



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**RUMİNANLARI ENFEKTE EDEN PESTİVİRUSLARIN
AYIRICI TANISI VE MOLEKÜLER
KARAKTERİZASYONU**

Onur ÜLGENALP

**VİROLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Tuba Çiğdem OĞUZOĞLU**

**ANKARA
2022**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**RUMİNANTLARI ENFEKTE EDEN PESTİVİRUSLARIN
AYIRICI TANISI VE MOLEKÜLER
KARAKTERİZASYONU**

Onur ÜLGENALP

**VİROLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. Tuba Çiğdem OĞUZOĞLU

**Bu araştırma Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü'nün
TAGEM/HSGYAD/A/21/A5/P1/2692 proje numarası ile desteklenmiştir**

ANKARA

2022

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Doktora Tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Ruminantları Enfekte Eden Pestivirusların Ayırıcı Tanısı ve Moleküler Karakterizasyonu” başlıklı tez; 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.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Onur ÜLGENALP

Tarih:

İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Viroloji Anabilim Dalında Onur ÜLGENALP tarafından hazırlanan
“Ruminantları Enfekte Eden Pestivirusların Ayırıcı Tanısı ve Moleküler
Karakterizasyonu” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ
olarak OY BİRLİĞİ / OY ÇOKLUĞU ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 16.05.2022

İmza

Prof. Dr. Hakan YARDIMCI

Ankara Üniversitesi

Jüri Başkanı

İmza

Prof. Dr. Seval BİLGE DAĞALP

Ankara Üniversitesi

Raportör

İmza

Prof. Dr. Tuba Çiğdem OĞUZÖĞLU

Ankara Üniversitesi

Üye

İmza

Prof. Dr. Mehmet Tolga TAN

Adnan Menderes Üniversitesi

Üye

İmza

Prof. Dr. Veysel Soydal ATASEVEN

Mustafa Kemal Üniversitesi

Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır

İmza

Prof. Dr. Fügen AKTAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vii
Simgeler ve Kısaltmalar	ix
Şekiller	xi
Çizelgeler	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Genel Bilgiler	1
1.2. Amaç ve Kapsam	3
1.3.1. Tarihçe	4
1.3.2. Etiyoloji	8
1.3.2.1. Genomik Organizasyon	9
1.3.2.2. Yapısal ve Yapısal Olmayan Proteinler	11
1.3.3. Pestiviruslarda Hücreye Bağlanma ve Giriş	14
1.3.4. Pestivirus Replikasyon Siklusu	14
1.3.5. Genetik ve Antijenik Çeşitlilik	16
1.3.5.1. Pestivirus A'nın Genetik ve Antijenik Çeşitliliği	17
1.3.5.2. Pestivirus B'nin Genetik ve Antijenik Çeşitliliği	17
1.3.5.3. Pestivirus H'nin Genetik ve Antijenik Çeşitliliği	19
1.3.5.4. Pestivirus D'nin Genetik ve Antijenik Çeşitliliği	19
1.3.6. Türler Arası Geçiş	20
1.3.7. Patogenez	21
1.3.8. Klinik	22
1.3.8.1. Bulaşma	22

1.3.8.2. Enfeksiyon	24
1.3.8.2.1. Akut Enfeksiyon	24
1.3.8.2.3. Persiste Enfeksiyon	25
1.3.8.2.4. Mukozal Hastalık	25
1.3.8.2.5. Klinik Belirtiler	26
1.3.8.3. Bağışıklık ve İmmunosupresyon	27
1.3.9. Tanı	28
1.3.9.1. Konvansiyonel Yöntemler	28
1.3.9.1.1. Virus İzolasyonu	28
1.3.9.1.2. Antijen ELISA	29
1.3.9.1.3. Virus Nötralizasyon Testi (VNT)	29
1.3.9.2. Moleküler Yöntemler	30
1.3.9.2.1. Reverse Transcriptase Polimerase Chain Reaction (RT-PCR)	30
1.3.9.2.2. Gerçek Zamanlı RT-PCR	30
1.3.9.2.3. Dizileme ve Yeni Nesil Dizileme	31
1.3.10. Önleme ve Kontrol	31
2. GEREÇ VE YÖNTEM	33
2.1. Gereç	33
2.1.1. Materyal	33
2.1.2. Hücre ve Referans Viruslar	35
2.1.3. Kimyasal Maddeler ve Sarf Malzemeleri	35
2.1.4. Ticari Kitler	36
2.1.5. Cihazlar	36
2.2. Yöntem	37
2.2.1. Kan Numunelerinin Hazırlanması	37
2.2.2. Organ ve Doku Numunelerinin Hazırlanması	37
2.2.3. Hücre ve Referans Virusların Hazırlanması	37
2.2.4. Pestivirus Antijen ELISA Testi	38
2.2.5. Viral Nükleik Asit İzolasyonu	40
2.2.6. Komplementer Deoksiribo Nükleik Asit (cDNA) Sentezi (ReverseTranscription-RT)	41

2.2.7. Polimeraz Chain Reaction (PCR)	42
2.2.7.1. 5'UTR Gen bölgesine Yönelik PCR Ürün Eldesi	42
2.2.7.2. NS2-3 Gen bölgesine Yönelik PCR Ürün Eldesi	42
2.2.7.3. Npro Gen bölgesine Yönelik PCR Ürün Eldesi	43
2.2.7.4. E Gen Bölgesine Yönelik PCR Ürün Eldesi	44
2.2.8. PCR Ürünlerinin Görüntülenmesi	45
2.2.9. Amplikonların Purifikasyonu	45
2.2.10. Dizileme Analizi	47
2.2.11. Moleküler Karakterizasyon ve Filogenetik Ağaç Oluşturulması	47
3. BULGULAR	48
4. TARTIŞMA	71
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	88
ÖZET	91
SUMMARY	92
KAYNAKLAR	93
EKLER	91
Ek-1 Etik Kurul Raporu	108
Ek-2 Doktora Tezinin Çalışılmasına Tarım ve Orman Bakanlığı Onayı	109
Ek-3 Tez çalışmasında elde edilen dizinlere ait GenBank'tan alınan accession numaraları	110
ÖZGEÇMİŞ	112

ÖNSÖZ

Pestiviruslar, büyükbaş hayvanlarda Bovine Virus Diarrhoea Virusu (BVDV) ve küçük ruminantlarda Border Disease Virusu (BDV) olmak üzere klasik viral taksonomide adlandırılmış olup, hidraensafalopati, serebellar hipoplazi, arthrogripozis ve anormal tüy yapısı gibi çok çeşitli konjenital anomalilerle karakterize hastalık tablosu oluşturan viral etkenler arasında yer almaktadırlar. Pestivirus enfeksiyonlarının varlığı ve yaygınlığı, büyükbaş ve küçükbaş hayvan yetiştiriciliği yapılan birçok ülkede bildirilmiş olup ulusal ve uluslararası mücadele programları yürütülmektedir. Bu programların yürütülmesinde persiste enfekte bireylerin tanısı temel oluşturmakta, ülkede persiste enfekte hayvan bulunduran işletmelerinin sayısını belirlemek için en uygun tanı metodu tercih edilerek taramalar yapılmaktadır. Tanı metodu seçilirken, Pestivirusların türler arası geçişi ve zengin çeşitliliği göz önünde bulundurulmaktadır.

Ülkemizde Pestivirus enfeksiyonlarına ilişkin halen sürdürülmekte olan bir mücadele programı olmamakla birlikte, söz konusu enfeksiyonların varlığı ve yaygınlığına dayalı araştırmalar mevcuttur. Büyük ve küçükbaş hayvan yetiştiriciliğinin birlikte yapıldığı işletmelerde pestivirusların türler arası geçiş olasılığı sebebiyle farklı pestiviruslarla enfeksiyon riski de söz konusu olabilmektedir. Bu bağlamda ayırıcı tanı önem kazanmaktadır. Bu noktadan hareketle, planlanan bu doktora tez çalışmasında Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsüne sığır, koyun ve keçi sürülerinden gelen kan örneklerinde, antijen ve nükleik asit tespitine dayalı test metodları kullanılarak Pestivirus enfeksiyonlarının ayırıcı teşhisinin yapılması hedeflenmiştir. Ayırıcı teşhiste sekans verilerinin filogenetik olarak karşılaştırılması yapılacaktır. Bu çalışma sonucunda elde edilecek bulgular pestivirus mücadele ve kontrol programlarının geliştirilebilmesine kaynak teşkil edebilecektir.

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı Laboratuvarlarını kullanım izni veren ve akademik olarak her türlü desteğini esirgemeyen Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Aykut ÖZKUL'a, tez çalışmalarım dahil akademik hayata geçtiğim günden bu yana bana yol gösteren, desteklerini ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Tuba Çiğdem OĞUZOĞLU'na, lisansüstü eğitimim süresince yardımlarını esirgemeyen değerli Viroloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri, Prof. Dr. Feray ALKAN, Prof. Dr. Seval BİLGE DAĞALP, Prof. Dr. Mehmet Taner KARAOĞLU ve Doç.Dr. A. ZEYNEP AKKUTAY-YOLDAR'a; emekli öğretim üyesi Prof. Dr. Yılmaz AKÇA'ya, ayrıca tez izleme komitesi ve tez savunma sınavı jüri üyeleri Prof. Dr. Hakan YARDIMCI, Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Mehmet Tolga TAN ve Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Veysel Soydal ATASEVEN'e; Doç Dr. B. Taylan KOÇ'a, tez çalışmam sırasında moleküler biyoloji konusunda destek olan Dr. Aytül YILDIRIM'a, ayrıca doktora eğitimim boyunca beraber mesai paylaştığım PVKE Moleküler Genetik ve Viral Teşhis Laboratuvarı çalışanlarına; Ankara Üniversitesi Viroloji Anabilim Dalının tüm araştırma görevlileri ile lisansüstü öğrencilerine ve idari personeline, tezimin maddi olanaklarını sağladıklarından dolayı TAGEM ve Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü'ne, sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak yanımda fiziken olmasalar da manevi olarak her zaman yanımda olduklarını hissettiğim, her saniye özlediğim, hayat denen bu zorlu yolda ilerlemem için bana şans veren, erken ölümleriyle açtıkları boşluğu hiç birşeyle dolduramadığım, ANNEM ve BABAM'a sevgileri için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

SİMGELER VE KISALTMALAR

UTR	Untranslated Region
ORF	Open Reading Frame
cp	Sitopatik
ncp	Sitopatik olmayan
PI	Persiste Enfeksiyon
BVDV	Bovine Viral Diarrhea Virus
BDV	Border Disease Virus
CSFV	Classical Swine Fever Virus
PVKE	Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
Ag	Antijen
bp	Baz çifti, Base Pair
Ca	Kalsiyum
gp	Glikoprotein
IL	İnterleukin
kb	Kilobaz
µl	Mikrolitre
ml	Mililitre
DNA	Deoksiribo-Nükleik-Asit
cDNA	Komplementer Deoksiribo-Nükleik-Asit Phosphat
PBS	Buffer Saline
PCR	Polimerase Chain Reaction
RNA	Ribo-Nükleik-Asit
RT-PCR	Reverse Transcription Polimerase Chain Reaction
TAE	Tris Asetat Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
OD	Optik Dansite

PK	Pozitif Kontrol
NK	Negatif Kontrol
MgCl	Magnezyum Klorür
SPPase	Sinyal Peptidi Peptidazı
SPase	Hücrel Sinyal Peptidazı
N ^{pro}	N-Terminal Otoproteaz
ICTV	Uluslararası Virus Taksonomi Komitesi
MD	Mukozal Hastalık
GAG	Glikozaminoglikanlara
C	Kapsid Proteinini
MDBK	Madin-Darby Bovine Kidney
SFT-R	Sheep Fötal Thymus

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. <i>Pestivirus B</i> türlerinin dünya üzerindeki coğrafi dağılımı.	7
Şekil 1.2. <i>Pestivirus D</i> türlerinin dünya üzerindeki coğrafi dağılımı.	7
Şekil 1.3. Pestiviral partikülün bir diyagramı.	8
Şekil 1.4. Pestiviral partiküllerin elektron mikroskopik görüntüsü.	9
Şekil 1.5. Pestivirus genom yapısı.	10
Şekil 1.6. Pestivirusların replikasyon döngüsünün şematik gösterimi.	15
Şekil 3.1. MDBK hücre kültürü ışık mikroskobu görüntüsü	48
Şekil 3.2. SFT-R hücre kültürü ışık mikroskobu görüntüsü	
Şekil 3.3. Poliklonal pestivirus antikorları kullanılarak hazırlanan peroksidaz konjugatı ile yapılan PLA testi görüntüleri.	49
Şekil 3.4. Sırasıyla Moredun ve NADL suşları post inokulasyon üçüncü gündeki CPE görüntüleri.	49
Şekil 3.5. Pozitif oldukları saptanan örneklerden 5'UTR gen bölgesi hedeflenerek elde edilen amplikonların (288 bp) elektroforez işlemi sonucu elde edilmiş görüntüleri.	53
Şekil 3.6. Pozitif oldukları saptanan örneklerden NS2-3 gen bölgesi spesifik amplikonların (402 ve 672 bp) elektroforez görüntüleri.	53
Şekil 3.7. Pozitif oldukları saptanan örneklerden E gen bölgesi spesifik amplikonların (1179 bp) sekans öncesi elektroforezde elde edilmiş görüntüleri.	54
Şekil 3.8. Pozitif oldukları saptanan örneklerden N ^{pro} gen bölgesi hedeflenerek elde edilen amplikonların (412 bp) elektroforez işlemi sonucu elde edilmiş görüntüleri.	54
Şekil 3.9. 5'UTR gen bölgesine ait sekans analizlerinin GenBank'tan elde edilen referans dizinlerle karşılaştırılmasına ait filogenetik ağaç.	55
Şekil 3.10. NS2-3 gen bölgesine ait sekans analizlerinin GenBank'tan elde edilen referans dizinlerle karşılaştırılmasına ait filogenetik ağaç.	56
Şekil 3.11. N ^{pro} gen bölgesine ait sekans analizlerinin GenBank'tan elde edilen referans dizinlerle karşılaştırılmasına ait filogenetik ağaç.	57
Şekil 3.12. E2 gen bölgesine ait sekans analizlerinin GenBank'tan elde edilen referans dizinlerle karşılaştırılmasına ait filogenetik ağaç.	58
Şekil 3.13. Pestivirus D tespit edilmiş dört adet örneğin 5'UTR gen bölgesine ait sekans analizlerinin GenBank'tan elde edilen Pestivirus D alt türlerinin referans dizinleri ile karşılaştırılmasına ait filogenetik ağaç.	59

Şekil 3.14. Pestivirus B tespit edilmiş bir adet örneğin 5'UTR gen bölgesine ait sekans analizlerinin GenBank'tan elde edilen Pestivirus B alt türlerinin referans dizinleri ile karşılaştırılmasına ait filogenetik ağaç.	60
Şekil 3.15. Pestivirus 5'UTR geni baz alınarak yapılan <i>Pestivirus A</i> suşların birbirlerine olan uzaklığının gösterildiği matrix tablosu (SDT Viral sequence nucleotide identity v1.2)	61
Şekil 3.16. Pestivirus 5'UTR gen bölgesi yönünden <i>Pestivirus A</i> suşlarının nükleotid benzerlik tablosu (MatGat 2.0)	61
Şekil 3.17. Pestivirus 5'UTR sekansları yönünden <i>Pestivirus B</i> suşlarının nükleotid benzerlik tablosu (MatGat 2.0)	62
Şekil 3.18. Pestivirus 5'UTR sekansları baz alınarak yapılan <i>Pestivirus B</i> suşların birbirlerine olan uzaklığının gösterildiği matrix tablosu (SDT Viral sequence nucleotide identity v1.2)	62
Şekil 3.19. Pestivirus 5'UTR sekansları yönünden <i>Pestivirus D</i> suşlarının nükleotid benzerlik tablosu (MatGat 2.0)	63
Şekil 3.20. Pestivirus 5'UTR sekansları baz alınarak yapılan <i>Pestivirus D</i> suşların birbirlerine olan uzaklığının gösterildiği matrix tablosu (SDT Viral sequence nucleotide identity v1.2)	63
Şekil 3.21. Pestivirus 5'UTR sekansları yönünden <i>Pestivirus I</i> suşlarının nükleotid benzerlik tablosu (MatGat 2.0)	64
Şekil 3.22. Pestivirus 5'UTR baz alınarak yapılan <i>Pestivirus I</i> suşların birbirlerine olan uzaklığının gösterildiği matrix tablosu (SDT Viral sequence nucleotide identity v1.2)	64
Şekil 3.23. NS2-3 gen bölgesine ait sekans analizlerinin GenBank'tan elde edilen referans dizinlerle (NADL cp, NADL ncp) nükleik asit karşılaştırılması.	65
Şekil 3.24. N ^{pro} gen bölgesine ait sekans analizlerinin GenBank'tan elde edilen referans dizinlerle nükleik asit karşılaştırılması.	65
Şekil 3.25. E gen bölgesine ait sekans analizlerinin GenBank'tan elde edilen referans dizinlerle nükleik asit karşılaştırılması.	66
Şekil 3.26. Tespit edilen Pestivirus türlerinin ve alt türlerinin yüzdelik dağılımı.	66
Şekil 3.27. Pestivirus tespit edilen örneklerin orjin aldıkları hayvan türlerinin yüzdelik dağılımı.	67
Şekil 3.28. Ülkemiz orjinli hayvanlardan elde edilen pozitif numunelerin (n=43) toplandığı iller ve örnek sayıları.	67

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Uluslararası Virus Taksonomi Komitesi (ICTV)'nin genel Pestivirus taksonomisi	5
Çizelge 1.2. Hayvan türleri bazında tespit edilen Pestivirus türlerinin tablosu	5
Çizelge 1.3. Ülkeler bazında bildirilen Pestivirus türleri.	18
Çizelge 1.4. Ülkeler bazında tespit edilen <i>Pestivirus D</i> suşlarının tablosu.	20
Çizelge 2.1. Elde edilen tüm numunelerin hayvan türü, numune şekli ve lokasyon bilgileri.	34
Çizelge 2.2. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve Sarf Malzemeleri	35
Çizelge 2.3. Çalışmada kullanılan ELISA, ekstraksiyon ve PCR kitleri	36
Çizelge 2.4. Çalışmada kullanılan cihazlar listesi.	36
Çizelge 2.5. cDNA eldesi için kullanılan bileşenler ve ısı protokolü.	41
Çizelge 2.6. 5'UTR gen bölgesi için RT-PCR tekniğinde kullanılan primer setleri.	42
Çizelge 2.7. 5'UTR gen bölgesi için RT-PCR tekniğinde kullanılan bileşenler ve ısı protokolü.	42
Çizelge 2.8. NS2-3 gen bölgesi için RT-PCR tekniğinde kullanılan primer setleri.	43
Çizelge 2.9. NS2-3 gen bölgesi için RT-PCR tekniğinde kullanılan bileşenler ve ısı protokolü.	43
Çizelge 2.10. Npro gen bölgesi için RT-PCR tekniğinde kullanılan primer setleri.	44
Çizelge 2.11. Npro gen bölgesi için RT-PCR tekniğinde kullanılan bileşenler ve ısı protokolü.	44
Çizelge 2.12. E gen bölgesi için RT-PCR tekniğinde kullanılan primer setleri.	44
Çizelge 2.13. E gen bölgesi için RT-PCR tekniğinde kullanılan bileşenler ve ısı protokolü.	45
Çizelge 3.1. Numunelerden elde edilen ekstraktlarda bulunan nükleik asit miktarı	50
Çizelge 3.2. Ekstraktlardan elde edilen cDNA'ların nükleik asit miktarı	51
Çizelge 3.3. Pozitif numunelerin hayvan türü, materyal türü, lokasyon bilgileri, Antijen ELISA ve RT-PCR test sonuçları.	52
Çizelge 3.4. Elde edilen verilerin görsel özeti	68

1. GİRİŞ

1.1. Genel Bilgiler

Pestiviruslar, büyük (Bovine Virus Diarrhoea Virusu-BVDV) ve küçük ruminantlarda (Border Disease Virusu-BDV), döl verimi ve sürü sağlığı yönünden önem arz eden, abort, konjenital anomali ve yaşama gücü zayıf yavru doğumları ile karakterize ekonomik kayıplara sebep olan viral etkenler arasında yer almaktadırlar. Pestivirus enfeksiyonlarının varlığı ve yaygınlığı, dünyada birçok ülkede bildirilmiş olup; *Office International des Epizooties* (OIE), yeni adıyla *World Organization of Animal Health* listesinde yer alan bu enfeksiyöz ajanlarla ulusal ve uluslararası mücadele programları yürütülmektedir (OIE, 2017). Bu programların yürütülmesinde persiste enfekte bireylerin tanısı temel oluşturmaktadır. Bu amaçla ülkede persiste enfekte hayvan bulunduran işletmelerinin sayısını belirlemek için en uygun tanı metodu tercih edilerek taramalar yapılmaktadır. Tanı metodu tercihi yapılırken, Pestivirusların türler arası geçiş özelliği ve zengin çeşitliliği göz önünde bulundurulmaktadır. Bu doktora tez çalışmasında OIE tarafından gold standart olarak belirlenmiş iki tanı metodu olan antijen ELISA ve RT-PCR teknikleri enfeksiyonun laboratuvarında direkt tanısı için tercih edilmiştir. Ayrıca pestivirusların türler arası geçiş özellikleri nedeniyle hem büyükbaş hem de küçükbaş ruminant örnekleri test edilerek, enfeksiyona neden olan farklı pestivirusların tür bazında ruminantlar arasında aktarımı hakkında bilgi sahibi olunması hedeflenmiştir.

Bu doktora tezi ülkemizde bulunan ruminant türlerinde klinik/subklinik enfeksiyonlara neden olan pestivirus enfeksiyonlarından Bovine Viral Diarrhoea - Mucosal Disease (BVD-MD) ve Border Disease (BD) enfeksiyonlarının moleküler metotlarla araştırılmasına yönelik olup, elde edilen bulgular, uygulanan tanı metodu, türleri baz alınarak sorgulanmış, ayrıca pozitif örnekler filogenetik olarak da karakterize edilmiştir. Çalışmada, ruminant kökenli Pestivirusların moleküler

karakterizasyonunda Pestivirus genomunun *5'UTR*, *N^{pro}*, *E* ve *NS2-3* bölgelerinden köken alan primerler kullanılarak; ülkemizin Marmara Bölgesi'nden elde edilen suşlar, dünyada ve Türkiye'de tespit edilen suşlarla karşılaştırılmıştır. Tez çalışması; Tarım ve Orman Bakanlığı Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Etik Kurulu'nun 02.07.2019 tarih ve 11/2019 (Ek-1) sayılı izni ile yapılmıştır.



1.2. Amaç ve Kapsam

Pestivirüsler; ekonomik kayıplara neden olmaları sebebiyle hayvancılık endüstrisinde önemli bulaşıcı patojenler olarak kabul edilirler. Klasik sınıflandırmada sığırları enfekte eden pestivirüsler Bovine Virus Diarrhoea Virus (BVDV), küçük ruminantları enfekte edenler ise Border Disease Virus (BDV) olarak adlandırılmaktayken; gelişen moleküler teknikler ile aslında BD virüslerinin sığırları enfekte edebildiği, aynı şekilde BVD virüslerinin de koyun ve keçilerden izole edilebildiği görülmüştür.

Avrupa Birliği ülkeleri başta olmak üzere özellikle sığırlardaki pestivirüs enfeksiyonlarının kontrolü için aşılama ve mücadele programları yürürlükte olmasına rağmen, bu patojenlerin spesifik olarak kazandıkları hayatta kalma stratejilerinden dolayı güçlüklerle karşılaşmaktadır. Bu güçlüklerden en önemlisi, pestivirüslerin transplasental enfeksiyon sonrası duyarlı konakçı hayvanlarda persiste enfeksiyon oluşturma yetenekleridir. Enfeksiyonun doğal rezervuarı olan bu persiste enfekte (PI) hayvanlar yaşamları boyunca virüs saçarlar. Bu şekilde enfeksiyonun sürü içerisinde ve sürüler arasında yayılmasına neden olurlar. Birçok ülkede kullanılan kontrol programlarının temelinde, PI hayvanların tespiti ve sürüden çıkarılması zorunludur. PI hayvanların erken aşamada, özellikle doğumdan hemen sonra tespiti Pestivirüs enfeksiyonlarının kontrol programlarının uygulanmasında önemli yarar sağlar. Bu aşamada laboratuvar tanı oldukça önemlidir. Bu bağlamda bu tez çalışması;

- Ülkemizde sirküle olan pestivirüs enfeksiyonlarının laboratuvar tanısını,
- Pozitifliği tespit edilen bireylerdeki enfeksiyonun klinik döneminin (akut/persiste) belirlenmesini,
- Moleküler teknikler kullanılarak saha örneklerindeki pestivirüs türleri ve alt tiplerinin belirlenmesini,
- Türler arası (sığır/koyun/keçi vb ruminantlar) geçiş potansiyellerinin aydınlatılmasını hedeflemektedir.
- Elde edilen verilerin; pestivirüs enfeksiyonlarıyla kontrol ve mücadelede kullanılacak stratejilerin belirlenmesine yardımcı veri tabanını oluşturması amaçlanmıştır.

1.3.1. Tarihçe

Ruminant pestivirusları arasında en baskın tür olan *Pestivirus A* ilk olarak 1946 yılında Cornell Üniversitesi'nde araştırmacı olan Olafson ve ark. (1946) tarafından “Görünüşe göre bulaşıcı yeni bir sığır hastalığı” adı altında yaptıkları yayın ile tüm dünyaya duyurulmuştur. Sürüdeki az sayıda hayvanda rastlanan, ama yüksek mortaliteyle seyreden ishal ile karakterize bu hastalık, başlangıçta “X-disease” olarak adlandırılmış, 1963 yılında Pitchard tarafından yapılan incelemelerde mukozal hastalığın (MD) ilk tanımı yapılmıştır (Childs, 1946; Pritchard, 1963). Ramsey ve Chivers (1953), ABD’de tespit edilen MD’yi rapor etmiş ve hastalığa adını vermiştir. 1957’de akut sığır ishal hastalığından (BVD) izole edilen viral ajanın hücre kültüründe sitopatolojiye neden olmadığı keşfedilmiştir (Lee ve Gillespie, 1957). Aynı yıl içerisinde, sitopatik etki oluşturan bir virus MD’li bir vakadan izole edilmiş, o dönemlerde BVD’ye neden olandan farklı bir virusun MD’ye sebep olduğu düşünülmüştür (Underdahl ve ark., 1957). Referans suşlardan kabul edilen NY-1 suşu ve BVD vakalarından iki sitopatik olmayan virusun izole edilmesinden sonra (Lee ve Gillespie, 1957), Gillespie ve ark., (1960) Oregon C24V olarak adlandırılan BVDV’nin sitopatik bir suşunun ilk izolasyonu bildirilmiştir. Sitopatik suşların keşfi, serum nötralizasyonu ve plak nötralizasyon deneylerinin gelişmesine izin vermiştir (Gillespie ve ark., 1962; Kniazeff ve ark., 1961 ve Thomson ve Savan, 1963), Kuzey Amerika ve Avrupa’daki BVD ve MD’den izole edilen viral ajanların aslında aynı etkenin farklı biyotipleri olduğu, semptomların farklılık gösterdiği ortaya konulmuş ve enfeksiyon BVD-MD olarak tanımlanmıştır (Brownlie, 1990).

Koyun ve keçilerde tanımlanan ve günümüzde *Pestivirus D* olarak klasifiye edilen pestivirusların neden olduğu BD ilk olarak 1959 yılında İngiltere ile Wales arasındaki sınır bölgelerinde bulunan koyunlarda tespit edilmiş (Hughes ve ark., 1959), Yeni Zelanda’daki koyunlarda merkezi sinir sistemini etkileyen bir hastalık olduğu bildirilen (Hartley ve Kater, 1962) bir çalışmayla da yaygınlığı ortaya konulmuştur.

Uluslararası Virus Taksonomi Komitesi'nin (ICTV) 2017 yılında yapılan toplantıları sonucunda Pestiviruslar 11 türe ayrılmış olup, klasik taksonomiden farklı olarak konakçı tür ayrımı yapılmaksızın isimlendirilmiştir (ICTV, 2017) (Çizelge 1.1.).

Çizelge 1.1. Uluslararası Virus Taksonomi Komitesi 'nin (ICTV)'genel Pestivirus taksonomisi (ICTV, 2017 ve Smith ve ark., 2017)

AİLE:

Flaviviridae

Genus:

Pestivirus

Tür: *Pestivirus A*

Tür: *Pestivirus B*

Tür: *Pestivirus C*

Tür: *Pestivirus D*

Tür: *Pestivirus E*

Tür: *Pestivirus F*

Tür: *Pestivirus G*

Tür: *Pestivirus H*

Tür: *Pestivirus I*

Tür: *Pestivirus J*

Tür: *Pestivirus K*

Çizelge 1.2. Hayvan türleri bazında tespit edilen Pestivirus türlerinin tablosu (Firth ve ark. 2014; Jo ve ark., 2019; Smith ve ark., 2017 ve Wu ve ark., 2018)

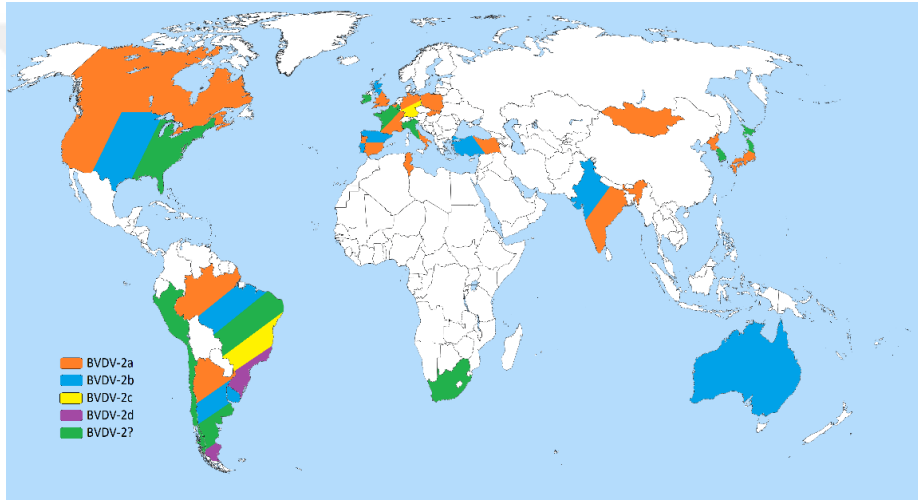
Pestivirus Türü	Eski Adı	Hayvan Türü
<i>Pestivirus A</i>	Bovine viral diyare virusu 1	Sığır, Diğer Ruminantlar, Domuz
<i>Pestivirus B</i>	Bovine viral diyare virusu 2	Sığır, Diğer Ruminantlar, Domuz
<i>Pestivirus C</i>	Klasik domuz vebası virusu	Domuz
<i>Pestivirus D</i>	Border hastalığı virusu	Koyun, Diğer Ruminantlar, Domuz
<i>Pestivirus E</i>	Pronghorn Pestivirus	Antilop
<i>Pestivirus F</i>	Bungowannah Pestivirus	Domuz
<i>Pestivirus G</i>	Zürafa Pestivirus	Zürafa, Sığır
<i>Pestivirus H</i>	Hobi - Like Pestivirus	Sığır, Bufalo
<i>Pestivirus I</i>	Aydın - Like Pestivirus	Koyun, Keçi
<i>Pestivirus J</i>	Sıçan Pestivirus	Sıçan
<i>Pestivirus K</i>	Atipik domuz Pestivirus	Domuz
Sınıflandırılmamış		Yarasa, kemirgen, koyun, keçi, balina

Pestivirus A, *Pestivirus B* ve *Pestivirus D* tüm kıtalarda gözlenmiş olmasına rağmen, *Pestivirus H* şimdiye kadar Güney Amerika, Avrupa ve Asya'da rapor

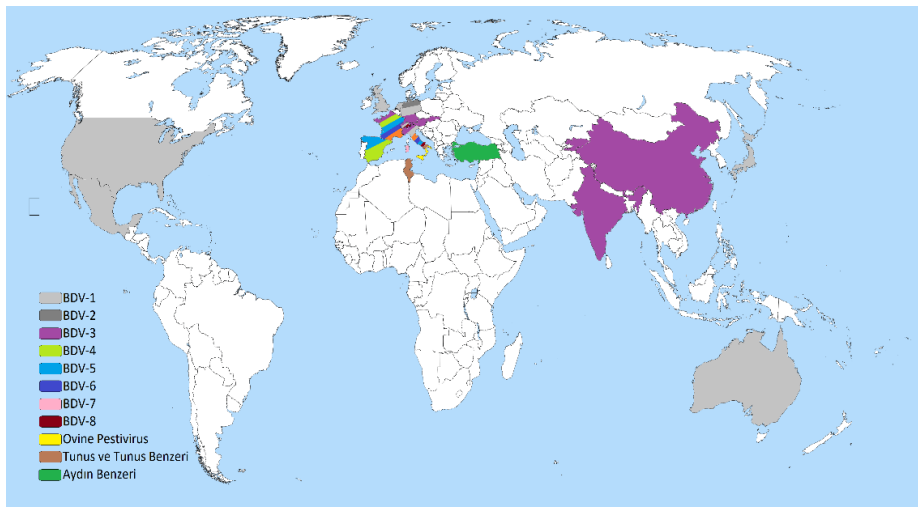
edilmiştir. *Pestivirus A* alt tipleri, *m*, *n*, *o*, *p* ve *q* sadece Asya'daki bazı ülkelerde bulunurken, *f*, *g*, *h*, *k*, *l*, *r*, *s* ve *t* sadece Avrupa'da bulunmuştur. *Pestivirus B*, ilk olarak ABD ve Kanada'daki sığırlarda tespit edilmiş, daha sonra Güney Amerika, Avrupa, Asya ve Avustralya'da bu etkenin neden olduğu hastalıklar bildirilmiştir (Vilcek ve ark., 2005). BVDV-2a, dünya çapında dolaşan baskın *Pestivirus B* alt tipidir. Sığırlarda *Pestivirus D* enfeksiyonu şimdiye kadar Brezilya, İtalya, Tayland, Hindistan ve Bangladeş'te sporadik olarak rapor edilmiştir.

Pestivirusların konu edildiği, ülkemizin çeşitli bölgelerinde farklı zamanlarda yapılan moleküler çalışmalarda; *Pestivirus A*, *Pestivirus B* ve *Pestivirus D* tiplerinin tespitleri yapılmıştır. 1997-2005 yılları arasında Türkiye'den toplam 7 bölgedeki 15 ildeki hayvanlardan alınan 722 serum, 582 tam kan örneği ile yapılan ve N^{pro} kodlayan gen bölgelerinin nükleotid dizilerinin hedef alındığı çalışmada toplam olarak 30 pestivirus izolatı karakterize edilmiştir (Yeşilbağ ve ark., 2008). Marmara bölgesindeki sığırlarda, şiddetli zatürre ve buzağılarda hemorajik enterit ile karakterize bir salgın meydana gelmiş ve vakalardan *Pestivirus A* ve *B* izole edilmiştir (Yeşilbağ ve ark., 2014). Aydın ve Burdur illerindeki koyun ve keçilerden alınan örneklerin serolojik ve moleküler teknikler kullanılarak yapılan analizinde; BDV/Aydın/04 ve BDV/Burdur/05 adlandırılan iki izolat elde edilmiş (Oğuzoğlu ve ark., 2009), bu izolatların tam genomları moleküler olarak iki farklı çalışmada araştırılmış (Becher ve ark., 2012 ve Postel ve ark., 2015), son pestivirus taksonomisinde bu izolatların ayrı bir tür oldukları belirlenmiş ve taksonomi komitesince *Pestivirus I* olarak sınıflandırılmasına karar verilmiştir (ICTV, 2017). Sığırlarda BVDV-2 varlığına yönelik ilk tespit ile *Pestivirus B* türünün ülkemizde varlığı bildirilmiştir (Oğuzoğlu ve ark., 2010). Türkiye'de BVDV ile enfekte sığırlarının sıklığı ve çeşitliliği üzerine yapılan bir araştırmada, 1124 sığır kan örneğinin moleküler ve serolojik testleri sonucunda 26'sının pestivirus pozitif olduğu belirlenmiştir (Yılmaz ve ark., 2012). Karadeniz bölgesinden elde edilen örnekler BVDV ve BDV yönünden moleküler düzeyde incelenmiştir (Albayrak ve ark., 2012). 2002 ve 2007 yılları arasında sahadan elde edilmiş izolatların moleküler düzeyde incelenmesini içeren bir çalışmada, lokal suşların tespiti yapılmıştır (Oğuzoğlu ve ark., 2011). Karadeniz bölgesinde kuzularda ve sığırlardaki abort vakalarından elde edilmiş fetal organ numunelerinin kullanıldığı

başka bir araştırmada; sığır örneklerinin %28,57'sinde BVDV, koyun örneklerinin %66,66'sında BDV RNA'sı tespit edilmiştir (Albayrak ve ark., 2012). 2012 ve 2017 yılları arasında, Ege, İç Anadolu, Akdeniz bölgelerinden elde edilen 2029 aborte fetüs örneğini kapsayan moleküler çalışmada, *Pestivirus A* türünün *b*, *f*, *l*, *r* alt türleri ve *Pestivirus I* türünün tespiti yapılmıştır (Şevik, 2021). Erzurum ve Elazığ illerinden alınan 28 örneğin moleküler incelenmesi sonucunda; dünyada BVDV-3 olduğu bilinen *HoBi-Like* virusların doğal enfeksiyonlarda varlığının tespiti de yapılmıştır (Timurkan ve Aydın, 2019). 1291 sığır örneğiyle yapılan bir çalışmada *Pestivirus A*'nın yeni bir alt grubunun (BVDV-1v) varlığı bulunmuştur (Oğuzoğlu ve ark., 2019).



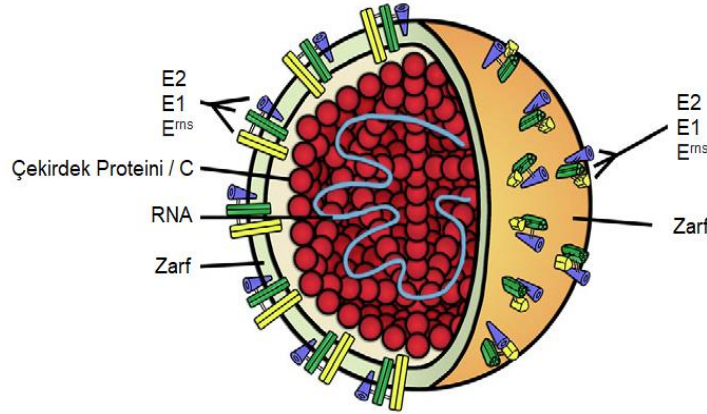
Şekil 1.1. *Pestivirus B* türlerinin dünya üzerindeki coğrafi dağılımı.



Şekil 1.2. *Pestivirus D* türlerinin dünya üzerindeki coğrafi dağılımı.

1.3.2. Etiyoloji

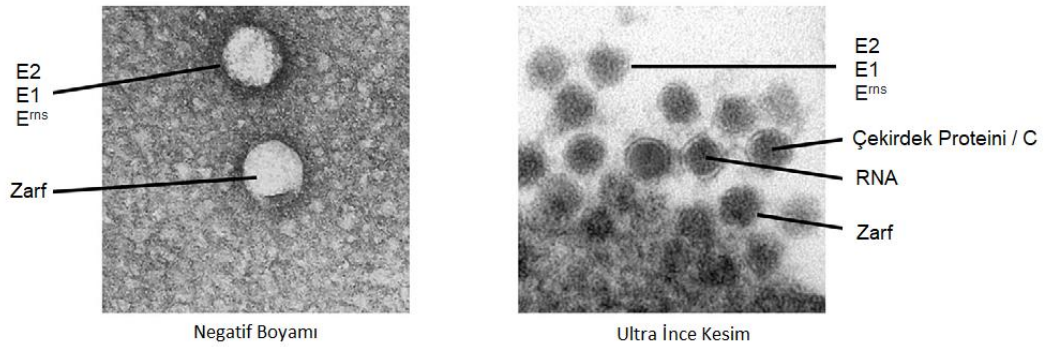
Flaviviridae familyası *Flavivirus*, *Hepacivirus*, *Pegivirus* ve *Pestivirus* olmak üzere 4 genusa ayrılır. Pestivirus virionları, çapı 40-60 nm olan zarflı, küresel parçacıklardır. BVDV, bir lipid zarf ile çevrelenen yapısal kapsid veya çekirdek proteini ile kaplanmış genomik RNA'dan oluşan bir çekirdek bölgesinden oluşur. Kapsid yaklaşık 30 nm çapındadır ve elektron yoğun bir iç çekirdek olarak görünür (Horzinek ve ark., 1971). Saflaştırılmış pestivirus virionlarının kriyo-elektron mikroskobu ile yapılan incelemesinde viral partiküllerin çift katmanlı sivri olmayan bir fosfolipid tabakasıyla çevrili elektron yoğun bir kapside sahip olduğu (Şekil 1.3.) ve çoğu pestivirus partikülünün 50-65 nm büyüklüğünde olduğu bildirilmiştir (Callens ve ark., 2016).



Şekil 1.3. Pestiviral partikül diyagramı (Tautz ve ark., 2015).

Lipid çift katmanlı zarf, üç glikoproteinden (E^{ms} , E1 ve E2) oluşur. Bu glikoproteinlerden E^{ms} yoğun şekilde glikozile haldedir, virus partikülü ile gevşek bir şekilde ilişkilidir ve enfekte olmuş hücreler tarafından çözünerek salgılanır. E1 ve E2 glikoproteinleri, bütünleyici zarf proteinleridir ve E1-E2 heterodimerleri pestivirus girişi için esastır. Pestivirus virionları, E1 ve E2'den daha yüksek bir E^{ms} konsantrasyonuna sahiptir. Zarfın pleomorfik doğası ve pestivirus partiküllerinin

konakçı hücrelerle ilişkisi nedeniyle, ultrasantrifüjleme ve elektron mikroskobu ile tanımlama yoluyla yüksek oranda saflaştırılmış bulaşıcı viral partiküller elde etmek zordur. Virionun sakkarozdaki yüzer yoğunluğu 1,134 gm/ml'dir ve moleküler ağırlığı $6,0 \times 10^7$ olarak tahmin edilmektedir (Lindenbach ve ark., 2013). Diğer zarflı viruslara benzer şekilde, pestiviruslar organik çözücüler ve deterjanlar tarafından inaktive edilir, ancak aynı ailede yer alan Flavivirus'ların aksine düşük pH derecelerine dirençlidirler.



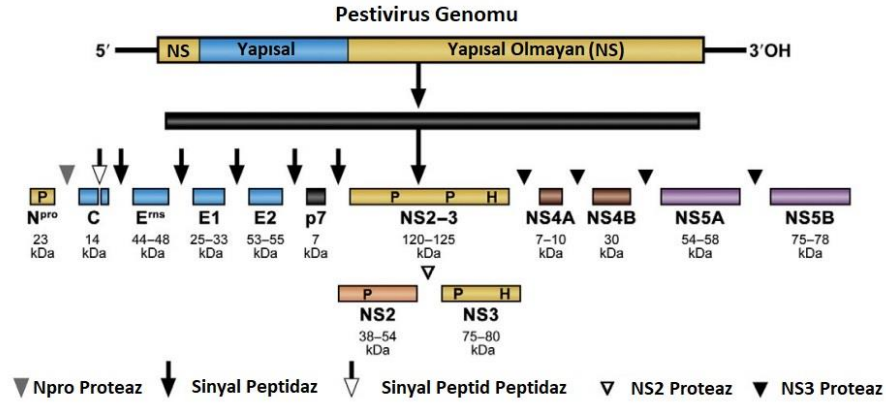
Şekil 1.4. Pestiviral partiküllerin elektron mikroskopik görüntüsü. Solda ultra ince kesitte BVDV; sağda negatif boyamada Pestivirus Core proteini (Tautz ve ark., 2015).

1.3.2.1. Genomik Organizasyon

Pestivirus genomu, yaklaşık 12,3 kb büyüklüğünde pozitif anlamda tek sarmallı bir RNA'dan oluşur. Ancak, eklemeler, genomik duplikasyonlar ve genomik rekombinasyon olayları nedeniyle boyut 16,5 kb'ye kadar değişebilir (Becher ve ark., 1999). Pestivirusların replikasyonu sırasında hiçbir subgenomik RNA kopyalanmaz.

Pestivirusların genomik organizasyonu, tanımlanan tüm pestiviruslarda benzerdir. RNA genomu, sırasıyla yaklaşık 400 ve 200 nükleotidlik 5'UTR ve 3'UTR ile çevrili bir büyük açık okuma çerçevesinde yaklaşık 3900 amino asitlik bir poliproteini kodlar. Oluşan poliprotein daha sonra viral ve hücresel proteazlar tarafından işlenir. Bu işlemler sonrasında N^{pro}, C (kapsid), zarf proteinleri (E_{ms}, E1, E2) ve yapısal olmayan proteinlerden (p7, NS2, NS3, NS2-3, NS4A, NS4B, NS5A,

NS5B) oluşur (Lindenbach ve ark., 2013). Poliprotein üzerindeki proteinlerin dizilimi NH₂-N^{pro}/C/E^{ms}/E1/E2/p7/NS2/NS3/NS4A/NS4B/NS5A/NS5B-COOH (Şekil 1.2.) şeklindedir (Nagai ve ark., 2004).



Şekil 1.5. Pestivirus genom yapısı. Viral genomun poliprotein kodlayan tek uzun ORF ve bu poliprotein'in belirtilen proteazlar tarafından işlenmesi sonucu oluşan viral proteinlerin şematik bir şekilde gösterimi (Tautz ve ark., 2015).

Pestivirusların 5'UTR'si, viral RNA'nın hem translasyon başlangıcında hem de replikasyonunda yer alan stabil bir kök döngü yapısına (hair pin – saç tokası) sahiptir (Grassmann ve ark., 2005). Pestivirus RNA'ları 5' başlığa sahip olmadığı gibi aynı zamanda 3'-ucunda poliadenile değildir. 5'UTR'nin sonunda ve N^{pro} gen bölgesinin ilk kısmında yer alan dahili ribozomal giriş bölgesi (IRES), küçük ribozomal alt birimi doğrudan işleme alır, onu translasyon başlangıç bölgesinde konumlandırır ve metiyonin kodunu (AUG) varlığı olmasa bile translasyonun başlamasını sağlar.

Viral RNA'nın 3' ucunda bulunan UTR, korunmuş bir kök döngü yapısına sahiptir ve virus replikasyonu için gereklidir. Pestivirus türleri arasında 3'UTR dizisinin uzunluğunda önemli farklılıklar mevcuttur. Bu farklılıklar, Pestiviruslarda bulunan 3'UTR'nin, 5'UTR'den daha az korunmuş olmasından kaynaklanmaktadır. Örnek olarak *Pestivirus A* izolatları 3'UTR'nin değişken kısmında sekiz nükleotid tekrar dizisine sahipken *Pestivirus B* izolatları tek bir tekrar dizisine sahiptir (Giangaspero ve ark., 2008; Poole ve ark., 1995 ve Pestova ve ark., 2008).

Poliprotein oluşumu, ko-translasyon yoluyla gerçekleşir ve N-terminal otoproteaz (N^{pro}) salınımı ile başlar. Sadece Pestiviruslarda bulunan N^{pro} , kendi karboksil terminalindeki bölünmeden sorumludur ve bu şekilde C proteininin amino terminalini serbest bırakır (Stark ve ark., 1993). C/ E^{ms} bölünmesi, hücrel sinyal peptidazı (SPase) ve sinyal peptidi peptidazı (SPPase) tarafından meydana gelirken, E^{ms} /E1, E1/E2, E2/p7 ve p7/NS2 bölünmeleri SPase tarafından gerçekleştirilir. NS2 ve NS3'ün işlenmesi, NS2 içinde yer alan proteaz tarafından gerçekleşirken, NS3'ün aşağı akışındaki tüm işlemler, NS3 proteaz tarafından yapılır. NS4A, NS3 proteazın bir kofaktörü olarak görev yapar ve NS4B/NS5A ve NS5A/NS5B bölgesinde gerçekleşen işlemler için gereklidir (Xu ve ark., 1997).

Pestivirus suşlarının sitopatik olmayan (ncp) ve sitopatik (cp) olmak üzere iki biyotipi bulunur. Sitopatik viruslar, NS2-3 protein kodlama bölgesinde NS2 ve NS3 proteinlerinin oluşumuna yol açan değişiklikleri takip eder. Bu genomik değişiklikler, nokta mutasyonlarını, genomik kopyaları ve hücrel mRNA dizilerinin eklenmesini içerir. N^{pro} , kapsid ve NS4B'deki genomik değişiklikler, pestivirusların bazı cp suşlarında da bildirilmiştir (Kümmerer ve Meyers, 2000 ve Xu ve ark., 1997).

1.3.2.2. Yapısal ve Yapısal Olmayan Proteinler

N^{pro} dışında, açık okuma çerçevesinin (ORF) birinci kodlama bölgesi, viral partikülün bütünleyici bileşenleri olan yapısal proteinleri kodlar. Bu proteinler, kapsid proteini (C) ve üç glikoproteini (E^{ms} , E1 ve E2) içerir. Pestivirus poliproteininin ilk yapısal proteini olan kapsid proteini (C) oldukça baziktir. N-ucu, N^{pro} 'nun otokatalitik bölünmesi yoluyla üretilirken, C-ucu SPase tarafından E^{ms} ile bağlantısı koparılırken oluşur. RNA'ya düşük afinite ile bağlıdır ve düzensiz bir proteindir (Tautz ve ark., 2015). E^{ms} Pestiviruslara özgü, 2-48 kDa boyutunda, yüksek oranda glikozillenmiş, yaygın olarak disülfid bağlantılı homodimer olarak bulunan ve endoribonükleazların T2 ailesine dahil bir proteindir (Hulst ve Moormann, 2001). E^{ms} 'in sahip olduğu RNaz aktivitesi ile viral RNA degradasyonundan sorumlu olduğu ve bu şekilde konakçının doğuştan gelen bağışıklık yanıtını sınırlamada önemli bir protein olduğu

bilinmektedir. Bu amaçla, çözünür E^{ns} hücre yüzeyinde bulunan heparin veya heparan sülfatlar gibi glikozaminoglikanlara (GAG) bağlanır, ardından klatrin aracılı endositoz yoluyla hücre içine alım gerçekleşir; her ikisi de IFN sentezini verimli bir şekilde bloke etmek için ön koşuldur (Iqbal ve ark., 2000 ve Zürcher ve ark., 2014). E1 ve E2 glikoproteinleri, integral membran proteinleridir ve Pestivirusların hücreye girişinden ve enfektivitesinden sorumlu olan disülfid bağlantılı E1-E2 heterodimerlerini oluşturmakla görevlidir (Ronecker ve ark., 2008). E1'in yapısı ve işlevi henüz bilinmemektedir ve enfekte hayvanlarda E1'e karşı antikor bulunmamıştır. Ancak E1'in giriş sırasında füzyon için gerekli olan füzyon peptidini içerdiği öne sürülmüştür. Pestivirus kaynaklı E2 glikoproteini, virus bağlanmasından, nötralize edici antikorların üretilmesinden ve konakçı tropizminden sorumludur (Liang ve ark., 2003 ve Weiland ve ark., 1990). E2 genel olarak 373 amino asit uzunluğundadır ve yüksek oranda korunmuş dört N-glikozilasyon bölgesi içerir. Ayrıca üç alana sahiptir; alan I ve II, viral yüzey üzerinde açığa çıkan nötralizan epitopları içerirken, alan III bir çapa görevi görür.

İlk yapısal olmayan protein olan N^{pro}, 168 amino asit içeren bir otoproteaz olup pestiviruslara özgüdür. Pestivirus ile enfekte olmuş hücrelerde interferon (IFN-1) üretimini inhibe ederek konakçı hücrenin antiviral aktivitesine müdahale eder (Darweesh ve ark., 2018). Bazı çalışmalar, N^{pro}'nun Glu22-His49-Cys69'un katalitik bir üçlü oluşturduğunu gösteren papain benzeri bir sistein proteaz olduğunu gösterse de başka bir çalışma bu proteini C53proteaz ailesi olarak sınıflandırmıştır (Rawlings ve ark., 2012). His49 ve Cys69 katalitik ikilisi, N^{pro}'nun proteolitik aktivitesinden sorumludur ve hücrel S100A9 proteinine bağlanır (Darweesh ve ark., 2018 ve Zogg ve ark., 2013).

NS2 ve NS3 proteinleri ağırlıklı olarak ncp biyotipteki viruslar ile enfekte hücrelerde işlenmemiş NS2-3 olarak, cp biyotipteki viruslar ile enfekte hücrelerde ise NS2 ve NS3 olarak bulunur. Son çalışmalarda enfeksiyonun çok erken safhalarında ncp virusun replikasyonu için NS2-3'ün bölünmesinin gerekli olduğu gösterilmiştir. NS2 proteaz enzimi, NS2-3 bölünmesi için gereklidir. Hücrel dizilerin eklenmesi veya Pestivirus genomik dizilerinin çoğaltılması, yaygın olarak NS2-3 bölgesinde

meydana gelir. NS2 450 aminoaside ve 7 adede kadar transmembran segmentli hidrofobik N-terminale sahiptir. Sistein-oto-proteaz olarak görev yapar. NS3 80kDa büyüklüğünde ve 683 adet amino aside sahiptir. İmmundominant olduğu düşünülen parçası aa205 ile aa549 arasında lokalize olmuştur. Serin proteaz, RNA helikaz ve NTPaz olarak görev yapar (Meyers ve Thiel, 1996; Tautz ve ark., 2015 ve Xu ve ark., 1997).

NS4A proteini, 66 amino asitten oluşur, bunların 1/3'lük kısmı hidrofobik son 1/3 lük kısmı ise asidiktir. NS3 serin proteaz için bir kofaktör olarak işlev görür ve virionların morfogenezinde önemli bir role sahiptir. NS4B proteininin, hücre içi membranlarda lokalize olan ve RNA replikasyon kompleksi ile bağlantılı olan bir integral membran proteini olduğu düşünülür. 38 kDa boyutunda yüksek oranda hidrofobiktir. Otofaji indüksiyonu, viral replikasyon kompleksi için iskele görevi görür. NS4B nin diğer önemli görevi otofagozomların indüksiyonundan sorumlu olmasıdır. NS4B'deki tek nokta mutasyon (Y2441C), BVDV'nin sitopatik biyotipten sitopatik olmayan bir biyotipe değişmesini sağlar; bu durumda proteinin viral patogenezdeki rolünün önemini gösterir (Qu ve ark., 2001 ve Suda ve ark., 2019). NS5A proteini, RNA replikasyon kompleksinde membrana bağlı NS4B ve NS5B ile birlikte lokalize olur, ancak viral replikasyondaki rolü net değildir. NS5A proteini, trafiği ve nükleer faktör kappa B (NF-kappaB) sinyalleşmesinde rol oynayan sıgır NIK- ve IKKbeta-bağlayıcı proteinine (NIBP) bağlanır, bu şekilde Hepatit C virus enfeksiyonu sırasında oynadığı rolün bir benzerini *Pestivirus A* enfeksiyonlarında da oynadığı düşünülmektedir. Ayrıca NS5A endoplazmik retikulumda NIBP ile birlikte hücre içerisinde de otofaji belirteci LC-31 ile birlikte lokalize olur (Zahoor ve ark., 2010 ve Zhang ve ark., 2021).

NS5B proteini, RNA'ya bağımlı RNA polimeraz görevi görür ve genomik RNA replikasyonunda ana protein olarak işlev gördüğü gibi aynı zamanda RNA'ya bağımlı polimeraz görevindedir. Bu görevlerinin haricinde NS5B'nin C-terminali, virionların morfogenezi için önemlidir. Bağlanma paketi içerisinde oluşan belirli birkaç mutasyon, kataliz etkisini ve bağlanmayı azaltır (Curti ve Jaeger, 2013 ve Weiskircher ve ark., 2009).

1.3.3. Pestiviruslarda Hücreye Bağlanma ve Giriş

Pestivirusların hücreye girişi, hücrel reseptörlere virionun bağlanmasını, endositozu ve membran füzyonunu içerir. Pestivirus replikasyonu, virusun konakçı hücre yüzeyine bağlanmasıyla başlar. NS viral zarf glikoproteinleri E^{rns} ve E2'nin her ikisi de bu süreçte önemli roller üstlenir (Hulst ve Moormann, 1997). Glikoproteinler E^{rns} ve E2 hücre yüzeyinde farklı reseptörlere sahiptir. Heparan sülfat (HS) ve laminin reseptörünün (LamR), her ikisi de E^{rns} bağlanma reseptörleri olarak tanımlanmıştır (Iqbal ve ark., 2000). E2, Pestivirus tropizminin bir belirleyicisi olan reseptör bağlayıcı protein olarak, viral girişte de önemli rol oynar (Borca ve ark., 2019 ve Liang ve ark., 2003). E1 ve E2 virus enfeksiyonu için çok önemli olan heterodimerleri meydana getirmek için kritik olan disülfid bağlar oluştururlar (Ronecker ve ark. 2008). Psödotip viruslarda E1-E2 heterodimerlerinin, viral girişe aracılık etmek ve aynı zamanda E^{rns}'in giriş adımını belirlemek için gerekli oldukları gösterilmiştir (Ronecker ve ark., 2008 ve Wang ve ark., 2004).

Pestiviruslar, reseptör aracılı endositoz yoluyla konakçı hücrelere girer. Sığır kökenli CD46'nın BVDV için hücrel bir reseptör olarak görev yaptığı bildirilmiş (Maurer ve ark., 2004), ancak tek başına CD46'nın pestivirusların girişi için yeterli olmadığı ve başka elementlerin de viral bağlanma için gerekli olabileceği gösterilmiştir. Enfeksiyon sürecini başlatmak için pestivirus E1-E2 heterodimerleri, hücrel reseptörlere bağlanır ve hücre içine girişi pH'a bağlı bir şekilde klatrin bağımlı endositoz ve endozomal füzyon yoluyla gerçekleşir (Grummer ve ark., 2004; Lecot ve ark., 2005 ve Mathapati ve ark., 2010).

1.3.4. Pestivirus Replikasyon Siklusu

Pestiviral proteinlerin transkripsiyonu ve translasyonu hücrel sitoplazmada gerçekleşir. Pestivirus RNA genomunun 5' ucunda kap yapısı içermemesi nedeniyle pestiviruslar etkili translasyon için 5' UTR'sinde bulunan bir "dahili ribozomal giriş sitesinden" (IRES) yararlanır. IRES aracılı translasyonun başlatılmasını takiben,

1.3.5. Genetik ve Antijenik Çeşitlilik

Pestiviruslar, 40-60 nm büyüklüğe sahip zarflı ve genomları yaklaşık 12.300 nükleotitten oluşan tek sarmallı, pozitif polariteli bir RNA'dan oluşan viruslardır. Isı, kurutma, deterjanlar ve UV ışığı ile kolayca inaktive edilirler (Firquet ve ark., 2015). Pestivirus genomunun tek bir açık okuma çerçevesi (ORF), kapsid (C) ve üç zarf glikoproteini (E^{ms} , E1 ve E2) olmak üzere dört yapısal protein ve 7-8 adet yapısal olmayan protein (N^{pro} , p7, NS2-3, NS4A, NS4B, NS5A ve NS5B) kodlar (Becher ve ark 1998; Collett ve ark., 1988 ve Thiel ve ark., 2005).

Pestivirus suşları, nokta mutasyonların birikimi ve buna ek olarak homolog ve homolog olmayan RNA rekombinasyonlarından kaynaklanan yüksek genetik çeşitlilik gösterirler. Bu sebepten dolayı Pestivirus suşlarının genetik tiplendirilmesi BVD, BD, MD ve diğer pestivirus enfeksiyonlarının epidemiyolojisi ve kontrolü için gereklidir. Pestivirusların doğru genetik tiplemesi, Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR), yeni nesil dizileme ve filogenetik analiz gibi ileri moleküler tekniklerin ortaya çıkması ve uygulanması sonucunda daha ayrıntılı şekilde elde edilmeye devam etmektedir. Pestivirus izolatlarının tür düzeyinde sınıflandırılması için bugüne kadar yapılan çalışmalarda çoğunlukla 5'UTR gen bölgesinin dizi analizi kullanılsa da, her tür içindeki alt tiplerin ayırımında, tam genom, N^{pro} , NS2-3 ve E2 gibi gen bölgelerinin analizi de önemlidir (Becher ve ark., 2003; Vilcek ve ark., 2001, 2004 ve Yeşilbağ ve ark., 2017). Bu metodlara ek olarak, monoklonal antikor (MAb) bağlanma, homolog ve heterolog antiserumlarla çapraz nötralizasyon deneyleri ile tespit edilen antijenik benzerlik, pestivirus suşlarının antijenik çeşitliliğini belirlemek için kullanılmıştır (Becher ve ark., 2003; Dias ve ark., 2017 ve Paton ve ark., 1995). Şimdiye kadar, *Pestivirus A* 22 alt tipe (a-v), *Pestivirus B* 4 alt tipe (2a-2d), *Pestivirus H* 4 alt tipe (a-d), *Pestivirus D* (1-8) 8 alt tipe ayrılmıştır (Becher ve ark., 2003; Peletto ve ark., 2016).

1.3.5.1. *Pestivirus A*'nın Genetik ve Antijenik Çeşitliliği

Pestivirus türleri arasında yer alan *Pestivirus A*, dünya çapında yaygındır. Başlangıçta BVDV-1a (NADL-like) ve BVDV-1b (Osloss-like) olmak üzere iki alt tipe ayrılrsa da, farklı ülkelerde tespit edilen *Pestivirus A* izolatları, 11 alt tipe ayrılmış (Vilcek ve ark., 2001), genetik tiplendirme ile ilgili daha ileri çalışmalarla *Pestivirus A*'nın en az 23 alt tipinin varlığını ortaya konmuştur (Giammarioli ve ark., 2015; Oğuzoğlu ve ark., 2019; Yeşilbağ ve ark., 2014 ve Yeşilbağ ve ark., 2017). BVDV alt tiplerinin tek tek ülkelerde ve kıtalarda doğru dağılımı bilinmemekle birlikte, yayınlanan raporlar BVDV-1b'nin dünya çapında baskın alt tip olduğunu ve bunu BVDV-1a ve BVDV-1c'nin izlediğini ortaya koymuştur. BVDV-1b Avrupa, Asya ve Amerika'da baskın alt tip iken, BVDV-1c ağırlıklı olarak Avustralya ve Meksika'da yaygındır. *Pestivirus A*'nın kapsamlı genetik çeşitliliği, Avrupa'daki birçok ülkede, Türkiye, Çin ve Japonya'dan rapor edilmiş, Amerika, Afrika ve Avustralya ile Hindistan'dan nispeten daha az biyoçeşit bildirilmiştir (Giammarioli ve ark., 2015; Yeşilbağ ve ark., 2014 ve Yeşilbağ ve ark., 2017).

1.3.5.2. *Pestivirus B*'nin Genetik ve Antijenik Çeşitliliği

Pestivirus B suşları, tüm kıtalarda dağılmış olmasına rağmen genetik çeşitliliği ve Dünya üzerine yayılımı *Pestivirus A*'dan daha düşüktür. Dört (2a–2d) alt tipe ayrılmıştır. BVDV-2a tüm kıtalarda en yaygın alt tip iken, BVDV-2b Amerika (Brezilya, Arjantin, Uruguay, ABD) (Neill ve ark., 2019), Avrupa (Portekiz, İspanya, Slovakya, Türkiye) ve Asya'da (Hindistan, Çin) tespit edilmiştir (Barros ve ark. 2006; Giangaspero ve ark., 2008; Neill ve ark., 2019; Oğuzoğlu ve ark., 2010 ve Partida ve ark., 2016). BVDV-2c sadece Avrupa'da (Almanya, İrlanda) ve Güney Amerika'da (Arjantin) tespit edilmiştir (Gethmann ve ark., 2015; Giangaspero ve ark., 2008; Guelbenzu-Gonzola ve ark., 2016 ve Maya ve ark., 2016). Koyunlarda, ABD ve İtalya'da BVDV-2a alt tipi saptanırken, Hindistan'dan (Mishra ve ark., 2008b) ve Türkiye'den (Yeşilbağ ve ark., 2008) koyunlarda BVDV-2b alt tipi bildirilmiştir. Keçilerde ise şimdiye kadar sadece BVDV-2a alt tipi rapor edilmiştir (Mishra ve ark., 2007a).

Çizelge 1.3. Ülkeler bazında bildirilen Pestivirus türleri [Yeşilbağ ve ark.'dan (2017) modifiye edilmiştir.]

ÜLKE	<i>Pestivirus A</i>	<i>Pestivirus B</i>	KAYNAKLAR
Avusturya	a, b, d, e, f, g, h, k, ?	a, ?	Giangaspero ve ark., 2008; Harnberg ve ark., 2009; Vilcek ve ark., 2001 ve Vilcek ve ark., 2003
Belçika	a, b, ?	a, ?	Couvreux ve ark., 2002 ve Giangaspero ve ark., 2008
Hırvatistan	b, f,		Bedekovi ve ark., 2012
Çek Cumhuriyeti	b, d, e, f,		Vilcek ve ark., 2004
Danimarka	b, d, e, f,		Nagy ve ark., 2014 ve Uttenhal ve ark., 2005
Finlandiya	d, f, j		Vilcek ve ark., 2004
Fransa	a, b, d, e, k	a, ?	Giangaspero ve ark., 2008; Jackova ve ark., 2008 ve Vilcek ve ark., 2001
Almanya	a, b, d, e, f, g, h, k,	a, c	Beer ve ark., 2002 ve Tajima ve ark., 2005
Macaristan	b, f,		Vilcek ve ark., 2001
İrlanda	a, b, d, e	c	Grahama ve ark., 2001 ve O' Brien ve ark., 2017
İtalya	a, b, c, d, e, f, g, h, k, l, r, s, t, u, ?	a, ?	Bazzucchi ve ark., 2017; Giangaspero ve ark., 2008; Luzzago ve ark., 2014 ve Vilcek ve ark., 2001
Kosova	b		Goga ve ark., 2014
Polonya	b, d, f, g	a	Kuta ve ark., 2013; Polak ve ark., 2014
Portekiz	a, b, d, e	a, b	Barros ve ark., 2006
Slovakya	d, e, f, h	a	Giangaspero ve ark., 2008; Vilcek ve ark., 2001 ve Vilcek ve ark., 2004
Slovenya	b, d, e, f, g		Toplak ve ark., 2004 ve Toplak ve ark., 2006
İspanya	a, b, c, d, e, f, h, k, l	a, b	Aduriz ve ark., 2015; Arias ve ark., 2003; Rodriguez-Prieto ve ark., 2016 ve Vilcek ve ark., 2001
İsveç	a, b, d		Stahl ve ark., 2005
İsviçre	b, e, f, h, k, ?		Bachofen ve ark., 2008; Stalder ve ark., 2015 ve Stalder ve ark., 2016
Türkiye	a, b, d, f, h, i, l, r, ?	a, b	Oğuzoğlu ve ark., 2010 ve Yılmaz ve ark., 2012
Birleşik Krallık	a, b, c, d, e, f, i, j, ?	a	Booth ve ark., 2013; Giangaspero ve ark., 2008; Vilcek ve ark., 2001 ve Wakeley ve ark., 2004
Çin	a, b, c, d, m, o, p, q		Deng ve ark., 2012; Gong ve ark., 2013; Wang ve ark., 2014; Xue ve ark., 2010 ve Zhong ve ark., 2011
Hindistan	b, c	a, b	Mishra ve ark., 2004; Mishra ve ark., 2007a; Mishra ve ark., 2011; Mishra ve ark., 2012
Filipin	b		Giangaspero ve ark., 2008 ve Mingala ve ark., 2009
Japonya	a, b, c, j, m, n, o, ?	a, ?	Giangaspero ve ark., 2008, Abe ve ark., 2016; Giangaspero ve ark., 2019; Yamamoto ve ark., 2008
Kore	a, b, c, n	a, ?	Han ve ark., 2016; Oem ve ark., 2009 ve Ryu ve ark., 2020
Moğolistan	a	a	Ochirkhuu ve ark., 2016
Arjantin	a, b	a, b, c, d, ?	Jones ve ark., 2001; Giangaspero ve ark., 2008 ve Pecora ve ark., 2014
Brezilya	a, b, c, d, e, i, ?	a, b, c, d, ?	Cortez ve ark., 2006; Flores ve ark., 2018; Weber ve ark., 2014 ve Silveira ve ark., 2015
Peru ve Şili	a, b, c	?	Pizarro-Lucero ve ark., 2006
A.B.D	a, b, ?	a, b, ?	Fulton ve ark., 2005 ve Workman ve ark., 2015
Kanada	a, b	a	Deregt ve ark., 2005 ve Giangaspero ve ark., 2008
Uruguay	a, j	b	Maya ve ark., 2016
Avustralya	a, b, c	b	Mahony ve ark., 2005 ve Ridpath ve ark., 2010
Mısır	b, j		Abdel Latif ve ark., 2013; Soltan ve ark., 2015 ve Vilcek ve ark., 2004
Tunus	b	a	Thabti ve ark., 2005
Güney Afrika	a, b, c, d		Baule ve ark., 1997; Kabongo ve ark., 2003 ve Ullaramu ve ark., 2013

1.3.5.3. *Pestivirus H*'nin Genetik ve Antijenik Çeşitliliği

Pestivirus H suşları en az yaygın olan pestivirus türü olarak kabul edilebilir. Bugüne kadar yapılan çalışmalar *Pestivirus H* suşlarının 4 alt tipte (a-d) sınıflandırılabilceğini göstermiştir. *Pestivirus H*-a Güney Amerika'da (Brezilya) ve Avrupa'da (İtalya) ve fetal bovine serum (FBS) kontaminantları olarak tespit edilirken, *Pestivirus H*-b Bangladeş'ten bildirilmiş ek olarak *Pestivirus H*-c ve *Pestivirus H*-d Hindistan'da tespit edilmiştir (Giammarioli ve ark., 2015 Haider ve ark., 2014 ve Mishra ve ark., 2014).

Sığırlarda doğal *Pestivirus H* enfeksiyonu şu ana kadar üç kıtada, Güney Amerika (Brezilya ve Arjantin), Avrupa (İtalya ve Türkiye) ve Asya'da (Tayland, Hindistan, Bangladeş ve Çin) tespit edilmiştir (Cortez ve ark., 2006; Decaro ve ark., 2012; Haider ve ark., 2014; Mishra ve ark., 2014; Pecora ve ark., 2014; Shi ve ark., 2020; Stahl ve ark., 2009; Timurkan ve Aydın, 2019). *Pestivirus H* küresel olarak *Pestivirus A* ve *Pestivirus B*'den daha az yaygın olmasına rağmen, Kuzeydoğu Brezilya'da en yaygın geviş getiren *Pestivirus* türü olarak bulunduğu (Silveira ve ark., 2017) ve Hindistan'da da yüksek bir *Pestivirus H* sıklığı rapor edilmiştir (Mishra ve ark., 2014). Bu bilgilere ek olarak *Pestivirus H* kaynaklı enfeksiyonlar Brezilya'daki mandalarda (Cortez ve ark., 2006) ve Çin'deki koyun ve keçilerde de bildirilmiştir (Shi ve ark., 2018).

1.3.5.4. *Pestivirus D*'nin Genetik ve Antijenik Çeşitliliği

Pestivirus D izolatlarının bugüne kadar tanımlanan genotipleri filogenetik olarak *Pestivirus D*-1'den *Pestivirus D*-8'e kadar sekiz genotip olarak tanımlanmıştır (Becher ve ark., 2003; Peletto ve ark. 2016). Bu genotiplere ek olarak BD benzeri sendromlardan sorumlu olan ve farklı genetik gruplar oluşturan başka küçükbaş hayvan orijinli pestivirusları da tanımlanmıştır. Bunlar; Tunus, Tunus benzeri ve Aydın benzeri olarak adlandırılmıştır (Becher ve ark. 2012; Postel ve ark., 2015 ve Thabti ve ark., 2005). Son zamanlarda, bilinen *Pestivirus* türlerinden oldukça farklı olan ve yeni ortaya çıkan

bir küçükbaş hayvan pestivirusunu (OVPV) genetik ve antijenik olarak CSFV ile yakından ilişkili olduğu bulunmuş ve yeni bir tür olarak tanımlanabileceği bildirilmiştir (Casciari ve ark., 2020 ve Sozzi ve ark., 2019).

Çizelge 1.4. Ülkeler bazında tespit edilen *Pestivirus D* suşlarının tablosu.

TÜR	ÜLKE	KAYNAK
BDV -1	İtalya Japonya, Meksika, Hollanda, Yeni Zelanda, İsviçre, İngiltere, ABD	Becher ve ark., 1997 ve Vilcek ve ark., 1998
BDV -2	Almanya Avusturya, Çin, Fransa, Almanya, Hindistan	Becher ve ark., 2003
BDV -3	İtalya, Slovakya, İsviçre	Dubois ve ark., 2008; Giammarioli ve ark., 2011 ve Krametter-Froetscher ve ark., 2007
BDV -4	Fransa, İspanya	Luzzago ve ark., 2016 ve Rossel ve ark., 2014
BDV -5	Fransa, İtalya, İspanya	Dubois ve ark., 2008; Giammarioli ve ark., 2015 ve Vega ve ark., 2015
BDV -6	Fransa, İtalya	Martin ve ark., 2015 ve Vega ve ark., 2015
BDV -7	İtalya	Giammarioli ve ark 2015
BDV -8	İtalya, İsviçre	Caruso ve ark., 2017 ve Stalder ve ark., 2017
Aydın Benzeri	Türkiye	Oğuzoğlu ve ark., 2009
Tunus Benzeri	Fransa, İtalya, Tunus	Ciulli ve ark., 2017 ve Thabti ve ar. 2005
Ovine pestivirus	İtalya	Sozzi ve ark., 2019

1.3.6. Türler Arası Geçiş

Pestivirus türlerinin yapılan ilk taksonomik ayrımlarında konakçı spesifik bir yol izlenmiş ve virusun doğal konakçısından köken alan bir isimlendirme kullanılmıştır. Bu doğrultuda *Pestivirus A*, *Pestivirus B*, *Pestivirus C* ve *Pestivirus D* enfeksiyonlarının sadece doğal konakçı hayvan türünde enfeksiyona neden olabileceği düşünülmüş olsa da, ilerleyen teknolojik gelişimler sayesinde bu bilginin yanıltıcı olduğu ortaya çıkmış ve tür spesifik olarak düşünülen viral ajanların başka türleri de etkileyebileceği, bulaşabileceği ve onları enfekte edebileceği gerçeği ile

karşılaşılmıştır (Julia ve ark., 2009; Kaiser ve ark., 2017 ve Vilcek ve ark., 1997). Bu bağlamda; sığırların doğal konakçısı olduğu *Pestivirus A* veya *Pestivirus B*'nin koyunlardan izole edildiği birçok çalışma bildirilmiştir (Eiras ve ark., 2017; Julia 2009 ve Krametter ve ark., 2010). Yapılan deneysel bir çalışmada PI sığırdan keçilere BVDV'nin geçişi tespit edilmiştir (Broaddus ve ark., 2007). İspanya'da koyun abortları üzerine yapılan bir çalışmada koyunlarda *Pestivirus B* tespit edildiği bildirilmiştir (Partida ve ark., 2017). Arjantin'de koyunların *Pestivirus A*, *Pestivirus B* ile ayrı ayrı ve bazı koyunların her iki tür ile aynı anda enfekte olduğu bildirilmiş (Julia ve ark., 2009), Kuzey Amerika, Güneydoğu Asya ve Afrika'da büyükbaş hayvan türlerinden başka türlerde de BVDV ile ilişkili hastalıkların bildirimleri yapılmıştır (Deng ve ark., 2012; Kim ve ark., 2009 ve Mingala ve ark 2009). Keçilerden *Pestivirus H* izole edildiğine dair bildirimler de yapılmıştır (Shi ve ark., 2018).

Tıpkı BVDV'nin koyunlarda tespit edilmesi gibi, *Pestivirus D*'nin de sığırlarda tespitleri bildirilmiştir. İsviçre'de 1170 koyun ve 923 sığırın dahil olduğu ve bu hayvanların beraber beslendiği ahırlarda yapılan bir çalışmada sığırların *Pestivirus D* ile enfekte olduğu gözlenmiştir (Braun ve ark., 2013). 2015 yılında deneysel olarak yapılan bir çalışmada sığırlar *Pestivirus D* ile enfekte edilmiş, 2018 yılında yapılan benzer bir araştırmada *Pestivirus D* yönünden enfekte edilmiş sperma ile gebe bırakılmış hayvanlarda enfeksiyon gözlenmiş, ancak virus yönünden persiste yavru tespiti yapılamamıştır (Braun ve ark., 2019). İsviçre'de tam genom sekansları yapılan sığır, koyun ve domuz izolatlarından aynı subgenotipe sahip *Pestivirus D* elde edilmiştir (Stalder ve ark., 2017).

1.3.7. Patogenezi

Pestiviruslar oronazal yolla enfeksiyonu takiben orofarenksin epitel hücrelerinde ve lenfoid dokularında replike olur. Fagositik hücreler, Pestivirus ve/veya Pestivirus ile enfekte olmuş hücreleri periferik lenfoid dokulara taşır, 2-4 gün sonra viremiye yol açar ve virüsü iç organlara yayar. Pestivirusların patogenezi etken, konakçı ve çevresel

faktörler arasındaki karmaşık bir etkileşimdir ve bu nedenle klinik belirtiler oldukça değişkendir. Pestivirus suşlarının virölansı ve Pestivirus'nun biyotipi (ncp ve cp) etken açısından başlıca belirleyiciyken, bağışıklık durumu, bağışıklık yeterliliği ve gebelik evresi konakçı açısından belirleyici faktörleridir (Baker, 1995 ve Lanyon ve ark., 2014).

Sitopatojen Pestivirus suşları ile enfekte olmuş hücre kültürlerinde, hücrelerin yuvarlaklaşması, ayrılması ve apoptoz nedeniyle hücre ölümleri gözlenirken, ncp Pestivirus ile enfekte olmuş hücrelerde mikroskopik olarak saptanabilir bir değişiklik görülmez. Ancak hem cp hem de ncp Pestivirus izolatları, in vivo olarak T ve B hücrelerinin apoptozunu indükler. Pestivirus ile konakçı etkileşimleri, bağışıklık tepkisinin varlığı ya da yokluğu ve klinik belirtilerin yokluğundan yüksek oranda öldürücü enfeksiyona kadar oldukça değişkendir. PI hayvanlarda Pestivirus replikasyonu veya viral bulaşma için hastalık oluşması zorunlu değildir. Virusun fetüse ve lenfatik organların hücrelerine olan afinite nedeniyle üreme problemleri veya immünoşüpresyon Pestivirus enfeksiyonlarının başlıca sonuçlarıdır. Pestivirus'un lenforetiküler dokulara olan güçlü affinitesi, lenf düğümlerinde ve dalakta nekroza ve Peyer plaklarının tahrip olmasına neden olur. Ayrıca fetüsün çeşitli dokularında, mononükleer hücre infiltrasyonu ile nekrotizan inflamatuvar reaksiyon bildirilmiştir. Pestivirus patogenezi ile ilişkili dört ana sendrom; akut enfeksiyon, transplasental enfeksiyon, kalıcı-persiste enfeksiyon ve mukozal hastalık (MD) olarak tanımlanmıştır (Baker, 1995 ve Lanyon ve ark., 2014).

1.3.8. Epizootiyoloji ve Klinik Bulgular

1.3.8.1. Bulaşma

Pestivirus bulaşını etkileyen dört ana faktör; virus türünün bulaşıcılığı (virölans), enfekte ve duyarlı hayvanlar arasındaki belirli zaman periyodunda yeterli temas sayısı, bir sürüdeki bulaştırıcı hayvanların prevalansı ve duyarlı hayvanların varlığıdır. Pestivirus enfeksiyonlarında 2 tip bulaşma vardır. Bunlardan ilki enfekte hayvanlarla

oro-nazal yoldan doğrudan temas ile horizontal olarak gerçekleşir. Horizontal geçiş geçici olarak enfekte (TI) hayvanlar ve/veya PI hayvanlar tarafından saçılan nazal veya oküler akıntı, süt veya kolostrum, semen, idrar, dışkı gibi tüm sekret ve sekresyonlar yolu ile gerçekleşir (Van Campen ve Frolich, 2001). Bir sürüde bulunan TI boğalar spermaları vasıtası ile Pestivirus kaynaklı bir enfeksiyonu bulaştırabilir. Bu tür boğalarda virus 28 güne kadar saptanabilir (Kirkland ve ark., 1994). Buna karşılık, PI boğalar hayatlarının her döneminde spermaları ile virus saçarlar ve TI hayvanların spermalarına oranla PI hayvanların spermalarında daha yüksek titrede virus bulunur. TI veya PI boğalardan elde edilen sperm ile suni tohumlama veya aynı boğalar ile doğal aşım yaptırılan seronegatif inekler akut enfekte olurlar. Kalabalık ahır ortamı, aerosol bulaşmayı mümkün kılan çevresel koşullar, kontamine materyaller, kontamine canlı aşılar akut enfekte hayvanlardan seronegatif hayvanlara horizontal bulaşma nedenlerinin en önemlileridir (Fulton ve ark., 2003 ve Niskanen ve Lindberg, 2003).

Diğer bir bulaşma şekli de plasenta yoluyla vertikal bulaşmadır ki; bu bulaşma yolu hastalığın epidemiyolojisinde önemli bir rol oynar. Bu bulaşma şekli gebe hayvanlar için çok önemlidir. İki Pestivirus biyotipinden biri olan sitopatojenik olmayan biyotip, bağışıklık sistemleri gelişmeden önce prenatal olarak fetüsü enfekte ederek, persiste enfeksiyona neden olur. Persiste enfeksiyonda, gebe hayvanın gebeliğinin hangi döneminde bu virusu aldığı önemlidir. Eğer yavru da bağışıklık sistemi gelişmeden virus plasentaya ulaşırsa, persiste enfeksiyon şekillenebilir. Sığırlar için bağışıklık sisteminin olgunlaşması gebeliğin 90-125 günleri arasında, koyunlar için gebeliğin 60-80. günleri ve keçiler için gebeliğin 80-100. günleri arasındadır (Hewicker-Trautwein ve Trautwein, 1994a; Hewicker-Trautwein ve ark., 1994b ve Oğuzoğlu, 2008).

Pestivirus enfeksiyonlarının bulaşmasında genellikle evcil geviş getirenlerden yabani geviş getirenlere veya tam tersi olarak geçiş olduğu bilinmekteyken, Çin'de yapılan bir çalışmada kan emen bir ektoparazit olan *Melophagus ovinus*'tan *Pestivirus D* izole edildiği ve *Melophagus ovinus*'un *Pestivirus D* taşıyıcısı olarak potansiyel bir rolü olabileceği bildirilmiştir (Liu ve ark., 2019). Pirene kürkü için beslenen tavşanlarda yüksek ölümlü salgınlarla ilişkili bir çalışmada ise, Avrupa tavşanının

(*Lepus europaeus*), çiftlik hayvanları için potansiyel bir pestivirus rezervuarı olabileceği tanımlamıştır (Colom-Cadena ve ark., 2016).

1.3.8.2. Enfeksiyon

1.3.8.2.1. Akut Enfeksiyon

Akut Pestivirus enfeksiyonları, seronegatif (immün kompetent olmayan) erişkin sığırlarda hafif semptomlarla karakterizedir. Bu enfeksiyon kaynaklı hastalık bazen subklinik, bazen de şiddetli semptomlarla birlikte görülebilir. Pestivirus suşlarının virulansı, akut enfeksiyonun sonucunun temel belirleyicisidir. Replikasyon farklılıklarının Pestivirus suşlarının virulansı üzerinde büyük etkisi vardır çünkü en yüksek düzeyde viremiye neden olan suşlar en şiddetli klinik semptomlara neden olmaktadır (Walz ve ark., 2001). Akut Pestivirus enfeksiyonları ayrıca hem B hem de T lenfositlerin azalmasına ve buna bağlı olarak immunsupresyona neden olarak enfekte hayvanda bağışıklık fonksiyonlarının baskılanmasına yol açar (Chase ve ark., 2004). Pestivirusların neden olduğu immunsupresyon, yalnızca enterit veya solunum semptomlarına neden olmakla kalmaz, aynı zamanda organizmanın diğer ajanlara karşı savunmasızlığını artırır ve sekonder bakteriyel enfeksiyonların gelişimine açık hale getirir (Baker, 1995).

1.3.8.2.2. Transplasental Enfeksiyon

Pestivirusların en büyük ekonomik etkisi, hayvanlarda gebelik sırasında veya hemen öncesinde akut enfeksiyon, suni tohumlama veya doğal aşım yoluyla kontamine sperma kaynaklı intrauterin ve transplasental enfeksiyona neden olma yeteneklerinden kaynaklanmaktadır. Pestivirus kaynaklı şekillenen fetal enfeksiyonun sonucu, enfeksiyon anında fetal bağışıklık sisteminin hangi gelişim aşamasında olduğuna bağlıdır. Gebeliğin ilk iki trimesterindeki fetal enfeksiyonlar üremeye ilgili ciddi problemlere, persiste enfeksiyonlara, fetal ölümlere, düşüklere veya konjenital anomalilere neden olur (Brownlie ve ark., 1998). Pestiviruslara bağlı yavru atıkları çoğunlukla gebeliğin erken evrelerinde meydana gelse de, bu atıklar gebeliğin

geç evresinde de meydana gelebilir. Geç gebelikte bağışıklık sistemi yeterli bir fötüsün intrauterin enfeksiyonu, hastalığın akut evresine benzerlik gösterir. Pestivirus kaynaklı kongenital anomaliler çoğunlukla gebeliğin ortasında ortaya çıkar ve bağışıklık, deri, kas-iskelet, sinir veya solunum sistemini etkileyen sonuçları olabilir (Hewicker-Trautwein ve Trautwein, 1994 ve Oğuzoğlu, 2008).

1.3.8.2.3. Persiste Enfeksiyon

Pestiviruslar, konakçı popülasyonunda kalıcı olmak ve yayılmak için persiste enfeksiyona neden olabilme özelliklerini kullanırlar. Gebeliğin ilk üç ayında, lenfoid dokular ve fonksiyonel bağışıklık tepkileri gelişmeden önce fötüsün ncp Pestivirus suşları ile enfeksiyonunun ardından PI hayvanlar doğar (McClurkin ve ark., 1984). Gebe hayvanlarda meydana gelen akut Pestivirus enfeksiyonu, PI yavru oluşumunun temel nedenidir. Bu durum, yalnızca Pestivirusların ncp biyotipine özgüdür. İmmünotolerans, adaptif bağışıklık sisteminden tamamen kaçınmaya ek olarak, ncp Pestivirus enfeksiyonunu takiben IFN-I sentezinin inhibisyonu yoluyla fetüste doğuştan gelen bağışıklığın seçici olarak ortadan kaldırılması ile gelişir.

1.3.8.2.4. Mukozal Hastalık

Mukozal hastalık (MD), çoğunlukla 6-24 aylık hayvanlarda, bazen de daha yaşlı yetişkin hayvanlarda ortaya çıkabilen, sporadik ve Pestivirus türlerinin ncp ve cp biyotiplerinin bir arada varlığı ile ilişkili oldukça ölümcül bir hastalıktır. MD'nin mekanizmasına ilişkin ilk hipotez, bu hastalığın yalnızca PI hayvanlarda geliştiği yönündeyken, ikinci hipotez bu hastalığı geçiren hayvanların hastalık süresince ncp suş ile birlikte bir cp virusu barındırdığı şeklindedir (Bolin ve ark., 1985 ve McClurkin ve ark., 1985). Daha sonra aynı hayvana ait ncp ve cp suşlar arasındaki yakın antijenik ilişkinin MD gelişimi için zorunlu olduğu tespit edilmiştir (Meyers ve ark., 1991). Mukozal hastalık, PI hayvanlarda, bulanık ncp biyotipteki Pestivirus türünün, cp biyotipine mutasyonlar sonucu dönüşümü ile şekillenebilir. Şüpheli

hayvanlarda şekillenen akut MD, esas olarak hücresel dizilerin eklenmesi, viral dizilerin kopyalanması ve silinmesi ile sonuçlanan rekombinasyon olaylarından kaynaklanan cp suşa özgü genomik değişikliklerden kaynaklanır. Genomik değişiklikler, enfekte hücreler için apoptotik bir sinyal sağlayan NS3 protein üretimini arttırır. NS3 geninin yukarı akışına ubiquitin kodlama dizilerinin eklenmesi ve NS2-3 bölünme bölgesinin yukarı yönde artışına NS2 içine konakçı hücre kaynaklı *Jiv* dizilerinin eklenmesi en yaygın olarak gözlenen genomik değişikliklerdir (Becher ve Tautz 2011 ve Tautz ve ark., 1993). MD hastalığının bir başka meydana gelme yolu da, PI hayvanların cp biyotipte ve antijenik olarak ncp biyotipteki virusa yakın, başka bir Pestivirus ile enfekte olmaları (süperenfeksiyon) ile ortaya çıkar. MD'e yakalanan hayvanlarda, hastalığın ortaya çıkmasından önce yapılan incelemelerde PI hayvanlarda ncp BVDV ile enfekte olmuş hücrelere kıyasla daha yüksek sayıda cp BVDV ile enfekte olmuş hücre bulunmuştur. Kronik MD'de, PI hayvanlarda bulunan ncp virusun antijenik özellikleri ve ekzojen kaynaklı süperenfeksiyona neden olan cp viruslar daha farklıdır. Süperenfeksiyon geçiren bu tür hayvanlar klinik olarak uzun bir süre prognozları kötüdür. Bazı durumlarda, MD süperenfeksiyondan birkaç hafta sonra gelişebilir ve bu durum geç başlangıçlı MD olarak bilinir. Bu hayvanlarda bulunan cp viruslar, aynı hayvanda cp ve ncp virusların rekombinantlarıdır. Bu cp viruslar; yapısal genlerini ncp virustan, yapısal olmayan genlerini de cp virustan almışlardır (Becher ve Tautz, 2011).

1.3.8.2.5. Klinik Belirtiler

Yetişkin hayvanlarda BVDV enfeksiyonlarının çoğu subklinik veya hafiftir. Bununla birlikte, bazı suşlar ölümlü ciddi hastalıklara neden olabilir. 5-7 günlük kuluçka döneminden sonra ateş, depresyon, iştahsızlık, okulonazal akıntı ve bazen erozyonlar, sığ ülserasyonlar gibi oral lezyonlar görülür (Baker, 1987). Buzağılarda, ara sıra ölümcül enterit ile solunum ve gastrointestinal semptomlar ortaya çıkar. Büyüme gecikir ve PI buzağılar çoğunlukla sütten kesilmeden önce ölür. BVDV boğalarda cinsel organlarda enfeksiyonlara neden olur, bu sebepten PI boğalardan elde edilen semen enfektiftir. Düşük motilite ve sperm hücrelerinin anormal morfolojisi

nedeniyle semen kalitesi düşer. Bu boğalardan elde edilen semen ile yapılan suni tohumlama veya doğal dölleme dışı hayvanlarda döl tutamama problemlerine neden olur. BVDV ile enfekte sürülerde sürekli tohumlanmaya rağmen dışı hayvanlarda gebe kalamama ve buna bağlı olarak para ve zaman kaybı gözlenir (Meyling ve Jensen, 1988).

Mukozal hastalığın belirgin özellikleri ateş, iştahsızlık, ataksi ve genel halsizlik ile birlikte kanlı ishaldir. Mortalite genellikle %100'dür ve klinik belirtilerin başlamasından sonraki 15 gün içinde şekillenir. Postmortem sırasında gastrointestinal sistemde, özellikle mukozadaki bağırsakla ilişkili lenfoid dokuyu (GALT) etkileyen yaygın ülseratif lezyonlar gözlenir (Baker, 1987).

BD enfeksiyonlarında klinik belirtiler arasında zayıf kuzuların doğumu ve yeni doğanlarda persiste enfeksiyonlar (PI) bulunur. Persiste enfeksiyonun nedeni fötüsler virusa olgunlaşmamış bir bağışıklık sistemi ile maruz kalmalarıdır. Bu PI kuzular viremiktir, antikor negatiftir ve yaşamları boyunca virus yayarak bir sürüdeki ana enfeksiyon kaynağı haline gelirler (Oğuzoğlu, 2012). Döl tutmama veya erken embriyonik ölümler, abortlar, zayıf/yaşama gücü düşük yavru doğumları; büyüme ve gelişmede geriliği gösteren yavru doğumları; yapağı kalitesinde bozukluk gösteren yavru doğumları (köpek kılı görünümü ya da yağlı yapağı sendromu) karakteristik klinik bulgulardandır (Oğuzoğlu, 2008).

1.3.8.3. Bağışıklık ve İmmunosupresyon

Pestivirusa karşı bağışıklık tepkileri aşılama, enfeksiyon, çapraz reaktif Pestivirus türlerine maruz kalma veya pasif olarak kolostrum yoluyla gelişir. Pestivirusa karşı antikor yanıtı, enfeksiyondan 2-3 hafta sonra oluşur, yaklaşık 10-12 hafta sonra platoya ulaşır ve uzun süre sabit olarak devam eder. Kolostrum yoluyla alınan pasif antikorlar, yeni doğan buzağıyı pestivirus enfeksiyonundan korur. Yapısal proteinler, E2 ve E^{ms} ve yapısal olmayan protein NS3 (P80), immünodominant proteinlerdir ve Pestivirus enfeksiyonunu takiben önemli antikor tepkilerini

indüklerler. E^{rms} ve NS3, nötralize edici olmayan antikorları ortaya çıkarırken, E2 glikoproteini nötralize edici antikorları uyarır bu sebepten dolayı koruyucu bağışıklığın ana belirleyicisidir (Chase ve ark., 2015), İnaktif aşılarda aşılammış sığırlar, zayıf bir NS3 antikor yanıtı geliştirirken, doğal enfeksiyon veya modifiye canlı aşı ile aşılamanın ardından güçlü bir NS3 antikor yanıtı ortaya çıkar (Ridpath, 2013).

Pestivirüsler, sığırlarda hücresele immun yanıtın genel inhibisyonuna neden olur. Pestivirus suşunun virulansına bağılı olarak hafif (%10-20 azalma) veya şiddetli lenfopeni (%50-60 azalma) şekillenir. Bu durumdan sitotoksik T-lenfositler (CD8⁺), yardımcı T-lenfosit (CD4⁺) hücrelerinden daha fazla etkilenir (Brodersen ve Kelling 1999). Ayrıca Pestiviruslar monositleri, dendritik hücreleri ve makrofajları etkileyerek, monosit ve makrofajların toll benzeri reseptörlerin (TLR) işlevini, sitokinlerin ekspresyonunu ve kostimülatör molekülleri değiştirebilir. Bu durum da onların yardımcı T hücrelerini uyarma yetenekleri üzerinde olumsuz bir etkiye neden olur (Brodersen ve Kelling 1999). Pestivirus kaynaklı E^{rms} ve N^{pro}, persiste enfeksiyonların oluşması ve sürdürülmesinde çok önemlidir çünkü doğuştan gelen bağışıklık tepkisini IFN-1 indüksiyonunun önlenmesi ile engellerler (Meyers ve ark., 2007).

1.3.9. Tanı

1.3.9.1. Konvansiyonel Yöntemler

1.3.9.1.1. Virus İzolasyonu

Virus izolasyonu (VI), pestivirus teşhisi için OIE tarafından önerilen altın standart testtir. VI, MDBK veya BT (sığır turbinata) gibi spesifik hücre hatlarında virus çoğaltılmasına ve ardından spesifik antikorlar veya moleküler yöntemler kullanılarak tespit edilmesine dayanır. VI için kullanılan hücreler ve serum, pestivirus antijeni ve antikoru içermemelidir. Pestivirus izolatlarının çoğu ncp biyotipi

olduğundan, E^{ms} veya NS3'e özgü monoklonal antikorlar kullanılarak immün boyama veya immünofloresan ile tespit önemlidir. cp suşlarda karakteristik sitopatik etkiler gözlenir. VI, hayvanlarda viremiyi saptar ve PI varlığını doğrulamak için kullanılır. Direkt immunperoksidaz testi, PI hayvan tespiti için yaygın olarak kullanılır. Kolostral antikorlar, PI hayvanlarda Pestivirus türlerini maskeleyebilir ve bunların saptanmasını engelleyebilir (Paton ve ark., 1995).

1.3.9.1.2. Antijen ELISA

Lökositler veya serum numunelerinde viral antijenin doğrudan tespiti, Pestivirus antijen ELISA ile yapılabilir. Antijen ELISA genellikle PI hayvanların taraması için önerilen bir yöntemdir ancak geçici olarak enfekte olmuş hayvanları da tespit edebilir. Bu nedenle PI hayvanların durumunu doğrulamak için 4-6 hafta sonra bir takip numunesi daha test edilmelidir. Test, monoklonal antikorlar kullanan sandviç ELISA prensibine dayanır ve genellikle periferik kan lökositlerinde, plazmada veya serumda BVDV NS2-3 veya E^{ms} antijenini tespit eder. Testin uygulanması kolay ve hızlı olmasına rağmen, duyarlılığı ve özgüllüğü düşüktür. Ayrıca, yanlış pozitifler olağandışı değildir. E^{ms} mAb tabanlı Antijen ELISA, bovine pestivirus'un üç türünü de, *Pestivirus A*, *Pestivirus B* ve *Pestivirus H*'yi tespit edebildiği için tercih edilir (Göktuna ve Yeşilbağ, 2017 ve Mishra ve ark., 2014).

1.3.9.1.3. Virus Nötralizasyon Testi (VNT)

VNT, anti-BVDV antikorlarını tespit etmek için altın standart testtir (OIE, 2017). Serokonversiyonun gösterilmesi için hem akut hem de nekahat dönemi serumları aynı anda test edilmelidir. Test, %50 nötralizan antikor değerinin belirlenmesine dayanır ve BVDV'nin hem cp hem de ncp suşları için kullanılabilir. Pestivirus türüne özgü lokal izolatlar kullanılmalıdır, çünkü belli bir Pestivirus türüne karşı oluşmuş düşük antikor seviyeleri, başka bir Pestivirus türü için kullanan bir VNT tarafından tespit edilemeyebilir. Pestivirus türlerinin, türler arası geçiş

özelliğinden ve serolojik çapraz reaktivite meydana gelebilme olasılığından dolayı, serolojik ayırıcı tanı için test edilen Pestivirus suşuna karşı ayırıcı nötralizasyon testi de eş zamanlı olarak yapılmalıdır (Kirkland ve Macintosh, 2006).

1.3.9.2. Moleküler Yöntemler

1.3.9.2.1. Reverse Transcriptase Polimeraz Chain Reaction (RT-PCR)

RT-PCR testleri, akut olarak enfekte olmuş hayvanları, PI hayvanları ve modifiye canlı aşılarla aşılanmış hayvanları hızlı şekilde saptayabilir ancak pozitif hayvanların durumunu tanımlamak için takip testleri gereklidir. Birkaç RT-PCR protokolü günümüze kadar geliştirilmiş ve değerlendirilmiştir. Bu gelişmelerin sonucunda günümüzde Pestivirus kaynaklı hastalıkların teşhisi için kullanılmaktadırlar. Kan, serum, süt, foliküler sıvı, tükürük ve doku örnekleri de dahil olmak üzere birçok örnek türü RT-PCR ile başarılı bir şekilde test edilebilir (Dubovi, 2013). Bununla birlikte, çapraz kontaminasyondan kaynaklanan yanlış pozitif vakalar nedeniyle nükleik asit bazlı testler sırasında önlemler alınmalıdır.

1.3.9.2.2. Gerçek Zamanlı RT-PCR

Gerçek zamanlı RT-PCR testi, eşzamanlı ölçme ve genotiplendirme sağladığından, sonuçların elde edilmesindeki hızlılığı nedeniyle günümüzde teşhis için daha yaygın olarak kullanılmaktadır. Pestivirus türlerinin teşhisi, genetik tiplendirilmesi ve 5'UTR'yi hedefleyen primerler ve probalar kullanılarak diğer Pestiviruslardan ayırt edilmesi için uniplex, duplex veya multiplex formatlarında birkaç gerçek zamanlı PCR testi ticari olarak mevcuttur (Baxi ve ark., 2006; Hoffmann ve ark., 2006; Liu ve ark., 2008 ve Willoughby ve ark., 2006)

1.3.9.2.3. Dizileme ve Yeni Nesil Dizileme

BVDV'nin genetik tiplemesi, BVD epidemiyolojisi ve kontrolü sırasında faydalı bilgiler sağlar. Pestivirus suşlarının daha doğru genetik tiplemesi, nükleotid dizilemesinden veya yeni nesil dizileme metodlarından elde edilen verilerin filogenetik analizler ile işlenmesi sonucu yapılır. Pestivirus tür ataması için 5'UTR'nin dizi analizi kullanılabilir de N^{pro} ve E2 genlerinin dizi analizi veya tüm genom analizleri, doğru bir şekilde sınıflandırabilme yapabilmek için kullanılabilir (Becher ve ark., 2003 ve Vilcek ve ark., 2001).

1.3.10. Önleme ve Kontrol

Başlangıçta pestivirus kaynaklı enfeksiyonların kontrolünün mümkün olmadığı düşünülse de, birçok Avrupa ülkesinde BVDV kontrol programlarının başarılı bir şekilde uygulanmasıyla yıllar içinde iyi planlanmış bir dizi kontrol stratejisi tasarlanmıştır. Kontrol programları için ortak stratejiler, PI hayvanların tanımlanması ve uzaklaştırılması, enfekte hayvanların hareket kontrolü, çiftlik biyogüvenliği ve gözetimidir. İskandinav ülkeleri, Avusturya ve İsviçre'de aşısız BVD kontrol programları başarıyla uygulanırken, Almanya, Belçika, İrlanda ve İskoçya'da aşıli kontrol uygulanmıştır (Moennig ve Becher, 2018). Zorunlu ve sistematik kontrol programları, gönüllü kontrol programlarından daha başarılı bulunmuş olsa da, çoğu ülkede BVD kontrolüne ilişkin resmi kılavuzlar bulunmamaktadır.

Pestivirus kaynaklı enfeksiyonları önlemek amacıyla sığır popülasyonlarında bağışıklığı artırmak, Pestivirus viremisini azaltmak ve fetal enfeksiyona bağlı olarak şekillenen PI buzağı oluşumunu önlemek için modifiye canlı (MLV) ve inaktif aşılar kullanılmaktadır. Aşılama, akut ve persiste enfeksiyonların insidansını azaltabilmesine rağmen, hayvanlarda bireysel olarak şekillenmiş tüm enfeksiyonları önlemede başarısız olabilmektedir. Bunun nedeni, Pestivirus alt

türlerinin (*Pestivirus A*, *Pestivirus B*, *Pestivirus H*, *Pestivirus D*) varlığı ve çeşitliliğinden kaynaklanmaktadır. Hali hazırda ticari olarak temin edilebilen BVD aşılarının çoğu, BVDV-1a, BVDV-1b, BVDV-2a antijenlerini veya farklı kombinasyonların bivalent aşılarını içerir ancak *Pestivirus H*'ye karşı herhangi bir aşı mevcut değildir. Aşılama çalışmaları, saha koşullarında etkili olmasına rağmen, tek başına kullanıldığında BVDV'nin neden olduğu klinik hastalığın ortadan kaldırılmasına veya BVDV kayıplarında önemli bir azalmaya neden olmamıştır (Ridpath, 2013). *Pestivirus D* için standart bir aşı yoktur, ancak deneysel olarak inaktif bir aşı üretilmiştir (Brun ve ark., 1993).

Bu bilgiler ışığında planlanan bu tez çalışmada;

- ✓ Ruminantlarda sirküle olan pestivirus enfeksiyonlarının laboratuvar tanısı,
- ✓ Pozitif olgularda bireylerdeki enfeksiyonun klinik döneminin (akut/kronik/persiste) belirlenmesi,
- ✓ Moleküler teknikler kullanılarak saha örneklerindeki pestivirus türlerinin ve alt tiplerinin aydınlatılması,
- ✓ Pestivirusların türler arası (sığır/koyun/keçi/manda vb ruminantlar) geçiş potansiyellerinin ortaya çıkarılması,
- ✓ Elde edilen verilerin; pestivirus enfeksiyonlarıyla kontrol ve mücadelede kullanılacak stratejilerin belirlenmesine yardımcı veri tabanını oluşturması hedeflenmiştir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

Doktora tez çalışması kapsamında, Marmara Bölgesi büyük ve küçükbaş hayvancılık işletmelerinden gönderilen kan, organ ve abort örnekleri (n=87) ile Ülkemize ihracat yolu ile gelen ve millileştirme işlemine tabi olmadan önce karantinada tutulan hayvanlardan alınan kan örnekleri (n=28) olmak üzere toplam 115 adet ruminant örneği Tarım ve Orman Bakanlığı Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Etik Kurulu'nun 02.07.2019 tarih ve 11/2019 (Ek-1) sayılı kararı ile araştırılmıştır.

2.1.1. Materyal

Etilendiamin Tetra Asetik Asit (EDTA) içeren kan tüplerine alınan tam kan ve natif amaçla alınan serum örnekleri ile abort ve/veya ölü ruminantlardan alınan organ ve dokular; Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Viral Teşhis Laboratuvarına soğuk zincir altında ulaştırıldı. Kan numuneleri 4 °C'de, doku örnekleri -20 °C'de muhafaza edildi. Örneklerin alındığı hayvanlara ait lokasyon bilgileri kaydedildi (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. Elde edilen tüm numunelerin (n=115) hayvan türü, numune şekli ve lokasyon bilgileri.

Kod Numarası	Tür	Numune şekli	Lokasyon	Kod Numarası	Tür	Numune şekli	Lokasyon
A01	Siğır	Kan / Serum	Kırklareli	C03	Siğır	Kan / Serum	İthalat
A02	Koyun	Atık Fetüs	Balıkesir	C04	Siğır	Kan / Serum	İthalat
A03	Siğır	Kan / Serum	Kırklareli	C05	Siğır	Kan / Serum	İthalat
A04	Siğır	Kan / Serum	Kırklareli	C06	Siğır	Kan / Serum	İthalat
A05	Siğır	Kan / Serum	Kırklareli	C07	Koyun	Atık Fetüs	Düzce
A06	Siğır	Kan / Serum	Kırklareli	C08	Koyun	Atık Fetüs	Düzce
A07	Siğır	Kan / Serum	Kırklareli	C09	Keçi	Kan / Serum	Kocaeli
A08	Siğır	Kan / Serum	Kırklareli	C10	Siğır	Atık Fetüs	Yalova
A09	Siğır	Kan / Serum	Kırklareli	C11	Siğır	Kan / Serum	Balıkesir
A10	Siğır	Kan / Serum	Kırklareli	C12	Koyun	Kan / Serum	İthalat
A11	Siğır	Kan / Serum	Kırklareli	C13	Siğır	Kan / Serum	İthalat
A12	Siğır	Kan / Serum	Kırklareli	C14	Siğır	Kan / Serum	İthalat
A13	Siğır	Kan / Serum	Kırklareli	C15	Siğır	Kan / Serum	Kırklareli
A14	Siğır	Kan / Serum	Kırklareli	C16	Siğır	Kan / Serum	Edirne
A15	Siğır	Kan / Serum	Bursa	C17	Siğır	Kan / Serum	Edirne
A16	Siğır	Kan / Serum	Çanakkale	C18	Siğır	Kan / Serum	İthalat
A17	Siğır	Kan / Serum	Kırklareli	C19	Kuzu	Organ	Bursa
A18	Siğır	Kan / Serum	Kırklareli	C20	Koyun	Atık Fetüs	Kırklareli
A19	Siğır	Kan / Serum	Kırklareli	C21	Siğır	Kan / Serum	İthalat
A20	Siğır	Kan / Serum	Kırklareli	C22	Siğır	Kan / Serum	İthalat
A21	Keçi	Atık Fetüs	Balıkesir	C23	Siğır	Kan / Serum	İthalat
A22	Siğır	Kan / Serum	İthalat	C24	Buzağı	Organ	Edirne
A23	Siğır	Kan / Serum	İthalat	C25	Siğır	Kan / Serum	İthalat
A24	Siğır	Kan / Serum	İthalat	C26	Siğır	Kan / Serum	İthalat
A25	Siğır	Kan / Serum	İthalat	C27	Siğır	Kan / Serum	İthalat
A26	Siğır	Kan / Serum	İthalat	C28	Siğır	Kan / Serum	İthalat
B01	Siğır	Kan / Serum	Bursa	C29	Siğır	Kan / Serum	İthalat
B02	Siğır	Kan / Serum	İthalat	C30	Koyun	Atık Fetüs	Bursa
B03	Keçi	Organ	Edirne	C31	Keçi	Organ	Çanakkale
B04	Siğır	Atık Fetüs	Kocaeli	C32	Koyun	Atık Fetüs	Kocaeli
B05	Koyun	Organ	Kocaeli	C33	Koyun	Atık Fetüs	İstanbul
B06	Siğır	Kan / Serum	İthalat	C34	Oğlak	Organ	Tekirdağ
B07	Keçi	Organ	Çanakkale	C35	Keçi	Atık Fetüs	Tekirdağ
B08	Koyun	Organ	Kırklareli	C36	Keçi	Atık Fetüs	Sakarya
B09	Koyun	Kan / Serum	İthalat	C37	Siğır	Atık Fetüs	Düzce
B10	Siğır	Atık Fetüs	Tekirdağ	C38	Siğır	Atık Fetüs	Bursa
B11	Koyun	Organ	Bilecik	C39	Koyun	Atık Fetüs	Sakarya
B12	Siğır	Organ	Çanakkale	C40	Siğır	Atık Fetüs	Çanakkale
B13	Siğır	Kan / Serum	Kırklareli	C41	Koyun	Atık Fetüs	İstanbul
B14	Siğır	Kan / Serum	Kırklareli	C42	Koyun	Organ	Çanakkale
B15	Siğır	Kan / Serum	Kırklareli	C43	Koyun	Atık Fetüs	Bursa
B16	Siğır	Kan / Serum	Bursa	D01	Keçi	Atık Fetüs	Düzce
B17	Siğır	Kan / Serum	Bursa	D02	Siğır	Kan / Serum	İthalat
B18	Siğır	Kan / Serum	Bursa	D03	Koyun	Atık Fetüs	Balıkesir
B19	Siğır	Kan / Serum	Bursa	D04	Keçi	Atık Fetüs	Edirne
B20	Siğır	Kan / Serum	Bursa	D05	Koyun	Atık Fetüs	Yalova
B21	Siğır	Kan / Serum	Bursa	D06	Siğır	Kan / Serum	Balıkesir
B22	Siğır	Kan / Serum	Bursa	D07	Siğır	Kan / Serum	Düzce
B23	Siğır	Kan / Serum	Bursa	D08	Siğır	Kan / Serum	İthalat
B24	Siğır	Kan / Serum	Bursa	D09	Siğır	Atık Fetüs	Düzce
B25	Siğır	Kan / Serum	Bursa	D10	Koyun	Organ	Kocaeli
B26	Siğır	Kan / Serum	Edirne	D11	Keçi	Atık Fetüs	Çanakkale
B27	Siğır	Atık fetüs	Edirne	D12	Manda	Atık Fetüs	Kocaeli
B28	Koyun	Organ	Çanakkale	D13	Keçi	Fetüs	Çanakkale
B29	Keçi	Organ	Çanakkale	D14	Keçi	Atık Fetüs	Edirne
B30	Koyun	Organ	Kırklareli	D15	Koyun	Organ	İstanbul
C01	Siğır	Kan / Serum	İthalat	D16	Keçi	Atık Fetüs	Çanakkale
C02	Siğır	Kan / Serum	İthalat				

2.1.2. Hücre ve Referans Viruslar

Moleküler tanı testlerinin optimizasyon çalışmalarında kullanılmak üzere referans Pestivirus suşları olarak BVDV için NADL-cp, Border Disease için Moredun-cp seçilmiş olup, bu virusların üretiminde MDBK ve SFTR hücreleri kullanıldı. Referans viruslar ve üretildikleri hücre kültürleri; Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı virus ve hücre koleksiyonundan temin edildi..

2.1.3. Kimyasal Maddeler ve Sarf Malzemeleri

Tez çalışmalarında kullanılan kimyasal maddeler ve sarf malzemeleri ticari olarak temin edildi ve Çizelge 2.2’de sunuldu.

Çizelge 2.2. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve Sarf Malzemeleri

Kimyasalar	Firmalar
Agaroz Jel	Grisp, Portekiz
TAE Buffer	Grisp, Portekiz
Mutlak etanol	Merck, Almanya
Etidiyum bromit	Promega, ABD
Yükleme tamponu	Grisp, Portekiz
Pipet 10ul	Kirgen, Çin
Pipet 100ul	Kirgen, Çin
Pipet 200ul	Kirgen, Çin
Pipet 1000ul	Kirgen, Çin
Microcentrifuge tube 1,5 ml	Thermo Scientific, Litvanya
Water Molecular biology grade	Thermo Scientific, Litvanya
Random Hexamer Primer	Thermo Scientific, Litvanya
RevertAid Reverse Transcriptase	Thermo Scientific, Litvanya
dNTP Mix	Thermo Scientific, Litvanya
Taq DNA Polymerase	Thermo Scientific, Litvanya
Universal Ladder	Grisp, Portekiz
Nitril Eldiven Large	
PBS Solution w/o Ca ²⁺ ,Mg ²⁺	

2.1.4. Ticari Kitler

Tez çalışmasında kullanılan ticari kitlere ait bilgiler, Çizelge 2.3’de sunuldu.

Çizelge 2.3. Çalışmada kullanılan ELISA, ekstraksiyon ve PCR kitleri.

Kitler	Firmalar
BVDV Ag/Serum Plus ELISA	IDEXX, İsviçre
2x Master Mix with Dye	Grisp, Portekiz
DNA Purification Kit	Roche, Almanya

2.1.5. Cihazlar

Tez çalışmasında; Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü, Viral Teşhis Laboratuvarına ve Moleküler Genetik Laboratuvarına ait cihazlar kullanılmış olup, cihazlara ait bilgiler Çizelge 2.4’de sunuldu.

Çizelge 2.4. Çalışmada kullanılan cihazlar listesi.

Cihazlar	Firmalar
-20 ve -80 °C derin dondurucu	Sanyo, Japon
Laminar flow	Heraeus, Almanya
Magna-Lyser doku parçalayıcı	Roche, ABD
Soğutmalı Santrifüj	Sigma, ABD
Vorteks	Heidolph Reax Top, Almanya
Kuru blok ısıtıcı	Techne, UK
Soğutmalı mikrosantrifüj	Hettich micro 22 R, Japon
Termal Cyclers	Biorad, Amerika
Hassas terazi	Presica, İsviçre
Mikrodalga fırın	Beko, TR
Elektroforez cihazı	Biorad 300v
Trans-İlluminator	312 Vilber Lourmat
Jel Görüntüleme Sistemi	Poloroid, GelCam, UK

2.2. Yöntem

2.2.1. Kan Numunelerinin Hazırlanması

Tam kan örnekleri; 4 °C’de 1500 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası, her örneğe ait plazma ve lökosit kısımları ayrılarak stok tüplere konuldu ve -80 °C’de depolanarak saklandı. Viral nükleik asit izolasyonu amacıyla stok örneklerden 0,5 ml alınarak, 1,5 ml’lik ependorf tüplere aktarıldı.

2.2.2. Organ ve Doku Numunelerinin Hazırlanması

Soğuk zincirde laboratuvara ulaştırılan organ ve doku numuneleri, Viral Teşhis Laboratuvarında bulunan biyogüvenlik kabininde, (Holten HWR 2448) steril petri kaplarında, her örnekten 0,5 gram olacak şekilde bistüri yardımıyla küçültüldükten sonra, steril 15 ml’lik tüplere konularak üzerlerine Fosfat Buffered Saline (PBS w/o Ca^{2+} , Mg^{2+}) ilave edilip vortekslendi. Daha sonra 1/10 oranında homojenize edilen doku ve organ numuneleri, 3000 devirde 4 °C’de 10 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatanttan viral nükleik asit izolasyonu amacıyla 0,5 ml alınarak 1,5 ml’lik ependorf tüpe aktarıldı. Artı kalan şahit numune ise -80 °C’de derin dondurucuda muhafaza edildi.

2.2.3. Hücre ve Referans Virusların Hazırlanması

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı Laboratuvarı hücre koleksiyonundan temin edilen ve pestivirus negatifliği test edilmiş MDBK ve SFT-R hücreleri, %10 FCS içeren MEM ile kültüre edilip çoğaltıldı ve kademeli soğutma yapılarak -80 °C’de stoklandı. Monolayer olarak tabakalanmış MDBK hücre kültürüne BVDV referans suşu olan NADL-cp, SFT-R hücre kültürüne Border Disease referenz suşu olan Moredun-cp 0,5 MOI oranında adsorbsiyonlu metotla

inokule edildi. Üreme takibi invert mikroskopta 5 gün boyunca yapıldı. Cpe takibinin beşinci günü sonunda (cpe oranı %70-80) -20 °C’de enfekte hücreler donduruldu. Üç kör pasajı takiben, hücre kültüründe çoğaldığı belirlenen virus izolatlarının standardizasyonu amacıyla Frey ve Liess’in (1971) bildirdiği metoda göre virusların 10 katlı dilusyonları hazırlandı ve titrasyon testi ile TCID₅₀/0,1ml değerleri belirlendi. Ayrıca referans virusların üreme teyidi poliklonal antikorlardan hazırlanan peroksidaz konjugatı kullanılarak PLA testi ile yapıldı. Titresi belirlenen referenz viruslar 0,5 ml olacak şekilde porsiyonlanarak, -80 °C’de saklandı ve RT-PCR optimizasyon çalışmalarında pozitif kontrol olarak kullanıldı.

2.2.4. Pestivirus Antijen ELISA

Gelen örneklerin kan serumlarından pestivirus antijenlerinin varlığı ticari ELISA (BVDV Antijen Test Kit, IDEXX, İsviçre), üretici firmanın prosedürüne göre yapıldı. Sonuçlar ELISA cihazında okundu ve optik dansite (OD) değerlerine göre pozitif serumlar kaydedildi. Test aşağıda tarif edildiği şekilde gerçekleştirildi:

- Testte başlamadan önce bütün kimyasallar 18-26 °C oda ısısına getirildi ve nazik bir şekilde çevrilerek karıştırıldı.
- Ticari olarak kaplanmış olan ELISA pleyti üzerindeki kuyucuklar numaralandırıldı.
- Kit içerisinde bulunan tespit antikor solüsyondan 50 µl tüm gözlere konuldu.
- Kit içerisinde bulunan ticari pozitif kontrol (PK) ve negatif kontrol solüsyonlarından 50 µl PK ve NK için belirlenmiş gözlere konuldu.
- Her bir kuyucukta bulunan solüsyonlar 2-8 °C’de 12-18 saat inkubasyona bırakıldı ve sonrasında solüsyonlar döküldü.
- Her bir kuyucuk 300 µl yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkandı.
- Yıkamayı takiben, konjugat solüsyonundan tüm kuyucuklara 100 µl konuldu.
- Pleytler 30 dk. oda ısısında (18-26 °C) inkubasyona bırakıldı.
- Yıkama işlemi tekrar edildi ve son yıkamadan sonra kuyucuklara 100 µl TMB substrate eklendi.

- Reaksiyon için 18-26 °C’da 10 dk. beklenildi.
- Bu süre sonunda reaksiyonlar tüm kuyucuklara 100 µl stop solüsyonu konularak durduruldu.
- Tüm örneklerin ve kontrollerin optik dansite değerleri 450 nm dalga boyunda ELISA okuyucuda okutuldu. Sonuçlar aşağıda belirtildiği gibi hesaplandı.

$$NKx = \frac{NK1 A(450) + NK2 A(450)}{2} \quad PKx = \frac{PK1 A(450) + PK2 A(450)}{2}$$

NK1 = Negatif Kontrol 1 (birinci kuyucuk OD değeri)

NK2 = Negatif Kontrol (ikinci kuyucuk OD değeri)

NKx = Negatif Kontrol ortalaması (negatif kontrollerin 1 ve 2 inci kuyucuklarının OD toplamalarının ikiye bölünmesi ile elde edilen ortalama OD değeri.

PKx = Pozitif Kontrol ortalaması (pozitif kontrollerin 1 ve 2 inci kuyucuklarının OD toplamalarının ikiye bölünmesi ile elde edilen ortalama OD değeri.

$$Validasyon: NKx \leq 0,250 \quad PKx \leq 0,150$$

$$\text{Örnek Doğrulanmış OD Değeri (Ö)} = \text{Örnek OD değeri} - NKx \text{ OD değeri (N)}$$

$$\text{NEGATİF SONUÇ: } \text{Ö} - \text{N} \leq 0,300$$

$$\text{POZİTİF SONUÇ: } \text{Ö} - \text{N} > 0,300$$

Sonuçların yorumlanması ise aşağıda tarif edildiği şekilde gerçekleştirildi.

- Örneklerin Doğrulanmış OD değerinden Negatif Kontrol ortalaması çıkartıldığında elde edilen sonucun 0,300’den düşük veya eşit olması durumunda sonuç negatif,
- Örneklerin Doğrulanmış OD değerinden Negatif Kontrol ortalaması çıkartıldığında elde edilen sonucun 0,300’den büyük olması durumunda sonuç pozitif olarak değerlendirildi.

2.2.5. Viral Nükleik Asit İzolasyonu

Antijen ELISA ile pozitif bulunan kan örnekleri ile tüm organ materyalleri, viral nükleik asit ekstraksiyonuna alındı. Örnekler ile birlikte negatif kontrol olarak steril distile su kullanıldı. High Pure Viral Nükleik Asit Kiti (Roche, Almanya) kullanılarak, üretici firmanın önerileri doğrultusunda RNA'lar elde edildi. Bu kite ait uygulama protokolü aşağıda belirtildiği şekilde uygulandı.

- Örneklerden 200'er µl alındı ve 1,5 ml'lik tüplere konuldu.
- Aynı tüplere 200'er µl bağlanma tamponu,
- 50 µl proteinaz K solüsyonu (25 U/mg),
- 4 µl poly (A) eklendi ve vorteks yardımıyla karıştırıldı.
- Karışım 72°C'de 10 dk. inkube edildi.
- Aynı tüplere 100'er µl bağlanma tamponu (Guanidinium HCL/Triton x-100) ilave edilerek vortekslendi.
- Hazırlanan karışım toplama tüpleri içerisine yerleştirilen filtreli tüplere aktararak 8000 g'de 1 dk. santrifüj edildi.
- Santrifüjü takiben sıvı biriken toplama tüpleri atıldı.
- Filtreli tüpler yeni toplama tüplerine yerleştirildi.
- Tüplere 500 µl inhibitor uzaklaştırma tamponu eklenip 8000 g'de 1 dk. santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası altta sıvı biriken toplama tüpleri atıldı.
- Üstteki filtreli tüpler yeni toplama tüpleri içine yerleştirilerek üzerine 450 µl yıkama tamponu eklendi ve 8000 g'de 1 dk. santrifüj edildi.
- Bu basamak bir kez daha tekrar edildi.
- Ardından filtrede kalan etanolün tamamen uzaklaştırılması için 14000 g'de 10 saniye santrifüj edildi
- Filtreli tüpler yeni tüpler içine yerleştirildi ve üzerine daha önceden 70°C'de ısıtılmış çözünme tamponundan 50'şer µl eklendi ve 8000 g'de 1 dk. santrifüj edildi.
- Son olarak üstteki tüpler atıldı ve elde edilen ekstraktlar PCR testinde kullanılıncaya kadar, -80°C'de muhafaza edildi.

2.2.6. Komplementer Deoksiribo Nükleik Asit (cDNA) Sentezi (Reverse Transcription-RT)

Ekstraksiyonu yapılan RNA'lar kullanılarak; Çizelge 2.5'te bildirilen koşullarda cDNA elde edildi.

- RNA ekstraktları -80 °C'den alınarak, kit protokolündeki tüm reaksiyon bileşenleri ile ısı bloğunda çözüldü, vorteks ile karıştırıldı ve kısa süreli santrifüj yapıldıktan sonra buz aküsü içerisine yerleştirildi.
- Buz aküsü üzerine çalışılacak örnek sayısı kadar PCR mikro santrifüj tüpleri konuldu.
- PCR mikro santrifüj tüplerinin içerisine örnek başına 3 µl steril deionize moleküler su, 0,5 µl Random Hexamer Primeri konulmasını takiben, ekstraksiyonu yapılan örneklerle ait RNA'lardan her tüpe 3'er µl konuldu.
- Tüpler, thermal cyclere yerleştirilerek 70 °C'de 5 dk inkübasyona bırakıldı.
- Inkübasyon sonunda, tüpler buz aküsüne yerleştirilerek soğuması sağlandı.
- Her tüpün üzerine toplam 3,5 µl (Miks 2 = 2 µl 5X Reaction Buffer, 1 µl 10 mM dNTP mix ve 0,5 1 µl RT enzimi) miks 2 karışımından ilave edildi.
- Tüpler, tekrar thermal cyclere yerleştirilerek 25°C'de 10 dk, 37°C'de 60 dk ve 70°C'de 5 dk'dan oluşan program süresince inkübasyona bırakıldı.
- Inkübasyon sonunda cDNA'lar elde edildi.

Çizelge 2.5. cDNA eldesi için kullanılan bileşenler ve ısı protokolü,

Bileşenler	Konsantrasyon	Kullanılan Program
Random Hegzamer	0,5 µl	
Moleküler Deionize su	3 µl	70°C 5 dk
RNA	3 µl	12°C 1dk
5X buffer	2 µl	25°C 10 dk
dNTP mix	1 µl	37°C 1 saat
RT	0,5 µl	70°C 5 dk

2.2.7. Polimerase Chain Reaction (PCR)

2.2.7.1. 5'UTR Gen bölgesine Yönelik PCR Ürün Eldesi

Örneklerden elde edilen cDNA'lar Vilcek ve ark., (1994) tarafından bildirilen yöntemler ve primerler kullanılarak konvansiyonel RT-PCR protokolü uygulandı. Bu uygulamada kullanılan primer ve ısı protokollü Çizelge 2.6 ve Çizelge 2.7'de sunuldu.

Çizelge 2.6. 5'UTR gen bölgesi için RT-PCR tekniğinde kullanılan primer setleri.

Primerler	Primer Dizini (5'-3')	Hedef Gen	Ürün (Bp)	Referans
F V324	ATGCCCCGTAGTAGGACTAGCA	5'UTR Pozisyon (108-128)	288	Vilcek ve ark., 1994
R V326	TCAACTCCATGGCCATGTAC	5'UTR Pozisyon (375-395)	288	Vilcek ve ark., 1994

Çizelge 2.7. 5'UTR gen bölgesi için RT-PCR tekniğinde kullanılan bileşenler ve ısı protokolü.

Bileşenler	Konsantrasyon	Kullanılan Program
Taq DNA Polymerase	0,25 µl	
10XBuffer	3 µl	96°C 6 dk
MgCl	2,4 µl	
dNTp mix	0,5 µl	56°C 1 dk
Forward Primer	0,5 µl	72°C 2 dk
Reverse Primer	0,5 µl	94°C 1 dk (34 Siklus)
Deionize su	19,85 µl	50°C 1 dk
cDNA	3 µl	72°C 10 dk

2.2.7.2. NS2-3 Gen bölgesine Yönelik PCR Ürün Eldesi

Örneklerden elde edilen cDNA'lar, c ve ark. (1993) tarafından bildirilen primerler kullanılarak konvansiyonel RT-PCR protokolü uygulandı. Bu uygulamada kullanılan primer ve ısı protokolü Çizelge 2.8. ve Çizelge 2.9'da sunuldu.

Çizelge 2.8. NS2-3 gen bölgesi için RT-PCR tekniğinde kullanılan primer setleri.

Primerler	Primer Dizini (5'-3')	Hedef Gen	Ürün (Bp)	Referans
NS2-3-F	GCAGATTTTGAAGAAAGACACTA	NS 2-3	402 veya 672	Greiser-Wilke ve ark., 1993
NS2-3-R	TTGGTGTGTGTAAGCCCA	NS 2-3	402 veya 672	Greiser-Wilke ve ark., 1993

Çizelge 2.9. NS2-3 gen bölgesi için RT-PCR tekniğinde kullanılan bileşenler ve ısı protokolü.

Bileşenler	Konsantrasyon	Kullanılan Program
Taq DNA Polymerase	0,25 µl	96°C 6 dk
10XBuffer	3 µl	
MgCl	2,4 µl	48°C 1 dk
dNTp mix	0,5 µl	72°C 2 dk
Forward Primer	0,5 µl	94°C 1 dk (34 Siklus)
Reverse Primer	0,5 µl	
Deionize su	19,85 µl	50°C 1 dk
cDNA	3 µl	72°C 10 dk

2.2.7.3. N^{pro} Gen bölgesine Yönelik PCR Ürün Eldesi

Şüpheli numunelerden elde edilen cDNA ürünleri, bu çalışmada dizayn edilen yöntemler ve primerler kullanılarak konvansiyonel RT-PCR protokolü uygulandı. Bu uygulamada kullanılan primer ve ısı protokollü Çizelge 2.10. ve Çizelge 2.11’de sunuldu.

Çizelge 2.10. N^{pro} gen bölgesi için RT-PCR tekniğinde kullanılan primer setleri.

Primerler	Primer Dizini (5'-3')	Hedef Gen	Ürün (Bp)	Referans
N ^{pro} TC01F	ATGGAGTTGATTCAAATGAAC	N ^{pro}	412	Bu çalışmada dizayn edildi.
N ^{pro} TCO3R	CACCCATCTATRCACACATA	N ^{pro}	412	Bu çalışmada dizayn edildi.

Çizelge 2.11. N^{pro} gen bölgesi için RT-PCR tekniğinde kullanılan bileşenler ve ısı protokolü.

Bileşenler	Konsantrasyon	Kullanılan Program
Taq DNA Polymerase	0,25 µl	96°C 6 dk
10XBuffer	3 µl	
MgCl	2,4 µl	52°C 1 dk
dNTp mix	0,5 µl	72°C 2 dk
Forward Primer	0,5 µl	94°C 1 dk (34 Siklus)
Reverse Primer	0,5 µl	
Deionize su	19,85 µl	52°C 1 dk
cDNA	3 µl	72°C 10 dk

2.2.7.4. E Gen Bölgesine Yönelik PCR Ürün Eldesi

Şüpheli numunelerden elde edilen cDNA ürünleri, Oğuzoğlu ve ark., (2017) tarafından bildirilen yöntemler ve primerler kullanılarak konvansiyonel RT-PCR protokolü uygulandı. Bu uygulamada kullanılan primer ve ısı protokolü Çizelge 2.12 ve Çizelge 2.13’de sunuldu.

Çizelge 2.12. E gen bölgesi için RT-PCR tekniğinde kullanılan primer setleri.

Primerler	Primer Dizini (5’-3’)	Hedef Gen	Ürün (Bp)	Referans
E-F	GGGATCCATAACAGGGGTACAAGGG	E	1179	Oğuzoğlu ve ark., 2017
E-R	GAAGCTTCTAGACAAGTTGCCCATCATCAC			

Çizelge 2.13. E gen bölgesi için RT-PCR tekniğinde kullanılan bileşenler ve ısı protokolü.

Bileşenler	Konsantrasyon	Kullanılan Program
Taq DNA Polymerase	0,25 µl	96°C 6 dk
10XBuffer	3 µl	
MgCl	2,4 µl	50°C 1 dk
dNTp mix	0,5 µl	72°C 2 dk
Forward Primer	0,5 µl	94°C 1 dk (34 Siklus)
Reverse Primer	0,5 µl	
Deionize su	19,85 µl	50°C 1 dk
cDNA	3 µl	72°C 10 dk

2.2.8. PCR Ürünlerinin Görüntülenmesi

RT-PCR aşamasından elde edilen amplifikasyon ürünlerini görüntülemenin yapılabilmesi için Agaroz Jel Elektroforezi yapıldı. Bu işlem için:

- Beher içerisine 1,50 gr agaroz konulup üstüne 100 ml 10X TAE (Tris Asetat -EDTA) tamponu ilave edildi.
- Isı yardımıyla (mikro dalga fırın) çözülen agaroz, soğutulduktan sonra, sonra üzerine 0,5 µg/ml oranında ethidium bromide (Sigma, ABD) konularak % 1,5'lik agaroz jel hazırlandı.
- Bu karışım tarak yerleştirilmiş olan jel kasetine döküldü.
- Yaklaşık olarak 30 dakika sonra donmuş olan jel elektroforez tankına yerleştirildi.
- Elektroforez tankı agaroz jelin üzerini örtecek şekilde TAE buffer ile dolduruldu.
- PCR ürünleri yükleme boyası ile (6x Loading Dye, Jena, Almanya) agaroz jelde kuyucuklara sırasıyla yüklendi.
- Yükleme boyası içinde 100 bp merdiven (DNA merdiveni, Jena Bioscience, Almanya) solüsyonundan ilk ve son kuyucuklara 5 µl yüklendi.
- Ürünler yaklaşık 40 dakika, 100 Volt elektrik akımında örnekler jelin 2/3'ünü geçene kadar yürütüldü.
- Jel görüntüleme sistemi (Kodak, Gel Logic 100) kullanılarak PCR sonucu oluşan ampikonlar UV ışık altında görüntülendi.

2.2.9. Ampikonların Purifikasyonu

Ampikonlar, agaroz jel elektroforez sonrası görüntülenerek, dizin analizine gönderilmek üzere saflaştırma işlemine tabi tutuldu. Saflaştırma işlemi için iki yöntem kullanıldı. PCR sonucu beklenen büyüklükte, tek ve temiz bir bant elde edilmişse, ticari “clean-up” kiti (ExoSAP-IT™, Thermo Fisher), beklenen bantın altında veya

üstünde farklı bantlarda var ise, ticari “gel extraction” kiti (High Pure PCR Product Purification Kit, Roche) kullanıldı. Söz konusu kitlerin protokolü aşağıda belirtilmiştir.

- %1,5’luk agaroz jelden çalışılmak istenen bant steril bisturi ile kesilerek ependorf tüplere konuldu.
- Tüplere konulan jel bantların ağırlığının 3 katı miktarında “Gel solubilization” solüsyonu konuldu.
- Tüpler 56 °C’de 10 dk bekletildikten sonra, ependorf tüpündeki jelin eriyik hale dönüşmesi görüldü.
- Tek ve temiz bir bant elde edildiyse, üste anlatılan basamaklar atlanıldı.
- PCR reaksiyonu sonucu oluşan PCR ürününün sıvı miktarının 3 katı kadar “Binding Buffer” tüplere konuldu.
- Söz konusu iki durumda da alta yazılan basamaklar uygulandı.
- Filtreli kolon tüplerine alınan sıvılar 10000xg devirde 1 dk santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası süzülen kısımlar atıldıktan sonra, filtreler üzerine 500 µl BW yıkama solüsyonu konuldu ve tekrar 10000xg de 1 dk santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası süzülen kısımlar atıldıktan sonra filtreler üzerine 700µl TW yıkama solüsyonu konuldu ve tekrar 10000xg de 1 dk santrifüj edildi.
- Santrifüj işleminden sonrası süzülen kısımlar atıldı ve filtreler boş olarak 10000xg’de 1 dk daha santrifüj edildi.
- Steril ependorf tüplere alınan filtreler 70°C sıcaklığa getirilmiş “elution buffer” dan 35 µl eklendi.
- 1 dk oda sıcaklığında bekleyen tüpler daha sonra 10000xg’de 1 dk santrifüj edildi.
- Elde edilen amplikonlar kontrol için tekrar agaroz jelde yürütüldü, uygun olanlar sekans analizine kadar -20°C’de saklandı.

2.2.10. Dizileme Analizi

Saflaştırılan ürünler jelde tekrar yürütölerek kontrol edildikten sonra, TAGEM projesi kapsamında sağlanan hizmet alımı ile ticari Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü, Moleköler Genetik Laboratuvarına dizin analizine gönderildi. Dizin analizi Sanger metoduna göre yapılmış olup, kullanılan cihaz ABI 3130xl DNA Analyzer (Applied Biosystem, ABD)'dır.

2.2.11. Moleköler Karakterizasyon ve Filogenetik Ağaç Oluşturulması

Dizileme analizi sonrası elde edilen dizinler, doğrulama amacıyla National Center for Biotechnology Information (NCBI) veritabanında yer alan Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) programına yüklendi (Camacho ve ark., 2009) ve sekans analizi sırasında histogramların düzgünlüğünü ve derinliğini kontrol etmek için Molecular Evolutionary Genetic Analysis version 6.0 (MEGA 6.0v) (Tamura ve ark., 2013) programının Tracer bölümü kullanıldı. Kontrol ve düzeltme işlemleri sonrasında aynı gen bölgelerine ait dizinleri birbirine hizalamak ve kıyaslamak için "Clustal W Alignment" yazılımı kullanıldı. Hizalama ve kıyaslama işlemi sonrası dizin uzunluklarını birbirine eşitlemek için uzun olan dizinlerin 5' ve 3' uçlarından kesildi. Nükleotid bazlı değişiklikler gözlemlendi ve karşılaştırma yapıldı.

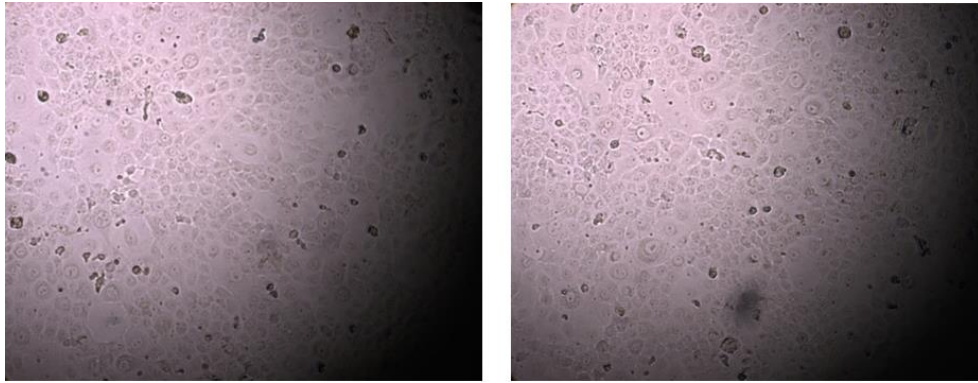
Filogenetik analizlerin yapılması için, elde edilen dizinlerin karşılaştırılması amacıyla NCBI GenBank veri tabanında yer alan referans dizinler alındı (Benson ve ark., 2014). Bioedit programı kullanılarak Clustal W yöntemi ile hizalanan tüm dizinler Fasta formatında kaydedilerek, MEGA programına aktarıldı ve en iyi modelleme için "Find best DNA models" işlemine alındı. Bu işlem sonucunda 5'UTR, N^{pro}, NS2-3 ve E gen bölgeleri için en uygun modelin GTR+G+I modellemesi olduğu saptandı. Modelleme sonrası filogenetik ağacı oluşturmak için programda Neighbour Joining istatistik metodu, Kimura-2 parametre modeli, GTR +G+I modellemesi ve 1000 bootstrap tekrarı seçildi. 1000 bootstrap tekrarı seçildi.İşlem sonucunda filogenetik ağaçlar elde edilmiştir. Filogenetik ağaç üzerinde genotiplendirme yapıldı.

3. BULGULAR

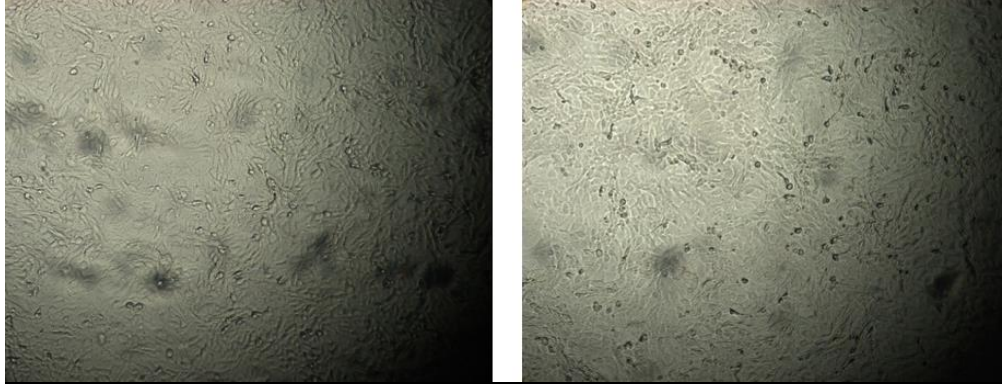
Elde edilen numuneler (n=115), sığır (n=76), koyun (n=23), keçi (n=15) ve manda (n=1) orijinli olup, 85 örnek Türkiye orijinli, 30 örnek ise ithalat yolu ile elde edilen numunelerdir. İthalat yolu ile gelen hayvanlardan elde edilen örneklerin tamamı tam kan numunesi, Ülkemize ait örneklerin 29'u (%34) atık fetüs, 16'sı (%19) organ/doku ve 40'ı (%47) ise kan örneğidir.

Elde edilen örneklerin coğrafi dağılımı Balıkesir (n=5), Bilecik (n=1), Bursa (n=14), Çanakkale (n=11), Düzce (n=6), Edirne (n=8), İstanbul (n=3), Kırklareli (n=24), Kocaeli (n=6), Sakarya (n=2), Tekirdağ (n=3) ve Yalova (n=2) şeklindedir.

RT-PCR'da hem optimizasyon çalışmalarında hem de pozitif kontrol olarak kullanılmak üzere gereksinim duyulan referans virus suşlarının üretilmesi amacıyla Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı laboratuvarı hücre koleksiyonundan sağlanan MDBK ve SFT-R hücre hatlarının monolayer üretimi gerçekleştirildi (Şekil 3.1 ve 3.2).

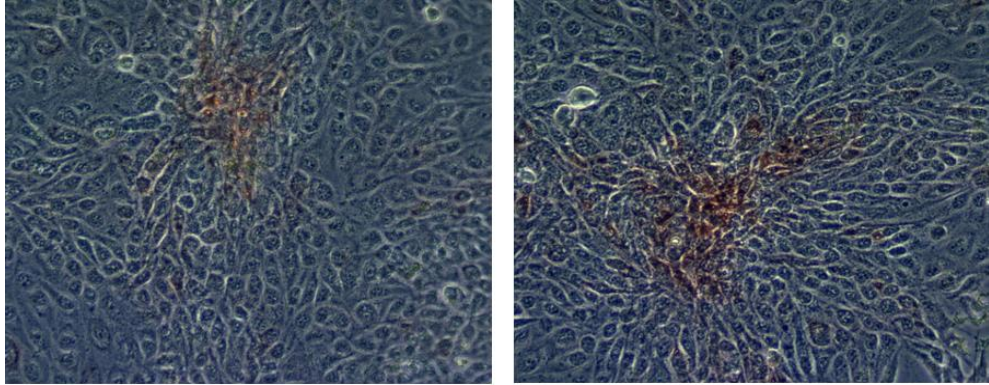


Şekil 3.1. MDBK hücre kültürü ışık mikroskobu görüntüsü.

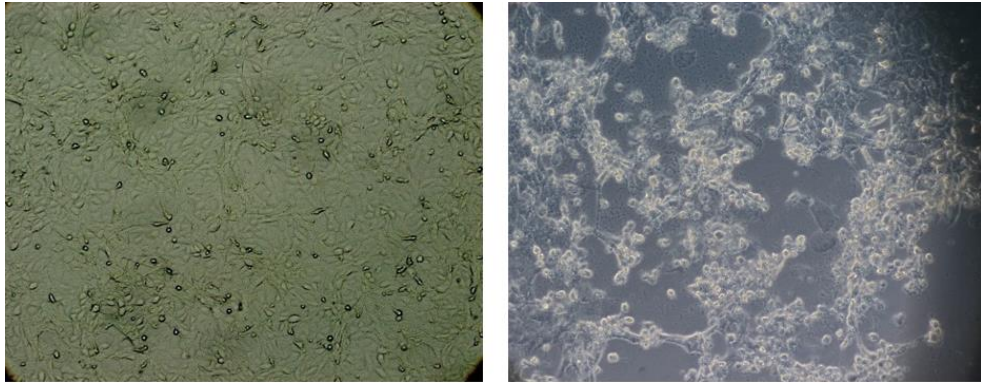


Şekil 3.2. SFT-R hücre kültürü ışık mikroskobu görüntüsü.

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Ana Bilim Dalı laboratuvarı bünyesinden temini sağlanan referans pestivirus suşları olan NADL ve Moredun, MDBK ve SFT-R hücre kültürleri kullanılarak üretilmiş, PLA testi ile boyanarak immunhistokimyasal olarak üremeleri teyit edildi (Şekil 3.4 ve 3.5).



Şekil 3.3. Poliklonal pestivirus antikorları kullanılarak hazırlanan peroksidaz konjugatı ile yapılan PLA testi görüntüleri.



Şekil 3.4. Sırasıyla Moredun ve NADL suşları post inokulasyon üçüncü gündeki CPE görüntüleri.

Pestivirus şüpheli kan ve serum numunelerine öncelikli olarak Antijen ELISA testi uygulandı. Tablo 1’de lokasyon ve hayvan türü bilgileri de yer alan kan ve serum örneklerinden 35 adedi antijen ELISA’da pozitif olarak tespit edildi. Daha sonra kan numuneleri ve doku numuneleri beraber olarak ekstraksiyon işlemine tabii tutulmuştur. Örneklerin ekstraksiyon sonrası spektrofotometrede ölçülen nükleik asit miktarları Çizelge 3.1’de verildi.

Çizelge 3.1. Numunelerden elde edilen ekstraktlarda bulunan nükleik asit miktarı (ng/uL)

Örnek İsmi	Viral Nükleik Asit Miktarı	Örnek İsmi	Viral Nükleik Asit Miktarı	Örnek İsmi	Viral Nükleik Asit Miktarı	Örnek İsmi	Viral Nükleik Asit Miktarı
B1	53,39	C3	48,29	B30	79,28	C32	62,45
B2	119,72	C4	58,42	A1	80,42	C33	98,78
B3	116,65	C5	202,4	A2	138,36	C34	117,05
B4	157,54	C6	86,25	A3	47,54	C35	184,92
B5	102,43	C7	176,41	A4	132,22	C36	58,64
B6	174,18	C8	22,34	A5	37,27	C37	75,25
B7	182,41	C9	93,97	A6	41,38	C38	91,28
B8	151,98	C10	234,69	A7	137,55	C39	76,47
B9	121,57	C11	31,21	A8	85,41	C40	82,25
B10	150,38	C12	32,83	A9	160,88	C41	9,31
B11	176,03	C13	34,07	A10	75,61	C42	248,64
B12	113,81	C14	59,38	A11	162,01	706	160,58
B13	61,47	C15	213,08	A12	73,62	D1	136,64
B14	58,55	C16	211,59	A13	61,38	D2	36,68
B15	99,04	C17	73,26	A14	243,8	D3	48,97
B16	75,95	C18	88,41	B	23,83	D4	41,38
B17	179,73	C19	74,42	C	82,56	D5	162,86
B18	182,32	C20	65,38	S1	174,15	D6	234,47
B19	245,83	C21	260,79	S2	180,27	D7	93,74
B20	52,63	C22	89,29	S3	79,93	D8	257,75
B21	48,54	C23	77,96	S4	203,83	D9	57,71
B22	288,62	C24	118,28	S5	21,18	D10	294,2
B23	194,36	C25	216,23	2A	185,86	D11	60,34
B24	110,02	C26	63,54	2B	105,5	D12	262,61
B25	86,73	C27	40,58	2C	293,27	D13	280,63
B26	112,51	C28	52,21	2D	135,09	D14	180,21
B27	118,24	C29	60,17	2E	156,5	D15	134,49
B28	37,11	C30	174,92	C1	194,53	D16	67,29
B29	123,58	C31	90,18	C2	77,29		

Viral nükleik asit miktarı yeterli olan ürünler cDNA eldesi için kullanılmış ve bütün ürünlerden cDNA eldesi sağlanmıştır. Örneklerin cDNA eldesi sonrası spektrofotometrede ölçülen nükleik asit miktarları Çizelge 3.2’de verildi.

Çizelge 3.2. Ekstraktlardan elde edilen cDNA’ların nükleik asit miktarı (ng/uL)

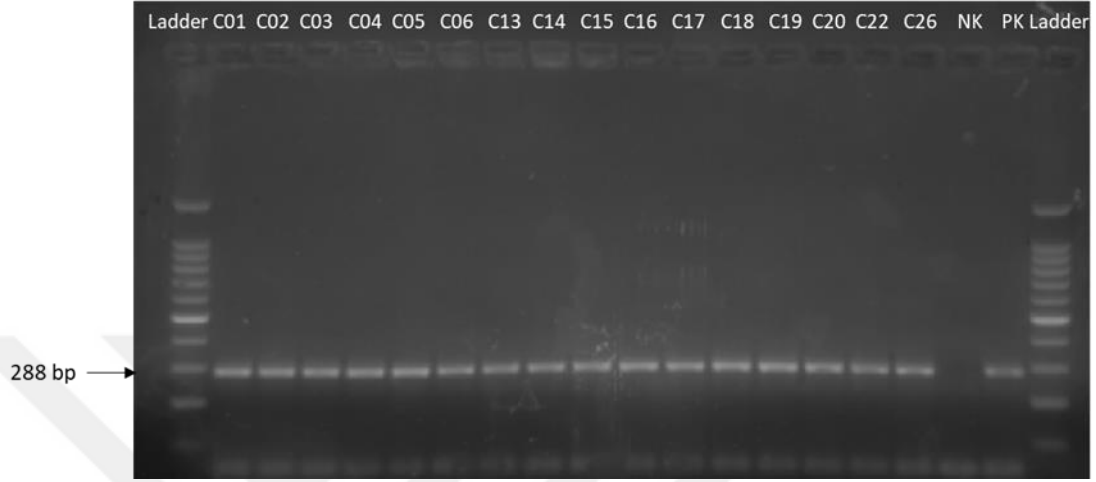
Örnek İsmi	Viral Nükleik Asit Miktarı	Örnek İsmi	Viral Nükleik Asit Miktarı	Örnek İsmi	Viral Nükleik Asit Miktarı	Örnek İsmi	Viral Nükleik Asit Miktarı
B1	2349,15	C3	2780,53	B30	806,12	C32	738,95
B2	1684,78	C4	2222,44	A1	712,41	C33	282,20
B3	1719,37	C5	1570,59	A2	1170,73	C34	758,58
B4	2876,47	C6	1579,60	A3	878,99	C35	2294,19
B5	1511,50	C7	2363,06	A4	1184,61	C36	2129,33
B6	1765,76	C8	2373,94	A5	963,41	C37	1427,27
B7	1950,61	C9	2377,13	A6	1750,99	C38	1687,57
B8	1999,48	C10	1342,47	A7	1194,42	C39	17139,52
B9	1747,49	C11	1360,41	A8	765,17	C40	1987,54
B10	1697,13	C12	2053,09	A9	1128,09	C41	2101,81
B11	1358,30	C13	2077,60	A10	875,99	C42	2144,64
B12	1657,64	C14	2403,32	A11	1116,48	706	1145,13
B13	1685,17	C15	2462,42	A12	128,84	D1	2183,18
B14	2280,94	C16	2059,17	A13	943,83	D2	1778,69
B15	2313,03	C17	2101,29	A14	1108,34	D3	2313,42
B16	2819,38	C18	1651,27	B	952,73	D4	2288,76
B17	2858,83	C19	1692,39	C	1259,4	D5	1942,26
B18	1562,43	C20	1577,15	s1	1199,99	D6	1300,26
B19	1572,29	C21	1618,82	s2	845,07	D7	1418,81
B20	1841,03	C22	2572,52	S3	1219,37	D8	1141,55
B21	1949,54	C23	2551,37	S4	1175,88	D9	1271,31
B22	1959,12	C24	1186,32	S5	153,94	D10	1154,25
B23	1992,60	C25	1155,01	2A	1225,14	D11	2135,91
B24	2007,15	C26	2021,24	2B	1204,04	D12	230,48
B25	2290,76	C27	2111,82	2C	1713,08	D13	1240,84
B26	2191,48	C28	2135,81	2D	881,73	D14	1276,66
B27	2337,45	C29	2200,45	2E	1221,44	D15	1130,73
B28	2244,70	C30	1980,21	C1	1689,32	D16	1136,69
B29	2257,51	C31	2353,21	C2	1711,98		

Elde edilen cDNA’lardan 5’UTR gen bölgesine yönelik yapılan RT-PCR işlemi sonucunda 61 adet örnek pozitif bulundu. Pozitiflik tespit edilen örneklerin lokasyon, numune türü, hayvan türü ve test sonuç bilgileri Çizelge 3.3’de sunuldu.

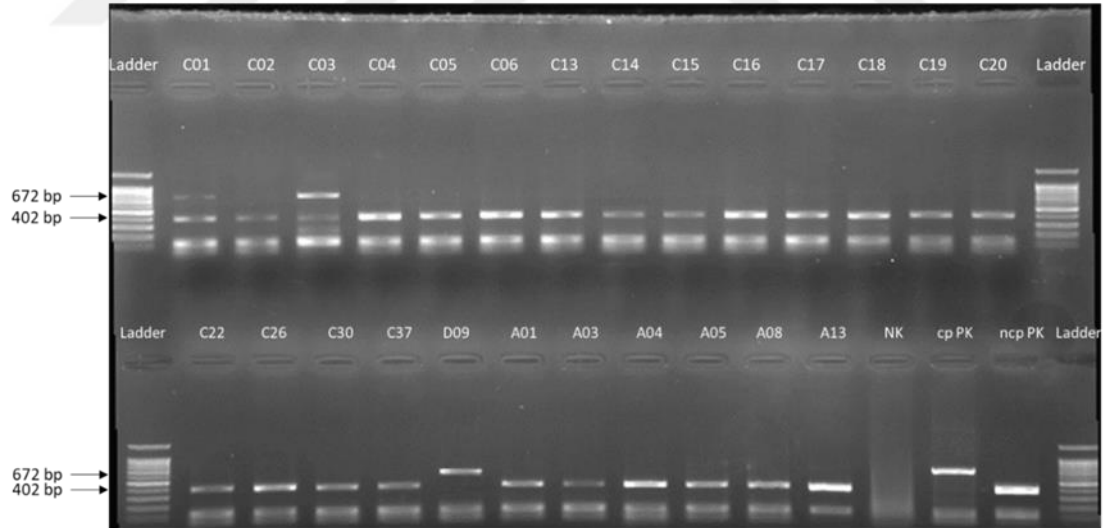
Çizelge 3.3. Pozitif numunelerin hayvan türü, materyal türü, lokasyon bilgileri, Antijen ELISA ve RT-PCR test sonuçları.

NO	Numune Kodu	Hayvan Türü	Numune Türü	Lokasyon	Antijen ELISA Testi	RT-PCR 5'UTR	Türler / Alt Genotipler	
1	A01	Sığır	Kan / Serum	Kırklareli	Pozitif	Pozitif	Pestivirus A	1-f
2	A03	Sığır	Kan / Serum	Kırklareli	Pozitif	Pozitif	Pestivirus A	1-f
3	A05	Sığır	Kan / Serum	Kırklareli	Pozitif	Pozitif	Pestivirus A	1-f
4	A06	Sığır	Kan / Serum	Kırklareli	Pozitif	Pozitif	Pestivirus A	1-f
5	A08	Sığır	Kan / Serum	Kırklareli	Pozitif	Pozitif	Pestivirus A	1-f
6	A13	Sığır	Kan / Serum	Kırklareli	Pozitif	Pozitif	Pestivirus A	1-f
7	B01	Sığır	Kan / Serum	Bursa	Pozitif	Pozitif	Pestivirus A	1-l
8	B02	Sığır	Kan / Serum	İthalat	Pozitif	Pozitif	Pestivirus A	1-g
9	B03	Keçi	Organ	Edirne	Teste Alınmadı	Pozitif	Pestivirus A	1-f
10	B04	Sığır	Atık Fötüs	Kocaeli	Teste Alınmadı	Pozitif	Pestivirus A	1-f
11	B05	Koyun	Organ	Kocaeli	Teste Alınmadı	Pozitif	Pestivirus A	1-f
12	B06	Sığır	Kan / Serum	İthalat	Pozitif	Pozitif	Pestivirus A	1-g
13	B07	Keçi	Organ	Çanakkale	Teste Alınmadı	Pozitif	Pestivirus A	1-f
14	B08	Koyun	Organ	Kırklareli	Teste Alınmadı	Pozitif	Pestivirus A	1-f
15	B10	Sığır	Atık Fötüs	Tekirdağ	Teste Alınmadı	Pozitif	Pestivirus A	1-f
16	B11	Koyun	Organ	Bilecik	Teste Alınmadı	Pozitif	Pestivirus I	
17	B13	Sığır	Kan / Serum	Kırklareli	Pozitif	Pozitif	Pestivirus A	1-f
18	B14	Sığır	Kan / Serum	Kırklareli	Pozitif	Pozitif	Pestivirus A	1-f
19	B15	Sığır	Kan / Serum	Kırklareli	Pozitif	Pozitif	Pestivirus A	1-f
20	B16	Sığır	Kan / Serum	Bursa	Pozitif	Pozitif	Pestivirus A	1-f
21	B21	Sığır	Kan / Serum	Bursa	Pozitif	Pozitif	Pestivirus A	1-f
22	C01	Sığır	Kan / Serum	İthalat	Pozitif	Pozitif	Pestivirus A	1-f
23	C02	Sığır	Kan / Serum	İthalat	Pozitif	Pozitif	Pestivirus A	1-f
24	C03	Sığır	Kan / Serum	İthalat	Pozitif	Pozitif	Pestivirus A	1-f
25	C04	Sığır	Kan / Serum	İthalat	Pozitif	Pozitif	Pestivirus A	1-f
26	C05	Sığır	Kan / Serum	İthalat	Pozitif	Pozitif	Pestivirus A	1-f
27	C06	Sığır	Kan / Serum	İthalat	Pozitif	Pozitif	Pestivirus B	2-b
28	C07	Koyun	Atık Fötüs	Düzce	Teste Alınmadı	Pozitif	Pestivirus I	
29	C08	Koyun	Atık Fötüs	Düzce	Teste Alınmadı	Pozitif	Pestivirus I	
30	C09	Keçi	Kan / Serum	Kocaeli	Pozitif	Pozitif	Pestivirus D	
31	C10	Sığır	Atık Fötüs	Yalova	Teste Alınmadı	Pozitif	Pestivirus I	
32	C12	Koyun	Kan / Serum	İthalat	Pozitif	Pozitif	Pestivirus A	1-f
33	C13	Sığır	Kan / Serum	İthalat	Pozitif	Pozitif	Pestivirus A	1-f
34	C14	Sığır	Kan / Serum	İthalat	Pozitif	Pozitif	Pestivirus A	1-f
35	C15	Sığır	Kan / Serum	Kırklareli	Pozitif	Pozitif	Pestivirus A	1-f
36	C16	Sığır	Kan / Serum	Edirne	Pozitif	Pozitif	Pestivirus A	1-l
37	C17	Sığır	Kan / Serum	Edirne	Pozitif	Pozitif	Pestivirus A	1-f
38	C18	Sığır	Kan / Serum	İthalat	Pozitif	Pozitif	Pestivirus A	1-g
39	C19	Koyun	Organ	Bursa	Teste Alınmadı	Pozitif	Pestivirus A	1-l
40	C20	Koyun	Atık Fötüs	Kırklareli	Teste Alınmadı	Pozitif	Pestivirus A	1-f
41	C21	Sığır	Kan / Serum	İthalat	Pozitif	Pozitif	Pestivirus A	1-g
42	C22	Sığır	Kan / Serum	İthalat	Pozitif	Pozitif	Pestivirus A	1-f
43	C26	Sığır	Kan / Serum	İthalat	Pozitif	Pozitif	Pestivirus A	1-f
44	C27	Sığır	Kan / Serum	İthalat	Pozitif	Pozitif	Pestivirus D	
45	C28	Sığır	Kan / Serum	İthalat	Pozitif	Pozitif	Pestivirus A	1-f
46	C30	Koyun	Atık Fötüs	Bursa	Teste Alınmadı	Pozitif	Pestivirus A	1-l
47	C31	Keçi	Organ	Çanakkale	Teste Alınmadı	Pozitif	Pestivirus I	
48	C32	Koyun	Atık Fötüs	Kocaeli	Teste Alınmadı	Pozitif	Pestivirus I	
49	C33	Koyun	Atık Fötüs	İstanbul	Teste Alınmadı	Pozitif	Pestivirus I	
50	C37	Sığır	Atık Fötüs	Düzce	Teste Alınmadı	Pozitif	Pestivirus A	1-v
51	C38	Sığır	Atık Fötüs	Bursa	Teste Alınmadı	Pozitif	Pestivirus A	1-l
52	C41	Koyun	Atık Fötüs	İstanbul	Teste Alınmadı	Pozitif	Pestivirus I	
53	C42	Koyun	Organ	Çanakkale	Teste Alınmadı	Pozitif	Pestivirus I	
54	D01	Keçi	Atık Fötüs	Düzce	Teste Alınmadı	Pozitif	Pestivirus I	
55	D02	Sığır	Kan / Serum	İthalat	Pozitif	Pozitif	Pestivirus A	1-f
56	D03	Koyun	Atık Fötüs	Balikesir	Teste Alınmadı	Pozitif	Pestivirus A	1-l
57	D04	Keçi	Atık Fötüs	Edirne	Teste Alınmadı	Pozitif	Pestivirus I	
58	D09	Sığır	Atık Fötüs	Düzce	Teste Alınmadı	Pozitif	Pestivirus A	1-l
59	D10	Koyun	Organ	Kocaeli	Teste Alınmadı	Pozitif	Pestivirus D	
60	D11	Keçi	Atık Fötüs	Çanakkale	Teste Alınmadı	Pozitif	Pestivirus I	
61	D12	Manda	Atık Fötüs	Kocaeli	Teste Alınmadı	Pozitif	Pestivirus D	

Dört farklı gen bölgesine göre (5'UTR, NS2-3, N^{pro}, E) kazanılan ampliconların elektroforez görüntüleri elde edildi (Şekil 3.6, Şekil 3.7, Şekil 3.8, Şekil 3.9).



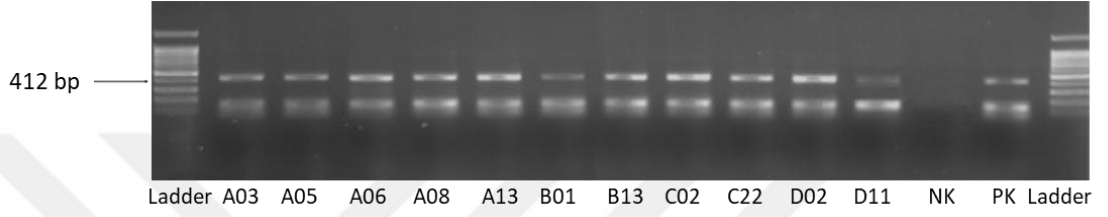
Şekil 3.5. Pozitif oldukları saptanan örneklerden 5'UTR gen bölgesi hedeflenerek elde edilen ampliconların (288 bp) elektroforez işlemi sonucu elde edilmiş görüntüleri.



Şekil 3.6. Pozitif oldukları saptanan örneklerden NS2-3 gen bölgesi spesifik ampliconların (402 ve 672 bp) elektroforez görüntüleri.

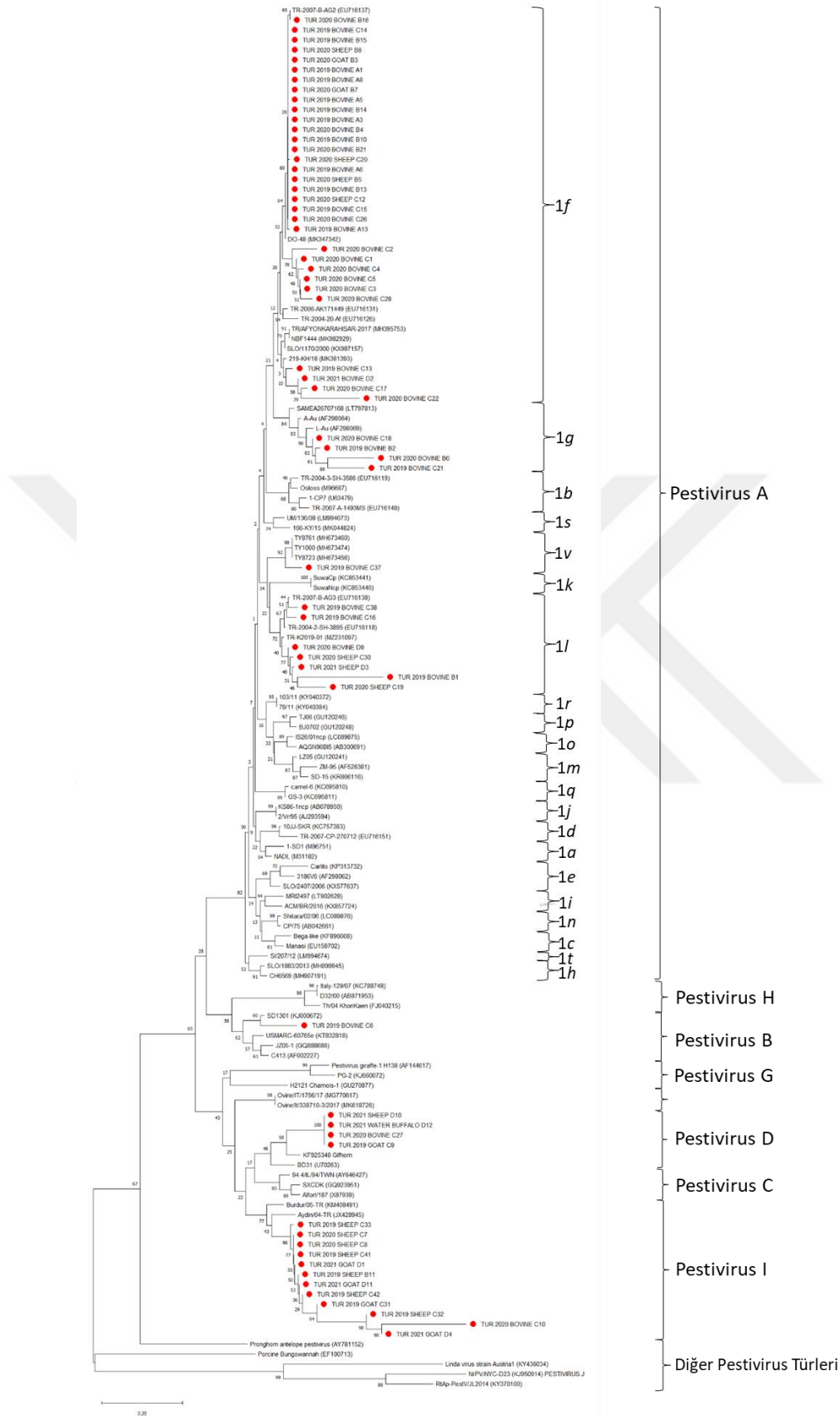


Şekil 3.7. Pozitif oldukları saptanan örneklerden E gen bölgesi spesifik ampliconların (1179 bp) elektroforezde elde edilmiş görüntüleri.

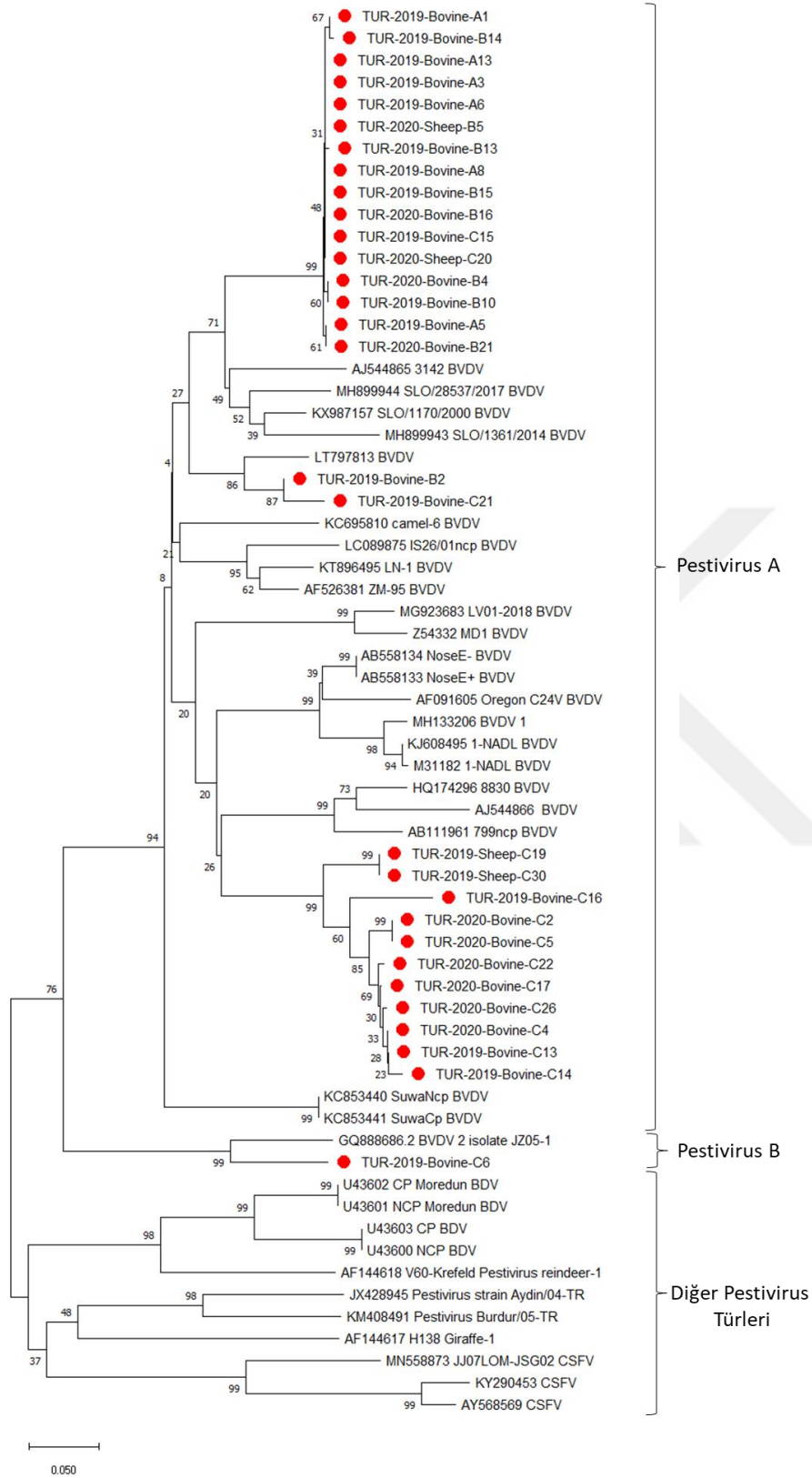


Şekil 3.8. Pozitif oldukları saptanan örneklerden N^{pro} gen bölgesi hedeflenerek elde edilen ampliconların (412 bp) elektroforez işlemi sonucu elde edilmiş görüntüleri.

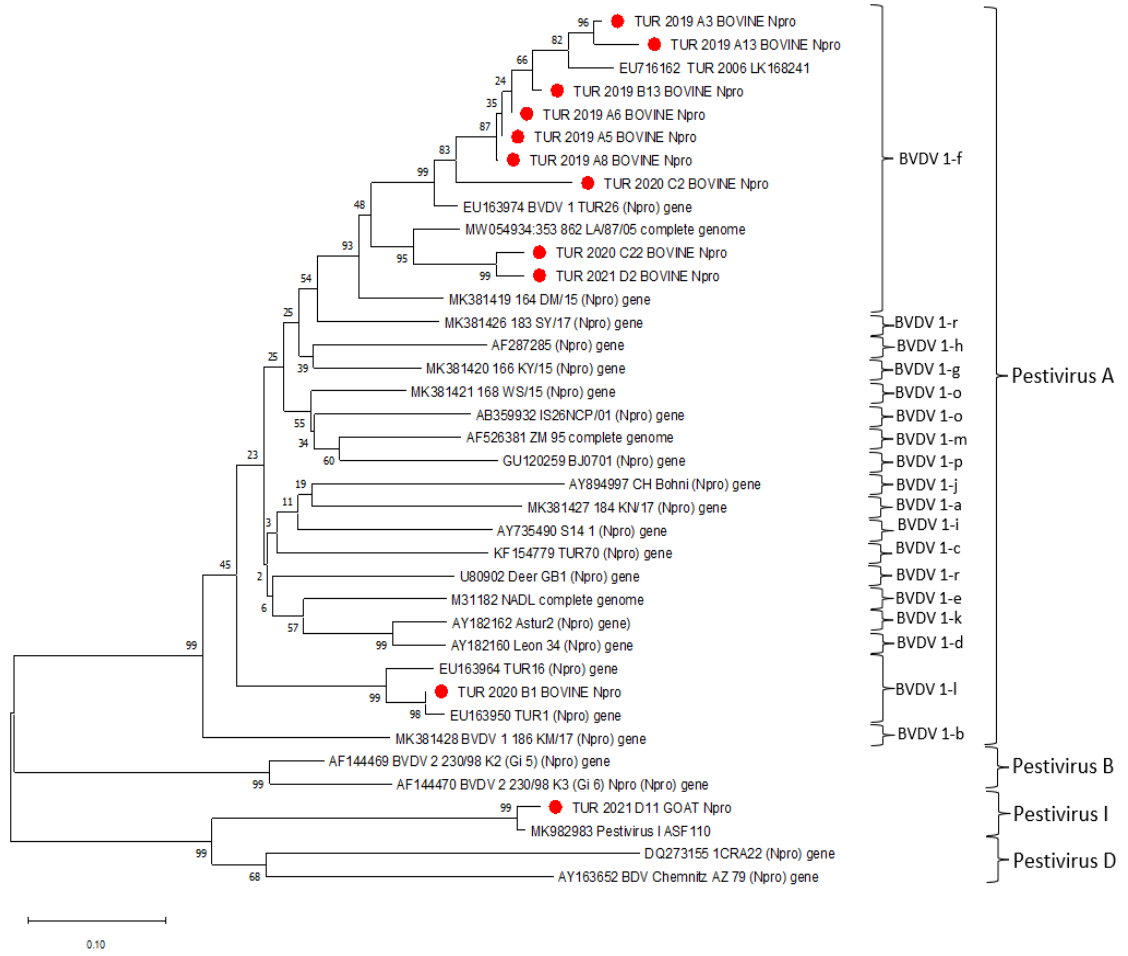
Pozitif numunelerden elde edilen ampliconlardan Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü, Moleküler Genetik Laboratuvarında dizin analizleri yapılarak, uygun modelleme metodu ile filogenetik ağaçlar çizildi. Elde edilen filogenetik ağaçlar Şekil 3.10, Şekil 3.11, Şekil 3.12, Şekil 3.13, Şekil 3.14 ve Şekil 3.15’de sunuldu.



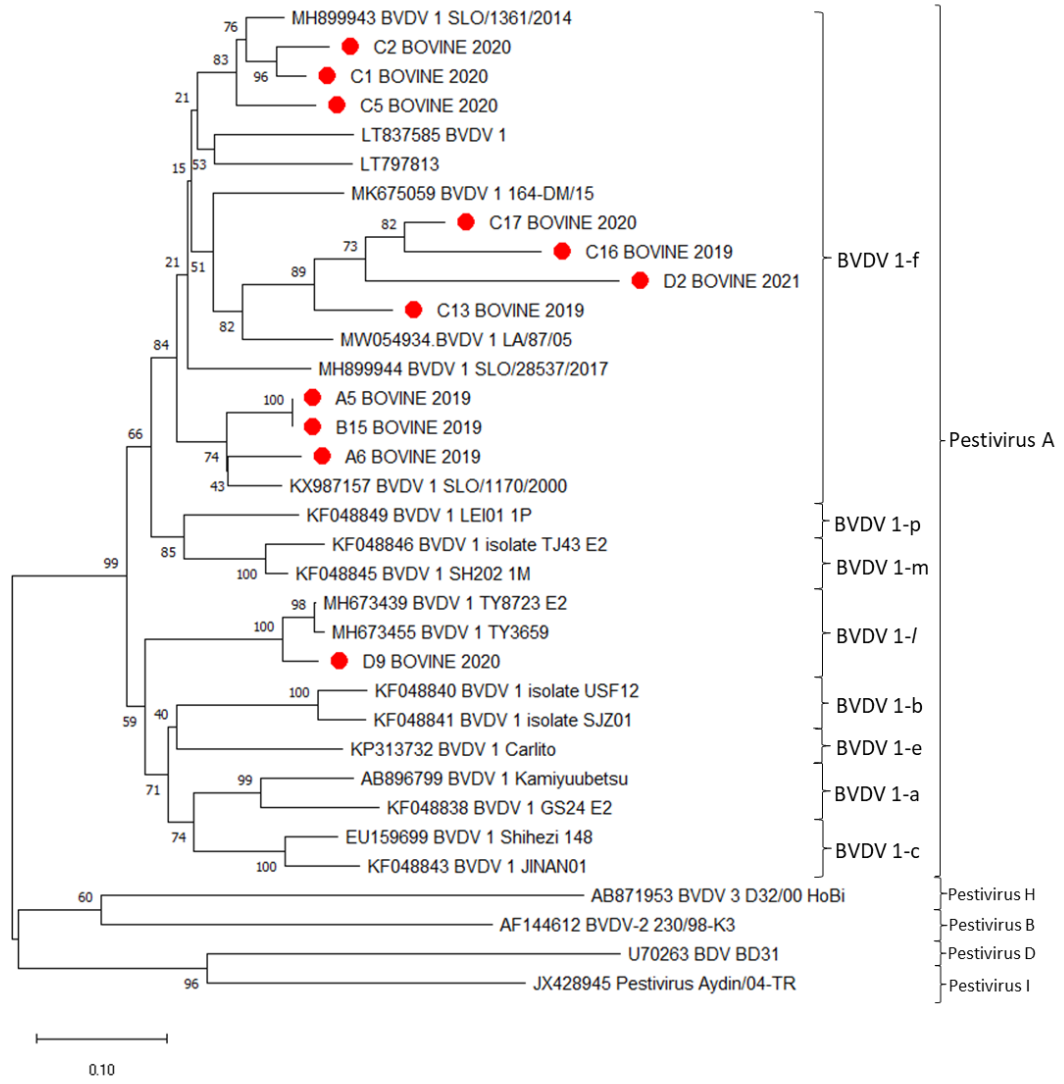
Şekil 3.9. 5'UTR gen bölgesine ait dizilerin (n=61) GenBank'tan elde edilen referans dizinlerle karşılaştırılmasına ait filogenetik ağaç.



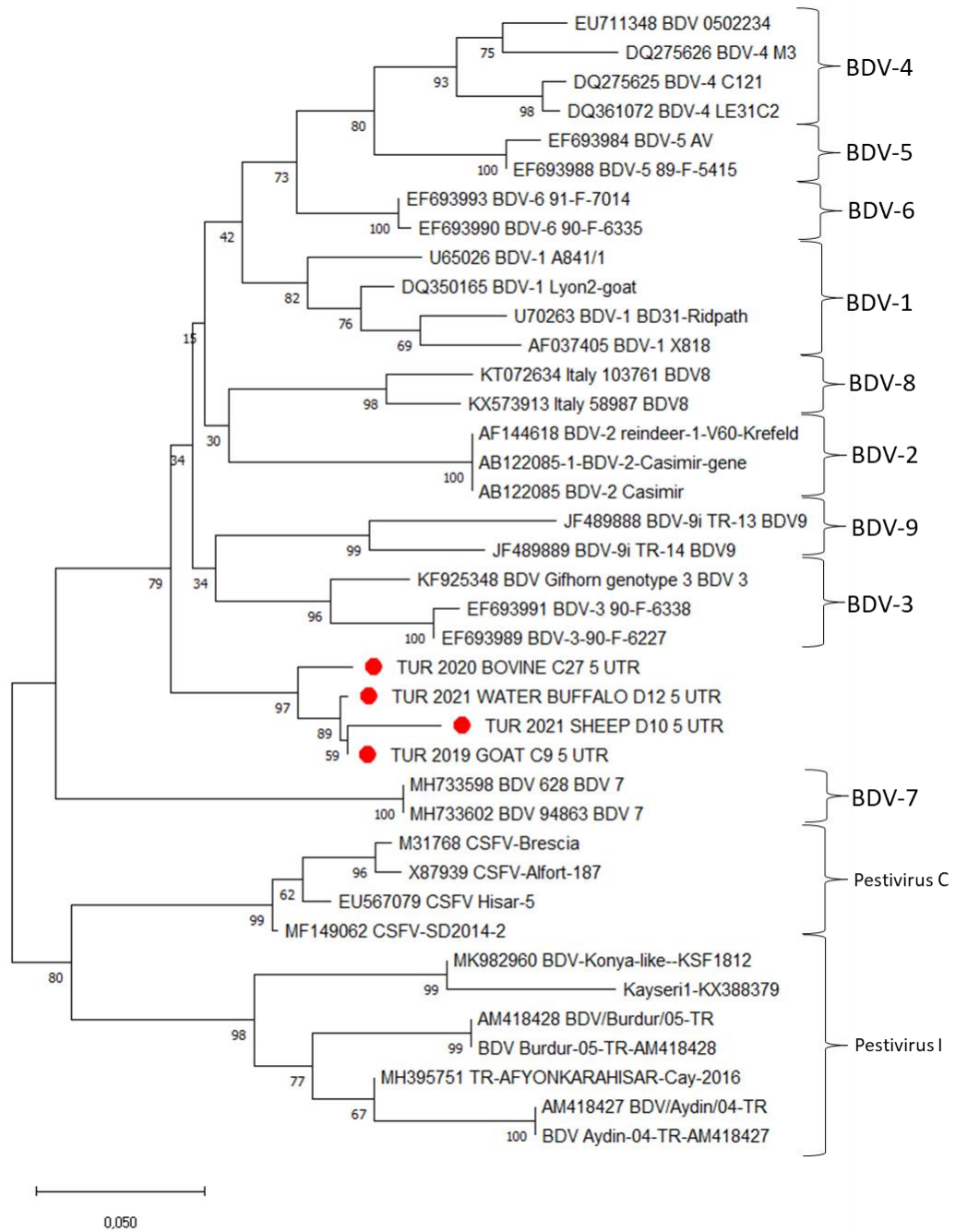
Şekil 3.10. NS2-3 gen bölgesine ait dizinlerin (n=30) GenBank'tan elde edilen referans dizinlerle karşılaştırılmasına ait filogenetik ağaç.



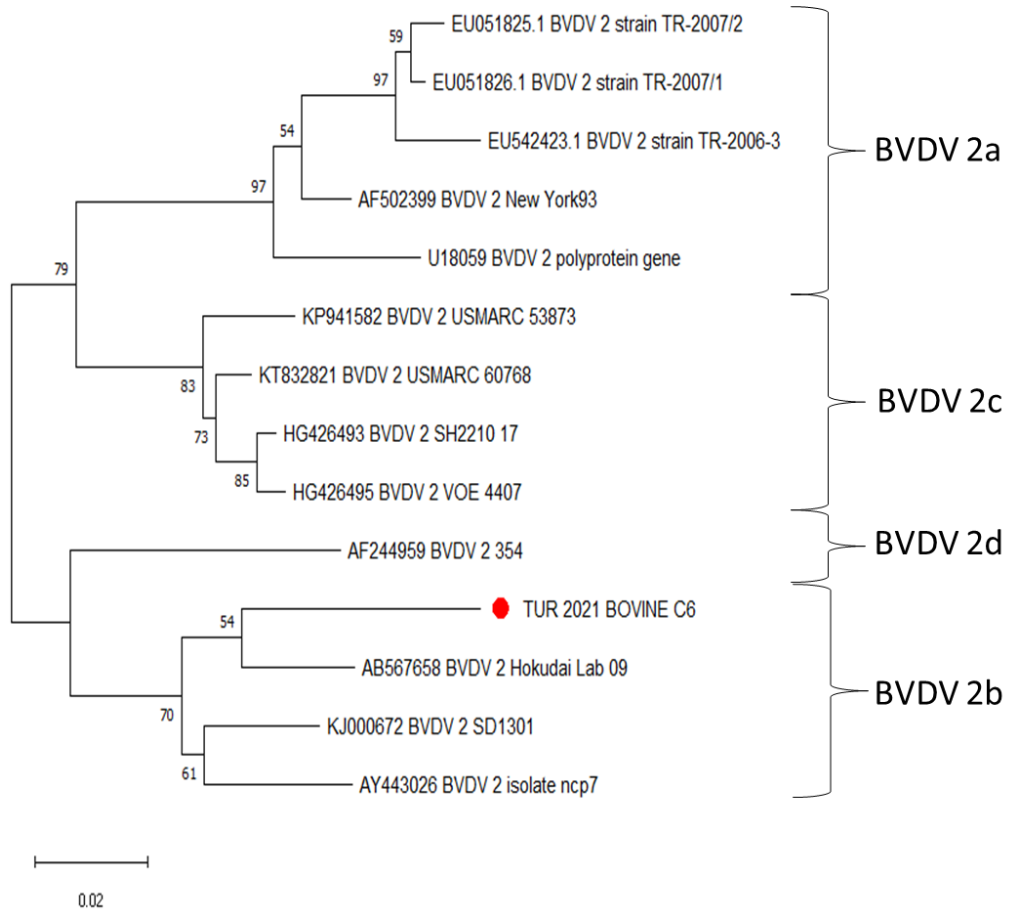
Şekil 3.11. N^{pro} gen bölgesine ait dizinlerin (n=11) GenBank'tan elde edilen referans dizinlerle karşılaştırılmasına ait filogenetik ağaç.



Şekil 3.12. E2 gen bölgesine ait sekans analizlerinin (n=11) GenBank'tan elde edilen referans dizinlerle karşılaştırılmasına ait filogenetik ağaç.



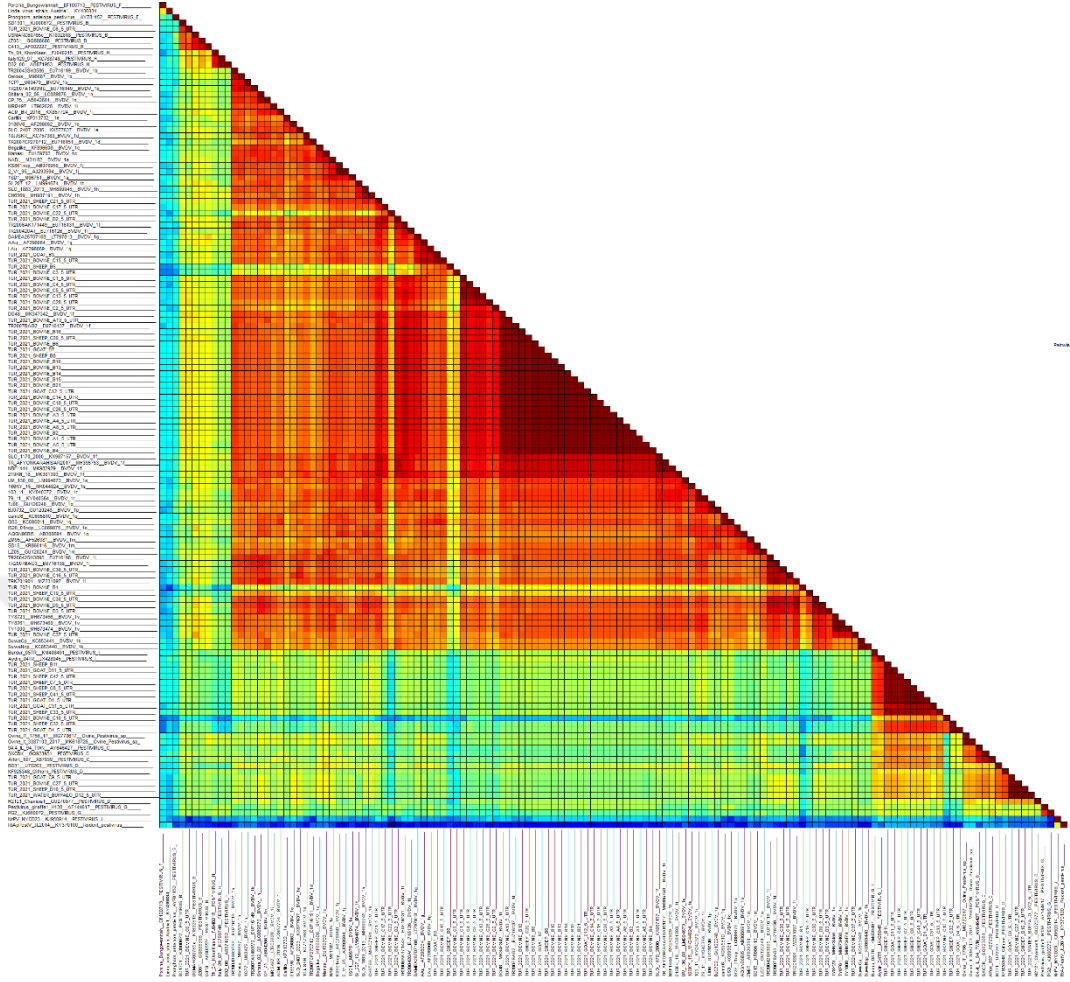
Şekil 3.13. *Pestivirus D* türü tespit edilen dört adet örneğin 5'UTR gen bölgesine ait sekans analizlerinin GenBank'tan elde edilen Pestivirus türleri referans dizinleri ile karşılaştırılmasına ait filogenetik ağaç.



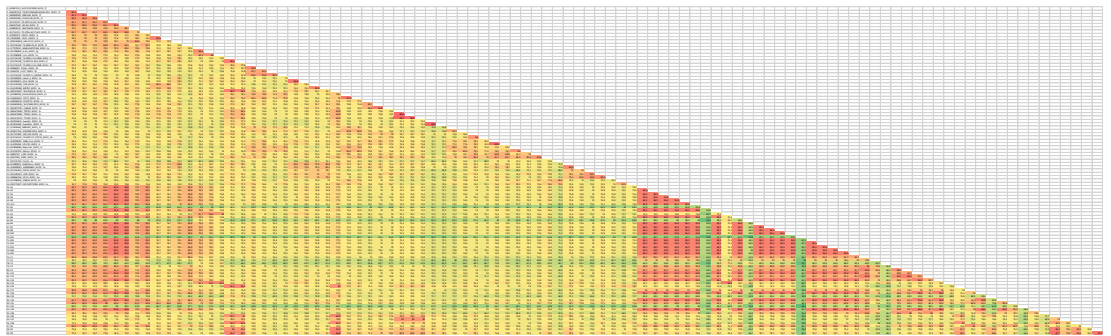
Şekil 3.14. *Pestivirus B* türü olduğu belirlenen bir adet örneğin 5'UTR gen bölgesine ait sekans GenBank'tan elde edilen *Pestivirus B* alt tipi referans dizinleri ile karşılaştırılmasına ait filogenetik ağaç.

61 örneğin filogenetik analizi sonucunda *Pestivirus A* [BVDV-1f (n=32), BVDV-1g (n=4), BVDV-1l (n=7) BVDV-1v (n=1)], *Pestivirus B* [BVDV-2b (n=1)], *Pestivirus D* (n=4) ve *Pestivirus I* (n=12) varlığı belirlendi.

Ülkemizden orijin alan pozitif numunelerden (n=43) elde edilen analiz sonuçları: *Pestivirus A* (BVDV 1-f (n=20), BVDV 1-l (n=7) BVDV 1-v (n=1)), *Pestivirus D* (n=3) ve *Pestivirus I* (n=12) şeklindedir. İthalat yolu ile gelen ve millileştirme öncesi elde edilen pozitif numuneler (n=18); *Pestivirus A* (BVDV 1-f (n=12), BVDV 1-g (n=4)), *Pestivirus B* (n=1) ve *Pestivirus D* (n=1) türlerinde bulundu.



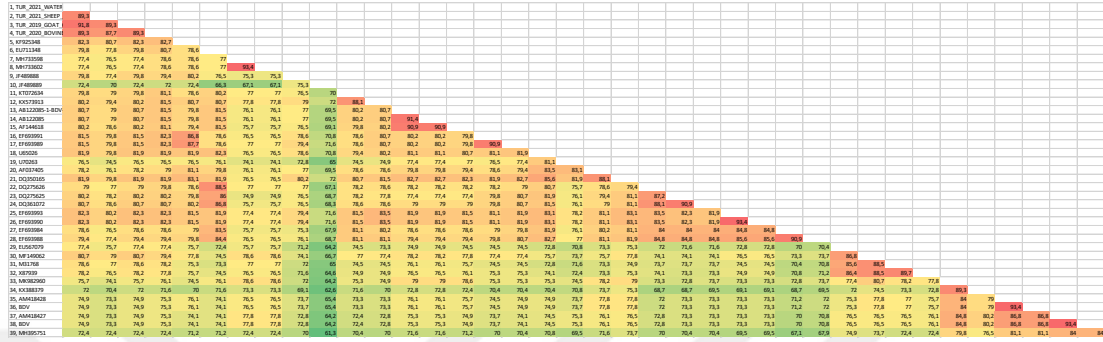
Şekil 3.15. Pestivirus 5'UTR geni baz alınarak yapılan *Pestivirus A* suşlarının birbirlerine olan uzaklığının gösterildiği matrix tablosu (SDT Viral sequence nucleotide identity v1.2).



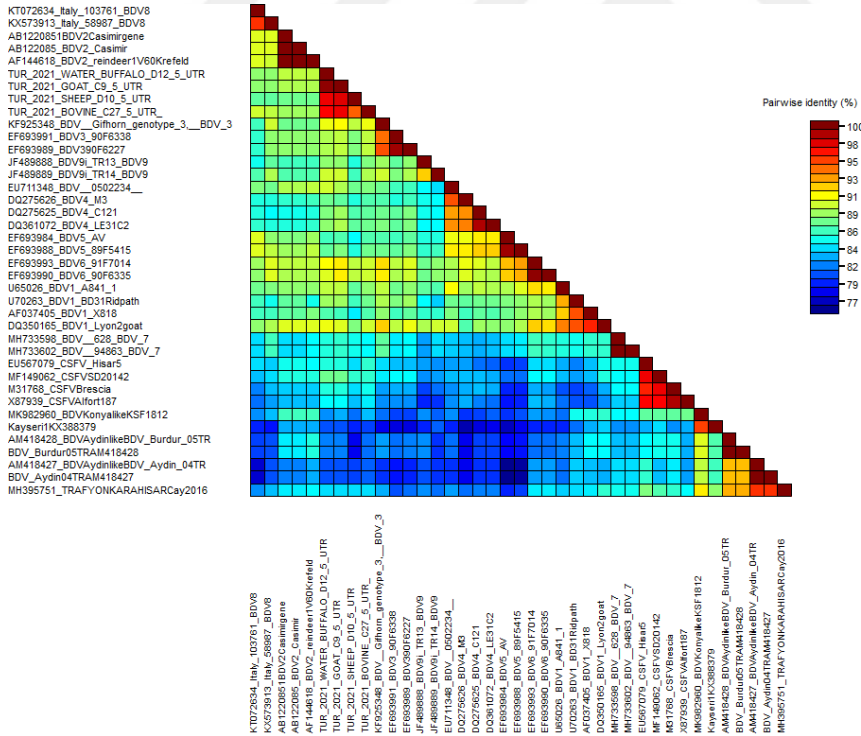
Şekil 3.16. Pestivirus 5'UTR gen bölgesi yönünden *Pestivirus A* suşlarının nükleotid benzerlik tablosu (MatGat 2.0).

Pestivirus A olarak tespit edilen örneklerin sekans analizi sonrası yapılan benzerlik/farklılık oranlarını ve filogenetik durumlarını gösteren tablolar (Şekil 3.2)'de sunuldu. Tez çalışmasındaki A-1, A-3, A-5, A-6, A-8, A13, B-4, B-13, B-14, B-15,

Bu tez çalışmasında ithal bir hayvan örneğinden elde edilen dizin (C-6) Dünya’da daha önce bildirilen BVDV-2b suşlarına (AB567658) yakın olduğu belirlendi (Şekil 3.18 ve 3.19).

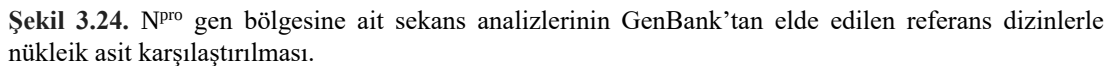
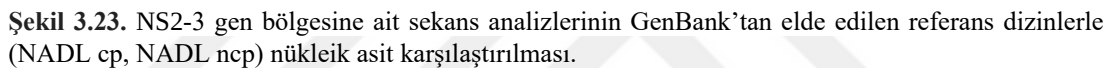


Şekil 3.19. Pestivirus 5'UTR sekansları yönünden *Pestivirus D* suşlarının nükleotid benzerlik tablosu (MatKat 2.0).



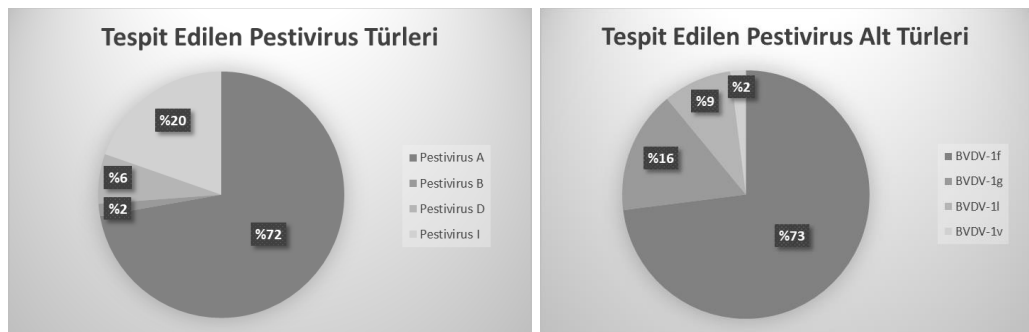
Şekil 3.20. Pestivirus 5'UTR sekansları baz alınarak yapılan *Pestivirus D* suşların birbirlerine olan uzaklığının gösterildiği matrix tablosu (SDT Viral sequence nucleotide identity v1.2).

Biyotip tayininde kullanılan primerler ile pozitif bulunan amplikonlara ait dizinler; aminoasit farklılıkları ve benzerlikleri yönünden, NADL referenz virusunun cp ve ncp biyotip dizinleri ile karşılaştırıldı (Şekil 3.24).



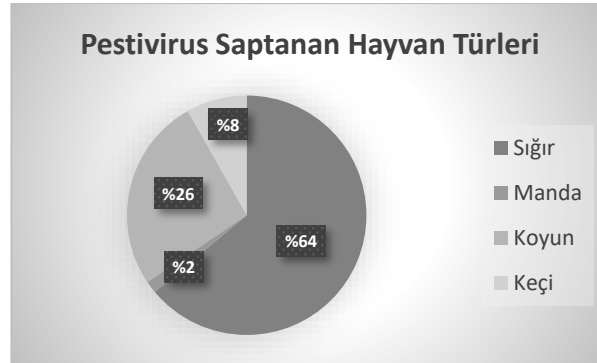


Şekil 3.25. E gen bölgesine ait dizin analizlerinin GenBank’tan elde edilen referans dizinlerle nükleik asit karşılaştırması



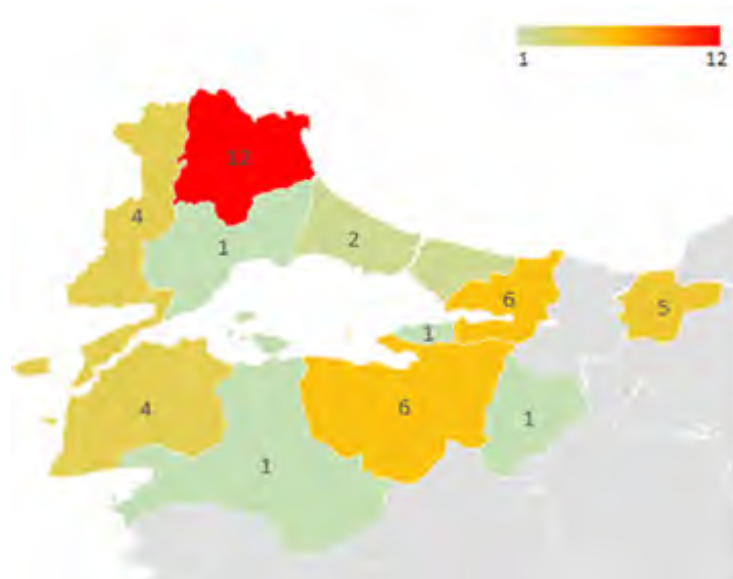
Şekil 3.26. Tespit edilen Pestivirus türlerinin ve alt türlerinin yüzdelik dağılımı.

Pozitiflik saptanan numunelerin 38'i sığır (%62), 15'i koyun (%24.5), 7'si keçi (%12) ve 1'i manda (%1.5) orijinlidir. Bu numunelerin kendi aralarındaki yüzdelik dağılımı Şekil 3.28'de gösterilmiştir.



Şekil 3.27. Pestivirus tespit edilen örneklerin orjin aldıkları hayvan türlerinin yüzdelik dağılımı.

Pozitiflik saptanan 38 sığır örneğinden, 35'inde *Pestivirus A* (26 BVDV 1-f, 4 BVDV 1-g, 4 BVDV 1-l, 1 BVDV 1-v), birinde *Pestivirus B*, birinde *Pestivirus D* ve birinde *Pestivirus I* türleri tespit edildi. 15 koyun örneğinin, 7'sinde *Pestivirus A* (4 BVDV 1-f, 3 BVDV 1-l), 1'inde *Pestivirus D* ve 7'sinde *Pestivirus I*; 7 keçi örneğinin 2'sinde *Pestivirus A* (2 BVDV 1-f), birinde *Pestivirus D* ve 4'ünde *Pestivirus I* tespit edildi.



Şekil 3.28. Ülkemiz orijinli hayvanlardan elde edilen pozitif numunelerin (n=43) toplandığı iller ve örnek sayıları.

Bu tez çalışmasında NS2-3 gen bölgesi spesifik primerler kullanılarak yapılan RT-PCR sonucunda toplam 34 örnek pozitif reaksiyon vermiş olup, bunlardan 30'u sığır (A-1, A-3, A-5, A-6, A-8, A13, B-2, B-4, B-5, B-6, B-13, B-14, B-15, B-16, B-21, C-1, C-2, C-3, C-4, C-5, C-6, C-13, C-14, C-15, C-16, C-17, C-18, C-22, C-26, C-37, D-9), 4'ü koyun (B-5, C-19, C-20, C-30) orijinli örneklerdir.

NS2-3 primerleri ile reaksiyon veren 30 adet sığır örneğinin 29'u *Pestivirus A* [BVDV-1f (n=24), BVDV-1g (n=3), BVDV-1l (n=2), BVDV-1v (n=1)] 1'i *Pestivirus B* olup, bunlardan 25'i ncp biyotiple persiste enfekte bireyler olarak tespit edildi. C-1, C-3 ve B-6 nolu örneklerin hem cp (672 bp) hem de ncp (402 bp) biyotiplere sahip oldukları belirlendi. B-21 ve D-9 numaralı örneklerde ise sadece cp (672 bp) biyotipe rastlandı.

Çizelge 3.4 RT-PCR ve sekans sonrası elde edilen verilerin özeti.

No	Tür	AG ELISA	RT-PCR				Pestivirus Türleri							Biyotip
			5 UTR	Npro	E	NS2-3	A				B	D	I	
							1l	1f	1v	1g				
A01	Sığır	Pozitif	Pozitif	Negatif	Negatif	Pozitif		1-f						ncp
A03	Sığır	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Negatif	Pozitif		1-f						ncp
A05	Sığır	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif		1-f						ncp
A06	Sığır	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif		1-f						ncp
A08	Sığır	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Negatif	Pozitif		1-f						ncp
A13	Sığır	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Negatif	Pozitif		1-f						ncp
B01	Sığır	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Negatif	Negatif	1-l							
B02	Sığır	Pozitif	Pozitif	Negatif	Negatif	Pozitif				1-g				ncp
B04	Sığır	Teste Alınmadı	Pozitif	Negatif	Negatif	Pozitif		1-f						ncp
B06	Sığır	Pozitif	Pozitif	Negatif	Negatif	Pozitif				1-g				ncp + cp
B10	Sığır	Teste Alınmadı	Pozitif	Negatif	Negatif	Negatif		1-f						
B13	Sığır	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Negatif	Pozitif		1-f						ncp
B14	Sığır	Pozitif	Pozitif	Negatif	Negatif	Pozitif		1-f						ncp
B15	Sığır	Pozitif	Pozitif	Negatif	Pozitif	Pozitif		1-f						ncp
B16	Sığır	Pozitif	Pozitif	Negatif	Negatif	Pozitif		1-f						ncp
B21	Sığır	Pozitif	Pozitif	Negatif	Negatif	Pozitif		1-f						cp

C01	Sığır	Pozitif	Pozitif	Negatif	Pozitif	Pozitif		1-f						ncp + cp
C02	Sığır	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif		1-f						ncp
C03	Sığır	Pozitif	Pozitif	Negatif	Negatif	Pozitif		1-f						ncp + cp
C04	Sığır	Pozitif	Pozitif	Negatif	Negatif	Pozitif		1-f						ncp
C05	Sığır	Pozitif	Pozitif	Negatif	Pozitif	Pozitif		1-f						ncp
C06	Sığır	Pozitif	Pozitif	Negatif	Negatif	Pozitif					2-b			ncp
C10	Sığır	Teste Alınmadı	Pozitif	Negatif	Negatif	Negatif							I	
C13	Sığır	Pozitif	Pozitif	Negatif	Pozitif	Pozitif		1-f						ncp
C14	Sığır	Pozitif	Pozitif	Negatif	Negatif	Pozitif		1-f						ncp
C15	Sığır	Pozitif	Pozitif	Negatif	Negatif	Pozitif		1-f						ncp
C16	Sığır	Pozitif	Pozitif	Negatif	Pozitif	Pozitif	1-l							ncp
C17	Sığır	Pozitif	Pozitif	Negatif	Pozitif	Pozitif		1-f						ncp
C18	Sığır	Pozitif	Pozitif	Negatif	Negatif	Pozitif				1-g				ncp
C21	Sığır	Pozitif	Pozitif	Negatif	Negatif	Negatif				1-g				
C22	Sığır	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Negatif	Pozitif		1-f						ncp
C26	Sığır	Pozitif	Pozitif	Negatif	Negatif	Pozitif		1-f						ncp
C27	Sığır	Pozitif	Pozitif	Negatif	Negatif	Negatif						D		
C28	Sığır	Pozitif	Pozitif	Negatif	Negatif	Negatif		1-f						
C37	Sığır	Teste Alınmadı	Pozitif	Negatif	Negatif	Pozitif			1-v					ncp
C38	Sığır	Teste Alınmadı	Pozitif	Negatif	Negatif	Negatif	1-l							
D02	Sığır	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Negatif		1-f						
D09	Sığır	Teste Alınmadı	Pozitif	Negatif	Pozitif	Pozitif	1-l							cp
Ara Toplam		32	38	10	10	30	4	26	1	4	1	1	1	30
B05	Koyun	Teste Alınmadı	Pozitif	Negatif	Negatif	Pozitif		1-f						ncp
B08	Koyun	Teste Alınmadı	Pozitif	Negatif	Negatif	Negatif		1-f						
B11	Koyun	Teste Alınmadı	Pozitif	Negatif	Negatif	Negatif							I	
C07	Koyun	Teste Alınmadı	Pozitif	Negatif	Negatif	Negatif							I	
C08	Koyun	Teste Alınmadı	Pozitif	Negatif	Negatif	Negatif							I	
C12	Koyun	Pozitif	Pozitif	Negatif	Negatif	Negatif		1-f						
C19	Koyun	Teste Alınmadı	Pozitif	Negatif	Negatif	Pozitif	1-l							ncp
C20	Koyun	Teste Alınmadı	Pozitif	Negatif	Negatif	Pozitif		1-f						ncp
C30	Koyun	Teste Alınmadı	Pozitif	Negatif	Negatif	Pozitif	1-l							ncp
C32	Koyun	Teste Alınmadı	Pozitif	Negatif	Negatif	Negatif							I	
C33	Koyun	Teste Alınmadı	Pozitif	Negatif	Negatif	Negatif							I	

C41	Koyun	Teste Alınmadı	Pozitif	Negatif	Negatif	Negatif							I	
C42	Koyun	Teste Alınmadı	Pozitif	Negatif	Negatif	Negatif							I	
D03	Koyun	Teste Alınmadı	Pozitif	Negatif	Negatif	Negatif	1-1							
D10	Koyun	Teste Alınmadı	Pozitif	Negatif	Negatif	Negatif								
Ara Toplam		1	15	0	0	4	3	4	0	0	0	1	7	4
B03	Keçi	Teste Alınmadı	Pozitif	Negatif	Negatif	Negatif		1f						
B07	Keçi	Teste Alınmadı	Pozitif	Negatif	Negatif	Negatif		1f						
C09	Keçi	Pozitif	Pozitif	Negatif	Negatif	Negatif						D		
C31	Keçi	Teste Alınmadı	Pozitif	Negatif	Negatif	Negatif							I	
D01	Keçi	Teste Alınmadı	Pozitif	Negatif	Negatif	Negatif							I	
D04	Keçi	Teste Alınmadı	Pozitif	Negatif	Negatif	Negatif							I	
D11	Keçi	Teste Alınmadı	Pozitif	Pozitif	Negatif	Negatif							I	
Ara Toplam		1	7	0	0	0	0	2	0	0	0	1	4	0
D12	Manda	Teste Alınmadı	Pozitif	Negatif	Negatif	Negatif						D		
Ara Toplam		0	1	0	0	0						1		
Genel Toplam		34	61	11	11	34	7	32	1	4	1	4	12	34

4. TARTIŞMA

Ruminantlarda Pestivirus kaynaklı enfeksiyonlar, tüm dünyada olduğu gibi ülkemiz hayvancılığı için de önemli ekonomik kayıpların yanısıra, hayvan sağlığını ve döl verimliliğini de etkileyerek, multisistemik hastalık semptomlarına neden olan, türler arası geçiş yetenekleri ve biyoçeşitlilikleri sebebiyle de Veteriner Viroloji’de güncelliğini koruyan çalışma konularının başında gelmektedirler.

Pestivirus enfeksiyonlarıyla ilgili yürütülen kontrol programlarının temelinde; persiste enfekte (PI) bireylerin hızlı/doğru tanısını yapmak ve bu bireylerin sürüden uzaklaştırılmasını sağlamak önem arz etmektedir. Pestivirus ile enfekte olmuş hayvanların tespiti için farklı yöntemler bildirilmiştir. Bu yöntemler kullanılırken en önemli nokta, akut enfekte olmuş hayvanların, PI hayvanlardan hızla ayırt edilmesidir. PI hayvanların varlığını tespit etmek için virus izolasyonu (VI), immunohistokimyasal testler (IHC), ELISA (Antigen-capture enzyme (ACE)-linked immunosorbent assay) ve Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) metotları mevcut olup; birbirlerine göre avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Virus izolasyon yöntemleri; klinik örneklerden pestivirusların tanımlanmasında “altın standart” tanı tekniği olmakla birlikte (Sandvik, 2005); emek, deneyim, laboratuvar alt yapısı gerektiren ve hızlı sonuç verilmesi gereken durumlarda dezavantaja sahip tanı tekniği olduğundan, günümüzde antijen ELISA ve PCR temelli teknikler daha tercih edilir hale gelmiştir. Akut, yani geçici enfekte (transient-TI) ve PI hayvanların ayrımının yapılabilmesi için pozitif tespit edilen hayvanların en az 3 hafta sonra tekrar test edilmeleri gerektiğinden (Cornish ve ark., 2005 ve Edmondson ve ark., 2007) ve kolostral antikorların genç hayvanlarda serumdaki serbest virus miktarını azaltabilmesine dayalı olgular nedeniyle hücre kültürü izolasyon metodlarının hassasiyetinin düşmesine sebep olabildiğinden (Palfi ve ark., 1993); bu metodun Pestivirus hızlı tanısında ziyade, izolasyon çalışmalarında kullanımı söz konusudur. Ayrıca büyük ve küçükbaş hayvanları enfekte eden ve türler arası da yayılabilen pestivirusların biyoçeşitliliğinin de yüksek

olduğu bilinmektedir. Bu nedenle tanı metodlarının tek başına kullanımı yetersiz kalmaktadır. Yukarıda belirtilen avantaj ve dezavantajlar dikkate alınarak ruminant kökenli pestivirusların tanısını temel alan bu doktora tez çalışmasında; antijen ELISA ve konvansiyonel PCR tekniklerinin birlikte kullanımı tercih edilmiştir.

Antijen capture ELISA testleri, Pestiviral antijeni tespit etmek için duyarlı, özgül ve tekrarlanabilirliğe sahip olmakla birlikte, test protokolünde bildirildiği gibi tanı materyali olarak kan ve kulak kıkırdağı kullanımını zorunlu kılmaktadır. Ayrıca özellikle PI sığırların tanımlanması için ekonomik bir yöntem olarak önerilmektedir (Pacheco ve Lager, 2003). Pestivirus genomunun yapısal (C ve E^{ms}, E1, E2) ve yapısal olmayan (NS) proteinlerinden bazıları, teşhis amacıyla laboratuvar testlerinde hedeflenen antijenik bölgelerdir. Pestiviral replikasyon sırasında kanda ilk sentezlenen erken protein olan E^{ms} başta olmak üzere, biyotip belirteci olan NS3 (P80) gen bölgesi de; antijen ELISA'lar ile saptanabilen proteinlerdir. Pestivirus eradikasyon programı uygulayan ülkelerin çoğunda, kan serum ve plazmasındaki pestiviral E^{ms} proteinini belirleyen antijen ELISA testi tercih edilmiş olup, hem kan hem kulak kıkırdağı için optimize ve valide edilmiştir. Avrupa ülkelerindeki kontrol programlarında kulak küpelemesi sırasında alınan kıkırdak örneği sayesinde, küpelenen tüm hayvanlardan alınan örnekler Pestivirus antijeni yönünden test edilebilmektedir. İskandinav ülkelerinde BVDV'nin başarılı bir şekilde ortadan kaldırılmasının ardından, günümüzde İsviçre, Almanya, Avusturya, Lüksemburg ve İrlanda gibi Avrupa ülkeleri BVDV'yi kontrol altına almak ve hayvan sağlığı için yarattığı riskleri ortadan kaldırmak için eradikasyon programları uygulamaya devam etmektedir (GreiserWilke ve ark., 2003 ve Schoepf ve ark., 2016). Bu programların en önemli aşaması olan persiste enfekte hayvanların tespiti öncelikli olarak antijen ELISA testleri kullanılarak gerçekleştirilmektedir (Barrett ve ark., 2011; Krametter-Froetscher ve ark., 2009; Thomann ve ark. 2017 ve Wernike ve ark., 2017). Ancak antijen ELISA ile küçük ruminantlardaki pestivirus enfeksiyonlarının tanısında bazen yetersizlikler görülebilmektedir. Bu tez çalışmasında ticari antijen ELISA kitleri içerisinde E^{ms} proteinine yönelik olan kit tercih edilmiş olup, kan numunelerin tamamı bu kit ile test edilmiştir. Küpeme metodu ile kulak kıkırdağı eldesi, ülkemizde uygulanan bir metod olmadığından, doku materyali örnekleme mümkün

olamamıştır. Ayrıca; antijen ELISA kit protokolünde organ örneklerinin kullanımı önerilmediğinden bu methodda teşhis materyali olarak doku örneği kullanılması mümkün olmamış, sadece kan numuneleri antijen ELISA ile test edilmiştir. Bu tez kapsamında; toplam 115 ruminant örneği incelenmiş olup, 85'i Türkiye orijinli, 30'u ise ithalat yolu ile ülkemize gelen hayvanlardan elde edilmiştir. Türkiye'den elde edilen örneklerin 29'u atık fetüs, 16'sı erişkin hayvana ait organ/doku ve 40 adedi de kan örneğidir. İthalat yolu ile gelen hayvanlardan elde edilen örneklerin tamamı tam kan numunesidir (n=30).

Bu çalışmada pestivirus şüpheli kan numunelerinden %55,73'ünde (34/70) antijen pozitiflik belirlenmiştir. Pozitiflik saptanan 34 kan numunesinin tümü, RT-PCR ile de pozitif olarak tespit edilmiştir. Bu konu ile ilgili ülkemizde yapılan ve Pestivirus tanı metodlarının karşılaştırıldığı bir çalışmadan (Tuncer ve Yeşilbağ, 2017) farklı olarak; bu tez çalışmasında kan numuneleri için antijen ELISA ve RT-PCR arasında tam bir uyum olduğu belirlenmiştir. Tuncer ve Yeşilbağ'ın (2017) çalışmasında iki test arasındaki uyumsuzluğun nedeni; örneklerin uygun koşullarda saklanmaması ve dondurma çözme sırasında RNA'nın kaybindan kaynaklı olabileceği şeklinde yorumlanmıştır. Bu tez çalışmasında kullanılan kan örnekleri; antijen ELISA ile örnek kabulünü takip eden en kısa süreç içerisinde test edilmiş olup, RT-PCR çalışmalarında test edilmek üzere yaklaşık 2 yıl süreyle dondurulup saklanmıştır. Bu çalışmada; herhangi bir antijenik kayıp yaşanmamasının ve iki test metodu sonuçlarının tam uyum göstermiş olmasının nedeni, numunelerin -80 °C'de uygun koşullarda saklanması ve tanısal tekniklerin doğru bir şekilde uygulanması şeklinde yorumlanmıştır.

RT-PCR metodu, Pestivirus enfeksiyonları için rutin bir teşhis yöntemi olarak günümüzde kullanılmaktadır. Bu methodda; serum, kan (buffy coats), dokular, fetal sıvılar, süt, nazal swab ve PI hayvanlarının deri örnekleri de dahil olmak üzere çok çeşitli klinik örnekte Pestivirus tanısı yapılabilmektedir (Drew ve ark., 1999; Peddireddi ve ark., 2018 ve Stokstad ve ark., 2003). RT-PCR ile Pestivirus taramasında, korunaklı bölge olan 5'UTR'i hedefleyen pan-generik primerler sıklıkla tercih edilmektedir. Abort veya ölü doğum vakalarında, organ materyalinden

tanı yapmaya imkân sağlayan RT-PCR tekniği bu tez çalışmasında da kullanılmış olup; sadece antijenik pestivirus varlığı değil, aynı zamanda elde edilen amplikonların dizin analizleri de yapılarak tür tayinine imkân sağlanabilmektedir. Pestivirus türlerinin klasik taksonomisinde; geçmişte konakçı spesifik bir yol izlenmiş olmasına rağmen moleküler karakterizasyon çalışmalarının yaygınlaşması ile farklı türlere ait Pestivirusların da doğal konakçıları dışında enfeksiyon yapma yeteneklerinin olduğu kanıtlanmıştır. Bu nedenle doğal konakçıdan köken alan isimlendirme (BVDV-1, BVDV-2, BDV ve CSFV) (Julia ve ark., 2009 ve Vilcek ve ark., 1997), yerini ICTV'nin kararı doğrultusunda alfabetik sınıflandırmaya bırakmıştır (ICTV, 2017 ve Smith ve ark., 2017).

Bu doktora tez çalışmasında pestivirus türleri güncel alfabetik sınıflandırma ile verilirken, alt tür isimlendirmelerinde klasik sınıflandırmaya bağlı kalınmıştır. Moleküler araştırmada pestivirusların 4 gen bölgesine ait primerler kullanılmış olup, 5'UTR bölgesi yönünden 61, NS2-3 gen bölgesi yönünden 34, N^{pro} gen bölgesi yönünden 11 ve E gen bölgesi yönünden 11 dizin verisine göre; *Pestivirus A*, *Pestivirus B*, *Pestivirus D* ve *Pestivirus I* türlerinin varlığı/yaygınlığı ve türler arası geçişleri tespit edilmiştir.

Eradikasyon programlarında persiste enfekte hayvanların tespiti kadar önemli olan bir diğer konu, belirlenen pozitifliğin Pestivirus genusunun hangi tür ve/veya alt türü ile meydana gelmiş olduğudur. Tür ve alt tür tespiti; eradikasyon programlarında kullanılabilecek aşının seçiminde (aşı etkinliği/etkililiği) önemli olduğu gibi, aynı zamanda hastalığın epidemiyolojik durumu hakkında bilgi edinilmesi ve o coğrafyaya ait yeni türlerin varlığının araştırılmasında da kritik rol oynar. Konvansiyonel RT-PCR tekniğinin hem tanı hem de karakterizasyon için kullanılabilmesi, bu metodun yürütülecek eradikasyon programlarının seçiminde de değerini arttırmaktadır (Greiser-Wilke ve ark., 2003; Oğuzoğlu ve ark., 2011; Wernike ve ark., 2017). Moleküler tiplendirme çalışmalarında; Pestivirusların çeşitli gen bölgelerine spesifik (5'UTR, 3'UTR ve ORF'nin çeşitli proteinlerini hedef alan) primerler kullanılarak 22 *Pestivirus A* (a-v), 4 *Pestivirus B* (a-d), 4 *Pestivirus H* (a-d), 8 *Pestivirus D* (1-8) alt türü tanımlanmıştır (Becher ve ark., 1999; De Oliveira

Figueiredo ve ark., 2019; Nagai ve ark., 2004; Oğuzoğlu ve ark., 2011; Oğuzoğlu ve ark., 2019; Ridpath ve ark., 1994; Yeşilbağ ve ark., 2017 ve Vilcek ve ark., 1994). Pestiviruslardaki yüksek biyoçeşitlilik ve alt tiplendirmede hangi gen bölgesinin seçileceği konusundaki farklı yaklaşımlar, sınıflandırmada da yeniliği gerektirmiştir. Tür tayini ve alt tiplendirmede; viral genomun tamamının analiz edilmesi daha doğru bir yaklaşım olsa da, maliyetinin yüksek oluşu ve rutin teşhiste uygulanabilirlik imkânı olmaması nedeniyle birçok laboratuvar için tercih edilememektedir. Tek bir genomik bölgeye dayalı analiz Pestivirus türlerini tanımlamak için pratik olsa da, tek bir bölgeye dayalı alt tür tiplendirmeleri virusların hatalı sınıflandırılmasına neden olabilmektedir. Ayrıca, pestiviruslar arasındaki rekombinasyon olasılığı da göz önüne alındığında, bireysel hedeflere dayalı alt tiplendirmenin, analiz edilen genomik bölgeye göre farklı gruplanmalar oluşturması mümkündür. Mücadelede aşı kullanımı söz konusu olduğunda; ülkede var olan tür ve alt tiplerin belirlenmesi de önem arz etmektedir. Bu tez çalışmasında, daha önce alt tür sınıflandırması için de sıklıkla kullanılan pestivirusların 5'UTR, N^{pro}, NS2-3 ve E2 gen bölgelerine yönelik RT-PCR testleri yapılmıştır. Aynı numuneye ait anılan bu dört gen bölgesine yönelik dizinlerin filogenetik analizlerinde, tür ve alt tür tespitinde gen bölgeleri arasında herhangi bir farklılığa rastlanmamıştır. Bu çalışmada, *Pestivirus A* (n=44), *Pestivirus B* (n=1), *Pestivirus D* (n=4) ve *Pestivirus I* (n=12) olmak üzere toplamda 61 adet ruminant örneği karakterize edilmiştir (Çizelge 3.3; Çizelge 3.4; Şekil 3.9). Bu örneklerin coğrafik orijinleri incelendiğinde; ülkemiz coğrafyasından (Marmara Bölgesi) ve ithalat yoluyla ülkemize girişleri sırasında test edilen ruminantlardan köken aldığı görülmektedir (Çizelge 3.3). Pozitiflik saptanan örneklerin orijin aldığı hayvan türleri; sığır (n=38), koyun (n=15), keçi (n=7) ve mandadır (n=1) (Çizelge 3.3; Şekil 3.27).

Türkiye'de *Pestivirus A*'nın serolojik prevalansının % 24,8 - % 64,7 arasında değiştiği bildirilmiştir (Burgu, 1999 ve Burgu ve ark., 2003). Burgu ve ark., (2003)'nın 12413 sığırdan 40 örnekte pestivirus pozitifliği saptadığı virolojik çalışmada, pozitiflerden alınan ikincil kan örneklerinden de 9 hayvanda persiste enfeksiyon tespiti yapılmıştır. Bu tez çalışmasında NS2-3 gen bölgesine yönelik RT-PCR sonucunda, 34 örnekte pestivirus enfeksiyonu tespiti yapılmıştır (Şekil 3.9 ve

3.24). Persiste enfekte oldukları tek kan örnekleme ile tespit edilen 3 sığırdan (A-5/B-15; A-3/B13; A-1/B14) 21 gün sonra alınan ikincil kan örneklerinde de Pestivirus antijeni varlığı tespiti yapılmış olup, bu hayvanlarda persiste enfeksiyonun varlığı, hem antijen ELISA hem de RT-PCR ile teyit edilmiştir. Bu tez çalışmasında pozitiflik belirlenen numuneler içerisindeki persiste enfeksiyon oranı % 4,91 (3/61) olarak belirlenmiştir.

Bu tez çalışmasında 22 koyun örneğinden 15'inde pozitiflik tespit edilmiş olup, 12'si abort materyali (8/12, %66), 9'u erişkin koyundan organ örneği (6/9, %66), 2'si erişkin koyundan kan (1/2, %50) numunesidir. Albayrak ve ark., (2011)'nin yaptığı bir çalışmada, koyun abort materyallerinde %66,66, sığır abort materyallerinde %28,57 pozitiflik oranları bildirilmiş olup, bu tez çalışmasında koyun abort materyallerinde %68 (15/22), sığır abort materyallerinde %85,71 (6/7) oranında pestivirus pozitifliği belirlenmiştir. Bu çalışmada sığır abort materyali sayısı 7 olup, bu yüksek pozitifliğin sığır abort örneklerinin azlığından kaynaklı olduğu kanaatine varılmıştır. Dolayısıyla sığır abort materyal sayısının fazla olacağı araştırmalara ihtiyaç olup, abort olgularında pestivirus prevalansına yönelik gerçek pozitiflik oranının ilerideki çalışma sonuçlarıyla değerlendirilmesinin daha doğru bir yaklaşım olacağı düşünülmektedir.

Bu tez çalışmasındaki filogenetik analizler sonucunda; *Pestivirus A* türü en çok alt tip çeşitliliğinin görüldüğü grup olmuştur. Bu bağlamda; *Pestivirus A* türünde BVDV alt tipleri olarak $f (n=32) > l (n=7) > g (n=4) > v (n=1)$ şeklinde bir sıralama (Çizelge 3.3; Çizelge 3.4; Şekil 3.9) söz konusu olmuştur:

- BVDV-1f alt türü; sığır (n=26), koyun (n=4) ve keçi (n=2) orijinli örneklerde tespit edilmiştir.
- BVDV-1l alt türü; sığır (n=4) ve koyun (n=3) orijinli örneklerde tespit edilmiştir.
- BVDV-1g alt türü; sadece sığır (n=4) orijinli örneklerde tespit edilmiştir.
- BVDV-1v alt türü; sadece sığır (n=1) orijinli örnekte tespit edilmiştir.

Bu çalışmada *Pestivirus B* türünden bir adet sığır örneği pozitif bulunmuş olup, filogenetik analizde BVDV-2b alt tipinde yer aldığı belirlenmiştir (Şekil 3.9 ve 3.15).

Pestivirus D türünde sınıflandırılan örnek sayısı 4'tür. Hayvan türü bazında değerlendirildiğinde sığır (n=1), koyun (n=1), keçi (n=1), manda (n=1) şeklinde bir dağılım söz konusudur (Çizelge 3.3, Şekil 3.9 ve 3.14).

Pestivirus I türünde bulunan 12 örnek hayvan türü açısından değerlendirildiğinde koyun (n=7), keçi (n=4) ve sığır (n=1) orijinlidir (Çizelge 3.3; Şekil 3.9).

Bu tez kapsamında pestivirusların dört gen bölgesine (5'UTR, N^{pro}, E, NS2-3) yönelik olarak elde edilen filogenetik analiz sonuçları aşağıda literatür eşliğinde tartışılmıştır:

BVDV-1f'nin ilk bildirimi; Vilcek ve ark. (2001) tarafından yapılmış olup, çalışmada kan ve organ örnekleri kullanılmıştır. BVDV-1f'nin bulunduğu ülkeler olarak Avusturya, Macaristan, İtalya, Slovakya bildirilmiştir. Sonraki yıllarda yapılan araştırmalarda; BVDV-1f'nin Avrupa kıtasında ve ülkemizde sirküle olduğu rapor edilmiştir (Oguzoğlu ve ark 2011 ve Yeşilbaş ve ark., 2017). Bu doktora tez çalışmasında BVDV-1f grubu örnekler yoğun olarak tespit edilmiş olup, materyal olarak kan, aborte fetüs ve organ örneklerinde pozitiflik bulunmuştur. Bulgular, literatürle de uyumludur.

Tez çalışmasındaki A ve B örneklemelerine ait BVDV-1f alt tipindeki dizinler genellikle coğrafik orijin olarak Kırklareli, Kocaeli, Tekirdağ, Edirne, Çanakkale ve Bursa illerinden köken almaktadır. Bu örneklerin 14 adedi sığır (A-1, A-3, A-5, A-6, A-8, A-13, B-3, B-4, B-10, B-13, B-14, B-15, B16, B-21), 1 adedi keçi (B-7) ve 2 adedi koyuna (B-5, B-8) aittir (Çizelge 3.3; Şekil 3.9). Sığır örnekleri tam kan/serum örnekleridir. Küçük ruminatlardan elde edilen örnekler, fetal dokular ve ölen hayvanlara ait organ örneklerini kapsamaktadır.

Aynı işletmeden alınan ve persiste enfekte oldukları tespit edilen 3 sığira (A-5/B-15; A-3/B13; A-1/B-14) ait kan örneklerinden elde edilen dizinler incelendiğinde; BVDV-1f grubunda yer aldıkları belirlenmiştir (Çizelge 3.3; Şekil 3.9). Bu işletmeden bildirilen klinik bulgular arasında; abort ve ölü buzağı doğumları yer almaktadır. BVDV-1f alt grubunda yer alan etkenlere yönelik çalışmalarda; persiste enfeksiyonun yanı sıra bu hayvanlarda gözlenen abortlar, ölü doğum ve yaşama gücü zayıf yavru doğumları dikkate alındığında BVDV 1f grubuna ait virusların döl verimliliğini negatif yönde etkilediğine dair bir ilişkilendirme yapılabileceği kanaati oluşmuştur.

BVDV-1f alt tipi ülkemizde sığır örneklerinde tespit edilmiş olup, küçük ruminant örneklerinde henüz bildirimi yapılmamıştır (Oğuzoğlu ve ark., 2011 ve Şevik, 2021). Bu doktora tezinde 1f grubunda olduğu tespit edilen 6 örnek (koyun örnekleri B-5, B-8, C-12, C-20, keçi örnekleri B-3, B-7) küçük ruminant orijinli olup, bunlardan sadece biri ithal edilen (C-12) koyunlardan elde edilmiştir (Çizelge 3.3, Şekil 3.9). İki keçiye ait olan örnekler (B-3, B-7) Çanakkale ve Edirne illerinden gelmektedir. Söz konusu bu iki örnek organ numunesi olup, erişkin dişi keçiye aittir. BVDV-1f bulunan 4 (B-5, B-8, C-12, C-20) koyun örneği Bursa, Kırklareli, Kocaeli ve Avrupa'dan ithalat orijinlidir. B-5 ve B-8 erişkin koyunlara ait doku örnekleri, C-20 kod numaralı örnek aborte fötüs ve C-12 numaralı örnek erişkin bir koyuna ait kan örneği olup; klinik bulgular ve örnekler dikkate alınarak sonuçlar değerlendirildiğinde; küçük ruminantlarda BVDV-1f ile oluşan hastalık tablosunda hem erişkin hayvanlarda hem de gebelerde enfeksiyonun gözlenebileceği tespit edilmiştir. Ülkemizde BVDV-1f'nin küçük ruminantlarda varlığı ilk kez bu tez çalışmasında belirlenmiş olup; erişkin küçük ruminantlarda ölümlere ve gebelerde abortlara neden olduğu ortaya konmuştur. Bu sonuçlar BVDV-1f'nin sığırlardaki klinik bulgularıyla da örtüşmektedir.

B-7, B-8 ve C-20 örnekleri Marmara bölgesinden aborte fötuslardan elde edilmiştir. Bu durum dikkate alındığında; BVDV-1f suşlarının döl verimliliğini direkt etkileyebilecek bir potansiyele sahip olduğu ve sıklıkla abort olaylarında aktif bir rol aldığı görülmektedir.

C-20 örneği koyun orijinli ve Kırklareli'nden gelen bir örnek olup, BVDV-1f alt türünde yer alan ncp biyotipte bir virus olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.9 ve 3.11). Bu örneğin aborte koyun fötusundan köken alması, aynı bölgeden gelen (Kırklareli / Türkgeldi) sığır örnekleri (A-1, A-3, A-5, A-6, A-8, A-13) ile kurduğumuz hipotezimizi doğrulamaktadır. BVDV-1f küçük ruminantlarda sığırlarda olduğu gibi hem persiste enfeksiyon hem de abort vakalarından sorumlu bir alt tip olarak görülmektedir.

C-13, C-17, C-22, D-2 örnekleri ithalatla ülkemize gelen bir diğer hayvan grubunu oluşturmaktadır. Bu örnekler filogenetik ağaçta, BVDV-1f'ye yakın lokasyon göstermiş olmakla birlikte (Şekil 3.9), kendi aralarında ayrı bir grup oluşturmaktadır. Bu örneklerle ait hayvanların, Ülkemize giriş yapmamları nedeniyle ülkesel anlamda herhangi bir değerlendirme yapılmamıştır.

Aynı şekilde C-1, C-2, C-3, C-4, C-5 ve C-28 numaralı örnekler ithalat yolu ile Ülkemize gelen sığırlardan elde edilmiş örneklerdir. Bu örneklerle ait filogenetik analiz sonuçlarına göre BVDV-1f alt grubuna yakın olmalarına rağmen, ayrı bir grup oluşturdıkları görülmektedir (Şekil 3.9). C-1 ve C-3 numaralı örnekler aynı anda Avrupa kıtasından Ülkemize ithalat yolu ile getirilen sığırlara ait olup, bu örneklerde hem ncp hem de cp Pestivirus biyotiplerinin varlığı RT-PCR ile tespit edilmiştir. Bu iki sığır örneğindeki cp ve ncp biyotiplerin birlikte varlığı, bu hayvanlarda MD tablosunun olduğu şeklinde yorumlanmıştır. Bu gruptaki bireylerin, ithal hayvanlar olması nedeniyle ülkemize girişleri engellenmiş olup, bu sayede yeni alt tiplerin ülkemizdeki pestivirus biyoçeşitliliğini artırma potansiyellerinin önüne geçilmiştir. Bu bağlamda; bu gruptaki pozitifliklerin ülkesel anlamda bir değerlendirmesi yapılmamıştır.

Çalışmada test edilen sığır orijinli dört örnek (B-2, B-6, C-18, C-21) BVDV1g grubunda klasifiye edilmiştir (Şekil 3.9). Bu örneklerin elde edildiği dört hayvan da Avrupa'dan ülkemize ithal edilmek istenen hayvanlardır. Bu taramalarla enfekte hayvanların ülkemiz sınırları içerisine girişleri önlenmiştir.

Ülkemizde lokal dominant suş olarak belirtilen BVDV-1/ alt grubu, ilk kez Yeşilbağ ve ark. (2008) tarafından bildirilmiştir. Aynı yıl içerisinde BVDV-1/ olarak Fransa'dan bir bildirim daha yapılmış olsa da (Jackova ve ark., 2008); bu iki aynı isimli alt türün farkı gruplar olduğu belirlenmiştir (Minami ve ark., 2011). Günümüze kadar yapılan çalışmalarda BVDV-1/ alt türünün Türkiye'de yaygın olduğu gösterilmiştir (Oğuzoğlu ve ark., 2011 ve Yeşilbağ ve ark., 2008). Doktora tez çalışmasında sığır (B-1, C-16, C-38, D-9) ve koyun (D-3, C-19, C-30) orijinli olmak üzere toplam 7 örnek BVDV-1/ alt tipi ile aynı grup içerisinde yer almıştır (Çizelge 3.3, Çizelge 3.4, Şekil 3.9). Ülkemizde bugüne dek BVDV-1/ lokal dominant alt tipin varlığı sadece sığırlarda bildirilmiş olup, bu tez çalışmasında küçük ruminantlarda da BVDV-1/ alt tipinin varlığı belirlenmiştir. Küçük ruminant orijinli aborte fötüs kaynaklı dokularda ve bir adet kuzuya ait organ örneğinde belirlenen bu alt tip, klinik bulgular açısından değerlendirdiğinde enfeksiyonun büyük ruminantlarda meydana getirdiği bulgulara benzerlik göstermekte olup, BVDV-1/ alt tipinin küçük ruminantlarda abort ve yaşama gücü zayıf yavru doğumlarına sebep olduğu şeklinde yorumlanmıştır. Ayrıca Pestivirusların türler arası geçiş özelliği açısından değerlendirildiğinde, BVDV-1/ alt tipinin sadece büyük ruminantlarda değil, küçük ruminantlarda da enfeksiyonlara yol açabileceği tespit edilmiştir.

B-1 ve C-19 numaralı numuneler, filogenetik olarak her ne kadar ülkemiz için lokal dominant suş kabul edilen BVDV-1/ 'ye yakın olsalar da kendi aralarında farklı bir alt tip oluşturma ihtimali göz ardı edilmemelidir (Şekil 3.9). Bu bağlamda; ileriki yıllarda elde edilebilecek benzer örneklerin yeni alt grubun içerisinde yer alma potansiyeli sorgulanmalıdır. Aynı zamanda bu yeni alt tipte hem sığır hem koyun orijinli virusların yer alabileceği tespit edilmiştir. Dolayısıyla bu alt tip için, türler arası geçiş ihtimalinin de unutulmaması gereken bir özellik olduğu değerlendirilmiştir.

Oğuzoğlu ve ark.'nın (2019) 1291 sığır örneğinde yaptıkları çalışmada yeni bir alt tür tespit ederek, bu alt türü BVDV-1v olarak isimlendirmiştir. Bu tez çalışmasında da Düzce ilinden elde ettiğimiz sığır orijinli C-37 numaralı örnek,

filogenetik ağaçta BVDV-1v alt türleri ile aynı grup içerisinde yer almıştır (Şekil 3.9). BVDV-1v alt tipinin bildiriminin yapıldığı tarih dikkate alındığında, aradan geçen süreç zarfında bu tipin ülkemiz coğrafyasına yayılmakta olduğu tespit edilmiş olup, ileride yapılacak taramalarda yeni bir lokal dominant suş adayı olma potansiyelinin araştırılması önerilmektedir.

Pestivirus B türü ilk olarak Amerika Birleşik Devletleri (Ridpath ve ark., 1994) ve ilerleyen yıllarda Avrupa kıtasından rapor edilmiş (Wolfmeyer ve ark., 1997), takip eden yıllarda 5'UTR gen bölgesine yönelik yapılan moleküler çalışmalarla dört alt gruba (BVDV-2a, -2b, -2c ve -2d) ayrılmıştır (Decaro ve ark., 2017; Flores ve ark., 2002; Giangaspero ve ark., 2008; Jones ve ark., 2001 ve Ridpath ve ark., 2000). Bu tez çalışmasında ithalat yoluyla ülkemize gelen bir sığırdan *Pestivirus B* türünde pozitiflik elde edilmiştir (Şekil 3.9). Ülkemize bu hayvanın girişi olmamakla birlikte, ülkemizde daha önce *Pestivirus B* türü (BVDV-2a) enfeksiyonlarının varlığı bildirilmiştir (Oğuzoğlu ve ark., 2010; Sarıkaya ve ark., 2012 ve Yılmaz ve ark., 2012). Bu örnek için Türkiye orijinli olmaması nedeniyle ülkesel bazlı bir değerlendirme yapılmamakla birlikte, dünyada var olan *Pestivirus B* türleri ile karşılaştırılması yapıldığında BVDV-2b olanlarla aynı dalda yer aldığı tespit edilmiştir (Şekil 3.14). Elde edilen sonuçlar; ülkemize canlı hayvan ithalatı yapıldığında *Pestivirus* enfeksiyonu yönünden ruminantların taranması gerekliliğini bir kez daha ortaya koymaktadır.

Border Disease Virusları (BDV) klasik adlandırmada orijin aldıkları hayvanlara göre klasifiye edilmiş olmakla beraber, filogenetik çalışmalar sayesinde yapılan yeni sınıflandırmada bu viruslar da antijenik yapılarına göre yeni isimlendirmeye alınmıştır. Ülkemizde daha önce yapılan çalışmalarda, lokal BD viruslarının farklı bir moleküler karakteristiği olduğu ve ayrı bir tür (*Pestivirus I*) oluşturdukları bildirilmiştir (Oğuzoğlu ve ark., 2009 ve Toplu ve ark., 2012). Bu tez çalışmasında; *Pestivirus D* ve *Pestivirus I* türlerinin ruminantlarda varlığı belirlenmiştir (Şekil 3.9, 3.12 ve 3.14)

Pestivirus D içerisinde karakterize edilen 4 adet dizin, 4 farklı ruminant türünden orijin almaktadır (1 keçi, 1 koyun, 1 sığır ve 1 manda). Güncel taksonomide; klasik BDV suşları *Pestivirus D* olarak klasifiye edilmiştir. Anılan bu 4 farklı hayvandan elde edilen dizinler da klasik BDV suşları gibi *Pestivirus D* türü içinde yer almaktadır. Konak spektrumuna bakıldığında; bu doktora tezinde, koyun ve keçi yanı sıra, sığır ve mandalarda da *Pestivirus D* türünün varlığı belirlenmiştir. Literatür taramasında klasik BDV suşlarının büyük ruminantlarda varlığı ile ilgili herhangi bildirime rastlanmadığından, ülkemizde büyük ruminantlarda *Pestivirus D* türünün varlığı ilk kez bu çalışma kapsamında gösterilmiştir. Ayrıca bu 4 dizin (C-9, C-27, D-10, D-12) diğer *Pestivirus D* türlerinden farklı olarak kendi aralarında tek bir dal oluşturmaktadırlar (3.14). Coğrafik orijinlerine bakıldığında koyun (D-10), keçi (C-9) ve manda (D-12) orijinli örnekler Kocaeli ilinden alınmıştır. Kocaeli ilinde *Pestivirus D* türüne ait bu sıklığın oluşu ve farklı ruminant türlerinde görülmesi, hem türden türe bulaşın tipik bir örneği hem de lokal bir virus sirkülasyonunu göstermektedir. Kocaeli’nde 2021 yılında abortlara neden olan pestivirusların kendi aralarında da homoloji göstermeleri, aynı mera kaynaklı bir bulaş hipotezini kuvvetlendirmektedir. *Pestivirus D* türünden son örnek ithalat yolu ile ülkeye girişten men edilen bir sığıra (C-27) aittir. Ülkemiz coğrafyasında var olan suşlarla ile filogenetik olarak yakın bulunan bu sığır pestivirusu (C-27), filogenetik ağaçta ülkemiz orijinli diğer ruminant örnekleri (C-9, D10 ve D12) ile aynı grupta yer almıştır (Şekil 3.13, 3.16 ve 3.17).

Oğuzoğlu ve ark. (2009) Burdur (BDV/Burdur/05/cp) ve Aydın (BDV/Aydın/04/ncp) illerinden aldıkları küçük ruminant örneklerinde pestivirusların 5'UTR ve N^{PRO} gen bölgelerini hedef alarak RT-PCR ile daha sonra *Pestivirus I* türü olarak adlandırılan yeni bir Pestivirus türünü belirlemişlerdir. Ülkemizde son yıllarda sığır orijinli *Pestivirus I* viruslarının varlığı da bildirilmiş olup (Şevik, 2021), bu doktora tezinde Yalova ilinden gönderilen sığır orijinli bir örnekte (C-10) de *Pestivirus I* tespiti yapılmıştır. Ayrıca bu tez kapsamında elde edilen küçük ruminant orijinli pozitif 11 örneğin *Pestivirus I* türünde oldukları (koyun B-11, C-7, C-8, C-32, C-33, C-41, C42) (keçi C-31, D-1, D-4, D11) belirlenmiştir (Şekil 3.9. ve 3.11). Bu bağlamda; pestivirusların türler arası geçişine yeni örnekler elde edilmiştir. Ayrıca;

Pestivirus I türünün ülkemiz coğrafyası için dominant lokal bir tür olduğu kanaatine varılmıştır.

Pestiviruslar; üretildikleri doku/hücre kültürlerinde morfolojik bozukluk meydana getiren (sitopatojen-cp) ve herhangi morfolojik bozukluk meydana getirmeyen (non sitopatojen-ncp olmak üzere iki biyotipe ayrılır (McClurkin, 1985). Sitopatojen olmayan biyotipteki Pestiviruslar PI'dan sorumludurlar (Tautz ve ark., 1993 ve Vilcek ve ark., 2000). Ncp Pestivirus biyotiplerinin yaşam döngüsünde yapısal olmayan NS2-3 proteininin işlenmesi ve düzenlenmesi büyük öneme sahiptir. Persiste virus meydana getirebilme yeteneği, NS2-3 proteininin bölünme sürecinin aşağı yönlü regülasyonu ve bu sürecin doğal sonucu olan NS2-3 birikimi ile doğrudan bağlantılıdır (Mendez ve ark., 1998 ve Tautz ve ark., 1999). Yapılan çalışmalarda yüksek miktarda NS3, yalnızca cp BVDV suşları ile şekillenmiş enfeksiyonlar sonrası tespit edildiğinden, bu proteinin, cp biyotip için bir belirteç olduğu kabul edilmiştir (Donis ve ark., 1987 ve Pocock ve ark., 1987). Cp biyotipteki BVDV genomlarında, konakçı hücresi kaynaklı dizilerin entegrasyonu, genomik yeniden düzenlemeler, delesyonlar ve birikmiş nokta mutasyonları tanımlanmış, bu değişimlerin ve nokta mutasyonların NS3 ekspresyonuna neden olduğu gösterilmiştir (Kümmerer ve ark., 2000; Mendez ve ark., 1998 ve Meyers ve ark., 1998). Doğada Pestivirus biyotipleri incelendiğinde, cp suşlara nazaran ncp suşların daha yaygın olarak görülmektedir. Genellikle mukozal hastalık (MD) olgularından ya da aşılama sonrası gelişen salgınlarda cp biyotipte olan suşlar izole edilmektedir (Tautz ve ark., 1999).

Bu bilgilerden hareketle pestivirusların NS2-3 gen bölgesine spesifik primerler kullanılarak yapılan RT-PCR sonucunda toplam 34 örnek pozitif reaksiyon vermiş olup, bunlardan 30'u sığır (A-1, A-3, A-5, A-6, A-8, A13, B-2, B-4, B-6, B-10, B13, B14, B15, B-16, B-21, C-1, C-2, C-3, C-4, C-5, C-6, C-13, C-14, C-15, C-16, C-17, C-21, C-22, C-26, D-9) ve 4'ü koyun (2 adet BVDV-1f C-19, C-30 ve 2 adet BVDV-1f B-5, C-20) örneğidir (Şekil 3.10.) NS2-3 primerleri ile reaksiyon veren 30 adet sığır örneğinin 29 adedi *Pestivirus A* (BVDV-1f (n=23), BVDV-1g (n=3), BVDV-1f (n=2), BVDV-1v (n=1)) olup, bunlardan 25 tanesi ncp biyotiple enfekte bireyler olarak tespit edilmişlerdir. Prensipte olarak; pestiviral persistensin tespiti, çift

tam kan örneklemeğinde pozitiflik ve/veya antijenik pozitif bulunan örneklerde antikor negatifliği esası aranmaktadır. Bu tez kapsamında, 3 sığır örneğinin ikinci örnekleme yapılabildiği (A-5/B-15; A-3/B13; A-1/B-14) ve bu sığırların her iki örneklemede de antijenik pozitifliği belirlenerek persiste enfekte oldukları tespit edilmiştir. PI oldukları belirlenen bu 3 sığırda ait 6 örnek de ncp biyotiptedir ve bu bireylerde örnekleme döneminde MD tablosunun gelişmediği belirlenmiştir. Geri kalan sığırların ikinci örnekleme yapılamamış olmakla birlikte; ncp biyotiple enfekte oldukları görülmektedir. ncp biyotip dizinlerinin mutasyon analizinde; persiste enfekte olan bireylerdeki (n=3) virus suşları ile diğer pozitiflerin benzer bir uyum içinde oldukları bulunmuştur (Şekil 3.23). Ancak bu bireylerden ikinci örnekleme yapılamaması nedeniyle enfeksiyonun akut veya persiste olabileceği konusu aydınlatılamamıştır. Bu bağlamda; NS2-3 gen bölgesine spesifik primerler kullanılarak gerçekleştirilecek RT-PCR testi sonuçlarının, serolojik sonuçlarla desteklenmesi veya ikincil örnekleme yapılarak persiste enfeksiyonun aydınlatılabileceği kanaatine varılmıştır.

C-1, C-3 ve B-6 numaralı örneklerin, hem cp (672 bp) hem de ncp (402 bp) biyotiplere sahip oldukları belirlenmiştir (Şekil 3.6.). Literatür bilgide sadece, MD tablosunun oluşumunun ncp biyotiple enfekte bireylerde söz konusu olduğu verilmiştir (Fritzemeier, 1996). MD tablosu geliştiğinde; aynı bireyde hem cp hem de ncp biyotiplerin varlığının beraber görüleceği, süper enfeksiyon veya mutasyon teorilerinin gerçekleşmesine göre de 2 farklı fazda MD (early-onset veya late-onset) gelişimi olacağı bildirilmektedir. Bu teorilerde homolog veya heterolog suşla enfeksiyon tanımlaması önem kazanmaktadır. Yukarıda anılan örneklere ait bireysel anamnez bulgularına ulaşamadığından, sonuçları klinik bulgular ile ilişkilendirme durumu mümkün olamamaktadır. Ancak her iki biyotipe de sahip bu 3 örnekte, MD tablosunun gelişmiş olabileceği ihtimali kuvvetle muhtemel görünmektedir. Bu bağlamda NS2-3 gen bölgesine spesifik bu primerlerin, MD tablosunun değerlendirilmesi için kullanılabileceği öngörüsüne varılmıştır.

B21 (erişkin sığır-kan/BVDV-1f) ve D9 (sığır-abort/BVDV-1f) numaralı örnekler ise sadece cp (672 bp) biyotip tespit edilmiş olup, bu hayvanların akut enfekte oldukları kanaatine varılmıştır (Şekil 3.6).

NS2-3 gen bölgesine spesifik primerler ile *Pestivirus B* türünde olduğu belirlenen C-6 örneğinin de ncp biyotiple enfekte olduğu, ithalat yoluyla alınan bu hayvanın tek kan örneği ile persiste enfekte bir birey olabileceği kanaatine varılmıştır (Şekil 3.10).

Biyotip tayinini mümkün kılan NS2-3 gen bölgesine spesifik primerler kullanılarak hastalığın dönemleri (akut/kronik) aydınlatılabilmekte, persiste enfekte bireylerin tespiti mümkün hale gelmekte ve hastalığın patogeneze yönelik (MD tablosu) durum belirlenebilmektedir. Ancak bu tez çalışmasında dikkat çekici bir bulgu olarak; NS2-3 gen bölgesi spesifik primerlerin sadece *Pestivirus A* ve *Pestivirus B* türleri için reaksiyon verdiği; *Pestivirus I* ve *Pestivirus D* türlerinden örneklerle biyotip tayini için uygun olmadığı görülmüştür. Laboratuvar tanıda bu primerlerin tek başına kullanılmaması, RT-PCR sonuçlarının mutlaka pan-generik primerlerle kombine edilmesi gerektiği, biyotip tayini gereken durumlarda ve enfeksiyon tablosunun (akut/persiste) aydınlatılması amacıyla bu primerlerle RT-PCR yapılabileceği tarafımızca önerilmektedir.

*Pestivirus*ların klasifikasyonunda sıklıkla 5'UTR gen bölgesi kullanılsa da moleküler çalışmalarda N^{pro} ve E gen bölgelerinin analizleri de karşılaştırmalı olarak değerlendirilmektedir (Giammarioli ve ark., 2015; Nagai ve ark., 2004; Oğuzoğlu ve ark., 2010; Oğuzoğlu ve ark., 2019; Robesova ve ark., 2009 ve Tajima 2004). Bu tez çalışmasında N^{pro} ve E gen bölgesine dayalı yapılan filogenetik çalışmalar sonrasında elde edilen verilerin 5'UTR sonuçları ile de uyumlu olduğu gözlenmiştir.

A-3, A-5, A-6, A-13, B13, C-2, C-22, D-2 numaralı örneklerden elde edilen N^{pro} gen bölgesi dizinleri, 5'UTR bölgesine yönelik filogenetik analiz sonuçları ile uyumlu olup; *Pestivirus A* türü, BVDV-1f alt türünde gruplanmış oldukları görülmektedir (Şekil 3.11). Bunlara ek olarak hem 5'UTR hem de N^{pro} dizin sonuçlarına göre; B-1 örneği de *Pestivirus A* türü, BVDV-1f alt türünde

gruplanmışlardır (Şekil 3.11). Ayrıca D-11 numaralı örnek; her iki filogenetik analiz sonucunda *Pestivirus I* türünde yer almıştır (Şekil 3.9 ve 3.12). Bu bağlamda, N^{pro} ve 5'UTR dizinlerinin birbiriyle homoloji oluşturacak sonuçlar verdiği görülmektedir. Bu bağlamda, otoproteazlardan zengin ve korunaklı olmayan bir bölge olan N^{pro}'ya yönelik RT-PCR ile ampikon kazanımında yaşanabilecek sorunlar nedeniyle, korunaklı bir bölge olan 5'UTR'ye karşı elde edilecek ampikonların hem tanısal anlamda hem de tiplendirmede kullanılabileceği ve 5'UTR'nin pestiviruslara ait moleküler çalışmalarda tercih edilebileceği kanaatine sahip olunmuştur.

E gen bölgesi yönünden kazanılan 11 adet (A-5, A-6, B-15, C-2, C-4, C-5, C-13, C-17, C-16, D-2, D-9) örneğe ait dizin analizi sonuçları; 5'UTR ve N^{pro} gen bölgesine yönelik olanlarla karşılaştırıldığında, uyumlu bulunmuştur (Şekil 3.12). E gen bölgesine yönelik filogenetik analiz sonuçlarına göre; D-9 numaralı örnek *Pestivirus A* türünün BVDV-1l alt tipinde klasifiye olurken; diğer örnekler *Pestivirus A* türünün BVDV-1f alt tipinde yer almıştır. Persiste enfekte olduğu tespit edilen bir sığira ait çift kan örneğinin (A5/B15) envelope gen bölgesi dizin analizinde de herhangi bir amino asit değişikliğinin olmadığı ve 21 gün arayla alınan kan örneklerinde envelope gen bölgesi dizinlerinin birbirleriyle %100 homoloji gösterdikleri tespit edilmiştir (Şekil 3.25). Bu doktora tez çalışmasında elde edilen BVDV-1f alt tipine ait örneklerin immun dominant E2 gen bölgesi dizinlerinin aminoasit karşılaştırmasında, diğer alt tipler ve BVDV-1f alt tipinde bulunan hem cinsleri ile farklılıklarının yüksek olduğu görülmüştür (Şekil 3.25). Bu bağlamda; aşı kompozisyonlarında bu biyoçeşitliliğin dikkate alınması ve BVDV-1f gibi ülkemizde yaygın görülen alt tiplerin de aşılarda mutlaka bulunması gerekliliği göz ardı edilmemelidir.

Bu tez çalışmasında büyükbaş ve küçükbaş hayvanların bir arada tutulduğu işletmelerden örnek alınması mümkün olamamıştır. Bununla birlikte elde edilen pozitiflikler incelendiğinde; ayrı zaman dilimlerinde ve farklı işletmelerden alınmış olmakla birlikte, bazı örneklerin (sığır orijinli B-1/koyun orjinli C-19; sığır orijinli C-10/koyun orjinli D-4; sığır orijinli C-27/koyun orijinli D-10) filogenetik ağaçta birbirleri ile yakın ilişkili oldukları görülmüştür. Bu örneklerde olduğu gibi, yakın

antijenik ilişkileri bulunan ve farklı konaklara ait olan Pestivirusların türler arası geçiş potansiyeline sahip oldukları düşünülmektedir. Bu bağlamda; bu çalışmada tespit edilen *Pestivirus A* (f ve l), *Pestivirus I* ve *Pestivirus D* türlerinin türler arası geçiş özelliğine sahip tür ve alt türler oldukları kanaatine varılmıştır.



5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez çalışması ruminant pestiviruslarının tanısında kullanılabilecek testlerin karşılaştırmalarının yapıldığı, ülkemizde bulunan pestivirus biyoçeşitlerinin karakterizasyonlarının ve türler arası geçiş potansiyellerinin sorgulandığı bir hipotezle kurgulanmış ve yürütülmüştür. Aşağıda tez kapsamında elde edilen sonuç ve öneriler listelenmiştir:

- ✓ Antijen ELISA ile Pestivirus tanısında tanı materyali açısından kan ve kulak kıkırdağı kullanımı ile bir sınırlama söz konusu iken; RT-PCR metodu, enfeksiyon şüpheli hayvanlardan alınacak tüm tanı materyalleri için tercih edilmektedir. Ayrıca biyoçeşitliliğin yüksek olmasından dolayı meydana gelebilecek mutasyonların da belirlenebilmesi için daha duyarlı bir tanı metodu olarak konvansiyonel RT-PCR önerilmektedir.
- ✓ Bu çalışmada Pestivirus enfeksiyonları yönünden pozitif bulunan 61 ruminant örneğinin virus türü yönünden yoğunluk sıralaması: *Pestivirus A* (n=44) > *Pestivirus I* (n=12) > *Pestivirus D* (n=4) > *Pestivirus B* (n=1) şeklinde olmuştur.
- ✓ *Pestivirus A* türü en çok tespit edilen tür olup, alt tipler yönünden de en çok çeşitliliğe sahiptir. Toplam 44 *Pestivirus A* türü pozitiflerin alt tip dağılımı şöyledir: f (n=32) > l (n=7) > g (n=4) > v (n=1).
- ✓ Aşı etkinliği için ülkemizde bulunan lokal alt tipler yanı sıra, dominant tür/alt tiplerin de bulundurulması gerekliliği unutulmamalıdır. Bu bağlamda; ruminant pestivirusları ile mücadelede kullanılacak aşı kompozisyonlarında, BVDV-1f, BVDV-1l, BVDV-2, *Pestivirus D* ve *Pestivirus I* etkenlerini içeren multivalan aşılardan kullanılması önerilmektedir.
- ✓ BVDV-1f alt grubunda yer alan etkenlere yönelik çalışmalarda; persiste enfeksiyonun yanı sıra bu hayvanlarda gözlenen abort, ölü doğum ve yaşama gücü zayıf yavru doğumları dikkate alındığında 1f grubuna ait virusların döl verimliliğini negatif yönde etkilediğine dair bir ilişkilendirme yapılabileceği kanaati oluşmuştur.

- ✓ Bu tez çalışmasında Türkiye orijinli lokal pestivirus alt tipi olan BVDV-1I'nin küçük ruminantlarda da varlığı ilk kez belirlenmiş olup, enfeksiyonun büyük ruminantlardaki klinik bulgulara benzer (abort ve yaşama gücü zayıf yavru doğumları) seyrettiği tespit edilmiştir. BVDV-1I'nin türler arası geçiş özelliğinin de olması nedeniyle küçük ruminantlarda bulunma sıklığının ileriki çalışmalarda araştırılması gerektiği; bu tez çalışmasının bir öngörüsüdür.
- ✓ Bu tez çalışmada moleküler tanıda 5'UTR gen bölgesine yönelik primerler ile yüksek pozitiflik elde edilmiş olup, Pestivirus türlerinin belirlenmesinde dört gen bölgesinden en uygun olanının 5'UTR bölgesi olduğu gözlemlenmiştir. 5'UTR'ye karşı elde edilecek pozitifliklerin hem tanısal hem de tiplendirmede çalışmalarında kullanılabileceği kanaatine sahip olunmuştur. Bu bölgenin Pestiviruslara ait moleküler bazlı çalışmalarda tek başına da tercih edilebileceğini önermekteyiz.
- ✓ Biyotip tayininde kullanılan NS2-3 gen bölgesi spesifik primerlerin sadece *Pestivirus A* ve *Pestivirus B* türleri için reaksiyon verdiği; *Pestivirus I* ve *Pestivirus D* türlerinden örneklerle çalışmadığı tespit edilmiştir. Laboratuvar tanıda bu primerlerin tek başına kullanılmaması, konvansiyonel RT-PCR sonuçlarının mutlaka pan-generik primerlerle kombine edilmesi gerektiği kanaatine varılmıştır. Biyotip tayini ile enfeksiyon tablosunun (akut/persiste) aydınlatılması durumunda; ikinci kan örnekleme, serolojik değerlendirme ve sekans analizi sonucu desteğiyle pestivirus türünün belirlenmesini takiben bu primerlerle RT-PCR yapılabileceği önerilmektedir. Biyotip tayininin, enfeksiyonun sığırlardaki MD tablosu formunun aydınlatılmasında önemli olduğu kanaatine varılmıştır.
- ✓ Bu doktora tezi kapsamında ruminant orijinli *Pestivirus I* türünde (n=12) Pestivirusların türler arası geçişine yeni adaylar tespit edilmiştir. Bunlar hayvan türü olarak; sığır (n=1), koyun (n=7), keçi (n=4) orijinlidir. Yapılan filogenetik analizler; *Pestivirus I* türünün ülkemiz coğrafyası için dominant lokal bir tür olduğunu göstermektedir.
- ✓ Bu doktora tez çalışmasında *Pestivirus D* türünün, koyun, keçi yanı sıra, sığır ve mandalarda da varlığı belirlenmiştir. Literatür taramasında ülkemizde klasik BDV suşlarının büyük ruminantlarda varlığı ile ilgili herhangi bildirime rastlanmadığından, ülkemizdeki büyük ruminantlarda *Pestivirus D* türünün varlığı ilk kez bu çalışma kapsamında belirlenmiştir. Böylelikle, türler arası geçiş ve biyoçeşitliliğe dair yeni sonuçlar kazanılmıştır.

- ✓ Sığır orijinli dört örnek BVDV-1g, sığır orijinli bir örnek BVDV-2b gurubunda klasifiye edilmiş olup, söz konusu sığırlar Avrupa'dan ülkemize ithal edilmek istenen hayvanlardır. T.C Tarım ve Orman Bakanlığı'nın hayvan salgın hastalıkları ile mücadele tedbirleri çerçevesinde, yapılan rutin taramalarla bu hayvanların ülkemiz sınırları içerisine girişleri önlenmiştir. Bu bağlamda; ithalat yoluyla canlı hayvan girişlerinde millileştirme öncesinde, mikrobiyel hastalıklar yönünden kontrol edilmelerinin gerekliliği görülmektedir. Ayrıca, Pestiviruslar gibi mutasyon kaabiliyeti ve biyoçeşitliliği yüksek etkenlerin, düzenli saha taramalarıyla araştırılması ve moleküler tiplendirme çalışmalarının yapılması tarafımızca önerilmektedir.
- ✓ *Pestivirus A* türü içinde yeni tanımlanan BVDV-1v alt tipinin ülkemiz coğrafyasına yayılmakta olduğu bu tez kapsamında tespit edilmiş olup, bu alt tipin ileride yapılacak taramalarda yeni bir lokal dominant suş adayı olma potansiyelinin araştırılması önerilmektedir.
- ✓ Pestivirus enfeksiyonlarına yönelik ulusal düzeyde yapılacak olan koruma/kontrol/mücadele çalışmalarında türler arası geçiş özelliğinin göz önünde tutulması önem arz etmektedir. Ortak mera kullanımı sebebiyle bu geçiş potansiyelinin yüksekliği söz konusudur. Bu durumun kullanılacak aşıların seçiminde yüksek bir öneme sahip olduğu unutulmamalıdır.

ÖZET

Ruminantları Enfekte Eden Pestivirusların Ayırıcı Tanısı ve Moleküler Karakterizasyonu

Pestiviruslar, sığırlarda Bovine Virus Diarrhoea Virusu (BVDV) ve küçük ruminantlarda Border Disease Virusu (BDV) olmak üzere klasik viral taksonomide adlandırılmışlardır. Sürü sağlığı ve devamlılığı yönünden önem arz eden bu viruslar abortlar, kongenital anomalili ve yaşama gücü zayıf yavru doğumları ile karakterize ekonomik kayıplara sebep olan viral etkenler arasında yer almaktadırlar.

Bu doktora tezi; ülkemizde bulunan ruminant türlerinde klinik/subklinik enfeksiyonlara neden olan Pestivirus enfeksiyonlarından Bovine Viral Diarrhoea (BVD), Border Disease (BD) ve Mucosal Disease (MD) enfeksiyonlarının moleküler metotlarla araştırılmasına yöneliktir. Elde edilen bulgular uygulanan tanı metodu türleri baz alınarak sorgulanmış, ayrıca pozitif örnekler filogenetik olarak da karakterize edilmiştir. Ülkemizin Marmara Bölgesi'nden ve Avrupa Ülkelerinden köken alan hayvanlardan elde edilen izolatların karakterizasyonunda, Pestivirus genomunun 5'UTR, N^{pro}, E ve NS2-3 bölgelerine yönelik primerler kullanılmış elde edilen sonuçlar dünyadaki ve Türkiye'deki hem cinsleri ile karşılaştırılmıştır. Saptanan 61 adet pozitif numuneden elde edilen ampikonlar dizin analizine tabi tutulmuştur. İlgili dizinler Gen Bankasına kaydedilmiş olup, aynı zamanda dünyadaki hem cinsleri ile filogenetik analizler kullanılarak karşılaştırılmıştır. Bu bağlamda *Pestivirus A*, *Pestivirus B*, *Pestivirus D* ve *Pestivirus I* türleri tespit edilmiştir. Bu çalışmada *Pestivirus D* ve *Pestivirus I* türlerinin büyük ruminantlarda varlığı belirlenmiş olmakla birlikte *Pestivirus A* türüne ait BVDV-1f ve 1l alt türlerinin küçük ruminantlarda varlığı da tespit edilmiş ve bu sonuçlara bağlı olarak Pestivirusların türler arası geçiş özelliği gösterilmiştir.

Elde edilen bulgular Veteriner Viroloji alanında Ruminant orijinli Pestiviruslar hakkında moleküler bilgiye katkı sağlamakla birlikte ileride yapılması muhtemel ulusal eradikasyon ve aşılama programları için kaynak teşkil edecektir.

Anahtar Kelimeler: Ayırıcı Teşhis, Pestivirus, Border Disease Virus, BVDV, Moleküler Karakterizasyon.

SUMMARY

Differential Diagnosis and Molecular Characterization of Pestiviruses Infecting Ruminants

Pestiviruses are named in classical viral taxonomy as Bovine Virus Diarrhoea Virus (BVDV) in cattle and Border Disease Virus (BDV) in small ruminants. These viruses, which are important in terms of herd health and continuity, are among the viral factors that cause economic losses characterized by abortions, congenital anomalies and poor viability.

This doctoral thesis focuses on the investigation of Bovine Viral Diarrhoea (BVD), Border Disease (BD) and Mucosal Disease (MD) infections, which are Pestivirus infections that cause clinical/subclinical infections in ruminant species in our country, by molecular methods. The findings were questioned based on the types of diagnostic methods applied, and positive samples were also characterized phylogenetically. Primers for the 5'UTR, N^{pro}, E and NS2-3 regions of the Pestivirus genome were used in the characterization of the isolates obtained from animals originating from the Marmara Region of our country and European countries, and the results were compared with both genera in the world and in Turkey. Amplicons obtained from 61 positive samples detected were subjected to sequence analysis. Relevant indexes were registered in the GenBank and were also compared with their genera in the world using phylogenetic analysis. In this context, *Pestivirus A*, *Pestivirus B*, *Pestivirus D* and *Pestivirus I* species have been identified. In this study, although the presence of *Pestivirus D* and *Pestivirus I* species in large ruminants was determined, the presence of BVDV-1f and 1l subspecies of *Pestivirus A* species in small ruminants was also detected, and depending on these results, the interspecies transmission characteristic of pestiviruses was demonstrated.

The findings will contribute to the molecular knowledge about Ruminant Pestiviruses in the field of Veterinary Virology and will also be a source for possible national eradication and vaccination programs in the future.

Keywords: Border Disease Virus, BVDV, Differential Diagnosis, Molecular Characterization, Pestivirus,

KAYNAKLAR

- ABE Y, TAMURA T, TORII S, WAKAMORI S, NAGAI M, MITSUHASHI K, MINE J, FUJIMOTO Y, NAGASHIMA N, YOSHINO F, SUGITA Y, NOMURA T, OKAMATSU M, KIDA H, SAKODA Y (2016). Genetic and antigenic characterization of bovine viral diarrhoea viruses isolated from cattle in Hokkaido, Japan. *The Journal of veterinary medical science*, **78**: 61–70.
- ABDEL LATIF AO, GOYAL SM, CHANDER Y, ABDEL-MONEIM AS, TAMAM SM, MADBOULY HM (2013). Isolation and molecular characterisation of a pestivirus from goats in Egypt. *Acta Vet. Hung* **612**: 270–280.
- ALBAYRAK H, OZAN E, (2012). The Investigation of pestivirus and Rift Valley fever virus infections in aborted ruminant foetuses in the Blacksea Region in Turkey. *Kafkas Univiversitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*, **18**: 457–461.
- ADURIZ G, ATXAERANDIO R, CORTABARRIA N (2015). First detection of bovine viral diarrhoea virus type 2 in cattle in Spain. *Veterinary record open*, **2**: e000110.
- ARIAS P, ORLICH M, PRIETO M, CEDILLO ROSALES S, THIEL HJ, ALVAREZ M, BECHER P (2003). Genetic heterogeneity of bovine viral diarrhoea viruses from Spain. *Veterinary microbiology*, **96**: 327–336.
- BACHOFEN C, STALDER H, BRAUN U, HILBE M, EHRENSPERGER F, PETERHANS E (2008). Co-existence of genetically and antigenically diverse bovine viral diarrhoea viruses in an endemic situation. *Vet Microbiol*, **131**: 93–102.
- BAKER JC (1987). Bovine viral diarrhoea virus: a review. *J Am Vet Med Assoc* **190**: 1449–1458.
- BAKER JC (1995). The clinical manifestation of bovine viral diarrhoea infection. *Vet Clin N Am Food Anim Pract*, **11**: 425–445.
- BARRETT DJ, MORE SJ, GRAHAM DA, O'FLAHERTY J, DOHERTY ML, GUNN, HM (2011). Considerations on BVD eradication for the Irish livestock industry. *Irish veterinary journal*, **64**: 12.
- BARROS SC, RAMOS F, PAUPERIO S, THOMPSON G, FEVEREIRO M (2006). Phylogenetic analysis of Portuguese bovine viral diarrhoea virus. *Virus Res.*, **118**: 192–195.
- BAULE C, VAN VUUREN M, LOWINGS JP, BELAK S (1997). Genetic heterogeneity of bovine viral diarrhoea viruses isolated in Southern Africa. *Virus Res.*, **522**: 205–220.
- BAXI M, MCRAE D, BAXI S, GREISER-WILKE I, VILCEK S, AMOAKO K, DEREGT D (2006). A one-step multiplex real time RT-PCR for detection and typing of bovine viral diarrhoea viruses. *Vet Microbiol*, **116**: 37–44.
- BAZZUCCHI M, BERTOLOTI L, GIAMMARIOLI M, CASCIARI C, ROSSI E, ROSATI S, DE MIA GM (2017). Complete Genome Sequence of a Bovine Viral Diarrhoea Virus Subgenotype 1h Strain Isolated in Italy. *Genome announcements*, **5**: e01697-16.
- BECHER P, SHANNON AD, TAUTZ N, THIEL HJ (1994). Molecular characterization of border disease virus a pestivirus from sheep. *Virology*, **198**: 542–551.
- BECHER P, ORLICH M, SHANNON AD, HORNER G, KÖNIG M, THIEL HJ (1997). Phylogenetic analysis of pestiviruses from domestic and wild ruminants. *J Gen Virol*, **78**: 1357–1366.
- BECHER P, ORLICH M, THIEL HJ (1998). Complete genomic sequence of border disease virus a pestivirus from sheep. *J Virol*, **72**: 5165–5173.
- BECHER P, ORLICH M, KOSMIDON A, KONIG M, BAROTH M, THIEL HJ (1999). Genetic diversity of pestiviruses: identification of novel groups and implication for classification. *Virology*, **262**: 64–71.

- BECHER P, AVALOS RAMIREZ R, ORLICH M, CEDILLO ROSALES S, KONIG M, SCHWEIZER M, STALDER H, SCHIRRMIEIER H, THIEL HJ (2003). Genetic and antigenic characterization of novel pestivirus genotypes: implications for classification. *Virology*, **311**: 96–104.
- BECHER P ve TAUTZ N (2011) RNA recombination in pestiviruses: cellular RNA sequences in viral genomes highlight the role of host factors for viral persistence and lethal disease. *RNA Biol*, **8**: 216–224.
- BECHER P, SCHMEISER S, OGUZOGLU TC ve POSTEL A (2012). Complete genome sequence of a novel pestivirus from sheep. *J Virol*, **86**: 11412.
- BEDEKOVIC T, LOJKIC I, LEMO N, CAC Z, CVETNIC Z, LOJKIC MI, MADIC J (2012). Genetic typing of Croatian bovine viral diarrhoea virus isolates.. *Veterinarski arhiv*, **82** (5), 449-462.
- BEER M, WOLF G, KAADEN OR (2002). Phylogenetic analysis of the 5'-untranslated region of german BVDV type II isolates. *Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health*, **49**: 43–47.
- BENSON DA, CLARK K, KARSCH-MIZRACHI I, LIPMAN DJ, OSTELL J, SAYERS EW (2014). GenBank. *Nucleic Acids Res.* **42**: 32-37.
- BOLIN SR, MCCLURKIN AW, CUTLIP RC, CORIA MF (1985). Severe clinical disease induced in cattle persistently infected with noncytopathogenic bovine viral diarrhoea virus by superinfection with cytopathogenic bovine viral diarrhoea virus. *Am J Vet Res.*, **46**: 573–576.
- BOOTH RE, THOMAS CJ, EL-ATTAR LM, GUNN G, BROWNLIE J (2013). A phylogenetic analysis of Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) isolates from six different regions of the UK and links to animal movement data. *Veterinary research*, **44**: 43.
- BORCA MV, HOLINKA LG, RAMIREZ-MEDINA E, RISATTI GR, VUONO EA, BERGGREN KA, GLADUE DP (2019). Identification of structural glycoprotein E2 domain critical to mediate replication of Classical Swine Fever Virus in SK6 cells. *Virology*, **526**: 38–44.
- BRAUN U, BACHOFEN C, BÜCHI R, HÄSSIG M, PETERHANS E (2013). Infection of cattle with Border disease virus by sheep on communal alpine pastures. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*, **155**: 123–128.
- BROADDUS C, HOLYOAK G, DAWSON L, STEP D, FUNK R, KAPIL SANJAY (2007). Transmission of Bovine Viral Diarrhoea Virus to Adult Goats from Persistently Infected Cattle. *Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians*, **19**.
- BRODERSEN BW, KELLING CL (1999). Alteration of leukocyte populations in calves concurrently infected with bovine respiratory syncytial virus and bovine viral diarrhoea virus. *Viral Immunol*, **12**: 323–334.
- BROWNLIE J (1990). Pathogenesis of mucosal disease and molecular aspects of bovine virus diarrhoea virus. *Vet. Microbiol.*, **23**: 371-382.
- BROWNLIE J, HOOPER LB, THOMPSON I, COLLINS ME (1998). Maternal recognition of foetal infection with bovine viral diarrhoea virus (BVDV) the bovine pestivirus. *Clin Diag Virol*, **10**: 141–150.
- BRUN A, LACOSTE F, REYNAUD G, KATO F, SAINT-MARC B (1993). Evaluation of the potency of an inactivated vaccine against border disease pestivirus infection in sheep. In: Proceedings of the Second Symposium on Pestiviruses Edwards S ed. Fondation Marcel Merieux Annecy France 1–3 October 1992 257-259.
- BRAUN U, HILBE M, PETERHANS E, SCHWEIZER M (2019). Border disease in cattle. *The Veterinary Journal*, **246**: 12-20.
- BURGU I (1999). Türkiye'de Sığırlarda Persiste Bvd Virus Enfeksiyonu. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **46**: (02.03) 0-0
- BURGU I, ALKAN F, ÖZKUL A, YEŞİLBAG K, KARAOĞLU T, GÜNGÖR B (2003). Türkiye'de süt sığırcılığı işletmelerinde bovine viral diarrhoea virus (BVDV) enfeksiyonunun epidemiyolojisi ve kontrolü. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **50**: 127-133.
- CALLENS N, BRÜGGER B, BONNAFOUS P, DROBECQ H, GERL MJ, KREY T, ROMAN-SOSA G, RÜMENAPF T, LAMBERT O, DUBUISSON J, ROUILLE Y (2016). Morphology and molecular composition of purified bovine viral diarrhoea virus envelope. *PLoS Pathog*, **12**: e1005476.

- CAMACHO C, COULOURIS G, AVAGYAN V, MA N, PAPADOPOULOS J, BEALER K, MADDEN TL (2009). BLAST+: architecture and applications. *BMC bioinformatics*, **10**: 421.
- CARUSO C, PELETTI S, CERUTTI F, MODESTO P, ROBOTTO S, DOMENIS L, MASOERO L, ACUTI P (2017). Evidence of circulation of the novel border disease virus genotype 8 in chamois. *Arch. Virol*, **162**: 511–515.
- CASCIARI C, SOZZI E, BAZZUCCHI M, MARTIN AMM, GAFFURI A, GIAMMARIOLI M, LAVAZZA A, DE MIA GM (2020). Serological relationship between a novel ovine pestivirus and classical swine fever virus. *Transbound Emerg Dis*, **67**: 406–410.
- CHASE CCL, ELMOWALID G, YOUSIF AAA (2004). The immune response to bovine viral diarrhoea virus: a constantly changing picture. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, **20**: 95–114.
- CHASE C, THAKUR N, DARWEESH M, MORARIE-KANE S, RAJPUT M (2015). Immune response to bovine viral diarrhoea virus—looking at newly defined targets. *Animal Health Research Reviews*, **16**: 4–14.
- CHILDS T. X Disease of Cattle – Saskatchewan (1946). *Can J Comp Med Vet Sci.*, **10**: 316–319.
- CIULLI S, PURPARI G, AGNELLO S, DI MARCO P, DI BELLA S, VOLPE E, MIRA F, DE AGUIAR SALDANHA PINHEIRO AC, VULLO S, GUERCIO A (2017). Evidence for Tunisian-like pestiviruses presence in small ruminants in Italy since 2007. *Transbound. Emerg. Dis.*, **64**: 1243–1253.
- COLLETT MS, LARSON R, GOLD C, STRICK D, ANDERSON DK, PURCHIO AF (1988). Molecular cloning and nucleotide sequence of the pestivirus bovine viral diarrhoea virus. *Virology*, **165**: 191–199.
- COLOM-CADENA A, CABEZONA O, ROSELL R, FERNÁNDEZ-AGUILAR X, BLANCH-LÁZARO B, TETAS E, LAVÍN S, MARCO I (2016). The European hare (*Lepus europaeus*) as a potential wild reservoir for ruminant pestiviruses. *Prev Vet Med*, **131**: 60–63.
- CORNISH TE, VAN OLPHE AL, CAVENDER JL, EDWARDS JM, JAEGER PT, VIEYRA LL, WOODARD LF, MILLER DR, O'TOOLE D (2005). Comparison of ear notch immunohistochemistry, ear notch antigen-capture ELISA, and buffy coat virus isolation for detection of calves persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. *Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc.*, **17**: 110–117.
- CORTEZ A, HEINEMANN MB, DE CASTRO AM, SOARES RM, PINTO AMV, ALFIERI AA, FLORES EF, LEITE RC, RICHTZENHAIN LJ (2006). Genetic characterization of Brazilian bovine viral diarrhoea virus isolates by partial nucleotide sequencing of the 5'UTR region. *Pesq. Vet. Brasil*, **26**: 211–216.
- COUVREUR B, LETELLIE C, COLLARD A, QUENON P, DEHAN P, HAMERS C, PASTORET PP, KERKHOF P (2002). Genetic and antigenic variability in bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates from Belgium. *Virus research*, **85**: 17–28.
- CRAIG, M.I, KÖNIG, G.A, BENITEZ, D.F, DRAGHI, M.G (2015). Molecular analyses detect natural coinfection of water buffaloes *Bubalus bubalis* with bovine viral diarrhoea viruses BVDV in serologically negative animals. *Rev. Argent Microbiol.*, **472**: 148–151.
- CURTI E ve JAEGER J (2013). Residues Arg283, Arg285, and Ile287 in the nucleotide binding pocket of bovine viral diarrhoea virus NS5B RNA polymerase affect catalysis and fidelity. *Journal of Virology*, **87**: 199–207.
- DARWEESH MF, RAJPUT MK, BRAUN, LJ, ROHILA, JS, CHASE CC (2018). BVDV Npro protein mediates the BVDV induced immunosuppression through interaction with cellular S100A9 protein. *Microbial Pathogenesis*, **121**: 341–349.
- DE OLIVEIRA FIGUEIREDO P, DE OLIVEIRA DB, FIGUEIREDO LB, COSTA GB, ALVES PA, GUEDES MIMC, DE SOUZA TRINDADE G (2019). Molecular detection and phylogeny of bovine viral diarrhoea virus 1 among cattle herds from Northeast, Southeast, and Midwest regions, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, **50**: 571–577.
- DECARO N, MARI V, PINTO P, LUCENTE MS, SCIARRETTA R, CIRONE F (2012) Hobi-like pestivirus: both biotypes isolated from a diseased animal. *J Gen Virol*, **93**: 1976–1983.

- DECARO N, LUCENTE MS, LANAVE G, GARGANO P, LAROCCA V, LOSURDO M, CIAMBRONE L, MARINO PA, PARISI A, CASALINUOVO F, BUONAVOGLIA C, ELIA G (2017). Evidence for Circulation of Bovine Viral Diarrhoea Virus Type 2c in Ruminants in Southern Italy. *Transbound Emerg Dis.*, **64**:1935-1944.
- DENG Y, SUN CQ, CAO SJ, LIN T, YUAN SS, ZHANG HB VE ARK., (2012). High prevalence of bovine viral diarrhoea virus 1 in Chinese swine herds. *Vet Microbiol*, **159**: 490–493.
- DEREGT D, TESSARO SV, BAXI MK, BEREZOWSKI J, ELLIS JA, WU JT, GILBERT SA (2005). Isolation of bovine viral diarrhoea viruses from bison. *Vet. Rec.*, **157**: 448–450.
- DIAS RK, CARGNELUTTI JF, WEBER MN, CANAL CW, BAUERMANN FV, RIDPATH JF, WEIBLEN R, FLORESEF (2017). Antigenic diversity of Brazilian isolates of HoBi-like pestiviruses. *Vet Microbiol*, **203**: 221–228.
- DONIS RO CORAPI W DUBOVI EJ (1987) Differences in virus-induced polypeptides in cells infected by cytopathic and noncytopathic biotypes of bovine virus diarrhoea-mucosal disease virus. *Virology*, **158**: 168–73.
- DREW TW, YAPP F, PATON DJ (1999). The detection of bovine viral diarrhoea virus in bulk milk samples by use of a singletube RT-PCR. *Vet. Microbiol.*, **64**: 145–154.
- DUBOIS E, RUSSO P, PRIGENT M, THIERYR (2008). Genetic characterization of ovine pestiviruses isolated in France between 1985 and 2006. *Vet Microbiol*, **130**: 69–79.
- DUBOVI EJ (2013). Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhoea virus. *Biologicals*, **41**: 8–13.
- EDMONDSON MA, GIVENS MD, WALZ PH, GARD JA, STRINGFELLOW DA, CARSON RL (2007). Comparison of tests for detection of bovine viral diarrhoea virus in diagnostic samples. *Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, **19**: 376–381.
- EIRAS M, VIÑA M, FERNANDEZ D, MARTÍNEZ S, DIEGUEZ F (2017). Border disease-like clinical signs in sheep caused by a BVDV-2 type d. *Veterinary Record Case Reports*. 5.
- FIRTH C, BHAT M, FIRTH MA, WILLIAMS SH, FRYE MJ, SIMMONDS P, CONTE JM, NG J, GARCIA J, BHUVA NP, LEE B, CHE X, QUAN PL, LIPKIN WI (2014). Detection of zoonotic pathogens and characterization of novel viruses carried by commensal *Rattus norvegicus* in New York City. *mBio*, **14**: 5
- FIRQUET S, BEAUJARD S, LOBERT PE, SANE F, CALOONE D, IZARD D, HOBER D (2015). Survival of enveloped and non-enveloped viruses on inanimate surfaces. *Microbes Environ*, **30**: 140–144.
- FLORES EF, RIDPATH JF, WEIBLEN R, VOGEL FS, GIL LH (2002). Phylogenetic analysis of Brazilian bovine viral diarrhoea virus type 2 (BVDV-2) isolates: evidence for a subgenotype within BVDV-2. *Virus Res.*, **87**: 51-60.
- FLORES, E., CARGNELUTTI, J., MONTEIRO, F., BAUERMANN, F., RIDPATH, J., & WEIBLEN, R. (2018). A genetic profile of bovine pestiviruses circulating in Brazil (1998–2018). *Animal Health Research Reviews*, **19**: 134-141.
- FREY HR., VE LIESS B (1971). Multiplication kinetics and usefulness of a highly cytopathogenic VD-MD virus strain in diagnostic studies using the microtiter method. *Journal of veterinary medicine*. **18**: 61–71.
- FRITZEMEIER, J. (1996). Früh- und Spätausbruch experimentell induzierter Mucosal Disease: Charakterisierung der beteiligten BVD-Viren. Hannover, Tierärztl. Hochschule, Inaugural-Dissertation.
- FULTON RW RIDPATH JF CONFER AW SALIKI JT BURGE LJ PAYTON ME (2003). Bovine viral diarrhoea virus antigenic diversity: impact on disease and vaccination programmes. *Biologicals*, **31**: 89–95.
- FULTON RW, RIDPATH JF, ORE S, CONFER AW, SALIKI, JT, BURGE LJ, PAYTON ME (2005). Bovine viral diarrhoea virus BVDV subgenotypes in diagnostic laboratory accessions, distribution of BVDV1a, 1b, and 2a subgenotypes. *Vet. Microbiol.*, **111**: 35–40.
- GETHMANN J, HOMEIER T, HOLSTEG M, SCHIRRMIEIER H, SABERATH M, HOFFMANN B, BEER M, CONRATHS FJ (2015). BVD-2 outbreak leads to high losses in cattle farms in Western Germany. *Heliyon.*, **21**: 1

- GIAMMARIOLI M, RIDPATH JF, ROSSI E, BAZZUCCHI M, CASCIARI C, DE MIA GM, (2015). Genetic detection and characterization of emerging HoBi-like viruses in archival foetal bovine serum batches. *Biologicals*, **43**: 220–224.
- GIAMMARIOLI M, LA ROCCA SA, STEINBACH F, CASCIARI C, DE MIA GM (2011). Genetic and antigenic typing of border disease virus (BDV) isolates from Italy reveals the existence of a novel BDV group. *Vet Microbiol*, **147**: 231–236.
- GIANGASPERO M, HARASAWA R, WEBER L, BELLOLO A (2008). Genoepidemiological evaluation of bovine viral diarrhoea virus 2 species based on secondary structures in the 5' untranslated region. *J Vet Med Sci*, **70**: 571–80.
- GIANGASPERO M, ZHANG SQ, APICELLA C (2019). Heterogeneity of Pestivirus Species in Asia. *Advances in Microbiology*, **09**: 266–342.
- GILLESPIE JH, BAKER JA, MCENTEE K (1960). A cytopathogenic strain of virus diarrhoea virus. *Cornell Vet.*, **50**: 73–79.
- GILLESPIE JH, MADIN SH, DARBY NB (1962). Cellular resistance in tissue culture, induced by noncytopathogenic strains, to a cytopathogenic strain of virus diarrhoea virus of cattle. *Exp. Biol. Med.*, **110**: 248–250.
- GOGA I, BERXHOLI K, HULAJ B, SYLEJMANI D, YAKOBSON B, STRAM Y (2014). Genotyping and phylogenetic analysis of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates in Kosovo. *Veterinaria italiana*, **50**: 69–72.
- GONG X, CAO X, ZHENG F, CHEN Q, ZHOU J, YIN H VE ARK., (2013) Identification and characterization of a novel subgenotype of bovine viral diarrhoea virus isolated from dairy cattle in Northwestern China. *Virus Genes*, **46**: 375–376.
- GÖKTUNA PT VE YEŞİLBAĞ K (2017). Evaluation of diagnostic methods for the detection of pestiviruses in clinical samples. *Turkish Journal Of Veterinary & Animal Sciences*, **41**: 175–179.
- GRAHAM DA, CALVERT V, GERMAN A, MC CULLOUGH SJ (2001). Pestiviral infections in sheep and pigs in Northern Ireland. *Vet Rec*, **148**: 69–72.
- GRASSMANN CW, YU H, ISKEN O, BEHRENS SE (2005). Hepatitis C virus and the related bovine viral diarrhoea virus considerably differ in the functional organization of the 5' non-translated region: implications for the viral life cycle. *Virology*, **333**: 349–366
- GREISER-WILKE I, GRUMMER B, MOENNIG V (2003). Bovine viral diarrhoea eradication and control programmes in Europe. *Biologicals*, **31**: 113–118.
- GREISER-WILKE I, HAAS L, DITTMAR K, LIESS B, MOENNIG V (1993). RNA insertions and gene duplications in the nonstructural protein p125 region of pestivirus strains and isolates in vitro and in vivo. *Virology*, **193**: 977–980.
- GRUMMER B, GROTHA S, GREISER-WILKE I (2004). Bovine viral diarrhoea virus is internalized by clathrin-dependent receptor-mediated endocytosis. *J Veterinary Med*, **51**: 427–432
- GUELBENZU-GONZALO M.P, COOPER L, BROWN C, LEINSTER S, O'NEILL R, DOYLE L, GRAHAM DA (2016). Genetic diversity of ruminant Pestivirus strains collected in Northern Ireland between 1999 and 2011 and the role of live ruminant imports. *Ir. Vet. J.*, **69**: 7.
- HAIDER N, RAHMAN MS, KHAN SU, MIKOLON A, GURLEY ES, OSMANI MG, SHANTA IS, PAUL SK, MACFARLANE-BERRY L, ISLAM A, DESMOND J, EPSTEIN JH, DASZAK P, AZIM T, LUBY SP, ZEIDNER N, RAHMAN MZ (2014). Identification and epidemiology of a rare HoBi-like pestivirus strain in Bangladesh. *Transboundary and Emerging Diseases*, **61**: 193–198.
- HAN YJ, CHAE JB, CHAE JS, YU DH, PARK J, PARK BK, KIM HC, YOO JG, CHOI KS (2016). Identification of bovine viral diarrhoea virus infection in Saanen goats in the Republic of Korea. *Trop. Anim. Health Prod.*, **48**: 1079–1082.
- HARTLEY WJ ve KATER JC (1962). Observations on diseases of the central nervous system of sheep in New Zealand. *New Zealand Veterinary Journal*, **10**: 128–142.

- HEWICKER-TRAUTWEIN, M., & TRAUTWEIN, G. (1994a). Porencephaly, hydranencephaly and leukoencephalopathy in ovine fetuses following transplacental infection with bovine virus diarrhoea virus: distribution of viral antigen and characterization of cellular response. *Acta neuropathologica*, **87**: 385-397.
- HEWICKER-TRAUTWEIN M, LIESS B, FREY HR, TRAUTWEIN G (1994b). Virological and pathological findings in sheep fetuses following experimental infection of pregnant ewes with cytopathogenic-bovine-virus diarrhoea virus. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, **41**: 264-276.
- HOFFMANN B, DEPNER K, SCHIRRMIEIER H, BEER M (2006). A universal heterologous internal control system for duplex real-time RT-PCR assays used in a detection system for pestiviruses. *J Virol Methods*, **136**: 200–209.
- HORZINEK M, MAESS J, LAUFS R (1971). Studies on the substructure of togaviruses. *Arch Gesamte Virusforsch*, **33**: 306–318.
- HUGHES, LE, KERSHAW GF, SHAW IG (1959). " B" or Border disease: an undescribed disease of sheep. *Veterinary Record*, **71**: 313-317.
- HULST MM VE MOORMANN RJ (1997). Inhibition Of Pestivirus Infection In Cell Culture By Envelope Proteins E(Rns) And E2 Of Classical Swine Fever Virus: E(Rns) And E2 Interact With Different Receptors. *The Journal of general virology*, **78**: 2779–2787.
- HULST MM ve MOORMANN RJ (2001). E^{rns} protein of pestiviruses. *Methods Enzymol*, **342**: 431–440.
- INTERNATIONAL COMMITTEE OF VIRUS TAXONOMY (ICTV) (2017) 9th Report (2011, updated in 2017). Family: Flaviviridae.
- IQBAL M, FLICK-SMITH H, MCCAULEY JW (2000). Interactions of bovine viral diarrhoea virus glycoprotein Erns with cell surface glycosaminoglycans. *J. Gen. Virol.*, **81**: 451–459.
- JACKOVA A, NOVACKOVA M, PELLETIER C, AUDEVAL C, GUENEAU E, HAFFAR A, PETIT E, REHBY L, VILCEK S (2008). The extended genetic diversity of BVDV-1: typing of BVDV isolates from France. *Veterinary research communications*, **32**: 7–11.
- JO, WK, VAN ELK C, VAN DE BILDT M, VAN RUN P, PETRY M, JESSE ST, JUNG K, LUDLOW M, KUIKEN T, OSTERHAUS A (2019). An evolutionary divergent pestivirus lacking the N^{pro} gene systemically infects a whale species. *Emerging microbes & infections*, **8**: 1383–1392.
- JONES LR, ZANDOMENI R, WEBER EL (2001). Genetic typing of bovine viral diarrhea virus isolates from Argentina, *Veterinary Microbiology*, **81**: 367-375.
- JULIA S, CRAIG MI, JIMENEZ LS, PINTO GB, WEBER EL (2009). First report of BVDV circulation in sheep in Argentina. *Preventive Veterinary Medicine*, **90**: 274-277,
- KABONGO, N, BAULE, C, VAN VUUREN, M (2003). Molecular analysis of bovine viral diarrhoea virus isolates from South Africa. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, **704**: 273–279.
- KAISER V, NEBEL L, SCHÜPBACH-REGULA G, ZANONI RG, SCHWEIZER M (2017). Influence of border disease virus (BDV) on serological surveillance within the bovine virus diarrhoea (BVD) eradication program in Switzerland. *BMC veterinary research*, **13**: 21.
- KIM SG, ANDERSON RR, YU JZ, ZYLICH NC, KINDE H, CARMAN S, BEDENICE D, DUBOVI EJ (2009). Genotyping and phylogenetic analysis of bovine viral diarrhoea virus isolates from BVDV infected alpacas in North America. *Vet. Microbiol.* **136**: 209–216
- KIRKLAND PD, MACINTOSH SG, MOYLE A (1994). The outcome of widespread use of semen from a bull persistently infected with pestivirus. *Vet Rec*, **135**: 527–529.
- KIRKLAND PD, MACINTOSH SG, MOYLE A (2006). Ruminant pestivirus infections. *Australia and New Zealand Standard Diagnostic Procedures*, 1-30.

- KNIAZEFF AJ, HUCK ZA, JARRETT WFH, PRITCHARD WR, RAMSEY FK, SCHIPPER IA, STROBER M, LIESS B (1961). Antigenic relationship of some bovine viral diarrhea mucosal disease viruses from the United States, Great Britain and West Germany. *Vet Rec*, **73**: 768-769.
- KRAMETTER-FROETSCHER R, KOHLER H, BENETKA V, MOESTL K, GOLJA F, VILCEK S, BAUMGARTNER W (2007). Influence of communal alpine pasturing on the spread of pestiviruses among sheep and goats in Austria: First identification of border disease virus in Austria. *Zoonoses Public. Health*, **54**: 209–213.
- KRAMETTER-FROETSCHER R, BENETKA V, RASSER K, TOCKNER F, MOESSLACHER K, GEORG K, MOESTL, K, BAUMGARTNER W (2009). BVDV control program in Austria - Is a monitoring of the BDV status in sheep in Austria necessary?. *Veterinari Medicina* **11**: 517-524
- KRAMETTER-FROETSCHER R, DUENSER M, PREYLER B, THEINER A, BENETKA V, MOESTL K (2010). Baumgartner W Pestivirus infection in sheep and goats in West Austria. *Vet J*, **186**: 342–346.
- KUTA A, POLAK MP, LARSKA M, ZMUDZINSKI JF (2013). Predominance of bovine viral diarrhea virus 1b and 1d subtypes during eight years of survey in Poland. *Veterinary microbiology*, **166**: 639–644.
- KÜMMERER BM, MEYERS G (2000). Correlation between point mutations in NS2 and the viability and cytopathogenicity of bovine viral diarrhea virus strain Oregon analyzed with an infectious cDNA clone. *J Virol* **74**: 390–400.
- KÜMMERER BM, TAUTZ N, BECHER P, THIEL HJ, MEYERS G (2000). The genetic basis for cytopathogenicity of pestiviruses. *Veterinary Microbiology*, **77**: 117-128.
- LANYON SR, HILL FI, REICHEL MP, BROWNLIE J (2014). Bovine viral diarrhoea: pathogenesis and diagnosis. *Vet J*, **199**: 201-9.
- LECOT S, BELOUZARD S, DUBUISSON J, ROUILLE Y, (2005). Bovine viral diarrhea virus entry is dependent on clathrin-mediated endocytosis. *J Virol*, **79**: 10826-10829.
- LEE KM ve GILLESPIE JH (1957). Propagation of virus diarrhea virus of cattle in tissue culture. *Am J Vet Res*, **18**: 952–953.
- LESKOVA V, JACKOVA A, VLÁŠÁKOVÁ M, VILCEK S (2013). Genetic characterization of a border disease virus isolate originating from Slovakia. *Acta Virol*, **57**: 17–25.
- LIANG D, SAINZ IF, ANSARI IH, GILL LH, VASSILEV V, DONIS RO (2003). The envelope glycoprotein E2 is a determinant of cell culture tropism in ruminant pestiviruses. *J Gen Virol*, **84**: 1269–1274.
- LINDENBACH BD, MURRAY CL, THIEL HJ, RICE CM (2013). Flaviviridae. Ed.: Knipe DM, Howley PM, *Fields virology*. 712–746.
- LIU L, XIA H, BELAK S, BAULE C (2008). A TaqMan real-time RT-PCR assay for selective detection of atypical bovine pestiviruses in clinical samples and biological products. *J Virol Methods*, **154**: 82–85.
- LIU YH, HE B, LI KR, LI F, ZHANG LY, LI XQ, ZHAO L (2019). First report of border disease virus in *Melophagus ovinus* (sheep ked) collected in Xinjiang China. *Plos One*, **14**: e0221435.
- LUZZAGO C, EBRANATI E, CABEZON O, FERNÁNDEZ-SIRERA L, LAVÍN S, ROSELL R, VEO C, ROSSI L, CAVALLERO S, LANFRANCHI P (2016). Spatial and temporal phylogeny of border disease virus in Pyrenean chamois (*Rupicapra pyrenaica*). *PLoS ONE*, **11**: 168-232
- LUZZAGO C, LAUZI S, EBRANATI E, GIAMMARIOLI M, MORENO A, CANNELLA V, MASOERO L, CANELLI E, GUERCIO A, CARUSO C, CICCOCCHI M, DE MIA GM, ACUTIS PL, ZEHENDER G, PELETTI S (2014). Extended genetic diversity of bovine viral diarrhea virus and frequency of genotypes and subtypes in cattle in Italy between 1995 and 2013. *BioMed research international*, **2014**: 147145.
- MAHONY TJ, MCCARTHY FM, GRAVEL JL, CORNEY B, YOUNG PL, VILCEK S (2005). Genetic analysis of bovine viral diarrhoea viruses from Australia. *Vet. Microbiol.*, **106**: 1–6
- MARTIN C, DUQUESNE V, ADAM G, BELLEAU E, GAUTHIER D, CHAMPION JL, SAEGERMAN C, THIERY R, DUBOIS E (2015). Pestiviruses infections at the wild and domestic ruminants interface in the French Southern Alps. *Vet. Microbiol.*, **175**: 341–348.

- MATHAPATI BS, MISHRA N, RAJUKUMAR K, NEMA RK, BEHERA SP, DUBEY SC (2010). Entry of bovine viral diarrhoea virus into ovine cells occurs through clathrin-dependent endocytosis and low pH-dependent fusion. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, **46**: 403–407.
- MAURER K, KREY T, MOENNIG V, THIEL HJ, RUMENAPF T (2004). CD46 is a cellular receptor for bovine viral diarrhoea virus. *J Virol*, **78**: 1792–1799.
- MAYA L, PUENTES R, REOLON E, ACUÑA P, RIET F, RIVERO R, CRISTINA J, COLINA R (2016). Molecular diversity of bovine viral diarrhoea virus in Uruguay. *Arch. Virol.*, **1613**: 529–535.
- MCCLURKIN AW, LITTLEDIKE ET, CUTLIP RC, FRANK GH, CORIA MF, BOLIN SR (1984). Production of cattle immunotolerant to bovine viral diarrhoea virus. *Can J Comp Med*, **48**: 156–161.
- MCCLURKIN AW, BOLIN SR, CORIA MF (1985). Isolation of cytopathic and noncytopathic bovine viral diarrhoea virus from the spleen of cattle acutely and chronically affected with bovine viral diarrhoea. *J Am Vet Med Assoc*, **186**: 568–569.
- MENDEZ E, RUGGLI N, COLLETT MS, RICE CM (1998). Infectious bovine viral diarrhoea virus (strain NADL) RNA from stable cDNA clones: a cellular insert determines NS3 production and viral cytopathogenicity. *J Virol*, **72**: 4737–4745.
- MEYERS G, STOLL D, GUNN M (1998). Insertion of a sequence encoding light chain 3 of microtubule-associated proteins 1A and 1B in a pestivirus genome: connection with virus cytopathogenicity and induction of lethal disease in cattle. *J Virol*, **72**: 4139–4148.
- MEYERS G THIEL HJ (1996). Molecular characterization of pestiviruses. *Adv Virus Res*, **47**: 53–118.
- MEYERS, G, TAUTZ N, BECHER P, THIEL HJ, KÜMMERER B (199A). Recovery of cytopathogenic and noncytopathogenic bovine viral diarrhoea viruses from cDNA constructs. *J Virol*, **70**: 8606-8613.
- MEYERS G, TAUTZ N, DUBOVI EJ, THIEL HJ (1991). Viral cytopathogenicity correlated with integration of ubiquitin-coding sequences. *Virology*, **180**: 602–616.
- MEYERS G, EGE A, FETZER C, VON FREYBURG M, ELBERS K, CARR V, PRENTICE H, CHARLESTON B, SCHURMANN EM (2007). Bovine viral diarrhoea virus: prevention of persistent foetal infection by a combination of two mutations affecting the E^{ms} RNase and the N^{pro} protease. *J Virol*, **81**: 3327–3338.
- MEYLING A ve JENSEN AM (1988). Transmission of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) by artificial insemination (AI) with semen from a persistently-infected bull. *Vet Microbiol*, **17**: 97 105.
- MINAMI, F, M. NAGAI, M. ITO, T. MATSUDA, H. TAKAI, Y. JINKAWA, T. SHIMANO, M. HAYASHI, Y. SEKI, Y. SAKODA, K. SUGIURA, ve H. AKASHI (2011). Reactivity and prevalence of neutralizing antibodies against Japanese strains of bovine viral diarrhoea virus subgenotypes. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, **34**: 35–39.
- MINGALA CN, KONNAI S, TAJIMA M, ONUMA M, OHASHI K (2009). Classification of new BVDV isolates from Philippine water buffalo using the viral E2 region. *J Basic Microbiol.*, **49**: 495-500.
- MISHRA N, DUBEY R, RAJUKUMAR K, TOSH C, TIWARI A, PITALE SS, PRADHAN HK (2007A). Genetic and antigenic characterization of bovine viral diarrhoea virus type 2 isolated from Indian goats (*Capra hircus*). *Vet Microbiol*, **124**: 340–347.
- MISHRA N, DUBEY R, GALAV V, TOSH C, RAJUKUMAR K, PITALE SS, PRADHAN HK, (2007B). Identification of bovine viral diarrhoea virus 1 in Indian buffaloes and their genetic relationship with cattle strains in 5' UTR. *Curr Sci*, **93**: 97–100.
- MISHRA N, PATTNAIK B, VILCEK S, PATIL SS, JAIN P, SWAMY N, BHATIA S, PRADHAN HK (2004). Genetic typing of bovine viral diarrhoea virus isolates from India. *Vet Microbiol*, **104**: 207–212.
- MISHRA N, PITALE SS, RAJUKUMAR K, PRAKASH A, BEHERA SP, NEMA RK, DUBEY SC (2012). Genetic variety of bovine viral diarrhoea virus 1 strains isolated from sheep and goats in India. *Acta Virol*, **56**: 209–215.

- MISHRA N, RAJUKUMAR K, VILCEK S, TIWARI A, SATAV JS, DUBEY SC (2008). Molecular characterization of bovine viral diarrhoea virus type 2 isolate originating from a native Indian sheep (*Ovis aries*). *Vet Microbiol*, **130**: 88–98.
- MISHRA N, RAJUKUMAR K, KALAIYARASU S, DUBEY SC (2011). Pestivirus infection an emerging threat to ruminants in India: a review Indian. *J Anim Sci*, **81**: 545–551.
- MISHRA N, RAJUKUMAR K, PATERIYA A, KUMAR M, DUBEY P, BEHERA SP, VERMA A, BHARDWAJ P, KULKARNI DD, VIJAYKRISHNA D, REDDY ND (2014). Identification and molecular characterization of novel and divergent HoBi-like pestiviruses from naturally infected cattle in India. *Vet Microbiol*, **174**: 239–246.
- MOENNIG V ve BECHER P (2018). Control of bovine viral diarrhoea. *Pathogens*, **7**: 29.
- NAGAI M, HAYASHI M, SUGITA S, SAKODA Y, MORI M, MURAKAMI T, OZAWA T, YAMADA N, AKASHI H (2004). Phylogenetic analysis of bovine viral diarrhoea viruses using five different genetic regions. *Virus Res*, **99**: 103–113.
- NAGY A, FAHNØE U, RASMUSSEN TB, UTTENTHAL A (2014). Studies on genetic diversity of bovine viral diarrhoea viruses in Danish cattle herds. *Virus genes*, **48**: 376–380.
- NEILL JD, WORKMAN AM, HESSE R, BAI J, PORTER EP, MEADORS B, ANDERSON J, BAYLES DO, FALKENBERG SM (2019). Identification of BVDV2b and 2c subgenotypes in the United States: genetic and antigenic characterization. *Virology*, **528**: 19–29.
- NISKANEN R, LINDBERG A (2003). Transmission of bovine viral diarrhoea virus by unhygienic vaccination procedures ambient air and from contaminated pens. *Vet J*, **165**: 125–130.
- O'BRIEN E, GARVEY M, WALSH C, ARKINS S, CULLINANE A (2017). Genetic typing of bovine viral diarrhoea virus in cattle on Irish farms. *Research in veterinary science*, **111**: 14–20.
- OCHIRKHUU N, KONNAI S, ODBILEG R, ODZAYA B, GANSUKH S, MURATA S, OHASHI K (2016). Molecular detection and characterization of bovine viral diarrhoea virus in Mongolian cattle and yaks. *Arch. Virol.*, **161**: 2279–2283.
- OEM JK, HYUN BH, CHA SH, LEE KK, KIM SH, KIM HR, PARK CK, JOO YS (2009). Phylogenetic analysis and characterization of Korean bovine viral diarrhoea viruses. *Vet. Microbiol.*, **139**: 356–360.
- OIE (2017). Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. *Bovine viral diarrhoea OIE Paris* **247**: 1–22.
- OLAFSON P, MCCALLUM AD, FOX FH (1946). An apparently new transmissible disease of cattle. *Cornell Vet*, **36**: 205–213.
- OĞUZÖĞLU TC (2008). Sınır Hastalığı (Border Disease). *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, **55**: 69-74
- OĞUZÖĞLU TC (2012). A Review of Border Disease Virus Infection in Ruminants: Molecular Characterization Pathogenesis Diagnosis and Control. *Anim Health Prod Hyg*, **1**: 1–9.
- OĞUZÖĞLU TÇ, KOÇ BT, COŞKUN N, DOĞAN F, DURAN-YELKEN S (2019). Endless variety for bovine virus diarrhoea viruses: new members of a novel subgroup into *Pestivirus A* from Turkey. *Trop Anim Health Prod.*, **5**: 1083-1087.
- OĞUZÖĞLU TC, TAN MT, TOPLU N, DEMİR AB, BİLGE-DAGALP S, KARAOĞLU T, ÖZKUL A, ALKAN F, HAAS L, GREISER-WILKE I (2009). Border disease virus (BDV) infections of small ruminants in Turkey: A new BDV subgroup. *Vet Microbiol*, **135**: 374–379.
- OĞUZÖĞLU TC, MUZ D, YILMAZ, V, ALKAN F, AKÇA Y, BURGU G. (2010): Molecular characterization of Bovine virus diarrhoea viruses species 2 (BVDV-2) from cattle in Turkey. *Trop Anim Health Prod*, **42**: 1175–1180.
- OĞUZÖĞLU TC, MUZ D, YILMAZ V, TIMURKAN MÖ, ALKAN F, AKÇA Y, BURGU I (2011). Molecular characteristics of bovine virus diarrhoea virus 1 isolates from Turkey: approaches for an eradication programme. *Transboundary and Emerging Diseases*, **59**: 303-310.

- OĞUZOĞLU TC, MUZ D, TIMURKAN MÖ, KOÇ BT, ÖZŞAHİN E, BURGU I, AKÇA Y, DEMİRBAĞ Z (2017). Expression and production of recombinant proteins from immunodominant E gene regions of bovine viral diarrhoea virus 1 (BVDV-1) Turkish field strains for prophylactic purpose. *Revue Méd. Vét.*, 168, 7-9: 183-191.
- PALFI V, HOUE H, PHILIPSEN J (1993). Studies on the decline of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) maternal antibodies and detectability of BVDV in persistently infected calves. *Acta veterinaria Scandinavica*, **34**: 105–107.
- PARTIDA EL, FERNÁNDEZ M, GUTIERREZ J, ESNAL A, BENAVIDES J, PEREZ V, DE LA TORRE A, ÁLVAREZ M, ESPERON F (2017). Detection of Bovine Viral Diarrhoea Virus 2 as the Cause of Abortion Outbreaks on Commercial Sheep Flocks. *Transbound Emerg. Dis.*, **64**: 19-26.
- PATON DJ, CHRISTIANSEN K, ALENIUS S (1998). Prevalence of antibodies to bovine virus diarrhoea virus and other viruses in bulk tank milk in England and Wales. *Vet Rec*, **142**: 385–391.
- PATON DJ, SANDS JJ, LOWINGS JP, SMITH JE, IBATA G, EDWARDS S (1995). A proposed division of the pestivirus genus using monoclonal antibodies supported by cross-neutralization assays and genetic sequencing. *Vet Res*, **26**: 92–109.
- PECORA A, MALACARI DA, RIDPATH JF, PEREZ AGUIRREBURUALDE, M.S, COMBESSIES, G, ODEON, A.C, ROMERA, S.A, GOLEMBA, M.D, WIGDOROVITZ, A (2014). First finding of genetic and antigenic diversity in 1b-BVDV isolates from Argentina. *Res. Vet. Sci.*, **961**: 204–212.
- PEDDIREDDI L, FOSTER KA, POULSEN EG, AN B, HOANG QH, O'CONNELL C, ANDERSON JW, THOMSON DU, HANZLICEK GA, BAI J, HESSE RA, OBERST RD, ANDERSON GA, LEYVA-BACA I (2018). Molecular detection and characterization of transient bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections in cattle commingled with ten BVDV persistently infected cattle. *J Vet Diagn Invest.*, **30**: 413-422.
- PELETTO S, CARUSO C, CERUTTI F, MODESTO P, ZOPPI S, DONDO A, ACUTIS PL, MASOERO LA (2016). New genotype of border disease virus with implications for molecular diagnostics. *Arch Virol*, **161**: 471–477
- PESTOVA TV, DE BREYNE S, PISAREV AV, ABAEVA IS, HELLEN CU (2008). eIF2-dependent and eIF2 independent modes of initiation on the CSFV IRES: a common role of domain II. *Embo J*, **27**: 1060–1072.
- PRITCHARD WR (1963). The Bovine Viral Diarrhoea-Mucosal Disease Complex. *Adv Vet Sci.*, **8**: 1-47
- PIZARRO-LUCERO J, CELEDON MO, AGUILERA M, DE CALISTO A (2006). Molecular characterization of pestiviruses isolated from bovines in Chile. *Vet Microbiol*, **115**: 208–217.
- POCOCK D.H, HOWARD C.J, CLARKE M.C, BROWNLIE J (1987). Variation in the intracellular polypeptide profiles from different isolates of bovine virus diarrhoea virus. *Arch Virol*, **94**: 43–53.
- POLAK MP, KUTA A, RYBAŁTOWSKI W, ROLA J, LARSKA M, ZMUDZIŃSKI JF (2014). First report of bovine viral diarrhoea virus-2 infection in cattle in Poland. *Veterinary journal (London, England: 1997)*, **202**: 643–645.
- POOLE TL, WANG CY, POPP RA, POTGIETER LND, SIDDIQUI A, COLLETT MS (1995). Pestivirus translation initiation occurs by internal ribosome entry. *Virology*, **206**: 750–754.
- POSTEL A, SCHMEISER S, OĞUZOĞLU TC, INDENBIRKEN D, ALAWI M, FISCHER N, GRUNDHOFF A, BECHER P (2015). Close Relationship of Ruminant Pestiviruses and Classical Swine Fever. *Virus Emerg Infect Dis*, **21**: 668.
- QU L, MCMULLAN LK, RICE CM (2001). Isolation and characterization of noncytopathic pestivirus mutants reveals a role for nonstructural protein NS4B in viral cytopathogenicity. *J Virol.*, **75**: 10651-10662.
- RAMSEY FK ve CHIVERS WH (1953). Mucosal disease of cattle. *North Am Vet*, **34**: 629–633.
- RAWLINGS ND, BARRETT AJ, BATEMAN A (2012). MEROPS: The database of proteolytic enzymes their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res*, **40**: D343–D350.
- RIDPATH JF (2013). Immunology of BVDV vaccines. *Biologicals*, **41**: 14–19.

- RIDPATH J, BOLIN SR, DUBOVI EJ (1994). Segregation of bovine viral diarrhoea virus into genotypes. *Virology*, **205**: 66–74.
- RIDPATH JF, NEILL JD, FREY M, LANDGRAF JG (2000). Phylogenetic antigenic and clinical characterization of type 2 BVDV from North America. *Vet Microbiol*, **77**: 145–155.
- RIDPATH JF, FULTON RW, KIRKLAND PD, NEILL JD (2010). Prevalence and antigenic differences observed between bovine viral diarrhoea virus subgenotypes isolated from cattle in Australia and feedlots in the southwestern United States. *J Vet Diagn Investig*, **22**: 184–191.
- ROBESOVA B, KOVARCIK K, VILCEK S (2009). Genotyping of bovine viral diarrhoea virus isolates from the Czech Republic. *Vet. Med. (Praha)*, **54**: 393–398.
- RODRÍGUEZ-PRIETO V, KUKIELKA D, RIVERA-ARROYO B, MARTÍNEZ-LOPEZ B, DE LAS HERAS A I, SÁNCHEZ-VIZCAÍNO JM, VICENTE J (2016). Evidence of shared bovine viral diarrhoea infections between red deer and extensively raised cattle in south-central Spain. *BMC veterinary research*, **12**: 11.
- RONECKER S, ZIMMER G, HERRLER G, GREISER-WILKE I, GRUMMER B (2008). Formation of bovine viral diarrhoea virus E1-E2 heterodimers is essential for virus entry and depends on charged residues in the transmembrane domains. *J Gen Virol*, **89**: 2114–2121.
- ROSELL R, CABEZON O, PUJOLS J, DOMINGO M, MUNOZ I, NÚÑEZ JI, GANGES L (2014). Identification of a porcine pestivirus as a border disease virus from naturally infected pigs in Spain. *The Veterinary record*, **174**: 18.
- RYU, J. H, SHIN, S. U, CHAE, J. S, & CHOI, K. S. (2020). Molecular Characterization of Bovine Viral Diarrhoea Virus Infection from Boer Goats. *International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*, **18**: 109-113.
- SANDVIK T (2005). Selection and use of laboratory diagnostic assays in BVD control programmes. *Preventive veterinary medicine*, **72**: 3–219.
- SARIKAYA B, AZKUR AK, GAZYAGCI S, ASLAN ME (2012). Genetic Variability of Bovine Viral Diarrhoea Virus in the 5'UTR in the Central Anatolia of Turkey. *Acta Scientiae Veterinariae*, **40**: 1013.
- SCHMEISER S, MAST J, THIEL HJ, KONIG M (2014). Morphogenesis of pestiviruses: new insights from ultrastructural studies of strain Giraffe-1. *J Virol*, **88**: 2717–2724.
- SCHOEPF K, REVILLA-FERNÁNDEZ S, STEINRIGL A, FUCHS R, SAILER A, WEIKEL J, SCHMOLL F (2016). Retrospective epidemiological evaluation of molecular and animal husbandry data within the bovine viral diarrhoea virus (BVDV) control programme in Western Austria during 2009–2014. *Berl Münch Tierärztl Wschr*, **129**: 196–201.
- SHI H, LENG C, XU Q, SHI H, SUN S, KAN Y, YAO L (2018). Characterization of a Pestivirus H isolate originating from goats. *Virus genes*, **54**: 603–607.
- SHI H, LI H, ZHANG Y, YANG L, HU Y, WANG Z, DUAN L, LENG C, YAN B, YAO L (2020). Genetic Diversity of Bovine Pestiviruses Detected in Backyard Cattle Farms Between 2014 and 2019 in Henan Province, China *Frontiers in Veterinary Science*, **7**: 197.
- SILVEIRA S, WEBER MN, MOSENA AC, DA SILVA MS, STRECK AF, PESCADOR CA, FLORES EF, WEIBLEN R, DRIEMEIER D, RIDPATH JF, CANAL CW (2017). Genetic Diversity of Brazilian Bovine Pestiviruses Detected Between 1995 and 2014. *Transbound Emerg. Dis.*, **64**: 613–623.
- SMITH DB, MEYERS G, BUKH J, GOULD EA, MONATH T, MUERHOFF AS, PLETNEV A, RICO-HESSE R, STAPLETON JT, SIMMONDS P, BECHER P (2017). Proposed revision to the taxonomy of the genus Pestivirus family Flaviviridae. *J Gen Virol*, **98**: 2106–2112.
- SOLTAN MA, WILKES RP, ELSHEERY MN, ELHAIG MM, RILEY MC, KENNEDY MA (2015). Circulation of bovine viral diarrhoea virus-1 BVDV-1 in dairy cattle and buffalo farms in Ismailia Province, Egypt. *J. Infect. Dev. Ctries*, **9**: 1331–1337.
- SOZZI E, LAVAZZA A, GAFFURI A, BENCETTI FC, PROSPERI A, LELLI D, CHIAPPONI C, MORENO A (2019). Isolation and full-length sequence analysis of a Pestivirus from aborted lamb foetuses in Italy. *Viruses*, **11**: 744.

- STAHL K, BENITO A, FELMER R, ZUÑIGA J, REINHARDT G, RIVERA H, BAULE C, MORENO-LOPEZ, J (2009). Genetic diversity of bovine viral diarrhoea virus BVDV from Peru and Chile. *Pesq. Vet. Brasil*, **29**: 41–44.
- STAHL K, KAMPA J, BAULE C, ISAKSSON M, MORENO-LOPEZ J, BELÁK S, ALENIUS S, LINDBERG, A (2005). Molecular epidemiology of bovine viral diarrhoea during the final phase of the Swedish BVD-eradication programme. *Preventive veterinary medicine*, **72**: 103–219.
- STALDER HP, MARTI S, FLÜCKIGER F, RENEVEY N, HOFMANN MA, SCHWEIZER M (2017). Complete genome sequences of three border disease virus strains of the same subgenotype, BD Swiss, isolated from sheep, cattle, and pigs in Switzerland. *Genome Announc.*, **5**: 1238–47.
- STALDER H, SCHWEIZER M, BACHOFEN C (2015). Complete Genome Sequence of a Bovine Viral Diarrhea Virus Subgenotype 1e Strain Isolated in Switzerland. *Genome announcements*, **3**: e00636-15.
- STALDER H, HUG C, ZANONI R, VOGT HR, PETERHANS E, SCHWEIZER M, BACHOFEN C (2016). A nationwide database linking information on the hosts with sequence data of their virus strains: A useful tool for the eradication of bovine viral diarrhea (BVD) in Switzerland. *Virus research*, **218**: 49–56.
- STARK R, MEYERS G, RUMENAPF T, THIEL HJ (1993). Processing of pestivirus polyprotein: cleavage site between autoprotease and nucleocapsid protein of classical swine fever virus. *Virology*, **67**: 7088–7095.
- STOKSTAD M, NISKANEN R, LINDBERG A, THOREN P, BELAK S, ALENIUS S, LOKEN T (2003). Experimental infection of cows with bovine viral diarrhoea virus in early pregnancy – findings in serum and foetal fluids. *J. Vet. Med.*, **50**: 424–429.
- SUDA Y, MURAKAMI S, HORIMOTO T (2019). Bovine viral diarrhea virus non-structural protein NS4B induces autophagosomes in bovine kidney cells. *Arch Virol.*, **164**: 255-260.
- ŞEVİK M (2021). Genomic characterization of pestiviruses isolated from bovine, ovine and caprine foetuses in Turkey: A potentially new genotype of *Pestivirus 1* species. *Transboundary and Emerging Diseases*, **68**: 417-426
- TAJIMA M, DUBOVI EJ (2005). Genetic and clinical analyses of bovine viral diarrhea virus isolates from dairy operations in the United States of America. *J. Vet. Diagn. Investig.*, **17**: 10–15.
- TAJIMA M (2004). Bovine viral diarrhea virus 1 is classified into different subgenotypes depending on the analyzed region within the viral genome. *Vet. Microbiol.*, **99**: 131–138.
- TAMURA K, STECHER G, PETERSON D, FILIPSKI A, KUMAR S (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol.*, **30**: 2725-2729.
- TAUTZ N, MEYERS G, THIEL HJ (1993). Processing of poly-ubiquitin in the polyprotein of an RNA virus. *Virology*, **197**: 74–85.
- TAUTZ N, MEYERS G, STARK R, DUBOVI EJ, THIEL HJ (1996). Cytopathogenicity of a pestivirus correlated with a 27 nucleotide insertion, *J Virol*, **70**: 7851–7858.
- TAUTZ N, HARADA T, KAISER A, RINCK G, BEHRENS SE, THIEL HJ (1999) Establishment and characterization of cytopathogenic and noncytopathogenic pestivirus replicons. *J Virol*, **73**: 9422–9432
- TAUTZ N, Tews BA, MEYERS G (2015) The Molecular Biology of Pestiviruses. *Advances in Virus Research*, **93**: 47-160.
- THABTI F, LETELLIER C, HAMMAMI S, PEPIN M, RIBIERE M, MESPLEDE A, KERKHOF S, RUSSO P (2005). Detection of a novel border disease virus subgroup in Tunisian sheep. *Arch Virol*, **150**: 215–229.
- THIEL HJ, COLLE MS, GOULD EA, HEINZ FX, HOUGHTON M, MEYERS G, PURCELL R.H, RICE CM (2005). Family Flaviviridae. In *Virus Taxonomy Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier Academic Press, **1**: 981–998.
- THOMANN B, TSCHOPP A, MAGOURAS I, MEYLAN M, SCHUPBACH-REGULA G, HASLER B (2017). Economic evaluation of the eradication program for bovine viral diarrhea in the Swiss dairy sector. *Prev. Vet. Med.* **145**: 1–6

- THOMSON RG ve SAVAN M (1963). Studies on Virus Diarrhea and Mucosal Disease of Cattle. *Can J Comp Med Vet Sci.*, **27**: 207-214.
- TIMURKAN MÖ ve AYDIN H (2019). Increased genetic diversity of BVDV strains circulating in Eastern Anatolia, Turkey: first detection of BVDV-3 in Turkey. *Tropical animal health and production*, **51**: 1953-1961.
- TOPLAK I, KUCHAR U, KUSAR D, PAPIC B, KOREN S, TOPLAK N (2016). Complete Genome Sequence of a Bovine Viral Diarrhea Virus Subgenotype 1e Strain, SLO/2407/2006, Isolated in Slovenia. *Genome announcements*, **4**: e01310-16.
- TOPLAK I, SANDVIK T, BARLIC-MAGANJA D, GROM J, PATON DJ (2004). Genetic typing of bovine viral diarrhoea virus: most Slovenian isolates are of genotypes 1d and 1f. *Veterinary microbiology*, **99**: 175-185.
- TOPLU N, OGUZOGLU TC, ALBAYRAK H (2012). Dual infection of fetal and neonatal small ruminants with border disease virus and peste des petits ruminants virus (PPRV): neuronal tropism of PPRV as a novel finding. *Journal of comparative pathology*, **146**: 289-297.
- TUNCER GP ve YEŞİLBAĞ K (2017). Evaluation of diagnostic methods for the detection of pestiviruses in clinical samples. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, **41**: 175-179.
- ULARAMU, H.G, SIBEKO, K.P, BOSMAN, A.B, VENTER, E.H, VAN VUUREN, M (2013). Genetic characterization of bovine viral diarrhoea BVD viruses, confirmation of the presence of BVD genotype 2 in Africa. *Arch. Virol.*, **158**: 155-163.
- UNDERDAHL NR, GRACE OD, HOERLEIN AB (1957). Cultivation in tissue-culture of cytopathogenic agent from bovine mucosal disease. *Proc Soc Exp Biol Med*, **94**: 795-797.
- UTTENTHAL A, STADEJEK T, NYLIN B (2005). Genetic diversity of bovine viral diarrhoea viruses (BVDV) in Denmark during a 10-year eradication period. *APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, **113**: 536-541.
- VAN CAMPEN H, FROLICH K (2001). Pestivirus infections In: Williams ES, Barker IK, Infectious diseases of wild mammals. *Iowa State University Press*, **1**: 232-244.
- VEGA S, ROSELL R, ORDEN JA, PEREZ T, MARÍN C, GONZÁLEZ S, MARCO I, CABEZON O, DE LA FUENTE (2015). R Antigenic and molecular characterisation of Border disease virus associated with high mortality in lambs in Spain. *Vet Rec Open*, **2**: e000048.
- VILCEK S, BJORKLUND HV, HORNER GW, MEERS J, BELAK S (1998). Genetic typing of pestiviruses from New Zealand. *N. Z. Vet. J.*, **46**: 35-37.
- VILCEK S, DURKOVIC B, KOLESAROVA M, GREISER-WILKE I, PATON DJ (2004). Genetic diversity of international bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates: identification of a new BVDV-1 genetic group. *Vet Res*, **35**: 609-615.
- VILCEK S, GREISER-WILKE I, DURKOVIC B, OBRITZHAUSER W, DEUTZ A, KÖFER J (2003). Genetic diversity of recent bovine viral diarrhoea viruses from the southeast of Austria (Styria). *Veterinary Microbiology*, **91**: 285-291.
- VILCEK S, GREISER-WILKE I, NETTLETON P, PATON DJ (2000). Cellular insertions in the NS2-3 genome region of cytopathic bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates. *Veterinary Microbiology*, **77**: 129-136.
- VILCEK S, HERRING AJ, HERRING JA, NETTLETON PF, LOWINGS JP, PATON DJ (1994). Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. *Archives of Virology* **136**: 309-323.
- VILCEK S, NETTLETON PF (2006). Pestiviruses in wild animals. *Vet Microbiol*, **116**: 1-12.
- VILCEK S, NETTLETON PF, PATON DJ, BELAK S (1997). Molecular characterization of ovine pestiviruses. *The Journal of general virology*, **78**: 725-735.

- VILCEK S, PATON DJ, DURKOVIC B, STROJNY L, IBATA G, MOUSSA A, LOITSCH A, ROSSMANITH W, VEGA S, SCICLUNA MT, PALFI V (2001). Bovine viral diarrhea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups. *Arch Virol*, **146**: 99–115.
- VILCEK S, RIDPATH JF, VAN CAMPEN H, CAVENDER JL, WARG J (2005). Characterization of a novel pestivirus originating from a pronghorn antelope. *Virus Res*, **108**: 187–193.
- WAKELEY PR, TURNER JL, IBATA G, KING DP, SANDVIK T, HOWARD P, DREW TW (2004). Characterisation of a type 2 bovine viral diarrhoea virus isolated from cattle in the UK. *Veterinary microbiology*, **102**: 19–24.
- WALZ PH, BELL TG, WELLS JL, GROOMS DL, KAISER L, MAES RK, BAKER JC (2001). Relationship between degree of viremia and disease manifestation in calves with experimentally induced bovine viral diarrhea virus infection. *Am J Vet Res*, **62**: 1095–1103.
- WANG Z, NIE Y, WANG P, DING M, DENG H (2004). Characterization of classical swine fever virus entry by using pseudotyped viruses: E1 and E2 are sufficient to mediate viral entry. *Virology*, **330**: 332–341.
- WANG W, SHI X, CHEN C, WU H (2014). Genetic characterization of a noncytopathic bovine viral diarrhea virus 2b isolated from cattle in China. *Virus Genes*, **49**: 339–341.
- WARRILOW D, LOTT WB, GREIVE S, GOWANS EJ, (2000). Properties of the bovine viral diarrhoea virus replicase in extracts of infected MDBK cells. *Arch Virol*, **145**: 2163–2171.
- WEBER MN, SILVEIRA S, MACHADO G, GROFF FH, MOSENA AC, BUDASZEWSKI RF, DUPONT PM, CORBELLINI LG, CANAL CW (2014). High frequency of bovine viral diarrhea virus type 2 in Southern Brazil. *Virus Res.*, **191**: 117–124.
- WEILAND E, STARK R, HAAS B, RUMENAPF T, MEYERS G, THIEL HJ (1990). Pestivirus glycoprotein which induces neutralizing antibodies forms part of a disulfide linked heterodimer. *J Virol*, **64**: 3563–3569.
- WEISKIRCHER E, ALIGO J, NING G (2009). Bovine viral diarrhea virus NS4B protein is an integral membrane protein associated with Golgi markers and rearranged host membranes. *Virol J*, **6**: 185
- WERNIKE K, SCHIRRMIEIER H, STREBELOW HG, BEER M (2017). Eradication of bovine viral diarrhea virus in Germany-Diversity of subtypes and detection of live-vaccine viruses. *Vet Microbiol*, **208**: 25–29.
- WILLOUGHBY K, VALDAZO-GONZALEZ B, MALEY M, GILRAY J, NETTLETON PF, (2006). Development of a real time RT-PCR to detect and type ovine pestiviruses. *J Virol Methods*, **132**: 187–194.
- WOLFMAYER A, WOLF G, BEER M, STRUBE W, HEHNEN HR, SCHMEER N, KAADEN OR (1997). Genomic (5'UTR) and serological differences among German BVDV field isolates. *Archives of Virology*, **142**: 2049–2057
- WORKMAN AM, HARHAY GP, HEATON MP, GROTELUESCHEN DM, SJEKLOCHA D, SMITH TP (2015). Full-length coding sequences for 12 bovine viral diarrhea virus isolates from persistently infected cattle in a feedyard in Kansas. *Genome Announc.*, **3**: 3
- WU Z, LIU B, DU J, ZHANG J, LU L, ZHU G, (2018). Discovery of diverse rodent and bat pestiviruses with distinct genomic and phylogenetic characteristics in several Chinese provinces. *Front Microbiol.*, **9**: 2562.
- XU J, MENDEZ E, CARON PR, LIN C, MURCKO MA, COLLETT MS, RICE CM (1997). Bovine viral diarrhoea virus NS3 serine proteinase: polypeptide cleavage sites cofactor requirements and molecular model of an enzyme essential for pestivirus replication. *Journal of Virology*, **71**: 5312–5322
- XUE F, ZHU YM, LI J, ZHU LC, REN XG, FENG JK, VE ARK, (2010). Genotyping of bovine viral diarrhoea viruses from cattle in China between 2005 and 2008. *Vet Microbiol*, **143**: 379–383.
- YAMAMOTO T, KOZASA T, AOKI H, SEKIGUCHI H, MORINO S, NAKAMURA S (2008). Genomic analyses of bovine viral diarrhoea viruses isolated from cattle imported into Japan between 1991 and 2005. *Veterinary microbiology*, **127**: 386–391.
- YESILBAĞ K, ALPAY G, BECHER P (2017). Variability and global distribution of subgenotypes of bovine viral diarrhoea virus. *Viruses*, **9**: 128.

YESILBAĞ K, FORSTER C, BANK-WOLF B, YILMAZ Z, ALKAN F, OZKUL FA, BURGU I, ROSALES SC, THEIL HJ, KONIG M (2008). Genetic heterogeneity of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates from Turkey: identification of a new subgroup in BVDV-1. *Vet Microbiol*, **130**: 258–267.

YESILBAĞ K, FORSTER C, OZYIGIT MO, ALPAY G, TUNCER P, THEIL HJ, KONIG M, (2014). Characterisation of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates from an outbreak with haemorrhagic enteritis and severe pneumonia. *Vet Microbiol*, **169**: 42–49.

YILMAZ H, ALTAN E, RIDPATH J, TURAN N. Genetic diversity and frequency of bovine viral diarrhea virus (BVDV) detected in cattle in Turkey (2012). *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.*, **35**: 411-416.

ZAHOR MA, YAMANE D, MOHAMED YM, SUDA Y, KOBAYASHI K, KATO K, TOHYA, Y, AKASHI H (2010). Bovine viral diarrhea virus non-structural protein 5A interacts with NIK- and IKK β -binding protein. *The Journal of general virology*, **91**: 1939–1948.

ZHANG C, WANG X, SUN J, GUO M, ZHANG X, WUY (2021). Autophagy Induced by the N-Terminus of the Classic Swine Fever Virus Nonstructural Protein 5A Protein Promotes Viral Replication. *Frontiers in microbiology*, **12**: 733385.

ZHONG F, LI N, HUANG X, GUO Y, CHEN H, WANG X VE ARK, (2011). Genetic typing and epidemiologic observation of bovine viral diarrhea virus in Western China. *Virus Genes*, **42**: 204–207.

ZOGG T, SPONRING M, SCHINDLER S, KOLL M, SCHNEIDER R, BRANDSTETTER H, AUER B (2013). Crystal structures of the viral protease N^{pro} imply distinct roles for the catalytic water in catalysis. *Structure*, **21**: 929–938.

ZÜRCHER CM, SAUTER KS, MATHYS V, WYSS F, SCHWEIZER M (2014). Prolonged activity of the pestiviral RNase E^{rms} as an interferon antagonist after uptake by clathrin-mediated endocytosis. *J. Virol.*, **88**: 7235–7243.

EKLER

Ek-1. Etik Kurul Raporu



T.C
TARIM VE ORMAN BAKANLIĞI
PENDİK VETERİNER KONTROL ENSTİTÜSÜ HAYVAN DENEYLERİ
YEREL ETİK KURULU

Sayı :222

02.07.2019

Karar No: 11/2019

Başvuru Tarihi:27/06/2019

Sayın Onur ÜLGENALP

Sorumluluğunu üstlendiğimiz “**Ruminantları Enfekte Eden Pestivirusların Ayırıcı Tanısı ve Moleküler Karakterizasyonu**” isimli çalışmanız incelenmiş olup Etik Kurul kapsamı dışında olduğundan etik kurul kararına gerek olmadığına karar verilmiştir.

Dr. Rüçhan ALP
PEVHADYEK Başkanı

Dr. Ümit ÖZDEMİR
Başkan Yardımcısı

Dr. Ayşe KATEŞOĞLU
Üye

Dr. Gülseren YILDIZ ÖZ
Üye

Uzm. Vet. Hek. Ali ÖZKARA
Üye

Vet. Hek. Ahmet ŞİMŞEK
Üye

Dr. Canan ALTINEL
Üye

Vet. Hek. M. Engin MALAL
Üye

Dr. Esra VATIR
Üye

Dr. Arıkan GÜREL

Ek-2 Tez konusu için bakanlık onayı.



T.C.
TARIM VE ORMAN BAKANLIĞI
Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü

Sayı : 71037622-604.01.01-E.1912242
Konu : Doktora tezi konusu

25.06.2019

İSTANBUL/PENDİK VETERİNER KONTROL ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

İlgi : 15.05.2019 tarihli ve 46756119-604.01.01-E.1536142 sayılı yazınız.

İlgide kayıtlı yazı ve eklerinde Genel Müdürlüğümüze iletilen "Ruminantları Enfekte Eden Pestivirusların Ayrıcı Tanısı ve Moleküler Karakterizasyonu" konulu doktora tezinin kurumunuzda yapılabilmesi Enstitü Müdürlüğünüz değerlendirmesi sonucu uygun görülmüş ise Genel Müdürlüğümüz tarafından yapılmasında sakınca bulunmamaktadır.
Gereğini rica ederim.

 e-imzalıdır

Doç. Dr. Veli GÜLYAZ
Genel Müdür Yardımcısı V.

Ek-3. Tez çalışmasında elde edilen dizinlere ait GenBank'tan alınan accession numaraları

N^{pro} Gen Bölgesi Sekansları	Accession no.
TUR_A3_2019	ON401199
TUR_A5_2019	ON401200
TUR_A6_2019	ON401201
TUR_A8_2019	ON401202
TUR_A13_2019	ON401203
TUR_B12_2019	ON401204
TUR_B13_2019	ON401205
TUR_C2_2020	ON401206
TUR_C22_2020	ON401207
TUR_D2_2021	ON401208

E Gen Bölgesi Sekansları	Accession no.
TUR_A5_2019	ON411647
TUR_A6_2019	ON411648
TUR_B15_2019	ON411649
TUR_C1_2019	ON411650
TUR_C2_2019	ON411651
TUR_C5_2019	ON411652
TUR_C13_2019	ON411653
TUR_C16_2019	ON411654
TUR_C17_2019	ON411655
TUR_D2_2019	ON411656
TUR_D9_2019	ON411657

NS2-3 Gen Bölgesi Sekansları	Accession no.	NS2-3 Gen Bölgesi Sekansları	Accession no.
TUR_2019_A1	ON401209	TUR_2020_C2	ON401224
TUR_2019_A3	ON401210	TUR_2020_C4	ON401225
TUR_2019_A5	ON401211	TUR_2020_C5	ON401226
TUR_2019_A6	ON401212	TUR_2019_C6	ON401227
TUR_2019_A8	ON401213	TUR_2019_C13	ON401228
TUR_2019_A13	ON401214	TUR_2019_C15	ON401229
TUR_2020_B2	ON401215	TUR_2019_C16	ON401230
TUR_2020_B4	ON401216	TUR_2020_C17	ON401231
TUR_2020_B5	ON401217	TUR_2020_C19	ON401232
TUR_2019_B10	ON401218	TUR_2020_C20	ON401233
TUR_2019_B13	ON401219	TUR_2019_C14	ON401234
TUR_2019_B14	ON401220	TUR_2019_C21	ON401235
TUR_2019_B15	ON401221	TUR_2020_C22	ON401236
TUR_2020_B16	ON401222	TUR_2020_C26	ON401237
TUR_2020_B21	ON401223	TUR_2020_C30	ON401238

5'UTR Gen Bölgesi Sekansları	Accession no.	5'UTR Gen Bölgesi Sekansları	Accession no.
TUR_2019_A1	ON401138	TUR_2020_C10	ON401160
TUR_2019_A3	ON401139	TUR_2019_C15	ON401161
TUR_2019_A5	ON401140	TUR_2019_C16	ON401162
TUR_2019_A6	ON401141	TUR_2020_C17	ON401163
TUR_2019_A8	ON401142	TUR_2020_C19	ON401164
TUR_2019_A13	ON401143	TUR_2020_C20	ON401165
TUR_2020_B1	ON401144	TUR_2020_C30	ON401166
TUR_2020_B3	ON401145	TUR_2020_C31	ON401167
TUR_2020_B4	ON401146	TUR_2019_C32	ON401168
TUR_2020_B5	ON401147	TUR_2019_C33	ON401169
TUR_2020_B7	ON401148	TUR_2019_C37	ON401170
TUR_2020_B8	ON401149	TUR_2019_C38	ON401171
TUR_2019_B10	ON401150	TUR_2019_C41	ON401172
TUR_2019_B11	ON401151	TUR_2020_C42	ON401173
TUR_2019_B13	ON401152	TUR_2021_D1	ON401174
TUR_2019_B14	ON401153	TUR_2021_D3	ON401175
TUR_2019_B15	ON401154	TUR_2021_D4	ON401176
TUR_2020_B16	ON401155	TUR_2020_D9	ON401177
TUR_2020_B21	ON401156	TUR_2021_D10	ON401178
TUR_2020_C7	ON401157	TUR_2021_D11	ON401179
TUR_2020_C8	ON401158	TUR_2021_D12	ON401180
TUR_2019_C9	ON401159		