



T.C.
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ATIK PROBLEMİ OLAN KOYUN VE KEÇİ İŞLETMELERİNDE
BORDER DİSEASE ENFEKSİYONUNUN ARAŞTIRILMASI**

Veteriner Hekim Hakan GÜZEL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

VETERİNERLİK VİROLOJİSİ ANABİLİM DALI

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Kamil ATLI

BURDUR-2023

T.C.
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ATIK PROBLEMİ OLAN KOYUN VE KEÇİ İŞLETMELERİNDE
BORDER DİSEASE ENFEKSİYONUNUN ARAŞTIRILMASI**

Hakan GÜZEL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

VETERİNERLİK VİROLOJİSİ ANABİLİM DALI

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Kamil ATLI

*Bu Araştırma Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinatörlüğü tarafından 0782-YL-21 proje numarası ile desteklenmiştir.*

BURDUR-2023

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimine başladığım dönemden bu yana gerek tez, gerekse ders aşama süresince bilgi ve emeğini benden esirgemeyen, tez çalışmam süresince bana yol gösteren, değerli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Kamil ATLI'ya yine bu süreç boyunca kıymetli bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan Viroloji Anabilim Dalı hocalarıma, tez savunmama katılarak değerli görüşlerini esirgemeyen Prof. Dr. Yakup YILDIRIM ve Dr. Öğr. Üyesi Irmak DİK'e, tezin düzeltme aşamasında yapıcı eleştirileri ile tezin son şeklini almasında yardımlarını gördüğüm Doç. Dr. Fırat DOĞAN'a, tez çalışmamda analizlerin yürütülmesinde bana yardımcı olan, araştırmamı yürüttüğüm süreçte desteğini esirgemeyen çok kıymetli çalışma arkadaşım Doktora öğrencisi Uzman Biyolog Ayşegül USTA'ya teşekkür ederim.

Saha materyali toplama sürecinde yardımlarını gördüğüm Veteriner Hekim Mustafa ÜGDÜL'e, Dinar Tarım ve Orman İlçe Müdürlüğünde ve Burdur İl Tarım ve Orman Müdürlüğünde görevli mesai arkadaşlarıma ve meslektaşlarıma teşekkür ederim.

Hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini her zaman yanımda hissettiğim ve bugünlere gelmemde büyük emek sahibi olan sevgili babam, annem ve kız kardeşime ve tezimin istatistiksel analiz kısmında bilgi ve tecrübesini benden esirgemeyen ilgisi ve anlayışı için sevgili eşim Dr. Öğr. Üyesi Aysun GÜZEL'e teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmamı maddi olarak destekleyen Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK.....	i
KABUL ve ONAY	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ETİK BEYAN.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİLLER	vii
TABLolar	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR	ix
ÖZET.....	x
ABSTRACT	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Etiyoloji.....	4
2.1.1. Sınıflandırma	4
2.1.2. Morfoloji	9
2.1.3. Genom Özellikleri	11
2.2. Epidemiyoloji	14
2.2.1. Dünyadaki Durum.....	14
2.2.2. Türkiyedeki Durum	16
2.3. Bulaşma	20
2.4. Klinik ve Patogenez	22
2.4.1. Fötal Enfeksiyon.....	22
2.4.2. Postnatal Enfeksiyon.....	24
2.5. Teşhis	26
2.5.1. Klinik Teşhis	26
2.5.2. Laboratuvar Teşhisi.....	26
2.5.2.1. Direkt Teşhis.....	26
2.5.2.2. İndirekt Teşhis	27
2.6. Koruma ve Kontrol	28
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	29
3.1. Gereç	29
3.1.1. Araştırma Materyali	29
3.1.2. Kan ve Kulak çentiği Örnekleri.....	31

3.1.2.1.	Kan Örnekleri	31
3.1.2.2.	Kulak çentiği Örnekleri.....	32
3.2.	Yöntem.....	32
3.2.1.	Pestivirus Antijenlerinin Ag-ELISA Testi ile Belirlenmesi.....	32
3.2.2.	Pestivirus Viral Nükleik Asitin RT-PCR Testi ile Belirlenmesi	35
3.2.2.1.	Çalışmada Kullanılan Malzemeler	35
3.2.2.2.	Viral RNA Ekstraksiyon İşlemi.....	36
3.2.2.3.	One Step RT-PCR Uygulaması.....	37
3.2.2.4.	Agaroz Jel Elektroforezi.....	37
3.2.3.	İstatiksel Değerlendirme.....	38
4.	BULGULAR.....	39
4.1.	Klinik Bulgular	39
4.2.	Laboratuvar Bulguları.....	39
4.2.1.	Ag-ELISA Testi Sonuçları.....	39
4.2.1.1.	Kan Örneklerinin Ag-ELISA Testi Sonuçları.....	39
4.2.1.2.	Kulak çentiği Örneklerinin Ag-ELISA Testi Sonuçları	40
4.2.2.	One Step RT-PCR Testi Sonuçları	40
4.2.2.1.	Kan Örneklerinin One Step RT-PCR Testi Sonuçları	40
4.2.2.2.	Kulak çentiği Örneklerinin One Step RT-PCR Testi Sonuçları	41
4.3.	İstatistik Değerlendirme Sonuçları	46
4.3.1.	Sensitivite ve Spesifite Testi Sonuçları	46
4.3.2.	Ki-kare Testleri Sonuçları	47
5.	TARTIŞMA ve SONUÇ	50

ŞEKİLLER

Şekil 2.1. BVDV-1 izolatının negatif kontrastlı elektron mikroskopundaki görüntüsü	6
Şekil 2.2. Pestivirus familyasında yer alan viruslar	8
Şekil 2.3. 5'-UTR, Npro ve kısmi C gen bölgelerine göre elde edilen pestivirus filogenetik ağacı	9
Şekil 2.4. Pestivirus genomik organizasyonu	10
Şekil 2.5. BDV CP Cumnock, BDV CP Moredun ve BVDV NADL ile non-cp genom yapısının şematik gösterimi	14
Şekil 2.6. Hairy Shaker görünümlü kuzu	25
Şekil 3.1. Çalışmada örnekleme yapılan bir koyun sürüsü	30
Şekil 3.2. Çalışmada örnekleme yapılan bir keçi sürüsü	30
Şekil 4.1. Kan ve Kulak çentiklerine uygulanan Ag- ELISA pleyti görünümü	40
Şekil 4.2. Kulak çentiği örneklerinde One Step RT-PCR jel elektroforez görüntüsü	42

TABLÖLAR

Tablo 2.1. Pestivirus cinsi içerisinde bulunan türler ve suşlar	7
Tablo 3.1. Kan ve Kulak çentiği numunesi alınan küçük ruminantların tür, yaş ve cinsiyete göre dağılımları	31
Tablo 3.2. İşletmelerdeki toplam hayvan sayısı, Numune alınan hayvan sayısı ve Numune alınan işletme sayısı	31
Tablo 3.3. Çalışma bölgesinde Numune alınan hayvanların Toplam hayvan sayısına oranı	31
Tablo 3.4. Pestivirus için kullanılan primerler ve ampikon uzunlukları	35
Tablo 3.5. RT-PCR test reaksiyonunun evreleri, ısı, zaman ve siklus koşulları	37
Tablo 4.1. Ag-ELISA ve RT-PCR testi sonuçlarına göre pestivirus enfeksiyonun hayvan türü ve yaşa göre dağılımı	43
Tablo 4.2. Tam kan ve Kulak çentiği örneklerinin işletmelere göre RT-PCR testi ve Ag-ELISA testi sonuçları	44
Tablo 4.3. Ag-ELISA (Tam kan) ve RT-PCR (Tam kan) testi Sensitivite ve Spesifitesi	46
Tablo 4.4. Ag-ELISA (Kulak çentik) testi ve RT-PCR (Kulak çentik) testi Sensitivite ve Spesifitesi	46
Tablo 4.5. Hayvan türlerine göre Tam kan örneklerine uygulanan Ag-ELISA testi sonuçlarının dağılımı	47
Tablo 4.6. Hayvan türlerine göre Tam kan örneklerine uygulanan RT-PCR testi sonuçlarının dağılımı	47
Tablo 4.7. Hayvan türlerine göre Kulak çentiği örneklerine uygulanan RT-PCR testi sonuçlarının dağılımı	48
Tablo 4.8. Hayvan yaşlarına göre Kulak çentiği örneklerine uygulanan RT-PCR testi sonuçlarının dağılımı	49

SİMGELER ve KISALTMALAR

Ab-ELISA	Antibody Elisa
Ac-ELISA	Antigen Capture Elisa
Ag-ELISA	Antigen Elisa
BDV	Border Disease Virus
bp	Base pair
BVDV	Bovine Virus Diarrhea Virus
CSFV	Classical Swine Fever Virus (Klasik Domuz Vebası Virusu)
cDNA	Complementary DNA
cp	Sitopatojenik
cpe	Sitopatik efekt
dk	Dakika
EDTA	Etilendiamin Tetraasetikasit
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ICTV	Uluslararası Virus Taksonomisi
IHC	İmmunohistokimya
ISH	In situ hybridization
kb	Kilo base
ncp	Non-sitopatojenik
nm	Nanometre
NPLA	Neutralization Peroxidase Linked Antibody
OD	Optik Dansite
OIE	Office International des Epizooties (Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü)
ORF	Open Reading Frame (Açık Okuma Bölgesi)
PBS	Phosphate Buffered Saline
PI	Persiste Enfekte
pH	Power of Hydrogen
RdRp	RNA dependent RNA polymerase (RNA bağımlı RNA polimeraz)
RNA	Ribo Nükleik Asit
rpm	Revolutions per minute
RT-PCR	Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
TAE	Tris Asetik Asit-EDTA
UTR	Untranslate Region (Kodlamayan Bölge)
VN	Virus Nötralizasyon
°C	Santigrat
µl	Mikrolitre
%	Yüzde

ÖZET

Atık Problemi Olan Koyun ve Keçi İşletmelerinde Border Disease Enfeksiyonunun Araştırılması

Bu çalışma ile Burdur ilinde küçük ruminant hayvan sürülerinden toplanan kan ve kulak çentiği örneklerinde pestivirus enfeksiyonunun varlığı ve yaygınlığının araştırılması amaçlanmıştır. Örnekler, il merkezine bağlı küçük ruminant hayvan yetiştiriciliğinin yoğun olarak yapıldığı köylerde bulunan işletmelerden toplanmıştır. Bu amaçla çalışmanın yürütüldüğü toplam 37 küçük ruminant işletmesi Nisan 2021 – Nisan 2022 tarihleri arasında ziyaret edilmiştir. İşletme sahiplerinden alınan anamnez bilgileri doğrultusunda işletmelerde kayıtlı 6445 küçük ruminant hayvandan 74 adedi koyun, 26 adedi keçi olmak üzere toplam 100 adet tam kan ve kulak çentiği numunesi alınmıştır. Numuneler Pestivirus yönünden Ag-ELISA ve RT-PCR tekniği ile incelenmiştir. Ag-ELISA testi ile toplam 100 küçük ruminant hayvandan alınan tam kan numunelerinin sadece 3 adedi (%3) pestivirus antijen varlığı yönünden pozitif bulunmuştur. Keçilerde pestivirus antijen varlığı yönünden pozitiflik oranı %11,5 (3/26) iken koyunların hiçbirinde pestivirus antijen varlığı saptanmamıştır. Keçilerdeki 1-3 yaş arası pestivirus enfeksiyon oranı %15,3 (2/13), 4 yaş ve üzeri keçilerdeki enfeksiyon oranı %7,7 (1/13) saptanmıştır. Kulak çentiği numunelerinin Ag-ELISA testi ile incelenmesi sonucunda her iki hayvan türünde de pestivirus antijen varlığına rastlanmamıştır. RT-PCR testi ile toplam 100 küçük ruminant hayvandan alınan tam kan numunelerinin 40 adedi (%40) pestivirus nükleik asit varlığı yönünden pozitif bulunmuştur. Koyunlarda pestivirus nükleik asit varlığı yönünden pozitiflik oranı %51,3 (38/74) iken, keçilerde bu oran %7,7 (2/26) olarak saptanmıştır. Koyunlardaki 1-3 yaş arası pestivirus enfeksiyon oranı %52,3 (22/42), 4 yaş ve üzerinde ise %50 (16/32) bulunmuştur. Keçilerde 1-3 yaş arasında pestivirus enfeksiyonuna rastlanmazken, 4 yaş ve üzeri keçilerdeki enfeksiyon oranı %15,3 (2/13) bulunmuştur. RT-PCR testi ile toplam 100 küçük ruminant hayvandan alınan kulak çentiği numunelerinin 22 adedi (%22) pestivirus nükleik asit varlığı yönünden pozitif bulunmuştur. Bu oran koyunlarda %27 (20/74) iken keçilerde %7,7 (2/26) olarak saptanmıştır. Koyunlardaki 1-3 yaş arası pestivirus enfeksiyon oranı %33,3 (14/42), 4 yaş ve üzerinde ise %18,75 (6/32) bulunmuştur. Bir ve üç yaş arasındaki keçilerde enfeksiyon oranı %15,3 (2/13) bulunurken, 4 yaş ve üzeri keçilerde enfeksiyona rastlanmamıştır. Çalışmada sadece 1 erkek koyundan numune alınmış ancak pestivirus antijen ve nükleik asit varlığına rastlanmamıştır. Erkek keçilerden numune alınmamıştır. Sonuç olarak bu çalışma ile enfeksiyonun küçük ruminant işletmelerinde varlığı tespit edilmiş olup, ileride yapılması planlanan yeni çalışmalara, alınacak koruma ve kontrol stratejilerine katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: BDV, Keçi, Koyun, Kulak çentik, Pestivirus

ABSTRACT

Investigation of Border Disease Infection in Sheep and Goat Farms with Abort Problems

In this study, it was aimed to investigate the presence and prevalence of pestivirus infection in blood and ear notch samples collected from small ruminant animal herds in Burdur province. The samples were collected from the enterprises located in the villages of the city center where small ruminant animal husbandry is intense. For this purpose, a total of 37 small ruminant enterprises where the study was carried out were visited between April 2021 and April 2022. In line with the anamnesis information obtained from the owners of the enterprises, a total of 100 whole blood and ear notch samples, 74 of which were sheep and 26 of which were goats, were taken from 6445 small ruminant animals registered in the enterprises. The samples were examined for Pestivirus by Ag-ELISA and RT-PCR technique. Only 3 (3%) of the whole blood samples taken from a total of 100 small ruminant animals by Ag-ELISA test were found positive for the presence of pestivirus antigen. While the positivity rate for the presence of pestivirus antigen in goats was 11.5% (3/26), the presence of pestivirus antigen was not detected in any of the sheep. The pestivirus infection rate in goats aged 1-3 years was 15.3% (2/13), and the infection rate in goats aged 4 years and older was 7.7% (1/13). As a result of the examination of ear notch samples with Ag-ELISA test, the presence of pestivirus antigen was not found in both animal species. By RT-PCR test, 40 (40%) of the whole blood samples taken from a total of 100 small ruminant animals were found positive for the presence of pestivirus nucleic acid. While the positivity rate for the presence of pestivirus nucleic acid in sheep was 51.3% (38/74), this rate was 7.7% (2/26) in goats. The pestivirus infection rate in sheep between 1-3 years of age was 52.3% (22/42) and 50% (16/32) in 4 years and older. While pestivirus infection was not found in goats between 1-3 years of age, the infection rate in goats aged 4 years and over was 15.3% (2/13). By RT-PCR test, 22 (22%) of the ear notch samples taken from a total of 100 small ruminant animals were found to be positive for the presence of pestivirus nucleic acid. While this rate was 27% (20/74) in sheep, it was 7.7% (2/26) in goats. The pestivirus infection rate in sheep between 1-3 years of age was 33.3% (14/42) and 18.75% (6/32) in 4 years and older. While the infection rate was 15.3% (2/13) in goats between one and three years of age, no infection was found in goats aged 4 and over. In the study, only one male sheep sample was taken, but the presence of pestivirus antigen and nucleic acid was not found. No samples were taken from male goats. As a result, with this study, the presence of infection in small ruminant enterprises has been determined and it is thought that it will contribute to the new studies planned in the future and the protection and control strategies to be taken.

Keywords: BDV, Goat, Sheep, Ear notch, Pestivirus

1. GİRİŞ

Hayvancılık sektörü içinde koyun ve keçi yetiştiriciliği oldukça önemli yer tutmaktadır. Türkiye'nin coğrafi şartları, arazi yapısı ve tarımsal potansiyeli, koyun ve keçi yetiştiriciliğine olanak sağlayacak özelliktedir. Türkiye'de küçük ruminant hayvan yetiştiriciliği iklim ve doğa koşullarına göre teknik ve ekonomik imkanlar el verdiği ölçüde büyük, orta, küçük sürüler veya geleneksel aile tipi işletme şeklinde yapılmaktadır. Yetiştiriciliği yapılan küçük ruminant hayvanlardan elde edilen et, süt gibi ürünler halk tarafından sevilerek ve yüksek miktarlarda tüketilmektedir (Akçapınar, 1984, İnce, 2022). Artan nüfusun yeterli ve dengeli beslenebilmesi, kırsal hayatın devamlılığı, istihdam ve daha birçok açıdan küçük ruminant hayvancılık faaliyeti hayati önem arz etmektedir (Keskinkılıç, 2019).

Hayvancılık istatistikleri incelendiğinde ülkemizde 58 447 555 baş küçük ruminant hayvan bulunmaktadır. Küçük ruminant hayvan yetiştiriciliğinin yoğun olarak yapıldığı Burdur il merkezi 27700 keçi, 47400 koyun olmak üzere toplam 75100 küçük ruminant hayvana ev sahipliği yapmaktadır (Ergün, 2012; TÜİK, 2022; TOM, 2022). Bu rakamlar dikkate alındığında ülkemiz küçük ruminant hayvan yetiştiriciliğinde sayısal olarak önemli bir popülasyona sahip olmakla birlikte bu sektörde önemli sorunlar yaşanmaktadır. Küçük ruminant hayvan yetiştiriciliğinde, her hayvandan sağlıklı bir şekilde yavru alınması işletmelerin devamlılığı ve ekonomik anlamda sürdürülebilirliği için oldukça önemlidir. Küçük ruminant yetiştiriciliğini olumsuz yönde etkileyen birçok faktör bulunmaktadır. Bu faktörlerin en önemlileri abort ve yavru ölümleridir. Abortlar enfeksiyöz ve enfeksiyöz olmayan nedenlerden kaynaklanmaktadır. Enfeksiyöz olmayan nedenlerin başında; beslenme, bakır eksikliği, iyot eksikliği, selenyum eksikliği, toksik bitkiler, stres ve travma, hatalı ilaç ve hormon uygulamaları gelir. Enfeksiyöz olan sebepler ise Brusellozis, Enzootik abortus (*Chlamydia psittaci*), Salmonellozis, Kamfilobakteriyozis, Listeriozis, Toxoplazmozis, Border disease, Mavi dil, Akabene, Cache valley virus, Caprine herpes virus, gibi bakteriyel, viral ve paraziter etkenlerdir (Keskin, 2015; Ay ve ark., 2017). Viral transplasental enfeksiyonların neden olduğu fetal ve embriyonik ölümler, koyun ve keçi yetiştiriciliğinde ekonomik olarak sürdürülebilirliğin

önündeki problemlerin başında gelmektedir. Buna ek olarak abort yapan hayvanlarda süt veriminin olmaması da, ekonomik anlamda önem arz etmektedir (İssi ve ark., 2012; Pestil, 2014).

Küçük ruminant (koyun ve keçi) türlerinde üreme sistemi üzerinde bulgularla karakterize enfeksiyonlara neden olan pestiviruslar, *flaviviridae* ailesinin aynı isimli genusunda bulunmaktadır. Pestivirusların konakçı hayvan türüne göre yapılan sınıflandırılmasında; sığırların esas konakçı olduğu BVDV ve koyun ve keçilerde enfeksiyon oluşturan BDV yer almakta olup, her iki virusun söz konusu türlerde enfeksiyona neden olması sebebiyle bu viruslar ruminant pestivirusları olarak adlandırılmaktadır (Ergün, 2012). Border Disease hastalığı ilk olarak 1959'da İngiltere ve Galler sınır bölgesinde yetiştirilen koyunlarda bildirilen ve o zamandan beri dünyanın çeşitli bölgelerinde kaydedilen viral bir koyun ve keçi hastalığıdır. Hastalık ayrıca "*Hairy Shaker Disease* ve *Fuzzy Lambs*" gibi isimlerle de adlandırılmaktadır (OIE, 2017).

Dünyada ve ülkemizde küçük ruminant hayvan sürülerinde yüksek oranda görülen Pestivirus enfeksiyonları, sebep olduğu ekonomik kayıplar nedeniyle oldukça önemlidir. Dünyada persiste enfekte (PI) hayvanları saptamak için şu anda mevcut yöntemler arasında virus izolasyonu (VI), ters transkripsiyon-polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR), immunohistokimya (IHC) ve antijen yakalama enzim bağlantılı immunosorbent testi (Ag-ELISA) yer alır. Bu tanı yöntemleri serum, plazma, tam kan ve kulak çentiği gibi örnekler üzerinde uygulanmaktadır. Kulak çentiği numunesi toplanması kolay, minimum malzeme ve ekipman gerektiren, çok sayıda numuneyi analiz etme imkanı sunan, geleneksel testlerle de karşılaştırıldığında testin güvenilirlik raporlarının iyi olması nedeniyle özellikle PI sığırları saptamak için dünyada yapılmış bir çok çalışma bulunmaktadır (Cornish ve ark., 2005; Kennedy ve ark., 2006; Funk ve ark., 2008; Bedeković ve ark., 2011; Yan ve ark., 2011; Ahmad ve ark., 2014; Mozaffari ve ark., 2014; Bauermann ve ark., 2014; Khodakaram-Tafti ve ark., 2016; Mirosław ve Polak, 2019).

Burdur ilinde bugüne kadar pestiviruslar ile ilgili yapılan çalışmalar küçük ruminant hayvan sürülerinde enfeksiyonun varlığını ortaya koymuştur (Hasırcıoğlu

ve ark., 2009; Oğuzoğlu ve ark., 2009). Burdur ilinde yapılan bu çalışmada il merkezine bağlı köylerde aile tipi işletmelerde yetiştirilen hayvanlar kullanılmıştır. İşletme sahiplerine çalışma bitiminde hastalık ile ilgili gerekli bilgiler verilmiş, koruma kontrol stratejileri hakkında tavsiyelerde bulunulmuştur. Bu çalışma ile, hem Türkiye’de hem de Burdur ilinde ilk kez kulak çentik dokusu kullanılarak koyun ve keçilerde enfeksiyonun varlığı saptanmıştır.

Bu tezin amacı Burdur ilinde yetiştiriciliği yapılan küçük ruminant sürülerinden toplanan kan ve kulak çentiği örneklerinde Ag-ELISA ve RT-PCR testleri ile pestivirus enfeksiyonunun varlığını ve yaygınlığını belirlemektir. Yürütülen bu çalışma ile hem Türkiye’de hemde Burdur ilinde ilk kez kulak çentik dokusu kullanılarak koyun ve keçilerde enfeksiyonun varlığının saptanması hedeflenmiştir. Bu çalışma ile enfeksiyonun Burdur ilinde varlığına ve yaygınlığına yönelik yeni veriler elde edilmesi amaçlanmış olup, bu verilerin yapılacak yeni çalışmalara katkı sağlayacağı ve enfeksiyonun eliminasyonuna yardımcı olabileceği düşünülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Etiyoloji

2.1.1. Sınıflandırma

Pestivirus cinsi, *flaviviridae* ailesi içerisinde sınıflandırılmaktadır. Pestivirus cinsi genel çerçeve içerisinde Border Disease Virus (BDV), Bovine Virus Diarrhea Virus genotip 1 (BVDV-1), Bovine Virus Diarrhea Virus genotip 2 (BVDV-2) ve Classical Swine Fever Virus (CSFV) olmak üzere dört virüsü barındırmaktadır. Uluslararası Virus Taksonomi Komitesi (ICTV)'ne uygun olarak 2017 yılından sonra (Tablo 2.1) bu dört tür sırasıyla; *pestivirus A, B, C* ve *D* olarak yeniden adlandırmış ve *pestivirus* cinsine zürafadan izole edilen *pestivirus G* ve diğer vahşi ve evcil memelilerden de izole edilen *pestivirus E, F, G, H, I, J, K* olmak üzere yedi başka tür eklenmiştir. Halen *pestivirus* cinsi içinde toplam 11 tür bulunmaktadır. Flaviviridae ailesi içerisinde bulunan diğer cinsler ise *flavivirus*, *pegivirus* ve insanlarda enfeksiyon oluşturan hepatit virusunun dahil olduğu *hepacivirustur* (Schirrneier ve ark., 2004; Pestil, 2014; Feknous, 2018; ICTV, 2020a).

Border Disease Virusu'nun konakçıları koyun ve keçiler, BVDV genotip 1 ve genotip 2' in konakçısı sığır, CSFV'nin ise domuzlardır. Fakat bahsi geçen bu viruslar birbirleriyle antijenik ve genetik olarak yakın akraba olması sebebiyle kırtan fazla ruminant türünde pestivirus varlığının tespit edildiği ve pestivirusların konakçı spektrumunun kesin çizgilerle ayrılmadığına dair araştırmalar bulunmaktadır (Becher ve ark., 1997; Becher ve ark., 1999; Becher ve ark., 2003; Hurtado ve ark., 2003; Schirrneier ve ark., 2004; Lindenbach ve ark., 2007; Saltik ve ark., 2022). Classical Swine Fever Virus (CSFV) esas olarak domuzları enfekte eder ve deneysel olarak sığırları ve keçileri de enfekte edebilmesine rağmen, şimdiye kadar domuz dışındaki bir türde doğal enfeksiyon bildirilmemiştir (Vilcek ve ark., 1997; Hurtado ve ark., 2003).

Pestiviruslar, geçmişte bulundukları konakçı türüne, meydana getirdikleri hastalık ve patolojik durumlara göre sınıflandırılmış olup, viroloji alanında yakın

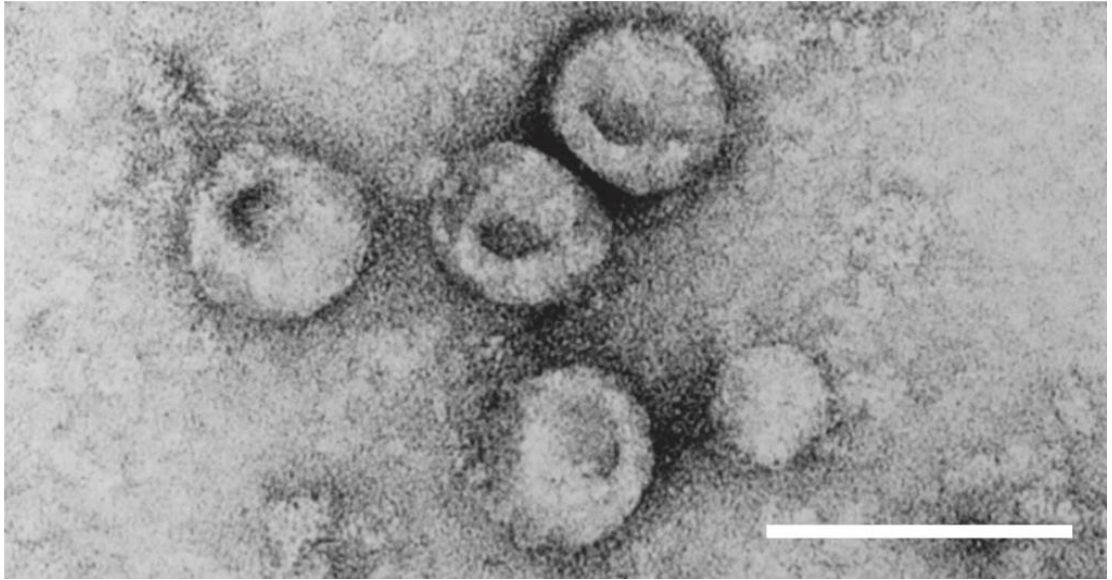
zamanlardaki gelişmeler hayvanlardan izole edilen izolatların yeniden sınıflandırılmasına olanak sağlamıştır. Pestivirusların yapısında yer alan viral proteinlerden 5'-UTR, Npro, E2 ve NS3 gibi bölgelerin oldukça sık kullanıldığı filogenetik çalışmalar virus izolatlarının genetik sınıflandırılmasına öncülük etmiştir. Npro kodlama bölgesinin farklı pestivirus türleri ve alt türleri arasında kesin bir ayırım sağladığı düşünülmektedir. Sahadan izole edilen yeni izolatları ile birlikte mevcut BDV sekiz farklı alt gruba ayrılmaktadır (Vilcek ve ark., 1997; Hurtado ve ark., 2003; Becher ve ark., 2003; Schirrmeyer ve ark., 2004; Peterhans ve ark., 2010; Peletto ve ark., 2016).

Border Disease Virus-1 (BDV-1) ABD, Birleşik Krallık, Avustralya ve Yeni Zelanda'da yetiştirilen koyunlarda tespit edilmiştir. Referans viruslar olarak adlandırılan Moredun, X818, V2536 ve T1802 gibi izolatlar bu grupta yer almıştır (Becher ve ark., 1994; Sullivan ve ark., 1997; Vilcek ve ark., 1997; Vilcek ve ark., 1998; Becher ve ark., 2003). Border Disease Virus-2 (BDV-2) Almanya'da ruminantlardan izole edilmiştir. Ren geyiklerinden izole edilen V60 suşu da bu grupta yer almaktadır (Becher ve ark., 2003). Border Disease Virus-3 (BDV-3) İsviçre ve Avusturya'da izole edilmiş olup domuzlardan izole edilen Gifhorn suşu bu grupta yer almaktadır (Becher ve ark., 2003; Stalder ve ark., 2005; Krametter-Froetscher ve ark., 2007). İspanya'da bir keçi türünden izole edilen Chamois suşu Border Disease Virus-4 (BDV-4) grubunda yer almaktadır (Arnal ve ark., 2004; Valdazo-Gonzalez ve ark., 2007). Border Disease Virus-5 ve 6 (BDV-5, BDV-6) Fransada (Dubois ve ark., 2008), Border Disease Virus-7 (BDV-7) ise İtalya ve Türkiye'de izole edilmiştir (Oğuzoğlu ve ark., 2009; Giammarioli ve ark., 2011). Border Disease Virus-8 (BDV-8) ise İsviçre ve İtalyada izole edilmiştir (Peterhans ve ark., 2010; Peletto ve ark., 2016).

Bovine Virus Diarrhea Virus genotip 1 ve 2 (BVDV-1 ve BVDV-2)'nin sadece sığır değil, koyun, domuz, keçi, geyik ve zürafayı da enfekte edebildiğini bildirilmiştir (Paton, 1995). Geçmiş çalışmalarda BDV olarak bilinen pestivirus suşları genetik özellikleri temel alınarak sonraki çalışmalarda tekrar sınıflandırılmıştır. İtalya'nın güney bölgelerinde BDV benzeri semptomlar gösteren kuzulardan ve oğlaklardan izole edilen birkaç pestivirusun genetik tiplendirme ile

BVDV-2 olduğu tespit edilmiştir (Giammarioli ve ark., 2011). Yeni Zelanda, Avustralya, Norveç, İsveç, İngiltere ve Arjantinde koyunlarda yapılan çalışmalarda BVDV-1 ve BVDV-2 bildirilmiştir (Becher ve ark., 1995; Vilcek ve ark., 1997; Valdazo-Gonzalez ve ark., 2006; Willoughby ve ark., 2006; Julia ve ark., 2009).

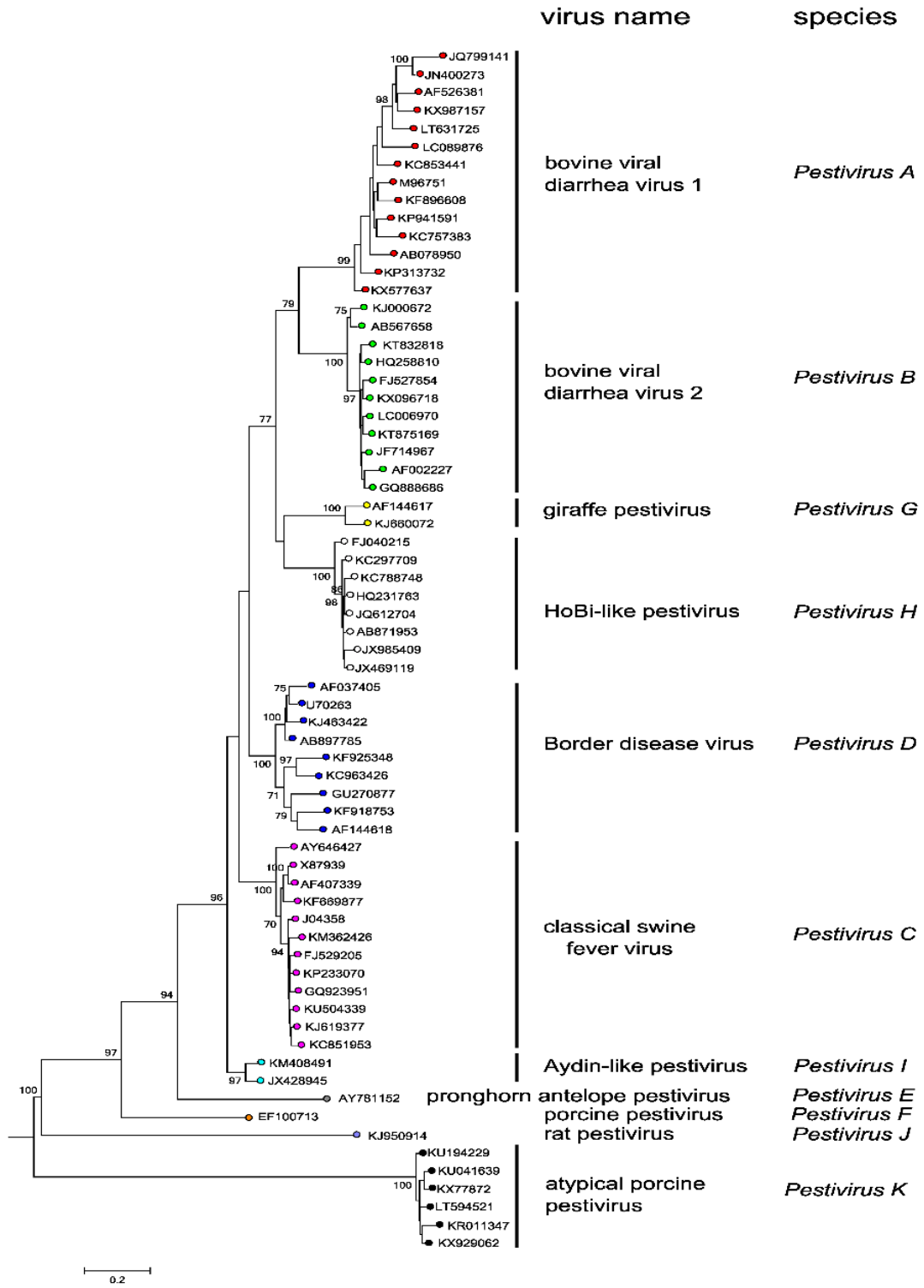
Türkiye’de yürütülen bir çalışmada 30 adet pestivirus izolatının Npro proteinini kodlayan nükleotid dizilerinin filogenetik analizi yapılmış, incelenen virus izolatlarının sadece bir izolatın koyun kökenli olduğu diğerlerinin sığır kökenli olduğu bildirilmiştir. Sığır orjinli bu izolatların BVDV-1’e ait olduğu, koyun orjinli izolatın ise BVDV-2’ye ait olduğu rapor edilmiştir (Yesilbag ve ark., 2008). Esas olarak domuzları enfekte eden CSFV deneysel olarak sığırları ve keçileri de enfekte ettiği tespit edilmiştir (Vilcek, 1997). Japonya’da domuzdan izole edilen FNK2012-1 izolatı BDV-1’de gruplandırılmıştır (Nagai ve ark., 2014). Bovine Virus Diarrhea Virus (BVDV) ve Border Disease Virus (BDV) sığır, koyun, keçi ve domuzların yanı sıra bazı yabani hayvan türlerinde çapraz enfeksiyona neden olmaktadır (Sullivan ve ark., 1997).



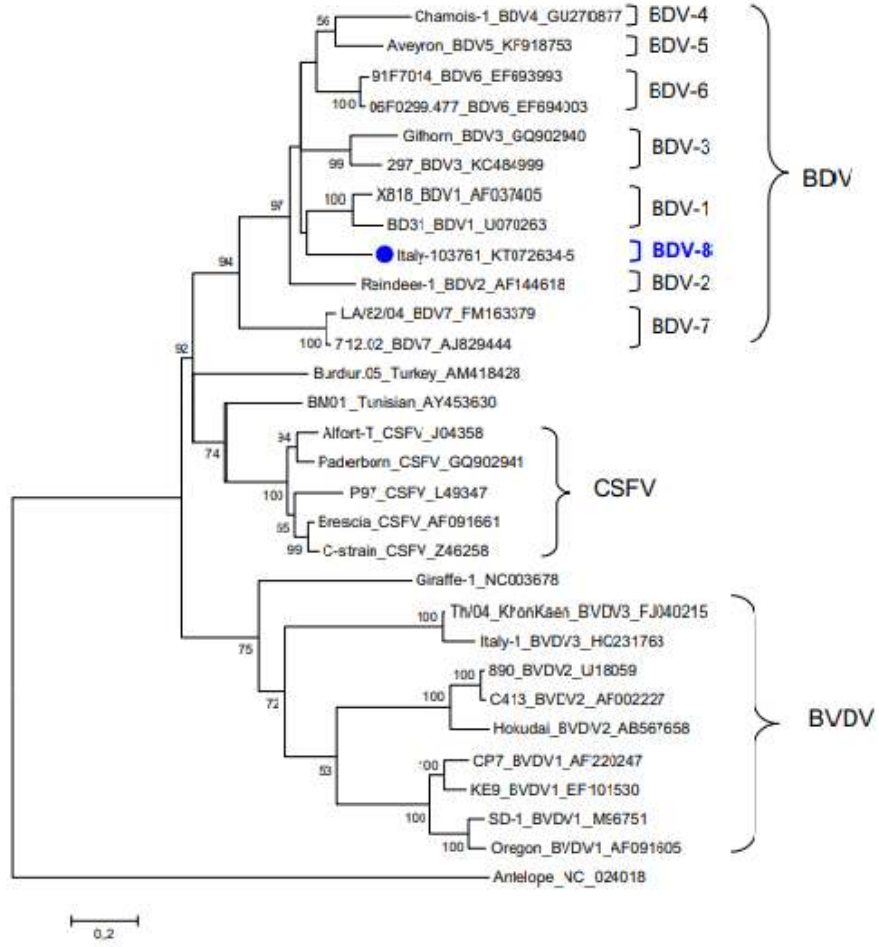
Şekil 2.1. BVDV-1 izolatının negatif kontrastlı elektron mikroskopundaki görüntüsü (ICTV, 2022a).

Tablo 2.1. Pestivirus cinsi içerisinde bulunan türler ve suşlar (ICTV, 2022).

Türler	Virus adı	Suş	Kısaltma
Pestivirus A	bovine viral diarrhea virus 1	NADL	BVDV-.1
Pestivirus B	bovine viral diarrhea virus 2	XJ-04	BVDV-.2
Pestivirus B	bovine viral diarrhea virus 2	890	BVDV-.2
Pestivirus C	classical swine fever virus	Alfort/187	CSFV
Pestivirus D	border disease virus	X818	BDV
Pestivirus E	pronghorn antelope pestivirus		PAPeV
Pestivirus F	porcine pestivirus	Bungowannah	PPeV
Pestivirus G	giraffe pestivirus	H138	GPeV
Pestivirus H	Hobi-like pestivirus	Th/04 Khon Kaen	HoBiPeV
Pestivirus I	Aydın-like pestivirus	04-TR	AydinPeV
Pestivirus J	rat pestivirus	NrPV/NYC-D23	RPeV
Pestivirus K	atypical porcine pestivirus	515	APPeV



Şekil 2.2. Pestivirus cinsinde yer alan viruslar (ICTV, 2022).



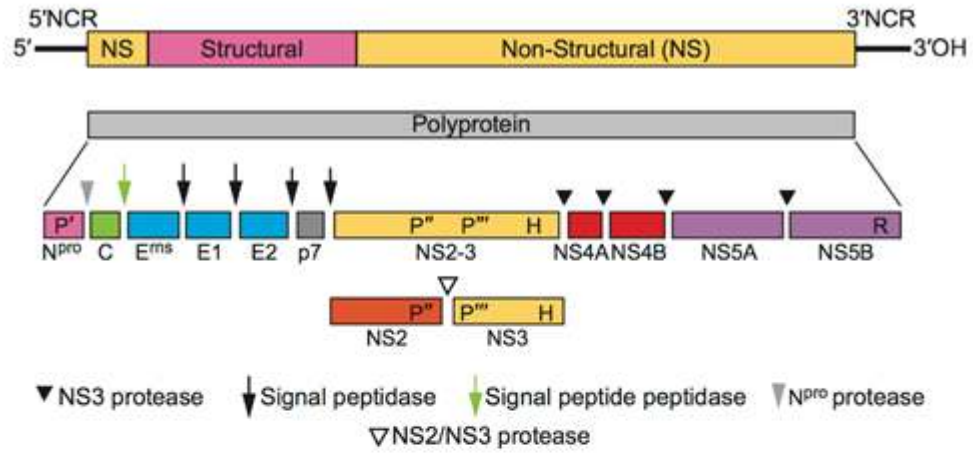
Şekil 2.3. 5'-UTR, Npro ve kısmi C gen bölgelerine göre elde edilen pestivirus filogenetik ağacı (Peletto ve ark., 2016).

2.1.2. Morfoloji

Pestivirus zarlı, pozitif polariteli, tek iplikçikli, 40-60 nm büyüklükte, 12.3 kb büyüklükte genoma sahip bir RNA virusudur. Virus çoğalması ve olgunlaşması hücre sitoplazmasında olur, yeni nesil virionlar endoplazmik retikulumdan zarfını alır ve ekzositozis yoluyla hücre dışına atılır. Virus genomunda 356-385 bazlık bir 5' kodlamayan bölge (5' Untranslate Region, UTR) ve 223-228 bazlık 3' - kodlamayan bölge (3' Untranslate Region, UTR) ile çevrili tek bir açık okuma çerçevesi (Open Reading Frame, ORF) vardır (Nettleton, 1998; Becher ve ark., 1998 Oğuzoğlu, 2008; Yeşilbağ, 2017). (Şekil 2.3).

Virus genomunun sahip olduğu viral proteinlerden 5'-UTR, Npro, E2 ve NS3 bölgeleri pestivirusların filogenetik analizlerinde kullanılmaktadır (Vilcek ve ark., 1997; Hurtado ve ark., 2003; Becher ve ark., 2003; Schirrmeier ve ark., 2004; Patel

ve ark., 2005; Peterhans ve ark., 2010; Giammarioli ve ark., 2011). Etken saha şartlarında dayanıklı değildir. Konak dışında güneş ışığında ve nemli yerlerde, düşük pH'ta uzun süre canlılığını koruyamaz. Otuz yedi santigrat derece üzerindeki sıcaklıklarda dayanıklılığı azalır. Elli altı santigrat derecede 30 dk'da inaktive olmaktadır. Lipid eriticiler, organik çözücüler, dezenfektanlar ve ultraviyole ışınları bu viruslari hızla etkisiz hale getirir (Depner ve ark., 1992; Avcı, 2010; Ural, 2014).



- Npro** = Poliproteinden kendi kendini ayırır. Konak interferon üretimini durdurur.
C = Viral RNA'yı paketleyen bir nükleokapsit proteindir.
Erns = Antikorları uyaran bir zarf ribonükleazıdır.
E1 = Bir zarf glikoproteindir.
E2 = Nötralizan antikorları uyaran bir zarf glikoproteindir.
P7 = Fonksiyonu anlaşılamamıştır.
NS2-3 = Nonsitopatik suşlara yapışmış olarak kalan yapısal olmayan bir proteindir.
NS2 = Oldukça değişken bir proteindir. Hidrofobik bölge ve çinko kapsar.
NS3 = Sitopatik etkilerle sonuçlanan hücrel apoptozu uyaran immünojenik bir proteindir. Proteinler bir serin proteaz ve RNA helikaz alanı içerir.
NS4A = Serin proteaz (NS3) kofaktörüdür. Bölünme için gereklidir.
NS4B = Bir replikaz bileşimini içerdiği varsayılmaktadır.
NS5A = Bir replikaz bileşimini içerdiği düşünülen fosforlanmış bir proteindir.
NS5B = RNA bağımlı bir RNA polimerazdır.

Şekil 2.4. Pestivirus genomik organizasyonu (Newcomer ve Givens, 2013, ICTV, 2022).

2.1.3. Genom Özellikleri

Open Reading Frame (ORF), viral ve hücresel enzimler tarafından işlenen 4.000 amino asitten oluşan proteinleri kodlar. Bu viruslar, post-translasyonel olarak on bir proteine bölünen tek bir poliproteini kodlayan lineer ve pozitif bir RNA genomuna sahiptir. Virus partikülünde yapısal olan ve olmayan proteinler N ucundan C ucuna doğru sırasıyla 5'-Npro, C, Erns, E1, E2, p7, NS2-3, NS4A, NS4B, NS5A, ve NS5B-3' şeklindedir. ORF içindeki yapısal olmayan bir otoproteaz olan ilk poliproteini (Npro), yapısal proteinler olan C nükleokapsid proteini, Erns, E1 ve E2 gibi glikoproteinler izler. Erns, RNase aktivitesine sahiptir. Hücre içi peptidazlar ile zarf proteinlerinin salınmasına öncülük eder. Glikoproteinlerden E2, immünodominant majör zarf proteini olup, virüsü nötralize edici antikorları uyarır. E2 proteininden sonra yer alan proteinler yapısal olmayan proteinler şeklinde sentezlenir. NS2-3 proteinleri pestivirus biyotiplerinin sitopatojenitesindeki rolü nedeniyle önem arz etmektedir. Bu protein helikaz ve serin proteazı kodlar (Becher ve ark., 1998; Kümmerer ve ark., 1998; Nettleton, 1998; Harada ve ark., 2000; Becher ve ark., 2003; Oğuzoğlu, 2008; Newcomer ve Givens, 2013; Yeşilbağ, 2017; Göktuna ve ark., 2017).

Yapısal olmayan proteinlerden p7 pestiviruslardaki yapısal ve yapısal olmayan genler arasındaki bağlantıyı oluşturur (Elbers ve ark. 1996). Bu proteinin işlevi tam bilinmemekle birlikte yapılan çalışmalarda iyon kanalları oluşturarak bulaşıcı virionların üretilmesinde gerekli olduğu bildirilmiştir. Ancak RNA replikasyonu için gerekli olmadığı düşünülmektedir (Harada ve ark., 2000; Lindenbach ve ark., 2007).

Pestiviruslar, konakçı dokularında meydana getirdiği enfeksiyonun oluşturduğu patogeneizde oldukça önem arz eden iki biyotipe sahiptirler. Bu biyotipler hücre kültürlerinde morfolojik bozukluk oluşturan sitopatojen (cp) ve morfolojik bozukluk oluşturmeyen nonsitopatojen (ncp) olarak adlandırılmıştır. Doğada yoğunlukla sitopatojen olmayan biyotipler yaygındır. Nonsitopatojen olan biyotip persiste enfeksiyondan sorumlu iken, sitopatojen biyotip ise enfekte

hayvanlardan pestivirusların mutasyonu yolu ile ya da doğal hayatta süperenfeksiyon yolu ile kazanılır (Oğuzoğlu, 2008; Ergün, 2012).

Moleküler seviyede analizi yapılan iki sitopatojen BDV izolatu olan BDV Cumnock ve BDV Moredun, enfekte hayvanlardan nonsitopatojen viruslar ile birlikte izole edildiği bildirilmiştir (Akman, 2019). (Şekil 2.4).

İzole edilen sitopatojen ve nonsitopatojen viruslar arasında antijenik anlamda benzerlik olduğu tespit edilmiştir. Böylece BVDV sistemine benzer şekilde, sitopatojen ve nonsitopatojen Cumnock viruslarına ek olarak sitopatojen ve nonsitopatojen Moredun virusları da virus çiftleri olarak ifade edilmiştir. Ters transkripsiyon-Polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) tekniği ile gerçekleştirilen genom analizleri, sitopatojen virusların nonsitopatojen virus mutantlarına benzediğini gösteren olgular için her çiftin üyelerinde % 99 nükleotid benzerliğini ortaya çıkarmıştır. BDV Cumnock ve Moredun dizileri BDV X818'in dizileri ile karşılaştırıldığında, yaklaşık % 90 özdeş nükleotidler, BVDV SD-1 ve CSFV Al- fort ile karşılaştırıldıklarında % 75'in altında benzer nükleotidler ortaya koymuştur (Becher ve ark., 1996; Oğuzoğlu, 2008; Ergün, 2012; Akman, 2019).

Bir araştırmada sitopatojen BDV Cumnock genomu içindeki amino asit dizilerinin sitopatojen BVDV NADL genomundaki aminosit dizisine benzer olduğu açıklanmıştır. BDV izolatları arasındaki ilişkinin derecesini belirlemek için NS2-3 bölgelerinde bulunan nükleotid dizileri araştırılmıştır. Sitopatojen BVD Cumnock ve Sitopatojen BVD Moredun RNA'larında sırasıyla 387 ve 333 nükleotid, sitopatojen BVDV NADL ise 270 nükleotid içerdiği bildirilmiştir (Becher ve ark., 1996).

Yapısal olmayan NS2-3 (p125) proteini, pestivirusun sitopatojenitesi ile ilişkisi nedeniyle dikkat çekmiştir. Nonsitopatojen (ncp) pestivirusları ile enfekte olmuş hücrelerde sadece p125 karşı antikorlar üretilir. Sitopatojen (cp) pestivirusları ile enfekte olmuş hücrelerde sadece p125 değil, aynı zamanda p125'ten türetilen iki protein, yani p54 ve p80'e karşı antikorlar üretilir. P80 proteini yüksek düzeyde korunmuş ve immünojenik bir proteindir ve tüm enfekte olmuş hayvanlarda buna karşı yüksek düzeyde antikor bulunur. P54 proteini ise izolatlar arasında değişken

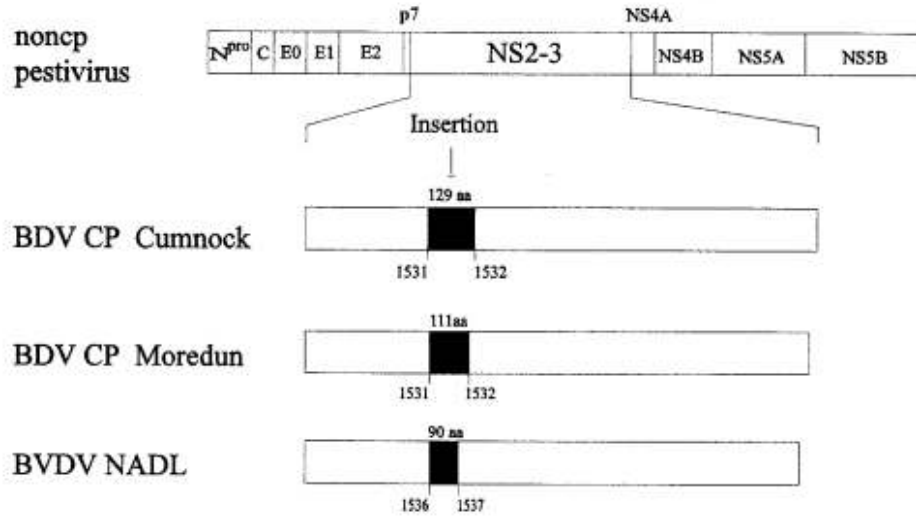
olup, buna karşı antikorlar enfekte hayvanlarda kolaylıkla tespit edilemez (Nettleton and Entrican, 1995).

Geçmiş yıllarda yapılan çalışmalar, NS3'ün N-terminal bölgesinde bulunan bir serin proteazın, pestivirus NS proteinlerinin üretilmesi için gerekli olduğunu göstermiştir. NS4A'nın NS4B, NS5A ve NS5B bölgelerinde verimli bölünme için gerekli olan bir NS3 serin proteinaz kofaktörü olarak işlev gördüğü bildirilmektedir. (Tautz ve ark., 1997; Xu ve ark., 1997).

NS4A ve NS4B viral replikasyon aşamasında görev aldıkları düşünülmektedir. Fosforile olmuş bir NS5A ve NS5'in helikaz ve polimeraz aktiviteleri viral replikasyon üzerinde etkili olup, flavivirusların yaşam döngüsünde önemli bir rol oynadığı öne sürülmektedir (Tautz ve ark., 1997; Xu ve ark., 1997; Reed ve ark., 1998).

Yapısal olmayan protein NS5B, viral replikasyon için gerekli olan RdRp (RNA bağımlı RNA polimeraz) aktivitesini gösterir (Dabramo ve ark., 2006).

Pestivirusların hücreye girişi; enfektif virionların hücre zarına bağlanması, özgül reseptörler ile etkileşimi, hücre zarının içe doğru kıvrılması ve membran füzyonunu içeren çok aşamalı süreçlerden oluştuğu bildirilmektedir. Rekombinant E2 ve Erns, hücre yüzeylerine bağımsız olarak bağlanabilse de E2, en azından pestiviruslar için hücre kültürü tropizminin ana belirleyicisidir. Pestiviruslar hücreye bağlandıktan sonra klatriin bağımlı endositoz yoluyla hedef hücrelere girer (Lindenbach ve ark., 2007).



Şekil 2.5. BDV CP Cumnock, BDV CP Moredun ve BVDV NADL ile non-cp pestivirusun genom yapısının şematik gösterimi (Becher ve ark., 1996).

2.2. Epidemiyoloji

2.2.1. Dünyadaki Durum

Pestivirusların neden olduğu “*Border Disease*” hastalığı, ilk olarak İngiltere ile Galler arasındaki sınır bölgesinden bildirilen konjenital bir koyun ve keçi hastalığıdır. Koyunlarda hastalığın prevalansı ülkeler ve bölgeler arasında %5 ile %50 arasında değişmektedir (OIE., 2017). Yapılan çeşitli araştırmalar neticesinde pestivirus enfeksiyonlarının küçük ruminantlarda varlığı İskoçya, Yeni Zelanda, İrlanda, Avustralya, Amerika Birleşik Devletleri, İsviçre, Yunanistan, Hollanda, Kanada, Norveç, Almanya, Suriye, Fransa, İsveç, Nijerya gibi dünyanın birçok ülkesinde tespit edilmiştir (Nettleton, 1990; Graham ve ark., 2001; Garcia-Perez ve ark., 2009; Danuser ve ark., 2009; Krametter-Froetscher ve ark., 2010; Ali ve ark., 2015; Silveiraa, 2018; Feknous ve ark., 2018; Dahir ve ark., 2019; Campbell ve ark., 2020; Piras ve ark., 2020; Intisar, 2020; Al-Ahmed ve Salman, 2020; Hasan, 2021).

Kuzey İrlanda'da koyun sürülerinde pestiviral enfeksiyonların prevalansını belirlemek için Ab-ELISA testi kullanılarak yapılan çalışmada 918 koyunun %5,3'ünde antikor varlığı bildirilmiştir (Graham ve ark., 2001).

Kuzey İspanya'daki 25 ticari koyun sürüsünde enfeksiyon oranı % 32 olarak bildirilmiştir (Garcia-Perez ve ark., 2009).

İsviçre'de küçük ruminant sürülerinden alınan serum örneklerinde koyunların %9'unda, keçilerin %6'sında BDV-1 antikoru tespit edilmiştir. Aynı çalışmada elde edilen serum örneklerinde koyunların %2,1'inde keçilerin %2,5'inde BVDV-1 antikoru ve koyunların %5'inde ve keçilerin %17'sinde tanımlanamamış pestivirus antikoru saptanmıştır (Danuser ve ark., 2009).

Avusturya'nın Batı bölgesinde yetiştirilen 3112 koyun ve 1196 keçiden alınan kan örnekleri, RT-PCR yöntemi ile pestivirusa özgü RNA varlığı test edilmiştir. Çalışma sonucunda koyunların pestivirus antijen prevalansı %0,32 keçilerin ise %0,08 olduğu bildirilmiştir (Krametter-Froetscher ve ark., 2010).

Sudan'ın batısında Nisan-Mayıs 2010 yılları arasında yürütülen bir çalışmada klinik belirti gösteren koyunlardan toplanan 52 kan serumu örneği C-ELISA tekniği kullanılarak incelenmiş, %48'inde pestivirus antikoru tespit edilmiştir (Ali ve ark., 2015).

Amerika Birleşik Devletleri'nde koyun popülasyonunun yüksek olduğu Wyoming eyaletinde pestivirus prevalansının belirlenmesi için 500 koyundan alınan serumlar virus nötralizasyon testi ile incelenmiştir. İncelenen serumlarda pestivirus antikor prevalansı %5,6 olup, antikorlar en sık BVDV-1'e karşı saptanmıştır (Silveiraa, 2018).

Cezayir'de koyun sürüsünde hastalığın seroprevalansını belirlemek için yapılan bir çalışmada prevalans %60,1 olarak bulunmuştur (Feknous ve ark., 2018).

Irak'ın Musul şehrinin farklı bölgelerinde yetiştirilen İvesi ırkı koyun ve Şami ırkı keçilerde yapılan bir çalışmada BDV'nin seroprevalansı koyunlarda %46,9, keçilerde ise %16 olarak saptanmış olup, BDV'nin bu bölgedeki koyun ve keçi sürülerinde oldukça yaygın olduğu bildirilmiştir (Dahhir ve ark., 2019).

Kuzey İrlanda'da koyun ve keçi sürülerinde pestivirus varlığını değerlendirmek için yürütülen bir çalışmada Ab-ELISA yöntemi kullanılarak test edilen serumların %1,7'sinde pestivirus antikoru tespit edildiği bildirilmiştir. Pozitif çıkan örneklerin Serum Nötralizan Testi ile testi sonucunda %52,6'sının BVDV'ye karşı antikor varlığı bildirilmiştir (Campbell ve ark., 2020).

İtalya'nın Sardunya bölgesinde araştırılan sürülerin %11,3'ünde pestiviruslara ait antikor varlığı tespit edilmiştir (Piras ve ark., 2020).

Suudi Arabistan'ın Hail ve Rafha bölgelerinde yetiştirilen küçük ruminantlarda Border Disease hastalığının yaygınlığını belirlemek için yürütülen bir çalışmada C-ELISA tekniği kullanılarak koyunlarda hastalığın seroprevalansı %20,7, keçilerde ise %16,3 olarak bulunmuştur (Intisar, 2020).

Irak'ın Basra eyaletinde 100 adet koyun ve 80 adet keçide yürütülen bir çalışmada ELISA yöntemi kullanılarak test edilen numunelerde Border Disease enfeksiyonunun prevalansı %21,11 bildirilmiştir (Al-Ahmed ve Salman, 2020). Irak'ın Musul şehrinde koyun ve keçilerde Border Disease hastalığının prevalansını belirlemek için gerçekleştirilen bir başka çalışmada RT-PCR tekniği kullanılarak serum örnekleri test edilmiş, koyun ve keçilerde enfeksiyonun prevalansının sırasıyla %15.9 ve %3 olduğu bildirilmiştir (Hasan, 2021).

2.2.2. Türkiye'deki Durum

Türkiye'de pestivirusların ekonomik kayıplara ve yavru atıklarına neden olduğu üzerine yapılan birçok çalışma ile virusun varlığı ortaya konulmuştur (Burgu ve ark., 1984; Burgu ve ark., 1987; Burgu ve ark., 2001; Gumusova ve ark., 2006; Gür ve ark., 2009; Gür, 2009; Hasircioğlu ve ark., 2009; Oğuzoğlu ve ark., 2009; Azkur ve ark., 2011; İssi ve ark., 2012; Ergün, 2012; Yavru ve ark., 2014; Ameen, 2016; Ural ve Erol, 2017; Hasircioglu ve ark., 2017; Şevik, 2018; Akman, 2019; İnce, 2022).

Burgu ve ark. (1984), Tahirova Devlet Üretme Çiftliği'nden alınan koyunların %21,6'sının kan serumlarında BVD virusunun NADL suşuna karşı

nötralizan antikor tespit etmişlerdir. Bu çalışma Border Disease enfeksiyonu ile ilgili seroepizootiolojik olarak yapılan ilk kayıttır.

Burgu ve ark. (1987), pestivirus enfeksiyonlarıyla ilgili daha sonraki yıllarda koyunlarda yapmış oldukları çalışmalarında atık yapan koyunlardan elde edilen kan numunelerinin %3'ünde ve aborte fötusların %10'unda pestivirus varlığını bildirmişlerdir.

2001 yılında farklı kamu işletmelerinde yetiştiriciliği yapılan koyunlarda yürütülen bir çalışmada transplasental pestivirus enfeksiyonunun sonuçları ve patogenezi araştırılmıştır. Bu amaçla koç katım tarihlerine dikkat edilerek, 174 adedi gebeliğinin 2-3. aylarında ve doğum yaptıkları gün, 487 adedi sadece doğum yaptıkları gün olmak üzere toplamda 661 koyun ve 29 koçtan kan örnekleri toplanmıştır. Ayrıca bir kısmı ikiz doğum yapan söz konusu toplam 661 koyunun doğurduğu 770 kuzudan da prekoloztral kan örnekleri toplanmıştır. Koyunlardan alınan kan örneklerinde persiste pestivirus enfeksiyonuna rastlanmamıştır. Ancak kuzuların prekoloztral kan örneklerinde antikor tespit edilmiştir. Prekoloztral kan örneklerinde antikor taşıyan yavruların doğumuna dayanılarak, fötal immun sistemin gelişimi sonrasında oluşan transplasental enfeksiyon ile ilgili kanıtlar elde edilmiştir (Burgu ve ark., 2001).

Orta ve Doğu Karadenizin iç ve kıyı kesimlerinde yürütülen bir çalışmada toplam 11 ilden toplanan 2444 adet koyun kan serumunda Bovine Viral Diarrhea Virus NADL suşu kullanılarak serum nötralizasyon testi ile pestivirus seroprevalansı araştırılmış olup, pestivirus seropozitifliği %18,94 olarak bulunmuştur. Bu çalışmada elde edilen serolojik veriler ışığında Türkiye'nin özellikle iç kesimlerinde yetiştirilen koyunlarında kıyı kesimlerinde yetiştirilen koyunlara göre pestivirusun daha yaygın olduğunu bildirilmiştir (Gumusova ve ark., 2006).

Afyonkarahisar, Konya ve Eskişehir illerinde yürütülen bir çalışmada 7 koyun sürüsünden toplam 1346 kan serum numunesi toplanmış, mikronötralizasyon testine göre, sürü bazında pestivirusa özgü antikorların %35.2 ile %78.8 aralığında olduğu tespit edilirken, toplam 1346 örneğin 933'ünün (%69.3) pestivirus için

seropozitif olduğu bildirilmiştir. Elde edilen bu veriler ışığında virusun sürülerde yüksek oranda sirkülasyonda olduğunu düşündürmektedir (Gür ve ark., 2009).

Afyonkarahisar ilinin çeşitli bölgelerinde Akkaraman ırkı koyunlardan toplanan serum örneklerinin %78,5'inin pestivirus antikoru yönünden pozitif oldukları tespit edilmiştir (Gür, 2009). Aynı ilde daha sonraki tarihlerde yürütülen bir çalışmada RT-PCR yöntemi kullanılarak ruminantlarda abortlara sebep olan Border Disease Virus (BDV) ve Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) enfeksiyonu araştırılmıştır. Atık 74 koyun fötüsünün 9'unda (%12,16) BDV RNA'sı, tespit edilmiştir. Bu çalışma pestivirusların yörede yetiştirilen ruminantların abort olaylarında önem arz ettiğini göstermektedir (Şevik 2018). Yine aynı ilde yürütülen bir başka çalışmada ise Ag-ELISA ve Ab-ELISA teknikleri kullanılarak 460 adet koyunun, %1,96'sının antijen, %24,57'sinin ise antikor varlığı açısından pozitif olduğu bildirilmiştir (İnce, 2022).

Burdur bölgesinde Ab-ELISA ve Ag-ELISA teknikleri kullanılarak atık yapmış koyun ve keçilerde sürdürülen bir çalışmada, toplanan serum örneklerinde koyunların %64,6'sının, keçilerin ise %5,7'sinin pestivirus antikorları yönünden, koyunların %0,7'sinin ise pestivirus antijeni yönünden pozitif oldukları tespit edilmiştir. Keçilerden toplanan kan örneklerinde pestivirus antijeni tespit edilememiştir. Aynı çalışmada atık kuzulardan toplanan doku örneklerinin %10,4'ünde pestivirus antijeni saptanmıştır. Bu çalışmada bölgede yetiştirilen koyunlarda pestivirus enfeksiyonun yaygın olduğu ve bu durumun gözlenen abort olgularının sebebi olduğu ifade edilmektedir (Hasırcıoğlu ve ark., 2009). Burdur ve Aydın'da yapılan başka bir çalışmada, küçük ruminant sürülerinde Ag-ELISA metodu ile enfeksiyon oranı %2 olarak kaydedilmiştir (Oğuzoğlu ve ark., 2009).

Kırıkkale bölgesinde yetiştiriciliği yapılan 25 koyun sürüsünün, Ab-ELISA testi kullanılarak incelendiği çalışmada pestivirusa karşı oluşan antikor oranı %74,5 olarak tespit edilmiştir (Azkur ve ark., 2011).

Elazığ bölgesinde yetiştirilen Akkaraman ırkı koyun sürüleri içerisinde atık yapan hayvanlardan alınan serum örneklerinin %65,7'inde BVDV antikoru, doku

örneği alınan f tuslerin %55'inde BVDV antijeni bildirilmiştir (İssi ve ark., 2012). Aynı yörede yürütülen bir başka çalışmada Ag-ELISA testi ile koyunlardan toplanan atık numunelerinde pestivirus yayılışı %22.5 tespit edilmiş olup, pestivirusların yörede yetiştirilen koyunlarda abortlarda önemli rol oynadığı bildirilmiştir (Berber ve Sözdutmaz, 2013).

Ankara'da yapılan bir çalışmada koyunlardan alınan kan serumları, Nötralizasyon İmmunperoksidaz Tekniği (NPLA) ile test edilmiş olup, serum örneklerinde pestivirus antikor varlığının %60 olduğu belirlenmiştir (Ergün, 2012).

Konya'da abort yapan koyun f tuslarında, pestivirus antijenlerinin varlığını belirlemek için yürütülen bir çalışmada immunperoksidaz (IP) yöntemi kullanılarak incelenen fötus örneklerinin %8,8'isinde pestivirus antijen tespit edilmiştir (Yavru ve ark., 2014).

Van ili ve çevresindeki koyunlarda Border Disease Virus (BDV) enfeksiyonlarının seroprevalansını belirlemek amacıyla Ab-ELISA testi ile yapılan bir çalışmada enfeksiyonun seroprevalansı %45.2 olarak tespit edilmiştir (Ameen, 2016).

Aydın ve İzmir illerinde küçük ruminant sürülerinde yapılan çalışmalarda pestivirus seropozitifliği yaklaşık olarak koyunlarda %47,59, keçilerde ise %41,40 bulunmuştur. Örneklem olarak seçilen sürülerde viremik hayvan tespit edilmemiştir. Bu oran pestivirusların bölgede yoğun bir şekilde yayıldığını ve ekonomik kayıplara neden olma potansiyeli olduğunu göstermektedir (Ural ve Erol, 2017).

Antalya Doğa Koruma ve Milli Parklar Müdürlüğü tarafından farklı dönemlerde Antalya Hayvanat Bahçesi'ne beslenme ve bakım için getirilen 5 adet yaban keçisi yavrusunun (1,5-6 aylık)  lmesinin ardından 2 hayvanın kan örneklerinde Ag-ELISA testine göre pestivirus antijeni tespit edilmiştir. Floresan antikor tekniği testine göre aynı hayvanların beyin ve karaciğer ve dalak dokusunda da pestivirus antijeni olduğu bildirilmiştir (Hasircioglu ve ark., 2017).

Samsun Veteriner Kontrol Enstitüsü'ne 2015-2017 yılları arasında İç Anadolu ve Karadeniz Bölgelerinde yer alan çeşitli illerden gelen abort yapmış koyun ve keçi fötüslerinde Ag-ELISA testi kullanılarak yürütülen çalışmada pestivirus prevalansı koyunlarda %58, keçilerde %55 olarak saptanmıştır. Ayrıca aynı çalışmada RT-PCR yöntemi ile pozitif fötüs materyallerinde gerçekleştirilen filogenetik dizi analizi sonrasında söz konusu bölgelerde farklı iki genotipin (BDV-3 ve BDV-7) sirküle olduğu da bildirilmiştir (Akman, 2019).

Doğan ve ark. (2021), Doğu Akdeniz bölgesinde keçiler üzerinde yaptıkları çalışmada % 16,7 oranında seropozitiflik tespit etmişlerdir. Araştırmacılar ayrıca farklı ırklar arasındaki seropozitifliğin istatistiksel olarak anlamlı olduğunu vurgulayarak Halep (Damascus) ırkı keçilerin daha duyarlı olduğunu bildirmişlerdir.

2.3. Bulaşma

Pestivirusların konakçı spektrumu geniş olup, sadece doğal konakçısına spesifik değildir. Evcil hayvanların birlikte yetiştirildiği yerlerde türler arası çapraz enfeksiyonun dikkate alınması önemlidir. Örneğin; BVDV yalnız sığırlarda enfeksiyon oluşturmayıp, koyun, keçi, domuz, geyik ve zürafalarda, BDV enfeksiyonu ise hem kendi konakçısı olan küçük ruminatlarda, hem de domuz ve vahşi ruminantlar gibi diğer hayvan türlerinde de enfeksiyon oluşturabilmektedir. Karaca, alageyik, kızılgeyik gibi serbest yaşayan türlerden de virus izole edilmiştir (Nettleton, 1987; Garcia-Perez ve ark., 2009; Pestil, 2014). Koyun ve keçilerin serbest yaşayan geviş getiren hayvanların bulunduğu bölgelerde otlatılması sonucu bu türler birbirlerini enfekte edebilmektedir (Nettleton, 1987).

Pestivirus enfeksiyonlarının bulaşması vertikal ve horizontal nakil ile olmaktadır. Enfeksiyonun epidemiyolojisinde özellikle vertikal nakil önemli rol oynamaktadır. Virusun vertikal geçişi plasenta yoluyla olur. Bu durum hayvanlar için oldukça önemlidir. Gebeliğin başlarında fötüsler gelişmemiş bir immün sisteme sahiptir. Bu fötüsler plasenta yoluyla enfekte olurlar. Pestiviruslar plasentayı geçerek embriyo veya fötüsü enfekte etme potansiyeline sahiptir. Bu hayvanlar doğduklarında persiste enfekte dirler. Persiste enfekte yavrular hastalığın kaynağıdır.

Bu hayvanlar hayatları boyunca viremik olup sürekli etrafa virus saçarlar (Gardiner ve Barlow, 1981; Göktuna ve ark., 2017; Akman, 2019).

Pestivirusler dış ortam şartlarına oldukça dayanıksız olup, konak dışında uzun süre canlılığını sürdüremez. Virus bulaşmasının büyük oranda PI (persiste enfekte) hayvanlar tarafından kaynaklandığı bildirilmektedir (Nettleton ve Entrican, 1995).

Horizontal bulaşmada virus ekstret, sekret (gözyaşı, burun akıntısı, sperma, aborte fötüs, plasenta, idrar, dışkı vs.) ve kontamine gıdalar vasıtasıyla akut hasta ve persiste enfekte hayvanlardan duyarlı konakçılara kolayca taşınmaktadır. Burun akıntılarında virus yükünün yüksek olduğu bildirilmiştir. Enfeksiyona yakalanmış koçların spermasında yüksek miktarlarda virus bulunduğu belirlenmiştir. Bu gibi enfektif hayvanların üreme programlarından kesinlikle çıkarılması gerekmektedir. Sığırların koyunlarla yakın temasta bulunması durumunda bulaşmada sebep olabileceği ifade edilmektedir. Sığır ve koyunlar arasında karşılıklı etkenin nakli bildirilmesine rağmen, akut enfekte keçilerden diğer türlere enfeksiyonun nakli bildirilmemiştir. Fakat persiste enfekte hayvanlar ile birlikte keçiler aynı ortamda olduğu zaman, çok kolay enfekte olabilmektedirler (Nettleton ve Entrican, 1995; Oğuzoğlu, 2008; Pestil, 2014).

Kapalı alanlarda yoğun olarak yetiştirilen koyunlarda PI hayvanlardan yayılma daha kolay meydana gelmektedir (Nettleton, 1998).

Border Disease Virus enfeksiyonunun göz ardı edilemeyecek bir diğer kaynağı, pestivirus ile kontamine olmuş modifiye canlı virus aşılardır. Modifiye edilmiş canlı virus aşıları koyun, sığır veya domuz hücre kültürlerinde ve bu türlerden elde edilen serum eklenmiş vasatlarda üretilmektedir. Bu sebeple pestivirus yönünden negatif serum ve hücre kullanımı enfeksiyonun kontrol altına alınmasında önemlidir (Nettleton, 1987). Geçmişte koyunlara uygulanan kontamine koyun çiçeği ve orf virusu aşıları, pestivirus enfeksiyonuna neden olduğu bildirilmiştir (Nettleton ve Entrican, 1995).

Deneyisel koşullar altında virus, kanla beslenen *Haematopota pluvialis* adlı sinek türünden izole edilmiş, bu durum virusun bulaşmasında vektörlerinde rol oynayabileceği şeklinde değerlendirilmiştir (Nettleton ve Entrican, 1995).

2.4. Klinik ve Patogenez

Pestiviruslar enfeksiyonun seyri ve patogenezinde oldukça önemli olan iki biyotipe sahiptirler. Bunlar; hücre kültüründe morfolojik değişimler oluşturarak üreyen sitopatojen (cp) biyotip ve herhangi bir morfolojik değişiklik oluşturmadan üreyen sitopatojen olmayan (ncp) biyotiplerdir. Sitopatojen olmayan biyotipler, doğada % 95 oranında yaygındır. Her iki biyotipin akut, konjenital ve kronik form şeklinde seyreden klinik tablonun oluşmasında etkin role sahip olduğu bildirilmiştir (Nettleton, 1990; Burgu ve ark., 2001; Oğuzoğlu, 2008; Pestil, 2014).

Fötal enfeksiyonun şiddeti, virusun biyotipi ve dozuna bağlıdır, ancak en önemlisi enfeksiyonun meydana geldiği fötal gelişim evresidir. Fötüsün immünolojik yeterlilik kazandığı yaş, virusun dağılımını ve kalıcılığını belirlemede kritik öneme sahiptir ve bu da fötal hasarın boyutunu etkilemektedir (Nettleton, 1987; Oğuzoğlu, 2008).

2.4.1. Fötal Enfeksiyon

Koyun ve keçilerde plasenta syndesmo-chorioallantoic, villous cotyledonary tiptedir. Koyun plasentası histolojik yapısı gereği normal koşullarda maternal immünoglobulinin fetüse transferine izin vermez (Sammin ve ark, 2009). Koyun blastosistleri, embriyonun uterus mukoza yüzeyine transplantasyonu öncesinde (16 günlük süreç), pestivirus enfeksiyonu oluşmasını engelleyebilecek yapıya sahiptir. Benzer bir durum keçi blastosistleri için de geçerlidir. Embriyo bu preimplantasyon periyodunda, uterus mukozasına tam anlamıyla tutunmamaktadır. Bu süreçte henüz zona pellucida yapısı bozulmadığından fötal enfeksiyonun oluşmadığı düşünülmektedir (Oğuzoğlu, 2008).

Koyun fötüsü, antijenik bir uyarana ilk olarak gebeliğin yaklaşık 60 ile 80 günü arasında yanıt verebilir (Nettleton, 1990). Eğer gebelik esnasında meydana gelen bu

pestivirus enfeksiyonu immün sistem gelişimini tamamlamamış (immature) olan yavruya transplasental yolla aktarılırsa (koyunda gebeliğin 60-80. güne kadar, keçilerde 80-100. güne kadar) yavru da immüntolerans gelişir. Bu şekilde persiste enfekte olarak doğan yavrular, hayatları boyunca virus rezervuarı olarak enfeksiyonun devamlılığından sorumludur. Bu hayvanların antikor testleri negatiftir. Persiste enfekte olan hayvanların yaşam süresi en fazla 5 yıl olarak ifade edilmektedir. Persiste enfekte hayvanlar, ömürlerinin herhangi bir döneminde sitopatojen bir biyotiple karşılaşırlarsa, ölüme sebep olan Mukozal Hastalık (Mucosal Disease) şekillenmektedir (Oğuzoğlu, 2008).

Persiste enfekte hayvanlarda generalize bir enfeksiyon tablosu gözlemlenir. Retiküloendotelial sistem hücreleri, epitelyal ve endotelial hücreler gibi birçok hücre ve organlarda virus tespit edilmektedir (Avcı, 2010).

Gebe koyunlarda immün sistemin gelişmesi öncesi oluşabilecek transplasental enfeksiyon, embriyonun resorbsiyonu sonucu erken ölümler, corpus luteumun gerilemesi nedeniyle gebelikte östrus başlangıcı, fötusun mumifikasyonu veya ikizlerden birinin resorbsiyonu, kongenital anomalili yavru doğumları ve normal görünümlü yavru doğumları ile sonuçlanabilmektedir (Oğuzoğlu, 2008).

Enfekte doğan yavru da görülen klinik belirtiler çok değişkendir. Etkilenen kuzular genellikle küçük ve kaşektiktir, yaşama güçleri zayıftır, çoğu ayakta duramaz. Tiroid hipofonksiyonu sebebiyle kıl foliküllerinde meydana gelen anormallik (anormal kahverengi ve siyah pigmentasyon) sonucu özellikle sırt ve boyun bölgesinde görülen yapağı, köpek kılı görünümünde (Hairy Shaker Disease, (Resim 2.2)), karışık ve dayanıklılığını kaybetmiş bir durumla kategorize olmaktadır. Merkezi sinir sistemi bulguları; titreme, arka bacak kaslarının şiddetli ritmik kasılmaları, baş, kulaklar ve kuyruğun titremesi, diş gıcırdatma, sallantılı yürüyüş, körlük, arthrogryposis, hydranencephali, beyincik hipoplazisi ve tiroid hipofonksiyonu sebebiyle oluşan hipomyelinasyon şeklinde görülmektedir. Ayrıca timusta atrofi, zayıf gelişmiş lenf nodülleri, lenfosit düşüklüğü ve iç organlarda histopatolojik değişiklikler kaydedilmiştir. Persiste enfekte koçların genellikle

kalitesi düşük enfekte spermaya ve düşük fertilititeye sahip oldukları bildirilmiştir (Nettleton, 1987; Nettleton ve ark., 1998; Oğuzoğlu, 2008; Ural ve Erol, 2017).

Gebeliğin 60-80. günlerinde oluşan fetal enfeksiyonun nasıl sonuçlanacağını önceden tahmin edilmesi zordur. Çünkü fötusun immun sisteminin, bireysel farklılıklara bağlı olarak bahsedilen tarihlerden önce ya da sonra gelişimi söz konusu olmaktadır. Bazı kuzular persiste enfekte olarak viremik doğar ve precolostral kanda antikor mevcut değildir. Bazı kuzular ise precolostral kanda antikor taşıyarak doğmaktadırlar (Nettleton, 1990; Burgu ve ark., 2001). Gebeliğin bu dönemlerinde oluşan enfeksiyonda enfektif koyunlardan doğan kuzularda iskelet-kas sisteminde anomaliler ve sinir sisteminde serebellar hipoplazi, displazi, hydroencephali, porencephali gibi bozukluklar görülebilmektedir (Barlow ve Patterson, 1982; Roeder ve ark., 1987; Nettleton and Entrican, 1995).

Gebeliğin 80. gününden sonra oluşabilecek bir enfeksiyonda fötus immun yanıt oluşturma yeteneği kazanır. İmmun sistemi gelişmiş bir fötusun enfeksiyonunda oluşan immun yanıt sonucunda virus elimine edilir. Fetal ölüm nadirdir. Kuzular genellikle normal görünüşte doğarlar. Bu dönemde enfeksiyona yakalanmış kuzularda virus bulunmaz, ancak precolostral kan numunelerinde antikor varlığı tespit edilebilir (Nettleton and Entrican, 1995; Burgu ve ark., 2001).

2.4.2. Postnatal Enfeksiyon

Doğum sonrası dönemde kuzu ya da koyunlarda, her iki biyotipe ait pestiviruslar ile meydana gelen enfeksiyonlar çoğunlukla subklinik ya da geçici ateş ve leukopeni ile karakterize, hafif klinik bulgular ile gelişen akut enfeksiyon şeklindedir. Enfeksiyonun bu seyrinde geçici bir viremi tablosu gözlemlenir ve 11. ve 14. günlerde etkene özgü antikor yanıtı gelişmesini takiben virus vücuttan elimine edilir (Nettleton, 1987; Nettleton, 1990). Yaş, bakım ve besleme gibi özelliklere göre değişse de bazı BDV izolatlarının postnatal enfeksiyonlarda yüksek ateş, şiddetli ve uzun süren leukopeni, iştahsızlık, konjunktivit, burun akıntısı, dispne ve ishal ile genç kuzularda %50 ölüme neden olduğu bildirilmiştir (Nettleton ve ark., 1998). Ayrıca enfekte kuzularda meydana gelen nötrofil disfonksiyonu ve periferik kan

mononükleer hücrelerinin apoptozu gibi diğer immünolojik bozukluklarla ilişkili ciddi immünosupresyon durumu oluşabilir. Pestivirusların neden olduğu immünosupresyon, hayvanın diğer hastalık etkenlerini kan ve diğer dokularından elimine olmasını engeller (Toplu ve ark., 2012). Hastalığı atlatan koyunlarda virusun uterusu 32 güne kadar varlığını sürdürebildiği bildirilmiştir (Gardiner ve Barlow, 1981).

Ruminantlarda plasentanın histolojik yapısından dolayı antikor geçişi olmamaktadır. Enfekte olmuş annenin immun sistemi viral etkeni kendi dokularından elimine edebilmektedir. Ancak virusun plaseenta yoluyla fötüsü enfekte etmesi durumunda, anneden antikor geçişi olmadığı için fötüs annedeki immun cevaptan etkilenmemektedir (Sammin ve ark., 2009; Pestil, 2014).

Fötal ölüm, gebeliğin herhangi bir dönemde meydana gelebilir. Erken dönemde meydana gelen ölümler plaseenta tarafından fötüsün rezorbe edilmesi nedeniyle fark edilmesi güçtür. Bu durum vücut kondisyonu ve beslenmesi iyi olan gebe koyunlarda herhangi bir klinik belirtiyeye neden olmaz (Nettleton ve ark., 1998).



Şekil 2.6. Hairy Shaker görünümlü kuzu (ICTV, 2020b).

2.5. Teşhis

2.5.1. Klinik Teşhis

Border Disease Virus enfeksiyonunun teşhisinde klinik bulgular önem taşımaktadır. Sürü içerisinde gözlemlenen yavru atma, kongenital anomalili yavru doğumu, erken ölümler, döl tutma problemleri, doğan yavruarda gelişme geriliği, merkezi sinir sistemi bulguları gibi değişiklikler pestivirus enfeksiyonunu akla getirmelidir. Ayrıca pestivirus enfeksiyonları *Chlamydiosis*, *Listeriosis*, *Toxoplasmosis* ve *Leptospirosis* gibi sürüde yavru atıklarına sebep olan enfeksiyonlar ile karışabilmektedir (Oğuzoğlu, 2008; Avcı, 2010).

2.5.2. Laboratuvar Teşhisi

Pestivirus enfeksiyonunun laboratuvar tanısı, virusun veya viral bileşenlerin saptanmasına veya virusa karşı serolojik bir yanıtın tespitine dayanır. Enfeksiyonun teşhisi için Office International des Epizooties (OIE) tarafından belirlenmiş herhangi bir referans laboratuvarı bulunmamaktadır. Virus tespiti için en hassas kanıtlanmış yöntemlerden biri etken izolasyonudur (Nettleton ve Entrican, 1995; OIE, 2017).

2.5.2.1. Direkt Teşhis

Virolojik teşhiste; canlı hayvanlardan defibrine kan örneği (özellikle lökosit), ölmüş hayvanların dalak, tiroid, böbrek, beyin, lenf yumrusu ve bağırsak dokuları en iyi marazi maddelerdir (Nettleton ve ark., 1998; OIE, 2017). Bu amaçla virus izolasyonu ve viral nükleik asit tespitini hedefleyen yöntemler kullanılmaktadır. Virus izolasyonu gerçekleştiren laboratuvarlarda pestivirus içermeyen duyarlı hücreler ile fetal dana serumu kullanılmaktadır. Ayrıca virus koyun hücre kültürlerinde de (böbrek, testisler ve akciğer) izole edilebilir. İmmunperoksidaz ve immunfloresan testlerinin hücre kültüründe virus izolasyonunun ve identifikasyonunda kullanıldıkları rapor edilmiştir. Ters transkripsiyon-polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) da koyun pestivirus enfeksiyonlarının moleküler tanısında kullanılmaktadır (Carlsson ve Belak, 1994; Nettleton ve ark., 1998, Willoughby ve ark., 2006). Ters transkripsiyon-polimeraz zincir reaksiyonu (RT

PCR) tekniğinde virus nükleik asidin tespiti için en iyi dokuların beyin, dalak ve barsak lenf nodülü, tiroid bezi ve böbrek gibi dokular olduğu bildirilmiştir (Garcia-Perez ve ark., 2009). Nested ve real time RT-PCR teknikleri persiste enfekte hayvanların tespitinde kullanımı hızlı ve ayırıcı teşhis için avantajlı olduğu bildirilmektedir (Willoughby ve ark., 2006). Enfekte hayvanların beyin, ağız mukozası, bağırsak ve akciğerinden alınan örneklerden virus antijeninin immünohistokimyasal olarak tespit edildiği bildirilmiştir (Toplu ve ark., 2012). Ek olarak Immunhistokimyasal test, kulak çentiği numunelerinde bulunan viral glikoprotein Erns'yi saptayarak BVDV ile persiste enfekte hayvanların tespitinde başarıyla kullanılmaktadır (Bauermann ve ark., 2014). Yine enfeksiyonun teşhisinde kullanılan Ag-ELISA testi, IHC testine kıyasla çok daha kısa bir sürede gerçekleştirilebilir bir metottur. PI hayvanların daha erken sürede saptanmasına olanak sağlar. Ancak incelenen numunede antikorlar mevcut ise Ag-ELISA yanlış negatif sonuçlar verebileceği bildirilmiştir. Bundan dolayı maternal antikorlara sahip genç hayvanlarda test uygulanırken bu durum dikkate alınmalıdır (Mozaffari ve ark., 2014; Ahmad ve ark., 2014).

Viremik koyunlarda pestivirus antijen tespiti için Ag-ELISA kullanılmaktadır. Koyun ve sığırlarda bir çift monoklonal antikor kullanılarak test modifiye edilmektedir. Testte yaygın olarak yıkanmış ve deterjanla parçalanmış lökositler kullanılarak, enfekte viremik koyunlar belirlenmektedir. Duyarlılık, virus izolasyonuna yakındır ve sürü taramaları için pratik bir yöntemdir. Ayrıca antijen ELISA laboratuvarında yüksek maliyetli olmayan hızlı ve kolay bir metottur (Nettleton ve ark., 1998; Garcia-Perez ve ark., 2009). Pestivirusların tespiti için elektron mikroskobu da kullanılabilir (Avcı, 2010).

2.5.2.2. İndirekt Teşhis

Pestiviruslara karşı oluşan spesifik antikorların tespit edilebilmesi için virus nötralizasyon testi ve indirekt ELISA sık kullanılan yöntemlerdir. İndirekt ELISA virus izolasyonundan daha etkilidir, ancak 2 aylıktan küçük kuzularda yanlış negatif sonuçlar verebilir. Daha az duyarlı olan Agar jel immünodifüzyon testi (AGID)

tanıda önerilmemektedir (Nettleton ve ark., 1998; Valdazo-Gonzalez ve ark., 2006; OIE, 2017).

2.6. Koruma ve Kontrol

Küçük ruminant yetiştiriciliğinde yüksek oranda ekonomik kayıplara sebep olan BDV hastalığından korunmak için, gebeliğin başlarında hayvanların hastalığa yakalanmasının önlenmesi, sürü bağışıklığının oluşturulması, persiste enfekte hayvanların virolojik taramalarla belirlenerek sürüden uzaklaştırılması, hasta ve ölü kuzu ve oğlakların imha edilmesi, atık yapan ve anomalili yavru doğuran hayvanların kesime sevk edilerek sürüden uzaklaştırılması tavsiye edilen önlemlerin başında gelmektedir. Ancak sözü edilen yöntemler ekonomik nedenlerden dolayı sadece küçük sürülerde uygulanabilmektedir. Hastalığın sağaltımı mümkün görülmemektedir (Gül, 2002; İssi ve ark., 2012).

Border Disease Virus enfeksiyonunun aşısı ile mücadelesi incelendiğinde, sadece Avrupa’da üretimi yapılan bir ticari aşı olması, bu aşı haricinde BDV aşısının bulunmaması ve BVDV aşıları ile aşılanan küçük ruminantlarda tam bir korunma sağlanmaması gibi durumlar mücadeleyi kısıtlamaktadır. Aşılamamanın amacı, gebelik öncesinde dişilerin immun sisteminin aktifleştirilmesi ile transplasental enfeksiyonun önüne geçebilmektir (Oğuzoğlu, 2008). Koçlarda persiste enfeksiyon az olmakla beraber, bu hayvanlarda da BDV enfeksiyonu görülmektedir ve bu hayvanlar enfeksiyonun bulaşmasında önemlidirler. Koçlar, spermaları ile yüksek miktarda virus yaydıkları için enfeksiyonun taşınmasında önemli yer tutarlar. Doğal aşımında veya donör olarak kullanılan koçların kan ve semen örnekleri alınarak, virus izolasyonu ya da RT-PCR tekniği kullanılarak BDV nükleik asit varlığı yönünden kontrol edilmelidirler (Feknous, 2018). Koyun hücreleri yada koyun serumları kullanılarak üretimi yapılan canlı virus aşılarının, pestivirus ile kontaminasyon olma riski sebebiyle bu enfeksiyonun oluşumunda potansiyel tehlike olabileceği de göz ardı edilmemelidir (Thabti ve ark., 2005).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Araştırma Materyali

Yürütülen bu çalışmada kullanılan örnekler, Burdur ili merkezine bağlı küçük ruminant yetiştiriciliğinin yoğun olarak yapıldığı köylerde bulunan işletmelerden toplandı. Bu amaçla küçük ruminant işletmelerine Nisan 2021–Nisan 2022 tarihleri arasında ziyaretlerde bulunuldu. Çalışmanın yürütüldüğü köylerde bulunan sürülerin tamamından numune alınması bütçe kapsamında mümkün olmadığı için işletme sahiplerinden alınan anamnez bilgileri doğrultusunda hayvan sürüleri içerisinde yavru atma geçmişi ve anomalili yavru doğuran hayvanlardan numuneler toplandı. Örneklerin toplanmasında Tarım ve Orman Bakanlığı hayvan bilgi sistemi veri tabanında kayıtlı olan kulak küpe numarası ile tanımlı hayvanlar kullanıldı.

Çalışmada kullanılacak örnekler için Burdur İl Tarım ve Orman Müdürlüğü (sayı: 1705041, tarih: 15.06.2021) ve Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan (Karar no: 787, tarih: 13.07.2021) gerekli onaylar alınmıştır.

Çalışmanın yürütüldüğü toplam 6445 küçük ruminant bulunan 37 işletmeden hayvan sahiplerinin bilgileri doğrultusunda abort yapmış yada geçmişte abort problemi olan toplam 100 hayvandan kan ve kulak çentiği numunesi alındı. Numune alınan hayvanların tür, yaş ve cinsiyete göre dağılımları Tablo 3.1’de ve işletmelerdeki toplam hayvan sayısı, numune alınan hayvan sayısı ve numune alınan işletme sayısı Tablo 3.2’de verilmiştir. Numunelerin alımı esnasında hayvanların ait oldukları işletme, hayvanın türü, kulak küpe numarası, cinsiyet, yaş bilgileri kaydedildi. İşletmelere ziyaret sırasında işletme sahiplerinden işletmenin tipi, mevcut hayvan sayısı, işletmede büyükbaş hayvan bulunup bulunmadığı, yakın bir zamanda hayvan hareketinin olup olmadığı (alım-satım vs.), mevcut hayvanlarda başka hastalık semptomları olup olmadığı, hayvanların meraya çıkıp çıkmadığı, aynı tür yada başka bir tür hayvan ile aynı merayı paylaşp paylaşmadığı gibi bilgiler epidemiyolojik olarak değerlendirilmek üzere alındı. Örneklerin analizleri Burdur

Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı laboratuvarında gerçekleştirildi.



Şekil 3.1. Çalışmada örnekleme yapılan bir koyun sürüsü



Şekil 3.2. Çalışmada örnekleme yapılan bir keçi sürüsü

Tablo 3.1. Kan ve Kulak çentiği numunesi alınan küçük ruminantların tür, yaş ve cinsiyete göre dağılımları

Yaş	1-3				≥ 4				Toplam
Hayvan Türü	Koyun		Keçi		Koyun		Keçi		
Cinsiyet	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	
	1	41	0	13	0	32	0	13	100

Tablo 3.2. İşletmelerdeki toplam hayvan sayısı, Numune alınan hayvan sayısı ve Numune alınan işletme sayısı

	Koyun	Keçi	Toplam
İşletme Sayısı	26 (%70)	11 (%30)	37
Numune Alınan Hayvan Sayısı	74 (%74)	26 (%26)	100
Toplam Hayvan Sayısı	4167 (%65)	2278 (%35)	6445

Tablo 3.3. Çalışma bölgesinde Numune alınan hayvanların Toplam hayvan sayısına oranı

	Çalışma Bölgesinde İşletmelerdeki Toplam Hayvan Sayısı		Numune Alınan Hayvan Sayısı		Numune Alınan Hayvanların İşletmelerdeki Toplam Hayvan Sayısına Yüzdesi
	Koyun	Keçi	Koyun	Keçi	
Merkez BURDUR	4167	2278	74	26	% 1,55

3.1.2. Kan ve Kulak çentiği Örnekleri

3.1.2.1. Kan Örnekleri

Tam kan (lökosit) elde etmek amacıyla kan örnekleri hayvanların vena jugularisinden holder kullanılarak içinde EDTA ihtiva eden tüplere alındı. Alınan kan örnekleri soğuk zincirde laboratuvara getirildi (+4 °C’de buz akülü termos ile). Örnekler 3000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilip santrifüj sonrasında tüpte üç tabakaya ayrılan (en alt kısımda eritrosit, orta kısımda lökosit ve en üst kısımda plazma) kandan, otomatik pipet ile üstteki plazma kısmı uzaklaştırıldıktan sonra ortada beyaz bulutlanma şeklinde “Buffy Coat” olarak adlandırılan lökosit tabakası

pastör pipeti ile çekildi. Elde edilen lökosit tabakası steril eppendorf tüplerine aktarılıp test işlemi yapılıncaya kadar -20 °C’de muhafaza edildi.

3.1.2.2. Kulak çentiği Örnekleri

Hayvanların kulak bölgesi alkol ile dezenfekte edildikten sonra özel kulak çentiği pensi ile kulağın alt kısmının tüysüz bölgesinden yaklaşık 1 cm² üçgen deri parçası kesilerek PBS (pH 7,4) içeren steril eppendorf tüplerine alınarak, soğuk zincirde laboratuvara getirildi (+4 °C’de buz akülü termos ile). Kulak çentikleri test işlemine kadar -20 °C’de muhafaza edildi. Özel kulak çentiği pensi her bir hayvandan kulak çentiği alınmadan önce alkol ile dezenfekte edildi.

3.2. Yöntem

3.2.1. Pestivirus Antijenlerinin Ag-ELISA Testi ile Belirlenmesi

Araştırmada, işletmelerde yetiştirilen koyun ve keçilerden toplanan toplam 100 adet tam kan (lökosit) ve kulak çentiği numunesinde pestivirus antijeninin tespiti amacıyla Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) Antigen Test Kit/Serum Plus (IDEXX BVDV Ag Serum Plus, Cat. No: 06-43860-16, United States) kullanılmıştır. Örnekler ticari kiti üreten firmanın önerdiği talimata göre pestivirus antijenleri yönünden test edildi. IDEXX BVDV Ag/Serum Plus, hayvanlarda serum, plazma, tam kan ve kulak çentik dokusundaki BVDV antijenlerini (Ag) tespit etmek için tasarlanmış immunoenzimatik bir testtir. Test pleytinin anti-BVDV (E^{ms}) monoklonal antikorlarla kaplı her bir kuyucuğuna kontrol ve örnekler konulur. Örneklerde antijen varlığı durumunda monoklonal antikorlara bağlanır. Örneklerin inkübasyonundan ve yıkamadan sonra kuyucuklara konjugat eklenir. BVDV antijen ve spesifik antikor kompleksini konjugat tarafından tespit edilir. Daha sonra, bağlanmamış konjugat yıkanarak uzaklaştırılır ve bir substrat solüsyonu eklenir. Substrat, antijen-antikor kompleksini mavi renk oluşumu vasıtasıyla gözle görülür hale getirilir. Durdurma solüsyonunun kuyucuklara eklenmesi sonrasında oluşan sarı renk absorbans bir spektrofotometre kullanılarak ölçülür.

Testin uygulaması belirli aşamalarla gerçekleşmektedir. Testte başlamadan önce kiti üreten firma tarafından sağlanmayan malzemeler hazırlanarak bütün kimyasallar oda ısısına getirildi ve vortex ile homojenize edildi. Test uygulamasında kullanılacak olan “Wash Solution” 1/10 oranında distile su ile sulandırıldı.

Dondurularak saklanan kulak çentiği örneklerinin bulunduğu eppendorflara test uygulamasından 24 saat önce 200 µl IDEXX “Ear Notch Soaking Buffer” eklenerek 18-26 °C'de bekletildi. Doku örneği solüsyonla tamamen kaplandı. Buharlaşmayı önlemek için tüpler kapalı bir şekilde inkübe edildi. Test esnasında örneklerden 50 µl kullanıldı.

Tam kan örneklerinden ve kulak çentiklerinden elde edilen süpernatant'ta pestivirus antijenini belirlemek amacıyla “E^{rns}” (yapısal olan protein) gen bölgesini hedef alan spesifik monoklonal antikorlarla kaplanmış 96 kuyucuklu ELISA pleytleri kullanıldı.

Pleytlerin herbir kuyucuğuna 50 µl ‘Detection antibody’ konuldu. A1 kuyucuğuna 50 µl pozitif kontrol ve B1 kuyucuğuna 50 µl negatif kontrol koyuldu. Diğer her bir kuyucuğa örneklerden 50 µl konuldu. Ardından mikrolept yavaşça sağa ve sola sallanarak gözlerdeki solüsyonların karışması sağlandı. Bu işlemten sonra pleytlerin üzeri folyo kaplanarak 37°C’de 2 saat inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon işleminin ardından pleytler ters çevrilerek kuyucuklardaki solüsyon döküldü. Tüm kuyucukların herbiri 500 µl solüsyon denk gelecek şekilde daha önce hazırlanmış ‘Wash Solution’ ile 5 kez yıkandı. Pleytler ters çevrilerek kurutma kağıdı üstüne hafifce vuruldu. Kuyucuklar içerisinde herhangi bir kalıntı kalıp kalmadığı kontrol edildi.

Pleytlerin her bir kuyucuğuna kit içerisinde bulunan konjugattan 100 µl koyuldu ve pleytler folyo ile sarılarak oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon işleminin ardından Pleytler ‘Wash Solution’ ile 3 kez yıkandı.

Tekrar yıkama işleminin ardından tüm kuyucuklara 100 µl TMB Substrate N12 ilave edildi. Pleytler folyoya sarılarak 10 dakika inkübasyona bırakıldı.

İnkubasyon sonrasında kuyucuklar boşaltılmadan her kuyucuğa 100 µl stop solüsyonu eklendi. Pleytler vakit kaybedilmeden değerlendirmeye alındı.

ELISA okuyucu kullanılarak 450 nm dalga boyunda pleytlerdeki örneklerin ve kontrollerin OD değerleri okutuldu. Bu amaçla ticari kitte aşağıda belirtilen formüller kullanılarak pozitif ve negatif sonuçlar belirlendi.

$$PC\bar{x} = PC1 A(450)$$

$$NC\bar{x} = NC1 A(450)$$

Validasyon kriterleri: $NC\bar{x} \leq 0,250$ $PC\bar{x} - NC\bar{x} \geq 0,150$

Her bir örneğin OD (S-N) değerleri tespit edilerek örneklerdeki antijen varlığı veya yokluğu aşağıdaki gibi hesaplandı;

$$S-N = \text{Sample A}(450) - NC\bar{x}$$

Tam kan örnekleri için:

$S-N \leq 0,300$ olan örnekler negatif, $S-N > 0,300$ olan örnekler pozitif olarak değerlendirildi.

Kulak çentik örnekleri için:

$S-N \leq 0,200$ olan örnekler negatif, $0,200 < S-N \leq 0,300$ olan örnekler şüpheli,

$S-N > 0,300$ pozitif olarak değerlendirildi.

3.2.2. Pestivirus Viral Nükleik Asitin RT-PCR Testi ile Belirlenmesi

3.2.2.1. Çalışmada Kullanılan Malzemeler

Pozitif Kontrol:

PCR optimizasyonu için pozitif kontrol olarak Bovilis BVD aşısından elde edilen viral RNA'lar kullanıldı.

Araştırmada Kullanılan Primer Çiftleri:

Tez çalışmasında kullanılan primer çiftleri Tablo 3.4'de gösterilmiştir.

Tablo 3.4. Pestivirus için kullanılan primerler ve ampikon uzunlukları (Vilcek ve ark., 1994).

Etken	Primer Çiftleri (5'-3')	Ampikon Uzunluğu	Hedef Bölge
324	ATG CCC TA GTA GGA CTA GCA	288 bp	5' UTR
326	TCA ACT CCA TGT GCC ATG TAC	288 bp	5' UTR

RNA Ekstraksiyon Kiti:

Kan ve Kulak çentiği örneklerinden High Pure Viral Nükleik Asid Kit (REF No: 11858874, Roche, Germany) kullanılarak, üretici firmanın önerileri doğrultusunda RNA'lar elde edildi. Kitin içeriği;

- Wash Buffer
- Proteinase K
- Poly (A)
- Binding Buffer
- Elution Buffer
- Inhibitor Removal Buffer

PCR Isı Döngü Cihazı: Applied Biosystems SimpliAmp, Cat. No: A24811, Singapur

Jel Elektroforez Cihazı: EV1450 Consort, Belgium

Jel Görüntüleme Cihazı: Biorad Gel Doc Go Imaging System, USA

Agaroz Jel: Norgen, CAS # 9012-36-6 1/50 sulandırılmış TAE (Tris Asetik Asit-EDTA) solüsyonu ile % 1,1'lik hazırlandı.

Agaroz Jelin Hazırlanışı

Yüzde 1,1'lik agaroz jel hazırlamak için beher içerisine 0.55 gr agaroz ilave edilip, üstüne 50 ml 1X TAE buffer eklendi. Agaroz jel mikrodalga fırında 1-2 dk ısıtılarak çözdürüldü ve ardından 50-55 °C'ye kadar soğutuldu. Soğutulan jelin üzerine 0,5 µg/ml oranında Xpert Green DNA Stain ilave edildi. Tarak yerleştirilmiş olan jel taşıyıcısının üzerine hazırlanan bu karışım döküldü. Agaroz jelin +4 °C'de Yaklaşık 20 dakika donması için beklendi.

TAE Buffer: (50X) 1/50 oranında distile suyu ile sulandırıldı.

Grisp GRS DNA: 6x Loading: QLB01.0001

Plus Opti DNA Marker:

Jel Boyası: Grisp Xpert Green DNA Stain (20.000X) Cat. No: GS01, Portugal

One-Step RT-PCR Kiti: Grisp, Xpert One Step RT-PCR Kit GK64.0100

3.2.2.2. Viral RNA Ekstraksiyon İşlemi

Araştırmada, koyun ve keçilerden toplanan toplam 100'er adet tam kan (lökosit) ve kulak çentiği numunesinde pestivirus viral nükleik asitin tespiti için One-Step RT-PCR tekniği uygulandı. Dondurularak saklanan kulak çentiği örneklerinin bulunduğu eppendorflara test uygulamasından 24 saat önce 200 µl IDEXX “Ear Notch Soaking Buffer” eklenerek +4 C'de bekletildi. Doku örneği solüsyonla tamamen kaplandı. Buharlaşmayı önlemek için tüpler kapalı bir şekilde inkübe

edildi. Tam kan ve kulak çentik örneklerinden elde edilen süpernatantlar viral nükleik asit ekstraksiyonu için kullanıldı. Süpernatantlar High Pure Viral Nükleik Asid Kit (REF No: 11858874, Roche, Germany) prosedürüne uygun olarak total nükleik asit ekstraksiyonu için 50 µl kullanılmıştır. Numunelerden elde edilen RNA örnekleri tekrar kullanılıncaya kadar -80°C’de muhafaza edildi.

3.2.2.3. One Step RT-PCR Uygulaması

One-Step RT-PCR Kit (Grisp, Xpert One Step RT-PCR Kit, Ref: GK64.0100, Portugal) kullanıldı. Her bir örnek için steril bir ependorfa; 12,5 µl Fast PCR Master mix, forward GSP (10 p/mol) ve reverse GSP (10 p/mol) 1,5’er µl, 3 µl ekstrakte edilmiş RNA örneği, 1,25 µl RTase Mix, 2,25 µl RNase-free water eklenerek karışım hazırlandı. Plus opti DNA marker cihazı ile etkenler çoğaltıldı. RT-PCR reaksiyon evreleri Tablo 3.5’de verilmiştir.

Tablo 3.5. RT-PCR test reaksiyonunun evreleri, ısı, zaman ve siklus koşulları

Evre	Isı	Zaman	Siklus
cDNA	45 °C	13 dk.	1 kez
İlk	94 °C	2 dk.	1 kez
Denaturasyon	94 °C	1 dk.	35 kez
Bağlanma	56 °C	1 dk.	35 kez
Uzama	72 °C	1 dk.	35 kez
Son Uzama	72 °C	7 dk	1 kez

3.2.2.4. Agaroz Jel Elektroforezi

Jelin donmasının ardından takılı olan taraklar jelden çıkarıldı. Jel, taşıyıcı elektroferez tankına yerleştirildi. Bu işlemten sonra jelin üzerini örtecek şekilde 1XTAE buffer ile dolduruldu. PCR ürünleri yükleme boyası ile (6x Loading Dye, Fermentas, Litvanya) agaroz jelde kuyucuklara sırasıyla yüklendi. 288 bp Ürün büyüklüğünün yaklaşık olarak belirlenebilmesi için yükleme boyası içinde 100 bp merdiven (DNA merdiveni, Fermentas, Litvanya) solüsyonundan ilk ve son kuyucuklara 6 µl yüklendi. RT-PCR sonucunda elde edilen ürünler, içinde 100 ml TAE bulunan %1,1’luk agaroz jelde 95 voltta 1 saat yürütüldü. Spesifik bantlar Jel görüntüleme sistemi (Biorad Gel Doc Go Imaging System, USA) kullanılarak görüntülendi ve fotoğraflandı.

3.2.3. İstatiksel Değerlendirme

Verilerin analizi SPSS 3,0 paket programında gerçekleştirildi. Tanımlayıcı istatistikler (%) şeklinde gösterildi. Verilerin değerlendirilmesinde ki-kare testi kullanıldı. İstatiksel olarak anlamlı fark sınırı $p<0,05$ olarak belirlendi. Ag-ELISA ve RT-PCR yöntemlerinin pestivirus enfeksiyonu tahmininde pozitif ve negatiflik tanısı performanslarını incelemek amacıyla duyarlılık, seçicilik, pozitif prediktif değer ve negatif prediktif değer hesaplandı. Bu değerlerin hesaplanmasında RT-PCR testi referans testi olarak kabul edildi. Referans teste göre Ag-ELISA pozitif olanlara (a), yanlış pozitif olanlara (b), yanlış negatif olanlara (c), negatif olanlara (d) harfleri verildi ve aşağıdaki formüller kullanıldı.

Sensitivite (Duyarlılık) $(a/(a+c) \times 100)$

Spesifite (Özgüllük) $(d/(b+d) \times 100)$

Pozitif prediktif değer $(a/(a+b) \times 100)$

Negatif prediktif değer $(d/(c+d) \times 100)$ (Kastelic, 2006; Akkaya Doğan ve Köse, 2022)

4. BULGULAR

4.1. Klinik Bulgular

Yürütülen bu çalışmada örnek toplanan hayvan sahiplerinden alınan anemnez bilgilerinde bazı hayvanlarda yavru atma, gelişme geriliği ve erken ölümler olduğu öğrenildi.

4.2. Laboratuvar Bulguları

Burdur il merkezine bağlı küçük ruminant yetiştiriciliğinin yoğun olarak yapıldığı köylerde yürütülen çalışma süresince toplam 100 hayvandan kan ve kulak çentiği numunesi alındı. Toplanan numuneler Ag-ELISA ve One Step RT-PCR yöntemiyle analiz edildi.

4.2.1. Ag-ELISA Testi Sonuçları

4.2.1.1. Kan Örneklerinin Ag-ELISA Testi Sonuçları

Çalışmada 74'ü koyun 26'sı keçi olmak üzere toplam 100 küçük ruminantdan alınan tam kan (lökosit) numuneleri Ag-ELISA ile incelenmiş olup, sadece 3 adedi (%3) pestivirus antijen varlığı yönünden pozitif bulundu. Numunelerin 97 adedi ise pestivirus antijen varlığı yönünden negatif bulundu. Keçilerde pestivirus antijen varlığı yönünden pozitiflik oranı %11,5 (3/26) iken koyunların hiçbirinde pestivirus antijen varlığına saptanmadı.

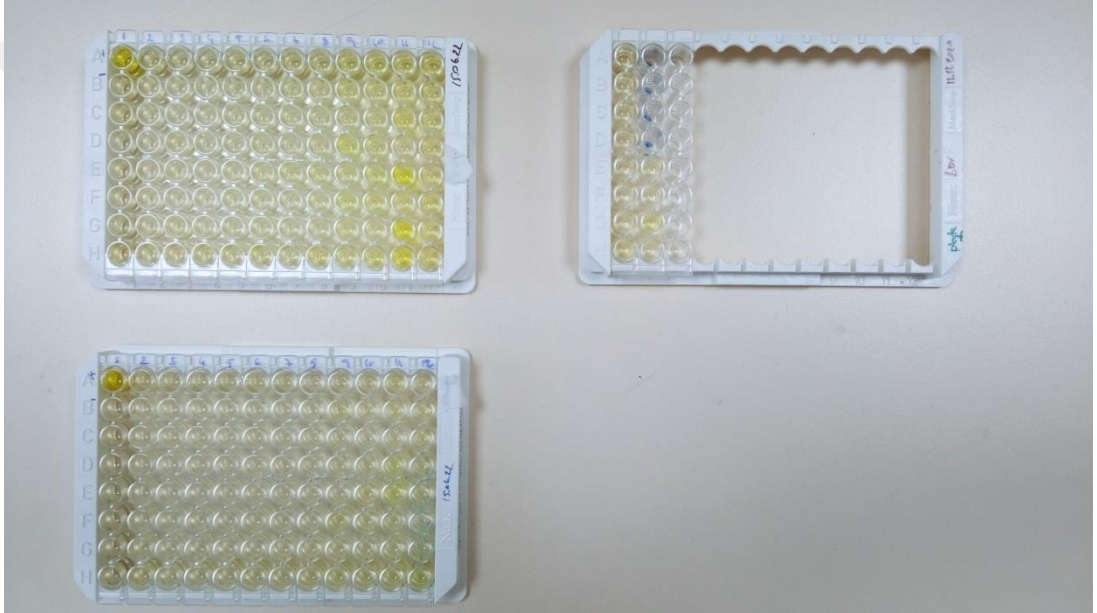
Keçilerdeki 1-3 yaş arası pestivirus enfeksiyon oranı %15,3 (2/13) bulunmuştur. Dört yaş ve üzeri keçilerdeki enfeksiyon oranı ise %7,7 (1/13) saptanmıştır. Ag-ELISA testi sonuçlarına göre pestivirus enfeksiyonun hayvan türü ve yaşa göre dağılımı Tablo 4.1'de gösterilmiştir.

Örneklenen hayvanlar cinsiyetlerine göre pestivirus antijen varlığı yönünden değerlendirildiğinde sadece 1 koçtan numune alınmış ancak pestivirus antijen varlığı saptanmamıştır. Tekelerden ise numune alınmamıştır.

İşletme düzeyinde yapılan değerlendirme sonucunda toplam işletmelerin % 8,1'inde (3/37) pestivirus enfeksiyonu tespit edilmiştir. Bu oran keçi işletmelerinde %27,2 (3/11) iken, koyun işletmelerinde herhangi bir pozitiflik (0/26) bulunmamıştır.

4.2.1.2. Kulak çentiği Örneklerinin Ag-ELISA Testi Sonuçları

Çalışmada 74'ü koyun 26'sı keçi olmak üzere toplam 100 küçük ruminantdan alınan kulak çentiği numuneleri Ag-ELISA ile incelenmiş olup, her iki hayvan türünde pestivirus antijen varlığına rastlanmamıştır.



Şekil 4.1. Kan ve Kulak çentiklerine uygulanan Ag-ELISA pleyti görünümü

4.2.2. One Step RT-PCR Testi Sonuçları

4.2.2.1. Kan Örneklerinin One Step RT-PCR Testi Sonuçları

Çalışmada One Step RT-PCR testi ile toplam 100 küçük ruminantdan alınan kan numunelerinin 42 adedi (%42,0) pestivirus nükleik asit varlığı yönünden pozitif bulunmuştur. Numunelerin 58 (%58,0) adedi ise pestivirus nükleik asit varlığı yönünden negatif bulunmuştur. Koyunlarda pestivirus nükleik asit varlığı yönünden pozitiflik oranı %51,3 (38/74) iken keçilerde bu oran %15,3 (4/26) olarak saptanmıştır.

Koyunlardaki 1-3 yaş arası pestivirus enfeksiyon oranı %52,3 (22/42) iken 4 yaş ve üzeri koyunlardaki enfeksiyon oranı %50,0 (16/32) bulunmuştur.

Keçilerdeki 1-3 yaş arası pestivirus enfeksiyon oranı %7,69 (1/13) iken 4 yaş ve üzeri keçilerdeki enfeksiyon oranı %23,0 (3/13) bulunmuştur.

Örneklenen hayvanlar cinsiyetlerine göre pestivirus nükleik asit varlığı yönünden değerlendirildiğinde sadece 1 erkek koyundan numune alınmış ancak pestivirus nükleik asit varlığı saptanmamıştır. Erkek keçilerden numune alınmamıştır. One Step RT-PCR testi sonuçlarına göre pestivirus enfeksiyonun hayvan türü ve yaşa göre dağılımı Tablo 4.1’de gösterilmiştir.

Çalışma yürütülen işletmelerin % 54,0’ünde (20/37) pestivirus enfeksiyonu tespit edilmiştir. Örnek toplanan koyun işletmelerindeki pestivirus enfeksiyon oranı %61,5 (16/26) bulunmuştur. Keçi işletmelerinde bu oran %36,3 (4/11) tespit edilmiştir.

4.2.2.2. Kulak çentiği Örneklerinin One Step RT-PCR Testi Sonuçları

Çalışmada One Step RT-PCR testi ile toplam 100 küçük ruminantdan alınan kulak çentiği numunelerinin 22 adedi (%22,0) pestivirus nükleik asit varlığı yönünden pozitif bulunmuştur. Numunelerin 78 (%78,0) adedi ise pestivirus nükleik asit varlığı yönünden negatif bulunmuştur. Koyunlarda pestivirus nükleik asit varlığı yönünden pozitiflik oranı %27,0 (20/74) iken keçilerde bu oran %7,7 (2/26) olarak saptanmıştır.

Koyunlardaki 1-3 yaş arası pestivirus enfeksiyon oranı %33,3 (14/42) iken 4 yaş ve üzeri koyunlardaki enfeksiyon oranı %18,75 (6/32) bulunmuştur.

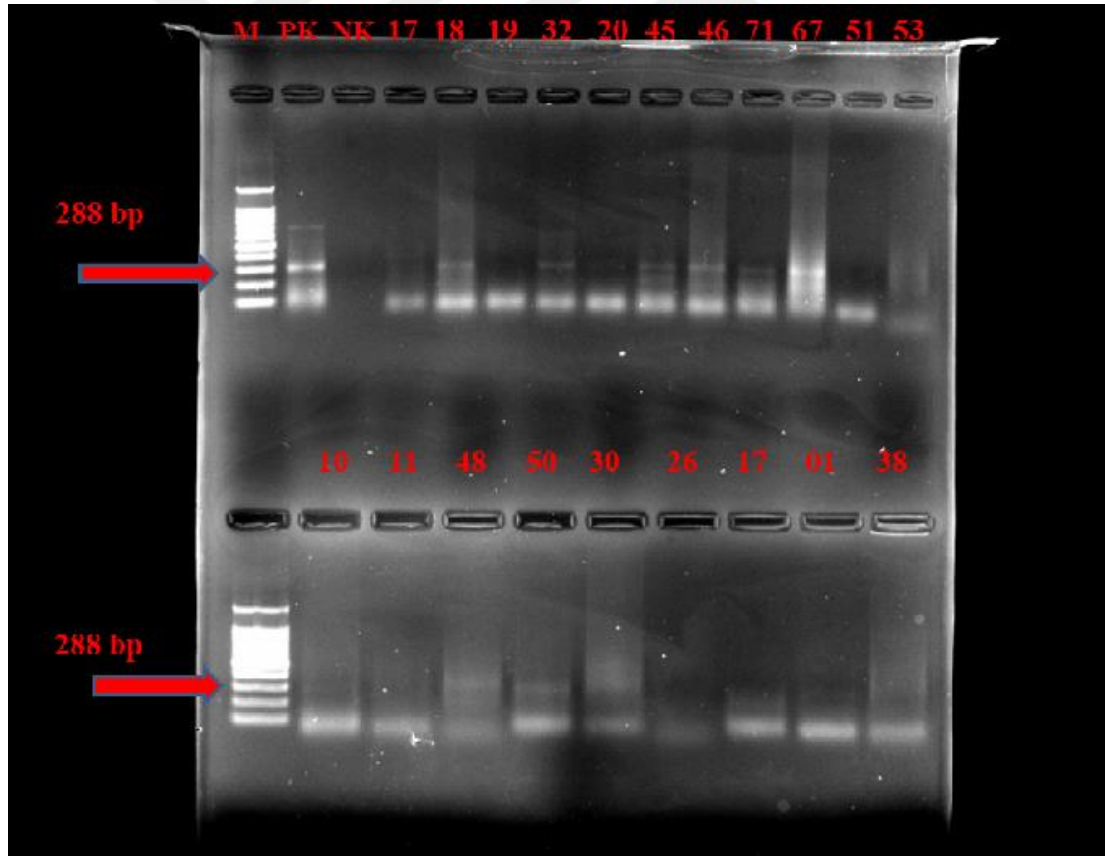
Keçilerdeki 1-3 yaş arası pestivirus enfeksiyon oranı %15,3 (2/13) bulunmuştur. Dört yaş ve üzeri keçilerde enfeksiyona rastlanmamıştır.

Örneklenen hayvanlar cinsiyetlerine göre pestivirus nükleik asit varlığı yönünden değerlendirildiğinde sadece 1 koçtan numune alınmış ancak pestivirus

nükleik asit varlığı saptanmamıştır. Tekelerden numune alınmamıştır. One Step RT-PCR testi sonuçlarına göre pestivirus enfeksiyonun hayvan türü ve yaşa göre dağılımı Tablo 4.1’de gösterilmiştir.

Çalışma yürütülen işletmelerin % 29,7’sinde (11/37) pestivirus enfeksiyonu tespit edilmiştir. Örnek toplanan koyun işletmelerindeki pestivirus enfeksiyon oranı %34,6 (9/26) bulunmuştur. Keçi işletmelerinde bu oran %18,0 (2/11) tespit edilmiştir.

Çalışma yürütülen hayvanlarda One Step RT-PCR testi sonuçlarına göre hem tam kan hemde kulak çentiği dokularında pestivirus nükleik asit varlığı %15,0 (15/100) bulunmuştur. Koyunlarda bu oran %18,9 (14/74), keçilerde ise %3,8 (1/26) tespit edilmiştir.



Şekil 4.2. Kulak çentiği örneklerinde One Step RT-PCR jel elektroforez görüntüsü (M:Marker, PK: Pozitif Kontrol, NK: Negatif Kontrol)

Tablo 4.1. Ag-ELISA ve RT-PCR testi sonuçlarına göre pestivirus enfeksiyonunun hayvan türü ve yaşa göre dağılımı

	Hayvan Türü	Koyun		Keçi		Toplam		Genel Toplam
	Yaş	1-3	≥ 4	1-3	≥ 4	Koyun	Keçi	
Ag-ELISA Kan (%)		%0 (0/42)	%0 (0/32)	%15,3 (2/13)	%7,7 (1/13)	%0 (0/74)	%11,5 (3/26)	%3 (3/100)
Ag-ELISA Kulak çentiği (%)		%0 (0/42)	%0 (0/32)	%0 (0/13)	%0 (0/13)	%0 (0/74)	%0 (0/26)	%0 (0/100)
RT-PCR Kan (%)		%52,3 (22/42)	%50,0 (16/32)	%7,69 (1/13)	%23 (3/13)	%51,3 (38/74)	%15,3 (4/26)	%42 (42/100)
RT-PCR Kulak çentiği (%)		%33,3 (14/42)	%18,75 (6/32)	%15,3 (2/13)	%0 (0/13)	%27,0 (20/74)	%7,7 (2/26)	%22,0 (22/100)

Tablo 4.2. Tam kan ve Kulak çentiği örneklerinin işletmelere göre RT-PCR testi ve Ag-ELISA testi sonuçları

İşletme No	İşletme Tipi	İşletmelerdeki Hayvan Mevcudu	Örnekleme Yapılan Numune Sayısı (n)		RT-PCR Sonucu		Ag-ELISA Sonucu	
			Kan	Kulak çentiği	Kan (n) (%)	Kulak çentiği (n) (%)	Kan (n) (%)	Kulak çentiği (n) (%)
1	Koyun	73	2	2	0	2 (% 100)	0	0
2	Koyun	62	2	2	2 (%100)	0	0	0
3	Koyun	295	4	4	4 (%100)	0	0	0
4	Koyun	144	3	3	0	0	0	0
5	Koyun	120	3	3	2 (%66,6)	2 (%66,6)	0	0
6	Koyun	105	2	2	0	2 (% 100)	0	0
7	Koyun	123	2	2	0	2 (% 100)	0	0
8	Koyun	82	2	2	0	0	0	0
9	Koyun	325	4	4	3 (%75)	3 (%75)	0	0
10	Koyun	208	3	3	2 (%66,6)	0	0	0
11	Koyun	170	3	3	2 (%66,6)	0	0	0
12	Koyun	273	4	4	2 (%50)	2 (%50)	0	0
13	Koyun	276	4	4	3 (%75)	0	0	0
14	Koyun	285	4	4	2 (%50)	2 (%50)	0	0
15	Koyun	219	4	4	3 (%75)	0	0	0
16	Koyun	163	2	2	2 (%100)	0	0	0
17	Koyun	121	3	3	0	0	0	0
18	Koyun	202	3	3	2 (%66)	2 (%66)	0	0
19	Koyun	139	3	3	0	0	0	0

Tablo 4.2. Tam kan ve Kulak çentigi örneklerinin işletmelere göre RT-PCR testi ve Ag-ELISA testi sonuçları (Devam)

20	Koyun	203	4	4	3 (%75)	3 (%75)	0	0
21	Koyun	215	3	3	0	0	0	0
22	Koyun	63	2	2	0	0	0	0
23	Koyun	96	2	2	2 (%100)	0	0	0
24	Koyun	68	2	2	0	0	0	0
25	Koyun	60	2	2	2 (%100)	0	0	0
26	Koyun	77	2	2	2 (%100)	0	0	0
Toplam Koyun		4167	74	74	38 (%51,3)	20 (%27)	0	0
1	Keçi	174	2	2	0	0	1 (%50)	0
2	Keçi	122	1	1	0	0	0	0
3	Keçi	410	4	4	1 (%25)	0	0	0
4	Keçi	323	4	4	0	0	0	0
5	Keçi	212	3	3	1 (%33)	0	1 (%33)	0
6	Keçi	329	4	4	0	0	0	0
7	Keçi	129	1	1	0	0	0	0
8	Keçi	145	2	2	0	1 (%50)	1 (%50)	0
9	Keçi	99	1	1	1 (%100)	1 (%100)	0	0
10	Keçi	118	2	2	0	0	0	0
11	Keçi	217	2	2	1 (%50)	0	0	0
Toplam Keçi		2278	26	26	4 (%15,3)	2 (%7,7)	3 (%11,5)	0
TOPLAM		6445	100	100	42 (%42)	22 (%2)	(%3)	0

4.3. İstatistik Değerlendirme Sonuçları

4.3.1. Sensitivite ve Spesifite Testi Sonuçları

Bu çalışmada sensitivite, Ag-ELISA testine göre enfekte çıkan hayvanların RT-PCR testine göre ne kadarının enfekte olduğunu hesaplamak için yapılmıştır. Spesifite ise Ag-ELISA'ya göre enfekte olmayan hayvanların RT-PCR testine göre ne kadarının enfekte olmadığını hesaplamak amacıyla yapılmıştır.

Tablo 4.3. Ag-ELISA (Tam kan) testi ve RT-PCR (Tam kan) testi Sensitivite ve Spesifitesi

RT-PCR Testi					Sensitivite (Duyarlılık)	Spesifite (Özgüllük)
		+	-	Toplam		
Ag-ELISA	+	(a) 1	(b) 2	(a+b) 3	%2,4	%96,6
	-	(c) 41	(d) 56	(c+d) 97		
Toplam		(a+c) 42	(b+d) 58	100		
Pozitif Prediktif Değer				%33,3		
Negatif Prediktif Değer				%57,7		

Sahada kullanılan Ag-ELISA'nın (tam kan) referans RT-PCR (tam kan) testine göre sensitivitesi %2,4, spesifitesi %96,6 olarak bulunmuştur (Tablo 4.3).

Tablo 4.4. Ag-ELISA (Kulak çentik) testi ve RT-PCR (Kulak çentik) testi Sensitivite ve Spesifitesi

RT-PCR Testi					Sensitivite (Duyarlılık)	Spesifite (Özgüllük)
		+	-	Toplam		
Ag-ELISA	+	(a) 0	(b) 0	(a+b) 0	-	%100,0
	-	(c) 22	(d) 78	(c+d) 100		
Toplam		(a+c) 22	(b+d) 78	100		
Pozitif Prediktif Değer				Ag-ELISA'ya göre enfekte olan hayvan verisi olmadığı için sensitivite ve pozitif prediktif değer hesaplanamadı.		
Negatif Prediktif Değer				%78,0		

Sahada kullanılan Ag-ELISA'nın (kulak çentik) referans RT-PCR (kulak çentik) testine göre spesifitesi %100,0 olarak bulunmuştur (Tablo 4.4).

Bu çalışmaya katılan hayvanların hiçbirinde Ag-ELISA (kulak çentik) testine göre pestivirus enfeksiyonu pozitifliğine rastlanmamıştır.

4.3.2. Ki-kare Testleri Sonuçları

Çalışmaya katılan hayvanlar arasında sadece 1 erkek olduğu için, cinsiyete göre Ag-ELISA ve RT-PCR sonuçları istatistiksel olarak değerlendirilememiştir.

Tablo 4.5. Hayvan türlerine göre Tam kan örneklerine uygulanan Ag-ELISA testi sonuçlarının dağılımı

		Ag-ELISA Testi			İstatistik	
		Pozitif	Negatif	Toplam	χ^2	p*
Hayvan Türü	Koyun	0 (%0,00)	74 (%76,3)	74	8,803	0,016
	Keçi	3 (%11,5)	23 (%88,5)	26		
	Toplam	3 (%3,0)	97 (%97,0)	100		

*Fisher's Exact testi

Hayvan türleri ile pestivirus Ag-ELISA (tam kan) pozitiflik/negatiflik durumları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğu belirlendi (p=0,016). Keçilerin %11,5'inde pestivirus Ag-ELISA (tam kan) pozitif bulunmuş, koyunlarda pestivirus Ag-ELISA (tam kan) pozitifliğine rastlanmamıştır. Ag-ELISA'ya (tam kan) göre keçilerde pestivirus enfeksiyonu pozitif olma durumu koyunlara göre daha fazladır (Tablo 4.5). Hayvanların tamamında pestivirus Ag-ELISA (kulak çentik) negatif çıkmıştır. Bu nedenle hayvan türleri ile pestivirus Ag-ELISA (kulak çentik) pozitiflik/negatiflik durumu karşılaştırılamamıştır.

Tablo 4.6. Hayvan türlerine göre Tam kan örneklerine uygulanan RT-PCR testi sonuçlarının dağılımı

		RT-PCR Testi			İstatistik	
		Pozitif	Negatif	Toplam	χ^2	p*
Hayvan Türü	Koyun	38 (%51,4)	36 (%48,6)	74	10,217	0,001
	Keçi	4 (%15,4)	22 (%84,6)	26		
	Toplam	42(%42,0)	58(%58,0)	100		

*Ki kare testi

Hayvan türleri ile RT-PCR (tam kan) testi pestivirus enfeksiyonu pozitiflik/negatiflik durumları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki

bulunmuştur ($p=0,001$). Koyunların %51,4'ünde RT-PCR (tam kan) testine göre pestivirus enfeksiyonu pozitif bulunmuş, keçilerin ise %15,4'ünde RT-PCR (tam kan) testine göre pestivirus enfeksiyonu pozitif bulunmuştur. RT-PCR (tam kan) testine göre koyunlarda pestivirus enfeksiyonu pozitif olma durumu keçilere göre daha fazla bulunmuştur (Tablo 4.6).

Tablo 4.7. Hayvan türlerine göre Kulak çentiği örneklerine uygulanan RT-PCR testi sonuçlarının dağılımı

		RT-PCR Testi			İstatistik	
		Pozitif	Negatif	Toplam	χ^2	p*
Hayvan Türü	Koyun	20 (%27,0)	54 (%73,0)	74	4,191	0,041
	Keçi	2 (%7,7)	24 (%92,3)	26		
	Toplam	22 (%22,0)	78 (%78,0)	100		

*Ki kare testi

Hayvan türleri ile RT-PCR (kulak çentik) testi pestivirus enfeksiyonu pozitiflik/negatiflik durumları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğu tespit edildi ($p=0,041$). Koyunların %27,0'sinde RT-PCR (kulak çentik) testine göre pestivirus enfeksiyonu pozitif bulunmuş, keçilerin ise %7,7'sinde RT-PCR (kulak çentik) testine göre pestivirus enfeksiyonu pozitif bulunmuştur. RT-PCR (kulak çentik) testine göre koyunlarda pestivirus enfeksiyonu pozitif olma durumu keçilere göre daha fazla bulunmuştur (Tablo 4.7).

Hayvanların yaşları ile Ag-ELISA ve RT-PCR testleri arasındaki dağılımı/ilişkiyi inceleyebilmek için, hayvanlar 1-3 yaş arası ve 4 yaş ve üstü şeklinde gruplandırılmış ve ki-kare analizleri yapılmıştır. Hayvanların yaş gruplarına göre Ag-ELISA (tam kan) testi ($p=0,560$) ve RT-PCR (tam kan) testi ($p=0,896$) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Hayvanların tamamında pestivirus Ag-ELISA (kulak çentik) negatif çıkmıştır. Bu nedenle hayvanların yaşları ile pestivirus Ag-ELISA (kulak çentik) pozitiflik/negatiflik durumu karşılaştırılamamıştır.

Tablo 4.8. Hayvan yaşlarına göre Kulak çentiği örneklerine uygulanan RT-PCR testi sonuçlarının dağılımı

		RT-PCR Testi			İstatistik	
Hayvanların Yaş Grubu	1-3	Pozitif	Negatif	Toplam	χ^2	P*
	≥ 4	16 (29,6)	38 (%70,4)	54	3,982	0,046
	Toplam	6 (%13,0)	40 (%87,0)	46		
		22 (%22,0)	78 (%78,0)	100		

*Ki kare testi

Hayvanların yaş grupları ile RT-PCR (kulak çentik) testi pestivirus enfeksiyonu pozitiflik/negatiflik durumları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğu bulunmuştur ($p=0,046$). 1-3 yaş grubu hayvanların %29,6'sında RT-PCR (kulak çentik) testine göre pestivirus enfeksiyonu pozitif bulunmuş, 4 yaş ve üstü hayvanların ise %13,0'ünde RT-PCR (kulak çentik) testine göre pestivirus enfeksiyonu pozitif bulunmuştur. RT-PCR (kulak çentik) testine göre 1-3 yaş grubu hayvanların pestivirus enfeksiyonu pozitif olma durumu, 4 yaş ve üstü hayvanlara göre daha fazla bulunmuştur (Tablo 4.8).

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Türkiye'nin sahip olduğu coğrafik şartlar, arazi yapısı ve tarımsal potansiyeli koyun ve keçi yetiştiriciliğine olanak sağlayan bir yapıdadır. Bu bağlamda hayvancılık sektörü içerisinde koyun ve keçi yetiştiriciliği oldukça önem arz etmektedir (Akçapınar, 1984). Koyun ve keçi yetiştiriciliğinde, her hayvandan sağlıklı bir şekilde yavru alınması işletmelerin devamlılığı ve ekonomik anlamda sürdürülebilirliği için oldukça önemlidir. Küçük ruminant yetiştiriciliğini olumsuz yönde etkileyen birçok faktör bulunmaktadır. Bu faktörlerden en önemlileri abort ve yavru ölümleridir. Abortlar enfeksiyöz ve enfeksiyöz olmayan birçok nedenden kaynaklanabilmektedir (Keskin, 2015; Ay ve ark., 2017). Virus kaynaklı transplasental enfeksiyonların neden olduğu fetal ve embriyonik ölümler, koyun ve keçi yetiştiriciliğinde ekonomik olarak sürdürülebilirlik için en önemli engellerin başında gelmektedir. Buna ek olarak abort yapan hayvanlarda süt veriminin olmaması da, ekonomik anlamda önem arz etmektedir (İssi ve ark., 2012; Pestil, 2014). Akut, transplasental ve persiste enfeksiyonlara sebep olan pestiviruslar koyun ve keçilerde yavru atma, ölü doğum, anomalili doğum, kıl örtüsünde bozukluk ve yavru ölümleri gibi klinik bulgular ile karakterizedir (Oğuzoğlu, 2008; Yeşilbağ, 2021).

Burdur ilinde yürütülen bu çalışma ile küçük ruminant sürülerinden toplanan kan ve kulak çentiği örneklerinden pestivirus enfeksiyonunun varlığı ve yaygınlığının saptanması amaçlanmıştır. Çalışmada işletme sahiplerinden alınan anamnez bilgileri doğrultusunda hayvan sürüleri içerisinde yavru atma geçmişi ve anomalili yavru doğumları olan 74 adet koyun, 26 adet keçi olmak üzere toplam 100 adet hayvandan kan ve kulak çentiği örnekleri toplanmıştır. Toplanan numuneler pestivirus enfeksiyonu yönünden Ag-ELISA ve One Step RT-PCR tekniği ile incelenmiştir.

Geçmişte koyun ve keçilerden kaynaklanan tüm pestivirus izolatları BDV olarak adlandırılmaktaydı. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda küçük ruminant pestivirusuna ilişkin sekans verilerinin mevcudiyeti, bu virusların genotip karakterizasyonuna izin vermiştir (Pratelli ve ark., 2001). Koyun ve keçilerde pestivirus enfeksiyonlarının BVDV-1, BVDV-2 ve BDV tarafından

oluşturulabileceği yapılan çalışmalarda ortaya konulmuştur (Sullivan ve ark., 1997; Pratelli ve ark., 2001; Valdazo-Gonzalez ve ark., 2006; Mishra ve ark., 2012). Ayrıca bahsi geçen bu viruslar birbirleriyle antijenik ve genetik olarak yakınlık göstermektedir. Bu sebeble pestivirusların konakçı spektrumunun kesin çizgilerle ayrılmadığına dair birçok çalışma bulunmaktadır (Becher ve ark., 1997; Becher ve ark., 1999; Becher ve ark., 2003; Hurtado ve ark., 2003; Schirrmeyer ve ark., 2004; Lindenbach ve ark., 2007; Saltik ve ark., 2022). Literatürde BDV yerine pestivirus isminin tercih edilmesi nedeniyle bu çalışmada da sıklıkla pestivirus ifadesi kullanılmıştır.

Koyun ve keçilerde önemli ekonomik kayıplara neden olan pestivirus enfeksiyonları üzerine dünyada serolojik ve virolojik olarak yapılan birçok çalışma bulunmaktadır (Graham ve ark., 2001; Berriatua ve ark., 2004; Garcia-Perez ve ark., 2009; Danuser ve ark., 2009; Krametter-Froetscher ve ark., 2010; Ali ve ark., 2015; Silveiraa, 2018; Feknous ve ark., 2018; Dahhir ve ark., 2019; Campbell ve ark., 2020; Piras ve ark., 2020; Intisar, 2020; Al-Ahmed ve Salman, 2020; Hasan, 2021).

Dünya literatüründe yapılan çalışmalar incelendiğinde pestivirus antijen varlığı çeşitli oranlarda bildirilmiştir. İspanya'da 2000-2003 yılları arasında örnekleme yapılarak yürütülen çalışmada enfeksiyonun seroprevalansı Ag-ELISA ile 1 yaş altı koyun sürülerinde %29 ile %33, 1 yaşındaki koyun sürülerinde %1,9 ile %88 ve 1 yaşından büyük koyun sürülerinde %20 ile 98,9 oranında değiştiği bildirilmiştir. İspanyada yürütülen bu çalışma BDV bulaşmasının nispeten yavaş olduğunu, enfeksiyonun sürü içinde yayılmasının belirli bir zaman aldığı ve görünüşü normal olan PI koyunların yetişkinliğe kadar hayatta kalabileceğini göstermiştir (Berriatua ve ark. 2004). İspanya'da Ag-ELISA ile kuzu fötüsü, ölü doğan kuzular ve canlı kuzulardan örnekler alınarak gerçekleştirilen çalışmada pestiviral antijen varlığı sırasıyla %24 ve %75 bulunmuş ancak canlı kuzularda antijen varlığı tespit edilmemiştir (Garcia-Perez ve ark., 2009). Musul'da daha önce aşılanmamış, 1,5 yaş ve üzerindeki koyun ve keçilerde pestivirus enfeksiyonunun seroprevalansının tespit edilmesi amacıyla yapılan bir çalışmada koyunların %46,9, keçilerin ise %16'sının seropozitif olduğu bildirilmiştir. Aynı çalışmada Ag-ELISA ile persiste enfeksiyona yönelik yapılan incelemede koyunlarda bu oran %1.4 olarak

belirlenirken, keçi sürülerinde PI hayvan saptanmamıştır. Musul'da yürütülen bu çalışmada BDV'nin bu bölgedeki koyun ve keçilerde oldukça yaygın olduğunu, aynı zamanda sürülerdeki kalıcılık ve bulaşmada rol oynayan persiste enfekte haldeki koyunların varlığını göstermiştir (Dahhir ve ark., 2019). Gerçekleştirdiğimiz çalışmada ise keçilerde tespit edilen %11,5 oranındaki antijen varlığı oransal olarak Dahhir ve ark. (2019)'nın yapmış oldukları çalışmadan yüksek bulunmuştur. Koyunlarda Ag-ELISA ile pozitiflik tespit edilemediği için gerçekleştirilen diğer çalışmalar ile kıyaslama yapılamamıştır.

Dünya literatürünün yanı sıra ülkemizde de koyun ve keçilerdeki pestivirus enfeksiyonları üzerine çalışmalar bulunmaktadır (Hasırcıoğlu ve ark., 2009; Oğuzoğlu ve ark., 2009; Avcı, 2010; Berber ve Sözdutmaz, 2013; Ural, 2014; Akman, 2019; İnce, 2022).

Burdur bölgesinde Ag-ELISA ve Ab-ELISA kullanılarak atık yapmış koyun ve keçiler örneklenerek yapılan bir çalışmada toplanan serum örneklerinde koyunların %64,6'sının, keçilerin ise %5,7'sinin pestivirus antikorları yönünden pozitif oldukları bildirilmiş, ayrıca koyunlardan alınan lökosit örneklerinin %0,7'sinin pestivirus antijeni yönünden pozitif oldukları tespit edilmiştir. Keçilerden toplanan kan örneklerinde ise pestivirus antijeni tespit edilmemiştir. Aynı çalışmada atık kuzulardan toplanan doku örneklerinin %10,4'ünde pestivirus antijeni saptanmıştır. (Hasırcıoğlu ve ark., 2009). Burdur ve Aydın'da yapılan başka bir çalışmada, küçük ruminant sürülerinde Ag-ELISA ile yapılan araştırmada enfeksiyon oranı %2 olarak bulunmuştur (Oğuzoğlu ve ark., 2009). Elazığ bölgesinde Ag-ELISA ile koyunlardan toplanan atık numunelerinde pestivirus enfeksiyonunun yaygınlığı %22.5 tespit edilmiştir (Berber ve Sözdutmaz, 2013). İzmir ve Aydın yöresinde viremik hayvanların tespiti amacıyla Ag-ELISA kullanılarak yürütülen bir çalışmada 116 adet keçi ve 232 adet koyun olmak üzere toplam 348 adet hayvan pestivirus yönünden incelenmiş ve tamamının antijen yönünden negatif olduğu bildirilmiştir (Ural, 2014). Samsun'da abort yapmış koyun ve keçi fötüslerinde Ag-ELISA ile yürütülen başka bir çalışmada pestivirus prevalansı koyunlarda %58, keçilerde %55 olarak bildirilmiştir (Akman, 2019). Afyonkarahisar'da koyunlarda yürütülen bir çalışmada toplanan serum örneklerinin %78,5'inin pestivirus antikoru

yönünden pozitif oldukları tespit edilmiştir. Aynı çalışmada Ag-ELISA ile yapılan değerlendirme sonucunda enfeksiyon oranı %0,35 bildirilmiştir (Gür, 2009). Yine Afyonkarahisarda 2019-2020 yıllarında pestivirus enfeksiyonunun prevalansını ve PI hayvanları belirlemek için yapılan bir başka çalışmada koyunlardan alınan örneklerle Ab-ELISA ve Ag-ELISA uygulanarak pozitiflik oranları sırasıyla %24,57 ve %0,43 bulunmuştur (İnce, 2022). Bu çalışmada Ag-ELISA ile toplam 100 küçük ruminantdan alınan tam kan numunelerinin sadece 3 adedi (%3) pestivirus antijen varlığı yönünden pozitif bulunmuştur. Keçilerde pestivirus antijen varlığı yönünden pozitiflik oranı %11,5 tespit edilmiştir. Koyunlarda pozitiflik elde edilmemesine rağmen Afyon'da yürütülen (Gür, 2009; İnce, 2022) çalışmalarda düşük oranda da olsa pozitiflik elde edilmiştir. Bu benzerliğin sebebinin iki şehrin konum yakınlığı itibariyle yetiştirme faaliyetlerinin benzer oluşu, şehirler arasındaki kontrolsüz hayvan hareketi ve coğrafi ve iklimsel yapılarının yakınlığından kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. Burdur' da yapılmış olan ve (Hasırcıoğlu ve ark., 2009) koyunlarda düşük oranda pestivirus antijen varlığı tespit edilen çalışma ile bu çalışma benzerlik taşımaktadır. Hasırcıoğlu ve ark. (2009), yaptıkları çalışmada keçilerde antijen varlığı tespit edememişler ancak yapılan bu çalışmada keçilerde %11,5 oranında Ag-ELISA ile pozitiflik bulunmuştur. Bu veri ışığında geçmiş yıllara göre Burdur ilinde keçilerde enfeksiyon sirkülasyonunda artış olduğu söylenebilir. Burdur ve Aydın'da yürütülen çalışmalarda (Oğuzoğlu ve ark., 2009) küçük ruminant sürülerinden elde edilen pozitiflik oranı (%2) ile bu çalışmada elde edilen (%3) oran benzer bulunmuştur. Samsun'da abort yapmış koyun ve keçi fötüslerinde yürütülen bir çalışmada (Akman, 2019) koyun ve keçilerde tespit edilen enfeksiyon oranı bizim çalışmamıza (%3) kıyasla düşük bulunmuştur. İzmir ve Aydın yöresinde yürütülen bir başka çalışmada bizim çalışmamıza paralel bir şekilde koyun ve keçilerde antijen varlığına rastlanmamıştır (Ural, 2014). Avcı (2010), yapmış olduğu çalışmada 50 koçtan alınan örneklerde BDV antijen varlığının tespit edilmediğini bildirmiştir. Bu çalışmada sadece 1 koçtan numune alımı gerçekleştirilmiş, ancak pestivirus antijen varlığı saptanmamıştır. Bu sonucun diğer literatür verileri ile sağlıklı karşılaştırılabilmesi için daha fazla sayıda hayvanda çalışılmasına ihtiyaç olduğu düşünülmektedir. Aynı çalışmada Ag-ELISA ile koyun lökosit örneklerinden (1.örnekleme) 11 adedi (%1.1) BDV antijen varlığı yönünden pozitif olarak tespit edilmiştir. BDV antijen varlığı yönünden pozitif olduğu belirlenen 11 adet hayvan,

serolojik olarak BDV'ye karşı oluşan antikor varlığı yönünden negatif tespit edilmiştir. Bu hayvanların 15 gün sonra 2. örneklemeleri gerçekleştirilmiş, 11 örneğin 3 adedi 2. örnekleme sonrasında da BDV antijen varlığı yönünden pozitif, BDV'ye karşı oluşan antikor varlığı yönünden ise negatif tespit edilmiştir. İncelenen örneğin 8 tanesi ise BDV antijen varlığı yönünden negatif ve BDV'ye karşı oluşan antikor varlığı yönünden ise pozitif olarak tespit edilmiştir (Avcı, 2010). Ancak bu çalışmada imkanlar dahilinde tek örnekleme yapılmış ve koyunlarda pestivirus antijen varlığı tespit edilmemiştir. İlgili literatür ışığında BDV enfeksiyonunun önlenmesinde persiste enfekte olan hayvanların sağlıklı bir şekilde tespit edilebilmesi için çift örnekleme yapılması (Aslın ve ark., 2021) ve ikinci örneklemede antijen pozitif olan hayvanların sürüden uzaklaştırılmasının hastalıkla mücadelede etkin bir yol olacağı düşünülmektedir.

Bu çalışmada 74'ü koyun 26'sı keçi olmak üzere toplam 100 küçük ruminantdan alınan kulak çentiği numuneleri Ag-ELISA ile incelenmiştir. Persiste enfekte sığırların tespit edilmesinde tüm dünyada kullanılan bir teşhis yöntemi olan kulak çentiği numunesi kullanılarak BVDV antijen test kitinin küçük ruminant hayvanlarda da kullanılması düşünülmüştür. Hem Türkiye'de hem de Burdur ilinde ilk kez kulak çentik dokusu kullanılarak koyun ve keçilerde söz konusu enfeksiyonun varlığının saptanması hedeflenmiştir. Ancak çalışmada her iki hayvan türünde de pestivirus antijen varlığına rastlanmamakla beraber koyun ve keçilerde kulak çentiği dokusu ile ilgili literatür bilgisine ulaşamadığından dolayı herhangi bir karşılaştırma yapılamamıştır.

RT-PCR tekniği pestivirus enfeksiyonlarının teşhisi için başarılı bir moleküler yöntemdir. Bu tekniğin kan, organ, serum ve sürüntüler gibi çeşitli klinik örneklerde pestivirus RNA'sının saptanmasına olanak sağladığı bildirilmiştir (Albayrak ve Özcan, 2012). Koyun ve keçilerde pestivirus enfeksiyonları, tüm dünya da RT-PCR testi kullanılarak birden fazla çalışma ile ortaya koyulmuştur (Garcia-Perez ve ark., 2009; Krametter-Froetscher ve ark., 2010; Braun ve ark., 2013; Hasan, 2021).

İspanya’da RT-PCR testi ile kuzu fôtusu, ölü doğan kuzular ve canlı kuzularda yapılan çalışmada BDV antijen varlığı sırasıyla %7,9, %50 ve %50 bulunmuştur (Garcia-Perez ve ark., 2009). Avusturya’nın Batı bölgesinde yetiştirilen koyun ve keçiden alınan kan örnekleri, RT-PCR yöntemi ile pestivirusa özgü RNA varlığı için test edilmiştir. Çalışma sonucunda pestivirus antijen prevalansının koyunlar için %0,32 keçiler için ise %0,08 olduğu tespit edilmiştir (Krametter-Froetscher ve ark., 2010). İsviçre’de gerçekleştirilen bir çalışmada RT-PCR testi ile 2384 koyunda BDV varlığı negatif olarak bildirilmiştir. Aynı araştırmada Ab-ELISA ile koyunların %13,5’inde BDV antikor tespit edilmiştir (Braun ve ark., 2013). Irak’ın Musul şehrinde koyun ve keçilerde Border Disease hastalığının prevalansını belirlemek için gerçekleştirilen bir başka çalışmada RT-PCR tekniği kullanılarak serum örnekleri test edilmiş, koyun ve keçilerde enfeksiyon prevalansının sırasıyla %15.9 ve %3 olduğu bildirilmiştir (Hasan, 2021).

Bu çalışmada One Step RT-PCR testi ile toplam 100 küçük ruminantdan alınan kan numunelerinin 42 adedi (%42) pestivirus nükleik asit varlığı yönünden pozitif bulunmuştur. Koyunlarda pestivirus nükleik asit varlığı yönünden pozitiflik oranı %51,3 iken keçilerde bu oran %15,3 olarak saptanmıştır. İspanya’da kuzularda yürütülen çalışmanın sonucunda (Garcia-Perez ve ark., 2009) bildirilen veriler bu çalışmada elde edilen veriler ile benzerlik taşımaktadır. Avusturya’da yetiştirilen koyun ve keçilerde yapılan çalışmada (Krametter-Froetscher ve ark., 2010) kaydedilen enfeksiyon oranı bu çalışmada elde edilen enfeksiyon oranından oldukça düşük bulunmuştur. İsviçre’de koyunlarda yapılan çalışmada (Braun ve ark., 2013) BDV antijen varlığı negatif bildirilmiş ancak Ab-ELISA ile koyunların %13,5’inde BDV antikoru tespit edilmiştir. Irak’ta (Hasan, 2021) Border Disease enfeksiyonu prevalansının koyun ve keçilerde sırasıyla %15.9 ve %3 olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmadaki bulgular Irak’ta gerçekleştirilen çalışmadaki bulgulardan oldukça yüksek bulunmuştur. Yapılan çalışmalardaki enfeksiyon oranındaki bu farklılıkların sebebi coğrafi ve iklimsel yapılar, bölgesel virus prevalansı ve geçen zamana göre artan virus pozitifliğinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Ülkemizde de koyun ve keçilerdeki pestivirus enfeksiyonları ile ilgili birçok çalışma mevcuttur. (Avcı, 2010; Albayrak ve Özkan, 2012; Gülyaz ve ark., 2016; Şevik, 2018; Kadiroğlu ve ark., 2020; Aslım ve ark., 2021).

Konya’da yapılan bir çalışmada RT-PCR ile incelenen 63 adet koyun lökosit örneklerinden 14 adedi (%22.2) BD viral genom varlığı yönünden pozitif olarak tespit edilmiştir (Avcı, 2010). Karadeniz Bölgesinde atık koyun ve keçi fötüslerinde RT-PCR testi kullanılarak yürütülen bir çalışmada 37 kuzunun 34’ünde (%91,9) ve 2 oğlağın 2’sinde (%100) pestivirus nükleik asitleri tespit edilmiştir (Albayrak ve Özkan, 2012). Sakarya’da bir koyun işletmesinde Contagious Ecthyma enfeksiyonuna yakalanan koyun ve kuzularda PCR testi ile pestivirus varlığının araştırılması amacıyla 18 koyun ve 26 kuzudan kan ve dudak dokusu örnekleri alınmıştır. Alınan lökosit örneklerinin pestivirus nükleik asit varlığı yönünden negatif olduğu saptanmıştır (Gülyaz ve ark., 2016). Diyarbakır’da RT-PCR yöntemiyle sığır, koyun ve keçilerde yürütülen bir çalışmada koyun ve keçiye ait örnekler pestivirus yönünden negatif bulunmuştur (Kadiroğlu ve ark., 2020). Afyonkarahisar ilinde koyun ve sığırlarda RT-PCR tekniği kullanılarak BDV ve BVDV yaygınlığı ile ilgili bir çalışmada 74 aborte koyun fötüsünde (%12.16) BDV varlığı tespit edilmiştir (Şevik, 2018). Konya Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Kliniğine gelen abort problemlili çeşitli yaş gruplarındaki 75 koyunun kan örnekleri PCR testi ile BDV varlığı araştırılmış ancak tüm hayvanlar negatif bulunmuştur (Aslım ve ark., 2021).

Bu çalışmada One Step RT-PCR testi ile toplam 100 küçük ruminantdan alınan kan numunelerinin 42 adedi (%42) pestivirus nükleik asit varlığı yönünden pozitif bulunmuştur. Koyunlarda pestivirus nükleik asit varlığı yönünden pozitiflik oranı %51,3 iken keçilerde bu oran %15,3 olarak saptanmıştır. Konya’da yürütülen çalışmada (Avcı, 2010) elde edilen enfeksiyon oranı bu çalışmada elde edilen orandan oldukça düşük bulunmuştur. Karadeniz bölgesinde abort olmuş koyun ve keçi fötüslerinde RT-PCR testi kullanılarak yürütülen çalışmada (Albayrak ve Özkan, 2012) elde edilen veriler bu çalışmada elde edilen verilerden oldukça yüksek bulunmuştur. Bu durum atık yapmış fötüs ve taze organ örnekleri gibi dokularda, pestivirus gibi transplasental enfeksiyonlarının teşhisinin kan örneklerinden daha

yüksek oranda teşhis edilmesinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Diyarbakır (Kadiroğlu ve ark., 2020), Sakarya (Gülyaz ve ark., 2016) ve Konya’da (Aslım ve ark., 2021) yürütülen çalışmalarda pestivirus enfeksiyon varlığı tespit edilmemiş olup, Afyonkarahisar’da yürütülen çalışmada bildirilen (Şevik, 2018) enfeksiyon oranı bu çalışmadan düşük bulunmuştur. Afyonkarahisarda düşük de olsa enfeksiyonun tespit edilmesinin sebebi Afyonkarahisar ve Burdur’un komşu olması itibariyle iki şehir arasındaki kontrolsüz hayvan hareketi ve coğrafi yapılarının benzerliğinden dolayı olabileceği düşünülmektedir.

Dünyada PI hayvanları saptamak amacıyla serum, plazma, tam kan ve kulak çentiği gibi örnekler ile uygulanmakta olan birçok test mevcuttur. Kulak çentiği numunesi toplanması kolay olduğundan, minimum malzeme ve ekipman gerektirdiğinden, çok sayıda numuneyi analiz etme imkanı olduğundan, geleneksel testlerle de karşılaştırıldığında testin güvenilirlik raporları nedeniyle özellikle PI sığırları saptamak için dünyada yapılmış birçok çalışma bulunmaktadır. Dünyada ve Türkiye’de koyunlar ve keçilerde kulak çentiği dokusu kullanılarak yapılmış olan herhangi bir literatür bilgisine ulaşılammıştır. Yürütülen bu çalışma ile hem Türkiye’de hem de Burdur ilinde ilk kez kulak çentik dokusu kullanılarak koyun ve keçilerde enfeksiyonun varlığının saptanması hedeflenmiştir.

Bu çalışmada One Step RT-PCR testi ile toplam 100 küçük ruminantdan alınan kulak çentiği numunelerinin 22 adedi (%22) pestivirus nükleik asit varlığı yönünden pozitif bulunmuştur. Koyunlarda pestivirus nükleik asit varlığı yönünden pozitiflik oranı %27 (20/74) iken keçilerde bu oran %7,7 (2/26) olarak saptanmıştır. VanderLey ve ark. (2011), tarafından sığırlarda gerçekleştirilen bir çalışmada, persiste enfekte hayvanlarda BVDV’nin tespitinde kulak çentiği, nazal swap ve kuyruk derisi biyopsi örneklerinin kan serumu, göz, ağız, rektal ve vajinal swap örneklerine kıyasla daha güvenli ve duyarlı sonuçlar verdiği bildirilmiştir. Bu çalışmada elde edilen veriler, koyun ve keçilerde kulak çentiği dokusu ile ilgili literatür bilgisine ulaşılamadığından herhangi bir karşılaştırma yapılamamıştır. Ancak bu çalışmada VanderLey ve ark. (2011) sığırlarda yapmış olduğu çalışmanın aksine kulak çentiği numunelerinin One Step RT-PCR testi ile elde edilen bulgular, tam kan numunelerinin One Step RT-PCR testi ile elde edilen bulgulardan düşük

bulunmuştur. Bunun sebebi numune alınan hayvan türlerinin farklı olması ya da hayvanların persiste enfekte olmamasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Ag-ELISA tam kan (lökosit) numunelerinin antijen varlığı yönünden incelenmesinde kullanılabilecek uygun bir yöntem olup, yapılan çalışmalarda virus izolasyonuna göre kısa bir süre içerisinde sonuçlanması ve diğer testlere göre ucuz olması sebebiyle BDV'nin teşhisinde sık kullanıldığı bildirilmiştir (Valdazo-Gonzalez ve ark., 2007; Hasırcıoğlu ve ark. 2009, Oğuzoğlu ve ark. 2009; Avcı, 2010). İncelenen numunede antikorlar mevcut ise Ag-ELISA yanlış negatif sonuçlar verebileceği ve maternal antikorlara sahip genç hayvanlarda ve akut enfekte hayvanlarda test uygulanırken bu durum dikkate alınması gerektiği bildirilmiştir (Mozaffari ve ark., 2014; Ahmad ve ark., 2014; OIE, 2017). RT-PCR testi, ruminantlarda pestivirusların tanısında yaygın olarak kullanılan testler arasında olduğu bildirilmiştir. (Carlsson ve Belak, 1994; Becher ve ark., 1994; Vilcek ve ark., 1994; Willoughby ve ark., 2006; Avcı, 2010). RT-PCR testinin yüksek duyarlılığı ve numunedeki antikorlardan etkilenmemesi nedeniyle PI hayvanların teşhisinde önerilmektedir (OIE, 2017).

Garcia-Perez ve ark. (2009), 25 ticari sürüde yaptıkları çalışmada 67 fötüs örneğinde Ag-ELISA testi ile %41,4, RT-PCR testi ile ise %7,9 oranında, ölü doğan kuzularda Ag-ELISA testi ile %75, RT-PCR testi ile ise %50 oranında, kuzularda ise RT-PCR testi ile %50 oranında pozitiflik tespit etmişler, kuzularda Ag-ELISA ile enfeksiyona rastlamadıklarını bildirmişlerdir. Oğuzoğlu ve ark (2009), Aydın ve Burdur'da Ag-ELISA testi ile koyun ve keçilerde yapmış oldukları çalışmada pestivirus antijen varlığını koyun (3/146) ve keçilerde (3/151) %2 oranında tespit etmiş olup, BDV antijen varlığı yönünden pozitif tespit edilen bu 6 örneği RT-PCR ile de pozitif bulduklarını bildirmişlerdir. Avcı (2010), koyunlarda yapmış olduğu çalışmada BDV antijen varlığı yönünden pozitif tespit edilen 14 adet lökosit örneği RT-PCR testi ile incelenmiş olup, viral nükleik asit varlığı yönünden pozitif olduğu bildirilmiştir. Akman (2019), yapmış olduğu çalışmada Ag-ELISA testi ile koyun abort materyallerinde %58, keçi abort materyalininde %55, panpestivirus primerleri kullanılarak yapılan RT-PCR testi ile ise koyun abort materyalinde %3 oranında pozitiflik tespit etmişler, keçilerde RT-PCR testi ile enfeksiyona rastlamamışlardır.

Bu çalışmada Ag-ELISA testi ve One Step RT-PCR testi ile toplam 100 küçük ruminantdan alınan tam kan numuneleri incelenmiştir. İncelenen kan numunelerinin Ag-ELISA testi ile 3 adedi (%3) pestivirus antijen varlığı yönünden pozitif, One Step RT-PCR testi ile 42 adedi (%42) pestivirus nükleik asit varlığı yönünden pozitif bulunmuştur. Ag-ELISA testi ile koyunlarda pozitiflik elde edilmemesine rağmen keçilerde pestivirus antijen varlığı yönünden pozitiflik oranı %11,5 tespit edilmiştir. One Step RT-PCR testi ile koyunlarda pestivirus nükleik asit varlığı yönünden pozitiflik oranı %51,3 iken keçilerde bu oran %15,3 olarak saptanmıştır.

Literatürde ulaşılan bazı çalışmalarda Ag-ELISA testi ile koyun ve keçi abort materyallerinde enfeksiyon oranı yüksek, RT-PCR testi ile enfeksiyon oranı düşük olduğu bildirilmiştir (Garcia-Perez ve ark., 2009; Akman, 2019). Garcia-Perez ve ark. (2009), Ag-ELISA testini RNA bütünlüğünü olumsuz etkileyebilecek ileri derecede otolizi olan fötuslar ve ölü doğum durumlarında teşhiste alternatif olabileceğini bildirmişlerdir Bu çalışmada ise sözü edilen çalışmaların aksine koyun ve keçilerde Ag-ELISA testi ile enfeksiyon oranı düşük, RT-PCR testi ile enfeksiyon oranı yüksek bulunmuştur. Bunun sebebi teşhiste kullanılan doku örneklerinin farklı olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Garcia-Perez ve ark. (2009), yapmış oldukları çalışmada kuzularda Ag-ELISA testi ile enfeksiyon oranının düşük, RT-PCR testi ile enfeksiyon oranının yüksek olduğunu tespit etmişler, kuzularda kolostral antikorların varlığı, Ag-ELISA ile antijenin saptanmasını maskeleyebileceğini ve kan dokusunda BDV teşhisinde RT-PCR testinin daha hassas olduğunu bildirmişlerdir. Garcia-Perez ve ark. (2009), elde ettikleri veriler bu çalışmada koyunlardan elde edilen veriler ile benzerlik taşımaktadır. Oğuzoğlu ve ark. (2009), Aydın ve Burdur’da Ag-ELISA testi ile koyun ve keçilerde yapmış oldukları çalışmada pestivirus antijen varlığını koyun (3/146) ve keçilerde (3/151) %2 oranında tespit etmiş olup, BDV antijen varlığı yönünden pozitif tespit edilen bu 6 örneği RT-PCR ile de pozitif bulduklarını bildirmişlerdir. Avcı (2010), koyunlarda yapmış olduğu çalışmada BDV antijen varlığı yönünden pozitif tespit edilen 14 adet lökosit örneği RT-PCR testi ile incelenmiş olup viral nükleik asit varlığı yönünden pozitif olduğu bildirilmiştir. Avcı (2010) ve Oğuzoğlu ve ark. (2009), bildirmiş oldukları veriler bu çalışma ile paralellik göstermektedir.

Sonuç olarak koyun ve keçi yetiştiriciliği ile ilgilenen işletmelerin faaliyetlerini sürdürebilmeleri için et, süt gibi ürünlerin sağlıklı ve verimli bir şekilde elde edilmesi gerekmektedir. İşletmelerdeki küçük ruminantlardan sağlıklı yavru alınması sürünün devamlılığı için öncelikli hedeflerdendir. Burdur ili bulunduğu bölge itibarıyla küçük ruminant yetiştiriciliği açısından önemli bir potansiyele sahip olup, aile tipi ve büyük işletmeler halinde yaygın olarak küçük ruminant yetiştiriciliği yapılmaktadır. İlimizde yürütülen bu çalışma ile enfeksiyonun küçük ruminant işletmelerinde halen varlığını sürdürdüğü tespit edilmiş olup, ileride yapılması planlanan yeni çalışmalara, alınacak koruma ve kontrol önlemlerine katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Küçük ruminant işletmelerinde persiste enfekte hayvanların varlığı ve bu hayvanların persiste enfekte yavru doğurması, sürü içinde klinik bulgu göstermeyen ancak sürekli olarak virus saçan hayvanların bulunmasına neden olur. Böylece virusun sürü içinde devamlılığı sağlanmış olur. Hayvan yetiştiricileri ekonomik olmadığı için hayvanlarını imha ve kesime göndermek yerine satmayı tercih etmekte ve bundan dolayı hastalık sürüler arasında hızlıca ve kolaylıkla yayılmaktadır. Pestivirus enfeksiyonlarıyla mücadele için hayvan yetiştiricilerinin hastalık hakkında bilinçlendirilmeleri, hastalığın görüldüğü küçük ruminant sürülerinde persiste enfekte ve klinik enfekte hayvanların bulundukları sürüden çıkarılması ve kesime sevk edilmesi metodu önerilmektedir. Türkiye’de Pestivirus enfeksiyonları ile ilgili planlanmış herhangi bir eradikasyon stratejisi bulunmamaktadır. Pestivirus enfeksiyonu tespit edilen sürülere kordon ve karantina tedbirlerinin uygulanması ve bu hastalığın Tarım ve Orman Bakanlığı tarafından düzenli takiplerinin yapılması ve gerektiğinde tazminatlı kesim gibi uygulamalar ile mücadeleye destek vermesi gerektiği düşünülmektedir. Hastalıkla mücadelenin diğer bir şekli de, sığırlarda attenüe veya inaktif BVDV aşısının kullanılmasıdır fakat aşılama tam bir koruma sağlayamamaktadır.

KAYNAKLAR

- Akçapınar H (1984).** Orta Anadolu'da koyun yetiştiriciliği ve ekonomik önemi. Selçuk Üniversitesi *Vet. Fak. Derg.*, Özel Sayı 51-59.
- Akkaya Doğan A, Köse AM (2022).** Evaluation of bovine visual ELISA test for detection of pregnancy-associated glycoproteins in early pregnancy diagnosis in goats. *Small Rumin. Res.*, **212**, 106722.
- Akman A (2019).** Karadeniz Bölgesi'ndeki Ruminantlarda Border Disease Epidemiyolojisi. Ondokuzmayıs Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Doktora Tezi.
- Ahmad A, Rabbani M, Younus M, Zahid MN, Javed A, Ghaffoor A (2014).** Diagnostic Approaches for Detection of Bovine Viral Diarrhea Virus Persistent Infection. *J. Inf. Mol. Biol.*, **2(4)**, 53–60.
- Albayrak H, Özcan E (2012).** The Investigation of Pestivirus and Rift Valley Fever Virus Infections in Aborted Ruminant Foetuses in the Blacksea Region in Turkey. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.*, **18(3)**, 457-461.
- Ali YH, Saeed IK, Mohammed A, Elmagboul SB, Elghazali F (2015).** An Outbreak of Pestivirus Infection in Sheep in West Kordofan, Sudan. *British. Microbiol. Res. J.*, **8(4)**, 540-545.
- Al-Ahmed AT, Salman SS (2020).** Seroprevalence of Enzootic Abortion and Border Disease in Small Ruminants in Al-Basra Province, Iraq. *Plant. Arch.*, **20(2)**, 2722-2727.
- Ameen PSM (2016).** Van ili çevresinde Visna-Maedi Virus (VMV) ve Border Disease Virus (BDV) Enfeksiyonlarının Seroprevalansı. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi.
- Arnal M, Fernandez-de-Luco D, Riba L, Maley M, Gilray J, Willoughby K, Vilcek S, Nettleton PF (2004).** A novel pestivirus associated with deaths in Pyrenean chamois (*Rupicapra pyrenaica pyrenaica*). *J. Gen. Virol.*, **85**, 3653–3657.
- Aslım HP, Palancı HS, Dik I, Çivril V, Avcı Ç, Bulut O (2021).** Virological Investigation of Border Disease Infection in Sheep with Abortion Problem. *Animal. Health. Prod. and Hyg.*, **10(1)**, 12–16.
- Ay SS, Gürler H, Önyay F, Fındık A (2017).** Küçük Ruminatlarda Abortus Sorunu ve Reprodüktif Aşılama Programları. *Türkiye Klinikleri J. Vet. Sci. Obstet Gynecol-Special Topics*, **3(2)**, 129-36.
- Avcı O (2010).** Konya ve çevresinde abort problemlili koyun sürülerinde Border Disease Virus enfeksiyonunun araştırılması. Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Doktora Tezi.

Azkur AK, Gazyağcı S, Aslan ME, Ünal N (2011). Molecular and serological characterization of pestivirus infection among sheep in Kirikkale Turkey. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.*, **17**(Suppl A), 83-92.

Barlow RM, Patterson DSP (1982). Border disease of sheep: a virus-induced teratogenic disorder. *J. Vet. Med.*, **36**, 1–87.

Bauermann FV, Falkenberg Vander Ley B, Decaro N, Brodersen BW, Harmon A, Hessman B, Flores EF, Ridpath JF (2014). Generation of Calves Persistently Infected with HoBi-Like Pestivirus and Comparison of Methods for Detection of These Persistent Infections. *J. Clin. Microbiol.*, **52** (11), 3845–3852.

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, König M, Paton DJ, Thiel HJ (1995). Further characterization of border disease virus isolates: Evidence for the presence of more than three species within the genus pestivirus. *Virology*, **209**, 200-206.

Becher P, Meyers G, Shannon AD, Thiel HJ (1996). Cytopathogenicity of border disease virus is correlated with integration of cellular sequences into the viral genome. *J. Virol.*, **70**(5), 2992-2998.

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**(6), 5165–5173.

Becher P, Orlich M, Kosmidu A, König M, Baroth M, Thiel HJ (1999). Genetic diversity of pestiviruses: identification of novel groups and implications for classification. *Virology*, **262**, 64–71.

Becher B, Avalos Ramires R, Orlich M, Cedillo Rosales S, König M, Schweizer M, Stalder H, Schirrmeier H, Tiel HJ (2003). Genetic and antigenic characterization of novel pestivirus genotypes: implications for classification. *Virology*, **311**, 96-104.

Bedeković T, Lemo N, Lojkić I, Beck A, Lojkić M, Madić J (2011). Implementation of immunohistochemistry on frozen ear notch tissue samples in diagnosis of bovine viral diarrhea virus in persistently infected cattle. *Acta. Vet. Scand.*, **53**(65), 2-4.

Berber E, Sözdutalmaz İ (2013). Elazığ, Malatya ve Tunceli İllerinde Koyunlarda Görülen Abort Vakalarında Pestivirusların Rolünün Araştırılması. *F. Ü. Sağ. Bil. Vet. Derg.*, **27**(1), 39–41.

Berriatua E, Barandika J, Aduriz G, Atxaerandio R, Garrido J, Garcia-Perez AL (2004). Age-specific seroprevalence of border disease virus and presence of persistently infected sheep in Basque dairy-sheep flocks. *Vet J.*, **168**(3), 336–342.

Braun U, Bachofen C, Schenk B, Hässig M, Peterhans E (2013). Investigation of border disease and bovine virus diarrhoea in sheep from 76 mixed cattle and sheep farms in eastern Switzerland. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.*, **155(5)**, 293-8.

Burdur T.O.M (2022). Burdur İl Tarım ve Orman Müdürlüğü Hayvancılık Verileri <https://burdur.tarimorman.gov.tr/Sayfalar/Detay.aspx?SayfaId=16>. (Erişim Tarihi: 04.09.2022).

Burgu İ, Öztürk F, Akça Y (1984). Tahirova devlet üretme çiftliği koyunlarında viral enfeksiyonlar üzerinde serolojik araştırmalar. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.*, **31(2)**, 167-179.

Burgu İ, Öztürk F, Akça Y, Toker A, Frey HR, Liess B (1987). Investigations on the occurrence and impact of bovine viral diarrhoea (BVD) virus infections in sheep in Turkey. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.*, **94**, 292-294.

Burgu İ, Akça Y, Alkan F, Özkul A, Karaoğlu TM, Bilge Dağalp S, Oğuzoğlu TÇ, Yeşilbağ K (2001). Koyunlarda doğum öncesi ve sonrası dönemlerde bovine viral diarrhoea (BVD) virus enfeksiyonunun serolojik virolojik ve patogenezi yönünden araştırılması. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, **25**, 551-557.

Campbell E, McConville J, Clarke J, Donaghy A, Moyce A, Byrne AW, Verner S, Strain S, McKeown IM, Borne P, Guelbenzu-Gonzalo M (2020). Pestivirus apparent prevalence in sheep and goats in Northern Ireland: A serological survey. *Vet. Rec. Open.*, 2020;e1.

Carlsson U, Belak K (1994). Border Disease Virus transmitted to sheep and cattle by a persistently infected ewe: epidemiology and control. *Acta. Vet. Scand.*, **35(1)**, 79-88.

Cornish TE, Olphen 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. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **17**, 110-117.

Dabramo CM, Deval J, Cameron CE, Cellai L, Götte M (2006). Control of template positioning during de Novo initiation of RNA synthesis by the Bovine Viral Diarrhoea virus NS5B Polymerase. *J. Biol. Chem.*, **281(34)**, 24991-24998.

Dahhir HS, Talb OQ, Asim MH (2019). Preliminary study of seroprevalence of border disease virus (bdv) among sheep and goats in Mosul city, Iraq. *Adv. Anim. Vet. Sci.*, **7(7)**, 566-569.

Danuser R, Bogt HR, Kaufmann T, Peterhans E, Zanoni R (2009). Seroprevalence and characterization of pestivirus infections in small ruminants and new world camelids in Switzerland. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.*, **151**, 109-117.

Depner K, Bauer Th, Liess B (1992). Thermal and pH stability of pestiviruses. *Rev. sa. tech. Off. int. Epiz.*, **11(3)**, 885-893.

Doğan F, Ataseven VS, Ergün Y (2021). Türkiye’de Doğu Akdeniz İllerindeki Sütçü Keçi İşletmelerinde Pestivirus Enfeksiyonlarının Seroprevalansı. *Etlik Vet. Mikrobiyol. Derg.*, **32(1)**, 45–49.

Dubois E, Russo P, Prigent M, Thiery R (2008). Genetic characterization of ovine pestiviruses isolated in France, between 1985 and 2006. *Vet. Microbiol.*, **130**, 69–79.

Elbers K, Tautz N, Becher P, Stoll D, Rumenapf T, Thiel HJ (1996). Processing in the pestivirus E2-NS2 region: Identification of proteins p7 and E2p7. *J. Virol.*, **70(6)**, 4131–4135.

Ergün Ç (2012). Koyun pestiviruslarının (Border disease virus, Bovine diarrhoea virus) antijenik yakınlıklarının serum nötralizasyon testi ile araştırılması. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi.

Feknous N, Hanon JB, Tignon M, Khaled H, Bouyoucef A, Cay B (2018). Seroprevalence of border disease virus and other pestiviruses in sheep in Algeria and associated risk factors. *BMC. Vet. Res.*, **14**, 339.

Funk RA, Thomson DU, White BJ, Renter DG, Rust RL (2008). Effects of Ear-Notch Sample Handling on Reliability of Antigen-Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Testing for Bovine Viral Diarrhea Virus. *The Bovine Practitioner* **42**, 1.

Garcia-Perez AL, Minguñon E, Barandika JF, Aduriz G, Povedano I, Juste RA, Hurtado A (2009). Detection of Border disease virus in fetuses, stillbirths, and newborn lambs from natural and experimental infections. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **21(3)**, 331-337.

Gardiner AC, Barlow RM (1981). Vertical transmission of Border disease infection. *J. Comp. Pathol.*, **91(3)**, 467–470.

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(3-4)**, 231-236.

Göktuna PT, Alpay G, Öner EB, Yeşilbağ K (2017). Co-existence of bovine viral diarrhoea and border disease viruses in a sheep flock suffering from abortus and diarrhoea. *Turk. J. Vet. Anim Sci.*, **41**, 590-597.

Graham DA, Calvert V, German A, McCullough SJ (2001). Pestiviral infections in sheep and pigs in Northern Ireland. *Vet. Rec.*, **148**, 69-72.

Gumusova SO, Yazici Z, Albayrak H (2006). Pestivirus seroprevalence in sheep populations from inland and coastal zones of Turkey. *Rev. Med. Vet-Toulouse.*, **157**, 595-598.

Gül Y (2002). Geviş Getiren Hayvanların İç Hastalıkları (Sığır, Koyun-Keçi). 1. baskı. Malatya: Medipres Matbaacılık Yayıncılık Ltd. Şti.

Gülyaz V, Baca A, Saraç F, Sait A (2016). Contagious Ecthyma (ORF) enfeksiyonu görülen koyun ve kuzularda pestivirus varlığının araştırılması. *Etlik Vet. Mikrobiyol. Derg.*, **27(1)**, 12-15.

Gür S (2009). A investigation of border disease virus in sheep in Western Turkey. *Trop. Anim. Health. Prod.*, **41**, 1409- 1412.

Gür S, Erol N, Yapıcı O (2009). Afyon, Konya ve Eskişehir İllerinde Keçilerde Pestivirus ve Parainfluenzavirus Tip 3 Enfeksiyonlarının Serolojik Olarak Araştırılması. *Kocatepe Vet. J.*, **2(1)**, 23-27.

Harada T, Tautz N, Thiel HJ (2000). E2-p7 region of the bovine viral diarrhea virus polyprotein: Processing and functional studies. *J. Virol.*, **74(20)**, 9498–9506.

Hasan SD (2021). Prevalence of border disease virus in sheep and goats in Mosul, Iraq. *Iraqi J. Vet. Sci.*, **35(2)**, 257-262.

Hasircioğlu S, Kale M, Acar A (2009). Investigation of pestivirus in aborted sheep and goats in Burdur region. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.*, **15(2)**, 163-167.

Hasircioglu S, Ozmen O, Kale M, Saltik HS (2017). Pestivirus infections in kids of wild goats (*Capra hircus aegagrus*). *Indian J. Animal. Res.*, **51(4)**, 752–755.

Hurtado A, Garcia-Perez AL, Aduriz G, Juste RA (2003). Genetic diversity of ruminant pestiviruses from Spain. *Virus. Res.*, **92**, 67-73.

İnce OB (2022). The seroepidemiology of pestivirus infection in sheep in Afyonkarahisar province of Turkey and the analysis of associated risk factors. *J. Hellenic. Vet. Med. Soc.*, **73(1)**, 3809–3816.

İssi M, Gül Y, Gürçay M, Gök T (2012). Elazığ yöresindeki koyunlarda saptanan pestivirus enfeksiyonu. *Fırat Univ. Sağlık. Bilim. Vet. Derg.*, **26(3)**, 165-169.

Intisar KS (2020). Border disease of sheep and goats in Saudi Arabia. *Indian. J. Microbiol. Res.*, **7(1)**, 95-98.

International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV).

<https://talk.ictvonline.org>. (Erişim Tarihi: 14.11.2020a).

International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Hairy Shaker Görünümlü Kuzu https://www.oakhill-vets.com/border-disease/?upm_export=print. (Erişim Tarihi: 17.11.2020b).

International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). BVDV-1 izolatının negatif kontrastlı elektron mikroskopundaki görüntüsü <https://ictv.global/report/chapter/flaviviridaeport/flaviviridaeport/flaviviridae/pestivirus>. (Erişim Tarihi: 19.10.2022).

Julia, S, Craig, MI, Jimenez LS, Pinto GB, Weber EL (2009). First report of BVDV circulation in sheep in Argentina. *Prev. Vet. Med.*, **90**, 274–277.

Kadiroğlu B, Aytoğlu G, Yeşilbağ K (2020). Diyarbakır İlinde Yetiştirilen Ruminantlarda Solunum Sistemi Viruslarının Seroprevalansı ve Pestivirus Varlığının Araştırılması. *J. Res. Vet. Med.*, **39(1)**, 26-33.

Kastelic JP (2006). Critical evaluation of scientific articles and other sources of information: An introduction to evidence-based veterinary medicine. *Theriogenology.*, **66**, 534–542.

Kennedy JA, Mortimer RG, Powers B (2006). Reverse transcription-polymerase chain reaction on pooled samples to detect bovine viral diarrhea virus by using fresh ear-notch–sample supernatants. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **18**, 89–93.

Keskin A (2015). Koyun ve keçilerde abort sebepleri. II.Koyun Keçi Sağlığı ve Yönetimi Sempozyumu. 15-18.04.2015. Marmaris.

Keskinkılıç K (2019). Koyunculuk Faaliyetinin Sürdürülebilirliği. İzmir Ticaret Borsası Yayınları Yayın No: 99. İZMİR.

Khodakaram-Tafti A, Mohammadi A, Farjani Kish GH (2016). Molecular characterization and phylogenetic analysis of bovine viral diarrhea virus in dairy herds of Fars province, Iran. *IJVR.*, **17(2-55)**, 89-97.

Krametter-Froetscher R, Kohler H, Benetka V, Moestly 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, Duenser M, Preyler B, Theiner A, Benetka V, Moestl K, Baumgartner W (2010). Pestivirus infection in sheep and goats in West Austria. *The Vet. J.*, **186**, 342–346.

Kümmerer BM, Stoll D, Meyers G (1998). Bovine viral diarrhea virus strain Oregon: a novel mechanism for processing of NS2–3 based on point mutations. *J. Virol.*, **72(5)**, 4127–4138.

Lindenbach B, Thiel HJ, Rice CM (2007). Family Flaviviridae, 1101-1133. In: Knipe DM, Howley PM (Eds.), *Fields Virology*, 5th Edition. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.

Mozaffari AA, Khalili M, Jahangosha F (2014). Identification of Cattle Persistently Infected with BVDV (PI) By Ear-Notch Testing in Southeast of Iran. *Animal Review*, **1(4)**, 65-68.

Mirolaw P, Polak M (2019). Increased genetic variation of bovine viral diarrhea virus in dairy cattle in Poland. *Vet. Res.*, **15(278)**, 2-12.

Mishra N, Pitale SS, Rajukumar K, Prakash A, Behera SP, Nema RK, Dubeyi SC (2012). Genetic variety of bovine viral diarrhea virus 1 strains isolated from sheep and goats in India. *Acta. Virol.*, **56**, 209-215.

Nagai M, Aoki H, Sakoda Y (2014). Molecular, biological, and antigenic. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **26(4)**, 547-552.

Nettleton PF (1987). Pathogenesis and epidemiology of border disease. *Ann. Rech. Vet.*, **18**, 147-155.

Nettleton PF (1990). Pestivirus infections in ruminants other than cattle. *Rev. Sci. Tech.*, **9**, 131-150.

Nettleton PF, Entrican G (1995). Ruminant pestiviruses. *Br. Vet.*, **5**, 615-642.

Nettleton PF, Gilray JA, Russo P, Dliissi E (1998). Border disease of sheep and goats, *Vet. Res*, **29**, 327-340.

Newcomer BW, Givens MD (2013). Approved and experimental countermeasures against pestiviral diseases: Bovine viral diarrhea, classical swine fever and border disease. *Antivir Res.*, **100(1)**, 133-150.

Office International Epizooties (OIE) (2017). *Manual of diagnostic tests and vaccines terrestrial animals.* Chapter 2.7.1. Border Disease.

Oğuzoğlu ÇT (2008). Sınır hastalığı (Border disease). *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.*, **55**, 69-74.

Oğuzoğlu TÇ, Tan MT, Toplu N, Demir AB, Bilge-Dagalp S, Karaoglu T, Ozkul A, Alkan F, Burgu L, 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.

Patel JR, Didlick S, Quinton J (2005). Variation in immunogenicity of ruminant pestiviruses as determined by the neutralisation assay, *The Vet. J.*, **169**, 468-472.

Paton DJ, Carlsson U, Lowings JP, Sands JJ, Vilcek SC, Alenius S (1995). Identification of herd-specific bovine viral diarrhoea virus isolates from infected cattle and sheep. *Vet. Microbiol.*, **43**, 283-294.

Peletto S, Caruso C, Cerutti F, Modest P, Zoppi S, Dondo A, Masoero L (2016). A new genotype of border disease virus with implications for molecular diagnostics. *Arch. Virol.*, **161**, 471-477.

Pestil Z (2014). Marmara Bölgesinde Koyunlardan alınan Abort ve Postnatal örneklerde Viral Etkenlerin (Pestivirus, Mavidil ve Akabene Virus) Araştırılması. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Doktora Tezi.

Peterhans E, Bachofen C, Stalder H, Schweizer M (2010). Cytopathic bovine viral diarrhea viruses (BVDV): emerging pestiviruses doomed to extinction. *Vet. Res.*, **41**:44.

Piras IM, Dei Giudici S, Fadda M, Anfossi AG, Oggiano A, Pittau M, Chessa B (2020). Distribution and Genetic Characterization of Border Disease Virus Circulating in Sardinian Ovine Flocks. *Pathogens.*, **9(5)**, 360.

Pratelli A, Martella V, Cirone F, Buonavoglia D, Elia G, Tempesta M, Buonavoglia C (2001). Genomic characterization of pestiviruses isolated from lambs and kids in southern Italy. *J. Virol. Methods.*, **94**, 81–85.

Reed KE, Gorbalenya AE, Rice CM (1998). The NS5A/NS5 proteins of viruses from three genera of the family Flaviviridae are phosphorylated by associated serine/threonine kinases. *J. Virol.*, **72**(7), 6199–6206.

Roeder PL, Jeffrey M, Drew TW (1987). Variable nature of Border disease on a single farm: the infection status of affected sheep. *Res. Vet. Sci.*, **43**(1), 28–33.

Saltik HS, Kale M, Atli K (2022). First molecular evidence of border disease virus in wild boars in Turkey. *Vet. Res. Commun.*, **46**, 243–250.

Sammin D, Markey B, Bassett H, Buxton D (2009). The ovine placenta and placentitis. *Vet. Microbiol.*, **135**(1–2), 90–97.

Schirrmeier H, Strebelow G, Depner K, Hoffmann B, Beer M (2004). Genetic and antigenic characterization of an atypical pestivirus isolate, a putative member of a novel pestivirus species. *J. Gen. Virol.*, **85**, 3647–3652.

Silveiraa S, Falkenbergb SM, Elderbrookc MJ, Sondgerothc KS, Dassanayakeb RP, Neillb JD, Ridpathb JF, Canala CW (2018). Serological survey for antibodies against pestiviruses in Wyoming domestic sheep. *Vet. Microbiol.*, **219**, 96–99.

Stalder HP, Meier P, Pfaffen G, Wageck-Canal C, Rufenacht J, Schaller P, Bachofen C, Marti S, Vogt HR, Peterhans E (2005). Genetic heterogeneity of pestiviruses of ruminants in Switzerland. *Prev. Vet. Med.* **72**, 37–41.

Sullivan DG, Chang DJ, Akkina RK (1997). Genetic characterization of ruminant pestiviruses: sequence analysis of viral genotypes isolated from sheep. *Virus. Res.*, **47**, 19–29.

Şevik M (2018). The Role of Pestiviruses (BDV and BVDV) in Ruminant Abortion Cases in the Afyonkarahisar Province. *Kocatepe. Vet. J.*, **11**(3), 238-244.

Tautz N, Elbers K, Stoll D, Meyers G, Thiel HJ (1997). Serine protease of pestiviruses: determination of cleavage sites. *J. Virol.*, **71**, 5415–5422.

Thabti F, Letellier C, Hammami S, Pepin M, Ribiere M, Mesplede A, Kerkhofs P, Russo P (2005). Detection of a novel border disease virus subgroup in Tunisian sheep. *Arch. Virol.*, **150**, 215-229.

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. *J. Comp. Path.*, **146**, 289-297.

TÜİK (2022). Türkiye İstatistik Kurumu. Hayvansal Üretim İstatistikleri.

<https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Hayvansal-Uretim-Istatistikleri-Haziran-2022-45594>. (Erişim Tarihi: 04.09.2022).

Ural ZE (2014). Aydın ve İzmir İllerindeki Koyun ve Keçilerde Pestivirus Enfeksiyonunun Serolojik ve Virolojik Olarak Araştırılması. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi.

Ural ZE, Erol N (2017). Aydın ve İzmir İllerindeki Koyun ve Keçilerde Pestivirus Enfeksiyonunun Serolojik ve Virolojik Olarak Araştırılması. *Harran Üniv. Vet. Fak Derg*, **6 (1)**, 63-68.

Valdazo-Gonzalez B, Alvarez-Martinez M, Greiser-Wilke I (2006). Genetic typing and prevalence of Border disease virus (BDV) in small ruminant flocks in Spain. *Vet. Microbiol.*, **117(2-4)**, 141-153.

Valdazo-Gonzalez, B, Alvarez-Martinez M, Sandvik T (2007). Genetic and antigenic typing of border disease virus isolates in sheep from the Iberian Peninsula. *Vet. J.*, **174**, 316-324.

VanderLey B, Ridpath J, Sweiger S (2011). Comparison of detection of bovine virus diarrhea virus antigen in various types of tissue and fluid samples collected from persistently infected cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **23**, 84-86.

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. *Arch. Virol.*, **136**, 309-323.

Vilcek S, Nettleton PF, Paton DJ, Belak S (1997). Molecular characterization of ovine pestiviruses. *J. Gen. Virol.*, **78**, 725-735.

Vilcek S, Björklund HV, Horner GW, Meers J, Belak S (1998). Genetic typing of pestiviruses from New Zealand. *NZ. Vet. J.*, **46**, 35-37.

Willoughby K, Valdazo-Gonzales B, Maley M, Gilray J, Nettleton P (2006). Development of a real time RT-PCR to detect and type ovine pestiviruses. *J. Virol.*, **132**, 187-194.

Xu J, Mendez E, Caron PR, Lin C, Murcko MA, Collett MS, Rice CM (1997). Bovine viral diarrhea NS3 serine proteinase: polyprotein cleavage sites, cofactor requirements, and molecular model of an enzyme essential for pestivirus replication. *J. Virol.*, **71(7)**, 5312-5322.

Yan L, Zhang S, Pace L, Wilson F, Wan H, Zhang M (2011). Combination of reverse transcription real-time polymerase chain reaction and antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of animals persistently infected with Bovine viral diarrhea virus. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **23**, 16-25.

Yavru S, Avcı O, Atlı K (2014). Koyun fötüslerinde Border Disease Virus varlığının immunperoksidaz ile saptanması. *Eurasian. J. Vet. Sci.*, **30(4)**, 222-226.

Yesilbag K, Förster C, Bank-Wolf B (2008). Genetic heterogeneity of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates from Turkey: Identification of a new subgroup in BVDV1. *Vet. Microbiol.*, **130(3-4)**, 258-267.

Yeşilbağ K (2017). Genol Viroloji. Genişletilmiş 2. Baskı, Bursa: Medyay Kitabevi.

Yeşilbağ K (2021). Bölüm 17: Flaviviridae. Veteriner Viroloji Hayvanların Viral Hastalıkları. 1. Baskı, Medipres Matbaacılık Yayıncılık Ltd. Şti. Malatya ISBN:9786059720533



