

**T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**( DOKTORA TEZİ )**

**ENZOOTIC BOVINE LEUKOSIS VIRUS  
İNFEKSİYONUNUN MARMARA BÖLGESİNDE  
SEROLOJİK VE MOLEKÜLER YÖNTEMLER İLE  
ARAŞTIRILMASI.**

**HASAN DEĞİRMENCİ**

**DANIŞMAN  
PROF. DR. NURİ TURAN**

**MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
MİKROBİYOLOJİ PROGRAMI**

**İSTANBUL-2011**

**TEZ ONAYI**

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikrobiyoloji Programında Hasan DEĞİRMENCİ tarafından hazırlanan Enzootic Bovine Leukosis Virus İnfeksiyonunun Marmara Bölgesinde Serolojik ve Moleküler Yöntemler İle Araştırılması başlıklı Doktora tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

01 / Nisan / 2011

**Tez Sınav Jürisi**

<u>Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)</u>	<u>İmzası</u>
1.Prof. Dr. A. Atila ILGAZ (İ.Ü. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Abd).	
2.Prof. Dr. Mehmet ÇABALAR (Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Abd).	
3.Prof. Dr. Nuri TURAN (İ.Ü. Veteriner Fakültesi Viroloji Abd).	
4.Prof. Dr. Abdulkadir UYSAL (İ.Ü. Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Abd).	
5.Doç. Dr. Serkan İKİZ (İ.Ü. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Abd).	

**BEYAN**

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

HASAN DEĞİRMENÇİ



## İTHAF

Bu tezi bana her türlü desteklerini esirgemeyen babama, anneme, eşime ve kızıma ithaf ediyorum.

## TEŞEKKÜR

Çalışmanın tüm aşamalarında büyük desteğini gördüğüm danışman hocam. Prof. Dr. Nuri TURAN'a

Bilgi ve deneyimleriyle ilgisini esirgemeyen Prof. Dr. Hüseyin YILMAZ'a

Desteğinden dolayı Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Atilla ILGAZ'a

Yardımlarından dolayı Prof. Dr. Mustafa HASÖKSÜZ'e

Laboratuvar çalışmalarında yardımcı olan Veteriner Hekim Eda ALTAN'a

Desteğini esirgemeyen aileme ve bu çalışmada emeği geçen herkese sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 3672

## İÇİNDEKİLER

ENZOOTIC BOVINE LEUKOSIS VIRUS İNFEKSİYONUNUN MARMARA BÖLGESİNDE SEROLOJİK VE MOLEKÜLER YÖNTEMLER İLE ARAŞTIRILMASI.....	İ
TEZ ONAYI.....	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR .....	V
İÇİNDEKİLER .....	VI
TABLolar LİSTESİ.....	VIII
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	IX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ .....	X
ÖZET .....	XI
ABSTRACT.....	XII
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. Tanım .....	3
2.2. Tarihçe .....	3
2.3. Etyoloji.....	4
2.4. Epidemiyoloji.....	6
2.5. Persiste infeksiyon .....	7
2.6. Klinik Bulgular ve Taşıyıcılık.....	8
2.7. Patogenez .....	8
2.8. Tanı .....	10
2.8.1. Nekropsi .....	10
2.8.2. Mikroskopi .....	11
2.8.3. Viral Antijenlerin, Viral RNA yada Proviral DNA'nın Saptanması .....	11
2.8.3.1. Polimerase chain reaction =Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR-PZR).....	11
2.8.4. Serolojik Yöntemler .....	12
2.8.4.1. ELISA .....	12
2.9. Koruma ve Kontrol .....	13
2.10. Eradikasyon.....	14

2.11. Bağışıklık .....	16
2.12. Sağaltım .....	16
3. GEREÇ VE YÖNTEM .....	17
3.1. Örnekler .....	17
3.2. ELISA .....	18
3.3. ELISA Yöntemi .....	18
3.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Gereçler .....	20
3.4.1. Örnekler .....	20
3.4.2. Ekstraksiyon .....	20
3.4.3. DNA miktarının ölçümü .....	20
3.4.4. Konvansiyonel PCR .....	20
3.4.5. Real-time PCR .....	21
3.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR, PCR) Yöntemi .....	22
3.5.1. Proviral DNA ekstraksiyonu .....	22
3.5.2. DNA miktarının ölçümü .....	23
3.5.3. Real-Time PCR .....	23
3.5.4. Konvansiyonel PCR .....	24
3.5.5. PCR Ürünlerinin Horizontal Agaroz Jel Elektroforezi ile Analizi .....	25
3.5.6. Sekanz analizi .....	25
4. BULGULAR .....	26
4.1. ELISA Bulguları .....	26
4.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Bulguları (PZR, PCR) .....	28
4.3. Sekans analizi bulguları .....	34
5. TARTIŞMA .....	36
KAYNAKLAR .....	40
ETİK KURUL KARARI .....	52
ÖZGEÇMİŞ .....	53

**TABLolar LİSTESİ**

Tablo 4.1- ELISA’da pozitif örneklerin sayısı ve oranı. ....	27
Tablo 4.2- Real-time PCR ve Konvansiyonel PCR’da pozitif örneklerin sayısı ve oranı .....	34

## ŞEKİLLER LİSTESİ

2.1- BLV viral parçacığının şematik görünümü.....	5
2.2- BLV provirus genomunun şematik yapısı.....	6
2.3- Enzootik Sığır Löykozunun Patogenez Şeması.....	9
2.4-Almanya’da BLV Enfeksiyonuna karşı uygulanan eradikasyon programı.....	15
4.1- ELISA pozitiflik oranı .....	28
4.2- Real time RT-PCR ct grafiği.....	29
4.3- Melting Curve (Erime eğrisi) değerleri ekran görüntüsü.....	30
4.4- Pozitif kontrol ve örneklerle yapılan Real time PCR’ın jel görüntüsü.....	31
4.5- Gradient RT-PCR (52 °C-62 °C) elektroforez görüntüsü.....	32
4.6-Örneklerin Konvansiyonel PCR ile incelenmesi sonucunda elektroforez görüntüsü.....	33
4.7- Örneklerin sekans analizi sonucunda oluşan gen ağacı görüntüsü.....	35

**SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ**

PCR	Polymerase Chain Reaction
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
ELISA	Enzyme linked Immuno Sorbent Assay
BLV	Bovine leukemia virus
EBL	Enzootic bovine leukosis
WOAH	World Organization for Animal Health (Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü)
OIE	Office International Epizooti (Uluslararası Salgınlar Ofisi)
Ct	Cycle threshold (Yükselme eşiği)
AGPT	Agar Gel Precipitation Test
IF	Immunfloresan Test
RT-PCR	Reverse Transcriptase PCR
CMI	Cell Mediated Immunity (Hücreye Bağlı İmmünite)
BLAST	Basic Local Alingment Search
MEGA	Molecular Evolutionary Genetics Analysis

## ÖZET

Değirmenci, H. (2011). Enzootik bovine leukosis virus infeksiyonunun Marmara bölgesinde serolojik ve moleküler yöntemler ile araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Doktora Tezi. İstanbul.

Bu çalışmanın amacı Marmara bölgesinde, sığırlarda Bovine Leukemia Virus genomunun moleküler yöntemlerle saptanması ve ELISA ile anti-BLV antikörlerinin tespitidir.

Bu çalışmada Marmara bölgesindeki 9 ilçede toplam 13 adet çiftlikten 211 adet kan ve serum toplandı. ELISA için EDTA'sız kan tüpleri, PCR için ise EDTA'lı tüplere kan alındı. Kan serumları BLV'ye karşı oluşan antikörleri saptamak için ELISA ile test edildi. Ayrıca total kandan BLV Proviral DNA'sının tespit için real-time ve konvansiyonel PCR kullanıldı. Örneklerden proviral DNA'nın izolasyonu için ticari DNA ekstraksiyon kiti kullanıldı. BLV referans kontrol ve primerler kullanılarak PCR standardize edildi. ELISA ile 23 (%10.9) adet kan serumunda seropozitiflik tespit edildi. Örneklerin 24 adetinde (%11.379) BLV proviral DNA'sı konvansiyonel ve real-time PCR ile saptandı. BLV "*env gen*" kısmi olarak sekanlandı ve filogenetik analiz yapıldı.

Bu çalışma, Marmara bölgesinde EBL infeksiyonunun tanısına yönelik olarak real-time PCR'ın kullanıldığı ilk çalışmadır. Çalışma sonucunda ELISA ve PCR sonuçlarının yüksek oranda benzerlik gösterdiği ortaya konmuştur. Ayrıca sekans analizleri sonucunda 4 adet Türkiye BLV suşu Genotip 4 içerisinde sınıflandırıldı.

Sonuç olarak, bölgede ve tüm Türkiye'de EBL infeksiyonuna yönelik olarak risk analizlerini de kapsayan ve eradikasyona yönelik daha geniş çapta araştırmaların planlanması gerektiği görüşündeyiz.

Anahtar Kelimeler: EBL, PCR, ELISA, Bovine Leukemia Virus, Marmara Bölgesi.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 3672

## ABSTRACT

Değirmenci, H. (2011). Detection of Bovine Leukemia Virus by using serological and molecular methods in Marmara region. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Microbiology Phd Thesis. İstanbul.

The aim of this study was to detect the genome of Bovine Leukemia Virus (BLV) by molecular methods and antibodies to BLV by ELISA.

In this study, 211 cattle belonging to 13 farms from 9 localities in Marmara region of Turkey were sampled. For ELISA, blood samples were taken into vacutainer without EDTA while for PCR blood had taken into tubes with EDTA. Sera samples were analysed by a commercial ELISA kit for presence of antibodies to BLV. In addition, real-time and conventional PCR were used to detect proviral DNA of BLV in whole blood. The proviral DNA was extracted by using a commercial kit. The PCR was standardized using a positive control and primers. Antibodies to bovine leukosis virus (BLV) were detected in 23 cattle sera (10.9%) by ELISA belonging to thirteen farms in nine localities. The proviral DNA of the BLV was detected in the 24 (%11.37) of the samples by conventional PCR and also with real-time PCR.

The “*env gene*” of BLV was partially sequenced, and phylogenetic analysis was performed.

This is the first study in which real-time PCR has been used to investigate EBL infection in cattle in the Marmara region. Results of PCR and ELISA were found to be correlated. Sequence analyses have shown that 4 Turkish BLV strains clustered within Genotype 4.

In conclusion, further investigations are necessary to establish risk analysis and to eradicate of EBL infection in the Marmara region and in Turkey.

Key Words: EBL, PCR, ELISA, Bovine Leukemia Virus, Marmara region.

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No.3672

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Dünyanın çeşitli bölgelerinde sıkça görülen bovine leukemia virus (BLV) enfeksiyonu, iki yaşından büyük sığırlarda lenf düğümlerinde tümör oluşumları, kan tablosu değişiklikleri ve lenfosit sayısı artışı ile karakterize, sığırlarda kondisyon ve ağırlık kaybı ile süt veriminde ve fertilitede azalmadan dolayı ekonomik kayıplara neden olan bir enfeksiyondur. Genellikle subklinik seyirli olup klinik belirtileri, lenfosarkom oluşumu ve tümörlerin yerleştiği bölgeye göre değişmektedir (10, 17, 19).

Bovine leukemia virus (BLV) Retroviridae familyasında Deltaretrovirus cinsi içinde sınıflandırılmıştır. İkozahedral simetride ve zarflı olan virion, tek iplikçikli, pozitif polariteli, tek segmentli, linear RNA genomuna (Proviral DNA) sahiptir (10).

Bovine leukemia virus, sığırların lökosit hücrelerinde, özellikle B lenfositlerde persiste kalır. Bulaşmada en önemli yol bu infekte hücrelerin sağlıklı hayvanlara aktarılmasıdır. Bu noktada çeşitli amaçlarla yapılan uygulamalar (kan alma, kulak numaralama, vb.) sırasında gelişen iatrojenik bulaşma, enfeksiyonun bulaşmasında önem taşımaktadır. Bunun yanında enfeksiyonun artropodlar vasıtası ile naklinin mümkün olduğu ve süt ile de yavrulara aktarılabildiği bildirilmiştir (20).

Yapılan çalışmalarda bir çok ülkede değişik oranlarda varlığı bildirilen EBL enfeksiyonu (7, 29, 73, 75, 93), ülkemizde ilk kez 1962 yılında patolojik ve hematolojik bulgulara dayanılarak bildirilmiştir (33). Daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda, gerek halk elinde bulunan ve gerekse kamuya ait işletmelerde yetiştirilen sığırlarda enfeksiyonun değişen oranlarda varlığı serolojik olarak saptanmıştır. Bu çalışmalardan bazılarında Marmara bölgesi kapsamından da örnekleme yapılmış ve ortalama %10 oranında pozitiflik saptanmıştır (11, 36, 78, 87).

Bu çalışma Trakya bölgesinde planlanmıştır. Bölgede küçük aile işletmeleri, orta ve büyük işletmeler ile kombine tesisler ve meradan faydalanmaya dayalı sığır yetiştiriciliğini yapılmaktadır.

Trakya ve Avrupa Birliđi ilgili beklentiler göz önünde bulundurularak, bölge kapsamındaki illerde halk elindeki sığırlarda BLV enfeksiyonunun seroprevalansının araştırılması amaçlandı. Türkiye'nin Avrupa Birliđine sınırı olan Marmara Bölgesi'nde hem halk elindeki hemde sığır işletmelerindeki EBL enfeksiyonunu serolojik ve moleküler biyolojik yöntemler kullanılarak araştırıldı.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Tanım

Enzootik Bovine Leukosis (EBL) iki yaşından büyük sığırların hemen hemen tüm organlarında neoplastik lenfosit gelişimiyle, kan tablosu ve lenfosit sayılarındaki artışla karakterize, sığırlarda verim ve kilo kaybına neden olan, Retroviridae familyasına ait bir Oncorna virus olan Bovine Leukemia Virus (BLV)'unun oluşturduğu sistemik ve kronik viral bir hastalıktır (60).

Çoğunlukla iatrojenik yollarla bulaşabilen bu hastalık etkeni, lenfositlerde değişiklik oluşturmadan ve semptom göstermeden seyredebilir. Enfekte sığırların 1/3 ünde persiste lenfositosis gelişirken, %5-10 oranında neoplazma, organ ve dokularda lösemik infiltrasyonlar ve lenf yumrularında büyümeye bağlı olarak, süt veriminde azalmalara, kilo kaybına, üremenin azalmasına ve ölüme sebebiyet vermesi nedeniyle sığırcılık endüstrisinde önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır (60, 83).

### 2.2. Tarihçe

Miller ve ark. ineklerden yapılan lenfosit kültürlerinde C-tipi viral partiküllerin varlığını saptamış ve lökositik sığırların serumlarında bu partiküllere karşı antikorlar tesbit etmişlerdir (55). Daha sonra Miller ve Olson hastalığın teşhisi amacıyla EBL alanında yeni bir araştırma başlatmışlardır (55). Transmisyon denemeleri C-tipi viral partiküllerin EBL'nin etkeni olduğunu ortaya koymuş ve daha sonra retroviridea familyasından sığır löykemi virusu olarak adlandırılmıştır. Hastalığın gelişmiş şeklinin ve persiste lökositosis olgularının belirli coğrafik bölgelerde kümeleşme göstermesi nedeniyle, hastalık genelde "Enzootik bovine leukosis (EBL)" olarak anılmaktadır (18).

Yapılan çalışmalarda dünyanın birçok ülkesinde değişik oranlarda varlığı bildirilen EBL enfeksiyonu (7, 12, 21, 30, 62, 93), ülkemizde ilk kez 1962 yılında patolojik ve hematolojik bulgulara dayanılarak bildirilmiştir (33). Daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda gerek halk elinde bulunan ve gerekse kamuya ait işletmelerde yetiştirilen sığırlarda enfeksiyonun değişen oranlarda varlığı saptanmıştır (17, 23, 36, 65, 66, 78, 80, 87, 92). Ayrıca Burgu ve ark. tarafından 2005 yılında kontrol ve eradikasyona yönelik çalışmalar da bulunmaktadır.

Hastalık 22.01.2011 tarihinde resmi gazetede yayınlanan Tarım ve Köyişleri Bakanlığı'na ait “ İhbarı Mecburi Hayvan Hastalıkları ve Bildirimine İlişkin Yönetmelik” uyarınca ihbarı mecburi hastalıklar listesine eklenmiştir (81).

### 2.3. Etiyoloji

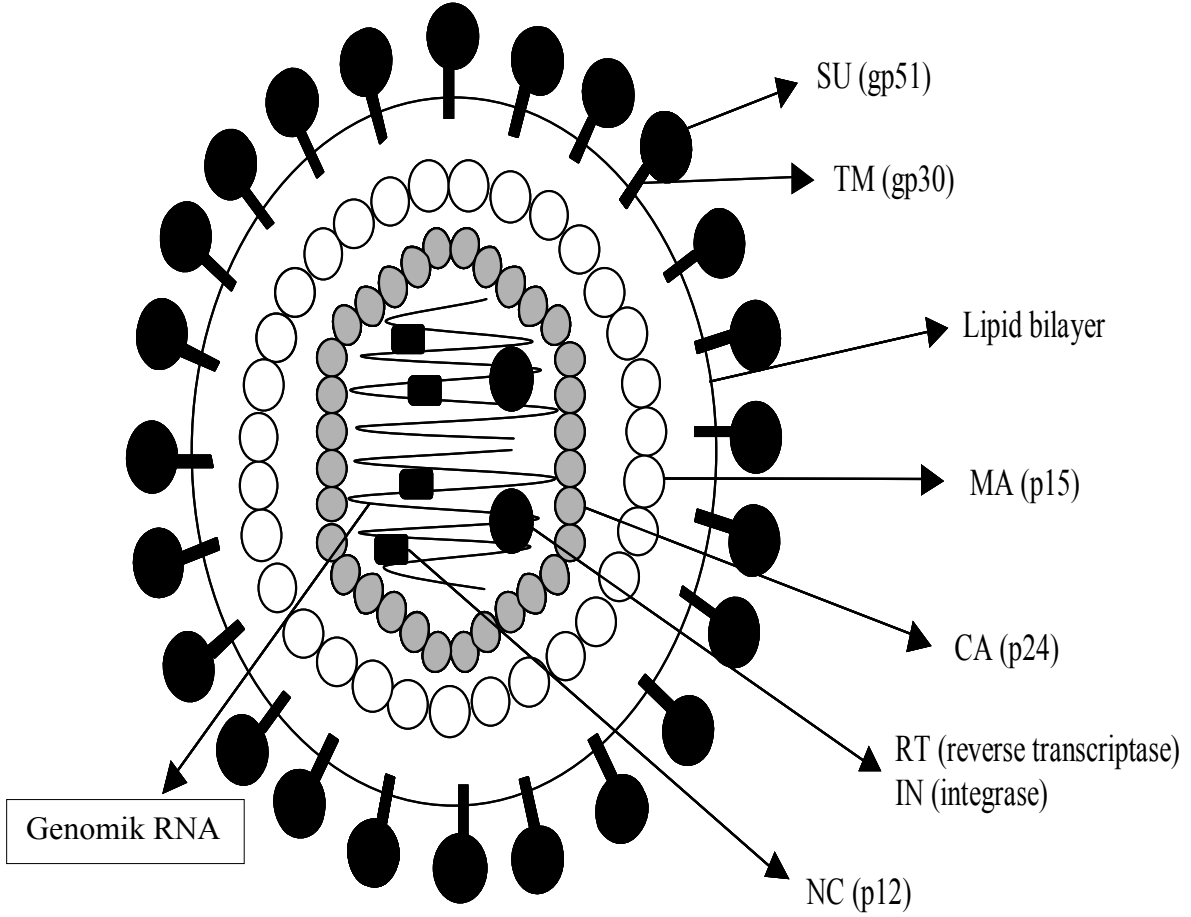
Bovine leukemia virus (BLV) Retroviridae familyasının Orthoretrovirinae altfamilyasında ve Deltaretrovirus cinsi içinde sınıflandırılmaktadır. İkozahedral simetrik ve zarflı olan virion, tek iplikçikli, pozitif polariteli, tek segmentli, linear RNA genomuna sahiptir. 80-120 nm büyüklüğünde, küresel görünümde RNA viruslarıdır. Zarflı viruslardır ve DNA aracılığıyla ikileşme yapabilirler. Retroviruslar retro (reverse, backward) adını bütün ailenin genomunda bulunan “reverse transcriptase” enzimi sebebiyle almaktadırlar. Retrovirusların sebep olduğu hastalıklar veteriner hekimlik alanında önemli bir yer tutmaktadır (10, 17, 19).

Etkende viral genomu ikozahedral simetrik bir kapsid çevreler. Kapsid kısmında ribonükleoproteinler bulunur. En dış kısımda ise lipid ihtiva eden çift tabakalı bir zarf vardır. Zarf üzerinde ise glikoproteinden oluşan yuvarlak çıkıntılar yer alır. BLV, konakçı dışında stabil değildir (11). Retrovirus'lar iki tip antijene sahiptir. Birinci tip antijenler viral zarf üzerinde bulunan glikoprotein çıkıntıları ile ilişkili antijenlerdir. Bunlar tipe özgül ya da alt gruba özgül antijenlerdir. Buna karşı oluşan antikolar farklı türdeki Retrovirus'lar ile reaksiyona girmezler. Bu antijenik yapılar viral genomda yer alan *envolope (env)* genleri tarafından kodlanırlar. Bu antijenlere karşı nötralizan antikolar oluşmaktadır (Şekil 2.1) (21). İkinci tip antijenler ise virusun yapısında bulunan antijenler olup, bunlar viral genomdaki *gag* genleri tarafından kodlanırlar. Bu antijenler gruba özgül antijenler olup, bunlara karşı oluşan antikolar farklı türdeki Retrovirus'lar ile reaksiyona girerler (Şekil 2.2) (56, 79).

Rodríguez ve ark. Bovine leukosis virusunun proviral *env* sekanslarına ve filogenetik çalışmalarına göre 7 genogruba ayrıldığını bildirmiştir (70). Matsumura ve ark. ise 2011 yılında yaptıkları çalışmada BLV'nin 8 genogrup olduğunu rapor etmişlerdir (54).

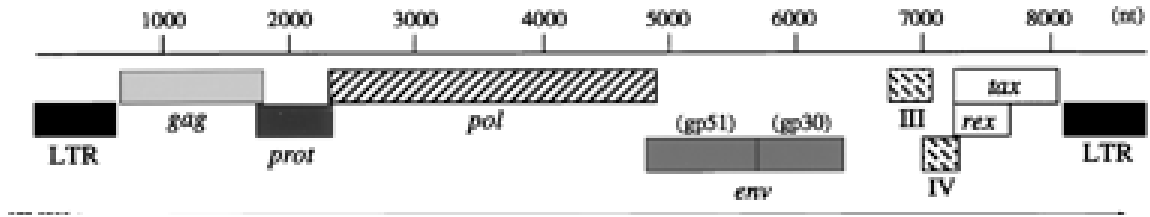
Etkenin üretilmesi hasta hayvanlardan lökosit hücre kültürlerinde mümkündür. Sinsitya oluşumu dışında başka bir sitopatolojik değişiklik gözlenmez. Doku kültüründe

antijen tespitinde AGPT (Agar Gel Precipitasyon Test) ve IF (Immunfloresan) testleri ve genom analizi için PCR kullanılır (6).



**Şekil 2.1-BLV viral parçacığının şematik görünümü (28)**

Tek iplikçikli genomik RNA'nın viral parçacık içerisindeki iki kopyası. Nükleokapsit NC (p12) ve viral RNA'yı çevreleyen CA (p24) proteinleri. Ayrıca kapsitin içerisindeki iki enzimatik protein olan RT ve IN. Matrix proteini olan MA (p15). Viral proteinler gp51 SU and gp30 TM. Kapsit ve dış yapıyı birbirine bağlayan lipid bilayer tabaka.



Şekil 2.2-BLV provirus genomunun şematik yapısı (79)

## 2.4. Epidemiyoloji

Serolojik ve moleküler testler ile yapılan çalışmalardan elde edilen bulgulara göre BLV tüm dünyada yaygın bir hastalıktır. İnfeksiyon varlığı sığırlarda serolojik ve moleküler olarak ortaya konulmuştur, virus izolasyonu zordur ve tanıya yönelik çok fazla çalışma bulunmamaktadır (4, 6, 10, 29, 51, 71). Sığırlardaki seropozitiflik oranı ülkelere ve ırklara göre değişmektedir. Irk olarak hastalığın süt sığırlarında, et sığırlarına göre daha fazla görüldüğü bildirilmiştir (85). Pandemik seyirli olan Bovine Lökozis enfeksiyonunun prevalansı sürülerde yüzde 60 ile 90 düzeyine ulaşabilir (39, 42).

Bulaşmada en önemli yol bu enfekte hücrelerin sağlıklı hayvanlara aktarılmasıdır. Bu noktada çeşitli amaçlarla yapılan kan alma, kulak numaralama, sürü sağaltımlarında aynı enjektörlerin kullanılması, aynı eldiven ile birden fazla hayvanda rektal muayene gibi uygulamalar sırasında gelişen bulaşmalar, hastalığın naklinde iatrojenik bulaşmanın doğal enfeksiyonun bulaşmasında önemli bir yer tuttuğunu göstermektedir. İatrojenik bulaşmaya örnek olarak intradermal tüberkülin uygulamaları da diğer bir yoldur (11). Bunun yanında enfeksiyonun bulaşmasının hayvanların fiziki temasları sırasında meydana gelen travmalar ile mümkün olduğunu, ayrıca süt ile de yavrulara aktarımın yapılabileceği bildirilmiştir (11, 19). Asemptomatik olarak virus taşıyan boğalar ve sperma yoluyla da virusun bulaşabildiği bildirilmiştir. Ancak vertikal bulaşma konusunda kesin bir bilgi yoktur (91). Artropodların vasıtası ile olan bulaşmalarda deneysel bulgular ve epizootiyolojik gözlemlerde ülkemizde mevcut olan (43, 86) *Ixodes ricinus* kenelerinin, kan emici *Tabanidae* sineklerinin ve bazı sivrisinek türlerinin rol oynayabileceği bildirilmiştir (18, 19).

## 2.5. Persiste enfeksiyon

Bovine leukemia virus, sığırların lökosit hücrelerinde özellikle B lenfositlerde persiste kalır. Lenfoid hücrelere bağlı olarak konakçının kendisinin sekresyon ve ekstresyonlarının virusla bulaşık olması BLV'nin başka hayvanlara aktarılmasına olanak sağlar (56, 87).

Genelde salya, burun akıntısı, idrar ve dışkı da BLV enfektivitesi saptanmamış olmakla beraber, bazı araştırmacılar salyanın ve idrarın enfeksiyon kaynağı olabileceğini bildirmişlerdir (11). Bir sekret olan süt üzerine yapılan çalışmalar süütün fazla hücre içermesinden dolayı bulaşmada rol oynayabileceğini ortaya koymuştur. Boğa ejakulatlarının BLV naklinde rol oynayabileceği üzerinde görüş ayrılıkları olmakla birlikte, ejakulatın elde edilme metodu nedeniyle kanlı olması halinde bulaşma tehlikesi olabileceği öne sürülmüştür (91). Sekret ve ekskret ile enfekte bir konakçıdan virusun çevreye yayılması hücreye bağlı olarak meydana gelebileceğinden bu tür salgıların enfeksiyon gücü, içerdiği hücreyle orantılı olarak değişmektedir. Özellikle lenfositler yönünden sekresyonların hücresel içeriğini artıracak fizyolojik, yangısal ve travmatik faktörler bulaşmayı kolaylaştırır (11).

BLV ile enfekte olan sığırlarda yaşamları boyunca persiste bir enfeksiyon oluşur. Bu tür hayvanlar, sağlıklı hayvanlar için bulaşma kaynağı oluştururlar (82).

BLV ile enfekte sığırların % 60 veya daha fazlasında persiste bir lenfositosis rastlanmaktadır. BLV enfeksiyonunun teşhisinde perifer kandan yapılan lenfosit sayımları kullanılmakta ancak yetersiz kalmaktadır. Hastalık etkeninin izolasyonu oldukça güçtür. Bu nedenlerden dolayı BLV enfeksiyonu ve hastalığın kontrolü için daha çok serolojik ve moleküler metotlardan yararlanılmaktadır (24, 32, 35).

## 2.6. Klinik Bulgular ve Taşıyıcılık

Enfeksiyonun iki klinik görünümü vardır. Birincisi enzootik form olup üç yaş ve üzerindeki ergin sığırlarda görülür, ikincisi spontan (deri) löykozu (Sporadik form) 2 yaşına kadar olan genç sığırlarda görülmektedir (18, 77).

Enfeksiyon çoğunlukla subklinik seyrederek ancak lenfosarkom oluşumu ve tümörlerin yerleştiği bölgeye göre farklı klinik belirtiler ortaya çıkabilir (18, 77).

Enfekte hayvanlarda klinik bulgular genellikle 4 ile 8 yaşlar arasında görülmektedir (60).

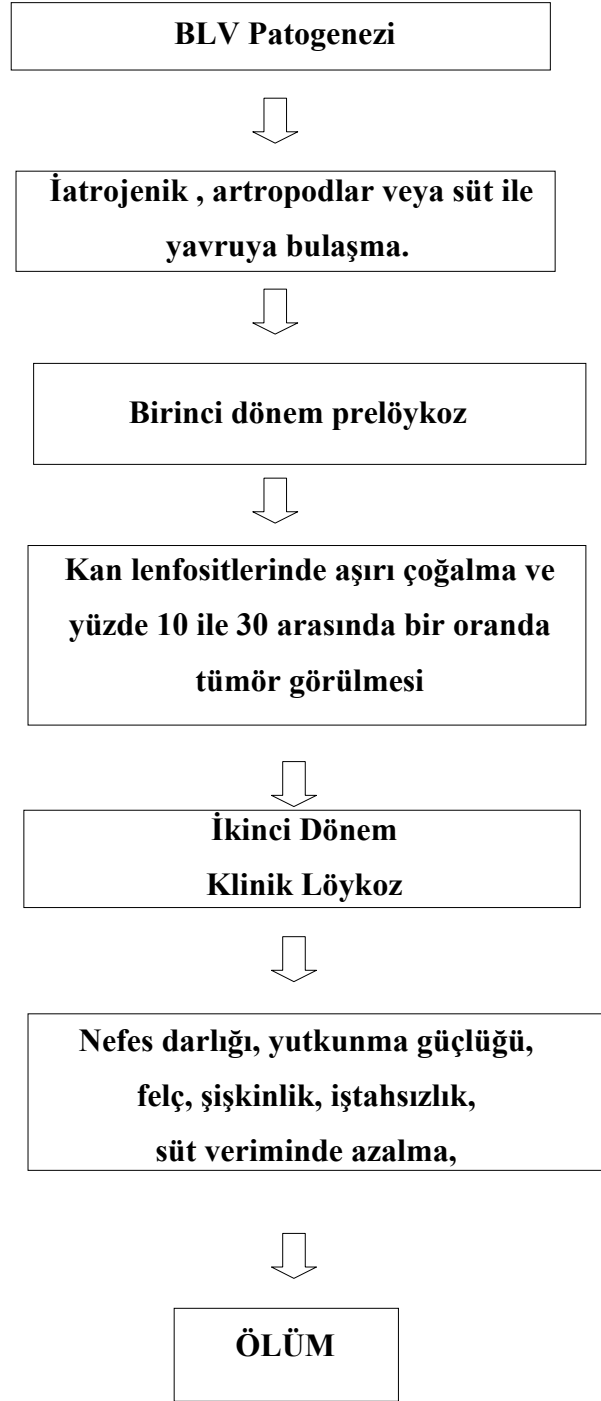
Hastalık iki dönem halinde birbirini izler. Birinci dönem prelöykoz ve ikinci dönem klinik löykoz dur. Birinci dönemde kan lenfositlerinde aşırı çoğalma ve yüzde 10 ile 30 arasında bir oranda da tümör görülür. İkinci dönemde nefes darlığı, yutkunma güçlüğü, felç, şişkinlik, iştahsızlık, süt veriminde azalma, sindirim bozukluğu ve ölüm görülmektedir (1, 56).

Hastalıklı hayvanların lenf yumrularında, abomasumda, kalpte, böbreklerde, uterusda, dalakta ve beyinde lenfoid tümörlere rastlanmaktadır. Rektal palpasyonda dalakta büyüme gözlemlenebilir (60).

Etken, sığırların lökosit hücrelerinde, özellikle B lenfositlerde persiste kalır ve sığıra yerleştikten sonra virus proteinlerine karşı antikor oluşur, dolayısıyla persiste bir enfeksiyon şekillenir. Etken bütün bir yaşam boyu sığırdaki persiste kaldığından dolayı hasta hayvan yaşamı boyunca etkeni saçmaya devam eder (41, 56, 66).

## 2.7. Patogenez

BLV etkeni iatrojenik yolla, artropodlar vasıtasıyla veya süt yoluyla anneden yavruya bulaştıktan sonra, prelöykoz döneminde kan tablosunda lökositlerde aşırı çoğalma ve ardından 4 ile 8 yaş aralığındaki hastaların % 10-30'unda tümörlerin oluştuğu gözlenir (Şekil 2.3). Klinik löykoz döneminde histopatolojik olarak lenfadenöz, lenfosarkom, retikulosarkom, karışık formda tümör oluşumları, lenf yumrularında şişme ve lenfosit değerlerinde artma görülür. Bu değişikliklere bağlı olarak nefes darlığı, yutkunma güçlüğü, felç, şişkinlik, iştahsızlık, süt veriminde azalma ve sonunda ölüm görülebilir (60, 77, 83).



Şekil 2.3- Enzootik Sığır Löykozunun Patogenez Şeması.

## 2.8. Tanı

EBL enfeksiyonunda prelöykoz döneminde kan tablosu değişiklikleri, klinik löykoz döneminde ise tümöral oluşumların izlenmesi teşhiste yardımcı olabilir. Daha önceki yıllarda yapılan çalışmalarda kandaki lenfosit değerleri ölçülerek “Löykoz Teşhis Anahtarları” geliştirilmiştir, hastalık çoğunlukla subklinik seyrettiğinden dolayı daha çok serolojik ve moleküler yöntemler kullanılmaktadır (18, 53, 58, 72, 76).

Sığırlar 6 aylıktan itibaren serolojik, hematolojik ve moleküler yöntemler ile teste tabi tutulmalıdır. AGID, ELISA, PCR gibi testler ile 6 ayda bir kontrollerin yapılması teşhise yardımcı olur. Pozitif hayvanlar kesime sevk edilir. Tümör varlığı teşhiste yardımcı olabilir. Özellikle populasyon taramalarında AGID testi ile kan serumlarında antikor aranması büyük önem taşımaktadır. Son yıllarda kan serumu ve süt örneklerinde ELISA testi ile antikor tespiti sıkça kullanılmaktadır (3, 8, 26, 42).

Kan örneklerinden yapılan PCR testleri etkenin özellikle proviral DNA’sının saptanmasında büyük önem taşımaktadır. Bu amaçla konvansiyonel PCR, nested PCR ve real-time PCR teknikleri kullanılmaktadır. Ayrıca etkenin RNA’sının saptandığı RT-PCR (Reverse Transcriptase PCR) kullanılabilir (25, 38, 45). PCR ürünleriyle yapılan dizi analizi çalışmaları ile virusun soy ağacı çıkartılabilmekte ve bu şekilde sınıflandırılabilir (49, 54, 59).

### 2.8.1. Nekropsi

Nekropside hastalıklı hayvanlarda lenf yumruları, abomasum, kalp, böbrek, uterus, bağırsak, karaciğer, akciğer, dalak ve beyinde lenfoid tümörlere rastlanmaktadır. Deri, vertebral kanal ve iskelet kaslarında genelde neoplastik oluşumlar görülmez. Lenfosarkomlar organlarda nodüller halinde veya yaygın olarak infiltre olarak gözlenir. Baş, boyun, göğüs ve özellikle mezenterial ve pelvik lenf düğümlerinin büyüdüğü gözlenir (27, 41, 60).

### **2.8.2. Mikroskopi**

Mikroskopik bulgular genellikle lenf yumruları, abomasum, kalp, böbrek, uterus, dalak ve beyinde saptanabilmektedir. Löykozlu hayvanların karaciğer ve akciğerlerindeki kılcal damarlarında çok sayıda lenfositler görülmektedir (41, 60).

Makroskopik lezyonlar histolojik olarak izlendiğinde; lenf yumruları normal görüntülerini kaybetmişlerdir, aralarında birçok mitotik figürlü hücrelerin bulunduğu, neoplastik hücrelerin yaygın infiltrasyonunun normal doku yapısını bozduğu veya tamamen yerini aldığı rapor edilmiştir (18).

### **2.8.3. Viral Antijenlerin, Viral RNA yada Proviral DNA'nın Saptanması**

İzolasyon çalışmaları yapılmadan da tümör dokuları, kan ve süttten alınmış örneklerde virusun varlığı saptanabilmektedir. Bu amaçla serolojik ve moleküler yöntemler kullanılmaktadır. AGID ve ELISA gibi antijen saptamaya yönelik serolojik metodlar yanında, viral genomu saptamaya yönelik olarak PCR en çok kullanılan yöntemdir (9, 22, 46, 50, 67).

#### **2.8.3.1. Polimerase chain reaction =Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR-PZR)**

Moleküler yöntemlerden Real Time ve Konvansiyonel PCR ile etkenin Proviral DNA'sı saptanabilmektedir. Ayrıca reverse transcriptase (RT) PCR ile etkenin RNA'sıda saptanabilmektedir (57).

BLV'nin tanımlanmasında kullanılan PCR çalışmalarında örnekleme amacıyla başta total kan olmak üzere, dokular, süt, semen ve kolostrum kullanılmaktadır. Bu örneklerde konvansiyonel PCR, RT- PCR, nested PCR ve real-time PCR yöntemleri kullanılarak viral RNA yada proviral DNA'sı saptanmaktadır (51, 61, 68).

PCR testlerinin diğer bir avantajı virus canlı olmasa da viral genomun saptanabilmesidir. Ancak yüksek sensitivite nedeniyle laboratuvar örnekleri arasında kros-kontaminasyon riski de vardır. Bu risk özellikle proviral DNA ekstraksiyonu ve amplifikasyon aşamalarında artmaktadır. Kontaminasyon riskinin en aza indirilmesi için PCR'in tüm aşamalarında çok dikkatli çalışılması, pozitif ve negatif kontroller kullanılarak sürekli test edilmesi gerekmektedir (51, 57).

#### 2.8.4. Serolojik Yöntemler

BLV ile infekte sığırlarda AGID ve ELISA ile serolojik olarak saptanması güvenilir tanı yöntemleri arasındadır. AGID testi, agar ile oluşturulan yarı katı ortamda antijen ve antikorun diffuze olmaları ve antijen ile antikorun birleştiği alanlarda presitasyon oluşması esasına dayanır. AGID testi; genellikle nötralizasyon ve komplement fikzasyon testlerinden daha az duyarlıdır. Ancak, Retroviruslar ile oluşan persiste enfeksiyonların teşhisinde referans yöntem olarak önerilmektedir (88, 89).

AGID testi dışında en sık kullanılan yöntem olan ELISA'da birçok laboratuvar tarafından kullanılmakta ve WOAHA (World Organization for Animal Health) ve OIE (Office International Epizooti) tarafından onaylı ve önerilen testlerdir (89, 90). Bunların yanında IFA, nötralizasyon ve radioimmunoassay yöntemleri de tanıda kullanılmaktadır. Bu testler ile enfeksiyonun farklı dönemlerinde seropozitifliğin saptanabileceği bildirilmiştir (30, 37, 47).

##### 2.8.4.1. ELISA

BLV'ye karşı oluşan antikorları saptamaya yönelik bir çok ELISA geliştirilmiştir.

Doğal infekte sığırlarda BLV zarf glikoproteini (gp51) ve core (öz) proteinine (p24) karşı antikorlar oluşmaktadır ve her ikisi de ELISA yönteminde hedef protein olarak kullanılmaktadır (52, 69).

Son yıllarda BLV gp51 ve p24 proteinlerinin *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, rekombinant vaccinia virus ve baculovirus sistemleri kullanılarak elde edilen rekombinant proteinleri serolojik tanıda kullanıldığı rapor edilmiştir (52, 93).

AGID ve ELISA testleri ticari amaçla, EBL tanısında kullanılmak üzere WOAHA (89) tarafından tanı testi olarak onaylanmışlardır. ELISA ve AGID testleri arasında yüksek oranda uyum sağlandığı belirtilmekle birlikte bazı araştırmacılar ELISA sensitivitesinin daha yüksek olduğunu vurgulamışlardır (20, 58).

## 2.9. Koruma ve Kontrol

Hastalığın önlenmesi ve korunmak için başlıca yapılması gereken virusun sığır popülasyonu içinde yayılmasını engellemektir. Bu amaçla öncelikle taşıyıcı hayvanların ortaya çıkarılması gerekmektedir. Sürüde bulunan sığırlar test edilmeli ve kontrol açısından da 6 ayda bir yapılan testler yenilenmelidir. Sürüye dahil edilecek sığırlar ise, testleri tamamlanincaya kadar ayrı bir yerde tutulup hastalık yönünden testleri tamamlandıktan sonra sürüye dahil edilmelidir (2, 17, 42).

Yapılan testlerin sonuçları pozitif ise bu hayvanlar ayrı bir yerde bakılmalı, damızlıkta kullanılmamalıdır. Bu hayvanlar sürüde bulunan diğer hayvanlarla bir arada bulunmamalı ve pozitif hayvanlarda kullanılan malzemeler sürünün diğer sağlıklı hayvanlarında kullanılmamalıdır, mümkünse pozitiflik saptanan hayvanlar bir an önce elden çıkartılmalıdır (2, 42).

Enfekte olmayan buzağılar elde etmek için, buzağı yeni doğduğunda daha kolostrum almadan annelere gerekli testler yapıp, sağlıklı annelerden elde edilen kolostrumla beslenmelidir (2, 10, 73).

İşletme içerisinde kontrol programları oluşturulmalı, kayıtlar iyi tutulmalıdır. 6 ayda bir testler düzgün olarak yapılmalı sonuçlar sürekli takip edilmelidir. Enfekte olduğu saptanan hayvanlar asla damızlığa alınmamalı ve en kısa sürede de kesime gönderilmelidir (2, 42).

Bazı kaynaklarda ise enfekte ineklerden enfekte olmamış buzağılar elde etmek için embriyo transferi gerçekleştirilebileceği bildirilmiştir fakat bunun uygulaması zor ve ekonomik olarak verimli olmayacağı düşünüldüğünden pek tercih edilmemektedir (42, 13).

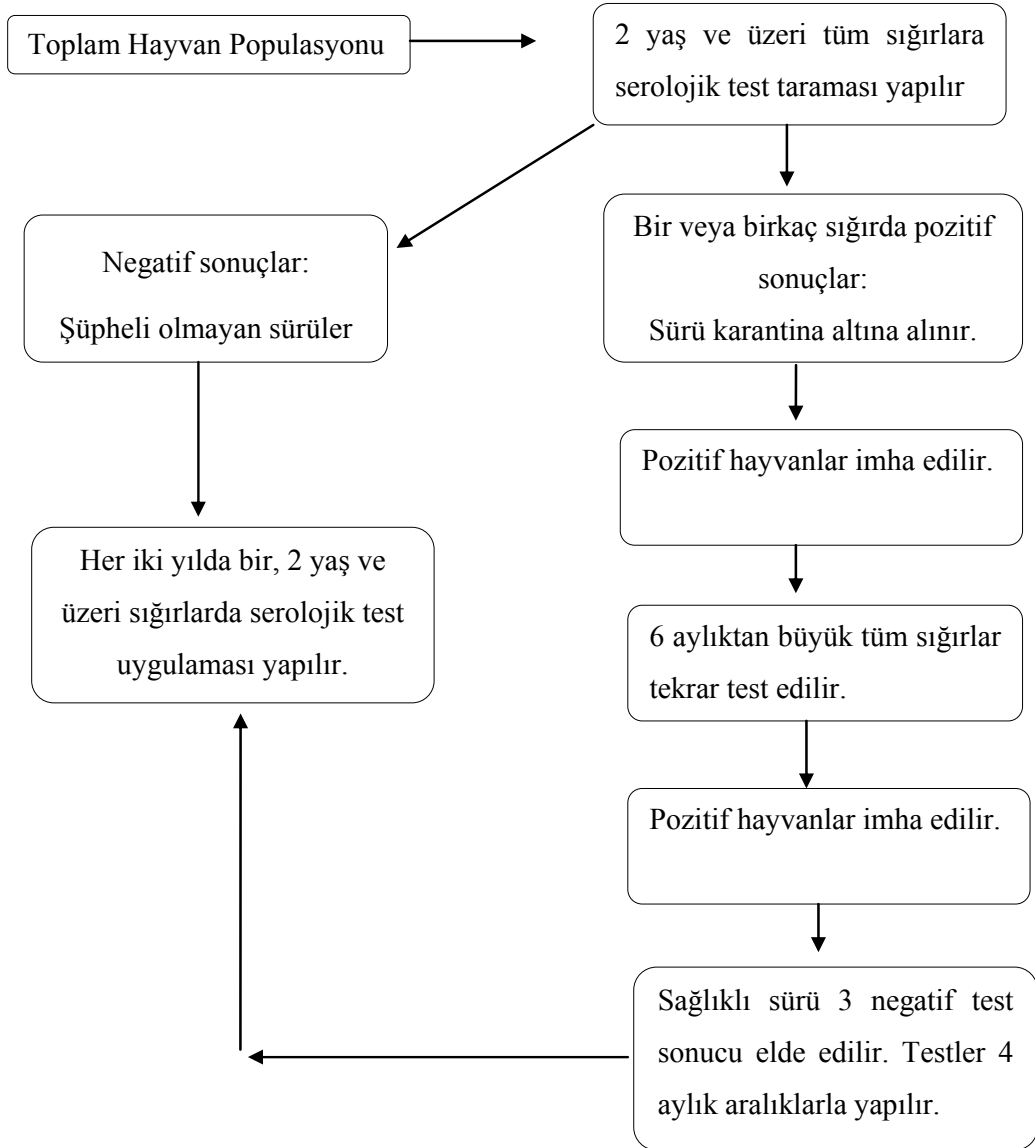
İatrojenik olarak bulaşmayı önleyebilmek için kullanılan enjektör, eldiven gibi malzemelerin tek kullanımlık olmasına dikkat etmeli ve bu ekipmanların sadece bir kez kullanılmasına özen gösterilmelidir. Ortak kullanılan sağım makinası, suni tohumlama ekipmanlarının ve boynuz kesme malzemelerinin temiz olmasına ve mümkünse her bir hayvanda kullanıldıktan sonra dezenfekte edilmesine dikkat edilmelidir. Yine boynuz kesme aletlerinin mümkünse elektrikli yakma prensibiyle çalışan modelleri tercih edilmelidir. Döllemede doğal çiftleştirme yerine hijyenik malzemelerin kullanıldığı suni tohumlama metodu uygulanmalıdır (48 ).

Hayvanları çok kalabalık ahırlarda birbirlerine yakın olarak barındırmamak da hastalık etkeninin yayılmasını önlemede bir yöntemdir. Bulaşmada göz ve burun sıvılarının da rol oynayabileceği unutulmamalıdır. Ayrıca boynuz kesme metodu birçok yaralanmaları önleyeceğinden dolayı korunmada bir yol olarak düşünülebilir (11, 42).

Populasyonda yayılmayı engellemenin diğer bir yolu da hastalık etkenini bulaştırmada rol oynadığı düşünülen artropodları barınaklardan uzak tutmak için önlemler almaktır. Bunun için fiziksel (sinek telleri ve elektronik kapanlar) ve kimyasal (kovucu ve öldürücü zehirler) yöntemlere başvurulmalıdır (42).

### **2.10. Eradikasyon**

Eradikasyon için çiftlik içerisinde iyi bir kontrol programı oluşturulmalıdır. Kayıtlar iyi tutulmalı ve sürekli yeni yapılan testlerle (6 ayda bir) güncellenmelidir. Enfekte olduğu saptanan hayvanlar asla damızlığa alınmamalıdır ve en kısa sürede de elden çıkartılmalı ve kesime gönderilmelidir. Sürüye mümkünse dışarıdan yeni hayvanlar alınmamalı eğer alınacaksa ari çiftliklerden alınmalı veya sürüye katmadan testlerinin bir an önce yapılması sağlanmalı ve bu süre zarfında karantinada tutulmalıdır (2, 42). Eradikasyona örnek olarak Aşağı Saksonya'da BLV enfeksiyonuna karşı uygulanan programı Şekil 2.4' deki şemada gösterilmiştir.



**Şekil 2.4- Almanya’da BLV enfeksiyonuna karşı uygulanan eradikasyon programı (42).**

### 2.11. Bağışıklık

BLV replikasyonunun baskılanmasında BLV antijenlerine karşı özellikle cell mediated immunitenin=hücreye bağlı immunité (CMI) katkı sağlar ve enfeksiyonun gelişmesini geciktirir. Ayrıca kronik retroviral enfeksiyonlarda hastalığın ilerlemesinde sitokin artışıdaki değişikliklerin etkili olduğu ve hastalığın oluşmasına katkı sağladığı gösterilmiştir. Serolojik olarak pozitif olan hayvanlarda IL-2'nin arttığı, persiste lenfositozisli hayvanlarda ise IL-10 'un arttığı gösterilmiştir. Enfeksiyonun erken fazında ise IL-12 artmaktadır. Ayrıca T helper 1 (Th1) sitokinler CMI' nın başlatılmasında önemli rol oynamaktadırlar (40).

Hastalıktan korunma için bazı aşı denemeleri yapılmıştır, fakat bu çalışmalar sonucu elde edilen aşılar, uzun süreli korumadan uzak kalmışlardır (14, 27, 34). Yapılan ilk aşı denemelerinde, aşılar fütal kuzu böbrek hücrelerinde hazırlanmıştır. BLV glikoprotein antijenleri, fütal kuzu böbrek hücre kültürlerinden elde edilen kültür sıvılarında tespit edilmiştir (5). Gp 51 ve p24 antijenlerinin immunolojik özelliklerinin bulunduğu ve bu sebeplede gp51 antijenlerinin ve fütal kuzu böbrek hücrelerinin gp51 antikorlarının şekillenmesi sağlanarak koruyuculuk oluşturmuştur (64). Bazı araştırmacılar virus ile enfekte fütal kuzu böbrek devamlı hücre kültürlerine p24 antijeni ilave ederek canlı aşı elde etmişler ve bu aşılar ile kısa süreli bağışıklık sağlamışlardır (5,55, 63). Günümüzde dünyada ve ülkemizde kullanılan ticari bir aşı bulunmamaktadır.

### 2.12. Sağaltım

Bovine leukemia virus, sığırların lökosit hücrelerinde özellikle B lenfositlerde persiste kalır. Etken, sığıra yerleştikten sonra virus proteinlerine karşı antikor oluşur ve yaşam boyu persiste bir enfeksiyon şekillenir. İyileşme söz konusu değildir (41, 60, 66).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Örnekler

Sığırların kuyruk venalarından antikoagulanlı ve antikoagulansız kan alınmıştır. Örneklemeler 2008 Haziran ayı ile 2010 Haziran ayları arasında çoğunluğu dişi 1.5 ile 10 yaş arasındaki sığırlardan yapılmıştır. Kan alınmadan önce çok belirgin klinik belirti gösteren sığırlar muayene edilmişlerdir. Normal kanlardan serumları elde edildikten sonra ELISA da kullanılmak üzere -35 °C derece tutulmuşlardır. Antikoagulanlı kanlardan ise ticari DNA izolasyon kiti kullanılarak elde edilen DNA'lar -35 °C derecede tutulmuşlardır.

Bunların dağılımı aşağıdaki gibidir :

- Kırklareli Lüleburgaz: 32 adet
- Kırklareli Pınarhisar: 14 adet
- Kırklareli Vize: 10 adet
- Tekirdağ Çerkezköy: 37 adet
- Tekirdağ Malkara: 39 adet
- İstanbul Çatalca: 9 adet
- İstanbul Küçükçekmece: 20 adet
- Bursa: 35 adet
- Çanakkale: 15 adet

### 3.2. ELISA

ELISA testi için Institut Pourquier firmasının ticari ELISA kiti kullanıldı.

ELISA plakaları SLT.SPECTRA okuyucuda okundu.

Institut Pourquier firmasının ticari ELISA kitinin içeriği:

- Monowell Coated microplates (Tekli antijen yapıştırılmış plakalar)
- Concentrated (20x) wash solution (Konsantre yıkama solusyonu)
- Dilution Buffer 1 sky blue ( Mavi renkli sulandırma tamponu)
- Pozitif kontrol
- Negatif Kontrol
- Monoclonal antibovine IgG / peroxidase conjugate
- Revelation solution 3 (TMB) (Kullanıma Hazır Substrate solusyonu)
- Stop Solution (H2 SO4 0,5M) (Reaksiyon durdurma solusyonu)

### 3.3. ELISA Yöntemi

Ticari ELISA kitinin kullanım klavuzunda belirtilen şekilde ELISA gerçekleştirildi.

Teste başlamadan önce 20X olarak konsantre halde bulunan 100 ml yıkama solusyonunu 1900 ml distile suyla dilue edildi.

Testte ilk aşama olarak serumlar 1/20 oranında sulandırıldı ve 1 saat boyunca inkube edildi. Bu periyotta ilk önce plakalarda pozitif kontrol, negatif kontrol ve örnekler için her bir kuyucuğa 190 µl “Dilution buffer 2” konuldu. Ardından serum örnekleri, pozitif kontrol ve negatif kontrol’den plakalar üzerindeki kuyucuklarına 10 µl eklendi. Eklenmesinin ardından plakalar hafifçe sallanarak içeriklerin homojenize olması sağlandı. Plakaların üzeri alüminyum folyo ile kaplandı ve 37 °C’de 1 saat boyunca inkube olması sağlandı. Daha sonra plakalar, içeriği ters çevrilerek boşaltıldıktan sonra önceden hazırladığımız yıkama solusyonundan çukurlara 300’er ul eklenerek 3 kez yıkandı.

Konjugat “Dilution Buffer 1” ile 1/100 oranında sulandırıldı ve her bir kuyucuğa 100 µl eklendi. Plakanın üzeri alüminyum folyo ile kapatıldıktan sonra (37 °C)’de 30 dakika boyunca inkubasyona bırakıldı. İnkubasyonun ardından plakanın içeriği ters çevrilerek boşaltıldı ve yukarıda tarif edilen şekilde 3 kez yıkandı.

Yıkamanın ardından her bir kuyucuğa 100 µl “Revelation Solution 3= substrate solusyonu” konuldu ve üzeri alüminyum folyo ile kapatılıp karanlık bir yerde 20 dakika boyunca oda ısısında inkubasyona bırakıldı. İnkubasyonun ardından her bir kuyucuğa 100 µl “Stop solution” konuldu. Plaka hafifçe sallanarak renkli çözeltinin homojenize olması sağlandı ve SLT.SPECTRA okuyucu ile 450 nm’de okundu.

OD (Optik Dansite ) değerlerinin hesaplanması:

$$S/P\% = 100 \times \frac{(\text{Örneğin OD450 nm'deki değeri} - \text{Negatif kontrolün OD450 nm'deki değeri})}{(\text{Pozitif kontrolün OD450 nm'deki değeri} - \text{Negatif kontrolün OD450 nm'deki değeri})}$$

Cut off (+) pozitif değeri %115 olarak hesaplandı. OD değeri %115 in üzerinde pozitif, %85-115 arası şüpheli, %85 altında negatif olarak değerlendirildi.

### 3.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Gereçler

#### 3.4.1. Örnekler

-ELISA da kullanılan aynı hayvanların EDTA'lı kanları kullanıldı.

#### 3.4.2. Ekstraksiyon

-Kit ve moleküler belirteçler:

DNeasy Blood & Tissue Kit (Cat No: 69506)

Total kandan Proviral DNA ekstraksiyonu için QIAGEN DNeasy Blood & Tissue Kit kullanıldı.

#### 3.4.3. DNA miktarının ölçümü

Nanodrop (Thermo scientific) spektrofotometre cihaz ile ölçüldü.

#### 3.4.4. Konvansiyonel PCR

-Proviral DNA.

-MgCl<sub>2</sub> 25 mM (Promega A351H).

-PCR Mastermix

PCR karışım için Hotstar Taq PCR MasterMix Kit (Qiagen,Cat No:201445) kullanıldı. (içerisinde:Taq DNA Polymeras, 2x Qiagen PCR Buffer, 3 mM MgCl<sub>2</sub> ve d NTP mix).

-Konvansiyonel PCR primerleri: Primerler Primer 3 (versiyon 0.4.0) programı ile seçildi ve BLAST'ları ve ikincil yapıları internetten serbest programlarla kontrol edildikten sonra ticari firmaya sentezletirildi.

Viral *env* geninden seçildi (495 bp).

Konvansiyonel PCR çalışmasında kullanılan primer dizileri :

Forward Primer TGCCCTTAGCCATCAGAGAC

Reverse Primer CACAGAGGCCACATTAAGCA

-Agaroz

Agaroz (sigma, kod 5093) RT-PCR ürünlerinin horizontal jel elektroforez'de incelenen örneklerin molekül ağırlıklarına göre bantlara ayrılması amacıyla kullanıldı.

-Ethidium Bromide ( Biochemica, kod; 46065)

Agaroz jel'de PCR ürünlerinin görülmesi için % 0.1' lik ethidium bromide kullanıldı.

-10X Tris-Asetat EDTA (TAE) Buffer:

10X TAE buffer'ı hazırlamak için 4,84 gr Tris (SİGMA, Kod;T-60663.72),0,74 gr Na<sub>2</sub> EDTA 2H<sub>2</sub>O (SIGMA,Kod;E5134) 1,14 ml Glacial asetik asit (SIGMA,Kod;A6283) 100 ml'ye deionize suyla tamamlandıktan sonra 10 M NaOH kullanılarak pH 8.5 olarak ayarlandı. 10X TAE buffer 10 kat sulandırıldıktan sonra jelin hazırlanması (1X) ve elektrik akımının iletilmesi amacıyla kullanıldı.

-Pozitif kontrol DNA

PCR' da kontrol amacıyla kullanılan Bovine Leukemia Virus DNA'sı Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nden Prof.Dr.Hakan Bulut' tan sağlandı.

-Negatif kontrol olarak RNase-DNase içermeyen bidistile su kullanıldı.

### 3.4.5. Real-time PCR

-Proviral DNA.

-MgCl<sub>2</sub> 25 mM (Promega A351H).

-PCR Mastermix(Qiagen marka Cat No:201445)

Konvansiyonel PCR Karışımında (Mastermix) kullanılan ile aynı.

-Real –Time PCR primerleri: Primerler Primer 3 (versiyon 0.4.0) programı ile seçildi ve BLAST'ları ve ikincil yapıları internetten serbest programlarla kontrol edildikten sonra ticari firmaya sentezletirildi.

Viral polimeraz geninden seçildi (115 bp)

Real –Time PCR çalışmasında kullanılan primer dizileri.

Forward Primer- ATTTTCCATCTCCATTGACC

Reverse Primer - GAAGGTTCCCAACATATAGCA

-Sybr green 1/1000 oranında sulandırılmış çözeltisi kullanıldı.

-Ethidium Bromide ( Biochemica, kod; 46065)

-10X Tris-Asetat EDTA (TAE) Buffer

-Pozitif kontrol DNA

Real-time PCR' da normal PCR' da kullandığımız pozitif kontrol kullanıldı

-Negatif kontrol olarak RNase-DNase free bidistile su kullanıldı.

Normal ve real-time PCR çalışmaları “Bio Rad Chromo 4” thermocycler cihazında gerçekleştirildi.

### **3.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR, PCR) Yöntemi**

#### **3.5.1. Proviral DNA ekstraksiyonu**

QIAGEN DNeasy Blood & Tissue Kit (Cat No: 69506) ile DNA ekstraksiyonun prosedürü:

1. 2 ml'lik Mikrosantrifüj tüpüne 20 µl proteinase K koyuldu, üzerine 100 µl antikoagulanlı kan eklendi ve PBS ile 220 µl'ye tamamlandı
2. Karışımın üzerine AL Buffer eklendi ve homojenize etmek için vortex cihazı ile karıştırıldı. Karışım daha sonra 56 °C'de 10 dakika inkubasyona bırakıldı.
3. İnkubasyonun ardından karışıma 200 µl %100 saf etanol eklenip homojenize etmek için vortex cihazı ile karıştırıldı.
4. 3.adımda elde edilmiş olan karışım daha sonra 2ml'lik DNeasy Mini spin kolon tüplerine alındı. Karışım 8000 rpm devir hızında 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüjün ardından DNeasy Mini Spin kolon başka bir toplama tüpüne konuldu.
5. Tüpün içerisine 500 µl AW1 buffer konuldu ve yine 8000rpm devir hızında 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüjün ardından DNeasy Mini Spin kolon başka bir toplama tüpüne konuldu.

6. Tüpün içerisine 500 µl AW2 buffer konuldu ve DNeasy membranın kuruyabilmesi için 14000 pm devir hızında 3 dakika santrifüj edildi. Santrifüjün ardından DNeasy Mini Spin kolon 2ml'lik Mikrosantrifüj tüpüne konuldu.
7. 200 µl AE Buffer doğrudan DNeasy membranına konuldu ve oda ısısında 1 dakika inkube edildi. Ardından 8000 rpm devir hızında 1 dakika santrifüj edildi ve ekstrakt Mikrosantrifüj tüpüne ayrıldı.

### 3.5.2. DNA miktarının ölçümü

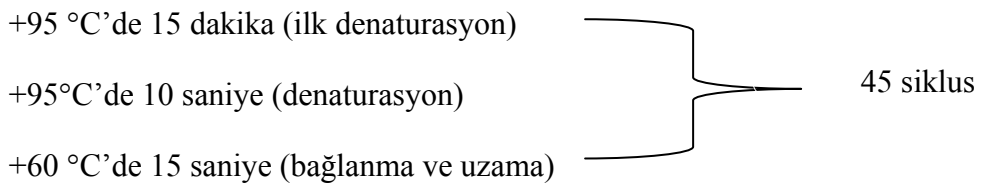
Bu amaçla pozitif kontrol ve örneklerden izole edilen DNA miktarları Nanodrop spektrofotometre cihazı ile ölçüldü (Thermo Scientific) .

### 3.5.3. Real-Time PCR

Real-Time PCR Karışımı

- Hot Star Tag Master mix (Qiagen marka Cat No:201445) 12,50 µl
- F Primer (20 pmol): 1,0 µl
- R Primer (20 pmol): 1,0 µl
- MgCl<sub>2</sub> 25 mM: 1,0 µl
- Sybr green 1/1000: 0,5 µl
- Distile su: 6,0 µl
- DNA: 3,0 µl

Daha sonra karışım PCR Thermocycler cihazına (Bio Rad Chroma 4) yerleştirildi ve aşağıdaki program uygulandı.



Program melting curve için 70-99 °C'ler arasında 1 derece aralıklarla 10 saniye okumaya ayarlandı.

### 3.5.4. Konvansiyonel PCR

Konvansiyonel PCR da primerlerin en uygun bağlanma ısılarının saptanması için öncelikle gradient PCR gerçekleştirildi. Gradient PCR ile bağlanma derecesinin standardizasyon çalışmasında 52 °C ile 62 °C dereceler arası test edilerek en uygun bağlanma ısı saptandı. Buna göre aşağıdaki PCR karışımı ve koşulları kullanıldı;

-Hot Star Tag Master mix(Qiagen marka Cat No:201445): 12,50 µl

-F Primer (20pmol): 1,0 µl

-R Primer (20pmol): 1,0 µl

- MgCl<sub>2</sub> 25 mM: 0,5 µl

- Distile su: 6,0 µl

- DNA: 4,0 µl

Daha sonra karışım PCR Thermocycler cihazına (Bio rad Chroma 4) yerleştirildi ve aşağıdaki program uygulandı.

+95 °C'de 15 dakika (ilk denaturasyon)

+94°C'de 1 dakika (denaturasyon)

+56 °C'de 45 saniye (bağlanma)

+72 °C'de 1 dakika (uzama)

+4 °C'de 10 dakika



### 3.5.5. PCR Ürünlerinin Horizontal Agaroz Jel Elektroforezi ile Analizi:

PCR ürünleri ethidium bromide (1/10.000) içeren agaroz jel elektroforezi ile incelendi. Jel için %1.5 'luk agaroz ve 1X TAE buffer ile hazırlandı. 9 µl PZR ürünü 1.5 µl yükleme buffer'ı (6X Loading Dye Buffer) ile karıştırılarak jele aktarıldı. Aynı zamanda 100 bp' lik marker jeldeki ilk çukura yüklendi. 100 volt elektrik akımında ortalama 35 dk elektforez edildikten sonra Kodak (Gel Logic 200 Imaging System) marka görüntüleme cihazında DNA bantları gözlemlendi ve fotoğraflandı.

### 3.5.6. Sekanz analizi:

Konvansiyonel PCR sonucunda elde edilen *env* genine ait 495 bp lik ürünle purifiye edildikten sonra sekanslandı. Bu işlem ticari bir firmadan (Refgen) hizmet alımı yapılarak gerçekleştirildi. Sekanslama sonrasında elde edilen dizinler MEGA 4 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis ) analiz programı kullanılarak filogenetik (soy ağacı) gerçekleştirildi. Soy ağacı oluşturulmasında gen bankasından seçilen aşağıdaki dizinlerden yararlanıldı:

Amerika Birleşik Devletleri ( EF065656, EF065647, EF065649, EF065648), Arjantin (FJ808586, FJ808583, FJ808580, FJ808594, FJ808587, FJ808598, FJ808582, FJ808595, FJ808596), Avustralya (D00647), Belçika (AF503581, M35240, K02251, EF065638), Brezilya (AY185360), Fransa (M35238), İran (EU266060, EU266063), İtalya (S83530), Japonya (EF065651), Kore (AY995174), Kostarika (EF065637, EF065655, EF065639, EF065643, EF065654, EF065645, EF065635, EF065636), Uruguay (Uru33).

## 4. BULGULAR

### 4.1. ELISA Bulguları

Örnek bulguları:

Kırklareli Lüleburgaz alınan 32 adet örnekten 2 adedinde ELISA ile BLV antikorları yönünden pozitiflik saptandı.

Kırklareli Pınarhisar'dan alınan 14 adet serumda ELISA ile pozitiflik saptanmadı.

Kırklareli Vize'den alınan 10 adet sığır serumundan 1 adedinde ELISA ile BLV antikorları yönünden pozitiflik saptandı.

Tekirdağ Çerkezköy'den alınan 37 adet örneğin 2 adedinde ELISA ile BLV antikorları yönünden pozitiflik saptandı.

Tekirdağ Malkara'dan alınan 39 adet örneğin 1 adedinde ELISA ile BLV antikorları yönünden pozitiflik saptandı.

İstanbul Çatalca dan alınan 9 adet serumda ELISA ile pozitiflik saptanmadı.

İstanbul Küçükçekmece'den alınan 20 adet serumun ELISA ile 18 adedinde pozitiflik saptandı.

Bursa dan alınan 35 adet serumda ELISA ile pozitiflik saptanmadı.

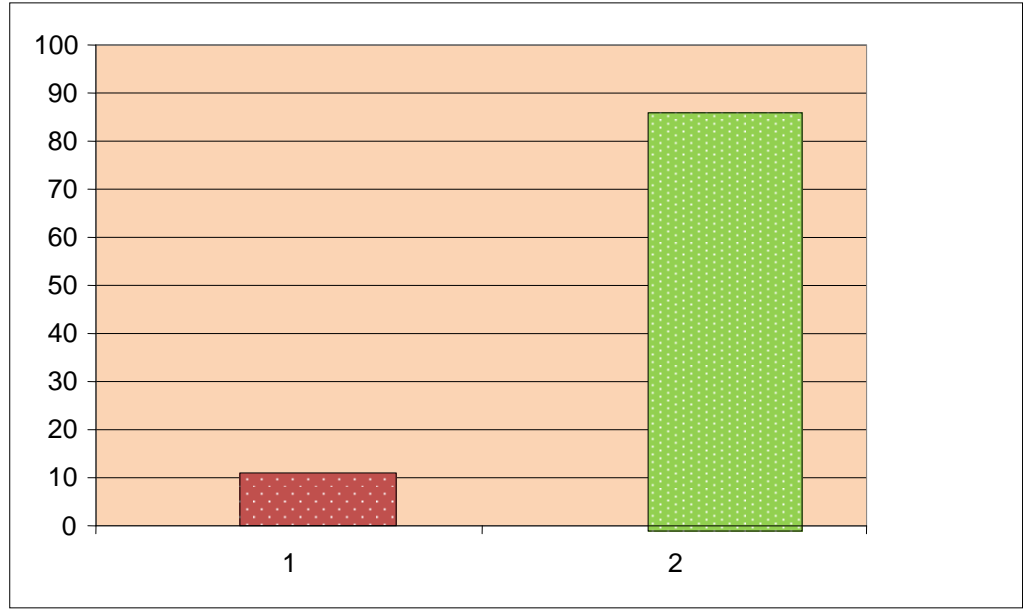
Çanakkale'den alınan 15 adet serumda ELISA ile BLV antikorları yönünden pozitiflik saptanmadı.

Sürü bazında 9 yerleşim biriminde bulunan toplam 13 sürüden 5 adedinde (%38) pozitiflik saptandı. Ayrıca total olarak 211 adet serumda 23 (%10.9) adet pozitiflik tespit edildi (Tablo 4.1, Şekil 4.1).

NO	Toplam hayvan sayısı	ELISA pozitif	ELISA şüpheli	Pozitiflik oranı	Şüpheli oranı
1	32	2	-	% 6	% 0
2	14	-	-	% 0	% 0
3	10	1	-	% 9	% 0
4	37	2	-	% 7	% 0
5	39	1	-	% 3.8	% 0
6	9	-	-	% 0	% 0
7	20	17	1	%85	% 5
8	35	-	-	% 0	% 0
9	15	-	-	% 0	% 0
Toplam	211	22	1	% 10.9	% 0,47

**Tablo 4.1- ELISA'da pozitif örneklerin sayısı ve oranı.**

1- Kırklareli Lüleburgaz, 2- Kırklareli Pınarhisar, 3- Kırklareli Vize, 4- Tekirdağ Çerkezköy, 5- Tekirdağ Malkara, 6- İstanbul Çatalca, 7- İstanbul Küçükçekmece, 8- Bursa, 9- Çanakkale.



**Şekil 4.1- ELISA pozitiflik oranı;**

1-Pozitif 2- Negatif

#### **4.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Bulguları (PZR, PCR)**

DNA Ekstraksiyonu: Pozitif kontrol olarak kullanılan suşdan ve alınan kan örneklerinden DNA ekstraksiyon çalışmaları ile Proviral DNA elde edildi. Bu örneklerle real-time ve konvansiyonel PCR gerçekleştirildi.

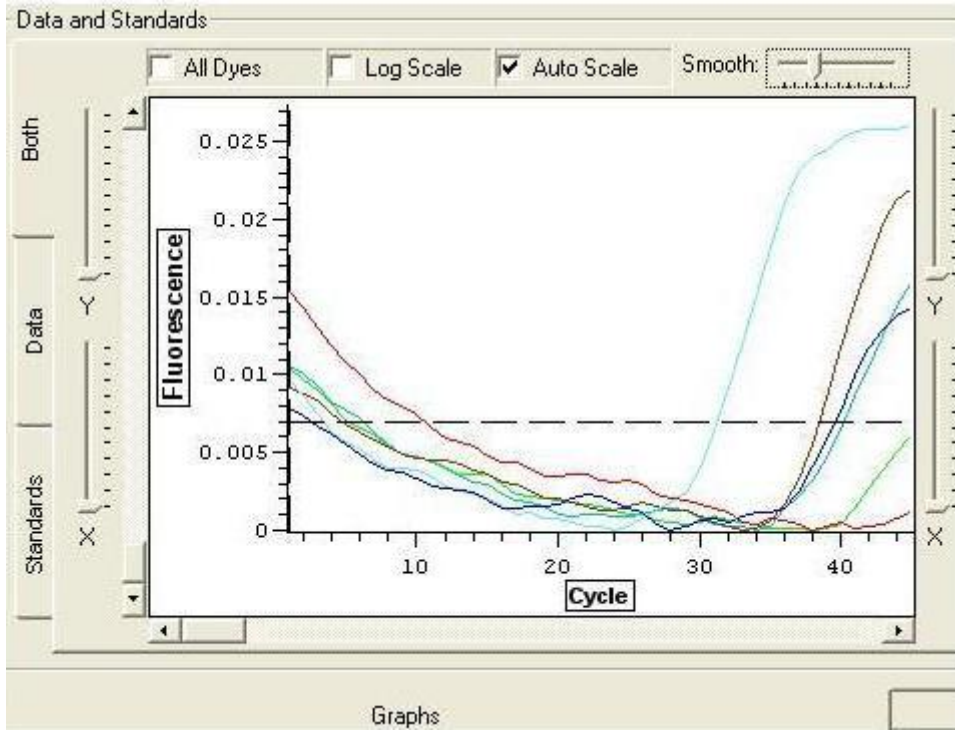
DNA Miktarı:

Pozitif kontrollerin DNA miktarının nanodrop ölçüm cihazında ölçümü ile miktarın ortalama 35 ng/µl olduğu saptadı.

Kan örneklerinde ise DNA miktarı ortalama 30 ng/µl olarak tespit edildi.

### DNA Miktarının Optimizasyonu :

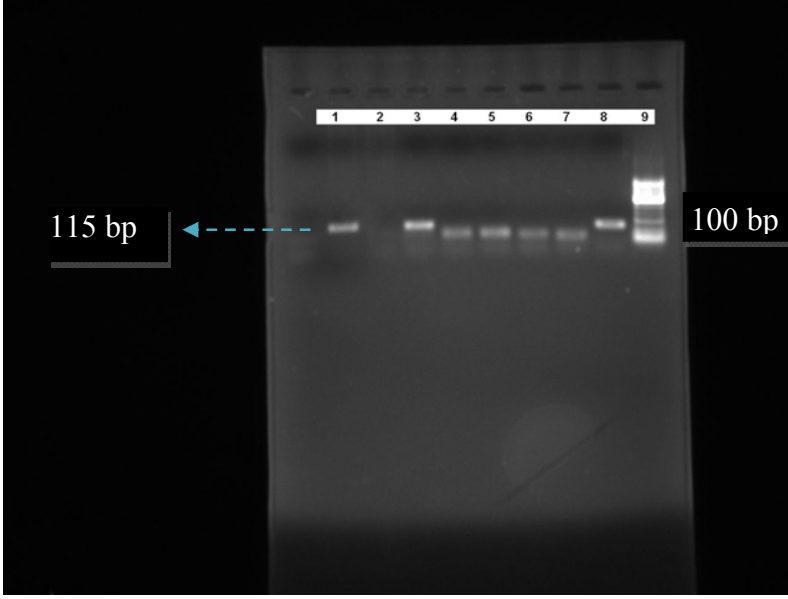
Pozitif kontrollerden elde edilen DNA'ların farklı miktarlarda dilusyonları kullanılarak yapılan standardizasyon çalışmaları sonucunda real-time PCR için 3  $\mu$ l, konvansiyonel PCR için ise 4  $\mu$ l DNA'nın en iyi çalıştığı saptandı. Real-time PCR için DNA miktarların saptanmasında pozitif kontrollerin *ct* değerleri ve erime eğrisi dereceleri göz önüne alındı. Konvansiyonel PCR için ise pozitif ve negatif kontrollerin DNA bantlarına ve dimer oluşumuna göre değerlendirme yapıldı.



**Şekil 4.2- Real-time PCR *ct* (Cycle threshold) grafiği.**

Pozitif kontrol ve örneklerle yapılan Real-time PCR görüntüsü. 1. eğri (yeşil) Pozitif kontrol, 2. eğri (açık yeşil) pozitif örnek, 3. eğri (mavi) Pozitif örnek, diğer eğriler; negatif kontrol ve negatif örnekler.





**Şekil 4. 4- Pozitif kontrol ve örneklerle yapılan Real-time PCR'ın jel görüntüsü.**

1. ve 3 Pozitif örnek, 2. negatif kontrol, 4, 5, 6, 7. negatif örnekler, 8. pozitif kontrol, 9 Marker

#### **Primer Miktarının Standardizasyonu :**

Primer miktarının optimizasyonu için primerlerden ana stok hazırlandıktan sonra reaksiyon başına 10, 20, 30, 40, 50 pmol kullanılarak optimizasyon yapıldı. Bu işlemlerde bir reaksiyon için 20 pmol primerlerin en iyi çalıştığını saptandı.

#### **MgCl<sub>2</sub> Miktarını Optimizasyonu :**

MgCl<sub>2</sub> (25 mMol) miktarını optimizasyonu için çeşitli miktarlarda (1.5, 1.75, 2, 2.25, 2.5 , 2.75 mM) kullanılarak optimizasyon yapıldı. Bu işlemlerde bir reaksiyon için 2 mM Mgcl<sub>2</sub> en iyi çalıştığını saptandı.

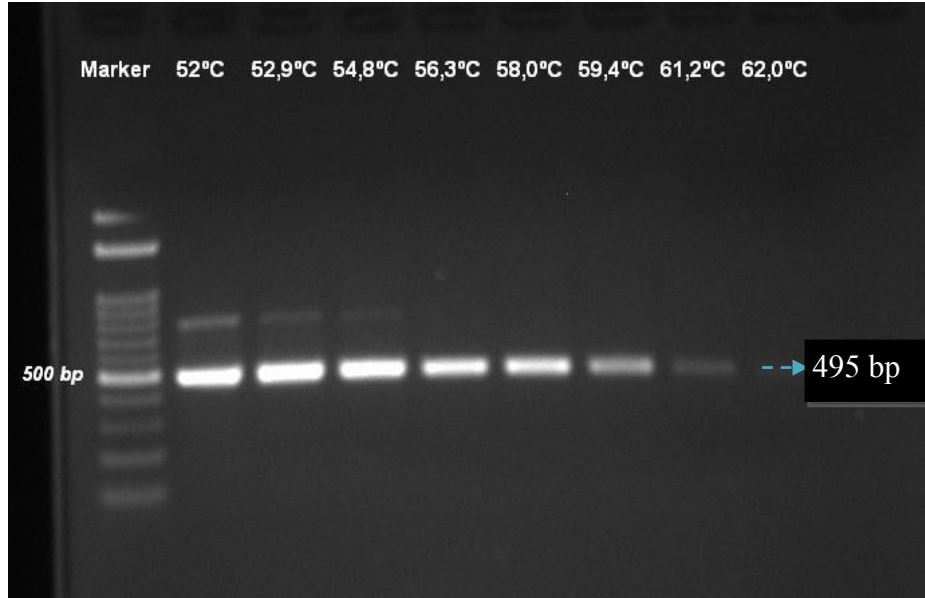
### PCR Karışımı

Primerler, MgCl<sub>2</sub> (25 mMol) , ve DNA miktarları optimize edildikten sonra Hotstartaq PCR master mix kullanılarak PCR yapıldı. Kontrol DNA ile yapılan karışım için 12.5 µl PCR Master Mix, 1 µl forward primer (20 pmol), 1 µl revers primer (20 pmol), 4 µl DNA, 1 µl (2 mM MgCl<sub>2</sub>) ve 5.5 µl saf su içeren toplam 25 µl' lik karışımın en uygun olduğu saptandı.

### Amplifikasyon Koşullarının Optimizasyonu:

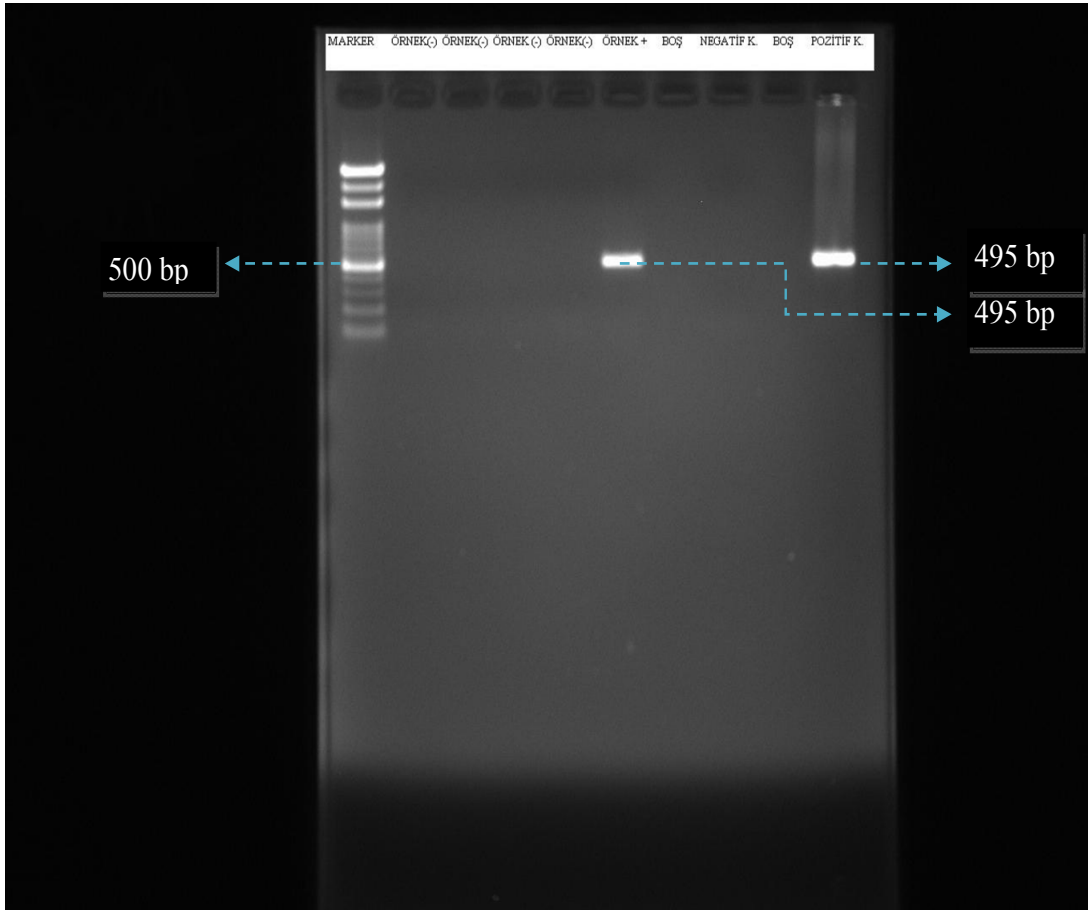
Annealing derecesinin optimizasyonu:

Gradient PCR reaksiyonu sonucu oluşan PCR ürünlerinde elektroforezde primer-dimerin en az olduğu ve yoğunluğu en uygun bantın 56 °C de olduğu gözlemlendi.



**Şekil 4.5- Gradient PCR (52 °C-62 °C) elektroforez görüntüsü**

1- marker °C, 2- 52°C, 3- 52,9°C, 4- 54,8°C, 5- 56,3°C, 6- 58°C, 7- 59,4°C, 8- 61,2°C, 9- 62°C,



**Şekil 4.6- Örneklerin Konvansiyonel PCR ile incelenmesi sonucunda elektroforez görüntüsü.**

1- Marker (100 bp) 2.3.4- negatif örnekler, 5- pozitif Örnek 8-Negatif kontrol 10-Pozitif kontrol (495 bp)

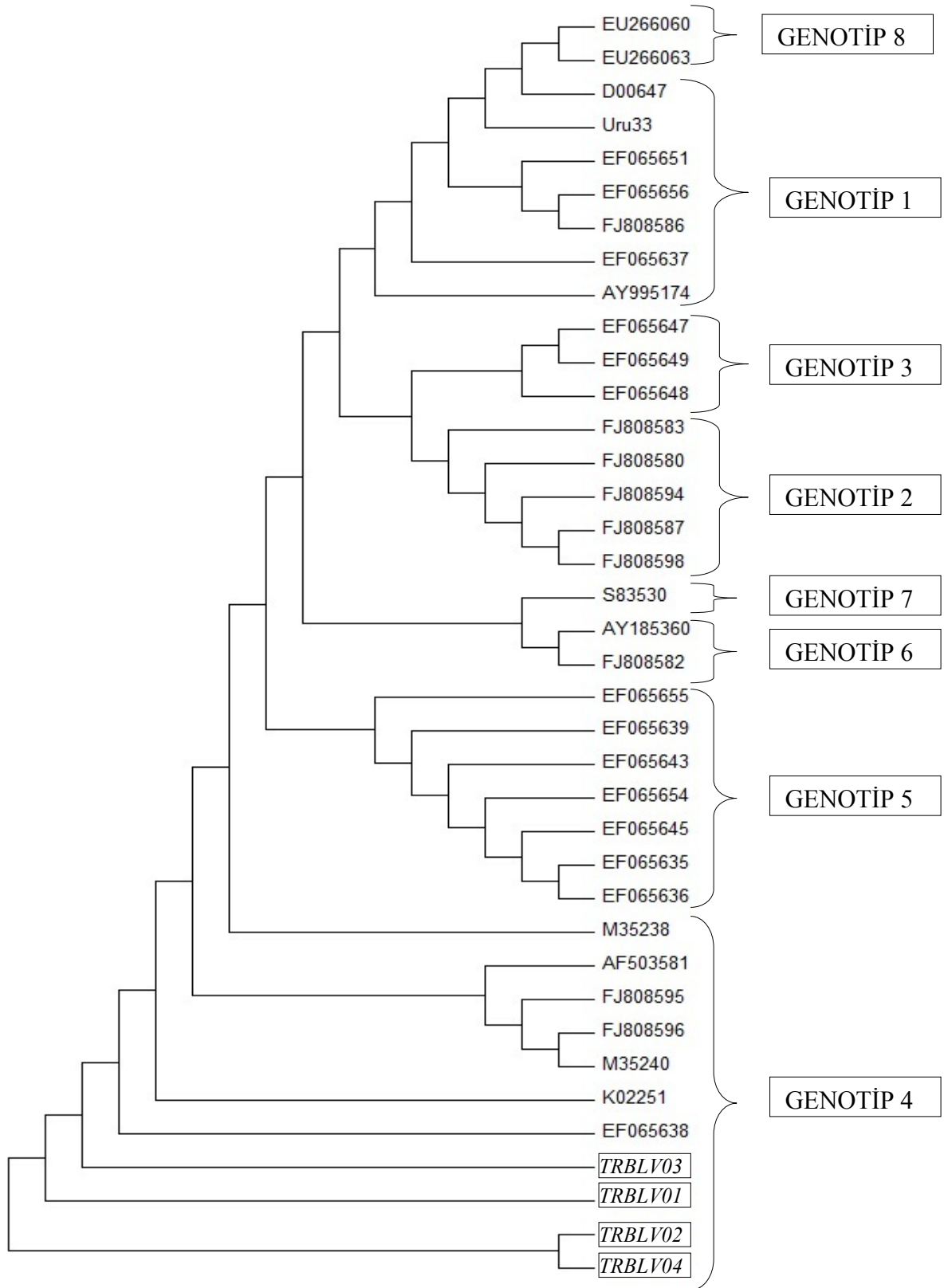
NO	Toplam hayvan sayısı	Real-time PCR pozitif	Konvansiyonel PCR pozitif	Her iki PCR için Pozitiflik oranı
1	32	2	2	% 6
2	14	-	-	% 0
3	10	1	1	% 9
4	37	2	2	% 7
5	39	1	1	% 3.80
6	9	-	-	% 0
7	20	18	18	% 90
8	35	-	-	% 0
9	15	-	-	% 0
Toplam	211	24	24	% 11.37

**Tablo 4.2- Real-time PCR ve Konvansiyonel PCR’da pozitif örneklerin sayısı ve oranı**

1- Kırklareli Lüleburgaz, 2- Kırklareli Pınarhisar, 3- Kırklareli Vize, 4- Tekirdağ Çerkezköy, 5- Tekirdağ Malkara, 6- İstanbul Çatalca, 7- İstanbul Küçükçekmece, 8- Bursa, 9- Çanakkale.

#### 4.3. Sekans analizi bulguları:

Konvansiyonel PCR’da pozitiflik saptanan ve sekans çalışmaları sonrasında da değerlendirmeye alınan 4 adet pozitif örneğin MEGA 4 programı ile analizi yapılmış ve nükleotid sekans bulguları soy ağacı Sekil 4.7’de verilmiştir. Bu sonuçlara göre sekanslamada kullanılan 4 BLV genotipide Moratorio ve ark. larının (59) çalışmalarında sundukları soy ağacı da dikkate alınarak genogrup IV olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.7- Örneklerin sekans analizi sonucunda oluşan gen ağacı görüntüsü.

Bu çalışmada kullanılan örnekler, TRBLV1, TRBLV2, TRBLV3, TRBLV 4

## 5. TARTIŞMA

Sığırlarda EBL infeksiyonu dünyanın birçok bölgesinde ve ülkemizde sığırcılık endüstrisinde asemptomatik seyirden ölüme kadar farklı klinik tablolarla seyreden ve ekonomik kayıplara neden olan önemli bir infeksiyondur.

İnfeksiyonun çoğunlukla asemptomatik seyretmesi ve gözden kaçması sürü içerisinde yayılma olasılığını arttırmaktadır. Bu nedenle Sığırcılık ünitelerinin düzenli aralıklarla serolojik yada moleküler yöntemlerle test edilmesi gerekliliği araştırmacılar ve Dünya hayvan sağlığı organizasyonu (WOAH)) tarafından önerilmektedir (88, 89, 90).

Ticari AGID ve ELISA testleri, EBL tanısında kullanılmak üzere WOAH (77) ve Office international epizooti (OİE) (89, 90) tarafından tanı testi olarak onaylanmışlardır. ELISA ve AGID testleri arasında yüksek oranda uyum sağlandığı belirtilmekle birlikte bazı araştırmacılar ELISA sensitivitesinin daha yüksek olduğunu vurgulamışlardır (20, 58, 82). ELISA ve AGID'in PCR ve Southern blot testleri ile karşılaştırmalı çalışmalarında ELISA'da %97.2 oranında ve AGID'de %79.7 oranlarında duyarlılık rapor edilmiştir (82). Benzer şekilde Nguyen V.K. ve ark (62) ELISA'nın kantitatif olarak antikor miktarını belirleyebildiğini, AGID testinden daha duyarlı olduğunu ve çok daha kısa sürede sonuç alınması avantajlarını bildirmişlerdir.

Bu çalışmada daha öncede araştırmacılar tarafından kullanılan ve önerilen ticari bir ELISA kiti (POURQUIER®ELISA Bovine Leukosis Screening-Fransa) kullanılmıştır. Bu kit ile anti-gP 51 antikorları saptanmaktadır. Benzer şekilde anti-p24 antikorlarının arandığı ELISA larda geliştirilmiş ve başarıyla kullanılmaktadır (44, 76). Simart ve ark. 2000 yılında yaptıkları çalışmada gP51 ELISA'nın hem AGID testinden hemde p24 ELISA'dan daha duyarlı olduğunu ve Kanada'da resmi tarama testi olarak kullanılmasını önermişlerdir (76).

EBL ile ilgili olarak tüm dünyada seropozitiflikler bildirilmiştir. Arjantin'de 2001 yılında (82) ELISA ile yapılan bir çalışmada %32.85 prevalans saptanırken, 2008 yılında (29) AGID ile %59 seropozitiflik bildirilmiştir. Kanada'da 1200 sığır serumu 3 farklı ELISA kiti ile test edilmiş ve ortalama %40.8 oranında pozitiflik bildirilmiştir (76). Amerika Birleşik Devletleri'nde 1997 yılında sürülerin %79'unda en az bir

hayvanda seropozitiflik rapor edilmiştir (84). 2003 yılında ise bir çalışmada, ELISA ile %80 seropozitiflik bildirilmiştir (61).

Mısır'da 2002 yılında ELISA ile yapılan seroprevalans çalışmasında 2 yaşın altındaki sığırlarda % 37.7 ve 2 yaşın üstündekilerde ise %72.8 oranında pozitiflik saptanmış ve bu pozitiflikler PCR ile de gösterilmiştir (93). Tanzania'da, ülkenin çeşitli bölgelerinden alınmış 2,859 örnekten ELISA ile yapılan seroprevalans çalışmalarında seropozitiflik oranı %36 olarak tespit edilmiştir (75).

Japonya'da 2003 yılında yapılan serolojik çalışmada , pozitiflik oranının % 3,3 olduğu tespit edilmiştir(85). Ayrıca Fransa (31, 62) ve İsrail'de (13) 1990' lı yıllarda yaklaşık % 3 oranlarında seropozitiflik bildirilmiştir.

Türkiye'nin Marmara Bölgesi'ne komşu olan ülkelerden, Bulgaristan'da yapılan çalışmalarda ise Sandev ve ark. 2000 yılında %17.2 ve 2004 yılında ise %22.26 ile artan pozitiflik oranlarını rapor etmişlerdir (65, 74). Bu çalışmadaki bulgular diğer ülkelerdeki bulgulara çok fazla benzerlik göstermemektedir.

Türkiye'nin farklı bölgelerinde EBL'nin seroprevalansı ile ilgili yapılan çalışmalarda Çukurova bölgesinde 1990'da %30 (18), Doğu Anadolu bölgesinde 2001 yılında %18 (23), 2005 yılında Güneydoğu'da %0.27 (66), 2006 yılında Aydın yöresinde yapmış oldukları çalışmada % 0,3 (80) ve Bursa ilinde 2009'da % 9 (16) oranında pozitiflik bildirilmiştir. Bu çalışmada ELISA ile saptanan % 9 oranındaki pozitiflik önceki yıllarda yapılan bazı çalışmaların sonuçlarına benzerlik gösterirken bazı çalışmaların bulgularına uymamaktadır.

EBL tanısında son yıllarda PCR yöntemleri bir çok araştırmacı tarafından yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (16, 54, 59, 73). Bu çalışma Marmara bölgesinde EBL nin tanısına yönelik olarak yapılan ilk Real-time PCR çalışmasıdır.

Araştırmacılar, PCR çalışmalarından önce DNA ekstraksiyon amacıyla farklı ticari kitler ve konvensiyonel yöntemlerden yararlanmışlardır (16, 51, 71). Bu çalışmada kandan DNA ekstraksiyonu için Qiagen marka DNeasy Blood & Tissue Kit kullanılmıştır.

Konvansiyonel PCR çeşitlerinde çoğalan ürünün saptanması için agaroz jel elektroforez testi kullanılır. Real-time PCR'da ise çoğalan ürünü anlık olarak izlemek mümkündür ve ayrıca jel elektroforeze gerek yoktur. Ancak pozitif örneklerden sekanslama çalışması yapılmak istendiğinde real-time primerleri yeterli olmayacağı için daha büyük bir gen bölgesi için sekans primerlerin hazırlanması ve konvansiyonel PCR'ın yapılması gerekmektedir. Klinik örneklerden; total kan, süt, kolostrum, semenden PCR çalışmalarında Proviral DNA saptanabilir. Diğer testler ile karşılaştırıldığında moleküler testlerin çok daha kısa sürmesi büyük bir avantajdır.

Bu çalışmada real-time PCR tekniğinde elektroforez görüntüsüne gerek olmadığı halde pozitifliği kanıtlamak için ve *ct* eğrilerinin primer-dimere bağlı olmadığını göstermek amacıyla elektroforez yapılmış ve pozitif bantlar izlenmiştir.

Real time ve konvansiyonel PCR testinin sensitivisinde primer seçimi çok önemlidir. Birçok araştırmacı BLV genomunun saptanmasında Viral *pol*, *env*, *gag* genlerinden seçilen primer sekanslarının normal PCR ve real-time PCR için etkili olduğu rapor edilmiştir (12, 16, 54). Bu çalışmada diğer araştırmacılar tarafından kullanılan primerler yerine konvansiyonel PCR için *env* ve real-time PCR için *pol* genine spesifik primerler, Primer3 programından seçilerek Blast ve ikincil yapıları kontrol edildikten sonra ticari firmaya sentezletirildi. Bu çalışmada, konvansiyonel PCR çalışmasında kullanılan primerler, sekanslamada da kullanılmıştır.

Bazı araştırmacılar ELISA testinin duyarlılığını ortaya koymak için PCR'ı kullanmışlar ve ELISA duyarlılığını %97 oranlarında rapor etmişlerdir (30, 48). Benzer şekilde bu çalışmada da ELISA duyarlılığı %95.8 bulunmuştur.

Son zamanlardaki çalışmalar BLV'nin tahmin edilenden yüksek oranda genetik varyasyonu olduğunu rapor etmiştir. (54, 59). BLV *env* geninin tamamı yada kısmi bölgeleriyle yapılan sekans analizleri sonucunda Güney Amerika'da 7 genotip sınıflandırılmıştır. Araştırmacılar, dünyanın bu bölgesinde birden fazla genotipin olmasını uluslararası sığır ticaretinin fazlalığıyla açıklanabileceğini bildirmişlerdir (59). Matsumuro ve ark. ise yaptıkları çalışmada *env* genine göre 8 genotip sınıflandırmış, ancak Japonya'daki genotiplerin çoğunluğunun genogrup I olduğunu bildirmişlerdir (54).

Bu çalışmada, sekans bulguları MEGA 4 programı kullanılarak analiz edildi. Ancak genogruplandırma konusunda Matsumura (54) ve Moratorio'nun (59) filogenetik ağaçlarından da yararlandı. Buna göre çalışmadaki 4 örneğin sekans bulguları sonucunda yapılan analizler, tamamının genogrup 4 olduğunu gösterdi. Bu genogrupta ayrıca gen bankasına kayıtlı Belçika, Arjantin ve Fransa'ya ait BLV suşları bulunmaktadır. Bu çalışma ülke genelinde yapıldığında farklı genogrupların saptanma olasılığı vardır. Ülkemize yakın zamanda dünyanın farklı bölgelerinden canlı hayvan ithalatının yapılması da ileride BLV enfeksiyonu ile ilgili olarak farklı genotiplerin ortaya çıkabileceği olasılığını arttırmaktadır.

Bölgede yapılan önceki çalışmalar ve bu çalışma EBL'nin Marmara bölgesinde endemik olduğunu göstermektedir. Enfeksiyonun bölgedeki eradikasyonu için maliyet fayda hesabının yapılması gerekmektedir. Enfeksiyonun korunmasına yönelik olarak birçok aşı çalışması olmasına rağmen ticari bir aşısı olmadığı için diğer ülkelerdeki eradikasyon stratejisi düzenli aralıklarla serolojik testlerin yapılması ve seropozitif hayvanların sürüden çıkartılması esasına dayalıdır. Ayrıca sürüye yeni katılacak hayvanların karantina uygulaması ve bu dönemde serolojik testlerden negatif olduğu belirlendikten sonra sürüye katılması ve son olarakta yönetsel olarak iatrojenik bulaşmanın önlenmesi eradikasyonda kullanılan yöntemlerdir (2, 42). Bazı ülkelerde bu hastalığa karşı başarılı eradikasyon çalışmaları yürütülmüştür (2, 15).

Ayrıca hastalık çoğunlukla aseptomatik seyretmekte ve bu hayvanlar aracılığı ile yayılmaktadır (18). Bu çalışmada da serolojik ve moleküler yöntemlerle saptanan pozitif hayvanlarda herhangi bir klinik semptom gözlenmemiştir. Bu durum enfeksiyonun asemptomatik hayvanlar ile yayılım olasılığını arttırdığı bilgisini doğrulamaktadır.

Sonuç olarak, EBL'nin Ülkemizdeki prevalansının tam olarak ortaya konulabilmesi için multidisipliner projelerle sadece Marmara değil tüm bölgeleri içine alacak şekilde risk analizlerini de kapsayan ve eradikasyona yönelik daha geniş çapta araştırmaların planlanması gerektiği görüşündeyiz. Bu amaçla, tarama testi olarak kolay uygulanabilirliği ve çok sayıda serumun kısa sürede incelenebileceği ELISA ve sonrada pozitif örneklerin teyid edilmesi amacıyla proviral DNA'nın saptanmasına yönelik olarak yapılan PCR tekniklerinin güvenle kullanılabiliceği görüşündeyiz.

## KAYNAKLAR

1. Abd El-Hafeiz, Y.G.M., Metias, K.N., Ibrahim, I.G.A. (2010). Comparative serological detection of enzootik bovine leukosis virus (EBLV) in cattle sera. *Global Veterinaria* 4 (3), 267-270
2. Acaite, J., Tamosiunas, V., Lukauskas, K., Milius, J., Pieskus. (2007). The eradication experience of enzootic bovine leukosis from Lithuania. *Prev. Vet. Med.* 82, 83–89
3. Agresti, A., Ponti, W., Rocchi, M., Meneveri, R., Marozzi, A., Cavelleri, D., Poli, G., Ginelli, E. (1993). Use of polymerase chain reaction to diagnose bovine leukemia virus infection in calves at birth. *Am. J. Vet. Res.* 54, 373–378.
4. Akça, Y., Alkan, F., Bilge, S., Karaoğlu, T., Özkul, A., Burgu, İ., Kaaden, O.R. (1996). Süt sığırlarının süt ve kan serumlarında enzootik sığır löykozuna (EBL) karşı antikor varlığının enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) ve agar jel immunodiffüzyon (AGID) testi ile araştırılması. *Ankara Univ. Vet. Fak. Derg.*, 43, 53-59.
5. Altaner, C., Ban, J., Alternova, V., Janik, V. (1991). Protective vaccination against bovine leukomia virus infection by means. Of cell-derived vaccine. *Vaccine*, 9, 889-895
6. Altaner, C., Bán, J., Zajac, V., Rössler, H., Rosenthal, S., Kettmann, R., Burny, A. (1985). Isolation and characterization of cell clones producing various amounts of bovine leukosis virus. *Folia Biol. (Praha)* 31(2),107-14.
7. Asfaw, Y., Tsuduku, S., Konishi, M.,Murakami, K., Tsuboi, T.,Wu, D., Sentsui, H. (2005). Distribution and super infection of bovine leukemia virus genotypes in Japan. *Arch. Virol.* 150 (3), 493–505.
8. Ballagi-Pordany, A., Klintevall, K., Merza, M., Klingeborn, B., Belak, S., (1992). Direct detection of bovine leukemia virus infection: practical applicability of a double polymerase chain reaction. *J. Vet. Med.* 39, 69–77.

9. Baron, T., Betemps, D., Mallet, F., Cheynet, V., Levy, D., Belli, P. (1998). Detection of bovine immunodeficiency-like virus infection in experimentally infected calves. *Arch. Virol.* 143, 181–189.
10. Batmaz, H., Çarlı, K.T., Kahraman, M., Çetin, C., Kennerman, E. (1995). Serological and haematological diagnosis of enzootic bovine leukosis in cattle in Turkey. *Vet. Rec.*, 136, 42-44.
11. Batmaz, H., Çarlı, K.T., Şen, A., Kennerman, E., Minbay, A., Yılma, Z., Caner, V., Baklacı, C. (1999). Güney marmara bölgesi'nde enzootik bovine leukosis'in prevalansı ve bazı bakım-yetiştirme koşullarının incelenmesi. *Turk J. Vet. Anim. Sci.*, 23, 261-268.
12. Beier, D., Blankenstein, P., Marquardt, O., Kuzmak, J. (2001). Identification of different BLV provirus isolates by PCR, RFLPA and DNA sequencing. *Berl. Munch. Tierarztl. Wschr.* 114, 252–256.
13. Brenner, J., Trainin, Z. (1989). Bovine leukosis virus-a review, with emphasis on Israeli aspects. *Isr. J. Vet. Med.*, 45 (2), 95-105
14. Brun, A., Albina, E., Barret, T., Chapman, D.A.G., Czub, M., Dixon, L. K., Keil, G.M., Klonjkowski, B., Le Potier, M.F., Libeau, G., Ortego, J., Richardson, J., Takamatsu, H.H. (2008). Antigen delivery systems for veterinary vaccine development Viral-vector based delivery systems. *Vaccine* 26, 6508–6528.
15. Brunner MA, Lein DH, Dubovi EJ. (1997). Experiences with the New York State bovine leukosis virus eradication and certification program. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 13, 143–150.
16. Bulut, H., Gülaçtı, İ., Sözdutmaz, İ. (2009). Doğal Enfekte Bir Sürüde ELISA ve Nested-PCR ile sığırların lösemi virüs enfeksiyonunun belirlenmesi. *F.Ü.Sağ.Bil.Vet.Derg.* 23 (1), 39 – 42.

17. Burgu, I., Alkan, F., Karaoglu, T., Bilge-Dagalp, S., Can-Sahna, K., Gungor, B., Demir, B. (2005). Control and eradication programme of enzootic bovine leucosis (EBL) from selected dairy herds in Turkey. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr. Jul;112(7): 271-4.*
18. Burgu, I., Urman, H.K., Kaaden, O.R., Akça, Y., Alçığır, G., Berkin, Ş., Alkan, F., Atasever, A. (1990). Türkiye’de enzootik sığır löykozu’nun seroepidemiolojisi ve patolojisi. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.*, 37, 32-45.
19. Buxton, B.A., Schultz, R.D., Collins, W.E. (1982). Rolle of insects in the transmission of bovine leukosis virus: Potential for transmission by mosquitoes. *Am. J. Vet. Res.*, 43: 1458-1459.
20. Buzala, E., Deren , W. (2003). Comparison of PLA with AGID and ELISA results in serology diagnosis of bovine leukosis. *Pol. J. Vet. Sci.* 6, 9–11.
21. Camargos, M.F., Stancek, D., Rocha, MA., Lessa, L.M., Reis, J.K.P., Leite, R.C. (2002). Partial sequencing of env gene of bovine leukaemia virus from Brazilian samples and phylogenetic analysis. *J. Vet. Med. B.*, 49, 325-331,.
22. Choi, K., Liu, R., Buehring, G. (2002). Relative sensitivity and specificity of agar gel immunodiffusion, enzyme immunosorbent assay, and immunoblotting for detection of anti-bovine leukemia virus antibodies in cattle. *J. Virol. Meth.* 104, 33–39.
23. Çabalar, M., Voyvoda, H., Sekin, S. (2001). Doğu ve güney-doğu Anadolu bölgesi’nde süt sığırlarında enzootik bovine leukozis (EBL)’in seroprevalansı. *IV. Uluslararası İç Hastalıkları Kongresi, 04-06 Temmuz 2001, Konya-Türkiye.* s:180-183.
24. Dus Santos, M.J., Trono, K., Lager, I., Wigdorovitz, A. (2007). Development of a PCR to diagnose BLV genome in frozen semen samples. *Vet. Microbiol.* 119 10–18.

25. Eaves, F.W., Molloy, J.B., Dimmock, C.K., Eaves, L.E., (1994). A field evaluation of the polymerase chain reaction procedure for the detection of bovine leukaemia virus proviral DNA in cattle. *Vet. Parasitol.* 39, 313–321
26. Fechner, H., Kurg, A., Geue, L., Blankenstein, P., Mewes, G., Ebner, D., Beier, D. (1996). Evaluation of polymerase chain reaction (PCR) application in diagnosis of bovine leukaemia virus (BLV) infection in naturally infected cattle. *J. Vet. Med. B* 43, 621–630.
27. Gatei, M.H., Good, M.F., Daniel, R.C., Lavin, M.F. (1993). T-cell responses to highly conserved CD4 and CD8 epitopes on the outer membrane protein of bovine leukemia virus: relevance to vaccine development. *J Virol.* April; 67(4), 1796–1802.
28. Gillet, N., Florins, A., Boxus, M., Burteau, C., Nigro, A., Vandermeer, F., Balon, H., Bouzar, A.B., Defoiche, J., Burny, A., Reichert, M., Kettmann, R., Luc Willems, L. Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human. 16 March 2007,. Erişim 12.08.2010, <http://www.retrovirology.com/content/4/1/18>
29. González E.T., Licursi M., Vila Roza V., Bonzo E., Mortola E., Frossard J.P., Venables C. (2008). Evidence of bovine immunodeficiency virus (BIV) infection: Serological survey in Argentina. *Res. Vet. Science* 85 353–358.
30. González, E.T., Norimine, J., Valera, A.R., Traver'ia, G., Oliva, G.A., Etcheverrigaray, M.E. (1999). A rapid and sensitive diagnosis of bovine leukaemia virus infection using the nested shuttle polymerase chain reaction. *Pesq. Vet. Bras.* 19 (2), 63–67.
31. Grover, Y.P., Guillemain, B. (1992). An immunoblotting procedure for detection of antibodies against bovine leukemia virus in cattle. *Zentralbl Veterinarmed B.* 39(1), 48-52.

32. Gutiérrez, S.E., Dolcini, G.L., Arroyo, G.H., Rodriguez Dubra, C., Ferrer, J.F., Esteban, E.N. (2001). Development and evaluation of a highly sensitive and specific blocking enzyme-linked immunosorbent assay and polymerase chain reaction assay for diagnosis of bovine leukemia virus infection in cattle. *Am. J. Vet. Res.*;62(10):1571-7.
33. Hakioglu, F. (1962). Karacabey harası sığırlarında löykosis bakımından yapılan hematolojik araştırmalara ait ilk tebliğ. *Türk. Vet. Dern. Derg.*, 186-187,167-175.
34. Heldens, J.G.M., Patel, J.R., Chanter, N., Thij, G.J., Gravendijck, M., Schijns, V.E.J.C., Langen, A, Schetters P.M. (2008). Veterinary vaccine development from an industrial perspective. *The Vet. J.* 178, 7–20
35. Hoff-Jørgensen, R. (1989). An international comparison of different laboratory tests for the diagnosis of bovine leukosis: suggestions for international standardization. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 22 (3), 293–297.
36. İyisan, A.S., Bitgel, A., Özyörük, F. (1996). İstanbul ilindeki süt sığırlarında enzootik bovine leukosisin sero epidemiyolojisi. *I.Uluslararası Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi, 25-27 Eylül, İstanbul-Türkiye.* s:34
37. Jacobs, F., Pollari, F., McNab, W., Jefferson, B.A., (1995). Serological survey of bovine syncytial virus in Ontario: association with bovine leukemia and immunodeficiency-like viruses, production records, and management practices. *Can. J. Vet. Res.* 59, 271-278.
38. Jacobs, R.M., Song, Z., Poon, H., Heeney, J.L., Taylor, J.A., Jefferson, B., Vernau, W., Valli, V.E., (1992). Proviral detection and serology in bovine leukemia virus exposed normal cattle and cattle with lymphoma. *Can. J. Vet. Res.* 56 (4), 339–348.
39. Johnson, R., Kaneene, J.B. (1992). Bovine leukaemia virus and enzootic bovine leukosis. *Vet. Bull.* 62, 286–312.
40. Kabeya, H., Ohashi K., Onuma M. (2001). Host Immune Responses in the Course of Bovine Leukemia Virus Infection. *J. Vet. Med. Sci.* 63, 703-708

41. Kahrs, R.F. (2001). Bovine Leukemia Virus and Enzootic Bovine Leukosis, Viral Diseases of Cattle, second ed. *Iowa State University Press, Ames, Iowa*, pp. 103–112.
42. Kale, M., Kale, A.S. (2005). Sığır löykozis virus (Enzootik sığır löykozu) enfeksiyonunun kontrolü, eradikasyonu ve ekonomik açıdan önemi. *Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg.* 11(2), 195-200
43. Karsavuran, Y., Pehlivan, E., Tezcan, S., Kılıç, A. Y. (2005). Notes on Tabanidae (Diptera) fauna of Turkey. *Türk. entomol. derg.*, 29 (3): 187-195
44. Kittelberger, R., Reichel, M.P., Meynel, R.M., Tham, K.M., Molloy, J.B. (1999). Detection of antibodies against the core protein p24 of the bovine leukaemia virus in cattle for confirmatory serological testing. *J. Virol. Methods*, 77(1), 109-114.
45. Klintevall, K., Ballagi-Pordany, A., Naslund, K., Belak, S., (1994). Bovine leukemia virus: rapid detection of proviral DNA by nested PCR in blood and organs of experimentally infected calves. *Vet. Microbiol.* 42, 191–204.
46. Klintevall K., Fuxler L., Fossum, C. (1997). Bovine leukemia virus: Early reflections in blood after an experimental infection of calves. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 20 (2), 119-130
47. Klintevall, K., Näslund, K., Svedlund, G., Hajdu, L., Linde, N., Klingeborn, B., (1991). Evaluation of an indirect ELISA for the detection of antibodies to bovine leukaemia virus in milk and serum. *J. Virol. Methods* 33 (3), 319–333.
48. Kobayashi, S, Tsutsui, T, Yamamoto, T, Hayama, Y, Kameyama, K, Konishi, M, Murakami, K. (2010). Risk factors associated with within-herd transmission of bovine leukemia virus on dairy farms in Japan. *BMC Vet. Res.* 7;6:1.
49. Komiyama, C., Suzuki, K., Miura, Y., Sentsui, H.J. (2009). Development of loop-mediated isothermal amplification method for diagnosis of bovine leukemia virus infection. *Virol. Methods.* 157(2),175-9.

50. Kono, Y., Sentsui, H., Miyamoto, T., Morozumi, K., Sakamoto, Y. (1982). Changes in antibody titers in cattle infected clinically and subclinically with bovine leukemia virus. *Int. J. Cancer* 30, 655–657.
51. Kuckleburg, C.J., Chase, C.C., Nelson, E.A., Marras, S.A., Dammen, M.A., Christopher-Hennings, J. (2003). Detection of bovine leukemia virus in blood and milk by nested and real-time polymerase chain reactions. *J Vet Diagn Invest.* ;15(1):72-6.
52. Legrain, M., Portetelle, D., Dumont, J., Burny, A., Hilger, F. (1989). Biochemical and immunological characterization of the bovine leukemia virus (BLV) envelope glycoprotein (gp51) produced in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 79, 227–237
53. Martin, D., Arjona, A., Soto, I., Barquero, N., Viana, M., Gomez-Lucia, E., (2001). Comparative study of PCR as a direct assay and ELISA and AGID as indirect assays for the detection of bovine leukemia virus. *J. Vet. Med. B* 48 (2), 97–106.
54. Matsumura, K., Inoue, E., Osawa, Y., Okazaki, K. (2011). Molecular epidemiology of bovine leukemia virus associated with enzootic bovine leukosis in Japan. *Virus Res.* 155(1), 343-8.
55. Miller, J.M., Van Der, M.M.J., Schmerr, M.J.F. (1983). Vaccination of cattle with binary ethylenimine-treated bovine leukemia virus. *Am J Vet Res*, 44, 64-67.
56. Mirsky, M., Olmstead, C., Da, Y., Lewin, H., (1996). The prevalence of proviral leukemia virus in peripheral blood mononuclear cells at two subclinical stages of infection. *J. Virol.* 70, 2178–2183.
57. Molteni, E., Agresti, A., Meneveri, R., Marozzi, A., Malcovati, M., Bonizzi, L., Poli, G., Ginelli, E., (1996). Molecular characterization of a variant of proviral bovine leukaemia virus (BLV). *J. Vet. Med. B* 43, 201–211.
58. Monti, G.E., Frankena, K., Engel B., Buist, W., Tarabla, H.D., de Jong, M.C. (2005). Evaluation of a new antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of bovine leukemia virus infection in dairy cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.*;17(5):451-7.

59. Moratorio, G., Obal, G., Dubra, A., Correa, A., Bianchi, S., Buschiazzo, A., Cristina, J., Pritsch, O. (2010). Phylogenetic analysis of bovine leukemia viruses isolated in South America reveals diversification in seven distinct genotypes. *Arch Virol.* 155(4),481-9.
60. Murphy, F.A., Gibbs, E.P.J., Horzinek M.C., Studdert M.J. *Vet. Virol.* United States Of America. Elsevier B.V. 1999
61. Nagy, D.W., Tyler, J.W., Kleiboeker, S.B., Stoker, A. (2003). Use of a polymerase chain reaction assay to detect bovine leukosis virus in dairy cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1;222(7), 983-5.
62. Nguyen, V.K., Maes, R.F. (1993). Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to bovine leukemia virus in serum and milk. *Clin Microbiol.* 31(4),979-81.
63. Ohishi, K., Suzuki, H., Yamamoto, T., Maruyama, T., Miki, K., Ikawa, Y., Numakunai, S., Okada, K., Ohshima K.I., Sugimoto, M. (1991). Protective immunity against bovine leukemia (BLV) induced in carrier sheep by inoculation with a vaccinia virus BLV *env* recombinant: association with cell-mediated immunity. *J General Virol.*, 72, 1887-1892
64. Orlik, O., Ban, J., Hlavaty, J., Altaner, C., Kettmann, R., Portetelle, D., Splitter, G.A. (1997). Polyclonal bovine sera but not virus-neutralizing monoclonal antibodies block bovine leukemia virus (BLV) gp51 binding to recombinant BLV receptor BLVRcp1. *J Virol.* April; 71(4) 3263–3267.
65. Otlu, S., Aydın, F., Genç, O., Güler, M.A., Gökçe, G. (2001). Kars yöresi sığırlarında bovine leukaemia virus enfeksiyonu üzerinde serolojik ve hematolojik araştırmalar. *Turk J Vet Anim Sci*, 25, 105-110.
66. Özgünlük, İ., Yıldırım, Y., Alkan, F. (2005). Güneydoğu Anadolu Projesi (GAP) kapsamındaki bölgede halk elinde yetiştirilen sığırlarda bovine leukemia virus (BLV) enfeksiyonunun seroprevalansı. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.*, 52, 109-112

67. Rice, N.R., Stephens, R.M., Burny, A., Gilden, R.V. (1985). The gag and pol genes of bovine leukemia virus: nucleotide sequence and analysis. *Virology* 142, 357–377.
68. Rice, N.R., Stephens, R.M., Couez, D., Deschamps, J., Kettmann, R., Burny, A., Gilden, R.V. (1984). The nucleotide sequence of the env gene and post-env region of bovine leukemia virus. *Virology* 138, 82–93.
69. Rodak, L., Granatova, M., Vesely, T., Nevorankova, Z. (1997). Monoclonal antibody for the demonstration by ELISA of antibodies to protein p24 of enzootic bovine leukosis virus in individual and pooled blood serum and milk samples. *J. Vet. Med. B.* 44, 425–436.
70. Rodriguez, S.M., Golemba, M.D., Campos, R.H., Trono, K., and Jones, L.R. (2009). Bovine leukemia virus can be classified into seven genotypes: evidence for the existence of two novel clades. *J Gen Virol* 90, 2788-2797.
71. Rola, M., Kuzmak, J. (2002). The detection of bovine leukemia virus proviral DNA by PCR-ELISA. *J. Virol. Methods.*;99(1-2), 33-40.
72. Rułka, J., Kubiś, P., Buzala, E., Kamiński, S., Dereń, W. (2003). The improvement of monitoring methods of cattle infection with bovine leukemia virus (BLV). *Pol. J. Vet. Sci.* 6 (3 Suppl), 40-2.
73. Sandev, N., Darinka, I., Ignat, S., Nikolina, R., Emil, I. (2006). Prevalence of enzootic bovine leukosis in the Republic of Bulgaria in 1997-2004 *Veterinarski Arhiv* 76 (3), 263-268.
74. Sandev N, Sizov I, Pandarov S, Alexandrova S, Dojchev T, Vasilev V, Tanchev T, Georgieva L. (2001). Prevalence of enzootic bovine leukosis in South-eastern Bulgaria during the period 1998-2000. *Veterinarski arhiv.* 71 (4), 215-221, 2001
75. Schoepf, K.C., Masami H.M., Hyera, J.M.K. (1997) Serological evidence of the occurrence of enzootic bovine leukosis (EBL) virus infection in cattle in Tanzania. *Trop. Anim. Health and Prod. IF:0.559* 29(1), 15-19.

76. Simard, C., Richardson, S., Dixon, P., Belanger, C., Maxwell, P. (2000). Enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of bovine leukosis: comparison with the agar gel immunodiffusion test approved by the Canadian Food Inspection Agency. *Can. J. Vet. Res.* 64, 101–106.
77. Snider, T.G., Hoyt, P.G., Coats, K.S., Graves, K.F., Cooper, R.R., Stors, R.W., Luther, D.G., Jenny, B.F., (2002). Natural bovine lentiviral type 1 infection in Holstein dairy cattle. I. Clinical serological and pathological observations. *Com. Immunol, Microbiol. and Inf. Dis.* 26, 89-101.
78. Şen, A., Ülgen, M., Çarlı, K.T., Batmaz, H. (1995). Seroprevalance of bovine leukemia virus infection in cattle slaughtered at Bursa abattoir. *Turk J Vet Anim Sci,* 19, 325-327.
79. Tajima, S., Ikawa, Y., Aida, Y. (1998). Complete Bovine Leukemia Virus (BLV) Provirus Is Conserved in BLV-Infected Cattle throughout the Course of B-Cell Lymphosarcoma Development. *J. of Virol.,* 72(9), 7569-7576.
80. Tan, M.T., Yıldırım, Y., Erol, N., Güngör, A.B. (2006) . The Seroprevalence of Bovine Herpes Virus type 1 (BHV-1) and Bovine Leukemia Virus (BLV) in Selected Dairy Cattle Herds in Aydın Province, Turkey. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 30, 353-357.
81. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı (2011, 22 Ocak). İhbarı Mecburi Hayvan Hastalıkları Ve Bildirimine İlişkin Yönetmelik. Resmi Gazete. Erişim 11.02.2011, <http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/01/20110122-4.htm>.
82. Trono, K., Perez-Filgueira, D., Duffy, S., Borca, M., Carrillo, C. (2001). Seroprevalence of bovine leukemia virus in dairy cattle in Argentina comparison of sensitivity and specificity of different detection methods. *Vet. Microbiol.* 83, 235–248.
83. United States Department of Agriculture. *Bovine Leukosis Virus (BLV) on U.S. Dairy Operations*, Animal And Plant Health Inspection Service 2007 (İnternette) 2008, Ekim. Erişim16.07.2010, [http://www.aphis.usda.gov/vs/ceah/ncahs/nahms/dairy/dairy07/Dairy07\\_is\\_BLV.pdf](http://www.aphis.usda.gov/vs/ceah/ncahs/nahms/dairy/dairy07/Dairy07_is_BLV.pdf)

84. USDA-Veterinary Services. High prevalence of BLV in U.S. dairy herds. (İnternette) 1997. Erişim 02.03.2011, <http://nahms.aphis.usda.gov/dairy/dairy96/DR96blv.pdf>
85. Usui, T., Meas, S., Konnai, S., Ohashi, K., Onuma, M. (2003). Seroprevalence of bovine immunodeficiency virus and bovine leukemia virus in dairy and beef cattle in Hokkaido. *J Vet Med Sci*, 65, 287-289.
86. Uyar, Y., Akçalı, A., Çarhan, A., Özkaya, E., Ertek, M. (2007). Türkiye’de kene ısırığı öykülü olgularda tick-borne encephalitis virüsünün seroprevalansı. *Türk hijyen ve deneysel biyoloji dergisi*, 64 (2), 21-25.
87. Uysal, A., Yılmaz, H., Bila, T., Berriatua, E., Bakirel, U., Arslan, M., Zerin, M., Tan, H. (1998). Seroprevalence of enzootic bovine leukosis in Trakya district (Marmara region) in Turkey. *Prev Vet Med*. 1998 1;37(1-4):121-8.
88. World Organization for Animal Health (OIE). *Enzootic bovine leucosis*. Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals. Part 2. Section 2.3. Chapter 2.3.4. (İnternette) 2004 Erişim 03.08.2010, [http://www.oie.int/fr/normes/mmanual/A\\_00055.htm](http://www.oie.int/fr/normes/mmanual/A_00055.htm)
89. World Organization for Animal Health (OIE). *Enzootic bovine leucosis*. Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals (mammals, birds and bees). Vol. 2. Chapter 2.4.11. 729–738. (İnternette) 2008 Erişim 12.07.2010, <ftp://ftp.oie.int/imprimeur/OLD%20divers/TERRESTRIAL%20MANUAL%202008/Volume2.pdf>
90. World Organization for Animal Health (OIE). *Prescribed and alternative diagnostic tests for OIE listed diseases*. Chapter 1.3. (İnternette) 2010 Erişim 04.08.2010, [http://www.oie.int/eng/normes/mcode/en\\_chapitre\\_1.1.3.pdf](http://www.oie.int/eng/normes/mcode/en_chapitre_1.1.3.pdf)
91. Wrathall, A.E., Simmons, H.A., Van Soom, A. (2006). Evaluation of risks of viral transmission to recipients of bovine embryos arising from fertilisation with virus-infected semen. *Theriogenology*. 20;65(2),247-74.

92. Yılmaz, K., Gül, Y., Bolat, Y., Özdemir H. (1995). Elazığ ve çevresindeki sığırlarda Enzootik Bovine leukemia virus sığır löykozunun araştırılması. I.Veteriner İç Hastalıkları Kongresi, 28-30 Eylül 1995,Elazığ. s:38
93. Zaghawa, A., Beier, D., Abd El-Rahim I.H.A., El-Ballal, S., Karim, I., Conraths, F.J., Marquardt, O. (2002). An outbreak of enzootic bovine leukosis in upper Egypt: Clinical, laboratory and molecular-epidemiological studies. *J. Vet. Med. B.*, 49, 123-129.

## ETİK KURUL KARARI



T.C  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU




Sayı: 16


13.02.2008


Sn. Doç. Dr. Nuri Turan, İ. Ü. Veteriner Fakültesi,

Karar No: 10  
Başvuru Tarihi: 11.02.2008

Sorumluluğunu üstlendiğiniz, Vet. Hek. Hasan Değirmenci'ye ait "Enzootik Bovine Leukosis virus enfeksiyonunun Marmara bölgesinde serolojik ve moleküler yöntemler ile araştırılması" isimli proje Kurulumuz tarafından incelenmiş ve Etik Kurul İlkelerine uygun bulunmuştur.

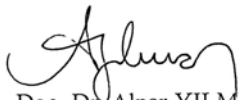
  
Prof. Dr. Mehmet KAYA  
İ. Ü. HADYEK Başkanı


  
Prof. Dr. Müjdat UYSAL  
Üye


  
Prof. Dr. Nuriye AKEV  
Üye

Prof. Dr. Gülderen ŞAHİN  
Üye (22p-10)

Prof. Dr. Cüneyt K. ORAL  
Üye

  
Doç. Dr. Alper YILMAZ  
Üye

  
Uzm. Vet. Hek. Fatma TEKELİ  
Üye

  
Avukat Saniye ALTUN  
Üye

  
Mak. Müh. Seyfettin AVCI  
Üye

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

<b>Adı</b>	Hasan	<b>Soyadı</b>	Değirmenci
<b>Doğ.Yeri</b>	İstanbul	<b>Doğ.Tar.</b>	05.01.1978
<b>Uyruğu</b>	Türkiye Cumhuriyeti	<b>TC Kim No</b>	10868378180
<b>Email</b>	hasdeg@yahoo.com	<b>Tel</b>	0535 3585868

### Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
<b>Doktora</b>		
<b>Yük.Lis.</b>	İstanbul Üni. Veteriner Fakültesi	2003
<b>Lisans</b>	İstanbul Üni. Veteriner Fakültesi	2003
<b>Lise</b>	Yeşilköy 50. Yıl Lisesi	1995

### İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Veteriner Hekim	Firuzköy Veteriner Kliniği	2006- devam
2.	Veteriner Hekim	Avcılar Belediyesi	2005-2006
3.	Veteriner Hekim	Asya Veteriner Kliniği	2004-2005

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	İyi	İyi	İyi	63.750	-

\*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
<b>LES Puanı</b>	55.559	58.414	61.269
<b>(Diğer) Puanı</b>			

### Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
MS Office	İyi

### Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

**Özel İlgi Alanları (Hobileri):** Gazete okumak, müzik dinlemek, sinemaya gitmek.