



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

**DİREKT IMMUNFLORESAN (DİF) TESTİ ve REVERZ
TRANSKRİPTAZ - POLYMERASE CHAIN REACTION (RT-
PCR) TEKNİĞİ KULLANILARAK SIĞIRLARDA
PARAİNFLUENZA VİRUS TİP 3' ÜN (BPIV3) ARAŞTIRILMASI**

Ali KÜÇÜK

DOKTORA TEZİ

VETERİNER VİROLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman
Prof. Dr. Yakup YILDIRIM

BURDUR-2020

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

**DİREKT IMMUNFLORESAN (DIF) TESTİ ve REVERZ
TRANSKRIPTAZ - POLYMERASE CHAIN REACTION (RT-
PCR) TEKNİĞİ KULLANILARAK SIĞIRLARDA
PARAİNFLUENZA VİRUS TİP 3' ÜN (BPIV3) ARAŞTIRILMASI**

Ali KÜÇÜK

DOKTORA TEZİ

VETERİNER VİROLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman
Prof. Dr. Yakup YILDIRIM

Bu tez, Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Projeler Koordinatörlüğü tarafından 0476-DR-17 Nolu proje ile desteklenmiştir.

BURDUR-2020

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamda hiçbir konuda yardımlarını esirgemeyen Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı öğretim üyesi danışman hocam Sayın Prof. Dr. Yakup YILDIRIM' a, bana destek olan Viroloji Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Sayın Prof. Dr. Mehmet KALE' ye, Sayın Dr. Öğr. Üyesi Sibel HASIRCIOĞLU' na, Sayın Dr. Öğr. Üyesi Kamil ATLI' ya, Sayın Dr. Öğr. Üyesi Hasbi Sait SALTİK' a; Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Sibel YAVRU' ya, Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Doktor Öğr. Üyesi Özlem ŞAHAN YAPICIER'e, Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Özlem ÖZMEN' e, İzmir Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü Viroloji Bölümü Veteriner Hekimi Dr. Abdurrahman Anıl ÇAĞIRGAN' a, moleküler çalışma aşamasında pozitif kontrolün sağlanmasında yardımcı olan ZOETİS firmasına ve doktora tez çalışmam sürecinde yardımcı olan Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı öğretim üyesi hocalarıma en içten teşekkürlerimi sunarım. Bu günlere gelebilmem için maddi ve manevi hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan sevgili aileme, eşim Cemre'ye ve kızım Ilgın' a varlıkları ve destekleri için teşekkürü borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK	ii
TEŞEKKÜR	iii
ETİK BEYAN	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER	vii
TABLolar	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR	ix
ÖZET	xi
İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT)	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. BPV3 Enfeksiyonunun Dünya'daki Durumu	3
2.2. BPIV3 Enfeksiyonunun Türkiye'deki Durumu	5
2.3. Etiyoloji	6
2.3.1. BPIV3'ün Taksonomisi	6
2.3.2. Virion Özellikleri	9
2.3.2.1. Virusun Morfolojisi	9
2.3.2.2. Nükleik Asit	10
2.3.3. Viral Proteinler	11
2.3.4. Biyolojisi	15
2.3.5. Kimyasal ve Fiziksel Ajanlar ile İnaktivasyonu	16
2.4. Epidemiyoloji	16
2.5. Patogenez	18
2.6. Klinik ve Patolojik (Nekropsi) Bulguları	21
2.7. İmmunoloji	23
2.8. Tanı	25
2.8.1. Klinik Tanı	25
2.8.2. Laboratuvar Tanı	25
2.8.2.1. Virolojik Tanı	25
2.8.2.2. Virus İzolasyonu	26
2.8.2.3. Moleküler Tanı	26
2.8.2.4. Serolojik Tanı	26
2.9. Tedavi	27
2.10. Koruma ve Kontrol	27
2.11. Tezin Amacı	28
3. GEREÇ ve YÖNTEM	30
3.1. Gereç	30
3.1.1. Örnekleme Yapılan Hayvanlar ve Alınan Numuneler	30
3.1.2. Moleküler Çalışmada Kullanılan Materyaller	32
3.1.2.1. Total RNA Ekstraksiyon Kiti	32
3.1.2.2. Virus	32
3.1.2.3. Tris-Acetate-Edta (TAE)	32
3.1.2.4. Agaroz Jel	33
3.1.3. Antijenik Çalışmada Kullanılan Materyaller	33

3.1.3.1. Anti-BPIV3 Poliklonal Antiserum Konjugat	33
3.1.3.2. Direkt İmmunfloresan (DIF) Pozitif Kontrol	33
3.1.4. Hücre Kültürü Çalışmalarında Kullanılan Materyal ve Numuneler	33
3.1.5. Histopatolojik Muayenede Kullanılan Materyal ve Numuneler	34
3.2. Yöntem	34
3.2.1. Moleküler Çalışmada Kullanılacak Örneklerin Hazırlanması	34
3.2.1.1. Lökosit Örneklerinin Hazırlanması	34
3.2.1.2. Nazal ve Konjuktival Swap Örneklerinin Hazırlanması	35
3.2.2. Moleküler Çalışma	35
3.2.2.1. Total RNA İzolasyonu	35
3.2.2.2. Primer Dizileri	36
3.2.2.3. One Step RT-PCR Metodu	36
3.2.2.4. Jel Elektroforezi	37
3.2.2.5. Dizi Analizi ve Filogenetik Ağaç Oluşturulması	38
3.2.3. DIF Yönteminde Kullanılan Örneklerin Hazırlanması	38
3.2.3.1. Nazal ve Konjuktival Swap Örneklerinin Hazırlanması	38
3.2.4. DIF Antikor Boyama Yöntemi	39
3.2.5. Hücre Kültürü	39
3.2.6. Histopatolojik İnceleme	40
4. BULGULAR	41
4.1. RT-PCR Metodu ile Yapılan Moleküler Araştırma Sonuçları	41
4.2. Sekans Çalışması ve Filogenetik Ağaç	43
4.3. DIF Antikor Boyama Testi Sonuçları	47
4.4. Histopatolojik Bulgular	52
4.5. Hücre Kültürü İnokulasyon Sonuçları	55
5. TARTIŞMA	58
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	70
KAYNAKLAR	71
ÖZGEÇMİŞ	84

ŞEKİLLER

Şekil 2.1.	BPIV3' ün filogenetik sınıflandırılması (MacLachlan ve ark., 2017)	8
Şekil 2.2.	Paramyxovirusların genel yapısı (Rima ve ark., 2019)	11
Şekil 2.3.	Respirovirusların RNA genom dizilimi (Rima ve ark., 2018)	12
Şekil 2.4.	BPIV3' ün transkripsiyon-replikasyon şeması (MacLachlan ve ark., 2017)	16
Şekil 2.5.	Paramyxovirusların yaşam döngüsü (Najjar ve ark., 2014)	20
Şekil 2.6.	BPIV3 ile enfekte bir akciğerin görüntüsü (Ellis 2010)	22
Şekil 4.1.	Pozitif ve Negatif jel elektroforez görüntüleri	42
Şekil 4.2.	163 NS örneğinin sekans çalışması sonucu çizilen filogenetik ağaç	44
Şekil 4.3.	DIF pozitif kontrol görüntüsü	49
Şekil 4.4.	DIF negatif kontrol görüntüsü	49
Şekil 4.5.	Pozitif DIF görüntüsü (163 numaralı nazal swap örneği)	50
Şekil 4.6.	Pozitif DIF görüntüsü (175 numaralı nazal swap örneği)	50
Şekil 4.7.	Pozitif DIF görüntüsü (178 numaralı nazal swap örneği)	51
Şekil 4.8.	Pozitif DIF görüntüsü (182 numaralı nazal swap örneği)	51
Şekil 4.9.	Normal görünümlü akciğerin histolojik görüntüsü	53
Şekil 4.10.	Pnömonili akciğerin histopatolojik görüntüsü	54
Şekil 4.11.	Pnömonili akciğerin histopatolojik görüntüsü	55
Şekil 4.12.	Bilateral nonpurulent nazal akıntı	56
Şekil 4.13.	Solunum güçlüğü	56
Şekil 4.14.	Unilateral purulent nazal akıntı	57

TABLÖLAR

Tablo 3.1.	Örneklemlerin yapıldığı hayvanlara ait ırk ve cinsiyet bilgileri	31
Tablo 3.2.	Örnekleme yapılan hayvanların ve alınan marazi maddelerin sayıları	31
Tablo 3.3.	Antijenik ve viral genom varlığı yönünden test edilen örnekler ve sayılar	32
Tablo 3.4.	BPIV3 primer dizileri, pozisyonları ve ürün büyüklüğü	36
Tablo 3.5.	One step RT-PCR metodunda kullanılan komponentleri konsantrasyon ve miktarları	37
Tablo 3.6.	RT-PCR metodunda protokol ve amplifikasyon aşaması	37
Tablo 4.1.	Lökosit, nazal/konjunktival swap örneklerinde RT-PCR Metodu ile elde edilen sonuçlar ve oranları	41
Tablo 4.2.	RT-PCR tekniğı ile BPIV3 nükleik asiti tespit edilen hayvanlar hakkında genel bilgiler ve klinik durumları.	41
Tablo 4.3.	Tez çalışmasında elde edilen dizilere ilişkin veriler.	43
Tablo 4.4.	Çalışmada elde edilen sekans ve Genbank' tan referans alınan dizinlerin genetik olarak birbirlerine olan yakınlıkları.	45
Tablo 4.5.	Tez çalışmasında elde edilen ve GenBank üzerinden referans alınan dizinlerin ait oldukları genotipler ve virus genusları arasındaki genetik yakınlıklar	46
Tablo 4.6.	Tez çalışmasında elde edilen ve GenBank üzerinden referans alınan dizinlerin ait oldukları genotiplerin kendi aralarındaki genetik yakınlıkları	46
Tablo 4.7.	DIF testi uygulanan nazal/konjunktival swap örneklerinde BPIV3 antijen varlığının sayısı ve oranı	47
Tablo 4.8.	DIF testi ile BPIV3 antijen tespiti yapılan hayvanlar hakkında genel bilgiler ve klinik belirtileri.	48

SİMGELER ve KISALTMALAR

µl	Mililitre
µm	Mikrometre
α	Alfa
β	Beta
aa	Amino asit
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
BAV	Bovine Adenovirus
BCoV	Bovine Coronavirus
BHV1	Bovine Herpesvirus 1
BK	Bovine Kidney
BPIV3	Bovine Parainfluenza Virus 3
bp	Base pair
BRDC	Sığırların Solunum Sistemi Hastalıkları Kompleksi
BRSV	Bovine Respiratory Syncytial Virus
BT	Bovine Turbinate
BVDV	Bovine Viral Diarrhea Virus
cDNA	Komplementer DNA
cm	Santimetre
CPE	Sitopatojen Etki
CPIV	Caprine Parainfluenza virus
DEPC	Dietilpiro Karbonat
DIF	Direkt İmmunfloresan
DIP	Direkt İmmunperoksidaz
dk	Dakika
DKID	Doku Kültürü Enfektif Doz
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles Medium
EBTr	Embryo Bovine Trechea
EDTA	Etilendiamin Tetra Asetik Asit
ELISA	Enzym Linked Immonosorbent Assay
F	Fuzyon
FAT	Floresan Antikor Testi
G	Guanin
gr	Gram
HA	Hemagglutinasyon
HE	Hemotoksilen Eozin
HI	Hemagglutinasyon İnhibisyon
HKİD	Hücre Kültürü Enfektif Doz
HN	Hemagglutinin-Neuroaminidaz
HPIV1	Human Parainfluenza virus 1
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
IFN	Interferon
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
IU	Internasyonal Ünite

kDA	Kilodalton
L	Large
M	Matrix
MDA5	Melanoma Farklılaşmasıyla ilgili protein
MDBK	Madin Darby Bovine Kidney
mg	Miligram
ml	Mililitre
MPiV1	Sendai Virus (Murine Parainfluenza virus 1)
mRNA	Mesajcı Ribonükleik Asit
N	Nükleokapsit
NANA	N-acetylneuraminic Acid
NK	Natural Killer
nm	Nanometre
NSV	Segmentsiz RNA virus
nt	Nükleotit
P	Fosfoprotein
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PCR	Polimerase Chain Reaction
PIV3	Parainfluenza virus 3
PKR	Protein Kinaz R
PPR	Kalıp Tanıma Reseptörleri
RdRp	RNA Bağımlı RNA Polimeraz
RIG-1	Retionik asit ile indüklenebilen gen
RLR	RIG-1 benzeri reseptör
RNA	Ribonükleik Asit
RNP	Ribonükleoprotein
RPM	Revolutions Per Minutes (Dakikadaki devir sayısı)
RSV	Respiratory Syncytial Virus
RT	Reverz Transkriptaz
RT PCR	Reverse Transcriptase Polimerase Chain Reaction
SF	Shipping Fever
SN	Serum Nötralizsyon
SPIV	Swine Parainfluenza virus 3
ss	Single strand (tek iplikcikli)
TAE	Tris Asetat Edta
TLR	Toll Like Reseptör
UTR	Untranslated Region (Translasyona Uğramayan Bölge)
qRT PCR	Quantitive RT-PCR

ÖZET

Direkt Immunfloresan (DIF) Testi ve Reverz Transkriptaz - Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) Tekniğı Kullanılarak Sığırlarda Parainfluenza Virus Tip 3' ün (BPIV3) Araştırılması

Burdur, Afyonkarahisar ve Isparta illerinde bulunan solunum sistemi enfeksiyonu klinik bulguları taşıyan ve aşılanmamış 190 adet sığırdan örnekleme yapıldı. Bu amaçla hayvanlardan nazal ve konjuktival swap örnekleri ile kan örneğı alındı. Alınan örnekler virolojik ve moleküler olarak incelendi. Toplanan 570 örnekte RT-PCR testi ile BPIV3 RNA viral genomu, 380 örnekte direkt immunfloresan antikor boyama yöntemi ile antijen varlığı araştırıldı. Yapılan moleküler çalışmada nazal swap örneklerinde 2 adet pozitiflik elde edilirken, konjuktival swap ve lökosit örneklerinde nükleik asit varlığına rastlanılmadı. Bunun yanı sıra virolojik olarak yapılan araştırmada 6 adet nazal swap örneğinde BPIV3' e ait antijenik yapılar gözlemlendi. Konjuktival swap örneklerinde ise etken tespiti yapılamadı. Viral genom varlığının ortaya koyulduğu 2 örnekte de virolojik teşhis gerçekleştirildi. Bunun yanı sıra moleküler ve virolojik olarak BPIV3 tespit edilen bir hayvana ait akciğer dokusunda histopatolojik incelemelerde bulunuldu. Bu incelemeler sonucunda pnömoni olgularına özgü septal doku kalınlaşması ve yangısal hücre infiltrasyonları gibi patolojik bulgular ortaya koyuldu. Moleküler ve DIF testi ile BPIV3 pozitifliği ortaya konulan bir örneğın sekans ve filogenetik analizleri yapıldı. Bu analizler sonucunda izole edilen suşun M proteinini kodlayan gen bölgesi baz alındığında BPIV3c genotipinde yer aldığı sonucuna ulaşıldı.

Anahtar Kelimeler: Bovine Parainfluenza Virus Tip 3, DIF, Histopatoloji, RT-PCR Sekans

ABSTRACT

Investigation of Parainfluenza Virus Type 3 (BPIV3) in Cattle Using Direct Immunofluorescence (DIF) Test and Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) Technique

Sampling was obtained from 190 unvaccinated cattle with clinical signs of respiratory system infection in the provinces of Burdur, Afyonkarahisar and Isparta. For this purpose, blood samples were taken from animals with nasal and conjunctival swap samples. The samples taken were examined virologically and molecularly. The viral genome of BPIV3 RNA was investigated by RT-PCR test in 570 samples collected and the presence of antigen in 380 samples by direct immunofluorescent antibody staining method. While 2 positivity was obtained in the nasal swap samples in the molecular study, no nucleic acid was found in the conjunctival swap and leukocyte samples. In addition, antigenic structures of BPIV3 were observed in 6 nasal swap samples in the virological study. In conjunctival swap samples, the virus could not be detected. Virological diagnosis was performed in both samples in which the presence of viral genome was revealed. In addition, histopathological examinations were made in the lung tissue of an animal whose molecular and virological BPIV3 was detected. As a result of these examinations, pathological findings such as septal tissue thickening and inflammatory cell infiltrates specific to pneumonia cases were revealed. Sequence and phylogenetic analysis of a sample in which BPIV3 positivity was revealed by molecular and DIF tests were performed. As a result of these analyzes, it was concluded that the isolated strain is included in the BPIV3c genotype based on the gene region encoding the M protein.

Anahtar Kelimeler: Bovine Parainfluenza Virus Type 3, DIF, Histopathology, RT-PCR, Sequence

1. GİRİŞ

Sığırların solunum sistemi enfeksiyonları kompleksi, özellikle büyük kapasiteli sürülerde hayvanların sağlığını ve refahını tehdit eden bununla birlikte üreticilerin ekonomik kayıp yaşamasına sebep olan multifaktoriyel hastalıklardır ve bu enfeksiyonlar özellikle stres, baskılanmış immun sistem, çevresel etmenler, kötü sürü yönetimi gibi pek çok olumsuz faktörün bir arada bulunması ile farklı patojenlerin koenfekte olması sonucu ortaya çıkar (Headley ve ark., 2018). Hayvanlarda meydana gelen pnömoni, bronkopnömoni, bronşit gibi solunum yolu enfeksiyonlarının büyük bir çoğunluğu viral etkenler tarafından meydana getirilir. Bu kompleksi oluşturan viruslar genellikle solunum sistemi epitellerini enfekte ederler. Bunun sonucunda meydana gelen bu enfeksiyon küçük bir alanı lokal olarak etkileyebilir veya alveol, trake ve akciğerler gibi doku veya organlara yayılarak tüm solunum sistemi üzerinde etkili olabilir. Bunun yanı sıra, bazı viral etkenler, vücuda giriş yolu olarak solunum sistemini kullanıp daha sonra farklı sistem veya organlara da yayılım gösterebilirler (Kirchhoff ve ark., 2014; Taylor ve ark., 2010; Welsh ve ark., 2004).

Bu solunum sistemi hastalık kompleksini ortaya çıkaran etkenlerden birisi olan Bovine Parainfluenza Virus-3 (BPIV3), çoğunlukla sonbahar ve kış aylarında gözlemlenen bir üst solunum yolu patojenidir. Hayvanlarda, immunsupresyona sebep olan yoğun stres, beslenme yetersizliği, kötü bakım koşulları vb. durumlarda meydana gelen hastalık, çoğunlukla genç sürüleri etkilediği gibi her yaşta hayvanda görülmektedir. Etkenin tek başına meydana getirdiği enfeksiyonlar genellikle subklinik seyrederken diğer patojen etkenlerin katılması halinde dispne, öksürük, yüksek ateş ve nazal ve konjuktival akıntılar gözlemlenebilir (Aly ve ark., 2003; Gür ve ark., 2009; Harwood ve ark., 2008; Philip-Reversat ve ark., 2017; Yıldırım ve ark., 2009). Virus, genellikle *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* gibi bakteriyel; BHV-1, RSV, BAV gibi viral etkenler ile koenfeksiyonlar oluşturmaktadır (Griffin ve ark., 2010; Welsh ve ark., 2004; Yıldırım ve ark., 2009).

Planlanan bu araştırmada, BPIV3'ün Burdur, Afyonkarahisar ve Isparta yörelerindeki solunum sistemi enfeksiyonu semptomları gösteren aşılanmamış sığırlardan toplanan nazal-konjuktival swaplardan direkt immunfloresan testi ile

antijenik yine bu swaplar ve aynı hayvanlardan alınan kan örneklerinde konvensiyonel RT-PCR yöntemi kullanılarak moleküler tespitinin yapılması ve etkenin örnekleme yapılan bölgelerdeki varlığıyla ilgili bilgi edinilmesi amaçlanmıştır. Bunun yanı sıra daha önceden araştırmanın yapıldığı bölgelerde BPIV3'ün antijenik ve moleküler olarak tespiti ile ilgili herhangi bir çalışmanın yapılmamış olmasından dolayı literatür bilgisine katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Araştırma sonucu elde edilecek veriler ile çalışmanın yapıldığı bölgelerdeki BPIV3 etkenin varlığı belirlenecek ve enfeksiyonla mücadele konusunda bilimsel yaklaşımlarda bulunulacaktır.



2. GENEL BİLGİLER

BPIV3, ilk olarak Amerika Birleşik Devletleri (ABD) Maryland Beltsville'deki Tarım Bakanlığı çalışanlarınca solunum sistemi semptomları gösteren sığırların nazal sekretlerinden izole edilmiştir (Reisinger ve ark., 1959). Bu veri *American Veterinary Medical Association*'ın 1959 yılı Ağustos sayısında yayımlanan bir makalede ilk olarak *Myxovirus SF-4* olarak isimlendirilmiştir (Reisinger ve ark., 1959). Aynı sayıda Maryland, Bethesda'daki Ulusal Sağlık Enstitüsü ile ortak çalışma yürüten İllinois Üniversitesi çalışanları ise virusun ikinci kez izolasyonu ile ilgili bir rapor sunmuşlardır (Hoerlein ve ark., 1959). Bu raporla birlikte etkene human Parainfluenza Virus-3 (HPIV3)'ün HA-1 suşu ile BPIV3 arasındaki serolojik ilişkiye dayandırılarak günümüzde kullandığımız ismi verilmiştir (Abinanti ve Huebner, 1959).

BPIV3'ün üreme özellikleri ve izolatları ilgili ilk bilgiler 1960'lı yıllarda yapılan araştırmalara dayanmaktadır (Ellis, 2010). Bu araştırmalar doğrultusunda etkenin dünya genelindeki sığır popülasyonlarında endemik bir enfeksiyon meydana getirdiği belirlenmiştir (Elenkumaran, 2013). Bin dokuz yüz yetmiş ve 1980'li yıllara gelindiğinde ise yapılan çalışmalar BPIV3 enfeksiyonunun patogenezi ve izolatlar arasındaki genetik ve antijenik farklılıkların ortaya konulması üzerine yoğunlaşmıştır (Ellis, 2010). Patogenez ve genetik çalışmaların yanı sıra enfeksiyonun koruma ve kontrolüne yönelik intranazal ve parenteral aşılama çalışmaları da yapılmıştır (Ellis 2010).

2.1 BPIV3 Enfeksiyonunun Dünya'daki Durumu

Süt ve besi hayvanı yetiştiriciliği yapılan çiftlikler dünya gıda ekonomisinde önemli bir rol oynamaktadır. Viral veya bakteriyel patojenlerin yol açtığı solunum sistemi hastalıkları bu çiftliklerde hayvan ölümlerine, süt ve besi performansında düşüşlere ve veteriner hizmetleri giderlerine neden olarak ekonomik kayıplar meydana getirir. Solunum sistemi enfeksiyonlarının başlıca viral sebeplerinden biri olan BPIV3 ilk kez ABD'de teşhis edilmiştir (Reisinger ve ark., 1959). Abinanti ve Huebner (1959), yaptıkları çalışmada ise ülkenin farklı bölgelerindeki sığırlardan alınan serum örneklerinde etkene karşı gelişmiş antikor tespit etmişlerdir. BPIV3 Avrupa, Kuzey ve

Güney Amerika, Asya ve Afrika’da besi ve süt sığırlarında endemik olarak görülmektedir (Tiwari ve ark., 2016). Dünya’da BPIV3 prevalansının ortaya koymak için çok sayıda araştırma yapılmıştır.

Gulliksen ve ark. (2009), Norveç’te süt inekleri üzerinde enzim-linked-immunosorbent-assay (ELISA) ile yaptıkları araştırmada virusa karşı %50,2; Pardon ve ark. (2011), Belçika’da besi danalarında ELISA ile yaptıkları çalışmada %53,3; Kestaitiene ve ark. (2009), Litvanya’da sığırlar üzerinde yaptıkları çalışmada 2006’da %72,8, 2008 yılında %56,8; Valarcher ve Hogghund (2006), Fransa’nın Güney batısında ve merkezindeki sığırlardan alınan kan serumlarından ELISA ve hemaglutinasyon (HA)- hemaglutinasyon-inhibisyon (HI) testi aracılığıyla yaptıkları analizlerde danalarda %97,5, ineklerde %100 seropozitifliğe rastlamışlardır. Bu çalışmaların yanı sıra Salwa ve ark. (2007), Polonya ormanlarındaki 122 adet vahşi bizon üzerinde yaptıkları seroprevalans araştırmasında HI testi yöntemiyle etkene karşı %13,9 antikor pozitifliği belirlemişlerdir.

Roshtkhari ve ark. (2012), İran’nın Horasan bölgesindeki akut enfekte ve konvelesan dönemdeki sığırlar üzerinde ELISA ile yapmış olduğu çalışmada, akut enfekte hayvanlarda %90, iyileşen hayvanlarda %26,1 antikor pozitifliği tespit etmişlerdir. Bu çalışmaya benzer şekilde Ezzi ve ark. (2013), İran’ın Kazvin bölgesinde 1 ile 4 yaşlı sığırlardan farklı mevsimlerde toplanılmış kan serumları ile ELISA testi uygulanarak yaptıkları araştırmada ortalama seropozitiflik oranını %95 olarak hesaplanmış bununla birlikte yaştan seropozitiflikte önemli bir rol oynamadığı fakat serum örneklerindeki antikor titresinin sonbahar ve kış aylarında diğer aylara oranla daha yüksek olduğu sonucuna varmışlardır. Mahmoud ve Allam (2013), Suudi Arabistan’ da 460 sığırdan aldıkları kan örneklerinde ELISA yöntemi kullanarak BPIV3’e karşı %67,6 antikor pozitifliği saptamışlardır. Goswami ve ark. (2017), Hindistan’ın Pencap eyaletinde yaptıkları çalışmada BPIV3’e karşı %27,81 seropozitiflik tespit etmişlerdir. Hai-Yong ve ark. (2014), Çin’de yaptıkları çalışmada ülkenin 12 farklı bölgesinde yetiştirilen sığırların kan serumlarında BPIV3’e karşı antikor pozitifliğini araştırmışlardır. Nötralizasyon testinin kullanıldığı bu çalışmada %77,6 oranında seropozitiflik bildirmişlerdir. Yang ve ark. (2008), Kore’ de keçilerde yaptıkları çalışmada BPIV3 etkenine karşı %9,5 seropozitiflik bulmuşlardır.

Nijerya’ da Ibu ve ark. (2005), sığırlarda yaptığı araştırmada %51,37; Callaby ve ark. (2016), Kenya’ da sığırlar üzerinde yaptığı araştırmada %20,1; Ghram ve Minocha (1990), Tunus’da ELISA yöntemiyle yaptığı seroprevalans çalışmasında BPIV3’e karşı 1 yaşın altındaki deneklerde %46,5, 1-2 yaş arasındaki hayvanlarda %37,87 ve 2 yaşın üstündekilerde %81,33 antikor pozitifliği bildirilmiştir. Saeed ve ark. (2016) Sudan’daki mezbalardan topladıkları pnömoni tablosu gösteren keçi, koyun ve sığır akciğerlerinde ELISA ve direkt immunfloresan (DIF) tekniğini kullanarak BPIV3 antijeni varlığını araştırmışlardır ve %12,8 (29/226), koyunlarda %9,8 (31/316) ve keçilerde %47,8 (11/23) oranında pozitiflik tespit etmişlerdir.

2.2 BPIV3 Enfeksiyonunun Türkiye’deki Durumu

Ülkemizdeki hayvancılık faaliyetleri ve politikaları, hayvanların barınma besleme koşulları, bölgeler arası hayvan transportları, Türkiye’nin coğrafi konumu ve ulusal aşılama programları gibi etmenler göz önünde bulundurulduğunda özellikle sığır, koyun ve keçi gibi çiftlik hayvanları BPIV3 ve benzeri solunum sistemi enfeksiyonlarına predispoze hale gelmektedir.

Türkiye’ de Parainfluenza virus-3 (PIV-3) kaynaklı enfeksiyonlar üzerine pek çok araştırma bulunmaktadır. Etken üzerine yapılan ilk çalışmalar 1970’li yıllarda başlamıştır. Erhan ve ark. (1971), gerçekleştirdikleri çalışmada İnanlı İnekhanesindeki (Tekirdağ) 25 sığırın tümünün (%100); Karacabey İnekhanesinde (Bursa) ise 75 sığırın 72’sinin (%96) kan serumlarında HI testi ile BPIV3 seropozitifliği bildirilmiştir. Günümüzde ise Kale ve ark. (2013), Burdur ilindeki sığırlarda ELISA testi ile yaptıkları araştırmada virusa karşı %94,6; Yıldırım ve ark. (2009), Iğdır, Kars, Ardahan illerindeki sığırlarda mikronötralizasyon testi ile yaptıkları araştırmada %55,84; Gür (2018) Afyonkarahisar ve ilçelerindeki sığırlarda nötralizasyon testi ile yaptığı çalışmada %82,7; Avcı ve ark. (2014), Amasya, Çorum, Kayseri, Nevşehir, Yozgat illerindeki sığırlarda ELISA testi ile yaptıkları araştırmada %85,6 oranında seropozitiflik tespit edilmiştir. Yazıcı ve ark. (2019), ise Karadeniz bölgesindeki koyun, keçi ve sığırlardan aldıkları kan serumlarında virus nötralizasyon testi ile BPIV3 genotip C’nin bölgedeki seroprevalansı araştırmasında, koyunlarda %20, keçilerde %24,19, sığırlarda ise %21,04 oranında seropozitiflik saptamışlardır. Bu

Çalışma lkemizde genotip C ile alakalı elde edilen ilk veriler olması açısından da önemlidir.

Hacıoğlu (2011), Ankara ilinde farklı marazi maddeler kullanarak RT-PCR tekniğıyle BPIV3' n moleküler tespiti üzerine yapmış olduğu çalışmada %1,4 (1/71) oranında pozitiflik tespit etmiştir. Yapılan bu alışma Türkiye'de BPIV3'n moleküler teşhisi üzerine yapılan ilk araştırma olarak kabul edilir.

Timurkan ve ark. (2019), Erzurum ve çevresindeki illerde yetiştirilen sığırlar üzerinde RT-PCR tekniğı ile yaptıkları alışma, BPIV3'n karakterizasyonunun ortaya koyulması açısından Türkiye'de yapılan ilk çalışma olarak kabul edilebilir. Bu çalışmaya benzer şekilde Albayrak ve ark. (2019), yaptıkları çalışmada da etkenin teşhisi için ELISA testi ve RT-PCR tekniğı kullanılmıştır.

BPIV3 sığırlar dahil tüm ruminantlar için patojen bir etkendir. Koyunlardaki PIV3 enfeksiyonun varlığı ülkemizde ilk defa Erhan ve Martin (1969), tarafından ortaya koyulmuştur. Gençay ve Akça (2004), Ankara çevresindeki mezbahalara gelen koyunlardan aldıkları kan, nazal swap, akciğer ve mediastinal lenf yumrusu doku örneklerinde mikro serum nötralizasyon (SN) ve DIF testlerini kullanarak PIV3'n serolojik ve virolojik olarak teşhisini gerçekleştirmiştir. Ayrıca Van bölgesindeki keçi sürülerinde yapılan bir çalışmada Ataseven ve ark. (2010), %5,2; yine aynı bölgede koyunlar üzerinde yapılan bir araştırmada özgünlük ve ark. (2012), %31,75 seropozitiflik tespit etmişlerdir. Bu çalışmalara benzer olarak Akça ve ark (2004), Türkiye'nin çeşitli illerinde yetiştiriciliğı yapılan mandalardan alınan kan serumlarında mikronötralizasyon testi ile PIV3'a karşı %11 oranında antikör pozitifliğı bulmuşlardır.

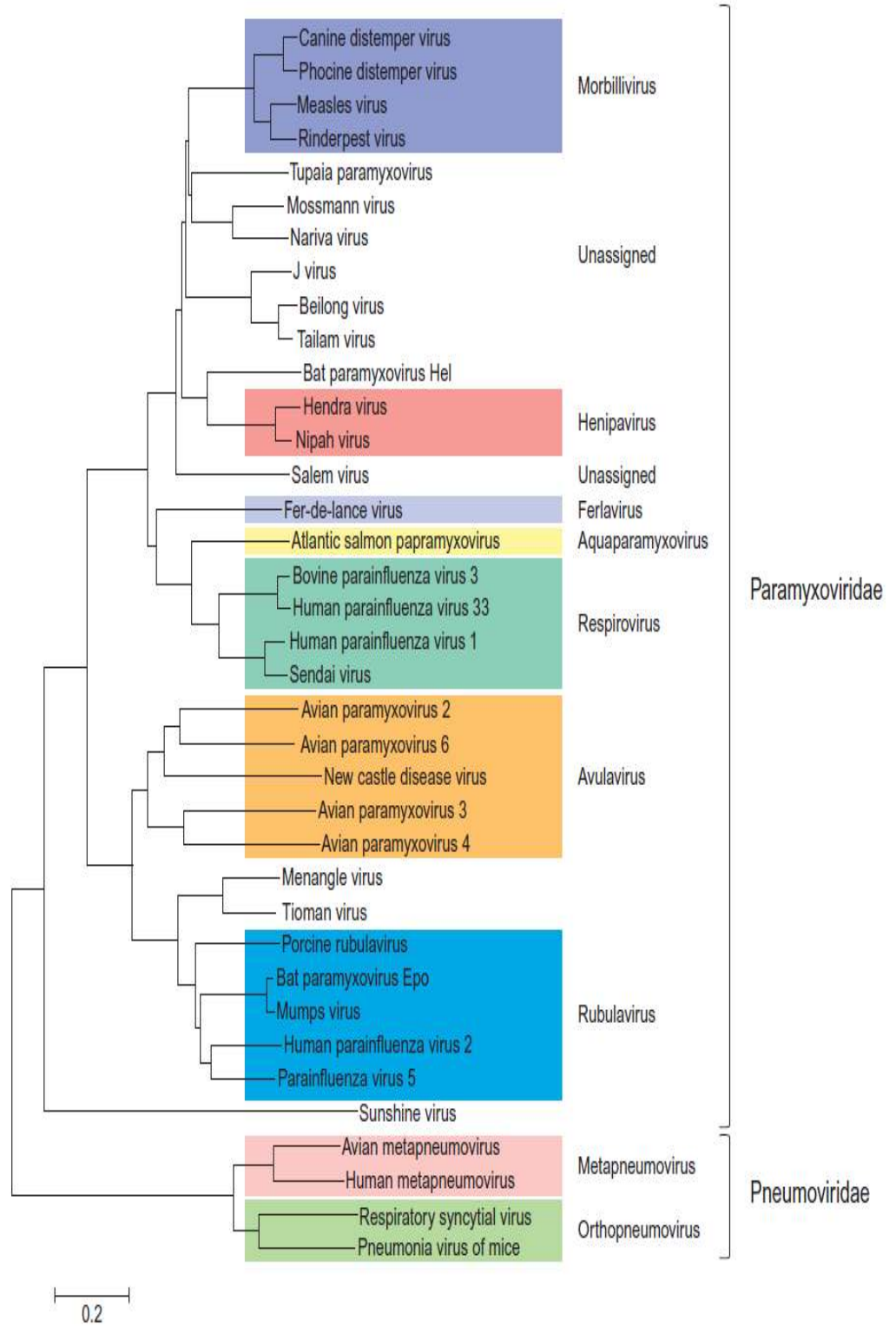
2.3 Etiyoloji

2.3.1. Bovine Parainfluenza Virus Tip 3'n Taksonomisi

Bovine Parainfluenza Virus Tip 3, Uluslararası Virus Taksonomi Komitesi (ICTV)'nin 2018 yılında yapmış olduğu yeni taksonomik dizilemeye göre

Mononegavirales takımında yer alan *Paramyxoviridae* familyası *Orthoparamyxovirinae* alt familyası içindeki *Respirovirus* genusunda sınıflandırılmış, etkenin ismi ise *Bovine Respirovirus 3* olarak değiştirilmiştir (Rima ve ark., 2019). BPIV3 insanlarda enfeksiyona yol açan Human Parainfluenza virus tip 1-3 (HPIV1 ve HPIV3) ve rodentlerde enfeksiyon meydana getiren Sendai Virus (MPIV-1) ile aynı genustadır (Karron ve Collins, 2007). HPIV1-HPIV3 ve MPIV-1 ile BPIV3 arasında genetik ve antijenik yakınlık bulunmaktadır (Ellis, 2010; Gaeta ve ark., 2017).





Şekil 2.1. *Paramyxoviridae* ve *Pneumoviridae* familyalarında yer alan virusların L protein sekans verilerine göre filogenetik ilişkileri (MacLachlan ve ark., 2017).

BPIV3 izolatlarının tümü yakın antijenik ilişki içinde olsalar da genetik çeşitlilik gösterebilmektedir. Harwood ve ark. (2008), Avustralya’da yaptıkları bir çalışmada SF-4/32 referans suşu ile saha örneklerinden izole edilen etkenin M proteinini kodlayan gen bölgesinin nükleotit sekans verilerini karşılaştırmış ve virusun BPIV3a ve BPIV3b olmak üzere 2 farklı genotipini ortaya koymuşlardır. Bu çalışma BPIV3 izolatları arasındaki genetik ayrışmayı gösteren ilk çalışma olma özelliğini taşımaktadır (Harwood ve ark., 2008). BPIV3b genotipinin BPIV3a’dan köken aldığı ve evrildiği düşünülmektedir. Zhu ve ark. (2011), Kore’ de yaptıkları araştırmada bir diğer genotip olan BPIV3c’yi izole etmişler ve bu genotipin daha önce tanımlanan BPIV3a ve BPIV3b’den farklı olduğunu ortaya koymuşlardır.

2.3.2. Virion Özellikleri

2.3.2.1 Virusun Morfolojisi

BPIV3, *Paramyxoviridae* familyasının tipik özelliklerini taşımakta ve pleomorfik bir morfoloji sergileyen virion genellikle ikosahedral yapıda olup buzlu cam görünümündedir (Rima ve ark., 2019). Flamentöz şekilde de olabilen etkenin çapı 150-350 nm boyutlarındadır (MacLachlan ve ark., 2017). Nükleokapsiti çevreleyen lipid-bilayer zar tomurcuklanma yöntemi ile direkt olarak konakçı hücre membranından köken alır (Chamber ve Takimoto, 2011). Üzerinde homooligomer glikoprotein yapısında hemagglutinin-neuroaminidaz (HN) ve fusion (F) peplomerlerini bulundurur (Hacıoğlu, 2011; Rima ve ark., 2019). Yüzey proteinlerinin uzunluğu 8-14 µm iken birbirleri arasındaki mesafe 7-10 µm dir (Harwood ve ark., 2008; Karron ve Collins, 2007; Rima ve ark., 2019).

M proteini viral zarın hemen altında uzanır, transmembran glikoproteinleri ve nükleokapsitle etkileşim halindedir. Bu protein morfolojik yapının oluşması ve viral maturasyon aşamalarında önemli rol oynar (Elenkumaran, 2013).

Viral genom 1 µm uzunluğunda, 18 µm çapında “balık kılçığı” şeklinde morfolojiye sahip helikal yapıli bir nükleokapsit tarafından paketlenmiş haldedir. Bu yapıyı temel olarak Nükleokapsit (N) proteini oluştursa da, az miktarda fosfoprotein

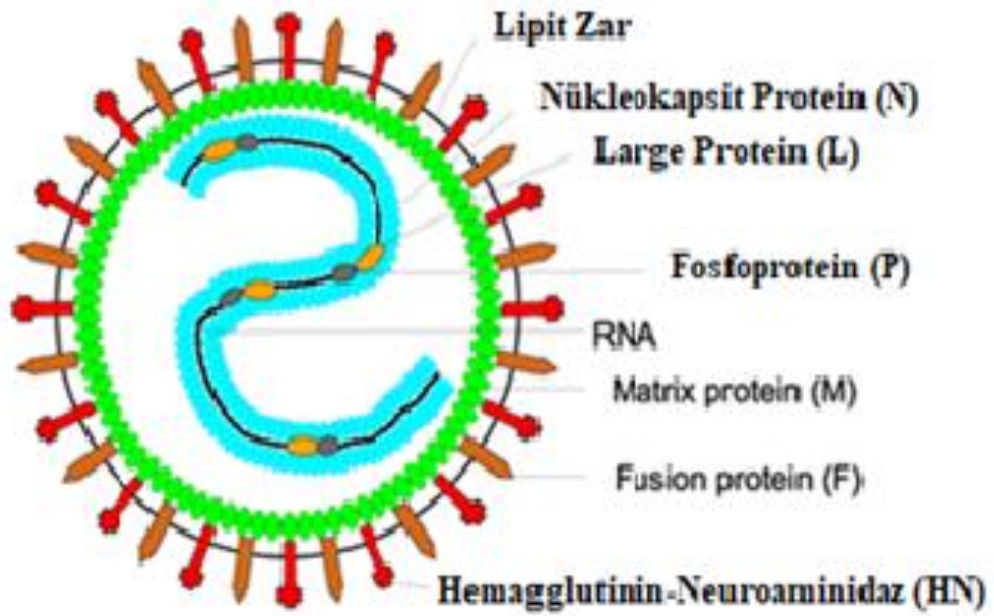
(P) ve Large (L) protein de bulunmaktadır (Ellis, 2010). Etkenin buoyant değeri 1.197 g cm³dür (Elenkumaran, 2013).

Konakçı hücre yapısına göre farklılık göstermekle birlikte virionun %20-25'i konakçı hücre membranından köken alan lipid yapıdan oluşur. Bunun yanı sıra %6 oranında karbonhidrat içermektedir (Rima ve ark., 2019).

2.3.2.2. Nükleik Asit

Lineer, segmentsiz, negatif polariteli, tek iplikcikli (ss) RNA nükleokapsidin içerisinde yer alır (Elenkumaran, 2013; Lamb ve Parks, 2007; Rima ve ark., 2019). BPIV3 15456 nükleotit (nt) büyüklüğündedir (Ellis, 2010). Nükleoprotein yapısının her bir alt ünitesinin 6 nt'ye bağlanmasından dolayı *Paramyxoviridae* familyasındaki pek çok etkenin nt uzunluğu altının katları şeklindedir. Altı kuralı olarak bilinen bu durum viral genom replikasyonun meydana gelmesi için gereklidir (Kolakofsky ve ark., 2005).

BPIV3 genomu 3' başlangıç ve 5' bitiş nükleotit dizileri tarafından düzenlenmekte ve bu dizilerin viral replikasyon ve transkripsiyon aşamalarında önemli bir rol oynadıkları düşünülmektedir (Elenkumaran, 2013). Viral genom 9 protein kodlayan 6 gen içermektedir (Ellis, 2010). Bunun yanı sıra tüm genler 3' ucunda "leader" adı verilen yaklaşık 55 nt büyüklüğünde; 5' ucunda "trailer" denilen yaklaşık 44 nt büyüklüğünde translasyona uğramayan bölgelere (Untranslated Region-UTR) sahiptir (Spilki, 2016). "Leader" bölgede 13-14 nt içeren iyi korunmuş viral genom protomerleri bulunur. Böylece transkripsiyon ve translasyon aşamalarında P ve L proteinlerinin RNA ile etkileşim halinde olmasına olanak tanır (Bailey ve ark., 2000; Lamb ve Parks, 2007). Gen dizilimi 3' 5' e doğru sırayla N-P-M-F-HN-L şeklindedir (Ellis, 2010).



Şekil 2.2. Paramyxovirus partikülünün şematik diagramı (Rima ve ark.,2019).

2.3.3. Viral Proteinler

BPIV3, 6 gen tarafından kodlanan 9 adet proteine sahiptir. Bu proteinlerden N, M, P, F, HN ve L proteinleri yapısal proteinlerken V, C ve D ise yapısal olmayan proteinlerdir (Ellis, 2010; Karron ve Collins, 2007). P geni *Paramyxovirinae* altı sınıfında yer alan virüslerde birden fazla protein kodlayabilmektedir (Elenkumaran, 2013).

Paramyxoviridae familyası içerisinde sınıflandırılmış olan tüm virüsler zarları üzerinde glikoprotein yapısında peplomer kompleksleri taşırlar. Etkenin konumlandırıldığı genusa bağlı olarak bu yapılar farklılaşmaktadır (Lamb ve Parks, 2007). Fusion (F) ve Haemagglutinin-Neuroaminidase (HN) BPIV'ün en önemli yüzey proteinleridir. Bu proteinler etkenin konakçı hücreye adsorbsiyonu ve penetrasyonundan sorumludur (MacLachlan ve ark., 2017).

Helikal simetrik nükleokapsit ise viral genomunu simetrik bir şekilde saran Nükleokapsit protein (N), Fosfoprotein (P) ve Large Polymerase proteinden (L) oluşur. Bir diğer yapısal protein olan Matrix (M) protein nükleokapsit ve zar arasında

yer alır. Bu protein etkenin morfolojisi ve enfeksiyon aşamalarında önemli rol oynar (Elenkumaran, 2013).



Şekil 2.3. Respirovirusların transkripsiyondan sorumlu gen bölgelerinin dizilimi (Rima ve ark.,2018).

BPIV3'ün yapısında en fazla bulunan proteinlerden biri olan N proteini hücresel enfeksiyon aşamasında viral RNA genomundan transkribe edilen ilk proteindir. Dört yüz seksen dokuz amino asitten (aa) meydana gelir ve ağırlığı yaklaşık 53-58 kilo dalton (kDa)'dır (Elenkumaran, 2013). N protein, helikal morfolojiye sahip ribonükleoproteini (RNP) sararak P (fosfoprotein) ve L (large protein) ile birlikte RNP'nin yapısına katılır. Bunun yanı sıra RNA bağımlı RNA polimeraz (RdRp) ile de ilişkilidir (Chambers ve Takimoto, 2011; Elenkumaran, 2013; MacLachlan ve ark, 2017). P ve L proteinleri N protein ile etkileşim içerisinde olabileceği gibi sitoplazmada serbest şekilde de bulunabilir (Ellis, 2010). N proteini enfekte hücre içerisinde viral RNA'ya bağlı şekilde veya N⁰ isimlendirmesiyle P proteiniyle ilişkili bir halde 2 farklı formda bulunabilir (Karron ve Collins, 2007; Precious ve ark., 1995). Viral RNA sentez basamağının en önemli etmenlerinden birisi 400 aa uzunluğundaki P proteindir. Bu protein P geni tarafından üretilen mRNA'dan kodlanmaktadır (Karron ve Collins, 2007). Oligomer yapıdaki protein serine ve threonine ile fosforile olur (Elenkumaran, 2013). N ve L proteinleri ile etkileşime girerek viral RNA ile birlikte RNP yapısını oluşturur (Ellis, 2010). N⁰-P kompleksi N proteinin konakçı hücre RNA ile nonspesifik bir etkileşime girmesini önler ve yeni sentezlenen RNA genomlarının enkapsidasyonunda görev alır (Chattopadhyay ve ark., 2011). L proteini yaklaşık 2200 aa uzunluğundadır ve en az bulunan yapısal proteindir. Yapı, mRNA sentezi için gerekli olan metilasyon ve poliadenilasyon aşamalarında katalitik görevi görmektedir. P proteini ile kurduğu kompleks yapı viral genomun replikasyonunda önemli rol oynar (Chamber ve Takimoto, 2011; Grdzelishvili ve ark., 2005).

Virion yapısında en fazla bulunan bir diğer protein ise Matrix (M) proteinidir (Elenkumaran, 2013). Yaklaşık 38-41 kDa ağırlığına sahip olan bu protein, hidrofobik ve non glikozildir. M protein lipid bilayer zarın hemen altında uzanmış halde bulunur ve nükleokapsid ile zarı birbirinden ayırır, yeni virus partiküllerinin, tomurcuklanması ve salınımı sırasında görev yapar (Chattopadhyay ve ark., 2011; Chamber ve Takimoto, 2011).

Yapısal olmayan V proteini P geninden RNA düzenlenmesi de denilen bir mekanizma ile viral RNA polimeraz tarafından mRNA'ya bir guanin (G) bazı eklenmesi sonucu sentezlenir. D proteini ise yine aynı mekanizma ile iki G bazı eklenmesi ile meydana gelmektedir (Karron ve Collins, 2007). C proteini farklı bir mekanizma ile sentezlenmektedir. P geni üzerinde bulunan overlapping gen bölgelerinde alternatif bir başlangıç kodonunun translasyonu ile ortaya çıkar (Ohkura ve ark., 2015).

C proteininin, virus ile enfekte hücrede tip 1 interferonun indüksiyonunu ortadan kaldırarak salınımını engellediği böylece virus patojenitesinde büyük rol oynadığı bilinmektedir (Chamber ve Takimoto, 2011). Bunun yanı sıra L proteini ile etkileşim halinde olan C proteini viral genomun transkripsiyonunda ve replikasyonunun düzenlenmesinde görev alır (Karron ve Collins, 2007; Takimoto ve Portner, 2004). Bu proteinlerin, BPIV3 ile enfekte bir hücrenin, α ve β interferon salınımını inhibe ettikleri düşünülmektedir (Ellis, 2010; Karron ve Collins, 2007; Takimoto ve Portner, 2004).

F (füzyon) glikoproteini konakçı hücre plazması ile virion zar arasında viral penetrasyon aşamasında görev alan tip 1 integral membran proteinidir (Elenkumaran, 2013). Yaklaşık 540 aa uzunluğunda olan yapı nötr pH seviyelerinde aktiftir. F proteini ilk olarak konakçı hücrede bulunan proteolitik enzim ile inaktif prokürsörü olan F^0 formunda sentezlenir (Chattopadhyay ve ark., 2011). F^0 fonksiyonel hale gelebilmek için bölünme (klivaj) aşaması geçirir. Bu bölünme sonucunda disülfid bağlı F^1 ve F^2 polipeptitlerinden oluşan aktif füzyon proteinleri meydana gelir (Scheid ve Choppin, 1974). F^1 C-terminal transmembran alan içermektedir. Bu dizinin yaklaşık ilk 25 aa uzunluğundaki N-terminal bölgesi hidrofobiktir ve F proteininin en iyi korunan

bölgesidir, N terminal bölgesindeki füzyon peptidi adı verilen bu yapının hedef hücre zarına direkt olarak invaze olmasından dolayı virusun konakçı hücreye penetrasyonunda önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir (Chamber ve Takimoto, 2011). Yeni meydana gelen virus partiküllerinin enfektif hale gelebilmesi için F⁰ prokürsörünün bölünme geçirmesi gerekmektedir (Garten ve ark., 1980).

Bağlanma proteini *Paramyxoviridae* familyasında yer alan virusların konakçı hücreye adsorbsiyonu aşamasında görev alan bir diğer integral membran glikoproteinidir (Lamb ve Parks, 2007). *Respirovirus*, *Avulavirus* ve *Rubulavirus* genusunda bulunan virus tipleri konakçı hücredeki sialik asit taşıyan reseptörlere bağlanır ve eritrositleri agglutine etme yeteneğine sahiptir. Bunun yanı sıra neuroaminidase aktivitesine de sahip olan bağlanma proteinleri yeni sentezlenen virus partiküllerinin sialik asit ile reaksiyona girmesini önleyerek virus partiküllerinin kendi kendilerine aglutine olmalarını engeller ve viral projenlerin hücre zarından salınımını sağlar (Scheid ve Choppin, 1974).

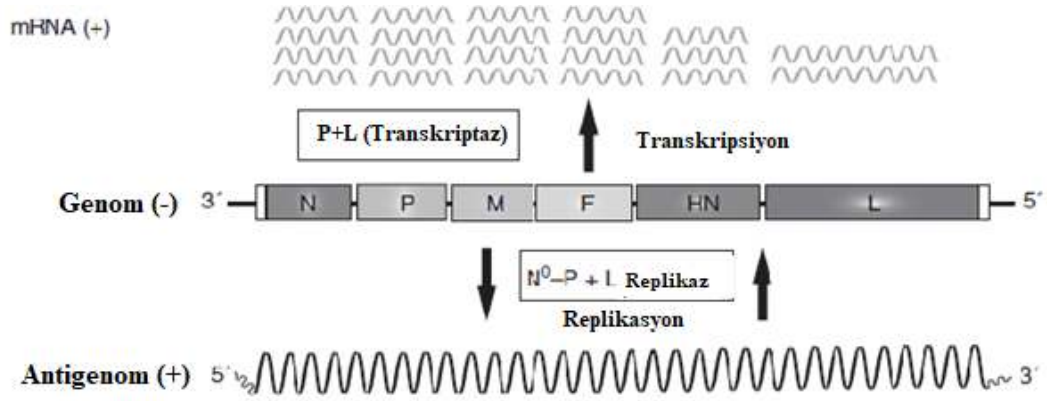
Paramyxovirusların bağlanma proteini olan HN proteini 562-582 aa uzunluğunda bir tip II glikoproteindir. HN proteininin globular bölgesi sialik asit ile etkileşime girerek virusun hücreye adsorbsiyonundan ve hemaglutinin aktivitesinden sorumludur. Bununla birlikte F proteini ile etkileşime girip adsorbsiyon aşamasında da görev yaptığı düşünülmektedir (Moscona, 2005). Yapılan araştırmalarda BPIV3 projenlerinden bazılarında neuraminidase enziminin bulunmadığı tespit edilmiştir (Waterson ve Almeida, 1966).

Bailley ve ark. (2000), yapmış oldukları çalışmada BPIV3 ve HPIV3 etkenlerinin sahip oldukları F ve HN proteinlerinin aa sekans diziliminin %75'ten fazla benzerlik gösterdiğini ortaya koymuşlardır. Van Wyke Coeling ve ark., (1988), yaptığı araştırmada ise sığır ve insan parainfluenza virus etkenleri arasında %25'e yakın antijenik ilişki bulunduğunu tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra BPIV3 ve HPIV3'ün N, L ve V proteinlerinin de %80-85 oranında benzerlik gösterdiği bilinmektedir (Pennathur ve ark., 2003).

2.3.4. Biyolojisi

BPIV3 replikasyonunu konakçı hücre sitoplazmasında gerçekleştirir (MacLachlan ve ark., 2017). Etkin adsorbisyon aşamasında yüzey glikoproteinlerinden biri olan HN aracılığıyla hedef hücre membranında yer alan sialik asit reseptörlerine bağlanır. Adsorbisyon aşamasını takip eden süreçte bir diğer viral yüzey glikoproteini olan F proteini viral membran ve konak hücre plazma membranı arasında füzyon meydana getirir böylece ribonükleoprotein (RNP) hücre sitoplazmasına aktarılır (Elenkumaran, 2013). Bu kompleks N proteini tarafından paketlenmiş negatif polariteli genomik RNA taşımaktadır. Bununla birlikte viral RNA bağımlı RNA polimeraz (RdRp) ile de bağlantılıdır (Chattopadhyay ve ark., 2011).

RdRp, P proteininin ko-faktörlülüğüyle birlikte viral RNA' yı şablon olarak kullanıp transkripsiyonu gerçekleştirir (Karron ve Collins, 2007; Lamb ve Parks, 2007). RdRp heterokompleksi 3' ucundan viral genoma bağlanır ve start-stop mekanizması ile leader RNA ve 6-10 tane mRNA transkribe eder (Emerson, 1982; MacLachlan ve ark., 2017). Bu enzim aynı zamanda yeni oluşan mRNA'ların 3' ucundaki polyadenilasyondan ve cap metilasyon aşamalarından da sorumludur (Ogino ve Banerjee, 2007). Transkripsiyon sonucu hücre sitoplazmasında yeterli miktarda N proteini biriktiğinde viral genomun 3' ucundaki promotor sekans RdRp tarafından transkribe edilir böylece protein terminasyon mesaj sinyalinin yok sayan RdRp pozitif anlamlı antigenomu sentezler (Noton ve Fearn, 2015). N proteini tarafından kapsitlenen bu antigenom yeni negatif anlamlı viral RNA'ların replikasyonu için şablon olarak kullanılır (MacLachlan ve ark., 2017; Noton ve Fearn, 2015).



Şekil 2.4. BPIV3'ün transkripsiyon ve replikasyon şeması (MacLachlan ve ark., 2017).

2.3.5. Kimyasal ve Fiziksel Ajanlar ile İnaktivasyonu

Sıcaklık, nem, pH ve laboratuvar şartlarında saklama koşulları BPIV3'ün enfektivitesini etkileyen çevresel etkenlerdendir (Spilki, 2016). Bu etkenler pek çok vakada etkenin teşhis ve izolasyonunu imkansız hale getirmektedir (Segura ve ark., 2013). Etken, 50°C ve üzeri sıcaklıklarda 15 dakikada inaktif olur (Spilki, 2016). Optimal stabilite ve enfektivite için pH değerlerinin 7,4-8,0 arasında olması gerekmektedir ayrıca virusun 3-3,4 pH değerlerinde hızlıca inaktif olduğu bilinmektedir (Trybała ve ark., 1991).

Etken lipid çözücüler, non-ionik deterjanlar, formaldehit ve oksitleyici ajanlara karşı oldukça dayanıksızdır (Rima ve ark., 2019).

2.4. Epidemiyoloji

BPIV3 patojeni, keşfinden günümüze kadar geçen zamanda araştırıldığı her bölgedeki sığır popülasyonlarında endemik bir solunum sistemi enfeksiyonu olarak kabul edilmiştir (Ellis, 2010). Doğal ve deneysel enfeksiyonların pek çoğu genç hayvanlarda meydana gelmektedir. Bununla birlikte hayvanların yaşlarının arttıkça BPIV3'e karşı oluşan antikor titresinin de yükseldiği söylenebilir (Frank ve Marshall, 1973). Genellikle subklinik seyrettiği için fark edilemeyebilen enfeksiyon sıcak iklimli

bölgelerde kış ve sonbahar aylarında görülmektedir (Ellis, 2010; Stott ve ark., 1980). BPIV3'ün immunizasyon süresi tam olarak bilinmese de deneysel olarak yapılan çalışmalarda seropozitif buzağların ilk enfeksiyonu takip eden 1-2 hafta içinde reenfekte olduğu bildirilmiştir (Frank ve Marshall, 1973). Allan ve ark. (1978), BPIV3 ile doğal enfekte buzağlar üzerine yaptıkları bir çalışmada enfeksiyonun 5. gününde bronşiyal epitel hücrelerinden etkeni izole etmeyi başarmışlardır.

Nazal sekresyon ve damlacık yoluyla saçılan etken çoğunlukla duyarlı hayvanların solunum yolu kanalında enfeksiyon meydana getirir (Ellis, 2010). Virusun solunum yolu kanalında ve nazal sekrette titresi oldukça yüksektir, yapılan çalışmalarda DKID₅₀ logaritmik tabanda 10⁶-10⁷ olarak belirlenmiştir (Frank ve Marshall, 1973; Sharma ve Adlakha, 2009). Yapılan araştırmalarda BPIV3'ün nazal sekrette 3 saate kadar enfektivitesini koruduğu ve 6°C gibi düşük sıcaklıklarda canlılığını sürdürdüğü ortaya koyulmuştur (Smith ve ark., 1966).

Etkenin respiratorik mukozaya adsorbisyonunu takip eden aşamalarda enfekte ettiği hücrelerde meydana getirdiği değişiklikler diğer patojenlerin enfeksiyona dahil olmasına neden olur (Elenkumaran, 2013). *Paramyxovirusların* türler arasında enfeksiyona yol açabilme potansiyeli yüksektir. Çoğunlukla ruminantlarda olmak üzere pek çok türde BPIV3'e karşı geliştirilmiş antikorlar tespit edilmiştir (Ellis, 2010; Hacıoğlu, 2011).

Çeşitli hayvan türleri üzerinde yapılan serolojik ve virolojik araştırmalarda BPIV3'ün sadece sığırlarda değil koyunlarda (Lyon ve ark., 1997), yabani ve kültür ırkı keçilerde (Gaffuri ve ark., 2006; Yener ve ark., 2005), mandalarda (Maidana ve ark., 2012), develerde (Eisa ve ark., 1979), bizonlarda (Zarnke ve Erickson, 1990), geyiklerde (Thorsen ve Henderson, 1971), gine domuzlarında (Ohsawa ve ark., 1998), hamsterlerde (Ohkura ve ark., 2015), siyah ve beyaz gergedanlarda (Fischer-Tenhagen ve ark., 2000) da enfeksiyona yol açabildiği bildirilmiştir. Yapılan bir araştırmada sinirsel semptomlar gösteren domuzların beyin dokularından 2 farklı swine PIV (SPIV) etkeni izole edilmiş olup, bu etkenlerin BPIV3 ile çok yakın antijenik ve genetik ilişki halinde olduğu tespit edilmiştir (Qiao ve ark., 2009).

Etken insan veya insan olmayan primatlarda subklinik veya hafif seyirli bir enfeksiyon meydana getirebilmektedir fakat insandan insana bulaşma zayıftır (Elenkumaran, 2013; Chamber ve Takimoto, 2011; Maclachlan ve ark., 2017). Ben İshai ve ark. (1980), solunum sistemi enfeksiyonu klinik bulguları gösteren bir çocuktan alınan örnek üzerinde yaptıkları serolojik çalışmada BPIV3'e karşı geliştirilmiş olan antikor titresini HPIV3'e oranla daha yüksek olarak tespit etmişler fakat enfeksiyona yol açan etkeni izole edememişlerdir. Pennethur ve ark. (2003), ise rhesus maymunları ile yaptıkları araştırmada denekleri BPIV3 ile enfekte etmeyi başarmışlardır. HPIV3 ve BPIV3 arasındaki antijenik ve genetik yakınlığa bağlı olarak primatlarda ve insanlarda HPIV3'e karşı immunizasyon geliştirmek amacıyla BPIV3 attenüe canlı aşı (Greenberg ve ark., 2005; Karron ve ark., 1995) ve Bovine/Human Parainfluenza virus 3 rekombinant aşı çalışmaları yapılmıştır (Schmidt ve ark., 2001).

2.5. Patogenez

Solunum sistemi enfeksiyonu meydana getiren diğer viruslar gibi BPIV3'de primer olarak aerosol ve damlacık yoluyla saçılır. İnhalasyon yolu ile canlı vücuduna giren etken ilk olarak paramyxovirusların affinite gösterdiği yüksek miktarda N-acetylneuraminic acid (NANA) barındıran mukus tabakasıyla karşılaşır (Ellis, 2010). Mukus glikoproteinleri BPIV3 için reseptör görevi görür (Sharma ve Adlakha, 2009).

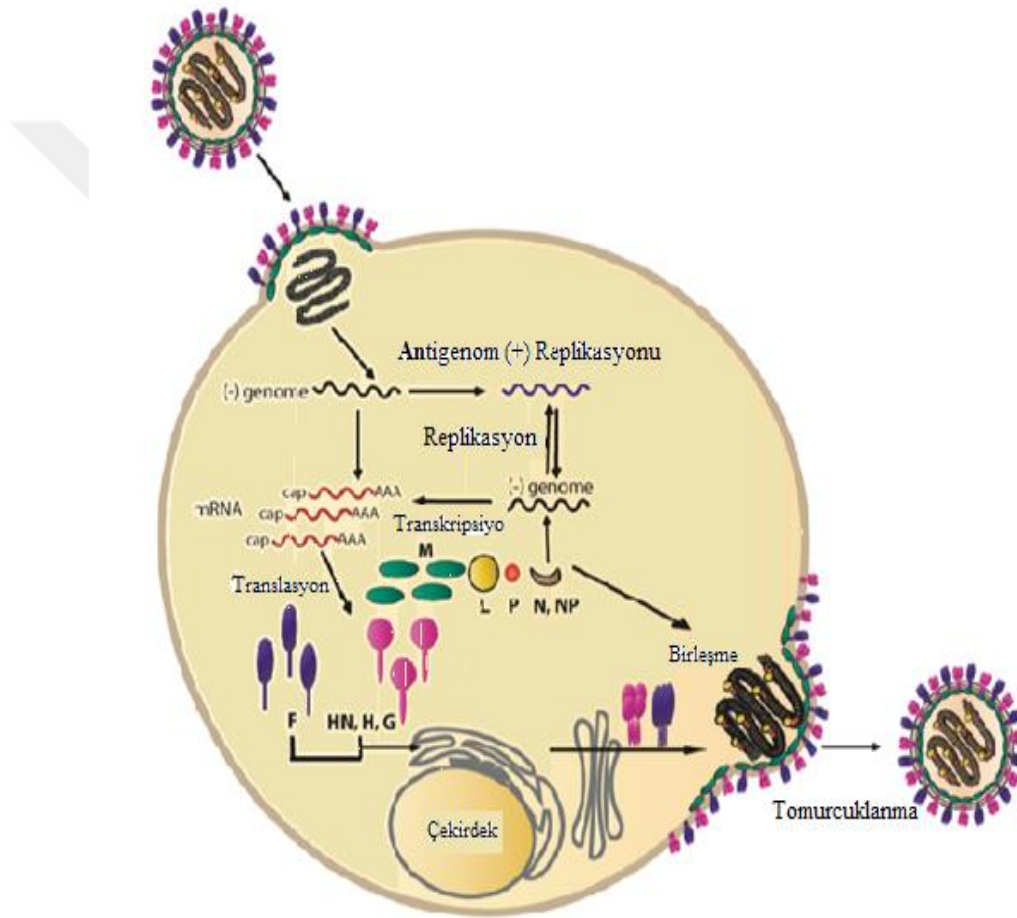
BPIV3'ün hücresel düzeyde enfeksiyonu, yüzey proteinlerinden biri olan HN glikoproteininin nötr pH'da NANA reseptörlerine adsorbsiyonu ile başlar (Chattopadhyay ve ark., 2011; Karron ve Collins, 2007). Solunum kanalını oluşturan tip I ve tip II pnömositlerde, siliar ve nonsiliar bronşial hücrelerinde, trake epitellerinde, alveolar makrofajlarda NANA reseptör moleküllerinin çokça bulunması virusun bu dokularda enfeksiyon meydana getirmesine yol açar (Elenkumaran, 2013; Sharma ve Adlakha 2009; Tsai ve Thomson, 1975). Bununla birlikte etkenin genç buzağılara intranazal ve intratrakeal inokulasyonu denemelerinde akciğer dokusu dışında enteritis ve splenitise de yol açtığı gözlemlenmiştir (Elenkumaran, 2013). Etkenin nazal kavitede ve farinksteki bazı hücrelerde de enfeksiyona yol açabileceği düşünülmektedir (Ellis, 2010).

BPIV3'ün konakçı hücreye adsorbsiyonunu takiben HN proteini F proteini ile etkileşime geçerek bu proteinde konformasyonel bir değişime yol açar. Bu değişimle birlikte viral zar ve hücre membranı arasında füzyon şekillenir (Lamb ve ark., 2006). Bunun sonucunda viral nükleokapsid konakçı hücre sitoplazmasına aktarılır (Karron ve Collins, 2007). Hücre sitoplazmasına giren virusun kapsitten sıyrılması ile viral replikasyon aşaması başlar. Kapsitten kurtulan RNP, RdRp, L ve P proteinleri sitoplazma içerisine salınır (Chattopadhyay ve ark., 2011). P ve L proteinleri ile heterokompleks yapıda olan RdRp ss (-) RNA'yı şablon olarak kullanıp viral transkripsiyon ve replikasyonu başlatır (Chattopadhyay ve ark., 2011; Rima ve ark., 2019). Viral genom 3' ucundan entegre olan RdRp ilk RNA ve viral mRNA' ları sentezlemek için transkripsiyona başlar (Emerson, 1982).

Selüler glikolitik enzimler, β katenin (Bose ve Banerjee, 2004), kinaz, enolaz (Ogino ve ark., 2001), aktin ve tubulin (Ogino ve ark., 2003) gibi pek çok konakçı hücre proteininin de viral genomun transkripsiyonu aşamasına dahil olduğu görülmüştür. Hücrede yeterli miktarda N proteini biriktiğinde projen genom RNA'ların replikasyonunda kullanılmak üzere P proteini ile birlikte N⁰-P kompleksini oluşturur (Chattopadhyay ve ark., 2011).

RdRp her gen bölgesinin transkripsiyon işlemini bitirip pozitif polariteli tam bir antigenom sentezledikten sonra replikasyon aşaması başlar. Sentezlenen antigenom ise nükleokapsid proteinleri tarafından kaplanır ve daha sonra negatif polariteli genomların sentezi için şablon olarak kullanılır (Chattopadhyay ve ark., 2011; Elenkumaran, 2013). M proteini tomurcuklanmada ve projeni virus partiküllerinin salınımlarında rol oynar (Ellis, 2010). Virus salınımları genellikle enfekte hücrenin apikal yüzeyinde meydana gelir (Takimoto ve Portner, 2004).

BPIV3'ün sitopatolojik etkilerinin ortaya koyulması için yapılan doku ve hücre kültürü çalışmalarında etkenin intrastoplazmik inklüzyon cisimciği oluşumuna, epitel hücrelerde proliferasyona ve sinsityum oluşumuna yol açtığı gözlenmiştir (Goris ve ark., 2009; Tsai ve Thomson, 1975). Etken solunum yolu epitel hücrelerinin yanısıra pulmoner alveolar makrofajları da enfekte etmektedir (Bryson ve ark., 1983). Makrofajlar içerisinde yüksek titrelerde üreyebilen BPIV3 bu hücrelerin araşidonik metabolizmasını ve fagositoz özelliklerini yok eder (Ellis, 2010).



Şekil 2.5. Paramyxovirusların biyolojik döngüsünün şematik gösterimi (Najjar ve ark., 2014).

2.6. Klinik ve Patolojik (Nekropsi) Bulgular

BPIV3 enfeksiyonu her yaşıta sığırdada enfeksiyon meydana getirirse de genellikle 2-8 ay yaştaki hayvanlar arasında gözlemlenmektedir. Fakat tek başına bu etkenin neden olduğu vaka sayısı oldukça düşüktür (Arslan ve Küllük, 2017). BPIV3 çoğunlukla sığırların solunum sistemi kompleksi tablosu (Bovine Respiratory Disease Complex-BRDC) bulunan hastalardan izole edilmiştir (Elenkumaran, 2013). BPIV3 enfeksiyonu subklinik veya orta şiddette seyretmektedir. BPIV3 enfeksiyonunun histopatolojik bulgularından bazıları plazma hücre infiltrasyonu ile birlikte seyreden bronşitis ve bronşiolitis olgularıdır. Bu epitel hücrelerinde nekrozis ve hiperplazi gözlemlenebilir (Spilki, 2016). Etken bronş ve bronşiyol epitel hücrelerinde lokal immunsupresyonlara yol açarak viral/bakteriyel sekonder veya koenfeksiyonlara neden olur (Aly ve ark., 2003; Ellis, 2010; Arslan ve Küllük, 2017). Saha enfeksiyonlarında BPIV3 ile birlikte en çok izole edilen viral etkenler BHV-1 ve BRSV; bakteriyel etkenler ise *Mannheimia hemolytica* ve *Mycoplasma spp.*'dir (Ellis, 2010; Tiwari ve ark., 2016).

Etkenin morbidite oranı %4-44, mortalite oranı ise %10-20 arasında seyreder (Arslan ve Küllük, 2017; Sharma ve Adlakha, 2009). Genel semptomları, öksürük, pnömoni, ateş, iştahsızlık, depresyon, nazokonjuktival akıntı ve abdominal solunumdur (Bryson ve ark., 1989; Newcomer ve ark., 2017; Sharma ve Adlakha, 2009). Şiddetli enfeksiyonlarda solunum sayısında ve derinliğinde artış gözlenir ve kuru raller duyulabilir (Omar, 1966). Bununla birlikte akciğerin oskültasyonla muayenesinde pnömoni bulgularına rastlanılır (Arslan ve Küllük, 2017). Enfeksiyon, hayvanlar etkene maruz kaldıktan yaklaşık 2 gün sonra yükselmeye başlayan ateş ile kendini gösterir. Takip eden dört ve beşinci günlerde 40,1-41,4°C seviyelerine ulaşarak pik yapar ve 7-10 gün arasında devam eder. Sert ve hırıltılı öksürük, rinit ve mukopurulent nazal akıntı göze çarpar (Elenkumaran, 2013; Ellis, 2010).

Enfeksiyonu takip eden iyileşme sürecinde solunum yolları ve alveolar epitel hücrelerinde hiperplaziler şekillenir (Ellis, 2010). Bu oluşumlar bronşiolitis obliteransa yol açarak hastalığı atlatan hayvanların akciğerlerinde kalıcı hasarlar meydana gelmesine neden olur (Bryson ve ark., 1979). Bu nedenle besi hayvanlarının

vücut kondüsyon skorlarında düşüş ve et verimlerinde azalma şekillebilir (Arslan ve Küllük, 2017).

Akciğerlerin genellikle kranioventral bölümlerinde görülen gri-kırmızı renk değişimi, atelektazi ve konsolidasyon enfeksiyonun pnömonik bulgularındandır (Elenkumaran, 2013; Ellis, 2010). Plörezi oluşmadığı hastalıkta interlobuler ödemle birlikte hava yollarında mukopurulent eksudata rastlanır ve lenf nodüllerinde büyüme şekillenir. Solunum stresi sonucu ölen buzağuların akciğerlerinin kaudal loblarında amfizemlerle karşılaşmıştır (Bryson ve ark., 1999; Coswell ve Williams, 2007).



Şekil 2.6. BPIV3 enfeksiyonu sonucu ölen 2 aylık buzağıda akciğer görüntüsü, kranial loblardaki anterioventral bölümde yer alan mor ve kırmızı atelektazi ve konsolidasyon alanlarıdır (Ellis, 2010).

Enfeksiyonun histopatolojik semptomları arasında bronşit ve bronşiyolit sayılabilir (Elenkumaran, 2013). Enfeksiyonu takip eden 24 saat içerisinde üst solunum yolu kanalı epitel hücrelerinde hiperplazi, metaplazi veya nekroz meydana

gelir (Bryson ve ark., 1983), alt solunum yollarında ise bronşiyollerin üzerini örten epitel hücrelerinde hiperplazi ve attenuasyonla birlikte yuvarlaklaşma ve vakuolleşme şekillenir (Coswell ve Williams, 2007). Değişime uğrayan bu hücreler solunum yolu lümenine dökülür (Bryson ve ark., 1983). Bu dökülmeyi izleyen süreçte inflamasyon durumunda rol oynayan hücrelerin yangılı bölgeye infiltre olmasıyla beraber hayvanda ciddi solunum stresine yol açabilecek tıkanmalar şekillenir (Ellis, 2010).

Enfeksiyonun akut evrelerinde üst solunum yolu (bronş, bronşiyol ve alveolar) epitel hücreleri ve makrofajlarında, eozinofilik intrastoplazmik inklüzyon cisimcikleri görülür. Bununla birlikte bazen intranükleer inklüzyon cisimcikleri de gözlemlenebilir (Elenkumaran, 2013). İntrastoplazmik eozinofilik inklüzyon cisimciklerine enfeksiyonu takip eden 2-7 günler arasında bronş, bronşiyol ve alveolar epitellerinde yaygın bir şekilde rastlanılır (Bryson ve ark., 1979). Epitelyal sinsityum oluşumu bazı BPIV3 suşları için rapor edilmiştir (Bryson ve ark., 1979; Omar ve ark., 1966).

2.7. İmmunoloji

Parainfluenza virüsüne karşı doğal immunizasyon ilk olarak retionik asit indükleyici gen (RIG-1) benzeri reseptörler RIG-1 benzeri reseptör (RLR) ve Melanom farklı bağımlı protein 5 (MDA5) ve Toll like receptor (TLR) gibi PPR reseptörleri tarafından meydana getirilir (Takeuchi ve Akira, 2009). Enfeksiyon sırasında bu reseptörler tarafından tip1 interferon, interferon bağımlı protein kinaz R (PKR), sitokinler 2' ve 5' oligoadenilat gibi ürünler üretilir (Elenkumaran, 2013). *Respirovirus* genusunda bulunan etkenler tarafında enfekte edilen hücrelerde TLR ve RLR aktivasyonu artar. Bu reseptörler IFN tip 1 ve sitokin üretimini indükler (Melchjorsen ve ark., 2005). RIG 1 NSV (nonsegment virus) ile enfekte hücrelerde 5' trifosfat RNA ürünlerini tanıdığı için BPIV3 de diğer NSV'ler gibi IFN tip1 ve IFN bağılı genlerin üretimini indükler (Elenkumaran, 2013). Bununla birlikte BPIV3'ün yapısında bulunan V proteininin MDA5'i; C proteininin ise MDA5 ve RIG 1'i suprese ederek interferon (IFN) β aktivitesini durdurduğu bilinmektedir (Komatsu ve ark., 2007).

Sığırların pek çoğunda BPIV3'e karşı antikor bulunmaktadır ve buzağılar bu antikorları annelerinden doğum sonrası kolostral yolla alabilirler (Elenkumaran, 2013). Kolostrumla alınan maternal antikorlar yaklaşık 10 hafta boyunca koruyuculuk sağlar, yüksek dozda kolostral antikor alan buzağılarda ise 19-23 hafta boyunca koruma sağlanabilir (Dawson, 1966). Enfeksiyon, maternal antikor alan buzağılarda almayanlara oranla daha hafif şekilde seyreder fakat klinik semptomları göstermeye ve virüsü saçmaya devam edebilirler (Elenkumaran, 2013). Hastalık sırasında maternal antikorlara sahip buzağının seronegatif olanlara oranla hastalıktan 1 ay sonra daha düşük BPIV3 nötralizan antikor titresine sahip oldukları belirlenmiştir (Marshall ve Frank, 1975). Bu sonuç pasif immunitenin kazanılmış bağışıklığı suprese ettiği şeklinde değerlendirilmiştir (Ellis, 2010). Seronegatif buzağılar üzerinde yapılan deneysel intranazal virus inokulasyon çalışmalarında etkene karşı lokal olarak IgA, sistemik olarak da IgM ve IgG nötralizan antikorlarının sentezlendiği ortaya konulmuştur (Marshall ve Frank, 1971; Morein, 1970). Her iki immun cevap da enfeksiyondan 6 gün sonra tespit edilebilmektedir (Marshall ve Frank, 1971).

Serum antikor varlığı enfeksiyonu takip eden 3-5 ay boyunca tespit edilebilir seviyelerdedir fakat lokal antikorlar (IgA) 6-8 hafta içerisinde hızla azalmaktadır (Frank ve Marshall, 1971). Serum antikor seviyesi yüksek lokal antikor seviyesi düşük olan buzağılarda reenfeksiyon meydana gelme sıklığı lokal antikor seviyesi yüksek serum antikor seviyesi düşük buzağılara oranla çok daha yüksektir (Frank ve Marshall, 1971). Nazal antikorlar virusun primer replikasyonunu engellerken serum antikorları enfeksiyon sonrası ciddi klinik bulguların oluşmasını engeller (Elenkumaran, 2013). Buna bağlı olarak lokal antikor titresi yüksek olan buzağılarda virus saçılımının azaldığı tespit edilmiştir (Gates ve ark., 1970). Ayrıca, enfeksiyonu takip eden 6-9. günlerde sığırlardan alınan kan örneklerinde etkene karşı sitotoksik aktiviteye sahip natural killer (NK) hücrelerine ve lenfositlere rastlanılmıştır (Bamford, 1995; Campos, 1982).

2.8. Tanı

2.8.1. Klinik Tanı

Sığırların solunum sistemi enfeksiyonlarında genellikle birden fazla etken hastalığın oluşumunda rol oynadığı için sadece klinik bulgular değerlendirilerek BPIV3 teşhisinin konulabilmesi zordur (Arslan ve Küllük, 2017; Elenkumaran, 2013). Bununla birlikte aşısız ve çeşitli stres faktörlerine (transport, yetersiz ventilasyon, malnütrasyon vb.) maruz kalmış solunum sistemi enfeksiyonu semptomları gösteren hayvanlarda BPIV3 enfeksiyonundan şüphelenilmelidir. Etkenin klinik olarak patognomik bir semptomu olmasa da enfekte hayvanlarda mukopurulent nazal akıntı, rinit, ateş ve kuru öksürük gibi bulgular meydana getirir (Spilki, 2016).

2.8.2. Laboratuvar Tanı

2.8.2.1. Virolojik Tanı

Virusun tespiti için nazal swap, trakeal ve bronkoalveolar lavaj örnekleri kullanılabilir (MacLachlan ve ark., 2017; Sharma ve Adlakha, 2009). Etken enfeksiyonun 7-9. günlerine kadar nazal sekretlerden izole edilebilmektedir (MacLachlan ve ark., 2017). BPIV3 çok fragil olduğu için polyester swaplar ile alınan swap örnekleri hücre vasatı içerisinde taşınmalı ve soğuk zincir altında en kısa sürede tanı laboratuvarlarına ulaştırılmalıdır (Elenkumaran, 2013; Ellis, 2010; West ve ark., 1999). Bununla birlikte nekropsi yapılan hayvanların akciğerlerinin kraniyovertral alanlarından alınan doku örnekleri de tanı için kullanılmaktadır. Etken bu alanlardan yaklaşık 12 gün boyunca izole edilebilir bu nedenle postmortem tanıda kullanılacak akciğer doku örnekleri enfeksiyonun akut döneminde ölen hayvanlardan alınırsa virus izolasyonu mümkündür (Elenkumaran, 2013; Ellis, 2010). Bu bağlamda viral antijen tespiti için Floresan Antikor Testi (FAT) (Çeribaşı ve ark., 2012), İmmunohistokimyasal teknikler (Çeribaşı ve ark., 2012; Jarikre ve Emikpe, 2017) ve ELISA (Noori ve ark., 2014) sıklıkla kullanılan yöntemlerdir.

2.8.2.2. Virus İzolasyonu

BPIV3'ün identifikasyonu hücre kültürleri kullanılarak da yapılabilir. Etken bovine kidney (Madin-Darby Bovine Kidney-MDBK) ve bovine turbinate (BT) hücre kültürlerinde intrastoplazmik inklüzyon cisimciği ve sinsityal hücre oluşumu gibi sitopatojen etki göstererek ürer (Ellis, 2010).

2.8.2.3. Moleküler Tanı

Reverz Transkriptaz- Polimerase Chain Reaction (RT-PCR) yöntemi viral nükleik asitin tespitine yönelik oldukça duyarlı bir tanı protokolüdür. BPIV3 ile enfekte hayvanlardan elde edilen akciğer dokusu, nazal swap veya nazal mukus gibi örneklerde RT-PCR tekniği ile nükleik asit tespiti yapılabilir (Albayrak ve ark., 2019; Timurkan ve ark., 2019). Fakat BPIV3 enfeksiyonunun çoğunlukla subklinik seyretmesi, sığırların solunum sistemi enfeksiyonlarının etiyolojisinin multifaktöriyel olması ve hayvanların korunması için modifiye canlı BPIV3 aşılarının kullanılması gibi sebeplerden ötürü etkenin tespiti hastalığın kaynağı olduğunu göstermez (MacLachlan ve Dubovi, 2011).

2.8.2.4. Serolojik Tanı

BPIV3'ün serolojik olarak değerlendirilmesinde çoğunlukla indirekt ELISA (Gulliksen ve ark., 2009; Kale ve ark., 2013), virus nötralizasyon (VN) (Yıldırım ve ark., 2009), Hemagglutinin İnhibisyon (HI) (Özdarendeli ve ark., 2001) ve İndirekt Floresan Antikor (Panigrahi ve Mohanty, 1989) testleri kullanılmaktadır. Enfeksiyona karşı gelişmiş nötralizan antikorların çift serum örneğinde 4 katlı bir artışın ortaya konması BPIV3 enfeksiyonunun varlığıyla ilişkilendirilebilir (MacLachlan ve ark., 2017). Bununla birlikte gine domuzu eritrositleriyle hemabsorbe olurlar (Minnich ve Ray, 1987).

2.9. Tedavi

BPIV3 enfeksiyonuna karşı geliştirilmiş etkili bir antiviral ilaç bulunmamaktadır. Hasta sığırların solunum sistemlerinde sıklıkla meydana gelen sekonder bakteriyel enfeksiyonlara karşı geniş spektrumlu antibiyotikler kullanılmalıdır (Arslan ve Küllük, 2017). Bunun yanı sıra, BPIV3 makrofajları enfekte ederek replikasyonunu burada gerçekleştirip hücre ölümüne veya değişikliklerine neden olabilir (Kapil ve Basaraba, 1997). Enfekte makrofajların neden olduğu hücre yağ asidi metabolizmasındaki değişimler immunsupresif prostaglandinlerin salınımına yol açar. (Laegreid ve ark., 1989). Bu nedenle immunsupresyondan ötürü oluşacak sekonder enfeksiyonları engellemek için prostaglandin sentezi üzerinde inhibitör özelliği bulunan non steroid anti enflamatuvar ilaçların tedaviye dahil edilmeleri faydalı olacaktır (Kapil ve Basaraba, 1997; Laegreid ve ark., 1989).

2.10. Koruma ve Kontrol

Hayvanların hastalığa karşı korunmasında aşamasında en çok dikkat edilmesi gereken nokta hayvanlarda pnömoni salgınlarında predispozisyona yol açacak stres faktörleridir (Arslan ve Küllük, 2017). Bu aşamada hayvanların transportu en önemli stress faktörlerinden birisidir (Gür ve ark., 2009). Hayvan bakım ve beslemesine özen gösterilmelidir çünkü düşük besin içerikli yemlerle beslenen hayvanlarda immunsupresyonun ortaya çıktığı bilinmektedir (Arslan ve Küllük, 2017; Ellis, 2010). Ahırlarda kapasitelerinden daha fazla hayvan barındırılmamalıdır (Sharma ve Adlakha, 2009). Hava sirkülasyonunun yeterli olmadığı, tozlu ve temizlenmemiş ahırlarda barınan sığırlarda BPIV3 ile ilişkili solunum yolu enfeksiyonlarının görülme oranı daha fazladır (Elenkumaran, 2013; Frank ve Marshall, 1973; Taylor ve ark., 2010). Bu nedenle barınaklar düzenli aralıklar ile boşlatılmalı ve dezenfekte edilmelidir. Bununla birlikte özellikle buzağı yetiştiriciliğinde kullanılmak üzere her hayvan için ayrı, bölünmüş ve serbest hava alma alanı bulunan padoklar kullanılmalıdır (Arslan ve Küllük, 2017). Hijyen kurallarına uyulmalı, hastalığın tüm sürüye yayılmasını önlemek için gerekli kontroller yapılmalıdır (Elenkumaran, 2013).

Enfeksiyondan korumak için en etkin yollardan birisi de aşı uygulamalarıdır (Arslan ve Küllük, 2017). Bin dokuz yüz altmışlı yıllardan günümüze kadar etkene karşı pek çok inaktif aşı üretilmiştir (Ellis, 2010). Virusa karşı antikor bulundurmeyen buzağılar üzerinde yapılan çalışmalar çift doz inaktif aşı uygulamasının sistemik ve lokal antikor üretimini stimule ettiğini ortaya koymuştur (Gale, 1968; Probert ve ark., 1978). Günümüzde kullanılan BPIV3 aşıları Bovine Herpes Virus 1 (BHV-1), Bovine Respiratory Syncytial Virus (BRSV), Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV), *Mannheimia hemolytica* ve *Pasteurella multocida* gibi solunum sistemi enfeksiyonuna yol açabilen patojenlere karşı geliştirilen aşılar ile kombine şekilde aktif veya inaktif olarak üretilmektedir (Sharma ve Adlakha, 2009; Wenzhi ve ark., 2010). Enfeksiyona karşı geliştirilen bir diğer aşı ise intrnazal aşılardır. Fakat bu aşılar sıcaklığa oldukça duyarlıdır ve vücut ısısından daha düşük sıcaklıklarda replikasyon gerçekleştirip immun sistemi stimule edebilirler (Vangeel ve ark., 2009).

2.11. Tezin Amacı

BPIV3 sığırlarda solunum sistemi enfeksiyonuna neden olan en önemli viral etkenlerden birisidir. Damlacık ve aerosol yollarla yayılan etken hayvanlarda yüksek ateş, kuru öksürük, pnömoni ve nazal mukopurulent ekstremlere neden olur. Genellikle kötü bakım besleme ve nakliye gibi stres faktörlerinin arttığı durumlarda ortaya çıkan hastalık et ve süt üretimi üzerine negatif yönde bir etki meydana getirerek ekonomik kayıplara yol açar. Ülkemizdeki hayvan sirkülasyonunun devamlılığı nedeniyle her bölgede görülebilen enfeksiyonun eradikasyonu mümkün değildir. Hastalığın hızlı tanısı ve kontrol altına alınabilmesi için enfeksiyonun en fazla görüldüğü kış ve sonbahar aylarında alınan örneklerin sensitivitesi yüksek ve hızlı laboratuvar testleriyle analiz edilmesi önem arz etmektedir.

Bu bilgiler ışığında bu tez çalışmasında Isparta, Afyonkarahisar ve Burdur illerinde özel işletmelerde yetiştirilen solunum sistemi problemlili hayvanlarda BPIV3 etkeni varlığının moleküler, antijenik ve virus izolasyonu metotlarıyla karşılaştırılmalı olarak araştırılması planlanmıştır.

Elde edilen verilerin söz konusu semptomlarda BPIV3' ün etiyolojik ajan olarak rol oynadığı, tanı metotunun ve materyallerinin etkenin varlığının araştırılmasında duyarlılığı ayrıca moleküler çalışma sonrası pozitif olarak belirlenen örneklerin dizin analizleri sonrasında virusun alttipi ve filogenetik ağaçtaki yeri belirlenecektir.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Örnekleme Yapılan Hayvanlar ve Alınan Örnekler

Tez çalışmasında 2018-2020 yılları arasında Burdur, Afyonkarahisar ve Isparta illerinde aile tipi yetiştiriciliği yapılan solunum sistemi enfeksiyonu klinik semptomları gösteren, BPIV3'e karşı aşılanmamış sığırlar kullanıldı. Farklı cinsiyet, yaş ve ırktaki 190 adet sığırdan nazal, konjuktival swap ve lökosit örnekleri olmak üzere toplamda 570 örnek toplandı. Toplanan tüm örnekler RT-PCR tekniği uygulandı. Alınan nazal swap (NS) ve konjuktival swap (KS) örneklerinden hazırlanan preparatlara direkt immunfloresan testi kullanılarak virus taraması gerçekleştirildi. Ayrıca örneklemeler gerçekleştirildikten sonra MAKÜ Araştırma ve Uygulama Hastanesi'nde nekropsisi yapılan hayvanların akciğer doku materyallerinden hazırlanan preparatlarda histopatolojik incelemelerde bulunuldu.

Solunum sistemi enfeksiyonu belirtileri gösteren farklı yaş, ırk ve cinsiyetteki toplam 190 hayvandan kan, konjuktival ve nazal swap örnekleri toplandı. Çalışmada BPIV3 antijenik yapılarının tespiti ve viral genomu varlığı yönünden araştırılan örnek ve sayılar Tablo 3.3.'de gösterildi.

Tablo 3.1. Örneklemelerin yapıldığı hayvanlara ait ırk ve cinsiyet bilgileri (*n*).

Örneklenen Hayvanlara Ait Veriler	Adet (<i>n</i>)
Örneklenen Hayvan Sayısı (<i>n</i>)	190
Yaş	
< 1 yaş	137
> 1 yaş	53
Cinsiyet	
Dişi (♀)	92
Erkek (♂)	98
İrk	
Montofon	40
Simental	78
Holstein	72

Tablo 3.2. Örnekleme yapılan hayvanların ve alınan marazi maddelerin sayıları (*n*).

Örneklemelerin Yapıldığı İller	Örneklenen Hayvan Sayısı (<i>n</i>)	Konjunktival Swap (<i>n</i>)	Nazal Swap (<i>n</i>)	Lökosit (<i>n</i>)	Akciğer Doku Örneği (<i>n</i>)
Afyonkarahisar	43	43	43	43	-
Burdur	124	124	124	124	1
Isparta	23	23	23	23	-
Toplam	190	190	190	190	1

Tablo 3.3. Antijenik ve viral genom varlığı yönünden test edilen örnekler ve sayılar (*n*).

Numune Türü	RT-PCR tekniğinde kullanılan numune sayısı (<i>n</i>)	DIF testinde kullanılan numune sayısı (<i>n</i>)
Konjunktival Swap (KS)	190	190
Nazal Swap (NS)	190	190
Lökosit	190	-
Toplam	570	380

3.1.2. Moleküler Çalışmada Kullanılan Materyaller

3.1.2.1. Total RNA Ekstraksiyon Kiti

Viral RNA'nın ekstraksiyonu için RNA izolasyon (Wizbiosolutions, Wizol Reagent, Kore) solüsyonuyla beraber kloroform (Sigma, ABD), izopropil alkol (Sigma, ABD), etanol (Sigma, ABD) gibi kimyasallar ve ekstraksiyon aşamalarında yüksek devirli santrifüj işlemleri için soğutmalı santrifüj (Nüve, Türkiye) kullanıldı.

3.1.2.2 Virus

RT-PCR çalışmasında kullanılmak üzere Zoetis firmasından sağlanan RLB103 suşu pozitif kontrol olarak kullanıldı. Örnekler test aşamasına kadar -80 °C'lik derin dondurucuda muhafaza edildi.

3.1.2.3 Tris-Acetate-EDTA (TAE)

50X hacmindeki TAE solüsyonu hazırlamak için 242 gr Tris baz ve 37.2 gr disodyum EDTA 900 ml deiyonize su içerisinde çözdürüldü. Bu çözelti üzerine 57.1 ml glacial asetik asit eklendi ve solüsyonun son konsantrasyonu deiyonize su ile 1 litreye tamamlandı. Elektroforez aşamasında deiyonize su ile 1X hacminde dilüsyonu yapılarak kullanıldı.

3.1.2.4. Agaroz Jel

RT PCR testinin elektroforezis aşamasında gerekli olan agaroz jel (Biomax Agarose, Prona) ticari olarak temin edildi.

3.1.3. Antijenik Çalışmada Kullanılan Materyaller

3.1.3.1 Anti-BPIV3 Poliklonal Antiserum Konjugat

Lama fikze edilen hücrelerde viral antijen varlığının ortaya koyulabilmesi için floresan bir boya (Fluorescein isothiocyanate-FITC) ile işaretli anti-BPIV3 poliklonal antiserum konjugat (VMRD, ABD) kullanıldı.

3.1.3.2. Direkt Immunfloresan (DIF) Pozitif Kontrol

Direkt immunfloresan testinde pozitif ve negatif kontrol olarak kullanılmak üzere floresan antikor kontrol preparatı (VMRD, ABD) satın alındı.

3.1.4. Hücre Kültürü Çalışmalarında Kullanılan Örnekler

Hücre kültürü çalışmalarında toplanan nazal ve konjunktival swap örneklerinin tamamı kullanıldı ($n=380$). Alınan swap örnekleri 2500 IU/ml Penisilin ve 20 mg/ml Streptomisin eklenmiş 1,5 ml DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium) içerisinde soğuk zincir prosedürüne uygun bir şekilde tanı laboratuvarına getirildi. Bu örnekler vorteks yardımıyla iyice karıştırıldıktan sonra swap çubukları atıldı. Sonra bu tüpler soğutmalı santrifüj kullanılarak (Nüve, Türkiye) $+4^{\circ}\text{C}$ de 3000 rpm'de 20 dk boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant alındı ve çalışma aşamasına kadar -80°C 'de saklandı.

Çalışmada swap örneklerinden elde edilen inokulumlardan virus izolasyonu amacıyla Madin Darby Bovine Kidney (MDBK) hücre hattından yararlanıldı. Hücre kültürü hazırlık aşamasında %10'luk fetal dana serumu (FDS) içeren DMEM

kullanıldı. Bunla birlikte mikotik ve bakteriyel bir kontaminasyonun önünü geçebilmek amacıyla vasatın %1'i oranında Penisilin/Streptomisin solüsyonu eklendi.

3.1.5. Histopatolojik Muayenede Kullanılan Materyal ve Numuneler

Histopatolojik muayenede kullanılmak üzere örneklemeler yapıldıktan sonra ölen ve nekropsisi yapılan nazal swap numunesinde virolojik ve moleküler olarak BPIV3 etkeni tespit edilmiş bir sığırın pnömoni bulguları gösteren akciğer doku örnekleri ve normal görünümlü ve lezyonlu akciğerlerin karşılaştırılabilmesi için sağlıklı bir sığırdan elde edilmiş akciğer doku örnekleri kullanıldı. Dokuların tespitinde %10' luk formaldehit solüsyonundan yararlanıldı. Doku takip aşamasında alkol ve ksilol ile muamele edilen örneklerin bloklanması parafin kullanıldı. Dokuların lamlara fiksasyonu tamamlandıktan sonra hematoxilen (HE) ile boyandı ve ışık mikroskobu altında incelendi. Morfometrik analizlerin düzenlenmesinde Database Manual Cell Sens Life Science Imaging Software System (Olympus Co., Japonya) bilgisayar programı kullanıldı.

3.2. Yöntem

3.2.1. Moleküler Çalışmada Kullanılacak Örneklerin Hazırlanması

3.2.1.1 Lökosit Örneklerinin Hazırlanması

Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) içeren tüplere alınan kan örnekleri 1200 devirde 10 dakika (dk) süreyle santrifüj edildi. Ayrılan lökosit tabakası steril pastör pipeti yardımıyla içerisinde Phosphate-Buffered Saline (PBS) (VWR, ABD) bulunan 2 ml hacminde steril tüplere aktarıldı ve 2000 rpm'de 10 dakika +4 °C'de santrifüj edildi. Tüpün dibinde kalan lökosit tabakası toplanarak üzerine PBS eklendi ve 2000 rpm'de 10 dakika +4 °C'de santrifüj edildi. Yıkama işlemi son bir kez tekrar edildikten sonra dipte kalan pelet üzerine 1 ml antibiyotik eklenmiş PBS eklendi. Bu numunelerde viral nükleik asit varlığının araştırılması için dilüe edilen örneklerden 250 mikrolitre (µl) alınarak RNase-DNase bulundurmayan 2 ml'lik tüplere aktarıldı.

Bu örnekler üzerine 750 ml total RNA izolasyon solüsyonu eklenip 5 dk oda sıcaklığında bekletildi ve RNA ekstraksiyon aşamasına kadar -80 °C’de saklandı.

3.2.1.2. Nazal ve Konjunktival Swap Örneklerinin Hazırlanması

Steril ticari swap çubukları ile alınan örnekler 2500 IU/ml Penisilin ve 20 mg/ml Streptomisin eklenmiş 1.5 ml DMEM (Dulbecco’ s Modified Eagles Medium) içerisinde soğuk zincir prosedürüne uygun bir şekilde tanı laboratuvarına getirildi. Bu tüpler vorteks yardımıyla iyice karıştırıldıktan sonra swap çubukları atıldı. Sonra bu tüpler +4°C de 3000 rpm’de 20 dk boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant kısmından 250 µl alınarak viral nükleik asit varlığının araştırılması için RNase-DNase içermeyen steril 2 ml’lik tüplere alındı. Bu 250 µl örneğin üzerine 750 µl total RNA izolasyon ticari solüsyonu eklenip 5 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra nükleik asit ekstraksiyonu yapılncaya kadar -80 °C’de saklandı. Süpernatant, steril 2 ml tüplere aktarıldı ve hücre kültürü çalışmalarında kullanılmak üzere -80 °C’de stoklandı.

3.2.2. Moleküler Çalışma

3.2.2.1. Total RNA İzolasyonu

Önceden RNA izolasyonu amacıyla -80 °C’de 2 ml’lik mikrotüpler içerisinde saklanan örnekler oda sıcaklığında 5 dakika bekletilerek çözündürüldü. Çözünen örneklerin üzerine 200 µl kloroform eklendi ve oda sıcaklığında 2-3 dakika bekletildi. Daha sonra +4 °C’de 12.000 g’de 15 dk santrifüj yapıldı. Santrifüjü takiben alt, ara ve akuatik olmak üzere üç faza ayrılan örneklerin akuöz (renksiz) fazı yeni steril mikrotüplere aktarıldı. Örneklerin üzerine 500 µl %100 isopropil alkol (2-propanol) ilave edildi ve RNA presipitasyonu için oda sıcaklığında 10 dk bekletildi. Bu süre sonunda +4 °C’ de 12.000 g’de 10 dk santrifüj yapıldı. Süpernatant kısmı atıldıktan sonra dipte kalan pelet üzerine 1 ml %75’lik etanol ilave edildi ve vortekslendi. +4 °C’de 7500 g’de 5 dk süreyle santrifüj edildi. Santrifüj işlemini takiben kalan etanol uzaklaştırıldı ve pelet dietilpirokarbonat (DEPC)’ lı saf suda +58 °C’de 10 dk

çözdürüldü. Elde edilen ekstraktlar RT-PCR’da kullanılıncaya kadar -80 °C’de saklandı.

3.2.2.2. Primer Dizileri

BPIV3'ün moleküler olarak tespitinde kullanılmak üzere mutasyonlara karşı daha korunaklı olması nedeniyle M gen bölgesini kodlayan Maidana ve ark. (2012), tarafından belirlenmiş primer dizileri kullanıldı. RT-PCR amplifikasyonu aşamasında kullanılan primer dizileri, pozisyonları ve ürün büyüklüğü Tablo 3.4'de gösterilmiştir.

Tablo 3.4. BPIV3 primer dizileri, pozisyonları ve ürün büyüklüğü (bp).

Primer	Dizin (5'- 3')	Pozisyon	Ürün(bp)
BPIV3 F	AGTGATCTAGATGATGATCCA	3960	328
BPIV3 R	GTTATTGATCCAATTGCTGT	4288	

3.2.2.3. One step RT-PCR Metodu

Bütün one step RT-PCR metodu için ticari kit (Geneall® HyperScript™ one-step RT PCR master mix, Kore) kullanıldı. Örneklerin amplifikasyonu, Amplitronyx™ (96-well) thermal cycle cihazında (NYX Teknik Inc., ABD) gerçekleştirildi. Geneall® HyperScript™ one-step RT-PCR master mix içerisinde Hyperscript™ reverse transkriptaz, HS-Taq DNA polimeraz, dNTPs, reaksiyon buffer (2.5 ml MgCL₂), dengeleyici ve RNase inhibitörü bulunmaktadır. Testte kullanılacak her bir örnek için tablo 3.4'daki gibi reaksiyon hacmi oluşturulurdu.

Tablo 3.5. One step RT-PCR metodunda kullanılan komponentleri konsantrasyon ve miktarları (μl).

Komponent	Miktar (μl)
Mastermix	10
Forward Primer (20 μM)	1
Reverse Primer (20 μM)	1.5
RNase free su	2.5
RNA Template	5
Toplam Reaksiyon Hacmi	20

Yapılacak tüm testler için pozitif ve negatif kontroller hazırlandı. Negatif kontrol için reaksiyon tüplerine 5 μl nükleaz içermeyen saf su eklenirken, pozitif kontrol için tüplerin içerisinde RLB103 suşundan elde edilen BPIV3 nükleik asiti ilave edilmiştir. RT-PCR metodunda uygulanan sıcaklık ve döngü protokolü tablo 3.5’de gösterildi.

Tablo 3.6. RT-PCR metodunda protokol ve amplifikasyon aşaması (°C/dk).

	cDNA Sentezi	Pre- Denatürasyon	Amplifikasyon			Son uzama
Döngü	1	1	35			1
Sıcaklık	55°C	95 °C	94°C	50°C	72°C	72°C
Süre	30 dk	15 dk	1 dk	1 dk	1 dk	7 dk

3.2.2.4. Jel Elektroforezi

RT-PCR sonucunda elde edilen ampikonlar jel elektroforez ile görüntülendi. Bunun için önce hassas terazi ile 1.2 gr toz agaroz (Biomax Agarose, Prona) tartıldı ve 1X TAE (100 ml) solüsyonu ile çözelti haline getirildi, homojen bir görünüme sahip

olana kadar ısıtıldı. Daha sonra 40-45 °C sıcaklığa düşene kadar soğutuldu ve içerisine 7 µl SafeView™ Classic (ABM, ABD) DNA jel boyası eklendi. OWL™ B1 EasyCast™ (Thermo Fisher Scientific, ABD) tanka dökülen jele 10 veya 14 gözlü taraklar takıldı ve 20-25 dakika beklenerek agarozun donması beklendi. Donan jelin üzerini kaplayacak kadar 1X TAE solüsyonu konuldu. Amplikonlardan 10 µl alındı ve 2 µl yükleme boyası ile karıştırılarak jel üzerindeki kuyucuklara dolduruldu. Bir güç kaynağı kullanılarak 85 V güçte 75 dakika boyunca yürütülen amplikonlar transillüminatör (Vilber Lourman, Fransa) yardımıyla UV ışığı altında değerlendirildi.

3.2.2.5. Dizi Analizi ve Filogenetik Ağaç Oluşturulması

RT-PCR metodu ile gerçekleştirilen moleküler çalışma ile BPIV3'e ait nükleik asitlerin sekans analizleri hizmet alımı (Letgen Biyoteknoloji, Türkiye) yoluyla yapıldı. Elde edilen sekans verileri, MegaX programı yardımıyla hizalandı.

Hizalanan sekans verilerine, MegaX programı ile 1000 bootstrap replikasyon seçeneği kullanılarak maksimum olasılık analizi (maximum likelihood analysis) gerçekleştirildi (Kumar ve ark., 2018). Filogenetik ağacın düzenlenmesinde kullanılan referans dizinler M proteinini kodlayan gen bölgesine göre GenBank'tan alındı (GenBank, 2020). Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) veri tabanı kullanılarak sekans analizi sonrası baz dizilimleri elde edilen örneğin GenBank'a daha önce girişleri yapılmış sekanslarla benzerlikleri karşılaştırıldı.

3.2.3. Direkt Immunfloresan Antikor Boyama Yönteminde Kullanılacak Örneklerin Hazırlanması

3.2.3.1. Nazal ve Konjunktival Örneklerin Hazırlanması

Steril ticari swap çubukları ile alınan örnekler 2500 IU/ml Penisilin ve 20 mg/ml Streptomisin eklenmiş 1.5 ml DMEM (Dulbecco' s Modified Eagles Medium) içerisinde soğuk zincir prosedürüne uygun bir şekilde tanı laboratuvarına getirildi. Bu tüpler vorteks yardımıyla iyice karıştırıldıktan sonra swap çubukları atıldı. Örnekler

+4 °C’ de 1200 rpm 10 dk boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonrası tüpün dibinde biriken pelet kısım toplandı. Toplanan pelet 50 µl DMEM ile sulandırıldı ve temiz bir lam üzerine damlatılarak lamel yardımıyla yayıldı.

Oda sıcaklığında kuruyan lam preparatları -20 °C’de soğutulmuş aseton ile 15 dk boyunca muamele edilerek hücrelerin lama fikzasyonu sağlandı.

3.2.4. Direkt İmmunofloresan Antikor Boyama Yöntemi

Lam üzerine fikze edilen nazal ve konjuktival swap örnekleri PBS ile iki kez yıkandı. Daha sonra lamaların üzeri karanlık bir ortamda 50 µl anti-BPIV3 poliklonal antiserum konjugat (VMRD, ABD) solüsyonu ile kaplandı ve nemli bir ortamda 37°C’de 30 dk boyunca inkubasyona bırakıldı. İnkübasyonu takip eden süreçte preparatlar üzerindeki konjugat artıklarının uzaklaştırılması için karanlık ortamda PBS ile 3 kez yıkandı. Yıkama işlemini takiben kurutulup, immersiyon yağı damlatılarak floresan mikroskopta 100x büyütmede (Olympus Co., Japonya) incelendi.

3.2.5. Hücre Kültürü

MDBK devamlı hücre kültürlerini çoğaltmak amacıyla 24 gözlü mikroplyeteler kullanıldı. Hücre kültürü pleytinin her bir gözüne MDBK hücre kültürü süspansiyonundan 1 ml konuldu. Hücre üretme vasatı olarak %10 fetal dana serumu (FDS)’li antibiyotik ve antimikotik içeren steril ticari DMEM’den yararlanıldı. Hücreler 37 °C ve %5’lik CO₂’li ortam oluşturan etüv’de (Nüve, Türkiye) inkubasyona bırakıldı. İnkube edilen hücreler hergün invert mikroskop yardımıyla incelendi ve tabanı %80 ve daha fazla oranda kapladıkları tespit edildiğinde numunelerin ekimlerinde kullanıldılar.

Hücreler ekime hazır hale getirildiklerinde hücre kültürüne ekim yapılacak -80°C’de saklanan nazal ve konjuktival swap örnekleri 37 °C sıcaklıktaki su banyosunda hızlıca çözündürüldü. Daha sonra 0.22 mikrometre (µm)’ lik filtrelerden geçirilerek inokulumları hazırlandı. İnokulumların her birinden pleytin bir gözüne 400 µl hacminde inokule edildi ve 37 °C ve %5’lik CO₂ etüve (Nüve, Türkiye) kaldırıldı.

Burada bir saat inkube edildikten sonra içerik uzaklaştırılarak üzerlerine 2 ml serumsuz DMEM eklendi ve aynı değerlerde tekrar inkube edildi. Pleyt, hücrelerde meydana gelecek sitopatojen etkilerin saptanabilmesi için 4-10 gün boyunca invert mikroskop ile incelendi. Bu süre sonunda pleyt -80 °C’de donduruldu ve 37 °C’de tekrar çözündürüldü. Ekim işlemi bu 24 gözlü pleytlerin süpernatantlarının kullanılmasıyla 2 defa daha tekrarlanarak kör pasajlama işlemi gerçekleştirildi.

3.2.6. Histopatolojik İnceleme

Lezyonlu ve normal akciğer dokuları %10’luk tamponlu formaldehit solüsyonunda tespit edildi. İki günlük tespitin ardından trimlenen akciğer örnekleri takip kasetlerine alındı ardından doku takip prosedürüne geçildi. Bu işlem için gece boyunca doku takip cihazında alkol ve ksilol serilerinden geçirilerek parafine bloklandı. Gece boyunca ayarlanan cihaz ile rutin patolojik doku takibi yapıldı, bu amaçla Leica ASP300S model ototeknikon (Leica RM 2155, Almanya) kullanıldı. Ertesi gün parafine bloklanan dokular 4-5 saat soğutulduktan sonra Leica 2155 model rotary mikrotomda (Leica RM 2155, Almanya), 5 mikron kalınlığında seri kesitleri alındı. Kesitler normal lamlara çekildi ve bir gece oda ısısında kurutuldu. Kuruyan kesitler ertesi gün rutin boyamaya alındı. Bu amaçla lamlara çekilen doku kesitleri 30’ar dakika süreyle 3 ayrı ksilol serisinden geçirilerek parafin tabakası uzaklaştırıldı. Daha sonra sırasıyla %100, 96, 90, 80 ve 70’lik olmak üzere alkol serisinden geçirilerek dokulara su verildi. Ardından dokular hematoksilenle (15 dakika) ve eozinle (3 dakika) boyandı. Boyama işleminin ardından sırasıyla %70, 80, 90, 96 ve 100’lük alkollerden geçirilerek dokuların suyu alındı. Parlatmak için ksilolden geçirilen dokuların üzerine entellan damlatılarak lamel yapıştırıldı. Entellan ile dokuların üzerine lamel kapatıldı ve kurutmanın ardından mikroskop altında incelendi. Morfometrik analizler için Database Manual Cell Sens Life Science Imaging Software System (Olympus Co., Japonya) bilgisayar programı kullanıldı.

4.BULGULAR

4.1 RT-PCR Metodu ile Yapılan Moleküler Araştırma Sonuçları

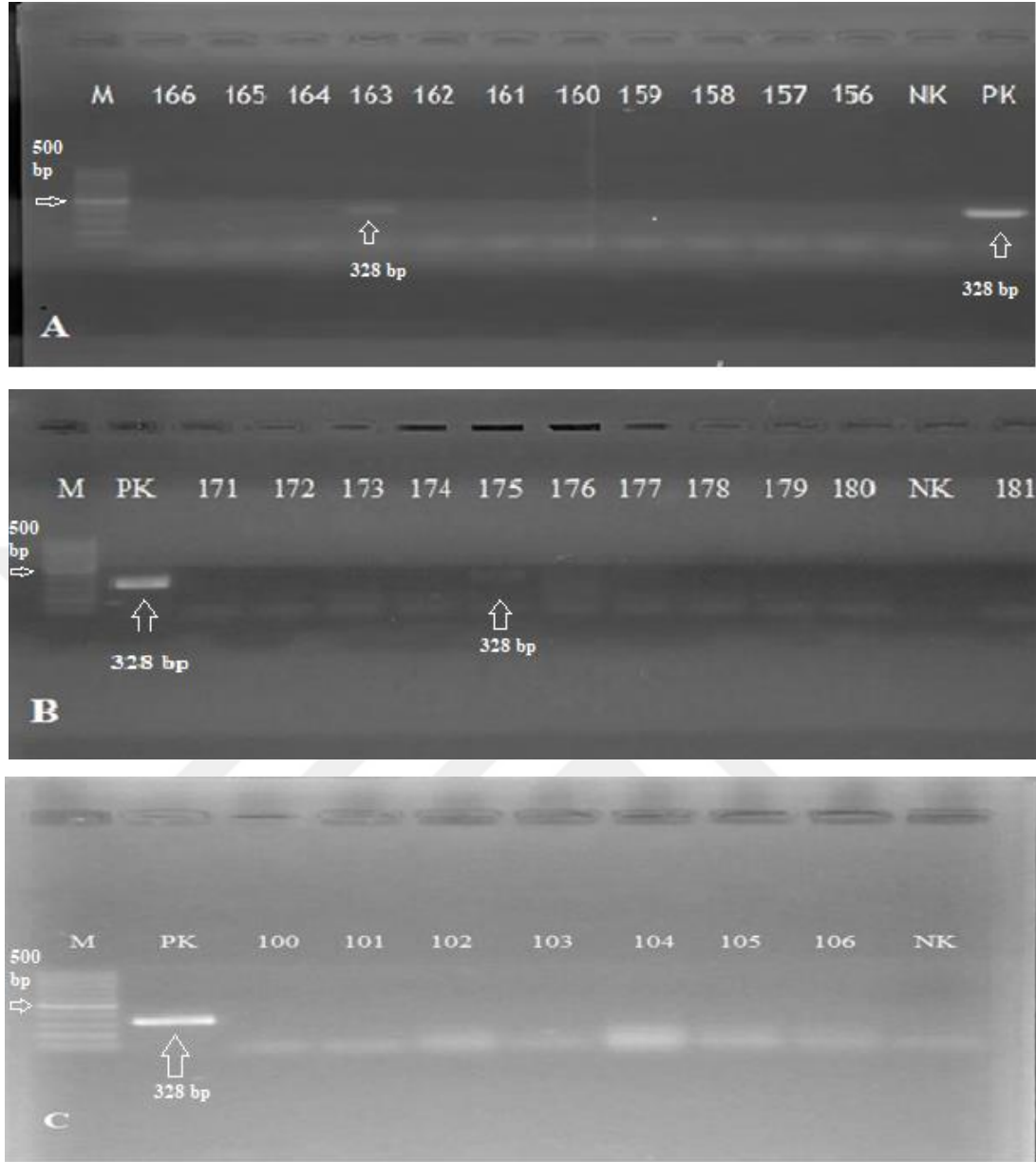
Çalışmada kullanılan 190 hayvandan alınan nazal swap, konjuktival swap ve lökosit örneğinde RT-PCR tekniği ile yapılan araştırmada sadece 2 adet BPIV3 viral nükleik asit varlığı saptanmıştır. Konjuktival swap ve lökosit örneklerinde BPIV3 nükleik asiti saptanamamıştır.

Tablo 4.1. Lökosit, nazal/konjuktival swap örneklerinde RT-PCR Metodu ile elde edilen sonuçlar ve oranları (n/%).

Örnekler	Örnek Sayısı (n)	(+)	(%)	(-)	(%)
Lökosit	190	0	0	190	100
Nazal Swap	190	2	1,05	188	98,95
Konjuktival Swap	190	0	0	190	100
Toplam	570	2	0,35	568	99,65

Tablo 4.2. RT-PCR tekniği ile BPIV3 nükleik asiti tespit edilen hayvanlar hakkında genel bilgiler ve klinik durumları.

RT-PCR Pozitif Örnekler	Cinsiyet	İrk	Yaş	Semptomlar	Enf. Süresi	Trans port	Barınan Hayvan Sayısı
163	♂	Montofon	7 ay	Güç solunum Yüksek ateş	6 gün	12 gün önce	7
175	♂	Simental	1 yaş	Yüksek ateş Güç solunum Mukopurulent nazal akıntı	3 gün	10 gün önce	5



M: Merdiven (100 bp'lık) NK: Negatif Kontrol PK: Pozitif Kontrol bp: Baz Pair (Baz Çifti)

Şekil 4.1. BPIV3 RT-PCR ürünlerinin jel elektroforez görüntüsü, 156-166 saha Nazal Swap örnekleri, 163 pozitif nazal swap örneği (A); BPIV3 RT-PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü, 171-181 Nazal Swap saha örnekleri, 175 pozitif nazal swap örneği (B); BPIV3 RT-PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü, 100-106 Nazal Swap negatif saha örnekleri (C)., NK: Negatif Kontrol, PK: Pozitif Kontrol, bp: Base Pair (Baz çifti).

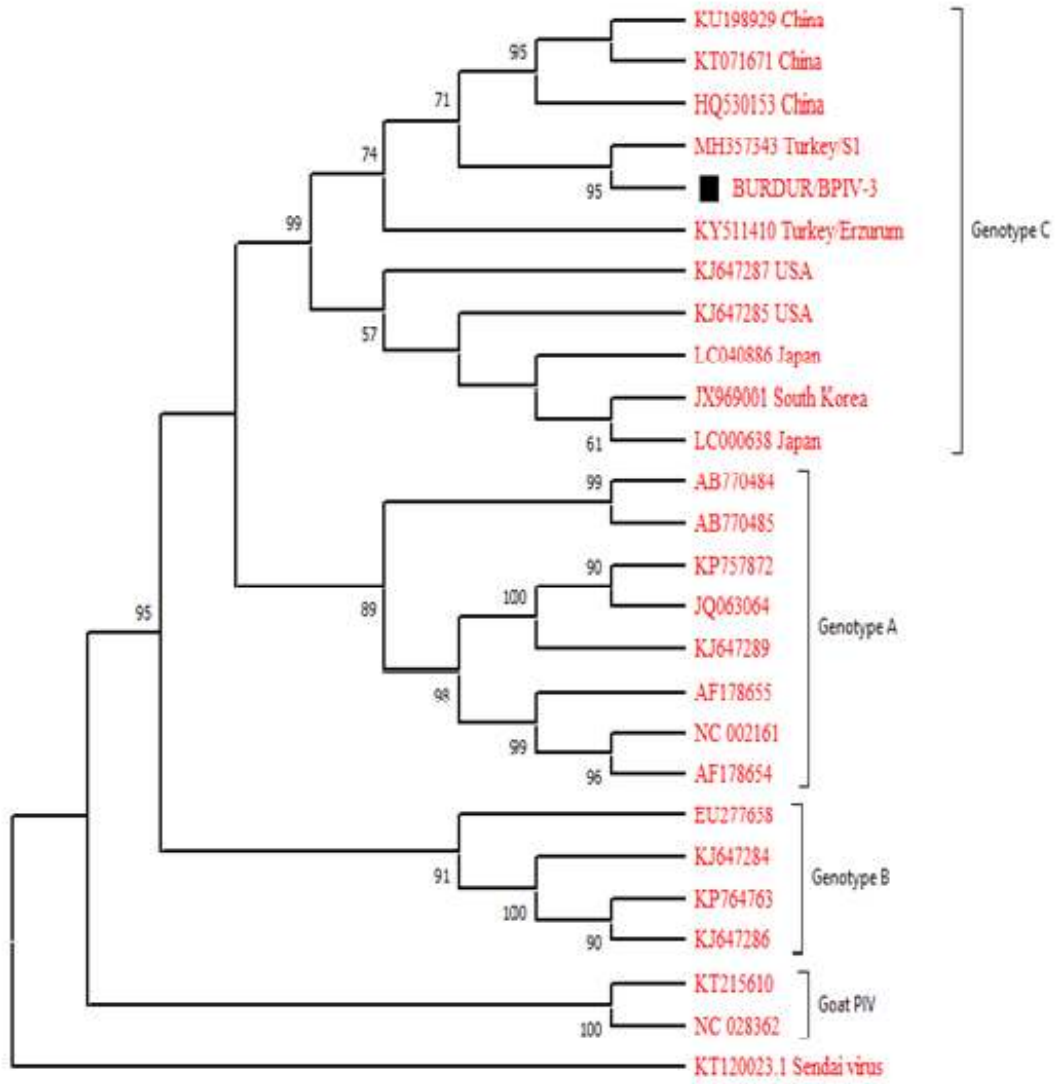
4.2. Sekans Çalışması ve Filogenetik Ağaç

Yapılan moleküler çalışma ile pozitif tespit edilen PCR ürünlerinin sekans analizi sonucu elde edilen verileri tablo 4.3’de gösterildi.

Tablo 4.3. Tez çalışmasında elde edilen dizilere ilişkin veriler.

Örnek No ve Türü	Sekans (5’-3’)	bp
163Nazal Swap	GATCTAGGATGATGATCCAAGTTATAAAGTCTGTGGTTCTGGATC TCTACCACTTGGGCTAGCAAAATACACTGGGAATGATCAGGAAC TCCTACAAGCCGCAATTAAGTTAGACATAGAAGTGAGAAGAACT GTCAAAGCCACAGAGATGATAGTCTACACCGTGCAGAACATTAA ACCTGAACTGTACCCATGGTCAAGCAGATTAAGAAAAGGGATGT TATTTGACGCCAACAAAGTTGCGCTTGACCTCAGTGTCTTCCAC TCGATAGAGGGATAAAATTTCAGAGTAATTTGTGAATTGTACA	314

M proteinini kodlayan gen bölgesine özgü primerler kullanarak gerçekleştirilen RT-PCR tekniği ile BPIV3 etkeni tespit edilen 163 NS örneğinin MegaX programı kullanılarak ortaya koyulan filogenetik analizi sonucu BPIV3 genotip C’de yer aldığı sonucuna ulaşılmıştır. Bununla birlikte etkenin MT949524 erişim numarası (Access Number) ile GenBank kaydı yapıldı.



Şekil 4.2: 163 NS (Nazal swap) saha suşunun M proteinini kodlayan gen bölgesine ait filogenetik ağaç. (■: Çalışmada elde edilen BPIV3 dizini).

Tablo 4.4. Çalışmada elde edilen sekans ve Genbank’ tan referans alınan dizinlerin genetik olarak birbirlerine olan yakınlıkları.

İzolatlar	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
1 KT2 1561 0	-																							
2 NCO 2836 2	10 0	-																						
3 EU2 7765 8.1	66, 33	66, 33	-																					
4 KJ64 7284	67, 27	67, 27	89, 16	-																				
5 KP76 4763	66, 62	66, 62	89, 98	99, 35	-																			
6 KJ64 7286	66, 62	66, 62	89, 98	99, 35	10 0	-																		
7 KY5 1141 0	62, 58	62, 58	82, 74	80, 28	80, 28	80, 28	-																	
8 MH3 5734 3	62, 74	62, 74	85, 36	82, 55	82, 55	82, 55	97, 99	-																
9 BUR /BPI V3	62, 74	62, 74	85, 31	82, 55	82, 55	82, 55	97, 99	99, 68	-															
10 HQ5 3015 3	60, 59	60, 59	85, 71	81, 97	81, 97	81, 97	97, 65	99, 22	99, 22	-														
11 KU1 9892 9	60, 59	60, 59	85, 71	81, 97	81, 97	81, 97	97, 65	99, 22	99, 22	10 0	-													
12 KTO 7167 1	60, 59	60, 59	85, 71	81, 97	81, 97	81, 97	97, 65	99, 22	99, 22	10 0	10 0	-												
13 JX96 9001	63, 52	63, 52	81, 85	79, 34	79, 34	79, 34	96, 54	97, 31	97, 31	96, 97	96, 97	96, 97	-											
14 KJ64 7287	60, 47	60, 47	82, 34	80, 39	80, 39	80, 39	97, 33	98	98	96, 97	97, 66	97, 66	98, 68	-										
15 KJ64 7285	61, 27	61, 27	82, 32	80, 44	80, 44	80, 44	96, 54	97, 65	97, 65	97, 65	97, 65	97, 65	99, 31	99, 31	-									
16 LC04 0886	63, 41	63, 41	82, 34	80, 39	81, 38	81, 38	95, 88	96, 62	96, 62	96, 62	96, 62	96, 62	98, 91	98, 91	98, 91	-								
17 LC00 0638	63, 41	63, 41	81, 99	79, 99	79, 99	79, 99	96, 59	97, 31	97, 31	96, 98	96, 98	96, 98	99, 65	98, 99	99, 65	98, 69	-							
18 AB7 7048 4	70, 06	70, 06	76, 45	81, 21	81, 21	81, 21	84, 56	85, 68	85, 68	84, 28	84, 28	84, 28	86, 61	86, 61	86, 61	88, 38	87, 52	-						
19 AB7 7048 5	70, 06	70, 06	76, 45	81, 21	81, 21	81, 21	84, 56	85, 68	85, 68	84, 28	84, 28	84, 28	86, 61	86, 61	86, 61	88, 38	87, 52	10 0	-					
20 KJ64 7289	65, 39	65, 39	78, 98	78, 88	78, 88	78, 88	79, 55	80, 24	80, 24	81	81	81	80, 99	82, 29	80, 29	81, 91	81, 91	89, 34	89, 34	-				
21 KP75 7872	64, 88	64, 88	76, 77	78, 77	78, 77	78, 77	78, 77	79, 22	79, 22	79, 22	79, 22	79, 22	79, 66	80, 63	80, 63	80, 63	80, 63	89, 34	89, 34	99, 35	-			
22 JQ06 3064	64, 88	64, 88	76, 77	78, 77	78, 77	78, 77	78, 77	79, 22	79, 22	79, 22	79, 22	79, 22	79, 66	80, 63	80, 63	80, 63	80, 63	89, 34	89, 34	99, 35	10 0	-		
23 NCO 0216 1	67, 87	67, 87	78, 01	81, 66	81, 66	81, 66	80, 56	80, 62	80, 62	81, 16	81, 16	81, 16	82, 77	82, 77	82, 77	84, 61	83, 68	92, 44	92, 44	93, 43	93, 46	93, 46	-	
24 AF17 8654	67, 87	67, 87	78, 01	81, 66	81, 66	81, 66	80, 56	80, 62	80, 62	81, 16	81, 16	81, 16	82, 77	82, 77	82, 77	84, 61	83, 68	92, 44	92, 44	93, 43	93, 46	93, 46	10 0	-
25 AF17 8655	67, 77	67, 77	79, 66	80, 66	80, 66	80, 66	81	81, 12	81, 12	82, 65	82, 65	82, 65	83, 12	83, 12	83, 12	84, 11	84, 11	92, 03	92, 03	94, 66	94, 66	99, 02	99, 02	

Tablo 4.5. Tez çalışmasında elde edilen ve GenBank üzerinden referans alınan dizinlerin ait oldukları genotipler ve virus genusları arasındaki genetik yakınlıklar (%).

Virus ve genotipler	1	2	3	4
1 CPIV	-			
2 BPIV3 genotip B	65,6	-		
3 BPIV3 genotip C	60,6	81,5	-	
4 BPIV3 genotip A	66,3	79,3	82,1	-

CPIV: Caprine Parainfluenza Virus

Tablo 4.6. Tez çalışmasında elde edilen ve GenBank üzerinden referans alınan dizinlerin ait oldukları genotiplerin kendi aralarındaki genetik yakınlıkları (%).

Virus ve Genotipler	%
CPIV3	100
BPIV3 genotip B	95
BPIV3 genotip C	98
BPIV3 genotip A	94

CPIV: Caprine Parainfluenza Virus

4.3. DIF Antikor Boyama Testi Sonuçları

190 hayvandan elde edilen 380 adet nazal ve konjuktival swap örneğinde direkt immunfloresan antikor boyama yöntemi ile antijenik araştırma yapıldı. Yapılan testte 190 adet nazal swap örneğinin 6 tanesinde BPIV3 antijenine rastlandı. Konjuktival swap örneklerinde ise BPIV3 tespit edilemedi.

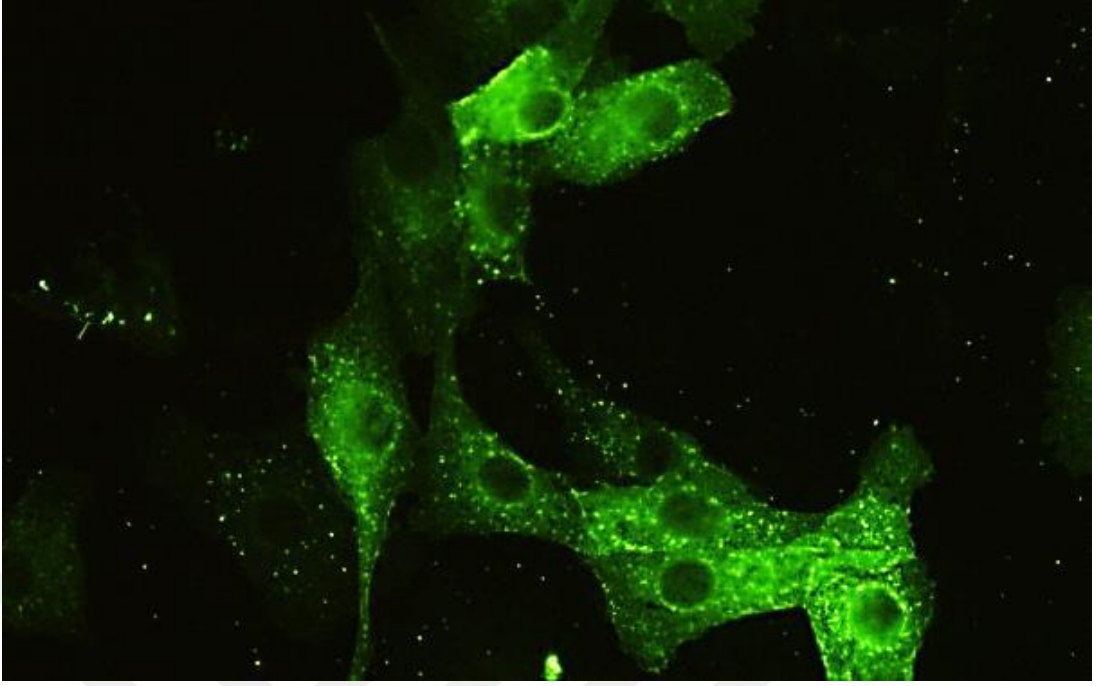
Tablo 4.7. DIF testi uygulanan nazal/konjuktival swap örneklerinde BPIV3 antijen varlığının sayısı ve oranı (*n/%*).

Örnekler	Örnek Sayısı (<i>n</i>)	(+)	(%)	(-)	(%)
Nazal Swap	190	6	3,15	184	96,85
Konjuktival Swap	190	0	0	190	100
Toplam	380	6	1,57	374	98,43

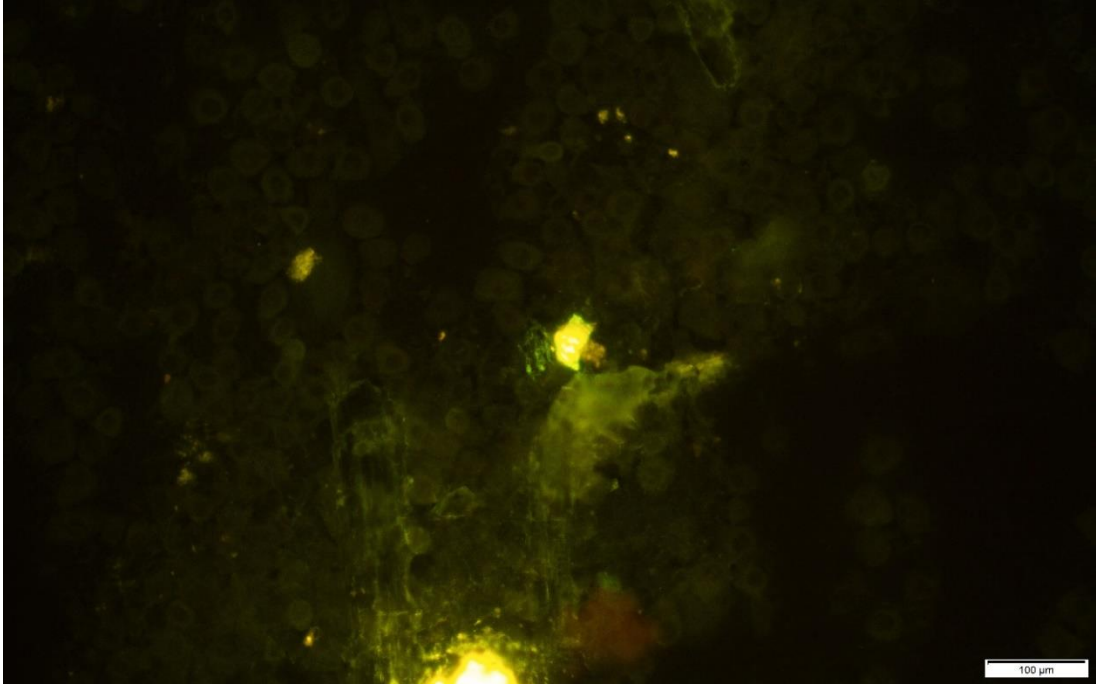
Tablo 4.8. DIF testi ile BPIV3 antijen tespiti yapılan hayvanlar hakkında genel bilgiler ve klinik belirtileri.

DIF Pozitif Örnekler	Cinsiyet	İrk	Yaş	Semptomlar	Enf. Süresi	Transport	Barınan Hayvan Sayısı
163*	♂	Montofon	7 ay	Güç solunum Yüksek ateş	6 gün	12 gün önce	7
175*	♂	Simental	12 ay	Yüksek ateş Güç solunum Mukoprulent nazal akıntı	3 gün	10 gün önce	5
178	♀	Simental	7 ay	Mukoprulent nazal akıntı Öksürük	2 gün	Yok	14
182	♀	Holstein	4 ay	Abdominal Solunum Mukoprulent nazal akıntı	10 gün	Yok	9
186	♀	Simental	1 ay	Abdominal Solunum Mukoprulent nazal akıntı	3 gün	Yok	13
191	♂	Holstein	4 ay	Mukoprulent nazal akıntı Yüksek ateş	7 gün	4 gün önce	8

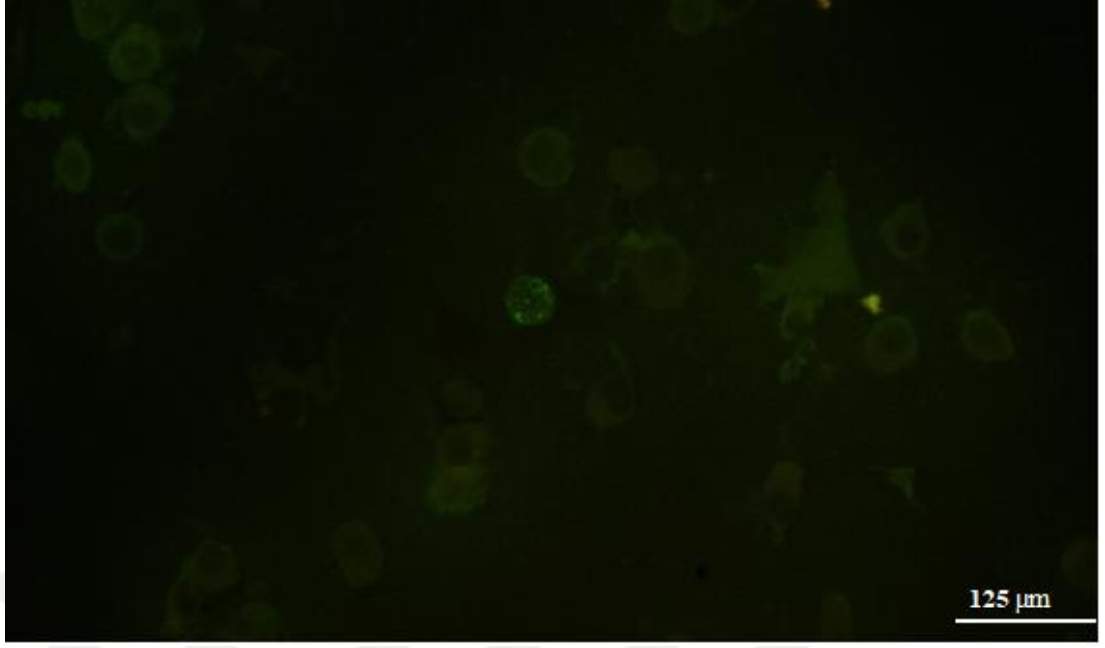
* PCR pozitif numuneler



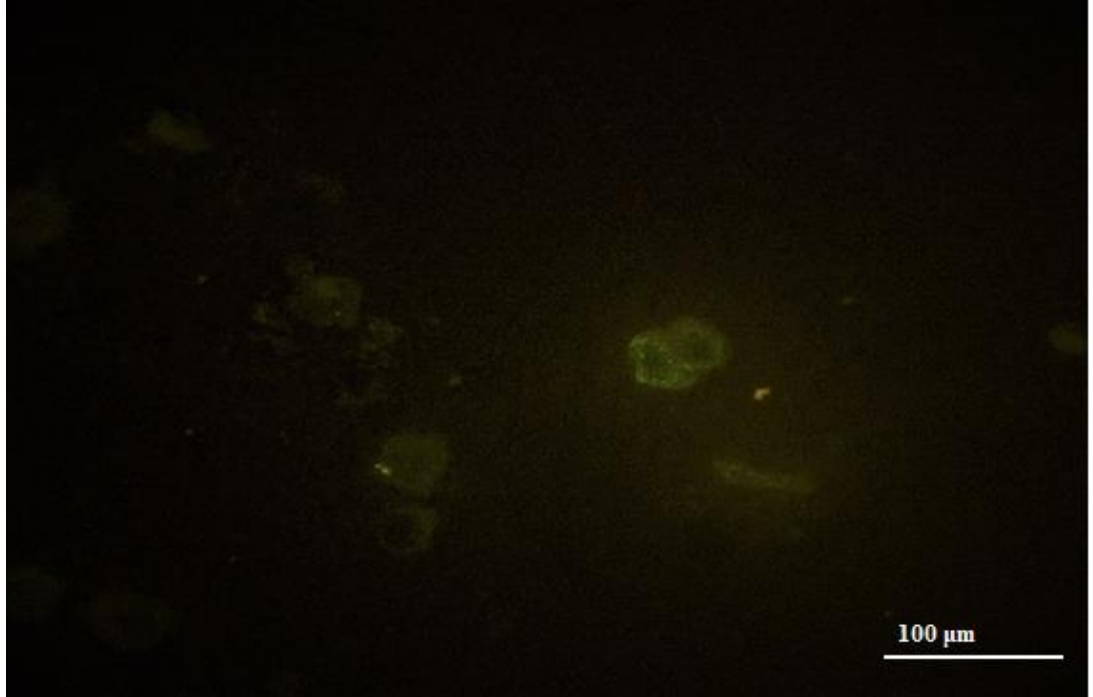
Şekil 4.3. DIF pozitif kontrol (Katalog No: CJ-F-PI3)



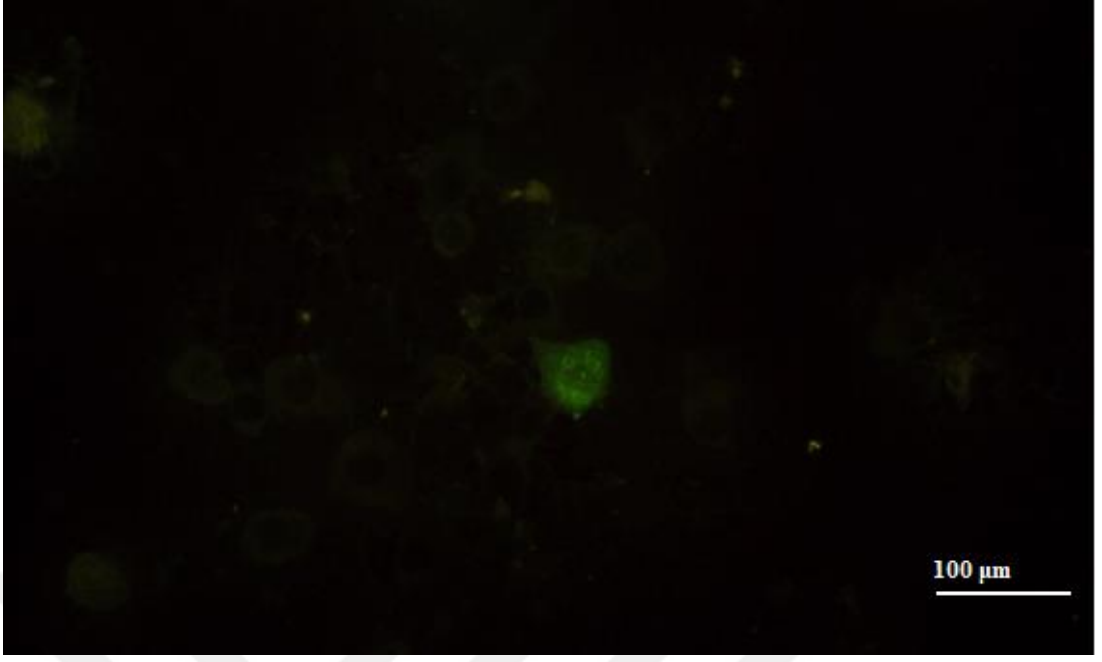
Şekil 4.4. DIF negatif kontrol



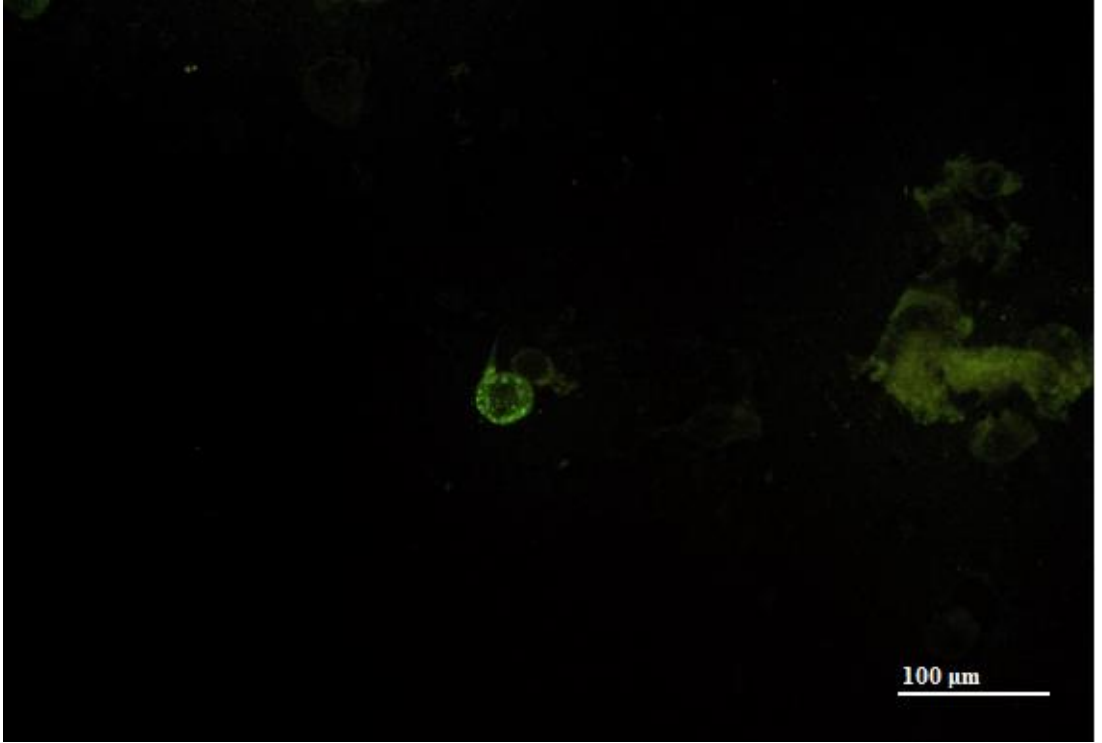
Şekil 4.5. DIF Pozitif nazal swap örneği (Numune Protokol No: 163, bu örnek PCR’de de pozitif bulunmuştur)



Şekil 4.6. DIF Pozitif nazal swap örneği (Numune Protokol No: 175, bu örnek PCR’de de pozitif bulunmuştur)



Şekil 4.7. DIF Pozitif nazal swap örneği (Numune Protokol No: 178)

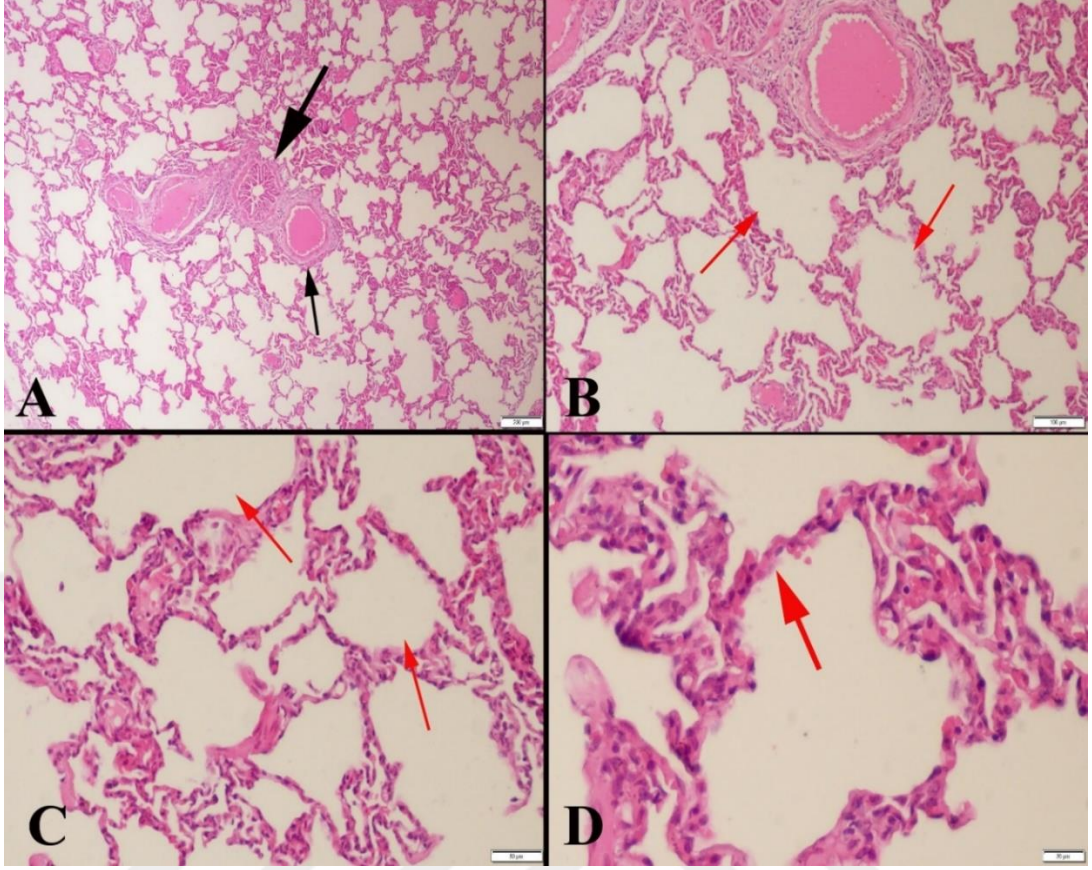


Şekil 4.8. DIF Pozitif nazal swap örneği (Numune Protokol No: 182)

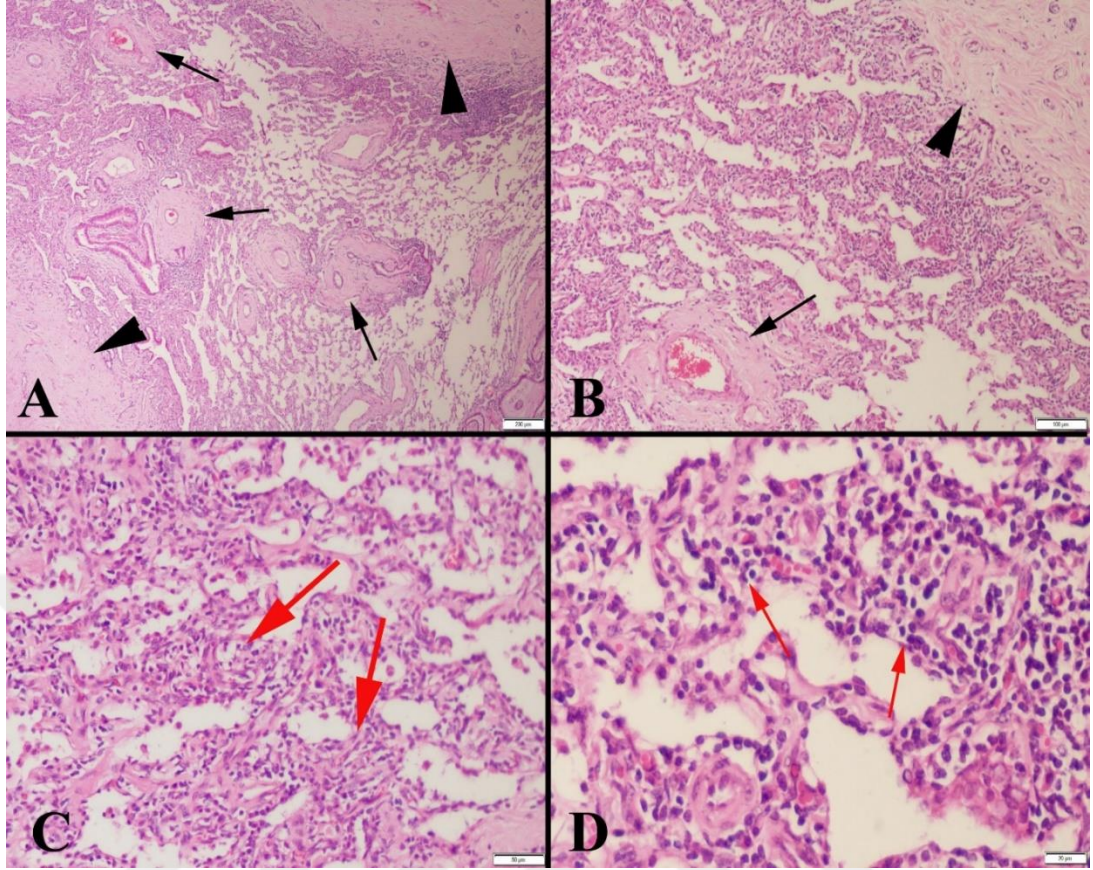
4.4. Histopatolojik Bulgular

Alınan nazal swap numunesinde RT-PCR tekniği ve DIF testi ile moleküler ve antijenik olarak BPIV3 tespiti yapılan 163 numaralı hayvan örneklemeleri takip eden günlerde öldü, yapılan nekropsi sonrası akciğer doku örneklerinden histopatolojik muayene gerçekleştirildi. Bunun yanı sıra kontrol olarak klinik bakıda sağlıklı görünüşlü bir sığırın akciğeri kullanıldı. Kontrol olarak kullanılan sağlıklı akciğerlerde her hangi bir makroskobik ve mikroskobik bulgu saptanmadı (Şekil 4.21). Makroskobik olarak lezyonlu bölgelerden örneklemeler yapıldı ve histopatolojik yoklamada damarlarda şiddetli hiperemi ve yer yer nekrotik alanlar dikkati çekti. Bağ doku artışları ve epitel hücre proliferasyonları sıklıkla gözlenen bulgulardandı. Ayrıca tüm olgularda septal dokuda kalınlaşmalar ile yangısal hücre infiltrasyonları görüldü (Şekil 4.22, Şekil 4.23.).

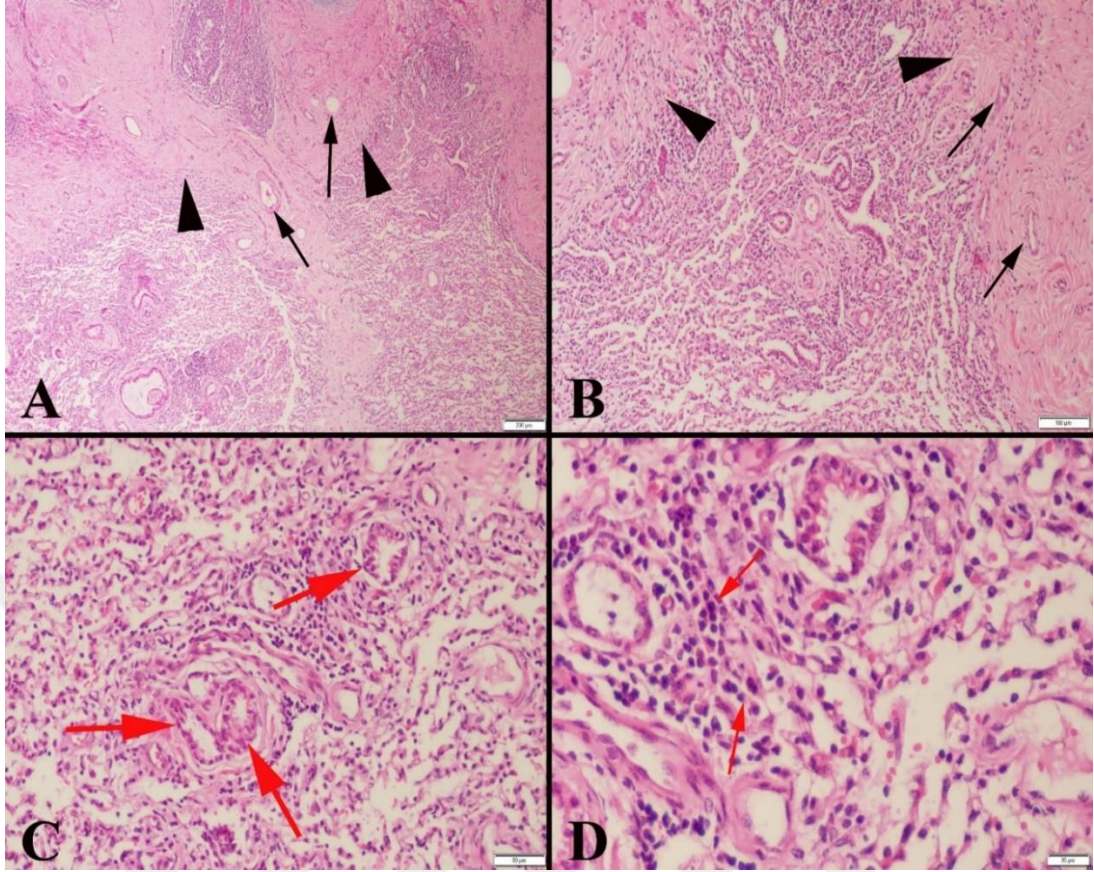
Nekropsi sonrası akciğerlerin enfekte bölgeleri formaldehit içinde taşındığı için dokudan antijenik veya moleküler teşhis uygulamaları gerçekleştirilememiştir.



Şekil 4.9. Normal görünümde bir akciğerin histolojik görünümü, (A) küçük büyütmede akciğer damarları (siyah ince ok) ve bir bronşiyolün siyah (kalın ok) normal mikroskopik görünümü, Bar= 200µm. (B) Alveollerin (kırmızı ince oklar) görünümü, Bar= 100µm. (C) Alveollerin (kırmızı ince oklar) yakından görünümü, Bar= 50µm. (D) Alveol septal dokusunun (kırmızı kalın ok), Bar= 20µm, Hemotoksilen Eozin (HE).



Şekil 4.10. Pnömonili bir akciğerin histopatolojik görünümü, (A) Damarlaşmada artış (siyah ince oklar) ve yaygın bağ doku gelişimi (siyah ok başları), Bar= 200µm, (B) Damarlaşma ve bağ doku artışının yakından görünümü, Bar= 100µm, (C) Septal doku kalınlaşması (kırmızı kalın oklar), Bar= 50µm, (D) yangısal hücre infiltrasyonu (kırmızı ince oklar) Bar= 20µm.

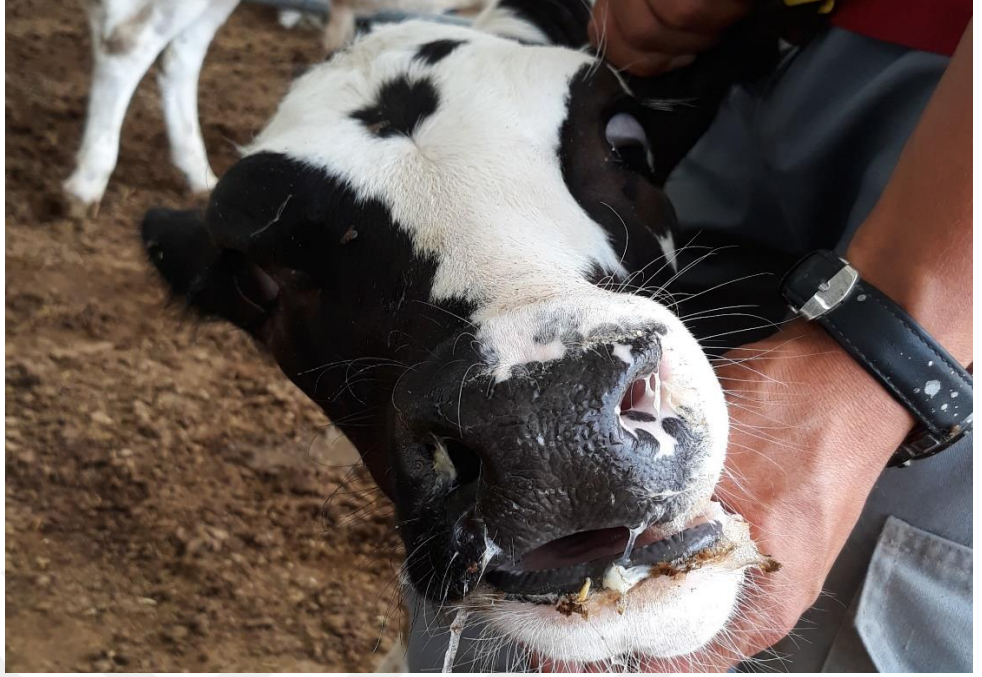


Şekil 4.11. (A) Bağdoku artışı (siyah ok başları) ve damarlaşma da artış (siyah ince oklar), Bar= 200µm, (B) Bağ doku artışı (siyah ok başları) ve damarlaşmanın (siyah ince oklar) yakından görünümü, Bar= 100µm, (C) Küçük bronşiollerde epitel hücre proliferasyonları (kırmızı kalın oklar), (D) İntertisyel dokuda yangısal hücre infiltrasyonları (kırmızı ince oklar), Bar= 20µm, HE.

4.5. Hücre Kültürü İnokulasyon Sonuçları

Araştırmada kullanılan 380 hayvandan alınan nazal ve konjunktival swap örnekleri BPIV3 izolasyonu amacıyla MDBK hücre kültürlerine ekildi. İki kez kör pasajı yapılan örneklerin mikroskopik incelemeleri sonucu hücrelerde herhangi bir CPE gözlenmedi.

Örneklemlerin yapıldığı hayvanlarda BPIV3 enfeksiyonunda gözlenen klinik semptomların bazıları şekil 4.24-26 gösterilmiştir.



Şekil 4.12. Bilateral non-purulent nazal akıntı (150 numaralı hayvan).



Şekil 4.13. Solunum güçlüğü (178 numaralı hayvan).



Şekil 4.14. Unilateral purulent nazal akıntı (148 numaralı hayvan).

5.TARTIŞMA

Sığırların solunum sistemi hastalık kompleksi (BRD) tüm dünyada yaygın olarak gözlemlenen multifaktöriyel sağlık problemlerinden birisidir. Etiyolojisinde BPIV3, BHV-1, BCoV, BRSV, BAV, BVDV gibi viral; *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, *Histophilus somni* gibi bakteriyel pek çok patojen etkeni bir arada bulundurur (Headley ve ark., 2018; Griffin ve ark., 2010). Enfeksiyon kaynaklı hayvan refahındaki düşüşe bağlı olarak kilo kaybı ve karkas kalitesindeki azalma, profilaksi ve veteriner hizmetleri giderlerinin artması, döl veriminde azalma, hayvan ölümlerinin görülmesi gibi etmenler yetiştiricilerin büyük çaplı ekonomik kayıplar yaşamasına yol açar (Ellis 2010).

BPIV3 solunum sistemi hastalıkları kompleksine zemin hazırlayan en önemli viral ajanlardan birisidir (Karron ve Colins, 2007). Dünya genelinde yaygın olarak bulunan etken her yaştan ve ırktan sığırdan enfeksiyon meydana getirirse de genç hayvanlarda görülme sıklığı daha yüksektir. Sonbahar ve kış aylarında ortaya çıkan hastalık çoğunlukla subklinik seyreder fakat diğer etkenlerin enfeksiyona katılması durumunda ölümcül bronkopnömoniler şekillenebilir (Ellis 2010).

Ülkemizde ulusal aşılama programında, solunum sistemi hastalıklarına karşı profilaktik bir uygulama bulunmamaktadır. Bununla birlikte geliştirilen ticari attenué canlı veya inaktif kombine aşılar özel veteriner kliniklerinin oluşturduğu protokollere göre hayvan sahiplerinin istekleri doğrultusunda uygulanabilir. Buna rağmen bazı yetiştiricilerin solunum sistemi enfeksiyonlarını önemsememesi, koruyucu işlemlerin devlet eliyle yapılmaması ve ülkemizde özellikle bazı dönemlerde hayvan hareketlerinin artmasından dolayı solunum sistemi enfeksiyonlarının prevalansı oldukça yüksek seyretmektedir.

Yaptığımız çalışmada solunum sistemi enfeksiyonu semptomları gösteren ve aşılanmamış sığırlardan alınan nazal/konjunktival swap ve lökosit örneklerinde BPIV3'ün RT-PCR tekniği ile moleküler olarak tespit edilmesi amaçlanmıştır. Bunun yanı sıra konjunktival ve nazal swap örneklerinde DIF yöntemi ile etkenin antijenik tanısının konulması hedeflenmiştir. Bu sayede BPIV3 enfeksiyonunun sığırlar

arasında yaygınlığının ortaya konulması ve solunum sistemi hastalıklarında bu virusun etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca sığırlarda görülen solunum sistemi enfeksiyonlarında hasta hayvanlardan hangi marazi maddenin alınması durumunda laboratuvar teşhisinin doğru bir şekilde yapılabileceği de belirlenmeye çalışılmıştır.

Ülkemizde konuyla alakalı pek çok çalışma yapılmıştır. Hacıoğlu (2011), Ankara bölgesindeki sığırlardan topladığı nazal swap örneklerinde RT-PCR tekniğini kullanarak BPIV3'ün moleküler teşhisi üzerine çalışmış ve %1,41 (1/71) oranında pozitiflik saptamıştır.

Timurkan ve ark. (2019), Erzurum bölgesindeki sığırlardan aldıkları 127 nazal swap ve 28 akciğer doku örneğinde BPIV3 ve BRSV nükleik asit tespiti üzerine çalışmışlardır. RT-PCR metodu kullanarak gerçekleştirdikleri araştırmada toplamda %1,94 (3/155) oranında BPIV3 nükleik asiti tespit etmişlerdir.

Çomaklı ve Özdemir (2019), Erzurum bölgesindeki sığırlardan topladıkları meme dokusu örneklerinde BHV1 ve BPIV3 varlığını araştırmışlardır. qRT-PCR tekniği kullanılarak yapılan bu araştırmada %21,67 (26/120) oranında sadece BPIV3'e ait nükleik asit varlığı tespit edilirken, %4,16 (5/120) oranında da iki etkene ait viral genom varlığı ortaya koyulmuştur.

Albayrak ve ark. (2019), Ordu bölgesinde solunum sistemi enfeksiyonu nedeniyle ölen bir sığırdaki BPIV3 viral genomunu moleküler olarak tespit edebilmek için akciğer doku örneği kullanmışlardır. Homojenizasyon sonrası elde ettikleri inokulumu virus izolasyonu ve moleküler teşhis amacıyla MDBK hücre kültüründe pasajlamışlar bununla birlikte homojenatta BPIV3'e ait nükleik asit varlığını araştırmışlardır. RT-PCR tekniği kullanılarak yapılan bu çalışmada hem virus inokule edilen hücrelerde hem de homojenatta viral nükleik asit varlığını tespit etmişlerdir. İzole edilen etkenin filogenetik analiz çalışmaları sonucu BPIV3 genotip C grubunda yer aldığı ortaya koyulmuştur. Bu araştırma ile Türkiye'de ilk defa BPIV3'ün izolasyonu gerçekleştirilmiş bununla birlikte BPIV3 genotip C grubunda yer alan bir izolat elde edilmiştir.

Toker (2019), Bursa ve çevre illerinde solunum sistemi enfeksiyonu belirtileri gösteren sığırlardan alınan 133 nazal swap ve 60 akciğer doku örneğinde solunum sistemi enfeksiyonuna neden olan virusların izolasyonu ve moleküler teşhisi üzerine çalışmıştır. RT-PCR yönteminin kullanıldığı moleküler çalışmada sadece bir nazal swap örneğinde BPIV3 etkenine ait nükleik asit tespit edilmiştir.

Zhu ve ark. (2011), Çin’de yaptıkları araştırmada solunum sistemi enfeksiyonu semptomu gösteren 63 sığırdan aldıkları nazal swap örneklerinde RT-PCR yöntemiyle BPIV3 nükleik asit varlığını araştırmışlar ve 4 örnekte pozitiflik belirlemişlerdir.

Thonur ve ark. (2012), yaptıkları araştırmada solunum problemlili hayvanlardan kış aylarında aldıkları nazal swap, akciğer dokusu, bronkoalveolar lavaj ve treka dokusu gibi örneklerde qRT-PCR tekniği ile BPIV3 nükleik asitini tespit etmeye çalışmışlar ve yukarıda belirtilen marazi maddelerde sırasıyla %2,94 (4/136), %6,60 (7/106,) %10,52 (2/19), %5,26 (1/19) oranında pozitiflik elde etmişlerdir.

O’Neill ve ark. (2014), İrlanda’da yaptıkları retrospektif çalışmada, 2008-2012 yılları arasında solunum sistemi enfeksiyonu semptomları gösteren 1364 sığırdan nazal swap örnekleri toplamışlar. Aldıkları bu örneklerde solunum sistemi enfeksiyonuna yol açan bazı viral etkenlerin nükleik asit varlığını araştırmışlardır. qRT-PCR ve qPCR tekniğini kullanarak yaptıkları moleküler araştırmada, BPIV3 enfeksiyonunun oranı %7 (95/1364) olarak belirlemişlerdir.

Moore ve ark. (2015), Avustralya’dan diğer ülkelere ihraç edilecek olan 1484 sığırı solunum yolu enfeksiyonuna yol açan bazı viral ve bakteriyel etkenlere yönelik taramışlardır. Nazal swap örneklerinde qRT-PCR ve PCR yöntemini kullanarak nükleik asit varlığının araştırıldığı bu çalışmada BPIV3 %1,4 (21/1484) oranında tespit edilmiştir.

Veljovic ve ark. (2016), Sırbistan’da yaptıkları çalışmada ciddi solunum sistemi enfeksiyonu bulguları olan 119 sığırdan aldıkları nazal swap örneklerini önce MDBK devamlı hücre kültürlerine ekmişler daha sonra RT-PCR tekniğini kullanarak

yaptıkları moleküler araştırmada %6,72 (8/119) oranında BPIV3 nükleik asit varlığı tespit etmişlerdir.

Kishimoto ve ark. (2017), Japonya’da sığırılarda solunum sistemi enfeksiyonuna neden olan 16 farklı etkenin qRT-PCR tekniği ile moleküler olarak tespiti üzere yaptıkları araştırmada farklı çiftliklerdeki 40 sığırılardan nazal swap örnekleri almışlar ve BPIV3’ tespit edememişlerdir.

Headley ve ark. (2018), Brezilya’da yaptıkları çalışmada ise solunum sistemi enfeksiyonu semptomu gösteren 23 sığırılardan aldıkları nazal swap örneklerinde BPIV3’ izole edememiştir.

Kamdi ve ark. (2020), Hindistan’da 166 sığır ve 240 mandadan elde ettikleri akciğer, mediastinal/bronşiyol lenf nodülleri ve trake dokularında RT-PCR ve DIF tekniklerini kullanarak BPIV3’n teşhisi üzerine çalışmışlardır. Araştırma sonucuna göre %3,69 (15/406) oranında etkene ait nükleik asit ve antijenik yapılar tespit edilmiştir.

Bu tez çalışmasında 190 hayvandan aldığımız nazal swap örneklerinin ikisinde BPIV3 varlığını tespit ettik. Aynı hayvanlardan alınan konjunktival swap ve lökosit örneklerinde ise etkene ait nükleik asit varlığı tespit edilemedi. Pozitif sonuç alınan nazal swap örneklemeleri solunum sistemi hastalıklarının sıklıkla görüldüğü aralık-şubat aylarında gerçekleştirildi. Hayvanların yaklaşık 3 ile 7 gündür devam eden abdominal solunum, 39 °C ve üzeri ateş, mukopurulent nazal akıntı, öksürük gibi hastalık semptomları göstermeleri nedeniyle enfeksiyonun akut döneminde oldukları dşnlmştir.

Bunun yanı sıra düşük olan pozitiflik oranının ve olası etken tespit ihtimalinin artırılması amacıyla nazal ve konjunktival swap örneklerinin hücre kültürüne ekimi gerçekleştirildi. Hücre kültürü ekimini takiben pleytler hücrelerde meydana gelen sitopatolojik etkilerin gözlemlenebilmesi için 7 gün boyunca invert mikroskop ile incelendi. Pleytler incelemeleri takiben -80 °C’ye kaldırıldı ve daha sonra 37 °C’de çözdürüldü. Bu işlemler ekim amacıyla supernantların kullanılması yolu ile 2 kez daha

tekrar edildi. K r pasaj sonucunda yapılan mikroskopik incelemelerde herhangi bir CPE gözlenmedi.

Bizim araştırmamıza benzer olarak Noori ve ark. (2014), yaptıkları çalışmada da 25 adet DIF ve PCR analizlerinde pozitiflik tespit edilmiş örneklerin sadece bir tanesinin hücre kültürü pasajlarından etken izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Etkenin fragil bir yapıya sahip olması ve hücre hatlarına zor adapte olmasından ötürü bir örnekten izole edilebildiği d ş n ld . Bu sonuçlar BPIV3 enfeksiyonunun teşhisinde hücre kültürü çalışmalarının güçlüğünü göstermektedir.

Dünya genelinde ve  lkemizde BPIV3 enfeksiyonunun prevalansı oldukça yüksektir (Kale ve ark., 2013; Spilki, 2016; G r, 2018). Bu nedenle seropozitif sığırların buzağıları kolostral yolla maternal antikorları edinebilirler. Bu antikorlar buzağılarda ortalama 10 haftaya kadar tespit edilebilir titrededir, bazen yüksek düzeyde BPIV3 antikor  içeren bir kolostrum alan buzağıda bu süre 19-23 haftaya kadar uzayabilmektedir (Elenkumaran, 2013). BPIV3 seronegatif buzağılar üzerinde yapılan çalışmalarda intranazal virus inokulasyonundan 6 gün sonra lokal (IgA) ve sistemik (IgM ve IgG) antikorların gözlemlenebildiği ortaya konulmuştur (Elenkumaran, 2013). Enfeksiyonu takip eden süreçte nötralizan antikorlar 3-5 ay boyunca yüksek seviyelerde seyrederken, nazal sekretlerdeki antikor titresi 6-8 hafta içerisinde tespit edilemeyecek konsantrasyonlara geriler (Sharma ve Adlakha, 2009). Fakat reenfeksiyon durumlarında mukozal ve serum antikor seviyeleri ilk enfeksiyona oranla çok daha yüksek titrelelere ulaşır. Nazal antikor titresi 5 aya kadar, serum antikor seviyesi ise çok daha uzun s reler tespit edilebilir d zeeye yükselir. Bununla birlikte virusun yüksek seviyelerde mukozal, düşük seviyelerde serum antikor konsantrasyonu bulunan buzağılarda hastalık meydana getirmezken, tersi durumlarda klinik belirtilere neden olduğu bilinmektedir (Frank ve Marshall, 1971).

Bu nedenle etkenin nazal sekretler yoluyla saçılması antikor titrelerindeki farklılıklara göre değişim göstermektedir. Genel anlamda mukozal immunit  enfeksiyonun önlenmesi ve saçılımın azaltılmasına yönelik rol oynarken, sistemik immunit  meydana gelmiş olan bir enfeksiyonun daha hafif seyretmesini sağlar (Elenkumaran, 2013; MacLachlan ve ark., 2017). BPIV3 enfeksiyonunun

önlenmesinde mukozal immunité sistemik immunitéye oranla daha ön plandadır (MacIachlan ve ark., 2017). Bu nedenle buzağılar maternal antikor almış olsa dahi yine de enfekte olabilir ve virüsü saçabilirler. Fakat kolostrum almış olan buzağının enfeksiyonu çok daha hafif veya subklinik şekilde geçirdikleri bilinmektedir (Omar ve ark., 1966). Maternal antikorların nazal bölgeye göç ederek klinik semptomların oluşmasını engellediği düşünülmektedir.

Paramyxovirüsler gibi zarlı virüsler genellikle canlı vücudundan çıkıp çevre şartlarına maruz kaldıklarında oldukça kırılğan bir hale gelirler. Pirtle ve Beran (1991), etkeni $10^{5.5}$ DKID 50/ml dilüe edip farklı ortamları kontamine ettiklerinde deride 20 dakika, eldivende 1,5 saat ve cansız yüzeylerde en fazla 6 saat enfektif olduğunu tespit etmişlerdir. Bu nedenle alınan örnekler mümkün olan en kısa sürede soğuk zincir altında laboratuvarlara getirilmeli ve gerekli testler uygulanmalıdır. Dünya genelinde yapılan moleküler araştırmaların pek çoğunda düşük pozitifliklerin görülmesinin nedenlerinden birisi de etkenin zarlı ve fragil bir yapıya sahip olmasıdır.

BPIV3' ün moleküler ve virolojik olarak tespiti üzerine yaptığımız bu çalışmada örneklemelerin yapıldığı hayvanların seropozitif olması ve etken fragilitesi gibi nedenlerden ötürü prevalansının düşük olarak tespit edildiği kanısına varılmıştır.

Araştırmamızda BPIV3 tespiti yapılan hayvanların kayıtlarından aşısız oldukları, yaşlarının 6 ay ile 12 ay arasında olduğu ve bulundukları ahıra 10-15 gün önce getirildikleri bilgisine ulaşılmıştır. Ayrıca bu hayvanların yarı açık ve kapalı sistem ahırlarda barındırılmaları, yetersiz ventilasyon, yeni gelen hayvanlara karantina uygulanmaması, hijyen tedbirlerine uyulmaması ve barınakların hakim rüzgarlara karşı korunaksız olması gibi nedenlerden dolayı enfeksiyonun gelişmiş olabileceği düşünülmüştür.

Çalışmamızda viral nükleik asit varlığı tespit edilen hayvanlarda hastalığın erken evrelerinde mukozal ve sistemik immün cevabın yeterli düzeye ulaşmamasından dolayı etken teşhisinin konulabildiği kanısına varılmıştır. Klinik semptom gösterdiği halde BPIV3 viral genomu tespit edilemeyen hayvanlarda diğer viral, bakteriyel veya paraziter patojenlerin neden olduğu bir solunum sistemi enfeksiyonunun şekillendiği

veya BPIV3 enfeksiyonu sonrası meydana gelen sekonder enfeksiyonlara bağılı bir klinik tablo olduğı düşünölmüştür. Bununla birlikte örnekleme yapılan klinik semptomları hafiflemiş hayvanlarda etkenin tespit edilememesinin nedeni olarak hastalığın iyileşme aşamasında olmasından ötürü etkeni bulundurmadıkları veya şiddetli semptom göstermelerinin üzerinden yaklaşık 1-2 haftalık bir sürenin geçmiş olmasından dolayı konvelesan dönemde oldukları kanısına varılmıştır.

Etkenin viremi döneminin olmaması veya çok kısa olması nedeniyle lökosit örneklerinde virusun tespit edilememesinin doğal olduğı düşünölmüştür. Bununla birlikte BPIV3'ün pnömositler, bronşial hücreleri, trake epiteller gibi NANA reseptör moleküllerinin çokça bulunduğı solunum kanalı hücrelerine affinite gösterdiği bilinmektedir (MacLachlan ve ark., 2017). Konjunktival swap örneklerinde virusa ait nükleik asit tespitinin bu nedenle gerçekleştirilemediğı düşünölmektedir.

BPIV3'ün A, B ve C olmak üzere bilinen 3 genotipi vardır. Bu genotipler ilk kez BPIV3a ABD'de (Reisinger ve ark., 1959), BPIV3b Avustralya'da (Harwood ve ark., 2008), BPIV3c Çin'de izole edilmiştir (Zhu ve ark., 2011). Son yıllarda yapılan moleküler çalışmalarda etkenin belirtilen genotiplerinin dünya'nın pek çok bölgesinde sirkölasyon halinde olduğı gösterilmiştir.

BPIV3a Kuzey Amerika'da (Qiao ve ark., 2009), Çin'de (Leal ve ark., 2019), Japonya'da (Ohkura ve ark., 2013) ve Mısır'da (Sobhy ve ark., 2017) bildirilmiştir. Bununla birlikte, Harwood ve ark. (2008), Avustralya'da yaptıkları çalışmada farklı saha suşlarında BPIV3a ve ilk kez BPIV3b genotiplerini izole etmişlerdir. Wen ve ark. (2012), gerçekleştirdikleri araştırmada Çin'de BPIV3c genotipinin yanı sıra BPIV3a'yı da izole etmişlerdir. Neill ve ark. (2015), yaptıkları araştırmada ABD'de BPIV3a genotipinin yanı sıra BPIV3b ve BPIV3c genotipinin de sirkölasyon halinde olduğunu bildirmişlerdir. Maidana ve ark. (2012), mandalar üzerine Arjantin'de gerçekleştirdikleri araştırmada etkenin 3 genotipini de izole etmişlerdir. BPIV3c Çin'de izole edildikten sonra Güney Kore'de (Oem ve ark., 2013) ve Japonya'da (Konishi ve ark., 2014) tespit edilmiştir.

Filogenetik ağacın çizilmesinde kullanılan referans dizinler ve bu çalışmada elde ettiğimiz suşa ait sekans verilerinin MegaX programı kullanılarak Pariwise Distance analizi sonucu saha suşu Albayrak ve ark. (2019), Samsun’da yaptıkları çalışmada elde ettikleri izolata (MH357343) %99,68; Timurkan ve ark. (2019), Erzurum’da yaptıkları çalışmada elde ettikleri izolata (KY511410) %97,99 genetik benzerlik gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır. Bununla birlikte araştırmamızda izole ettiğimiz virusun Zhu ve ark. (2011); Wen ve ark. (2012), Çin’de yaptıkları çalışmalarda elde ettikleri izolatlarla (HQ530153, KU198929, KT071671) %99,2; Konishi ve ark. (2014), Japonya’da yaptıkları araştırmada elde ettiği izolatlarla (LC000638, LC040886) sırasıyla %96,62, %97,31; Oem ve ark. (2013), Güney Kore’de yaptıkları çalışmada izole ettikleri virusa (JX969001) %97,31 oranında genetik yakınlık gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır. Diğer yandan Sobhy ve ark. (2017) Mısır’da yaptıkları araştırmada izole ettikleri suşla (KP757872) %79,22; Neill ve ark. (2015), ABD’ de yaptıkları çalışmada izole ettikleri suşla (KJ647289) %80,45 oranında genetik yakınlığı bulunmaktadır. Araştırmamızda elde ettiğimiz etkenin referenz suş kabul edilen SF-4 suşuna olan genetik yakınlığı ise (AF178655) %82,12’dir.

Bu bilgiler ışığında tez çalışmamızda elde edilen suşun filogenetik analizine göre Çin, Türkiye, Japonya ve Güney Kore’deki bazı izolatlarla yakın genetik ilişkide olduğu ve BPIV3c içerisinde yer aldığı tespit edilmiştir. Öte yandan ABD ve Mısır’da tespit edilen izolatlardan Asya izolatlarına oranla genetik olarak daha uzak olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Türkiye’de BPIV3’ün viral genom tespiti ve sekans analizi üzerine yapılan üç çalışma bildirilmiştir (Albayrak ve ark., 2018; Timurkan ve ark., 2016; Toker, 2019). Tez çalışmamızda elde ettiğimiz veriler bu çalışmalar ile benzerlik göstermektedir. Araştırma sonuçlarımız Türkiye’de BPIV3c genotipinin sirkülasyon halinde olduğunu desteklemektedir. Diğer yandan RT-PCR metodu ile viral genom tespiti yapılan 175 NS numaralı örneğin sekans analizi sonucu herhangi bir veri elde edilememiştir. Bunun nedeni olarak ekstrakte viral RNA’nın fragil bir yapıya sahip olmasından ötürü saklama aşamasında degrades olduğu düşünülmüştür.

Saaed ve ark. (2016), Sudan’da yaptıkları araştırmada izole ettikleri suşun sekans analizi sonucu genetik olarak %93-95 arasında değişen oranlarla BPIV3’e, %94 oranında SPIV’ e benzerlik gösterdiği sonucuna ulaşmışlardır. Suşlar arasında görülen düşük oranlardaki genetik farklılığı (%7-5), RNA genomu taşıyan viruslarda meydana gelen mutasyonlar ve rekombinasyon olaylarıyla açıklamışlardır (Murphy ve ark., 1999; Saaed ve ark. 2016).

Etkenin nazal swap örneklerinden RT-PCR tekniği kullanılarak tanısı üzerine yaptığımız çalışmanın sonuçları daha önce yapılan (Hacıoğlu 2011; Thonur ve ark., 2012; Timurkan ve ark. 2019; Veljovic ve ark., 2016) çalışmalarla paralellik göstermektedir. Öte yandan Çomaklı ve Özdemir (2019) ile Albayrak ve ark. (2019), yaptıkları çalışmalarda viral nükleik asit izolasyonunu daha yüksek oranlarda tespit etmişlerdir. Bunun nedeni çalışmalarda kullanılan enfekte doku materyallerinin nazal swap örneklerinden çok daha fazla viral yüke sahip olması bunun yanı sıra hücre kültürü inokulasyonları ile virusun zenginleştirilmesi olarak düşünülmüştür.

Sığırlarda BPIV3’ün antijenik olarak tanısı üzerine yapılan çalışmalar 1960’lı yıllarda başlamış olup genel anlamda deneysel çalışmalardır. Van der Maaten (1969a), etkenin farklı hücre kültürlerinde ve deney hayvanlarında üreme kabiliyeti üzerine bir araştırma yapmıştır. Direkt immunfloresan antikor boyama yönteminin kullanıldığı bu araştırmada virusun MDBK (Mardin Darby Bovine Kidney) ve BK (Bovine Kidney) hücre kültürü hatlarında iyi bir şekilde ürettiği fakat EBTr (Embryo Bovine Trechea) hücre kültürü hattında üremediğini ortaya koymuştur. Bununla birlikte etkenin deney hayvanlarındaki etkisinin tespiti amacıyla BPIV3 ile intraanazal yolla enfekte edilen hamsterlerin turbinat, treka ve akciğer hücrelerinde virusa rastlanmıştır.

Bu araştırmada ayrıca alınan nazal ve konjunktival swap örneklerine DIF testi uygulanarak etkenin hızlı tanısına çalışılmıştır.

Van der Maaten (1969b), etkenin sığırlardaki enfeksiyon yeteneği ve penetre olduğu dokular üzerine yapmış olduğu diğer bir deneysel çalışmada immunfloresan tekniği kullanmıştır. Kolostrum almamış 1 yaşlı buzağılara intranazal ve intratrakeal yolla etken inokule etmiş, on gün boyunca aldığı nazal swap örneklerinde beşinci

günden sonra virus teşhisi gerçekleştirememiştir. Bunun yanı sıra inokulasyonun onuncu gününden sonra nekropsiye alınan hayvanların dokularında virus teşhis edilmeye çalışılmış, dorsal ve ventral turbinatelerde etkene rastlanırken, tonsillerde, trakede, akciğerde, bronşial ve retrofarengeal lenf yumrularında tespit edilememiştir.

Alkan ve ark. (2000), solunum sistemi klinik bulguları gösteren 95 sığırdan aldıkları nazal swap örneklerinde DIF tekniğini kullanarak BHV-1, PI-3 virus, BRSV ve BVDV tespiti üzerine yaptıkları çalışmada %10,5 (10/95) oranında PI-3 virus pozitifliği tespit etmişlerdir.

Gençay ve Akça (2004), koyunlardan aldıkları nazal swap, akciğer, mediastinal lenf yumrusu ve lökosit örneklerinde DIF tekniği ile BPIV3'ün antijenik teşhisi üzerine yaptıkları araştırmada nazal swap numunelerinde %17,4 (23/132), akciğer doku örneklerinde %11,4 (16/140) oranında pozitiflik elde ederken, lökosit ve mediastinal lenf yumrusu örneklerinde etken teşhisi gerçekleştirememişlerdir.

Çeribaşı ve ark. (2012), keçilerden topladıkları akciğer dokularında direkt immunfloresan (DIF) ve direkt immunoperoksidaz (DIP) teknikleriyle BPIV3 teşhisi üzerine bir araştırma yapmışlardır. Akciğerlerin apikal ve kardiyak loblarında kırmızı-mor ve gri renk değişimleriyle karakterize konsolide alanlarından alınan 106 doku örneğinde uyguladıkları DIF testiyle %41,5 (44/106) , DIP testiyle ise %28 (30/106) oranında pozitiflik tespit etmişlerdir.

Yine Çeribaşı ve ark. (2014) yaptıkları diğer bir çalışmada kesimhanelerden topladıkları apikal ve kardiyak loblarında makroskopik pnömoni bulguları gösteren 247 akciğer numunesini IP ve DFAT yöntemlerini kullanarak BRSV, BAV3, BHV-1 ve BPIV3 antijenlerinin direkt tespiti üzerine araştırma yapmışlardır. Çalışma sonucunda DIF testi ile %10,5 (26/247); IP tekniği ile ise %6,8 (16/247) oranında BPIV3 pozitifliği belirlemişlerdir.

Delgado ve ark. (2005), sağlıklı ve solunum sistemi enfeksiyonu olan sığırlardan aldıkları nazal swap örneklerinde DIF ve DIP teknikleri ile BPIV3 varlığını

teşhis etmeye çalışmışlardır. Sonuçta DIF yöntemi ile %37,3 (151/405); DIP yöntemi ile ise %39,1 (212/542) pozitiflik belirlemişlerdir.

Maidana ve ark., (2012) Arjantin’de 12 mandadan aldıkları nazal ve vaginal swap örneklerinde BPIV3’ün moleküler ve antijenik teşhisi üzerine araştırma yapmışlardır. Yapılan çalışmada örneklerden elde edilen inokulumlar MDBK hücre kültürüne ekilip zenginleştirildikten sonra RT-PCR metodu ile moleküler, DIF testi ile antijenik olarak incelenmiştir. Bir nazal iki vaginal swaptan elde edilen izolatlarda BPIV3 etkenine ait nükleik asit ve antijenik oluşumlar tespit edilmiştir.

Saeed ve ark. (2016), pnömoni tablosu gösteren keçi, koyun ve sığırlardan aldıkları akciğer dokusu örneklerinde DIF ve RT-PCR yöntemi kullanarak BPIV3’ün antijenik ve moleküler tanısı üzerine yaptıkları çalışmada, keçilerde %47,8 (11/23), koyunlarda %9,8 (31/316) ve sığırlarda %12,8 (29/226) oranında pozitiflik tespit etmişlerdir.

Sığırlarda solunum sistemi hastalıkları kompleksinin histopatolojik bulguları üzerine pek çok çalışma mevcuttur (Çeribaşı ve ark., 2012; Çeribaşı ve ark., 2014; Jarikre ve Emikpe, 2017). Yaptığımız çalışmada moleküler ve antijenik olarak BPIV3 etkeni teşhis edilen bir hayvanın akciğer dokusu üzerinde gerçekleştirdiğimiz histopatolojik muayenede bu araştırmaları destekler nitelikte bulgular elde edildi. Akciğerlerin özellikle kranio ventral alanlarından alınan doku numunelerinde bronkopnömoniyi işaret eden patolojik ve histopatolojik lezyonlar görüldü. Apikal ve kardiyak loblarda konsolidasyon, kırmızı, mor ve gri odaklar, lobuler atelaktazi gözlemlendi.

Hemotoksilen eozin (HE) boyama yöntemi yardımıyla ile yapılan histopatolojik muayenede ise enfeksiyonun yayılmasını engellemeye yönelik olan bağ doku artışı ve damarlaşma, bronşiollerde epitel hücre proliferasyonları, intersitisyel bölgede yangısal hücre infiltrasyonları ve septal doku artışı gibi solunum yolu enfeksiyonlarında ortaya çıkan bulgular ile karşılaşıldı.

Benzer şekilde Sudan’da, İntisar ve ark. (2009) makroskobik pnömoni bulguları gösteren akciğer doku örneklerinde DIF, ELISA ve PCR yöntemlerini kullanarak BPIV3’ün antijenik ve moleküler tespiti üzerine yaptıkları çalışmada, DIF ve ELISA ile altı örnekte pozitiflik tespit ederlerken PCR tekniğiyle dört örnekten etkene ait viral nükleik asit izolasyonu sağlamışlardır. Test sonuçları arasındaki bu farklılığa virusun fragilitésinin, viral nükleik asit ekstraksiyonu ve PCR tekniği aşamalarındaki uygulamalarda meydana gelebilecek hataların ve ekstrakte edilmiş nükleik asitin uygun koşullarında saklanmamasının neden olabileceği düşünülmüştür.

Yaptığımız bu tez çalışmasında solunum sistemi enfeksiyonu bulgularına sahip hayvanlara ait nazal ve konjunktival swap örneklerinde BPIV3’ün antijenik olarak tespit edilmesi amaçlanmıştır. Yüz doksan adet hayvandan elde edilen örnekler DIF yöntemi uygulanmış ve nazal swap örneklerinin 6’sında (%3,15) BPIV3’e ait antijenik yapılar tespit edilmiştir. DIF testi pozitif örneklerin hepsinde solunum sistemi enfeksiyonu semptomları gözlenmiştir. Konjunktival swap örneklerinde ise herhangi bir pozitiflik tespit edilememiştir. Bununla birlikte nükleik asit varlığı tespit edilen iki örnekte de DIF yöntemi ile etken identifikasyonu sağlanmıştır. Bu araştırmada, yapılan diğer çalışmalardan (Akça ve ark., 2004; Çeribaşı ve ark., 2012; Maidana ve ark., 2012; Çeribaşı ve ark., 2014; Saaed ve ark., 2016) daha düşük pozitiflik oranı tespit edilmiştir. Bu sonucun bölgedeki bilinçli yetiştiricilik, gelişmiş veteriner hizmetleri ve yaygın olarak yapılan aşılama çalışmaları sebebiyle enfeksiyonlarla daha iyi mücadele edilmesinden kaynaklandığı düşünülmüştür.

Pozitif olarak değerlendirilen örneklerin alındığı hayvanlarda ateş, öksürük, unilateral veya bilateral mukopurulent nazal akıntı, abdominal solunum gibi solunum sistemi enfeksiyonu semptomlarına rastlanılmıştır. Bu hayvanların yaşlarının 3 ay ve üzerinde olması nedeniyle eğer annelerinden maternal antikör aldılarsa bunların titrelerinin BPIV3 enfeksiyonuna karşı koruyucu bir düzeyde olmadığı kanısına varılmıştır. Bunun yanı sıra örneklerin alındığı hayvanların aşılanmamış olmaları nedeniyle etkene karşı oluşan immün yanıtın yeterli titreye ulaşmadan enfeksiyonun klinik semptomlarının oluştuğu sonucuna varılmıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu araştırmada klinik olarak solunum sistemi enfeksiyonu semptomları gösteren aşısız sığırlarda BPIV3'ün RT-PCR tekniği ile moleküler, DIF yöntemi ile de virolojik teşhisi üzerine çalışıldı. Nazal swap örneklerinin moleküler ve virolojik teşhiste kullanılmasının uygun olduğu görüldü. Öte yandan etkenin konjuktival swap ve lökosit örneklerinde teşhisi yapılamadı. Bu nedenle bu örneklerin BPIV3'ün tanısı için uygun materyaller olmadığı sonucuna ulaşıldı. Bununla birlikte çalışılan örneklerden iki adet saha suşu tespit edildi. Bu saha suşlarından birine uygulanan sekans ve filogenetik ağaç çalışmaları sonucu bölgede bulunan suşun Türkiye ve Dünya'da enfeksiyona yol açan diğer suşlar ile genetik yakınlığı tespit edildi.

Solunum sistemi enfeksiyona neden olan BPIV3'ün virolojik olarak teşhisinde hastalığın akut döneminde, doğru şekilde alınan ve soğuk zincir altında uygun transport sıvısı kullanılarak çabuk bir şekilde tanı laboratuvarına getirilen nazal swap örneklerinin smear şeklinde kullanılabileceği kanısına varıldı. BPIV3 enfeksiyonunun nazal swap kullanılarak moleküler ve virolojik teşhis çalışmalarında özellikle solunum sistemi enfeksiyonu semptomları gösteren sığırların dikkate alınmasını ve örneklemelerin hastalığın akut döneminde yapılmasını önermekteyiz.

BPIV3 enfeksiyonunun laboratuvar tanısında bizim araştırmamızda DIF testi ile RT-PCR'ye göre daha fazla pozitiflik belirlenmiştir. Bu açıdan bu iki yöntemin BPIV3'ün tanısında spesifite ve sensitivitelerinin belirlenmesi ve kıyaslama yapılabilmesi için fazla sayıda numune ve daha fazla çalışma yapılması gerektiği düşüncesindeyiz.

BPIV3 ile enfekte sığırlar solunum sekretleriyle etkeni kolayca saçabildiklerinden öncelikle hayvan bakım, besleme, karantina, hijyen, barınma koşulları gibi hususlara dikkat edilmesinin, devlet eliyle uygulanan rutin koruma ve kontrol programlarına BPIV3 aşısının eklenmesinin ve BPIV3'ün yaban hayvanlarındaki varlığı ve epidemiyolojisine dayalı araştırmaların yapılmasının faydalı olabileceği kanısındayız.

KAYNAKLAR

- Abinanti FR, Huebner RJ (1959).** The serological relationships of strains of parainfluenza 3 virus isolated from humans and cattle with respiratory disease. *Virology*, **8**, 391-394.
- Akça Y, Burgu İ, Gür S, Dağalp SB (2004).** A study on investigation of occurrence of some virus infection in Buffaloes in Turkey. *Revue Med. Vet.*, **156**, 268-271.
- Albayrak H, Yazıcı Z, Ozan E, Tamer C, Abdelwahed A, Wehner S, Ulrich K, Weidmann M (2019).** Characterisation of the first bovine parainfluenza virus 3 isolate detected in cattle in Turkey. *Vet. Sci.*, **6**, 56.
- Alkan F, Bilge-Dağalp S, Yeşilbaş K, Oğuzoğlu TÇ, Akça Y, Burgu I (2000).** Virological and serological studies on the role of PI-3 virus, BRSV, BVDV, BHV-1 on respiratory infectious of cattle. I. The detection of etiological agents by direct immunofluorescence technique. *Dtsch. Tierarztl. Wschr.*, **107**, 193-195.
- Allan EM, Pirie HM, Selman IE, Snodgrass DR (1978).** Some characteristics of a natural infection by parainfluenza 3 virus in a group of calves. *Res. Vet. Sci.*, **24**, 339-346.
- Aly NM, Shebab GG, Abd El Rahim İHA (2003).** Bovine Viral Diarrhea, Bovine Herpes Virus and Parainfluenza Virus-3 infection in three cattle herds in egypt in 2000. *Revue Scient. Tecniq. (International Office of Epizootics)*, **22**, 879-892.
- Arslan HH, Küllük E (2017).** Sığırlarda parainfluenza-3 virus enfeksiyonu. *Türkiye Klinikleri J. Vet. Sci. Intern Med-Special Topics*, **3**, 173-177.
- Ataseven VS, Başaran Z, Yılmaz V, Dağalp SB (2010).** Van bölgesi keçilerinde parainfluenza virus-3 (PIV-3) ve bovine herpesvirus-1 (BHV-1) enfeksiyonlarının seroprevalansı. *YYU Vet. Fak. Derg.*, **21**, 7-9.
- Avcı O, Yavru S, Şevik M (2014).** Antibody prevalence against respiratory viruses in naturally infected cattle in Central Anatolia. *Eurasian J. Vet. Sci.*, **30**, 80-84.
- Bailley JE, McAuliffe JM, Skiadopoulos MH, Collins PL, Murphy BR (2000).** Sequence determination and molecular analysis of two strains of bovine parainfluenza virus type 3 that are attenuated for primates. *Virus Genes*, **20**, 173-182.
- Bamford AI, Adair BM, Foster JC (1995).** Primary cytotoxic response of bovine peripheral blood leukocytes to parainfluenza type 3 virus infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **45**, 85-95.
- Ben-Ishai Z, Naftali V, Avram A, Yatziv S (1980).** Human infection by a bovine strain of parainfluenza virus type 3. *J. Med. Virol.*, **6**, 165-168.

Bose S, Banerjee AK (2004). Beta-catenin associates with human parainfluenza virus type 3 ribonucleoprotein complex and activates transcription of viral genome RNA in vitro. *Gene Expression*, **11**, 241-249.

Bryson DG, Adair BM, McNulty MS, McAliskey M, Bradford HEL, Allan GM, Evans RT, Forster F (1999). Studies on the efficacy of intranasal vaccination for the prevention of experimentally induced parainfluenza type 3 virus pneumonia in calves. *Vet. Rec.*, **145**, 33-39.

Bryson DG, McNulty MS, Ball HJ, Neill SD, Connor TJ, Cush PF (1979). The experimental production of pneumonia in calves by intranasal inoculation of parainfluenza type-3 virus. *Vet. Rec.*, **105**, 566-573.

Bryson DG, McNulty MS, Evans RT and Allan G (1989). Studies of the effect of recombinant human alpha interferon on experimental parainfluenza type 3 virus infections of the respiratory tract of calves. *Vet. Rec.*, **125**, 615-618.

Bryson DG, McNulty MS, McCracken RM, Cush PF (1983). Ultrastructural features of experimental parainfluenza type 3 virus pneumonia in calves. *J. Comp. Pathol.*, **93**, 397-414.

Callaby R, Toye P, Jennings A, Thumbi SM, Coetzer JAW, Conradie Van Wyk, Hanotte O, Mbole-Kariuki MN, Bronsvoort BM, Kruuk LEB, Woolhouse MEJ, Kiara H (2016). Seroprevalence of respiratory viral pathogens of indigenous calves in Western Kenya. *Res. Vet. Sci.*, **108**, 120-124.

Campos M, Rossi CR, Lawman MJ (1982). Natural cell-mediated cytotoxicity of bovine mononuclear cells against virus-infected cells. *Infect Immun.*, **36**, 1054-1059.

Chamber R, Takimoto T (2011). *Parainfluenza Viruses*. In: Takimoto T. (ed), Encyclopedia of Life Science (ELS). Chichester, United Kingdom: John Wiley & Sons Ltd, p: 1-8.

Chattopadhyay S, Esper F, Benerjee AK (2011). *Parainfluenza Viruses*. In: Saman S.K. (ed), The Biology of Paramyxoviruses. Norfolk, United Kingdom: Caister Academic Press, p: 175-197.

Coswell JL, Williams KJ (2007). *Bovine parainfluenza virus 3*. In: Grant Maxie, M. (ed), Jubb Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals. 2nd edition. Pennsylvania, Philadelphia: Saunders Elsevier, p: 598-599.

Çeribaşı AO, Özkaraca M, Çeribaşı S, Özer H (2014). Histopathologic, immunoperoxidase and immunofluorescent examinations on natural cattle pneumonia originated from parainfluenza type 3, respiratory syncytial virus, adenovirus type 3 and herpesvirus type 1. *Revue Méd. Vét.*, **165**, 201-212.

Çeribaşı S, Özkaraca M, Özer H, Çeribaşı AO (2012). Prevalence of parainfluenza type 3 virus antigens in pneumonic caprine lungs by direct immunofluorescence and immunoperoxidase techniques. *Small Rum. Res.*, **108**, 127-132.

Çomaklı S, Özdemir S (2019). Comparative evaluation of the immune responses in cattle mammary tissues naturally infected with bovine parainfluenza virus type 3 and bovine alphaherpesvirus-1. *Pathogens*, **8**, 26.

Dawson PS (1966). Persistence of maternal antibodies to parainfluenza 3 virus. *J. Comp. Pathol.*, **76**, 373–378.

Delgado ID, Valle MB, Barrero NR, Miranda LS, Elvira SM, Carrasco AC (2005). Use of direct immunofluorescence and immunoperoxidase diagnostic kits for bovine parainfluenza 3 and bovine herpes virus 1 in cuba. *Vet. Mex.*, **36**, 295-301.

Eisa M, Karrar AE, Abdel Rahim AH (1979). The occurrence of antibodies to parainfluenza3 virus in sera of some domestic animals of the Sudan. *Br. Vet. J.*, **135**, 192–197.

Elenkumaran S (2013). *Bovine Parainfluenza Virus 3*. Munir M. (ed), Mononegaviruses of Veterinary Importance: Pathobiology and Molecular Diagnosis. Crayton, South Carolina: CPI Group, Crayton, p: 117-140.

Ellis JA (2010). Bovine Parainfluenza-3 Virus. *Vet. Clin. Food Anim. Pract.*, **26**, 575–593.

Emerson SU (1982). Reconstitution studies detect a single polymerase entry site on the vesicular stomatitis virus genome. *Cell*, **31**, 635–642.

Erhan M, Martin WB (1969). A preliminary report on parainfluenza-3 virus infection of sheep in Turkey. *Pendik Vet. Kont ve Araş Ens Derg.*, **2**, 90-101.

Erhan M, Onar B, Csontos L, Hopkins IG (1971). Koyun, sığır ve atların bazı virüsü ve Bedzonya hastalıkları üzerinde serotojik çalışmalar. *Pendik Vet. Kont. Araş. Enst. Derg.*, **4**, 51-58.

Ezzi A, Hatami A, Bakhshesh M, Shoukri MR, Gharaghozloyan M (2013). Serological study of bovine herpesvirus type 1 and parainfluenza type 3 in cow farms of Qazvin province based on different ages and seasons. *Arch. Razi. İnst.*, **68**, 53-57.

Fischer-Tenhagen C, Hamblin C, Quandt S, Frolich K (2000). Serosurvey for selected infectious disease agents in free-ranging black and white rhinoceros in Africa. *J. Wildl. Dis.*, **36**, 316–323.

Frank GH, Marshall RG (1971). Relationship of serum and nasal secretion-neutralizing antibodies in protection of calves against parainfluenza-3 virus. *Am. J. Vet. Res.*, **32**, 1707–1713.

Frank GH, Marshall RG (1973). Parainfluenza-3 virus infection of cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **163**, 858–60.

Gaeta NC, Ribeiro BLM, Alemán MAR, Thomazelli LM, Durigon ED, EHC Nogueira, Stefano E, Okuda LH, Pituco EM, Gregory L (2017). Evaluation of bovine Parainfluenza type-3 virus and Influenza virus D participation in bovine

respiratory disease of calves from Brazilian family farming. *Medicine Veterinária*, **11**, 227-232.

Gaffuri A, Giacometti M, Tranquillo VM, Magnino S, Cordioli P, Lanfranchi P (2006). Serosurvey of roe deer, chamois and domestic sheep in the central Italian Alps. *J. Wildl. Dis.*, **42**, 685-690.

Gale C (1968). Bovine parainfluenza-3 immunization procedures. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **152**, 871-880.

Garten W, Berk W, Nagai Y, Rott R, Klenk HD (1980). Mutational changes of the protease susceptibility of glycoprotein F of Newcastle disease virus: effects on pathogenicity. *J. Gen. Virol.*, **50**, 135-147.

Gates GA, Cesario TC, Ebert JW, Kriel RL, Wulff HT, Poland JD, Gutekunst DE, Chin TD (1970). Neutralizing antibody in experimentally induced respiratory infection in calves. *Am. J. Vet. Res.*, **31**, 217-224.

GenBank (2020). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> (Erişim Tarihi: 20.08.2020).

Gençay A, Akça Y (2004). Direkt immunofloresan ve mikronötralizasyon testleri ile koyunlarda parainfluenza-3 (PI-3) virus enfeksiyonunun araştırılması. *Erciyes Üniv. Vet. Fak. Derg.*, **1**, 91-96.

Ghram A, Minocha HC (1990). Neutralizing antibodies to bovine herpesvirus-1 (BHV-1) and bovine parainfluenza-3 (PI-3) viruses in cattle in Tunisia. *Archs. Inst. Pasteur Tunis.*, **67**, 25-31.

Goris K, Uhlenbeck S, Schwegmann-Wessels C, Köhl W, Niedprf F, Stern M, Hewicker-Trautwein M, Bals R, Taylor G, Braun A, Bicker G, Kietzmann M, Herrler G (2009). Differential sensitivity of differentiated epithelial cells to respiratory viruses reveals different viral strategies of host infection. *J. Virol.*, **83**, 1962-1968.

Goswami P, Banga HS, Mahajan V, Singh ND, Deshmukh S, Brar RS (2017). Detection of multiple antibodies and risk factor association of common respiratory viruses in the state of Punjab, India. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.*, **6**, 567-577.

Grdzlishvili VZ, Smallwood S, Tower D, Hall RL, Hunt DM, Moyer SA (2005). A single amino acid change in the L-polymerase protein of vesicular stomatitis virus completely abolishes viral mRNA cap methylation. *J. Virol.*, **79**, 7327-7337.

Greenberg DP, Walker RE, Lee MS, Reisinger KS, Ward JI, Yogev R, Blatter MM, Yeh SH, Karron RA, Sangli C, Eubank L, Coelingh KL, Cordova JM, August MJ, Mehta HB, Chen W, Mendelman PM (2005). A bovine parainfluenza virus type 3 vaccine is safe and immunogenic in early infancy. *J. Infect. Dis.*, **191**, 1116-1122.

Griffin D, Chengappa MM, Kuszak J, McVey DS (2010). Bacterial pathogens of the bovine respiratory disease complex. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, **26**, 381-394.

Gulliksen SM, Jor E, Lie KI, Loken T, Akerstedt J, Osteras O (2009). Respiratory infections in Norwegian dairy calves. *J. Dairy Sci.*, **92**, 5139-5146.

Gür S (2018). An investigation of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) and bovine parainfluenza type 3 virus (BPI3V) infections in small-scale cattle herds in Afyonkarahisar province. *Etlik Vet. Mikrobiyol. Derg.*, **29**, 51-56.

Gür S, Erol N, Yapıcı O (2009). Afyon, Konya ve Eskişehir illerinde keçilerde pestivirus ve parainfluenza virus tip 3 enfeksiyonlarının serolojik olarak araştırılması. *Kocatepe Vet. J.*, **2**, 23-27.

Hacıoğlu S (2011). Sığırların solunum yollarında bovine parainfluenza 3 (BPIV-3) ve infectious bovine rhinotracheitis (IBR)' in moleküler ve serolojik tanısı. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara/Türkiye.

Hai-Yong W, Qin T, Wei W, Hua W (2014). Serological survey of antibodies against bovine parainfluenza virus type 3 in 12 provinces. *Chin. J. Prev. Vet. Med.*, **36**, 154-156.

Harwood PF, Gravel JL, Mahony TJ (2008). Identification of two distinct bovine parainfluenza virus type 3 genotypes. *J. Gen. Virol.*, **89**, 1643-1648.

Headley SA, Okano W, Balbo LC, Marcasso RA, Oliveira TE, Alfieri AF, Filho LCN, Michelazzo MZ, Rodrigues SC, Baptista LA, Saut SJP, Alfieri AA (2018). Molecular survey of infectious agents associated with bovine respiratory disease in a beef cattle feedlot in southern Brazil. *JVDI.*, **30**, 249-251..

Hoerlein AB, Mansfield ME, Abinati FR, Huebner RJ (1959). Studies of shipping fever of cattle, I. Para-influenza 3 virus antibodies in feeder calves. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **135**, 153-160.

Ibu OJ, Salihu EA, Abechi MA, Aba-Adulugba EP, Okewu M (2005). Activity of bovine parainfluenza type 3 virus in cattle in North Eastern Nigeria- a short commutation. *Sokoto J. Vet. Sci.*, **6**, 1-4.

Intisar KS, Ali YH, Khalafalla AI, Rahman MEA, Amin AS (2009). Respiratory infection of camels associated with parainfluenza virus 3 in Sudan. *J. Virol. Methods*, **163**, 82-86.

Jarikre TA, Emikpe BO (2017). First report of immunohistochemical detection of Peste des petit ruminants, parainfluenza 3 and respiratory syncytial viral antigens in lungs of Nigerian goats. *J. Immun. Immunochem.*, **38**, 555-568.

Kale M, Öztürk D, Hasircioğlu S, Pehlivanoğlu F, Türütoğlu H (2013). Some viral and bacterial respiratory track infectious of dairy cattle during the summer season. *Acta. Vet. (Beograd)*, **63**, 227-236.

Kamdi B, Singh R, Singh V, Singh S, Kumar P, Singh KP (2020). Immunofluorescence and molecular diagnosis of bovine respiratory syncytial virus and bovine parainfluenza virus in the naturally infected young cattle and buffaloes from India. *Microb. Pathog.*, **145**, 104165.

Kapil S, Basaraba RJ (1997). Infectious bovis rhinotracheitis, parainfluenza-3 and respiratory coronavirus. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Prat.*, **13**, 455-469.

Karron RA, Collins PL (2007). *Parainfluenza viruses*. In: Knipe DM, Howley PM (Eds), *Fields virology*. 5th Edition, Philadelphia, Pennsylvania: Lippincott, Williams & Wilkins, p. 1497–1526.

Karron RA, Wright PF, Hall SL, Makhene M, Thompson J, Burns BA, Tollefson S, Steinhoff MC, Wilson MH, Harris DO, Clements ML, Murphy BR (1995). A live attenuated bovine parainfluenza virus type 3 vaccine is safe, infectious, immunogenic, and phenotypically stable in infants and children. *J. Infect. Dis.*, **171**, 1107-1114.

Kestaitiene K, Salomskas A, Jace Vicius E, Petkevicius S, Lelesius R, Mockeliunas R, Liutkeviciene V (2009). Prevalence of bovine parainfluenza 3 and respiratory syncytial virus in Lithuanian cattle. *Vet. I. Zootec.*, **47**, 69.

Kirchhoff J, Uhlenbruck S, Goris K, Keil GM, Herrler G (2014). Three viruses of the bovine respiratory disease complex apply different strategies to initiate infection. *Vet. Res.*, **45**, 20.

Kishimoto M, Tsuchiaka S, Rahpaya SS, Hasebe A, Otsu K, Sugimura S, Kobayashi S, Komatsu N, Nagai M, Omatsu T, Naoi Y, Sano K, Okazaki-Terashima S, Oba M, Katayama Y, Sato R, Asai T, Mizutani T (2017). Development of a one-run real-time PCR detection system for pathogens associated with bovine respiratory disease complex. *J. Vet. Med. Sci.*, **79**, 517–523.

Kolakofsky D, Roux L, Garcin D, Ruigrok RW (2005). Paramyxovirus mRNA editing, the ‘rule of six’ and error catastrophe: a hypothesis. *J. Gen. Virol.*, **86**, 1869–1877.

Komatsu T, Takeuchi K, Gotoh B (2007). Bovine parainfluenza virus type 3 accessory proteins that suppress beta interferon production. *Microbes and Infection*, **9**, 954–962.

Konishi M, Ohkura T, Shimizu M, Akiyama M, Kameyama K, Takeuchi K (2014). Complete genome sequence of the first isolate of genotype C bovine parainfluenzavirus type 3 in Japan. *Genome Announc.*, 2:e01215-14.

Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.*, **35**, 1547-1549.

Laegreid WW, Liggitt HD, Silflow RM, Evermann JR, Taylor SM, Leid RW (1989). Reversal of virus-induced alveolar macrophage bactericidal dysfunction by cyclooxygenase inhibition in vitro. *J. Leukoc. Biol.*, **45**, 293-300.

Lamb RA, Parks GD (2007). *Paramyxoviridae*. In: Knipe DM., Howley PM. (Eds), Fields Virology. Philadelphia, Pennsylvania: Lippincott Williams & Wilkins, p: 1449–1496.

Lamb RA, Paterson RG, Jardetzky TS (2006). Paramyxovirus membrane fusion: lessons from the F and HN atomic structures. *Viol.*, **344**, 30–37.

Leal E, Liu C, Zhao Z, Deng Y, Villanova F, Liang L, Li J, Cui S (2019). Isolation of a divergent strain of bovine parainfluenza virus type 3 (BPIV3) infecting cattle in China. *Viruses*, **11**, 489.

Lyon M, Leroux C, Greenland T, Chastang J, Patet J, Mornex JF (1997). Presence of a unique parainfluenza virus 3 strain identified by RT-PCR in visna-maedi virus infected sheep. *Vet. Microbiol.*, **57**, 95–104.

MacLachlan NJ, Dubovi EJ (2011). *Paramyxoviridae: Bovine parainfluenza virus 3*. In: MacLachlan NJ., Dubovi EJ (Eds), Fenner's Veterinary Virology, 4th edition, London, England: Academic Press, p: 308–309.

MacLachlan NJ, Dubovi EJ, Barthold SW, Swayne DE, Winton JR (2017). *Paramyxoviridae and Pneumoviridae*. In: MacLachlan NJ, Dubovi EJ (Eds), Fenner's Veterinary Virology, 5th edition, San Diego, USA: Elsevier Inc., p:327-356.

Mahmoud MA, Allam AM (2013). Seroprevalence of bovine viral diarrhoea virus (BVDV), bovine herpes virus type 1 (BHV-1), parainfluenza type 3 virus (PI-3V) and bovine respiratory syncytial virus (BRSV) among non vaccinated Cattle. *Glob. Vet.*, **10**, 348-353.

Maidana SS, Lomonaco PM, Combessies G, Craig MI, Diodati J, Rodriguez D, Parreno V, Zabal O, Konrad JL, Crudelli G, Mauroy A, Thiry E, Romera SA (2012). Isolation and characterization of bovine parainfluenza virus type 3 from water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Argentina. *BMC Vet. Res.*, **8**, 83.

Marshall RG, Frank GH (1971). Neutralising antibody in serum and nasal secretions of calves exposed to parainfluenza-3 virus. *Am. J. Vet. Res.*, **32**, 1669–1706.

Marshall RG, Frank GH (1975). Clinical and immunological responses of calves with colostrally acquired maternal antibody against parainfluenza-3 virus to homologous viral challenge. *Am. J. Vet. Res.*, **36**, 1085–1089.

Melchjorsen J, Jensen SB, Malmgaard L, Rasmussen SB, Weber F, Bowie AG, Matikainen S, Paludan SR (2005). Activation of innate defense against a paramyxovirus is mediated by RIG-I and TLR7 and TLR8 in a cell-type-specific manner. *J. Virol.*, **79**, 944-951.

Minnich LL, Ray CG (1987). Early testing of cell cultures for detection of hemadsorbing viruses. *J. Clin. Microbiol.*, **25**, 421–422.

Moore SJ, O’ Dea MA, Perkins N, O’ Hara AJ (2015). Estimation of nasal shedding and seroprevalence of organisms known to be associated with bovine respiratory disease in Australian live export cattle. *JVDI*, **27**, 6-17.

Morein B (1970). Immunity against parainfluenza-3 virus in cattle; immunoglobulins in serum and nasal secretions. *Int. Arch. Allergy.*, **39**, 403–414.

Moscana A (2005). Entry of parainfluenza virus into cells as a target for interrupting childhood respiratory disease. *J. Clin. Invest.*, **115**, 1147-1150.

Murphy FA, Gibbs EP, Horzinek MC, Studdert MJ (1999). *Veterinary Virology*. 3rd Edition, California: Academic press, p: 411-429.

Najjar FE, Schmitt AP, Dutch RE (2014). Paramyxovirus glycoprotein incorporation, assembly and budding: A three way dance for infectious particle production. *Viruses*, **6**, 3019-3054.

Neill JD, Ridpath JF, Valayudhan BT (2015). Identification and genome characterization of genotype B and genotype C bovine parainfluenza type 3 viruses isolated in the United States. *BMC Vet. Res.* **11**, 112.

Newcomer BW, Neil JD, Galik PK, Riddell KP, Zhang Y, Passler T, Velayudhan BT, Walz PH (2017). Serologic survey for antibodies against three genotypes of bovine parainfluenza 3 virus in unvaccinated ungulates in Alabama. *Am. J. Vet. Res.*, **78**, 239-243.

Noori YM, İntisar KS, Nada EM, Ali YH (2014). Detection and isolation of bovine parainfluenza virus type 3 (PIV-3) in cattle in North Kordofan State, Sudan. *JAVS.*, **15**, 70-78.

Noton SL, Fearn R (2015). Initiation and regulation of paramyxovirus transcription and replication. *Virol.*, **480**, 545-554.

O’Neill R, Mooney J, Connaghan E, Furphy C, Graham DA (2015). Patterns of detection of respiratory viruses in nasal swabs from calves in Ireland: a retrospective study. *Vet. Rec.*, **175**, 351.

Oem JK, Lee EY, Lee, KK, Kim SH, Lee MH, Hyun BH (2013). Molecular characterization of a Korean bovine parainfluenza virus type 3 isolate. *Vet. Microbiol.*, **162**, 224-227.

Ogino T, Banerjee AK (2007). Unconventional mechanism of mRNA capping by the RNA-dependent RNA polymerase of vesicular stomatitis virus. *Mol. Cell*, **25**, 85-97.

Ogino T, Iwama M, Ohsawa Y, Mizumoto K (2003). Interaction of cellular tubulin with Sendai virus M protein regulates transcription of viral genome. *Biochem Biophys. Res. Commun.*, **311**, 283-293.

Ogino T, Yamadera T, Nonaka T, Imajoh-Ohmi S, Mizumoto K (2001). Enolase, a cellular glycolytic enzyme, is required for efficient transcription of Sendai virus genome. *Biochem Biophys. Res. Commun.*, **285**, 447-455.

Ohkura T, Kokuho T, Konishi M, Kameyama KI, Takeuchi K (2013). Complete genome sequences of bovine parainfluenza virus type 3 strain BN-1 and vaccine strain BN-CE. *Genome announc.*, **1**, e00247-12.

Ohkura T, Minakuchi M, Sagai M, Kokuho T, Konishi M, Kameyama KI, Takeuchi K (2015). Infection of the upper respiratory tract of hamsters by the bovine parainfluenza virus type 3 BN-1 strain expressing enhanced green fluorescent protein. *Virol.*, **476**, 134-140.

Ohsawa K, Yamada A, Takeuchi K, Watanabe Y, Miyata H, Sato H (1998). Genetic characterization of parainfluenza virus 3 derived from guinea pigs. *J. Vet. Med. Sci.*, **60**, 919-922.

Omar AR, Jennings AR, Betts AO (1966). The experimental disease produced in calves by the J121 strain of parainfluenza virus type 3. *Res. Vet. Sci.*, **7**, 379-388.

Özdarendeli A, Kandil M (2001). Malatya' da sığırlarda parainfluenza virus Tip-3 enfeksiyonu üzerinde serolojik araştırma. *Türk. J. Vet. Anim. Sci.*, **25**, 223-226.

Özgünlük İ, Çabalar M, Kozat S (2012). Van yöresindeki koyunlarda PI-3 virus enfeksiyonunun serolojik araştırılması. *Harran Univ. Vet. Fak. Derg.*, **1**, 39-73.

Panigrahi P, Mohanty SB (1989). Defective transport of hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein of bovine parainfluenza-3 virus in interferon treated cell. *Arch. Virol.*, **109**, 125-133.

Pardon B, De Bleecker K, Dewulf J, Callens J, Boyen F, Catry B, Deprez P (2011). Prevalence of respiratory pathogens in diseased, non-vaccinated, routinely medicated veal calves. *Vet. Rec.*, **169**, 278.

Pennathur S, Haller AA, MacPhail M, Rizzi T, Kaderi S, Fernandes F, Bicha L, Schickli JH, Tang RS, Chen W, Nguyen N, Mathie S, Mehta H, Coelingh KL (2003). Evaluation of attenuation, immunogenicity and efficacy of a bovine parainfluenza virus type 3 (PIV-3) vaccine and a recombinant chimeric bovine/human PIV-3 vaccine vector in rhesus monkeys. *J. Gen. Virol.*, **84**, 3253-3261.

Philippe-Reversat C, Homer D, Hamers C, Brunet S, Huňady M (2017). Duration of immunity of a four-valent vaccine against bovine respiratory diseases. *Acta Vet. BRNO*, **86**, 325-332.

Pirtle EC, Beran GW (1991). Virus survival in the environment. *Rev. Sci. Tech.*, **10**, 733–748.

Precious B, Young DF, Bermingham A, Fearn R, Ryan M, Randall RE (1995). Inducible expression of the P, V, and NP genes of the paramyxovirus simian virus 5 in cell lines and an examination of NP-P and NP-V interactions. *J. Virol.*, **69**, 8001-8010.

Probert M, Stott EJ, Thomas LH, Collins AP, Jebbett J (1978). An inactivated parainfluenza virus type 3 vaccine; the influence of vaccination regime on the response of calves and their subsequent resistance to challenge. *Res. Vet. Sci.*, **24**, 222-227.

Qiao D, BH Janke, Elankumaran S (2009). Molecular characterization of glycoprotein genes and phylogenetic analysis of two swine paramyxoviruses isolated from United States. *Virus Gen.*, **39**, 53-65.

Reisinger RC, Heddleston KL, Manthei CA (1959). A myxovirus (SF-4) associated with shipping fever of cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **135**, 147-152.

Rima B, Balkema-Buschmann A, Dundon WG, Duprex P, Easton A, Fouchier R, Kurath G, Lamb R, Lee B, Rota P, Wang L, ICTV Report Consortium (2019). ICTV Virus Taxonomy Profile: Paramyxoviridae. *J. Gen. Virol.*, **100**, 1593-1594

Rima B, Collins P, Easton A, Fouchier R, Kurath G, Lamb RA, Lee B, Maisner A, Rota P, Wang LF (2018). Problems of classification in the family *Paramyxoviridae*. *Arch. Virol.*, **163**, 1395-1404.

Roshtkhari F, Mohammadi G, Mayameei A (2012). Serological evaluation of relationship between viral pathogens (BHV-1, BVDV, BRSV, PI-3V, and Adeno3) and dairy calf pneumonia by indirect ELISA. *Trop. Anim. Health. Prod.*, **44**, 1105-1110.

Saeed IK, Yahia HA, Khalid MT, Nada EM, Yasir MN, Baraa AM, Osama IM, Salma BE, Fahad AA (2016). Parainfluenza virus 3 infection in cattle and small ruminants in Sudan. *J. Adv. Vet. Anim. Res.*, **3**, 236-241.

Salwa A, Anusz K, Arent Z, Paprocka G, Kita J (2007). Seroprevalence of selected viral and bacterial pathogens in free-ranging European bison from Bialowieza Primeval Forest. *Polish J. Vet. Sci.*, **10**, 19-23.

Scheid A, Choppin PW (1974). Identification of biological activities of paramyxovirus glycoproteins. Activation of cell fusion, hemolysis, and infectivity of proteolytic cleavage of an inactive precursor protein of Sendai virus. *Virol.*, **57**, 475–490.

Schmidt AC, Mcauliffe JM, Murphy BR, Collins PL (2001). Recombinant bovine/human parainfluenza virus type 3 (B/HPIV3) expressing the respiratory syncytial virus (RSV) G and F proteins can be used to achieve simultaneous mucosal immunization against RSV and HPIV3. *J. Virol.*, **75**, 4594-4603.

Segura Correa J, Figueroa-Chávez D, García-Márquez L, Pescador-Rubio A (2013). Parainfluenza-3 and bovine respiratory syncytial virus: Intraherd correlation adjusted for sensitivity and specificity. *Rev. MVZ Cordoba*, **18**, 3807–3811.

Sharma SN, Adlakha SC (2009). *Textbook of Veterinary Virology*. Delhi: International Book Distributing Company, p: 284-293.

Smith CB, Purcell RH, Bellanti JA, Chanock RM (1966). Protective effect of antibody to parainfluenza type 1 virus. *N. Engl. J. Med.*, **275**, 1145–52.

Sobhy NM, Mor SK, Bastawecy IM, Fakhry HM, Youssef CRB, Goyal SM (2017). Surveillance, isolation and complete genome sequence of bovine parainfluenza virus type 3 in Egyptian cattle. *IJVS*, **5**, 8-13.

Spilki FR (2016). *Bovine Parainfluenza virus 3*. In: Munir M. (Ed), Mononegaviruses of Veterinary Importance Volume 2: Molecular Epidemiology and Control. Crayton, Columbia: CPI Group, p: 98-105.

Stott EJ, Thomas LH, Collins AP, Crouch S, Jebbett J, Smith GS, Luther PD, Caswell R (1980). A survey of virus infections of the respiratory tract of cattle and their association with disease. *J. Hyg. (Camb)*, **85**, 257–270.

Takeuchi O, Akira S (2009). Innate immunity to virus infection. *Immunol. Rev.* **227**, 75–86.

Takimoto T, Portner A (2004). Molecular mechanism of paramyxovirus budding. *Virus Res.*, **106**, 133–145.

Taylor JD, Fulton TW, Lehenbauer TW, Step DL, Confer AW (2010). The epidemiology of bovine respiratory disease: what is the evidence for predisposing factors?. *Can Vet J*, **51**, 1095–1102.

Thonur L, Maley M, Gilray J, Crook T, Laming E, Turnbull D, Nath M, Willoughby K (2012). One-step multiplex real time RT-PCR for the detection of bovine respiratory syncytial virus, bovine herpesvirus 1 and bovine parainfluenza virus 3. *BMC Vet. Res.*, **8**, 32.

Thorsen J, Henderson JP (1971). Survey for antibody to infectious bovine rhinotracheitis (IBR), bovine virus diarrhea (BVD) and parainfluenza 3 (PI3) in moose sera. *J. Wildl. Dis.*, **7**, 93–95.

Timurkan MO, Aydın H, Sait A (2019). Identification and molecular characterisation of bovine parainfluenza virus-3 and bovine respiratory syncytial virus - first report from Turkey. *J. Vet. Res.*, **63**, 167-173.

Tiwari K, Cornish C, Gamble B, Thomas D, Sharma RN (2016). Seroprevalence of bovine parainfluenza virus type 3 (bPI-3V) in ruminants from Grenada. *Open J. Vet. Med.*, **6**, 23-27.

Toker EB (2019). *Klinik ve nekropsi örneklerinde sığır solunum sistemi viruslarının moleküler teşhisi*. Bursa Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Bursa /Türkiye.

Trybala E, Larski Z, Wis'niewski J (1991). The effect of some physical and serological treatments on haemofusing activity of bovine parainfluenza virus type 3. *Acta Microbiol. Polonica*, **40**, 59–64.

Tsai KS, Thomson RG (1975). Bovine parainfluenza type 3 virus infection: Ultrastructural aspects of viral pathogenesis in the bovine respiratory tract. *Infect. Immun.*, **11**, 783–803.

Valarcher JF, Hogghund S (2006). *Viral Respiratory Infections in Cattle*. XXIV World Buiatrics Congres., Nice/France,p:8-18.<https://www.ivis.org/library/wab/wbc-congress-france-2006/viral-respiratory-infections-cattle>. (Erişim Tarihi: 27.12.2020).

Van der Maaten MJ (1969). Immunofluorescent studies of bovine parainfluenza 3 virus I. cell cultures and experimentally infected hamster. *Can. J. Comp. Med.*, **33**, 135-140.

Van der Maaten MJ (1969). Immunofluorescent studies of bovine parainfluenza 3 virus II. Experimentally infected calves. *Can. J. Comp. Med.*, **33**, 141-147.

Van Wyke Coelingh KL, Winter CC, Tierney EL, London WT, Murphy BR (1988). Attenuation of bovine parainfluenza virus type 3 in nonhuman primates and its ability to confer immunity to human parainfluenza virus type 3 challenge. *J. Infect. Dis.*, **157**, 655–662.

Vangeel I, Ioannou F, Riegler L, Salt JS, Harmeyer SS (2009). Efficacy of an intranasal modified live bovine respiratory syncytial virus and temperature-sensitive parainfluenza type 3 virus vaccine in 3-week-old calves experimentally challenged with PI3V. *Vet. J.*, **179**, 101–108.

Veljovic L, Knezevic A, Milic N, Krnjaic D, Mikovic R, Zoric A, Markovic M, Milicevic V, Stamenkovic M, Stanojevic M, Maksimovic-Zoric J, Petrovic T, Nisavic J (2016). Isolation and molecular detection of bovine parainfluenza virus type 3 in cattle in Serbia. *ACTA Vet.*, **66**, 509-519.

Waterson AP, Almeida JD (1966). Taxonomic implications of myxovirus. *Nature*, **210**, 1138-1140.

Welsh RD, Laura DB, Payton ME, Confer AW (2004). Isolation and antimicrobial susceptibilities of bacterial pathogens from bovine pneumonia: 1994–2002. *J Vet. Diag. Invest.*, **16**, 426-431.

Wen YJ, Shi Xc, Wang Fx, Wang W, Zhang SQ, Li G, Song N, Chen LZ, Cheng SP, Wu H (2012). Phylogenetic analysis of the bovine parainfluenza virus type 3 from cattle herds revealing the existence of a genotype A strain in China. *Virus Genes*, **45**, 542-547.

Wenzhi Xue, Ellis J, Mattick D, Smith L, Brady R, Trigo E (2010). Immunogenicity of a modified-live virus vaccine against bovine viral diarrhoea virus types 1 and 2, infectious bovine rhinotracheitis virus, bovine parainfluenza-3 virus, and bovine respiratory syncytial virus when administered intranasally in young calves. *Vaccine*, **28**, 3784-3792.

West K, Petrie L, Haines DM, Konoby C, Clark EG, Martin K, Ellis JA (1999). The effect of formalin-inactivated vaccine on respiratory disease associated with bovine respiratory syncytial virus infection in calves. *Vaccine*, **17**, 809-820.

Yang DK, Hwang IJ, Kim BH, Kweon CH, Lee KW, Kang MI, Lee CS, Cho KO (2008). Serosurveillance of viral diseases in Korean native goats (*Capra hircus*). *J. Vet. Med. Sci.*, **70**, 977-979.

Yazıcı Z, Gümüşova S, Tamer C, Müftüoğlu B, Ozan E, Arslan S, Baş O, Elhag AE, Albayrak H (2019). The first serological report for genotype C bovine parainfluenza 3 virus in ruminant species of mid-northern Turkey: Traces from the past. *Trop. Biomed.*, **36**, 803-809.

Yener Z, Saglam YS, Timurkan N, Ilhan F (2005). Immunohistochemical detection of parainfluenza type 3 virus antigens in paraffin sections of pneumonic caprine lungs. *J. Vet. Med. A: Physiol., Pathol., Clin. Med.*, **52**, 268-271.

Yıldırım Y, Yılmaz V, Faraji A (2009). Seroprevalence of viral respiratory system infections in cattle in the border provinces of North-East Turkey. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.*, **15**, 601-609.

Zarnke RL, Erickson GA (1990). Serum antibody prevalence of parainfluenza 3 virus in a free-ranging bison (*Bison bison*) herd from Alaska. *J. Wildl Dis.*, **26**, 416-419.

Zhu YM, Sh, HF, Gao YR, Xin JQ, Liu NH, Xiang WH, Ren XG, Feng JK, hao LP, Xue F (2011). Isolation and genetic characterization of bovine parainfluenza virus type 3 from cattle in China. *Vet. Microbiol.*, **149**, 446-451.