine göre NPLA/VNT testi sonuçlarının sayısal olarak dağılımı.	34

ÇİZELGELER

Çizelge 3.2.1 Serum örneklerinde BDV antikorları yönünden BVDV pozitif ve BVDV negatif örneklerin dağılımı. 25

Çizelge 3.2.2 Tüm serum örneklerinde BDV antikorları yönünden BVDV antikorlarının dağılımı. 27

Çizelge 3.2.3 Pozitiflik saptanan serumlarda BDV antikorları yönünden BVDV antikorlarının SN₅₀ dağılımı. 28

Çizelge 3.2.4 VNT yöntemi Gold Standart olarak kabul edildiğinde antikor titreleri yönünden deneklerin farklı durumlarda sınıflandırılmasında alternatif yöntem olarak npla'nın duyarlılık, seçicilik, pozitif ve negatif tahmini değerleri ve doğruluk oranları. 30

Çizelge 3.2.5 NPLA yöntemi Gold Standart olarak kabul edildiğinde antikor titreleri yönünden deneklerin farklı durumlarda sınıflandırılmasında alternatif yöntem olarak vnt'nin duyarlılık, seçicilik, pozitif ve negatif tahmini değerleri ve doğruluk oranları. 31

1.GİRİŞ

1.1. Tarihçe

İlk kez 1959 yılında Hughes ve ark. tarafından İngiltere ile Wales arasındaki sınır bölgelerinde bulunan koyun sürülerinde tanımlanan Border Disease (BD) enfeksiyonu, *Hairy Shaker Disease* (Yağlı yapağı hastalığı) veya *Fuzzy Lambs Syndrome* (Köpek kılı yapağılı kuzu sendromu) gibi sinonim isimlerle de anılmaktadır. Semptomlar; enfekte gebe koyunlarda abortlar, ölü doğumlar, normalden düşük doğum ağırlığına sahip yavru doğumları veya kongenital anomalili yavru doğumları şeklinde tanımlanmaktadır (Nettleton ve ark., 1998). Serolojik araştırmalar BD enfeksiyonunun dünya çapında yayıldığını göstermiştir. Araştırma yapılan bölgelerde koyun sürülerinde seroprevalans oranları %5 ile %50 arasında saptanmış, hatta bazı ülkelerde %90'a kadar ulaşabildiği görülmüştür (Nettleton ve ark., 1998).

Bovine Virus Diarrhoea Virus (BVDV) enfeksiyonu ise, ilk olarak 1946 yılında Olafson ve ark. tarafından New York eyaletindeki sütçü sığır sürülerinde şiddetli ishalle karakterize mide ve bağırsak iltihabı olarak tanımlanmıştır. Ayrıca bazı enfekte hayvanlarda nazal ve oral mukozada erozyonlar olduğu gözlemlenmiş, gebe hayvanlarda da abortlar görülmüştür. Tüm bu bulgulara rağmen hastalığın morbidite oranlarının yüksek, mortalite oranlarının düşük olduğu bildirilmiştir. Ramsey ve Chivers (1953), bu adlandırmadan 7 yıl sonra Iowa'da yaşları değişen sığır sürülerinde ilk olarak Mucosal Disease (MD) adı verilen hastalığı tanımlamışlardır. Olafson ve ark. (1946) benzer olarak ülseratif mukozal lezyonlar ve ishal semptomları ile karşılaşmışlar, ancak mortalite oranlarını daha yüksek bulmuşlardır. Bu nedenle hastalığın BVDV'den ayrı bir hastalık olduğu düşünülmüştür. Sığırlar üzerinde yapılan çapraz bağışıklık ve hücre kültürü

çalışmaları, sonuçta BVDV ve MD enfeksiyonlarına aynı virusun neden olduğunun anlaşılmasını sağlamıştır.

BVD virusu üzerine 1960 ve 1970’li yıllarda yapılan çalışmalarda, domuzlardaki Klasik Domuz Vebası (Hog Cholera) virusu ve koyunlarda görülen BD virusları ile yakın akraba olduğu belirlenmiştir (Darbyshire, 1962). Daha sonra bu üç virus “*Flaviviridae*” familyasının “*Pestivirus*” genusunda sınıflandırılmışlardır (Heinz ve ark., 2000).

1.2. Etiyoloji ve Pestivirusların Genel Özellikleri

Flaviviridae ailesinde bulunan *Pestivirus* genusu, *Bovidae* ailesindeki sığır türlerini, *Ovidae* ailesindeki koyun, keçileri ve *Suidae* ailesindeki domuz türlerini enfekte eden virus türlerini içermektedir. Pestiviruslar, ilk olarak konak orijinlerine ve yaptıkları hastalıklara bakılarak sınıflandırılmışlardır. Ancak yapılan araştırmalar pestivirusların konakçı spesifik olmadıklarını kanıtlamıştır (Becher ve ark., 1999; Becher ve ark., 1997; Carlsson ve ark., 1994; Terpstra ve ark., 1998; Hurtado ve ark., 2003). Pestivirus genusunda Bovine Virus Diarrhoea Virus genotip 1 (BVDV-1), Bovine Virus Diarrhoea Virus genotip 2 (BVDV-2), Border Disease Virus (BDV), Klasik Domuz Vebası Virus (CSFV) ve atipik pestivirus türleri bulunmaktadır (Pellerin ve ark., 1994; Ridpath ve ark., 1994; Heinz ve ark., 2000).

Son yıllarda fütal serumlardan tespit edilen HoBi virusu BVDV-3 olarak kabul edilmiştir (Schirrneier ve ark., 2004). Domuzlardan izole edilen Bungowannah virusu (Kirkland ve ark., 2007) ile de pestivirus genusu yeni üyeler kazanmaya devam etmektedir.

Pestivirus genusundaki viruslar, tek iplikçikli, pozitif polariteli ve yaklaşık 12,3-12,5 kb arasında değişen uzunluğa sahip RNA molekülü içerirler. Virion yaklaşık 40-60 nm çapındadır, nükleokapsit lipid yapıda olan bir zarfla kaplıdır ve ikozaedral simetriye sahiptirler (Murphy ve ark., 1989; Rumenapf ve Thiel, 2008). Virionların zarflarının yüzeylerinde 10-12nm boyunda halka benzeri alt üniteler bulunur (Tidona ve Darai, 2011). Virionların RNA'ları enfeksiyözdür ve hem genom hem de viral messenger RNA olarak görev alırlar (Rumenapf ve Thiel, 2008). Serolojik olarak yapılan çalışmalar pestivirusların birbirleriyle antijenik olarak bağlantılı olduklarını göstermiştir (Darbyshire,1960; Fernelius ve ark., 1973).

Virus genomu; iki ucundan translate olmayan bölgelerle (5' ve 3', untranslate region UTR) çevrelenmiş, bir açık okunabilir bölgeye (Open Reading Frame, ORF) sahiptir. UTR bölgeleri, virus proteinlerinin sentezi ve virus genomunun replikasyonu için önemli sinyalleri bulundurmaktadır. Genomun 3' ucunda Poly (A) kısmı, 5' ucunda da şapka (cap) yoktur. ORF; yaklaşık 4000 aminoasitten oluşan bir polipeptid olarak kodlanır, yapısal olan ve olmayan 11-12 adet (bu sayısal farklılık biyotipik özelliklerden kaynaklanır.) polipeptid sahiptir (Moenning, 1990).

Yüksek korunurlukta olan 5'UTR, pestivirusların filogenetik analizlerinde en çok tercih edilen bölgedir (140). N^{pro} (p20), ORF'dan ilk kodlanan proteindir, 504 nükleotidden ibarettir ve proteaz aktivitesine sahiptir (Becher ve ark., 2003).

Olgun virionlarda N^{pro}'yu 303 nükleotide sahip kapsid proteini takip eder, ardından konakçı hücreden kazanılan E^{ms} (681 nükleotid), E1 (585 nt) ve E2 (1119 nt) zar proteinleri gelmektedir (Becher ve ark., 1994). E^{ms} glikozillenmiş bir proteindir (Rumenapf ve ark., 1993) ve hidrofobik bir yapı içermez (Weiland ve ark., 1992). Ayrıca ribonükleaz aktivitesine sahiptir ki bu enzim virus replikasyonunda rol oynar. Bu bölgeye karşı da nötralizan antikor oluşumu mevcuttur (Windisch ve ark., 1996).

Yapısal proteinlerden E1'e karşı herhangi bir nötralizan antikor oluşumu bildirilmemiştir.

Virusa ait zar glikoproteinlerinden E2, pestivirusla enfekte veya aşılı olan hayvanlarda nötralizan antikor üretiminden sorumlu başlıca proteindir. Major immundominant protein olarak da anılan E2 proteini, son derece varyasyonlar göstermesi sebebiyle immun sistem tarafından oluşturulan antikor yanıt nötralizasyon kinetiğine etki ederek, aynı genustaki farklı virusların alt tiplerinin tanınması durumunda da farklılıklara neden olmaktadır (Meyers ve Thiel, 1996; Patel ve ark., 2005).

Yapısal olmayan proteinler (NS), NS2-3 ile başlar. Bu bölge proteaz ve helikaz aktivitesine sahiptir. Ruminant pestivirusları üretildikleri hücre kültürlerinde yapmış oldukları morfolojik değişikliklere göre iki farklı biyotipte bulunurlar (Meyers ve Thiel, 1996) :

- Non-sitopatojen (ncp)
- Sitopatojen (cpe)

Bu biyotipler enfeksiyonun patogenezinde oldukça önem taşırlar. Persiste enfeksiyondan sorumlu biyotip ncp olandır. Sitopatik etki yapan biyotip ise, ya enfekte hayvanlardan pestivirusların mutasyonu yolu ile ya da doğal hayatta süperenfeksiyon yolu ile kazanılır. Bunun sonucunda her iki biyotipi de organizmasında barındıran bireyler MD'e yakalanarak ölürler (Meyers ve Thiel, 1996).

MD, homolog suşla şekillenirse erken (early-onset) veya heterolog suşla şekillenirse geç (late-onset) dönemde gelişebilmektedir (Fritzemeier, 1996). Yapısal olmayan NS2-3 proteini (p125), ubiquitin esteraz enzimi vasıtasıyla insersiyon veya delesyon şeklindeki mutasyonlarla ikiye ayrılabilir. Sitopatojen olan pestivirus suşlarının p125 proteinini kodlama bölgesinde oluşan mutasyonlar sonrasında NS2 ile NS3'ün ayrımı gerçekleşmektedir. Takip eden araştırmalar sonucunda NS3'ün sitopatojeniteden sorumlu yapısal olmayan protein olduğu tespit edilmiştir (Fritzemeier, 1996).

Diğer yapısal olmayan proteinler NS4A (p10), NS4B (p32) ve NS5A (p58)'dir. Viral replikasyonda önemli oldukları düşünülmektedir. Son olarak NS5B (p75) proteini üretilir. Bu proteinin RNA'ya bağımlı olduğu ve viral genomun çoğaltılmasında görev alan RNA polimeraz enzimiyle bağlantılı olduğu düşünülmektedir. Bu proteinlerden NS3/4A, NS4A/4B, NS4B/5A ve NS5A/5B'nin bölünme alanlarındaki işlemler, NS3 serin proteaz enziminin aracılığı ile olmaktadır (Tautz ve ark., 1997; Wiskerchen ve Collet, 1991; Xu ve ark., 1997). NS4B proteininin BVDV'nin patojenitesinde rol oynamakta olduğu tespit edilmiştir (Qu ve ark., 2001). Rekombinant ncp BVDV suşlarında yapılan bir analiz, NS4A ve NS4B genleri arasındaki viral sekansların eklenmesinin, verimli bir viral replikasyona etki etmediğini; böylece NS4AB'nin öncü olarak zorunlu bir rolü (in vitro ortamda) olmadığını göstermiştir (Gallei ve ark., 2005). NS5A hücre zarına bağlanan bir fosfoproteindir ve uzama faktörü-1'in α alt ünitesi ile etkileşime girdiği gösterilmiştir (Johnson ve ark., 2001). NS5B ise RNA'ya bağlı RNA polimerazdır (Zhong ve ark., 1998). NS5A ve NS5B, tamamlanmış (olgun) bölünme ürünleri olarak NS5A-5B ile birlikte bulunur (Collet ve ark., 1988; Collet ve ark., 1991).

1.3. Pestivirus Enfeksiyonlarında Konakçı Spektrumu

Pestiviruslar evcil/vahşi ruminantlarda ve domuzlarda dünya çapında ekonomik olarak önemli enfeksiyonlara neden olurlar (Snowdon ve French, 1968). Günümüzde Pestivirus genusunun dört adet tanımlanmış türü vardır ki, bunlardan üçü ruminantları doğal olarak enfekte eder; BVDV-1, BVDV-2 ve Border Disease Virus (Thiel ve ark., 2005). BVDV-1 ve BVDV-2 virusları sığırlarda (Flores ve ark., 2000; Flores ve ark., 2002; Vilcek ve ark., 2002; Vilcek ve ark., 2004) yaygın olmakla beraber, koyunlarda da enfeksiyon meydana getirebilmektedir (Ridpath ve Bolin, 1997; Vilcek ve ark., 2001; Nagai ve ark., 2001). Aynı zamanda BD Viruslarının sığırlarda da doğal enfeksiyon meydana getirdiği bildirilmiştir (Rumenapf ve ark., 1993).

Ruminant pestiviruslarının genetik karakterizasyonları sonrasında BVDV ve BDV alt tiplerinin, türler arası bariyerleri aşp *Artiodactyla* (çift tırnaklılar)

takımında bulunan geniş çaptaki konak türlerini enfekte ettiği gösterilmiştir (Fulton ve ark., 1982; Donis, 1995; Nettleton ve Entrican, 1995; Loken, 1990; Loken, 1995). Örnek olarak; BVDV ve BD virusları koyunlardaki ve keçilerdeki pestivirus enfeksiyonlarında aynı hayvanlardan izole edilmişlerdir (Loken, 2000; Moenning, 1990; Meyling, 1990). BVDV koyun (Carlsson, 1991; Hewicker-Trautwein ve ark., 1994; Scherer ve ark., 2001) ve keçilerin (Depner, 1991) yanı sıra, domuzları (Loken, 1995), alpakaları (Goyal ve ark., 2002) ve vahşi ruminantları (Fröhlich ve ark., 2002; Van Campen ve ark., 2001) da enfekte etmektedir. Bu türlerden koyun ve keçiler, pestivirus enfeksiyonlarının sığırlara naklinde büyük önem taşırlar; zira ortak mera kullanımı bu türlerin bir arada bulunmasını ve türler arası enfeksiyon naklini kolaylaştırmaktadır.

Özellikle BVDV-1 ve BVDV-2'nin koyunları doğal olarak enfekte edebilmesi (Sullivan ve ark., 1997; Vilcek ve ark., 1997) nedeni ile gebe koyunlarda ortaya çıkacak patoloji, gebe sığırlardaki pestivirus enfeksiyonlarına benzerlik gösterir (Scherer ve ark., 2001). Koyunlarda BVDV-1 ve BVDV-2 virusları Almanya, İsveç, İngiltere ve Amerika Birleşik Devletleri'nde de bildirilmiştir (Becher ve ark., 1994; Vilcek ve ark., 1997; Willoughby ve ark., 2006; Becher ve ark., 1995; Sullivan ve ark., 1997). Arjantin'deki koyunlar üzerinde yapılan bir çalışmada BVDV-1' in koyunlar arasında yayıldığı ve BVDV-2 alt gruplarının da bu koyunlar arasında sirküle olduğu gösterilmiştir (Julia ve ark., 2009). Aynı çalışmada BVDV-1a ile persiste enfekte koyunların sığırları enfekte edebilsinler ya da edemesinler, bu bölgede pestivirus enfeksiyonlarının doğal konakçıları olarak rol oynadıkları ifade edilmiştir (Julia ve ark., 2009).

İngiltere'de Vilcek ve ark. (1996) tarafından yapılan bir çalışmada, genetik tiplendirme sonucunda, toplam 38 koyun izolatının %60'ı (23 adet) klasik BDV ve %26'sının (10 adet) ise BVDV-1 olduğu gösterilmiştir. Diğer 5 izolat ise BVDV-2 olarak tanımlanmıştır (Vilcek ve ark., 1997). 2003-2004 yılları arasında İngiltere'de meydana gelen 25 salgından elde edilen koyun izolatlarının %80'i BD

virusu ve % 20' sinin de BVDV-1 olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada sığır ya da koyunlarda BVDV-2 tespit edilmemiştir (Nettleton ve Willoughby, 2007).

Mishra ve ark.'nın 2009 yılında yaptığı çalışmaya göre, Hindistan'da küçük ruminantlarda yaygın olan BVDV enfeksiyonlarının hakim olduğu ve genotip olarak daha çok BVDV-1 görüldüğü ayrıca pek sık olmamakla birlikte BVDV-2 enfeksiyonlarının da bulunduğu bildirilmiştir (Julia ve ark., 2009). Ayrıca Türkiye'den izole edilen bir adet koyun izolatının da BVDV-2 olduğu bildirilmiştir (Yeşilbağ ve ark., 2008).

Border Disease saha virusları bugüne kadar, konakçı spesifitesi ve genetik/antijenik analizleri sonrasında kendi aralarında numaralandırılmış 7 farklı alt grupta toplanmışlardır (De Mia ve ark., 2005; Liu ve ark., 2010; Giangaspero ve Harasawa, 2011). BDV-1, koyun ve keçilerden izole edilmiş referenz virusları kapsamaktadır. Referenz viruslardan kabul edilen Moredun, X818 gibi gerçek ya da klasik BD Virusları bu grupta yer almaktadır (Rumenapf ve Thiel, 2008). BDV-2 alt grubunda ren geyiklerinden izole edilmiş suşlar bulunmaktadır (Becher ve ark., 2003). Almanya ve İsviçre'de genellikle domuzlarla bir arada tutulan koyunlardan elde edilen izolatlar BDV-3 alt grubu olarak rapor edilmişlerdir (Oğuzoğlu ve ark., 2001; Becher ve ark., 2003; Stalder ve ark., 2005). Ülkemizden de BDV-3 alt grubunda yer alan koyun izolatları bildirilmiştir (Toplu ve ark., 2011). BDV-4 alt grubunun ilk karakterizasyonu Pirene dağ keçilerinde (*Rupicapra pyrenaica*) yapılmıştır (Hurtado ve ark., 2004; Arnal ve ark., 2004). Daha sonra bu alt gruba koyunlardan izole edilen etkenler de dahil edilmiştir (Valdazo ve ark., 2007). Sıklıkla Pirene dağ keçilerindeki BDV salgınlarının sorumlusu olarak, yine BDV- 4 suşları tespit edilmiştir (Marco ve ark., 2008; Pioz ve ark., 2007). Başkaca bir coğrafi bölgeden bildiri olmayan BDV-4 alt grubu, İber yarımadasına ve sınır bölgelerine özgü görünmektedir. Fransız izolatları ile ilgili yapılan moleküler karakterizasyon çalışmasında 1985 ve 2006 yılları arasında Fransa'daki koyunlardan izole edilen pestiviruslar, BDV-5 ve BDV-6 alt grubunu oluşturmuşlardır (Dubois ve ark., 2008). BDV-7 alt grubu olarak İtalyan koyun izolatları gösterilmiştir (Giammarioli ve ark., 2011).

BDV alt gruplarının çeşitliliği son yıllarda yapılan çalışmalarda oldukça artmış, numaralandırılmamış olmakla birlikte farklı ülkelerden izole edilen ve ülke isimleri ile anılan alt gruplar da bu sınıflandırmaya dahil edilmiştir. Bu bağlamda, Tunus koyunlarından izole edilen Pestiviruslar muhtemel ilave BDV alt grubunu oluştururken (Thabti ve ark., 2005), Türkiye’den izole edilen BD viruslarının ise, domuzlardaki klasik domuz vebası virusları ile ortak atadan geldikleri tespit edilmiştir (Oğuzoğlu ve ark., 2009; Schmeisser ve ark., 2011, Toplu ve ark., 2011).

Gebe olmayan keçilerdeki pestivirus enfeksiyonları genellikle subklinikdir. Koyunlarda abortlar, persiste enfekte yavru doğumuna göre daha fazla olarak rapor edilmiştir (Depner ve ark., 1991; Loken; 2000). Buna karşın doğal enfeksiyonda persistenz keçilerde bugüne dek bildirilmemiştir (Krametter-Froetscher ve ark., 2006; Lamontagne ve Roy, 1984; Zaghawa, 1998). Ancak yapılan çalışmalar, keçilerin de BVDV enfeksiyonuna duyarlı olduğuna işaret etmektedir (Zaghawa, 1998).

1.4. BVDV ve BDV Enfeksiyonlarında Klinik Bulgular

BD virusu izolatlarının çoğu diğer tüm pestiviruslarda olduğu gibi non-sitopatojeniktir. Nadir de olsa sitopatojen olan BD virusları izole edilmiştir (Vantsis ve ark., 1976). BD Virusu koyunlar arasında doğal olarak oro-nasal yolla ve dikey bulaşma yolu ile yayılır. Virus gebe koyun ve keçilerde kongenital anomalilere sebep olur, ancak erişkinlerde akut form da gözlenebilmektedir. BD virusu koyunlarda persiste enfeksiyonlara yol açabilir. Koyunlar sığırlardan bulaşan BVD virusları ile de enfekte olabilirler. Hatta bazı ülkelerde sıklıkla BVD virusları, BD viruslarından daha yaygın bir enfeksiyon nedenidir (Carlsson, 1991).

Sığırlarda bulunan pestiviruslar (BVDV) ise oldukça bulaşıcıdır ve çoğunlukla bu virusa karşı duyarlı olan sürüleri enfekte ederler. BVD virusu Avrupa’da bazı sığır populasyonlarında endemiktir ve bu konu ile ilgili mücadele programlarının oluşturulmasına neden olmuştur. Virusun popülasyona girişi persiste enfekte olan sürekli “taşıyıcı” hayvana bağlıdır. Sığır populasyonlarının genelinde,

taşıyıcı hayvanların prevalansı yaklaşık %1 oranındadır. Persiste enfekte hayvanın durumu ve idaresi, enfeksiyonun epidemiyolojisinde, bağışıklığın gelişmesinde ve hastalığın sürüde oluşmasında kritik bir öneme sahiptir (Kirkland ve Mackintosh, 2006).

Pestivirus enfeksiyonlarının klinik formları:

- a) Akut Enfeksiyonlar
- b) Fötal-Kongenital Enfeksiyonlar
- c) Persiste Enfeksiyonlar (Persiste Viremi) şeklinde gruplandırılabilir.

a) Akut Enfeksiyonlar

Akut enfekte koyunlarda yüksek ateş, şiddetli ve uzun lökopeni, iştahsızlık, konjunktivitis, burun akıntısı, solunum güçlüğü ve ishal görülmektedir. Genç hayvanlarda % 50 oranında mortalite görüldüğü de bildirilmiştir (Oğuzoğlu, 2008).

b) Fötal-Kongenital Enfeksiyonlar

BD ile enfekte gebe koyunlardaki pestivirus enfeksiyonlarında; annede bulunan virusun gebeliğin herhangi döneminde transplasental yolla fetusa geçişi çeşitli klinik tablolarla sonuçlanmaktadır. Enfeksiyonun erişkin dişi hayvandaki seyri subklinik ya da hafif belirtiler şeklinde olmasına rağmen, oluşturacağı sonuçlar fetus için ciddi olmaktadır. Bu sonuçların ciddiyeti, fötusun yaşı ile yakından ilgilidir. Erken gebelik döneminde resorbsiyon, ölüm, erken abortlar gözlenebilmektedir.

Koyunlarda gebelik süresi yaklaşık 165 gün (5,5 ay) sürmektedir. Fötusta immun sistemin gelişmesi 60-80. günlerde olmaktadır. Bu durum keçilerde 20 günlük farklılık gösterir. Keçi fötuslarında ise 80-100. günlerde immun sistem gelişmektedir. Küçük ruminantlarda gebeliğin ikinci ayının sonlarına kadar oluşan enfeksiyonlarda virus transplasental olarak fötusa aktarıldığında bu dönemde merkezi sinir sistemi organlarının gelişim dönemi olması sebebi ile nörotropik olan pestiviruslar hedef organlarına giderek şiddetli sinirsel semptomlara, lökomotor

bozukluklara ve anormal iskelet oluşumuna sebep olabilirler. Serebellar hipoplazi ve displazi lezyonlarına sahip kuzularda körlük dikkati çekerken, hydranencephalie ve porencephalie olguları, nekrotizan yangıdan kaynaklanmaktadır. Bu tür yavrular normalden zayıf görünümlü olabilirler ve doğum sonrası erken dönemde ölebilirler. Şayet bu kuzular yaşamlarını sürdürürlerse, persiste enfekte olduklarından ömür boyu virüsü saçarak ve tıpkı sığırlardaki MD'ye benzer semptomlar göstererek yaşamlarının bir döneminde mutlak surette ölürlür. Geç gebelik döneminde yani yaklaşık üçüncü ayın sonlarında enfekte olan çoğu koyun fötüsü ise, normal ve sağlıklı görünümlü ve BD virüsü olmadan doğabilirler, ancak bu hayvanlar BDV antikörlerine sahiptirler (Schmeisser ve ark., 2011; Barlow ve Patterson, 1982).

Pestiviruslarla enfekte doğan kuzularda karakteristik patolojik değişikliklerin çoğu merkezi sinir sisteminde ve deride oluşur. Merkezi sinir sistemi boyunca myelin tabakasındaki bozukluk, demiyelinizasyon veya hipomyelinizasyon şeklindedir, ayrıca retinal atrofi de gözlenebilmektedir (Terpstra, 1985; Trautwein ve ark., 1986). BD'deki sinirsel belirtiler bu hastalığın en karakteristik özelliğidir. Ön ve arka bacak ekstremitelerinde anomaliler, arthrogryposis, ataksi ve tremorlar gözlenebilmektedir. Kuzuların yapağlarında melanin birikiminden kaynaklı anormal pigmentasyon (kahverengi ve siyah pigmentasyon), tiroid hipofonksiyonu sonucu kıl foliküllerinde oluşan bozukluklar sonucunda yağlı yapağı ya da normal ondulasını yitirmiş köpek kılı görünümünde yapağı semptomları dikkat çekici bulgulardandır. Derideki ana kıl foliküllerinde boyda uzama ve ikincil kıl foliküllerinin sayısında ise azalma olur. Enfekte kuzular genelde büyüme ve gelişme geriliği gösterirler ve süttten kesilme zamanından önce ölürlür (OIE, 2009).

c) Persiste Enfeksiyon (Persiste Viremi)

İmmun sistemin olgun hale gelmesi öncesinde oluşan pestivirus enfeksiyonları genellikle persiste viremi ile sonuçlanır. Küçük ruminant fötüsleri antijenik uyarıcılara karşı ilk immün yanıtı 165 günlük toplam gebelik periyodunun yaklaşık 60-85. günlerinde verebilirler. Bu fötüsler belirtilen günler öncesinde oluşabilecek enfeksiyonda Pestiviruslara karşı immün tolerans

gösterebileceklerinden, enfekte fütuslarda viral replikasyon kontrolsüzdür, tüm organlar bu durumdan etkilenebilir ve %50 oranında fütal ölüm oluşabilmektedir. Persiste enfekte doğan bireyler genellikle 2 yaşına kadar zor erişebilirler. Tipik olarak inflamatuvar reaksiyon yoktur ve sürekli olarak diğer hayvanlar için enfeksiyon/virus kaynağıdırlar (OIE, 2009).

Tip 1 ve Tip 2 BVD virusları da küçük ruminant türlerinde enfeksiyon meydana getirdiğinden göz ardı edilmemesi gereken temel fark; oluşturdukları hastalığın şiddetidir (Richey, 2004). Tip 2 BVD virusları sığırlarda hemorajik sendromdan sorumlu oldukları için; koyunlarda da aynı türden bir enfeksiyon meydana getirip getirmediği halen araştırılması gereken bir konudur.

Koyunlarda persiste enfeksiyonun sonuçlarından birisi, sığırlardaki MD benzeri olgudur. Ancak keçilerde persiste enfeksiyon bugüne dek bildirilmemiştir (Oğuzoğlu, 2008).

1.5. Pestivirus Enfeksiyonlarında Çapraz (Kros) Nötralizasyon

Moleküler karakterizasyon çalışmaları ile tiplendirme yapılmaksızın ya da virus izolasyonu olmaksızın, uygulanan serolojik çalışmalar ile de Pestivirus enfeksiyonlarının ayırıcı teşhisi mümkündür. Ancak bu durumun gerçekleştirilebilmesi için çapraz nötralizasyon konusu aydınlığa kavuşturulmalıdır. Bu nedenle yakın akraba virusların çoklu enfeksiyon riski sonucu koyun kan serumlarında, BDV suşları yanı sıra BVDV suşlarının da enfeksiyonu değerlendirilmelidir.

Pestivirus enfeksiyonlarından ilk olarak küçük ruminantlarda tanımlanan BD virusu, sığırlardaki BVD virusu ile antijenik yakınlığa sahip olduğundan (Plant ve ark., 1973); hem koyunları hem de sığırları enfekte edebildiği bilinmektedir (Nettleton, 1987; Cranwell ve ark, 2007). Türler arasındaki yayılıma diğer bir örnek ise sığırlardan koyun ve keçilere pestivirus nakli şeklinde gösterilmiştir (Loken,

1995). Yapılan araştırmalar, koyunların ve keçilerin BD virus enfeksiyonu ile benzer klinik bulgulara neden olan BVDV-1 ve BVDV-2 ile de enfekte olabileceğini kanıtlamıştır (Sullivan ve ark., 1997; Pratelli ve ark., 2001; Kim ve ark., 2006; Valdazo ve ark., 2006; Schleiner ve ark., 2006). Anılan bu durumun tersi olarak, enfekte koyunlarla birlikte tutulan sığırlara nakil sonrasında BD viruslarından kaynaklı persiste enfeksiyon gelişimi de bildirilmiştir (Carlsson, 1991; Carlsson ve Belak, 1994). Avusturya’da sığırların, pestivirus enfeksiyonlarının koyun ve keçiler arasında yayılmasında anahtar rol oynayabileceği ve ayrıca test edilen küçük ruminantların %87’sinden fazlasının açıkça BVDV-1 suşuna karşı en yüksek antikor titrelerini sergilediği görülmüştür. Kalan %13’lük kısımda bulunan antikorlar BDV spesifik olarak sınıflandırılmıştır (Krametter-Froetscher ve ark., 2006; Krametter-Froetscher ve ark., 2007). Hatta yapılan çalışmalarda koyun pestiviruslarının antijenik olarak BDV benzeri ve BVDV benzeri viruslar olarak iki alt gruba ait olduğu bir sınıflandırma da yapılmıştır (Nettleton, 1987; Paton ve ark., 1991). Ayrıca BVDV-2 viruslarının sadece sığırlarda değil (Pioz ve ark., 2007; Ridpath ve ark., 1994), koyunlarda da bulunduğu ortaya konulmuştur (Becher ve ark., 1994; Sullivan ve ark. 1997). Önceleri BD olarak adlandırılan küçük ruminantlara ait pestivirus izolatlarının aslında BVDV-2 alt tipinde oldukları da tespit edilmiştir (Tautz ve ark., 1997).

Duyarlı sığırların, BD virusu ile persiste enfekte koyunlarla temastan sonra serokonverte olduğu kanıtlanmıştır. Ayrıca klinik olarak sağlıklı koyunlar persiste enfekte sığırlar tarafından da BDV-3 ile enfekte edilebilirler (Krametter-Froetscher ve ark., 2008). Sığırlarla beraber otlatılan keçilerde de BVDV enfeksiyonu riski artar. BVDV’nin sığırlardan keçilere geçme potansiyeli hakkında yapılan çalışmalarda, keçilerde BVDV’den kaynaklı abortların olduğu ve persiste enfekte sığırların BVDV kaynağı olduğu bildirilmiştir (Evermann ve Ridparth, 2002; Grooms, 2004).

Pestivirusların antijenik yakınlıkları, enfeksiyonun başlamasından sorumlu viral yüzey reseptörlerinin spesifitesi ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca reseptör spesifitesinin hücre kültürlerinde yapılan pasajlar sonucunda değişebildiği bildirilmiş olup, örneğin CSFV ve BD viruslarının konaklarını enfekte edebilmesinin spesifik reseptörler varlığında mümkün olabildiği belirlenmiştir (Reagan ve ark., 1984).

Koyun ve domuz hücrelerindeki reseptörlerin teşhisi ve araştırılması, domuz ve koyunlardaki ruminant pestivirus enfeksiyonlarının daha da netleşmesinde büyük rol oynamıştır. Anılan reseptör spesifitesi konusunda BVDV izolatları ile yapılan çalışmalarda BVDV suşları arasında “özel” statüye sahip olanlar sadece sığır (bovine) hücreleri için bağlanma reseptörlerine sahiplerken, “*multipotent virus*” özelliğine sahip olanlarki; bunlar köken aldıkları virustan farklılaşarak diğer türlere de bulaşabilme kabiliyetini kazanırlar. Bu bağlamda ovine (koyun/keçi) ve/veya porcine (domuz) kökenli hücreleri de enfekte edebilecek reseptörleri de yapılarında bulundurabilirler (Liess ve Moennig, 1990). Bu reseptör benzerliği çapraz bağışıklık konusunda da önemlidir. Zira enfeksiyon sonrası oluşan nötralizan antikorların bovine/ovine/porcine kökenli virüsler ile tam ya da kısmi nötralizasyonu, bu ortak reseptörlerden kaynaklanmaktadır.

Antikor molekülleri plazma hücrelerinden sentezlenen glikoproteinler olup, spesifik antijen reseptörlerine bağlanarak onları nötralize ederler. Antikorlar bu özelliklerini benzer immunojenler üzerinde kısmi olarak gösterdiklerinden dolayı, yakın akraba olan pestivirus reseptörlerini de aynı prensiple tanıyabilirler. Pestivirusların immunojen proteinlerindeki bu benzerlik, ayırıcı tanı sözkonusu olduğunda önem kazanır ve hangi türden kaynaklı enfeksiyon oluşuyorsa indüklenen spesifik antikorların yönünde pozitif bir ayırım ortaya çıkar. Dolayısıyla hangi referenz virusa karşı yüksek antikor varlığı belirleniyorsa, enfeksiyon referenz suşun dahil olduğu o gruptan kaynaklanır (Paton ve ark., 1995; Oguzoglu, 2002).

Pestivirus enfeksiyonlarının serolojik ayırıcı tanısını kapsayan bu araştırma, koyunlarda enfeksiyon meydana getirebilen ve aynı genusta bulunan BD ve BVDV enfeksiyonlarının laboratuvar ayırımını konu almaktadır. Bu virüsler türler arası geçiş imkanı bulduklarından dolayı koyunlarda her iki virus tarafından oluşturulan pestivirus enfeksiyonunun görülmesi söz konusudur. Aynı zamanda antijenik olarak yakın akraba olan bu virüslere bağlı oluşan immun yanıt, çapraz bağışıklık sağlamaktadır. Koyunlardaki pestivirus enfeksiyonlarının ayırıcı teşhisinde, söz konusu etkenlere karşı saptanan antikor titrelerinin farkları büyük önem arz etmektedir. Nitekim gerçek etiyolojik ajanın belirlenmesi için serum nötralizasyon

titrelerine bakıldığında, her iki virusa (BVDV/BDV) karşı oluşan antikor yanıtının yüksek olanı enfeksiyöz ajanın tanımlanmasında dikkate alınır.

Bu çalışmada çeşitli klinik bulgular bildirilen (abort, kongenital anomali, döl verimi düşüklüğü ve yapağı kalitesinde bozukluk gibi) ve virolojik yönden pestivirus enfeksiyonunun tespit edildiği iki koyun sürüsünden eş zamanlı olarak alınmış olan kan serumu örneklerinin BVDV ve BDV spesifik nötralizan antikor tespiti temeline dayalı testlerle (VNT ve NPLA) araştırılması, örneklenen populasyonda BVDV ve BDV enfeksiyonu varlığı/yaygınlığının belirlenmesi ve örneklenen hayvanlarda pestivirus enfeksiyonlarının ayırıcı tanısı amaçlanmıştır. Ayrıca pestivirus enfeksiyonlarının (BVD ve BD) serolojik ayırıcı tanısında antikor titresi farklılıklarında oransal referenz değer sorgulanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. GEREÇ

2.1.1. Serum Örnekleri

Çalışmanın materyalini iki koyunculuk işletmesinden Anabilim Dalına gönderilen saha serumları oluşturmaktadır. Bu iki işletmenin geçmişinde pestivirus enfeksiyonu varlığı tespit edilmiştir. Bu amaçla EDTA'lı kan örneklerinde Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) tekniği, Vilcek ve ark.'nın (1997) bildirdiği metoda göre kullanılarak, panpesti generik primerler yardımıyla virolojik yönden yapılan kontrollerde pestivirus nükleik asiti saptanmıştır. Tez materyali olarak her işletmeden 150'şer koyun kan serumu seçilerek Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı laboratuvarında -20°C'lik derin dondurucuda stoklandı. Toplam 300 adet koyun serumu, serolojik testlerde kullanılmadan önce 56°C'de 30 dakika tutularak inaktive edildi ve nötralizasyon testlerine hazır hale getirildi.

2.1.2. Virus ve Hücre Kültürleri

Referenz virus olarak BVDV enfeksiyonu için NADL ve BDV enfeksiyonu için Moredun suşları seçildi. Referenz viruslar, Almanya Hannover Veteriner Üniversitesi Viroloji Enstitüsüne bağlı Avrupa Domuz Vebası Referenz Laboratuvarından bilimsel çalışmalarda kullanılmak amacıyla izinli olarak temin edilmiştir. Referenz viruslardan NADL suşunun üretimi için Anabilim Dalı laboratuvarında üretilmiş ve pestivirus enfeksiyonu yönünden negatif olduğu

belirlenen Bovine Turbinata hücre kültürü, Madine Darby Bovine Kidney (MDBK) devamlı hücre kültürü ve Moredun suşunun üretimi için Sheep Foetal Thymus (SFT-R, Insel Riems, Kat. No: CCLV-RIE-43) kullanıldı.

2.1.3. Fötal Dana Serumu

Testlerde kullanılacak referenz virusların üretilmesinde ihtiyaç duyulan hücrelerin seri pasajlarının yapılmasında, ticari olarak temin edilen ve pestivirus yönünden negatif olduğu yapılan testlerle teyit edilen fötal dana serumu (FDS) (PAA, Cat No. A15-649) kullanıldı.

2.1.4. Konjugat

Moredun suşunun titrasyonunda ve nötralizasyon (Nötralizan Peroksidaz Linked Antibody- NPLA) testinde Almanya Hannover Veteriner Yüksek Okulu'ndan sağlanan peroksidaz enzimi ile işaretli pestivirus poliklonal antikorlarından hazırlanan konjugat kullanıldı.

2.2. YÖNTEM

2.2.1. Referenz Virusların Üretimi

Anabilim Dalı laboratuvarında bulunan referenz virusların (NADL ve Moredun) üretilmesi amacıyla 25 cm²'lik hücre kültürü şişelerinde pestivirus enfeksiyonu yönünden negatif olduğu bilinen Bovine Turbinata ve SFT-R hücreleri 50.000 hücre/ml yoğunlukta pasajlandı. Bir gün sonra, uygun yoğunlukta ve monolayer olarak tabakalanmış olduğu invert ışık mikroskopunda tespit edilen hücre kültürlerine söz konusu viruslar, adsorbsiyonlu metotla inokule edildi. NADL suşu sitopatojen etkiyi üç günlük inkubasyon sonrasında gösterdi. İlk pasajı Bovine Turbinata hücre kültüründe yapılan BVDV referenz virusu NADL, üç kör pasaj sonunda devamlı hücre kültürüne (MDBK) adapte edildi. İnkubasyon periyodunda her gün mikroskopik kontrolleri yapılan referenz viruslardan nonsitopatojen Moredun suşu ile enfekte olan hücre kültürleri inokulasyonu izleyen beşinci günün sonunda toplandı. Hücre kültürleri -20°C' de dondurulup çözüldükten sonra, tüm pasaj sıvısı +4°C'de 3000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatant, hücre pelletinden ayrıldıktan sonra 0,5 ml hacimde porsiyonlanarak titrasyon testinde kullanılmak üzere -80°C' de donduruldu.

2.2.2. Titrasyon

Viruslar Doku Kültürü Enfektif Doz 50 (DKID₅₀) değerlerinin hesaplanması amacıyla Frey ve Liess'in (1971) bildirdiği metoda göre mikro titrasyon testine tabii tutuldu. Bu amaçla log₁₀'a göre bir seri sulandırması yapılan viruslar mikrotitrasyon tabletlerine her gözde 100'er µl olacak şekilde taşındı ve üzerlerine ml'de 300.000 canlı hücre içeren süspansiyondan 50'şer µl ilave edildi. Sitopatojen NADL suşunun

titrasyonu hesaplanırken cpe değerlendirmesi dikkate alındı. Sitopatojen olmayan Moredun suşunun titresi ise Hyera ve ark.'nın (1987) bildirdiği Peroksidaz Bağlı Antikor Boyama (PLA) tekniği kullanılarak belirlendi.

Bulunan sonuçlara göre virus titresi Spearman - Kärber (Thrusfield, 2005) metoduna göre hesaplandı.

2.2.3. Peroksidaz Bağlı Antikor Boyama (PLA) Tekniği

Tabletler gözlerindeki sıvılar boşaltıldıktan sonra 80°C'ye ayarlanan fiksatorde 4 saat boyunca bekletildi. Ardından Tween-20'li PBS solüsyonu içerisinde titresi oranında (1:50) sulandırılan konjugattan her göze 50 µl hacimde ilave edildi. Bir saat oda ısısında karanlık ortamda çalkalayıcıda inkube edilen tabletlerin içlerindeki sıvılar döküldükten sonra hücre yüzeyleri PBS ile üç kere yıkandı. Boyama amacıyla Amino Ethil Carbazol (AEC) ve Dimethyl-Formamid (DMF) substrat olarak kullanıldı. Substrat sodyum asetat buffer (4,7 ml) içinde 0,3 ml AEC + DMF karışımı ve katalizör olarak 150µl Hidrojen peroksit (H₂O₂) şeklinde hazırlandı ve 50 µl hacminde tablet gözlerine koyuldu. Çalkalayıcı üzerinde 20 dakika bekletildikten sonra 1/3'lük PBS ile reaksiyon durduruldu ve boyama sona erdirildi. Hücresel boyanmalar mikroskop yardımıyla değerlendirildi.

2.2.4. Nötralizasyon

2.2.4.1. Virus Nötralizasyon Testi (VNT)

Koyun kan serumu örnekleri (toplam 300 adet) her numuneden iki göz olmak üzere 1/5 oranında sulandırılmış olarak (10 mikrolitre (µl) kan serumu + 40µl Dulbecco MEM = toplam 50'şer µl) 96 gözlü mikro tabletlere konuldu. 100DKID₅₀ oranında sulandırılan NADL referenz virusu serum sulandırmalarının üstüne eşit miktarda (50µl) aktarıldı. Bir saat 37°C'de inkubasyonu takiben ml'de 300.000 canlı hücre olacak şekilde hazırlanan MDBK hücresi tabletlere 50µl hacimde ilave edildi.

Virus kontrol (testte kullanılan virus sulandırması ve 10 katlı geriye sulandırmalarından her gözde 100'er µl) ve hücre kontrol (100 µl sulandırma sıvısı) gözleri hazırlandı. Virus kontrol gözlerinin hazırlanmasında geriye titrasyon tekniği kullanıldı. Her gün mikroskopik kontrollerin yapılmasını takiben virus kontrolün 10²'lik geriye titrasyonunda %50 cpe görüldükten sonra test değerlendirildi. Test sonucunda NADL referenz suşuna karşı nötralizan antikor varlığı saptanan serum örnekleri SN₅₀ testi için ayrıldı.

2.2.4.2. Nötralizasyon İmmunperoksidaz Tekniği (NPLA)

Sitopatojen olmayan Moredun suşu için Hyera ve ark. (1987)'nin bildirdiği yöntemle Nötralizasyon İmmunperoksidaz tekniği (Neutralizing Peroxidase-Linked Antibody Assay-NPLA) kullanılarak nötralizasyon testi gerçekleştirildi. Koyun kan serumu örnekleri (toplam 300 adet) her numuneden iki göz olmak üzere 1/5 oranında sulandırılmış olarak (10 mikrolitre (µl) kan serumu + 40µl Dulbecco MEM = toplam 50'şer µl) 96 gözlü mikro tabletlere aktarıldı. 100DKID₅₀ oranında sulandırılan Moredun referenz suşu serum sulandırmalarının üzerine eşit miktarda (50µl) konuldu. Bir saat 37°C'de inkubasyonu takiben ml'de 300.000 hücre olacak şekilde hazırlanan SFT-R hücresi tablet gözlerine 50µl hacimde ilave edildi. VNT'de bildirildiği gibi virus kontrol ve hücre kontrol gözleri hazırlandı. Beş günlük inkubasyonu takiben boyama işlemine geçildi. PLA tekniği kullanılarak boyanan tabletlerde mikroskopta yapılan değerlendirme sonrasında antikor varlığı saptanan örnekler SN₅₀ testi için ayrıldı.

2.2.5. Pozitif Serumlarda Serum Nötralizasyon₅₀ (SN₅₀) Değerinin Tespiti

Virus nötralizasyon ve NPLA testlerinin sonucunda NADL ve Moredun suşlarına karşı antikor varlığı tespit edilen serum örnekleri, antikor titrelerinin belirlenmesi amacıyla serum nötralizasyon testine (SN₅₀) tabi tutuldu. Bu amaçla NADL'e ve Moredun'a karşı antikor bulunduran serum örneklerinin, her örnekten iki göz

kullanılmak üzere 6 basamaklı sulandırma (1/5-1/160) yapıldı. Tabletler dik tutularak her tablette 8 örnek işlendi ve Dulbecco MEM içerisinde 50µl'lik serum sulandırmaları üzerine, 100DKID₅₀ oranında sulandırılan viruslar her gözde 50 µl olacak şekilde tüm tablete eklendi. Tüm antikor pozitif serum örnekleri hem NADL hem de Moredun referenz suşlarına karşı test edildi. Tüm tabletler %5 CO₂' li etüvde 37°C' de 1 saat bekletildi. İnkubasyon sonunda etüvden alınan tabletlerin tüm gözlerine 300.000 hücre/ml konsantrasyondaki hücre süspansiyonundan 50'şer µl konuldu. Testlerde NADL için bovine turbinata, Moredun için SFT-R hücreleri kullanıldı. Virus kontrol ve hücre kontrol gözleri hazırlandı. Virus kontrol gözlerinin hazırlanmasında geriye titrasyon tekniği kullanıldı.

NADL'e karşı SN₅₀ Değerlendirmesi: Her gün mikroskobik kontrollerin yapılmasını takiben virus kontrolün 10²'lik geriye titrasyonunda %50 CPE görüldükten sonra test değerlendirildi.

Moredun'a karşı SN50 Değerlendirmesi: 2.2.4.2.'de bildirilen NPLA tekniği kullanılarak yapılan boyama sonrasında test değerlendirildi.

2.2.6. İstatistiksel Analiz

Verilerin analizi SPSS for Windows 11.5 paket programında yapıldı. Tanımlayıcı istatistikler denek sayısı ve (%) şeklinde gösterildi. Serum örneklerinde VNT ve NPLA yöntemlerine göre BDV antikorları yönünden BVDV antikorlarının dağılımının uyumluluk düzeyi Kappa Katsayısı hesaplanarak değerlendirildi. Kappa katsayısı <0 ise hiç uyuşma olmadığı, 0.0-0.20 ise önemsiz uyuşma olduğu, 0.21-0.40 ise orta derecede uyuşma olduğu, 0.41-0.60 ise ekseriyetle uyuşma olduğu, 0.61-0.80 ise önemli derecede uyuşma olduğu, 0.81-1.00 ise neredeyse mükemmel uyuşma olduğu kabul edilmiştir. VNT ve NPLA yöntemlerinin antikor titresi yönünden deneklerin sınıflanmasındaki tanısal performanslarını incelemek amacıyla duyarlılık, seçicilik, pozitif ve negatif tahmini değerler ve tanısal doğruluk oranları

hesaplandı. Verilerin değerlendirilmesinde Pearson'un Ki-Kare testi kullanıldı. $p < 0.05$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Ayrıca BVDV ve BDV referenz virusları kullanılarak elde edilen antikor titreleri istatistiki olarak (T testi) önemlilik açısından değerlendirildi.

3. BULGULAR

3.1. Virusların Uygun Hücre Kültürlerinde Üretilmesi ve Enfeksiyözite Güçlerinin Tespiti

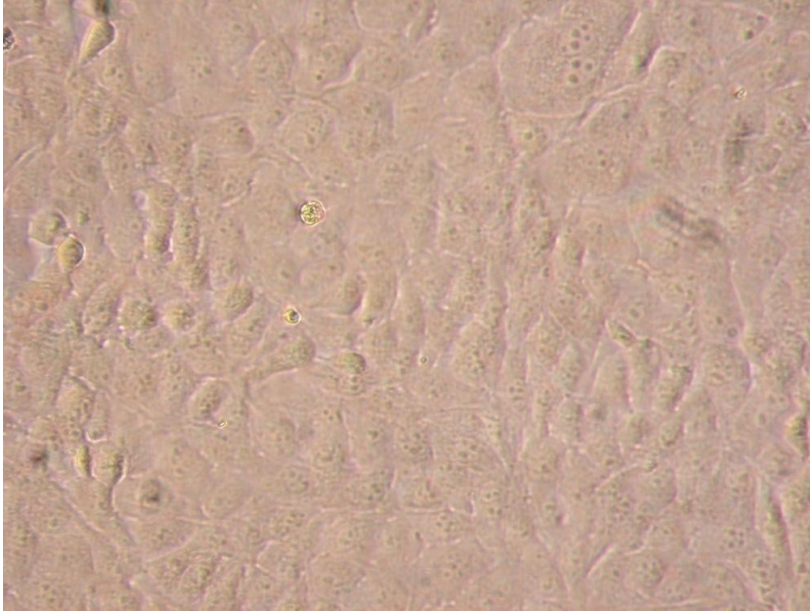
Moredun ve NADL virusları titrasyon ve diğer serolojik testlerde kullanılmak üzere uygun hücre kültürlerinde üretildi. Moredun virusu için Sheep Foetal Thymus (SFT-R, Insel Riems, Kat. No: CCLV-RIE-43) hücre kültürü (Şekil 3.1.3), NADL virusunun ilk pasajı için Anabilim Dalı laboratuvarında üretilmiş ve pestivirus enfeksiyonu yönünden negatif olan Bovine Turbinata primer hücre kültürü kullanıldı. NADL virusu primer hücre kültürü pasajının ardından MDBK devamlı hücre kültürüne adapte edilerek kullanıldı (Şekil 3.1.1). Virusların üreme kontrolleri NADL için CPE gözlenerek (Şekil 3.1.2) ve Moredun için PLA tekniği ile yapılan boyamalar sonucunda (Şekil 3.1.4) gerçekleştirildi.

NADL referenz suşunun üretiminde 5'er günlük inkubasyon periyodunda MDBK hücre kültürü kullanılarak yapılan üç kör pasaj, her gün doku kültürü mikroskopunda takip edildi. Üçüncü kör pasajın inokulasyonu takip eden 100. saatinde %85 CPE tespiti yapılarak enfekte hücreler -80°C'de donduruldu.

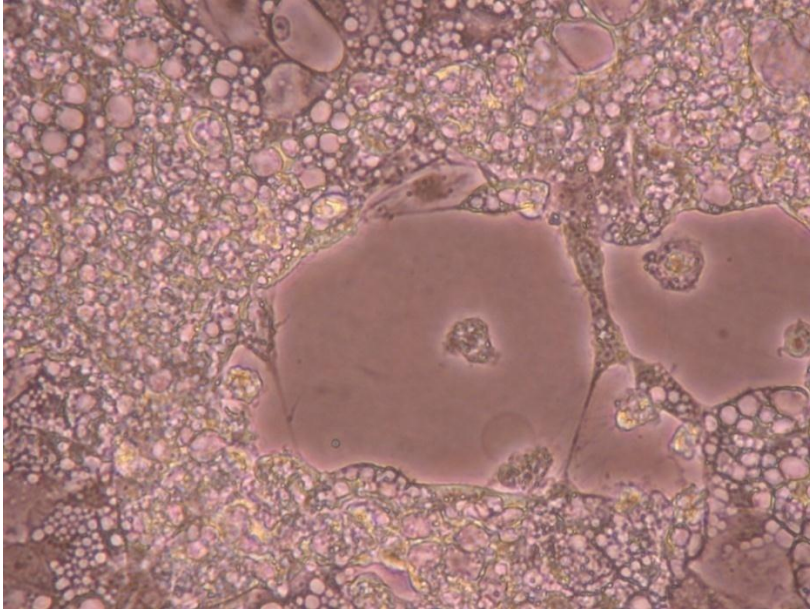
Moredun referenz suşu SFT-R devamlı hücre kültüründe 5'er günlük inkubasyon periyodunda tutularak üç kere pasajlandı.

Hücre kültüründe pasajları yapılan Moredun ve NADL referenz suşları titrasyona tabii tutuldu. Enfeksiyözite değerleri Spearman - Kärber metodu

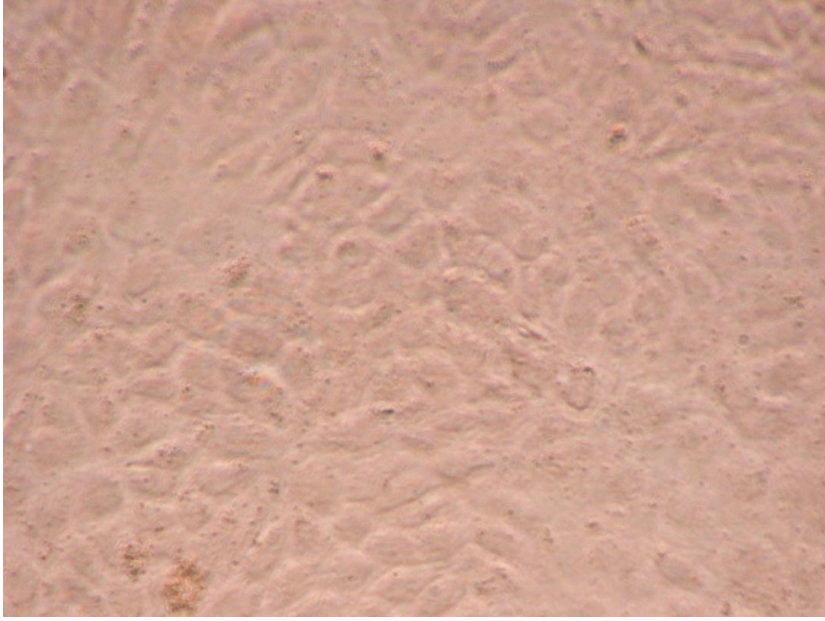
kullanılarak Moredun suşu için $DKID_{50}=10^5/0,1\text{ml}$, NADL suşu için ise $DKID_{50}=10^{4,5}/0,1\text{ml}$ olarak belirlendi.



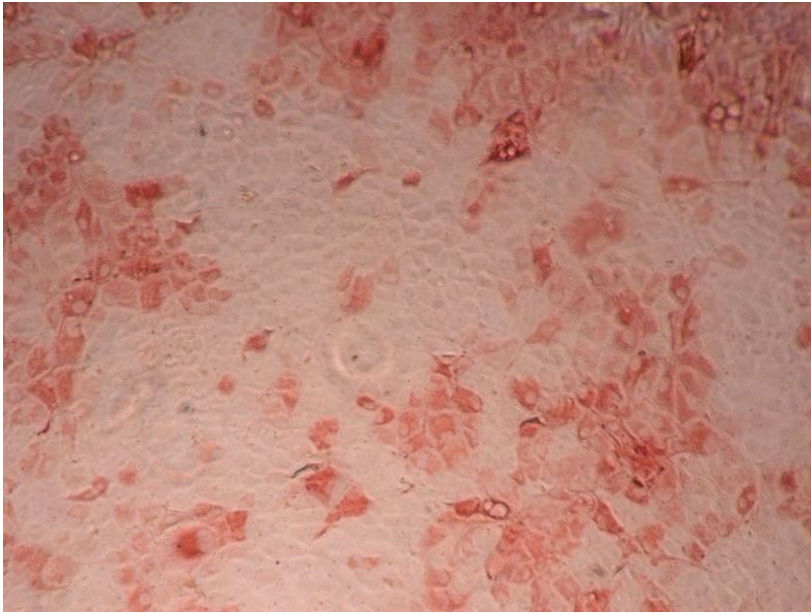
Şekil 3.1.1 NADL suşunun üretildiği MDBK hücre kültürü görüntüsü (X400) (negatif kontrol).



Şekil 3.1.2 NADL suşunun meydana getirdiği cpe görüntüsü (X400).



Şekil 3.1.3 Moredun suşunun üretildiği SFT-R hücre kültürü görüntüsü (X400) (negatif kontrol).



Şekil 3.1.4 Moredun suşu için yapılan PLA boyama görüntüsü (X200).

3.2. Serolojik Bulgular

3.2.1. VNT ve NPLA Testi ile Koyun Serumlarının Seropozitiflik Oranının Tespiti

Yapılan tüm serolojik testlerin bireysel sonuçları Ek-1'de sunulmuştur. Nötralizasyon testleri ile referenz virüslere karşı antikor yönünden test edilen toplam 300 adet koyun serum örneğinde Moredun virüsü için toplam 180 örnek, NADL virüsü için ise 129 örnek pozitif bulundu. Buna göre NADL suşuna karşı %43 seropozitiflik oranı, Moredun suşuna karşı %60 seropozitiflik oranı olduğu belirlendi (Çizelge 3.2.1).

Çizelge 3.2.1 Serum örneklerinde BDV antikorları yönünden BVDV pozitif ve BVDV negatif örneklerin dağılımı.

	VNT			κ Katsayısı	p-değeri
	BVDV (-)	BVDV (+)	Toplam		
NPLA				0.591	<0.001
<i>BDV (-)</i>	114 (%38,0)	6 (%2,0)	120 (%40,0)		
<i>BDV (+)</i>	57 (%19,0)	123 (%41,0)	180 (%60,0)		
<i>Toplam</i>	171 (%57,0)	129 (%43,0)	300(%100,0)		

3.2.2. Pozitif Koyun Serumlarında SN₅₀ Testi Bulguları

Referenz virüslere karşı antikor tespit edilen serum örneklerinin SN₅₀ testi ile hesaplanan antikor değerleri Ek -1'de sunulmuştur. Moredun ve NADL virüslerine karşı hem test edilen tüm serum örneklerinde ve hem de işletmeler bazında tespit edilen seropozitiflik oranları çizelge (Çizelge 3.2.2, Çizelge 3.2.3) ve şekillerde (Şekil 3.2.1) verilmiştir. Bu tez çalışmasında 80 adet pozitif koyun serumunda 1:80-

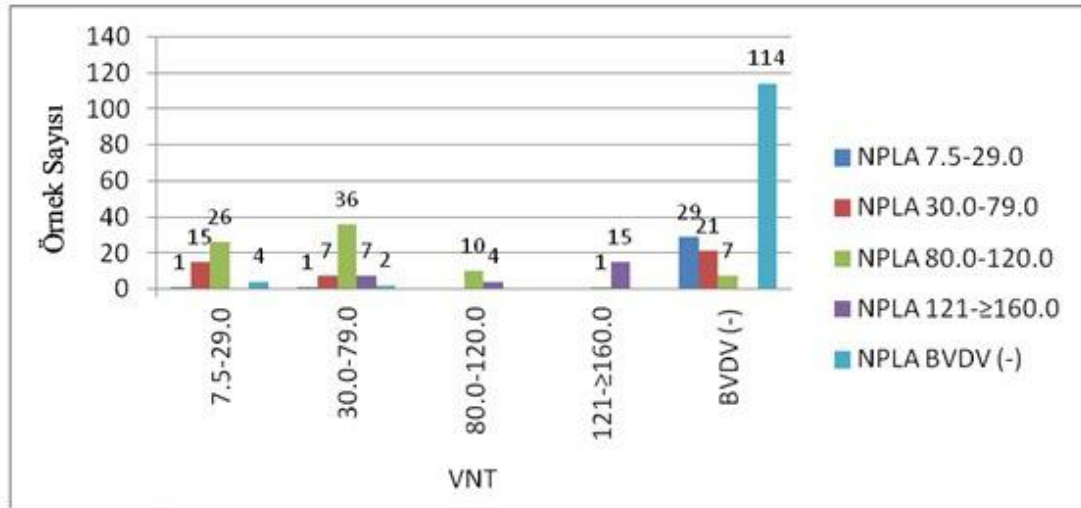
1:120'lik sulandırmalarda BDV antikor titresi tespit edilmiş olup (Çizelge 3.2.3), bunlardan 69'unda BVDV yönünden antikorların ya negatif (n=7) ya da SN₅₀ değerlerinin 1:80 titreden daha düşük (n=62) olduğu gözlenmiştir. Her iki işletmenin pozitif örneklerindeki SN₅₀ antikor titrelerinin BDV enfeksiyonu yönünde 1:80-1:120'lik sulandırmalar arasında yoğun olarak dağıldığı (%86,25) tespit edilmiştir.

Çizelge 3.2.2. Tüm serum örneklerinde BDV Antikorları Yöntünden BVDV Antikorlarının Dağılımı.

	VNT					κ Katsayısı	p-değeri
	7.5-29	30.0-79	80.0-120	121-≥160	BVDV (-)		
NPLA						0.285	<0.001
7.5-29	1 (%0,3)	1 (%0,3)			29 (%9,7)	31 (%10,3)	
30.0-79	15 (%5,0)	7 (%2,3)			21 (%7,0)	43 (%14,3)	
80.0-120	26 (%8,7)	36 (%12,0)	10 (%3,3)	1 (%0,3)	7 (%2,3)	80 (%26,7)	
121-≥160	0 (%0)	7 (%2,3)	4 (%1,3)	15 (%5,0)		26 (%8,7)	
BDV (-)	4 (%1,3)	2 (%0,7)			114 (%38,0)	120 (%40,0)	
Toplam	46 (%15,3)	53 (%17,7)	14 (%4,7)	16 (%5,3)	171 (%57,0)	300 (%100)	

Çizelge 3.2.3 Pozitiflik saptanan serumlarda BDV antikorları yönünden BVDV antikorlarının SN₅₀ dağılımı.

NPLA	VNT					BVDV (-)
	SN ₅₀ değerleri	7.5-29.0	30.0-79.0	80.0-120.0	121-≥160.0	
7.5-29.0	1	1	0	0	0	29
30.0-79.0	15	7	0	0	0	21
80.0-120.0	26	36	10	1	1	7
121-≥160.0	0	7	4	15	15	0
BDV (-)	4	2	0	0	0	114



Şekil 3.2.1 Çizelge 3.2.3.'de verilen değerlerin grafik olarak gösterimi.

Test sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesi amacıyla modellemeler yapılmıştır (Çizelge 3.2.4, Çizelge 3.2.5). Ayırıcı teşhiste kullanılan serolojik testlerin her ikisi de (NPLA ve VNT) pestivirus enfeksiyonlarının tanısında kullanılan “gold” testlerdir. Biri (NPLA) nonsitopatojen (Moredun), diğeri (VNT) sitopatojen (NADL) referenz suşlar için tercih edilerek kullanılmıştır. Bu sebeple birbirlerine karşı duyarlılık, seçicilik ve doğruluk oranlarının belirlenmesinde; bu ikiliden her biri tek başına “gold test” kabul edilmek suretiyle istatistiksel olarak değerlendirilmeye alınmıştır. Yapılan modellemelerden birincisinde VNT için BVDV (-) ve BVDV (+) olarak NPLA içinse BDV (-) ve BDV (+) olarak serum

örnekleri ikiye ayrılarak yöntemlerin tanısal performansı incelenmiştir. Ayrıca VNT gold standart olarak kabul edildiğinde hastalık tespit edilenlerle hastalık tespit edilmeyenleri ayırt etmede NPLA'nın duyarlılığı, seçiciliği, pozitif ve negatif tahmini değerleri ve doğruluk oranları hesaplanmıştır. NPLA gold standart olarak kabul edildiğinde hastalık tespit edilenlerle hastalık tespit edilmeyenleri ayırt etmede VNT'nin duyarlılığı, seçiciliği, pozitif ve negatif tahmini değerleri ve doğruluk oranları hesaplanmıştır.

VNT gold olarak kabul edildiğinde NPLA'nın duyarlılığı (sensitivite) %95,3 olarak tespit edilirken (Çizelge 3.2.4), NPLA gold test olarak kabul edildiğinde VNT'nin seçiciliği (spesifite) %95 olarak (Çizelge 3.2.5) bulunmuştur. Her iki testle elde edilen sonuçlar anlamlı bulunmuştur ($p < 0.001$).

Çizelge 3.2.4. VNT Yöntemi Gold Standart Olan Kabul Edildiğinde Antikor Titreleri Yönünden Deneklerin Farklı Durumlarda Sınıflandırılmasında Alternatif Yöntem Olarak NPLA'nın Duyarlılık, Seçicilik, Pozitif ve Negatif Tahmini Değerleri ve Doğruluk Oranları.

	Tanımlar	1.Model	2.Model	3.Model	4.Model
Duyarlılık	GP/(GP+YN)	123/129 (%95,3)	96/113 (%85,0)	24/99 (%24,2)	1/46 (%2,2)
Seçicilik	GN/(GN+YP)	114/171 (%66,7)	129/187 (%69,0)	151/201 (%75,1)	224/254 (%88,2)
Pozitif Tahmini Değer	GP/(GP+YP)	123/180 (%68,3)	96/154 (%62,3)	24/74 (%32,4)	1/31 (%3,2)
Negatif Tahmini Değer	GN/(YN+GN)	114/120 (%95,0)	129/146 (%88,4)	151/226 (%66,8)	224/269 (%83,3)
Doğruluk	(GP+GN)/(N)	237/300 (%79,0)	225/300 (%75,0)	175/300 (%58,3)	225/300 (%75,0)
κ Katsayısı		0,591	0,503	-0,007	-0,111
p-değeri		<0,001	<0,001	0,905	0,062

1.Modelde, denekler BVDV (-) ve BVDV (+) olarak ikiye ayrıldı, 2.Modelde BVDV (-) olan grup ile antikor titresi 121- \geq 160 olan grup birleştirilerek antikor titresi 7,5 ile 120 arasında değişen grup ile karşılaştırıldı. 3. Modelde BVDV (-) olan grup ile antikor titresi 121- \geq 160 ve antikor titresi 80-120 olan gruplar birleştirilerek antikor titresi 7,5 ile 79 arasında değişen grup ile karşılaştırıldı. 4. Modelde ise antikor titresi 7,5-29 arasında değişen grup ile diğer grupların birleşimi karşılaştırıldı. GP: Gerçek Pozitif, YN: Yalancı Negatif, GN: Gerçek Negatif, YP: Yalancı Pozitif, PTD: Pozitif Tahmini Değer, NTD: Negatif Tahmini Değer.

Çizelge 3.2.5. NPLA Yöntemi Gold Standart Olan Kabul Edildiğinde Antikor Titreleri Yönünden Deneklerin Farklı Durumlarda Sınıflandırılmasında Alternatif Yöntem Olarak VNT'nin Duyarlılık, Seçicilik, Pozitif ve Negatif Tahmini Değerleri ve Doğruluk Oranları.

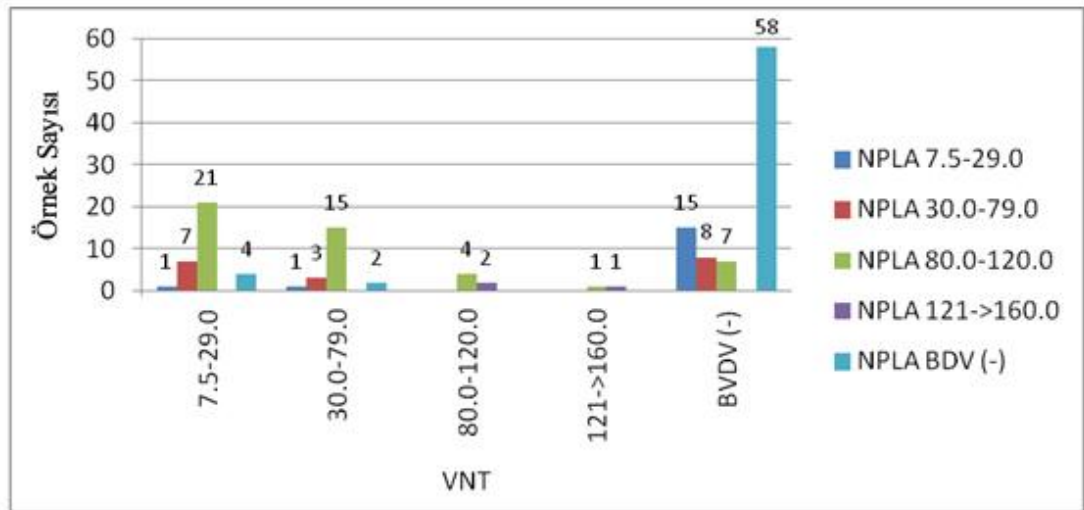
	Tanımlar	1.Model	2.Model	3.Model	4.Model
Duyarlılık	GP/(GP+YN)	123/180 (%68,3)	96/154 (%62,3)	24/74 (%32,4)	1/31 (%3,2)
Seçicilik	GN/(GN+YP)	114/120 (%95,0)	129/146 (%88,4)	151/226 (%66,8)	224/269 (%83,3)
Pozitif Tahmini Değer	GP/(GP+YP)	123/129 (%95,3)	96/113 (%85,0)	24/99 (%24,2)	1/46 (%2,2)
Negatif Tahmini Değer	GN/(YN+GN)	114/171 (%66,7)	129/187 (%69,0)	151/201 (%75,1)	224/254 (%88,2)
Doğruluk	(GP+GN)/(N)	237/300 (%79,0)	225/300 (%75,0)	175/300 (%58,3)	225/300 (%75,0)
κ Katsayısı		0,591	0,503	-0,007	-0,111
p-değeri		<0,001	<0,001	0,905	0,062

1.Modelde, denekler BVDV (-) ve BVDV (+) olarak ikiye ayrıldı, 2.Modelde BVDV (-) olan grup ile antikor titresi 121 \geq 160 olan grup birleştirilerek antikor titresi 7,5 ile 120 arasında değişen grup ile karşılaştırıldı. 3. Modelde BVDV (-) olan grup ile antikor titresi 121 \geq 160 ve antikor titresi 80-120 olan gruplar birleştirilerek antikor titresi 7,5 ile 79 arasında değişen grup ile karşılaştırıldı. 4. Modelde ise antikor titresi 7,5-29 arasında değişen grup ile diğer grupların birleşimi karşılaştırıldı. GP: Gerçek Pozitif, YN: Yalancı Negatif, GN: Gerçek Negatif, YP: Yalancı Pozitif, PTD: Pozitif Tahmini Değer, NTD: Negatif Tahmini Değer.

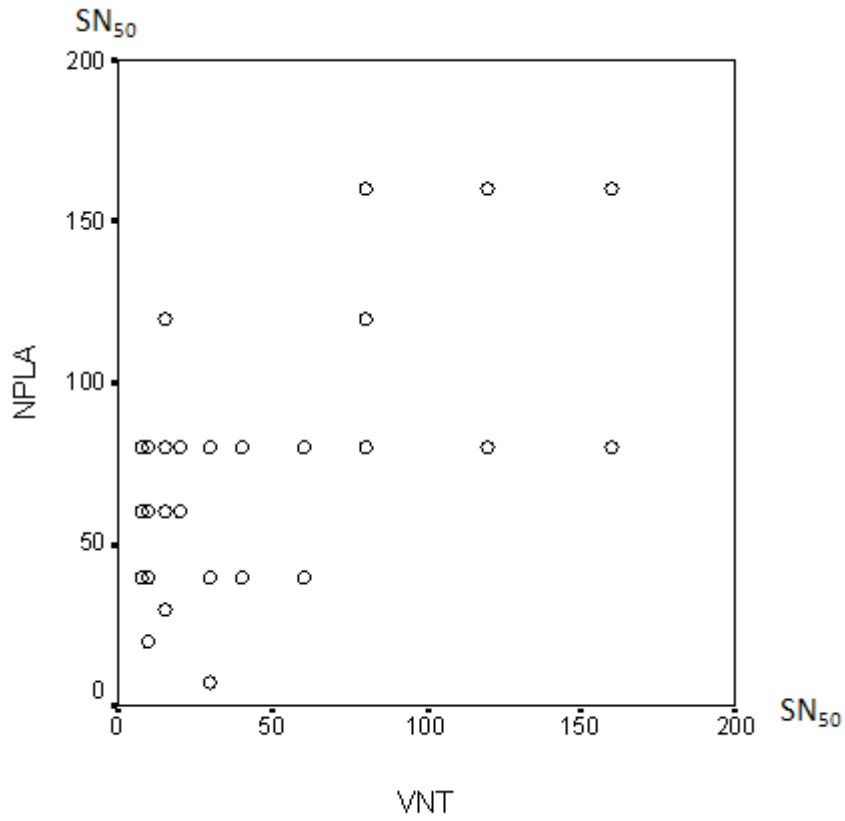
3.3. İşletmeler bazında pozitiflik oranlarının değerlendirilmesi

Birinci işletmede toplam 64 kan serumu BDV antikoru yönünden negatif olmasına karşın, bunlardan 58 kan serumu hem BDV hem de BVDV antikoru yönünden negatif olarak bulunmuştur (Şekil 3.3.1). Kan serumlarından 6 adedinde sadece BVDV antikoru yönünden pozitiflik tespit edilirken, pozitif örneklerde SN₅₀ titrelerine bakıldığında çoğunlukla BDV enfeksiyonu yönünde yükseklik gözlenmiştir. Pozitiflik tespit edilen koyun serumlarında SN₅₀ oranlarına göre NPLA/VNT testi sonuçlarının dağılımı Şekil 3.3.2’de görülmektedir.

Bu sonuçlara göre; Pestivirus enfeksiyonlarından BVDV’nin bu işletmede tek başına enfeksiyondan sorumlu olmadığı, BDV ile birlikte seyrettiği ve işletme için miks bir enfeksiyon varlığının sözkonusu olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca SN₅₀ antikor titre sonuçlarına göre, bireysel olarak her hayvanın hangi enfeksiyon yönünden pozitif olduğu belirlenmiştir.

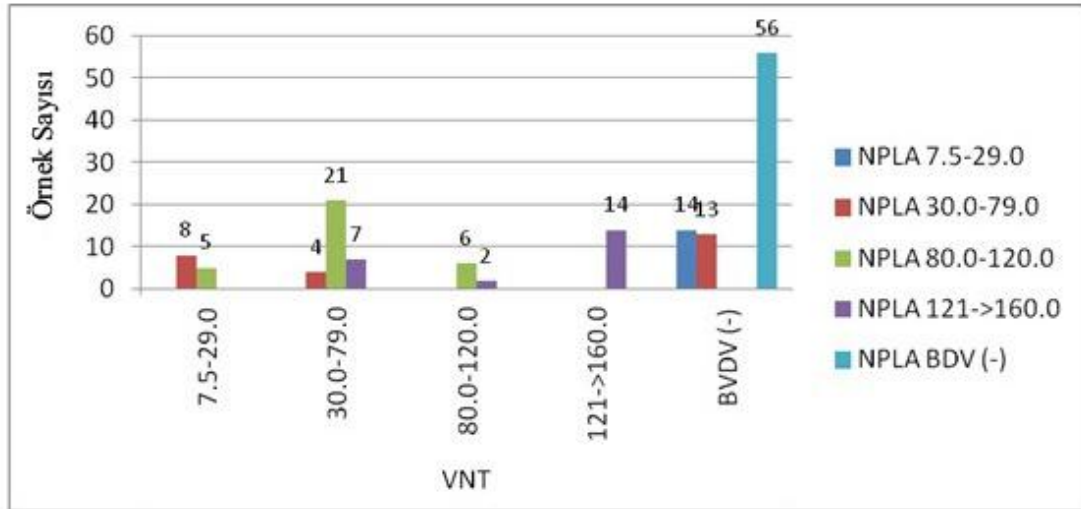


Şekil 3.3.1 Birinci işletmedeki antikor pozitif serum örneklerinin SN₅₀ değerlerinin BDV ve BVDV enfeksiyonları yönünden dağılımı.

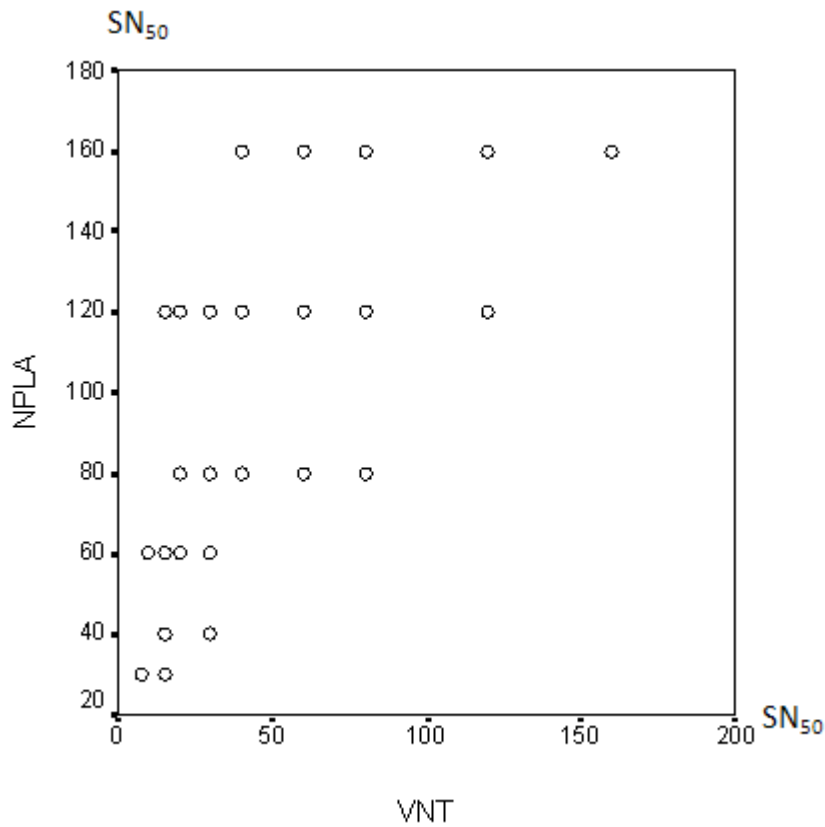


Şekil 3.3.2 Birinci işletmede pozitiflik tespit edilen koyun serumlarında SN₅₀ antikor titrelere göre NPLA/VNT testi sonuçlarının sayısal olarak dağılımı.

İkinci işletmeden alınan kan serumlarında da hem BVDV hem BDV enfeksiyonları yönünden pozitiflik tespit edilmiş olup, 56 kan serumunda hem BDV hem de BVDV yönünden antikor tespit edilmemiştir (Şekil 3.3.3). Enfeksiyonun tanısı yönünden SN₅₀ antikor titreleri araştırıldığında bu işletme için BDV enfeksiyonunun tek başına varlığından söz etmek mümkün olmaktadır. Bazı serumlarda her iki enfeksiyon yönünden eşit antikor titresi bulunurken, büyük bir çoğunluğunda ise BDV yönünde en az 2 basamak antikor titresi yüksekliği belirlenmiştir. SN₅₀ oranları tespit edilen koyun serumlarında NPLA/VNT testi sonuçlarının dağılımı Şekil 3.3.4'de gösterilmiştir.



Şekil 3.3.3 İkinci işletmedeki antikor pozitif serum örneklerinin SN₅₀ değerlerinin BDV ve BVDV enfeksiyonları yönünden dağılımı.



Şekil 3.3.4 İkinci işletmede pozitiflik tespit edilen koyun serumlarında SN₅₀ antikor titrelerine göre NPLA/VNT testi sonuçlarının sayısal olarak dağılımı.

4. TARTIŞMA

Tüm dünyada ve ülkemizde küçükbaş hayvan sürülerinde yaygın olan pestivirus enfeksiyonları, meydana getirdiği ekonomik kayıplar nedeniyle önem arz etmektedir. Ülkemiz hayvancılığının son yıllarda yaşadığı sıkıntıların temelinde işletmelerdeki enfeksiyöz hastalıklardan doğan hayvan kayıpları, yaşama gücü yüksek yavru alamama ve döl verimliliği sorunları bulunmaktadır. Giderek azalan hayvan sayısının arzu edilen düzeylere getirilebilmesi/artırılabilmesi için hayvan ithalatı yerine, ülkede mevcut bulunan ırkların ıslahı ve özellikle döl verimliliğine direkt etki edebilen mikrobiyel etkenlerin sürülerden eliminasyonunun hedef edinilmesi dikkate alınması gereken bir durumdur.

Özellikle OIE'nin (2009) önerisi ile Avrupa'da pestivirus enfeksiyonlarının teşhisinde nötralizasyon testi kullanılarak serolojik ayırıcı teşhise gidilmesi, referenz laboratuvarların sıklıkla kullandığı bir yöntemdir. Türkiye'de ise virus nötralizasyon testine dayalı serolojik ayırıcı teşhis, rutin tanı metodu olarak sıklıkla kullanılmamakla birlikte, pestiviruslarla ilgili epidemiyolojik araştırmaların temelini oluşturmaktadır. Türkiye'de Pestivirus enfeksiyonlarının küçükbaş hayvan sürülerinde varlığına dair Burgu ve ark. (2001) tarafından yapılan bir araştırmada, gebe koyunlarda ve post partum zamanda BVDV'ye karşı sırasıyla %25 ve %21,5 seropozitiflik tespit edilmiştir. 2004-2007 yılları arasında (Oguzoglu ve ark., 2009) sahadan elde edilen toplam 1036 adet koyun ve keçi kan serumu örneklerinde yapılan nötralizasyon testi sonuçlarına göre; BVDV'ye karşı yüksek oranda seropozitiflik (işletmeler bazında değişen oranlar %62,67-%91,96), BDV enfeksiyonu yönünden spesifik antikor ELISA testi ile %77,67'lik oranda seropozitiflik belirlenmiş ve izole edilen iki virus BDV olarak tanımlanmıştır. Keçi kan serumlarında yapılan diğer bir çalışmada (Ataseven ve ark., 2006) ise BVDV'ye karşı %30,2, BDV'ye karşı %63,6 seropozitiflik tespit edilmiştir.

Bu çalışmada iki koyunculuk işletmesinden elde edilmiş 300 adet koyun kan serumu örneği BVDV ve BD enfeksiyonları yönünden serolojik olarak kontrol edilmiş ve koyunlar arasında toplam seropozitiflik oranlarına bakıldığında (Çizelge 3.2.1) BD virusları ile oluşan pestivirus enfeksiyonlarının (180/300, %60) BVDV ile oluşturulan enfeksiyonlara (129/300, %43) göre daha yaygın olduğu tespit edildi. Test edilen 300 adet koyun kan serumunda her iki pestivirusa karşı (BVDV ve BDV) ortak antikor varlığı (123/300, %41) da belirlendi. Elde edilen sonuçlar, ülkemizde yapılan üç araştırma ile de uyumlu olup, pestivirus enfeksiyonlarının küçükbaş hayvancılık işletmelerinde yaygın olduğunu göstermektedir.

Pestivirus enfeksiyonlarının serolojik ayırıcı tanısında, koyunlarda enfeksiyon meydana getirebilen yakın akraba Border Disease virus (BDV) ve Bovine Virus Diarrhoea virus (BVDV) enfeksiyonlarının laboratuvar ayırımı önemli bir husustur. Anılan bu viruslar hem türler arası geçiş imkanı bulduklarından ve hem de antijenik olarak yakın akraba olduklarından, bu viruslara bağlı oluşan immun yanıt çapraz bağışıklık vermektedir. Oluşan bu çapraz bağışıklık tanısız metodlarla ayırt edilebilmektedir ve ayırıcı teşhiste tespit edilen antikor titrelerinin farklılıkları büyük önem arz etmektedir. Nitekim gerçek etiyolojik ajanın belirlenmesi için serumdaki nötralizan antikor titrelerine bakıldığında, her iki virusa (BVDV/BDV) karşı oluşan antikor yanıtın yüksek olanı enfeksiyöz ajanın tanımlanmasında dikkate alınmaktadır (OIE, 2009).

Ataseven ve ark. (2006) iki farklı keçi işletmesinden aldıkları kan serumu örneklerinde BVDV ve BDV'ye karşı nötralizasyon testleri ile gerçekleştirdikleri çalışmada, BVDV'ye karşı buldukları antikor pozitiflik oranlarının çapraz reaksiyondan kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir. Zira anılan bu çalışmada antikor titrelerinin tespiti yapılmamış, sadece seropozitiflik oranı verilmiştir. Ayrıca aşılammış hayvanlardaki yüksek düzeyde BVDV ve BDV seropozitifliğinin tespiti doğal enfeksiyonun varlığına işaret olarak bildirilmiştir. Tez çalışmasında kullanılan koyun kan serumları iki işletmeden köken almakta idi ve her iki işletmede de

Pestivirus nötralizan antikor varlığı yüksek bulunmuştur. Bu sonuçlar, aşılammamış olan bu işletmelerdeki koyunlarda pestivirus enfeksiyonunun varlığına işaret etmektedir. Aynı zamanda pestivirus enfeksiyonu pozitifliği tespit edilen bu işletmelerdeki enfeksiyonun hangi virustan kaynaklandığı konusu da aydınlatılarak ayırıcı teşhis yapılması söz konusu olmuştur.

Nötralizasyon testlerinin duyarlılıklarının karşılaştırıldığı bir diğer çalışmada (Çabalar ve Karaoğlu, 1999) sığır serumlarında BVDV'ye karşı yüksek oranda seropozitiflik saptanırken, NPLA testinin Nötralizasyon testine göre daha duyarlı ve hızlı bir yöntem olduğu bildirilmiş, NPLA'nın uygulama olanağı olmadığı durumlarda Nötralizasyon testine başvurulması önerilmiştir. Ancak anılan bu çalışmada SN₅₀ antikor titreleri karşılaştırılmamıştır. Tez çalışmasında kullanılan VNT ve NPLA testleri arasında T-testi kullanılarak yapılan analiz sonuçlarına göre; istatistiksel açıdan her iki test ile gerçekleştirilen SN₅₀ ölçümleri arasında anlamlı bir farklılık ($p < 0.001$) bulunmuştur. Buna göre; NPLA testinin VNT'ye oranla daha duyarlı bir test olduğu belirlenmiştir. Fakat bu testin sağlıklı şekilde yapılabilmesini zorlaştıran hususlardan; poliklonal serumdan hazırlanmış konjugatların temini ve deneyimli bir laboratuvar ekipman ve personelinin gerekliliği konuları akıldan çıkarılmamalıdır. NPLA ve VNT kullanılarak yapılan SN₅₀ antikor titrelerinin karşılaştırılması ile tüm serum örneklerinin bireysel olarak tanısal anlamda değerlendirilmesi imkanı ortaya çıkmıştır. Böylelikle hem hangi virus enfeksiyonunun sürüde yaygın olduğu ve hem de bireysel olarak hangi hayvanın hangi etkenle enfekte olduğu tespit edilebilmiştir.

Gerçekleştirilen bu çalışma ile koyunlarda pestivirus enfeksiyonlarının (BVDV, BDV) teşhisinde referenz laboratuvarlarda kullanımı uygun olan serolojik tekniklerin karşılaştırması ve pestivirus enfeksiyonlarına karşı oluşan immün yanıt sorgulanmıştır. Laboratuvar teşhisi için primer hücrelerin kullanımı; emek, tecrübe ve donanım gerektiren bir durumdur. Ayrıca primer hücre kültürlerinin sınırlı sayıda pasajları yapılabilmektedir. Bu nedenle devamlı hücre kültürlerinin kullanımına dayalı nötralizasyon testlerinin tercih edilmesi sözkonusu olmaktadır. Bu nedenle BVDV referenz virusu NADL MDBK hücre kültürüne, BD referenz virusu MOREDUN ise SFTR hücre kültürüne adapte edilerek kullanılmıştır.

Avrupa Domuz Vebası (CSFV) ile yasal mücadele tedbirlerinin açıklandığı bir çalışmada (Neukirch, 1980) BVDV ve CSFV virusu kullanılarak domuzlardan alınan saha serumlarında nötralizan antikörlerin karşılaştırılması yolu ile yapılan testlerde; $>1:40$ antikör titresi tespitinde büyük olasılıkla domuzlarda CSFV enfeksiyonundan bahsetmek mümkünken, $<1:40$ antikör titreleri tespitinde BVDV ile enfeksiyonu çağrıştırdığı ifade edilmiştir. Bu nedenle domuz serumlarında yapılan rutin taramalarda “sınır titre değeri” olarak $1:40$ belirlenmiş, gerçek negatifliğin olmadığı şüpheli durumlarda ayırıcı teşhis için karar verebilmek adına, domuz serumlarında BVDV antikörlerinin $1:5$ - $<1:40$ arasında olmasına dikkat edilmesi gerektiği bildirilmiştir. Almanya’da koyun ve domuzların birlikte tutulduğu bir işletmede domuzlardan bir pestivirusun tespitinin yapıldığı bir başka çalışmada (Oguzoglu ve ark., 2001), nötralizasyon testi kullanılarak aynı işletmeden alınan koyun kan serumları farklı pestiviruslara ve yeni izolata karşı test edilmiş ve yeni izolata karşı koyun kan serumlarında nötralizan antikör titrelerinin oldukça yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca CSFV referenz suşu Alfort-187 ve BVDV suşları ile düşük düzeyde çapraz reaksiyon tespiti yapılmış, BDV suşu Moredun’un bu antikörleri açıkça tanıdığı bildirilmiştir. Ruminant pestiviruslarının nötralizasyon testi temeline dayalı immunojenik varyasyonlarının tespitinin yapıldığı bir diğer çalışmada (Patel ve ark., 2005) 9 sığır BVDV 1, BVDV 2 ve BDV virusları ile deneysel enfekte edilmiş, kan serumlarında homolog ve heterolog suşlara karşı nötralizan antikör titreleri araştırılmış, sonuçta hastalıklara karşı aşılama kullanılmak üzere seçilecek suşun önemi üzerinde durulmuştur. Gerçi bu çalışmada nötralizan antikörlerin oluşumundan sorumlu olan E2 epitopu araştırılmamış olmakla birlikte, BVDV 1 ve 2 suşlarıyla transplasental enfeksiyona karşı aşı koşullu çapraz korunma sağlanmasında çapraz nötralizasyon aktivitesindeki varyasyonların etkisi olduğu üzerinde durulmuştur. Japonya’da küçük ruminant sürülerinde BDV enfeksiyonuna dair ilk epidemiyolojik verilerin sunulduğu bir çalışmada (Giangaspero ve ark., 2011), işletmelerden klinik bulgu bildirilmeksizin ve virus izolasyonu yapılmaksızın serolojik verilere dayalı olarak virus sirkülasyonunun olduğu tespit edilmiş, %17,6’lık bir BDV antikoru varlığı yanı sıra sığırcılık işletmesinde beslenen bir koyundan alınan sadece 1 serum örneğinde BDV’ye karşı

antikor negatifken aynı örnekte BVDV'ye karşı 1:256'lık bir antikor titresi tespit edilmiştir. Aynı çalışmada BDV'ye karşı kros antikor titrelerinin 20 ila >40 arasında olduğu bildirilmiştir. Yukarıda adı geçen sığır, koyun ve domuzlardaki pestivirus enfeksiyonlarının konu olduğu tüm çalışmalar ile bu tezde kullanılan serumlardan elde edilen antikor titreleri arasında bir sebep-sonuç ilişkisi kurulduğunda; BVDV ve BDV enfeksiyonlarının koyunlarda ayırıcı teşhisi konusunda aynı türden (ruminant) gelmeleri sebebiyle daha yüksek oranda çapraz bağışıklık vermeleri sözkonusu olacağından, domuzlardaki pestivirus enfeksiyonlarının (BVDV/BDV/CSFV) ayırıcı teşhisi için geçerli olan 1:40'lık sınır titre değeri gibi bir sabit sayının verilmesinin mümkün olamayacağı, bununla birlikte her bir pozitif serum örneği bireysel olarak SN₅₀ titreleri ile değerlendirildiğinde hangi etkene karşı yüksek antikor yanıt bulunuyorsa enfeksiyonun o virus kaynaklı olabileceği kararının verilmesinin mümkün olacağı görüşüne sahip olunmuştur.

Ülkelerin coğrafik özelliklerine bağlı olarak farklılık gösteren lokal pestivirus izolatlarının nötralizasyon testlerinde kullanılması ve bunların arasından uygun referenz virusun seçimi için ileri çalışmaların yapılması gerekliliği de göz ardı edilmemesi gereken bir durumdur. Zira oluşan nötralizan antikorların kinetiği yönünden, ülkelere ait lokal suşların o ülkedeki pestivirus enfeksiyonunun tanısı amacıyla nötralizasyon testlerinde kullanımı homolog virus olmaları sebebiyle tanısal önem arz etmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Elde edilen sonuçlara göre; koyun kan serumlarının pestivirus antikorları yönünden **ayırıcı teşhisi** yapılması gerektiğinde:

- Virus nötralizasyon testi ile sadece BVDV referenz virusu NADL'e karşı test edilmesinin yeterli olmadığı,
- NPLA testi kullanılarak BDV referenz virusu MOREDUN'a karşı da testlerin yapılması gerektiği,
- Sadece antikor pozitifliği yönünden serumların test edilmesinin yeterli olmadığı, pozitif serumlarda ayırıcı teşhis için mutlak surette antikor titrelerinin (SN_{50}) araştırılması gerektiği kanaatine varılmıştır.

ÖZET

Koyun Pestiviruslarının (Border Disease Virus, Bovine Virus Diarrhoea Virus) Antijenik Yakınlıklarının Serum Nötralizasyon Testi ile Araştırılması

Border Disease (BDV) ve Bovine Virus Diarrhoea (BVDV) virusları, *Flaviviridae* ailesine ait *Pestivirus* genusunda bulunan etkenlerdir. Pestiviruslar; koyunlarda abort, ölü doğum, kongenital anomalili veya yaşama gücü zayıf yavru doğumu gibi semptomlarla karakterizedir. Pestiviruslar, küçükbaş hayvancılık sektöründe döl verimliliğine direkt etkileri sebebiyle öneme sahip ekonomik kayıplara neden olan viral hastalıklar meydana getirmektedirler. Antijenik olarak yakın akraba olan bu etkenler, türler arası geçiş özelliklerinden dolayı farklı konakçılarda enfeksiyon meydana getirebilmekte ve organizmada enfeksiyona karşı çapraz (kros) nötralizasyon verebilecek antikorlar sentezlenebilmektedir. Bu durum enfeksiyonların ayırıcı teşhisi yönünden önem arz etmektedir.

Koyunlarda aynı genusta bulunan pestivirus enfeksiyonlarından BDV ve BVDV'nin serolojik ayırıcı tanısını amaçlayan bu çalışmada, 300 adet koyun kan serumu pestivirus spesifik antikor varlığı yönünden nötralizasyon testleri kullanılarak test edilmiş olup; 180'inde (%60) BDV için, 129'unda (%43) BVDV için pozitiflik belirlenmiştir. Ayrıca her iki enfeksiyon yönünden pozitif bulunan 123 adet serum ve tek enfeksiyon yönünden pozitif bulunan serumlar SN₅₀ testine tabii tutulduğunda, her bir hayvanın hangi virusla enfekte olduğu bireysel olarak aydınlatılabilmektedir.

Ruminant pestiviruslarının ayırıcı teşhisinde ana kriter homolog türe karşı yüksek antikor titresinin belirlenmesidir. Ayırıcı serolojik teşhiste Virus Nötralizasyon testinde BVDV referenz suşu olarak NADL, Nötralizasyon Peroksidaz Bağlı Antikor tekniği kullanılarak yapılacak olan nötralizasyon testinde Border Disease (BD) referenz suşu olarak Moredun'un kullanımı önerilmektedir.

Anahtar Sözcükler: Ayırıcı teşhis, koyun, pestivirus, serum.

SUMMARY

The Investigation of Antigenic Relationship of Sheep Pestiviruses (Border Disease, Bovine Virus Diarrhoea Virus) Using by Serum Neutralization Test

Border Disease (BDV) and Bovine Virus Diarrhoea (BVD) viruses are the agents, which belongs to genus pestivirus in the family *Flaviviridae*. Pestivirus infections of ewes characterized by abortion, stillbirth, congenital abnormality and birth of weak offsprings. Pestiviruses effect on reproductivity of sheep in farming sector and this cause important economic losses. These two agents are closely related as antigenically, they can be transmitted interspecies and cause infections on the different hosts. These infections result in the synthesis of cross-neutralizing antibodies in the organism against viral infections. This is important in the terms of differential diagnosis of infections.

The aim of this study is serological differential diagnosis of BDV and BVDV infections, which belongs to the same genus. The 300 blood serum samples from sheep tested using by neutralization tests to determine the presence of specific pestivirus antibodies. The 180 of 300 samples (60%) are found positive for BDV and 129 samples (43%) are found positive for BVDV. In addition, the 123 samples, which are positive for both infection, and positive samples for only one infection were investigated using by SN₅₀. Thus, it was explained that each animal infected as individual by which virus.

The main criteria for the differential diagnosis of ruminant pestiviruses is to determine the high antibody titer against homologous species. In the differential serological diagnosis it is proposed that the use of NADL for BVD in VNT, and Moredun for BD in NPLA as reference strains.

Key Words: Differential diagnosis, pestivirus, serum, sheep.

KAYNAKLAR

- ARNAL, M. C., FERNANDEZ DE LUCO, D., RIBA, L., MALEY, M., GIRLAY, WILLOUGHBY, J.K., VILCEK, S., NETTLETON, P. F. (2004). A novel pestivirus associated with deaths in Pyrenean chamois (*Rupicapra pyrenaica pyrenaica*). *J. Gen. Virol.*, **85**: 3653–3657
- ATASEVEN, V.S., ATASEVEN, L., TAN T., BABUR, C., OGUZOGLU, T.C. (2006). Seropositivity of agents causing abortion in local goat breeds in Eastern and South-eastern Anatolia, Turkey. *Rev. Med. Vet.*, **157**: 955-961
- BARLOW, R.M., PATTERSON, D.S.P. (1982). Border disease of sheep: a virus induced teratogenic disorder. *Adv. Vet. Med. (Suppl. J. Vet. Med.)*, **36**: 1–87
- BECHER, P., SHANNON, A.D., TAUTZ, N., THIEL, H.J. (1994). Molecular characterization of Border disease virus, a pestivirus from sheep. *Virology*, **198**: 542–551
- BECHER, P., KONIG, M., PATON, D. J., THIEL, H. J. (1995). Further characterization of border disease virus isolates: Evidence for the presence of more than three species within the genus pestivirus. *Virology*, **209**: 200-206
- BECHER, P., ORLICH, M., SHANNON, A.D., HORNER, G., KONIG, M., THIEL, H.J. (1997). Phylogenetic analysis of pestiviruses from domestic and wild ruminants. *J. Gen. Virol.*, **78**: 1357–1366
- BECHER, P., ORLICH, M., KOSMIDOU, A., KONIG, M., BAROTH, M., THIEL, H.J. (1999). Genetic diversity of pestiviruses: identification of novel groups and implications for classification. *Virology*, **262**: 64–71
- BECHER, P., AVALOS RAMIREZ, R., ORLICH, M., ROSALES, S.C., KONIG, M., SCHWEIZER, M., STALDER, H. SCHIRRMEIER, H., THIEL, H. J. (2003). Genetic and antigenetic characterization of novel pestivirus genotypes: implication for classification. *Virology*, **311**: 96–104
- BURGU, İ., AKÇA, Y., ALKAN, F., ÖZKUL, A., KARAOĞLU, T., BİLGE-DAĞALP, S., OĞUZOĞLU, C., YEŞİLBAĞ, K.(2001). Koyunlarda doğum öncesi ve sonrası dönemlerde Bovine Viral Diarrhea (BVD) Virus enfeksiyonunun serolojik, virolojik ve patogenez yönünden araştırılması. *Turk J. Vet. Anim. Sci.*, **25**: 551-557
- CARLSSON, U. (1991). Border disease in sheep caused by transmission of virus from cattle persistently infected with bovine virus diarrhoea virus. *Vet. Rec.*, **128**: 145–147
- CARLSSON, U., BELAK, K. (1994). Border disease virus transmitted to sheep and cattle by a persistently infected ewe: Epidemiology and control. *Acta Vet. Scand.*, **35**: 79-88
- COLLETT, M.S., LARSON, R., BELZER, S.K., RETZEL, E. (1988). Proteins encoded by bovine viral diarrhoea virus: The genomic organization of a pestivirus. *Virology*, **165** (1) :200–208
- COLLETT, M.S., WISKERCHEN, M., WELNIAK, E., BELZER, S.K.(1991). Bovine viral diarrhoea virus genomic organization. *Arch. Virol.*, Suppl; 3:19–27
- CRANWELL, M.P., OTTER, A., ERRINGTON, J., HOGG, R.A., WAKELEY, P., SANDVIK, T. (2007). Detection of Border disease virus in cattle. *Vet. Rec.*, **11**: 211–212
- ÇABALAR, M., KARAOĞLU, T., (1999). Sığırlarda Bovine Viral Diarrhoea Virus Enfeksiyonuna karşı antikor varlığının araştırılmasında nötralizasyon immün peroksidaz ve serum nötralizasyon testlerinin karşılaştırılması. *Ankara Univ. Vet. Fak. Derg.*, **46**: 249-255

- DARBYSHIRE, J.H. (1960). A serological relationship between swine fever and mucosal disease of cattle. *Vet. Rec.*, **72**: 331
- DARBYSHIRE, J.H. (1962). Agar gel diffusion studies with a mucosal disease of cattle. II. A serological relationship between a mucosal disease and swine fever. *Res. Vet. Sci.*, **3**: 123-128
- DE MIA G.M., GREISER-WILKE, I., FELIZIANI, F., GIAMMARIOLI, M., DE GIUSEPPE, A. (2005). Genetic characterization of a caprine pestivirus as the first member of a putative novel pestivirus subgroup. *J. Vet. Med., B* **52**: 206-210
- DEPNER, K., HUBSCHLE, O.J.B., LIESS, B., (1991). BVD-virus infection in goats—experimental studies on transplacental transmissibility of the virus and its effect on reproduction. *Arch Virol., Suppl.*, **3**: 253–256
- DONIS, R.O. (1995). Molecular biology of bovine viral diarrhoea virus and its interactions with the host. *Vet. Clin. North. Am.*, **11**: 393–423
- DUBOIS, E., RUSSO, P., PRIGENT, M., THIÉRY, R., (2008). Genetic characterization of ovine pestiviruses 417 isolated in France, between 1985 and 2006. *Vet. Microbiol.*, **130**: 69-79
- EVERMANN, J.F., RIDPATH, J.F. (2002). Clinical and epidemiologic observations of bovine viral diarrhoea virus in the Northwestern United States. *Vet. Microbiol.*, **89**:129–139
- FERNELIUS, A.L., AMTOWER, W.C., MALMQUIST, W.A., LAMBERT, G., MATTHEWS, P.I. (1973). Bovine virus diarrhoea in swine: neutralizing antibody in naturally and experimentally infected swine. *Can. J. Comp. Med.*, **37**: 96–102
- FLORES, E.F., GIL, L.H., BOTTON, S.A., WEIBLEN, R., RIDPATH, J.F., KREUTZ, L.C., PILATI, C., DRIEMEYER, D., MOOJEN, V., WENDELSTEIN, A.C. (2000). Clinical, pathological and antigenic aspects of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) type 2 isolates identified in Brazil. *Vet. Microbiol.*, **77**:175-183
- FLORES, E.F., RIDPATH, J.F., WEIBLEN, R., VOGEL, F.S.F., GIL, L.H.V.G., (2002). Phylogenetic analysis of Brazilian bovine viral diarrhoeavirus type 2 (BVDV-2) isolates: evidence for a subgenotype within BVDV-2. *Virus Res.*, **87**: 51–60
- FREY, H.R., LIESS, B. (1971). Vermehrungskinetik und Verwendbarkeit eines stark zytopathogenen VD-MD-Virusstammes für diagnostische Untersuchungen mit der Mikrotitermethode. *Zentralbl. Veterinarmed. B.*, **18**: 61–71
- FRITZEMEIER, J., (1996). Früh- und Spätausbruch experimentell induzierter Mucosal Disease: Charakterisierung der beteiligten BVD-Viren. Inaugural Dissertation, Hannover, Germany.
- FRÖLICH, K., THIEDE, S., KOZIKOWSKI, T., JAKOB, W., (2002). A review of mutual transmission of important infectious diseases between livestock and wildlife in Europe. *Ann. NY. Acad. Sci.*, **969**: 4–13
- FULTON, R.W., DOWNING, M.M., HAGSTAD, H.V.(1982). Prevalence of bovine herpesvirus-1, bovine viral diarrhoea, parainfluenza-3, bovine adenoviruses-3 and -7, and goat respiratory syncytial viral antibodies in goats. *Am. J. Vet. Res.*, **43**: 1454–1457
- GALLEI, A., ORLICH, M., THIEL, H.J., BECHER, P.(2005). Noncytopathogenic pestivirus strains generated by nonhomologous RNA recombination: alterations in the NS4A/NS4B coding region. *J. Virol.*, **79** (22): 14261–14270
- GIAMMARIOLI, M., LA ROCCA, S. A., STEINBACH, F., CASCIARI, C., DE MIA, G. M.(2011). Genetic and antigenic typing of border disease virus (BDV) isolates from Italy reveals the existence of a novel BDV group. *Vet. Microbiol.*, **147**: 3-4, 231-236
- GIANGASPERO, M., HARASAWA, R., (2011). Species characterization in the genus Pestivirus according to palindromic nucleotide substitutions in the 5'-untranslated region. *J. Virol. Methods*, **174** (1-2):166-72

- GOYAL, S.M., BOULJIHAD, M., HAUGERUD, S., RIDPATH, J.F. (2002). Isolation of bovine viral diarrhoea virus from an alpaca. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **14**:523–525
- GROOMS, D.L. (2004). Reproductive consequences of infection with bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, **20**:5–19
- HEWICKER-TRAUTWEIN, M., LIESS, B., FREY, H.R., TRAUTWEIN, G. (1994). Virological and pathological findings in sheep fetuses following experimental infection of pregnant ewes with cytopathic bovine viral diarrhoea virus. *J. Vet. Med. Series B* **41**: 264–276
- HEINZ, F. X., COLLETT, M. S., PURCELL, R. H., GOULD, E. A., HOWARD, C. R., HOUGHTON, M., MOORMANN, R. J. M., RICE, C. M., THIEL, H.-J. (2000). Family Flaviviridae in Virus Taxonomy. In Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, pp. 859–868. Academic Press, San Diego, USA
- HYERA, J.M.K., LIESS, B., FREY, H.-R. (1987). A direct neutralizing peroxidase Linked Antibody Assay for detection and titration of antibodies to bovine viral diarrhoea virus. *J. Vet. Med. Series B*, **34**: 227-229
- HUGHES, L.E., KERSHAW, G.F., SHAW, I.G. (1959). Border Disease. An undescribed disease of sheep. *Vet. Rec.*, **71**: 313-317
- HURTADO, A., GARCIA-PEREZ, A.L., ADURIZ, G., JUSTE, R.A. (2003). Genetic diversity of ruminant pestiviruses from Spain. *Virus Res.*, **92**:67-73
- HURTADO, A., ADURIZ, G., NIEVES, G., OPORTO, B., JUSTE, R.A., LAVIN, S., LOPEZ-OLVERA, J.R., IGNASI, M. (2004). Molecular identification of a new pestivirus associated with increased mortality in the pyrenean chamois in Spain. *J. Wild D.*, **40**:796-800
- JOHNSON, C.M., PEREZ, D.R., FRENCH, R., MERRICK, W.C., DONIS, R.O., (2001). The NS5A protein of bovine viral diarrhoea virus interacts with the alpha subunit of translation elongation factor-1. *J. Gen. Virol.*, **82**: 2935-2943
- JULIA, S., CRAIG, M.I., JIMENEZ, L.S., PINTO, G.B., WEBER, E.L. (2009). First report of BVDV circulation in sheep in Argentina. *Prev. Vet. Med.*, **90**: 274–277
- KIM, I.J., HYUN, B.H., SHIN, J.H., LEE, K.K., LEE, K.W., CHO, K.O., KANG, M.I., (2006). Identification of bovine viral diarrhoea virus type 2 in Korean native goat (*Capra hircus*). *Virus Res.*, **121**: 103–106
- KIRKLAND, P.D., MACKINTOSH, S.G., (2006). Ruminant Pestivirus Infections. Part 1. Diagnostic Overview. *Australia and New Zealand Standard Diagnostic Procedures*, 1-30
- KIRKLAND, P.D., FROST, M.J., FINLAISON, D.S., KING, K.R., RIDPATH, J.F., GU, X., (2007). Identification of a novel virus in pigs Bungowannah virus: a possible new species of pestivirus. *Virus Res.*, **129**: 26–34
- KRAMETTER-FROETSCHER, R., LOITSCH, A., KOHLER, H., SCHLEINER, A., SCHIEFER, P., MOESTL, K., GOLJA, F., BAUMGARTNER, W., (2006). Prevalence of antibodies to pestiviruses in goats in Austria. *J. Vet. Med. Series B.*, **53**:48–50
- KRAMETTER-FROETSCHER, R., LOITSCH, A., KOHLER, H., SCHLEINER, A., SCHIEFER, P., MOESTL, K., GOLJA, F., BAUMGARTNER, W. (2007). Serological survey for antibodies against pestiviruses among sheep in Austria. *Vet. Rec.*, **160** (21):726-30
- KRAMETTER-FROETSCHER, R., BENETKA, V., MOESTL, K., BAUMGARTNER, W. (2008). Transmission of Border Disease Virus from sheep to calves – a possible risk factor for the Austrian BVD eradication programme in cattle. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift/Veterinary Medicine Austria*, **95**: 200–203
- LAMONTAGNE, L., ROY, R. (1984). Presence of antibodies to bovine viral diarrhoea-mucosal disease virus (border disease) in sheep and goat flocks in Quebec. *Can. Comp. Med.*, **48**: 225–227
- LIESS, B., MOENNIG, V. (1990). Ruminant pestivirus infection in pigs. *Rev. Sci. Tech.*, **9**: 151–161

- LOKEN T. (1990). Pestivirus infections in Norway. Epidemiological studies in goats. *J. Comp. Pathol.*, **103**: 1-10
- LOKEN, T. (1995). Ruminant pestivirus infections in animals other than cattle and sheep. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, **3**: 597–614
- LOKEN, T. (2000). Border disease in goats. In: Recent advances in goat diseases, ed. Tempesta M. International Veterinary Information Service, Ithaca, NY.
- LIU, L., XIA, H., BAULE, C., BELÁK, S., WAHLBERG, N. (2010). Effects of methodology and analysis strategy on robustness of pestivirus phylogeny. *Virus Res.*, **147**: 1, 47-52
- MARCO, I., ROSELL, R., CABEZON, O., MENTABERRE, G., CASAS, E., VELARDE, R., LOPEZ-OLVERA, J.R., HURTADO, A., LAVÍN, S., (2008). Epidemiological study of border disease virus infection in Southern chamois (*Rupicapra pyrenaica*) after an outbreak of disease in the Pyrenees (NE Spain). *Vet. Microbiol.*, **127**: 29-38
- MEYERS, G., THIEL, H.-J. (1996). Molecular characterization of pestiviruses. *Adv. Virus. Res.*, **47**: 53–118
- MEYLING, A. (1990). Border disease / BVD hos geder (BD/BVD in goats). In: State Veterinary Serum Laboratory and State Veterinary Institute for Virus Research. København, 3-4
- MISRA, N., RAJUKUMAR, K., TIWARI, A., NEMA, R. K., BEHERA, S. P., SATAV, J. S., DUBEY, S. C. (2009). Prevalence of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) antibodies among sheep and goats in India. *Trop. Animal Health Prod.*, **41**:1231-1239
- MOENNING, V. (1990). Pestiviruses: a review. *Vet. Microbiol.*, **23**: 35–54
- MURPHY, F.A., GIBBS, J. P.E., HORZINEK, M.C., STUDDERT, M.J. (1989). VETERINARY VIROLOGY. Third Edition ED: MURPHY, F.A., GIBBS, J. P.E., HORZINEK, M.C., STUDDERT, M.J. Academic Press, USA, p: 563-569
- NAGAI, M., ITO, T., SUGITA, S., GENNO, A., TAKEUCHI, K., OZAWA, T., SAKODA, Y., NISHIMORI, T., TAKAMURA, K., AKASHI, H. (2001). Genomic and serological diversity of bovine viral diarrhoea virus in Japan. *Arch. Virol.*, **146**: 685–696
- NETTLETON, P. F. (1987). Pathogenesis and epidemiology of border disease. *Annales de Recherches Veterinaires* **18**: 147-155
- NETTLETON, P. F., ENTRICAN, G. (1995). Ruminant pestiviruses. *British Vet. J.*, **151**: 6, 615-642
- NETTLETON, P.F., GILRAY, J.A., RUSSO, P., DLISSI, E. (1998). Border disease of sheep and goats. *Vet. Res.*, **29**: 327–340
- NETTLETON, P.F., WILLOUGHBY, K. (2007). Border Disease. In: DISEASES OF SHEEP Fourth Edition. Edited by: Aitken ID. Oxford: Blackwell Science Publishing, p.119-126
- NEUKIRCH, M. (1980). Bekämpfung der Europäischen (klassischen) Schweinepest. *Tierärztl. Prax.* **8**: 55-74
- OIE (2009). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Chapter 2.7.1 Border Disease p: 963-967
- OGUZOGLU, T.C., FLOEGEL-NIESMANN, G., FREY, H.R., MOENNIG, V. (2001). Zur Differentialdiagnostik Klassische Schweinepest / Border Disease: Seroepidemiologische Untersuchung einer Pestivirusinfektion auf einem schaf- und schweinehaltenden Betrieb. *Dtsch. tierärztl. Wschr.* **108**, **5**: 210-213
- OGUZOGLU, T.C. (2002). Serologische Differential Diagnostik der Klassischen Schweinepest (KSP) mit Border Disease (BD). Inaugural Dissertation. Hannover, Germany.

- OGUZOGLU, T. C. (Derleme) (2008). Review. Border Disease. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.*, **55**: 69-74
- OGUZOGLU, C.T., TAN, M.T., TOPLU, N., DEMIR, A.B., DAGALP, S.B., KARAOGLU, T., OZKUL, A., ALKAN, F., BURGU, I., HAAS, L., GREISER-WILKE, I. (2009). Border disease virus (BDV) infections of small ruminants in Turkey: a new BDV subgroup?, *Vet. Microbiol.*, **135**: 374–379
- OLAFSON, P., MC CALLUM A., D., FOX, F.X. (1946). An apparently new transmissible disease of cattle. *Cornell Vet.*, **36**: 205-213
- PATEL, J.R., DIDLICK, S., QUINTON, J. (2005). Variation in immunogenicity of ruminant pestiviruses as determined by the neutralisation assay, *The Vet. J.*, **169**: 468–472
- PATON, D. J., SANDS, J., ROEHE, P. M. (1991). BVD monoclonal antibodies: Relationship between viral protein specificity and viral strain specificity. *Arch. Virol.*, (Suppl. 3), 47-54
- PATON, D. J. (1995). Pestivirus diversity. *J. Com. Pathol.*, **112**: 215-236
- PELLERIN, C., VAN DEN HURK, J., LECOMTE, J. & TIJSSEN, P. (1994). Identification of a new group of bovine viral diarrhea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. *Virology*, **203**:26-268
- PIOZ, M., LOISON, A., GILBERT, P., DUBREY, D., MENAUT, P., LE TALLEC, B., ARTOIS, M., GILOT-FROMONT, E. (2007). *Transmission of a pestivirus infection in a population of Pyrenean chamois. Vet. Microbiol*, **119**: 19-30
- PLANT, J.W., LITTLEJOHNS, I.R.; GARDINER, A.C., VANTSIS, J.T., MUCK, R.A. (1973) Immunological relationship between border disease, mucosal disease and swine fever. *Vet. Rec*, **92**: 455
- PRATELLI, A., MARTELLA, V., CIRONE, F., BUONAVOGLIA, D., ELIA, G., TEMPESTA, M., BUONAVOGLIA, C. (2001). Genomic characterization of pestiviruses from lambs and kids in Southern Italy. *J. Virol. Meth.*, **94**: 81–85
- QU, L., MCMULLAN, L.K., RICE, C.M. (2001). Isolation and characterization of noncytopathic pestivirus mutants reveals a role for nonstructural protein NS4B in viral cytopathogenicity. *J. Virol.*, **75**: 10651-10662
- RAMSEY, F. K., CHIVERS, W. H. (1953). Mucosal disease of cattle. *North American Veterinarian*, **34**: 629-633
- REAGAN, K.J., GOLDBERG, B., CROWELL, R.L. (1984). Altered receptor specificity of coxsackievirus B3 after growth in rhabdomyosarcoma cells. *J. Virol.*, **49**: 635-640
- RICHEY, E.J. (2004). Bovine Viral Diarrhea. Veterinary Medicine-Physiological Science Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. P:1-5
- RIDPATH, J. F., BOLIN, S. R., DUBOVI, E. J. (1994). Segregation of bovine viral diarrhea virus into genotypes. *Virology*, **205**: 66-74
- RIDPATH, J.F., BOLIN, S.R. (1997). *Comparison of the complete genomic sequence of the border disease virus, BD31 to other pestiviruses. Virus Res.*, **50**: 237–243
- RUMENAPF, T., UNGER, G., STRAUSS, J.H., THIEL, H.J. (1993). Processing of the envelope glycoproteins of pestiviruses. *J. Virol.*, **67** (6): 3288– 3294
- RUMENAPF, T., THIEL, H.-J. (2008). Molecular biology of pestiviruses. In: Mettenleiter T.C., Sobrino F. (Eds.), *Animal viruses: Molecular biology*, Caister Academic Press, Norwich, UK, pp. 39–96
- SCHERER, C. F. C., FLORES, E. F., WEIBLEN, R., CARON, L., IRIGOYEN, L. F., NEVES, J. P., MACIEL, M. N. (2001). Experimental infection of pregnant ewes with bovine viral diarrhea virus type-2: effect on the pregnancy and fetus. *Vet. Microbiol.*, **79**: 285-299

- SCHIRRMEIER, H., STREBELOW, G., DEPNER, K., HOFFMANN, B., BEER, M. (2004). Genetic and antigenic characterization of an atypical pestivirus isolate, a putative member of a novel pestivirus species. *J. Gen. Virol.*, **85**: 3647–3652
- SCHLEINER, A., KRAMETTER-FROTSCHER, R., SCHIEFER, P., LOITSCH, A., GOLJA, F., MOSTL, K., BAUMGARTNER, W. (2006). Seroepidemiologische Untersuchung bei Schafen in Karnten zur Verbreitung von ruminanten Pestiviren. *Berl. Münch. Tierarztl. Wochenschr.*, **119**: 203–208
- SCHMEISSER, S., POSTEL, A., OGUZOGLU, T.C., BECHER, P. (2011). Genetic and antigenic characterization of a novel sheep pestivirus most closely related to CSFV. 8th ESVV pestivirus symposium September, 25-28, 2011 Hannover-Germany, p: 48
- SNOWDON, W. A., FRENCH, E. L. (1968). The bovine mucosal disease-swine fever virus complex in pigs. *Aust. Vet. J.*, **44**: 179–184
- STALDER, H.P., MEIER, P.H., PFAFFEN, G., WAGECK-CANAL, C., RÜFENACHT, J., SCHALLER, P., BACHOFEN, C., MARTI, S., VOGT, H.R., PETERHANS, E. (2005). *Genetic heterogeneity of pestiviruses of ruminants in Switzerland. Prev. Vet. Med.*, **72**: 37-41
- SULLIVAN, D. G., CHANG, G. J., AKKINA, R. K. (1997). Genetic characterization of ruminant pestiviruses: sequence analysis of viral genotypes isolated from sheep. *Virus Res.*, **47**: 19–29
- TAUTZ, N., ELBERS, K., STOLL, D., MEYERS, G., THIEL, H.-J. (1997). Serine protease of pestiviruses: determination of cleavage sites. *J. Virol.*, **71**: 5415–5422
- TERPSTRA, C. Border disease: A congenital infection of small ruminants (1985). *Prog. Vet. Microbiol. Immunol.*, **1**: 175-198
- TERPSTRA, C., WENSVOORT, G. (1998). Natural infections of pigs with bovine viral diarrhoea virus associated with signs resembling swine fever. *Res. Vet. Sci.*, **45**: 137–142
- THABTI, F., LETELLIER, C., HAMMAMI, S., PEPIN, M., RIBIERE, M., MESPLEDE, A., KERKHOFS, P., RUSSO, P. (2005). *Detection of a novel border disease virus subgroup in Tunisian sheep. Arch. Virol.*, **150**: 215-229
- THIEL, H.-J., COLLETT, M.S., GOULD, E.A., HEINZ, F.X., HOUGHTON, M., MEYERS, G., PURCELL, R.H., RICE, C.M. (2005). FAMILY FLAVIVIRIDAE. IN: FAUQUET, C.M., MAYO, M.A., MANILOFF, J., DESSELBERGER, U., BALL, L.A. (Eds.), VIRUS TAXONOMY. CLASSIFICATION AND NOMENCLATURE OF VIRUSES. 8TH ED. ELSEVIER ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, pp. 981-998
- THRUSFIELD, M. (2005). *Veterinary Epidemiology*. Blackwell Science Ltd, P.307
- TIDONA, C., DARAI, G. (2002). THE SPRINGER INDEX OF VIRUSES, Springer Science + Business Media, LLC 2011, p: 328-331
- TOPLU, N., OGUZOGLU, T.C., ALBAYRAK, H. (2011). Dual Infection of Foetal and Neonatal Small Ruminants with Congenital Border Disease Virus and Peste des Petits Ruminants Virus (PPRV): Neuronal Tropism of PPRV as a Novel Finding. *J. Comp. Pathol.*, doi:**10.1016/2011.07.004**
- TRAUTWEIN, G., HEWICKER, M., LIESS, B., ORBAN, S., GRUNERT, E. (1986). Studies on transplacental transmissibility of a bovine virus diarrhoea (BVD) vaccine virus in cattle. III. Occurrence of central nervous system malformations in calves born from vaccinated cows. *J. Vet. Med. Series B.*, **33**: 260–268
- VALDAZO-GONZALEZ, B., ALVAREZ-MARTINEZ, M., GREISER-WILKE, I. (2006). Genetic typing and prevalence of Border disease virus (BDV) in small ruminant flocks in Spain. *Vet. Microbiol.*, **117**: 141–153

- VALDAZO-GONZALEZ, B., ALVAREZ-MARTINEZ, M., SANDVIK, T. (2007). Genetic and antigenic typing of border disease virus isolates in sheep from the Iberian Peninsula. *Vet. J.*, **174**: 316-324
- VAN CAMPEN, H., RIDPATH, J.F., WILLIAMS, E. (2001). Isolation of bovine viral diarrhoea virus from a free-ranging mule deer in Wyoming. *Wildl. Dis.*, **37**:306–331
- VANTSIS J.T., BARLOW R.M., FRASER J., MOULD D.L. (1976). Experiments in border disease VIII. Propagation and properties of a cytopathic virus. *J. Comp. Pathol.*, **86**: 111–120
- VILCEK, SC., STADEJEK, T., BALLAGI-PORDANY, A., LOWINGS, J. P., PATON, D. J., BELAK, S. (1996). Genetic variability of classical swine fever virus. *Virus Res.*, **43**: 137-147
- VILCEK, S., NETTLETON, P.F., PATON, D.J., BELAK, S. (1997). Molecular characterization of ovine pestiviruses. *J. Gen. Virol.*, **78**:725–735
- VILCEK, S., PATON, D.J., DURKOVIC, B., STROJNY, L., IBATA, G., MOUSSA, A., LOITSCH, A., ROSSMANITH, W., VEGA, S., SCICLUNA, M.T., PALFI, V. (2001). Bovine viral diarrhoea virus genotype-1 can be separated into at least eleven genetic groups. *Arch. Virol.*, **146**: 99–115
- VILCEK, S., DURKOVIC, B., BOBAKOVA, M., SHARP, G., PATON, D.J. (2002). Identification of bovine viral diarrhoea virus 2 in cattle in Slovakia. *Vet. Rec.*, **151**: 150–152
- VILCEK, S., DURKOVIC, B., KOLESAROVA, M., GREISER-WILKE, I., PATON, D. (2004). Genetic diversity of international bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates: identification of a new BVDV 1 genetic group. *Vet. Res.*, **35**: 609–615
- WEILAND, E., AHL, R., STARK, R., WEILAND, F., THIEL, H.J. (1992). A second envelope glycoprotein mediates neutralization of a pestivirus, hog cholera virus. *J. Virol.*, **66** (6): 3677–3682
- WINDISCH, J. M., SCHNEIDER, R., STARK, R., WEILAND, E., MEYERS, G., THIEL, H. J. (1996). RNase of classical swine fever virus: biochemical characterization and inhibition by virus-neutralizing monoclonal antibodies. *J. Virol.*, **70**:352-358
- WILLOUGHBY, K., VALDAZO-GONZALES, B., MALEY, M., GILRAY, J., NETTLETON, P. (2006). Development of a real time RT-PCR to detect and type ovine pestiviruses. *J. Virol.*, **132**: 187-194
- WISKERCHEN, M. A., COLLETT, M. S. (1991). Pestivirus gene expression: protein p80 of bovine viral diarrhoea virus is a proteinase involved in polyprotein processing. *Virology*, **184**:341–350
- XU, X., ZHANG, Q., YU, X., LIANG, L., XIAO, C., XIANG, H., TU, C. (2006). Sequencing and comparative analysis of a pig bovine viral diarrhoea virus genome. *Virus Res.*, **122**: 164–170
- XU, J., MENDEZ, E., CARON, P. R., LIN, C., MURCKO, M. A., COLLETT, M. S., RICE, C. M. (1997). Bovine viral diarrhoea NS3 serine proteinase: polyprotein cleavage sites, cofactor requirements, and molecular model of an enzyme essential for pestivirus replication. *J. Virol.*, **71**:5312–5322
- YEŞİLBAG, K., FORSTER C., BANK-WOLF B., YILMAZ, Z., ALKAN, F., OZKUL, A., BURGU, I., ROSALES, S. C., THIEL, H-J. (2008). Genetic heterogeneity of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates from Turkey: Identification of a new subgroup in BVDV-1. *Vet. Microbiol.*, **130** :258–267
- ZAGHAWA, A. (1998). Prevalence of antibodies to bovine viral diarrhoea virus and/or border disease virus in domestic ruminants. *Vet. Med. Series*, **B 45**:345–351
- ZHONG, W., GUTSHALL, L.L. & DEL VECCHIO, A.M. (1998). Identification and characterization of an RNA-dependent RNA polymerase activity within the nonstructural protein 5B region of bovine viral diarrhoea virus. *J. Virol.*, **72**:9365-9369

EKLER - Ek -1: Test edilen serum numunelerinin VNT ve SN₅₀ değerleri.

Sıra	Numara	NADL VNT	NADL SN50	Moredun NPLA	Moredun SN50	Sıra	Numara	NADL VNT	NADL SN50	Moredun NPLA	Moredun SN50
1	226979	pozitif	15	pozitif	30	33	227011	pozitif	40	pozitif	80
2	226980	negatif		negatif		34	227012	pozitif	60	pozitif	>80
3	226981	pozitif	10	pozitif	80	35	227013	negatif		negatif	
4	226982	negatif		negatif		36	227014	negatif		pozitif	7,5
5	226983	negatif		negatif		37	227015	negatif		negatif	
6	226984	pozitif	60	pozitif	40	38	227016	pozitif	40	pozitif	
7	226985	negatif		negatif		39	227017	pozitif	10	pozitif	>80
8	226986	negatif		negatif		40	227018	negatif		negatif	
9	226987	negatif		negatif		41	227019	pozitif	20	pozitif	>80
10	226988	pozitif	30	pozitif	40	42	227020	negatif		negatif	
11	226989	negatif		negatif		43	227021	negatif		negatif	
12	226990	pozitif	7,5	pozitif	80	44	227022	pozitif	60	pozitif	>80
13	226991	pozitif	10	pozitif	80	45	227023	negatif		pozitif	20
14	226992	negatif		negatif		46	227024	negatif		negatif	
15	226993	negatif		negatif		47	227025	negatif		negatif	
16	226994	negatif		negatif		48	227026	negatif		negatif	
17	226995	pozitif	7,5	negatif		49	227027	negatif		negatif	
18	226996	pozitif	7,5	negatif		50	227028	pozitif	60	pozitif	>80
19	226997	pozitif	80	pozitif	120	51	227029	pozitif	10	pozitif	80
20	226998	negatif		negatif		52	227030	negatif		negatif	
21	226999	pozitif	160	pozitif	>160	53	227031	pozitif	80	pozitif	>80
22	227000	pozitif	120	pozitif	>160	54	227032	negatif		negatif	
23	227001	pozitif	20	pozitif	60	55	227033	negatif		negatif	
24	227002	pozitif	40	pozitif	40	56	227034	negatif		pozitif	>80
25	227003	pozitif	20	negatif		57	227035	pozitif	120	pozitif	>80
26	227004	negatif		negatif		58	227036	negatif		negatif	
27	227005	negatif		negatif		59	227037	pozitif	10	pozitif	>80
28	227006	negatif		negatif		60	227038	pozitif	7,5	pozitif	40
29	227007	negatif		negatif		61	227039	pozitif	15	pozitif	>80
30	227008	negatif		pozitif	60	62	227040	negatif		pozitif	>80
31	227009	negatif		pozitif	30	63	227041	pozitif	30	pozitif	>80
32	227010	pozitif	20	negatif		64	227042	negatif		negatif	

Sıra	Numara	NADL VNT	NADL SN50	Moredun NPLA	Moredun SN50	Sıra	Numara	NADL VNT	NADL SN50	Moredun NPLA	Moredun SN50
65	227043	pozitif	15	pozitif	>80	95	227073	negatif		pozitif	60
66	227044	negatif		negatif		96	227074	negatif		negatif	
67	227045	negatif		pozitif	7,5	97	227075	negatif		pozitif	>80
68	227046	negatif		negatif		98	227076	negatif		negatif	
69	227047	pozitif	15	pozitif	60	99	227077	negatif		negatif	
70	227048	negatif		pozitif	7,5	100	227078	pozitif	10	pozitif	>80
71	227049	negatif		pozitif	>80	101	227079	negatif		pozitif	30
72	227050	pozitif	30	pozitif	>80	102	227080	negatif		negatif	
73	227051	negatif		pozitif	>80	103	227081	pozitif	10	pozitif	60
74	227052	pozitif	30	pozitif	>80	104	227082	negatif		negatif	
75	227053	negatif		negatif		105	227083	pozitif	20	pozitif	>80
76	227054	pozitif	30	pozitif	>80	106	227084	negatif		negatif	
77	227055	negatif		pozitif	7,5	107	227085	pozitif	30	pozitif	>80
78	227056	negatif		negatif		108	227086	negatif		negatif	
79	227057	pozitif	30	pozitif	>80	109	227087	pozitif	7,5	pozitif	60
80	227058	negatif		negatif		110	227088	negatif		negatif	
81	227059	negatif		negatif		111	227089	pozitif	20	pozitif	>80
82	227060	negatif		negatif		112	227090	negatif		negatif	
83	227061	negatif		pozitif	7,5	113	227091	negatif		negatif	
84	227062	negatif		pozitif	7,5	114	227092	negatif		negatif	
85	227063	pozitif	20	pozitif	>80	115	227093	pozitif	15	pozitif	>80
86	227064	negatif		pozitif	7,5	116	227094	pozitif	120	pozitif	>80
87	227065	pozitif	30	pozitif	>80	117	227095	negatif		negatif	
88	227066	pozitif	20	pozitif	80	118	227096	negatif		negatif	
89	227067	negatif		pozitif	60	119	227097	negatif		negatif	
90	227068	pozitif	160	pozitif	>80	120	227098	negatif		negatif	
91	227069	negatif		negatif		121	227099	pozitif	30	pozitif	7,5
92	227070	pozitif	15	pozitif	>80	122	227100	negatif		pozitif	30
93	227071	pozitif	60	pozitif	>80	123	227101	negatif		pozitif	7,5
94	227072	negatif		pozitif	>80	124	227102	negatif		pozitif	30

Sıra	Numara	NADL VNT	NADL SN50	Moredun NPLA	Moredun SN50	Sıra	Numara	NADL VNT	NADL SN50	Moredun NPLA	Moredun SN50
125	227103	pozitif	20	pozitif	80	138	227116	pozitif	30	pozitif	
126	227104	negatif		negatif		139	227117	negatif		pozitif	7,5
127	227105	pozitif	10	pozitif	40	140	227118	pozitif	15	pozitif	>80
128	227106	negatif		negatif		141	227119	negatif		negatif	
129	227107	pozitif	30	pozitif	>80	142	227120	pozitif	40	pozitif	80
130	227108	negatif		negatif		143	227121	negatif		pozitif	20
131	227109	pozitif	10	pozitif	20	144	227122	negatif		pozitif	40
132	227110	pozitif	7,5	pozitif	>80	145	227123	pozitif	40	pozitif	80
133	227111	negatif		pozitif	>80	146	227124	negatif		pozitif	15
134	227112	negatif		negatif		147	227125	pozitif	15	pozitif	120
135	227113	negatif		pozitif	15	148	227126	pozitif	80	pozitif	>160
136	227114	pozitif	7,5	pozitif	80	149	227127	negatif		pozitif	7,5
137	227115	negatif		negatif		150	227128	negatif		pozitif	15

Sıra	Numara	NADL VNT	NADL SN50	Moredun NPLA	Moredun SN50	Sıra	Numara	NADL VNT	NADL SN50	Moredun NPLA	Moredun SN50
151	227283	negatif		negatif		183	227315	negatif		pozitif	30
152	227284	pozitif	40	pozitif	>160	184	227316	negatif		negatif	
153	227285	pozitif	60	pozitif	120	185	227317	negatif		negatif	
154	227286	negatif		negatif		186	227318	negatif		negatif	
155	227287	pozitif	40	pozitif	120	187	227319	pozitif	160	pozitif	>160
156	227288	negatif		negatif		188	227320	negatif		negatif	
157	227289	pozitif	30	pozitif	120	189	227321	pozitif	>160	pozitif	>160
158	227290	pozitif	60	pozitif	160	190	227322	pozitif	>160	pozitif	>160
159	227291	pozitif	40	pozitif	120	191	227323	pozitif	60	pozitif	160
160	227292	negatif		negatif		192	227324	pozitif	160	pozitif	>160
161	227293	pozitif	30	pozitif	60	193	227325	negatif		negatif	
162	227294	pozitif	40	pozitif	>160	194	227326	negatif		negatif	
163	227295	pozitif	40	pozitif	120	195	227327	pozitif	120	pozitif	120
164	227296	pozitif	60	pozitif	120	196	227328	pozitif	120	pozitif	160
165	227297	pozitif	30	pozitif	40	197	227329	negatif		pozitif	30
166	227298	negatif		negatif		198	227330	negatif		negatif	
167	227299	negatif		negatif		199	227331	negatif		negatif	
168	227300	pozitif	120	pozitif	120	200	227332	pozitif	80	pozitif	120
169	227301	negatif		negatif		201	227333	negatif		pozitif	15
170	227302	negatif		negatif		202	227334	negatif		pozitif	30
171	227303	negatif		negatif		203	227335	negatif		pozitif	30
172	227304	negatif		negatif		204	227336	negatif		negatif	
173	227305	negatif		negatif		205	227337	pozitif	30	pozitif	120
174	227306	pozitif	15	pozitif	120	206	227338	pozitif	80	pozitif	120
175	227307	negatif		pozitif	15	207	227339	negatif		negatif	
176	227308	negatif		negatif		208	227340	negatif		pozitif	30
177	227309	negatif		pozitif	20	209	227341	negatif		negatif	
178	227310	negatif		pozitif	15	210	227342	negatif		negatif	
179	227311	negatif		pozitif	20	211	227343	pozitif	30	pozitif	80
180	227312	negatif		pozitif	20	212	227344	negatif		pozitif	30
181	227313	negatif		pozitif	40	213	227345	negatif		negatif	
182	227314	pozitif	160	pozitif	>160	214	227346	pozitif	60	pozitif	120

Sıra	Numara	NADL VNT	NADL SN50	Moredun NPLA	NADL SN50	Sıra	Numara	NADL VNT	NADL SN50	Moredun NPLA	Moredun SN50
215	227347	negatif		negatif		245	227377	pozitif	160	pozitif	160
216	227348	pozitif	30	pozitif	120	246	227378	pozitif	80	pozitif	80
217	227349	negatif		negatif		247	227379	pozitif	80	pozitif	160
218	227350	pozitif	30	pozitif	120	248	227380	pozitif	40	pozitif	160
219	227351	negatif		negatif		249	227381	pozitif	40	pozitif	>160
220	227352	negatif		negatif		250	227382	negatif		pozitif	10
221	227353	negatif		negatif		251	227383	pozitif	60	pozitif	120
222	227354	pozitif	120	pozitif	160	252	227384	negatif		negatif	
223	227355	negatif		pozitif	40	253	227385	negatif		negatif	
224	227356	negatif		pozitif	30	254	227386	pozitif	20	pozitif	80
225	227357	pozitif	>160	pozitif	>160	255	227387	pozitif	15	pozitif	60
226	227358	negatif		negatif		256	227388	negatif		pozitif	10
227	227359	pozitif	20	pozitif	120	257	227389	pozitif	>160	pozitif	>160
228	227360	negatif		negatif		258	227390	negatif		negatif	
229	227361	pozitif	30	pozitif	60	259	227391	negatif		negatif	
230	227362	negatif		negatif		260	227392	negatif		pozitif	15
231	227363	pozitif	160	pozitif	>160	261	227393	negatif		negatif	
232	227364	pozitif	60	pozitif	160	262	227394	negatif		pozitif	30
233	227365	pozitif	160	pozitif	>160	263	227395	pozitif	120	pozitif	120
234	227366	negatif		pozitif	15	264	227396	pozitif	160	pozitif	>160
235	227367	negatif		pozitif	30	265	227397	negatif		negatif	
236	227368	negatif		pozitif	20	266	227398	negatif		pozitif	15
237	227369	negatif		negatif		267	227399	pozitif	60	pozitif	80
238	227370	negatif		pozitif	15	268	227400	pozitif	30	pozitif	120
239	227371	negatif		negatif		269	227401	negatif		negatif	
240	227372	negatif		pozitif	10	270	227402	pozitif	7,5	pozitif	30
241	227373	negatif		pozitif	15	271	227403	pozitif	40	pozitif	80
242	227374	negatif		pozitif	30	272	227404	pozitif	>160	pozitif	>160
243	227375	pozitif	160	pozitif	160	273	227405	negatif		negatif	
244	227376	pozitif	40	pozitif	80	274	227406	pozitif	30	pozitif	120

Sıra	Numara	NADL VNT	NADL SN50	Moredun NPLA	Moredun SN50
275	227407	negatif		negatif	
276	227408	pozitif	20	pozitif	60
277	227409	pozitif	15	pozitif	40
278	227410	negatif		negatif	
279	227411	negatif		negatif	
280	227412	negatif		negatif	
281	227413	pozitif	40	pozitif	80
282	227414	negatif		pozitif	10
283	227415	negatif		negatif	
284	227416	negatif		negatif	
285	227417	negatif		negatif	
286	227418	pozitif	30	pozitif	120
287	227419	pozitif	40	pozitif	80

Sıra	Numara	NADL VNT	NADL SN50	Moredun NPLA	Moredun SN50
288	227420	pozitif	30	pozitif	40
289	227421	pozitif	10	pozitif	60
290	227422	negatif		pozitif	20
291	227423	pozitif	20	pozitif	60
292	227424	pozitif	15	pozitif	40
293	227425	pozitif	15	pozitif	30
294	227426	pozitif	20	pozitif	120
295	227427	negatif		pozitif	60
296	227428	negatif		negatif	
297	227429	pozitif	20	pozitif	80
298	227430	negatif		negatif	
299	227431	negatif		negatif	
300	227432	negatif		negatif	

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı- Soyadı : Çağlar ERGÜN
Doğum Tarihi : 04.10.1984
Doğum Yeri : Ankara
Uyruğu : T.C.
Medeni Hali : Bekar
Askerlik Durumu : Tecilli
Adres : Nuri Pamir Cad. Anız Sok. 12/4 Keçiören /ANKARA

Eğitim Durumu

2004 – 2009 Selçuk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji bölümü
2000 - 2003 Özel Arı Fen lisesi

Ayrıca, kültür mantarı (*Agaricus bisporus*) ve kayın mantarı (*Pleurotus ostreatus*) yetiştiriciliğinde kısa dönem (2 ay) eğitim almıştır.

Yabancı Diller

İngilizce, ÜDS puanı :72,5; Almanca (başlangıç seviyesinde)

Bilgisayar Bilgisi

- * Microsoft Windows 95/98/win7/vista/NT, Linux,Suse.
- * MS-office programları, web tasarımı (web master)
- * Dreamviewer, photoshop cs 2-3-4, html, flash, php.

İlgilenilen Alanlar: Resim, sinema, müzik, gitar, web tasarımı ve çizim.

İletişim : caglarergun1984@hotmail.com