T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TÜRKİYE'NİN DOĞUSUNDA SİRKÜLE OLAN BOVİNE VİRAL DİARRHEA VİRUS SUŞLARININ GENETİK KARAKTERİZASYONU

Biyolog Fatima ABOUNAAJA
VETERİNERLİK MİKROBİYOLOJİSİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Ali Rıza BABAOĞLU

VAN-2023

T.C.

VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TÜRKİYE'NİN DOĞUSUNDA SİRKÜLE OLAN BOVİNE VİRAL DİARRHEA VİRUS SUŞLARININ GENETİK KARAKTERİZASYONU

Biyolog Fatima ABOUNAAJA

VETERİNERLİK MİKROBİYOLOJİSİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi Ali Rıza BABAOĞLU

VAN-2023

Bu araştırma, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TYL-2023-10454 No'lu proje olarak desteklenmiştir.

KABUL VE ONAY

ETİK BEYAN

T.C.

VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum "Türkiye'nin Doğusunda Sirküle Olan Bovine Viral Diarrhea Virus Suşlarının Genetik Karakterizasyonu" başlıklı tezim; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir. Bu tezdeki bütün bilgiler akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak hazırlanıp, bu kural ve ilkeler gereği, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce ve sonuçlara atıf yapılmış ve kaynak gösterilmiştir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Adı Soyadı: Fatima ABOUNAAJA

Tarih: 25/12/2023

İmza

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans öğrenimim boyunca danışmanlığımı yürüten, bana bu konuda çalışma fırsatı veren, çalışmanın her aşamasında bilgi, tecrübe ve önerilerinden yararlandığım danışman hocam sayın ***Dr. Öğr. Üyesi Ali Rıza BABAOĞLU****'na* sonsuz teşekkürlerimi sunarım, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. İsmail HAKKI EKİN'e ve Anabilim Dalı'nda bulunan tüm hocalarıma teşekkür ediyorum.

Hayatım buyunca ve Türkiye'de eğitim çalışmalarım esnasında büyük fedakârlıklarda bulunan, bana olan inancını ve manevi desteğini esirgemeyen değerli annem *Fadma OUABOU*, babam *Almahjoub ABOUNAAJA* ve kardeşlerim *Moustapha, Rachid, Meryem, Ibrahim* ve *Khadija'*ye teşekkürlerimi borç bilirim.

Bu süreçte benden hiçbir desteğini esirgemeyen çok değerli arkadaşlarım Salma Bouye, Mohamed Ait Cheikh, Rabia Çelik, Lamiae Bouhandiya, Jihane Atifi, Tuba Nur Ervas, Nuran Sular ve Zeynep Özçelik'e gönülden teşekkür ederim.

ÖZET

ABOUNAAJA F., Türkiye'nin Doğusunda Sirküle Olan Bovine Viral Diarrhea Virus Suşlarının Genetik Karakterizasyonu, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı (Veteriner Programı), Yüksek Lisans Tezi, Van, 2023. Bovine viral diarrhea virus (BVDV) enfesiyonu dünya çapında sığırlarda yaygın olarak görülen; et, süt ve reprodüktif performans kayıplarına neden olan bir enfesiyondur. BVDV'nin dünya genelinde BVDV-1, BVDV-2 ve HoBi-like pestivirus (BVDV-3) olarak üç genotipi tanımlanmşıtır. Türkiye'de BVDV enfeksiyonun varlığı 1990'lardan beri bildirilmekte fakat şu ana kadar zorunlu bir aşılama programı uygulanmamıştır. Bu çalışmanın amacı, Türkiye'nin Doğu Anadolu bölgesinde yer alan Van, Ağrı ve Iğdır illerindeki sığırlardan alınan kan, nasal/vajinal sıvap ve abort materyallerinde BVDV'nin genetik çeşitliliğinin belirlenmesidir. Bu amaçla 6 aylık yaşın üzerinde 80 adet BVDV şüphesi olan sığırdan alınan toplam 110 adet örnek pestivirusların 5'UTR, autoprotease (Npro) ve E2 gen bölgelerini kodlayan primeler kullanılarak One Step RT-PCR ile test edildi. RT-PCR sonucunda pestivirus 5'UTR nükleik asit pozitiflik oranı %21.81, Npro nükleik asit pozitiflik oranı %9.1 ve E2 gen bölgesine yönelik pozitiflik tespit edilmemiştir. RT-PCR'da elde edilen pozitif amplikonlardan 12 hayvana ait 14 izolatın DNA dizin analizi ve filogenetik analizi sonucunda tamamı BVDV-1 genotip olarak belirlenmiştir. Dizinlerin 5'UTR gen bölgesinin filogenetik analizi sonucunda BVDV-1e (n = 3), BVDV-1a (n = 1) BVDV-1b (n = 2), BVDV-1l (n=1) ve BVDV-1d (n = 1) tanımlanırken; N pro gen bölgesine dayalı filogenetik analiz sonrasında BVDV-1b (n = 3), BVDV-1a (n = 2) ve BVDV-1f (n = 1) tespit edilmiştir. Bu çalışmada, BVDV'nin genital ve solunum sistemi problemlerindeki rolünün önemi bir kez daha vurgulanmış ve sürü taramalarında göz ardı edilmemesi kanaatine varılmıştır. Türkiye'de ve dünya çapında BVDV genetik çeşitliliğinin belirlenmesi; koruma-kontrol ve eradikasyon stratejilerin tasarlanması ve oluşturulmasında özellikle aşılamayı içeren programların önemi bir kez daha ortaya konulmuştur.

Anahtar Sözcükler: *Bovine viral diarrhea virus, Filogenetik Analiz, Sığır, Türkiye*.

ABSTRACT

ABOUNAAJA F., Genetic Characterization of Bovine Viral Diarrhea Virus Isolates Circulating in the East of Türkiye, Van Yüzüncü Yıl University, Institute of Health Sciences, Department of Microbiology (Veterinary Program), Master Thesis, Van, 2023. Bovine viral diarrhea virus (BVDV) infection is detected in cattle populations worldwide; It is an infection that causes meat, milk, and reproductive performance losses. Three genotypes of BVDV have been identified worldwide: BVDV-1, BVDV-2, and HoBi-like pestivirus (BVDV-3). The presence of BVDV infection in Turkey has been reported since the 1990s, but no mandatory vaccination program has been implemented so far. The aim of this study is to determine the genetic diversity of pestiviruses in blood, nasal/vaginal swabs, and abortion materials taken from cattle in Van, Ağrı, and Iğdır provinces in the Eastern Anatolia region of Turkey. For this purpose, a total of 110 samples taken from 80 BVDV-suspected cattle over 6 months of age were tested with one-step RT-PCR using primers encoding the 5'UTR, autoprotease (Npro), and E2 gene regions of pestiviruses. As a result of RT-PCR, the pestivirus 5'UTR nucleic acid positivity rate was 21.81%, the Npro nucleic acid positivity rate was 9.1%, and no positivity for the E2 gene region was detected. In the result of DNA sequence analysis and phylogenetic analysis of 14 isolates from 12 animals among the positive amplicons obtained in RT-PCR, all of them were determined to be of the BVDV-1 genotype. In the phylogenetic analysis of the 5'UTR gene region of the sequences, BVDV-1e (n = 3), BVDV-1a (n = 1), BVDV-1b (n = 2), BVDV-1l (n = 1), and BVDV-1d (n = 1) were defined. So phylogenetic analysis based on the N pro gene region was determined as BVDV-1b (n = 3), BVDV-1a (n = 2), and BVDV-1f (n = 1. In this study, the importance of the role of BVDVs in genital and respiratory system problems is once again emphasized, and it is concluded that it should not be ignored in herd screening. The determination of BVDV genetic diversity in Turkey and worldwide is important in designing and creating protection-control and eradication strategies, especially in programs that include vaccination.

Keywords: *Bovine viral diarrhea virus, Phylogenetic Analysis, Cattle, Türkiye.*

İÇİNDEKİLER

Kabul Ve Onay II
Etik Beyan..... III
Teşekkür..... IV
Özet..... V
Abstract..... VI
İçindekiler..... VII
Simgeler Ve Kısaltmalar..... IX
Şekiller Listesi XI
Tablolar Listesi XII
1.GİRİŞ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1. Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) Enfeksiyonu……..3
2.1.1. Tarihçe……..3
2.1.2. Etiyoloji……..…….4
2.1.3. Viral genom 5
2.1.4. Genetik çeşitliliği……7
2.1.5. Epidemiyoloji 7
2.1.6. Patogenez..... 8
2.1.7. Akut enfeksiyon..... 8
2.1.8. Persiste enfeksiyon ve mukozal hastalık (MD) 9
2.1.9. Klinik semptomlar 10
2.1.10. Teşhis……11
2.1.11. Antiviral immünite..... 11
2.1.12. Koruma ve kontrol..... 12
3. GEREÇ VE YÖNTEM..... 14
3.1. Gereç……..…….14
3.1.1. Örnekleme işlemi……...14
3.1.2. Marazi materyaller……..14
3.1.3. Pozitif kontroller..... …15

3.2. Yöntem…….....16
3.2.1. Marazi materyallerin hazırlık işlemleri……..…16
3.2.2. Ekstraksiyon ve konvansiyonel RT-PCR 17
3.2.3. PCR ürünlerinin görüntülenmesi ve saflaştırılması..... 19
3.2.4. Viral genomun kısmı dizin analizi..... 20
3.2.5. Filogenetik analiz 21
4. BULGULAR..... 22
4.1. RT-PCR Sonuçları ……22
4.1.1. Pestivirus 5'UTR gen bölgesinin nükleik asit tespiti…….....22
4.1.2. Pestivirus Npro gen bölgesinin nükleik asit tespiti ……...….23
4.2. Dizin Analizi ve Filogenetik Analiz Sonuçları…….…….24
5. TARTIŞMA VE SONUÇ……28
KAYNAKLAR……..……..33
ÖZGEÇMİŞ…….....41
EK 1. Etik Kurul Raporu……42
EK-2. Tez Orijinallik Formu……...43

SİMGELER VE KISALTMALAR

BVDV : Bovine Viral Diarrhea Virus

VD : Viral Diarrhea

MD : Mucosal Disease (mukozal hastalığı)

PI : Persiste Enfekte

CSFV : Classical Swine Fever Virus

BDV : Border Disease Virus (Sınır Hastalığı virusu)

CT : Congenital Tremor

Cp : Sitopatojen

NCp : non-Sitopatojen

UTR : Untranslated Region

Kb : Kilobaz

kDa : Kilodalton

% : Yüzde

°C : Derece Celcius

ORF : Open Reading Frame

PCR : Polymerase Chain Reaction

Npro : N terminal autoprotease

E2 : Envelope glycoprotein

RNA : Ribonükleik Asit

DNA : Deoksiribonükleik Asit

Bp : Baz Pair (Baz Çifti)

EDTA : Etilendiamin Tetraasetik Asit

ELISA : Enzyme Linked Immunosorbent Assay

MgCl2 : Magnezyum Klorür

ml : Mililitre

PBS : Phosphate Buffered Saline

rpm : Revolutions per Minute

RT : Reverse Transcription

SN : Serum Nötralizasyon

Vİ : Virus İzolasyonu

SNT : Serum Nötralizasyon Testi

CD4+ : Cluster of differenciation 4+

CD8+ : Cluster of differenciation 8+

IFN : Interferon

PK : Pozitif Kontrol

NK : Negatif Kontrol

M : Marker/Merdiven

cDNA : complementary DNA

dNTP : desoksiribonükleotit trifosfat

ddNTP : dideoksi NTP

TAE : Tris Asetat-Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid

UV : Ultra Viyole

µg : Mikrogram

µl : Mikrolitre

NCBI : National Center Biotechnology Information

Blast : Basic Local Aligment Search Tool

MEGA : Molecular Evolutionary Genetics Analysis software

ML : maximum likelihood

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Pestivirusların Morfolojik Yapısı…….5
Şekil 2. BVDV Genom Organizasyonun Şematik Görüntüsü……..5
Şekil 3. PI Hayvanlarda Virus Bulaşması…… 9
Şekil 4. Sığırlarda BVDV-MD Ve Persiste Enfeksiyon Arasındaki İlişkinin Şematik Görünümü……... 10
Şekil 5. BVDV'ye İlişkin Önerilen Genel Koruma Kontrol Modelinin Şematik Gösterimi……...……..13
Şekil 6. Doğu Anadolu Bölgesinin Coğrafi Haritası…….. 14
Şekil 7. Pestivirus 5'UTR Gen Bölgesine Yönelik Nükleik Asit Tespiti İçin Kullanılan Pozitif Kontrol (288bp)…….. 15
Şekil 8. Pestivirus Npro (BD1-BD3) Gen Bölgesine Yönelik Nükleik Asit Tespiti İçin Kullanılan Pozitif Kontrol (429bp). ……..16
Şekil 9. Sanger Dizileme Yönteminin Aşamalarının Şematik Gösterimi...…….. 20
Şekil 10. Pestivirus 5'UTR Nükleik Asit Tespitinde RT-PCR Sonuçlarının Jel Görüntüsü (288bp)……..…….22
Şekil 11. Pestivirus Npro Genine Yönelik Nükleik Asit Tespitinde Amplikonların Jel Görüntüsü (429bp)…….. 23
Şekil 12. Pestivirus Nükleotid Dizisinin 5'UTR Genine Dayanarak Oluşturulan Filogenetik Ağaç……..26
Şekil 13. Pestivirus Nükleotid Dizisinin Npro Genine Dayanarak Oluşturulan Filogenetik Ağaç……..27

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1. Flaviviridae Ailesi Pestivirus Genusunda Yer Alan Viruslar….....3

Tablo 2. BVDV'nin Yapısal Protein (SP), Yapısal Olmayan Proteinleri (NSP) Ve Özellikleri……..6

Tablo 3. Virolojik Kontrol Amacıyla Alınan Örneklerin İl Ve Örnek Bazında Dağlımı……15

Tablo 4. RT-PCR Testinde Kullanılan Primer Dizinleri Ve Özellikleri…….17

Tablo 5. RT-PCR Panpestivirus-BVDV 5'UTR Gen Bölgesi Çoğaltmak Amacıyla Kullanılan Karışım Bileşenleri Ve Programı……...18

Tablo 6. Npro Gen Bölgesini Çoğaltmak Amacıyla Kullanılan Karışım Bileşenleri Ve Programı……..18

Tablo 7. RT-PCR BVDV-E2 Gen Bölgesini Çoğaltmak Amacıyla Kullanılan Karışım Bileşenleri Ve Programı……..19

Tablo 8. Pestivirus 5'UTR, Npro Ve E2 Gen Bölgesine Yönelik RT-PCR Testine Alınan Örnekler Ve Sonuçları…….....24

Tablo 9. Bu Çalışmadaki 5'UTR Kısmı Gen Bölgesi Dizinlere İlişkin Bilgiler Ve Gen Bankası Erişim Numaraları…….24

Tablo 10. Bu Çalışmadaki Npro Kısmı Gen Bölgesi Dizinlere İlişkin Bilgiler Ve Gen Bankası Erişim Numaraları…….25

1.GİRİŞ

Viral hastalıklar, modern sığır endüstrisinde önemli ekonomik ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Bu virusların solunum, sindirim, fertilite ve reprodüktif üzerindeki potansiyel etkisi genellikle ciddiye alınmamaktadır. Virus ailelerinde Flaviviridae ailesindeki yer alan virusların önemli bir bölümü artropodlar aracılığıyla ve diğer bölümü ise vertikal ya da horizontal olarak bulaşmakta ve veteriner hekimlik ve insan sağlığı açısından önemli enfeksiyonlara yol açmaktadır. Sığırlarda solunum, sindirim ve genital sistem enfeksiyon olgularında en yaygın olarak görülen viruslardan bir tanesi *Pestivirus* genusunda yer alan Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) enfeksiyonudur (Doğan ve Bilge Dağalp., 2017; Babaoğlu, 2021).

BVDV enfeksiyonu, ağırlıklı olarak sığırlarda görülmekte ve yapılan araştırmalar BVDV'nin görüldüğü ülkelerde önemli kayıplar ve sığır yetiştiriciliğnde ciddi sağlık sorunlarının olduğunu göstermektedir (Solis Calderon ve ark., 2005; Selvaraj ve ark., 2007; Ghazi ve ark., 2008). Virus doğrudan direkt temasla veya enfekte hayvanların vücut sıvıları yoluyla sağlıklı hayvanlara bulaşmaktadır. Virusun virülensi ve biyotipine bağlı olarak bazı enfekte hayvanlar asemptomatik ve bazılarında ise çok ağır semptomlar oluşmaktadır. Bu belirtiler arasında yaygın olarak hemorhajik sendrom, diyare, ateş, burun akıntısı, göz yaşı akıntısı, abortlar ve solunum problemleri yer almaktadır (Baker, 1995). Enfeksiyon ayrıca sindirim, solunum ve reprodüktif organlarda doku bozukluklarına, bağışıklık sisteminin baskılanmasına, şiddetli diyareye, mukozal hastalığa (MD), gebe sığırlarda abortusa, yeni doğanlarda malformasyonlara, konjenital anomali doğumlara ve yeni doğan ölümlerine neden olmaktadır (Greiser-Wilke ve ark., 2003; Yıldırım ve Burgu, 2005; Rodning ve ark., 2010; Kameyama ve ark., 2016).

BVDV, akut enfeksiyonu takiben persiste enfekte (PI) buzağı doğumları ile diğer sağlıklı hayvanlara risk oluşturmaktadır. PI hayvanlar virusa karşı antikor geliştirmez fakat vücut sıvıları aracılığıyla sürekli olarak etrafa virus saçarlar. Bu sebeple, BVDV'nin kontrolü ve yayılmasının önlenmesi için aşılama ve kontrol

programlarının uygulanması önem arz etmektedir. Ayrıca, PI hayvanların doğru ve hızlı tespiti ve ayıklanması oldukça önemlidir. (Yazıcı ve ark., 2012; Babaoğlu, 2021; Yıldız ve Babaoğlu, 2022).

Türkiye'de BVDV enfeksiyonun varlığı ve sığılarda ciddi sağlık sorun oluşturdoğu ve buna bağlı olarak ekonomik kayıplara neden olduğu birçok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir (Burgu ve ark 1987, Alkan ve Burgu 1993, Burgu ve Özkul 1993). Türkiye'nin doğu bölgesi hayvancılığın yoğun olarak yapıldığı ve hayvansal ürünlerin büyük çapta üretildiği bir yer olması nedeniyle söz konusu etkene yönelik ve koruma-kontrol tedbirlerinde kullanılacak aşı molekülünün antijenik özelliklerinin belirlenmesi oldukça önemlidir. Son zamanlarda, Van bölgesindeki sığırlarda viral abort etkenlerin tespitine yönelik virolojik ve moleküler olarak yapılan bir çalışmada, abort vakalarında pestivirus nükleik asit varlığı %41.73 olarak belirlenmitir (Yıldız & Babaoğlu, 2022). Böylelikle bölgede BVDV enfeksiyonun varlığı ortaya konulmuş fakat etkene yönelik herhangi bir moleküler analiz ve genotipik çalışma bulunmamaktadır. Bu bilgiler ışığındsa yapılan bu çalışma ile saha koşullarında BVDV klinik belirtileri görülen sığırlardan alınan marazi materyallerde bovine pestiviruslarına yönelik moleküler tanı tespit, pozitif örneklerde dizin analizi ve filogenetik analizi yapılmıştır. BVDV'nin solunum ve genital sistem problemlerinde varlığının ve rolünün belirlenmesinin yanı sıra BVDV izolatlarının moleküler genetik karakterizasyonu ve tiplendirilmesinin yapılması bu çalışmanın öncelikli hedefini oluşturmaktadır. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda Türkiye'nin Doğu Anadolu bölgesinde yer alan Van, Ağrı, Iğdır illerinde sirküle olan BVDV'lerin genotipleri ve alt grupları belirlenmiş olup, sığır işletmelerinde aşılamayı içeren kontrol eradikasyon stratejilerin tasaralanması ve oluşturulması açısından önem kazanmıştır. Bir aşının koruma-kontrol programlarında başarılı ve etkili olabilmesi için saha ve yerel viruslarından oluşan antijenik bileşenlerin dahil edilmesi göz ardı edilmemelidir.

2. GENEL BİLGİLER

Büyükbaş hayvanlarda görülen solunum, sindirim ve genital sistem enfeksiyonlarında pestivirusların önemli bir paya sahip olduğu ve bunlardan ağırlıklı olarak sığırlarda enfeksiyona neden olan Bovine Viral Diarrhea Virusularıdır. *Pestivirus* genusunda yer alan viruslar Tablo 1'de özetlenmiştir.

Tablo 1. *Flaviviridae* ailesi *Pestivirus* genusunda yer alan viruslar (Simmonds ve ark, 2017).

Aile/Genus	Virus	Hastalık
Flaviviridae/ *Pestivirus*	*Pestivirus A*; Bovine Viral Diarrhea Virus 1 (BVDV-1)	Bovine Viral Diarrhea (BVD) ve Mukozal Hastalığı (MD)
	Pestivirus B; Bovine Viral Diarrhea Virus 2 (BVDV-2).	Bovine Viral Diarrhea (BVD) ve Mukozal Hastalığı(MD)
	Pestivirus C; Classical Swine Fever Virus (CSFV).	Klasik Domuz Vebası
	Pestivirus D; Border Disease Virus (BDV).	Sınır Hastalığı
	Pestivirus F; Bungowannah Virus.	Domuzlarda reprodüktif problemler
	Pestivirus H; Hobi-like pestivirus (BVD-3).	Bovine Viral Diarrhea (BVD) ve Mukozal Hastalığı (MD)
	Pestivirus K; Atypical Porcine Pestivirus.	Yeni doğan domuz yavrularının Congenital tremor (CT) sendromu

2.1. Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) Enfeksiyonu

2.1.1. Tarihçe

BVDV enfeksiyonu sığırlarda abort, konjenital anomaliler, persiste enfeksiyon, diyare ve ani ölümlere neden olan ve sığır işletmelerinde ekonomik kayıplara yol açan bir viral enfeksiyondur. Bu enfeksiyon 1946 yılında ilk kez tanımlanmıştır (Olafson ve ark., 1946). Enfeksiyon akut seyirli, şiddetli diyare ve bulaşıcı bulgularla ortaya çıktığı için Viral Diarrhea (VD) olarak adlandırılmıştır (Goens Denise, 2002; Reichel ve ark, 2008). BVDV'nin öldürücü formu ise Ramsey ve Chivers tarafından Mukuzal Hastalık (MD) olarak tanımlanmıştır (Ramsey ve Chivers., 1953).

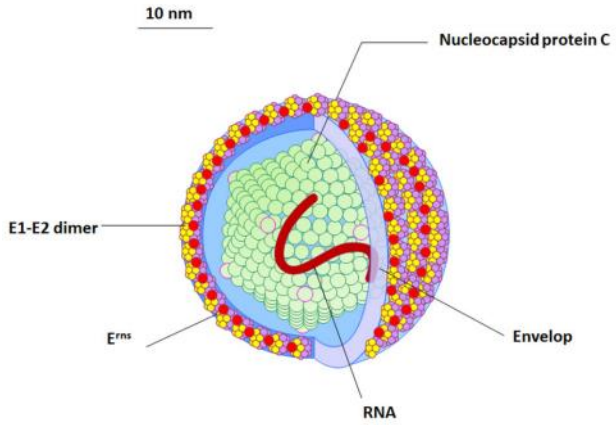
Hücre kültürülerinde yapılan çalışmalara göre; sitopatojen (cp) BVDV suşu 1957 yılında Mukozal hastalığı teşhisi konulan bir sığırdan ve sitopatojen olmayan

(ncp) BVDV suşu 1960 yılında Viral Diarrhea görülen sığırdan izole edilmiştir. İlk canlı BVDV aşısı 1961 yılında uygulanmış ve 1973 yılında PI hayvanlarda immunotolerans tanımlanmıştır. Virusun ful genom dizini 1988 yılında yapılmıştır (Goens DS, 2002; Tütüncü, 2016). BVDV üzerine 1960 ve 1970 yılları arasında yapılan araştırmalar, domuzlardaki Klasik Domuz Vebası (Hog Cholera) virusu ve koyunlardaki Border Disease (BD) virusları ile aynı genusun içerisinde olduğunu ortaya koymuştur (Darbyshire, 1962). Daha sonra "*Flaviviridae*" familyasının "*Pestivirus*" genusunda sınıflandırılmıştır (Heinz ve ark., 2000). 1993 yılında akut BVDV enfeksiyonun ilk kez tanımlanmasının ardından 1994 yılında BVDV-2 genotipi tespit edilmiştir (Goens, 2002; Tütüncü, 2016). Türkiye'de ise BVDV enfeksiyonu ilk kez 1964 yılında kültür ırkı ineklerinde görülen klinik hastalık semptomlarına göre tespit edilmiştir (Öncül ve ark., 1964).

2.1.2. Etiyoloji

BVDV, *Flaviviridae* ailesinin *Pestivirus* genusunda yer almaktadır. BVDV-1, BVDV-2 ve BVDV-3 olarak 3 farklı genotip ile birlikte aynı genus içerisinde Avrupa domuz vebası virusu (Classical Swine Fever Virus) ve border disease virusu (BDV) yer almaktadır (Perrin ve ark., 1994; Timurkan ve Aydın, 2019). BVDV, ikozahedral simetrili, pozitif polariteli, tek iplikli, 5'-3' Untranslated Region (UTR) ile çevrelenmiş, yaklaşık 12.3-12.5 kb uzunluğunda genoma sahip ve zarflı bir RNA virusudur (Şekil 1) (Ridpath JF, 2005).

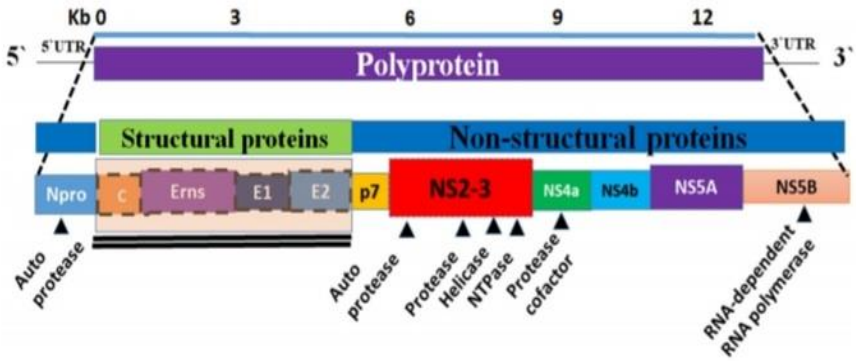
Virionu çevreleyen pleomorfik yapıdaki lipid tabakasının olması BVDV'yi diğer pestiviruslardan ayıran bir özelliktir (Ridpath, 2010). Virus 50-120 nm çapında viral partiküle sahip ve dört yapısal proteinden oluşmakla birlikte (C, Erns, E1 ve E2) RNA'yı korumaktadır. Viral zarf, konakçıya giriş için gerekli olan önemli E1-E2 heterodimerlerini bulundurmakta ve yaklaşık 449 kDa molekül ağırlığındadır. Virus pH, sıcaklık, eter ve kloroformdan kolaylıkla etkilenmektedir. 37°C'de 46 dakikada veya 56°C'de 35 dakika içerisinde inaktif olmaktadır (Murphy ve ark., 1999; Kahrs, 2001).



Şekil 1. Pestivirusların morfolojik yapısı (Al-Kubati ve ark., 2021).

2.1.3. Viral genom

BVDV genomunun 5'UTR bölgesi 360-390 nükleotidden oluşmakta ve 3'UTR bölgesi 200-240 nükleotidden oluşmaktadır (Ridpath, 2005). Viral genom 4000 amino asidin kodlanabildiği bir açık okuma bölgesi (ORF) içermektedir. ORF bölgesinden tek bir poliprotein kodlanmakta ve replikasyon sırasında proteolitik kesim enzimleri ile bu poliproteinden yapısal proteinler (Npro, C, Erns, E1, E2) ve yapısal olmayan proteinler (p7, NS2/3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B) meydana gelmektedir (Şekil 2 ve Tablo 2) (Collett ve ark., 1988, Vilcek ve ark., 2004; Tautz ve ark., 2003). Pestiviruslar arasında 5'UTR bölgesi korunan motifler içerdiği için PCR çalışmalarında en çok tercih edilen bölgedir. Bununla birlikte Npro ve E2 gen bölgeleri de aynı amplifikasyon amacıyla kullanılmaktadır (Yeşilbağ ve ark., 2008; Mingala ve ark., 2009).



Şekil 2. BVDV genom organizasyonun şematik görüntüsü. Viral genomu uzun bir poliproteini kodlar. Sekiz yapısal olmayan protein (Npro, p7, NS2, NS3, Ns4a, NS4b ve NS5b) ve dört yapısal proteinden (C, Erns, E1 ve E2) oluşmaktadır (Al-Kubati ve ark., 2021).

Tablo 2. BVDV'nin yapısal protein (SP), yapısal olmayan proteinleri (NSP) ve özellikleri (Ridpath, 2005).

Viral Protein	Büyüklüğü (kilodalton)	Özellik	Fonksiyon
Npro (p20)	20	NSP	Otoproteaz (RNA replikasyonunda önemli değildir)
C (p14)	14	SP	Nükleokapsidi oluşturur
Erns (gp48)	48	SP	Zarf glikoproteini ve Ribonükleaz aktiviteye sahiptir
E1	25	SP	Zarf glikoproteini ve integral membran proteinidir
E2 (gp53)	53	SP	Zarf glikoproteini, İntegral membran proteini İmmunodominant yapısal protein
p7	7	NSP	Fonksiyonu tanımlanmayan ve enfektif virus üretiminde görev almaktadır
NS2/3	125	NSP	RNA helikaz aktivitesi ve N terminal proteaz bölgeleri içermektedir
NS2 (p54)	54	NSP	Zinc-finger-like benzeri yapıya sahiptir
NS3 (P80)	80	NSP	RNA helikaz aktivitesi ve N terminal proteaz bölgeleri içermektedir
NS4A	7.2	NSP	Proteaz yardımcı faktörü
NS4B	38-39	NSP	Replikaz bileşeni
NS5A	55-56	NSP	Replikaz bileşeni
NS5B	81-82	NSP	RNA bağımlı RNA polimeraz

NS2/3 proteinleri bakımından, BVDV biyotiplerinin arasında farklılık tespit edilmiştir. Ncp-BVDV suşlarında rastlanan NS2/3 proteini, cp suşlarda NS2 ve NS3 olmak üzere iki farklı protein olarak belirlenmiştir. Ayrıca, NS3 proteinin RNA replikasyonunda rol üstlendiğini de bildirilmiştir (Behrens ve ark., 1998).

2.1.4. Genetik çeşitliliği

Dünya genelinde BVDV genotipleri; BVDV-1 ve BVDV-2 olarak iki genotipe ayrılmaktadır. Ancak, son zamanlarda HoBi-like pestivirus (BVDV-3) olarak adlandırılan yeni bir BVDV genotipi de tanımlanmıştır (Mishra ve ark., 2014). BVDV'nin her iki genotipinin (BVDV-1 ve 2) in-vitro sistemlerde cp ve ncp olarak iki farklı biyotipi vardır (Depner ve ark., 1992). Cp-BVDV suşları hücre kültüründe yuvarlaklaşma, büzüşme, çekirdek hiperkromazisi ve DNA fragmantasyonu nedeniyle apoptozise yol açmaktadır. Cp biyotipleri, mukozal hastalık (MD) formu ile ortaya çıkarkan, ncp biyotipleri hayvanlarda PI'ye neden olmaktadır (Schweizer ve ark., 2006). Monoklonal antikorlar ve moleküler genetik bazında yapılan araştırmalarda BVDV-1 genotipi içerisinde 18 alt grup (BVDV1a-1r) tanımlanmışken, BVDV-2 genotipinde 4 alt grub (BVDV2a-2d) tespit edilmiştir (Giangaspero ve ark., 2008; Mishra ve ark., 2014).

2.1.5. Epidemiyoloji

Pestiviruslar büyükbaş ruminantlarda doğal konakçı olarak bilinse de, domuz, koyun, keçi, bizon, geyik ve deve gibi hayvanların da duyarlı oldukları görülmüştür (Kirchgessner ve ark., 2013). BVDV'nin bulaşması hayvanlar arasında genellikle horizontal şeklinde olup sekresyonlar (gözyaşı, tükürük, gaita, abort materyali, kontamine yemler, süt, vektörler) yolu ile bulaşabilmektedir. Virusun vertikal bulaşmasınd; gebelik döneminde anneden fetüse geçtiğinde yavruda malformasyonlar, persiste enfeksiyonlar ve abortlara neden olabilmektedir. PI hayvanlar kilinik belirti göstermeden virusun bulaşmasında önemli rol üstlenmektedir (Baker, 1995).

BVDV enfeksiyonun dünya genelinde yaygın olduğu bir çok araştırmacı tatarfından bildirilmiştir (Xue ve ark., 2009; Ridpath ve ark., 2010). Moleküler analiz çalışmaları sonucunda BVDV-1 alt gruplarının daha yaygın olduğu görülmektedir (Ridpath, 2010a; Ridpath ve ark., 2010b). Türkiye'de ise BVDV ile ilgili yapılan serolojik çalışmalarda ortalama %50 oranında seropozitiflik bildirilmiş ve enfeksiyon varlığının ciddi sağlık sorunu ve ekonomik kayıplara neden olduğu birçok çalışmada ortaya konulmuştur. Ayrıca, Türkiye'de de BVDV-1'in predominant olduğu araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir (Burgu ve ark., 1987; Alkan ve Burgu 1993,

Burgu ve Özkul 1993; Oğuzoğlu ve ark., 2010; Yıldırım ve ark., 2011; Yılmaz ve ark., 2012; Yeşilbağ ve ark., 2014; Yıldız ve Babaoğlu, 2022).

2.1.6. Patogenez

BVDV oro/nazal yoluyla bulaştıktan sonra, ilk olarak oropharynx bölgesinde çoğalmaya başlar. Ardından virus giriş yaptığı bölgenin yakınındaki mukozalarda ve bağırsak kript hücrelerinde görülmektedir (Odeon ve ark., 1999). Oronazal mukoza epitellerinde bazen ülserler görülebilmektedir. Virus kana geçtikten sonra yayılarak fagositik hücreler tarafından lenfoid dokulara ulaşmaktadır. Virus, viremiyi takiben gebe hayvanlarda maternal ve fötal bariyeri aşarak ölümcül fötal ve kongenital anomali doğumlara neden olabilmektedir. Virus kanda lökositlerde taşınmakta ve böylece uterusa geçmektedir. Tam kan, nasal swab, vaginal swab, sperma ve fötal dokularda virusun varlığı tespit edilmektedir (Meyers ve Thiel, 1996).

2.1.7. Akut enfeksiyon

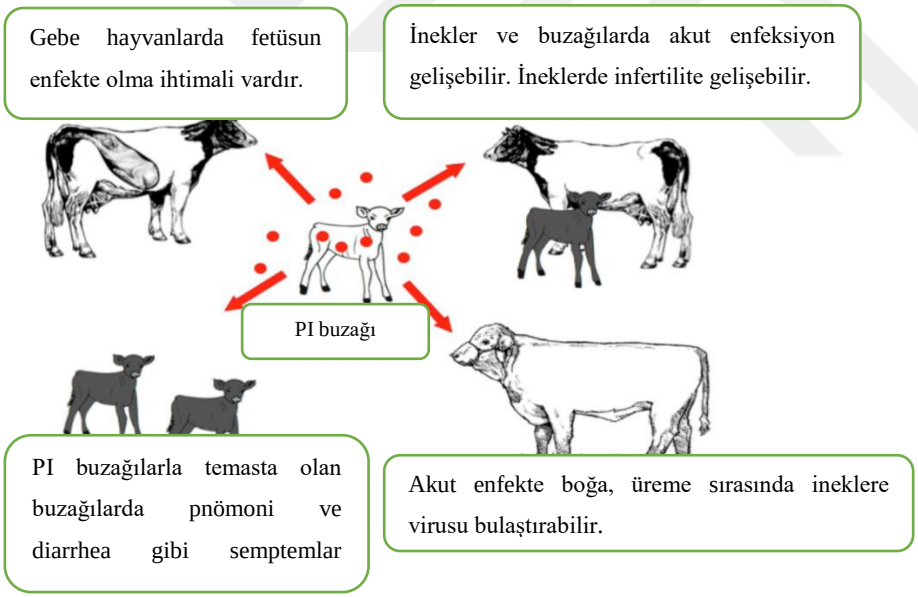
Duyarlı sığırlar virusa ilk maruz kaldıklarında akut enfeksiyon gelişebilmektedir. BVDV önce, tonsiller, lenf dokusu, nazal ya da orofarengeal dokuların mukozalarında çoğalır. Oro-nazal mukoza epitellerin içerisinde hızla çoğalan virus, mukozalarda ülserlere, salya ve burun akıntısına neden olmaktadır. Virus, lenfositler ve makrofajları konak hücre olarak seçmektedir. Virus kan aracılığıyla bulaşabildiği gibi, fagositler aracılığıyla periferal lenflere ulaşabilmektedir. İmmun sistem enfeksiyondan 2-3 hafta sonra viral etkene karşı antikor gelitirmeye başlamaktadır. Antikor seviyesi yavaş geliştiği nedeniyle immünosupresif etki görülebilmektedir (Kapil ve ark., 2005).

Gebe hayvanlarda gelişen akut enfeksiyonlar ciddi sonuçlara yol açmaktadır. Virus, plasenta bareyerini geçerek intrauterin enfeksiyonu oluşturabilmektedir (Alpay, 2013). Gebelik döneminde bu tip enfeksiyonlar daha çok gebelik dönemiyle ya da virusun özellikleriyle ilişkilendirilmektedir. BVDV'nin her iki biyotipi (cp ve ncp) de genital dokuyu enfekte edebilmekte ve fetüs enfeksiyonuna neden olabilmektedir. Erken gebelik sırasında ncp-BVDV virus varlığının immunotolere PI oluşturduğu, cp-BVDV virusların ise fetüse zarar verebildiği görünmektedir. Gebeliğin ilk dönemlerinde (0-100 gün) gelişen BVDV enfeksiyonları; fetüs ölümüne (abortus) sebep olabilmekte ve

gebeliğin ikinci ve üçüncü dönemlerinde (100-180 gün) anneye bulaşan BVDV ise oküler veya serebellar lezyonlar ve iskelet malformasyonları gibi ciddi konjenital veya fiziksel malformasyonlar gösteren buzağıların doğumuyla sonuçlanabilmektedir (Grooms, 2004).

2.1.8. Persiste enfeksiyon ve mukozal hastalık (MD)

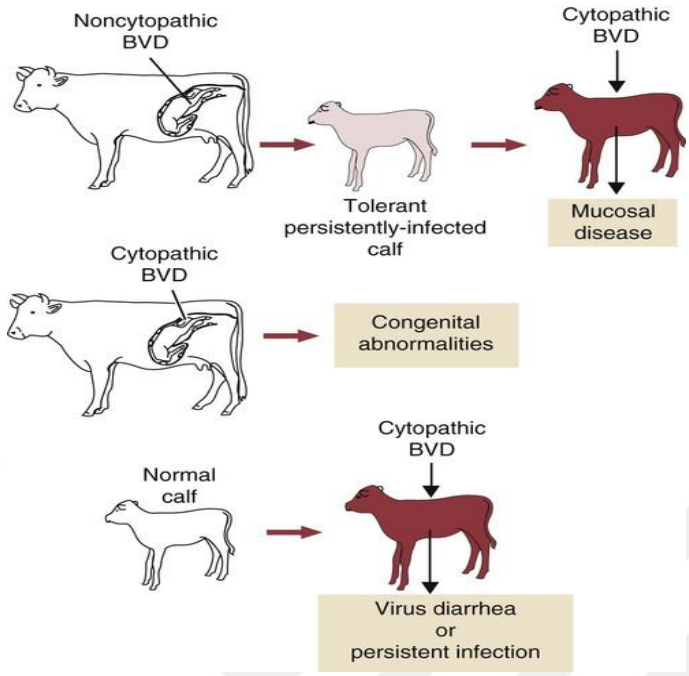
PI hayvanların, vücut sıvılarında fazla miktarda virus bulunduğu için virusu sahada sürekli olarak yaymaktadır (Şekil 3). Klinik olarak asemptom ve sağlıklı görülmelerine rağmen genellikle zayıf ve yaşıtlarına kıyasla az gelişmişlerdir. İmmün sistem baskılanmasıyla sekonder enfeksiyonlara hassas olup, düşük verim performansına sahip olma eğilimindedir. Sonuç olarak PI hayvanların yaşam süreleri diğerlerine göre daha kısa olup, MD nedeniyle ölümle sonuçlanabilmektedir (Evans ve ark., 2019).



Şekil 3. PI hayvanlarda virus bulaşması (Khodakaram-Tafti ve Farjanikish, 2017).

MD formu, ncp-BVDV ile persiste enfekte hayvanlarda, antijenik olarak homolog sitopatojen suşla veya mutasyon geçirmiş bir ncp virusla süperenfeksiyon oluşumuyla gelişmektedir (Şekil 4) (Brownlie J, 1990; Hamers ve ark., 2001). Enfeksiyon sonrası, sitopatojen viruslar tonsil epitel hücrelerinde replike olur, lenf

yumruları, peyer plakları, barsaklarda mukoza ilişkili lenfoid dokuya ve akciğer ya da nazal lenf folliküllerine geçmektedir. (Liebler ve ark., 2003).



Şekil 4. Sığırlarda BVDV-MD ve persiste enfeksiyon arasındaki ilişkinin şematik görünümü. Ncp-BVDV ile enfekte ve daha sonra cp-BVDV ile süper-enfekte olan buzağılarda MD formu gelişibilmektedir (Veterian Key, 2016).

2.1.9. Klinik semptomlar

BVDV enfeksiyonu solunum, genital ve gastrointestinal gibi birçok farklı klinik tablo ile görülebilmektedir (Meyers ve Thiel, 1996). BVDV ile enfekte olduktan sonra, lökopeni, salivasyon, burun akıntısı, öksürük, depresyon, ishal, anoreksi ve ülserasyon gibi semptomlar görülmektedir. 10-90 gün arasındaki gebe hayvanlarda subklinik enfeksiyonun aborta neden olma ihtimali bulunmaktadır (Özel, 2008).

Akut enfeksiyonlarda inkübasyon süresi 5-7 gün arasında ve morbidite yüksek görülmesine rağmen mortalite düşüktür. Akut form genellikle gebe olmayan buzağılarda (8–24 aylık) rastlanmakta ve çoğu vakalarda enfeksiyon subklinik olarak seyretmektedir. Yeni doğan yavrular 3–8 aylıığa kadar maternal antikorlarla korunabilir ancak, bu koruma süresi bitince enfeksiyon görülebilir (Özel, 2008). Erken gebelik dönemlerinde annenin virusla enfekte olması embriyonik ölüm ve rezorbsiyonla

sonuçlanabilmektedir. Diğer vakalarda görülen semptomlar ise; abort (Mcclurkin ve ark., 1984; Brownlie ve ark., 1998), fötal mumifikasyon (Weiss ve ark., 1993), beyin ve göz lezyonları, intrauterin enfeksiyonların gelişimi (Baker, 1987; Mcclurkin ve ark., 1984) ve persiste enfekte yavruların doğmasıdır (Liess, 1985).

Virusun biyotipi, virülensi ve hayvanların gebe olması gibi faktörler enfeksiyonun şiddetine etki edebilmektedir. Gebeliğin 30. günden sonra oluşan BVDV enfeksiyonlarda, PI buzağıların doğumuna neden olmaktadır. PI buzağılarda görülen klinik semptomlar; yüksek ateş, lökopeni ve burun akıntısıdır. PI buzağılar, bağışıklık sisteminin baskılanması nedeni ile fırsatçı enfeksiyonlara karşı daha duyarlı ve sonuç itibari ile MD forumu gelişebilmektedir (Kelling ve Topliff, 2013; Özel, 2008).

2.1.10. Teşhis

BVDV enfeksiyonu farklı klinik tablolar gösterdiği nedeniyle; doğru ve uygun tanı koymak amacıyla enfeksiyonun patogenezini anlamak şarttır (Lanyon ve ark., 2014). Etken tanısı için lenfoid organların biyopsi ve nekropsisi, fetüs dokuları, oro/nazal akıntılar, süt, idrar, gaita ve kan örnekleri alınabilmektedir (Sandvik, 1999). BVDV'nin rutin laboratuvar tanısında serolojik olarak indirekt enzyme link immunosorbant assay (ELISA-Ab), direkt virusa yönelik ELISA (ELISA-Ag) testi ve revers transkriptaz polimeras zincir reaksiyonu (RT-PCR) gibi farklı hızlı ve güvenilir sonuçlar sağlayan yöntemler kullanılmaktadır (Decaro ve ark., 2012).

2.1.11. Antiviral immünite

Viral enfeksiyon sonrası, etkene karşı spesifik humoral ve hücresel immün yanıt ogelişmektedir. $CD4^+$ yardımcı T hücreleri, NS3 ve E2 proteinlerine karşı koruma bağışıklığı oluşturmaktadır (Collen ve Morrison, 2000). Ayrıca, BVDV enfeksiyon sonucunda oluşan PI hayvanlarda, bağışıklık sisteminin disfonksiyonu da görülmektedir (Chase, 2013; Walz ve ark., 2020). $CD8^+$ ve $CD4^+$ hücrelerin azalması ile kanda viral yükün artması, viremi süresinin uzaması ve nazal yoluyla virus saçılımının bağlı olduğu düşünülmektedir (Howard ve ark., 1992).

B hücrelerinin aktivasyonunu takiben, ikinci haftadan itibaren nötralizen antikorlar tespit edilebilmektedir. Nötralizan antikorlar E2 yüzey protein ve Erns'ye karşı zayıf nötralizen etki göstermektedir. E1 ve NS2-3 proteinlerin yüksek performansla antikor üretimini indüklediği saptanırken, kapsid proteini (C) B hücrelerinin uyarmasında ve antikor yanıtında görev almadığı görülmektedir (Donis, 1995; Collen ve Morrison, 2000). BVDV'nin biyotipi ve virusa karşı oluşan immün tepkinin seyri sonucunda; ncp-BVDV'nin humoral bağışıklığın aktive etmesinde daha yüksek performans sağladığı görünürken, cp-BVDV'nin yüksek performansla hücresel immün yanıtını indüklediği görülmektedir (Maldonado ve ark., 2020).

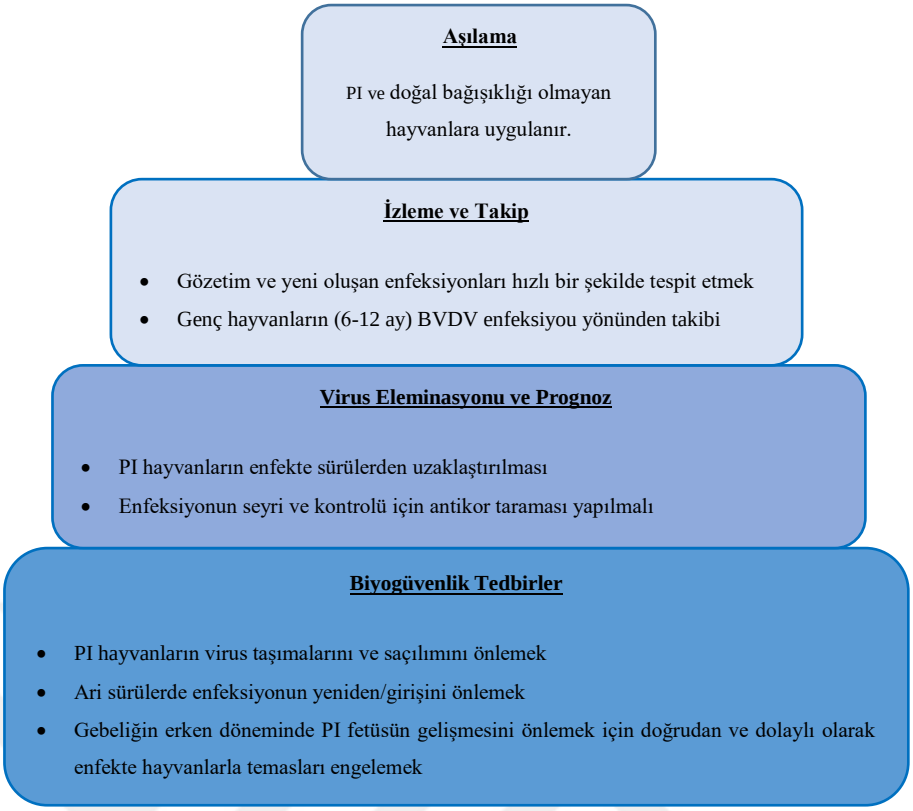
BVDV enfeksiyonunda tip I interferon (IFN-I), doğal bağışıklık hücreleri tarafından salgılanan en önemli sitokinlerden birisidir. INF-I, enfekte olmayan hücrelerin korumasını sağlamakla birlikte makrofajları, dendritik hücreleri, doğal ve spesifik immün sisteminde yer alan diğer hücreleri aktive ederek virusun çoğalmasını engelleektedir. Bu sitokinler ayrıca virusa özgü sitotoksik T hücrelerinin farklılaşmasını artırarak, kazanılmış immün yanıtta da önemli bir rol üstlenmektedir (Stetson ve Medzhitov, 2006).

2.1.12. Koruma ve kontrol

BVDV'nin eradikasyon programının temel prensibi, sığır popülasyonundaki PI hayvanların prevalansını en aza indirmek ve yeni PI hayvanların doğmasını engellemektir. Bu programda;

- ELISA-Ag gibi serolojik yöntemler kullanılarak PI hayvanları tespit etmek ve kesime sevk etmek,
- Sürü içerisinde virus bulaşmasını azaltmak için biyogüvenlik önlemlerin alınması,
- Sağlıklı hayvanlara aşı uygulaması yapılmalıdır (Lindberg ve ark., 2005).

Sığırlarda, BVDV enfeksiyonunu önlemek amacıyla ilk aşılama zamanının doğru belirlenmesi önemlidir. Aşı uygulamadan önce antikor tespiti yapılması önerilmektedir. Gebe hayvanlara inaktif aşı kullanılması tercih edilmelidir. (Gutekunst D, 1968; Liess ve ark., 1984). Bu enfeksiyonun koruma - kontrol programı ile ilili öneriler şekil 5'de şematik olarak gösterilmektedir.



Şekil 5. BVDV'ye ilişkin önerilen genel koruma kontrol modelinin şematik gösterimi (Lindberg ve Houe., 2005).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Örnekleme işlemi

Bu tez çalışmasında, 2019–2022 yılları arasında Türkiye'nin Doğu Anadolu bölgesinde yer alan Van, Ağrı ve Iğdır illerinde halk elindeki işletmelerde yetiştirlen 6 ay yaşın üzerinde BVDV klinik şüphesi (solunum, sindirim ve genital problemi) olan 80 sığırdan alınan ve Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı laboratuvarı stoklarında -80˚C sıcaklıkta muhafaza edilen örnekler, BVDV enfeksiyonuna yönelik moleküler virolojik amacıyla kullanılmıştır. Örnekleme yapılan hayvanların BVDV aşılı olmadığı bilgisi hayvan sahipleri tarafından doğrulanmıştır (Şekil 6).



Şekil 6. Doğu Anadolu bölgesinin coğrafi haritası: Örnekleme yaplan iller (Van, Ağrı ve Iğdı) kırmızı renk daire işareti ile gösterilmiştir (https://tr.m.wikipedia.org/wiki/Dosya:Turkey_Eanatolia_region.png).

3.1.2. Marazi materyaller

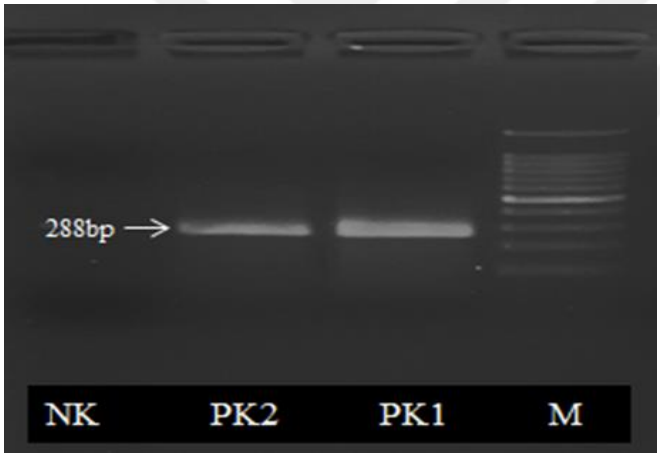
Bu amaçla, Türkiye'nin doğusunda 3 farklı ilden (Van, Ağrı, Iğdır) BVDV klinik şüphesi olan 80 sığırdan alınan toplam 110 adet; EDTA'lı kan, nazal/vajinal swap ve abort materyalleri pestivirus nükleik asit varlığı yönünden test edildi (Tablo 3).

Tablo 3. Virolojik kontrol amacıyla alınan örneklerin il ve örnek bazında dağlımı.

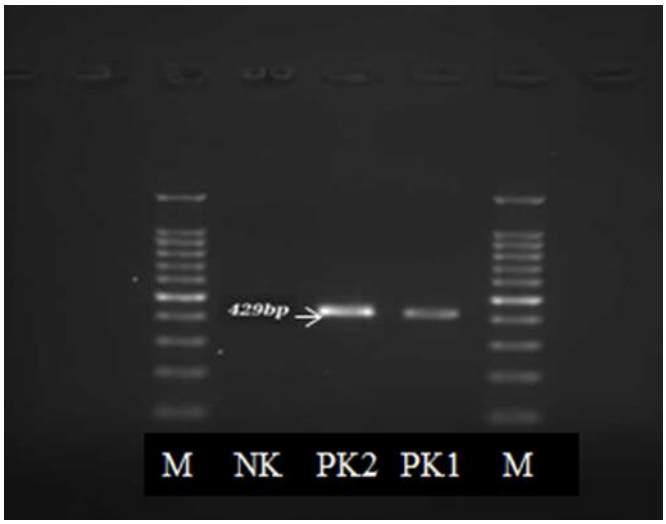
İl	Tanı Materyalleri				Toplam
	Lökosit	Nazal Swap	Vaginal Swap	Abort Materyali	
Van	41	5	3	7	56
Ağrı	12	3	4	7	26
Iğdır	18	4	1	5	28
Genel Toplam	**71**	**12**	**8**	**19**	**110**

3.1.3. Pozitif kontroller

RT-PCR tekniğinde optimizasyon çalışmalarında ve örneklerin analizinde kullanılan pozitif kontroller Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı stoklarında bulunan saha izolatlarından temin edildi (Şekil 7 ve Şekil 8).



Şekil 7. Pestivirus 5'UTR gen bölgesine yönelik nükleik asit tespiti için kullanılan pozitif kontrol (288bp). NK: negatif kontrol, PK: pozitif kontrol, M: Marker (100bp).



Şekil 8. Pestivirus Npro (BD1-BD3) gen bölgesine yönelik nükleik asit tespiti için kullanılan pozitif kontrol (429bp). NK: negatif kontrol, PK: pozitif kontrol, M: Marker (100bp).

3.2. Yöntem

3.2.1. Marazi materyallerin hazırlık işlemleri

Kan örneklerinin hazırlanması: Viroloji kontrol amacıyla ethylen diamine tetra-acetic asit (EDTA) içeren vakumlu tüplere (Greiner, Bio-One, Almanya) alınan kan örnekleri, 2000 rpm'de 4°C'de 10 dk. santrifüj edilerek üsteki plazma atılarak periferal kan mononükleer hücre (PBMC) tabakasından 400 µl, steril 1.5 ml'lik eppendorf tüplere alındı ve 1500 rpm'de 5 dk. süreyle PBS ile 3 defa yıkandı. Örnekler, moleküler çalışmalarda kullanılmak üzere -80 °C'de muhafaza edildi.

Abort materyali örneklerinin hazırlanması: Abort materyalleri, 25000 U/ml Penisilin ve 20 mg/ml Streptomisin içeren PBS (Phosphate Buffer Saline) ile 1/10 oranında homojenizatörde homojen hale getirildikten sonra 4 °C' de, 3000 rpm'de, 20 dakika santrifüj edilerek süpernatant steril bir stok tüpüne alındı. Stok tüpler moleküler çalışmalarda kullanılmak üzere -80 °C'de muhafaza edildi.

Swap örneklerinin hazırlanması: Nazal ve vajinal swap örnekleri vortekste (karıştırıcı) karıştırıldıktan sonra, tüp içerisindeki sıvı steril tüplere alınarak 4°C' de 3000 rpm de, 20 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda nükleik asit varlığını araştırmak için, supernatant kısmı steril tüplere alındı ve -80 °C' de muhafaza edildi.

3.2.2. Ekstraksiyon ve konvansiyonel RT-PCR

Alınan örnekler hazırlık aşmasından sonra, BVDV genomik RNA izolasyonu amacıyla ticari olarak temin edilen RNA ekstraksiyon kiti (EURx GeneMatrix Universal RNA Purification Kit, Poland) kullanıldı. Ekstraksiyon işlemi üretici firmanın belirlediği prosedüre uygun olarak uygulandı. Elde edilen RNA'lar konvansiyonel RT-PCR işlemine alındı. Reverse transkripsiyon (RT) ve PCR işlemi, OneStep RT-PCR kiti (Softec, Türkiye) kullanılarak üretici firmanın belirlediği prosedür modifiye edilerek yapıldı. RT-PCR testinde pestivirus nükleik asit tespitinde Vilcek ve ark. (1994) tarafından pestivirus 5'UTR genine yönelik olarak bildirdikleri primer çifti (324 ve 326) kullanıldı. Ayrıca, Npro gen bölgesine yönelik BD1, BD2 ve BD3 primerleri (Vilcek ve ark., 2001; Vilcek ve ark., 1997) ve E2 gen bölgesine yönelik BVDV-E2 (Liu ve ark., 2009) primer çiftleri kullanıldı. Primer dizinleri ve primerlere ait bilgiler Tablo 4 'te gösterilmiştir.

Tablo 4. RT-PCR testinde kullanılan primer dizinleri ve özellikleri (R/ A veya G).

Gen	Primerler	Primer dizini (5'→3')	Ürün büyüklüğü ve Referans
5'UTR	Panpesti-324 Panpesti-326	ATGCCCTTAGTAGGACTAGCA TCAACTCCATGTGCCATGTAC	288 bp (Vilcek ve ark., 1994)
Npro	BVDV-Npro-BD1 BVDV-Npro-BD3 BVDV-Npro-BD2	TCTCTGCTGTACATGGCACATG CCATCTATRCACACATAAATGTGGT TTGTTRTGGTACARRCCGTC	BD1-BD3: 429bp (Vilcek ve ark., 2001) BD1-BD2: 738bp (Vilcek ve ark., 1997)
E2	BVDV-E2-F1 BVDV-E2-R1	GACCTCAGTTGTAAGCCTGAG CCCCCTAGCTCCTTGTTCAGTT	1119 bp (Liu ve ark., 2009)

Pestivirus 5'UTR gen bölgesinin amplifikasyonu amacıyla kullanılan karışım bileşenleri ve ısı döngü cihazı programı temel olarak Tablo 5'de gösterildiği şekilde uygulandı.

Tablo 5. RT-PCR panpestivirus-BVDV 5'UTR gen bölgesi çoğaltmak amacıyla kullanılan karışım bileşenleri ve programı.

Bileşen	Konsantrasyon	Kullanılan Program
5X Master mix (buffer+ MgCl2+dNTP mix)	4.0 µl	55°C'de 15 dk
Reves Transkriptaz + Taq DNA polymerase	1.0 µl	95°C'de 1 dk
Primer PP-F (10 pmol/µl)	1.0 µl	95°C'de 10 s 56°C'de 30 s 72°C'de 10 s } 35 siklus
Primer PP-R (10 pmol/µl)	1.0 µl	
Deiyonize su	10.0 µl	72°C'de 5 dk
RNA	3.0 µl	
TOTAL	**20 µl**	

Npro gen bölgesini çoğaltmak için kullanılan karışım bileşenleri ve ısı döngü cihazı programı temel olarak Tablo 6'da gösterildiği şekilde uygulandı. Npro gen bölgesine yönelik kullanılan primelerden (BD1-BD2 ve BD1-BD3) reverse primerler hariç karışım bileşenleri ve ısı döngü programı aynı olarak uygulanmıştır.

Tablo 6. Npro gen bölgesini çoğaltmak amacıyla kullanılan karışım bileşenleri ve programı.

Bileşen	Konsantrasyon	Kullanılan Program
5X Master mix (buffer+ MgCl2+dNTP mix)	4.0 µl	55°C'de 15 dk
Reves Transkriptaz +Taq DNA polymerase	1.0 µl	95°C'de 1 dk
Primer- Npro-BD1 (10 pmol/µl)	1.0 µl	95°C'de 10s 54/56°C'de 30s 72°C'de 10s } 35 siklus
Primer- Npro-BD3/BD2 (10 pmol/µl)	1.0 µl	
Deiyonize su	10.0 µl	72°C'de 5 dk
RNA	3.0 µl	
TOTAL	**20 µl**	

E2 gen bölgesini çoğaltmak için kullanılan karışım bileşenleri ve ısı döngü cihazı programı temel olarak Tablo 7'de gösterildiği şekilde uygulandı.

Tablo 7. RT-PCR BVDV-E2 gen bölgesini çoğaltmak amacıyla kullanılan karışım bileşenleri ve programı.

Bileşen	Konsantrasyon	Kullanılan Program
5X Master mix (buffer+ MgCl2+dNTP mix)	4.0 µl	55°C'de 15 dk
Reves Transkriptaz +Taq DNA polymerase	1.0 µl	95°C'de 1 dk
Primer- E2-F (10 pmol/µl)	1.0 µl	95°C'de 10s
Primer- E2-R (10 pmol/µl)	1.0 µl	56°C'de 30s } 35 siklus
Deiyonize su	10.0 µl	72°C'de 10s 72°C'de 5 dk
RNA	3.0 µl	
TOTAL	**20 µl**	

3.2.3. PCR ürünlerinin görüntülenmesi ve saflaştırılması

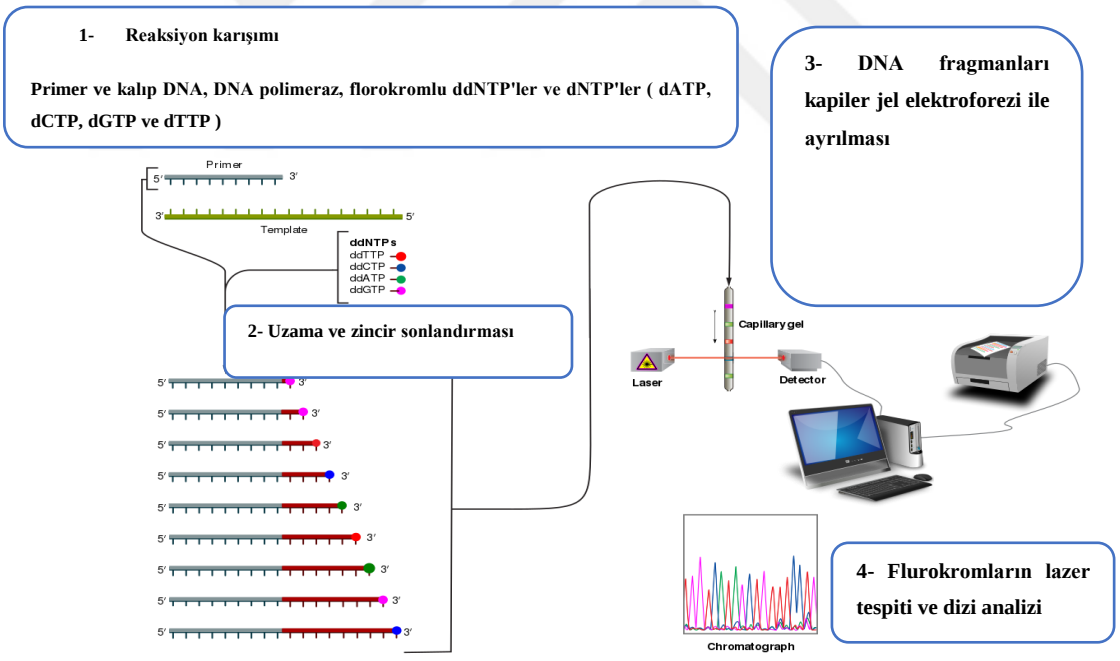
Amplikonların jelde görüntülenmesi için %1.5'lük agaroz 0.5X Tris Asetat - Ethylene Diamine Tetra Acetic acid (TAE) solusyonu kullanıldı. Pestivirus nükleik asiti yönünden RT-PCR'da pozitif olarak tespit edilen amplikonların jel görüntülerini değerlendirmek amacıyla, 4µl PCR ürünü ve 6x yükleme boyası (6x DNA Loading Dye Buffer Blue, Solis BioDyne, Estonya) olacak şekilde karıştırılıp jelde bulunan kuyucuklara 100 bp'lik DNA marker (100 bp DNA Ladder, Solis BioDyne, Estonya) rehberliğinde yüklendi. 0.5X TAE solusyonu içerisindeki jele 50 mAmp elektrik akımı, 20 dakika uygulanarak amplikon harekti sağlanarak ve UV jel görüntüleme sistemi (Vilber Lourmat, Fransa) kullanılarak PCR sonucu oluşan ürün bantları görüntülendi.

RT-PCR sonucunda pozitif bulunan örneklere yönelik saflaştırma işlemi ticari olarak temin edilen clean-up/jel ekstarkasiyon kiti (EURx, GeneMATRIX Basic DNA Purification Kit, Polonya) üretici firmanın önerdiği yönteme uygun olarak yapılmıştır. Elde edilen saflaştırılmış DNA'lar (5'UTR, Npro) hizmet satın alımı bedeli yöntemi ile DNA dizin analizine gönderildi.

3.2.4. Viral genomun kısmı dizin analizi (Sekans Analizi)

BVDV'nin 2 farklı gen bölgesine yönelik (5'UTR, Npro) RT-PCR testinde pozitif bulunan örneklerden; kuvvetli pozitif olanlardan, 3 farklı ili (Van, Ağrı ve Iğdır) ve örnekleri temsil edecek saflaştırılmış amplikonlar hizmet satın alımı yolu ile Sanger dizileme yöntemi (Sanger, 1975) kullanılmak üzere dizin analizine gönderildi.

Sanger dizin analizi yöntemi kısaca (Şekil 10); boyalı nükleotidlerle işaretleme işlemi ve ısı döngü programı sonucunda elde edilen DNA'lar absolut ve %70 oranında hazırlanmış etanol solüsyonuyla yıkama işlemine tutulmaktadır. Bu işlemin ardından DNA'lar etanolün uzaklaştırılması ve kuruması için karanlık bir ortamda bir gece bırakılarak ertesi gün işaretli ürünler kapillar elektroforetik separasyon için genetik analiz cihazına yerleştirilmektedir. Elde edilen dizinlerin ham verileri firma tarafından BioEdit programı dosyasında gönderilmekte ve değerlendirmeye alınmaktadır.



Şekil 9. Sanger dizileme yönteminin aşamalarının şematik gösterimi (Smith ve ark., 1986).

3.2.5. Filogenetik analiz

Dizin analizi sonrası elimize ulaşan ham veriler, National Center Biotechnology Information (NCBI) servisinin Basic Local Aligment Search Tool (BLAST) web sayfasında yer alan (BankIt: Gen Bank Submissions) programından yararlanılarak analiz edildi. Dizin analizi yapılan her bir örnek için Gen Bankasına kayıt yaptırarak erişim numarları alındı (Tablo 10, Tablo 11). Bu çalışmada elde edilen dizinler (5'UTR ve Npro gen bölgesi), Bioedit v. 7.7.1 (Hall, 1999) ve Clustral W çoklu hizalama (multiple alignment) yazılımını kullanarak hem kendi aralarında hem de BLAST programından yararlanılarak, Gen Bankasından elde edilen referans viruslar ve diğer ülke suşları ile karşılaştırılması yapıldı.

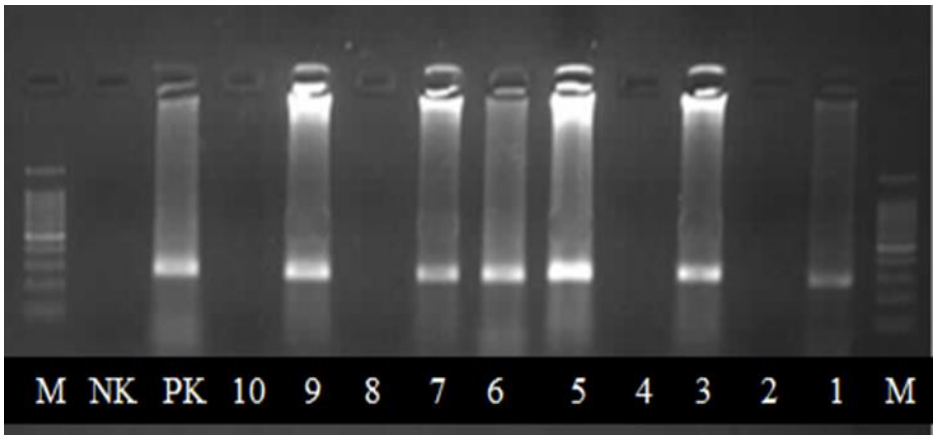
Filogenetik analiz, viral dizinlerin soyağacını gösteren, izolatların arasındaki evrimsel ilişkiyi araştırmak ve viral sınıflandırma amacıyla kullanılan bir yöntemdir. Bu çalışmada nükleotid dizinler baz alınarak dizin analizi yapılan örneklere yönelik filogenetik ağaç oluşturulması ve sirkülasyondaki diğer BVDV genotipleri ile bu çalışmadaki elde edilen dizinler arasındaki istatistiksel anlamlılığı test etmek amacıyla Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) versiyon 11.0 (Tamura ve ark. 2013) programının maximum likelihood (ML) ve bootstrap analizi (1000 tekrar) kullanıldı.

4. BULGULAR

4.1. RT-PCR Sonuçları

4.1.1. Pestivirus 5'UTR gen bölgesinin nükleik asit tespiti

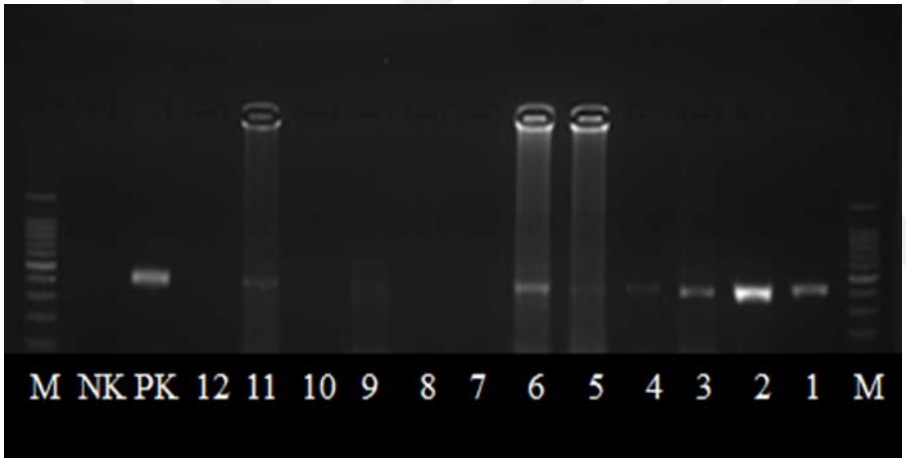
Pestivirusların 5'UTR gen bölgesinin varlığını araştırmaya yönelik; Van, Ağrı ve Iğdır illerinden alınan, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı laboratuvarı -80˚C'de sıcaklıkta muhafaza edilen toplam 110 adet marazi materyalinden genomik RNA ekstraksiyonu yapıldı. RNA ekstraksiyonunu takiben reverse transkriptaz (RT) ve PCR işlemi, One-Step RT-PCR kiti ile panpesti 324/326 (forward/reverse) primerleri kullanılarak gerçekleştirildi. Konvansiyonel RT-PCR sonucunda 110 adet sığır örneğinden 24 örnekte pestivirus 5'UTR genine yönelik nükleik asit varlığı tespit edildi (Tablo 8). Kan örneklerinde %22.53 (16/71), abort materyallerinde %26.31 (5/19), vajinal swap örneklerinde %12.5 (1/8) ve nazal swap örneklerinde %16.66 (2/12) oranında pozitiflik tespit edildi. Böylelikle pozitiflik oranı tüm örneklerde %21.81 olarak belirlendi (Tablo 8). Elde edilen amplikonlara ait agaroz jel görüntüsü Şekil 11'de gösterildi.



Şekil 10. Pestivirus 5'UTR nükleik asit tespitinde RT-PCR sonuçlarının jel görüntüsü (288bp). M: Marker (100 bp); NK: negatif kontrol; PK: pozitif kontrol; 1,3,5,6,7,9 pozitif saha örnekleri; 2,4,8,10 negatif saha örnekleri.

4.1.2. Pestivirus Npro gen bölgesinin nükleik asit tespiti

Npro gen bölgesine yönelik nükleik asit varlığını araştırmak amacıyla One-Step RT-PCR kiti ile BD1, BD2 ve BD3 primerleri kullanılarak semi nested PCR işlemi gerçekleştirildi. RT-PCR sonucunda test edilen 110 adet örnekten 10 örneğin pestivirus Npro genine yönelik nükleik asit varlığı pozitif olarak değerlendirildi (Tablo 8). Kan örneklerinde %5.63 (4/71), abort materyallerinde %15.78 (3/19), nazal swap örneklerinde %8.33 (1/12) ve vajinal swap örneklerinde %25 (2/8) pozitilik tespit edilmedi. Böylelikle Npro genine yönelik pozitiflik oranı tüm örneklerde %9.09 olarak belirlendi (Tablo 8). Elde edilen amplikonlara ait garoz jel görüntüsü Şekil 12'de gösterilmiştir. Ayrıca çalışma kapsamında RT-PCR testinde pestivirus E2 gen bölgesine yönelik herhangi bir pozitifliğe rastlanmamıştır.



Şekil 11. Pestivirus Npro genine yönelik nükleik asit tespitinde amplikonların jel görüntüsü (429bp). M: Marker (100 bp); NK: negatif kontrol; PK: pozitif kontrol; 1,2,3,4,5,6,11 pozitif saha örnekleri; 7,8,9,10,12 negatif saha örnekleri.

Tablo 8. Pestivirus 5'UTR, Npro ve E2 gen bölgesine yönelik RT-PCR testine alınan örnekler ve sonuçları.

Örnek Türü	Örnek Sayısı	Pestivirus 5'UTR Pozitif	Pestivirus Npro Pozitif	Pestivirus E2 Pozitif
Kan	71	16	4	0
Abort ateryali	19	5	3	0
Nazal Swap	12	2	1	0
Vaginal Swap	8	1	2	0
Toplam	**110**	**24**	**10**	**0**

4.2. Dizin Analizi ve Filogenetik Analiz Sonuçları

Çalışma kapsamında pestivirus-5'UTR ve Npro gen bölgelerine yönelik yapılan RT-PCR sonucunda kuvettli pozitiflik tespit edilen ve il bazında örnekleri temsil edecek 12 hayvana ait 14 örneğin (4 adet kan, 3 adet nazal swap, 2 adet vaginal swap ve 5 adet abort materyali) dizin analizi yapıldı. Dizin analizi yapılan 14 örnekten 8 örnek 5'UTR ve 6 örnek Npro genine yönelik yapılmıştır. Elde edilen dizinlerin Gen Bankasına kayıt yaptırarak onaylandıktan sonra her bir örnek için erişim numarası alındı (Tablo 10 ve Tablo 11). Dizinlerin ham verileri BLAST programında kontrol edilip, Gen Bankasında yer alan diğer BVDV dizinleri ile eşleştiği tespit edildikten sonra, 5'UTR ve Npro genlerine dayalı hem kendi aralarında hem de Gen Bankasında bulunan diğer BVDV izolatları ile nükleotid düzeyinde karşılaştırılmıştır.

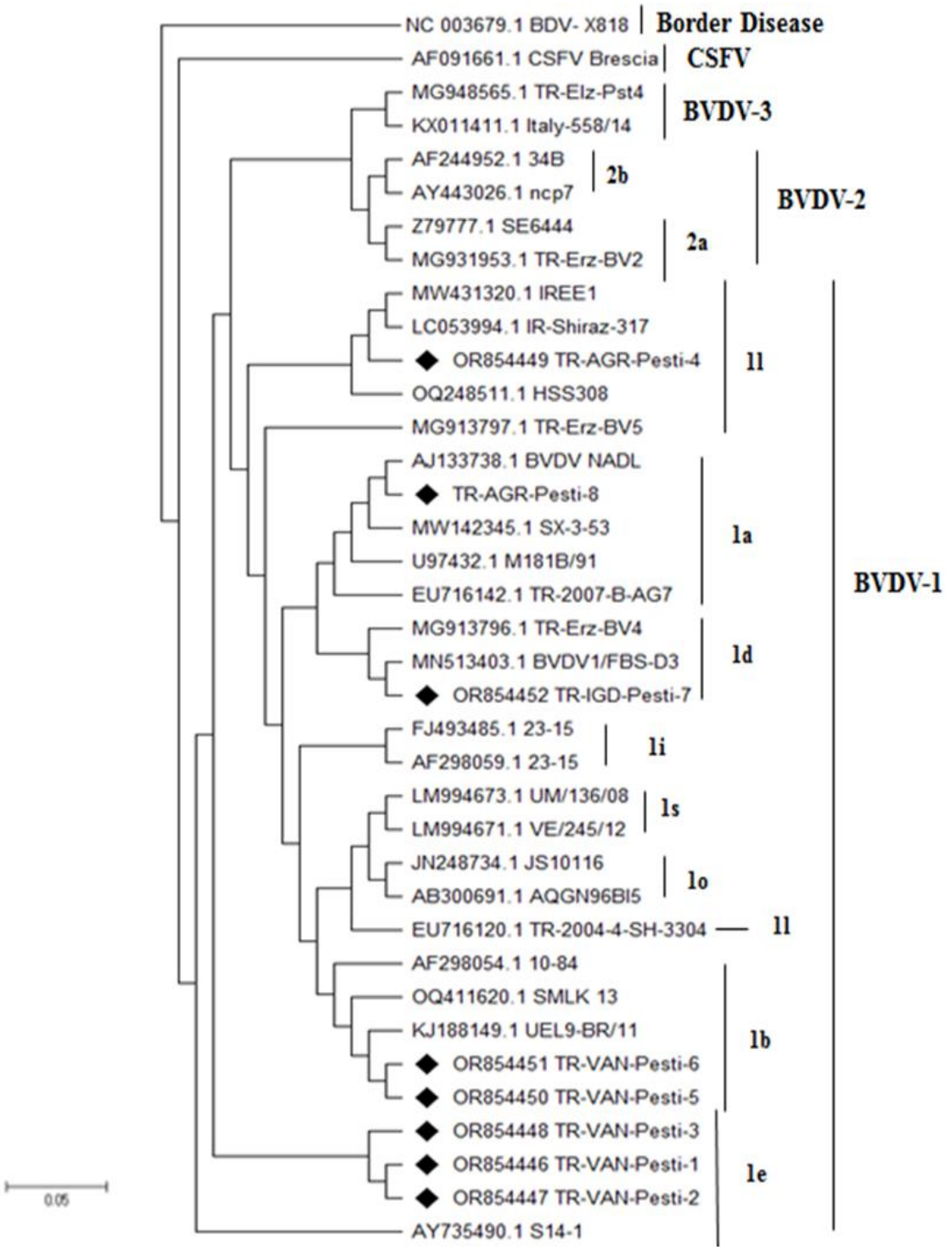
Tablo 9. Bu çalışmadaki 5'UTR kısmı gen bölgesi dizinlere ilişkin bilgiler ve Gen Bankası erişim numaraları.

No	Dizin ID	Örnek Türü	İL	Genotip	GenBank Erişim No
1	TR-VAN-Pesti1	Kan	Van	1e	OR854446
2	TR-VAN-Pesti2	Kan	Van	1e	OR854447
3	TR-VAN-Pesti3	Kan	Van	1e	OR854448
4	TR-AGR-Pesti4	Nazal Swap	Ağrı	1l	OR854449
5	TR-VAN-Pesti5	Abort Materyali	Van	1b	OR854450
6	TR-VAN-Pesti6	Abort Materyali	Van	1b	OR854451
7	TR-IGDR-Pesti7	Nazal Swap	Iğdır	1d	OR854452
8	TR-AGR-Pesti8	Kan	Ağrı	1a	Devam ediyor

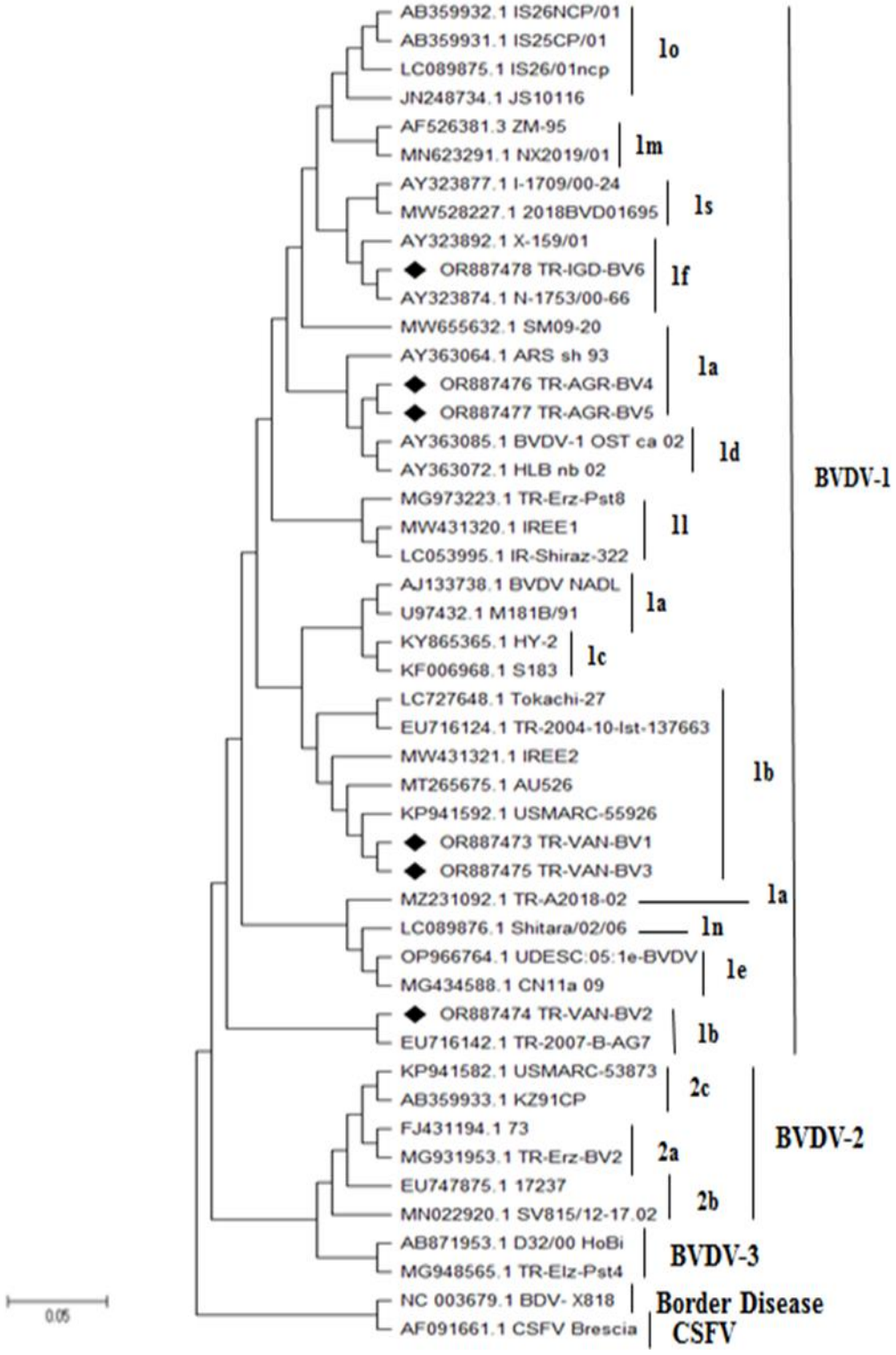
Tablo 10. Bu çalışmadaki Npro kısmı gen bölgesi dizinlere ilişkin bilgiler ve Gen Bankası erişim numaraları.

No	Dizin ID	Örnek Türü	İL	Genotip	GenBank Erişim No
1	TR-VAN-BV1	Abort Materyali	Van	1b	OR887473
2	TR-VAN-BV2	Abort Materyali	Van	1b	OR887474
3	TR-VAN-BV3	Abort Materyali	Van	1b	OR887475
4	TR-AGR-BV4	Vaginal Swap	Ağrı	1a	OR887476
5	TR-AGR-BV5	Vaginal Swap	Ağrı	1a	OR887477
6	TR-IGDR-BV6	Nazal Swap	Iğdır	1f	OR887478

Filogenetik ağaç oluşturulması amacıyla, dizin analizi sonucunda elde edilen 5'UTR gen bölgesine yönelik 8 hayvana ait örneğin (4 kan, 2 abort materyali ve 2 nazal swap) dizinleri ve Npro gen bölgesine yönelik 6 hayvana ait örneğin (3 abort materyali, 2 vaginal swap ve 1 nazal swap) dizinleri ile birlikte dünyada ve Türkiye'de daha önceki çalışmalarda tespit edilen ve Gen Bankasında verileri bulunan BVDV-1, BVDV-2, BVDV-3, BDV ve CSFV suşların verileri kullanıldı. Filogenetik analizinde Molecular Evolutionary Genetics Analysis software (MEGA) versiyon 11.0 (Tamura ve ark. 2013) programının maximum likelihood (ML) ve bootstrap analizi (1000 tekrar) metodundan yararlanıldı. Çizilen filogenetik ağaçta 14 izolatın tümü BVDV-1 genotipi olarak belirlendi. Dizinlerin filogenetik analizi sonucunda BVDV-1b (%35.71, n=5) alt tipinin Türkiye'nin doğusundaki illerde yaygın olduğu görülmektedir. Ayrıca, BVDV-1a %21.42 (n=3), BVDV-1e %21.42 (n=3), BVDV-1l %7.14 (n = 1), BVDV-1d %7.14 (n= 1) ve BVDV-1f %7.14 (n = 1) oranında BVDV-1'in alt tipleri olarak saptanmıştır. Elde edilen filogenetik analizleri sonucunda BVDV-2 ve BVDV-3 genotipleri tespit edilmemiştir (Şekil 12 ve 13).



Şekil 12. Pestivirus nükleotid dizisinin 5'UTR genine dayanarak oluşturulan filogenetik ağaç (Bu çalışmadaki BVDV dizinler siyah renk dörtgen (♦) işareti ile gösterilmiştir).



Şekil 13. Pestivirus nükleotid dizisinin Npro genine dayanarak oluşturulan filogenetik ağaç (Bu çalışmadaki BVDV dizinleri siyah renk dörtgen (◆) işareti ile gösterilmiştir).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Sığırları etkileyen kökeni bilinmeyen bir hastalık 1940'larda batı Kanada'da "X hastalığı" adı altında tanımlandı (Childs, 1946). 1946 yılında Cornel Üniversitesindeki araştırmacılar bahar ve yaz aylarında sığırlarda "yeni bulaşıcı sığır hastalığı" adıyla bir hastalığın ortaya çıktığını bildirdiler (Olafson ve ark., 1946). X hastalığı ve yeni bulaşıcı sığır hastalığı farklı klinik tablolarla virus diarrhea (VD) olarak bilinmeye başladı. Daha sonraki yıllarda BVDV-MD formu, cp ve ncp biyotipleri, VD'nin BDV ve CSV ile aynı genus içerisinde olduğu ve BVDV-1 (Pestivirus A), BVDV-2 (Pestivirus B) ve BVDV-3 (Pestivirus H) genotipleri ve PI hayvanlar bildirildi. Son zamanlarda (Gillespie ve ark., 1960; Darbyshire, 1962; Malmquist, 1968; Coria ve McClurkin, 1978; Ridpath ve ark., 1994; Mishra ve ark., 2014). BVDV'nin ekonomik önemi, 1980'lerde hemorajik sendrom ve şiddetli akut sığır viral diyare salgınlarının ortaya çıkması ile artmaya başlamıştır.

BVDV, farklı klinik tablolarla yaygın olarak görülen ve büyük ekonomik kayıplara neden olan bir enfeksiyondur. Türkiye'de yapılan çalışmalarda farklı klinik bulgularda serolojik ve virolojik olarak BVDV enfeksiyonun varlığı ve yayagın olarak görüldüğü rapor edilmektedir. Son yıllarda ise hayvan ithalatı nedeni ile diğer ülkelerde görülen BVDV suşları artık Türkiye'de de yaygın olarak görülmeye başlamıştır (Yeşilbağ ve ark., 2008; Oğuzoglu ve ark., 2010; Oğuzoğlu ve ark., 2012; Yilmaz ve ark., 2012; Oğuzoğlu ve ark., 2019; Timurkan ve Aydın, 2019; Yıldız ve Babaoglu, 2022). BVDV izolatlarının moleküler genetik tiplendirilmesi, koruma-kontrol ve eradikasyon stratejilerin tasarlanması ve oluşturulmasında özellikle aşılamayı içeren programlarda önem taşımaktadır.

Vilcek ve ark., (1994, 1997, 2001, 2004) saha örneklerinde farklı hayvan türlerinde (sığır, koyun, domuz) pestivirusların 5'UTR, Npro ve E2 gen bölgelerine dayanılarak identifikasyon, moleküler karakterizasyon ve alt gruplara genotiplendirilmesinin daha doğru ve uygun bir tablo verdiğini belirtmektedir. Pestiviruslarda 5'UTR gene bölgesi korunan motifler içerdiği için hem PCR çalışmalarında hem de pestiviusların moleküler karakterizasyonunda çoğunlukla tercih

edilen bölgedir. Ayrıca, Gen bankasında bulunan diğer referans dizinlerle karşılaştırmak için daha fazla olanak sağalamaktadır. Bununla birlikte autoprotease Npro ve glycoprotein E2 gen bölgeleri de moleküler analizlerde tercih edilmektedir (Vilcek ve ark., 2004; Oguzoglu ve ark., 2012; Yeşilbağ ve ark., 2017; Timurkan ve Aydın, 2019).

Bu çalışmada da, Türkiye'nin Doğu Anadolu bölgesinde yer alan Van, Ağrı ve Iğdır illerinde halk ilinde yetiştirlen sığırlarda sirküle olan BVDV'lerin solunum, sindirim ve genital sistem enfeksiyonlarındaki etiyolojik özelliklerinin belirlenmesi ve moleküler karakterizasyonuna ilişkin güncel verilere ulaşmamız amaçlanmıştır. Bu bağlamda, 2020-2021 yılları arasında 6 ay yaşın üzerinde ve BVDV enfeksiyonu şüphesi olan 80 sığırdan alınan toplam 110 adet; kan, abort materyali, nazal ve vaginal swap örnekleri bovine pestivirus 5'UTR, Npro ve E2 gen bölgelerine yönelik konvansiyonel OneStep RT-PCR yöntemi ile test edildi. RT-PCR sonucunda 5'UTR gen bölgesine yönelik %21.81 (24/110) ve Npro gen bölgesine yönelik %9.09 (10/110) oranında BVDV nükleik asit tespit edilmiştir. Ayrıca, E2 gen bölgesine yönelik herhangi bir pozitiflik tespit edilmemiştir. Konvansiyonel RT-PCR'da 5'UTR ve Npro gen bölgelerine yönelik pozitif olarak belirlenen ve iyi ürün kalitesine sahip olan 3 farklı ilden 12 hayvana ait elde edilen 14 amplikon DNA dizin analizi çalışmasına dahil edilmiştir. Dizin analizi yapılan 14 örnekten 8 örnek, 5'UTR ve 6 örnek Npro genine yönelik gerçekleştirilmiştir (Tablo 10, Tablo 11).

Türkiye'de pestivirus genetik karakterizasyonuna yönelik çalışmalarda BVDV-1 genotipinin ve alt tip olarak BVDV-1l'nin en yaygın olduğu rapor edilmiştir. Dünya çapındaki çalışmalar en sık görünen alt tipin BVDV-1b olarak tanımlandığını ve bunu 1a ve 1c'nin takip ettiğini bildirmektedir (Yeşilbağ ve diğ. 2008; Oğuzoğlu ve ark. 2012; Zhou ve ark., 2022). Yeşilbağ ve ark. (2008) tarafından yapılan bir çalışmada, BVDV-1l dominant alt grup olduğu ilk kez rapor edilmiştir. Daha sonra Oğuzoğlu ve ark. (2012) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada Türkiye'nin 40 farklı bölgesinden toplanan örneklerin filogenetik analizi sonucunda BVDV-1l %45 oranında alt tip olarak tanımlanmıştır.

Bu tez çalışmasında ise yapılan filogentik analizi sonrasında, daha önceki moleküler çalışmalar ile de ortaya konulduğu gibi sirküle eden pestivirusların BVDV-1

genotipinde yer aldığı görülmekte ve ülkedeki diğer çalışmalar ile genotip yönünden uyumlu olduğu görülmektedir (Yeşilbağ ve ark., 2008; Oğuzoğlu ve ark., 2012; Oğuzoğlu ve ark., 2019; Timurkan ve Aydın 2019). Ayrıca, elde edilen dizinlerin filogenetik analizi sonucunda BVDV-1b (%35.71, n=5) alt tipinin Türkiye'nin doğusundaki illerde yaygın olduğu görülmektedir. Ayrıca, BVDV-1a %21.42 (n=3), BVDV-1e %21.42 (n=3), BVDV-1l %7.14 (n = 1), BVDV-1d %7.14 (n= 1) ve BVDV-1f %7.14 (n = 1) oranında BVDV-1'in alt tipleri olarak tespit edilmiştir (Şekil 12, Şekil 13). Daha önceki çalışmalarda Türkiye'de sirküle edilen pestivirusların genetik çeşitliliği bakımından; BVDV-1a, 1b, 1d, 1f, 1h, 1i, 1l,1v, BVDV-2a, 2b ve BVDV-3 genotipleri görünürken, bu çalışmada da BVDV-1b, 1e, 1a, 1l, 1d ve 1f alt tipleri görülmekte ve dünyada ve ülkedeki diğer çalışmalar ile BVDV-1a, 1b, 1d, 1f ve 1l alt tipleri yönünden uyumlu olduğu görülmektedir (Yeşilbağ ve diğ. 2008; Oğuzoğlu ve ark., 2010; Oğuzoğlu ve ark. 2012; Yilmaz ve ark., 2012; Sarikaya ve ark., 2012; Oğuzoğlu ve ark., 2019; Timurkan ve Aydın. 2019). Ancak, bu çalışmada Türkiye'de ilk kez tanımlanan BVDV-1e tespit edilmiştir. Avrupa'daki çalışmalarda 1e alt tipinin varlığı Avusturya, Fransa, Almanya, Italya, İsveç ve Çek Cumhuriyetinde rapor edilmiştir (Yeşilbağ ve ark., 2017). Türkiye ara sıra Avrupa ülkelerinden özellikle Almanya, Danimarka, Fransa ve Çek Cumhuriyeti ülkelerinden sığır ithal ediyor. Bu nedenle canlı hayvan ticareti sonucunda ülkemizdeki sığılara bulaşma veya yayılma meydana gelebilmektedir. Bu bağlamda benzer durumların aydınlatılması konusunda ülke bazında daha fazla genetik çeşitlilik üzerine çalışma yapılabilir.

Bu çalışma, Türkiye'nin doğu bölgesinde yer alan 3 sınır ilinde pestivirus izolatlarının genetik karakterizasyonuna yönelik BVDV-1 genotipinin genital ve solunum sistemi problemlerinde sorumlu olduğunu; 1b (%35.71) ve 1a (%21.42) alt tiplerinin diğer alt tiplere göre daha yoğun olduğunu ortaya koymaktadır. Ayrıca, BVDV-1e Türkiye'de ilk kez rapor edilmiştir. Asya, Orta Doğu ve Balkan ülkelerinde özellikle İran ve Iraq gibi komşu ülkelerde BVDV'nin epidemiyolojisi ve yaygınlığına ilişkin yeterli veri bulunmamaktadır. Bu nedenle, epidemiyolojik dinamik bilgileri açıklığa kavuşturmak için o bölgede ve Türkiye'nin farklı bölgelerinde daha fazla izolatın karakterize edilmesi değerli olacaktır. Bu bilgiler aynı zamanda BVDV'nin küresel epidemiyolojisinin anlaşılmasına katkı sağlayacaktır.

Sonuç olarak, BVDV enfeksiyonu farklı klinik tablolarla dünya genelinde yaygın olarak görülmekte ve sığır endüstrisi için ekonomik yönden olumsuz etkilere devam etmektedir. Bu nedenle, enfeksiyona yönelik ulusal bir eradikasyon programının geliştirlmesinin yanı sıra, sistematik tanı çalışmaları, canlı hayvan, hayvansal ürünler ve biyolojik ürünlere yönelik uluslararası ticaret düzenlemelerini içeren koruma-kontrol ve eradikasyon programlarının oluşturulması önem arz etmektedir. Enfeksiyonun koruma-kontrolüne yönelik sürü taraması ve PI hayvanların tespit edilmesi ve uzaklaştırılması önemli ve gerekli uygulama olarak bilinmektedir. Ayrıca, sağlıklı hayvanlara ve buzağılara yeni BVDV tiplerini içeren aşıların uygulanması da faydalı olacaktır.

Sonuç ve Öneriler

- Türkiye'de BVDV enfeksiyonu sığır işletmelerine ve ekonomiye zarar vermeye devam etmektedir.
- Virusun yayılmasını önlemek amacıyla, sürüleri peryiodik olarak taramak, PI hayvanları tespit etmek ve sürülerden uzaklaştırmaktır.
- Sağlıklı hayvanlara ve buzağılara yeni BVDV tiplerini içeren aşıların uygulanması önerilmektedir.
- Bu çalışmanın sonuçları, Türkiye'de BVDV enfeksiyonun epidemiyolojisine, korum-kontrol ve eradikasyon programına ilişkin katkı sağılayacağını düşünmektedir.

KAYNAKLAR

Alkan F, Burgu I. Investigation on the incidence of bovine viral diarrhoea virus in calves born with encephalopathy in Turkey. Dtsch Tierarztl Wochenschr. 1993;100(3):107-9. PMID: 8386080.

Al-Kubati AAG, Hussen J, Kandeel M, Al-Mubarak AIA and Hemida MG. Recent Advances on the Bovine Viral Diarrhea Virus Molecular Pathogenesis, Immune Response, and Vaccines Development. Front. Vet. Sci. 2021;8:665-128. doi: 10.3389/fvets.2021.665128.

Alpay G. Bovine Viral Diarrhoea virus Türkiye izolatlarının serolojik özellikleri ve Türkiye'de kullanılan aşıların yerel suşlara karşı oluşturduğu bağışıklık düzeylerinin belirlenmesi. Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı. Doktora Tezi, Bursa, 2013.

Babaoğlu AR. Virus Kaynaklı Abortuslar. In: Ayvazoğlu Demir P, Kuru M (Editors). Tüm Yönleriyle İneklerde Embriyonik Ölümler ve Abortus. 1st Editon, Ankara, Akademisyen. 2021:219-42.

Baker J. Bovine viral diarrhea virus: a review. J. Am. Vet. Med. Assoc. 1987;190:1449.

Baker JC. The clinical manifestations of bovine viral diarrhea infection. Vet. Clin. North Am. Food Anim. 1995;11(3):425–45.

Behrens SE, Grassmann CW, Thiel HJ, Meyeres G, Tautz N. Characterization of an autonomous subgenomic pestivirus RNA replicon. J. Virol. 1998;72(3): 2364-72.

Brownlie J, Hooper L, Thompson I, Collins M. Maternal recognition of foetal infection with bovine virus diarrhoea virus (BVDV) the bovine pestivirus. Clinical and Diagnostic Virology. 1998;10:141-50.

Brownlie J. Pathogenesis of mucosal disease and molecular aspects of bovine virus diarrburguhoea virus. Vet. Microbiol. 1990;23(1-4):371-82.

Burgu İ, Özkul A. Detection by cultural isolation of bovine viral diarrhoea virus following field infections in cattle and their fetuses in Turkey. Dtsch Tierarztl Wochenschr. 1993;100:361-3.

Burgu I, Akca Y. First isolation of IBR virus in Turkey. Trop Anim Health Prod. 1987;19-56. https://doi.org/10.1007/BF02250848.

Chase CC. He impact of BVDV infection on adaptive immunity. Biologicals. 2013;41:52–60. doi: 10.1016/j.biologicals.2012.09.009.

Childs T. X disease in cattle — Saskatchewan. Can J Comp Med. 1946;10:316–9.

Collen T, Morrison WI. CD4(+) T-cell responses to bovine viral diarrhoea virus in cattle. Virus Rest. 2000;67:67–80. doi: 10.1016/S0168-1702(00)00131-3.

Collett M, Larson R, Gold C, Strick D, Anderson D, Purchio A. Molecular cloning and nucleotide sequence of the pestivirus bovine viral diarrhea virus. Virology. 1988;165(1):191–9.

Coria MF, McClurkin AW. Specific immune tolerance in an apparently healthy bull persistently infected with bovine viral diarrhea virus. J Am Vet Med Assoc 1978;172:449–51.

Darbyshire J. Agar gel diffusion studies with a mucosal disease of cattle. II. A serological relationship between a mucosal disease and swine fever. Rest. Vet. Sci. 1962;3:123-8.

Decaro N, Mari V, Lucente MS, Sciarretta R, Moreno A, Armenise C, Buonavoglia C. Experimental infection of cattle, sheep and pigs with 'Hobi'-like pestivirus. Vet. Microbiol. 2012;155(2-4):165-71.

Depner K, Bauer T ve Liess B. Thermal and pH stability of pestiviruses. Rev. Off. Int. Epizoot. 1992;11(3):885-93.

Doğan F, Bilge Dağalp S. Etiyopatogenesis of Viral Abortion Cases in Cattle. MAKU JHealth Sci Inst. 2017;5(1):66-77.

Donis RO. Molecular biology of bovine viral diarrhea virus and its interactions with the host. Vet. Clin. North Am. Food Anim. 1995;11(3):393-423.

Evans CA, Pinior B, Larska M, Graham D, Schweizer M, Guidarini C, Gates MC. Global knowledge gaps in the prevention and control of bovine viral diarrhoea (BVD) virus. Transbound. Emerg. Dis. 2019;66(2): 640-52.

Ghazi YA, El-Sherif AM, Azzam RA, Hussein HA. Diagnostic studies on bovine viral diarrhoea infection in cattle and buffaloes with emphasis on gene markers. Global Veterinaria. 2008;2(3):92-8.

Giangaspero M, Harasawa R, Weber L, Belloli A. Taxonomic and epidemiological aspect of the bovine viral diarrhoea virus 2 through the observation of 86 the secondary structures in the 5' genomic untranslated region. Veterinaria Italiana. 2008;44(2):319-45.

Gillespie JH, Baker JA, McEntee K. A cytopathogenic strain of virus diarrhea virus. Cornell Vet. 1960;50:73–9.

Goens Denise S. The evolution of bovine viral diarrhea: a review. Can. Vet. J. 2002;43(12):946.

Greiser-Wilke I, Grummer B, & Moennig V. Bovine viral diarrhoea eradication and control programmes in Europe. Biologicals. 2003;31(2):113-8.

Grooms DL. Reproductive consequences of infection with bovine viral diarrhea virus. Vet. Clin. North Am. Food Anim. 2004;20(1):5-19.

Gutekunst D. Comments on vaccination for bovine viral diarrhea-mucosal disease. J. Am. Vet. Med. Assoc. 1968;152:865-6.

Hall TA. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symp. Ser. 1999;41:95–8.

Hamers C, Dehan P, Couvreur B, Letellier C, Kerkhofs P, Pastoret PP. Diversity among bovine pestiviruses. Vet. J. 2001;161:112-22.

Heinz F, Collett M, Purcell R, Gould E, Howard C ve Houghton M. Report of ICTV, San Diego USA: Academic Press. 2000;859–68.

Houe H. Economic impact of BVDV infection in dairies. Biologicals. 2003;31:137–43. doi:10.1016/S1045-1056(03)00030-7.

Howard CJ, Clarke MC, Sopp P, Brownlie J. Immunity to bovine virus diarrhoea virus in calves: the role of different T-cell subpopulations analysedby specific depletion in vivo with monoclonal antibodies. Vet Immunol Immunopathol. 1992;32:303–14. doi: 10.1016/0165-2427(92)90052-R.

Kahrs RF. Viral Diseases of Cattle, 2nd ed. Iowa State University Press, Ames, 2001.

Kameyama K, Konishi M, Tsutsui T, Yamamot. Survey for detecting persistently infected catle with bovine viral diarrhea in Japan. J. Vet. Med. Sci. 2016;78(13):29–31.

Kapil S, Walz P, Wilkerson M, Minocha H. Immunity and immunosuppression. Editors: Goyal SM, Ridpath JA. Bovine Viral Diarrhea 91Virus: Diagnosis, Management and Control. Blackwell Publishing, Ames, IA. 2005;157-70.

Kelling CL, Topliff CL. Bovine maternal, fetal and neonatal responses to bovine viral diarrhea virus infections. Biologicals. 2013;41(1):20-5.

Khodakaram-Tafti A, Farjanikish GH. Persistent bovine viral diarrhea virus (BVDV) infection in cattle herds. Iran. J. Vet. Rest. 2017;18(3):154.

Kirchgessner MS, Dubovi EJ, Whipps CM. Spatial point pattern analyses of Bovine viral diarrhea virus infection in domestic livestock herds and concomitant seroprevalence in wild white-tailed deer (Odocoileus virginianus) in New York State, USA. J. Vet. Diagn. 2013;25(2):226-33.

Lanyon SR, Hill FI, Reichel MP, Brownlie J. Bovine viral diarrhoea: pathogenesis and diagnosis. Vet. J. 2014;199(2):201-9.

Liebler-Tenorio EM, Ridpath JF, Neill JD. Distribution of viral antigen and development of lesions after experimental infection of calves with a BVDV 2 strain of low virulence. J. Vet. Diagn. 2003;15 (3): 221-32.

Liess B, Orban S, Frey HR, Trautwein G, Wiefel W, & Blindow, H. Studies on transplacental transmissibility of a Bovine Virus Diarrhoea (BVD) vaccine virus in cattle 1: II. Inoculation of pregnant cows without detectable neutralizing antibodies to BVD virus 90–229 days before parturition (51st to 190th day of gestation). Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B. 1984;31(110):669-81.

Liess B. Significance of immune tolerance for the pathogenesis of bovine virus diarrhea. Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift. 1985;98:420.

Lindberg A, Houe H. Characteristics in the epidemiology of bovine viral diarrhea virus (BVDV) of relevance to control. Prev. Vet. Med. 2005;72:55–73 https://doi.org/10.1016/j.prevetmed. 2005.07.018.

Liu L, Xia H, Wahlberg N, Belák S, Baule C. Phylogeny. classification and evolutionary insights into pestiviruses. Virology. 2009;385(2):351–7.

Maldonado N, Fredericksen F, Espineira C, Toledo C, Oltra J, La Barra V, et al. BVDV-1 induces interferon-beta gene expression through a pathway involving IRF1, IRF7, NF-B kappa activation. Mol Immunol. 2020;128:33–40. doi: 10.1016/j.molimm.2020.09.018.

Malmquist WA. Bovine viral diarrhea-mucosal disease: Etiology, pathogenesis, and applied immunity. J Am Vet Med Assoc. 1968:763–8.

McClurkin A, Littledike E, Cutlip R, Frank G, Coria M, Bolin S. Production of cattle immunotolerant to bovine viral diarrhea virus. Can. j. comp. med. 1984;48:156.

Meyers G, Thiel HJ. Molecular characterization of pestiviruses. Adv. Virus Res. 1996;47:53–118.

Mingala C, Konnai S, Tajima M, Onuma M, Ohashi K. Classification of new BVDV isolates from Philippine water buffalo using the viral E2 region. J. Basic Microbiol. 2009; 49(5):495-500.

Mishra N, Rajukumar K, Pateriya A, Kumar M, Dubey P, Behera SP, Verma A, Bhardwaj P, Kulkarni DD, Vijaykrishn D, Reddy ND. Identification and molecular characterization of novel and divergent HoBi-like pestiviruses from naturally infected cattle in India, Vet. Microbiol. 2014;174(1–2):239–46.

Murphy FA, Gibbs EPJ, Horzinek MC, Studdert MJ. Veterinary Virology, 3rd Edition, Elsevier. 1999.

Odeon AC, Kelling CL, Marshal DJ, Estela ES, Dubovi EJ, Donis RO. Experimental infection of calves with bovine viral diarrhea virus genotype II (NY-93). J. Vet. Diagn. Invest. 1999;11:221–8.

Oguzoglu TÇ, Muz D, Yılmaz V, Alkan F, Yılmaz A, Burgu İ. Molecular characterization of Bovine virus diarrhea viruses species 2 (BVDV-2) from cattle in Turkey. Trop Anim Health Prod. 2010;42:1175–80. DOI 10.1007/s11250-010-9544-z

Oğuzoğlu TC, Muz D, Yılmaz V, Timurkan MÖ, Alkan F, Akça Y, Burgu İ. Molecular characteristics of bovine virus diarrhoea virus 1 isolates from Turkey: approaches for an eradication programme. Transbound Emerg Dis. 2012;59(4):303–10.

Oğuzoğlu TC, Koç BT, Coşkun N, Doğan F, Yelken SD. Endless variety for bovine virus diarrhea viruses: new members of a novel subgroup into Pestivirus A from Turkey. Trop. Anim. Health Prod. 2019;51:1083–7.

Olafson P, MacCallum A ve Fox F. An apparently new transmissible disease of cattle. He Cornell Veterinarian. 1946;36:205-13.

Öncül S, Merıç I, Korkut F. First incidence of mucosal disease in Turkey observed among cattle at Lalahan Animal Breeding Research Institute: Clinical Aspects, J Anim Breed Rest Inst. 1964;4:186-99.

Özel M. Yenidoğan buzağılarda ve annelerinde infectious bovine rhinotracheitis (IBR) ve bovine viral diarrhoea (BVD) enfeksiyonlarının serolojik olarak araştırılması. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Viroloji Anabilim Dalı. Yüksek lisans tezi, Afyon: Afyon Kocatepe Üniversitesi. 2008.

Perrin B, Calvo T, Cordioli P, Coudert M, Edwards S, Eloit M ve Thibier M. Selection of European Union standard reference sera for use in the serological diagnosis of infectious bovine rhinotracheitis. Rev Sci Tech. 1994;13:947.

Ramsey FK, Chivers WH. Mucosal disease of cattle. North American Veterinarian. 1953;34:629-33.

Reichel M, Hill F, Voges H. Does control of bovine viral diarrhoea infection make economic sense? N Z Vet J. 2008;56(2):60-6.

Ridpath J. Practical significance of heterogeneity among BVDV strains: impact of biotype and genotype on U.S. control programs. Prev. Vet. Med. 2005;72(1-2):17-30.

Ridpath JF, Bolin SR, Dubovi EJ. Segregation of bovine viral diarrhea virus into genotypes. Virology. 1994;205:66–74.

Ridpath JF, Fulton RW, Kirkland PD, Neil JD. Prevalence and antigenic differences observed between bovine viral diarrhea virus subgenotypes isolated from cattle in Australia and feedlots in the southwestern United States. JVDI. 2010a;22: 184–91.

Ridpath JF. Bovine viral diarrhea virus: global status. Vet. Clin. North AAM. Food Anim. 2010b;26(1):105-21.

Rodning SP, Marley MSD, Zhang Y, Eason AB, Nunley CL, Walz PH, & Givens MD. Comparison of three commercial vaccines for preventingpersistent infection with bovine viral diarrhea virus. Theriogenology. 2010;73(8):1154-63.

Sandvik T. Laboratory diagnostic investigations for bovine viral diarrhoea virus infections in cattle. Veterinary microbiology. 1999;64:123-34.

Sanger F. He Croonian Lecture. Nucleotide sequences in DNA. Proc R Soc Lond B Biol Sci. 1975;191(1104):317-33. doi: 10.1098/rspb.1975.0131. PMID: 2920.

Sarikaya B, Azkur AK, Gazyagci S, Aslan ME. Genetic variability of bovine viral diarrhea virus in the 5 0UTR in the Central Anatolia of Turkey. Acta Scientiae Veterinariae, 2012;40 (1), 1013

Schweizer M, Mätzener P, Pfaffen G, Stalder H ve Peterhans E. "Self" and "nonself" manipulation of interferon defense during persistent infection: bovine viral diarrhea virus resists alpha/beta interferon without blocking antiviral activity against unrelated viruses replicating in its host cells. J. Virol. 2006;80(14):6926-35.

Selvaraj J, Manohar B, Murali Balachandran C, Mishra N, Pradhan HK. Seroprevalence of bovine viral diarrhoea in buffaloes at Channai. Indian J. Vet. Pathol. 2007;31:2.

Simmonds P, Becher P, Bukh J, Gould EA, Meyers G, Monath T, Muerhoff S, Pletnev A, Smith DB, RicoHesse R, and Stapleton JT. ICTV virus taxonomy profile: Flaviviridae. J. Gen. Virol. 2017;98(1):2–3.

Smith LM, Sanders JZ, Kaiser RJ, Hughes P, Dodd C, Connell Charles R, Heiner Cheryl K, Stephen BH, Hood, Leroy E. "Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis". Nature. 1986;321(6071):674-9. doi:10.1038/321674a0. PMID 3713851.

Solis-Calderon JJ, Sequra-Correra VM, Sequra-Correra JC. Bovine Viral Diarrhoea Virus in beef cattle herds of Yucatan, Mexico: Seroprevalence and risk factors. Prev. Vet. Med. 2005;72:253-62.

Stetson DB ve Medzhitov R. Type I interferons in host defense. Immunity. 2006;25(3):373-81.

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Mol. Biol. Evol. 2013;30:2725–9.

Tautz N, Thiel H. Cytopathogenicity of pestiviruses: cleavage of bovine viral diarrhea virus NS2-3 has to occur at a defined position to allow viral replication. Arch. Virol. 2003;148(7):1405-12.

Timurkan MÖ. Aydın H. Increased genetic diversity of BVDV strains circulating in Eastern Anatolia, Turkey: first detection of BVDV-3 in Turkey. Trop Anim Health Prod. 2019;51:1953–61. https://doi.org/10.1007/s11250-019-01901-6.

Tütüncü H. Samsun ilinde bovine viral diarrhea virus ile enfekte sığırların araştırılması Yüksek lisans tezi. Samsun: Ondokuz Mayıs Üniversitesi. 2016.

Vilcek S, Durkovic B, Kolesárová M, Greiser-Wilke I, Paton D. Genetic diversity of international bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates: identification of a new BVDV-1 genetic group. Vet. Rest. 2004;35(5):609-15.

Vilcek S, Herring A, Herring J, Nettleton P, Lowings J, Paton D. Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. Arch. Virol. 1994;136:309–23.

Vilček Š, Paton DJ, Durkovic B, Strojny L, Ibata G, Moussa A, Palfi V. Bovine viral diarrhoea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups. Arch. Virol. 2001;146(1):99-115.

VilcekS, Nettleton PF, Paton DJ, Belak S. Molecular characterization of ovine pestivir uses. J. Gen. Virol. 1997;78:725-35.

Walz PH, Chamorro MF, S MF, Passler T, Van Der Meer F, A, et al. Bovine viral diarrhea virus: an updated American college of veterinary internal medicine consensus statement with focus on virus biology, hosts, immunosuppression, and vaccination. J Vet Intern Med. 2020; 34:1690–706. doi: 10.1111/jvim.15816.

Weiss M, Hertig C, Strasser M, Vogt H, Peterhans E. Bovine virus diarrhea/mucosal disease: a review. Schweizer Archiv fur Tierheilkunde. 1993;136:173-85.

Xue W, Mattick D, Smith L, Maxwell J. Fetal protection againstbovine viral diarrhea virus types 1 and 2 afterthe use of a modified-live virusvaccine. Can. J. Vet. Res. 2009;73:292–7.

Yazıcı Z, Serdar M.S, Gümüşova S, Albayrak H. Molecular diagnosis andseroepidemiology of pestivirus in sheep. Vet. Arhiv. 2012;82:35-45.

Yeşilbağ K, Forster C, Ozyigit MO, Alpay G, Tuncer P, Thiel HJ, Koning M. Characterisation of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates from an outbreak with haemorrhagic enteritis and severe pneumonia. Vet Microbiology. 2014;169(1-2):42-9.

Yeşilbağ K, Förster C, Bank-wolf B, Yılmaz Z, Alkan F, Ozkul A, Burgu I, Cedello R, Thiel H ve König M. Genetic heterogeneity of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates from Turkey: Identification of a new subgroup in BVDV-1. Vet. Microbiol. 2008;130:258-67.

Yeşilbağ K, Alpay G, Becher P. Variability and global distribution of subgenotypes of bovine viral diarrhea virus. Viruses, 2017;9 (6),e128.

Yıldırım Y, Burgu İ. Kuzeydoğu Anadolu bölgesindeki sığırlarda mavidil (BT), IBR, PI-3, EBL ve BVD enfeksiyonlarının seroprevalansı. Ankara Üniv Vet Fak Derg. 2005;52:113-7.

Yıldırım Y, Yilmaz V, Kalaycioglu A, Bilge Dağalp S, Babaoğlu (Faraji) AR, Çelebi O, Akça D. An investigation of a possible involvement of BVDV, BHV-1 and BHV-4 infections in abortion of dairy cattle in Kars district of Turkey. Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg. 2011;17:879-83.

Yıldız H, Babaoglu AR, Molecular Investigation of Bovine Viral Diarrhea Virus, Bovine Herpes Virus-1 and Bovine Herpes Virus-4 Infections in Abortion Cases of Cattle in Van District, Turkey. Van Vet J. 2022;33(3):106-11.

Yılmaz H, Altan E, Ridpath J, Turan N. Genetic diversity and frequency of bovine viral diarrhea virus (BVDV) detected in cattle in Turkey. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 2012;35:411–6.

ÖZGEÇMİŞ

EK 1. Etik Kurul Raporu

EK-2. Tez Orijinallik Formu