

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ANKARA, ÇORUM, KIRIKKALE ve YOZGAT İLLERİNDE  
YETİŞTİRİLEN *BRUCELLA* SERONEGATİF İNEKLERDE  
BVDV, BHV-1, BHV-4 ve BHV-5 ENFEKSİYONLARININ  
HEMATOLOJİK DEĞERLERE ETKİSİ, EPİDEMİYOLOJİSİ ve  
GENETİK KARAKTERİZASYONUN ARAŞTIRILMASI**

**Muhammet Eren ASLAN  
VETERİNER HEKİM**

**MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN  
Prof. Dr. Ahmet Kürşat AZKUR**

**2014 – KIRIKKALE**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ANKARA, ÇORUM, KIRIKKALE ve YOZGAT İLLERİNDE  
YETİŞTİRİLEN *BRUCELLA* SERONEGATİF İNEKLERDE  
BVDV, BHV-1, BHV-4 ve BHV-5 ENFEKSİYONLARININ  
HEMATOLOJİK DEĞERLERE ETKİSİ, EPİDEMİYOLOJİSİ ve  
GENETİK KARAKTERİZASYONUN ARAŞTIRILMASI**

**Muhammet Eren ASLAN  
VETERİNER HEKİM**

**MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN  
Prof. Dr. Ahmet Kürşat AZKUR**

**Bu tez, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (No:111O871), Kırıkkale  
Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (No: 2011/35) tarafından  
desteklenmiştir.**

**2014 – KIRIKKALE**

Kırıkkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Mikrobiyoloji Doktora Programı çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri üyeleri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 10/09/2014

# İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	II
İçindekiler	III
Önsöz	VII
Simgeler ve Kısaltmalar	VIII
Şekiller	XIV
Çizelgeler	XVI
<b>ÖZET</b>	1
<b>SUMMARY</b>	2
<b>1. GİRİŞ</b>	3
<b>1.1. <i>Brucella</i> Enfeksiyonu</b>	3
1.1.1. Etiyoloji	3
1.1.2. Epidemiyoloji	6
1.1.3. Patogenez ve Patoloji	8
1.1.4. Klinik Belirtiler	11
1.1.5. İmmünite	13
1.1.6. Teşhis	17
1.1.6.1. Klinik Teşhis	17
1.1.6.2. Laboratuvar Teşhis	17
1.1.6.2.1. Antijen Teşhisi	17
1.1.6.2.2. Antikor Teşhisi	19
1.1.7. Korunma ve Kontrol	21

<b>1.2. Bovine Viral Diarrhea Virüs Enfeksiyonu</b>	25
1.2.1. Etiyoloji	25
1.2.2. Epidemiyoloji	32
1.2.3. Patogenez ve Patoloji	34
1.2.4. Klinik Belirtiler	38
1.2.5. İmmünite	40
1.2.6. Teşhis	46
1.2.6.1. Klinik Teşhis	46
1.2.6.2. Laboratuvar Teşhis	47
1.2.6.2.1. Antijen Teşhisi	47
1.2.6.2.2. Antikor Teşhisi	49
1.2.7. Korunma ve Kontrol	51
<b>1.3. Bovine Herpesvirüs 1 Enfeksiyonu</b>	54
1.3.1. Etiyoloji	54
1.3.2. Epidemiyoloji	58
1.3.3. Patogenez ve Patoloji	60
1.3.4. Klinik Belirtiler	62
1.3.5. İmmünite	64
1.3.6. Teşhis	68
1.3.6.1. Klinik Teşhis	68
1.3.6.2. Laboratuvar Teşhis	68
1.3.6.2.1. Antijen Teşhisi	68
1.3.6.2.2. Antikor Teşhisi	71
1.3.7. Korunma ve Kontrol	71
<b>1.4. Bovine Herpesvirüs 4 Enfeksiyonu</b>	74
1.4.1. Etiyoloji	74
1.4.2. Epidemiyoloji	77
1.4.3. Patogenez ve Patoloji	78
1.4.4. Klinik Belirtiler	80
1.4.5. İmmünite	81
1.4.6. Teşhis	82

1.4.6.1. Klinik Teşhis	82
1.4.6.2. Laboratuvar Teşhis	83
1.4.6.2.1. Antijen Teşhisi	83
1.4.6.2.2. Antikor Teşhisi	84
1.4.7. Korunma ve Kontrol	84
<b>1.5. Bovine Herpesvirüs 5 Enfeksiyonu</b>	<b>86</b>
1.5.1. Etiyoloji	86
1.5.2. Epidemiyoloji	88
1.5.3. Patogenez ve Patoloji	89
1.5.4. Klinik Belirtiler	91
1.5.5. İmmünite	92
1.5.6. Teşhis	93
1.5.6.1. Klinik Teşhis	93
1.5.6.2. Laboratuvar Teşhis	94
1.5.6.2.1. Antijen Teşhisi	94
1.5.6.2.2. Antikor Teşhisi	95
1.5.7. Korunma ve Kontrol	95
<b>2. GEREÇ VE YÖNTEM</b>	<b>97</b>
2.1. Örneklenen Hayvanlar	97
2.2. Kan Örneklerinin Toplanması	98
2.3. Tam Kan Sayımı	99
2.4. <i>Brucella</i> Teşhisinde Kullanılan Serolojik Testler	100
2.4.1. Rose Bengal Pleyt Testi	100
2.4.2. Serum Tüp Aglütinasyon Testi	101
2.5. ELISA	102
2.5.1. Antikor ELISA	102
2.5.2. Antijen ELISA	104
2.6. RNA İzolasyonu	105
2.7. Tersine Transkriptaz ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR)	106

2.8. DNA İzolasyonu	107
2.9. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	108
2.10. Çoğaltılan PZR Ürünlerinin Jel Elektroforezi	110
2.11. İstatistiksel Analiz	110
2.12. Dizi Analizi ve Filogenetik Analiz	111
2.13. Hematolojik Parametrelerdeki Değişim Grafiklerin Hazırlanması	111
<b>3. BULGULAR</b>	<b>112</b>
3.1. Rose Bengal Pleyt ve Serum Tüp Aglutinasyon Testi Sonuçları	112
3.2. Antikor ve Antijen ELISA Sonuçları	114
3.3. RT-PZR ve PZR Sonuçları	117
3.4. Gen Sekans ve Filogenetik Analiz	119
3.5. Virüslerin Hematolojik Parametreler Üzerine Etkileri	125
3.6. BVDV, BHV-1 ve BHV-4'ün Hematolojik Parametreler Üzerine Karşılaştırmalı Olarak Etkisi	136
<b>4. TARTIŞMA ve SONUÇ</b>	<b>140</b>
<b>KAYNAKLAR</b>	<b>160</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>223</b>

## ÖNSÖZ

Sığırlarda genital sistemi etkileyen viral, paraziter ve bakteriyel birçok etken, enfeksiyon oluşturarak fertilitate problemlerine ve/veya abortlara neden olarak, hayvan sağlığını ve işletmelerin ekonomik verimliliğini olumsuz etkiler. Abort vakalarında virüslerin dağılımı ve genetik alt tipleri, bölgesel farklılıklar göstererek abort vakalarının şiddetini ve zamanını etkilemektedir. Bu nedenle etkenlerin genetik karakterizasyonun tespiti, hazırlanacak kontrol, koruma ve eradikasyon programlarının belirlenmesinde önemli rol oynar.

Bu tez kapsamında Ankara, Çorum, Kırıkkale ve Yozgat illerinde yetiştirilen sığırlarda, abort ve döl tutmama gibi üreme bozukluklarına neden olan Bovine Viral Diarrhea Virüs, Bovine Herpesvirüs 1, 4 ve 5 ile *Brucella* varlığı belirlenerek, hematolojik parametreler üzerine etkileri araştırılmıştır. Araştırmada incelenen bölgede etkenlerin varlığının ve genetik karakterizasyonlarının belirlenerek, araştırılan viral etkenlerin sığırlarda hematolojik verilerde meydana getirebilecekleri değişikliklerin tespit edilerek ayırıcı tanıda etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Doktora eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, yetişmemde büyük katkıları ve emekleri olan, tezimin hazırlanmasında sabırla bana yol gösterip, sonsuz yardımlarını esirgemeyen tez danışmanım ve Viroloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Ahmet Kürşat AZKUR'a;

Doktora eğitimim sırasında ilgilerini esirgemeyen Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Murat YILDIRIM'a; Doç. Dr. Serkal GAZYAĞCI'ya ve Viroloji Anabilim Dalı Araş. Gör. Emel BIYIKLI'ya;

Saha çalışmalarında yardımını esirgemeyen Veteriner Hekim arkadaşlarım İlker KIYAK'a, Fatih AYDIN'a, Sezgi AYCAN'a, Çağrı ATABEY'e ve emeği geçen tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Her konuda desteğini aldığım, her zaman sabır ve anlayış göstererek benim yanımda olan Eşim'e; tüm hayatım boyunca büyük özveri gösteren ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen Anneme, Babama ve Ablama sevgi ve emekleri için teşekkür ederim.

Tez projemi maddi yönden destekleyen TÜBİTAK'a ve Kırıkkale Üniversitesi BAP Birimi'ne teşekkürü bir borç bilirim.



## SİMGELER VE KISALTMALAR

%	Yüzde
ADCC	Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity
ASH	Antijen Sunan Hücreler
BAE	Bovine Arteriyel Endotelyal
BDV	Border Disease Virüs
BEK	Bovine Embriyonik Hücreler
BHK-21	Baby Hamster Kidney-21 (Yavru Hamster Böbrek)
BHV	Bovine Herpes Virüs
Bicp0	Enfekte Hücre Proteini 0
Bp	Baz Pair (Baz Çifti)
BRD	Bovine Respiratory Disease
BT	Bovine Turbinata
BVDV	Bovine Viral Diarrhea Virüs
°C	Derece Celcius
C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O	İsopropanol
CaCl	Kalsiyum Klorit
CCID <sub>50</sub>	Cell Culture Infective Dose 50 (Hücre Kültürü Enfeksiyöz Doz 50)
cDNA	Complementary DNA (Komplementer DNA)
CE	Cell Envelope (Hücre Membranı)
CFT	Komplement Fikzasyon Testi
Chr	Kromozom
cm <sup>2</sup>	Santimetre Kare
CO <sub>2</sub>	Karbondioksit
Cp	Cytopathic (Sitopatik)
CPE	Cytopathic Effect (Sitopatik Efeito)
CSFV	Classical Swine Fever Virus (Klasik Domuz Ateş Virüsü)
DNA	Deoksiribonükleik Asit

dsRNA	Çift İplikli RNA
E	Early (Erken)
EBL	Embriyonik Bovine Lung
EBV	Epstein-Barr Virüs
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FCS	Fötal Buzağı Serumu
fl	Femtolitre (1 fl=10 <sup>-15</sup> litre)
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FTS	Fizyolojik Tuzlu Su
GAGs	Glikozaminoglikan
GBK	Georgia Sığır Böbrek
Gr	Gram
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sülfürik Asit
HCS	High-Content Screening (Yüksek İçerik Analizi)
HCT	Hematokrit
HCT%	Hematokrit Yüzdesi
HIV	Human Immunodeficiency Virüs (İnsan Bağışıklık Yetmezlik Virüsü)
Hgb	Hemoglobin
HCl	Hidroklorik Asit
HCl <sub>2</sub>	Mercury(II) Chloride
HRPO	Horse Radish Peroksidaz
HSP70	Heat Shock (Isı şoku) proteini 70
HSV	Herpes Simpleks Virüs
IF	İmmunfloresans
IFAT	İndirekt Floresan Antikor Testi
IFN	İnterferon
Ig	İmmunglobulin
IL	İnterleukin
IBR	İnfeksiyöz Bovine Rhinotracheitis
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses (Uluslararası Virüs Taksonomi Komitesi)
IE	Immediate Early (En Erken)

IETS	International Embryo Transfer Society (Uluslararası Embriyo Transferi Derneği)
IP	İmmunperoksidaz
IPB	İnfeksiyöz Pustular Balanoposthitis
IPV	İnfeksiyöz Pustular Vulvovaginitis
IR	Internal Repeat (İnternal Tekrar)
IRES	Internal Ribosomal Entry Site
IRF	İnterferon Düzenleyici Faktör
ISGs	İnterferon Stümüle Edici Genler
Kb	Kilo Baz
kDa	Kilo Dalton
L	Late (Geç)
LDL	Low Density Lipoprotein (Düşük Yoğunluklu Lipoprotein)
Log	Logaritma
LPS	Lipopolisakkarit
LRG	Latency Related Gene (Latentlikle İlgili Gen)
LUR	Long Central Unique Region (Uzun Merkez Bölgesi)
LYM#	Lenfosit Sayısı
LYM%	Lenfosit Yüzdesi
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
M	Molar
MAbs	Monoklonal Antikorlar
Mbp	Megabaz Çifti
MCH	Eritrositlerdeki Hemoglobin Miktarı
MCHC	Eritrositlerdeki Ortalama Hemoglobin Konsantrasyonu
MCV	Eritrositlerin Ortalama Büyüklüğü
MD	Mucosal Disease (Mukozal Hastalık)
MDBK	Madin-Darby Bovine Kidney
mg	Miligram

MgCl <sub>2</sub>	Magnezyum Klorür
MHC	Major Histocompatibility Complex (Major Doku Uygunluk Kompleksi)
miRNA	MicroRNA
ml	Mililitre
mM	Milimolar
MON#	Monosit Sayısı
MON%	Monosit Yüzdesi
M.Ö.	Milattan Önce
MPV	Trombosit Hacmi
NaOH	Sodyum Hidroksit
NCP	Noncytopathic (Sitopatojen Olmayan)
NF- $\kappa$ B	Nükleer Faktör Kappa b
ng	Nanogram
NK	Natural Killer (Doğal Öldürücü)
nm	Nanometre
N.GR#	Nötrofil Granülosit Sayısı
N.GR%	Nötrofil Granülosit Yüzdesi
NOD	Nükleotid Bağlama Oligomerizasyon Domain
NTPase	Nükleosit Trifosfataz
OD	Optical Density (Optikal Dansite)
OIE	World Organisation for Animal Health (Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü)
OM	Outer Membrane (Dış Membran)
OMPs	Outer Membrane Proteins (Dış Membran Proteinleri)
ORF	Open Reading Frame (Açık Okuma Bölgesi)
PAMP	Pathogen-Associated Molecular Pattern (Patojen İlişkili Molekül Desenleri)
PBS	Phosphate Buffer Saline
PG	Peptidoglikan
PGE2	Prostaglandin E2
pH	Power of Hydrogen (Hidrojenin Gücü)

Pmol	Pikomol
PrDNA	Polyrepetitive DNA
PrP <sup>C</sup>	Prion Proteini
PE	Persiste Enfekte
PK	Pozitif Kontrol
PLT	Platelet (Trombosit)
RNase	Ribonükleaz
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RBC	Red Blood Cell (Eritrosit)
RBPT	Rose Bengal Pleyt Test
RNA	Ribonükleik Asit
RNAi	RNA İnterferens
RT-PZR	Tersine Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu
S-LPS	Smooth LPS
SDA	Serumlu Dekstroz Agar
ssRNA	Single Stranded RNA (Tek İplikli RNA)
SPF	Specific Pathogen Free (Spesifik Patojenden Ari)
Spp	Species Plural (Alt Tipler)
STAT	Serum Tüp Aglütinasyon Testi
T4SS	Tip IV sekresyon sistemi
TAE	Tris-asetat-EDTA
T <sub>c</sub>	Cytotoxic T (Sitotoksik T hücre)
TCID <sub>50</sub>	Doku Kültürü Enfeksiyöz Doz 50
TCR	T hücre Reseptörü
TcpB	Microtubule-Modulating <i>Brucella</i> Protein (Mikrotübül Düzenleyici <i>Brucella</i> Proteini)
TGF-β	Transforme Edici Büyüme Faktörü β
Th	T helper (Yardımcı T hücre)
TE	Transient Infection (Geçici Enfeksiyon)
TIF	Transindükleyici Faktör
TK	Timidin Kinaz
TLR	Toll Like Receptor (Toll Benzeri Reseptör)

TMB	Tetramethylbenzidine
TNF- $\alpha$	Tümör Nekrozis Faktör Alfa
TR	Terminal Repeat (Terminal Tekrar)
Treg	Regülatör T hücre
tRNA	Taşıyıcı RNA
TSA	Triptik Soy Agar
TSB	Triptik Soy Buyyon
TUNEL	Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (TdT)- Mediated dUTP Nick End Labelling
U	Ünite
UL	Unique Long
US	Unique Short
UTR	Translasyona Uğramayan Bölge
UV	Ultraviyole
V	Volt
WBC	White Blood Cell (Lökosit)

## ŞEKİLLER

	Sayfa
<b>Şekil 1.1</b> Persiste BVDV enfeksiyonu ile fütüsta gelişen doğal ve kazanılmış IFN- $\gamma$ cevabı	46
<b>Şekil 1.2</b> BHV-1 genom organizasyonu	55
<b>Şekil 2.1.</b> Tez kapsamında örnekleme yapılan iller ve toplanan örnek sayıları	98
<b>Şekil 3.1.</b> <i>Brucella</i> tespiti için kullanılan RBPT sonucu elde edilen kuvvetli pozitif, zayıf pozitif ve negatif örnekler	113
<b>Şekil 3.2</b> RBPT pozitif serumların titrelerinin belirlenmesi için yapılan STAT sonucu 1/80 titreye sahip serum örneği	114
<b>Şekil 3.3</b> RBPT pozitif serumların titrelerinin belirlenmesi için yapılan STAT sonucu 1/320 titreye sahip serum örneği	114
<b>Şekil 3.4</b> BVDV viral antijeni tespiti için kurulan nested RT-PZR ilk round	117
<b>Şekil 3.5</b> BHV-1 viral nükleik asit tespiti için kurulan, gB PZR	118
<b>Şekil 3.6</b> BVDV için yapılan filogenetik analiz ve filogenetik ağaç	120
<b>Şekil 3.7</b> BHV-1 DNA dizilimi, filogenetik analiz	124
<b>Şekil 3.8</b> Hematolojik yönden analiz edilen ineklere ait “lökosit sayısı (white blood cells/WBC)” değeri ile minimum ve maksimum referans değerler	126
<b>Şekil 3.9</b> Hematolojik yönden analiz edilen ineklere ait “alyuvar sayısı (red blood cell/RBC)” değeri ile minimum ve maksimum referans değerler	127
<b>Şekil 3.10</b> Hematolojik yönden analiz edilen ineklere ait “trombosit sayısı (platelet/PLT)” değeri ile minimum ve maksimum referans değerler	127
<b>Şekil 3.11</b> Hematolojik yönden analiz edilen ineklere ait “lenfosit yüzdesi (LYM%)” değeri ile minimum ve maksimum referans değerler	128
<b>Şekil 3.12</b> Hematolojik yönden analiz edilen ineklere ait “monosit yüzdesi (MON%)” değeri ile minimum ve maksimum referans değerler	129

<b>Şekil 3.13</b> Hematolojik yönden analiz edilen ineklere ait “nötrofil granülosit yüzdesi (N.GR%)” değeri ile minimum ve maksimum referans değerler	129
<b>Şekil 3.14</b> Hematolojik yönden analiz edilen ineklere ait “hematokrit yüzdesi (HCT%)” değeri ile minimum ve maksimum referans değerler	130
<b>Şekil 3.15</b> Hematolojik yönden analiz edilen ineklere ait “lenfosit sayısı (LYM#)” değeri ile minimum ve maksimum referans değerler	131
<b>Şekil 3.16</b> Hematolojik yönden analiz edilen ineklere ait “monosit sayısı (MON#)” değeri ile minimum ve maksimum referans değerler	131
<b>Şekil 3.17</b> Hematolojik yönden analiz edilen ineklere ait “nötrofil granülosit sayısı (N.GR#)” değeri ile minimum ve maksimum referans değerler	132
<b>Şekil 3.18</b> Hematolojik yönden analiz edilen ineklere ait “eritrositlerin ortalama büyüklüğü (mean corpuscular volume/MCV)” değeri ile minimum ve maksimum referans değerler	133
<b>Şekil 3.19</b> Hematolojik yönden analiz edilen ineklere ait ortalama “trombosit hacmi (mean platelet volume/MPV)” değeri ile minimum ve maksimum referans değerler	133
<b>Şekil 3.20</b> Hematolojik yönden analiz edilen ineklere ait “eritrositlerdeki ortalama hemoglobin konsantrasyonu (mean corpuscular hemoglobin concentration/MCHC)” değeri ile minimum ve maksimum referans değerler	134
<b>Şekil 3.21</b> Hematolojik yönden analiz edilen ineklere ait “hemoglobin (Hgb)” değeri ile minimum ve maksimum referans değerler	135
<b>Şekil 3.22</b> Hematolojik yönden analiz edilen ineklere ait “ortalama hemoglobin konsantrasyonu (mean corpuscular hemoglobin/MCH)” değeri ile minimum ve maksimum referans değerler	135



## ÇİZELGELER

	<b>Sayfa</b>
<b>Çizelge 2.1</b> İller bazında örnek toplanan sığır sayıları	97
<b>Çizelge 2.2</b> İller bazında hematolojik parametreleri analiz edilen sığır sayıları	99
<b>Çizelge 2.3</b> RT-PZR’de BVDV’nin tespiti için kullanılan primer çiftleri	107
<b>Çizelge 2.4</b> DNA virüslerinin tespiti için kullanılan primer çiftleri	109
<b>Çizelge 3.1</b> İller bazında <i>Brucella</i> RBPT sonuçları	112
<b>Çizelge 3.2</b> RBPT pozitif tespit edilen serum örneklerinin, STAT sonucu elde edilen titre sonuçları	113
<b>Çizelge 3.3</b> Toplanan serum örneklerinde BVDV, BHV-1, BHV-4 antikor ELISA sonuçları	115
<b>Çizelge 3.4</b> Serum örneklerinde BVDV, BHV-1, BHV-4 antikor ELISA seropozitiflik oranları karşılaştırması	115
<b>Çizelge 3.5</b> Toplanan serum örneklerinde illere göre BVDV, BHV-1 ve BHV-4 seropozitiflik oranları	116
<b>Çizelge 3.6</b> PZR ile belirlenen BVDV, BHV-1, BHV-4 ve BHV-5 pozitiflik oranları	119
<b>Çizelge 3.7</b> BVDV için nükleotid sekans uzaklıklarının karşılaştırması	122
<b>Çizelge 3.8</b> MS9-3 hemogram kan cihazı kullanılarak 360 sığıra ait tam kanlardan elde edilen hematolojik değerler	125
<b>Çizelge 3.9</b> BVDV’nin, hematolojik parametreler üzerine etkisinin istatistiksel olarak karşılaştırılması	136
<b>Çizelge 3.10</b> BVDV için antijen varlığının, hematolojik parametreler üzerine etkisinin istatistiksel olarak karşılaştırılması	137
<b>Çizelge 3.11</b> BHV-1’in, hematolojik parametreler üzerine etkisinin istatistiksel olarak karşılaştırılması	138
<b>Çizelge 3.12</b> BHV-4’ün, hematolojik parametreler üzerine etkisinin istatistiksel olarak karşılaştırılması	139

## ÖZET

Abortlar, neonatal ölümler ve döl tutmama sorunları hayvan yetiştiriciliğindeki önemli üretim kayıplarıdır. Abortlar ve döl tutmama vakaları virüs, bakteri, protozoa ve mantar enfeksiyonları kaynaklı olabilmektedir. Bu tezde, Ankara, Çorum, Kırıkkale ve Yozgat illerinde abort ve infertilite problemleri bildirilmiş olan ineklerde BVDV, BHV-1, BHV-4, BHV-5 ve *Brucella*'nın epidemiyolojik yönden incelenmesi ve kan parametreleri üzerine etkisinin karşılaştırılması amaçlanmıştır. 15 aylık ve üzeri yaştaki toplam 656 inekten tam kan ve kan serumu örnekleri toplandı. *Brucella* varlığı rose bengal pleyt testi ile %6.85 (45/656) ve serum tüp aglütinasyon testi ile %6.25 (41/656) olarak tespit edildi. Seropozitiflik oranları *Brucella* negatif serum örneklerinde sırası ile BVDV için 436/615 (%70.89), BHV-1 için 254/615 (%41.3), BHV-4 için 177/615 (%28.78) olarak belirlendi. BVDV, BHV-1 ve BHV-4'e spesifik ortak antikorlar %18.69 (117/615) oranında belirlendi. BHV-1 antijeni, seropozitif tam kan örneklerinde PZR ile %0.39 (1/254) oranında tespit edilir iken, BHV-4 ve BHV-5 belirlenemedi. BVDV antijeni RT-PZR ile %3.55 (18/506) oranında tespit edildi. BVDV ve BHV-1 pozitif örneklerin sekans ve filogenetik analizleri yapıldı. Elde edilen sonuçlara göre belirlenen BVDV virüslerin Kırıkkale'de ve Türkiye'de daha önceden rapor edilen pestivirüs tiplerine yakın ve BVDV-1 karakterinde olduğu belirlendi.

Virüslerin hematolojik parametrelere olan etkileri 360 tam kan örneğinin kontrol grubu ile karşılaştırmalı istatistiksel analizi sonucu belirlendi. BVDV için; mean corpuscular volume (MCV), yüzde hematokrit (Hct%), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) ve mean platelet volume (MPV), BHV-1 için; MCV, Hct% ve MPV, BHV-4 için ise MPV değerlerinde gruplar arasında istatistiksel olarak önemli farklılıklar belirlendi ( $p < 0.005$ ).

Sonuç olarak, belirtilen illerde *Brucella*, BHV-1, BHV-4 ve BVDV varlığının detaylı araştırıldığı ilk çalışmadır. Klinik belirtiler ve kan parametrelerdeki değişiklikler viral enfeksiyonların teşhisinde önemli rol oynamasına rağmen, kesin ve ayırıcı tanıda virolojik testlerin önemli olduğu bir kez daha belirtilmiştir.

**Anahtar Sözcükler:** Abort etkenleri, filogenetik analiz, hematolojik parametreler, seroprevalans, sığır

## SUMMARY

Abortion, neonatal deaths and infertility mainly important production losses in livestock industry. The abortions and infertility were attributed to virus, bacteria, protozoa and fungi infections. The aim of the thesis was to determine epidemiological data and comparison blood parameters of BVDV, BHV-1, BHV-4, BHV-5 and *Brucella*-associated cattle which were reported with abortion and infertility problems previously in Ankara, Corum, Kirikkale, and Yozgat provinces. Whole blood and sera samples were obtained from totally 656 cattle that are over age of 15 months. *Brucella* was detected as 6.85% (45/656) by rose bengal plate and 6.25% (41/656) by serum tube agglutination test. The seropositivity rates were detected by ELISA as BVDV 436/615 (70.89%), BHV-1 254/615 (41.3%) and BHV-4 177/615 (28.78%) in *Brucella* negative serum samples respectively. Common specific antibodies against to BVDV, BHV-1 and BHV-4 were determined 18.69% (117/615). BHV-1 antigens were detected 0.39% (1/254) in seropositive whole blood samples via PCR, but BHV-4 and BHV-5 were not. BVDV antigen rate was detected 3.55% (18/506) by RT-PCR. BVDV and BHV-1 PCR positive samples were sequenced and phylogenetic analyses were carried out. Accordingly this results, some BVDV viruses was close to BVDV-1 and also close to pestivirus types that previously reported from Kirikkale and Turkey.

Viruses could affect hematological parameters in 360 whole blood samples by comparing control groups. The percentage of mean corpuscular volume (MCV), hematocrit value (Hct%), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), mean platelet volume (MPV) for BVDV, MCV, Hct(%) and MPV values for BHV-1, MPV values for BHV-4 were determined statistically significant differences between the groups ( $p < 0.005$ ).

As a result presence of *Brucella* BHV-1, BHV-4 and BVDV were carried out detail investigation in these cities. Although diagnosis of viral diseases plays important role clinical observations and blood parameters, it is clearly found like others that virological test are necessary to precise and differential diagnosis.

**Key Words:** Abortion agents, cattle, hematological parameters, phylogenetic analysis, seroprevalance

# 1. GİRİŞ

## 1.1. *Brucella* Enfeksiyonu

### 1.1.1. Etiyoloji

*Brucella* birçok hayvan türünde genital organları enfekte ederek, boğalarda epididimitis ve orşitise, ineklerde döl tutmama ve abortlara neden olan bakteriyel bir etkidir (WHO 2006). *Brucella* etkenleri ökaryotik  $\alpha$ -proteobacteria sınıfında *Bartonella*, *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium* ve *Mesorhizobium* cinsleri ile birlikte yer alır (Moreno ve ark. 1990, Boussau ve ark. 2004). İnsanlarda enfeksiyon, hayvanlar ile direkt temas, kontamine çiğ süt ve ürünlerinin tüketimi gibi yollar ile gerçekleşir. *Brucella* enfeksiyonları, subakut veya kronik seyirli, zoonoz bir hastalıktır (Boschiroli ve ark. 2001).

Brucellozis, M.Ö. 460-M.Ö. 370 yıllarında yaşamış Hipokrat tarafından Yunanistan'a bağlı Taşoz adasında "humma" olarak tarif edilmiştir (Tezok ve ark. 1973, Çelebi ve Hacımustafaoğlu 2004). Literatürde ilk olarak 19. yüzyılda Malta adasında bulunarak rapor edilen hastalık, 1861 yılında cerrah Jeffery Allen Marston tarafından kendisinde de gözlediği enfeksiyon semptomlarını "nedeni belli olmayan gastrik ateş" olarak tanımlamıştır (Marston 1863). Bin sekiz yüz seksen yedi yılında David Bruce, Malta adasında nedeni belli olmayan ateş ile seyreden hastalık sonucu ölen askerlerin dalaklarından izole ettiği ve küçük koklar şeklinde görülen bu etkene "*Micrococcus melitensis*", neden olduğu enfeksiyona ise "Malta Humması" veya "Akdeniz Humması" adını vermiştir (Bruce 1887). Bin sekiz yüz doksan yedi yılında Hughes tarafından insanlardaki semptomları göz önüne alınarak hastalık "dalgalı ateş" olarak adlandırılmıştır (Hughes 1887). Aynı yıl Bernhard Bang, Danimarka'da

abort yapmış bir ineğin uterus sıvılarından izole ettiği Gram negatif basile “*Bacterium Infectiosa Bang*”, hastalığa ise “Bang hastalığı” (Bang's disease) adını vermiştir (Sriranganathan ve ark. 2009). Zammit, 1905 yılında etkeni keçi sütü ve idrarından izole ederek, keçilerin *M. melitensis*'in doğal rezervuarı olduğu ve çiğ keçi sütü ile peynirin insanları enfekte ettiğini bildirmiştir (Zammit 1905). Traum, 1914 yılında ABD’de aborte domuz fötusunda basil şeklindeki bir etkeni izole ederek, bu etkenin insanlarda görülen *Brucella* enfeksiyonlarında etkili olabileceğini bildirmiştir (Nicoletti 2002). Ülkemizde Dr. Hüsametdin Kural ve Mahmut Sabit Akalın tarafından 1915 yılında *B. melitensis*'in insandan izole edildiği bilinmektedir. Bunun öncesinde Kırım savaşı döneminde (1853-1856) İstanbul’da bulunan Hemşire Florence Nightingale’in de Brucellozise yakalandığı bilgisi rapor edilmiştir (Young 1995). Bin dokuz yüz onsekiz yılında Amerikalı bakteriyolog Alice Evans, keçi, koyun, sığır ve domuzlardan izole edilen etkenlerin morfolojik, kültürel ve biyokimyasal olarak ayrımının yapılamayacak kadar benzer olduğunu bildirmiştir. Bununla birlikte Evans, *M. melitensis*'in bir basil olduğunu ve sığır ile domuzdan izole edilen etkenin aynı cinse ait olduğunu rapor etmiştir (Evans 1918). Meyer ve Shaw, 1918 yılında *B. abortus*, *B. melitensis* ve *B. suis*'i bir grupta toplayarak, bu konuda ilk önemli çalışmaları yapan Bruce’un onuruna ve ismine ithafen *Brucella* grubu mikroorganizmalar, meydana getirdikleri hastalığa da Brucellozis adını vermişlerdir (Meyer ve Shaw 1920). *Brucella* cinsi bakterilerin ülkemizde sığırlardan ilk izolasyonu 1931-1932 yıllarında Zühtü Berke tarafından gerçekleştirilmiştir (Çelik 1937, Golem 1949). 1953 yılında Buddle ve Boyes, *B. ovis*'i ilk defa koçların epididimisinden izole etmişlerdir (Buddle ve Boyes 1953). *B. canis*'in 1968 yılında beagle ırkı köpeklerde abortla seyreden bir salgının araştırılması sırasında Carmicheal ve Bruner tarafından izole edildiği bildirilmiştir (Carmichael ve Bruner 1968). *Brucella* türlerinin deniz memelilerinde (fok, yunus, balina gibi) varlığı ilk olarak, 1994 yılında İskoçya ve Amerika’dan rapor edilmiştir. Takip eden yıllarda araştırmacılar tarafından deniz memelilerine ait iki yeni *Brucella* türüne; *B. pinnipediae* ve *B. cetaceae* adı verilmiştir (Foster ve ark. 2007a).

*Brucella* cinsi bakteriler; 0.6-1.5 µm uzunluğunda ve 0.5-0.7 µm genişliğinde, Gram negatif, kokobasil görünümünde, spor ve flagelladan yoksun hareketsiz mikroorganizmalardır. Etken, 20-40°C arasında üreyebilmesine rağmen, optimum

yaşama koşulları 37°C sıcaklık ve pH 6.6-7.4 olarak belirlenmiştir (Moreno ve Mariyo 2006, OIE 2009).

*Brucella* etkenlerinin yüzey katmanları diğer gram negatif bakterilerde olduğu gibi; en içte hücre membranı (Cell Envelope/CE), bunu çevreleyen peptidoglikan tabakası (PG) ve dış membrandan (Outer Membrane/OM) oluşur. Dış membran virülens faktörler olarak tanımlanan lipopolisakkarit (LPS) ve dış membran proteinlerini (Outer Membrane Proteins/OMPs) içermektedir. *Brucella* türlerinde bulunan smooth LPS (S-LPS) yapısı; lipid A, oligosakkarit kor ve O-zincir polisakkaritinden oluşur (Moriyón ve López-Goñi 1998).

*Brucella* 'nın diğer önemli virülens faktörleri olan dış membranda bulunan proteinler grup 2 (36-38 kDa) ve grup 3 (25-27 ve 31-34 kDa) olarak sınıflandırılır (Cloekaert ve ark. 2002). Grup 2 proteinler, *omp2a* ve *omp2b* genleri tarafından kodlanan porin benzeri proteinler olarak tanımlanmıştır (Ficht ve ark. 1989). *Omp25* ve *Omp 31* genleri ise grup 3'te yer alan, sırası ile 25-27 kDa ve 31-34 kDa ağırlığındaki proteinlerin kodlanmasında görevli olduğu belirlenmiştir (Cloekaert ve ark. 1996).

*Brucella* türlerine ait genom organizasyonları farklılık göstermektedir. *B. abortus* iki sirküler kromozomdan {2.12 Mbp (kromozom 1/ChrI) ve 1.16 Mbp (ChrII)} oluşan, yaklaşık 3.3 Mbp uzunluğunda bir genoma sahiptir. Genomda 3296 ORF (Open Reading Frame/Açık okuma çerçevesi) açıklanır iken, bunların 2158'i ChrI ve 1138'i ChrII üzerinde kodlanır (Halling ve ark. 2005). *B. melitensis* 16M suşu iki sirküler kromozomdan (2.11 Mbp ve 1.17 Mbp) oluşan yaklaşık 3.29 Mbp uzunluğunda ve 3197 ORF bölgesi açıklanan genomdan oluşur (Del Vecchio ve ark. 2002). *B. suis* 1330 suşu genomu iki sirküler kromozomdan (2.1 Mbp ve 1.2 Mbp) oluşan toplam 3.31 Mbp uzunluğunda genoma sahiptir. Genomda 3388 ORF açıklanırken, bunların 2185'i ChrI ve 1203'ü ChrII üzerinde kodlanır (Paulsen ve ark. 2002).

*Brucella* bakterilerinin üretilmesinde, serumlu dekstroz agar (SDA), kanlı agar, triptoz agar, triptik soy agar (TSA), serumlu patatesli infüzyon agar kullanılırken, sıvı besiyeri olarak *Brucella* buyyon, triptik soy buyyon (TSB) ve

karaciğerli buyyondan yararlanılmaktadır (Cengiz ve Dolapçı 1997, OIE 2009). *Brucella* türlerinin birçoğu dezenfektan ve antibiyotiklere duyarlıdır. *B. abortus*'un sütte yıkımlanması için gerekli olan pastörizasyon ısı ve süresi 61.5°C'de 23 dakika ya da 72°C'de 12-14 saniye olarak belirlenmiştir (Hudson ve ark. 2003).

### 1.1.2. Epidemiyoloji

Günümüzde yedi adet kara ve üç adet deniz kökenli *Brucella* türü sınıflandırması; *B. melitensis* (keçi, koyun, deve), *B. abortus* (sığır, koyun, keçi), *B. suis* (domuz ve vahşi hayvanlar), *B. canis* (köpekler), *B. ovis* (koyun), *B. neotomae* (çöl ve ağaç sıçanları), *B. inopinata* (konak bilinmiyor) şeklinde yapılmıştır. Yapılan son araştırmalarda *B. delphini*, *B. pinnipediae* ve *B. cetaceae* deniz memelilerinden (balina, yunus, fok) izole edilerek rapor edilmiştir (Foster ve ark. 2007a, Whatmore 2009). *Brucella* türlerinden; *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. canis*, *B. ceti*, *B. pinnipedialis* ve *B. inopinata*'nın zoonotik potansiyele sahip oldukları belirlenmiştir (Atluri ve ark. 2011). Yapılan çalışmalarda *B. abortus*'un evcil ruminantlar dışında vahşi hayatta su bufalosu (*Bubalus bubalus*), Afrika bufalosu (*Syncerus caffer*), bizon (*Bison bison*), geyik (*Cervus elaphus*) ve kurtları (*Canis lupus*) enfekte ettiği rapor edilmiştir (Tessaro ve Forbes 2004, White ve ark. 2013).

Enfekte gebe sığırların uterus içeriği ile fötüs ve fötal zarlarda yoğun bir şekilde bulunan etken, genellikle abort ve/veya doğum sırasında plasenta, fötal sıvılar ve süt aracılığı ile çevreye saçılır. *B. abortus* gebe sığırlarda enfeksiyondan sonra yaklaşık 11. günden itibaren çevreye saçılmaya başlayarak, doğumun veya abortun ardından 15. güne kadar yayılmaya devam eder (Philippen ve ark. 1970). Sığırlarda bulaşma; deri, konjiktiva, solunum sistemi mukozası ve gastrointestinal sistemin kontaminasyonu ile gerçekleşmektedir (Neta ve ark. 2010). *Brucella* ile enfekte ratların, sığırlara ve insanlara bulaşmada önemli bir kaynak olduğu rapor edilmiştir (Baek ve ark. 2005). Araştırmacılar ratlar arasında bulaşmanın özellikle enfekte erkek ratlardan, enfekte olmayan dişi ratlara çiftleşme yolu ile gerçekleştiğini

belirlemişlerdir (Islam ve ark. 2013). Buna benzer şekilde insanlar arasında *Brucella*'nın, enfekte erkek bireylerden kadın partnerine cinsel yol ile bulaştığı rapor edilmiştir (Kato ve ark. 2007). Zoonoz bir enfeksiyon olan Brucellozis, insanlara sindirim, konjiktiva, deri ve nozokomiyal yollar ile bulaşır. Ayrıca bulaşma, çiğ süt ve ürünlerinin (tereyağı, kaymak, taze peynir, krema) tüketilmesi yanında enfekte hayvanların karkasları ve vaginal ile fötal akıntılarına temas sonucu gerçekleşir (Corbel 1997, Mesner ve ark. 2007). Bu tarz bulaşma yolları göz önüne alındığında, şehirde yaşayan insanlar pastörizasyon uygulamaları sayesinde *Brucella* etkenlerine karşı korunabilirken, kırsal bölgelerde sığır yetiştiriciliği yapan halkın enfekte hayvanlar ile direkt temas etmelerinden dolayı enfeksiyon riski daha yüksek olmaktadır.

*Brucella* enfeksiyonlarının Cezayir, Mısır, İran, Irak, İsrail, Ürdün, Kuveyt, Lübnan, Libya, Fas, Filistin, Suudi Arabistan, Somali, Sudan, Suriye, Tunus, Yemen gibi ülkelerde hayvan yetiştiriciliğinde ekonomik kayıplara neden olduğu rapor edilmektedir (Refai 2002). Avrupa ülkelerinde ise Bulgaristan, Yunanistan, Makedonya, Hırvatistan, Sırbistan, Kosova, Fransa, İtalya, İrlanda, Portekiz, İspanya gibi Avrupa ülkelerinde *Brucella* enfeksiyonları varlığı bilinmekte ve mücadele programları titizlikle uygulanmaktadır. Bunun yanında Almanya, Avusturya, Danimarka, İsviçre, Hollanda, Norveç, İsveç ve İngiltere'nin büyük bir kısmının "*Brucella*'dan arı" statüsünde olduğu bildirilmektedir (Taleski ve ark. 2002, Godfroid ve Kasbohrer 2002, FAO Map 2013).

Ülkemizde insanlarda 1930-1980 yılları arasında 2000 civarında Brucellozis vakası rapor edilirken, 1980 yılından sonra vaka sayıları artış göstererek yaklaşık 190.000 civarına gelmiştir. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı verilerine göre 2000 yılında *Brucella* yönünden incelenen 2674 vakanın 182'si (%14) pozitif olarak belirlenirken, bu sayı 2011 yılında 66.475 vakanın 5496'sı (%12) pozitif olarak tespit edilmiştir. (Anonim 2012). Özellikle 2000 ve 2005 yılları arasında yıllık 15.000 vaka ortalaması ile toplamda yaklaşık 90.000 vaka kaydedilmiştir. Ülkemizde hayvanlarda görülen *Brucella* etkenlerinin varlığının tespitine yönelik yapılan çalışmalarda seropozitifliğin sığırlarda %2.9-34.78 arasında illere ve bölgelere göre değiştiği rapor edilmiştir (Ogutman 1972, Aslantaş ve Babür 2000, Şahin ve ark. 2008, Pehlivanoğlu



ve ark. 2011, Arserim ve ark. 2012, Yumuk ve Callaghan 2012). İnsanlarda *Brucella* seroprevalansı 1990-2012 yılları arasında pek çok ilde yapılan farklı çalışmalar ile %1.3-35.2 arasında değiştiği bildirilmiştir (Çetin ve ark. 1990, Durmaz ve ark. 1997, Kaleli ve ark. 1999, Karabay ve ark. 2004, Çetinkaya ve ark. 2005, Çetinkaya ve ark. 2006, Otlu ve ark. 2008, Arserim ve ark. 2012).

Brucellozis vakalarının seroprevalansı bu tez kapsamında örnekleme yapılan illerden Kırıkkale’de insanlarda %3-45 (Apan ve ark. 2007, Aşkar ve ark. 2013), sığırlarda %2.67-19 (Apan ve ark. 2007, Öcal ve ark. 2008, Yıldız ve ark. 2009, Aşkar ve ark. 2013) ve koyunlarda %5.1-8.73 (Apan ve ark. 2007, Aşkar ve ark. 2013) olarak belirlenmiştir. Yozgat, Çorum illerinde insan ve hayvanlarda kitlesel boyutta epidemiyolojik çalışmalar açısından boşluk olduğu görülmekte ve geniş kapsamlı seroepidemiolojik araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

### **1.1.3. Patogenez ve Patoloji**

*Brucella* cinsi üyeleri hedef aldıkları konak hücrelere iyi adapte olabilen, insan ve hayvanlar için patojen olan bakterilerdir. Fakültatif hücre içi parazitler olarak tanımlanan *Brucella* etkenleri, makrofajlar içerisinde canlı kalarak akut veya kronik enfeksiyonlara yol açabilirler (Baldwin ve Winter 1994, Gorvel ve Moreno 2002).

*B. ovis* dışındaki *Brucella* türleri oral yol ile alınması ardından *H. pylori* ve *Y. enterocolitica*’ya benzer şekilde üreaz aktivitesi sayesinde midenin asidik koşullarından korunarak, sindirilmeden mideyi direkt geçebilmektedir (Sangari ve ark. 2007). Mide asidini nötralize edici ilaç veya diyetler ile midenin pH’sı değiştiği durumlarda, bakteri geçişi benzer şekilde gerçekleşir. *B. ovis*’in üreaz negatif olduğu, bu nedenle hayvanlar arasında bulaşmanın genellikle venereal yol ile gerçekleştiği bildirilmektedir (Corbel ve Hendry 1985, OIE 2009). Mide’yi geçen *B. abortus*, bağırsak mukoza epitelinde bulunan ve transepitelyal membran transportunda aktif

role sahip M-hücrelerine (Microfold Cells) affinite duyar. Bir araştırmada *B. abortus*'un, BALB/c ve C57BL/6 farelerinde M-hücreleri apikal yüzeyinde bulunan hücresel prion proteini (PrP<sup>C</sup>) bir reseptör olarak kullandığı ve konak hücre içine bu yolla girebildiği tespit edilmiştir (Nakato ve ark. 2012). İntra-epitelyal fagositler *B. abortus*'un lamina propria ve submukozasına trans-epitelyal göçünü ve taşınmasını sağlar. Oponize olan *B. abortus* komplement veya Fc reseptörleri ile, oponize olmayan *Brucella* ise lektin ve fibronektin reseptörleri aracılığı ile etkileşime girerek penetre olurlar (Carvalho ve ark. 2010).

*Brucella* için önemli virülens faktörlerinden biri olan LPS'in O-zinciri ile makrofajın yüzeyinde bulunan lipid-sal (lipid raft) etkileşimi sonucu bakteri konak hücre içine girerek, erken fagozomu oluşturur (Porte ve ark. 2003, Roop ve ark. 2009). Oponize bakterilerde, aktif makrofaj içerisinde erken fagozomlar, lizozomlar ile birleşerek fagolizozomları oluştururlar. Fagolizozomların asidik yapısı oponize bakterilerin ölümüne yol açar (Starr ve ark. 2008). Yapılan deneysel enfeksiyon çalışmasında BHK-21 (Baby Hamster Kidney/Yavru hamster böbrek) hücreleri kullanıldığında, attenüe *Brucella* strain 19 (S19) suşunun hücreleri enfekte edebilmesine rağmen, etken enfeksiyonun geç aşamalarında *Brucella* içeren kompartmanların lizozom ile birleşmesi sonucu oluşan otofagozomlar içerisinde yıkımlanır (Pizarro-Cerdá ve ark. 2000). Oponize olmayan *Brucella*, LPS'in O-zinciri ile makrofaj yüzeyinde bulunan lipit sala (lipid raft) tutunarak hücre içine girer. Enfeksiyondan yaklaşık 1 saat sonra *Brucella* içeren vakuol endoplazmik retikulum ile etkileşime girer. Bakteri enfeksiyondan 10-12 saat sonra endoplazmik retikulumda replike olmaya başlar. Enfeksiyonun ardından yaklaşık 48 saat sonra, hücre içinin tamamen bakteri ile dolması veya besin maddelerinin tükenmesini takiben bakteri hücreyi lize ederek dışarı saçılır ve diğer hücrelerin enfeksiyonu şekillenmeye başlar (Celli 2006, Carvalho ve ark. 2010).

*Brucella* patogeneğinde rol oynayan bir diğer virülens faktör, *virB* operonu tarafından kodlanan "Tip IV sekresyon sistemi" (T4SS)'dir (de Jong ve Tsolis 2012). T4SS yapısı, *Legionella pneumophila*, *Coxiella burnetii*, *Bartonella* spp., *Helicobacter pylori*, *Bordetella pertussis* ve *Rickettsia prowazekii* gibi birçok Gram negatif bakteride, efektör proteinlerin konak hücre içerisinde transloke edilmesinde

görevlidir (Llosa ve ark. 2009). *Brucella*'da ise bakterinin fagosite edilmesi ile oluşan fagolizozomun asit ortamı T4SS'yi uyarır. Uyarılan T4SS ile konak hücre sitoplazmasında tanımlanan 11 *Brucella* proteininin 5'i {BAB1\_0678 (BspA), BAB1\_0712 (BspB), BAB1\_0847 (BspC), BAB1\_1671 (BspE) ve BAB1\_1948 (BspF)} hücre içine aktarılır. Enfeksiyon sırasında bu proteinlerin hücre salgı yolağını etkileyerek konakçı protein sentezini engellediği ve protein salgısını baskıladığı belirlenmiştir. Bu etkiler ile *Brucella* interferensi sağlanırken, hücre içi çoğalma ve *in vivo* persistenliğin desteklendiği rapor edilmiştir. Bu aşamada *Brucella* içeren vakuol oluşur ve endoplazmik retikulum ile etkileşime girer (Celli 2006, Myeni ve ark. 2013). Oluşan endoplazmik retikuluma bağlı kompartmanlar, *Brucella*'nın makrofaj, epitel hücre hatları ve plasental trofoblastlarda hücre içi replikasyonu için uygun alanlar oluşturur. *Brucella* bu mekanizma ile retikuloendotelyal sistemin fagositik hücreleri ile fagositik hücre özelliği göstermeyen trofoblastlarda çoğalabilirken, kompartmanlar sayesinde persiste kalarak kronik enfeksiyon halini alabilmektedir (Xavier ve ark. 2010).

*B. abortus* için önemli bir diğer virülens faktörün betain aldehid dehidrojenaz (BetB) (Gen Bankası ID: 006932) olduğu rapor edilmiştir. Yapılan deneysel enfeksiyon çalışmasında BetB geninin *B. abortus*'un hiperozmotik çevre ve ozmotik stres koşullarına direnç sağlanmasında görevli olduğu belirlenmiştir. Bunun yanında bakterinin hedef hücreye girişinde, hücre içi trafikte ve hücre içi çoğalmada rol oynadığı tespit edilmiştir. İlaveten araştırmacılar *B. abortus*'un virülens ve patogenezinde etkili olduğunu tespit ettikleri BetB geni silinmiş mutant *Brucella* suşunun Brucellozisin kontrolünde canlı aşı olarak kullanılabileceğini rapor etmişlerdir (Lee ve ark. 2014).

*Brucella* etkenleri sığırlarda vücuda deri, konjiktiva, solunum sistemi veya gastrointestinal sistemi aracılığı ile girer. Sonrasında etken bölgesel lenf düğümlerine yerleşir ve lenfatik damarlar ile kan dolaşımına geçer (Anderson ve ark. 1986, Ko ve Splitter 2003). Etken, bakteriyemi sonucu epitelial hücre hatlarına ve sığır trofoblastik hücrelere, lenf düğümleri, gebe uterus, testisler, tendo kılıfları, meme dokusu ve seyrek olarak da eklemlere yerleşir. Bu organ ve dokulara lokalize olan bakteriler, makrofajların ve epiteloid hücrelerin infiltrasyonuna neden olarak bu

bölgelerde makrofaj yığılmaları şekillenir (Carvalho ve ark. 2010, Poester ve ark. 2013).

Sığırların fetal zar ve plasental trofoblast hücrelerinden gebeliğin son trimesterinde salgılanan ve 4-karbon alkol şekeri yapısındaki eritritol, *Brucella* etkenlerinin (özellikle *B. abortus*) tercih ettiği karbon ve enerji kaynağıdır (Sperry ve Robertson 1975, Samartino ve Enright 1993). Eritritol varlığında genital kanalda hızla çoğalan *Brucella*'nın kotiledonlarda yangısal ve nekrotik değişiklikler meydana getirdiği belirlenmiştir. Meydana gelen değişimler sonucu fötusun beslenme ve gelişmesi engellenerek fetal ölüm ve abort vakaları gerçekleşir (Jain ve ark. 2012). Etken fötusa ait koriyonik villi epitellerinde üredikten sonra koriyon ve uterus mukozası arasına yayılır. Villilerde oluşan dejenerasyon ve yıkımlanma sonucu meydana gelen fibrinopurulent eksudat fetal ve maternal zarlar arasındaki bağlantının gevşemesine ve fetal membranın ayrılmasına neden olur. Böylece fötusun abortu gerçekleşir. İnsan plasentasında eritritol bulunmaz ve bundan dolayı insanlarda, *Brucella* enfeksiyonlarına bağlı abortların meydana gelmediği rapor edilmiştir (Smith ve ark. 1962, Poole ve ark. 1972, Khan ve ark. 2001).

#### **1.1.4. Klinik Belirtiler**

Brucellozis'in inkübasyon süresi, etkenin giriş yolu, sayısına ve hayvanın duyarlılığına bağlı olarak yaklaşık 10-200 gün arasında değişmektedir. Sığırlarda görülen başlıca klinik bulgular abort, döl tutmama, orşitis ve mastitis'dir. Gebelik süresince hayvanlarda klinik belirti görülmez. Abort vakaları gebeliğin her döneminde oluşabilse de genellikle gebeliğin 5-8. aylarında meydana gelir. Daha geç veya erken abort vakalarına rastlanabilmektedir. Genellikle ilk kez enfekte olan ve aşılammamış ineklerin %30-80'inde abort gözlenmektedir. Buna rağmen *Brucella* ile enfekte ineklerin takip eden gebeliklerinde tekrar abort yapma oranları %10-25

olduğu belirlenmiştir. Ayrıca ineklerde *Brucella* kaynaklı abortlardan sonra retensiyon sekondinarum ve metritis olgularına sıklıkla rastlandığı bildirilmiştir (Acha ve Szyfres 2003).

Brucellozis salgınlarında ineklerde süt veriminde önemli azalma, somatik hücre sayısında artış ile abort ve metritis vakaları meydana gelmektedir (Xavier ve ark. 2009a). Aborte fötusta otoliz şekillenirken abdominal organlar fibrinle kaplıdır. Pnömoni ve peritonit semptomları aborte fötusta tespit edilen diğer lezyonlardır (Xavier ve ark. 2009b). Enfeksiyonun erkek hayvanlarda oluşturduğu en önemli klinik semptom ise orşitistir. Akut dönemde testislerde adezyon ve fibrozis sonucu meydana gelen atrofi boğalarda kısırlık oluşumuna neden olmaktadır. Boğalarda testiste meydana gelen orşitis, unilateral şekillenmesine rağmen her iki testisin de enfekte olduğu bilinmektedir. Diğer bir çalışmada boğalarda *B. abortus* S19 aşılamasından 10 gün ve 7 ay sonra orşitis, epididimitis ve seminal vezikülitis semptomları gözlenmektedir (Trichard ve ark. 1982, Rhyan ve ark. 1997, Megid ve ark. 2010). *Brucella* enfeksiyonlarında artritis olguları da gözlenebilmektedir. *B. abortus* S19 suşu ile deneysel enfeksiyon çalışmasında buzağılarda eklem sıvısında fibrin artışı, kıkırdak eklem yüzeylerinde aşınma ve erozyonlar şekillenirken, eklem sıvısı irinli olmamakla birlikte bulanık görünümde olduğu belirlenmiştir (Johnson ve ark. 1994).

*Brucella* enfeksiyonları sonucu insanlarda akut ve ateşli bir hastalık tablosu meydana gelir. Hastalık kronik forma dönüştüğünde iskelet, kardiyovasküler ve merkezi sinir sisteminde ciddi komplikasyonlar görülür. Nadir olarak endokarditis, meningoensefalitis ve miyelitis meydana gelir (Franco ve ark. 2007). Son yıllarda yapılan araştırmalarda insan bağışıklık yetmezlik virüsü (Human Immunodeficiency Virus/HIV) ile enfekte insanlarda *B. canis* etkeni izole edildiği ve etkenin besledikleri evcil köpeklerinden bulaştığı tespit edilmiştir. Araştırmacılar bu durumun insan popülasyonunda *Brucella* enfeksiyonlarının yaygınlığını arttıran ve ilerleyen dönemde araştırılması gerekli önemli bir husus olduğunu rapor etmişlerdir (Lucero ve ark. 2010, Lawaczeck ve ark. 2011).

### 1.1.5. İmmünite

*Brucella* enfeksiyonlarına karşı gelişen doğal bağışıklıkta Toll benzeri reseptörler (Toll-like Receptors/TLRs) lipit, protein, lipoprotein, glikan ve nükleik asitler gibi patojen ilişkili molekül desenleri (Pathogen-Associated Molecular Patterns/PAMPs) tanıyarak, proinflamatuvar sitokinlerin üretilmesi ve kostimülatör moleküllerin açıklanmasında rol oynar (Takeuchi ve Akira 2010). Fare peritoneal makrofajları üzerindeki TLR-2'nin, bakterinin *Omp19* dış membran lipoproteini ile uyarılmasına bağlı olarak tümör nekrozis faktör alfa (TNF- $\alpha$ ) ve interleukin (IL)-6 salgılanır (Giambartolomei ve ark. 2004, Ferrero ve ark. 2014). *B.abortus* TLR2 geni silinmiş (knock out) farelerde, TLR-2 ile immün sistemin uyarılması by-pass edildiği için TLR-4 ile *Omp16* dış membran proteini etkileşerek immün sistemi uyarır (Oliveira ve ark. 2008, Pasquevich ve ark. 2010, Gomes ve ark. 2012). TLR-6'nın *in vivo* olarak immün yanıtın tetiklenmesinde, dentritik hücrelerin aktivasyonunda ve TNF- $\alpha$  ile IL-12 sitokinlerinin salınmasında gerekli olduğu rapor edilmiştir (de Almeida ve ark. 2013). Yapılan deneysel enfeksiyon çalışmalarında, TLR-9'un *Brucella* DNA'sı ile aktive olarak farelerde *Brucella* enfeksiyonlarına karşı konak savunmasında enfeksiyonun erken dönemlerinde (ilk 2 hafta) etkin rol alan ve interferon alfa (IFN- $\alpha$ ) ile IL-12 sitokinlerinin salınımını uyaran reseptörlerden biri olduğu belirlenmiştir (Oliveira ve ark. 2012, Gomes ve ark. 2012).

NOD (Nükleotid-Bağlama Oligomerizasyon Domaini) benzeri reseptörler (NOD1, NOD2) *B.abortus*'un mikrobiyal yapılarının tanınmasında görevli sitolitik hücre içi reseptörlerdir (Shaw ve ark. 2008). Yapılan çalışmalarda NOD1 ve NOD2 gen bölgeleri silinmiş farelerin dalaklarında bulunan bakteriyel yükün, normal fareler ile aynı olduğu saptanmıştır. Bu durumu araştırmacılar NOD benzeri reseptörlerin *Brucella* enfeksiyonlarına karşı immün cevapta sinyal oluşturduğunu fakat *in vivo* olarak enfeksiyona karşı gelişen konakçı savunmasında esansiyel rol oynamadıkları şeklinde yorumlayarak rapor etmişlerdir (Oliveira ve ark. 2012).

*B. abortus*, antijen sunan hücrelerden (ASH) IL-12 salınmasını tetikledikten sonra, doğal öldürücü (Natural Killer/NK) hücreleri aktive olurlar ve IFN- $\gamma$

salgılamaya başlarlar (Biron 1999). NK hücreleri immün yanıtta önemli olan IFN- $\gamma$  salgılama ve enfekte hedef hücrelerin öldürülmesi özelliklerine rağmen, farelerde yapılan deneysel *B.abortus* enfeksiyonlarının erken safhasında NK hücrelerinin önemli bir rol oynamadığı bildirilmiştir (Fernandes ve ark. 1995). *Brucella* enfeksiyonlarında NK hücrelerinin poliklonal antikör oluşumuna katkı sağladığı fakat bu katkının direkt B hücrelerini etkileyerek mi yoksa indirekt bir etki ile mi şekillendiği tartışılmaktadır (Gao ve ark. 2008). Gao ve ark. (2011) takip eden yıllarda yaptıkları çalışmalarında NK hücrelerinin direkt olarak B hücreleri ile etkileşime girdiğini ve poliklonal IgG uyarımını sağladığını belirlemişlerdir.

NK hücreleri ile birlikte etkene karşı erken immün yanıtta görevli ASH hücreleri, deri altı ve mukozal alanlarda lokalize olarak *Brucella*'nın hücre duvarı ve LPS yapısını tanırlar (Inguli ve ark. 1997). ASH hücreleri aktive olarak bakteriyi fagosite etmesini takiben TNF- $\alpha$ , IL- $\beta$  ve IL-6 sitokinleri salgılanır. ASH hücreleri içinde fagosite olan bakterinin peptid yapıları hücre yüzeyinde sentezlenen major doku uygunluk kompleksi I (Major Histocompatibility Complex/MHC-I) ve MHC-II ile sunulur. Bu aşamada ASH hücreleri periferden (deri, mukoza), T-hücrelerin yoğun olduğu lenfoid organlara göç ederler. ASH'ler iki farklı sinyal yolağı ile T hücre aktivasyonunu sağlarlar (Yingst ve Hoover 2003, Skendros ve Boura 2013).

*B. abortus*'un ASH fonksiyonları üzerine etkilerinin belirlenmesi için yapılan çalışmalarda bakterinin *in vitro* olarak insan monositlerinden TNF- $\alpha$ , IL- $\beta$  ve IL-6 salgılanmasını uyardığı belirlenmiştir (Huang ve ark. 1999). Bunun dışında özellikle dentritik hücrelerden salgılanan IL-12'nin, NK hücreleri ile B ve T hücrelerini aktive ederek, antijen spesifik efektör hücrelere dönüşmelerini sağladığı belirlenmiştir (Metzger ve ark. 1996). *B.abortus* ile enfekte edilen farede, dentritik hücreler dalağın T hücrelerden zengin kırmızı pulpasına göç eder. Bu bölgede IL-12 salgısına enfeksiyonun ardından yaklaşık 3 saat sonra rastlanırken, en yüksek seviyeye 6. saatte ulaştığı ve 24. saatte ise tespit edilemediği rapor edilmiştir (Golding ve ark. 2001).

*Brucella* enfeksiyonunda antijen ile dentritik hücrelerin aktivasyonu ardından naif T hücreleri efektör veya hafıza T hücrelerine dönüşerek, sitokin salgılamaya

başlarlar. *Brucella* enfeksiyonlarına karşı gelişen kazanılmış bağışıklıkta, yardımcı T hücreler (T helper/Th1) ve sitotoksik T hücreler (Cytotoxic T/Tc1); IFN $\gamma$  ve  $\beta$ -kemokinleri, Th2 ve Tc2 hücreler ise IL-4 ve IL-5 salgılanmasında görevlidir (Golding ve ark. 2001, Vitry ve ark. 2007). Ayrıca yardımcı T hücreleri, B hücrelerin antikor üretmesini uyarır iken üretilen antikor türleri, B hücreleri ile etkileşime giren T hücre alt tiplerine ve salgılanan sitokinlere göre değişiklik gösterir. *Brucella* ile enfekte farelerde IFN- $\gamma$  salgılanan Th1 hücreleri immunglobulin G2a (IgG2a) ve IL-4 salgılanan Th2 hücreleri IgG1 ve IgE üretimini sağlar (Snapper ve Paul 1987, Finkelman ve ark. 1988, Scott ve ark. 1997). İnsan periferik mononükleer kan hücrelerinde CD4<sup>+</sup> ve CD8<sup>+</sup> T hücrelerinden salgılanan IFN- $\gamma$ , enfeksiyondan 6 saat sonra belirlenirken, en yüksek seviyeye 18. saatte ulaştığı tespit edilmiştir (Golding ve ark. 1984, Sikder ve ark. 2012). B hücrelerinden salınan antikorlar nötralize edici özellikleri nedeni ile opsonin görevi yaparak; antijen sunan hücrelerin fagositozunu, komplementin aktivasyonunu, makrofaj, nötrofil ve NK hücrelerin antikora bağımlı hücre aracılı sitotoksitesini kolaylaştırır (Baldwin ve Goenka 2006). B hücrelerinden salınan IgM, IgG1, IgG2a ve IgG3 immunglobulinleri ile oluşan antikor aracılı opsonizasyon, bakterinin fagositozunu arttırarak ilk enfeksiyonu sınırlandırırken, *Brucella* enfeksiyonunun intrasellüler mekanizması üzerine sınırlı etkisi bulunur (Skendros ve Boura 2013).

*Brucella* etkenlerinin vücutta persiste kalarak kronik enfeksiyona yol açma mekanizmaları pek çok araştırmacı tarafından incelenmiştir. *In vitro* çalışmalarda insan hücrelerinde *Brucella* etkenlerinin ASH hücrelerin fonksiyonlarını değiştirerek immün sistemden kaçtığı belirlenmiştir. Akut *Brucella* hastalarında makrofaj hücrelerinin antijene cevap amaçlı kemotaksisinin azaldığı, fagolizozom füzyonun baskılanarak *Brucella* içeren vakoullerin oluşumunun arttığı ve fagositozun engellendiği belirlenmiştir. Bunun yanında T hücrelerine antijen sunumu ile TNF- $\alpha$  ve IL-12 üretimi baskılanmaktadır (Caron ve ark. 1996, Billard ve ark. 2007). *Brucella*'nın makrofaj hücrelerinde antiapoptotik faktörleri uyararak apoptozis mekanizmasını baskıladığı bildirilmektedir (Fernandez-Prada ve ark. 2003, Tolomeo ve ark. 2003). *Brucella* enfeksiyonlarında gelişen Th1 immün cevabında antijen spesifik CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T lenfositlerinden salgılanan IFN- $\gamma$  ve IL-2 miktarı kronik enfeksiyonlarda azalmaktadır (Giambartolomei ve ark. 2002, Rafiei ve ark. 2006).



*Brucella*'nın kronik enfeksiyonlarında Th1 hücrelerinde erken aktivasyon markırı CD69 ve IL-2 reseptörü (CD25) açıklanması azalmıştır (Skendros ve ark. 2011). İnsanlarda *Brucella* enfeksiyonlarında serumda, periferal mononükleer kan hücrelerinde transforme edici büyüme faktörü  $\beta$  (Transforming Growth Factor  $\beta$ /TGF- $\beta$ ) miktarında kronik hastalarda artış olduğunu ve bunun T hücre yanıtını baskıladığı rapor edilmiştir (Elfaki ve Al-Hokail 2009). Benzer şekilde BALB/c fare modelinde *B. melitensis*'in kronik enfeksiyonlarda, CD8<sup>+</sup> hafıza T hücrelerin düşük seviyede oluşması ve immün sistem hücrelerinin proliferasyonunu uyarıcı sitokinlerin üretimlerinin baskıladığı belirlenmiştir. İlâveten *B. melitensis* mikrotübül düzenleyici *Brucella* proteini (Microtubule-Modulating *Brucella* Protein/TcpB) sitotoksik CD8<sup>+</sup> T hücrelerinin *Brucella* peptidlerini açıklayan hedef hücreleri öldürme mekanizmasını engellendiği rapor edilmiştir (Durward ve ark. 2012).

Son yıllarda immün sistemin yeni hücre alt tipleri keşfedilmiştir. Tanımlanan hücre hatlarından biride CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regülatör T (Treg) hücreleridir (Suvas ve ark. 2004, Palomares ve ark. 2010). *Brucella abortus* enfeksiyonlarında akut dönemde *in vivo* olarak erken immün yanıtın şekillenmesinde Treg hücrelerin önemli bir yeri olduğu belirlenmiştir. Treg, IL-10'un *Brucella* ile enfekte makrofajların proenflamatuar sitokin salınımını azaltarak *B. abortus*'un hücre içinde çoğalmasını, persiste kalmasını ve kronik enfeksiyon oluşturmasını sağladığı tespit edilmiştir (Xavier ve ark. 2013).

*Brucella* enfeksiyonlarında patojen-konakçı etkileşimi üzerine yapılan çalışmalarda, microRNA (miRNA) olarak adlandırılan küçük endojen (ribonükleik asit) RNA moleküllerinin post-transkripsiyonel safha ile apoptozis ve otofaji gibi programlı hücre ölüm mekanizmalarında etkin rol oynadığı belirlenmiştir (Zheng ve ark. 2012).

## **1.1.6. Teşhis**

### **1.1.6.1. Klinik Teşhis**

Sığırlarda gebeliğin beşinci ayından sonra meydana gelen abort vakaları *Brucella* etkenleri varlığı yönünden incelenmelidir. Klinik tablo genellikle patognomik değildir ve anamnez bilgileri önem taşır.

### **1.1.6.2. Laboratuvar Teşhisi**

*Brucella* teşhisinde laboratuvar muayeneleri için kullanılan marazi maddeler fötusa ait kotiledonlar, fötal membranlar, mide içeriği, akciğer, dalak ile abort yapan ineğe ait vajinal sıvı, süt ve kan örnekleridir. Kesilmiş hayvanlara ait karkastan teşhis; meme dokusu, lenf nodülleri ve dalaktan gerçekleştirilmektedir (Poester ve ark. 2010).

#### **1.1.6.2.1. Antijen Teşhisi**

Bakteriyoskopik teşhiste şüpheli materyallerden hazırlanan frotilerin Gram, Ziehl Neelsen ve Köster boyama yöntemleri kullanılarak boyamaları yapılır. Modifiye Ziehl Neelsen metodu kullanıldığında, ışık mikroskobu altında mavi zemin üzerinde kırmızı renkte görülen *Brucella* etkenleri aranır (Alton ve ark. 1975).

Kültür muayenesinde laboratuvara gönderilen materyallerden çeşitli besi yerlerine ekimler yapılarak etkenin izole edilmesi, tedavi yönteminin belirlenmesi açısından önemlidir. Bu amaçla en çok *Brucella* medyum ve TSA gibi besi yerleri tercih edilmektedir. *B. abortus*'un izolasyonu için optimal inkübasyon koşulları; mikroaerofilik ortamda (%5-10 CO<sub>2</sub>), 37°C ve pH 6.6-7.4 olarak belirlenmiştir. İnkübasyonun 36-48. saatinden sonra küçük, şeffaf, yüzeysel kabarıklık, yuvarlak ve düzgün kenarlı, nemli, parlak yüzeysel kolonilerin varlığı gözlenir (OIE 2009).

*Brucella*'nın sığırlarda teşhisinde PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) tabanlı ilk moleküler çalışma 1990 yılında *B. abortus* S19 suşunun 43 kDa ağırlığında dış membran proteininin 635 bp uzunluğunda bir bölgesinin çoğaltılması ile gerçekleştirilmiştir (Fekete ve ark. 1990). Sonraki yıllarda PZR ile teşhis, genomun *Brucella* türleri bazında genetik mutasyonun en az olduğu ve korunmuş 16S rRNA (Herman ve De Ridder 1992) ve *bcs31* (Baily ve ark. 1992) gen bölgeleri hedef alınarak dizayn edilen primer dizimleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. *Brucella* genomu tarafından kodlanan ve *Brucella* türleri arasında ayırım için kullanılabilen *omp2* (A-B), *omp25*, *dnaK*, *groEL*, *dnaJ*, *htrA*, *omp31*, *hsp65* gibi gen bölgeleri incelenmiştir (Bricker 2002). Sığır ve buffalo kanında PZR ile *Brucella* etkenlerinin belirlenmesine yönelik bir çalışmada *bcs31*, *omp2* ve 16S rRNA gen bölgeleri hedef alınmıştır. Kan örneklerinden teşhiste en duyarlı gen bölgesinin *bcs31*, bunun yanında en az duyarlı bölgenin 16S rRNA olduğu belirlenmiştir (Mukherjee ve ark. 2007). Konvansiyonel PZR'nin aksine Real Time (Gerçek zamanlı) PZR'nin daha duyarlı, kontaminasyon riskinin az ve yanlış pozitifliklerin engellenebilmesi gibi avantajları göz önüne alınarak ilk çalışma 2001 yılında gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada *Brucella* türlerine spesifik olduğu belirlenen, *Brucella* kromozomunda insersiyon sekansı genetik elementini (*IS711*) (Hailing ve ark. 1993) hedef alan primer dizimleri kullanılmıştır (Redkar ve ark. 2001). Bunun dışında özellikle insan Brucellozisinin teşhisinde *bcs31*, 16S-23S ITS, *omp25* and *omp31* gen bölgeleri hedef alınan primer dizimleri ve problemleri kullanılan çalışmalar yapılmıştır (Queipo-Ortuno ve ark. 2005, Kattar ve ark. 2007, Queipo-Ortuno ve ark. 2008, Bounaadja ve ark. 2009). İlk olarak 1994 yılında *B. abortus* (biovar 1-2-4), *B. melitensis* (Biovar 1-2-3), *B. ovis* ve *B. suis* (Biovar 1) türlerinin ayırımına yönelik ve *IS711* gen bölgesi hedef alınarak geliştirilen multipleks PZR çalışması yapılmıştır (Bricker ve Hailing

1994). Daha sonraki yıllarda diğer *Brucella* türlerinin (*B. neotomae*, *B. pininipedialis*, *B. microti*, *B. ceti* ve *B. inopinata*) ve alt biyovarylarının birbirinden ayırımına yönelik multipleks PZR çalışmaları gerçekleştirilmiştir (Kang ve ark. 2011, Nagalingam ve ark. 2012).

Akış (flow) sitometri *Brucella* dahil olmak üzere birçok mikroorganizmanın tespitinde kullanılan bir yöntemdir (Cloeckert ve ark. 1998, Alvarez-Barrientos ve ark. 2000). *Brucella* için yapısında bulunan dış membran proteinleri ile S ve R form LPS gibi epitop yapılarına karşı oluşan monoklonal antikorlar kullanılarak süspanse kültürden direkt etken teşhisi yapılabildiği, bunun yanında karışık koloniler içerisinde *Brucella* türleri ve suşların ayırımı da kolaylıkla gerçekleştirildiği rapor edilmiştir (Bowden ve ark. 1995, Fernandez-Prada ve ark. 2006).

#### 1.1.6.2.2. Antikor Teşhisi

*Brucella*'nın indirekt teşhisinde yaygın bir şekilde kullanılan rose bengal pleyt testi (RBPT) antijeni rose bengal boyası ile boyanmış olan *B. abortus* standart antijeni S99 veya S1119.3 suşu ile hazırlanmaktadır. Bu aşamada antijen hazırlamada kullanılan buffer'in pH'sı 3.65 düzeyinde olmalıdır. Asidik pH sayesinde IgM aktivitesi engellenerek, IgG'lerin reaksiyona katılması sağlanır ve spesifik olmayan aglütinlerin etkinliği durdurulur. RBPT diğer serolojik testlere oranla daha güvenilir sonuçlar elde edilmesine rağmen özellikle aşılı hayvanlarda meydana gelen IgM'lerin çapraz reaksiyon vermesi ile yanlış pozitif sonuçlara rastlanmıştır (Nielsen 2002, Chothe ve Saxena 2013).

Serum tüp aglütinasyon testi (STAT), tüplerde %5'lik fizyolojik tuzlu su ile seri dilüsyon yapılan şüpheli seruma eşit miktarda standart *Brucella* aglütinasyon antijeni ilave edilmesi şeklinde gerçekleştirilir. *Brucella* teşhisinde akut dönemde etkili olan bu test ile aşılama ve enfeksiyona bağlı olarak oluşan antikorları

belirlemesine rağmen IgM ve IgG ayrımlarının yapılamadığı belirlenmiştir. Ayrıca *Brucella* ile benzer antijen yapısında olan *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli*, *Franciella tularensis*, *Campylobacter fetus* gibi bakteriler ile çapraz reaksiyon şekillenebildiği ve yanlış pozitifliklere neden olduğu belirlenmiştir. Testin değerlendirilmesi sırasında 24 saat 37°C’de inkübasyonu takiben tüpteki sıvının berrak olması ve dibinde tortu oluşması pozitif sonuç olarak kabul edilir. Aşısız hayvanlarda aglütinasyon oluşumu 1/40 ve üzeri dilüsyonlar pozitif, 1/40’ın altındaki dilüsyonlar negatif olarak değerlendirilirken, aşılı hayvanlarda 1/80 ve üzeri dilüsyonlar pozitif, 1/80’in altında dilüsyonlar negatif olarak kabul edilir (Öngör 1999, Aydın 2006).

Komplement fikzasyon testi (CFT) birçok reaktif gerektirmesi ve teknik olarak zor olmasına rağmen daha güvenilir sonuçlar vermesi nedeni ile tercih edilmektedir. *Brucella* ile doğal enfeksiyon veya aşılama sonrası oluşan immün yanıtın ayrılmasında etkili bir yöntem olan CFT ile IgG1 immünglobulinleri tespit edilmektedir. Testin esası, antijen-antikor kompleksine bağlanan komplementin testte kullanılan koyun eritrositlerini lize etmesidir. Testte kullanılacak antijen, amboseptör ve komplementin daha önceden titre edilmiş olması gerekir. Testin değerlendirilmesinde eritrositlerin parçalanmadan nokta şeklinde çökmesi pozitif, parçalanarak test ortamının rengini kırmızı yapması negatif sonuç olarak kabul edilir (Nielsen 2002, Poester ve ark. 2010).

Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) testi kullanılarak *Brucella* şüpheli sığırlardan elde edilen serum örneklerinde antikor veya antijenler direkt, indirekt ve kompetatif yöntemler ile saptanır (Nielsen 2002). Aşılama ardından gelişen antikorlar, indirekt ELISA ve diğer serolojik testler ile belirlenemediği için kompetatif ELISA yöntemi geliştirilmiştir. Sonraki yıllarda bu test OIE tarafından Brucellozisin sığır ve domuzlarda belirlenmesi için uluslararası geçerli bir test olduğunu açıklamıştır (OIE 2009).

Bazı serumlarda spesifik *Brucella* antikorları bulunmasına rağmen aglütinasyon meydana gelmez. Bu tip antikorların, anti-insan globulini (Coombs reaktifi) kullanılarak antijenle reaksiyon vermeleri sağlanabilir. Düşük titrede antikor

bulunan kronik enfeksiyonların tespitinde, Coombs testi ile ELISA karşılaştırıldığında aralarında %7.2-34 oranında bir yanlış olabildiği bildirilmiştir (Araj ve Awar 1997, Araj 2010).

Süt ring testi, aglütinasyon testinden farklı olarak süt örneklerinde *Brucella* teşhisi için geliştirilmiştir. Kitlesele sürü taramalarında kullanılan süt ring testi; hematoksilen veya trifenil tetrazolium'la boyanmış antijenlerin, süt içerisinde bulunan *Brucella* spesifik antikorlar ile bağlanarak kırmızı veya mavi renkte bir halka oluşturma esasına dayanır. Mastitisli memeden alınan bozuk sütler, kolostrum ve laktasyonun geç evrelerinde alınan sütler kullanılarak yapılan testler yanlış sonuçlar verebilmektedir (Poester ve ark. 2010).

Deri testi aşılammamış sığır, koyun ve keçi sürülerinde Brucellozis'in tanısında kullanılabilcek alternatif bir testtir. Brucellin olarak bilinen allerjenlerle (*Brucella* lysate, INRA, Brucellergen, Melitin, MBP vs.) yapılan bu test sığır, koyun ve keçilerin kuyruk altına veya boynun yan kısmı derisine 0.1-0.2 ml miktarında uygulanmaktadır. Bu işlemden 48-72 saat sonra deride meydana gelen kalınlaşmanın ölçülmesi ile test sonucu değerlendirilir (OIE 2009).

İndirekt floresan antikor testi (IFAT) ve indirekt hemaglütinasyon yöntemleri kullanılan diğer teşhis metotlarıdır. Son zamanlarda ise daha pratik olan ve Coombs testi gibi antikor engeline takılmaksızın Bruselloziste ortaya çıkan total antikorların saptanmasında kullanılmakta olan Brucellacapt (immunocapture) testi geliştirilmiştir (Orduña ve ark. 2000)

### **1.1.7. Korunma ve Kontrol**

Sığır yetiştiriciliğinde *Brucella* kaynaklı enfeksiyonların tespiti ve kontrol stratejilerinin geliştirilmesi, ekonomik açıdan ve hayvan sağlığı yönünden önemlidir. Bununla birlikte halk sağlığını tehdit eden bu tür zoonoz enfeksiyonlar ile

mücadelede yetiştirilen hayvanlara ait bilgileri içeren veri tabanları ve takip sistemleri geliştirilmelidir (EU commission 2011).

Zoonoz enfeksiyonlarda, hastalığın insidens ve prevalansının düşük seviyelerde tutulabilmesi amacı ile hazırlanan uzun süreli kontrol ve eradikasyon politikalarına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu kapsamda sığırların *B. abortus* S19, koyun ve keçilerin *B. melitensis* Rev-1 aşuları ile toplu şekilde aşılması, kitlesel tarama testleri kullanılması ve pozitif hayvanların tespit edilerek sürüden uzaklaştırılması ile Brucellozisin yayılımının önlenmesi gereklidir. Bu uygulamalar için önemli mali kaynaklar ayrılmalı, yetiştiricilere konu hakkında eğitimler verilmeli ve sürüden uzaklaştırılan enfekte hayvanların yerine sağlıklı hayvanlar konulmalıdır. Ancak bu sayede hastalıktan ari sürüler elde edilebilir (Renukaradhya ve ark. 2002, Minas 2006, Seleem ve ark. 2010).

Brucellozisin kontrol ve eradikasyonuna yönelik kullanılan farklı aşı çeşitleri mevcuttur. 1923 yılında keşfedilen canlı aşı *B. abortus* S19, eritritol *ery* gen gölgesinde 702bp'lik kısmının delesyonları ile hazırlanmıştır (Sangari ve Agüero 1994, Sangari ve ark. 1994). S19 aşısı uygulaması ardından, yüksek ateş, anoreksi, halsizlik, süt veriminde düşme ve enjeksiyon bölgesinde şişlik gibi çeşitli reaksiyonlar şekillenebilmektedir. Bunun yanında S19 suşunun gebe sığırlarda abortlara, boğalarda orşitise ve insanlarda dalgalı ateşe neden olduğu bilinmektedir (Tizard 2009). 1996 yılında Amerika'da S19 aşısı yerine *B. abortus* RB51 aşısı kullanılmaya başlanmıştır. *B. abortus* RB51 aşısı *B. abortus* 2308 suşundan hazırlanan ve LPS O-zincir antijeni silinmiş mutant bir canlı aşıdır. RB51, S19'un aksine daha güçlü bir Th1 cevabı tetiklediği ve komplement fikzasyon, tüp aglütinasyon, floresan antikor gibi serolojik testlerde yanlış pozitifliğe neden olan anti-LPS antikor yanıtın oluşumunu uyarmadığı belirlenmiştir (Stevens ve ark. 1994). Canlı *B. melitensis* aşı suşu olan Rev-1, 1957 yılında vahşi *B. melitensis* 6056 suşunun streptomisin içeren medyumdan streptomisine dirençli kolonilerinden elde edilmiştir (Elberg ve Faunce 1957). Rev-1 gebe keçilerde güvenilir olmadığı ve Rev-1 ile aşılana laktasyondaki keçilerin bazı vakalarda süt ile etkeni saçtıkları belirlenmiştir (Banai 2002). Canlı *B. suis* S2, abort yapan domuzdan izole edilen etkenin seri pasajlar ile attenüe edilmesi ile elde edilen ve Çin'de kullanılan bir aşıdır

(Ding ve ark. 2011). *Brucella* enfeksiyonlarının kontrolü ve eradikasyonu için *B. abortus*; BLS, InfC, L7/L12, *Omp16*, *Omp19*, P39, DnaK, SurA, SodC ve *B. melitensis*; Bp26, *Omp25*, IalB, *Omp31*, AdoHcyase gibi pek çok subunit aşı çalışması gerçekleştirilmiştir (Yang ve ark. 2013). Bunun dışında BP26, *Omp16* ve *Omp31* proteinleri kullanılarak üretilen vektör aşular ile *Omp31*, L7/L12, *Omp16*, P39 ve *bscp31* gibi antijenlerin aynı anda açıklanabildiği DNA aşı çalışmaları literatürde bulunmaktadır (He ve Xiang 2010, Avila-Calderón ve ark. 2013).

*Brucella* enfeksiyonlarına karşı geliştirilen kontrol ve eradikasyon programları 20. yüzyılın ikinci yarısında pek çok ülkede uygulamaya konulmuştur. Başta Arjantin, Portekiz, Mısır, İran, İsrail, Suriye ve Yunanistan gibi ülkelerde yoğun bir şekilde mücadele programları uygulanmaktadır (Refai 2002, Martins ve ark. 2009, Karagiannis ve ark. 2012, Aznar ve ark. 2014).

Ülkemizde *Brucella* enfeksiyonlarının kontrol ve eradikasyonu için ilk çalışmalar sığırdaki *B. abortus* için 1930 yılında başlatılmıştır. Brucellozisin eradikasyonuna yönelik mücadele 1984 yılından itibaren 4-8 aylık sığırlar ve 3-8 aylık kuzu ve oğlakların aşılması şeklinde başlatılarak halen devam etmektedir. Yapılan kitlesel aşulamalar ardından etkilerinin gözlenmesi amacı ile serosurvey çalışmaları yapılmaktadır (İyisan ve ark. 2000, Refai 2002).

*Brucella* enfeksiyonlarının insanlarda tedavisi için Dünya Sağlık Örgütü 1986'da altı hafta doksisisiklin (200 mg/oral) + rifampisin (600-900 mg/oral) kombinasyonunu önermiştir. Gebelerde ise tetrasiklin ve streptomisin kullanımının toksik etkilere neden olduğu, bunun yerine 45 gün süre ile rifampisin kullanılabileceği bildirilmiştir (WHO 2006). Sonraki yıllarda insanlarda etkenin doksisisiklin ve rifampisin yanında streptomisin, trimetoprim sulfametoksazol ve siprolaksin gibi antibiyotiklere duyarlı olduğu ve tigesiklinin tedavide kullanılabilecek alternatif ajan olabileceği rapor edilmiştir (Parlak ve ark. 2013). Hayvanlarda tedavide kullanılan antibiyotiklere duyarlılık ve dirençlilik çalışmaları sınırlı sayıda olmak ile birlikte, insan Brucellozisinin endemik olduğu bölgelerde yaşayan koyunlardan izole edilen *B. melitensis*'in streptomisin, siprofloksasin ve gentamisine %7.3, rifampine %9.7 oranlarında dirençli olduğu belirlenirken, en



yüksek dirençliliğin ise trimetoprim sulfametoksazola (%46.3) karşı geliştiği tespit edilmiştir (İlhan ve ark. 2013).

## 1.2. Bovine Viral Diarrhea Virüs (BVDV) Enfeksiyonu

### 1.2.1. Etiyoloji

Bovine viral diarrhoea virüs (BVDV), ilk kez Olafson ve ark. tarafından 1946 yılında tanımlanan ve sığırlar işletmelerinde ekonomik kayıplara yol açan bir etkidir (Olafson ve ark. 1946). *Flaviviridae* ailesinin Pestivirüs cinsinde, Bovine viral diarrhoea virüs 1 (BVDV-1), Bovine viral diarrhoea virüs 2 (BVDV-2), klasik domuz ateş virüsü (Classical Swine Fever Virus/CSFV) ve sınır hastalığı virüsü (Border Disease Virus/BDV) bulunur (ICTV 2013). BVDV, ikozahedral simetrik, pozitif polariteli, tek iplikli, 5'-3' UTR (Untranslated Region/Translasyona uğramayan bölge) ile çevrelenmiş ve yaklaşık 12.3-12.5 kb (Kilobaz) uzunluğunda genomu sahip zarlı bir RNA virüsüdür. Genom, 449 kDa ağırlığında ve 4000 amino asidin kodlanabildiği bir ORF yapısı içerir. ORF bölgesinden tek bir poliprotein kodlanır ve replikasyon sırasında proteolitik kesilmeler ile bu poliproteinden yapısal ve yapısal olmayan proteinler meydana gelir (Collett ve ark. 1988, Vilcek ve ark. 2004).

BVDV'nin, genomunda bulunan 5' UTR, E2 ve N<sup>pro</sup> gen bölgelerinin nükleotid diziliminde meydana gelen farklılıklara bağlı olarak, iki ana genotipik alttipi (BVDV-1 ve -2) tanımlanmıştır (Becher ve ark. 1999, Vilcek ve ark. 2001). Brezilya, Tayland, İtalya, İsviçre ve İsveç gibi birçok ülkede kan serumu, fetal sığırlar serumu, aborte fetus ve sperma örneklerinde "HoBi-like" veya "BVDV-3" olarak adlandırılan ve sığırlarda üreme bozuklukları, solunum yolu enfeksiyonları ile buzağuların akut enfeksiyonlarına neden olan yeni BVDV türü tespit edilmiştir (Bauermann ve ark. 2013). Xia ve ark. (2011) Amerika, Brezilya, Kanada, Meksika, Yeni Zelanda, Kolombiya, Avustralya, Danimarka, Fransa ve Dominik Cumhuriyeti gibi geniş bir coğrafyada satılan ticari fetal sığırlar serumlarında BVDV-1, BVDV-2 ve atipik BVDV (BVDV-3) varlığını tespit etmişlerdir. Atipik BVDV olarak tanımladıkları türün özellikle Güney Amerika kökenli olduğunu rapor etmişlerdir.

Son dönemde ise Amerika’da fetal sığır serumlarında tespit edilen atipik BVDV’nin HoBi-like virüs olduğu belirlenmiştir. Tespit edilen virüsün Avrupa kökenli olduğu ve bu ülkelerde işlem gören fetal sığır serumlarının kontaminasyonu aracılığı ile Amerika’ya girdiği belirlenmiştir (Bauer mann ve ark. 2014).

İlk olarak 2003 yılında Avustralya’nın Güney Galler bölgesinde 3-4 haftalık domuz yavrularında miyokardial semptomlar ile seyreden “Bungowannah virüs” isimli yeni bir pestivirüs türü belirlenmiştir. Bungowannah virüs ile Pestivirüs genusu üyeleri (BVDV-1, BVDV-2, BDV ve CSFV) arasında yapılan karşılaştırmalı filogenetik analizlerde; 5' UTR için %54-61, N<sup>pro</sup> için %50.9-55.8 ve E2 için %47.7-51.3 oranlarında benzerlikler tespit edilmiştir (Kirkland ve ark. 2007). Daha sonra Orta-Batı Amerika’da domuzlarda Bungowannah benzeri virüsün varlığı rapor edilmiştir (Abrahante ve ark. 2012). Bungowannah virüs ile Pestivirüs cinsi üyeleri arasında genetik benzerliğin az oluşu ve sınırlı çapraz antijen reaktivitesi göstermesi sonucu virüs, atipik pestivirüs olarak tanımlanmaktadır (Richter ve ark. 2011). Bungowannah virüs’ün N<sup>pro</sup> bölgesinin, BVDV’ye benzer şekilde IRF-3 (İnterferon Regulatory Factor-3/İnterferon düzenleyici faktör-3) etkinliğini enfeksiyondan 8 saat sonra baskılayarak, IFN I sekresyonunu durdurduğu belirlenmiştir (Richter ve ark. 2014).

BVDV virüsü pH 3.5 ve 4°C’de en stabil haldedir. Sitopatik (Cytopathic/cp) BVDV biyotipi pH 4 ve 4°C’de, sitopatik olmayan (Noncytopathic/ncp) BVDV biyotipine göre daha az duyarlıdır (Depner ve ark. 1992). BVDV-1 ile persiste enfekte sığır fütüsünden alınan beyin, deri, kas, kulak, kalp, akciğer, timüs, dalak, böbrek ve bağırsak dokularında antijen stabilitesini farklı saklama koşullarında incelenmiştir. En yüksek antijen stabilitesinin doku tipine, fekal kontaminasyona ve saklama süresine bağlı olmaksızın -80°C’de olduğu belirlenmiştir. Aynı çalışmada -20°C’de 36 ay saklandıktan sonra antijen en yüksek beyin dokusunda %92.7 olarak belirlenirken, en az antijen stabilitesi %80.2 ile dalak, böbrek ve bağırsak dokularından hazırlanan havuzda rapor edilmiştir. Bunun yanında fekal kontaminasyonun ve örnekleri dondurup-çözdürme sayısının antijen miktarı ve stabilitesini azaltıcı etkenlerin başında geldiği rapor edilmiştir (Ridpath ve ark. 2014).

BVDV-1 ve 2'nin, yapılan bölgesel epidemiyolojik çalışmalar ve filogenetik analizleri ile birçok alt tipi bulunmuştur. Buna göre, ilk olarak 1954 yılında tanımlanan BVDV-1 için günümüzde en az 16 (a, b1; b2; c; d; e; f; g; h; i; j; k; l; m; n; o) genetik alttipinin varlığı tanımlanmıştır (Baker ve ark. 1954, Vilcek ve ark. 2001, Barros ve ark. 2006, Giangaspero ve Harasawa 2014). BVDV'nin bu genetik çeşitliliği, taksonomik olarak önemli olması yanında laboratuvar uygulamaları ve aşuların hazırlanması için önemlidir (Becher ve ark. 1999). Yüksek patojeniteye sahip ve hemorajik hastalığa neden olabilen BVDV-2'nin günümüzde en az 5 (a, b, c, d, e) genetik alttipinin varlığı belirlenmiştir (Giangaspero ve ark. 2008, Giangaspero ve Harasawa 2014).

BVDV hücre kültüründe neden olduğu morfolojik değişikliklere göre cp ve ncp olmak üzere iki biyotipe ayrılmıştır (Fulton ve ark. 2000b). Cp BVDV, ncp biyotipi aksine hücre kültüründe hücrelerin yuvarlaklaşması, hücre büzülmesi (Shrinkage), çekirdek hiperkromazisi gibi morfolojik değişiklikler ve DNA fragmentasyonu ile apoptozise neden olur. Apoptozisin hücre üzerine en önemli etkilerinden biri olan DNA fragmentasyonu, TUNEL (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (TdT)-Mediated dUTP Nick End Labelling) metodu kullanılarak cp BVDV ile enfekte hücrelerde enfeksiyondan 12 saat sonra belirlenmeye başlanırken, 24-48. saatlerde en yüksek seviyeye ulaştığı gözlenmiştir (Zhang ve ark. 1996). Sonraki yıllardaki çalışmalarda yüksek virülense sahip BVDV ile meydana gelen akut enfeksiyonlarda lenfoid organ hücreleri ve kan dolaşımında bulunan beyaz kan hücrelerinin (White Blood Cell/WBC) sayısında azalma, bunun yanında apoptotik ve nekrotik WBC hücrelerinde artış olduğu saptanmıştır. Virülens ve lenfoid hücrelerde etkilerin incelenmesi için *in vitro* lenfoid hücre hattında (BL-3 hücreleri) deney modeli dizayn edildiğinde, epitel hücrelerde daha önce belirlenen iki biyotip (cp, ncp) aksine, BVDV'nin etkisi üç biyotipe ayrılarak tanımlanmıştır. Bu biyotipler; ncp (epitel ve lenfoid hücrelerde canlılık üzerine etkisi bulunmayan), cp (enfeksiyondan 48 saat sonra epitel ve lenfoid hücrelerde apoptozise neden olan) ve lenfositopatojenik (epitel hücrelerde değişiklik yapmadığı ve enfeksiyondan 5 gün sonra hücrelerde apoptozise neden olan) şeklinde rapor edilmiştir (Ridpath ve ark. 2006).

BVDV genomu yapısal ve yapısal olmayan proteinleri kodlar. Yapısal proteinler C, E<sup>ms</sup>, E1, E2 ve p7 olarak tanımlanmıştır.

**C proteini;** 88 amino asitten oluşan, yaklaşık 14-16 kDa ağırlığında, poliprotein N terminus bölgesinde bulunan bir kapsit proteindir (Heimann ve ark. 2006). Yapılan *in vitro* çalışmalarda C proteininin RNA ile düşük affinitede bağlanabildiği, böylece RNA genomunun konak hücre sitoplazmasına aktarılması ve translasyonu sağladığı tespit edilmiştir (Murray ve ark. 2008). *Flaviviridae* ailesinde bulunan BVDV, hog kolera virüs, hepasivirüs ve West Nile virüs C proteinlerinin RNA katlanma mekanizmasını düzenleyerek, yanlış katlanmaların önlenmesi ve düzeltilmesinde görevli RNA şaperon molekülü özelliğinde olduğu belirlenmiştir (Ivanyi-Nagy ve ark. 2008).

**E<sup>ms</sup>;** E0 veya gp44/48 olarak da bilinen, zar glikoproteindir. 227 amino asit uzunluğunda, 100 kDa ağırlığında ve disülfid bağlı homodimer yapıda olan E<sup>ms</sup> enfekte hücrelerden salgılanır ve ribonükleaz (RNase) aktivitesindedir (Rümenapf ve ark. 1993, Schneider ve ark. 1993). E<sup>ms</sup> konak hücre ile ilk temasta glikozaminoglikanlara (GAGs) bağlanmada görevlidir (Iqbal ve ark. 2000). Viral replikasyon sırasında pozitif ve negatif polariteli RNA virüslerinde sentezlenen çift iplikli RNA'nın (dsRNA) IFN sentezi yolağını uyardığı, böylece IFN- $\alpha/\beta$  transkripsiyonu gerçekleştiği ve enfekte hücrelerden IFN salgılandığı belirlenmiştir (Pichlmair ve Sousa 2007). Bunun üzerine yapılan çalışmalarda rekombinant pestiviral E<sup>ms</sup>'nin, sığır MDBK hücrelerinde ekstrasellüler dsRNA'ya bağlanarak yıkımladığı, bu sayede dsRNA aracılığı ile uyarılan IFN sentezinin baskılandığı ve IFN için antagonist etki meydana geldiği tespit edilmiştir (Magkouras ve ark. 2008).

**E1 ve E2;** heterodimer bağlanma özelliğinde olup virüsün hücreye girişinden sorumlu zar glikoproteinleridir (Ronecker ve ark. 2008). E2'nin, nötralizan antikörlerin oluşumunu sağlayan immünodominant bir zar glikoproteini olduğu bildirilmiştir (Toth ve ark. 1999). E2, aşı ile immünite çalışmalarında antijenik farklılıklar ve bağlanan monoklonal antikor yönünden hedef alınan önemli bir glikoproteindir (Kalaycıoğlu ve ark. 2012). Glikoproteinler için şaperon özelliği taşıyan ısı şoku proteinleri (Heat Shock Proteins/Hsp) ile E2'nin birleştirilerek

kompleks oluşturulduğu çalışmada, *in vitro* CD4<sup>+</sup> T hücre çoğalmasını uyardığı belirlenmiştir. Bunun yanında *in vivo* Hsp110-E2 kompleksi ve E2'nin Quil-A adjuvantı ile muamelesi sonucu üretilen aşının etkisi incelendiğinde, *in vitro* modelin aksine immün yanıtta Hsp110-E2'nin etkisiz kaldığı ve yalnızca E2 ile hazırlanan aşının uygulandığı grupta immün yanıtın daha fazla şekillendiği rapor edilmiştir (McLaughlin ve ark. 2011).

**p7;** hidrofobik yapıda ve yaklaşık 6-7 kDa ağırlığında, viral kurguda ve virüsün, enfekte hücrenin membranından çıkışında membran geçirgenliğinin düzenlenmesinde görevli, viroporin olarak adlandırılan, küçük integral membran proteindir (Harada ve ark. 2000). Araştırmacılar ilerleyen dönemde pestivirüslere karşı yeni antiviral ajanların, p7 proteininin membran üzerindeki por yapılarının geçirgenlik özelliğini hedef alarak geliştirilebileceğini speküle etmektedir (Largo ve ark. 2014).

Yapısal olmayan proteinler N<sup>pro</sup> (p20), NS2/3 (p125), NS4A (p10), NS4B (p32), NS5A (p58) ve NS5B (p75)'dir.

**N<sup>pro</sup>;** pestivirüslerin korunmuş bölgelerinden biri olup, viral poliprotein Cys-168 ve Ser-169 amino asitlerin karboksi (C) terminus bölgesinden kesen, yaklaşık 20 kDa ağırlığında ve 168 amino asitten oluşan bir otoproteazdır (Stark ve ark. 1993, Tratschin ve ark. 1998, Rügenapf ve ark. 1998). N<sup>pro</sup>'nun IFN antagonisti bir etkiye sahip olduğu ve N-terminal bölgesinin IFN antagoniziminde rol oynadığı belirlenmiştir (Gil ve ark. 2006). BVDV cp ile enfeksiyonda IFN için antagonist etki, N<sup>pro</sup>'nun IFN sentezini kontrol eden hücrel transkripsiyon faktörü IRF-3'e etkisi ile gerçekleştiği belirlenmiştir. Bu aşamada virüsün IRF-3 aracılı antiviral gen açıklanması baskılandığı, ardından posttranskripsiyonel IRF-3 proteinlerin oluşumunun poliubikitinasyon ve proteazom aracılı yıkımlanma ile geriletildiği anlaşılmıştır (Hilton ve ark. 2006, Chen ve ark. 2007). Benzer şekilde N<sup>pro</sup>'nun E<sup>ms</sup> ile birlikte intrauterin dönemde fötüsta IFN sentezini bloke edici etkisi ile persistenliğe neden olduğu belirlenmiştir (Meyers ve ark. 2007).

**NS2/3 (p125);** 120 kDa ağırlığında ve en büyük proteinlerden biridir. NS2/3 proteaz ile kapsit proteini C ucu ile etkileşime girerek protein katlanmasını düzenler

ve yeni virionların kurgulanmasında görev alır (Agapov ve ark. 2004). Doğal enfeksiyon veya modifiye canlı aşılarda aşılanma sonrasında NS2/3'e karşı kuvvetli bir immün yanıt oluşumu ve antikör miktarında artış gözlenir (Ridpath 2013). **NS3 (p80)**; serin proteaz, nükleosit trifosfataz (NTPase) ve RNA helikaz aktivitesi sayesinde (-) polariteli kalıp viral RNA ipliği sentezi ve enfeksiyöz virüs üretilmesinde görevlidir (Suzich ve ark. 1993, Warrener ve Collet 1995, Gu ve ark. 2000). NS3, pek çok moleküler filogenetik analiz ve ticari ELISA sistemlerinin dizaynı çalışmalarında hedef seçilmiştir (Deregt ve ark. 2005, Xia ve ark. 2007, Makoschey ve ark. 2007). Özellikle ticari ELISA sistemlerinde NS3'ün hedef alınmasında ki en önemli neden olarak inaktif BVDV aşılı ile aşılanma ardından kan serumu ve sütte NS3'e karşı oluşan antikörlerin, saha virüsü ile enfeksiyona göre düşük miktarda olması veya hiç meydana gelmemesi gösterilmektedir (Makoschey ve ark. 2007, Sarıkaya ve ark. 2011, Alvarez ve ark. 2012).

**NS4A/B**; yukarıda bahsedilen NS3'ün serin proteaz aktivitesi için kofaktörü olarak görev yaptığı ve NS4B'nin viral sitopatojenitede rol oynadığı tespit edilmiştir (Xu ve ark. 1997, Qu ve ark. 2001). Ncp BVDV, NS2-4A füzyon proteininin IFN- $\beta$  aktivasyonunda antagonist etki yaptığı belirlenmiştir. NS3/4A proteaz aktivitesi ile kaspaz 3 ve kaspaz 9 yollarını uyararak hücrel apoptozisin şekillenmesinde görev yaptığı rapor edilmiştir (Gamlen ve ark. 2010).

**NS5A**; 56-58 kDa ağırlığında ve viral replikasyonda görevli, yapısal olmayan hidrofilik bir fosfoproteindir. Pestivirüs NS5A ile hepatit C virüs NS5A'nın benzer şekilde N amino ucu bölgesinde çinko bağlanma rezidülerine sahip olduğu belirlenmiştir (Tellinghuisen ve ark. 2006). Ayrıca NS5A'nın NF- $\kappa$ B (nükleer faktör kappa b) aktivasyonunu baskıladığı ve BVDV patogeneğinde rol oynadığı rapor edilmiştir (Zahoor ve ark. 2010).

**NS5B**; 81-82 kDa ağırlığında, *in vitro* viral genom replikasyonunda ve transkripsiyonda RNA bağımlı RNA polimeraz olarak görev yapmaktadır (Reed ve ark. 1998, Steffens ve ark. 1999). Arg283, Arg285 ve Ile287 residüleri bu bölgenin en korunmuş amino asitleri olduğu belirlenir iken, Arg285 ve Ile287'nin pikornavirüslere yüksek benzerlikte olduğu rapor edilmiştir (Curti ve Jaeger 2013).

Viral genomun replikasyonu için duyarlı hücreye tutunması, penetrasyon, transkripsiyon, translasyon, viral RNA'nın üretimi, kurgu ve serbest kalma aşamalarının gerçekleşmesi gerekmektedir (Bolat ve Doymaz 2005). BVDV replikasyonunda; virion düşük yoğunluklu lipoprotein (Low Density Lipoprotein/LDL), CD46, CD81 ve heparan sülfat reseptörleri aracılığı ile hücreye tutunur (Maurer ve ark. 2004, Zezafoon ve ark. 2011, Li ve ark. 2013). BVDV'nin hücreye girişinde LDL reseptörünün önemli bir rolü olduğu bildirilmiştir. Anti-LDL reseptörü monoklonal antikor ile bloke edilir ise BVDV'nin sığır türbinata (Bovine Turbinate/BT) hücrelerinde enfeksiyonu inhibe edici etkiye neden olduğu rapor edilmiştir (Agnello ve ark. 1999, Krey ve ark. 2006). Pestivirüsler reseptörlere ve asidik pH'ya bağımlı olarak klattrin aracılı endositoz ile duyarlı hücreye giriş yapar (Lecot ve ark. 2005). Bu basamağı E1 ve E2 glikoproteinleri düzenler. E2 hücre tropizm, hücre yüzey reseptörlerine (CD46 veya CD81) bağlanma ve nötralizan antikor epitoplarını içermesi özelliğindedir (El Omari ve ark. 2013, Li ve ark. 2013).

Penetrasyon safhasında zarflı virionlar, endositik yol ile duyarlı hücrelere genomik RNA'yı transfekte ederler (Flores ve ark. 1996). Eklips safhası enfeksiyondan sonra yaklaşık 8-10 saat arasında sürmektedir. Genomik RNA sitoplazma içerisinde serbest kalarak transkripsiyon ve translasyon aşamaları düzenlenmeye başlar (Gong ve ark. 1996). Transkripsiyonda pozitif polariteli tek iplikli RNA (Single-Stranded RNA/ssRNA)'ya sahip olan BVDV'nin, virion içinde transkriptaza ihtiyacı yoktur. Tek bir polisistronik mRNA görevi gören genom, bir poliprotein sentezler. Bu proteinlerden biri RNA'ya bağlı RNA polimerazdır. RNA polimeraz, pozitif polariteli ssRNA'dan komplementer negatif polariteli ipliği sentezler. Bu negatif polariteli iplik, pozitif polariteli virüs genomunu üretmek için şablon olarak kullanılır. Viral genomun 5' ucunun "internal ribosomal entry site (IRES)" tutunması ile viral RNA, polisistronik olarak translasyona uğrar. Hücrenin enfeksiyonundan yaklaşık 3 saat sonra viral proteinler görülmeye başlar ve 12-14 saat içinde en yüksek seviyeye ulaşır. Translasyon neticesinde ortaya çıkan poliprotein proteaz aktivitesine sahiptir. Proteazlar belli tanıma bölgelerinden poliproteini daha küçük parçalara keserler (Lindenbach ve ark. 2007).



BVDV'nin serbest kalma safhasında hücreden çıkışı tomurcuklanma ile gerçekleşir. Golgi kompleksi veya granüllü endoplazmik retikulumun membranı ile plazma membranı füzyona uğrayarak virionlar ekzositozla hücre dışına salınır (Bolat ve Doymaz 2005, Sagar ve ark. 2008).

### 1.2.2. Epidemiyoloji

BVDV dünyanın pek çok bölgesinde yaygın olarak görülen ve ekonomik kayıplara neden olan sığırların viral enfeksiyonudur. BVDV enfeksiyonu ilk kez 1946 yılında Kanada'nın batısında "X Hastalığı" olarak adlandırılmıştır. Araştırmacılar bu hastalığın sulu-kanlı ishal, dehidrasyon, taşikardi, anoreksi, salya artışı, ağız ve burun mukozasında erozyonlar ile karakterize olduğunu bildirmişlerdir (Childs 1946). Aynı yıl Amerika'da Cornell Üniversitesinde görevli Olafson ve arkadaşları tarafından sığırlarda görülen ve "X Hastalığı" ile benzer semptomlar ile seyreden yeni bir salgın hastalığın varlığı bildirilmiştir. Yapılan çalışmalar ile bu yeni hastalığın lökopeni, süt veriminde düşme ve abort vakalarında artışa neden olduğu tespit edilmiştir. Hasta hayvanlardan hazırlanan inokulumdan yapılan kültür deneylerinde herhangi bir bakteri ürememesi sonrasında, bu hastalık etkeninin viral kaynaklı ve tekrar üretilebilir bir etken olduğu sonucuna varılmıştır (Olafson ve ark. 1946). Daha sonra bu yeni hastalık, sığırların "viral diarrhea" hastalığı olarak adlandırılmıştır.

1950'li yıllarda Iowa'da yaşayan çiftçiler daha önce karşılaşmadıkları yeni bir hastalığın varlığından bahsetmişlerdir. Bunun üzerinde Iowa Üniversitesinde görevli veteriner hekimler yeni vakaların daha önceden tanımlanan viral diarrhea hastalığı ile benzer semptomlu bir hastalık olabileceğini rapor etmişlerdir. Yapılan incelemeler sonucu bağırsak kanalında erozyonlar, hemorajiler ve az miktarda yangı hücresi infiltrasyonu tespit etmişlerdir. Belirlenen semptomlar eşliğinde bu sendroma "mucosal disease" adını vermişlerdir (Ramsey ve Chivers 1953). BVDV-1'in ilk kez 1954 yılında, BVDV-2 ise ABD ve Kanada'da 1990'lı yılların başında, yüksek

patojenik viral etken olarak izole edildiği bilinmektedir (Baker ve ark. 1954, Ridpath ve ark. 1994).

Ülkemizde BVDV enfeksiyonu ilk kez 1964 yılında, kültür ırkı ineklerde meydana gelen klinik hastalık bulgularına göre tespit ve teşhis edilmiştir (Öncül ve ark. 1964). Tüm dünyada yaygın olarak bulunan BVDV enfeksiyonunun prevalansı ülkelere göre değişiklik gösterir. BVDV enfeksiyonu vertikal ve horizontal olarak bulaşma gösterirken, seroprevalansın %60-85, persiste enfeksiyon oranının ise %1-2 arasında olduğu bildirilmiştir (Houe 1999). Ülkemizde BVDV seroprevalansı iller ve bölgeler bazında farklılık göstermek ile birlikte yapılan çalışmalar sonucu seroprevalansın %46-86 ve persiste enfekte (PE) sığır varlığının %0.07-4.9 olduğu rapor edilmiştir (Burgu ve ark. 1999, Ak ve ark. 2002, Burgu ve ark. 2003, Tan ve ark. 2006a, Yıldırım ve ark. 2011, Öztürk ve ark. 2012, Yılmaz ve ark. 2012, Avcı ve Yavru 2013). Tez kapsamında örnek alınan iller bazında Kırıkkale’de sığırlarda antikor varlığı %86.6, antijen varlığı %1.87-3.07 (Sarıkaya ve ark. 2012, Azkur ve ark. 2013a), koyunlarda pestivirüs antikor varlığı %74.51 ve antijen varlığı %4.37 (Azkur ve ark. 2011) olarak belirlenmiştir. Çorum’da sığırlarda antijen varlığı %16 (Sarıkaya ve ark. 2012), koyunlarda antijen varlığı %0-2.38 arasında değişmektedir (Yazıcı ve ark. 2012, Albayrak ve ark. 2012). Yozgat’ta sığırlarda antijen varlığı %0-2.5 (Oğuzoğlu ve ark. 2011, Sarıkaya ve ark. 2012) olarak tespit edilmiştir. Ankara’da ise mandalarda antikor varlığı %63.1 (Gür ve Akça 2008), sığırlarda antijen varlığı %0-27.5 (Oğuzoğlu ve ark. 2012, Sarıkaya ve ark. 2012) olarak belirlenmiştir.

BVDV hastalığının primer konakçısı sığırlardır. Sığırlar haricinde geyik, koyun, domuz ve birçok vahşi ruminant türünde pestivirüs antikorları belirlenmiştir (Nettleton 1990, Passler ve ark. 2007, Azkur ve ark. 2011, Kirchgessner ve ark. 2013). BVDV antijeni, sığır dışında, koyunlarda (Entrican ve ark. 1995), Asya mandalarında (*Bubalus bubalis*) (Craig ve ark. 2008), Tibet sığırında (*Bos poeaphagus grunniens*) (Mishra ve ark. 2008), alpakalarda (*Vicugna pacos*) (Foster ve ark. 2007b, Steffen ve ark. 2014), beyaz kuyruklu geyiklerde (*Odocoileus virginianus*) (Passler ve ark. 2010, İlha ve ark. 2012), develerde (Intisar ve ark. 2010, Gao ve ark.

2013) ve ak dağ keçilerinde (*Oreamnos americanus*) (Nelson ve ark. 2008) tespit edilmiştir.

BVDV'nin saçılmasında PE buzağılar önemli rol oynamaktadır. Bu tür hayvanlar klinik belirti olmaksızın vücut salgıları ile sürüdeki diğer hayvanları enfekte ederler. Enfekte hayvanlar kan, gözyaşı, oral ve nazal akıntıları, süt, dışkı, idrar, uterus akıntısı ile direkt olarak virüs saçarlar. İndirekt olarak kontamine yem, su, ekipman, canlı BVDV aşıları, veteriner malzemeleri ile virüs saçılır (Houe 1999).

BVDV'nin bulaşmasında doğal çiftleşme veya suni tohumlama uygulamalarında virüs ile enfekte boğaların kullanılması önemli bir etkidir. Enfekte boğa spermasında virüsün titresi 5-75 TCID<sub>50</sub>/ml olarak belirlenmiştir (Kirkland ve ark. 1991). Embriyo transfer uygulamalarının BVDV'nin bulaşmasında ki rolü pek çok araştırmada incelenerek ortaya konulmuştur (Waldrop ve ark. 2004, Perry 2007, Lalonde ve Bielanski 2011). Bielanski ve ark. (2013a) araştırmalarında BVDV ile enfekte embriyoların, embriyo transferi sırasında dünya hayvan sağlığı örgütü (World Organization for Animal Health/OIE) ve uluslararası embriyo transferi derneği (International Embryo Transfer Society/IETS) tarafından belirlenen embriyo yıkama işleminin BVDV'nin bulaşmasında etkisini incelemişlerdir. Bunun için BVDV ile persiste enfekte boğa sperması ile suni tohumlanan BVDV seronegatif ineklerden elde edilen embriyoların bir kısmı yıkama işlemine tabi tutulur iken, bir kısım embriyo yıkama işlemi yapılmadan direkt kullanılmıştır. Araştırmacılar yıkama işlemi gören embriyolar ile BVDV'nin alıcı (Recipient) sığırılara ve yavrularına bulaşmadığını tespit etmişlerdir ve bu işlemin embriyo transferinde uygulanması gereken önemli bir aşama olduğunu rapor etmişlerdir.

### **1.2.3. Patogenez ve Patoloji**

BVDV'nin oral ve/veya nazal yol ile bulaşmasını takiben giriş bölgesine yakın mukozada ve/veya gastrointestinal sistemde bulunan bağırsak kript hücrelerinde

primer virüs çoğalması meydana gelir. Salivasyon, nazal akıntılar, mukozal ülserasyon ile kript hücrelerinde, kolon, rektum ve ileum lenfoid dokularında nekrozlar şekillenir (Odeón ve ark 1999). Virüsün, fagositik hücreler ile lenfoid dokulara taşındığı ve bu bölgelerde primer çoğalma ardından viremi ile tüm vücuda yayılarak ateş, ishal, lökopeni ve immünosupresyona neden olduğu bildirilmiştir (Brownlie 1991). Lökopeni, T lenfositler ( $CD4^+$ ,  $CD8^+$ ), B lenfositler ve nötrofillerin sayısının azalması ile karakterizedir (Brewoo ve ark. 2007). BHV-1 ile BVDV miks enfeksiyon durumlarında ise buzağılarda  $CD4^+$  T ve B lenfositlerde enfeksiyondan 4 gün sonra azalma belirlenirken,  $CD8^+$  T lenfositlerin enfeksiyondan yaklaşık 6 saat sonra azaldığı rapor edilmiştir. Fakat monosit seviyesinde herhangi bir değişiklik görülmemiştir (Molina ve ark. 2013).

Akut enfeksiyon sırasında sığırların çoğu subklinik ve orta şiddette semptomlar (hafif ateş, lökopeni) göstererek seropozitif hale dönüşürler. Enfeksiyona karşı antikor oluşumu ilk olarak 2–4. günlerde tespit edilirken, 10–12. haftalara kadar artmaya devam eder. Enfeksiyondan sonra 39-56. günler arasında virüsün, mezenterik ve bronşiyal lenf nodüllerinden izole edildiği bildirilmiştir (Brownlie 1990). Spesifik patojenlerden arı (Specific Pathogen-Free/SPF) buzağıkların BVDV ile deneysel enfeksiyonu sonucu vücut sıvıları ve organlarda tespit edilen BVDV titresi incelenmiştir. Buna göre nazal akıntıda enfeksiyondan sonra 1-8. günlerde 2.5-3.2  $\log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/ml, tonsil, dalak, jejunum ve lenf yumrularında 2-9. günlerde 2.3-5.9  $\log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/gr, timus ve ileumda 3-9. günlerde 2.3-7.3  $\log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/gr, böbrekte 4-5. günlerde 2.3-3.5  $\log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/gr, kolonda 4-9. günlerde 2.3-4.7  $\log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/gr, akciğer, karaciğer, kolon, sekum, ovaryum ve testis dokularında 5-9. günlerde 2.3-5.8  $\log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/gr değişen titrelerde BVDV antijen varlığı tespit edilmiştir (Bruschke ve ark. 1998). Bazı şiddetli olgularda mukozal yüzeylerde ve organlarda peteşiyel kanamalar ve trombosit seviyesinde hızlı azalma ile şekillenen trombositopeni tablosu rapor edilmiştir (Corapi ve ark 1989, Corapi ve ark 1990).

BVDV-1 ve BVDV-2, PE sığırlarda merkezi sinir sisteminde serebellum, olfaktor lob, hipokampus ve serebral kortekse yerleşerek çoğalırken, morfolojik değişikliklere neden olmadığı bildirilmiştir (Fernandez ve ark 1989). BVDV-1 enfeksiyonu sonrasında dil ve özafagus mukozasında polimorfonükleer hücre

infiltrasyonu görülür. Bu durum mukozal hastalıkta daha şiddetli seyrederek sindirim sisteminde erozyonlar ve ülserleşmeler ile sert damak, diş etleri, dil ve özofagusta nekrotik plakların oluşumu ile seyrederek (Flores ve ark. 2000). Abomazumda kanama ve yaygın ülserler şekillenir. İleum, kolon ve sekumda hemorajik ve fokal ülserler ile peyer plaklarında nekrozlar görülür. Mezenterik lenf nodülleri ödemli ve şişkin olmakla birlikte hemorajiler oluşur (Bruschke ve ark. 1998). İncebağırsak submukozal ve mezenterik arteriollerinde dejenerasyon ve nekrozlar görülür. Damar duvarında ve perivasküler bölgede mononükleer hücre infiltrasyonu mevcuttur ve bu lezyonlar yalnızca incebağırsakla sınırlı olmayıp kalp, beyin ve adrenal kortekste de rastlanmaktadır (Blowey ve Weaver 2003).

Ovaryumların BVDV ile enfeksiyonu sonucu, oositler, foliküler sıvı, granülosa hücreleri ve tuba uterina hücrelerinden virüs izole edilir iken, BVDV'ye spesifik antikorların foliküler sıvıdan tespit edildiği rapor edilmiştir (Booth ve ark. 1995, Bielanski ve Dubuc 1995, Bielanski ve ark. 1998, Tsuboi ve Imada 1998, Galik ve ark. 2002). Ncp BVDV ile enfekte düvelerin ovaryumlarında enfeksiyondan sonra 6. ve 8. günlerde virüs izole edilmiştir. Viral antijen ise ovaryum korteksindeki stromal ve makrofaj benzeri hücrelerden enfeksiyondan sonra 6 ile 60. günler arasında belirlendiği bildirilmiştir (Grooms ve ark. 1998). BVDV ile akut enfekte boğaların testis dokusunda virüs, enfeksiyondan sonra 21 gün içerisinde izole edilebilir. Bunun yanında viral RNA spermada enfeksiyondan sonra 7. aya kadar tespit edilebilir (Givens ve ark. 2003).

BVDV'nin patogenezinde fötusun uterus içinde enfeksiyonunu takiben gelişen persistenlik önemlidir. Gebe sığırlar cp ve ncp BVDV ile enfekte olduklarında, fötusta enfeksiyon gelişir (Bruschke ve ark. 1998). Persistenliğin patogenezinin virüsün biyotipi ve gebelik zamanı belirler. Fötusta immünotolerans gebeliğin yaklaşık 110-120. günleri arasında gelişir.

Gebeliğin ilk trimesterinde cp biyotiple enfeksiyon, genellikle fötusta kongenital malformasyon, mumifikasyon, ölüm ve aborta neden olur (Brownlie ve ark. 1998). Fötus, immünotolerans gelişmeden önce ncp biyotip ile enfekte olur ise, etkene spesifik nötralizan antikorlar gelişmeyerek virüs self-antijen olarak algılanır

ve persiste enfeksiyon gelişir (Brownlie ve ark. 1989). PE buzağular doğumdan hemen sonra, kolostrum almadan önce incelendiklerinde spesifik antikor yönünden negatif fakat BVDV antijeni yönünden pozitif oldukları tespit edilmiştir (Brown ve ark. 1979, Kuhne ve ark. 2005). Kolostrum ile aldıkları maternal antikorların etkisi kaybolduktan sonra ise daha yüksek titrede ve sürekli ncp virüs saçmaya yaşam boyu devam ederler. Böylece sürüde persiste yavru doğumlarının artmasına yol açarlar. PE sığırlar tekrardan ncp biyotip ile enfekte olduklarında yanıtız kalmalarına rağmen diğer antijenlerle enfekte olduklarında immün yanıt geliştirebilirler (Kelling ve Topliff 2013). BVDV ile enfeksiyon gebeliğin 120. gününden sonra gerçekleşir ise kongenital bozukluklar serebellar hipoplazi, katarakt, retinal dejenerasyon, iskelet anomalileri, ve genel gelişim geriliği şekillenir (Done ve ark. 1980).

BVDV'nin otofaji ile MDBK hücrelerinde enfeksiyonun erken döneminde canlı kalabildiği belirlenmiştir. Yapılan çalışmada 3-MA ve wortmannin gibi otofaji baskılayıcılarının veya LC3 ile Beclin1 gibi otofaji ilişkili genleri hedef alan lentivirüs ile yapılan RNA interferensin (RNAi), BVDV NADL suşunun replikasyonunu baskıladığı tespit edilmiştir. Enfeksiyondan 18 saat sonra rapamisin uygulamasından sonra otofajinin indüklendiği ve virüsün replikasyonunda artış olduğu gözlenmiştir. Enfeksiyondan 18 saat sonra azalmaya başlayan 5' UTR mRNA seviyesinin otofagozom füzyonunu bloklayan ve lizozomal asidifikasyonu baskılayarak otofajiyi engelleyen klorokin ile tersine çevrildiği tespit edilmiştir. Buna göre otofajinin, MDBK hücrelerinde enfeksiyonun erken döneminde BVDV NADL suşu replikasyonu için pozitif bir etki meydana getirdiği rapor edilmiştir (Fu ve ark. 2013).

Mukozal hastalık (Mucosal Disease/MD) PE bireylerde ortaya çıkan yüksek mortaliteye sahip bir hastalık sendromudur. Ncp BVDV ile enfekte PE sığırların, cp BVDV ile enfekte olduklarında veya ncp BVDV'de meydana gelecek mutasyonlar sonucu mutlak ölümlerle sonuçlanan mukozal hastalık gelişir (Brownlie ve ark. 1989). Mutasyonlar genom tarafından kodlanan NS2-3, NS3 ve N<sup>pro</sup> gen bölgelerinde meydana gelen sekans insersiyonları, gen duplikasyonları ve delesyonlar ile tekli nükleotid değişiklikleri şeklinde gerçekleşmektedir (Tautz ve ark. 1994, Kummerer ve ark. 2000, Nagai ve ark. 2003). Cp BVDV biyotipi ile enfeksiyon şekillenmesi ve

ölüm arasında birkaç gün ile birkaç hafta arasında değişen kısa bir süre mevcuttur. MD nedeni ile ölen hayvanlarda yapılan otopside tüm gastrointestinal sistemde erozyonlar gözlenir, peyer plaklarında konjesyon ve hemoraji odakları ile kataral yangı bulguları vardır. Bağırsak içeriği koyu renkli ve kötü kokulu olup mukozası kalınlaşmıştır (Bolin 1995, Bielefeldt-Ohmann 1995).

#### 1.2.4. Klinik Belirtiler

Akut BVDV enfeksiyonları sığırlarda solunum, gastrointestinal, üreme, kardiovasküler ve merkezi sinir sisteminde çeşitli klinik semptomlara neden olmaktadır (Baker 1990). Abort, döl tutmama, erken embriyo ölümleri ve kongenital anomaliler en yaygın gözlenen üreme problemleridir. BVDV, ineklerde ovaryumları etkileyerek fonksiyon bozuklukları yanı sıra gonadotropin ve progesteron hormonlarındaki anormal değişiklikler ile birlikte infertiliteye neden olur (Grooms ve ark. 1998, Fray ve ark. 2002). Solunum ve sindirim sistemi mukozasının enfeksiyonu ardından yüksek ateş, lökopeni ve trombositopeni semptomları ile 15 gün kadar sürebilen kısa bir viremi görülür (Polak ve Zmudzinski 2000, Stoffregen ve ark. 2000).

Klinik olarak görülen hemorajik lezyonlar ve trombositopeni vakaları sporadik olarak Kanada ve Amerika gibi bazı ülkelerde bildirilmiştir (Corapi ve ark. 1990, Pellerin ve ark. 1994). Özellikle ncp BVDV-2 ile enfeksiyon sonucu trombosit fonksiyonlarında değişim tespit edilmiştir (Walz ve ark. 2001). BVDV'nin solunum sisteminin akut enfeksiyonları tam olarak anlaşılammakla birlikte patogenezinde solunum hastalıkları kompleksini (Bovine Respiratory Disease Complex) oluşturan diğer patojenler olan *Pasteurella multocida*, *Manheimia hemolytica*, parainfluenza-3 virüs, bovine respiratuvar sinsityal virüs ile birlikte değerlendirilmesi gerektiği bildirilmektedir (Fulton ve ark. 2000a, Ridpath 2010).

Föetal enfeksiyonlar duyarlı ve gebe ineklerin BVDV ile enfeksiyonu sonucu şekillenmektedir. Enfeksiyonun şiddeti; virüsün biyotipi ve virülensi yanında enfeksiyon sırasında gebelik dönemi gibi etkenlere bağlı olarak farklılık gösterir (Kelling ve Topliff 2013). Embriyonun uterusu tutunmadığı gebeliğin ilk 18 gününde BVDV zona pellusida'ya penetre olamadığı için enfeksiyon şekillenmediği belirlenmiştir (Moennig ve Liess 1995). Gebeliğin 30. gününden sonra ilk trimester süresinde meydana gelen BVDV enfeksiyonu PE buzağuların doğumuna neden olduğu rapor edilmiştir (Brownlie ve ark. 1998).

Gebeliğin 80-150. günlerinde ncp BVDV ile enfeksiyon sonucu föetal ölümler ve abortlar ile konjenital anomaliler şekillenmektedir. Meydana gelen anomaliler; merkezi sinir sisteminde (mikroensefali, serebral hipoplazi, hidrosefalus), gözlerde (katarakt, retinal dejenerasyon), solunum sisteminde (pleural, peritoneal ve pulmoner effüzyon), iskelet-kas sisteminde (artrogripozis, büyüme geriliği, perosomus elumbis) ve fötusun deri altında ödem birikmesi olarak belirlenmiştir (Done ve ark. 1980, Baker 1995, Fray ve ark. 2000, Otter ve ark. 2009, Blanchard ve ark. 2010, Karakaya ve ark. 2013).

Doğan PE buzağular zayıf görünümlüdür ve yaklaşık %50'sinde doğumdan sonraki ilk yılda ölüm gözlenir (McClurkin ve ark. 1984, Brownlie ve ark. 1998). BVDV, PE buzağuların beyin, timus, deri, akciğer, lenf nodülleri ve sindirim kanalı epitel ve lenfoid hücrelerinden izole edilebilir (Liebler-Tenorio ve ark. 2004). Vücut sıcaklığı ve solunum sayıları PE hayvanlarda normal seviyede olmasına rağmen, serumda tiroid hormonu {tiroksin (T4) ve triiodotironin (T3)} konsantrasyonunun enfeksiyondan 7-9 gün sonra normal buzağulara göre daha düşük olduğu belirlenmiştir (Larsson ve ark. 1995). Yapılan bir çalışmada gebeliğin 190. gününde sezaryen ile alınan PE fötuslar makroskopik anatomik yapıları incelendiğinde vücut ağırlıkları yanında kalp çapı ve sağrı bölgesi genişliğinin normal fötuslara göre daha az olduğu gözlenmiştir. Bunun yanında aynı çalışmada PE fötuslara ait femur kemiklerinin iç çapının ve medullar boşluğun belirgin bir şekilde daraldığı rapor edilmiştir (Smirnova ve ark. 2008).



Persiste enfekte boğalar spermaları ile yüksek miktarda virüsü ( $10^{7.6}$  CCID<sub>50</sub>/mL) çevreye yayarlar. Bu nedenle doğal ve/veya suni tohumlama için kullanılan boğaların BVDV yönünden test edilmeleri gerekmektedir (Polak ve Zmudzinski 1999). PE inekler, hastalığın yayılmasında potansiyel kaynak olup, *in vitro* fertilizasyon teknikleri için kullanılan biyolojik malzemeler (sığıır serum, sığıır hücre kültürleri) BVDV'den tamamen ari olmalıdır (Booth ve ark. 1995, Vanroose ve ark. 1998).

Mukozal hastalık sendromu, PE buzağıların doğum sonrası BVDV cp biyotipi ile süperenfeksiyonu ile şekillenebilmektedir. Bunun dışında enfeksiyona neden olan ncp biyotipinde meydana gelen mutasyonların da mukozal hastalığa neden olabildiği rapor edilmiştir (Fritzemeier ve ark. 1997, Smirnova ve ark. 2008). Mukozal hastalık, 6-24 ay yaş aralığındaki sığıırlarda düşük morbidite ve yüksek mortalite ile seyredir. MD'de klinik olarak anoreksi, yüksek ateş, ishal, kondüsyon kaybı ve ölüm gözlenmektedir (Brownlie ve ark. 1991). Bunun yanında burun, dudaklar, dil, rumen, retikulum ve abomazumda erozyon ve ülserler şekillendiği tespit edilmiştir (Kelling ve Topliff 2013).

### 1.2.5. İmmünite

BVDV ile enfekte hayvanlarda antijen varlığı lenfoid ve miyeloid hücreleride içeren farklı hücre türlerinde tespit edilebilir (Bruschke ve ark. 1998). Makrofajlar içerisinde replike olan cp ve ncp biyotipleri LPS'e cevap olarak oluşan superoksit anyon ve TNF oluşumunu azaltırken, ncp biyotipi nitrik oksit üretimini artırır. Bu durumun BVDV'nin immün baskılayıcı özelliğini gösterdiği belirtilmektedir (Adler ve ark. 1994, Adler ve ark. 1996, Peterhans ve ark. 2003). Ncp BVDV ile enfekte olan gnotobiyotik ve konvansiyonel olarak yetiştirilen buzağılarda enfeksiyondan sonra 1-7 gün içerisinde serumda artan oranlarda IFN- $\alpha$  ve  $\beta$  tespit edilmektedir. PE hayvanların serumunda IFN- $\alpha$  ve  $\beta$  tespit edilmediği bildirilmektedir (Brackenbury ve ark. 2003).

Toplam lökosit sayısının enfeksiyondan sonra 3. günde önemli oranda azaldığı ( $\leq 6 \times 10^9/\Gamma^{-1}$ ) belirlenmiştir. Takip eden 6-9 ve 12. günlerde kontrol grubuna oranla BVDV enfekte sığırlarda lökosit sayısı azalmaya devam etmektedir. Meydana gelen lökopeni tablosu belirgin şekilde lenfosit, monosit ve nötrofil miktarındaki düşüş ile ilişkilendirilmiştir. Bu aşamada lenfosit sayısı enfeksiyondan sonra 3-9. günler arasında belirgin şekilde azalırken ( $\leq 2 \times 10^9/\Gamma^{-1}$ ), 12.günde kısmen artış gösterdiği tespit edilmiştir. Monosit sayısı dalgalı bir seyir göstererek 3. ve 9. günlerde yapılan ölçümde azaldığı ( $\leq 0.5 \times 10^9/\Gamma^{-1}$ ), 6. ve 12. günlerde ise arttığı belirlenmiştir. Nötrofil sayısı 3. ve 12. günde azalma göstermektedir ( $\leq 2 \times 10^9/\Gamma^{-1}$ ).  $CD4^+$  T lenfosit sayısının enfeksiyonda sonra 1. günde yükseldiği ( $> 0.8 \times 10^9/\Gamma^{-1}$ ), 3-6. günlerde ise azaldığı gözlenmiştir.  $CD8^+$  T lenfositler 3-6. günlerde azalmasına rağmen ( $< 0.2 \times 10^9/\Gamma^{-1}$ ), 12.günde kontrol grubu ile aynı seviyede olduğu belirlenmiştir. B lenfositlerin ise 3-6 ve 9. günlerde yapılan ölçümlerde kontrol grubuna oranla azaldığı ( $< 0.4 \times 10^9/\Gamma^{-1}$ ) tespit edilmiştir. Aynı çalışmada serumda sitokin seviyeleri incelendiğinde IL-1 $\beta$  en yüksek seviyeye (1.21 ng/ml) enfeksiyondan sonra 9. günde ulaştığı belirlenmiştir. TNF- $\alpha$  seviyesinde enfeksiyondan sonra 1. günde artış olmasına rağmen kontrol grubu ile karşılaştırıldığında belirgin bir değişiklik gözlenmemiştir. Serumda IFN- $\gamma$  seviyesi enfeksiyondan sonra 1-3. günlerde, IL-12 seviyesi 3-6. günlerde en yüksek seviyeye ulaştığı belirlenmiştir. Serumda antiinflamatuvar sitokinlerden IL-4 seviyesinde BVDV ile enfekte grup ile kontrol grubu arasında istatistiksel fark belirlenemezken, IL-10 seviyesinde enfeksiyondan sonra 3. ve 12. günlerde artış olduğu gözlenmiştir (Molina ve ark. 2014).

Ncp BVDV ile enfekte monositlerde TLR3 ve TLR7 gen açıklanması cp biyotipe göre daha fazla olduğu rapor edilmiştir. TLR3 mRNA açıklanması enfeksiyonun erken döneminde baskın olmakla birlikte, enfeksiyondan 24 saat sonra TLR3 gen açıklanması azalır ve geç dönemde her iki biyotipte TLR7 mRNA açıklanması arttığı gözlenmiştir. Ncp BVDV ile enfeksiyondan 1 saat sonra IFN I gen açıklanmasında artış görülür. Sığırlarda enfeksiyondan 24 saat sonra ise IFN I gen açıklanmasında cp ve ncp biyotipleri arasında fark belirlenmemiştir. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ve IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinlerin seviyesi her iki biyotipte baskılanmaktadır. Th1 hücrelerden salgılanan IL-12 seviyesinde ncp BVDV ile

enfeksiyondan bir saat sonra TLR3 açıklanması ile doğru orantılı olarak artış gözlenmektedir. Fakat enfeksiyondan 24 saat sonra IL-12 ve IFN- $\gamma$  seviyesinde iki biyotip için değişim gözlenmemiştir. ASH hücrelerinde açıklanan CD80/CD86 kostimulatör moleküllerin her iki biyotipte enfeksiyondan 24 saat sonra daha az açıklandığı bildirilmiştir. Cp ve ncp BVDV'nin immün yanıtta kaçış mekanizmasında proenflamatuvar sitokinler yanında IFN I ve Th1/Th2 sitokin genlerinin açıklanması ile profesyonel antijen sunan hücrelerde CD80/CD86 açıklanma seviyesinin etkin rol oynadığı rapor edilmiştir (Lee ve ark. 2008).

Vücuda giren patojenler ile mücadelenin ilk hattını oluşturan monosit-makrofaj hücrelerinden, enfeksiyona karşı doğal immün yanıt sırasında çeşitli kemokinler salgılanır (Lim ve Murphy 2011). Yapılan araştırmalarda cp BVDV ile enfeksiyonun erken döneminde makrofaj hücrelerinde CCL ve CXCL ailesi kemokinlerin transkripsiyonel artışı meydana gelir iken, ncp BVDV için değişiklik şekillenmediği belirlenmiştir. Bunun yanında ncp BVDV ile enfekte makrofajlarda CCL4, CCL8, CXCL1, CXCL8 ve CXCL3 kemokinlerinin mRNA açıklanmasının, enfekte olmayan hücrelere oranla baskılandığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar ışığında ncp BVDV'nin immün sistemden kaçış mekanizması olarak makrofajlardan IFN I üretilmesini ve apoptozis oluşumunu baskılaması yanında kemokin aktivitesini de engellediği sonucu rapor edilmiştir (Burr ve ark. 2012).

BVDV'ye bağışıklıkta CD4<sup>+</sup> T hücreleri aktif rol oynamaktadır. T hücre cevabı cp biyotipi için enfeksiyondan sonra 3-4. haftada, ncp biyotipi için 6-8. haftalarda şekillenmeye başlamaktadır (Collen ve Morrison 2000). Yapılan çalışmalarda BVDV ile enfekte buzağılarda bronkoalveoler lavaj sıvısında anti-BVDV IgA ve anti-BVDV IgG miktarı ile CD4<sup>+</sup> ve CD8<sup>+</sup> hücre sayılarında artış olduğu belirlenmiştir (Silflow ve ark. 2005). Modifiye canlı ve ölü BVDV suşları ile hazırlanan aşılarda, sığırlarda antikor ve T hücre cevabını tetikler. Benzer şekilde BVDV-1a ve BVDV-2a suşları içeren modifiye canlı ve inaktif aşılarda antikor ve T hücre cevabı uyarılır (Platt ve ark. 2006, Platt ve ark. 2008). Buzağuların kolostrumda bulunan maternal antikorlar ile viral antijene karşı bağışıklıkları sağlanır iken, bu dönemde yapılan olası bir aşılamanın etkileri baskılanır. Buzağular

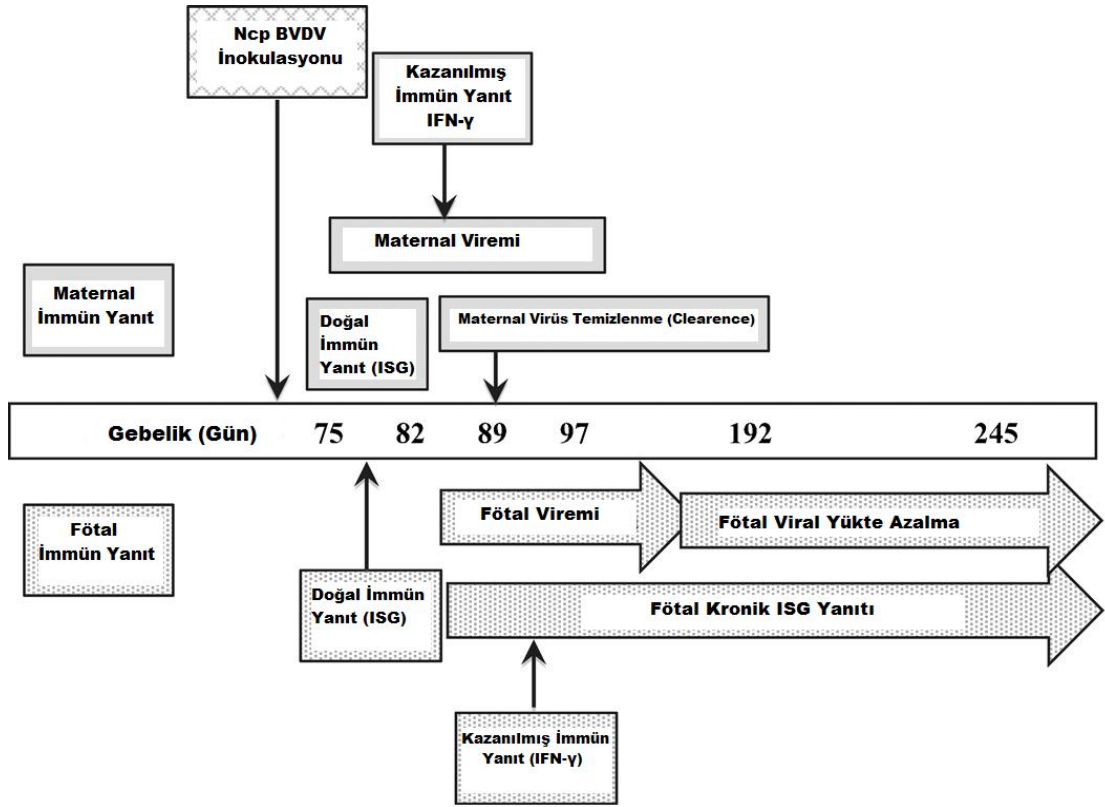
tarafından abzorbe edilen kolostral antikörlerin serumdaki yarılanma ömrü 22.8-23.1 gün arasında değiştiği belirlenmiştir (Fulton ve ark. 2004).

BVDV ile daha önce karşılaşarak veya aşı ile bağışıklık kazanmış yetişkin sığırlar ncp BVDV ile enfekte olduklarında hastalık semptomlarının daha hafif seyirli olduğu bildirilmiştir (Harding ve ark. 2002, Muller-Doblies ve ark. 2004). Gebe sığırlar ncp BVDV ile gebeliğin 150. gününden sonra enfekte olur ise fötüsta ve anada immün sistem virüse karşı immün cevap geliştirir ve geçici enfeksiyon (Transient Infection/TE) meydana gelir. Gelişen fötusun, gebeliğin 150. gününden önce ncp BVDV ile enfekte olması durumunda fetal immün sistem virüse karşı yanıt oluşturmadığını deneysel olarak göstermişlerdir (Stokstad ve ark. 2003, Smirnova ve ark. 2008). Ncp BVDV immün sistemden kaçış mekanizmasının temelini IFN-I yanıtının baskılanması oluşturmaktadır (Schweizer ve ark. 2006). IFN-I, miksovirus direnç faktörü 2 (MX2), 2'5'-oligoadenilat-sentetaz-1 (OAS-1), dsRNA bağlı protein kinaz (PKR) ve interferon stimüle edici genler (ISGs) gibi çeşitli genlerin açıklanmasını uyarır (Takaoka ve Yanai 2006). ISG15, antiviral aktiviteye sahip, hücrelerden salınarak ekstrasellüler sitokin görevi yapan veya ubiquitine benzer şekilde intrasellüler hedef proteinin C terminal bölgesi ile birleşen, IFN-I stümüle edici bir gendir. ISG15'in influenza, herpesvirus ve sindbis virüsleri için *in vivo* olarak farelerde antiviral aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir (Kim ve Zhang 2003, Lenschow ve ark. 2007). Ncp BVDV'nin, sığırlarda gebelik dönemine bağlı olarak maternal ve fetal immün sistem üzerine etkileri bilim insanları tarafından halen geçerliliğini koruyan bir araştırma konusu olduğu anlaşılmaktadır. Son dönemde özellikle ncp BVDV kaynaklı PE enfeksiyonunun oluşum mekanizması hakkında yapılan detaylı çalışmaların varlığı literatürde artış göstermiştir. Bu kapsamda yapılan bir çalışmada; PE fötüs oluşturmak için gebeliğin 75.gününde, TE fötüs oluşturmak için gebeliğin 175.gününde ncp BVDV ile düveler enfekte edilmiştir. BVDV RNA'sı enfeksiyondan 7 gün sonra (gebeliğin 82. ve 182. günleri) her iki gruptaki (PE-TE) düvelerde tespit edilmiştir. Enfeksiyondan 15 gün sonra (gebeliğin 90. günü) ise sadece PE gruptaki düvelerde BVDV RNA belirlenmiştir. Gebeliğin 190. günü her iki gruptaki fötüslara ait dalak dokusunda viral RNA belirlenirken, fetal kanda viral RNA sadece PE gruptaki fötüslarda tersine polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PZR) ile tespit edilmiştir. ELISA ile ise gebeliğin 75-190.

günlerinde her iki gruptaki düvelere ait kan örneklerinde BVDV antijeni belirlenemez iken, PE fötüs grubunda yüksek antijen varlığı tespit edilmiştir. Aynı çalışmada gebeliğin 75. günde enfekte edilen düvelerde nötralizan antikor varlığı ilk olarak enfeksiyondan 15 gün sonra (gebeliğin 90. günü) düşük titrede tespit edilmiştir ve gebeliğin 190. gününe kadar arttığı gözlenmiştir. IFN-I mekanizmasında önemli rol oynayan ISG15 mRNA konsantrasyonunun PE ve TE gruptaki düvelerde enfeksiyondan 3 gün sonra en yüksek seviyede olduğu tespit edilmiştir. Bunun yanında kandaki ISG15 mRNA varlığı her iki grupta son olarak enfeksiyondan 15 gün sonra (gebeliğin 90. ve 190. günü) belirlenmiştir. PE ve TE gruplarda bulunan fötüslara ait antiviral IFN-I aktivitesi incelendiğinde TE grup fötüslerde enfeksiyondan 15 gün sonra (gebeliğin 190. günü) serumda yüksek IFN-I (120 ünite/ml) biyoaktivitesi belirlenmiştir. PE gruptaki fötüslerde ise antiviral IFN-I tespit edilememiştir (Smirnova ve ark. 2008).

Smirnova ve ark. (2012) çalışmalarında ncp BVDV ile gebeliğin 75. gününde enfekte edilen gebe düvelere ait kanda BVDV RNA varlığı enfeksiyondan 7 gün sonra (gebeliğin 82.günü) belirlenmeye başlanmıştır. BVDV RNA'sı enfeksiyondan 22 gün sonra (gebeliğin 97.günü) tespit edilemeyecek düzeye gerilemiştir. Gebeliğin 75. gününde enfekte edilen düvelere ait fötüslerde ise BVDV RNA varlığı ilk olarak enfeksiyondan 14 gün sonra (gebeliğin 89. günü) tespit edilmiştir ve araştırmacılar tarafından son analizin yapıldığı gebeliğin 245. gününe kadar kanda mevcut olduğu belirlenmiştir. Aynı çalışmada kandaki ISG15 mRNA varlığı düvelerde ilk olarak enfeksiyondan 3 gün sonra (gebeliğin 78. günü) tespit edilmiştir. ISG15 seviyesi enfeksiyondan 7 gün sonra (gebeliğin 82. günü) en yüksek seviyeye ulaşmıştır ve enfeksiyondan 10 gün sonra (gebeliğin 85. günü) enfekte olmayan kontrol grubu ile aynı seviyeye gerilemiştir. PE fötüsta ise ISG15 mRNA varlığı ilk olarak enfeksiyondan 14 gün sonra (gebeliğin 89. günü) belirlenmesi yanında gebeliğin 192. gününe kadar kandaki varlığı tespit edilmiştir. Fötal kanda IFN- $\alpha$  ve IFN- $\beta$  mRNA varlığı çok düşük seviyede olduğu tüm gebelik döneminde gözlenmiştir. Buna rağmen karunkula ve kotiledonlarda ISG15 mRNA, IFN- $\alpha$  ve IFN- $\beta$  mRNA varlığı belirlenmemiştir (Smirnova ve ark. 2012).

Smirnova ve ark. (2014) çalışmalarında 2 farklı deney modeli dizayn etmişlerdir. Buna göre ilk modelde PE gruptaki düveler gebeliğin 75.günü, TE gruptaki düveler gebeliğin 175. günü ncp BVDV2 ile enfekte edilmiştir. Ardından gebeliğin 190. günü fötal kan ve amniotik sıvıda IFN- $\gamma$  konsantrasyonu ölçüldüğünde PE ile kontrol grubu arasında fark olmadığı, TE grubun diğerlerine göre yüksek olduğu belirlenmiştir. İlaveten TE gruba ait fötal dalakta IFN- $\gamma$  mRNA düzeyi diğer gruplara oranla yüksek olduğu tespit edilmiştir. İkinci modelde ise PE gruptaki düveler gebeliğin 75.gününde ncp BVDV2 ile enfeksiyon ardından, fötüsler gebeliğin 82, 89, 97,192 ve 245 günlerinde sezeryan ile alınmıştır. Buna göre IFN- $\gamma$  konsantrasyonu PE gruptaki düvelerde gebeliğin 82 ve 89. günlerde yükselmesine rağmen 97. gününde kontrol grubu ile aynı seviyeye gerilediği belirlenmiştir. IFN- $\gamma$  seviyesi PE gruba ait fötal kanda 97. günde en yüksek düzeye ulaşmasına rağmen gebeliğin ilerleyen günlerinde kontrol grubu ile aynı seviyeye gerilediği tespit edilmiştir. Fötal kanda IFN- $\gamma$  mRNA yoğunluğu gebeliğin 89 ve 97. günlerindeki ölçümde değişiklik gözlenmemesine rağmen gebeliğin 245. gününde belirgin bir artış olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre gebe düvelerin ncp BVDV ile enfeksiyonu sonucu aktive olan doğal ve kazanılmış immün cevap ile yaklaşık 3 hafta gibi bir sürede temizlendiği (clearance) belirlenmiştir. Fötusta ise virüsün plasentayı geçerek 7-14 gün içerisinde fötüsta enfeksiyon oluşturduğunu, ardından gelişen doğal ve kazanılmış yanıtın viral yükü azalttığı fakat virüsü elimine etmede başarısız olduğu, bu sayede persiste enfeksiyonun şekillendiği tespit edilmiştir (Smirnova ve ark. 2014) (Şekil 1.1).



**Şekil 1.1.** Persiste BVDV enfeksiyonu ile fütüsta gelişen doğal ve kazanılmış IFN-  $\gamma$  cevabı (Smirnova ve ark. 2014).

## 1.2.6. Teşhis

### 1.2.6.1. Klinik Teşhis

Buzağılarda görülen mumifikasyon, kongenital bozukluklar ve erken embriyo ölümleri yanında, yetişkin hayvanlarda görülen solunum bozuklukları, ateş, ishal, abort, döl tutmama sorunları, trombositopeni ve lökopeni semptomları BVDV'nin klinik teşhisinde yardımcı olmaktadır (Broaddus ve ark. 2009, Decaro ve ark. 2012).

### 1.2.6.2. Laboratuvar Teşhisi

Tam kan ve kan serumu ile dışkı, süt, idrar, sperma ve deri biyopsi örneklerinde BVDV varlığı direkt ve/veya indirekt yöntemlerle teşhis edilebilmektedir (Sandvik 1999, Renshaw ve ark. 2000, Grooms ve Keilen 2002).

#### 1.2.6.2.1. Antijen Teşhisi

BVDV suşları çeşitli hücre hatlarında çoğaltılabilir. Cp BVDV izolasyonu için ilk olarak fetal sığır böbreği hücrelerinden yararlanılmıştır (Gillespie ve ark. 1960). Sığır fetal akciğer, testis ve türbinata hücreleri virüs izolasyonunda kullanılan duyarlı diğer hücrelerdir (Edwards 1990). Pestivirüsler, doğal konakçıları olan sığırlar dışında, *in vitro* olarak koyun, keçi, geyik, bizon, tavşan, kedi, domuz ve maymun hücrelerinde üretilirken, insan, hamster, köpek ile bazı tavşan ve kedi hücrelerinin BVDV enfeksiyonlarına dirençli olduğu bildirilmiştir (Bolin ve ark. 1994). Hücre kültüründe fetal buzağı serumunun, BVDV antijeni ve spesifik antikordardan arı olması gerekmektedir. Bu tür kontamine materyalin kullanılması sonucu virüs izolasyonu gerçekleştirilemez veya yanlış pozitif sonuçlar elde edilir (Bolin ve ark. 1991, Sandvik 1999). Engellenemeyen kontaminasyon durumlarında, hücre üremesinin zayıf olması dezavantajına rağmen at serumu tercih edilebilir (OIE 2008). Virüs izolasyonu için enfekte hayvanların tam kan örneklerinden elde edilen lökositler, sperma, süt ve kan serumu örnekleri gibi materyaller kullanılabilir. Fakat PE buzağuların kan serumunda bulunan maternal antikordlar antijen varlığını maskeleyerek virüs izolasyonunu olumsuz etkilemektedir. Bu tür hayvanların ilerleyen yaşlarında tekrar teste tabi tutulmaları gerekmektedir (Edwards 1990, OIE 2008). Cp BVDV suşlarının MDBK hücre hattında enfeksiyonu takiben 24-48 saat



içerisinde belirgin sitopatik efekt (cpe) meydana getirdiği bildirilmiştir (Gao ve ark. 2011). Ncp BVDV suşları, negatif kontrol hücrelerden ayrılmadığı için florokrom veya enzimle işaretli BVDV'ye spesifik antikolar ile fikse edilerek inkübasyona tabi tutulmalıdır (Sandvik 1999).

Pestiviral antijenlerin tespiti için antijen ELISA, IFAT, immunperoksidaz (IP) ve akış sitometri yöntemleri kullanılmaktadır. Direkt “antijen yakalama (capture)” ELISA ile çok sayıda şüpheli örnekten pestivirüs antijeni varlığının belirlenmesinde kullanılan, virüs izolasyonuna göre ucuz, kolay ve hızlı bir yöntemdir (Kittelberger ve Pigott 2008). Test için potansiyel hedef antijenler olarak NS3 (p80) ve E<sup>ns</sup> (E<sup>0</sup>) proteinleri belirlenmiştir. E<sup>ns</sup>'nin enfekte hücrelerden serum, süt ve doku biyopsi örneklerinden PE hayvanların belirlenmesini sağlayacak kadar yeterli düzeyde salınması ve bunun için herhangi bir işleme gerek duyulmaması, kullanımı avantajlı hale getirmiştir (Sandvik ve Krogsrud 1995, Kampa ve ark. 2007, Dubovi 2013). IFAT testi ncp ve cp biyotiplerin teşhisinde kullanılmaktadır. Test için floresan konjugat olarak tavşan anti-sığır IgG veya keçi anti-fare IgG ile MDBK hücreleri kullanılabilir (Afshar ve ark. 1991, Greiser-Wilke ve ark. 1991). IP testi, özellikle suni tohumlama istasyonlarında spermadan BVDV tespitinde IFAT yönteminin yerini almıştır. Sığır türbinata, fetal akciğer ve MDBK hücreleri ile keçi anti-fare IgG konjugatı kullanılan test ile PE hayvanlarda BVDV antijeni, sperma, deri biyopsilerinden teşhis edilir (Horner ve ark. 1995, Deregt ve Prins 1998). Akış (flow) sitometri tekniği ile hücre kültüründeki gibi sitoplazma içerisinde lokalize olan viral antijenlerin tespit edilmesi yanında lökosit örneklerinden direkt teşhis yapılabilmektedir (Qvist ve ark. 1990). Araştırmacılar BVDV'nin teşhisinde akış sitometri'nin, virüs izolasyonuna göre daha duyarlı olduğunu ve PE hayvanların kan hücrelerinde BVDV'nin belirlenebildiği etkili bir teşhis metodu olduğunu rapor etmişlerdir (Qvist ve ark. 1991). BVDV *in vivo* olarak T, B ve antijen sunan hücreleri (monosit, makrofaj, dentritik hücreler) enfekte etmektedir. Akış sitometri tekniği ile PE ve PE olmayan hayvanların lökosit hücrelerinin immünofenotiplendirilmesi yapılabılırken, monosit, makrofaj ve dentritik hücrelerin aktiviteleri incelenebilmektedir (Glew ve ark. 2003, Brewoo ve ark. 2007).

BVDV'nin hızlı teşhisi ve genetik karakterizasyonu için RT-PZR uygulamaları geliştirilmiştir (Hertig ve ark. 1991). Kan, süt, salya ve doku biyopsi örnekleri teşhiste kullanılan materyallerdir (Dubovi 2013). Viral RNA'nın RT-PZR ile tespitinde RNA'nın ekstraksiyonu, komplementer DNA (cDNA)'nın tersine transkripsiyonu, spesifik oligonükleotid primerler ile DNA'nın çoğaltılması ve son olarak çoğaltılan ürünlerin görüntülenmesi aşamaları bulunmaktadır (Sandvik 2005). RT-PZR ile viral RNA'nın, ethidium bromide ile boyanmış jelden  $10^{-1}$ - $10^{-2}$  TCID<sub>50</sub> düzeyinde tespit limitlerine sahip olduğu bildirilmiştir (Hertig ve ark. 1991). Araştırmacılar geliştirdikleri yeni metotlar ile floresan probalar kullanarak viral nükleik asit tespiti yanında viral yük miktarını belirlemektedir. Real Time-PZR yöntemi ile PE sığırlardan alınan klinik örneklerde jel elektroforez işlemi kullanılmadan ve kontaminasyon riski en aza indirilerek BVDV genotipleri belirlenebilmektedir (McGoldrick ve ark. 1999, Kosinova ve ark. 2007). Pestivirüslerin genetik tiplendirilmesi için genellikle genomun mutasyonlar yönünden korunmuş 5' UTR, N<sup>pro</sup> ve E2 gen bölgelerinde meydana gelen farklılıklardan yararlanılmaktadır (Deng ve Brock 1993, Vilcek ve ark. 2004). Multipleks PZR yöntemi ile aynı reaksiyonda birden fazla farklı gen bölgesini hedef alan primer çifti kullanılarak, incelenen ampliconların genetik karakterizasyonu gerçekleştirilebilmektedir (Gilbert ve ark. 1999). BVDV'nin RT-PZR ve PZR yöntemleri ile kısa sürede antijen tespiti ve karakterizasyonunun yapılması gibi avantajlarına rağmen, virüs izolasyonu ve serolojik yöntemlere göre daha pahalı olması, teknik deneyim ve gelişmiş ekipman gerektirmesi gibi dezavantajları öne çıkmaktadır (Sandvik 2005).

#### **1.2.6.2.2. Antikor Teşhisi**

Antikor ELISA ve serum nötralizasyon BVDV'nin indirekt teşhisinde kullanılan yöntemlerdir. Serum nötralizasyon testi, BVDV E2 antijenine karşı oluşan spesifik antikorların tespiti esasına dayanmaktadır (Sandvik 1999, OIE 2008). Testin

gerçekleştirilmesi için gelişmiş laboratuvar koşullarına, konu ile ilgili tecrübeli çalışanlara ve 4-5 günlük bir süreye ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca hücre kültürlerinde meydana gelen pestivirüs kontaminasyonu nedeni ile laboratuvar çalışmalarında sorunların yaşanabildiği bildirilmektedir (Sandvik 2005).

ELISA testi, hücre kültürüne ihtiyaç duyulmadan, çok sayıda örneğin kısa sürede değerlendirilmesi ve ucuz olması nedeni ile en fazla tercih edilen teşhis yöntemidir. Ticari kitler NS3 proteini hedef alınarak hazırlanabilmektedir. İndirekt ve direkt olmak üzere iki farklı ELISA yöntemi kullanılmaktadır (Schrijver ve Kramps 1998). Nötralizasyon testi ile karşılaştırıldığında iki test arasında %96.7 uyumluluk olduğu belirlenmiştir. Bunun yanında ELISA testinin nötralizasyon testine göre %95.2 duyarlılığa ve %99.4 spesifiteye sahip olduğu belirlenmiştir (Horner ve Orr 1993). Bir başka çalışmada nötralizasyon testinin %6.25 oranında ELISA testine göre daha duyarlı olduğu rapor edilmiştir (Zarkov ve Jarullah 2012). İndirekt ELISA'nın duyarlılığı, test antijeninde oluşabilecek kontaminasyon ve serum antikoları ile çapraz reaksiyon sonucu olumsuz etkilenebilmektedir (Bhatia ve ark. 2008).

OIE tarafından standartları belirlenen BVDV serum nötralizasyon testine, son dönemde bilgisayar tabanlı görüntüleme ve veri analizi yöntemleri entegre edilerek yüksek içerik analizi (High-Content Screening/HCS) adı verilen yeni bir yöntem geliştirilmiştir. Klasik nötralizasyonun aksine HCS ile 16 saat gibi kısa bir sürede ve daha yüksek sensitivite ile sonuç elde edilmektedir. Bunun yanında klasik nötralizasyon yönteminde nötralizan antikolar en erken 9. günde tespit edilebilirken, HCS yönteminde enfeksiyondan sonra 3. günden itibaren nötralizan antikolar belirlenmektedir (Eschbaumer ve ark. 2014).

BVDV'nin serolojik teşhisinde agar jel immundifüzyon, komplement fikzasyon, indirekt immunfloresans ve western blot kullanılan diğer yöntemlerdir (Gutekunst ve Malmquist 1964, Ruckerbauer ve ark. 1971, Sandvik 1999).

### 1.2.7. Korunma ve Kontrol

BVDV enfeksiyonlarına karşı birçok ülkede korunma ve kontrol çalışmaları yürütülmektedir. Yapılan tüm mücadele programları başlıca aşı kullanılarak yapılan mücadele ve aşı kullanılmadan yapılan mücadele olarak ikiye ayrılabilir (EU 2001, Moennig ve ark. 2005).

Aşı kullanılmadan yapılan mücadele programı; serolojik testler ile sürü taramaları yapılması, enfekte sığırların tespiti ve sürüden uzaklaştırılması, enfekte olmayanların devamlı kontrolü, PE hayvanların tespiti ve sürüden uzaklaştırılması şeklinde gerçekleştirilmektedir (Lindberg ve Alenius 1999). Buzağılarda doğumdan sonra ilk altı aylık dönemde maternal antikorların miktarı azalmaktadır. Bu nedenle farklı yaştaki sığırlar ile buzağuların birlikte otlatılması, tavsiye edilmemektedir (Littlejohns ve Horner 1990). BVDV'nin sürülerde durumu belirlenirken, süt tanklarından alınan süt örnekleri veya farklı yaşlardaki sığır kan örnekleri spesifik antikor varlığı yönünde araştırılmaktadır (Niskanen ve ark. 1991, Bitsch ve ark. 2000). BVDV ile mücadele programlarında yetiştiricilere, sürülerini devamlı izleyerek geri bildirim yapmaları, biyogüvenlik önlemlerini uygulayarak PE sığırları sürüden uzaklaştırmaları gibi önemli görevler düşmektedir (Lindberg ve Alenius 1999). Genel olarak bu tür tarama ve teşhis protokolleri orta ve uzun vadede BVDV'nin eradikasyonunda olumlu sonuçlar vermektedir (Bitsch ve ark. 2000, Valle ve ark. 2005). Özellikle sürülerde PE buzağı ve bunların annelerinin karantina altına alınarak sürüden uzaklaştırılması, hastalığın yayılma riskinin önemli ölçüde azalmasını sağlar (Houe ve ark. 1995, Lindberg ve Alenius 1999).

Aşı kullanılarak yapılan mücadele programında ise ana hedef BVDV enfeksiyonuna karşı yeterli düzeyde bağışıklığı uyarmak, fötusun transplasental enfeksiyonunu önlemek ve PE yavruların doğumlarını azaltmaktır. BVDV enfeksiyonlarına karşı en etkili mücadele, aşı kullanılarak ve aşı kullanılmaksızın yapılan programlarının birlikte uygulanması ile gerçekleştirilmektedir (Moennig ve ark. 2005). BVDV ile mücadele için Bovilis (İntervet), Bovidec (Novartis), Bovi-

Shield, Pestigard, Rispoval (Pfizer), Vira Shield 6+Somnus gibi birçok ticari modifiye canlı ve inaktif aşı üretilmiştir. Ancak aşı programlarının seçilmesi ve uygulanması sırasında çeşitli sorunlar ortaya çıkmaktadır (Lindberg ve ark. 2006). Özellikle gebe sığırlarda, canlı virüs aşılarının uygulaması ile virüsün cp biyotipi plasentayı geçebilir (Ridpath ve Bolin 1995). İnaktif aşıları kullanmak ise güvenli olmasına rağmen, istenilen bağışıklığın elde edilmesi için yetersiz kalır. Canlı ve inaktif aşılarından hazırlanan karma aşı protokolünün kullanımı canlı aşının zararlı etkisini azaltabilir (van Oirschot ve ark. 1999). Sığırlarda BVDV'ye karşı etkili bir bağışıklığın sağlanması için birinci aşılamadan sonra 3 hafta içerisinde ikinci bir rapel aşı uygulaması yapılabilir. BVDV için yapılan aşılama ile ömür boyu bağışık görülmez, bu nedenle her yıl aşılamasının tekrarlanması tavsiye edilmektedir (Kelling 1996).

Son yıllarda insanlarda *Flaviviridae* ailesinde bulunan Hepatit C virüsü ile mücadelede pegile interferon  $\alpha$  (peg-IFN- $\alpha$ ), nükleosit analogu ribavirin ve virüse spesifik proteaz inhibitörü telaprevir veya boceprevir gibi antiviral kombinasyonları kullanılmaktadır (Butt ve Kanwal 2012). Fakat bu tür antiviral kombinasyonlarının pahalı olmasının yanında sınırlı oranda kronik hepatit C hastasında etkili olduğu ve bu sırada depresyon, grip benzeri semptomlar, yorgunluk ve hemolitik anemi gibi yan etkiler görüldüğü bilinmektedir (Delang ve ark. 2010, Lemon ve ark. 2010). BVDV ile mücadele için yapılan antiviral çalışmalarında sentezlenen “imidazo[1,2-a]pyridine”, “imidazo[1,2-b]pyridazine” ve “imidazo[1,2-a]pyrrolo[2,3-c]pyridine” gibi kimyasal komponentlerin virüsün MDBK hücrelerinde replikasyonunu baskılayıcı ve anti-BVDV aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir (Chezal ve ark. 2010, Enguehard-Gueiffier ve ark. 2013). Yapılan bir başka çalışmada ise “2-(2-benzimidazolyl)-5-[4-(2-imidazolino)phenyl]furan dihydrochloride (DB772)” komponentinin *in vitro* olarak BVDV'nin hücre kültüründe replikasyonunu engellediği, *in vivo* olarak buzağılarda BVDV enfeksiyonlarına karşı antiviral aktivitede olduğu belirlenmiştir. Fakat DB772'nin buzağılarda böbreklerde azotemi ve renal toksisite gibi önemli yan etkilerinin bulunduğu rapor edilmiştir (Newcomer ve ark. 2013).

Dünyada yaklaşık 170 milyon insanı etkileyen Hepatit C virüsü ile replikasyon siklusu, genetik organizasyonu ve gen ürünleri benzer olan BVDV'nin, Hepatit C'nin tedavisinde geliştirilecek yeni antiviraller için uygun bir virüs modeli olabileceği değerlendirilmiştir. Bu doğrultuda *Petromica citrina* deniz süngerinden izole edilen *Bacillus* spp.'nin %90-98 arasında BVDV'nin hücreye viral adsorbsiyonunu durdurucu antiviral aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Bu özelliğin ilerleyen yıllarda Hepatit C'nin tedavisinde kullanılabilecek umut verici bir yöntem olabileceği rapor edilmiştir (Bastos ve ark. 2013).

### 1.3. Bovine Herpesvirüs 1 (BHV-1) Enfeksiyonu

#### 1.3.1. Etiyoloji

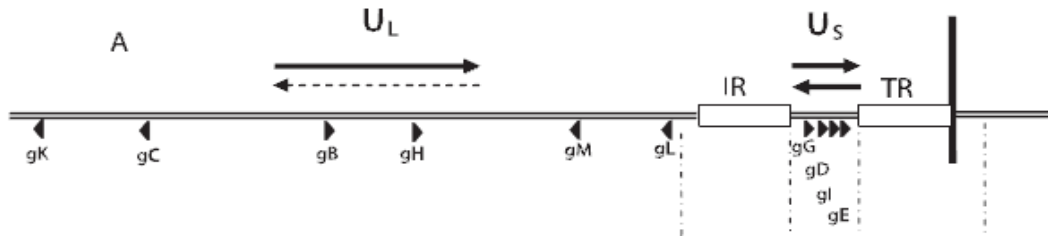
Bovine herpesvirüs 1 (BHV-1), Almanya’da 19. yüzyılda “Blaschenausschlag (coital veziküler ekzantem)” adıyla Büchner ve Trommsdorf tarafından tanımlanmıştır. Hastalığın viral kaynaklı olduğu ilk kez 1928’de Reisinger ve Reimann tarafından belirlenmiştir (Muylkens ve ark. 2007). 1950’lerin başına kadar ineklerde infeksiyöz pustular vulvovaginitis (IPV) ve boğalarda infeksiyöz pustular balanopostitis (IPB) semptomları ile gözlenen hastalık, Kuzeydoğu Amerika’da meydana gelen salgın ile infeksiyöz bovine rhinotracheitis (IBR) olarak isimlendirilmiştir (Schroeder ve Moys 1954, Graham 2013).

BHV-1 genomu, yaklaşık 135 kb büyüklüğünde çift iplikli düz yapıda bir DNA molekülüdür (Schwyzer ve Ackermann 1996, Schynts ve ark. 2003). Genom, yaklaşık 100 nm çapında ve 162 kapsomerden (150 heksamer ve 12 pentamer) oluşan ikozahedral simetrik bir kapsid ile çevrilidir. Nükleokapsid, tegument adı verilen materyal ile sarılmıştır. En dışta ise viral glikoproteinleri içeren tek katmanlı bir zarf bulunmaktadır (Pellett ve Roizman 2007).

BHV-1, *Herpesviridae* ailesinin *Alfaherpesvirinae* alt ailesinin *Varicellovirus* genusunda bulunmaktadır (ICTV 2013). BHV-1 izolatları genetik farklılık ve klinik semptomlardaki çeşitliliğe göre BHV-1.1, BVH-1.2a ve BHV-1.2b olmak üzere 3 farklı alt tipe ayrılmıştır (Misra ve ark. 1983, Metzler ve ark. 1985). BHV-1.1 ve BVH-1.2a solunum ve genital sistem bozuklukları ile abortlara neden olur. Bunun yanında BVH-1.2b abort vakalarında görülmemekle birlikte diğer alt tiplere oranla daha az patojen özelliktedir (Miller ve ark. 1991, Spilki ve ark. 2004a). BHV-1.3 ensefalitis sonucu ölen sığırlar ve abortte fötuslarda belirlenmiştir. 1992 yılında BHV-1.3 ismi Uluslararası Virüs Taksonomi Komitesi (International Committee on

Taxonomy of Viruses/ICTV) tarafından BHV-5 olarak değiştirilmiştir (Del Médico Zajac ve ark. 2010).

Herpesvirüslerin genomu, sekans özelliklerindeki farklılığa göre 6 genom sınıfına (A, B, C, D, E, F) ayrılmıştır (Pellett ve Roizman 2007). Bu sınıflandırmaya göre BHV-1 genomu, varicella-zoster virüs, pseudorabies virüs, equine herpesvirus 1, bovine herpesvirüs 5 ile birlikte “D sınıfında” yer alır. D sınıfı genom, 103 kb uzunluğunda “unique long” (U<sub>L</sub>) ve 32 kb uzunluğunda “unique short” (U<sub>S</sub>) olmak üzere başlıca iki kısımdan oluşmaktadır. D sınıfı genomlarda U<sub>S</sub> sekans bölgesi 11 kb uzunluğunda “internal tekrar (Internal Repeat-IR) ve terminal tekrar (Terminal Repeat-TR) sekansları ile çevrelenmiştir (Mayfield ve ark. 1983, Schynts ve ark. 2003) (Şekil 1.2).



Şekil 1.2. BHV-1 genom organizasyonu (Muylkens ve ark. 2007).

BHV-1 genomunda, *in vitro* replikasyon için esansiyel ve esansiyel olmayan 73 ORF bölgesi bulunur (Robinson ve ark. 2008). Genom tarafından 33 yapısal protein kodlanırken, bunların 13’ü viral zar, 10’u glikoproteinlerin kodlanması ile ilişkilidir (Liang ve ark. 1996). Kodlanan 10 glikoproteinden 6’sı U<sub>L</sub> bölgesinde; gK (U<sub>L</sub>53), gC (U<sub>L</sub>44), gB (U<sub>L</sub>27), gH (U<sub>L</sub>22), gM (U<sub>L</sub>10), gL (U<sub>L</sub>1) kodlanır iken, 4’ü U<sub>S</sub> bölgesinde; gG (U<sub>L</sub>4), gD (U<sub>L</sub>6), gI (U<sub>S</sub>7) ve gE (U<sub>S</sub>8) kodlanmaktadır (Muylkens ve ark. 2007). Viral genom tarafından kodlanan enzimler; ribonükleotid redüktaz (U<sub>L</sub>2, U<sub>L</sub>12, U<sub>L</sub>40), DNA polimeraz (U<sub>L</sub>42), dUTPaz (U<sub>L</sub>50), helikaz (U<sub>L</sub>52), protein kinaz (U<sub>S</sub>3) iken, düzenleyici proteinler; BICP0, 4, 22, 27 ve  $\alpha$ -TIF olarak tanımlanmıştır. Viral proteinler, konak hücrelerine tutunma ve füzyondan



başlayarak, hücreden hücreye yayılıma aracılık etmesine kadar tüm aşamalarda önemli görevlere sahiptir. Bunun yanında konakçı patogenezi, latentlik, immün yanıtın şekillenmesi ve interferenzde rol oynarlar (Schwyzer ve Ackermann 1996, Nandi ve ark. 2009).

BHV-1 genomunda bulunan ORF bölgelerinde 12 miRNA kodlayan, 10 miRNA geni tespit edilmiştir (Glazov ve ark. 2010). Yapılan son çalışmalarda BHV-1 ile BHV-5 arasında yalnızca bir konservatif miRNA'nın benzer olduğu belirlenerek, bu tür farklı miRNA desenlerinin genom yapısı benzer olan iki virüsün patogenezindeki farklılığın nedeni olabileceği bildirilmiştir (Tang ve ark. 2014).

BHV-1 genel olarak çevresel etkenlere dayanıklıdır. Ortam sıcaklığı, pH, ışık, nem oranında meydana gelen değişiklikler ve çeşitli kimyasallar virüsün inaktivasyonuna neden olan başlıca etkenlerdir. Virüs 4°C'de 1 ay stabil kalırken, 56°C'de 21 dakikada, 37°C'de 10 günde, 22°C'de 50 günde inaktif olur (Gibbs ve Rweyemamu 1977, Biswas ve ark. 2013). Virüs zarlı olduğu için kloroform, eter ve aseton gibi organik solventlere duyarlıdır ve %5'lik formalinde 1 dakikada inaktif olur. Bunun yanında %0.5 NaOH, %0.01 HCl<sub>2</sub>, %1 CaCl, %1 fenol ve %10 Lugol's iodin'e de duyarlıdır. BHV-1, pH 6.0-9.0 arasında stabil kalmaktadır (Griffin ve ark. 1958, Straub 1990, Nandi ve ark. 2009).

Virüsün hücreye girişinde ilk aşama gB, gC ve gD glikoproteinleri ile konak hücre yüzeyindeki glikoz aminoglikanlara (heparan sülfat) tutunmasıdır (Li ve ark. 1995). Daha sonra plazma membranı ile virion zarının füzyon yolu ile penetrasyonu gD, gB, gH ve gL glikoproteinleri aracılığı ile gerçekleşir (Liang ve ark. 1995, Meyer ve ark. 1998). Hücre membran fagositozu sonrası virüs hücreye endositoz yolu ile girer. Virüs hücre içine girdikten sonra kapsid ayrılır. Sitoplazmada serbest kalan DNA, konak hücre çekirdeğine geçer. Ardından transkripsiyon ve replikasyon aşamaları çekirdekte gerçekleşir. Virüs DNA'sı, konak hücrenin RNA polimeraz II enzimini kullanarak sentezi başlatır ve virüs genomu transkribe edilir (Roizman ve Taddeo 2007). Öncelikle tegümentte bulunan HSV-1 (Herpes simpleks virüs-1)  $\alpha$ -TIF (Alfa genlerin transindükleyici faktörü) olarak bilinen VP16 (virion protein) proteini yardımı ile en erken (Immediate Early/IE) genler eksprese edilerek "alfa"

proteinler sentezlenir (Roizman ve ark. 2005). Bu proteinler erken (Early/E) genlerin ekspresyonuna neden olurlar ve viral DNA sentezi için gerekli olan “beta” proteinler sentezlenerek viral DNA replikasyonu başlar. Sonrasında geç (Late/L) genler eksprese edilerek “gamma” proteinler sentezlenir. Beta gen proteinler, DNA replikasyonuna katılan enzim ve proteinlerin yapısını oluştururlar. Gamma proteinler ise kapsid ve zarf proteinleri gibi yapısal bileşenlerdir. Erken proteinler; DNA’ya bağımlı DNA polimeraz, deoksiribonükleaz, timidin kinaz ve ribonükleotid redüktaz’dır ve replikasyonda görevlidirler. Erken proteinler aynı zamanda hücresel mRNA ve DNA sentezini inhibe eder (Wirth ve ark. 1989, Levings ve Roth 2013a).

DNA replikasyon mekanizması tam olarak anlaşılacak şekilde, genellikle herpes simpleks virüs-1 model olarak kabul edilmektedir. Replikasyonda, beta proteinler sentezlenerek çekirdeğe lokalize olur ve DNA replikasyon kompleksi ile birleşir. İlk olarak bidireksiyonel şekilde devam eden ve kalıp olarak kullanılan linear genom, konkatemer DNA yapısını oluşturmak için daire şeklini alır. Replikasyon orijini olarak bilinen sekansa, U<sub>L</sub>9 (Orijin bağlanma proteini) bağlanır ve helikaz aktivitesi ile DNA sarmal yapısının ayrılmasını sağlar. Ardından ayrılmış DNA yapısına, ssDNA bağlanma proteini (ICP8), U<sub>L</sub>9 aracılığı ile bağlanır. Daha sonra U<sub>L</sub>9 ve ICP8, DNA replikasyon proteinlerinin replikasyon çatallına dahil olması ve teta replikasyonun gerçekleşmesini sağlar. Oluşan konkatemerik yapı, yeni sentezlenen DNA genomlarının baş-kuyruk şeklinde birleşmesi ile oluşur. Oluşan bu uzun yapı paketlenme aşamasında monomerik moleküller halinde kesilir. Yeni sentezlenen DNA, boş kapsidin içine girer. Nükleokapsid çekirdek zarından tomurcuklanarak zarf alır. Tübüler yapı veya vezikül içinde plazma membranına taşıyıp, ekstraselüler alana ulaşır. Ekstraselüler alanda fazla kalmayıp hücreden hücreye yayılır (Roizman ve ark. 2007, Muylkens ve ark. 2007). BHV-1 replikasyonu sığırlarda enfeksiyondan sonra 2 saat içinde başlar (Roizman ve ark. 2005). Virüs yaklaşık 8 saat içerisinde hücre içinde serbest kalır ve diğer hücreleri enfekte etmeye başlar. Viral replikasyonun tam siklusu enfeksiyonu takiben 15-18 saat kadar sürmektedir (Babiuk ve ark. 1996, Meurens ve ark. 2004).

### 1.3.2. Epidemiyoloji

BHV-1 enfeksiyonu dünyanın birçok ülkesinde, coğrafi konum ve yetiştirme özelliklerine bağlı olarak değişkenlik gösteren prevalans ve insidens oranları ile seyreden viral bir enfeksiyondur (Ackermann ve Engels 2006). Enfeksiyonun bulaşması direkt ve indirekt şekilde gerçekleşir. Direkt bulaşma genellikle enfekte hayvan ile doğrudan temas sonucu gerçekleşir iken, indirekt bulaşma kontamine ekipman ve semen vasıtası ile gerçekleşir (van Oirschot 1995, van Schaik ve ark. 2001). BHV-1'in bulaşmasında bir diğer yolun enfekte sperma kullanılarak yapılan suni tohumlama ve ardından yapılan embriyo transferi uygulamaları olduğu bildirilmiştir (Edens ve ark. 2003). Yapılan bir çalışmada embriyo transferinde embriyoların yıkanması için kullanılan domuz pankreatik tripsini yerine rekombinant sığır tripsini kullanılmıştır. Bu durumun BHV-1 ile enfekte embriyolar üzerinde dezenfektan etki gösterdiği ve enfeksiyonun önemli ölçüde engellendiği rapor edilmiştir (Bielanski ve ark. 2013b).

Serolojik çalışmalarda bir bölgede BHV-1 enfeksiyonu yaygınlığını etkileyen önemli faktörlerin; yaş, cinsiyet, sürü büyüklüğü ve yetiştirilme şekli (yerli besleme veya satın alma) olduğu bildirilmiştir. Buna göre kalabalık sürülerde, satın alınıp yetiştirilen yaşlı erkek hayvanların, bu enfeksiyon için daha riskli olduğu rapor edilmiştir (Boelaert ve ark. 2005).

BHV-1 enfeksiyonu için ana konakçı sığırlar olmak üzere, birçok *Artiodactyla* türünde (koyun, keçi, manda, deve) BHV-1 varlığı tespit edilmiştir. Doğal koşullarda koyunlar akut ve latent olarak BHV-1 ile enfekte olmasına rağmen sığırlara bulaşmada rol oynamaz (Hage ve ark. 1997). Tavşanlarda deneysel intrakonjiktival, intranasal, intraserebral ve intraperitoneal enfeksiyon çalışmaları yapıldığında, BHV-1'in tavşan modeli için intranasal inokulasyonun sistemik enfeksiyon şekillenmesi için en etkili yol olduğu belirlenmiştir (Meyer ve ark. 1996, Valera ve ark. 2013). Asya'da bulunan fillerde (*Elephas maximus*) BHV-1 ve 2 spesifik antikor varlığı belirlenmiştir (Bhat ve ark. 1997). Afrika'da bulunan fillerde

(*Loxodonta africana*) herpesvirüs kaynaklı akciğer nodüller ve proliferatif kutanöz lezyonların varlığı rapor edilmiştir (McCully ve ark. 1971, Jacobson ve ark. 1986). Antilop, vizon, bufalo, gelincik ve *Ornithodoros coriaceus* cinsi kenelerden BHV-1 izole edilmiştir (Porter ve ark. 1975, Taylor ve ark. 1982). *Musca autumnalis* cinsi sineklerde BHV-1 izole edilmesine rağmen, bu sinek türünün ise sığırlara mekanik bulaşmada rol oynamadığı rapor edilmiştir (Johnson ve ark. 1991).

BHV-1 enfeksiyonu tüm dünyada yaygın olarak bulunmaktadır. Belçika (Boelaert ve ark. 2000), Hollanda (Hartman ve ark. 1997), Almanya (Straub 1991), İtalya (Castrucci ve ark. 1997), Fransa (Gay ve Barnouin 2009), İngiltere (Crook ve ark. 2012), İrlanda (Cowley ve ark. 2011), Estonya (Raaperi ve ark. 2012) ve Amerika (Kirkbride 1992), İran (Roshtkhari ve ark. 2012), Hindistan (Trangadia ve ark. 2010) gibi ülkelerde farklı seroprevalans oranları ile sığırlarda varlığı rapor edilmiştir. Finlandiya, Avusturya, İsveç, Danimarka ve İtalya'nın Bolzano bölgesinde hastalığa karşı kontrol ve eradikasyon programları ile etkenin büyük ölçüde elimine edildiği bildirilmektedir (Scahaw 2000, Castrucci ve ark. 2002).

Ülkemizde BHV-1 varlığı ilk olarak 1971 yılında nötralizan antikorların tespiti ile ortaya konulmuştur (Erhan ve ark 1971). İlk virüs izolasyonu ise 1987 yılında gerçekleştirilmiştir (Burgu ve Akça 1987). Türkiye'de BHV-1 enfeksiyonu üzerine araştırmacılar tarafından yapılan serolojik çalışmalar seroprevalansın yüksek olduğunu (%50'nin üzerinde) göstermiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda, BHV-1 seroprevalansı yıllara göre incelendiğinde; 1981 yılında %54.46 (Akça 1981), 1994 yılında %68.1 (Çabalar ve Akça 1994), 1996 yılında %74 (Bilge 1996), 2006 yılında %19.5 (Tan ve ark. 2006), 2008 yılında %17.1 (Yeşilbağ ve Güngör 2008), 2009 yılında %51.63 (Gencay ve ark. 2009) ve %35.25 (Duman ve ark. 2009), 2012 yılında %9.25 (Ata ve ark. 2012), ve %43.5 (Öztürk ve ark. 2012), 2013 yılında %72.88 (Avcı ve Yavru 2013) olarak belirlenmiştir. Yapılan çalışmalar ile, İç Anadolu bölgesi dahil olmak üzere Türkiye'nin hemen hemen her bölgesinde değişen oranlarda BHV-1 varlığı ortaya konulmuştur.

### 1.3.3. Patogenez ve Patoloji

BHV-1'in konakçıya giriş ve replikasyonu solunum, genital kanal mukozası ve konjunktiva epitelyumunda gerçekleşir (Mars ve ark. 2000). Genital bulaşmada virüsle enfekte semen ile yapılan suni tohumlama uygulamaları yanında çiftleşme sırasında BHV-1 pozitif boğalar rol oynamaktadır (Kupferschmied ve ark. 1986, Wrathall ve ark. 2006). BHV-1 hedef hücreye penetre olduktan sonra yeni projen virüslerin üretilmesine başlanır (Hanon ve ark. 1996). BHV-1'in MDBK hücrelerinde neden olduğu cpe; hücre yuvarlaklaşması ve intranükleer inklüzyon cisimciklerinin artışı ile meydana gelir (Muylkens ve ark. 2007).

Virüs primer çoğaldığı yerden viremi yoluyla (kan, sinirler, enfekte hücre-hücre etkileşimi) organizmaya yayılır. BHV-1 buzağılarda doğumun ardından 14. günden itibaren başta adrenal bez olmak üzere karaciğer, akciğer, böbrek, ince/kalın bağırsaklar, rumen/omazum, trake/larenks, abomazum, kalp, özafagus, timus ve lenf nodülleri gibi pek çok dokuda tespit edilebilmektedir (Moeller ve ark. 2013). BHV-1 enfeksiyonu akut döneminde üst solunum yolunda mukozal hiperemi ve ödem ile seyreden rhinitis meydana gelirken, mukopurulent eksudat ve fokal bölgelerde nekrozlar birçok vakada belirlenmiştir (Yates 1982). Akciğer lezyonlarında bronşial ve bronşoilar epitelde dökülmeler ve nekrozlar görülür. Özafagus ve rumende yüzey epitelyumunda çok çekirdekli sinsityal hücreler, eozinofilik intranükleer inklüzyon cisimcikleri artışı ve nekrozlar belirlenir. Abomazum lezyonları mukozada multifokal nekrozlar, lamina propria bulunan bezler ve stromal bağ dokuda yıkımlanmalar ile karakterizedir. Adrenal bez, karaciğer, böbrek, lenf nodülleri ve timus paransiminde multifokal nekroz odakları yanında nötrofil ve nekrotik hücre debrisisi şekillenir. Kalpte küçük miyokardiyal nekroz odakları, intersitisyel bağ dokuda sınırlı ödem ve nekrotik odaklarda az miktarda nötrofilik infiltrat artışı gözlenebilir. Bağırsaklarda ise düz kas hücrelerinde nekrozlar yanında enfekte dokularda yangı gözlenebildiği rapor edilmiştir (Moeller ve ark. 2013).

BHV-1 ile enfekte dişi sığırlarda; vagina, vulva ve serviks mukozasında, erkek sığırlarda; penis ve prepisyum mukozalarında ödem ve veziküller gözlenir.

Meydana gelen lezyonlar immün yanıtın oluşumunu takiben, ortamda sekonder etkenlerin var olmadığı durumlarda kısa sürede ortadan kalkar (Wentink ve ark. 1993). Gebe sığırlarda BHV-1'in solunum formunun 15-64 günlük bir inkübasyonu ardından veya modifiye canlı BHV-1 aşılması sonucu gebeliğin üçüncü trimesterinde abortlara neden olabilir (Brower ve ark. 2008, Crook ve ark. 2012). İntrauterin ölen fötüslerin birçoğunda otoliz şekillenir ve 24-48 saat içerisinde dışarı atılırlar (Kennedy ve Richads 1964).

BHV-1, sığırların solunum hastalığı kompleksi (Bovine Respiratory Disease/BRD) veya taşıma hastalığı (shipping fever) olarak adlandırılan hastalık tablosunu oluşturan patojenlerden biridir. Stres faktörlerinin de aracılığı ile meydana gelen bu miks enfeksiyonun oluşmasında, BHV-1 dışında BVDV, parainfluenzavirüs-3 ve bovine respiratory syncytial virüs ile *Mannheimia haemolytica* veya *Pasteurella multocida* gibi bakteriyel etkenler bulunmaktadır (Yates 1982, Windeyer ve ark. 2012). Uzun mesafeler arasında sığırların bir arada taşınması esnasında ve sonrasında ölümlerin %59.4 oranında solunum sistemi enfeksiyonları kaynaklı olduğu belirlenmiştir (Moore ve ark. 2014).

BHV-1, üst solunum sistemi ve tonsil epitel hücrelerinde replike olduktan sonra sinir hücrelerini enfekte eder. Sinir sonlarına yerleşen virüs, nöro-aksonal transport aracılığıyla trigeminal ganglionlara ulaşır. BHV-1'in latent kalabildiği bir diğer bölge tonsillerdir. Virüs *in vivo* olarak bu bölgeden reaktif olarak tekrar enfeksiyona neden olabilmektedir (Winkler ve ark. 2000, Biswas ve ark. 2013). Latent dönemde viral DNA enfekte sığırdaki persiste kalmasına rağmen periyodik şekilde reaktif olarak enfekte olmayan sığırlara bulaşmaktadır. Bu dönemde enfekte nöronlarda ve tonsillerde açıklanan latentlikle ilgili gen (Latency-Related Gen/LRG) ve latentlikle ilgili proteinler, latent enfekte hücreleri apoptozisten korumaktadır. LRG'den köken alan transkriptler nöron çekirdeğinde birikerek viral IE genlerinin aktivitesini baskılar (Schang ve ark. 1996). Yapılan deneysel enfeksiyon çalışmasında latent enfekte sığır tonsillerinde BHV-1 DNA'sı yanında, LRG gen varlığı belirlenirken, LRG'nin antisensisi olan IE bICP0 geni ve ribonükleotit redüktaz tespit edilememiştir. Deksametazon uygulaması ile tonsil hücrelerinde apoptozisi uyandırır. Enjeksiyondan 24 saat sonra LRG genine rastlanmaz iken, IE bICP0 geni ve

ribonükleotit redüktaz varlığı tekrardan belirlenmiştir (Winkler ve ark. 2000). Sığırlar latent enfeksiyon döneminde BHV-1 gB ve gE yönünden seronegatif olarak tespit edildiği bildirilmiştir (Hage ve ark. 1998a). Canlı virüs suşları kullanılarak yapılan aşılama sığırlarda latent enfeksiyona neden olan diğer bir etkidir (Scahaw 2000).

Latent BHV-1 enfeksiyonunun reaktivasyonu, stres faktörleri ve kortikosteroid (deksametazon) uygulamaları sonucu meydana gelebilmektedir. Ganglionlarda oluşan reaktivasyon ardından BHV-1'in yeniden replikasyonu başlar. Replike olan virüs aksonlar aracılığı ile perifer dokulara immün yanıt oluşturmadan ilerler. Buradan mukoza, nasal sekresyon ve semen gibi sıvılar ile duyarlı konakçılara bulaşabilir (Muylkens ve ark. 2007). Sığırların taşınma sırasında meydana gelen stres faktörleri sonucu viral reaktivasyon, taşıma sonrası 1-3 gün içerisinde meydana gelmektedir (Thiry ve ark. 1987). Latent enfekte tavşanlarda deneysel deksametazon uygulamasından yaklaşık 15-18 saat sonra nöronlarda viral transkriptlere rastlanırken, 18-21 saat sonra ilk viral DNA tespit edilmiştir. İlaveten oküler sekresyonda latent virüsün ilk olarak 48-72 saat sonra belirlendiği rapor edilmiştir (Rock ve ark. 1992).

#### **1.3.4. Klinik Belirtiler**

BHV-1 enfeksiyonu sırasında görülen klinik semptomların şiddetini etkileyen faktörler olarak; BHV-1 suşunun virülensi, stres faktörleri, enfekte hayvanın yaşı, etkene dirençliliği ve taşıdığı sekonder etkenler sıralanabilir (Murphy ve ark. 1999). Görülen klinik semptomlar; solunum, konjunktival ve genital form olarak sınıflandırılır. Solunum formu genellikle subklinik seyirli olmak ile birlikte mortalite vakalarına yeni doğan ve genç sığırlarda sekonder bakteriyel ve viral etkenler ile miks enfeksiyon tablosu görülen durumlarda rastlanır (Hodgson ve ark. 2012). Akut

vakalarda inkübasyon periyodu 2-4 gün olmakla birlikte, yüksek ateş (40-42°C), nazal-lakrimal akıntı, iştahsızlık, hızlı ve sık soluma, nefes darlığı, inatçı öksürük, depresyon ve süt veriminde azalma rapor edilmiştir (Hage ve ark. 1998b, OIE 2010). Sekonder bakteriyel ve viral etkenler bu dönemde etkili olarak bronşitis ve pnömonilere neden olur. Akut vakalar 5-10 gün içerisinde hızla iyileşir ve hayvanlar ömür boyu virüs taşıyıcısı haline gelir (Nandi ve ark. 2009).

BHV-1 enfeksiyonunun konjiktival formunda tek veya çift taraflı yoğun lakrimal akıntı şekillenir. Fotofobi, kirpiklerin yağlanması ve göz kapaklarında görülen lezyonlar diğer semptomlardır. Bu aşamada sekonder bakteriyel etkenlerin bulaşması durumunda korneada keratit ve ülserasyonlar şekillenebilir (Turin ve Russo 2003). Konjiktival form, enfeksiyonun solunum formu ile eş zamanlı olarak devam etmektedir ve komplike olmayan vakalarda 5-10 gün içerisinde iyileşme gözlenir (Nandi ve ark. 2009).

BHV-1 enfeksiyonunun genital formunda, primer enfeksiyonu takiben ineklerde IPV ve boğalarda IPB meydana gelir. IPV tablosu ineklerde doğal çiftleşmeden 1-3 gün sonra sık işeme ve kuyruğun sürekli hareketi gibi karakteristik semptomlar ile ortaya çıkar. BHV-1 ile enfekte ineklerde ateş, depresyon, anoreksi semptomları yanında, kuyruk sürekli vulvaya bitişik durur. Vulva şişkin, hiperemiktir ve üzerinde 1-2 mm boyutunda püstüller vardır. Sekonder bakteriyel enfeksiyonun başlaması durumunda irinli akıntı gelmektedir. Lezyonlar genellikle 10-14 gün içerisinde ortadan kalkarken, bazı hayvanlarda purulent vaginal akıntılar birkaç hafta devam etmektedir (Turin ve Russo 2003, OIE 2010). Akut IPV uterusunda metritis yanında nekroz, ödem ve hemorajilere neden olur. Oviduktta lezyon gözlenmez iken ovaryumlarda corpus luteum kistik yapıdadır (Miller ve Van Der Maaten 1984). BHV-1 DNA'sı ovaryumda enfeksiyondan 22 gün sonra tespit edilmiştir (Mweene ve ark. 1996). Boğalarda IPB enfeksiyonundan 1-3 gün sonra penis ve prepisyum mukozasında IPV benzeri lezyonlar şekillenir. Bu formda bulaşma en çok enfekte boğaların doğal çiftleşme ve suni tohumlama merkezlerinde kullanılması sırasında mekanik yollarla gerçekleşir. Bu dönemde sekonder bakteriyel etkenler sıklıkla tespit edilebilmektedir. Enfekte hayvanlarda şekillenen lezyonlar 10-



14 gün içerisinde ortadan kalkar. Fakat bazı hayvanlarda libido azalması, ağırlı ereksiyon ve ejakülasyon görülebilir (Pastoret ve ark. 1982).

BHV-1 enfeksiyonu ile meydana gelen abort vakaları ilk olarak 1963 yılında Ormsbee tarafından rapor edilmiştir (Ormsbee 1963). Gebe sığırlarda inkübasyon süresi 15-64 gün olmak ile birlikte, meydana gelen abort vakalarına daha çok gebeliğin 4 ile 8. ayları arasında (üçüncü trimesterinde), fötal ölümlere ise gebeliğin ilk trimesterinde rastlanmaktadır (Crook ve ark. 2012). Virüs plasentadan enfeksiyonun ardından en erken 8 gün sonra izole edilebilir. Plasentada stromal ve perivasküler ödem, endotel hücrelerinde nekroz ve dökülmeler, koryoallantois ve villuslarda nekrozlar gözlenir. Plasentanın retensiyonu ve kotiledon dejenerasyonu gözlenen diğer lezyonlardır. Bu aşamada fötüsta otoliz şekillenirken, karaciğer ve akciğerde 1-3 mm büyüklüğünde beyazdan-griye değişen odaklar, böbrekte ödem ve hemorajiler gözlenir (Smith 1997). Araştırmacılar BHV-1’inde nadir olarak *Neospora caninum*’a benzer lezyonlar ile buzağılarda ensefalitlere neden olabildiğini rapor etmişlerdir (Brower ve ark. 2008).

### 1.3.5. İmmünite

Mikroarray yöntemi kullanılarak yapılan bir çalışmada akciğer bronş epitel hücrelerinin  $1 \times 10^6$  PFU BHV-1 ile enfeksiyonu sonrasında IL-6 seviyesinde 10 kat, TNF- $\alpha$  ve IL-1A seviyesinde 5 kat artış olduğu belirlenmiştir. Bunun yanında epitel hücreleri BHV-1 ve *M. haemolytica* ile birlikte enfekte edildiğinde NOS2A seviyesindeki artış 120 kat olur iken, IL-6 (>100 kat), IL-1A (>90 kat), CXCL2 (>40 kat), IL-8, CCL5 (30 kat) ve CXCL1 (20 kat) şeklinde artışlar olduğu saptanmıştır (N’jai ve ark. 2013). Sığır böbrek hücrelerinin (CRIB) BHV-1 ile enfekte edildiği çalışmada enfeksiyondan 8 saat sonra dokularda yangı ile ilgili IFI16 (Gamma-interferon-uyarıcı protein 16) ve NLRP3 (NOD-benzeri reseptör ailesinde, pürin domaini içeren 3) yapıların varlığı belirlenmiştir. Aynı çalışmada BHV-1 ile

enfeksiyondan 16 saat sonra kontrol grubuna oranla 10 kat daha fazla enfekte hücrelerde kaspaz-1 aktivitesi tespit edilmesine rağmen, kaspaz-1 aktivitesinin virüsün CRIB hücrelerinde çoğalmasında etkisinin olmadığını rapor etmişlerdir (Wang ve ark. 2014).

Primer virüs enfeksiyonunda TLR2 ve TLR1 reseptörleri ile tutunma sırasında viral glikoproteinlerin (gB, gH, gL), TLR9 ile endozom içerisinde viral dsDNA'nın, TLR3 ve TLR7 ile viral DNA'nın transkripsiyonu sonucu oluşan RNA'nın, antijen sunan hücrelere tanıtıldığı belirlenmiştir (Chew ve ark. 2009, Paludan ve ark. 2011). BHV-1 ile enfeksiyon sonrasında MDBK hücrelerinde TLR7 ve TLR8 aktive olur iken, lökosit hücrelerinde yalnızca TLR7 mRNA açıklanmasının arttığı tespit edilmiştir (Marin ve ark. 2014). TLR8'in transmembran ve sitoplazmik bölgeleri ile BHV-1 gD'nin ekstrasellüler domaininin direkt olarak hücre içine lokalize olmasında görevli olduğu anlaşılmıştır (Zhu ve ark. 2009). BHV-1 ile enfekte sığırlarda açıklanan TLR9'da 17 adet tek nükleotid polimorfizmi olduğu bunların 9'unun Holstein ırkı sığırlarda şekillendiği belirlenmiştir (Catalani ve ark. 2011).

Viral replikasyon sonucu enfekte hücrelerden, enfeksiyondan sonra 5. saatte IFN I (IFN- $\alpha$ ,  $\beta$ ) salgınır. IFN- $\alpha$  veya  $\beta$  komşu hücrelerin Jak/Stat reseptörlerine bağlanarak, hücre tutunmasından replikasyonun baskılanmasına kadar görevleri olan antiviral faktörlerin açıklanmasını sağlar (Ackermann ve ark. 2010). BHV-1 tarafından kodlanan bICP0 (enfekte hücre proteini 0) proteini IFN- $\beta$  sentezini engelleyerek, doğal bağışıklığın antiviral etkisini baskıladığı belirlenmiştir. Aynı çalışmada HSV-1 tarafından kodlanarak IFN sinyalini baskılayan ICP27 proteini homoloğu ve BHV-1 tarafından kodlanan bICP27 proteininin IFN- $\beta$ 1 ve IFN- $\beta$ 2'nin transkripsiyonel aktivitesini baskıladığı rapor edilmiştir (da Silva ve ark. 2012). bICP0 proteini IRF3 yıkımını ve IFN uyarıcı fonksiyonu baskılayıcı etki yaptığı bildirilmiştir (Jones 2009). Latentlik döneminde ise LRG tarafından kodlanan iki miRNA'nın, bICP0 açıklanmasını baskıladığı, bunun yanında IRF3 ile birlikte IFN- $\beta$  ve NF- $\kappa$ B aktivitesini uyardığı belirlenmiştir (Silva ve Jones 2012). IFN I, MHC I açıklanmasını, antijen sunumunu, dentritik hücrelerin aktivasyonunu sağlar. İlâveten NK hücrelerin uyarılarak virüs ile enfekte hücrelerin öldürülmesini

tetikleyerek viral enfeksiyonlara karşı direnci arttırır (Murphy ve ark. 2008). BHV-1 enfeksiyonlarında IFN I, ilk olarak enfeksiyondan sonra 5. saatte belirlenirken nazal sekresyon ve kanda 36-72. saatlerde en yüksek seviyeye ulaşır ve 8 gün etkinliğini korur (van Drunen Littel-van den Hurk ve ark. 1993, Levings ve Roth 2013a).

Makrofaj hücreleri BHV-1 enfeksiyonunun erken safhasında IFN- $\alpha$  üretimine katkıda bulunarak, virüsün yayılmasını sınırlandırır. Enfeksiyonun geç döneminde T hücrelerinden salgılanan IFN- $\gamma$  ile uyarılarak virüs ile enfekte hücrelerin öldürülmesinde görev alır. Makrofaj aktivitesi en erken akciğer paransimal hücrelerinin enfeksiyonundan 2 gün sonra belirlenirken, periferal kan hücrelerinin enfeksiyonundan 5-7 gün sonra tespit edilir (Tikoo ve ark. 1995, Levings ve Roth 2013a). Nötrofiller, patojen ilişkili reseptörler ve komplemente özgü reseptöre sahiptir. Sığır polimorfonükleer nötrofil hücreleri  $\alpha$ -defensin,  $\beta$  defensin ve kathelisidin kaynağı olarak, antikora bağımlı hücre aracılı sitotoksitede (Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity/ADCC) görevli en etkin hücreler olarak enfekte hücrelerin yıkılmasında hızla etki eder (Ackermann ve ark. 2010). NK hücreleri MHC'ye bağılı olmadan sitotoksitede görevli T ve B hücrelerinden köken alır. BHV-1 enfeksiyonlarında NK hücrelerinin öldürme aktivitesi, gB, gD ve gC hedef olmak üzere antijen sunumuna bağılıdır (Babiuk ve ark. 1996). Antijen sunan hücrelerden salınan IL-12 ile uyarılan NK hücrelerinden IFN- $\gamma$  üretilir (Jaime-Ramirez ve ark. 2011).

Kazanılmış immün yanıt oluşumu enfeksiyondan 5 gün sonra tespit edilmeye başlanır ve 7-10 gün içinde en yüksek seviyeye ulaşır. Bu aşamada yardımcı T hücreleri makrofaj ve NK hücrelerini aktive ederken, spesifik sitotoksik T hücrelerin çoğalmasını arttırır. Enfeksiyonun 10. gününden sonra nötralize edici antikorlar tespit edilebilir ve enfeksiyon büyük ölçüde sınırlandırılır (Schuster ve ark. 2011, Levings ve Roth 2013b). Kazanılmış immün cevap sırasında CD8<sup>+</sup> T hücreleri sitotoksik T hücreleri haline dönüşürler. Bunun yanında CD4<sup>+</sup> T hücreleri, yardımcı T hücreleri (Th1, Th2, Th17) ve Treg hücreleri haline gelirler. IL-12, IL-18, TNF- $\alpha$  ve IFN- $\alpha$  naif T hücrelerini Th1 hücrelerine dönüşümünü uyarır. TGF- $\beta$ , Treg hücrelerin oluşumunu tetikler iken, IL-6 Treg hücreleri baskılayarak, Th17 hücrelerini uyarır. Th17 hücreleri ise nötrofil cevabını arttırır. Th1 hücreleri IL-2, IL-

12, IFN- $\gamma$  salgılayarak makrofajların uyarılmasını sağlar. Th2 hücreleri ise IL-4, IL-5, IL-6 ve IL-10 salgılayarak B hücre aktivasyonu ve antikor cevabın oluşmasında görev alır (Murphy ve ark. 2008).

Gelişen hümmoral immün yanıt, virüs çoğalmasını durdurabilecek nötralizan antikorların salgılanmasını uyarır. Nötralizan antikorlar; virionları bir araya toplayarak enfeksiyöz merkezleri azaltılması, virionun hücreye tutunması için gerekli reseptörleri bloke edilmesi, virüsün füzyonunun hücre membranı veya endositik vezikülde baskılanması gibi mekanizmalar ile etki eder (Levings ve Roth 2013b). Zar glikoproteinlerinden gB, gC ve gD nötralizan antikorlar için en uygun uyarıcı ve hedef partikellerdir (Turin ve ark. 1999). Nötralize edici olmayan antikorlar ise virüs ile enfekte hücrelere bağlanarak bu hücrelerin antikor aracılı hücre sitotoksiste ile yıkımlanmasında görevlidir (van Drunen Littel-van den Hurk ve ark. 1993). Salgılanan IgM antikorları enfeksiyonun 7. gün itibaren belirlenebilmekte ve enfeksiyonun 40. güne kadar etkinliğini sürdürmektedir (Osorio ve ark. 1989). IgM salgılanmasından birkaç gün sonra IgA oluşur ve mukozal sekresyonda uzun süre etkinliğini korur. Yapılan araştırmalarda BHV-1 ile reenfeksiyon ve reaktivasyon sonrasında nazal, oküler ve genital sekresyonda yalnızca IgA'nın varlığına rastlanmaktadır. Böylece reenfeksiyon ve reaktivasyon durumlarında serumda bulunan IgA'nın BHV-1 için iyi bir indikatör olabileceğini bildirmişlerdir (Madic ve ark. 1995). IgG enfeksiyondan 7-10 gün sonra tespit edilmektedir (Kramps ve ark. 1994).

Oluşan antikor yanıt, primer enfeksiyonun elemine edilmesinde ve oluşabilecek reenfeksiyonların sonuçlarının sınırlandırılması dışında maternal bağışıklığın sağlanmasında önemli bir rol oynar. BHV-1 ile bağışık ineklerden doğan buzağuların doğumdan sonraki ilk 12 saatte kolostrum ile alınan maternal antikorlar, yavruyu 3-4 aya kadar sistemik ve letal hastalıklara karşı korumaktadır (Fulton ve ark. 2004). Maternal antikorların biyolojik yarı ömürleri 3 haftadır, fakat bazen hayvanlarda 9 aya kadar tespit edilebilir (OIE 2010).

### **1.3.6. Teşhis**

#### **1.3.6.1. Klinik Teşhis**

BHV-1 enfeksiyonunda solunum sistemindeki bulgulara ilave olarak infeksiyöz püstüler vulvovaginitis, balanopostitis, konjktivitis ve ensefalitis tablosu klinik olarak gözlemlenir. Yetişkin ineklerde meydana gelen süt veriminde azalma, infertilite ve abortlar ile boğalarda sperm kalitesinde azalmalarda BHV-1 enfeksiyonu varlığını akla getirebilmektedir. Buna rağmen hastalığın ve BHV-1 etkeninin kesin tanısı için laboratuvar testlerine ihtiyaç duyulmaktadır (OIE 2010).

#### **1.3.6.2. Laboratuvar Teşhis**

BHV-1'in laboratuvar teşhisi; tam kan ve kan serumu ile nasal sıvı, vaginal sıvı, sperma ile postmortem dokulardan direkt ve indirekt yöntemlerle teşhis edilebilir.

##### **1.3.6.2.1. Antijen Teşhisi**

BHV-1 izolasyonu enfeksiyonun akut döneminde alınan nazal, konjktival ve vaginal sıvı örnekleri, boğalardan alınan sperma ile fõtal karaciğer, akciğer, dalak, böbrek, lenf nodülü, tonsil ve solunum yolu mukoz membranından gerçekleştirilmektedir (Rola ve ark. 2005, OIE 2010, Biswas ve ark. 2013). Virüs izolasyonu için sığır böbreği, akciğer, testis, türbinata ve trake hücreleri ile hazırlanan primer ve sekonder hücre kültürü ile BHK-21, MDBK ve African green monkey cells (Vero) hücre hatları kullanılabilir (Saliki ve ark. 1997, Gu ve Kirkland 2008, Abu Elzein ve ark.

2008). Virüs varlığı 3 gün içerisinde mikropalak etrafında yuvarlaklaşmış hücrelerin üzüm salkımı gibi kümeleşmesi şeklinde meydana gelen karakteristik sitopatik efekt oluşumu ile tespit edilir. Bunun yanında ortamda dev hücreler ve sınıtya hücreleri oluşmaktadır (Nandi ve ark. 2009). Yaklaşık 7 günlük bir sürenin gerektiği metotta virüs izolasyonunun yapılabilmesi için toplanan numunelerin enfeksiyonun akut döneminde toplanması gerekmektedir (Rola ve ark. 2005).

Viral antijenlerin tespitinde immunfloresans (IF) testlerinden yararlanılmaktadır. İmmunfloresans testinde monospesifik antiserum, fluorescein isothiocyanate (FITC) gibi bir floresans boya ile işaretlenerek viral antijenlerin tespiti gerçekleştirilir (OIE 2010). Yapılan karşılaştırmalı bir analizde bu metot ile teşhisin hayvanlarda ateşin yükseldiği dönemde alınan örneklerde etkili olmasına rağmen enfeksiyondan sonra yaklaşık 11. güne kadar virüs izolasyonunun bu metoda göre daha duyarlı olduğu rapor edilmiştir (Edwards ve ark. 1983). Yapılan bir başka araştırmada oküler ve nazal sıvap örneklerinde BHV-1'in teşhisinde immunfloresans yönteminin virüs izolasyonuna göre daha az duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Aynı çalışmada BHV-1 salgınlarda her iki yöntem için oküler sıvap örneklerinin nazal örneklere göre daha etkili bir teşhis materyali olduğu rapor edilmiştir (Nettleton ve ark. 1983).

BHV-1'in direk teşhisi için kullanılan bir diğer yöntem ELISA'dır. Bu metot düşük maliyet ve kısa zaman içerisinde yüksek duyarlılıkli diagnostik bir test aracı olmasına rağmen viral antijen yoğunluğunun düşük olduğu örneklerde teşhiste yetersiz kalabilmektedir (Bashir ve ark. 2011). Antijenler genellikle monoklonal veya poliklonal antikorlar ile kaplanmış mikropaleytlar ile tespit edilir (Collins ve ark. 1988). Enfeksiyondan sonra 3-7 gün içerisinde nazal sekresyonda BHV-1 antijen titresi  $10^8-10^9$  TCID<sub>50</sub>/ml düzeyindedir. Bu dönemde elde edilen örnekler ile yapılan antijen ELISA sonuçları güvenilirliği yüksektir (Edwards ve Gitao 1987, OIE 2010).

BHV-1 enfeksiyonlarının PZR ile teşhisinde nazal sıvap, akciğer, trake, lenf nodülü, bademcik (tonsil), sakral-trigemal ganglia, sperma ve kan örnekleri kullanılmaktadır (Belak ve Ballagi-Pordany 1993, van Engelenburg ve ark. 1995, de Gee ve ark. 1996, Fuchs ve ark. 1999). BHV-1 teşhisinde araştırmacılar BHV-1

genomunda timidin kinaz (Kibenge ve ark. 1994), gB (Lyaku ve ark. 1996), gC (Galeota ve ark. 1997), gD (Wang ve ark. 2001) ve gE (Schynts ve ark. 1999) gen bölgeleri nükleotid dizilimlerine uygun primer çiftleri kullanarak farklı PZR yöntemleri geliştirmişlerdir. BHV-1 ile mücadelede kullanılmak üzere gE bölgesi silinmiş [gE deleted/gE(-)] marker aşılarda keşfedilmiştir (Kaashoek ve ark. 1994). gE(-) marker aşısı uygulamaları yaygınlaşmasını takiben araştırmacılar gE gen bölgesi hedef alan primer çiftleri kullanarak bir PZR yöntemi geliştirmişlerdir. Bu yöntem sayesinde vahşi tip virüs suşu kaynaklı doğal enfeksiyon ile gE bölgesi silinmiş marker aşısı suşunun ayrımı yapılabilmektedir (Schynts ve ark. 1999).

BHV-1 teşhisinde PZR yöntemi ile virüs izolasyonu karşılaştırıldığında PZR'nin 2-100 kat daha duyarlı olduğu ve izolasyona oranla kısa sürede sonuç vermesinden dolayı, iyi bir alternatif yöntem olarak belirlenmiştir. Ayrıca sperma örneklerinde BHV-1 DNA'sının tespiti çalışmasında 50 µl sperma içerisinde bulunan 3-5 DNA molekülü PZR yöntemi ile tespit edilebildiği rapor edilmiştir (van Engelenburg ve ark. 1993). Bir başka çalışmada  $10^5$ - $10^7$  lökosit örneğinde bir BHV-1 DNA kopyasının gB, gC ve gE PZR ile saptanabildiği belirtilmiştir (Fuchs ve ark. 1999). PZR metodu sayesinde BHV-1 ile BHV-5 başta olmak üzere diğer alphaherpesvirüslerin birbirinden ayrımı sağlanmaktadır (Ashbaugh ve ark. 1997, Ros ve ark. 1999). BHV-1 ve BHV-5 için sığırlarda ve farede deneysel enfeksiyonların teşhisinde Real time PZR uygulamaları kullanılmıştır (Abril ve ark. 2004). Real time PZR'nin standart PZR'den en önemli farkı, çoğaltılan PZR ürünlerinin amplifikasyon siklusu devam ederken hibridizasyon problemleri kullanılarak direkt teşhis edilmesidir. Bu sayede duyarlılık artarken kontaminasyon riski azalmaktadır (Mackay ve ark. 2002). Bunun yanında mide içeriği, plasental kotiledonlar, fetal dokular, vajinal akıntılar gibi klinik örneklerde viral yükün tespiti yapılarak klinik vakaları izleme ve teşhis çalışmalarında önemli veriler sağlanmaktadır (Niesters 2001, Mahajan ve ark. 2013).

### **1.3.6.2.2. Antikor Teşhisi**

Antikor (indirek veya bloklanmış) ELISA ve virüs nötralizasyon testleri, spesifik BHV-1 antijenleri kullanılarak hazırlanır. BHV-1'e karşı serumda oluşan spesifik antikorları belirleyerek seropozitif hayvanların teşhisinde yaygın olarak kullanılır (Kramps ve ark 1993). BHV-1 şüpheli hayvanlarda alınan serum ve süt örnekleri kullanılarak ELISA ile antikorlar belirlenebilmektedir (Wellenberg ve ark. 1998). BHV-1'in, gB, gE ve gC gibi antijen bölgeleri hedef alınarak birçok ELISA kiti dizayn edilmiştir (Das Neves ve ark. 2009). gB ELISA'nın diğer ELISA yöntemlerine göre daha duyarlı olduğu belirlenmiştir (Kramps ve ark. 2004). gE ELISA, gE bölgesi silinmiş (gE deleted) marker aşılardan aşılanmış sığırlar ile doğal enfekte sığırların ayrılması için kullanılan bir yöntemdir (van Oirschot ve ark. 1997). Araştırmacılar BHV-1.1 ve BHV-1.2 alttiplerinin ayrımını sağlayan ve sadece BHV-1.1 alttipi gC amino-terminal bölgesini tanıyan bir monoklonal antikor (MAb 71) keşfetmişlerdir (Rijsewijk ve ark. 1999). Daha sonra yapılan çalışmalar ile bu özellikten yararlanılarak geliştirilen gC ELISA yöntemi kullanılarak BHV-1 alttipleri %92 sensitivite ve %90 spesifite ile serum örneklerinden ayrımı sağlanmaktadır (Spilki ve ark. 2005).

Virüs nötralizasyon testleri, BHV-1 spesifik antikorları tespit etmede oldukça hassas olması nedeniyle, eradikasyon programlarında referans test olarak kullanılmaktadır. Virüs nötralizasyon testi için sığır böbrek, testis, akciğer ve trake hücreleri yanında MDBK hücre hatları kullanılmaktadır (OIE 2010).

### **1.3.7. Korunma ve Kontrol**

BHV-1 OIE'nin B listesinde bulunan enfeksiyonlardan birisi olup uluslararası düzeyde kontrol ve eradikasyon stratejileri geliştirilmektedir (OIE 2010). Uygulanan



programlar başlıca aşı uygulayarak veya uygulanmadan “test ve itlaf” ile “test ve uzaklaştır” esasına dayanmaktadır. Danimarka, Finlandiya, Avusturya, İsveç ve İsviçre’de BHV-1’in eradikasyonunda aşı kullanılmadan yapılan “test ve itlaf” uygulamaları ile yüksek başarı elde edilmiştir (Ackermann ve ark. 1989, Nylin ve ark. 1998, Kofer ve ark. 1999). Bu programlar kullanılarak BHV-1’in eradikasyonu çalışmaları sırasında uygulanacak biyogüvenlik uygulamaları önemli bir husustur. Yetiştirilmek üzere sürüye dahil edilecek sığırlardan, 4 haftalık karantina uygulaması sonrası seronegatif olanlara izin verilir. Bu aşamada enfekte olduğu belirlenen sığırlar, ömür boyu virüs saçıcısı olarak kabul edilir ve itlaf edilerek sürüden uzaklaştırılır (Noordegraaf ve ark. 2000). BHV-1’in kontrol ve eradikasyonu programında aşılama ve test uygulamaları Almanya, Belçika, Macaristan, İtalya ve Hollanda’da kullanılmaktadır (Tanyi ve Varga 1992, Nardelli ve ark. 1999, Trapp ve ark. 2003, Ackermann ve Engels 2006).

BHV-1 salgınlarının kontrolünde modifiye canlı, inaktif, marker ve multivalan olmak üzere birçok aşı türü kullanılmaktadır (Ackermann ve Engels 2006). Canlı virüs içeren aşilar intranazal yolla uygulandığında latent enfeksiyona veya latent virüsün reaktivasyonuna neden olabilir. Bunun yanında bu tür aşiların kullanılması abortlara neden olabilir. İnaktif aşilar abortlara, immunsupresyona ve latentliğe neden olmaması nedeni ile canlı aşilara göre daha güvenlidir. 10-14 gün ara ile 2 defa uygulaması önerilen inaktif aşilar ikinci dozdan sonra yaklaşık 7-10 gün içerisinde korumaya başlar (Patel 2005). Yapılan araştırmada modifiye canlı BHV-1 aşısı kullanıldığı durumlarda siyah japon sığırlarında vitamin E’nin antikor cevabını ve üretimini arttırıcı etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir (Otomaru ve ark. 2013). Marker aşilar bir veya daha fazla viral protein gen bölgesinin silinmesi (delesyon) ile elde edilir. İnaktif ve canlı attenüe aşilardan farklı olan bu marker aşilar ile doğal enfekte ve aşılanmış hayvanların birbirinden ayırımına olanak sağlanmaktadır (Oirschot ve ark. 1996). Pek çok Avrupa ülkesinde, gE(-) marker aşiların kullanımı temeline dayanan ve BHV-1’in eradikasyonunu amaçlayan kontrol programları başlatılmıştır (Scawah 2000). Multivalan aşilar BHV-1’in yanında parainfluenza-3, bovine respiratory sinsityal virüs ve BVDV antijenlerini içererek, farklı enfeksiyonlara karşı aynı anda korunma sağlanması için dizayn edilmiştir (Mars ve ark. 2000). Piyasada bulunan ticari aşilar; Rispoval (Pfizer), Hiprabovis-3

(Hipra), Bovilis IBRnMarker (İntervet), Vira Shield 6+Somnus olarak veteriner hekimler ve yetiştiriciler tarafından temin edilebilmektedir.

## 1.4. Bovine Herpesvirüs 4 (BHV-4) Enfeksiyonu

### 1.4.1. Etiyoloji

Bovine Herpesvirüs 4, ilk olarak 1963 yılında konjiktivitis ve solunum sistemi sorunları yaşayan buzağılarda belirlenmiştir (Bartha ve ark. 1966). Virion, *Herpesviridae* ailesi virüslerine benzer özelliklere sahiptir. Farklı bölgelerde keşfedilen yeni virüsün pek çok izolatu tespit edilerek, “Orphan Herpesvirüs”, “Movar-tip Herpesvirüs”, “Bovine Cytomegalovirüs” ve “Bovine Herpesvirüs-4” gibi değişik isimler ile rapor edilmiştir. 1987 yılında isimlendirmelerdeki farklılığın önlenmesi için virüse “Movar tip Bovine herpesvirus-4” ismi verilmiştir (Bartha ve ark 1987). 2000 yılında virüsün isimlendirmesi ICTV tarafından Bovine herpesvirüs-4 (BHV-4) olarak tescil edilmiştir (Fauquet ve ark. 2005).

BHV-4, *Herpesviridae* ailesinin *Gammaherpesvirinae* alt ailesinin Rhadinovirüs cinsinde bulunur (ICTV 2013). BHV-4, herpesvirüs B sınıfı genom organizasyonuna sahip, yaklaşık 145kb büyüklüğünde çift iplikli ve linear DNA'ya sahiptir (Ehlers ve ark. 1985). Virion, 90-100 nm çapında olan nükleokapsit ve tutunma, penetrasyon, tomurcuklanma ve saçılmadan sorumlu viral glikoproteinleri içeren zarf ile çevrilidir (Storz ve ark. 1984). Genom yapısında merkezde az miktarda G+C bazları içeren bir adet “uzun merkez bölgesi (Long Central Unique Region/LUR~110 kb)” ana sekans dizilimi bulunur. Bu dizilim iki tarafından fazla miktarda G+C bazları bulunduran ve suşlara bağlı olarak değişmekle birlikte 1450-2850 bp arasında büyüklükte tekrar bölgeleri (Polyrepetitive DNA/prDNA) ile çevrelenmiştir. Bu tekrar bölgelerinin linear genomda ortalama 15 civarında bulunduğu ve virüs replikasyonu sırasında bölünme ve paketlenme aşamalarında önemli rol oynayan bir element olduğu tespit edilmiştir (Broll ve ark. 1999). BHV-4'ün, tam genom sekans analizi sonucu 79 ORF bölgesi bulunduğu, bunların 62'sinin diğer rhadinovirüs ile benzerlik gösterirken 17'sinin BHV-4'e özgü olduğu

belirlenmiştir (Zimmermann ve ark. 2001). Yapılan restriksiyon endonükleaz analizleri sonucu Amerikan suşları DN-599, Avrupa suşları ise Movar 33/63 alt grubunda olacak şekilde BHV-4'ün iki alt grubu tanımlanmıştır (Bublot ve ark. 1990). Hindistan'da belirlenen M40 suşunun ise iki grubun dışında özellikte olduğu rapor edilmiştir (Thiry ve ark. 1992).

BHV-4 genomunda 29 yapısal protein varlığı tanımlanmıştır ve bunlardan 4'ü karakterize edilmiştir (Thiry ve ark. 1992). İlk olarak gp6/gp10/gp17 (150kDa/120kDa/51kDa), gp10-gp17'nin disülfid ve gp6'nın kovalent olmayan bağlar ile birbirine bağlanması sonucu oluşmuştur. Tüm herpesvirüslerde korunmuş bölge özelliğinde olan bu yapı, konak hücreye girişte rol oynamaktadır. İkinci olarak, gp11/VP24 (120kDa/16,5kDa) kovalent olmayan bağlar ile bağlanan ve yapısında en az altı nötralize edici epitop bulunduran bir komplekstir (Dubuisson ve ark. 1989a). Sonraki yıllarda virionun tutunmasında görevli olduğu anlaşılan gp8 (135kDa) ile enfeksiyondan yaklaşık 8 saat sonra tespit edilen ve enfekte hayvanın immün sistemi tarafından hedef alınan gp1 (>300kDa) gibi büyük glikoproteinler tanımlanmıştır (Dubuisson ve ark. 1992a, Dubuisson ve ark. 1992b). Bunların dışında gp110 (gH) ve hücreye girişte endositozisi tetikleme özelliğinde olan gL keşfedilmiştir (Lomonte ve ark. 1997, Lete ve ark. 2012).

*In vitro* virüs replikasyonu sırasında BHV-4'ün hücreye bağımlı ve yavaş üreme karakterinde olduğu anlaşılmıştır (Storz ve ark. 1984). BHV-4 için özellikle hücre bölünmesi esnasında S fazında olan hücrelerde viral DNA replikasyonu ve protein sentezi oranında artış gözlenmektedir (Vanderplasschen ve ark. 1995). Replikasyon siklusunda IE (En erken/Immediate Early), E (Erken/Early) ve L (Geç/Late) olmak üzere başlıca 3 protein sentezlenmektedir. IE proteinler (IE1-IE2) viral genomun kapsitten ayrılarak hücre nükleusu içine bırakılması ardından hücre RNA polimeraz II kullanılarak transkribe edilir. IE1, 1.7 kb büyüklüğünde splicing-RNA özelliğindedir ve 5' ucu yakınında 3 adet küçük ekson bulundurur. E proteini, IE proteinlerin sentezlenmesi ardından enfeksiyondan sonra yaklaşık 4-8 saat sonra açıklanırken, nükleotid metabolizması ve DNA replikasyonunda görev alır. L protein açıklanması ise IE ve E proteinleri ile viral DNA sentezine bağlı olarak en son şekillenir (Chang ve van Santen 1992, Vanderplasschen ve ark. 1995). 1.8 kb spliced

RNA yapısındaki IE2 geni tarafından kodlanan 61 kDA büyüklüğünde proteinin amino asit dizilimi, Epstein-barr virüs transaktivatör R proteini, herpesvirüs saimiri, equine herpesvirüs 2, murine herpesvirüs 68 ve Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus ile yüksek benzerlik göstermektedir. Bu benzerlikler sonucu araştırmacılar BHV-4'ün ruminantlar dışında duyarlı olmayan türlerin hücrelerinde replike olabilmesinde IE2 geninin kilit role sahip olabileceğini speküle etmektedirler (van Santen 1993, Donofrio ve ark. 2004). BHV-4'ün timidin kinaz (TK) geni 1335 nükleotid içermektedir. TK geni tarafından kodlanan 445 amino asit büyüklüğünde proteinin amino asit sekansının *Gammaherpesvirinae*'de bulunan Epstein-barr virüs ve HSV ile farklılıklar göstermesine rağmen, alfaherpesvirüsler ile karşılaştırıldığında yüksek homoloji tespit edilmiştir (Lomonte ve ark. 1992, Thiry ve ark. 1992). TK, ORF21 tarafından kodlanırken IE2 gen ürünleri tarafından transaktive edilir (Zhang ve van Santen 1995). Ayrıca TK, BHV-4'ün tespiti için PZR kullanılan pek çok moleküler tabanlı çalışmada hedef gen bölgesi olarak seçilmektedir (Wellenberg ve ark. 2001b, Donofrio ve ark. 2009).

BHV-4 enfeksiyonundan 24 saat sonra hücrelerin yuvarlaklaşması ve monolayer yapının bozulması şeklinde hücrelerde cpe gözlenir. Enfeksiyondan yaklaşık 72 saat sonra hücreler tamamen yüzer hale gelir (Peshev ve Christova 2013). BHV-4, sığırlardan elde edilen; böbrek, testis, akciğer, deri, meme bezi, nazal türbinata, endotel hücreleri, B-T lenfositleri, histiosit, tiroid, embriyonal trakea hücreleri ve fetal kemik iliği hücrelerinden hazırlanan primer hücre hatları yanında, MDBK, GBK (Georgia sığır böbrek), BEK (Sığır embriyonik hücreler) ve EBL (Embriyonik sığır akciğer) gibi devamlı hücre hatlarında çoğaltılarak izole edilebilir (Donofrio ve van Santen 2001). Bunun yanında BHV-4 bufalo, koyun, keçi, kedi, köpek, tavşan, hindi, at, rat, fare ve hamster gibi farklı türlerin hücrelerini enfekte edebilir (Egyed 2000). BHV-4'ün insan hücrelerini enfekte edebildiği ve bazı hücre hatlarının (Glioblastoma, MRC-5, WI-38, HELA) duyarlı olduğu araştırmacılar tarafından farklı çalışmalarda rapor edilmiştir (Egyed ve Bartha 1998, Donofrio ve ark. 2000b, Gillet ve ark. 2004). Bu duruma rağmen henüz insanlarda rapor edilmiş BHV-4 vakasının bulunmamasının, virion yüzeyinde açıklanan konak hücre epitoplardan biri olan "Gal $\alpha$ 1-3Gal" a karşı antikorlar aracılığı ile aktive olan

komplementler sayesinde, insan serumunun BHV-4'ü nötralize etmesi kaynaklı olduğu tespit edilmiştir (Machiels ve ark. 2007).

#### 1.4.2. Epidemiyoloji

BHV-4'ün doğal konakçıları sığırlar (*Bos Taurus* ve *Bos indicus*) olmak ile birlikte virüs, farklı ruminant türlerinde; Afrika bufalosu (*Syncerus caffer*), Amerikan bizonu (*Bison bison*) ve koyunda belirlenmiştir. Sporadik seyirli enfeksiyonda izolasyonlar bazı geyik türleri, kedi, aslan ve baykuş maymun (*Aotus trivirgatus*) türlerinde gerçekleştirilmiştir. Deneysel olarak keçi, tavşan, guinea piglerin BHV-4 enfeksiyonlarına duyarlı oldukları bildirilmektedir. *In vitro* olarak BHV-4'ün primer koyun, keçi, domuz, kedi, köpek, tavşan, geyik, at, hindi, tavuk, gelincik, fare ve maymun hücre hatlarında çoğalabildiği belirlenmiştir (Todd ve Storz 1983, Rossiter ve ark. 1989, Moreno-Lopez ve ark. 1989, Bublot ve ark. 1991, Egyed ve ark. 1997, Kalman ve Egyed 2005, Donofrio ve ark. 2011). Yapılan deneysel çalışmalar ile hamster, rat ve transgenik farelerin (IFNAR<sup>-/-</sup> /IFN alfa ve beta reseptörü bloke edilmiş) BHV-4'e karşı duyarlı olduklarına dair herhangi bir işaret gözlenmemiştir (Franceschi ve ark. 2011). *In vitro* olarak insan hücre hatlarında BHV-4'ün replike olabildiği ve izole edilebildiği yapılan çalışmalarda rapor edilmiştir (Egyed 1998; Donofrio ve ark. 2000b, Gillet ve ark. 2004).

Dünyanın pek çok yerinde yapılan çalışmalar ile BHV-4'ün %30-84.37 arasında seropozitiflik ile seyrettiği saptanmıştır (Metzler ve Wyler 1986, Truman ve ark. 1986, van Opdenbosch ve ark. 1988, House ve ark. 1990, Yoshima ve ark. 2005, Graham ve ark. 2005, Monge ve ark. 2006, Fridgut ve Stram 2006, Nikolin ve ark. 2007, Fichtelova ve Kovarcik 2010). Ülkemizde yapılan çalışmalarda BHV-4'ün sığırlar arasında %20.22-69.6 oranında seropozitiflik ile seyrettiği belirlenmiştir (Bilge Dağalp ve ark. 2007, Gür ve Doğan 2010, Kale ve ark. 2011, Yıldırım ve ark.

2011, Avcı ve Yavru 2013). Tez kapsamında örnekleme yapılan illerde ise henüz literatürde mevcut olan bir çalışma bulunmamaktadır.

### 1.4.3. Patogenez ve Patoloji

BHV-4 ile doğal enfeksiyon solunum, sindirim ve genital kanalda direkt bulaşma ile gerçekleşir. Direkt bulaşmada inhalasyon yanında sütte bulunan virüs ile enfekte hücrelerin etkili olduğu belirlenmiştir (Donofrio ve ark. 2000a). Virüs replikasyonu larenks, trake, bronşlar ile bağırsak epitel hücrelerinde gerçekleşir. Ayrıca virüsün periferik kan hücrelerinde çoğalarak tüm vücuda yayıldığı ve bu sayede birçok doku ve organdan BHV-4 izole edilebildiği bilinmektedir (Osorio ve ark. 1985, Egyed ve ark. 1996). Yapılan son çalışmalar ile intrauterin bulaşmanında gerçekleştiği olgusu BHV-4 genomunun, sperma hücreleri ve fötusun dalak hücrelerinde izolasyonu ile kanıtlanmıştır (Egyed ve ark. 2011). Sığırlarda viral DNA, kan hücrelerinde enfeksiyondan sonra 10-32., tavşanlarda 2-16. günlerde tespit edilebilmektedir (Egyed ve ark. 1999). BHV-4'ün konjunktival akıntı ve dalaktan enfeksiyondan 7 gün sonra tespit edilebildiği rapor edilmiştir (Osorio ve ark. 1985). Tavşanlarda ise CD11b<sup>+</sup> periferik kan lökositlerinin deneysel olarak BHV-4 ile enfekte olduğu belirlenmiştir. Araştırmacılar BHV-4'ün CD11b<sup>+</sup> hücreleri ile *in vivo* olarak intravasküler yayılma, replikasyon ve latentliğe neden olabileceğini rapor etmişlerdir (Fábián ve ark. 2005).

BHV-4'ün ORF16 ve ORF71 bölgelerinde açıklanan v-Bcl-2 ve v-FLIP genleri ile TNF- $\alpha$  aracılı apoptozis mekanizmasını inhibe ettiği ve BHV-4 ile enfekte hücreleri apoptozisten koruduğu önceki yıllarda rapor edilmiştir (Zimmermann ve ark. 2001). Bunun yanında BHV-4 tarafından açıklanan IE ve E genleri ile *in vitro* olarak insan A549 ve OVCAR karsinom hücrelerinde kaspaz-10 aracılı apoptozisi uyardığı belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre BHV-4'ün bazı insan karsinomlarının

tedavisinde kullanılabilecek potansiyel bir viro-onkoapoptotik ajan olabileceği bildirilmektedir (Gillet ve ark. 2005). Son dönemde ise BHV-4 ile enfekte MDBK hücrelerinde otofaji mekanizması geliştiği yapılan araştırmalar ile belirlenmiştir. Otofajinin MDBK hücrelerinde enfeksiyonun son döneminde (enfeksiyondan 48 saat sonra) otofaji için esansiyel olan LC3II proteinin artması ve p62 proteini seviyesinin tükenmesi sonucu şekillendiği gözlenmiştir. Ayrıca otofaji için gerekli Becline 1, PI3 kinase, Akt1/2 ve p21 proteinlerinin enfeksiyondan 24-48 saat sonra açıklanmasının BHV-4 replikasyonuna bağlı olarak arttırdığı belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre BHV-4'ün otofaji mekanizmasını kontrol ederek viral replikasyonu arttırdığı ve immün sistemden kaçışı düzenlediği, ilerleyen çalışmalar ile detaylı araştırılması gerektiği rapor edilmiştir (Montagnaro ve ark. 2013).

Akut enfeksiyonun ardından diğer herpesvirüslerde olduğu gibi BHV-4'te de latent enfeksiyon şekillenir. Sinir sistemi, lenf nodülleri, amigdala, üst solunum yolu, akciğerler, kemik iliği, safra kanalı gibi pek çok doku latentlik için uygun alanlar olarak ortaya çıkmıştır (Boerner ve ark. 1999). Sığırlarda dalağın marginal zonunun BHV-4'ün persiste kalabildiği önemli bölgelerden biri olduğu bildirilmiştir. Bunun yanında idrar kesesi, böbrekler ve timusta latent BHV-4 varlığına rastlanmıştır (Lopez ve ark. 1996). Sinir sistemi BHV-4 için bir diğer latentlik bölgesi olup, yapılan bir çalışmada lenf nodülleri yanında, medulla, spinal kord ve trigeminal gangliyonda BHV-4 genomu tespit edilmiştir (Asano ve ark. 2003). Tavşanların deneysel BHV-4 enfeksiyonunda dalağın önemli bir latentlik bölgesi olduğu ve özellikle monosit/makrofajlarda BHV-4'ün latent kaldığı belirlenmiştir (Osorio ve ark. 1985).

Latent enfeksiyon sonrasında BHV-4, doğum gibi stres faktörleri yanında *in vitro* olarak sodyum butirat ve *in vivo* olarak deksametazon gibi kimyasallar ile reaktif olabilir. Latent enfekte makrofaj hücrelerinde viral DNA miktarı 10-15 kat artış gösterir (Thiry ve ark.1986, Donofrio ve van Santen 2001). Böylece virüs nazal akıntılar, mononükleer kan hücrelerinden tekrar izole edilebilir (Dubuisson ve ark. 1989b). Yapılan bir çalışmada BHV-4'ün, latent enfekte makrofajlarda reaktif olarak replike olmasında bakteriyel enfeksiyonlar sırasında salgılanan prostaglandin E2 (PGE2)'nin etkili olduğu belirlenmiştir. Bu durumun özellikle genital



enfeksiyonlar sırasında bakteriyel etkenlerin uterus üzerinde meydana getirdiği yangısal etkileri sonucu artan PGE2 ile Şekillendiği rapor edilmiştir (Donofrio ve ark. 2005).

#### **1.4.4. Klinik Belirtiler**

BHV-4 ile ilgili yapılan çalışmalarda farklı semptomlar gösteren sığırlar yanında klinik olarak sağlıklı görünen sığırlarda BHV-4 varlığına rastlanmıştır. BHV-4'n ilk olarak keratokonjiktivitis, burun akıntısı, öksürük, dispne ve akciğer lezyonları gibi semptomlar gözlenen bir sığırdan izole edildiği bilinmektedir (Bartha ve ark. 1966, Mohanty ve ark. 1971). Yapılan deneysel enfeksiyon çalışmalarında BHV-4'n intranazal inokulasyonu sonucu solunum sistemi bozukluklarına ve buzağılarda lme neden olduğu belirlenmiştir (Mohanty ve ark. 1972).

BHV-4 genomu bakteriyel mastitis semptomu gözlenen sığırlarda süt kanalı epitel hücrelerinde ve BHV-4 enfeksiyonu geçiren sığırların süt hücrelerinde belirlenmiştir (Donofrio ve ark. 2000a, Klmn ve ark. 2004). Deneysel enfeksiyon çalışmalarında intranazal ve meme içi uygulamalarda BHV-4'n bazı olgularda subklinik mastitise neden olduğu görülmüştür (Wellenberg ve ark. 2002). Mevcut alıŐmalar ışığında BHV-4'n, bakteriyel etkenler gibi mastitise direkt olarak neden olmadığı düşünülmektedir (Izumi ve ark. 2006).

Deri lezyonları (memede püstüler dermatitis, kronik ülseratif dermatitis) bulunan sığırlardan BHV-4 izole edilmesine rağmen deneysel intradermal uygulamalarda etkin bir rolünün olmadığı bildirilmiştir (Kaminjolo ve ark. 1972, Osorio ve Reed 1983, House ve ark. 1990).

ıŐshal semptomu olan yetişkin bir sığırın dıŐkısında BHV-4'n varlığı belirlenmesine rağmen daha sonra yapılan deneysel enfeksiyonda BHV-4'n inokulasyonu ile ıŐshal oluŐturulamamıŐtır (Eugster 1979).

Ataksi ve ensefalitis gibi klinik semptomlar ve merkezi sinir sistemi ile sinir gangliyonlarında histopatolojik lezyonlar gözlenen sığırlarda BHV-4 varlığı tespit edilmesine rağmen BHV-4'ün nöronlar ile ilişkisi tam olarak bilinmemektedir. Yapılan bir çalışmada ise nörolojik bozukluklar görülen sığırlara ait merkezi sinir sistem dokularında BHV-4, BHV-5, BHV-1, Aujeszky's virüsü ve ovine herpesvirus 2 varlığı araştırılmıştır. Sonuç olarak diğer virüslerin aksine tüm dokularda BHV-4 izole edilirken, yalnızca iki örnekte BHV-5, BHV-4 ile birlikte belirlenmiştir (Costa ve ark. 2011).

Endometritis sorunu olan sığırların uterus içeriğinde ilk defa 1973 yılında BHV-4 varlığı tespit edilmiştir (Parks ve Kendrick 1973). Endometritis sorunu olan sığırların endometriyumunda BHV-4 virüsü PZR, virüs izolasyonu ve immunfloresans testleri ile tanımlanır iken, endometriyum epitel hücrelerinde BHV-4 kaynaklı intranükleer inklüzyon cisimcikleri elektron mikroskobu ile tespit edilmiştir (Frazier ve ark. 2001, Monge ve ark. 2006). Sığırlarda meydana gelen abort ve döl tutmama sorunlarında pek çok etkenin yanında BHV-4'ün de etkili olduğu yapılan çalışmalarda ortaya konulmuştur (Kirkbride 1992, Czaplicki ve Thiry 1998). Metritis ve vajinitis gibi genital kanal sorunları yaşayan gebe sığırlarda meydana gelen abort vakaları sonucu, aborte plasenta endometrial hücreler ve aborte fötüsa ait dokular incelendiğinde BHV-4 varlığı tespit edilmiştir (Deima ve ark. 2006, Deima ve ark. 2007, Chastant-Maillard 2013). Bunun yanında klinik semptom göstermeden fötüsün BHV-4 ile vertikal olarak enfekte olabildiği ve doğan yavruların seronegatif olduğu başka bir çalışmada rapor edilmiştir (Egyed ve ark. 2011).

#### **1.4.5. İmmünite**

İmmün yanıt, BHV-4 enfeksiyonunu takiben 22-34. günlerde serumda nötralize edici antikorların oluşması ile meydana gelir. Fakat enfeksiyondan sonra oluşan antikor miktarının daha az olduğu belirlenmiştir. BHV-4 enfeksiyonlarında oluşan hücre aracılı immün yanıt henüz tam olarak bilinmemektedir (Thiry ve ark. 1990).

Endometritis olgularında endometriyumdan makrofaj ve nötrofillerin yangı bölgesine çekilmesi için CXC kemokin ailesinden IL-8 salgılanır. BHV-4 kaynaklı endometritislerde şekillenen endometriyal savunma mekanizmasında, IE2 gen ürünü ORF50/Rta'nın endometriyal stroma hücrelerinde IL-8 gen promotorlarını transaktive edilmesinde ve IL-8 üretimini uyarmada görevli olduğu belirlenmiştir (Donofrio ve ark. 2010). Yine LPS ile aktive olan makrofajlardan TNF- $\alpha$  salgılanarak endometriyal stroma hücrelerinde NF- $\kappa$ B yolağının aktive olması sağlanır (Chastant-Maillard 2013). Yapılan bir çalışmada BHV-4 yönünden seronegatif olan buzağuların BHV-4 ile enfeksiyondan 8 hafta sonra tekrar virüs ile çelme yapıldığında buzağuların etkilenmediği görülmüştür ve virüse bağışık oldukları sonucuna varılmıştır (Mohanty ve ark. 1972). Hümorale ve hücresele yanıt ile virüsün replikasyonu olumsuz etkilenerek, hayvanların enfeksiyondan korunması sağlanır. BHV-4 ile akut ve latent enfekte sığırlarda lenfoid organlar ve kan hücreleri immün yanıtta aktif rol oynayarak enfeksiyonun elemine edilmesinde görev alırlar.

#### **1.4.6. Teşhis**

##### **1.4.6.1. Klinik Teşhis**

BHV-4 enfeksiyonlarında farklı klinik semptomlar gözlenmesine rağmen, bazı vakalarda sağlıklı görünümlü hayvanlarda BHV-4 tespit edilmiştir. Bu nedenle kesin teşhis için laboratuvar testlerine ihtiyaç duyulmaktadır.

## 1.4.6.2. Laboratuvar Teşhisi

### 1.4.6.2.1. Antijen Teşhisi

BHV-4 enfeksiyonlarında klinik örneklerden virüs izolasyonu primer sığır, koyun, keçi, köpek, kedi, tavşan, domuz ve tavuk böbreğinden hazırlanan primer hücre hatları yanında Vero, tavşan böbrek ve MDBK gibi devamlı hücre hatlarında *in vitro* olarak gerçekleştirilmektedir (Lin ve ark. 1997, Egyed 1998). İzolasyonun ardından BHV-4 suşlarının ayırımının yapılabilmesi için *Bam*HI, *Eco*RI ve *Hind*III enzimleri kullanılarak restriksiyon endonükleaz analizi yapılmaktadır (Bublot ve ark. 1990, Thiry ve ark. 1992).

BHV-4 viral DNA'nın doku ve organlardan tespitinde DNA problrarı dizayn edilerek dot-blot hibridizasyon tekniği kullanılabilir. Fakat araştırmacılar bu yöntemin rutin ayırıcı tanıya uygun olmadığını bildirilmektedir (Galik ve ark. 1992). Bunun yanında viral DNA tespitinde çeşitli gen bölgelerine özgü primer çiftleri kullanılarak hazırlanan PZR testleri spesifik ve duyarlı direkt teşhis metodu olduğu rapor edilmiştir (Egyed ve ark. 1996).

BHV-4 suşları arasında yüksek oranda genetik farklılıkların olduğu belirlenmiştir (Chang ve van Santen 1992). Virüse ait farklı gen bölgelerinin [glikoprotein B (Goltz ve ark. 1994), timidin kinaz (Lomonte ve ark 1992)] ve BHV-4 suşlarının gen dizilimleri karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir (Broll ve ark. 1999, Zimmermann ve ark. 2001). BHV-4 virionunun önemli yapılarından biri olan glikoprotein B, viral enfektivitede etkili olması yanında BHV-4 suşları arasında filogenetik ilişkiyi belirlemektedir (Lomonte ve ark. 1997). Yapılan bir çalışmada gB PZR ile klinik örnekte 2-10 BHV-4 DNA kopyası olduğunda viral DNA'nın tespit edilebildiğini ortaya koymuşlardır. Araştırmacılar, ayrıca gB PZR ve virüs izolasyonunu karşılaştırmalı olarak değerlendirdikleri çalışmalarında, gB PZR ve

virüs izolasyon yöntemlerinin sensitivitesini sırasıyla %93 ve %61 olarak belirtmişlerdir (Wellenberg ve ark. 2001b).

#### **1.4.6.2.2. Antikor Teşhisi**

BHV-4'ün indirekt teşhisinde, spesifik antikorların varlığının belirlenmesinde indirekt ELISA, komplement fikzasyon, İFAT ve agar jel immün difüzyon yöntemlerinden yararlanılmaktadır. Virüs nötralizasyon testi rutin olarak BHV-4 antikorlarının belirlenmesi için kullanılan bir yöntem olmasına rağmen BHV-4 enfeksiyonları sonrasında düşük titrede antikor oluşumu nedeni ile duyarlılığı düşük ve güvenilirliği az olduğu belirlenmiştir (Thiry ve ark. 1990). Bu nedenle BHV-4 için en duyarlı test olarak ELISA araştırmacılar tarafından yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Edwards ve Newman 1985). Ticari ELISA kitleri olarak; BIO-X BHV-4 ELISA (BIO-X), ID Screen® BHV-4 Indirect (IDVet), Abortion Screen (IBR, BVDV, BHV4) (Biomedica), Primacheck BHV-4 (Agrolabo SpA) kullanılmaktadır.

#### **1.4.7. Korunma ve Kontrol**

BHV-4'ün etiyolojik yapısının tam olarak anlaşılabilmesi nedeni ile henüz enfeksiyonla mücadelede kullanılacak bir aşı üretilmemiştir. Bunun yanında düşük patojenitesi, değişik türdeki hayvan hücre hatlarını enfekte edebilme kapasitesi, onkojen özelliğinin zayıf olması, gen aktarım vektörü olabilmesi gibi özellikleri ile vektör aşı üretilmesine uygun olduğu belirlenmiştir (Donofrio ve ark. 2007).

*In vitro* olarak BHV-4 ile mücadelede kimyasal maddelerin etkileri incelenmiştir. Bu amaçla yapılan araştırmada arsenit maddesinin, bovine arteriyel endotelyal (BAE) hücrelerinde artan hücre stresi sonucu meydana gelen ısı şoku proteini 70 (HSP70) ile birlikte BHV-4'ün replikasyonunu durdurduğu rapor edilmiştir (Jiang ve ark. 2004a). Yine farklı bir çalışmada arsenit maddesinin BAE hücrelerinde ekstraselüler sinyali regüle edici kinaz aktivitesini baskıladığı, viral IE-2 geninin transkripsiyonu ve DNA replikasyonunu durdurduğu belirlenmiştir (Jiang ve ark. 2004b).

BHV-4 enfeksiyonu ile mücadelede kullanılabilen en etkili yöntemler olarak, sürü taraması yapıp enfekte bireylerin tespiti ve sürüden uzaklaştırılması yanında sürüye dışarıdan hayvan katılırken seronegatif ve antijen negatif bireylerin seçilmesidir. Yeni doğan yavruların, antijen negatif annelerin kolostrumu ve sütleriyle beslenmesi gerekmektedir. Bunun yanında gebelik döneminde seropozitif olarak belirlenen ineklerin, doğum sonrasında mutlaka sürüden uzaklaştırılması gereklidir ki, bu tarz hayvanlar uterus sıvıları ile uzun bir dönem virüsü etrafa saçabilmektedirler (Egyed ve ark. 2011).

## 1.5. Bovine Herpesvirüs 5 (BHV-5) Enfeksiyonu

### 1.5.1. Etiyoloji

Herpesvirüs enfeksiyonu kaynaklı ve sığırlarda görülen ilk meningoensefalitis vakası 1962 yılında Avusturalya'da yetiştirilen buzağılarda rapor edilmiştir (Johnston ve ark. 1962). Aynı yıl gerçekleştirilen virüs izolasyonu, virion morfolojisi ve antijenik özelliklerin belirlenmesi çalışmaları sonucu tespit edilen viral etkenin, BHV-1'in nöropatojenik bir varyantı olduğu bildirilmiştir (French 1962). İlerleyen yıllarda virüsün yapısının tam olarak anlaşılabilmesi ve BHV-1 ile farklarının ortaya konulabilmesi için, BHV-1'in farklı suşları ile karşılaştırmalı olarak viral DNA haritalandırma ve çapraz nötralizasyon testi çalışmaları yapılmıştır (Brake ve Studdert 1985, Metzler ve ark. 1986). Yapılan araştırmalar sonucu yeni virüsün ismi, 1986 ve 1989 yıllarında bovine ensefalitis herpesvirüs veya BHV-1 altip 3, 1992 yılından itibaren BHV-5 olarak değiştirilmiştir (Roizman ve ark. 1992).

BHV-5, *Herpesviridae* ailesinin *Alfaherpesvirinae* alt ailesinin Varicellovirus cinsinde bulunur (ICTV 2013). BHV-5 suşları restriksiyon endonükleaz parmak izi yöntemi ile DNA analizi çalışmaları sonucu BHV-5a, BVH-5b ve a-b olmayan (BHV-5 non-a/non-b) olmak üzere 3 farklı alt tipe ayrılmıştır (D'Arce ve ark. 2002). Virion 120-250 nm çapında, en içte çift iplikli linear DNA'yı içeren çekirdek ve dışında ikozahedral simetrik bir kapside sahiptir. 162 kapsomerden oluşan nükleokapsid, tegüment ile sarılmıştır. En dışta ise viral glikoproteinleri içeren tek katmanlı bir zarf bulunmaktadır (Roizman ve ark. 1992).

BHV-5 genomu, BHV-1'e benzer şekilde 104.054 bp uzunluğunda U<sub>L</sub> ve 9548 bp uzunluğunda U<sub>S</sub> olmak üzere iki ana sekanstan oluşmaktadır. Ayrıca U<sub>S</sub>'yi çevreleyen 12109 bp uzunluğunda IR ve TR bölgeleri bulunur ki bu tür genom organizasyonu D sınıfı genom olarak sınıflandırılmaktadır (Delhon ve ark. 2003).

BHV-5 genomu, yaklaşık 137 kilobaz büyüklüğünde çift iplikli linear yapıda, %75 oranında G+C bazlarından oluşan DNA molekülüdür. BHV-5 genomunda 72 gen kodlanmakla birlikte 68'i U<sub>L</sub> ve U<sub>S</sub> bölgelerinde (60 U<sub>L</sub>/ 8 U<sub>S</sub>) kodlanırken, 2'si tekrar bölgeleri (TR/IR) tarafından açıklanır. BHV-5 ve BHV-1 genomları tarafından kodlanan proteinlerin amino asit yapıları karşılaştırıldığında %82 oranında benzerlik olduğu belirlenmiştir (Delhon ve ark. 2003). En fazla amino asit benzerliği gösteren genlerin ( $\geq$  %95) viral DNA replikasyonu ve virion proteinlerinin açıklanmasında görevli olan U<sub>L</sub>5, U<sub>L</sub>48, U<sub>L</sub>39, U<sub>L</sub>19 (VP5), U<sub>L</sub>14, U<sub>L</sub>29 ve U<sub>L</sub>15 olduğu tespit edilmiştir (Del Medico Zajac ve ark. 2010). Bunun yanında daha az benzerlik gösteren gen sekansların ( $\leq$  %75) viral patogenezi, virüs-hücre etkileşimi ve viral replikasyonda görevli U<sub>L</sub>44 (gC), U<sub>L</sub>3, BICP4, U<sub>L</sub>24, U<sub>S</sub>8 (gE), U<sub>L</sub>11, U<sub>L</sub>49, U<sub>S</sub>4 (gG), BICP0 U<sub>L</sub>3.5, LR ORF2, U<sub>S</sub>2 BICP22, U<sub>L</sub>0.7 olduğu belirtilmiştir. BHV-5 genomunda kodlanarak virionun hedef hücreye tutunması, girişi, füzyon ve saçılmadan sorumlu, virüsten önemli rol oynayan glikoproteinler; gK (U<sub>L</sub>53), gC (U<sub>L</sub>44), gB (U<sub>L</sub>27), gH (U<sub>L</sub>22), gM (U<sub>L</sub>10), gL (U<sub>L</sub>1), gG (U<sub>S</sub>4), gD (U<sub>S</sub>6), gI (U<sub>S</sub>7) ve gE (U<sub>S</sub>8)'dir (Delhon ve ark. 2003).

BHV-5'in kodladığı protein ve genlerden; gC (Chowdhury 1995), gD (Abdelmagid ve ark. 1995), gG (Engelhardt ve Günther 1996), gH (Meyer ve Thiry 1999), gE ve U<sub>S</sub>9 (Chowdhury ve ark. 2000, Chowdhury ve ark. 2002) BHV-1 ile benzerlikleri yönünden birçok araştırmacı tarafından analiz edilmiştir. Her iki virüs arasında %85 genetik benzerlik (Chowdhury 1995) ve %82 oranında amino asit benzerliği olduğu bildirilmiştir (Delhon ve ark. 2003). BHV-5 ve BHV-1 arasında yapılan genetik ve antijenik benzerlik çalışmaları, enfeksiyonların tanısı, aşılama ve eradikasyon programlarının geliştirilmesi için önemlidir (Del Médico Zajac ve ark. 2006). BHV-1 ve BHV-5'in en önemli 3 zar glikoproteini olan gB, gC ve gD'nin yapılan monoklonal antikor testleri sonucu çeşitli farklılıklar olduğu tespit edilmiştir. gB ve gD sekans dizilerine dayalı filogenetik çalışmalarda BHV-1 ve BHV-5 arasında yakın ilişki gösterilmiştir (Ros ve Belak 1999). Bununla birlikte her iki virüste bulunan gC'nin en farklı dizilime sahip olan gen bölgesi olduğu rapor edilmiştir (Collins ve ark. 1993, Chowdhury 1995).



Replikasyon siklusunda alfaherpesvirüslerin virion yapısı IE genlerin açıklanması aktive eder. Bu genler E ve L genlerin aktivasyonunda görevlidir (Favier ve ark. 2012). BHV-5 IE proteinleri (bICP0, bICP4 ve bICP22) en az değişiklik gösteren yapılardır. LR geni alfaherpesvirüslerde latentlik ve reaktivasyon ile ilgili önemli görevleri bulunmaktadır (Jones 2003). Hücre kültüründe BHV-1 ve BHV-5 benzer morfolojik ve sitopatik etkiler yaparlar. Bunun yanında BHV-1'e göre BHV-5'in hücre kültüründen izolasyonu son derece zordur (d'Offay ve ark. 1995, Cascio ve ark. 1999). Bunun en önemli nedeninin doku örneklerinde viral titrenin çok düşük olmasından kaynaklandığı bildirilmektedir (Belknap ve ark. 1994).

### **1.5.2. Epidemiyoloji**

BHV-5 için doğal konakçı sığırlardır. Altı aylıktan büyük genç sığırların enfeksiyona çok duyarlı olduğu, enfeksiyondan sonra ölüm şekillenebildiği rapor edilmiştir (Schudel ve ark. 1986). Yetişkin sığırlar ise BHV-5 enfeksiyonlarına daha az duyarlıdır. Latent enfekte sığırlar, reaktivasyon sonrası doğal enfeksiyon rezervuarı durumundadır. Bunun yanında BHV-5'e spesifik antikorların doğal enfeksiyon sonucu koyunlarda varlığı rapor edilmiştir (Lindner ve ark. 1993a, Lindner ve ark. 1993b). Deneysel BHV-5 enfeksiyonları sonucu koyun ve keçilerin BHV-5'e duyarlı oldukları bildirilmiştir. Koyun ve keçilerde akut ve latent enfeksiyonların oluşumu belirlenmiştir (Belak ve ark. 1999, Diel ve ark. 2007). Latent enfekte koyun ve keçilerde yapılan deksametazon uygulaması sonucu reaktif olan virüsün koyunlarda tekrardan akut enfeksiyona neden olduğu rapor edilmiştir (Silva ve ark. 1999). Yapılan çalışmalar koyun ve keçilerin de BHV-5 için potansiyel rezervuar olabileceği bildirilmesine rağmen, bu türlerden sığırlara bulaşmanın gerçekleşip gerçekleşmediği konusunda henüz bir çalışma yapılmamıştır. Tavşanlarda, deneysel BHV-5 enfeksiyonu meydana gelmektedir (Chowdhury ve ark. 1997). Farelerin hem

BHV-1'e hem de BHV-5'e dirençli olduğu, bunun yanında transgenik farelerde her iki virüs ile enfekte edildiği rapor edilmiştir (Abril ve ark. 2004).

BHV-5 enfeksiyonları dünyanın pek çok yerinde sporadik salgınlar halinde görülmektedir. Morbidite %15-50 arasında değişirken, mortalite %100'e yakındır. BHV-5 enfeksiyonu Avusturalya (French 1962, Johnston ve ark. 1962, Gardiner ve Nairn 1964), Macaristan (Bartha ve ark. 1969), Amerika (Eugster ve ark. 1974), İtalya (Moretti ve ark. 1964), Arjantin (Carrillo ve ark. 1983b, Schudel ve ark. 1986, Maidana ve ark. 2011), Brezilya (Salvador ve ark. 1998, Riet-Correa ve ark. 2006) gibi ülkelerde rapor edilmiştir.

Ülkemizde BHV-5 ile literatüre kayıtlı henüz bir çalışma bulunmamaktadır. İlerleyen dönemlerde yapılacak geniş kapsamlı çalışmalar sayesinde farklı bölgelerde BHV-5'in varlığının belirlenerek literatürdeki boşluğun giderilmesi gereklidir.

### **1.5.3. Patogenez ve Patoloji**

BHV-5'in neden olduğu ensefalitisin patogenezini tam olarak aydınlatılamamıştır. BHV-5 ve BHV-1, intranazal inokulasyonu takiben oluşan primer enfeksiyon sonrasında solunum yolu mukozası girişinde replike olmaya başlar. En yüksek miktarda viral yükün enfeksiyondan sonra 4-6. günlerde olduğu bildirilmiştir (Bagust ve Clark 1972, Meyer ve ark. 2001). Primer enfeksiyonu takiben BHV-5'in vücutta yayılması BHV-1'e benzer olarak; lokal yayılma, nöronal yayılma ve viremi ile sistemik yayılmadır. Lokal yayılma hücre arası sıvılardaki virüslerin duyarlı hücreleri enfekte etmesi ve direkt hücre-hücre aracılı virüs yayılması şeklinde gerçekleşir. Viremi ile gelişen sistemik enfeksiyon sonrasında virüs varlığına karaciğer, böbrekler ile lökositlerde rastlanmıştır (Belknap ve ark. 1994, Engels ve Ackermann 1996). Nazal epitelyum hücrelerinde viral replikasyondan sonra BHV-5 olfaktör sinir hücreleri ve maksillar sinir hücre sonlarını enfekte eder. Virüsün

merkezi sinir sistemine yerleşmesi iki şekilde gerçekleşir. Bunlar olfaktör mukozayı uyaran aksonların enfeksiyonu ve trigeminal sinir hücrelerinin enfeksiyonu şeklinde gerçekleşir. Trigeminal sinir hücrelerine yerleşen virüs, enfeksiyondan yaklaşık 5-7 gün sonra trigeminal gangliyonda mikroskobik değişikliklere neden olur (Chowdhury ve ark. 1997, Lee ve ark. 1999, Perez ve ark. 2002). Merkezi sinir sistemine yerleşen virüs enfeksiyondan 8-10 gün sonrasında ölümcül meningoensefalite neden olurken, bazı vakalarda subklinik veya latent enfeksiyon şeklinde görülür (Meyer ve ark. 2001, Perez ve ark. 2002). Enfeksiyonu atlatan hayvanlarda virüs, hayat boyu sensör gangliada latent kalır ve uygun şartlar altında reaktive olarak periferik dokularda tekrar enfeksiyon şekillenir. Alfaherpesvirüsler de oküler, nazal ve oral enfeksiyondan sonra virüs, trigeminal ve sensör sinir ganglionlarında latent kalır (Perez ve ark. 2002). Stres faktörleri veya glikokortikosteroid uygulamaları sonucu latent enfekte hayvanlarda virüsün reaktivasyonu gerçekleşir. Replikasyon alan virüs tekrardan saçılarak duyarlı hayvanları enfekte eder (Vogel ve ark. 2003). BHV-5 DNA'sı latent enfekte hayvanlarda merkezi sinir sisteminin koku alma korteksi, serebellum, talamus, orta beyin ve pons bölgelerinde tespit edilmiştir. Ayrıca nazal ve trakeal mukoza BHV-5 latentliğinin görüldüğü diğer bölgelerdendir (Meyer ve ark. 2001, Perez ve ark. 2002, Vogel ve ark. 2003). Dekametazona bağlı uyarım ile reaktive olan BHV-5 DNA'sına akut enfeksiyon başlayan hayvanlarda ön korteks, medulla oblongata ve servikal medulla bölgelerinde rastlanır (Vogel ve ark. 2003).

Genital kanalın enfeksiyonu doğal aşım ve suni tohumla uygulamaları sonucu oluşabilmektedir (Turin ve ark. 1999). BHV-1'in genital sistem üzerine etkisi ineklerde vulvovaginitis ve boğalarda pustuler balanopostitis şeklinde görülmektedir. Balanopostitis sperm kalitesini düşürdüğü gibi, BHV-1 ile kontamine sperma ile gebe kalan ineklerde endometritis yanında abortlar ve infertilite vakaları görülmektedir (Elazhary ve ark. 1980, van Oirschot 1995). Yapılan farklı araştırmalarda spermada BHV-5'in varlığı tespit edilerek rapor edilmiştir (Gomes ve ark. 2003, Kirkland ve ark. 2009, Diallo ve ark. 2010, Souza ve ark. 2011). BHV-5 ile enfekte boğanın sperması kullanılarak yapılan suni tohumlama sonucu ineklerde vulvovaginitise, döl tutmama ve venereal hastalığa neden olduğu rapor edilmiştir (Kirkland ve ark. 2009). Deneysel olarak yapılan çalışmada, BHV-5 DNA'sı

spermatozoitin kuyruk ve akrozomal bölgesinde belirlenmiştir (Silva-Frade ve ark. 2010b). Yapılan *in situ* hibridizasyon sonucu BHV-5'in oositlerin kümülüs hücrelerini ve embriyonun iç hücrelerini enfekte ettiği bildirilmiştir (Silva-Frade ve ark. 2010a). Abort vakalarında BHV-5'in rolü, BHV-1'e göre henüz tam olarak incelenmemiştir. Son dönemde yapılan çalışmalarda BHV-5 varlığı aborte fötusun merkezi sinir sisteminde tespit edilmiştir. Böylece BHV-5'in abort vakalarına neden olabildiği ortaya konulmuştur (Salvador ve ark. 1998).

BHV-5'in meydana getirdiği makroskobik patolojik değişiklikler beyinde; paranşimal dokunun yumuşaması, beynin ön ve yan bölgelerinde fokal kanamalar ile ponsta ve beynin sol lobunda kanama odakları ile karakterizedir. Solunum sisteminde görülen makroskobik değişikliklerin nazal konjesyon, farenks ve larenks mukozasında konjesyon ve peteşiyel kanamalar olduğu bildirilmiştir (Carrillo ve ark. 1983a, Perez ve ark. 2002). BHV-5 kaynaklı mikroskobik lezyonlar yaygın irinli olmayan meningitis, nöronofaji, satelitozis, fokal ve dağınık gliozis, hemorajiler, nöronal nekrozlar ve dejenerasyon ile karakterizedir (Belknap ve ark. 1994, Meyer ve ark. 2001). Bazı vakalarda nöron ve astrositlerde inklüzyon cisimleri varlığı rapor edilmiştir (Carrillo ve ark. 1983b).

#### **1.5.4. Klinik Belirtiler**

BHV-5 enfeksiyonu meydana gelen hayvanlarda ilk olarak depresyon, anoreksi ve halsizlik semptomları gözlenmektedir. Enfeksiyondan yaklaşık 5 gün sonra yüksek ateş, koordinasyon kaybı, körlük, kaslarda titreme, kendi eksenini etrafında dönme, başını bir yere dayama, yere uzanma gibi nörolojik bozukluklar ardından çırpınma ve ölüm görülür (Bartha ve ark. 1969). Nörolojik semptomlar virüs süşuna, hayvanın yaşına ve immünolojik direncine bağlı olarak enfeksiyondan sonra ortalama 8-13 gün

sonra görülmeye başlarken, ölüm klinik semptomların başlangıcından yaklaşık 2-5 gün sonra meydana gelir. Deneysel BHV-5 enfeksiyonları bazı hayvanlarda subklinik seyretmesine rağmen, genellikle ensefalitis şekillenen hayvanlarda ölüm görülmektedir (Cascio ve ark. 1999, Vogel ve ark. 2003).

BHV-5'in gebe sığırlarda abortlara neden olduğu ve atık fötusta BHV-5 varlığı yapılan çalışmalar ile belirlenmiştir (Salvador ve ark. 1998). Bunun yanında BHV-5'in ineklerde vulvovaginitis, döl tutmama ve venereal hastalık semptomlarına neden olduğu rapor edilmiştir (Kirkland ve ark. 2009). BHV-5 kaynaklı meydana gelen solunum sistemi semptomları genelde sınırlı ve hafif seyirli olmaktadır. Yapılan deneysel enfeksiyonlarda virüsün intranazal inokulasyonu sonucu nazal ve oküler akıntı ve aksırık şeklinde hafif semptomlar görülür (Meyer ve ark. 2001, Perez ve ark. 2002, Del Médico Zajac ve ark. 2006).

### **1.5.5. İmmünite**

BHV-5 enfeksiyonları ardından meydana gelen immün cevabın açıklanması için yapılan çok az sayıda çalışma mevcuttur. BHV-1 ile BHV-5 arasındaki benzerlik göz önüne alınarak, iki virüsün konakçı immün sistem mekanizmasını benzer şekilde uyardığı sonucu çıkarılmaktadır (Del Medico Zajac ve ark. 2010). BHV-1 enfeksiyonlarında, enfekte olan hayvanlarda doğal immün yanıtı takiben enfeksiyondan 5 gün sonra kazanılmış immün yanıt gelişir. CD4<sup>+</sup> ve CD8<sup>+</sup> lenfositlerin uyarılması ile en yüksek immün cevap etkinliği enfeksiyondan sonra 10 gün içerisinde gözlenir (Denis ve ark. 1994, Babiuk ve ark. 1996). Hümorale immün yanıt enfeksiyondan yaklaşık 10 gün sonra meydana gelir. BHV-1'e spesifik antikolar hücre dışı viral partikellerin nötralizasyonunda ve antikora bağlı hücre aracılı sitotoksistide görev alır. Bunun yanında antikolar sekonder enfeksiyonların

önlenmesi ve latent virüsün reaktivasyonunun sınırlandırılmasında görevlidir (Romera ve ark. 2001).

Yapılan deneysel çalışmalarda BHV-5 ile enfekte sığırlarda lenfoproliferatif cevabın enfeksiyondan 7-14 gün sonra meydana geldiği bildirilmiştir. Bunun yanında total serum antikorları 12. günden itibaren görülürken, IgA ve IgG<sub>1</sub> nazal sekresyonda tespit edilir. Nötralizan antikorlar ise ilk olarak enfeksiyondan 14 gün sonra belirlenmektedir (Meyer ve ark. 2001, Perez ve ark. 2002).

### **1.5.6. Teşhis**

#### **1.5.6.1. Klinik Teşhis**

BHV-5 enfeksiyonu için klinik teşhis zor olmakla birlikte, enfekte hayvanlarda meydana gelen depresyon, ateş, halsizlik, koordinasyon kaybı, kaslarda titremeler, dişlerini gıcırdatma, kendi ekseni etrafında dönme, körlük, başını bir yere dayama gibi nörolojik bozukluklar ile nazal akıntılar, laringeal mukozada kanamalar ve bronkopnömoni BHV-5 varlığını düşündürülebilir (Belknap ve ark. 1994, Rissi ve ark. 2008). Ölüm sonrası gözlenen beyin dokusundaki paranşimal dokuda yumuşamalar, beynin ön ve yan tarafları ile ponda ve sol periferal lobta kanamalar BHV-5 yönünden değerlendirilmesi gereken klinik semptomlardır (Perez ve ark. 2002). Yine de özellikle BHV-1 ile antijenik ve genetik benzerliği göz önüne alındığında BHV-5 için daha spesifik tanı testleri uygulanması gereklidir.

## 1.5.6.2. Laboratuvar Teşhisi

### 1.5.6.2.1. Antijen Teşhisi

BHV-5 varlığının tespiti ve neden olduğu enfeksiyonun belirlenmesi için şüpheli hayvanlardan alınan nazal ve göz akıntıları, kan, serebrospinal sıvılar, sperma ve postmortem doku örnekleri kullanılabilir. Virüs izolasyonu için MDBK hücre hattı kullanılabilir. BHV-5'in enfekte beyin dokusundan izolasyonu BHV-5'in yavaş çoğalan suşları varlığında geç cpe göstermesi nedeni ile kolaylıkla gerçekleştirilememektedir. Ayrıca buzağılarda beyin dokusundan BHV-5'in izolasyonu intranasal inokulasyondan sonra 6-8. ve 11. günlerde gerçekleştirilirken 28. günde başarılı olunamamıştır (d'Offay ve ark. 1995, Meyer ve ark. 2001). BHV-5 ile enfekte buzağılarda akciğer, böbrek ve nazal mukozada 9-14. günlerde izolasyon gerçekleştirirken, ovaryum, karaciğer ve mezenterik lenf yumrularından virüs izole edilememiştir. Bir başka çalışmada farelerde deneysel BHV-5 enfeksiyonu sonucu, virüs izolasyonu enfeksiyondan sonra 4-6. günlerde sadece koku soğancığında (olfactory bulb), 8-9. günlerde beynin pek çok bölgesinden (anteriyor-posterior korteks, hipokampus, amigdala) izole edilebilmiştir. Aynı çalışmada 2-12. günlerde serebellum ve trigeminal gangliyonlardan BHV-5 izole edilemediği rapor edilmiştir (Lee ve ark. 1999). Virüs izolasyonunda 37°C'de 7 günlük inkubasyon periyodunda cpe yönünden kontrol edilmektedir. Bu sürede yapılacak 3 pasajlamada cpe oluşturmayan örnekler negatif olarak değerlendirilmektedir (Isernhagen ve ark. 2011).

Enfeksiyona neden olan BHV-5 ile %85 oranında genetik benzerlik gösteren BHV-1'in ayırımında; restriksiyon enzim analizi (D'Arce ve ark. 2002), spesifik monoklonal antikorlar kullanılarak yapılan immunfloresans (Keuser ve ark. 2004), gB, gC ve gD bölgelerini hedef alarak dizayn edilen primer çiftleri kullanılan konvansiyonel PZR, nested PZR (Ashbaugh ve ark. 1997, Ros ve Belak 1999) ve

multipleks PZR (Claus ve ark. 2005) ile viral yükün belirlenebildiği multipleks real time PZR (Diallo ve ark. 2011) uygulamaları kullanılmaktadır.

#### **1.5.6.2.2. Antikor Teşhisi**

Antijen yapıları yakınlık gösteren BHV-5 ve BHV-1 suşlarının benzer epitoplari açıkladığı belirlenmiştir. Yapılan çalışmalarda kullanılan monoklonal antikorların her iki virüste ortak epitoplari tanıyabildiği anlaşılmıştır (D'Arce ve ark. 2002). Serum nötralizasyon ve ELISA testleri ile her iki virüse karşı oluşan spesifik antikorlar paralellik göstermektedir. BHV-1 teşhisinde kullanılan indirekt ELISA ile BHV-5 spesifik antikorların teşhis edildiği ve çapraz nötralizan antikorların her iki enfeksiyonda olduğu tespit edilmiştir (Meyer ve ark. 2001).

Serumda BHV-5'e spesifik antikorların indirekt teşhisinde, BHV-1 gB bloklanmış ELISA (gB blocking ELISA) kullanıldığında çapraz reaksiyon verdiği, BHV-1 gE ELISA kullanılması halinde herhangi bir çapraz reaksiyon gözlenmediği ve BHV-5 ile BHV-1'in serolojik olarak ayrımının yapılabileceği bir tanı testi olduğu bildirilmiştir (Wellenberg ve ark. 2001a).

#### **1.5.7. Korunma ve Kontrol**

BHV-5 enfeksiyonlarının sınırlı coğrafik dağılımı ve sporadik yayılım özellikleri nedeni ile literatürde az sayıda aşı çalışması mevcuttur. Yapılan çalışmalarda genellikle BHV-1 için geliştirilen aşılari BHV-5'e karşı çapraz koruma



oluşturmadaki etkinliği araştırılmıştır. İnaktif BHV-1 aşıları ile sığırın bağışıklandırılması sonucu BHV-5 viral replikasyonuna ve enfeksiyonda meydana gelen nörolojik bozukluklara karşı korunma sağlandığı belirlenmiştir (Del Médico Zajac ve ark. 2006).

Kolostrum ile alınan BHV-1 antikorlarının BHV-5'in neden olduğu nörolojik etkilerine karşı koruyucu etkisi olduğu, buna rağmen BHV-5 latentliğine etkisinin bulunmadığı rapor edilmiştir (Belknap ve ark. 1994). BHV-1 gE(-) aşıların BHV-5 enfeksiyonlarında etkinliği araştırıldığında sığırlarda tam koruma sağlamadığı tespit edilmiştir. Buna rağmen saha koşullarında BHV-5 salgınları meydana geldiğinde BHV-1 aşılarının kullanılmasının yararlı olabileceği bildirilmiştir (Spilki ve ark. 2004b).

## 2. GEREÇ ve YÖNTEM

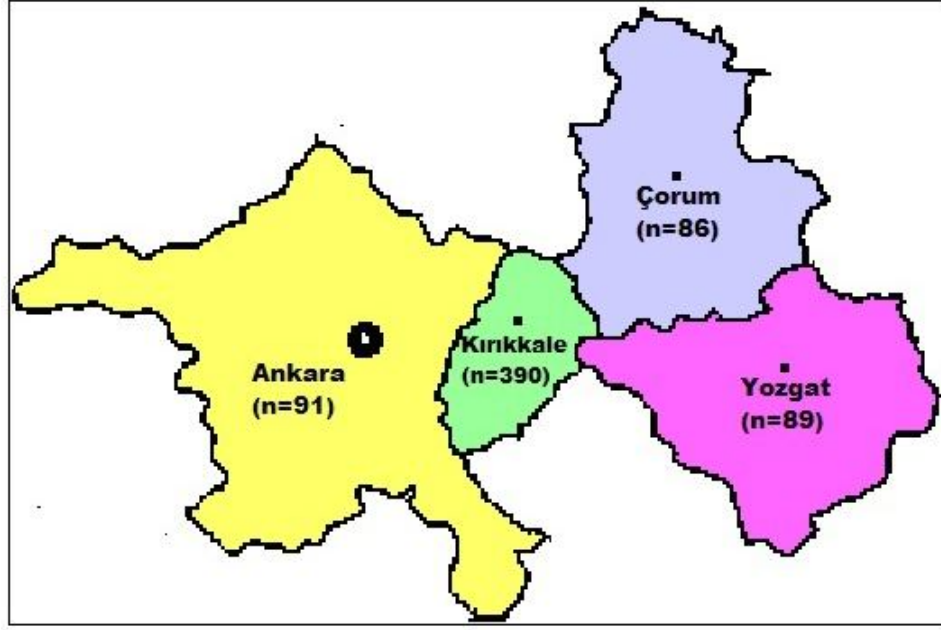
### 2.1. Örneklenen Hayvanlar

Tez kapsamında kullanılan örnekler; Ankara (39°56' N; 32°52' E; rakım: 870 m), Çorum (39°14' N; 38°27' E; rakım: 810 m), Kırıkkale (39°50' N; 33°31' E; rakım: 700 m) ve Yozgat (39°50' N; 34°48' E; rakım: 1418 m) illerinde bulunan sığır işletmelerinde yetiştirilen 15 aylık yaştan büyük ineklerden rastgele örnekleme metodu ile toplandı. Araştırılan viral ve bakteriyel etkenlerin varlığının tespit edilerek, etkilerinin anlaşılabilmesi için işletme sahibi yetiştiricilere abort yapmış ve döl tutmama sorunu olan inekler sorularak, örnekleme bu hayvanlardan gerçekleştirildi.

Dört ilde bulunan sığır işletmelerinden toplam 656 inekten alınan örnekler, analizler sırasında meydana gelebilecek karışıklıkların önlenmesi için kodlamalar yapılarak kayıt altına alındı (Çizelge 2.1; Şekil 2.1).

**Çizelge 2.1.** İller bazında örnek toplanan sığır sayıları

İl Adı	Örnek Toplanan Sığır Sayısı
KIRIKKALE	390
ANKARA	91
YOZGAT	89
ÇORUM	86
<b>Toplam</b>	<b>656</b>



**Şekil 2.1.** Tez kapsamında örnekleme yapılan iller ve toplanan örnek sayıları

## 2.2. Kan Örneklerinin Toplanması

Tez kapsamında 4 ilden toplam 656 sığırdan tam kan örnekleri EDTA'lı negatif basınçlı 9 ml'lik steril tüplere (Green Vac-tube<sup>®</sup>, Kore), serum elde edilmesi için kan örnekleri 10 ml'lik antikoagülsüz steril serum tüplerine (Vacutest<sup>®</sup>, İtalya) alındı. Örnekler soğuk zincirde (+4°C) laboratuvara taşındı.

Tam kan örneklerinden plazma elde edilmesi için; EDTA'lı negatif basınçlı 9 ml'lik steril tüplere alınmış kan örnekleri, 3000 rpm devirde 10 dakika santrifüj (Eppendorf<sup>®</sup>, 5417R, Almanya) edildi. Santrifüj sonrası ayrılan plazma mikropipet (Eppendorf<sup>®</sup>, Acura825) yardımıyla eppendorf tüplere alındı ve kullanılmak üzere derin dondurucuda (-20°C) saklandı.

Serum elde edilmesi için; antikoagülsüz serum tüplerine alınan kan örnekleri 3000 rpm devirde 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası ayrılan

serum, mikropipet yardımıyla eppendorf tüplere alınarak, kullanılıncaya kadar - 20°C’de derin dondurucuya kaldırıldı.

### 2.3. Tam Kan Sayımı

Ankara, Çorum, Kırıkkale ve Yozgat illerinde 656 inekten toplanan tam kan örneklerinden 383’ü, araştırılan etkenlerin hematolojik değerler üzerine etkilerinin belirlenmesi için kullanıldı. Bu örnekler içinde rose bengal ve serum tüp aglütinasyon testleri ile *Brucella* pozitif tespit edilen 23’ü örnekleme dışı bırakıldı. (Çizelge 2.2)

**Çizelge 2.2.** İller bazında hematolojik parametreleri analiz edilen sığır sayıları

İl Adı	Hematolojik Parametrelerin Analizi İçin Kullanılan Tam Kan Sayısı	Hematolojik Parametrelerin Analizinde Kullanılan ve <i>Brucella</i> Negatif Tam Kan Sayısı
KIRIKKALE	211	199
ANKARA	0	0
YOZGAT	86	76
ÇORUM	86	85
<b>Toplam</b>	<b>383</b>	<b>360</b>

Toplanan tam kan örnekleri MS9-3 hemogram cihazında (Melet Schloesing Labarotoires<sup>®</sup>, Fransa) analiz edildi. Yapılan analiz ile lökosit sayısı (white blood cells/WBC), monosit yüzdesi (MON%), monosit sayısı (MON#), lenfosit yüzdesi (LYM%), lenfosit sayısı (LYM#), nötrofil granülosit yüzdesi (N.GR%), nötrofil

granülosit sayısı (N.GR#), alyuvar sayısı (red blood cell/RBC), eritrositlerin ortalama büyüklüğü (mean corpuscular volume/MCV), hematokrit yüzdesi (HCT), eritrositlerdeki ortalama hemoglobin konsantrasyonu (mean corpuscular hemoglobin concentration/MCHC), ortalama hemoglobin konsantrasyonu (mean corpuscular hemoglobin/MCH), hemoglobin (Hgb), trombosit hacmi (mean platelet volume/MPV), trombosit (platelet/PLT) değerleri ölçüldü (Gazyacı ve ark. 2001, Sarıkaya ve ark. 2011).

## **2.4. *Brucella* Teşhisinde Kullanılan Serolojik Testler**

### **2.4.1. Rose Bengal Pleyt Testi**

Elde edilen kan serumu örneklerinde *Brucella* türleri (*B.abortus*, *B.melitensis* ve *B.suis*) için spesifik olan IgG'lerin varlığının belirlenmesi için rose bengal pleyt test (RBPT) antijeni (Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü, Türkiye) kullanılarak test gerçekleştirildi. RBPT antijeni, aglütinasyon yeteneği standart anti-*Brucella abortus* serumla standardize edilerek, *B.abortus* S99 suşu ile hazırlanarak rose-bengal ile boyanmış ölü bir süspansiyondur. Test, üretici enstitünün önerdiği prosedüre göre yapılarak değerlendirildi. Bu işlem kısaca; test edilecek şüpheli serumlar ve test antijeni oda sıcaklığında 10-15 dakika bekletildi. 1 damla (0.03 ml) antijen beyaz fayansın üzerine damlatıldı. Bir damla serum, antijenin uzağına olmak üzere aynı fayansın üzerine damlatıldı. Antijen ve serum bir kürdan vasıtası ile karıştırıldıktan sonra bir dakika kadar rotasyon hareketi ile hareket ettirildi. Reaksiyon dört dakika içinde değerlendirildi.

Reaksiyon değerlendirilirken pozitiflik; iri taneli aglütinasyon oluşumu, zayıf pozitiflik; hafif ince taneli aglütinasyon oluşumu, negatiflik; karışımda değişiklik olmamasının çıplak gözle görülmesi ile belirlendi.

#### 2.4.2. Serum Tüp Aglütinasyon Testi

RBPT ile pozitif olarak tespit edilen örneklerde antikor titresinin belirlenmesi amacı ile serum tüp aglütinasyon testi (STAT) antijeni (Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü, Türkiye) kullanıldı. *Brucella* tüp aglütinasyon test antijeni, *B.abortus* S99 suşu ile hazırlanan ve standart Anti-*B. abortus* serum ile standardize edilerek, smooth *Brucella* enfeksiyonlarının (*B.abortus*, *B.melitensis* ve *B.suis*) teşhisinde kullanılan ölü bir antijendir. Test üretici enstitünün önerdiği prosedüre göre yapılarak değerlendirildi.

Serum dilüsyonu için 6 adet temiz cam tüp (13-14 mm x 100 mm) alınarak % 0.5 fizyolojik tuzlu sudan (FTS) birinci tüpe 0.8 ml ikinci ve diğer tüplere 0.5'er ml konuldu. Birinci tüpe muayene edilecek olan serumdan 0.2 ml ilave edildi ve iyice karıştırıldıktan sonra 0.5 ml karışım pipet ile alınarak ikinci tüpe aktarıldı. Bu sulandırma işlemine son tüpe kadar devam edildi ve son tüpten 0.5 ml alınarak boşaltma kabına atıldı. Bu şekilde serum dilüsyonları 1/5, 1/10, 1/20, 1/40, 1/80 ve 1/160 haline getirildi. Her tüpe 0.5 ml standart *Brucella* aglütinasyon antijeni ilavesi ile serum antijen karışım oranları 1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160 ve 1/320 olacak şekilde hazırlandı. Kontrol olarak temiz bir tüp içerisine 0.5 ml FTS ve 0.5 ml tüp aglütinasyon testi antijeni eklendi. Tüpler 37°C'de 17-24 saat inkübasyonun ardından değerlendirildi.

Reaksiyonların okunmasında göz aldanmalarını önlemek ve hataya düşmemek için her muayenede pozitif ve negatif kontrol grupları kullanıldı. Tüpün

dibini kaplayacak biçimde dantela tarzında kümeleşme ve tüpün üst sıvısında berraklaşma olan tüpler pozitif olarak kabul edildi. Negatif ve kontrol tüplerde homojen bulanıklığın olduğu gözlemlendi. Sonuçlar değerlendirilirken hayvanların aşı geçmişleri anamnez olarak yetiştiricilerden öğrenilmiş olmasına rağmen hata oranını düşürmek için 1/80 ve üzeri titre düzeyi pozitif olarak kabul edildi (Öngör 1999, Apan ve ark. 2007).

## **2.5. ELISA**

### **2.5.1. Antikor ELISA**

Toplanan kan serum örneklerinde BVDV, BHV-1 ve BHV-4'e karşı oluşan spesifik antikorlar, her bir etken için geliştirilmiş ticari antikor ELISA kitleri ile test edildi.

BVDV'ye karşı spesifik antikorların tespiti için BVDV total antikor (Ab) ELISA test kiti (IDEXX Laboratories, USA, Katalog No: 99-44000) kullanıldı. Test üreticinin önerdiği prosedüre göre yapılarak, değerlendirildi. Örnek sulandırma solüsyonundan 100 µl tüm kuyucuklara ilave edildi. Negatif ve pozitif kontrollerden 25 µl belirlenmiş kuyucuklara ilave edildi. Geriye kalan kuyucuklara test serum örneklerinden 25 µl eklendi. Pleytin, 90 dakika oda sıcaklığında (ortalama +21°C) inkübasyonu sonrasında yıkama işlemi için pleyt içeriği boşaltıldı ve kuyucuklar 300 µl yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkandı. Tüm kuyucuklara 100'er µl enzimle işaretli konjugat eklenip 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Yıkama aşaması tekrarlanarak, tüm kuyucuklara 100'er µl tetramethylbenzidine (TMB) substrat eklendi. Pleyt ışık almayan bir ortamda 10 dakika oda ısısında bekletildi ve reaksiyonu durdurmak için her kuyucuğa 100'er µl durdurma solüsyonu (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5M) ilave edildi. Pleytler ELISA okuyucuya (Seac<sup>®</sup>, Sirio S, İtalya) yerleştirildi ve

OD-450 (450nm) de okutulularak değerlendirildi. Her bir örnek için OD ortalama değeri  $[S/P = S-N/P-N]$  formülüne göre hesaplandı  $[S=Örnek OD (450), N= negatif kontrol OD (450), P= pozitif kontrol OD (450)]$ . Buna göre serum örnekleri için hesaplanan S/P oranı 0.30'a eşit ve büyük ise pozitif, 0.30'dan küçük, 0.20'ye eşit ve büyük ise şüpheli, 0.20'den küçük ise negatif olarak belirlendi.

BHV-1'e karşı spesifik antikorların tespiti ve bu antikorların aşılama ya da vahşi tip virüs ile enfeksiyona bağlı olup olmadığının ayırımının yapılabilmesi için Herdchek IBR gE Ab ELISA test kiti (IDEXX Laboratories, USA, Katalog No: 99-09537) kullanıldı. Test üreticinin önerdiği prosedüre göre yapılarak, değerlendirildi. Serum örnekleri ve kontroller, örnek sulandırma solüsyonu ile 1:2 oranında sulandırıldı. Negatif kontrol, pozitif kontrol ve serum örneklerinden 100 µl belirlenmiş kuyucuklara ilave edildi. Pleytler 18-24 saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Yıkama basamağında pleyt içeriği boşaltıldıktan sonra kuyucuklar 300 µl yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkandı. Sonrasında tüm kuyucuklara 100'er µl horse radish peroksidaz (HRPO) enzimle işaretili anti-BHV-1gE konjugat eklenip, 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Yıkama aşaması üç kez tekrarlanarak, tüm kuyucuklara 100'er µl TMB substrat eklendi. Pleyt ışık almayan bir ortamda 15 dakika oda ısısında bekletildi. Reaksiyonu durdurmak için her kuyucuğa 100'er µl durdurma solüsyonu ( $H_2SO_4$  0.5M) eklendi. Pleyt, ELISA okuyucuya (Biotek, Powerwave XS2, U.S) yerleştirilerek 650nm (OD-650)'de okutuldu. Değerlendirme, her bir örnek için üretici firmanın önerdiği  $[S/N değeri=Örnek OD(650)/Negatif Kontrol OD(650)]$  formülasyonu kullanılarak yapıldı. Buna göre örnekler için hesaplanan S/N değerleri; 0.60'dan küçük veya eşit ise pozitif, 0.60'dan fazla, 0.70'den küçük veya eşit işe şüpheli, 0.70'den büyük ise negatif olarak belirlendi.

BHV-4'e karşı oluşan spesifik antikorların tespiti için BHV-4 Ab ELISA test kiti (BIO-X Diagnostics, Belçika, Katalog No: BIO K 263/2) kullanıldı. Test, üretici firmanın önerdiği prosedüre göre uygulanarak, değerlendirildi. Serum örnekleri ve kontroller örnek sulandırma solüsyonu ile 1:100 oranında sulandırıldı. Negatif, pozitif kontrol ve serum örnekleri 100 µl olarak kuyucuklara eklendi. Pleyt alüminyum folyaya sarılarak 1 saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Yıkama basamağında, pleyt içeriği boşaltılarak 200 µl yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkandı.



Tüm kuyucuklara 100'er µl, 1:50 oranında sulandırılmış HRPO enzimle işaretli anti-mammalian-IgG konjugat eklenerek, 1 saat oda sıcaklığında bekletildi. Yıkama aşaması üç kez tekrarlanarak, tüm kuyucuklara 100'er µl TMB substrat eklendi ve pleyt ışık almayan bir ortamda 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Reaksiyonu durdurmak için her kuyucuğa 50'şer µl durdurma solüsyonu (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 1M) eklendi. Pleyt, ELISA okuyucuya (Seac<sup>®</sup>, Sirio S, İtalya) yerleştirilerek, 450nm (OD-450)'de okutuldu. Değerlendirmede elde edilen OD değerleri için 0.70 üzeri pozitif ve 0.30 altı negatif olarak belirlendi. Ayrıca belirlenen pozitiflik değerlerinin derecelendirilmesi amacı ile her bir örnek için üretici firmanın önerdiği [%Değer=Örnek OD(450)\*100/Pozitif Kontrol OD(450)] formülasyonu kullanıldı. Buna göre örnekler için hesaplanan değer %30'dan büyük %60'a eşit ve küçük ise (+), %60'dan büyük %90'a eşit ve küçük ise (++), %90'dan büyük %120'ye eşit ve küçük ise (+++), %120'den büyük %150'ye eşit ve küçük ise (++++), %150'den büyük ise (++++) olarak değerlendirildi.

### 2.5.2. Antijen ELISA

BVDV NSP 2-3 (P80) ve E0(gP48) antijenlerinin belirlenmesi için ticari antijen ELISA kiti (PourQuier ELISA BVD/MD Antigen Mix Screening, Fransa, Katalog No: P00623/06) kullanıldı. Test kısaca; 1/10 oranda sulandırılan anti-E0/NSP2/3 antikor içeren dilüsyon solüsyonundan her kuyucuğa 50 µl, sulandırılan pozitif ve negatif kontrollerden belirlenmiş kuyucuklara 50 µl ve toplanan serumlardan her kuyucuğa 50 µl ilave edildi. Pleyt oda sıcaklığında 90 dakika bekletildi ve yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkandı. Yıkama işlemini takiben enzim peroksidaz işaretli konjugattan her bir kuyucuğa 100 µl ilave edildi ve 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi. İnkübasyon sonrası ve 4 kez yıkama işlemi tekrarlanarak, her bir kuyucuğa 100 µl "revelation solüsyonu" (enzim substrat TMB) ilave edildi. Oda sıcaklığında karanlıkta 20 dakika bekletildikten sonra, kuyucuklara 0.5M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

durdurma solüsyonundan 100 µl ilave edildi. Kuyucuklardaki absorban değerleri ELISA okuyucusunda 450nm’de okutularak sonuçlar değerlendirildi.

Değerlendirme, her bir örnek için üretici firmanın önerdiği [%S/P değeri={Örnek OD(450)-Negatif Kontrol OD(450)}/{Pozitif Kontrol OD(450)-Negatif Kontrol OD(450)}\*100] formülasyonu kullanılarak yapıldı. Buna göre örnekler için hesaplanan %S/P değerleri; %25’ten küçük veya eşit ise negatif, %25’ten büyük ise pozitif olarak belirlendi.

## 2.6. RNA İzolasyonu

BVDV antikor ELISA ve antijen ELISA pozitif olarak tespit edilen sığırlara ait tam kan örneklerinden viral RNA izolasyonu “High Pure Viral RNA Kit” (Roche Diagnostics, Almanya, Katalog No: 11 858 882 001) ticari RNA izolasyon kiti kullanılarak gerçekleştirildi. Bu işlem kısaca; 200 µl tam kan örneği 1.5 ml’lik mikrosantrifüj tüplerine konuldu. Üzerine içerisinde poly (A) taşıyıcı RNA (tRNA) bulunan bağlayıcı solüsyondan 400 µl eklendi. Oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi. Elde edilen karışımın tamamı “high pure filter” tüplere aktarıldı. 8000xg’de 15 saniye santrifüj ardından, içerisinde filtrat bulunan toplama tüpleri değiştirildi. Üzerlerine PZR inhibitörlerini ortamdan uzaklaştırmak amacı ile kullanılan 500 µl “inhibitor removal buffer” solüsyonu ilave edilip 8000xg’de 1 dakika santrifüj edildi. İçerisinde filtrat bulunan toplama tüpleri yenileri ile değiştirildi. Üzerlerine 450 µl yıkama solüsyonu eklenip 8000xg’de 1 dakika santrifüj yapıldı. Yıkama basamağı tekrarlandı ve “high pure filter” tüpler temiz 1.5 ml’lik mikrosantrifüj tüplere oturtuldu. Üzerlerine 50 µl “elution solüsyonu” eklenip 8000xg’de 1 dakika santrifüj edildi. Elde edilen viral RNA kullanılmaya kadar -20°C’ye kaldırıldı.

## 2.7. Tersine Transkriptaz ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR)

Elde edilen RNA'nın, cDNA'ya çevrilmesi için tersine transkripsiyon (RT) işlemi gerçekleştirildi. Bu amaçla; 13 µl RNA örneği, 1 µl random hekzamer primer (Fermentas, Litvanya, Katalog No: #S0142) sırası ile 90°C'de 20 saniye, 80°C'de 20 saniye ve 70°C'de 10 dakika inkübe edildi. Sonrasında 5 µl RT-Buffer (Fermentas, Litvanya, Katalog No: #EP0441), 4 µl dNTPs 10mM (Fermentas, Litvanya, Katalog No: #R0181), 1 µl RNase inhibitörü (Fermentas, Litvanya, Katalog No: #E00381), 1 µl M-MLV RT polimeraz (Fermentas, Litvanya, Katalog No: #EP0441) eklendi. Hazırlanan 25 µl'lik karışım 42°C'de 1 saat ve takibinde 25°C'de 10 dakika inkübe edildi.

RT sonrası elde edilen cDNA'lar PZR için template olarak kullanıldı. BVDV için, 5 µl cDNA, 5 µl PCR buffer 5X: 200mM Tris-HCl (Fermentas, Litvanya, Katalog No: #EP0402), 5 µl MgCl<sub>2</sub> 50mM, 1 µl *Taq* DNA polimeraz 5U/µl (Fermentas, Litvanya, Katalog No: #EP0402), 5 µl dNTPs 1.25mM (Fermentas, Litvanya, Katalog No: #R0181), 4 µl 324/326 primer miks 5 pmol (Çizelge 2.3), 25 µl deionize su, toplam karışım 50 µl olacak şekilde hazırlandı. İlk round reaksiyon; 95°C'de 2 dakika, 95°C'de 45 saniye, 55°C'de 45 saniye, 72°C'de 45saniye ve 72°C'de 5 dakika, 32 siklus olarak gerçekleştirildi. Elde edilen PZR ürünü 1/5 oranında sulandırıldı ve ikinci round PZR için template olarak kullanıldı.

BVDV'nin farklı alt tiplerinin tespiti amacı ile ikinci round RT-PZR işlemleri sırası ile 1AF-1ABR, 1BF-1ABR ve B5-B6 primer çiftleri (Çizelge 2.3) kullanılarak her bir örnek için gerçekleştirildi. Reaksiyonlar; 95°C'de 2 dakika, 95°C'de 30 saniye, 54°C'de 30 saniye, 72°C'de 30 saniye ve 72°C'de 10 dakika, 28 siklus şeklinde gerçekleşti. Elde edilen PZR ürünleri % 1'lik agarozda Tris-asetat-EDTA (TAE) buffer içerisinde yürütüldü ve ultraviyole ışık (UV) altında görüntülendi. PZR için pozitif kontrol virüs olarak Etlik Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'nden temin edilen BVDV NADL suşu kullanıldı.

**Çizelge 2.3.** RT-PZR’de BVDV’nin tespiti için kullanılan primer çiftleri

Hedef Virüs	Primer İsmi	Sekans Dizilimi 5' → 3'	Ürün Büyüküğü	Kaynak
<b>Pan-Pestivirus</b>	324	ATGCCCWTAGTAGGACTAGCA	288 bp	Vilcek ve ark. 1994
	326	TCAACTCCATGTGCCATGTAC		
<b>BVDV-1a</b>	1AF	TCGACGCCTTRRCATGAAGGT	169 bp	Ridpath ve Bolin 1998
<b>BVDV-1b</b>	1BF	TCGACGCTTTGGAGGACAAGC		
<b>BVDV- 1a ve b</b>	1ABR	CCATGTGCCATGTACAG		
<b>BVDV-2</b>	B5	ACTAGCGGTAGCAGTGAG	221 bp	Letellier ve ark. 1999
	B6	CTAGCGGAATAGCAGGTC		

## 2.8. DNA İzolasyonu

BHV-1 ve BHV-4 antikor ELISA pozitif sığırlara ait tam kan örneklerinden DNA izolasyonu “High Pure PCR Template Preparation Kit” (Roche, Almanya, Katalog No: 11796 828001) ticari DNA ekstraksiyon kiti kullanılarak üretici firmanın belirttiğı şekilde gerçekleştirildi. DNA izolasyonu kısaca; 1.5 ml’lik mikrosantrifüj tüplerine 200 µl tam kan, 200 µl bağlayıcı buffer (6M guanidine-HCl, 10mM ure, 10mM Tris-HCl, %20 Trion X-100, pH 4.4) ve 40 µl proteinaz K konuldu. 70 °C’de 10 dakika inkübasyona bırakıldı. Üzerine 100 µl isopropanol (C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O) eklendi. Elde edilen karışımın tamamı toplama tüplerine oturtulmuş “high pure filter” tüplere konuldu. 8000xg’de 1 dakika santrifüj ardından içerisinde filtrat bulunan toplama tüpleri yenileri ile değiştirildi. Üzerlerine PZR inhibitörlerini ortamdan uzaklaştırmak amacı ile kullanılan 500 µl “inhibitor removal buffer” solüsyonu ilave edilip 8000xg’de 1 dakika santrifüj edildi. İçerisinde filtrat bulunan toplama tüpleri yenileri ile değiştirildi. Üzerlerine 500 µl yıkama solüsyonu eklenip 8000xg’de 1 dakika

santrifüj edildi. Yıkama basamağı tekrarlandı. “High pure filter” tüpler temiz 1.5 ml’lik mikrosantrifüj tüplere oturtulup üzerlerine daha önceden 70°C’ye ısıtılmış 200 µl “elution solüsyonu” eklenip 8000 xg’de 1dakika santrifüj edildi. Elde edilen DNA kullanılmaya kadar -20 °C’de muhafaza edildi.

## 2.9. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

BHV-1 glikoprotein E gen bölgesi hedef alınarak hazırlanan PZR karışımı; 5 µl DNA, 10 pmol primer BHV-1 gE1/gE2 (Çizelge 2.4), 1.25 mM dNTP (Fermentas, Litvanya, Katalog No: #R0181), 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 10X PZR buffer ve 1U *Taq* DNA polimeraz (Fermentas, Litvanya, Katalog No: #EP0402) ile hazırlandı. PZR siklus kondüsyonu 95°C’de 2 dakika, 35 siklus 95°C’de 30 saniye, 58°C’de 30 saniye, 72°C’de 30 saniye ve 72°C’de 10 dakika ilave uzama basamağı şeklinde gerçekleştirildi

BHV-1 glikoprotein B gen bölgesi hedef alınarak hazırlanan PZR karışımı; 5 µl DNA, 10 pmol primer BVH-1 gB1/gB2 (Çizelge 2.4), 1.25 mM dNTP (Fermentas, Litvanya, Katalog No: #R0181), 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 10X PZR buffer ve 1U *Taq* DNA polimeraz (Fermentas, Litvanya, Katalog No: #EP0402) ile hazırlandı. PZR siklus kondüsyonu 95°C’de 2 dakika, 35 siklus 95°C’de 30 saniye, 58°C’de 30 saniye, 72°C’de 30 saniye ve 72°C’de 10 dakika ilave uzama basamağı şeklinde gerçekleştirildi.

BHV-4 tespiti için hazırlanan PZR karışımı; 5 µl DNA, 10 pmol primer BHV-4 gB1/gB2 (Çizelge 2.4), 1.25 mM dNTP (Fermentas, Litvanya, Katalog No: #R0181), 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 10X PZR buffer ve 1U *Taq* DNA polimeraz (Fermentas, Litvanya, Katalog No: #EP0402) ile hazırlandı. PZR siklus kondüsyonu 95°C’de 2 dakika, 32 siklus 95°C’de 45 saniye, 56°C’de 45 saniye, 72°C’de 45 saniye ve 72°C’de 10 dakika ilave uzama basamağı şeklinde gerçekleştirildi.

BHV-5 tespiti için hazırlanan PZR karışımı; 5 µl DNA, 10 pmol primer BHV-5 gD1/gD2 (Çizelge 2.4), 1.25 mM dNTP (Fermentas, Litvanya, Katalog No: #R0181), 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 10X PCR buffer ve 1U *Taq* DNA polimeraz (Fermentas, Litvanya, Katalog No: #EP0402) ile hazırlandı. PZR siklus kondüsyonu 95°C’de 2 dakika, 32 siklus 95°C’de 1 dakika, 59°C’de 1 dakika, 72°C’de 1 dakika ve 72°C’de 10 dakika ilave uzama basamağı şeklinde gerçekleştirildi

**Çizelge 2.4.** Herpes virüslerinin tespiti için kullanılan primer çiftleri

Hedef Virüs	Primer İsmi	Sekans Dizilimi 5' → 3'	Ürün Büyüklüğü	Kaynak
<b>BHV-1</b>	gB1	AAGCGCAAAAACGTGTG	323 bp	Santurde ve ark. 1996
	gB2	TGCAGGTACAGCTTGGC		
<b>BHV-4</b>	gE1	AGGAGACGCAGTTGGCGCTGA	281 bp	Schynts ve ark. 1999
	gE2	CAGGAAGTACCAGTCGATGCTG		
<b>BHV-4</b>	gB1	CCCTTCTTTACCACCACCTACA	615 bp	Wellenberg ve ark. 2001b
	gB2	TGCCATAGCAGAGAAACAATGA		
<b>BHV-5</b>	gD1	GCCCGCAGTTTCCCCTACC	564 bp	Alegre ve ark. 2001
	gD2	CGCACCCGCTCTCAATCTT		

## 2.10. Çoğaltılan PZR Ürünlerinin Jel Elektroforezi

Agaroz jel hazırlanırken tris base'den (Sigma) 121 g alınarak 28.55 ml asetik asit (Merck) içerisine konuldu. Üzerine 0.5M pH 8.0 EDTA çözeltilisinden 50 ml ilave edildi. Sonrasında 400 ml distile su (dH<sub>2</sub>O) eklenerek 50X TAE hazırlandı. Agaroz jel hazırlanması sırasında 1X olacak şekilde seyreltildi. PZR ürününü görüntülemek için % 1'lik agaroz jel hazırlandı. Agaroz jelin hazırlanması sırasında 1 g agaroz (Vivantis), hassas terazide (Scaltec, SBA31, Almanya) tartıldı. Bir erlenmayer içerisinde 100 ml 1X TAE ile çözdürüldü. Çözünmenin hızlı gerçekleşmesi için mikrodalga fırın kullanıldı. Agarozun ısısı yaklaşık 50°C ye düştükten sonra eriyiğe 0.5 µg/ml oranında ethidium bromide (Vivantis) ilave edilerek soğutuldu.

Çoğaltılan RT-PZR ve PZR örnekleri 6X yükleme tamponu (%0.35 bromfenol mavisi ve %30 gliserol) ile jele yüklendi. Elektroforez işlemleri, Cleaver elektroforez cihazı (Warwickshire, İngiltere) kullanılarak 100 volt (V) akımda 60 dakikada gerçekleştirildi. Agaroz jel ve UV ışık kaynağı (Illuminix, A.B.D) kullanılarak PZR ürünlerine ait hedef bantlar görüntüldü (Azkur ve ark. 2013a).

## 2.11. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel değerlendirme için "statistical package for social sciences" (SPSS Release 11.5, SPSS inc., Chicago, IL, USA) programı kullanıldı. Parametrik ve parametrik olmayan niteliksel verilerin karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis, Mann-Whitney U ve Student t testi kullanıldı. İstatistiksel farklılık, p değeri 0.005'in altında ise anlamlı kabul edildi. İstatistiksel analiz ve verilerin değerlendirilmesi Damla ASLAN (Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi İstatistik Bölüm Mezunlu, Veri Analiz Yöneticisi/Simsoft Ltd.Şti-Ankara) tarafından gerçekleştirildi.

### **2.12. Dizi Analizi ve Filogenetik Analiz**

Çoğaltılan PZR ürünleri agaroz jelde görüntülenmesi ardından sekans dizi analizi, hizmet alımı yolu ile İontek A.Ş. (Maslak, İstanbul) tarafından gerçekleştirildi. Dizilemede BVDV için 326 (Çizelge 2.3), BHV-1 için BHV-1 gB2 (Çizelge 2.4), primerleri kullanıldı. Daha sonra elde edilen gen dizilimleri, Mega 6 ve Clustal Omega programları kullanılarak analiz edildi.

### **2.13. Hematolojik Parametrelerdeki Değişim Grafiklerin Hazırlanması**

BVDV, BHV-1, BHV-4 etkenlerinin hematolojik parametreler üzerindeki olası etkilerini gösterir grafikler Microsoft Excel 2007 (Microsoft Corporation) paket programı kullanılarak hazırlandı. Grafiklerin hazırlanması için program içerisinde bulunan “Ekle” menüsü altında bulunan “Grafikler” sekmesinden “XY (Dağılım) grafiği” seçilerek kullanıldı. XY (dağılım) grafiğinde dağılımı gösterilecek ilgili veri aralıkları seçilmesi ve X ile Y eksenlerine ifade edeceği parametre bilgileri işlendikten sonra grafiğin oluşturulması işlemi tamamlandı.



### 3. BULGULAR

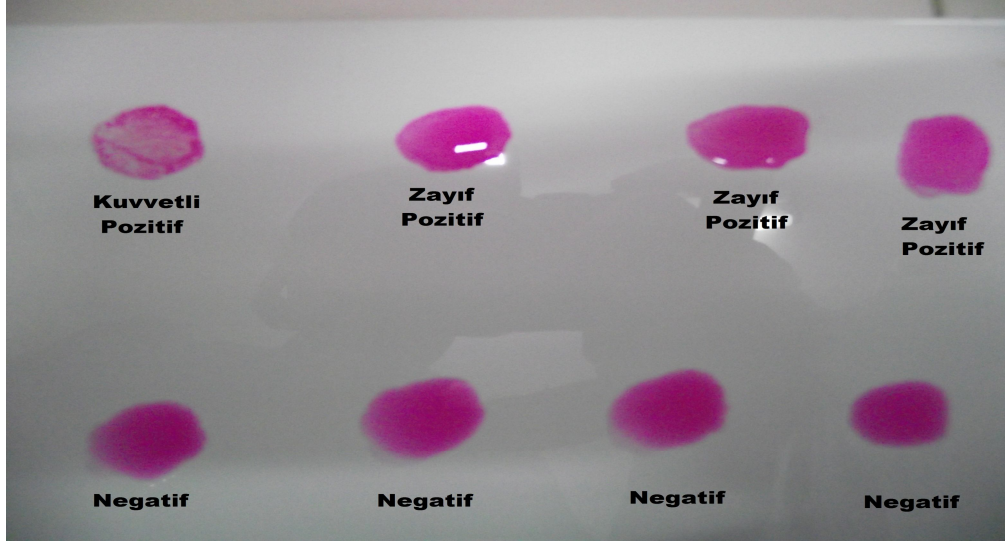
#### 3.1. Rose Bengal Pleyt ve Serum Tüp Aglütinasyon Testi Sonuçları

Ankara, Çorum, Kırıkkale ve Yozgat illerinde bulunan sığır işletmelerinde yetiştirilen 15 aylık yaştan büyük abort ve/veya döl tutmama sorunu yaşayan 656 adet sığırdan kan örnekleri toplandı (Çizelge 3.1). Elde edilen serum örneklerinde *Brucella* varlığı RBPT kullanılarak araştırıldı ve 656 adet serum örneğinin 45'inin (%6.85) pozitif olduğu gözlemlendi (Çizelge 3.1).

**Çizelge 3.1.** İller bazında *Brucella* RBPT sonuçları

İlçe Adı	Analiz Edilen Serum Sayısı	RBPT Pozitif Serum Sayısı
KIRIKKALE	390	28
ANKARA	91	5
YOZGAT	89	10
ÇORUM	86	2
<b>Toplam</b>	<b>656</b>	<b>45 (%6.85)</b>

Test sonucu değerlendirilirken pozitiflik; iri taneli aglütinasyon oluşumu, zayıf pozitiflik; hafif ince taneli aglütinasyon oluşumu, negatiflik ise; serum ve antijen karışımında değişiklik olmaması ile belirlendi (Şekil 3.1).

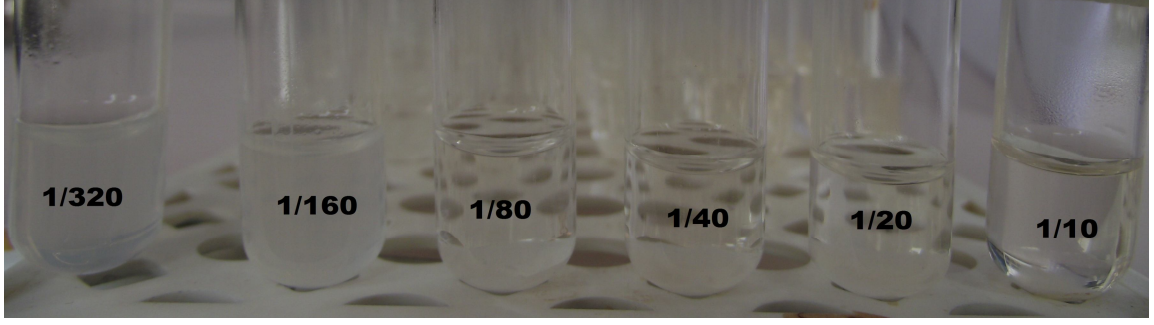


**Şekil 3.1.** *Brucella* tespiti için kullanılan RBPT sonucu elde edilen kuvvetli pozitif, zayıf pozitif ve negatif örnekler

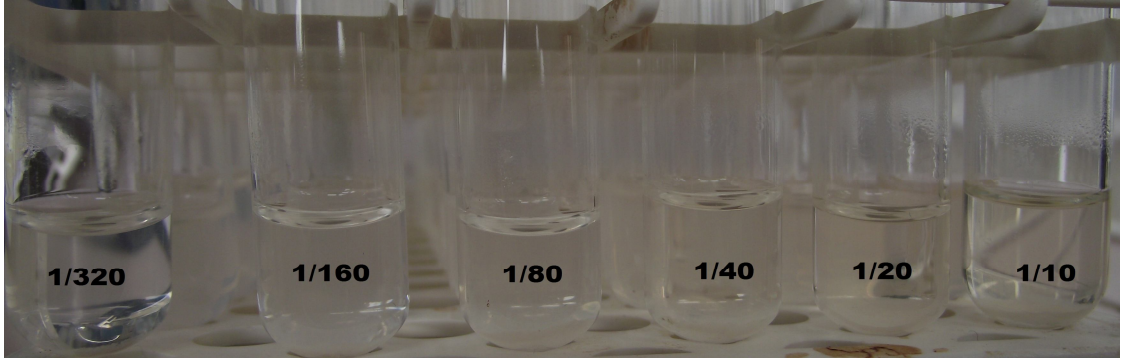
RBPT ile pozitif reaksiyon veren 45 serum örneğinde, antikor titresinin belirlenmesi için STAT kullanıldı. Kırkbeş serum örneğinin 41'inde 1/80 üzeri titre belirlendi. Buna göre Ankara (n=5), Çorum (n=1), Kırıkkale (n=25) ve Yozgat (n=10) illerinde *Brucella* enfeksiyonuna bağlı pozitiflik oranı 41/656 (%6.25) olarak tespit edildi (Çizelge 3.2). 1/80 ve 1/320 titreye sahip serum örnekleri Şekil 3.2 ve Şekil 3.3'te gösterildi.

**Çizelge 3.2.** RBPT pozitif tespit edilen serum örneklerinin, STAT sonucu elde edilen titre sonuçları

Serum Tüp Aglütinasyon Titreleri		
Titre Düzeyi	N	%
1/320	21/45	%46.6
1/160	12/45	%26.6
1/80	8/45	%17.7
<1/80	4/45	%8.8
<b>Toplam</b>		<b>41/656 (%6.25)</b>



**Şekil 3.2.** RBPT pozitif serumların titrelerinin belirlenmesi için yapılan STAT sonucu 1/80 titreye sahip serum örneği



**Şekil 3.3.** RBPT pozitif serumların titrelerinin belirlenmesi için yapılan STAT sonucu 1/320 titreye sahip serum örneği

### 3.2. Antikor ve Antijen ELISA Sonuçları

Ankara, Çorum, Kırıkkale ve Yozgat illerinden toplanan 656 sığırdan alınan serum örneklerinden 41'i *Brucella* pozitif olarak tespit edildi ve örnekleme dışı bırakıldı. 615 sığıra ait serum örneklerinde BVDV, BHV-1 ve BHV-4'e spesifik antikor varlığı ticari antikor ELISA kitleri ile incelendi. Buna göre genel seropozitiflik oranları; BVDV için %70.89 (436/615), BHV-1 için %41.3 (254/615) ve BHV-4 için %28.78 (177/615) olarak belirlendi (Çizelge 3.3).

**Çizelge 3.3.** Toplanan serum örneklerinde BVDV, BHV-1, BHV-4 antikor ELISA sonuçları

<b>Virüs</b>	<b>Seropozitiflik Oranları</b>
<b>BVDV</b>	436/615 (%70.89)
<b>BHV-1</b>	254/615 (%41.3)
<b>BHV-4</b>	177/615 (%28.78)

BVDV, BHV-1 ve BHV-4 ELISA sonuçları yorumlandığında, 615 serum örneğinin 111'inde (%18.04) bu üç virüse karşı antikor varlığı tespit edildi. 615 örneğin 143'ünde (%23.25) ise bu virüslere spesifik antikor varlığı belirlenmedi (Çizelge 3.4). Tekli seropozitiflik oranları 615 serum örneğinde BVDV için; 156 örnek (%25.36), BHV-1 için; 12 örnek (%1.95), BHV-4 için; 20 örnek (%3.25) olarak belirlendi. İkili seropozitiflik oranları BVDV/BHV-1 için; 615 sığırdada 127 (%20.65), BVDV/BHV-4 için; 615 sığırdada 42 (%6.82), BHV-1/BHV-4 için; 615 sığırdada 4 (%0.65) olarak tespit edildi (Çizelge 3.4).

**Çizelge 3.4.** Serum örneklerinde BVDV, BHV-1, BHV-4 antikor ELISA seropozitiflik oranları karşılaştırması

<b>Viral Antikorların Varlığı</b>	<b>Seropozitiflik (Adet/%)</b>
<b>Üçlü Seropozitiflik</b>	
BHV-1 + BVDV + BHV-4 +	<b>111/615 (%18.04)</b>
<b>İkili Seropozitiflik</b>	
BHV-1 + / BVDV + / BHV-4 -	<b>127/615 (%20.65)</b>
BHV-1 + / BVDV - / BHV-4 +	<b>4/615 (%0.65)</b>
BHV-1 - / BVDV + / BHV-4 +	<b>42/615 (%6.82)</b>
<b>Tekli Seropozitiflik</b>	
BHV-1 + / BVDV - / BHV-4 -	<b>12/615 (%1.95)</b>
BHV-1 - / BVDV + / BHV-4 -	<b>156/615 (%25.36)</b>
BHV-1 - / BVDV - / BHV-4 +	<b>20/615 (%3.25)</b>
<b>Üçlü Seronegatiflik</b>	
BHV-1 - / BVDV - / BHV-4 -	<b>143/615 (%23.25)</b>

Örneklerin toplandığı iller bazında seropozitiflik oranları Kırıkkale’de BVDV için; 316/365 (%85.47), BHV-1 için; 189/365 (%51.78) ve BHV-4 için; 107/365 (%29.31) olarak tespit edildi. Çorum’da BVDV için; 6/85 (%7.05) olarak belirlenir iken BHV-1 ve BHV-4 negatif olarak tespit edildi. Yozgat için seropozitiflik oranları BVDV için; %97.46 (77/79), BHV-1 için; %79.74 (63/79) ve BHV-4 için; %62.02 (49/79) olarak, Ankara’da BVDV için; %43.02 (37/86), BHV-1 için; %2.32 (2/86) ve BHV-4 için; %24.41 (21/86) olarak hesaplandı (Çizelge 3.5).

**Çizelge 3.5.** Toplanan serum örneklerinde illere göre BVDV, BHV-1, BHV-4 seropozitiflik oranları

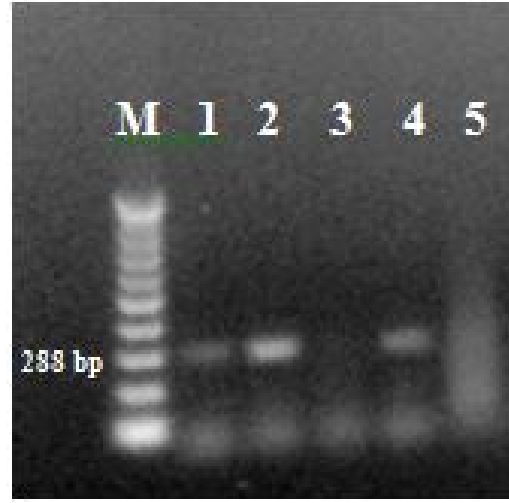
	<b>BVDV Ab (+)</b>	<b>BHV-1 Ab (+)</b>	<b>BHV-4 Ab (+)</b>
<b>KIRIKKALE</b>	316/365(%86.57)	189/365 (%51.78)	107/365 (%29.31)
<b>ÇORUM</b>	6/85 (%7.05)	0/85	0/85
<b>YOZGAT</b>	77/79 (%97.46)	63/79 (%79.74)	49/79 (%62.02)
<b>ANKARA</b>	37/86 (%43.02)	2/86 (%2.32)	21/86 (%24.41)

BVDV için antijen varlığı serum örneklerinde antijen ELISA kiti ile test edildi. Bunun için 615 serum örneği 7 şerli olarak gruplandırılarak 88 havuz oluşturuldu. Havuzlar oluşturulurken her bir serum örneğinden 500’er µl alınarak temiz cam tüplere konuldu ve vorteks ile karıştırıldı. Antijen ELISA sonucunda toplam 88 havuzun 10’unda bulunan örneklerde pozitiflik tespit edildi.

### 3.3. RT-PZR ve PZR Sonuçları

BVDV RNA'sının saptanması için tüm örneklerden (antikor ELISA pozitif olan 436 ve antijen ELISA pozitif 10 havuzda bulunan 70 adet sığır) RNA izolasyonu yapıldı. Nested RT-PZR'nin ilk roundu ile cDNA'lar 324/326 primerleri (Çizelge 2.3) kullanılarak test edildi. NADL referans suşu ve tam kan örnekleri için 288 bp büyüklükte PZR ürünleri %1'lik agaroz jelde, UV altında görüntülendi (Şekil 3.4).

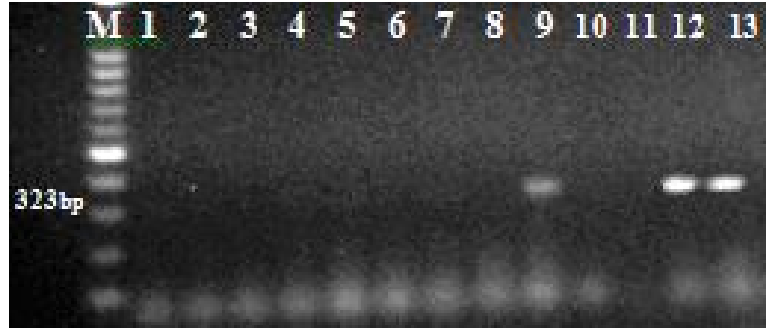
RT-PZR ile test edilen 506 adet tam kan örneğinin 18'inde (%3.55) BVDV viral nükleik asit varlığı tespit edildi (Çizelge 3.6).



**Şekil 3.4.** BVDV viral antijeni tespiti için kurulan nested RT-PZR ilk round. M: Marker DNA (Vivantis) 100 bp, 1-2; Sahadan toplanan pozitif örnekler, 3; Sahadan toplanan negatif örnek, 4; Pozitif kontrol NADL suşu, 5; Negatif Kontrol (dH<sub>2</sub>O)

İlk round RT-PZR ile pozitif olarak belirlenen örneklerin BVDV 1a-1b ve BVDV-2 olarak ayırımının yapılabilmesi için ikinci round PZR yapıldı. Her örnek 1AF-1ABR, 1BF-1ABR ve B5-B6 primer çiftleri kullanılarak test edildi (Çizelge 2.3). Hiçbir örnekte beklenen baz çifti büyüklüğüne sahip ampikon gözlenmedi (Veri gösterilmedi).

BHV-1 antikor ELISA pozitif olarak belirlenen 254 tam kan örneğine DNA izolasyonu yapıldı. Toplanan örneklerle ve kontrol virüse ait DNA'lar glikoprotein B (gB) ve E (gE) gen bölgeleri hedef alan primerler kullanılarak PZR kuruldu. Çoğaltılan PZR ürünleri %1'lik agaroz jelde UV altında görüntülendi (Şekil 3.5). Buna göre PZR ile test edilen 254 örnekten birinde (%0.39) BHV-1 gB primerleri ile nükleik asit varlığı tespit edildi (Çizelge 3.6).



**Şekil 3.5.** BHV-1 viral nükleik asit tespiti için kurulan, gB PZR.

M: Marker DNA (Vivantis) 100bp, 1-10; Sahadan toplanan örnekler, 9; Sahadan toplanan pozitif örnek, 11; Negatif kontrol (dH<sub>2</sub>O), 12-13; Pozitif Kontrol BHV-1 Cooper Suşu

BHV-5 genomunun tespiti için, BHV-1 antikor ELISA pozitif 254 tam kan örneğinden izole edilen DNA'lar, BHV-5 gD1/gD2 (Çizelge 2.4) primer çiftleri ile hazırlanan PZR ile test edildi. Hiçbir örnekte aranılan büyüklükte amplicon gözlemlenmedi (Çizelge 3.6).

BHV-4 antikor ELISA pozitif 177 tam kan örneğinden DNA izolasyonu gerçekleştirildi. Tam kan örneklerinden izole edilen DNA'lar, BHV-4 gB1/gB2 (Çizelge 2.4) primer çiftleri ile hazırlanan PZR ile test edildi. Hiçbir örnekte beklenen büyüklükte band agaroz jelde görülmedi (Çizelge 3.6).

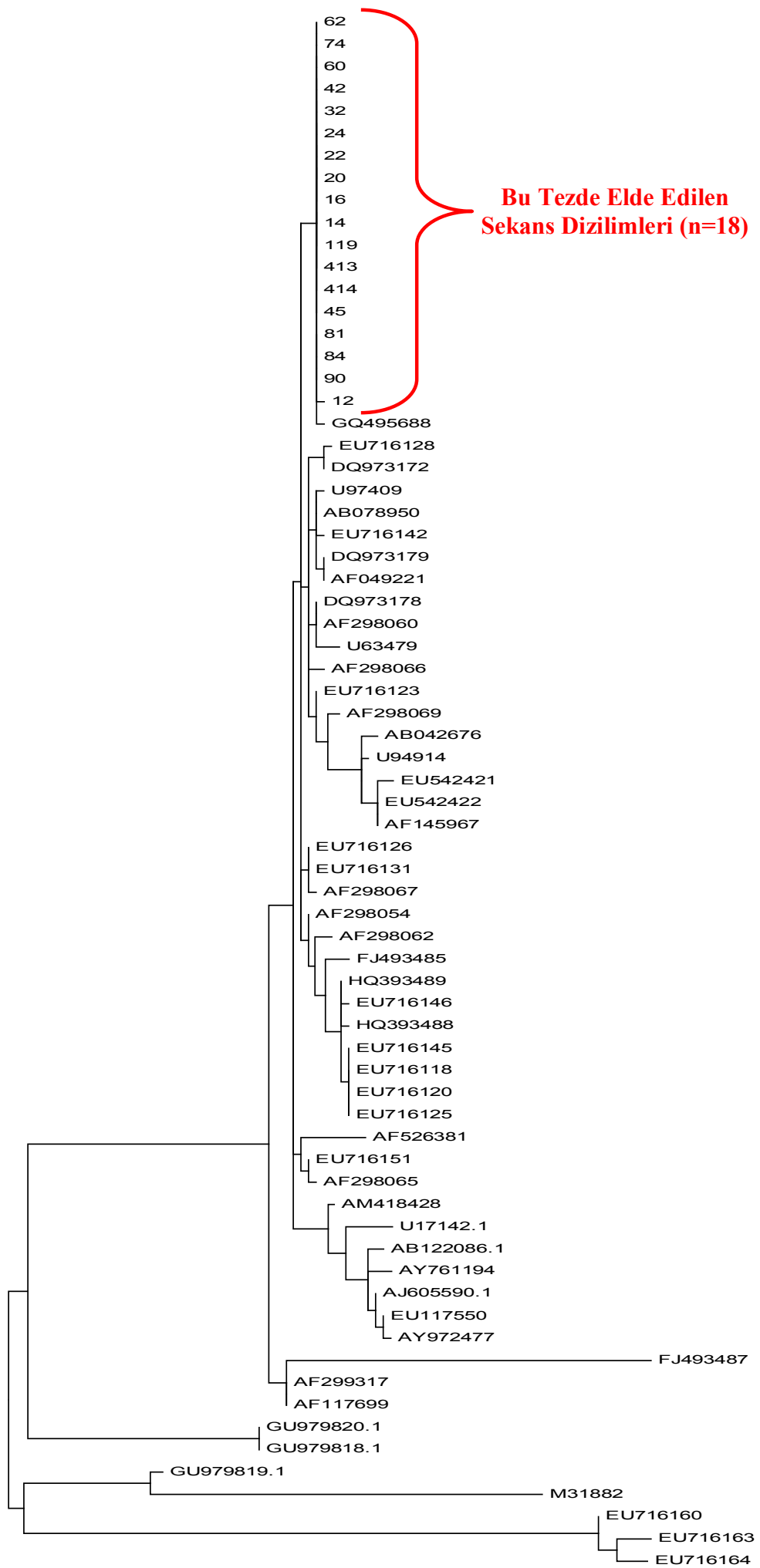
**Çizelge 3.6.** PZR ile belirlenen BVDV, BHV-1, BHV-4 ve BHV-5 pozitiflik oranları

<b>Virüs</b>	<b>PZR Pozitif</b>
<b>BVDV</b>	<b>18/506 (%3.55)</b>
<b>BHV-1</b>	<b>1/254 (%0.39)</b>
<b>BHV-4</b>	<b>0/177</b>
<b>BHV-5</b>	<b>0/254</b>

#### **3.4. Gen Sekans ve Filogenetik Analiz**

BVDV için; RT-PZR ardından pozitif DNA'lara yapılan dizi analizi sonucu elde edilen ampikon dizileri ile Kırıkkale'den daha önce bildirilen BVDV dizilimleri, BVDV-1, BVDV-2, BDV ve CSFV ile karşılaştırıldı. Bu işlem Mega 6 ve Clustal Omega bilgisayar programında "Maximum Composite Likelihood" yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi (Şekil 3.6; Çizelge 3.7).





**Şekil 3.6.** BVDV için yapılan filogenetik analiz ve filogenetik ağaç

Filogenetik ağaç, Pestivirüs genomunun 5'-UTR'si için çoklu dizi karşılaştırma MEGA 6 ve Clustal Omega programında “Maximum Composite Likelihood” yöntemi kullanılarak oluşturuldu. İlk paragrafta verilen dizilimler bu tezden elde edildi.

119-KF425303, 74-KF434627, 60-KF434625, 62-KF434626, 32-KF434623, 24-KF434622, 22-KF434621, 20-KF434620, 14-KF434618, 16-KF434619, 12-KF425300, 45-KF425299, 413-KF425302, 414- KF425301, 90- KF434630, 84-KF434629, 81-KF434628, 42-KF434624.

**BVDV-1;** HQ393488.2, HQ393489.2, EU716163, GQ495688, M31882, EU716145.1, EU716142, EU716128, EU716160, EU716123, DQ973178, AF298060, U63479, DQ973179, AF049221, U97409, AB078950, EU716151, AF298065, AF298062, AF298054, AF298067, EU716126, EU716131, EU716164, AF298069, AF298066, FJ493485, AF299317, AF117699, EU716118, EU716120, EU716125, EU716146, AF526381, DQ973172.

**BVDV-2;** EU542421, EU542422, AF145967, U94914, AB042676.

**BDV;** AM418428, U17142, FJ493487, AB122086, GU979820.1, GU979819, GU979818.1.

**CSFV;** AJ605590, AY972477, EU117550, AY761194.

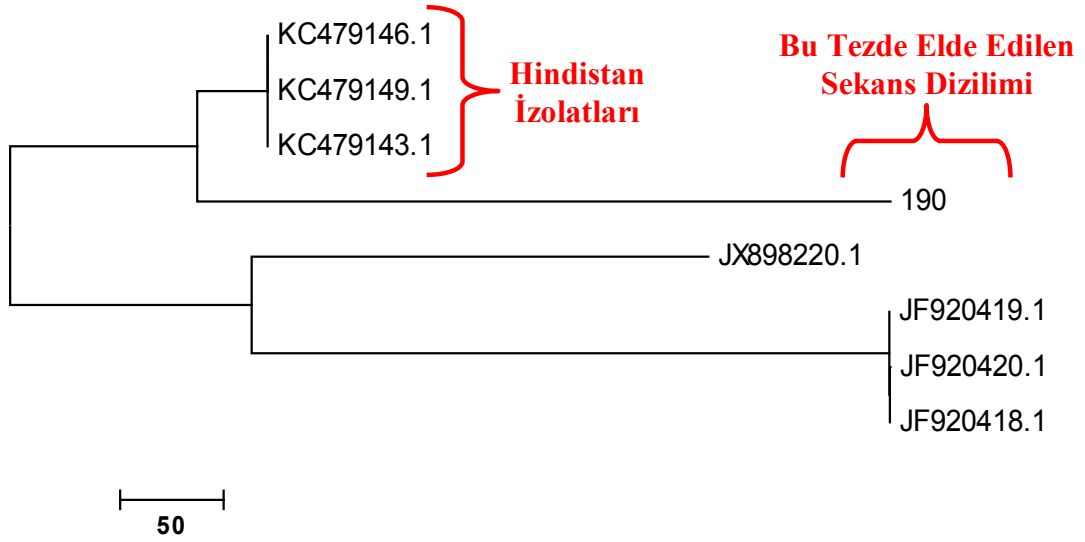
MEGA 6 ve Clustal Omega ile yapılan analizde bu tezde elde edilen sekans dizilimleri ile Gen bankasında kayıtlı BVDV izolatları dizilimlerinin genetik farklılıkları ve nükleotidlerin birbirlerine uzaklıkları Çizelge 3.7’de gösterilmiştir. Yapılan karşılaştırmalara göre nükleotid uzaklıkları 0 ile 3.9 arasında değişmektedir. Bu tezde elde edilen 45-KF425299 (Çizelge 3.7’de Numara: 53), 12-KF425300 (Çizelge 3.7’de Numara: 54), 414-KF425301 (Çizelge 3.7’de Numara: 55), 413-KF425302 (Çizelge 3.7’de Numara: 56), 119-KF425303 (Çizelge 3.7’de Numara: 57), 14-KF434618 (Çizelge 3.7’de Numara: 58), 16-KF434619 (Çizelge 3.7’de Numara: 59), 20-KF434620 (Çizelge 3.7’de Numara: 60), 22-KF434621 (Çizelge 3.7’de Numara: 61), 24-KF434622 (Çizelge 3.7’de Numara: 62), 32-KF434623 (Çizelge 3.7’de Numara: 63), 42-KF434624 (Çizelge 3.7’de Numara: 64), 60-KF434625 (Çizelge 3.7’de Numara: 65), 62-KF434626 (Çizelge 3.7’de Numara: 66), 74-KF434627 (Çizelge 3.7’de Numara: 67), 81-KF434628 (Çizelge 3.7’de Numara: 68), 84-KF434629 (Çizelge 3.7’de Numara: 69), 90-KF434630 (Çizelge 3.7’de Numara: 70) dizilimlerinin birbirine uzaklık değerleri 0 (sıfır) olarak belirlendi.

Gen bankasından elde edilen ve bu tezde belirlenen dizilimler karşılaştırıldığında en düşük değer, GQ495688 (Çizelge 3.7’de Numara: 16) ile aralarında olduğu görüldü. Bu tezde elde edilen dizilimler ile arasında en yüksek uzaklık değerini ise EU716163 (Çizelge 3.7’de Numara: 14) ile tespit edildi (Çizelge 3.7).

**Çizelge 3.7.** BVDV için nükleotit sekans uzaklıklarının karşılaştırması



BHV-1 gB ile kurulan PZR'den elde edilen pozitif DNA örneği için dizi analizi gerçekleştirildi. Ülkemizde ilk kez gB kısmi gen dizilimi gen bankasına yüklendi ve uluslararası diğer dizilimler ile karşılaştırıldı. Sonuç olarak Hindistan'da 2013 yılında yapılan kısmi gB gen dizisine yakınlık tespit edildi (Şekil 3.7).



**Şekil 3.7.** BHV-1 dizilimi, filogenetik analiz

Filogenetik ağaç, BHV-1 genomu gB için çoklu dizi karşılaştırma MEGA 6 kullanılarak oluşturuldu. 190 (KF716130.1) bu tez kapsamında elde edildi. Diğer gen dizileri; C479146.1, KC479143.1, KC479146.1, KC479149.1, JF920420.1, JF920419.1, JF920418.1, JX898220.1 gen bankasından sağlanmıştır.

### 3.5. Virüslerin Hematolojik Parametreler Üzerine Etkileri

Toplanan 360 tam kan örneği MS9-3 hemogram cihazında (Melet Schloesing Labarotoires®, Fransa) analiz edildi. Analiz sonucu lökosit sayısı (white blood cells/WBC), monosit yüzdesi (MON%), monosit sayısı (MON#), lenfosit yüzdesi (LYM%), lenfosit sayısı (LYM#), nötrofil granülosit yüzdesi (N.GR%), nötrofil granülosit sayısı (N.GR#), alyuvar sayısı (red blood cell/RBC), eritrositlerin ortalama büyüklüğü, (mean corpuscular volume/MCV), hematokrit değeri (HCT), eritrositlerdeki ortalama hemoglobin konsantrasyonu (mean corpuscular hemoglobin concentration/MCHC), ortalama hemoglobin konsantrasyonu (mean corpuscular hemoglobin/MCH), hemoglobin (Hgb), trombosit hacmi (mean platelet volume/MPV), trombosit sayısı (platelet/PLT) değerleri elde edildi (Çizelge 3.8).

**Çizelge 3.8.** MS9-3 hemogram kan cihazı kullanılarak 360 sığıra ait tam kanlardan elde edilen hematolojik değerler

Hematolojik Parametre	N	Ort.-Std	Referans Değerler
WBC ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	360	15.44±9.85	4-12*
RBC ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ )	360	6.06±0.99	5-10*
PLT ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	360	161.91±90.95	100-800*
Lym (%)	360	46.05±19.48	45-80**
Mon (%)	360	13.76±6.85	0-8*
N/Gr (%)	360	39.62±14.73	10-30**
Hct (%)	360	24.67±3.64	21-30****
Lym# ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	360	8.13±7.81	1.8-8.1***
Mon# ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	360	1.76±0.75	0.1-0.7***
N/Gr# ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	360	5.48±2.70	0.6-4.1*
MCV (fL)	360	41.10±4.57	40-60****
MPV (fL)	360	4.65±0.52	4.6-7.4*
MCHC (g/dL)	360	53.78±182.06	30-40**
Hgb (g/dL)	360	13.45±49.94	8-15****
MCH (pg)	360	22.34±78.25	11-17****

İstatistiksel değerlendirme için SPSS 11.5 programında yararlanıldı.

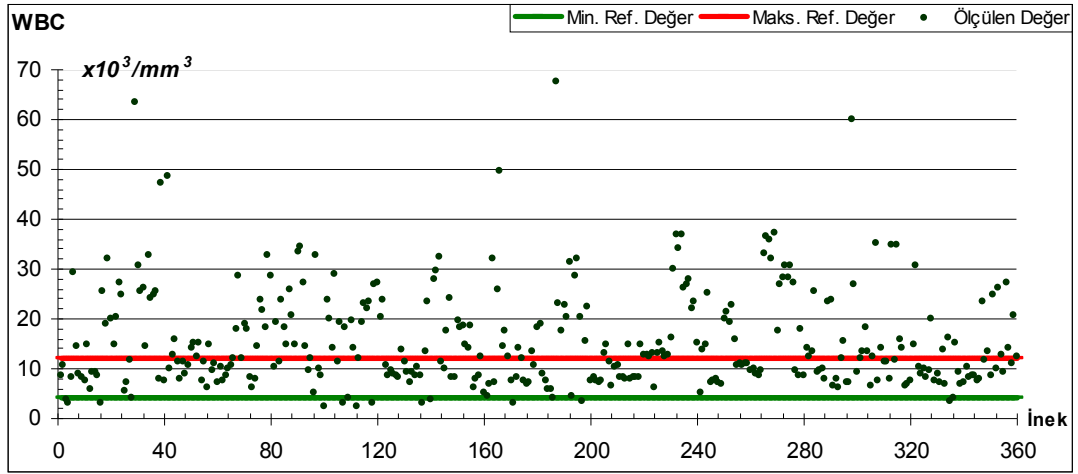
\*Merck Manual, 2012

\*\*Başoğlu ve ark. 2012

\*\*\*Wood ve ark. 2010

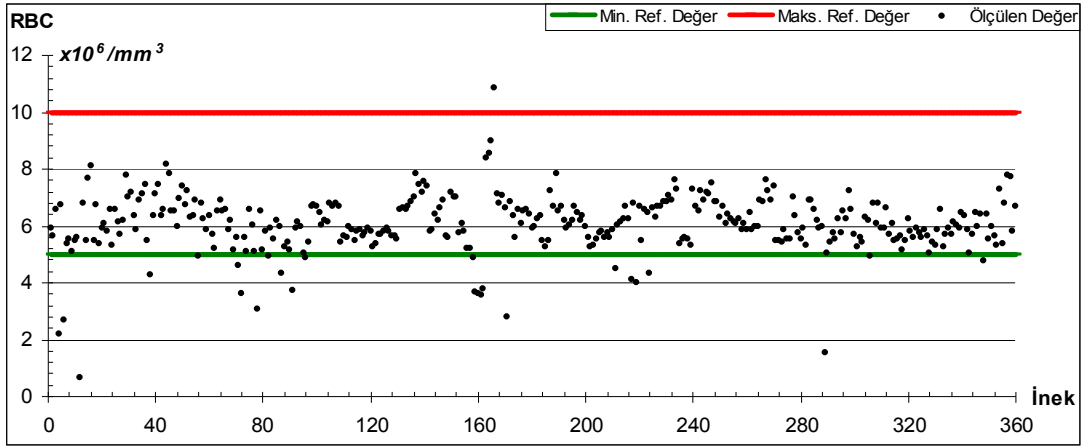
\*\*\*\*Feldman ve ark. 2000

Lökosit sayısı (white blood cells/WBC) değerinin sığırlarda normal referans aralığı  $4-12 \times 10^3/\text{mm}^3$ 'dir (Merck Manual, 2012). 360 tam kan örneğinde ölçülen lökosit sayısı değeri aritmetik ortalaması  $15.44 \pm 9.85 \times 10^3/\text{mm}^3$  olarak tespit edildi (Çizelge 3.8). 360 tam kan örneğinin 160'sinin  $4-12 \times 10^3/\text{mm}^3$  arasında, 12'sinin  $4 \times 10^3/\text{mm}^3$  altında ve 188'inin  $12 \times 10^3/\text{mm}^3$  üzerinde değere sahip olduğu belirlendi (Şekil 3.8).



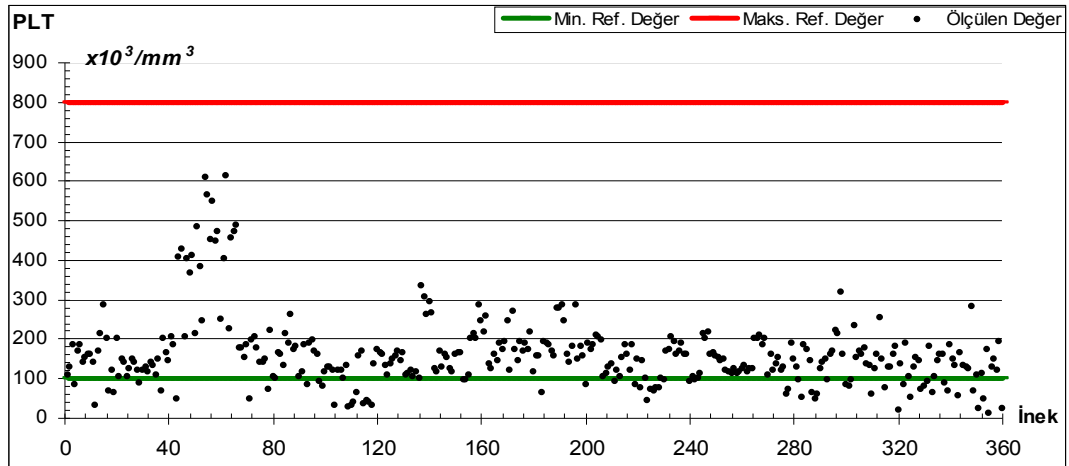
**Şekil 3.8.** Hematolojik yönden analiz edilen ineklere ait “lökosit sayısı (white blood cells/WBC)” değeri ile minimum ve maksimum referans değerler. X eksenini; inek sayısını (n=360), Y eksenini; WBC parametresinin  $1 \text{ mm}^3$  kandaki değerini ifade etmektedir.

Alyuvar sayısı (red blood cell/RBC) değerinin sığırlarda normal referans aralığı  $5-10 \times 10^6/\text{mm}^3$ 'dür (Merck Manual, 2012). 360 sığıra ait tam kan örneğinde ölçülen alyuvar sayısı değeri aritmetik ortalaması  $6.06 \pm 0.99 \times 10^6/\text{mm}^3$  olarak tespit edildi (Çizelge 3.8). Analiz edilen 360 tam kan örneğinin 334'ünün  $5-10 \times 10^6/\text{mm}^3$  arasında, 25'inin  $5 \times 10^6/\text{mm}^3$  altında ve 1'inin  $10 \times 10^6/\text{mm}^3$  üzerinde değere sahip olduğu gözlemlendi (Şekil 3.9).



**Şekil 3.9.** Hematolojik yönden analiz edilen ineklere ait “alyuvar sayısı (red blood cell/RBC)” değeri ile minimum ve maksimum referans değerler. X eksenini, inek sayısını (n=360), Y eksenini RBC parametresinin  $1 \text{ mm}^3$  kandaki değerini ifade etmektedir.

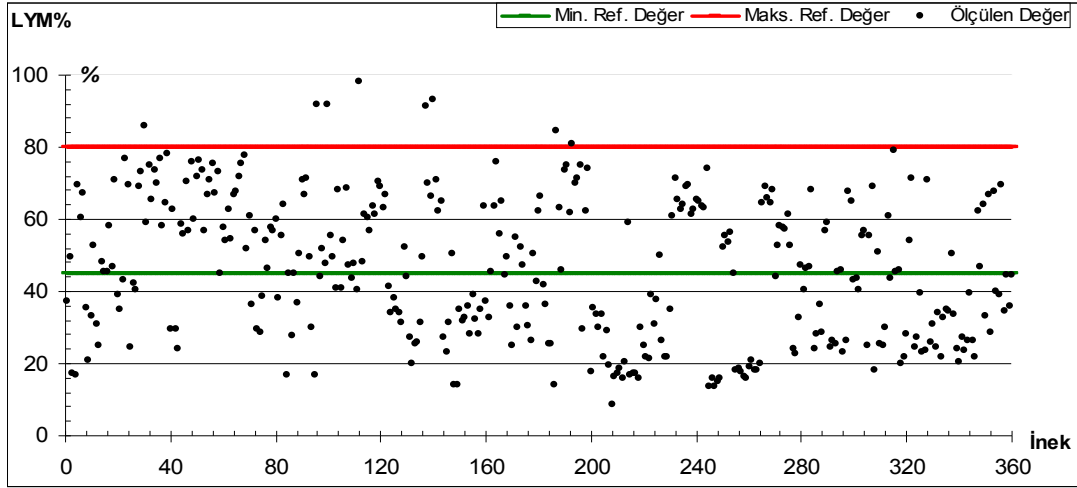
Trombosit sayısı (platelet/PLT) değerinin sığırlarda normal referans aralığı  $100-800 \times 10^3/\text{mm}^3$ 'dür (Merck Manual, 2012). 360 sığıra ait tam kan örneğinde ölçülen trombosit değeri aritmetik ortalaması  $161.91 \pm 90.95 \times 10^3/\text{mm}^3$  olarak tespit edildi (Çizelge 3.8). Analiz edilen 360 tam kan örneğinin 296'sının  $100-800 \times 10^3/\text{mm}^3$  arasında, 64'ünün  $100 \times 10^3/\text{mm}^3$  altında olduğu belirlenirken,  $800 \times 10^3/\text{mm}^3$  üzerinde değere sahip örnek gözlenmedi (Şekil 3.10).



**Şekil 3.10.** Hematolojik yönden analiz edilen ineklere ait “trombosit sayısı (platelet/PLT)” değeri ile minimum ve maksimum referans değerler. X eksenini, inek sayısını (n=360), Y eksenini PLT parametresinin  $1 \text{ mm}^3$  kandaki değerini ifade etmektedir.

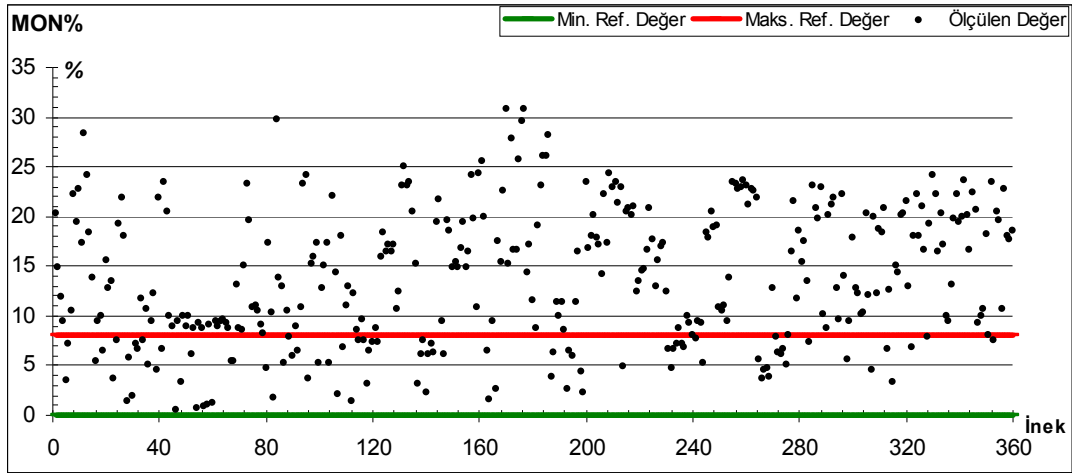


Lenfosit yüzdesi (LYM%) değerinin sığırlarda normal referans aralığı %45-80'dir (Başoğlu ve ark. 2013). 360 sığıra ait tam kan örneğinde ölçülen lenfosit değeri aritmetik ortalaması  $46.05 \pm 19.48$  olarak tespit edildi (Çizelge 3.8). Analiz edilen 360 tam kan örneğinin 176'sının %45-80 arasında, 176'sının %45'inin altında ve 8'inin %80'in üzerinde değere sahip olduğu belirlendi (Şekil 3.11).



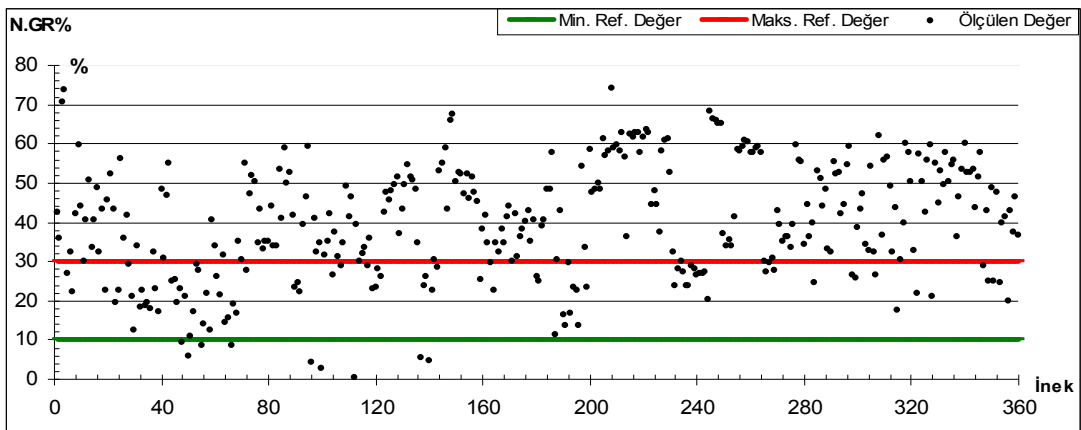
**Şekil 3.11.** Hematolojik yönden analiz edilen ineklere ait “lenfosit yüzdesi (LYM%)” değeri ile minimum ve maksimum referans değerler. X eksenini, inek sayısını (n=360), Y eksenini LYM% parametresinin 1 mm<sup>3</sup> kandaki % değerini ifade etmektedir.

Monosit yüzdesi (MON%) değerinin sığırlarda normal referans aralığı %0-8'dir (Merck Manual, 2012). 360 sığıra ait tam kan örneğinde ölçülen monosit değeri aritmetik ortalaması  $13.76 \pm 6.85$  olarak tespit edildi (Çizelge 3.8). Analiz edilen 360 tam kan örneğinin 87'sinin %0-8 arasında, 273'ünün %8'in üzerinde olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.12).



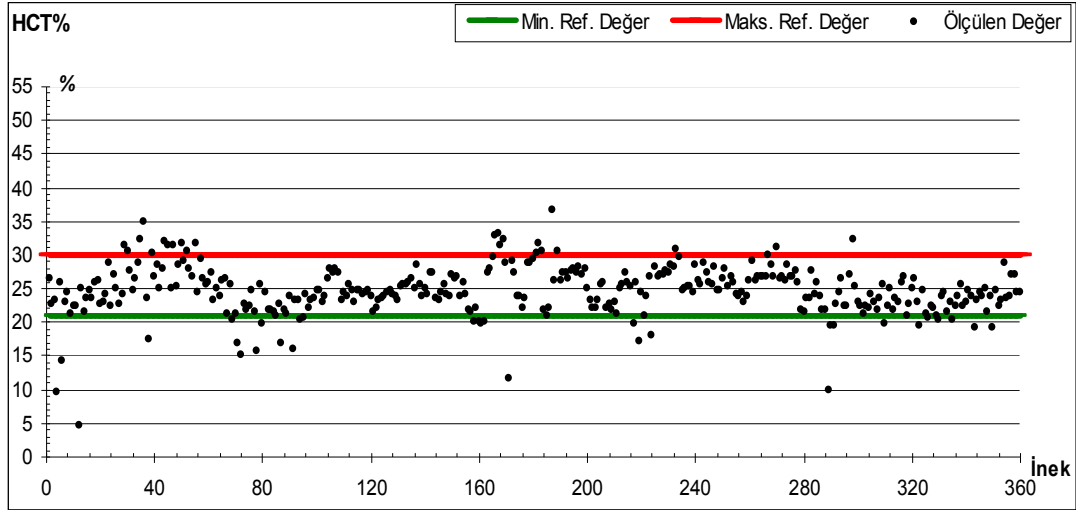
**Şekil 3.12.** Hematolojik yönden analiz edilen ineklere ait “monosit yüzdesi (MON%)” değeri ile minimum ve maksimum referans değerler. X eksenini, inek sayısını (n=360), Y eksenini MON% parametresinin 1 mm<sup>3</sup> kandaki % değerini ifade etmektedir.

Nötrofil granülosit yüzdesi (N.GR%) değerinin sığırlarda normal referans aralığı %10-30’dur (Başoğlu ve ark. 2013). 360 sığıra ait tam kan örneğinde ölçülen nötrofil granülosit değeri aritmetik ortalaması %39.62±14.73 olarak tespit edildi (Çizelge 3.8). Analiz edilen 360 tam kan örneğinin 92’sinin %10-30 arasında, 9’unun %10’un altında ve 259’unun %30’un üzerinde değere sahip olduğu belirlendi (Şekil 3.13).



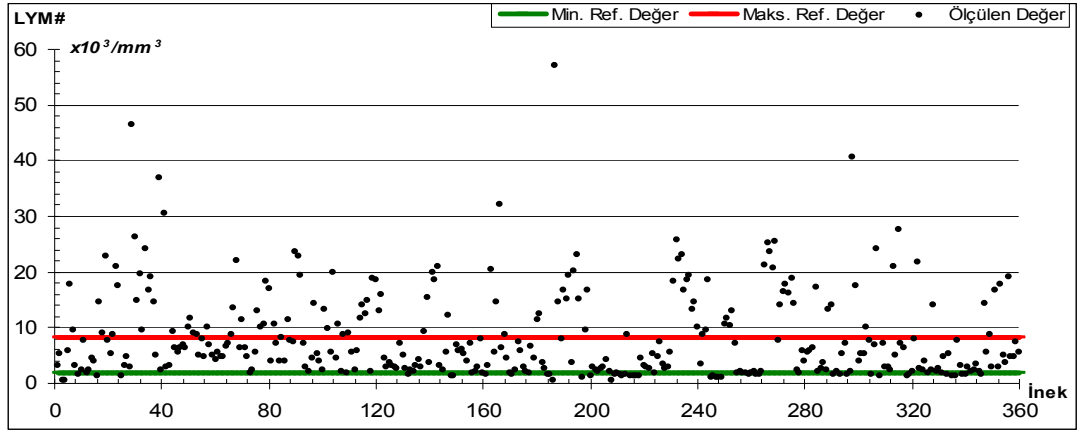
**Şekil 3.13.** Hematolojik yönden analiz edilen ineklere ait “nötrofil granülosit yüzdesi (N.GR%)” değeri ile minimum ve maksimum referans değerler. X eksenini, inek sayısını (n=360), Y eksenini N.GR% parametresinin 1 mm<sup>3</sup> kandaki % değerini ifade etmektedir.

Hematokrit yüzdesi (HCT%) değerinin sığırlarda referans aralığı %21-30'dur. (Wood ve ark. 2010). 360 sığra ait tam kan örneğinde ölçülen hematokrit değeri aritmetik ortalaması  $24.67 \pm 3.64$  olarak tespit edildi (Çizelge 3.8). Analiz edilen 360 tam kan örneğinin 304'ünün %21-30 arasında, 32'sinin %21'in altında ve 24'ünün %30'un üzerinde değere sahip olduğu gözlemlendi (Şekil 3.14).



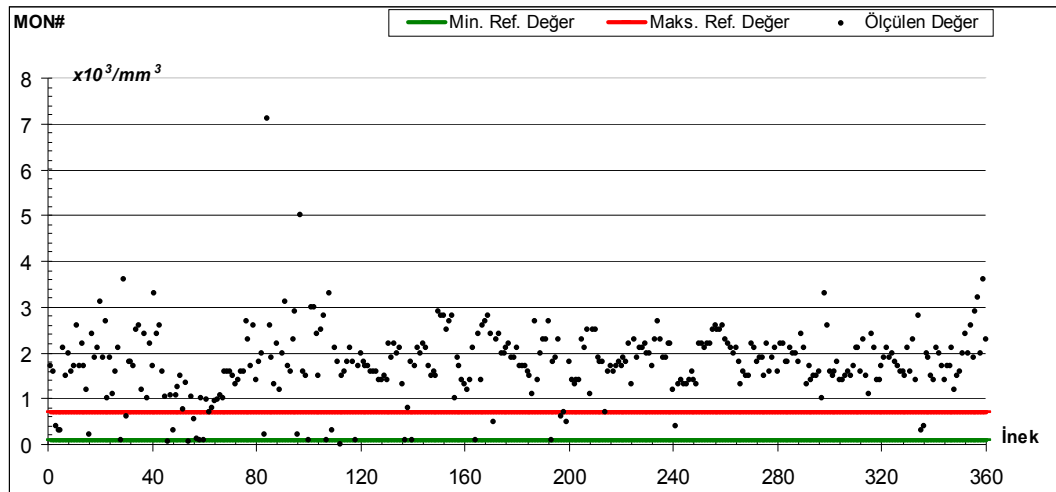
**Şekil 3.14.** Hematolojik yönden analiz edilen ineklere ait “hematokrit yüzdesi (HCT%)” değeri ile minimum ve maksimum referans değerler. X eksenini, inek sayısını (n=360), Y eksenini HCT% parametresinin  $1 \text{ mm}^3$  kandaki % değerini ifade etmektedir.

Lenfosit sayısı (LYM#) değerinin sığırlarda normal referans aralığı  $1.8-8.1 \times 10^3/\text{mm}^3$  'dür (Wood ve ark. 2010). 360 sığra ait tam kan örneğinde ölçülen lenfosit sayısı değeri aritmetik ortalaması  $8.13 \pm 7.81 \times 10^3/\text{mm}^3$  olarak tespit edildi (Çizelge 3.8). Analiz edilen 360 tam kan örneğinin 193'ünün  $1.8-8.1 \times 10^3/\text{mm}^3$  arasında, 45'inin  $1.8 \times 10^3/\text{mm}^3$  altında ve 122'sinin  $8.1 \times 10^3/\text{mm}^3$  üzerinde değere sahip olduğu belirlendi (Şekil 3.15).



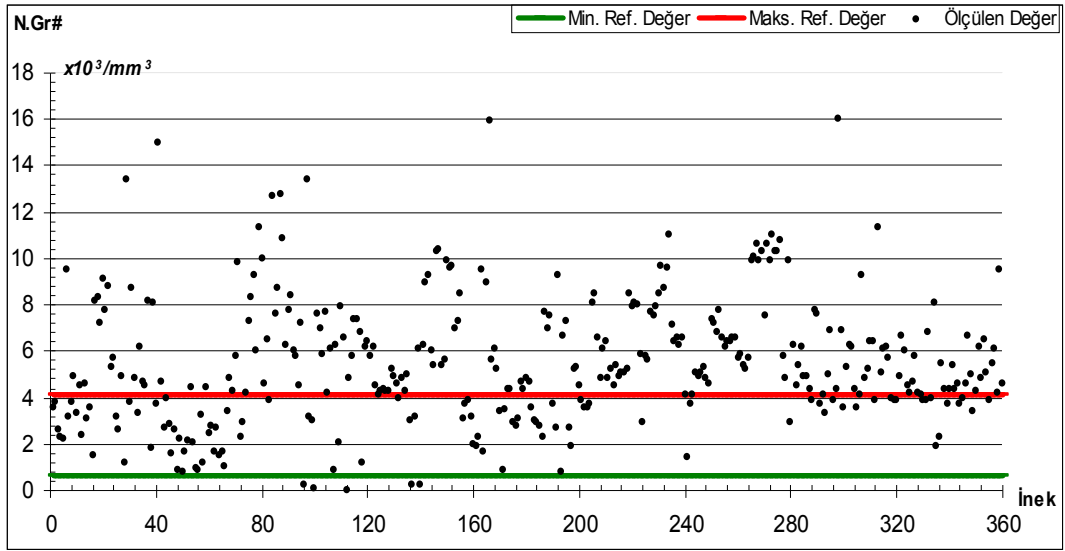
**Şekil 3.15.** Hematolojik yönden analiz edilen ineklere ait “lenfosit sayısı (LYM#)” değeri ile minimum ve maksimum referans değerler. X eksen, inek sayısını (n=360), Y eksen LYM# parametresinin  $1 \text{ mm}^3$  kandaki değerini ifade etmektedir.

Monosit sayısı (MON#) değerinin sığırlarda normal referans aralığı  $0.1-0.7 \times 10^3/\text{mm}^3$  'dür (Wood ve ark. 2010). 360 adet sığıra ait tam kan örneğinde ölçülen monosit sayısı değeri aritmetik ortalaması  $1.76 \pm 0.75 \times 10^3/\text{mm}^3$  olarak tespit edildi (Çizelge 3.8). Analiz edilen 360 tam kan örneğinin 28'inin  $0.1-0.7 \times 10^3/\text{mm}^3$  arasında ve 327'sinin  $0.7 \times 10^3/\text{mm}^3$  üzerinde ve 5'inin  $0.1 \times 10^3/\text{mm}^3$  altında değere sahip olduğu belirlendi (Şekil 3.16).



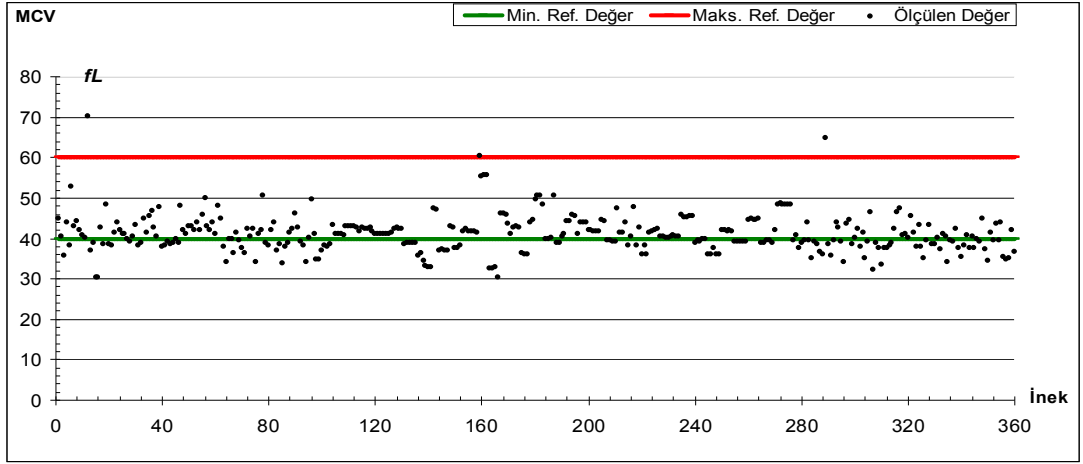
**Şekil 3.16.** Hematolojik yönden analiz edilen ineklere ait “monosit sayısı (MON#)” değeri ile minimum ve maksimum referans değerler. X eksen, inek sayısını (n=360), Y eksen MON# parametresinin  $1 \text{ mm}^3$  kandaki değerini ifade etmektedir.

Nötrofil granülosit sayısı (N.GR#) değerinin sığırlarda normal referans aralığı  $0.6-4.1 \times 10^3/\text{mm}^3$  'dür (Merck Manual, 2012). 360 sığıra ait tam kan örneğinde ölçülen nötrofil granülosit sayısı değeri aritmetik ortalaması  $5.48 \pm 2.70 \times 10^3/\text{mm}^3$  olarak tespit edildi (Çizelge 3.8). Analiz edilen 360 tam kan örneğinin 111'inin  $0.6-4.1 \times 10^3/\text{mm}^3$  arasında, 5'inin  $0.6 \times 10^3/\text{mm}^3$  altında ve 244'ünün  $4.1 \times 10^3/\text{mm}^3$  üzerinde değere sahip olduğu belirlendi (Şekil 3.17).



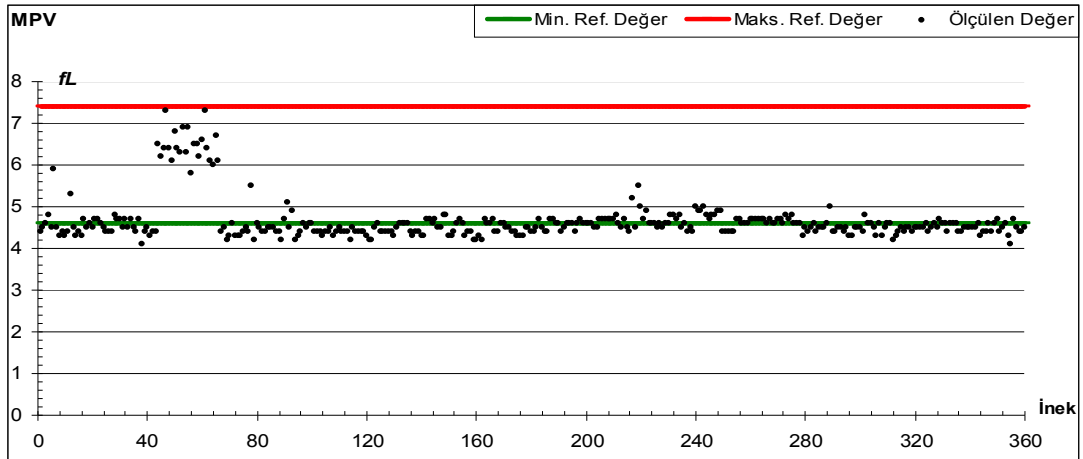
**Şekil 3.17.** Hematolojik yönden analiz edilen ineklere ait “nötrofil granülosit sayısı (N.GR#)” değeri ile minimum ve maksimum referans değerler. X eksenini, inek sayısını (n=360), Y eksenini N.GR# parametresinin  $1 \text{ mm}^3$  kandaki değerini ifade etmektedir.

Eritrositlerin ortalama büyüklüğü (mean corpuscular volume/MCV) değerinin sığırlara göre normal referans değer aralığı  $40-60 \text{ fL}$  'dir (Feldman ve ark. 2000). 360 sığıra ait tam kan örneğinde ölçülen MCV değeri aritmetik ortalaması  $41.10 \pm 4.57 \text{ fL}$  olarak tespit edildi (Çizelge 3.8). Analiz edilen 360 tam kan örneğinin 206'sının  $40-60 \text{ fL}$  arasında, 151'inin  $40 \text{ fL}$  altında ve 3'ünün  $60 \text{ fL}$  üzerinde değere sahip olduğu belirlendi (Şekil 3.18).



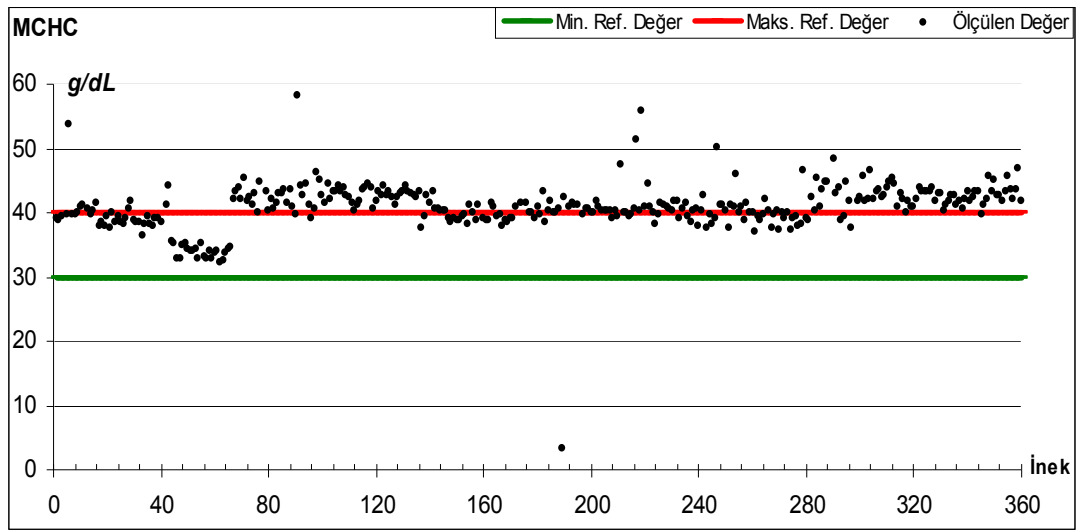
**Şekil 3.18.** Hematolojik yönden analiz edilen ineklere ait “eritrositlerin ortalama büyüklüğü (mean corpuscular volume/MCV)” değeri ile minimum ve maksimum referans değerler. X eksen, inek sayısını (n=360), Y eksen MCV parametresinin kanda femtolitre (fL) cinsinden değerini ifade etmektedir.

Trombosit hacmi (Mean Platelet Volume/MPV) değerinin sığırlara göre normal referans aralığı 4.6-7.4 fL’dir (Wood ve ark. 2010). 360 adet sığıra ait tam kan örneğinde ölçülen MPV değeri aritmetik ortalaması  $4.65 \pm 0.52$  fL olarak tespit edildi (Çizelge 3.8). Analiz edilen 360 tam kan örneğinin 163’ünün 4.6-7.6 fL arasında ve 197’sinin 4.6 fL altında olduğu belirlenirken, 7.6 fL üzerinde değere sahip örnek gözlenmedi (Şekil 3.19).



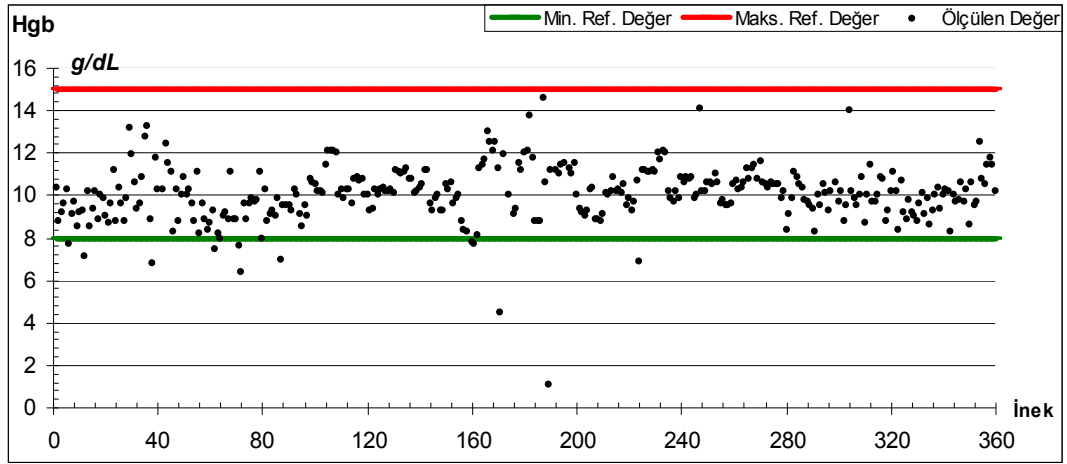
**Şekil 3.19.** Hematolojik yönden analiz edilen ineklere ait ortalama “trombosit hacmi (mean platelet volume/MPV)” değeri ile minimum ve maksimum referans değerler. X eksen, inek sayısını (n=360), Y eksen MPV parametresinin kanda femtolitre (fL) cinsinden değerini ifade etmektedir.

Eritrositlerdeki ortalama hemoglobin konsantrasyonu (Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration/MCHC) değerinin sığırlara göre normal referans aralığı 30-40 g/dL'dir (Başoğlu ve ark. 2013). 360 sığıra ait tam kan örneğinde ölçülen MCHC değeri aritmetik ortalaması  $53.78 \pm 182.06$  g/dL olarak tespit edildi (Çizelge 3.8). Analiz edilen 360 tam kan örneğinin 128'inin 30-40 g/dL arasında, 1'inin 30g/dL altında ve 231'inin 40g/dL üzerinde değere sahip olduğu belirlendi (Şekil 3.20).



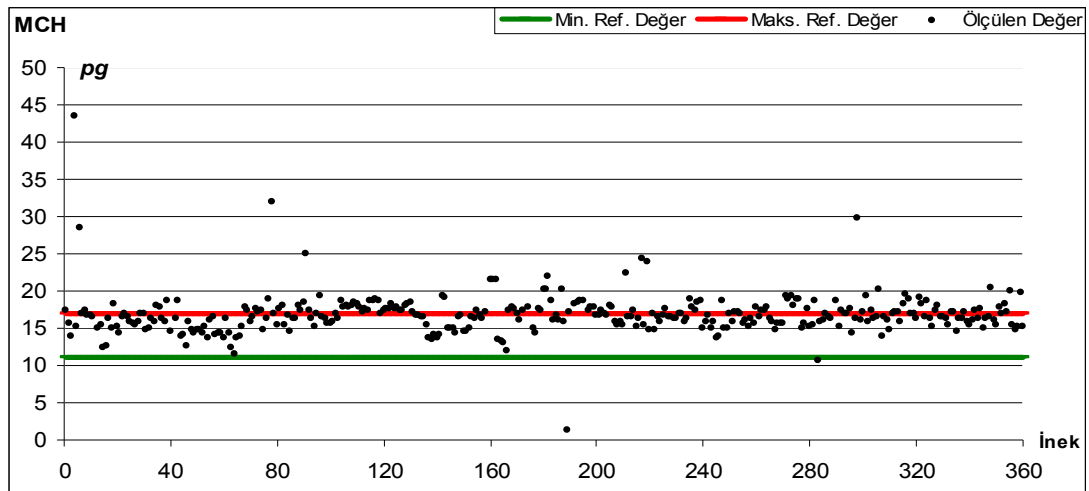
**Şekil 3.20.** Hematolojik yönden analiz edilen ineklere ait “eritrositlerdeki ortalama hemoglobin konsantrasyonu (mean corpuscular hemoglobin concentration/MCHC)” değeri ile minimum ve maksimum referans değerler. X eksenini, inek sayısını (n=360), Y eksenini ise MCHC parametresinin kanda g/dL cinsinden değerini ifade etmektedir.

Hemoglobin (Hgb) değerinin sığırlara göre normal referans aralığı 8-15 g/dL'dir (Feldman ve ark. 2000). 360 sığıra ait tam kan örneğinde hemoglobin değeri aritmetik ortalaması  $13.45 \pm 49.94$  g/dL olarak tespit edildi (Çizelge 3.8). Analiz edilen 360 tam kan örneğinin 341'inin 8-15 g/dL arasında, 12'sinin 8 g/dL altında ve 7'sinin 15g/dL üzerinde değere sahip olduğu belirlendi (Şekil 3.21).



**Şekil 3.21.** Hematolojik yönden analiz edilen ineklere ait “hemogloblin (Hgb)” değeri ile minimum ve maksimum referans değerler. X eksenı, inek sayısını (n=360), Y eksenı ise Hgb parametresının kanda g/dL cinsinden değeri ifade etmektedir.

Ortalama hemogloblin konsantrasyonu (mean corpuscular hemoglobin/MCH) değeri nin sığırlara göre normal referans aralığı 11-17 pg’dir (Feldman ve ark. 2000). 360 adet sığıra ait tam kan örneğinde MCH değeri aritmetik ortalaması  $22.34 \pm 78.25$  pg olarak tespit edildi (Çizelge 3.8). Analiz edilen 360 tam kan örneğinin 215’inin 11-17 pg arasında, 2’sinin 11 pg altında ve 143’ünün 17 pg üzerinde değere sahip olduğu belirlendi (Şekil 3.22).



**Şekil 3.22.** Hematolojik yönden analiz edilen ineklere ait “ortalama hemogloblin konsantrasyonu (mean corpuscular hemoglobin/MCH)” değeri ile minimum ve maksimum referans değerler. X eksenı, inek sayısını (n=360), Y eksenı ise MCH parametresinin kanda pikogram (pg) cinsinden değeri ifade etmektedir.



### 3.6. BVDV, BHV-1 ve BHV-4'ün Hematolojik Parametreler Üzerine Karşılaştırmalı Olarak Etkisi

Hematolojik parametrelerdeki istatistiksel değişikliklerin belirlenmesi için sığırlardan toplanan kan örnekleri ELISA (antikor-antijen), PZR ve RT-PZR sonuçlarına göre gruplara ayrıldı. BVDV için gruplandırma, 1.grup; antikor negatif (Ab-) ve antijen negatif (Ag-) 95 tam kan örneği, 2. grup; antikor pozitif (Ab+) ve Ag- 247 tam kan örneği, 3. grup; Ab+ ve antijen pozitif (Ag+) 15 tam kan örneği, 4. grup; Ab- ve Ag+ 3 tam kan örneği olacak şekilde düzenlendi (Çizelge 3.9).

Yapılan istatistiksel karşılaştırmalı Kruskal-Wallis ve Mann Whitney U testleri sonucu; MCV, HCT, MCHC ve MPV için; grup 1 ile 2 arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar belirlendi ( $p<0.005$ ), (Çizelge 3.9).

**Çizelge 3.9.** BVDV'nin, hematolojik parametreler üzerine etkisinin istatistiksel olarak karşılaştırılması

Parametre	BVDV Ab-/Ag- (1.grup / n=95)	BVDV Ab+/Ag- (2.grup / n=247)	BVDV Ab+/Ag+ (3.grup / n=15)	BVDV Ab-/Ag+ (4.grup / n=3)
WBC( $n/10^3$ )	13.29±7.76	16.04±10.36	18.99±11.96	16.20±6.20
Lym%	42.43±18.13	47.38±20.02	44.74±17.73	57.76±9.38
Mon%	15.43±5.84	13.17±7.16	13.66±6.75	9.96±0.75
NGr%	41.93±13.61	38.71±15.28	41.58±11.73	32.23±9.50
Lym#	6.36±6.04	8.67±8.25	10.04±9.45	9.53±4.50
Mon#	1.78±0.70	1.73±0.78	2±0.56	1.60±0.45
NGr#	5.12±2.31	5.54±2.82	6.96±2.91	5.03±1.65
RBC ( $n/10^9$ )	5.99 ±0.83	6.10±1.01	5.96±1.54	5.86±0.95
MCV (fl)	39.42±4.41 <sup>ab</sup>	41.74±4.53 <sup>b</sup>	41.33±3.86	40.40±4.01
Hct (%)	23.36±2.65 <sup>cd</sup>	25.21±3.81 <sup>d</sup>	24.15±4.34	23.46±1.88
MCH (pg)	16.95±5.02	24.78±94.38	17.32±2.69	17.70±2.43
MCHC (g/dl)	42.82±6.05 <sup>ef</sup>	58.83±219.71 <sup>f</sup>	42.18±4.86	43.70±1.83
Hgb (g/dl)	9.94±0.99	15.05±60.26	10.02±1.27	10.20±0.45
Plt ( $n/mm^3$ )	141.66±68.77	171.20±99.17	137.73±29.75	159±110.53
MPV (fl)	4.49±0.20 <sup>gh</sup>	4.72±0.60 <sup>h</sup>	4.53±0.21	4.53±0.11

\*İstatistiksel farkın belirlenmesi amacı ile Kruskal-Wallis ve Mann-Whitney U testleri kullanıldı ve  $p<0.005$  olan değerler istatistiksel anlamlı farklılık olarak kabul edildi.

<sup>a-b</sup> Satırda istatistiksel olarak farklılığı gösteren üst simgeler ( $p=0$ )

<sup>c-d</sup> Satırda istatistiksel olarak farklılığı gösteren üst simgeler ( $p=0$ )

<sup>e-f</sup> Satırda istatistiksel olarak farklılığı gösteren üst simgeler ( $p=0$ )

<sup>g-h</sup> Satırda istatistiksel olarak farklılığı gösteren üst simgeler ( $p=0$ )

BVDV için antijen varlığının, hematolojik parametrelere etkisinin istatistiksel olarak belirlenmesi için gruplandırma, 1.grup; Ag- 342 tam kan örneği, 2. grup; Ag+ 18 tam kan örneği olacak şekilde düzenlendi (Çizelge 3.10).

Yapılan Student t testi analizi ile antijen varlığında hematolojik parametrelerde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik belirlenemedi ( $p>0.005$ ), (Çizelge 3.10).

**Çizelge 3.10.** BVDV için antijen varlığının, hematolojik parametreler üzerine etkisinin istatistiksel olarak karşılaştırılması

<b>Parametre</b>	<b>BVDV Ag- (1.grup /n=342)</b>	<b>BVDV Ag+ (3.grup / n=18)</b>
<b>WBC(n/10<sup>3</sup>)</b>	15.28±9.78	18.52±11.11
<b>Lym%</b>	46.01±19.61	46.91±17.15
<b>Mon%</b>	13.79±6.89	13.04±6.29
<b>NGr%</b>	39.60±14.89	40.02±11.70
<b>Lym#</b>	8.03±7.76	9.95±8.72
<b>Mon#</b>	1.75±0.76	1.93±0.55
<b>NGr#</b>	5.42±2.69	6.64±2.8
<b>RBC (n/10<sup>9</sup>)</b>	6.07 ±0.96	5.94±1.44
<b>MCV (fl)</b>	41.09±4.61	41.17±3.78
<b>Hct (%)</b>	24.70±3.62	24.03±4
<b>MCH (pg)</b>	22.60±80.28	17.38±2.58
<b>MCHC (g/dl)</b>	54.38±186.78	42.43±4.50
<b>Hgb (g/dl)</b>	13.63±51.24	10.05±1.17
<b>Plt (n/mm<sup>3</sup>)</b>	162.99±92.60	141.27±47.25
<b>MPV (fl)</b>	4.66±0.53	4.53±0.20

\*İstatistiksel farkın belirlenmesi amacı ile Student t testi kullanıldı ve  $p<0.005$  olan değerler istatistiksel anlamlı farklılık olarak kabul edildi.

BHV-1 kaynaklı hematolojik parametrelerdeki istatistiksel farklılıkların belirlenmesi için sığırlar ELISA ve PZR sonuçlarına göre iki gruba ayrıldı. Gruplandırma; 1.grup Ab- ve Ag-; 202 tam kan örneği, 2.grup Ab+ ve Ag-; 158 sığır olacak şekilde düzenlendi (Çizelge 3.11).

Yapılan istatistiksel Student t testi analizi ile; MCV, Hct(%) ve MPV değerlerinde iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar belirlendi ( $p<0.005$ ), (Çizelge 3.11).

**Çizelge 3.11.** BHV-1'in, hematolojik parametreler üzerine etkisinin istatistiksel olarak karşılaştırılması

Parametre	BHV-1 Ab-/Ag- (1.grup /n=202)	BHV-1 Ab+/Ag- (2.grup / n=158)
WBC( $n/10^3$ )	15.85±9.58	14.92±10.20
Lym%	46.95±18.80	44.90±20.31
Mon%	13.66±6.68	13.88±7.08
NGr%	39.11 ±13.81	40.28±15.85
Lym#	8.44±7.55	7.73±8.14
Mon#	1.80±0.78	1.70±0.70
NGr#	5.56±2.65	5.38±2.78
RBC( $n/10^9$ )	6.03±1.07	6.10±0.88
MCV(fl)	40.29±4.71 <sup>ab</sup>	42.13±4.17 <sup>b</sup>
Hct(%)	23.98±3.70 <sup>cd</sup>	25.54±3.38 <sup>d</sup>
MCH (pg)	17.51±7.92	28.52±117.70
MCHC (g/dl)	42.96±11.59	67.61±274.36
Hgb(g/dl)	10.14±2.44	17.68±75.26
Plt( $n/mm^3$ )	150.85±81.15	176.05±100.63
MPV (fl)	4.56±0.42 <sup>ef</sup>	4.77±0.60 <sup>f</sup>

\*İstatistiksel farkın belirlenmesi amacı ile Student t testi kullanıldı ve  $p<0.005$  olan değerler istatistiksel anlamlı farklılık olarak kabul edildi.

<sup>a-b</sup> Satırda istatistiksel olarak farklılığı gösteren üst simgeler ( $p=0$ )

<sup>c-d</sup> Satırda istatistiksel olarak farklılığı gösteren üst simgeler ( $p=0$ )

<sup>e-f</sup> Satırda istatistiksel olarak farklılığı gösteren üst simgeler ( $p=0$ )

BHV-4 kaynaklı hematolojik parametrelerdeki istatistiksel farklılıkların belirlenmesi için sığırlar ELISA ve PZR sonuçlarına göre iki gruba ayrıldı. Gruplandırma; 1.grup; Ab- ve Ag- 246 tam kan örneği, 2.grup; Ab+ ve Ag- 114 tam kan örneği olacak şekilde düzenlendi (Çizelge 3.12).

Yapılan istatistiksel Student t testi analizi ile; MPV değerinde iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar belirlendi ( $p<0.005$ ), (Çizelge 3.12).

**Çizelge 3.12.** BHV-4'ün, hematolojik parametreler üzerine etkisinin istatistiksel olarak karşılaştırılması

Parametre	BHV-4 Ab-/Ag- (1.grup /n=246)	BHV-4 Ab+/Ag- (2.grup / n=114)
<b>WBC(n/10<sup>3</sup>)</b>	14.66±9.13	17.12±11.13
<b>Lym%</b>	46.25±17.79	45.64±22.77
<b>Mon%</b>	14.18±6.56	12.85±7.40
<b>NGr%</b>	39.16±13.25	40.62±17.53
<b>Lym#</b>	7.68±7.17	9.11±8.99
<b>Mon#</b>	1.75±0.68	1.77±0.89
<b>NGr#</b>	5.18±2.47	6.12±3.07
<b>RBC(n/10<sup>9</sup>)</b>	5.99±0.98	6.21±0.99
<b>MCV(fl)</b>	41.03±4.81	41.24±4.01
<b>Hct(%)</b>	24.31±3.59	25.44±3.63
<b>MCH (pg)</b>	23.89±93.32	19.01±23.55
<b>MCHC (g/dl)</b>	57.20±216.29	46.40±61.60
<b>Hgb(g/dl)</b>	14.17±59.24	11.90±17.70
<b>Plt(n/mm<sup>3</sup>)</b>	156.59±88.76	173.37±94.90
<b>MPV (fl)</b>	4.57±0.42 <sup>ab</sup>	4.83±0.64 <sup>b</sup>

\*İstatistiksel farkın belirlenmesi amacı ile Student t testi kullanıldı ve  $p<0.005$  olan değerler istatistiksel anlamlı farklılık olarak kabul edildi.

<sup>a-b</sup> Satırda istatistiksel olarak farklılığı gösteren üst simgeler ( $p=0$ )

#### 4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Sığır yetiştiriciliği yapılan işletmelerde, et ve süt kaynaklı gelirler yanında doğan yavruların sayısı ve bu yavruların sağlıklı olması işletmenin verimliliğini etkileyen önemli unsurların arasındadır. Sığır yetiştiriciliğinde %3-5 oranında meydana gelen abort ve ölü doğum vakası normal olarak kabul edilmektedir. Abort ve ölü doğum vakaları hayvan sağlığını ve refahını olumsuz etkilemesinin yanı sıra bu durum işletmelerde önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Peter 2000, Bolat ve Doymaz 2005, Lee ve Kim 2007).

Veteriner hekimler sahada abort ve döl tutmama vakaları ile sıklıkla karşılaşır. Virüs, bakteri, mantar ve protozoon kaynaklı birçok enfeksiyonun abort ve döl tutmama sorunlarına neden olduğu rapor edilmiştir. Bu tür üreme problemlerine enfektif ajanların dışında, genetik bozukluklar, hormonal ve metabolik düzensizlikler, yetiştirme koşullarının iyi olmaması hali ve aşılama programlarının yanlış uygulanması gibi durumların rol oynadığı bildirilmektedir (Anderson 2007, Hovingh 2013).

Kirkbride (1992) on yıl süresince çeşitli yangısal lezyonlara sahip 8962 abort materyalini incelediğinde, bu abortların 2723'üne (%30.38) enfeksiyöz ajanların neden olduğunu belirlemiştir. Çalışmaya göre bu ajanların %10.57'sinin viral, %14.49'unun bakteriyel ve %5.31'inin mantar kaynaklı olduğu ortaya konulmuştur. Ne var ki 8992 abort vakasından 6020'sinin (%67.17) nedeninin anlaşılamadığı rapor edilmiştir. Jamaluddin ve ark. (1996) inceledikleri 595 sığırda gözlenen abort vakalarının %37.1'inin enfeksiyöz etkenlerden, %5.5'inin enfeksiyona bağlı olmayan etkenlerden dolayı olduğunu belirler iken, %57.3'ünde abortun nedeninin tespit edilemediğini bildirmişlerdir. 2011'in sonunda ilk olarak Almanya'da keşfedilen ve daha sonra Hollanda, Belçika, Fransa, İtalya, İngiltere, Lüksemburg ve İspanya gibi pek çok ülkede ve Güney Afrika'da tespit edilen Schmallerberg virüsünün sığırlarda yüksek oranda abortlara ve üreme bozukluklarına yol açtığı rapor edilmiştir

(Hoffmann ve ark. 2012, EU commision 2012, Leask ve ark. 2013). Azkur ve ark. (2013b) Schmallenberg virüsün ülkemizde varlığını ilk defa rapor etmişlerdir. Benzer şekilde Avrupa'da keşfedilen yeni bir Pestivirüs tipi olan HoBi-Like (benzeri) virüslerin de abortlara ve üreme performansında kayıplara yol açabildiği tespit edilmiştir (Bauermann ve ark. 2013). Bu sonuçlar göz önüne alındığında geçmişte sebebi anlaşılamayan abortlara ve üreme sorunlarına yeni keşfedilen bu tür virüslerin yol açmış olma ihtimali söz konusudur.

Bu tezde Ankara, Çorum, Kırıkkale ve Yozgat illerinde abort ve döl tutmama sorunu yaşayan veya daha öncesinde böyle bir geçmişe sahip 656 adet sığırdan kan örneği toplandı (Çizelge 2.1; Şekil 2.1). Toplanan örnekler ilk önce *Brucella* varlığı yönünden incelendi. *Brucella*'nın neden olduğu Brucellozis birçok hayvan türünün duyarlı olduğu bakteriyel zoonoz bir hastalıktır (WHO 2006). *Brucella*'nın tanımlanan türlerinden biri olan *B. abortus*, sığırların genital kanal doku ve organlarını enfekte ederek, abort ve/veya döl tutmamaya neden olmaktadır (Xavier ve ark. 2009b, Carvalho ve ark. 2010).

Veteriner hekimler ve sığır yetiştiricilerinin yoğun olarak karşılaştığı Brucellozis vakalarının serolojik teşhisinde kullanılan yöntemlerin başında RBPT ve STAT testleri gelmektedir. RBPT kitlesel sürü taramalarında ucuz ve hızlı bir test olmasına rağmen, *B. abortus* S19 aşılması sonrası ve çapraz antikor reaksiyonlarında yanlış pozitiflik verebilmektedir. Bu nedenle bu test ile pozitif tespit edilen hayvanların diğer serolojik testler kullanılarak teyit edilmesi gerektiği bildirilmiştir (Öngör 1999, Nielsen 2002). Apan ve ark. (2007) 1436 insan ile 804 sığır ve koyun serumunda *Brucella* varlığını RBPT, STAT ve ELISA testleri kullanarak incelemişlerdir. Al-Delaimia ve ark. (1990) klinik olarak sağlıklı görümlü 696 koyun kan serumunu Brucellozis yönünden incelediklerinde STAT ile %7.4 ve RBPT ile %9.19 pozitiflik tespit etmişlerdir. Abort yapmış 30 koyuna ait serumda RBPT ile %62 ve STAT ile %77 *Brucella* pozitifliği belirleyerek STAT'ın, RBPT yönteminden daha duyarlı olduğunu bildirmişlerdir. Bu tezde *Brucella* varlığı öncelikle RBPT kullanılarak araştırıldı. 656 serum örneğinden 45'nin (%6.85) pozitif olduğu gözlemlendi (Çizelge 3.1; Şekil 3.1). Ardından RBPT ile pozitif reaksiyon veren 45 serum örneği STAT ile analiz edildi. 45 serum örneğinin 41'inde 1/80 ve üzeri

antikor titresi belirlendi. Bu tezde örnekleme yapılan bölgede *Brucella* seropozitifliği 41/656 (%6.25) olarak tespit edildi (Çizelge 3.2). Pozitif olarak belirlenen sığırların yetiştiricilerine geri bildirim yapıldığında, uzun süredir abort ve döl tutmama sorunu yaşayan bu sığırların tamamın kesildiği, öldüğü veya satıldığı bilgisi alındı.

Ülkemizde hayvanlarda görülen *Brucella* etkenlerinin varlığının tespitine yönelik yapılan çalışmalarda seropozitiflik sığırlarda %3.56 ve koyunlarda %1.26 olarak belirlenir iken, iller bazında seropozitifliğin %0-10 arasında değiştiği rapor edilmiştir (Yumuk ve Callaghan 2012). Sığırlarda *Brucella* seroprevalansı Kars'ta %32.92 (Şahin ve ark. 2008) ve %34.78 (Aslantaş ve Babür 2000), Diyarbakır'da %2.9 (Arserim ve ark. 2012), Erzurum'da %11.7 (Ogutman 1972) ve Burdur'da %6.8 (Pehlivanoğlu ve ark. 2011) olarak belirlenmiştir. İnsanlarda ise bu oranlar 1990 yılında Ankara, Antalya, Bursa, Diyarbakır, Erzurum, İstanbul, İzmir, Konya ve Sivas'ta %1.8-6 arasında değişen oranlarda olduğu tespit edilmiştir (Çetin ve ark. 1990). İnsanlarda 1991-2012 yılları arasında yapılan seroprevalans çalışmaları incelendiğinde Denizli'de %6.5 (Kaleli ve ark. 1999), Afyon'da %4.8 (Çetinkaya ve ark. 2005), Malatya'da %1.61-2.86 (Durmaz ve ark. 1997), Kars'ta %16.42 (Otlı ve ark. 2008), Kayseri'de %3.4 (Çetinkaya ve ark. 2006), Bolu'da %1.3 (Karabay ve ark. 2004), Diyarbakır'da %35.2 (Arserim ve ark. 2012) olarak tespit edilmiştir.

Brucellosis vakalarının bu tez kapsamında örnekleme yapılan odaklardan biri olan Kırıkkale ilinde; insanlarda %3 (Apan ve ark. 2007) ve %45 (Aşkar ve ark. 2013), sığırlarda %2.67 (Apan ve ark. 2007), %13.82 (Yıldız ve ark. 2009) ve %19 (Öcal ve ark. 2008, Aşkar ve ark. 2013), koyunlarda %8.73 (Apan ve ark. 2007) ve %5.1 (Aşkar ve ark. 2013) oranlarında seropozitiflik belirlenmiştir.

Apan ve ark. (2007) Kırıkkale'de 301 sığır ve 503 koyun serumu kullanılarak yaptıkları çalışmada, brusellosis oranı RBPT ve STAT ile %6.47 olarak belirlemişlerdir. Bu tezde RBPT ile belirlenen %6.85 ve STAT ile belirlenen %6.25'lik seropozitiflik oranları Apan ve ark. (2007) yapmış olduğu çalışmanın sonuçlarına yakındır. İki çalışma dönemi arasında geçen sürede *Brucella* yaygınlığında değişkenlik olmadığı açıkça görülmektedir. Öcal ve ark. (2008) Kırıkkale'de yaptıkları çalışmalarında 100 süt sığırında Brusellosis oranının STAT

ile %19 olduğunu rapor etmişlerdir. Aşkar ve ark. (2013) Kırıkkale’de 214 koyun, 100 süt sığırı ve bunların yetiştiricilerinden topladıkları serum örneklerinde, sığırlar arasında RBPT ile %43’ünde *Brucella* spesifik antikorların varlığını belirlemişlerdir. RBPT pozitif örneklerin antikor titrelerini STAT ile incelediklerinde, sığırlarda seropozitifliği %19 olarak tespit etmişlerdir. Öcal ve ark. (2008) ve Aşkar ve ark. (2013) yaptıkları çalışmalarında 1/40 ve üzeri titreyi pozitif olarak kabul etmişlerdir. Aşısız sığırlarda aglütinasyon 1/40’a kadar dilüsyonlarda varsa şüpheli, 1/40 ve yukarı dilüsyonlarda ise seropozitif olarak kabul edilmekle birlikte, aşılı sığırlarda 1/80 ve üzeri dilüsyonların pozitif olarak kabul edildiği rapor edilmiştir (Öngör 1999, Aydın 2006).

Bu tezde belirlenen *Brucella* seropozitiflik oranlarının Öcal ve ark. (2008) ve Aşkar ve ark. (2013) yaptıkları çalışmalara göre daha düşük olduğu görülmektedir. Elde edilen sonuçlara göre Öcal ve ark. (2008), Aşkar ve ark. (2013) sonuçlarının yüksek olmasının ilk nedeni; yapılan çalışmalarda bu teze oranla sınırlı bir bölgede örnekleme yapılmış olması olduğu düşünülmektedir. İkinci neden araştırmacıların pozitif olarak kabul ettikleri titre seviyesinin (1/40), bu tezde kabul edilen 1/80 oranına göre bir alt sulandırma basamağında olması nedeni ile daha fazla örneği pozitif olarak değerlendirmelerinden kaynaklanmaktadır. Ülkemizde Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı tarafından yürütülen Brucellozis ile mücadele programı kapsamında 2011 yılına kadar sadece 3-6 aylık yaştaki dişi sığırlar her yıl *Brucella* S19 aşısı ile aşılanmıştır. 2011 yılından itibaren ise 3 aylık yaştan büyük tüm dişi sığırların her yıl *Brucella* S19 aşısı ile aşılanmasına karar verilmiştir. Bu tür ulusal çapta ve programlı aşılanmanın yapıldığı bir ülkede, rastgele örnekleme metodu kullanılan serolojik araştırmalarda aşırıya bağlı yanlış pozitifliklerin önüne geçebilmek için 1/80 ve üzeri titrenin pozitif olarak belirlenmesinin daha güvenilir olduğu speküle edilmektedir.

Çorum ve Yozgat illerinde insan ve hayvanlarda epidemiyolojik çalışmalar açısından boşluk olduğu görülmekte, bu tez ile elde edilen verilerin ilerleyen dönemde yapılacak daha kapsamlı seroepidemiolojik araştırmalar için kaynak olacağı ve planlanacak aşılama programlarına yön verecek veri niteliğinde olduğu düşünülmektedir.



Avrupa Birliği ülkelerinde BVDV eradikasyonu için çalışmalar yapılan viral etkenler arasında yer alır ve uygulanan programlar ile başarılı sonuçlar alınmaya başlanmıştır (Lindberg ve ark. 2006). Ülkemizde ise BVDV ile mücadele için Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı tarafından geliştirilmiş bir kontrol ve eradikasyon programı bulunmamaktadır. Dünyada yapılan birçok çalışma sonucu ortalama %60-85 seropozitiflikle seyreden BVDV için, ülkemizde seropozitif sığır varlığının %44.09-86 olduğu bildirilmiştir (Burgu ve ark. 1999, Yavru ve ark. 2005, Tan ve ark. 2006a, Yıldırım ve ark. 2011, Öztürk ve ark. 2012, Avcı ve Yavru 2013).

şimşek ve Öztürk (1997) klinik olarak sağlıklı sığırlardan alınan serum örneklerinde BVDV'ye spesifik antikor varlığını serum nötralizasyon testi ile incelemişler ve %79.5 (113/142) seropozitiflik tespit etmişlerdir. Öztürk ve ark. (2012) Burdur'da bakteriyel ve viral abort etkenlerin sığır işletmelerinde varlığını araştırdıklarında, *B. abortus*, *C. burnetii* ve *C. abortus* negatif olarak belirledikleri 92 sığırdan 75'inin (%81.5) BVDV seropozitif olduğunu rapor etmişlerdir. Avcı ve Yavru (2013) Konya'da süt sığırcılığı yapılan bir işletmede 450 adet serum örneğinde ELISA ile %46.22 oranında BVDV'ye spesifik antikor varlığı olduğunu tespit etmişlerdir. Kırıkkale'de pestivirüslerin varlığının tespitine yönelik çalışmalarda koyunlara ait serum örneklerinde %74.51 ve işletme bazında %8.4-100 değişen oranlarda seroprevalans tespit edilir iken, tam kan örneklerinde RT-PZR ile %4.37 pestivirüs antijeni belirlenmiştir (Azkur ve ark. 2011). Azkur ve ark. (2013a) yaptıkları çalışmada yine Kırıkkale'de BVDV seroprevalansını %86.6 olarak bildirmişlerdir.

Bu tezde 615 sığırdan 436'sında (%70.89) BVDV antikor varlığı belirlendi (Çizelge 3.3). BVDV seropozitifliği iller bazında incelediğinde; Ankara (%43.02), Çorum (%7.05), Kırıkkale (%86.57), Yozgat (%97.46) olarak tespit edildi (Çizelge 3.5). Kırıkkale'de ve tez kapsamında örnek alınan illere yakın bölgelerde yapılan araştırmalar bu tezde elde edilen %70.89 oranındaki seroprevalansı destekler niteliktedir. Kırıkkale ve Yozgat'ta belirlenen %86.57 ve %97.46 pozitiflik oranlarının yüksek olmasının nedeni olarak yapılan örnekleme için halk eli ile geleneksel yöntemler kullanılarak yetiştiricilik yapılmaya çalışılan çok sayıda işletmenin seçilmiş olmasından kaynaklandığı düşünölmektedir. Tez kapsamında

örnekleme yapılan işletmelerde yetiştirilen sığırların sağlık kontrolleri, hastalık takipleri ve tedavilerinin yeterli düzeyde yapılmadığı, bunun yanında işletmeye hayvan giriş-çıkışlarının kontrolsüz olduğu ve işletmelerin bakım ve dezenfeksiyonuna önem gösterilmediği yetiştiriciler ile yapılan görüşmeler ile öğrenilmiştir. Kırıkkale ve Yozgat'ta örnekleme yapılan işletmelerin bu durumu dikkate alındığında sürekli olarak enfeksiyöz ajanlara maruz kalan sığırlarda tespit edilen yüksek BVDV seroprevalansının normal olduğu anlaşılmaktadır. Ankara ve Çorum'da ise belirlenen %43.02 ve %7.05 seropozitiflik oranlarının düşük olmasının veteriner hekim kontrolünde entansif yetiştiricilik yapılan işletmelerden örnekleme yapılmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

BVDV antijeni nazal akıntı, pek çok doku ve organ ile tam kan örneklerinde belirlenebilmektedir (Bruschke ve ark. 1998). Bu tezde 506 sığıra ait tam kan örneğinde BVDV antijeninin varlığı antijen ELISA ve RT-PZR ile araştırıldı. BVDV'nin 5'UTR bölgesini hedef olarak dizayn edilen, 324/326 primerleri (Çizelge 2.3) ile nested RT-PZR'nin ilk roundu kuruldu. İlk round RT-PZR ile 506 tam kan örneğinin 18'inde (%3.55) BVDV genom varlığı tespit edildi (Şekil 3.4, Çizelge 3.6). BVDV alt tipleri BVDV 1a-1b ve 2'nin PZR ile belirlenmesi için 1AF-1ABR, 1BF-1ABR ve B5-B6 primer çiftleri (Çizelge 2.3) kullanıldığında istenilen büyüklükte band tespit edilemedi. Sarıkaya ve ark. (2012) Kırıkkale ve çevresinde sığırlarda BVDV tespiti ve genetik karakterizasyonu için tam kan örneklerinde %0.625 oranında BVDV-1a ve %7.5 oranında BVDV-2 belirlemişlerdir. Birçok ülkede yapılan çalışmalarda sığırlarda BVDV'nin 1-2 ve HoBi-like virüs olmak üzere üç ana alt tipi rapor edilmiştir (Bauermann ve ark. 2013). İlaveten yapılan bölgesel epidemiyolojik çalışmalar ile BVDV-1'nin en az 16 (a, b1; b2; c; d; e; f; g; h; i; j; k; l; m; n; o) ve BVDV-2'nin 5 (a, b, c, d, e) genetik alttipinin varlığı bildirilmiştir (Baker ve ark. 1954, Vilcek ve ark. 2001, Barros ve ark. 2006, Giangaspero ve ark. 2008, Giangaspero ve Harasawa 2014). Ülkemizde yapılan iki ayrı çalışmada BVDV-1a, 1b, 1d, 1f, 1h, 1g ve BVDV 2a'nın bulunduğu rapor edilmiştir (Yeşilbağ ve ark. 2008, Oğuzoğlu ve ark. 2010). Bu iki çalışma ile Kırıkkale ilinde Sarıkaya ve ark. (2012) tarafından yapılan çalışmanın aksine, tezde nested RT-PZR ile BVDV alt tipleri belirlenememiştir. Bunun nedeni olarak bölgede

sirküle olan virüsün BVDV 1a, 1b ve 2 dışındaki alt tiplerden biri olma ihtimali düşünülmektedir.

Bu tezde ilk round RT-PZR sonucu elde edilen PZR ürünlerine DNA dizi analizi yapılarak gen bankasına kaydedildi. Bunlar; 119-KF425303, 74-KF434627, 60-KF434625, 62-KF434626, 32-KF434623, 24-KF434622, 22-KF434621, 20-KF434620, 14-KF434618, 16-KF434619, 12-KF425300, 45-KF425299, 413-KF425302, 414- KF425301, 90- KF434630, 84-KF434629, 81-KF434628, 42-KF434624 (Şekil 3.6). Bu tezde elde edilen dizilimler ile gen bankasında kayıtlı farklı BVDV dizilimlerinin filogenetik analizi ve nükleotid uzaklıkları karşılaştırıldı. Bu analizler sonucunda belirlenen gen dizilerinin genel olarak BVDV-1 karakterinde olduğu, bunun yanında Kırıkkale’de ve Türkiye’de sirküle olduğu tespit edilen virüslere yakın olduğu belirlendi (Şekil 3.6, Çizelge 3.7).

BVDV’nin fötal-plasental bariyeri geçerek fötusu enfekte ettiği birçok çalışma ile belirlenmiştir. Enfeksiyon ncp BVDV ile gebeliğin ilk trimesterinde gerçekleşirse doğan buzağular hayat boyu persiste enfekte olurlar. PE hayvanlarda BVDV’ye spesifik antikor cevap gelişmediği gibi sürekli çevreye virüs saçıldığı rapor edilmiştir (OIE 2008, Hilbe ve ark. 2007). Yapılan çalışmalarda farklı ülkelerde PE sığır varlığı %0.5-2 arasında değiştiği bildirilmiştir (Houe 1999). Ülkemizde PE sığır varlığı %0.07-4.9 olarak rapor edilmiştir (Burgu ve ark. 2003, Tan ve ark. 2006a). Bu tezde RT-PZR ile incelenen 506 örnekten 18’inde (%3.55) antijen varlığı tespit edilmesine rağmen, PE sığırların tespit edilmesi için BVDV antijen pozitif sığırlardan tekrar bir örnekleme yapılamamıştır. Bunun nedeni antijen pozitif sığırların sahiplerine geri dönüş sağlandığında pozitif sığırların kesilmiş veya satılmış olmasıdır.

Bulut ve Yavru (2004) klinik olarak sağlıklı sığırlara ait 100 serum örneğinde BHV-1 antikor varlığını ELISA ile %23 ve serum nötralizasyon ile %14 olarak belirlemişlerdir. Çabalar ve Akça (1994) fertilitate problemlili ineklerde BHV-1 seropozitifliğini %68.1 olarak bildirmişlerdir. Bulut ve ark. (2003) döl tutmayan ineklerde BHV-1’e spesifik antikor varlığını ELISA ile 120 sığırın 85’inde (%70.8) bildirmişlerdir. Yıldırım ve ark. (2011) yaptıkları çalışmada, abort yapan sığırlardan

topladıkları serum örneklerinde BHV-1 seropozitifliğini %61.4 olarak belirlemişlerdir. Öztürk ve ark. (2012) ise Burdur’da abort sorunu yaşayan ineklerde %43.5 (40/92) oranında BHV-1 seropozitifliği rapor etmişlerdir.

Bu tezde serum örneklerinde BHV-1’e spesifik antikor varlığı incelenirken, örnekleme yapılan işletmelerde olası gE marker aşısı kullanımı göz önüne alınarak, aşısı-doğal enfeksiyon ayrımının yapılabilmesi için ticari BHV-1 gE ELISA kullanıldı. Örnekleme yapılan 15 aylık yaştan büyük 615 sığırın 254’ünde (%41.3) BHV-1’e spesifik antikorlar tespit edildi (Çizelge 3.3). İller bazında seropozitiflik oranları incelendiğinde BHV-1’e spesifik antikor varlığı; Ankara (%2.23), Kırıkkale (%51.78), Yozgat (%79.74) olarak belirlenir iken, Çorum’da örnekleme yapılan popülasyonda BHV-1 antikorunu tespit edilememiştir (Çizelge 3.5).

BHV-1 enfeksiyonları üzerine etkisi olan faktörler içerisinde sürü büyüklüğü yanında kontrolsüz hayvan hareketleri, yaş ve cinsiyet sayılmaktadır. Yaşın artmasıyla birlikte enfeksiyona yakalanma oranının da arttığı rapor edilmiştir (Boelaert ve ark. 2005). Yavru ve ark. (2005) sığırlarda solunum kanalını etkileyen viral etkenleri inceledikleri çalışmada 254 serumda %57.8 oranında pozitiflik belirlemişlerdir. Elde ettikleri verilerde cinsiyet ve ırk arasındaki korelasyona baktıkları zaman BHV-1 seropozitiflik oranına etkisinin olmadığını belirlemişlerdir. Aynı çalışmada yaşın etkisi incelendiğinde erişkin sığırlarda buzağılara oranla daha yüksek BHV-1 seropozitifliği tespit etmişlerdir. Bu tezde örnekleme için 15 aylık ve üzeri yaştaki ineklerin seçilmesi elde edilen seropozitiflik oranını etkilediği düşünülmektedir.

BHV-1 antikor pozitif örneklerde BHV-1 antijeni varlığı gB ve gE gen bölgelerine özgü primer çiftleri (Çizelge 2.4) kullanılarak PZR ile belirlenmeye çalışıldı. Fuchs ve ark. (1999) doğal enfekte sığır kanında, gB, gE ve gC gen spesifik primerleri kullanarak BHV-1 antijeni varlığını PZR ile araştırmışlardır. Sonuç olarak BHV-1 antijeninin belirlenmesinde en duyarlı yöntem olarak gE daha sonra gB primeri kullanılan PZR’yi belirlemişlerdir. Bu tezde ise Fuchs ve ark. (1999) aksine pozitif kontrol virüs ve tam kan örneklerinde gE primerleri kullanılan PZR ile kesin sonuç olarak kullanılamayacak nitelikte, zayıf bant oluşturduğu belirlendi (Bilgi

gösterilmedi). Bu nedenle hatalı sonuçların önüne geçmek amacı ile tüm örnekler gB gen bölgesine özgü gB1/gB2 primeri ile test edildiğinde, 254 sığıra ait tam kan örneğinin sadece bir tanesinde (%0.39) BHV-1 viral antijeni tespit edildi (Çizelge 3.6, Şekil 3.5).

Yapılan literatür taraması sonucu gen bankasına kayıtlı Türkiye’de sirküle olan BHV-1 virüsünün gen dizilimi bulunmamaktadır. Bu tezde BHV-1 gB geninin kısmi dizi analizi yapılarak elde edilen gen dizisi KF716130.1 no ile Türkiye’de ilk defa uluslararası gen bankasına kayıt edildi. Yapılan karşılaştırmalı filogenetik analiz ile KF716130.1’in Hindistan’ da 2013 yılında bildirilen KC479143.1, KC479146.1, KC479149 kısmi BHV-1 gB gen dizilerine yakın olduğu tespit edildi (Şekil 3.7). Bu tez ile Türkiye’de ve bölgemizde sirküle olan BHV-1’in genetik karakterinin belirlenmesi, yapılacak daha kapsamlı çalışmalara ışık tutacağı düşünülmektedir.

BHV-1 ve BHV-5 arasında yakın ilişki, gB ve gD sekans dizilerine dayalı filogenetik çalışmalar ile gösterilmiştir (Ros ve Belak 1999). BHV-1 ve BHV-5 çapraz nötralizan antikorları her iki enfeksiyonda gelişmektedir (Cascio ve ark. 1999). BHV-5 için ticari ELISA kiti bulunmamaktadır. Bu tezde BHV-1 antikor ELISA pozitif 254 sığırlara ait tam kan örneğinde, BHV-5 antijen varlığının tespiti için, BHV-5 gD1/gD2 (Çizelge 3.6) primer çiftleri PZR’de kullanıldı. Hiçbir örnekte beklenen büyüklükte ampikon varlığı gözlenmedi.

Del Médico Zajac ve ark. (2010) 6 aylığa kadar yaşta olan buzağuların, yetişkin sığırlara oranla BHV-5’e daha duyarlı olduğunu bildirmişlerdir. BHV-5’in sinir sisteminde, beyin dokusunda, traheal ve nazal mukozada latent kaldığı belirlenmiştir (Wild ve ark. 1998, Meyer ve ark. 2001, Perez ve ark. 2002). Bu tezde tam kan örneklerinde BHV-5 antijeni tespit edilememesinin ilk nedeni olarak enfeksiyona duyarlı olduğu bildirilen genç sığırlar yerine, örneklerin 15 yaş ve üstü yetişkin sığırlardan toplanması, ikinci neden olarak örnek toplanma anında virüsün latent olduğu böylece kandan tespitinin gerçekleşmediği düşünülmektedir.

BHV-1 varlığının ve seroprevalansının belirlenmesine yönelik pek çok çalışma bulunmasına rağmen, antijenik ve genetik olarak yüksek benzerliğe sahip BHV-5 üzerine literatüre kayıtlı henüz bir çalışma bulunmamaktadır. Bunun en

önemli nedenin Türkiye’de, BHV-5’in neden olabildiği ekonomik kayıpların miktarının tam olarak bilinmemesidir. Yapılacak daha geniş kapsamlı çalışmalar sayesinde ülkemizin farklı bölgelerinde özellikle suni tohumlama istasyonlarında kullanılan boğalarda BHV-1 yanında BHV-5’in varlığının ortaya konularak, gerçek seroprevalansının belirlenerek literatürdeki boşluğun giderilmesi önerilmektedir.

BHV-4 varlığı solunum, sindirim, genital sistem bozuklukları ve deri lezyonları gibi farklı klinik semptomlar gösteren sığırlarda bildirilmiştir (Graham ve ark. 2005, Monge ve ark. 2006). Yapılan çalışmalarda BHV-4 antikor varlığı ile abort, döl tutmama ve metritis gibi fertilitate problemleri arasında yakın bir ilişkinin olduğu rapor edilmiştir (Kirkbride 1992, Czaplicki ve Thiry 1998, Frazier ve ark. 2001, Monge ve ark. 2006). BHV-4 enfeksiyonlarının Amerika (Mohanty ve ark. 1971), Mısır (House ve ark. 1990), İspanya (Monge ve ark. 2006), İsrail (Fridgut ve Stram 2006), Belçika (van Opdenbosch ve ark. 1988), Japonya (Yoshima ve ark. 2005), Sırbistan (Nikolin ve ark. 2007), Kuzey İrlanda (Graham ve ark. 2005), Hollanda (Metzler ve Wyler 1986), Batı Almanya (Truman ve ark. 1986), Çek Cumhuriyeti (Fichtelova ve Kovarcik 2010) gibi birçok ülkede sığırlarda %30-84.37 arasında değişen oranlarda seropozitiflik ile seyrettiği rapor edilmiştir.

Ülkemizde ise BHV-4 enfeksiyonunun seroprevalansına dair yapılan çalışmalar sonucunda abort ve döl tutmama gibi üreme sorunları yaşayan sığırlarda seropozitifliğin yaklaşık %20.22-69.6 arasında olduğu rapor edilmiştir. Bu oran iller bazında incelendiğinde Balıkesir, Bursa, Kırklareli, Muğla, Kırşehir ve Eskişehir’de %33.1-69.6 (Bilge Dağalp ve ark. 2007), Afyonkarahisar ve Aydın’da %24.7-69 (Gür ve Doğan 2010), Kars’ta %29.3 (Yıldırım ve ark. 2011), Burdur’da %53.7 (Kale ve ark. 2011), Konya’da %20.22 (Avcı ve Yavru 2013) şeklinde belirlenmiştir. Tez kapsamında örnekleme yapılan illerde BHV-4 seroprevalansın belirlenmesine yönelik henüz literatürde mevcut olan bir çalışma bulunmamaktadır. Bu tezde iller bazında BHV-4 seropozitifliği Ankara (%24.41), Kırıkkale (%29.31), Yozgat (%62.02) olarak tespit edilirken Çorum’da örnekleme yapılan sığırlarda BHV-4’e spesifik antikor varlığına rastlanmamıştır (Çizelge 3.5).

Bilge Dağalp ve ark. (2007) metritis sorunu olan, abort ve döl tutmama semptomları gözlenen sığırlarda %54.27 (476/877) oranında BHV-4'e spesifik antikorların varlığını tespit etmişlerdir. Gür ve Doğan (2010) döl tutma sorunu bulunan sığırlarda BHV-4 seropozitifliğinin %44.3 (121/273) olduğunu rapor etmişlerdir. Kale ve ark. (2011) 162 adet döl tutmama sorunu yaşayan sığırdaki %53.70 oranında BHV-4 seropozitifliği tespit etmişlerdir. Yıldırım ve ark. (2011) abort yapan sığırlardan aldıkları numunelerde ELISA ile BHV-4'e karşı %29.3 (41/140) oranında seropozitiflik belirlemişlerdir. Öztürk ve ark. (2012) Burdur'da abort yapmış sığırlarda BHV-4 seroprevalansını %42.4 (39/92) olarak belirlemişlerdir. Bu tezde ise BHV-4'e spesifik antikorların varlığı 615 sığırın 177'sinde (%28.78) belirlendi (Çizelge 3.3).

Monge ve ark. (2006) BHV-4 gB gen bölgesi hedef alınan primerler kullanarak PZR ile metritis semptomu gözlenen 12 sığırın 8'inde BHV-4 antijenini plasenta, uterus içeriği ve kan örneklerinde belirledikleri çalışmada, 8 pozitif örneğin 2'sini kandan tespit etmişlerdir. Bilge Dağalp ve ark. (2007) metritis semptomu görülen 55 sığıra ait vajinal akıntuların 16'sında PZR ile BHV-4 antijeni belirlemişlerdir. Bu tezde BHV-4 antikor ELISA pozitif 114 sığıra ait tam kan örneklerinden DNA izolasyonu yapıldı. İzole edilen DNA örneklerinde BHV-4 antijen varlığı Wellenberg ve ark. (2001) tarafından bildirilen gB1/gB2 primer çiftleri (Çizelge 2.4) kullanılarak PZR ile test edildi. PZR sonrasında elde edilen ürünler agaroz jelde UV altında görüntülendi ve örneklerde beklenen büyüklükte band gözlenmedi (Çizelge 3.6).

Yıldırım ve ark. (2011) ikili antikor analizinde BHV-1/BVDV oranını %23.6 ve BHV-1/BHV-4 oranını %6.4 olarak rapor etmişlerdir. Öztürk ve ark. (2012) BHV-1, BVDV ve BHV-4'ün karşılaştırmalı seropozitiflik analizinde en yüksek oranı % 40.2 ile BHV-1/BVDV ikilisinde belirlemiştir. Avcı ve Yavru (2013) benzer çalışmada BHV-1'in tekli seropozitifliğini %72.88 olarak belirler iken, BHV-1'in BVDV ve BHV-4 ile ikili karşılaştırmasında yine en yüksek oranın BHV-1/BVDV ikilisinde %33.33 olarak tespit etmişlerdir. Bu tezde incelenen BHV-1, BVDV ve BHV-4 için yalnızca tek enfeksiyona karşı oluşan spesifik antikorlar BHV-1 için; 615 örneğin 12'sinde (%1.95), BVDV için; 615 örneğin 156'sında (%25.36), BHV-4

için; 615 örneğin 20'sinde (3.25) belirlendi. Bunun yanında 615 örneğin 11'inde (%18.04) aynı anda üç etkene spesifik antikor varlığı belirlenirken, 143'ünde (%23.25) daha önce bu etkenler ile hiç karşılaşmadığı anlaşıldı (Çizelge 3.4). BHV-1'in BVDV ve BHV-4 ile ikili seropozitiflikleri karşılaştırıldığında, aynı anda iki virüse ait spesifik antikorlar BHV-1/BVDV arasında %20.65, BHV-1/BHV-4 arasında %0.65 ve BHV-4/BVDV arasında %6.82 olarak tespit edildi (Çizelge 3.4) Bu sonuca göre BVDV'in abort ve/veya döl tutmamada ana etken olabileceği gibi, BVDV'nin BHV-1 ile birlikte klinik vakalarda etkin rol oynadığı speküle edilmektedir.

Sığırlarda kan parametrelerinde gözlenen farklılıklar enfeksiyöz ajanlar yanında mekanik (sığırların transportu, buzağuların doğum şekli, kan örneklerinin saklanma koşulları ve farklı analiz cihazları), fizyolojik (ırk, yaş, beslenme, gebelik vb.) ve kimyasal faktörlere bağlı olarak meydana gelebilmektedir (Azkur ve ark. 2013a).

Dänicke ve ark. (2012) gebe sığırlarda ve buzağularında rasyona katılan konjuge linoleik yağ asitleri gibi maddelerin hematokrit, lökosit, monosit ve nötrofil oranlarında düşüşe, eozinofil oranında artışa neden olduğunu belirlemişlerdir. Ciaramella ve ark. (2005) 100 adet klinik olarak normal görünümlü, sağılmayan ve yaşları 2-14 yaş arasında değişen Akdeniz mandalarında (*bubalus bubalis*) hematolojik profili incelemişlerdir. Genç Akdeniz mandalarında ölçülen MCHC ve MCH değerlerinin yaşlılara oranla daha az olduğu, 8 yaş ve üstü mandalarda ise lenfosit miktarının diğer yaş gruplarına göre düşük olduğu rapor edilmiştir. Brun-Hansen ve ark. (2006) buzağular ve yetişkin sığırlarda belirlenen hematolojik parametrelere yaşın etkilerini incelemişlerdir. Bu amaçla 15 klinik olarak sağlıklı yeni doğan buzağıdan ilk 5 haftalık yaşa kadar haftalık olarak, 5 haftalık yaştan sonra 6 aylık yaşa kadar aylık olarak kan değerleri analiz edilmiştir. Daha sonra elde edilen verileri aynı sürüde bulunan ve kontrol grubu olarak seçilen 75 yetişkin sığırın kan değerleri ile karşılaştırmışlardır. Sonuç olarak buzağuların doğumlarını takiben ilk 6 aylık periyotta yetişkin sığırlara oranla MCV'nin düşük, RBC'nin yüksek olduğunu belirlemişlerdir. Buzağularda doğum sonrası ilk 5 haftada MCHC değerinin düşük olduğu, sonraki haftalarda yetişkin sığırların düzeyine yükseldiği tespit edilmiştir.



Benzer şekilde lenfosit ve monosit değerlerinin doğumdan sonraki ilk haftalarda yapılan ölçümlerde düşük olduğu fakat ilerleyen dönemde yetişkin sığırların değerlerine yükseldiği anlaşılmıştır. Trombosit seviyesinin buzağılarda doğumdan sonraki 19-21 haftalık dönemde yetişkin sığırlara oranla fazla olduğunu rapor etmişlerdir. Ohtsuka ve ark. (2009) WBC, CD3<sup>+</sup>TcR<sup>-</sup>N12<sup>-</sup> ve CD3<sup>+</sup>TcR1<sup>-</sup>N12<sup>+</sup> T ile MHC II<sup>+</sup>CD14<sup>-</sup> B hücrelerine yaşın ve gebeliğin etkisini klinik olarak sağlıklı görünümlü 170 süt sığırında araştırmışlardır. Bu amaçla sığırları buzağılama ve gebelik sayılarına göre (ilk, 2. 3. 4.) dört gruba ayırdıklarında, ilk buzağılama yaşında olan gebe ineklerin doğumdan önce 40-60 günlük dönemde, WBC oranının yaşlı ineklere göre daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Yaşlı ineklerde, tespit edilen düşük  $\gamma\delta$ T ve B hücre miktarı nedeni ile buzağılama öncesi genç sığırlara oranla enfeksiyonlara karşı duyarlı oldukları ve bu dönemde daha fazla özen gösterilmesi gerektiği rapor edilmiştir. Ohtsuka ve ark. (2011) 1 gün-14 hafta arasında yaştaki 105 siyah japon (black japan, JB) ve 95 holstein ırkı buzağıda yaş ve ırk değişkenlerinin lökosit popülasyonu üzerine etkisini incelemişlerdir. Siyah japon ırkı buzağılarda CD3<sup>+</sup>TcR1<sup>-</sup>N12<sup>+</sup> T ve MHC II<sup>+</sup>CD14<sup>-</sup> B hücrelerin 4-6 ve 8-10 haftalık holstein buzağılara göre daha düşük olduğunu akış (flow) sitometri cihazı kullanılarak tespit etmişlerdir. Siyah japon buzağıların düşük  $\gamma\delta$ T hücre oranı nedeni ile enfeksiyonlara karşı holstein ırkı buzağılara göre daha duyarlı olduğunu bildirmişlerdir. Akinbamijo ve ark. (1997) yaptıkları çalışmada farklı sığır ırklarında *Trypanosoma congolense* enfestasyonu ardından meydana gelen hematolojik parametrelerdeki değişiklikleri incelemişlerdir. Yaşları 1-2 arasında değişen 16 N'Dama ve 20 Gobra Zebu sığırında enfestasyon öncesinde RBC ve Hb değerlerinin N'Dama sığırlarında yüksek, MCV ve MCH değerlerinin düşük olduğunu belirlemişlerdir. Enfestasyon sonrası Gobra-Zebu ırkında, N'Dama ırkına oranla MCV ve MCH'nin daha fazla yükseldiği, MCHC'nin ise daha fazla azaldığı tespit edilmiştir. Aynı çalışmada her iki sığır ırkında RBC ve Hb'nin azaldığı belirlenmiştir.

Litwińczuk ve ark. (2009) mevsim farklılıklarının buzağılarda hematolojik profil üzerine etkilerini araştırmışlardır. Bu amaç ile sonbahar aylarında (ekim-aralık) mezbahada kesilen 20 buzağıya ait HCT, RBC ve MCV değerlerinin yaz aylarında (haziran-ağustos) kesilen 22 buzağıya göre yüksek, MCH ve MCHC

değerlerinin ise düşük olduğu belirlenmiştir. WBC ve LYM% değerlerinin yaz aylarında, sonbahar aylarına oranla daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. İlâveten hemoglobin miktarında mevsim farklılığının herhangi bir etkisinin olmadığını bildirmişlerdir. Marchesini ve ark. (2013) sığırlarda metabolik bir hastalık olan asidozisin kan parametrelerine etkilerini incelemişlerdir. Fazla karbonhidrat içeren diyet ile beslenerek asidozis meydana gelen sığırlarda hemoglobin, hematokrit ve trombosit miktarlarının kontrol grubuna göre yüksek olduğu rapor edilmiştir.

Hulbert ve ark. (2011) transportun innate immüne yanıt üzerine etkilerini incelemişlerdir. Bu amaç için Brahman ırkı boğaları 24, 48, 96 saatlik taşıma periyodu ardından sakin ve huysuz karakterli olarak gruplandırmışlardır. Transport sonrası 48. saatte huysuz karakterli boğalarda nötröfillerin L selektin açıklanmasının, fagositik ve oksidatif yanma aktivasyonunun sakin huylu boğalara oranla artış meydana geldiğini saptamışlardır. Aynı zamanda her iki sığır ırkında 48. saatte glukoz, kortizol ve TNF- $\alpha$  seviyesinde artış olur iken, 96. saatte nötrofil fagositozu, oksidatif yanma ve hücre adezyon moleküllerinin sakin karakterli boğalarda arttığı belirlenmiştir. Bu tezde 15 aylık yaştan büyük ineklerde sadece enfeksiyon durumları göz önüne alınmıştır. Beslenme, rasyon durumu, ırk, gebelik, mevsim, hayvanın karakteri ve transport durumları dikkate alınmamıştır. Buna rağmen kan parametrelerine ırk etkisinin gözleendiği en belirgin farklılık, Kırıkkale’de bulunan bir işletmede yetiştirilen Holstein ırkı ineklerden toplanarak 54-81 arasında numara ile kodlanan kan örneklerinin analizi sonucu belirlenen PLT, MPV ve MCHC değerlerinde tespit edilmiştir (Şekil 3.10; Şekil 3.19; Şekil 3.20). PLT, MPV ve MCHC’de belirlenen bu değişimin normal referans değer limitleri içinde olduğu ve ayırıcı klinik tanı için yeterli düzeyde olmadığı anlaşılmaktadır. Örnekleme yapılan Holstein ırkı ineklerin tez kapsamında kan alınma tarihinden yaklaşık 8-12 ay önce Amerika’dan getirildiği işletme sahibinden öğrenilmiştir. Elde edilen bilgi ve tespit edilen veriler birlikte değerlendirildiğinde, bu durumun daha detaylı çalışmalar ile incelenmesi gereken bir husus olabileceği düşünülmektedir.

Sığırlarda, fizyolojik, metabolizmal ve enfeksiyon etkenleri dışında hematolojik parametrelere etki eden diğer faktörler; toplanan örneklerin saklanma koşulları, kullanılan kan sayım cihazı modeli ve karşılaştırmalı analizler için

kullanılan referans değerlerdeki farklılıklardır. Ihedioha ve Onwubuche (2007) farklı hayvan türlerinde ortam sıcaklığının hematolojik parametrelere etkisini araştırmışlardır. Bu amaç ile 36 sığır, 32 keçi ve 48 domuzdan toplanan kanların analiz edilinceye kadar 5°C-30°C arasında 24 saatten daha uzun süre muhafaza edildiğinde Hgb, RBC ve WBC parametrelerinde değişiklik olmadığı rapor edilmiştir. Bu tezde sığırlardan toplanan örnekler direkt olarak laboratuvara getirilerek +4°C'deki buzdolabına konulmuş ve ilk 4 saat iğersinde hematolojik parametrelerin ölçümü yapılmıştır.

Riond ve ark. (2011) hematolojik parametreler ölçülürken, farklı kan sayım cihazlarının etkilerini araştırmışlardır. Buna göre sığır, at, köpek ve kedi kan örneklerinde WBC, RBC, Hgb, HCT, MCV, MCH, MCHC, PLT değerleri, Cell-Dyn 3500 (Abbott AG, Baar, Switzerland) ve pocH-100iV Diff (Sysmex Europe GmbH, Hamburg, Germany) marka hemagrom cihazları kullanıldığında köpek MCV, Hgb ve kedi PLT değerlerinde aynı kan örneklerinde cihazlara bağlı olarak farklılıklar belirlemişlerdir. Deprez ve ark. (2009) sığır ve atlara ait kan örneklerinin analizinde Coulter Counter (Model ZF, Coulter Electronics LTD, Harpenden Herts, England), Vet ABC (ABX Diagnostics, Montpellier, France), pocH-100iV DIFF (Sysmex Europe GmbH, Hamburg, Germany) ve Coulter LH 750 (Beckman Coulter) marka farklı kan sayım cihazları kullandığında, cihazlara bağlı olarak WBC, RBC, Hct, Hb ve PLT değerlerinde anlamlı istatistiksel farklılıkların olduğunu rapor etmişlerdir. Bu tezde sığırlardan toplanan 360 tam kan örneğinin MS9-3 hemogram cihazında analizi yapıldı. Hastalıkların tanısında ve detaylı kan parametrelerinin incelenmesinde akış (flow) sitometri cihazının kullanılması daha önemlidir. İnsan hekimliğinde ve deneysel çalışmalarda akış (flow) sitometri cihazı olmadan sağlıklı, detaylı ve bilimsel veri elde edilemediği görülmüştür. Ne var ki ülkemizde veteriner hekimlikte akış (flow) sitometrinin kullanımında geri kalınmıştır. Bu tez ile daha kapsamlı çalışmaların yapılması ve bilimsel etki faktörü yüksek yayınların elde edilmesi için akış (flow) sitometri ile lenfosit alt tiplerinin incelenmesi gerekliliği ve enfeksiyon modellerinde deneysel çalışmaların kullanılması önerilmektedir.

Sığırlarda kan değerlerinin incelendiği çalışmalarda, yıllar ve araştırma yapan gruplara bağlı olarak belirlenen referans kan değerlerinde değişiklikler olmaktadır.

George ve ark. (2010) araştırmalarında 1957 ve 2006 yılları arasında sığırlarda yapılan pek çok ölçüm ile referans olarak tanımlanan değerlerin yıllar içinde sürekli değişim gösterdiğini tespit etmişlerdir. İlaveten ilk olarak 1957 yılında Dr. Oscar Schalm tarafından yazılan “Veterinary Hematology” adlı kitabın 2. baskısında yer verilen referans değerler aynı kitabın takibeden yıllarda yayınlanan baskılarında dahi sürekli değişim göstermektedir (Schalm 1965, Schalm 1975, Jain 1986, Feldman 2000, Wood ve Quiroz-Rocha 2010).

Akut BVDV enfeksiyonlarında viremi inokulasyondan sonra 3-9. günler arasında şekillenmektedir. Bu dönem içerisinde sığırlarda lökosit, lenfosit, monosit ve nötrofil sayılarında belirgin bir azalış gözlenmiştir. Ayrıca CD4<sup>+</sup> ve CD8<sup>+</sup> T ve B lenfositlerde enfeksiyondan sonra 3-6. günlerde düşüş olduğu belirlenmiştir (Molina ve ark. 2014). Alsaad ve ark. (2012) BVDV ile enfekte buzağılarda RBC ve Hgb değerlerinde anlamlı bir değişiklik olmadığını, buna rağmen MPV'nin enfekte buzağılarda kontrol grubuna oranla daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir. Brewoo ve ark. (2007) BVDV PE ve PE olmayan onbeş sığırı gruplandırmışlardır. Yapılan akış (flow) sitometri analizi ile T ve B lenfosit sayılarında ve yüzdelerinde iki grup arasında fark olmadığını belirlemişlerdir. Bunun yanında nötrofil granülosit ve monositlerin fagositik aktivitelerini karşılaştırmalı olarak incelediklerinde yine iki grup arasında farklılık olmadığını tespit etmişlerdir. Bolin ve Ridpath (1992) ncp BVDV-2 ile enfekte edilen buzağılarda lökopeni, lenfopeni, trombositopeni ve nötropeni şekillendiğini bildirmiştir. Walz ve ark. (1999) BVDV-2 ile deneysel enfekte buzağılarda enfeksiyondan sonra 7-12. günler arasında MPV, WBC ve nötrofil granülosit seviyesinde önemli düşüş olduğunu bildirmiştir. Archambault ve ark. (2000) BVDV-2 ile intranazal olarak deneysel enfekte ettikleri 16-18 aylık yaştaki buzağılarda enfeksiyondan sonra 0-12. günlerde yapılan ölçümlerde lökosit, nötrofil, lenfosit, monosit seviyelerinin azaldığını tespit etmişlerdir. Walz ve ark. (2001) BVDV-1 ve BVDV-2'nin buzağılarda trombosit kümelenme fonksiyonları üzerine etkilerini incelediklerinde yalnızca BVDV-2 ile enfekte olan grupta belirgin bir farklılık olduğunu ve BVDV-1'in değişikliğe neden olmadığını rapor etmişlerdir. Keller ve ark. (2006) buzağıların ncp BVDV-2 enfeksiyonundan sonra 2-15. günlerde nötrofil, lenfosit ve monosit değerlerinde azalma olduğunu rapor etmişlerdir. Bolin ve ark. (1992), Walz ve ark. (1999), Archambault ve ark. (2000),

Walz ve ark. (2001), Keller ve ark. (2006) tarafından yapılan ve hematolojik değerlerde farklılıklar tespit edilen deneysel enfeksiyon çalışmalarında, virüs olarak BVDV-2 suşları kullanılmıştır. Bu tezde ise örnekleme yapılan bölgede sirküle olduğu belirlenen virüsün filogenetik analizi sonucu BVDV-1'e yakın olduğu tespit edildi. Böylece bölgede bulunan virüsün parametrelerde anlamlı değişikliklere neden olmadığı, diğer çalışmaların sonuçları ile uygunluk göstermektedir.

Kocatürk ve ark. (2010) BVDV ile doğal enfekte 4-9 aylık genç sığırlarda nötropeni ve lökopeni yanında RBC, Hgb, PLT ve MPV değerinde yükselme ile MCV değerinde azalma olduğunu tespit etmişlerdir. Sarıkaya ve ark. (2011) inaktif BVDV aşısının buzağılarda uygulanmasının WBC ve Lym değerlerinde değişikliğe neden olarak lökopeni ve lenfopeni tablosu şekillendirdiğini rapor etmişlerdir. İlâveten aynı çalışmada RBC, Mon, N/Gr, PLT, MPV, MCH değerlerinde aşılama sonrasında bir değişikliğin gözlenmediğini bildirmişlerdir. Bu tez ile BVDV'nin hematolojik parametreler üzerine etkisi karşılaştırmalı istatistiksel analiz yöntemleri kullanılarak incelendiğinde HCT, MCV, MPV ve MCHC için grup 1 ile 2 arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar belirlendi ( $p < 0.005$ ) (Çizelge 3.9). Belirlenen bu verilere göre BVDV spesifik antikor varlığında MCV, HCT, MCHC ve MPV değerlerinde istatistik olarak değişiklik olduğu anlaşılmaktadır. Bu tezde BVDV ile enfekte sığırlarda WBC, Lym, Mon ve N/Gr değerlerindeki değişimlere bağlı olarak lökopeni, lenfopeni ve trombositopeni tablosu tespit edilmemiştir. İstatistiksel olarak farklılık gözlenen parametrelerin, normal referans değer sınırları (Çizelge 3.8; Şekil 3.14; Şekil 3.18; Şekil 3.19; Şekil 3.20) içinde bulunması nedeni ile sığırlarda akut BVDV enfeksiyonlarında ayırıcı klinik tanıda kullanılabilecek düzeyde anlamlı olmadığı düşünülmektedir.

Bu tezde BVDV için antijen varlığının kan değerlerindeki istatistiksel değişimin belirlenmesi için 2 gruba ayrıldı ve antijen varlığında hematolojik parametrelerde meydana gelen istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik belirlenemedi ( $p > 0.005$ ), (Çizelge 3.10). Elde edilen verilere göre BVDV enfeksiyonu kaynaklı olarak hematolojik parametrelerde değişiklik olmamasında, araştırmacıların aksine deneysel enfeksiyon modeli yerine doğal enfekte sığırlardan toplanan kan örnekleri kullanılması ve bu nedenle olası bir şekilde sığırların

hematolojik parametrelerinde belirgin farklılıkların şekillendiği ve tespit edilebilir düzeyde olduğu akut viremi döneminin yakalanamamış olması düşünülmektedir.

Molina ve ark. (2013) BVDV ile enfekte buzağuların BHV-1 ile tekrar enfeksiyonunu incelemişlerdir. Elde edilen sonuçlara göre enfeksiyondan sonra 2-9. günde lökosit, nötrofil sayılarında belirgin bir değişme gözlenir iken lenfosit sayısında enfeksiyondan sonra 4. günde azalış tespit edilmiştir. Aynı çalışmada CD4<sup>+</sup> ve CD8<sup>+</sup> seviyesinde enfeksiyondan sonra 4. günde, B lenfositlerde ise enfeksiyondan sonra 1-14. günler arasında azalış gözlenmiştir. Arthington ve ark. (1996) ve BHV-1 enfeksiyonlarında dışarıdan diyet katılan bakırın kandaki RBC, WBC ve hemotokrit seviyelerine etkilerini incelemişlerdir ve herhangi bir farklılık tespit edememişlerdir. Benzer şekilde Cusack ve ark. (2005) sığırlarda BHV-1 enfeksiyonlarında diyet katılan vitamin E ve vitamin C'nin lenfosit sayısına etkisinin olmadığını rapor etmişlerdir.

Bu tezde BHV-1'in hematolojik parametrelerde neden olduğu olası istatistiksel değişikliklerin belirlenmesi amacı ile ELISA ve PZR sonuçlarına göre kan örnekleri iki gruba ayrıldı ve Hct(%), MCV ve MPV değerlerinde iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar belirlendi (p<0.005), (Çizelge 3.11). Hct(%), MCV ve MPV değerleri incelendiğinde BHV-1 antikor varlığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmesine rağmen, her iki gruptaki sığırlarda ölçülen bu parametrelerin sığırlar için belirlenen referans değer sınırları (Çizelge 3.8; Şekil 3.14; Şekil 3.18; Şekil 3.19) içinde olduğu görülmektedir. Yates (1982) pek çok araştırmacının BHV-1'in sığırlarda lökosit değeri üzerine etkilerini incelediğini, fakat bu parametrenin ayırıcı tanıda bir anlam ifade etmediğini bildirmiştir. Bu tezde BHV-1 spesifik antikor varlığında Hct (%), MCV ve MPV değerlerinde istatistiksel olarak fark olmasına rağmen, bu değerlerin ayırıcı tanıda kullanılması için yetersiz oldukları düşünülmektedir. Bunun yanında bu tezde elde edilen sonuçların BHV-1'in eritrosit ve trombosit mekanizması üzerine etkisinin araştırılacağı daha kapsamlı çalışmalar için temel oluşturacağı düşünülmektedir.

BHV-4 enfeksiyonlarının hematolojik parametreler üzerine etkisinin araştırıldığı literatüre kayıtlı sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. van Opdenbosch ve

ark. (1988) metritis ve döl tutmama sorunu yaşayan sığırlarda geçici bir lökopeni tablosu tespit ederken, Wellemans ve ark. (1986) gebe olan ve olmayan sığırlarda metritis gözlenen durumlarda lökopeni tablosunun geliştiğini bildirmişlerdir. Wellenberg ve ark. (2002) BHV-4'ün ineklerde subklinik mastitis ile ilişkisini incelemişlerdir. BHV-4 ile intranazal ve intramammal inokulasyondan sonra 14 gün içerisinde WBC değerlerinde herhangi bir değişim belirlememişlerdir. Yalnızca WBC değerinde azalmayı BHV-4 ile enfekte ineklerin *S. uberis* ile enfekte edilmesinden 3-5 gün sonra tespit etmişlerdir.

Bu tezde BHV-4'ün hematolojik parametreler üzerine etkisinin belirlenmesi için kan örnekleri iki gruba ayrıldı ve MPV değerinde iki grup arasında farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ( $p < 0.005$ ), (Çizelge 3.12). MPV değeri için iki grup arasında istatistiksel olarak fark belirlenmesine rağmen iki grupta ölçülen değerlerin sığırlar için belirlenen referans MPV sınırları (Çizelge 3.8; Şekil 3.19) içinde kalmaktadır. BVDV ve BHV-1 ile benzer şekilde bu farklılığın ayırıcı teşhis için kullanılacak yeterli bir veri olamayacağı görülmüştür. Elde edilen veriler ışığında belirlenen WBC değerinde BHV-4 kaynaklı bir farklılık tespit edilememesi örneklemenin akut viremi döneminde ve enfeksiyonu takiben 15 günlük periyotta yapılamamış olması en önemli neden olarak görülmektedir. Bunun yanında ülkemizde BHV-4'ün doğal enfeksiyon sırasında hematolojik parametreler üzerine etkilerinin incelendiği ilk çalışma olması nedeni ile önemli olduğu ve ilerleyen dönemde BHV-4 ile ilgili yapılacak detaylı çalışmalar için bir veri olacağı düşünülmektedir.

Sonuç olarak bu tez ile Ankara, Çorum, Kırıkkale, Yozgat illerini kapsayan geniş bir bölgede, BVDV ve BHV-1 antijen varlığı tespit edildi. BVDV, BHV-1 ve BHV-4 için seropozitiflik oranları belirlendi. Fakat BHV-5 varlığını gerek serolojik gerekse antijenik yönden gösteren bir kanıt tespit edilemedi. Kırıkkale'de ve Türkiye'de geçmiş yıllarda belirlenen BVDV ile bu tezde örnekleme yapılan bölgede sirküle olan BVDV tipi belirlenerek karşılaştırıldı. İlk defa ülkemizde BHV-1 virüsünün kısmi DNA sekansı belirlenerek gen bankasına kaydedildi. Bu konu hakkında daha detaylı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu tez ile yetiştiricilerin ve veteriner hekimlerin abort ve döl tutmama vakalarında akıllarına ilk gelen etken *Brucella* haricinde BVDV, BHV-1 ve BHV-4'ünde etkin rol oynadığı belirlenmiştir. Bu verilerin yapılacak seminer ve bilgilendirme toplantılarında paylaşılması ile sığırlarda görülen her abort ve döl tutmama vakasının *Brucella* kaynaklı olmadığı, bunun yanında pek çok viral etkenin de neden olabileceği anlatılmalıdır. Böylece Brucellozis tedavisine yönelik gereksiz antibiyotik kullanımının azaltılabileceği ve ekonomik olarak yarar sağlanabileceği speküle edilmektedir.

BVDV, BHV-1 ve BHV-4'ün, lenfosit alt popülasyonları üzerine etkilerinin yapılacak daha kapsamlı çalışmalar ile incelenmesi gerekmektedir. Yapılacak çalışmaların deneysel şartlarda yapılması ve analizlerde akış (flow) sitometri yöntemi kullanılması önem arz etmektedir.

Planlanacak daha kapsamlı çalışmalarda BVDV, BHV-1, BHV-4 ve BHV-5'in benzer problemlerde rolünün daha geniş popülasyonlarda ve/veya deneysel enfeksiyon çalışmalarında klinik semptomlar ile ilişkilendirilerek incelenmesi ve virüs suşlarının moleküler karakterizasyonlarının yapılarak, kontrol programlarına yönelik bilgi ve virüs koleksiyonlarının oluşturulmasında yarar görülmektedir.



## KAYNAKLAR

- ABDELMAGID OY, MINOCHA HC, COLLINS JK, CHOWDHURY SI (1995) Fine mapping of bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) glycoprotein D (gD) neutralizing epitopes by type-specific monoclonal antibodies and sequence comparison with BHV-5 gD. *Virology*, 206, 242–253.
- ABRAHANTE JE, ZHANG JW, ROSSOW K, ZIMMERMAN JJ, MURTAUGH MP (2012) Surveillance of bungowannah pestivirus in the upper midwestern USA. *Transbound Emerg Dis*, Nov 27, in press.
- ABRIL C, ENGELS M, LIMAN A, HILBE M, ALBINI S, FRANCHINI M, SUTER M, ACKERMANN M (2004) Both viral and host factors contribute to neurovirulence of bovine herpesviruses 1 and 5 in interferon receptor-deficient mice. *J Virol*, 78, 3644-3653.
- ABU ELZEIN EME, HOUSAWI FMT, AL-AFALEQ AI, AL-MUSA J (2008) Emergence of clinical infectious bovine rhinotracheitis in eastern saudi arabia. *Rev Elev Med Vet Pays Trop*, 61, 11-13.
- ACHA NP, SZYFRES B (2003) Zoonoses and Communicable Diseases Common to Man and Animals, 3rd ed, Pan American Health Organization (PAHO), Washington DC, vol. 1.
- ACKERMANN M, MULLER HK, BRUCKNER L, RIGGENBACH C, KIHM U (1989) The control of infectious bovine rhinotracheitis (IBR) in Switzerland from 1978 to 1988. *Schweiz Arch Tierheilkd*, 131, 397-407.
- ACKERMANN M, ENGELS M (2006) Pro and contra IBR-eradication. *Vet Microbiol*, 113, 293–302.
- ACKERMANN MR, DERSCHIED R, ROTH JA (2010) Innate immunology of bovine respiratory disease. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 26, 215–228.
- ADLER H, FRECH B, MEIER P, JUNGI TW, PETERHANS E (1994) Noncytopathic strains of bovine viral diarrhea virus prime bovine bone marrow-derived macrophages for enhanced generation of nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun*, 202, 1562–1568.
- ADLER H, JUNGI TW, PFISTER H, STRASSER M, SILEGHEM M, PETERHANS E (1996) Cytokine regulation by virus infection: bovine viral diarrhea virus, a flavivirus, downregulates production of tumor necrosis factor alpha in macrophages *in vitro*. *J Virol*, 70, 2650–2653.
- AFSHAR A, DULAC GC, DUBUC C, HOWARD TH (1991) Comparative evaluation of the fluorescent antibody test and microtiter immunoperoxidase assay for detection of bovine viral diarrhea virus from bull semen. *Can J Vet Res*, 55, 91-93.

- AGAPOV EV, MURRAY CL, FROLOV I, QU L, MYERS TM, RICE CM (2004) Uncleaved NS2-3 is required for production of infectious bovine viral diarrhoea virus. *J Virol*, 78, 2414-2425.
- AGNELLO V, ABEL G, ELFAHAL M, KNIGHT GB, ZHANG QX (1999) Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 12766-12771.
- AK S, FIRAT İ, BOZKURT HH, GÜLYAZ V, AK K (2002) The prevalence of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections in cattle and existence of persistently infected cattle in the trakya region. *Turk J Vet Anim Sci*, 26, 245-248.
- AKÇA Y (1981) Türkiye’de sığır ve koyunlarda infectious bovinerhinotracheitis-infectious pustular vulvovaginitis üzerine serolojik araştırmalar. Doktora tezi. Ankara üniversitesi, Ankara.
- AKINBAMIJO OO, BENNISON JJ, JAITNER J, DEMPFLER L (1998) Haematological changes in N'Dama and Gobra Zebu bulls during Trypanosoma congolense infection maintained under a controlled feeding regimen. *Acta Trop*, 69, 181-192.
- ALBAYRAK H, GUMUSOVA SO, OZAN E, YAZICI Z (2012) Molecular detection of pestiviruses in aborted fetuses from provinces in northern Turkey. *Trop Anim Health Prod*, 44, 677-680.
- AL-DELAİMIA, AK, ALI AH (1990) A study of epidemic abortions associated with brucellosis in sheep. *Pak Vet J*, 10, 1-4.
- ALEGRE M, NANNI M, FONDEVILA N (2001) Development of a multiplex polymerase chain reaction for the differentiation of bovine herpesvirus-1 and -5. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, 48, 613- 621.
- ALSAAD KM, AL-OBAIDI QT, HASSAN SD (2012) Clinical, haematological and coagulation studies of bovine viral diarrhoea in local Iraqi calves. *Bjvm*, 15, 44-50.
- ALTON GG, JONES LM, PIETZ DE (1975) Laboratory techniques in Brucellosis. World Health Organization Monograph Series No.55 2nd Ed.
- ALVAREZ-BARRIENTOS A, ARROYO J, CANTON R, NOMBELA C, SANCHEZ- PEREZ M (2000) Applications of flow cytometry to clinical microbiology. *Clin Microbiol Rev*, 13, 167.
- ALVAREZ M, DONATE J, MAKOSCHEY B (2012) Antibody responses against non-structural protein 3 of bovine viral diarrhoea virus in milk and serum samples from animals immunised with an inactivated vaccine. *Vet J*, 191, 371-376.
- ANDERSON TD, MEADOR VP, CHEVILLE NF (1986) Pathogenesis of placentitis in then goat inoculated with Brucella abortus. I. Gross and histologic lesions. *Vet Pathol*, 23, 219-226.
- ANDERSON ML (2007) Infectious causes of bovine abortion during mid- to late gestation. *Theriogenology*, 68, 474-486.

- ANONİM (2012) Yıllara Göre Brusella Tarama Ve Pozitif Vaka Sayıları, T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı.  
Erişim:[<http://www.tarim.gov.tr/Sayfalar//IceriklerDetay.aspx?rid=126&NodeValue=108&KonuId=107&ListName=Icerikler>], Erişim tarihi:11.05.2014.
- APAN TZ, YILDIRIM M, İSTANBULLUOĞLU E (2007) Seroprevalence of Brucellosis in human, sheep, and cattle populations in Kirikkale (Turkey). *Turk J Vet Anim Sci*, 31, 75-78.
- ARAJ GF (2010) Update on laboratory diagnosis of human brucellosis. *Int J Antimicrob Agents*, 36, 12-17.
- ARAJ GF, AWAR GN (1997) The value of ELISA vs negative coombs findings in the serodiagnosis of human brucellosis. *Serodiag Immunother Infect Dis*, 8, 169-172.
- ARCHAMBAULT D, BELİVEAU C, COUTURE Y, CARMAN S (2000) Clinical response and immunomodulation following experimental challenge of calves with type 2 noncytopathogenic bovine viral diarrhea virus. *Vet Res*, 31, 215-227.
- ARSERIM NB, OZEKINCI T, CEYLAN A, TEL OY, KESKIN O, VURAL A (2012) Brucellosis seroprevalance on goats, sheep, cows and man who are under risk in Diyarbakir region. *J Anim Vet Adv*, 7, 979-982.
- ARTHINGTON JD, CORAH LR, BLECHA F (1996) The effect of molybdenum-induced copper deficiency on acute-phase protein concentrations, superoxide dismutase activity, leukocyte numbers, and lymphocyte proliferation in beef heifers inoculated with bovine herpesvirus-1. *J Anim Sci*, 74, 211-217.
- ASANO A, INOSHIMA Y, MURAKAMI K, IKETANI Y, YAMAMOTO Y, SENTSUI H (2003) Latency and persistence of bovine herpesvirus type 4, strain B11-41, in bovine nervous tissues. *J Vet Med Sci*, 65, 87-93.
- ASHBAUGH SE, THOMPSON KE, BELKNAP EB, SCHULTHEISS PC, CHOWDHURY S, COLLINS JK (1997) Specific detection of shedding and latency of bovine herpesvirus 1 and 5 using a nested polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest*, 9, 387-394.
- ASLANTAŞ O, BABÜR C (2000) Seroepidemiologic studies on brucellosis and toxoplasmosis in sheep and cattle in Kars province. *Etlik Vet Mikrobiyol Derg*, 11, 47-55.
- AŞKAR Ş, MUMCU F, ÜNAL N, YİLDİRİM M (2013) Kırıkkale ve yöresindeki süt sığırı ve koyunlar ile bunların yetiştiricilerinde Brucella antikor varlığının araştırılması. *YYU Vet Fak Derg*, 24, 113-116.
- ATA A, KOCAMÜFTÜOĞLU M, HASIRCIOĞLU S, KALE M, GÜLAY MŞ (2012) Investigation of relationship between Bovine Herpesvirus-1 (BHV-1) infection and fertility in repeat breeding dairy cows in familytype small dairy farms. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 18, 579-583.

- ATLURI VL, XAVIER MN, DE JONG MF, DEN HARTIGH AB, TSOLIS RM (2011) Interactions of the human pathogenic Brucella species with their hosts. *Annu Rev Microbiol*, 65, 523-541.
- AVCI O, YAVRU S (2013) Investigation of Bovine Herpesvirus-1, Bovine Viral Diarrhea Virus and Bovine Herpesvirus-4 in a dairy herd with naturally infected in Konya. *Eurasian J Vet Sci*, 29, 82-86.
- AVILA-CALDERÓN ED, LOPEZ-MERINO A, SRIRANGANATHAN N, BOYLE SM, CONTRERAS-RODRÍGUEZ A (2013) A history of the development of Brucella vaccines. *Biomed Res Int*, 743509.
- AYDIN N (2006) Brucella İnfeksiyonları. In, Aydın N, Paracıkoğlu J (Eds): Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar). İlke-Emek Yayıncılık, Ankara, 145-163.
- AZKUR AK, GAZYAĞCI S, ASLAN ME, UNAL N (2011) Molecular and Serological Characterization of Pestivirus Infection Among Sheep in Kirikkale, Turkey. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 17, 83-92.
- AZKUR AK, GAZYAGCI S, ASLAN ME (2013a) Kırıkkale ilindeki ineklerde BVDV, BHV-1, BHV-4 ve BHV-5 enfeksiyonlarının epidemiyolojisi, genetik karakterizasyonun belirlenmesi ve kan parametrelerinin karşılaştırılması. Tübitak Projesi, No: 111O871.
- AZKUR AK, ALBAYRAK H, RISVANLI A, PESTİL Z, OZAN E, YILMAZ O, TONBAK S, CAVUNT A, KADI H, MACUN HC, ACAR D, OZENÇ E, ALPARSLAN S, BULUT H (2013b) Antibodies to Schmallenberg virus in domestic livestock in Turkey. *Trop Anim Health Prod*, 45, 1825-1828.
- AZNAR MN, SAMARTINO LE, HUMBLET MF, SAEGERMAN C (2014). Bovine Brucellosis in Argentina and Bordering Countries: Update. *Transbound Emerg Dis*, 61, 121-133.
- BABIUK LA, VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK S, TIKOO SK (1996) Immunology of bovine herpesvirus 1 infection. *Vet Microbiol*, 53, 31-42.
- BAEK BK, LEE BO, HUR J, RAHMAN MS, LEE SI, KAKOMA I (2005) Evaluation of the sprague-dawley rat as a model for vertical transmission of Brucella abortus. *Can J Vet Res*, 69, 305-308.
- BAGUST TJ, CLARK L (1972) Pathogenesis of meningo-encephalitis produced in calves by infectious bovine rhinotracheitis herpesvirus. *J Comp Pathol*, 82, 375-383.
- BAILY GG, KRAHN JB, DRASAR BS, STOKER NG (1992) Detection of Brucella melitensis and Brucella abortus by DNA amplification. *J Trop Med Hyg*, 95, 271-275.
- BAKER JC (1990) Clinical aspects of bovine virus diarrhoea virus infection. *Rev Sci Tech*, 9, 25-41.

- BAKER JC (1995) The clinical manifestations of bovine viral diarrhoea virus infection. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 11, 425-445
- BAKER J, YORK CJ, GILLESPIE JH, MITCHELL GB (1954) Virus diarrhoea in cattle. *Am J Vet Res*, 57, 525-531.
- BALDWIN CL, WINTER AJ (1994) Macrophages and Brucella. *Immunol Ser*, 60, 363-380.
- BALDWIN CL, GOENKA R (2006) Host immune responses to the intracellular bacterium Brucella: does the bacterium instruct the host to facilitate chronic infection? *Crit Rev Immunol*, 26, 407-442.
- BANAI M (2002) Control of small ruminant brucellosis by use of *Brucella melitensis* Rev.1 vaccine: laboratory aspects and field observations. *Vet Microbiol*; 90, 497-519.
- BARROS SC, RAMOS F, PAUPÉRIO S, THOMPSON G, FEVEREIRO M (2006) Phylogenetic analysis of Portuguese bovine viral diarrhoea virus. *Virus Res*, 118, 192-195.
- BARTHA A, JUHASZ M, LIEBERMANN H (1966) Isolation of a bovine herpesvirus from calves with respiratory disease and keratoconjunctivitis. A preliminary report. *Acta Vet Acad Sci Hung*, 16, 357-358.
- BARTHA A, HAJDU G, ALDASY P, PACZOLAY G (1969) Occurrence of encephalomyelitis caused by infectious bovine rhinotracheitis virus in calves in Hungary. *Acta Vet Acad Scient Hung*, 19, 145-151.
- BARTHA A, FADOL AM, LIEBERMANN H, LUDWIG H, MOHANTY SB, OSORIO FA, REED DE, STORZ J, STRAUB OC, VAN DER MAATEN MJ (1987) Problems concerning the taxonomy of the 'Movar-type' bovine herpesviruses. *Intervirology*, 28, 1-7.
- BASHIR S, SINGH R, SHARMA B, YADAV SK (2011) Development of a sandwich ELISA for the detection of bovine herpesvirus type 1. *Asian Pac J Trop Med*, 4, 363-366.
- BASTOS JC, KOHN LK, FANTINATTI-GARBOGGINI F, PADILLA MA, FLORES EF, DA SILVA BP, DE MENEZES CB, ARNS CW (2013) Antiviral activity of Bacillus sp. isolated from the marine sponge *Petromica citrina* against bovine viral diarrhoea virus, a surrogate model of the hepatitis C virus. *Viruses*, 5, 1219-1230.
- BAŞOĞLU A, AYDOĞDU U (2013) Terminal atrial standstill with ventricular escape rhythm in a neonatal calf with acute diarrhoea. *Turk J Vet Anim Sci*, 37, 362-365.
- BAUERMAN FV, RIDPATH JF, WEIBLEN R, FLORES EF (2013) HoBi-like viruses: an emerging group of pestiviruses. *J Vet Diagn Invest*, 25, 6-15.

- BAUERMANN FV, FLORES EF, FALKENBERG SM, WEIBLEN R, RIDPATH JF (2014) Lack of evidence for the presence of emerging HoBi-like viruses in North American fetal bovine serum lots. *J Vet Diagn Invest*, 26, 10-7.
- BECHER P, ORLICH M, KOSMIDOU A, KÖNIG M, BAROTH M, THIEL HJ (1999) Genetic diversity of pestiviruses: identification of novel groups and implication for classification. *Virology*, 262, 64–71.
- BELAK K, KUCSERA L, ROS C, KULCSAR G, MAKRANSZKI L, SOOS T, BELAK S (1999) Studies on the pathogenicity of bovine herpesvirus type 5 in sheep. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 22, 207–220.
- BELAK S, BALLAGI-PORDANY A (1993) Application of the polymerase chain reaction (PCR) in veterinary diagnostic virology. *Vet Res Commun*, 17, 55-72.
- BELKNAP EB, COLLINS JK, AYERS VK, SCHULTHEISS PC (1994) Experimental infection of neonatal calves with neurovirulent bovine herpesvirus type 1.3. *Vet Pathol*, 31, 358–365.
- BHAT MN, MANICKAM R, KUMANAN K (1997) Serological evidence of bovine herpesviruses 1 and 2 in Asian elephants. *J Wildl Dis*, 33, 919–920.
- BHATIA S, SOOD R, MISHRA N, PATTNAIK B, PRADHAN HK (2008) Development and evaluation of a MAb based competitive-ELISA using helicase domain of NS3 protein for sero-diagnosis of bovine viral diarrhea in cattle and buffaloes. *Res Vet Sci*, 85, 39-45.
- BIELANSKI A, DUBUC C (1995) *In vitro* fertilization of ova from cows experimentally infected with a non-cytopathic strain of bovine viral diarrhea virus. *Anim Reprod Sci*, 38, 215-221.
- BIELANSKI A, SAPP T, LUTZE-WALLACE C (1998) Association of bovine embryos produced by *in vitro* fertilization with a noncytopathic strain of bovine viral diarrhea virus type II. *Theriogenology*, 49, 1231-1238.
- BIELANSKI A, ALGIRE J, LALONDE A, GARCEAC A (2013a) Embryos produced from fertilization with bovine viral diarrhea virus (BVDV)-infected semen and the risk of disease transmission to embryo transfer (ET) recipients and offspring. *Theriogenology*, 80, 451-455.
- BIELANSKI A, ALGIRE J, LALONDE A, GARCEAC A (2013b) Prevention of bovine herpesvirus-1 transmission by the transfer of embryos disinfected with recombinant bovine trypsin. *Theriogenology*, 80, 1104-1108.
- BIELEFELDT-OHMANN H (1995) The pathologies of bovine viral diarrhoea virus infection. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 11, 447-476.
- BILGE S (1996) Kan ve süt serumlarında enfeksiyöz bovine rhinotracheitis-enfeksiyöz pustuler vulvovaginitis (IBR-IPV) antikorlarının nötralizasyon testi ile saptanması ve süt örneklerinden virus izolasyonu. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi, Ankara.

- BILGE DAGALP S, DEMIR AB, GUNGOR E, ALKAN F (2007) The seroprevalence of bovine herpes virus type 4 (BHV4) infection in dairy herds in Turkey and possible interaction with reproductive disorders. *Rev Med Vet*, 158, 201-205.
- BILLARD E, DORNAND J, GROSS A (2007) Brucella suis prevents human dendritic cell maturation and antigen presentation through regulation of tumor necrosis factor alpha secretion. *Infect Immun*, 75, 4980-4989.
- BIRON CA (1999) Initial and innate responses to viral infections– pattern setting in immunity or disease. *Curr Opin Microbiol*, 2, 374–381.
- BISWAS S, BANDYOPADHYAY S, DIMRI U, PATRA PH (2013) Bovine herpesvirus-1 (BHV-1) - a re-emerging concern in livestock: a revisit to its biology, epidemiology, diagnosis, and prophylaxis. *Vet Q*, 33, 68-81.
- BITSCH V, HANSEN KE, RØNSHOLT L (2000) Experiences from the Danish programme for eradication of bovine virus diarrhoea (BVD) 1994-1998 with special reference to legislation and causes of infection. *Vet Microbiol*, 77, 137-143.
- BLANCHARD PC, RIDPATH JF, WALKER JB, HIETALA SK (2010) An outbreak of lateterm abortions, premature births, and congenital deformities associated with a bovine viral diarrhoea virus 1 subtype b that induces thrombocytopenia. *J Vet Diagn Invest*, 22, 128-131.
- BLOWEY RG, WEAVER DA (2003) Color Atlas of Diseases and Disorders of Cattle. Elsevier Health Sciences.
- BOELAERT F, BIRONT P, SOUMARE B, DISPAS M, VANOPDENBOSCH E, VERMEERSCH JP, RASKIN A, DUFEY J, BERKVENNS D, KERKHOFS P (2000) Prevalence of bovine herpesvirus-1 in the Belgian cattle population. *Prev Vet Med*, 45, 285-295.
- BOELAERT F, SPEYBROECK N, DE KRUIF A, AERTS M, BURZYKOWSKI T, MOLENBERGHS G, BERKVENNS DL (2005) Risk factors for bovine herpesvirus-1 seropositivity. *Prev Vet Med*, 69, 285–295.
- BOERNER B, WEIGELT W, BUHK HJ, CASTRUCCI G, LUDWIG H (1999) A sensitive and specific PCR/Southern blot assay for detection of bovine herpesvirus 4 in calves infected experimentally. *J Virol Methods*, 83, 169-180.
- BOLAT Y, DOYMAZ M (2005) Veteriner Viroloji Ders Notları, Vol. 1. Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Elazığ.
- BOLIN SR (1995) The pathogenesis of mucosal disease. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 11, 489-500.

- BOLIN SR, MATTHEWS PJ, RIDPATH JF (1991) Methods for detection and frequency of contamination of fetal calf serum with bovine viral diarrhoea virus and antibodies against bovine viral diarrhoea virus. *J Vet Diagn Invest*, 3, 199-203.
- BOLIN SR, RIDPATH JF (1992) Differences in virulence between two noncytopathic bovine viral diarrhoea viruses in calves. *Am J Vet Res*, 53, 2157-2163.
- BOLIN SR, RIDPATH JF, BLACK J, MACY M, ROBLIN R (1994) Survey of cell lines in the American type culture collection for bovine viral diarrhoea virus. *J Virol Methods*, 48, 211-221.
- BOOTH PJ, STEVENS DA, COLLINS ME, BROWNLIE J (1995) Detection of bovine viral diarrhoea virus antigen and RNA in oviduct and granulosa cells of persistently infected cattle. *J Reprod Fertil*, 105, 17-24.
- BOSCHIROLI ML, FOULONGNE V, O'CALLAGHAN D (2001) Brucellosis: a worldwide zoonosis. *Curr Opin Microbiol*, 4, 58-64.
- BOUNAADJA L, ALBERT D, CHENAIS B, HENAULT S, ZYGMUNT MS, POLIAK S, GARIN-BASTUJI B (2009) Real-time PCR for identification of *Brucella* spp.: a comparative study of IS711, bcs31 and per target genes. *Vet Microbiol*, 137, 156-164.
- BOUSSAU B, KARLBERG EO, FRANK AC, LEGAULT BA, ANDERSSON SGE (2004) Computational inference of scenarios for a-proteobacterial genome evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 9722-9727.
- BOWDEN RA, CLOECKAERT A, ZYGMUNT MS, BERNARD S, DUBRAY G (1995) Surface exposure of outer membrane protein and lipopolysaccharide epitopes in *Brucella* species studied by enzyme-linked immunosorbent assay and flow cytometry. *Infect Immun*, 63, 3945-3952.
- BRACKENBURY LS, CARR BV, CHARLESTON B (2003) Aspects of the innate and adaptive immune responses to acute infections with BVDV. *Vet Microbiol*, 96, 337-344.
- BRAKE F, STUDDERT MJ (1985) Molecular epidemiology and pathogenesis of ruminant herpesviruses including bovine, buffalo and caprine herpesviruses 1 and bovine encephalitis herpesvirus. *Aust Vet J* 62, 331-334.
- BREWSTER JN, HAASE CJ, SHARP P, SCHULTZ RD (2007) Leukocyte profile of cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. *Vet Immunol Immunopathol*, 115, 369-374.
- BRICKER BJ (2002) PCR as a diagnostic tool for brucellosis. *Vet Microbiol*, 90, 435-446.
- BRICKER BJ, HALLING SM (1994) Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. *J Clin Microbiol*, 32, 2660-2666.



- BROADDUS CC, LAMM CG, KAPIL S, DAWSON L, HOLYOAK GR (2009) Bovine viral diarrhoea virus abortion in goats housed with persistently infected cattle. *Vet Pathol*, 46, 45-53.
- BROLL H, BUHK HJ, ZIMMERMANN W, GOLTZ M (1999) Structure and function of the prDNA and the genomic termini of the gamma2-herpesvirus bovine herpesvirus type 4. *J Gen Virol*, 80, 979-986.
- BROWER A, HOMB KM, BOCHSLER P, PORTER R, WOODS K, UBL S, KRUEGER D, CIGEL F, TOOHEY-KURTH K (2008) Encephalitis in aborted bovine fetuses associated with Bovine herpesvirus 1 infection. *J Vet Diagn Invest*, 20, 297-303.
- BROWN TT, SCHULTZ AD, DUNCAN JR, BISTNER SI (1979) Serological response of the bovine fetus to BVD virus. *Infect. Immun*, 25, 93-97.
- BROWNLIE J (1990) The pathogenesis of bovine virus diarrhoea virus infections. *Rev Sci Tech Off Int Epiz*, 9, 43-59
- BROWNLIE J (1991) The pathways for bovine virus biotypes in the pathogenesis of disease. *Arch Virol*, 3, 9-96.
- BROWNLIE J, CLARKE MC, HOWARD CJ (1989) Experimental infection of cattle in early pregnancy with a cytopathic strain of bovine virus diarrhoea virus. *Res Vet Sci*, 46, 307-311.
- BROWNLIE J, HOOPER LB, THOMPSON I, COLLINS ME (1998) Maternal recognition of foetal infection with bovine virus diarrhoea virus (BVDV)-The bovine pestivirus. *Clin Diagn Virol*, 10, 141-150.
- BRUCE D (1887) Note on the discovery of a microorganism in Malta fever. *Practitioner*, 39, 161-170.
- BRUN-HANSEN HC, KAMPEN AH, LUND A (2006) Hematologic values in calves during the first 6 months of life. *Vet Clin Pathol*, 35, 182-187
- BRUSCHKE CJ, HAGHPARAST A, HOEK A, RUTTEN VP, WENTINK GH, VAN RIJN PA, VAN OIRSCHOT JT (1998) The immune response of cattle, persistently infected with noncytopathic BVDV, after superinfection with antigenically semi-homologous cytopathic BVDV. *Vet Immunol Immunopathol*, 62, 37-50.
- BUBLLOT M, VAN BRESSEM MF, THIRY E, DUBUISSON J, PASTORET PP (1990) Bovine herpesvirus 4 genome: cloning, mapping and strain variation analysis. *J Gen Virol*, 71, 133-142.
- BUBLLOT M, DUBUISSON J, VAN BRESSEM MF, DANYI S, PASTORET PP, THIRY E (1991) Antigenic and genomic identity between simian herpesvirus aotus type 2 and bovine herpesvirus type 4. *J Gen Virol*, 72, 715-719.

- BUDDLE MB, BOYES BW (1953) A Brucella mutant causing genital disease of sheep in New Zealand. *Aust Vet J*, 29, 145-153.
- BULUT H, RIŞVANLI A, TONBAK Ş, GÜLAÇTI İ, AZKUR AK, BOLAT Y (2003) Döl tutmayan ineklerde bovine herpesvirus 1 infeksiyonlarının Sıklığı. *FÜ Sağlık Bil Derg*, 17, 23-26.
- BULUT O, YAVRU S (2004) Boğalarda Bovine Herpesvirus-1 (BHV-1) enfeksiyonunun Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), Polymerase Chain Reaction (PCR) ve virus izolasyonu (VI) metotları ile karşılaştırmalı teşhisi ve seroepidemiolojisi. *Eurasian J Vet Sci*, 20, 61-70.
- BURGU İ, AKÇA Y (1987) First isolation of IBR virus in Turkey. *Trop Amm Hlth Prod*, 19, 56.
- BURGU İ, ALKAN F, YEŞİLBAĞ K (1999) Türkiye'de sığırlarda persiste BVD virus enfeksiyonu. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 46, 169-177.
- BURGU İ, ALKAN F, ÖZKUL A, YEŞİLBAĞ K, KARAOĞLU T, GÜNGÖR B (2003) Türkiye'de süt sığırcılığı işletmelerinde bovine viral diarrhoea virus (BVDV) enfeksiyonunun epidemiyolojisi ve kontrolü. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 50, 127-133.
- BURR S, THOMAS C, BROWNLIE J, OFFORD V, COFFEY TJ, WERLING D (2012) Potential evidence for biotype-specific chemokine profile following BVDV infection of bovine macrophages. *Vet Immunol Immunopathol*, 150, 123-127.
- BUTT AA, KANWAL F (2012) Boceprevir and telaprevir in the management of hepatitis C virus-infected patients. *Clin Infect Dis*, 54, 96-104.
- CARMICHAEL LE, BRUNER DW (1968) Characteristics of a newly-recognized species of Brucella responsible for infectious canine abortions. *Cornell Vet*, 48, 579-592.
- CARON E, GROSS A, LIAUTARD JP, DORNAND J (1996) Brucella species release a specific, protease-sensitive, inhibitor of TNF-alpha expression, active on human macrophage-like cells, *J Immunol*, 156, 2885-2893.
- CARRILLO BJ, POSPISCHIL A, DAHME E (1983a) Pathology of bovine viral necrotizing encephalitis in Argentina. *Zentralbl Veterinarmed B*, 30, 161-168.
- CARRILLO BJ, AMBROGI A, SCHUDEL AA, VAZQUEZ M, DAHME E, POSPISCHIL A (1983b) Meningoencephalitis caused by IBR virus in calves in Argentina. *Zentralbl Veterinarmed B*, 30, 327-332.
- CARVALHO NETA AV, MOL JP, XAVIER MN, PAIXÃO TA, LAGE AP, SANTOS RL (2010) Pathogenesis of bovine brucellosis. *Vet J*, 184, 146-155.

- CASCIO KE, BELKNAP EB, SCHULTHEISS PC, AMES AD, COLLINS JK (1999) Encephalitis induced by bovine herpesvirus 5 and protection by prior vaccination or infection with bovine herpesvirus 1. *J Vet Diagn Invest*, 11, 134-149.
- CASTRUCCI G, MARTIN WB, FRIGERI F, FERRARI M, SALVATORI D, TAGLIATI S, CUTERI V (1997) A serological survey of bovine herpesvirus-1 infection in selected dairy herds in Northern and central Italy. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 20, 315-317.
- CASTRUCCI G, FRIGERI F, SALVATORI D, FERRARI M, SARDONINI Q, CASSAI E, LO DICO M, ROTOLA A, ANGELINI R (2002) Vaccination of calves against bovine herpesvirus-1 assessment of the protective value of eight vaccines. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 25, 29-41.
- CATALANI E, NARDONE A, BARONE A, SCICLUNA MT, AUTORINO GL, CAPRIOLI A, LACETERA N (2011) Preliminary association analysis of TLR9 gene polymorphisms and immune parameters in an Italian Holstein calves population. *BMC Proc*, 5, 20.
- CELLI J (2006) Surviving inside a macrophage: the many ways of Brucella. *Res Microbiol*, 157, 93-98.
- CENGİZ AT, DOLAPÇI Gİ (1997) Brucella'ların özellikleri ve Brusellozda tanı yöntemleri. *Ankara Üniv. Tıp Fak. Mecmuası*, 50, 41-46.
- CHANG LY, VAN SANTEN VL (1992) Immediate-early, early, and late RNAs in bovine herpesvirus-4-infected cells. *Virology*, 191, 909-920.
- CHASTANT-MAILLARD S (2013) Impact of bovine herpesvirus 4 (BoHV-4) on reproduction. *Transbound Emerg Dis*, (in press).
- CHEN Z, RIJNBRAND R, JANGRA RK, DEVARAJ SG, QU L, MA Y, LEMON SM, LI K (2007) Ubiquitination and proteasomal degradation of interferon regulatory factor-3 induced by Npro from a cytopathic bovine viral diarrhea virus. *Virology*, 366, 277-292.
- CHEW T, TAYLOR KE, MOSSMAN KL (2009) Innate and adaptive immune responses to herpes simplex virus. *Viruses*, 1, 979-1002.
- CHEZAL JM, PAESHUYSE J, GAUMET V, CANITROT D, MAISONIAL A, LARTIGUE C, GUEIFFIER A, MOREAU E, TEULADE JC, CHAVIGNON O, NEYTS J (2010) Synthesis and antiviral activity of an imidazo[1,2-a]pyrrolo[2,3-c]pyridine series against the bovine viral diarrhea virus. *Eur J Med Chem*, 45, 2044-2047.
- CHILDS T (1946) X disease in cattle-Saskatchewan. *Can J Comp Med*, 10, 316-319.
- CHOTHE SK, SAXENA HM (2013) Innovative modifications to Rose Bengal plate test enhance its specificity, sensitivity and predictive value in the diagnosis of brucellosis. *J Microbiol Methods*, 15, 25-28.

- CHOWDHURY SI (1995) Molecular basis of antigenic variation between the glycoprotein C of respiratory bovine herpesvirus 1 (BHV-1) and neurovirulent BHV-5. *Virology*, 213, 558-568.
- CHOWDHURY SI, LEE BJ, MOSIER D, SUR JH, OSORIO FA (1997) Neuropathology of bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) meningo-encephalitis in a rabbit seizure model. *J Comp Pathol*, 117, 295-310.
- CHOWDHURY SI, LEE BJ, WEISS ML (2000) Bovine herpesvirus type 5 glycoprotein E is important for neuroinvasiveness and neurovirulence in the olfactory pathway of the rabbit. *J Virol*, 2094-2106.
- CHOWDHURY SI, ONDERCI M, BHATTACHARJEE PS, AL-MUBARAK A, WEISS ML, ZHOU Y (2002) Bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) Us9 is essential for BHV-5 neuropathogenesis. *J Virol*, 3839-3851.
- CIARAMELLA P, CORONA M, AMBROSIO R, CONSALVO F, PERSECHINO A (2005) Haematological profile on non-lactating Mediterranean buffaloes (*Bubalus bubalis*) ranging in age from 24 months to 14 years. *Res Vet Sci*, 79, 77-80.
- CLAUS MP, ALFIERI AF, FOLGUERAS-FLATSCHART AV, WOSIACKI SR, MEDICI KC, ALFIERI AA (2005) Rapid detection and differentiation of bovine herpesvirus 1 and 5 glycoprotein C gene in clinical specimens by multiplex-PCR. *J Virol Methods*, 128, 183-188.
- CLOECKAERT A, VERGER JM, GRAYON M, VIZCAÍNO N (1996) Molecular and immunological characterization of the major outer membrane proteins of *Brucella*. *FEMS Microbiol Lett*, 145, 1-8.
- CLOECKAERT A, WEYNANTS V, GODFROID J, VERGER JM, GRAYON M, ZYGMUNT MS (1998) O-Polysaccharide epitopic heterogeneity at the surface of *Brucella* spp. studied by enzyme-linked immunosorbent assay and flow cytometry. *Clin Diagn Lab Immunol*, 5, 862-870.
- CLOECKAERT A, VIZCAÍNO N, PAQUET JY, BOWDEN RA, ELZER PH (2002) Major outer membrane proteins of *Brucella* spp.: past, present and future. *Vet Microbiol*, 90, 229-247.
- COLLEN T, MORRISON WI (2000) CD4<sup>+</sup> T-cell responses to bovine viral diarrhoea virus in cattle. *Virus Res*, 67, 67-80.
- COLLETT MS, LARSON R, GOLD C, STRICK D, ANDERSON DK, PURCHIO AF (1988) Molecular cloning and nucleotide sequence of the pestivirus bovine viral diarrhoea virus. *Virology*, 165, 191-199.
- COLLINS JK, AYERS YK, WHETSTONE CA, VAN DRUNNEN LITTEL-VAN DEN HURK S (1993) Antigenic differences between the major glycoproteins of bovine herpesvirus type 1.3. *J Gen Virol*, 74, 1509-1517.

- COLLINS JK, AYERS VK, CARMAN J (1988) Evaluation of an antigen-capture ELISA for the detection of bovine herpesvirus type 1 shedding from feedlot cattle. *Vet Microbiol*, 16, 101-107.
- CORAPI WV, FRENCH TW, DUBOVI EJ (1989) Severe thrombocytopenia in young calves experimentally infected with noncytopathic bovine viral diarrhoea virus. *J Virol*, 63, 3934-3943.
- CORAPI WV, ELLIOTT RD, FRENCH TW, ARTHUR DG, BEZEK DM, DUBOVI EJ (1990) Thrombocytopenia and hemorrhages in veal calves infected with bovine viral diarrhoea virus. *J Am Vet Med Assoc*, 196, 590-596.
- CORBEL MJ (1997) Brucellosis: an overview. *Emerg Infect Dis*, 3, 213-221.
- CORBEL MJ, HENDRY DM (1985) Urease activity of Brucella species. *Res Vet Sci*, 38, 252-253.
- COSTA EA, VASCONCELOS AC, BOMFIM MRQ, AMORIM HB, LIMA GBL, COELHO FM, RESENDE M (2011) Neurological disorder in cattle associated with bovine herpesvirus 4. *Arq Bras Med Vet Zootec*, 63, 828-835.
- COWLEY DJ, CLEGG TA, DOHERTY ML, MORE SJ (2011) Aspects of bovine herpesvirus-1 infection in dairy and beef herds in the Republic of Ireland. *Acta Vet Scand*, 53, 40.
- CRAIG MI, VENZANO A, KÖNIG G, MORRIS WE, JIMÉNEZ L, JULIÁ S, CAPELLINO F, BLANCO VIERA J, WEBER EL (2008) Detection of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) nucleic acid and antigen in different organs of water buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Res Vet Sci*, 85, 194-196.
- CROOK T, BENAVIDES J, RUSSELL G, GILRAY J, MALEY M, WILLOUGHBY K (2012) Bovine herpesvirus 1 abortion: current prevalence in the United Kingdom and evidence of haematogenous spread within the fetus in natural cases. *J Vet Diagn Invest*, 24, 662-670.
- CURTI E, JAEGER J (2013) Residues Arg283, Arg285, and Ile287 in the nucleotide binding pocket of bovine viral diarrhoea virus NS5B RNA polymerase affect catalysis and fidelity. *J Virol*, 87, 199-207.
- CUSACK PM, MCMENĪMAN NP, LEAN IJ (2005) The physiological and production effects of increased dietary intake of vitamins E and C in feedlot cattle challenged with bovine herpesvirus 1. *J Anim Sci*, 83, 2423-2433.
- CZAPLICKI G; THIRY E (1998) An association exists between bovine herpesvirus-4 seropositivity and abortion in cows. *Prev Vet Med*, 33, 235-240.
- ÇABALAR M, AKÇA Y (1994) Fertilité problemlí ineklerde enfeksiyöz bovine rhinotracheitis enfeksiyöz pustuler vulvovaginitis (IBR-IPV) virus izolasyonu ve seroepidemiolojisi. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 41, 337-349.

- ÇELEBİ S, HACIMUSTAFAOĞLU M (2004) Brusellozis. *Güncel Pediatri*, 2, 39-43.
- ÇELİK O (1937) A case of abortus (in Turkish) *Türk Tıp Cem Mecmuası*, 3, 14-16.
- ÇETİN ET, CORAL B, BİLGİ A, BİLGEHAN H, SİPAHİOĞLU O, GÜREL M (1990) Incidence of human brucellosis in Turkey (in Turkish). *Doga Tr J Medical Sciences*, 14, 324–334.
- ÇETİNKAYA F, NACAR M, AYDIN T, KOC N, GOKAHMETOĞLU S (2006) Prevalence of brucellosis in the rural area of Kayseri, central Anatolia, Turkey. *Int J Infect Dis*, 10, 179-181.
- ÇETİNKAYA Z, AKTEPE OC, ÇİFTÇİ İH, DEMİREL R (2005) Seroprevalence of human brucellosis in a rural area of Western Anatolia, Turkey. *J Health Popul Nutr*, 23, 137–141.
- D'OFFAY JM, ELY RW, BALDWIN CA, WHITENACK DL, STAIR EL, COLLINS JK (1995) Diagnosis of encephalitic bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) infection in cattle: virus isolation and immunohistochemical detection of antigen in formalin-fixed bovine brain tissues. *J Vet Diagn Invest*, 7, 247-251.
- D'ARCE RC, ALMEIDA RS, SILVA TC, FRANCO AC, SPILKI F, ROEHE PM, ARNS CW (2002) Restriction endonuclease and monoclonal antibody analysis of Brazilian isolates of bovine herpesviruses types 1 and 5. *Vet Microbiol*, 88, 315-324.
- DA SILVA LF, SINANI D, JONES C (2012) ICP27 protein encoded by bovine herpesvirus type 1 (bICP27) interferes with promoter activity of the bovine genes encoding beta interferon 1 (IFN- $\beta$ 1) and IFN- $\beta$ 3. *Virus Res*, 169, 162-168.
- DÄNICKE S, KOWALCZYK J, RENNER L, PAPPRITZ J, MEYER U, KRAMER R, WEBER EM, DÖLL S, REHAGE J, JAHREIS G (2012) Effects of conjugated linoleic acids fed to dairy cows during early gestation on hematological, immunological, and metabolic characteristics of cows and their calves. *J Dairy Sci*. 95, 938-53.
- DAS NEVES CG, ROGER M, YOCCOZ NG, RIMSTAD E, TRYLAND M (2009) Evaluation of three commercial bovine ELISA kits for detection of antibodies against Alphaherpesviruses in reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*). *Acta Vet Scand*, 51, 9.
- DE ALMEIDA LA, MACEDO GC, MARINHO FA, GOMES MT, CORSETTI PP, SILVA AM, CASSATARO J, GIAMBARTOLOMEI GH, OLIVEIRA SC (2013) Toll-like receptor 6 plays an important role in host innate resistance to *Brucella abortus* infection in mice. *Infect Immun*, 81, 1654-1662.
- DE GEE AL, WAGTER LH, HAGE JJ (1996) The use of a polymerase chain reaction assay for the detection of bovine herpesvirus 1 in semen during a natural outbreak of infectious bovine rhinotracheitis. *Vet Microbiol*, 53, 163-168.
- DE JONG MF, TSOLIS RM (2012) Brucellosis and type IV secretion. *Future Microbiol*, 7, 47-58.

- DECARO N, MARI V, LUCENTE MS, SCIARRETTA R, MORENO A, ARMENISE C, LOSURDO M, CAMERO M, LORUSSO E, CORDIOLI P, BUONAVOGLIA C (2012) Experimental infection of cattle, sheep and pigs with 'Hobi'-like pestivirus. *Vet Microbiol*, 155, 165-171.
- DEIMA Z, SZEREDIA L, TOMPO' BV, EGYED L (2006) Detection of bovine herpesvirus 4 in aborted bovine placentas. *Microb Pathog*, 41, 144-148.
- DEIMA Z, SZEREDI L, EGYED L (2007) Detection of Bovine herpesvirus 4 DNA in aborted bovine fetuses. *Can J Vet Res*, 71, 226-229.
- DEL MÉDICO ZAJAC MP, PUNTEL M, ZAMORANO P, SADIR AM, ROMERA SA (2006) BHV-1 vaccine induces cross-protection against BHV-5 disease in cattle. *Res Vet Sci*, 81, 327-334.
- DEL MEDICO ZAJAC MP, LADELFA MF, KOTSIAS F, MUYLKENS B, THIRY J, THIRY E, ROMERA SA (2010) Biology of bovine herpesvirus 5. *Vet J*, 184, 138-145.
- DELANG L, COELMONT L, NEYTS J (2010) Antiviral therapy for hepatitis C virus: beyond the standard of care. *Viruses*, 2, 826-866.
- DELHON G, MORAES MP, LU Z, AFONSO CL, FLORES EF, WEIBLEN R, KUTISH GF, ROCK DL (2003) Genome of bovine herpesvirus 5. *J Virol*, 77, 10339-10347.
- DEL VECCHIO VG, KAPATRAL V, ELZER P, PATRA G, MUJER CV (2002) The genome of *Brucella melitensis*. *Vet Microbiol*, 90, 587-592.
- DENG R, BROCK KV (1993) 5' and 3' untranslated regions of pestivirus genome: primary and secondary structure analyses. *Nucleic Acids Res*, 21, 1949-1957.
- DENIS M, KAASHOEK MJ, VAN OIRSCHOT JT, PASTORET PP, THIRY E (1994) Quantitative assessment of the specific CD4+ T lymphocyte proliferative response in bovine herpesvirus 1 immune cattle. *Vet Immunol Immunopathol*, 42, 275-286.
- DEPNER K, BAUER T, LIESS B (1992) Thermal and pH stability of pestiviruses. *Rev Sci Tech*, 11, 885-893.
- DEPREZ P, BAUWENS C, VAN SCHANDEVIJL K, LEFÈRE L, NOLLET H, DE CLERCQ D, VAN LOON G (2009) Evaluation of the pocH-100iV DIFF hematology analyzer for use in horses and cattle. *Vlaams Diergen Tijds*, 78.
- DEREGT D, PRINS S (1998) A monoclonal antibody-based immunoperoxidase monolayer (micro-isolation) assay for detection of type 1 and type 2 bovine viral diarrhea viruses. *Can J Vet Res*, 62, 152-155.

- DEREGT D, DUBOVI EJ, JOLLEY ME, NGUYEN P, BURTON KM, GILBERT SA (2005) Mapping of two antigenic domains on the NS3 protein of the pestivirus bovine viral diarrhoea virus. *Vet Microbiol*, 108, 13-22.
- DIALLO IS, HEWITSON GR, HOAD J, TURNER S, CORNEY BG, RODWELL BJ (2010) Isolation of bovine herpesvirus type 5 from the semen of a healthy bull in Australia. *Aust Vet J*, 88, 93-95.
- DIALLO IS, CORNEY BG, RODWELL BJ (2011) Detection and differentiation of bovine herpesvirus 1 and 5 using a multiplex real-time polymerase chain reaction. *J Virol Methods*, 175, 46-52.
- DIEL DG, ALMEIDA SR, BRUM MC, DEZENGRINI R, WEIBLEN R, FLORES EF (2007) Acute and latent infection by bovine herpesvirus type 5 in experimentally infected goats. *Vet Microbiol*, 121, 257-267.
- DING J, PAN Y, JIANG H, CHENG J, LIU T, QIN N, YANG Y, CUI B, CHEN C, LIU C, MAO K, ZHU B (2011) Whole genome sequences of four Brucella strains. *J Bacteriol*, 193, 3674-3675.
- DONE JT, TERLECKI S, RICHARDSON C, HARKNESS JW, SANDS JJ, PATTERSON DSP, SWEASEY D, SHAW IG, WINKLER CE, DUFFELL SJ (1980) Bovine virus diarrhoea-mucosal disease: pathogenicity for the fetal calf following maternal infection. *Vet Rec*, 106, 473-479.
- DONOFRIO G, FLAMMINI CF, SCATOZZA F, CAVIRANI S (2000a) Detection of bovine herpesvirus 4 (BoHV-4) DNA in the cell fraction of milk of dairy cattle with history of BoHV-4 infection. *J Clin Microbiol*, 38, 4668-4671.
- DONOFRIO G, CAVIRANI S, VAN SANTEN VL (2000b) Establishment of a cell line persistently infected with bovine herpesvirus-4 by use of a recombinant virus. *J Gen Virol*, 81, 1807-1814.
- DONOFRIO G, VAN SANTEN VL (2001) A bovine macrophage cell line supports bovine herpesvirus-4 persistent infection. *J Gen Virol*, 82, 1181-1185.
- DONOFRIO G, CAVIRANI S, TADDEI S, FLAMMINI CF (2004) Activation of bovine herpesvirus 4 lytic replication in a non-permissive cell line by overexpression of BoHV-4 immediate early (IE) 2 gene. *J Virol Methods*, 116, 203-207.
- DONOFRIO G, CAVIRANI S, VAN SANTEN V, FLAMMINI CF (2005) Potential secondary pathogenic role for bovine herpesvirus 4. *J Clin Microbiol*, 43, 3421-3426.
- DONOFRIO G, SARTORI C, RAVANETTI L, CAVIRANI S, GILLET L, VANDERPLASSCHEN A, TADDEI S, FLAMMINI CF (2007) Establishment of a Bovine Herpesvirus 4 based vector expressing a secreted form of the Bovine Viral Diarrhoea Virus structural glycoprotein E2 for immunization purposes. *BMC Biotechnol*, 7, 1-12.



- DONOFRIO G, FRANCESCHI V, CAPOCEFALO A, CAVIRANI S, SHELDON IM (2009) Isolation and characterization of bovine herpesvirus 4 (BoHV-4) from a cow affected by post partum metritis and cloning of the genome as a bacterial artificial chromosome. *Reprod Biol Endocrinol*, 7, 83.
- DONOFRIO G, CAPOCEFALO A, FRANCESCHI V, PRICE S, CAVIRANI S, SHELDON IM (2010) The chemokine IL8 is up-regulated in bovine endometrial stromal cells by the BoHV-4 IE2 gene product, ORF50/Rta: a step ahead toward a mechanism for BoHV-4 induced endometritis. *Biol Reprod*, 83, 919-928.
- DONOFRIO G, TADDEI S, FRANCESCHI V, CAPOCEFALO A, CAVIRANI S, MARTINELLI N, OTTONELLO S, FERRARI M (2011) Swine adipose stromal cells loaded with recombinant bovine herpesvirus 4 virions expressing a foreign antigen induce potent humoral immune responses in pigs. *Vaccine*, 29, 867-872.
- DUBOVI EJ (2013) Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhea virus. *Biologicals*, 41, 8-13.
- DUBUISSON J, BOULANGER D, BUBLLOT M, THIRY E, PASTORET PP (1989a) Proteins specified by bovine herpesvirus type 4: structural proteins of the virion and identification of two major glycoproteins by using monoclonal antibodies. *J Gen Virol*, 70, 1743-1753.
- DUBUISSON J, THIRY E, BUBLLOT M, SNEYERS M, BOULANGER D, GUILLAUME J, PASTORET PP (1989b) Production and characterization of monoclonal antibodies to bovid herpesvirus-4. *Vet Microbiol*, 19, 305-315.
- DUBUISSON J, KOROMYSLOV I, PASTORET PP, THIRY E (1992a) Proteins of bovine herpesvirus type 4 released into the culture medium of productively infected cells: identification of a 135K glycoprotein involved in viral attachment. *J Gen Virol*, 73, 189-194.
- DUBUISSON J, PASTORET PP, THIRY E (1992b) Identification and characterization of glycoprotein gp1 of bovine herpesvirus type 4. *J Gen Virol*, 73, 1293-1296.
- DUMAN R, YAVRU S; KALE M (2009) Seroprevalence of viral upper respiratory infections in dairy cattle. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 15, 539-542.
- DURMAZ R, DURMAZ B, REFIK MAS M, SONMEZ E (1997) Seropositivity of brucellosis in Malatya, Turkey (in Turkish). *Turk J Med Sci*, 27, 125-128.
- DURWARD M, RADHAKRISHNAN G, HARMS J, BAREISS C, MAGNANI D, SPLITTER GA (2012) Active evasion of CTL mediated killing and low quality responding CD8+ T cells contribute to persistence of brucellosis. *Infect Immun*. 80, 4271-4280.
- EDENS MS, GALIK PK, RIDDELL KP, GIVENS MD, STRINGFELLOW DA, LOSKUTOFF NM (2003) Bovine herpesvirus-1 associated with single, trypsin-treated embryos was not infective for uterine tubal cells. *Theriogenology*, 60, 1495-1504.

- EDWARDS S (1990) The diagnosis of bovine virus diarrhoea ± mucosal disease in cattle. *Rev Sci Tech Off Int Epiz*, 9, 115-130.
- EDWARDS S, CHASEY D, WHITE H (1983) Experimental Infectious bovine rhinotracheitis: comparison of four antigen detection methods. *Res Vet Sci*, 34, 42-45.
- EDWARDS S; NEWMAN RH (1985) Detection of antibodies to bovid herpesvirus 4 by ELISA. *Vet Microbiol*, 10, 149-154.
- EDWARDS S, GITAO GC (1987) Highly sensitive antigen detection procedures for the diagnosis of infectious bovine rhinotracheitis: amplified ELISA and reverse passive haemagglutination. *Vet Microbiol*, 13, 135-141.
- EGYED L (1998) Replication of bovine herpesvirus type 4 in human cells *in vitro*. *J Clin Microbiol*, 36, 2109-2111.
- EGYED L (2000) Bovine herpesvirus type 4: a special herpesvirus. *Acta Vet Hung*, 48, 501-513.
- EGYED J, BALLAGI-PORDANY A, BARTHA A, BELAK S (1996) Studies of *in vivo* distribution of bovine herpesvirus type 4 in the natural host. *J Clin Microbiol*, 34, 1091-1095.
- EGYED L, KLUGE JP, BARTHA A (1997) Histological studies of bovine herpesvirus type 4 infection in non-ruminant species. *Vet Microbiol*, 57, 283-289.
- EGYED L, BARTHA A (1998) PCR studies on the potential sites for latency of BHV-4 in calves. *Vet Res Commun*, 22, 209-216.
- EGYED L, BERENCSI G, BARTHA A (1999) Periodic reappearance of bovine herpesvirus type 4 DNA in the sera of naturally and experimentally infected rabbits and calves. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 22, 199-206.
- EGYED J, SASSI G, TIBOLD J, MADL I, SZENCI O (2011) Symptomless intrauterine transmission of bovine herpesvirus 4 to bovine fetuses. *Microb Pathog*, 50, 322-325.
- EHLERS B, BUHK HJ, LUDWIG H (1985) Analysis of bovine cytomegalovirus genome structure: cloning and mapping of the monomeric polyreplicative DNA unit, and comparison of European and American strains. *J Gen Virol*, 66, 55-56.
- EL OMARI K, IOURIN O, HARLOS K, GRIMES JM, STUART DI (2013) Structure of a pestivirus envelope glycoprotein E2 clarifies its role in cell entry. *Cell Rep*, 3, 30-35.
- ELAZHARY MA, LAMOTHE P, SILIM A, ROY RS (1980) Bovine herpesvirus type 1 in the sperm of a bull from a herd with fertility problems. *Can Vet J*, 21, 336-339.

- ELBERG SS, FAUNCE KJ JR (1957) Immunization against Brucella infection. VI. Immunity conferred on goats by a nondependent mutant from a streptomycin-dependent mutant strain of Brucella melitensis. *J Bacteriol*; 73, 211–217.
- ELFAKI MG, AL-HOKAIL AA (2009) Transforming growth factor beta production correlates with depressed lymphocytes function in humans with chronic brucellosis. *Microbes Infect*, 11, 1089-1096.
- ENGELHARDT T, GUNTHER MK (1996) Identification and characterization of the bovine herpesvirus type 5 Us4 gene and gene products. *Virology*, 225, 126–135.
- ENGELS M, ACKERMANN M (1996) Pathogenesis of ruminant herpesvirus infections. *Vet Microbiol*, 53, 3–15.
- ENGUEHARD-GUEIFFIER C, MUSIU S, HENRY N, VÉRON JB, MAVEL S, NEYTS J, LEYSSEN P, PAESHUYSE J, GUEIFFIER A (2013) 3-Biphenylimidazo[1,2-a]pyridines or [1,2-b]pyridazines and analogues, novel Flaviviridae inhibitors. *Eur J Med Chem*, 64, 448-463.
- ENTRICAN G, DAND A, NETTLETON PF (1995) A double monoclonal antibody ELISA for detecting pestivirus antigen in the blood of viraemic cattle and sheep. *Vet Microbiol*, 43, 65-74.
- ERHAN M, ONAR B, CSONTOS L, HOPKINS IG (1971) Serological survey on some virus and bedsonia disease of cattle, sheep and horse. *Pendik Vet Kont Araş Enst Derg*, 4, 55-58.
- ESCHBAUMER M, LAW S, SOLIS C, CHERNICK A, VAN DER MEER F, CZUB M (2014) Rapid detection of neutralizing antibodies against bovine viral diarrhoea virus using quantitative high-content screening. *J Virol Methods*, 198, 56-63.
- EU (2001) Thematic network on control of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) Position paper  
Erişim:[<http://www.afbini.gov.uk/chs-thematic-network-position-paper-on-bvd-control.pdf>]  
Erişim Tarihi:11.05.2014
- EU COMMISSION (2011) Bovine Brucellosis.  
Erişim:[[http://ec.europa.eu/food/animal/liveanimals/bovine/docs/final\\_report\\_2011\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/animal/liveanimals/bovine/docs/final_report_2011_en.pdf)]  
Erişim Tarihi: 12.05.2014
- EU COMMISSION (2012) Schmallenberg Virus.  
Erişim: [[http:// ec.europa.eu/food/animal/diseases/schmallenberg\\_virus/index\\_en.htm](http://ec.europa.eu/food/animal/diseases/schmallenberg_virus/index_en.htm)] Erişim Tarihi:21.05.2014
- EUGSTER AK (1979) Isolation of bovine herpesvirus III from diarrheic feces. *Vet Microbiol*, 3, 199-204.
- EUGSTER AK, ANGULO AA, JONES LP (1974) Herpesvirus encephalitis in range calves. *Proc Annu Meet Am Assoc Vet Lab Diagn*, 17, 267–281.

- EVANS AC (1918) Further studies on *Bacterium abortus* and related bacteria. 11. A comparison of *Bacterium abortus* and *Bacterium bronchisepticus* and with the organism which causes Malta fever. *J Infect Dis*, 22580-593.
- FÁBIÁN K, IVANICS R, TERÉNYI M, EGYED L (2005) Detection of bovine herpesvirus 4 in CD11b+ leukocytes of experimentally infected rabbits. *Acta Vet Hung*, 53, 265-273.
- FAO MAP (2013)  
Erişim:[[http://www.fao.org/ag/againfo/programmes/en/empres/gemp/avis/B103-brucellosis/tools/0\\_geo\\_world-distribution.html](http://www.fao.org/ag/againfo/programmes/en/empres/gemp/avis/B103-brucellosis/tools/0_geo_world-distribution.html)], Erişim Tarihi:11.05.2014
- FAUQUET CM, MAYO MA, MANILOFF J, DESSELBERG U, BALL LA (2005) *Virus Taxonomy. Eight Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* Elsevier Academic Press.
- FAVIER PA, MARIN MS, PÉREZ SE (2012) Role of bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) in diseases of cattle. Recent findings on BoHV-5 association with genital disease. *Open Vet J*, 2, 46-53.
- FEKETE A, BANTLE JA, HALLING SM, SANBORN MR (1990) Preliminary development of a diagnostic test for *Brucella* using polymerase chain reaction. *J Appl Bacteriol*, 69, 216-27.
- FELDMAN BF, ZINKL JG, JAIN NC (2000) *Schalm's Veterinary Hematology, Vol. 5* Lippincott Williams and Wilkins, A Wolters Company, Philadelphia, Baltimore, New York, P.1076.
- FERNANDES DM, BENSON R, BALDWIN CL (1995) Lack of a role of natural killer cells in early control of *Brucella abortus* 2308 infections in mice. *Infect Immun*, 63, 4029-4033.
- FERNANDEZ A, HEWICKER M, TRAUTWEIN G, POHLENZ J, LIESS B (1989) Viral antigen distribution in the central nervous system of cattle persistently infected with bovine viral diarrhea virus. *Vet Pathol*, 26, 26-32.
- FERNANDEZ-PRADA CM, ZELAZOWSKA EB, NIKOLICH M, HADFIELD TL, ROOP 2ND RM, ROBERTSON GL, HOOVER DL (2003) Interactions between *Brucella melitensis* and human phagocytes: bacterial surface O Polysaccharide inhibits phagocytosis, bacterial killing, and subsequent host cell apoptosis. *Infect Immun*, 71, 2110-2119.
- FERNANDEZ-PRADA CM, ZELAZOWSKA EB, BHATTACHARJEE AK, NIKOLICH MP, HOOVER DL (2006) Identification of smooth and rough forms in cultures of *Brucella melitensis* strains by flow cytometry. *J Immunol Methods*, 315, 162-170.
- FERRERO MC, HIELPOS MS, CARVALHO NB, BARRIONUEVO P, CORSETTI PP, GIAMBARTOLOMEI GH, OLIVEIRA SC, BALDI PC (2014) Key role of TLR2 in the inflammatory response and MHC-II down-regulation in *Brucella*-infected alveolar macrophages. *Infect Immun*, 82, 626-639.

- FICHT TA, BEARDEN SW, SOWA BA, ADAMS LG (1989) DNA sequence and expression of the 36-kilodalton outer membrane protein gene of *Brucella abortus*. *Infect Immun*, 57, 3281-3291.
- FICHTELOVA V, KOVARCIK K (2010) Characterization of two BHV-4 strains isolated in the Czech Republic. *Vet Med*, 55, 106-112.
- FINKELMAN FD, KATONA IM, MOSSMAN TR, COFFMAN RL (1988) IFN-gamma regulates the isotypes of Ig secreted during *in vivo* humoral immune responses. *J Immunol*, 140, 1022-1027.
- FLORES EF, KREUTZ LC, DONIS RO (1996) Swine and ruminant pestiviruses require the same cellular factor to enter bovine cells. *J Gen Virol*, 77, 1295-1303.
- FLORES EF, GIL LH, BOTTON SA, WEIBLEN R, RIDPATH JF, KREUTZ LC, PILATI C, DRIEMEYER D, MOOJEN V, WENDELSTEIN AC (2000) Clinical, pathological and antigenic aspects of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) type 2 isolates identified in Brazil. *Vet Microbiol*, 77, 175-183.
- FOSTER G, OSTERMAN BS, GODFROID J, JACQUES I, CLOECKAERT A (2007a) *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. *Int J Syst Evol Microbiol*, 57, 2688-2693.
- FOSTER AP, HOULIHAN MG, HOLMES JP, WATT EJ, HIGGINS RJ, ERRINGTON J, IBATA G, WAKELEY PR (2007b) Bovine viral diarrhoea virus infection of alpacas (*Vicugna pacos*) in the UK. *Vet Rec*, 161, 94-99.
- FRANCESCHI V, CAPOCEFALO A, CALVO-PINILLA E, REDAELLI M, MUCIGNAT-CARETTA C, MERTENS P, ORTEGO J, DONOFRIO G (2011) Immunization of knock-out alpha/beta interferon receptor mice against lethal bluetongue infection with a BoHV-4-based vector expressing BTV-8 VP2 antigen. *Vaccine*, 29, 3074-3082.
- FRANCO MP, MULDER M, GILMAN RH, SMITS HL (2007) Human brucellosis. *Lancet Infect Dis*, 7, 775-786.
- FRAY MD, PATON DJ, ALENIUS S (2000) The effects of bovine viral diarrhoea virus on cattle reproduction in relation to disease control. *Anim Reprod Sci*, 61, 615-627.
- FRAY MD, MANN GE, BLEACH ECL, KNIGHT PG, CLARKE MC, CHARLESTON B (2002) Modulation of sex hormone secretion in cows by acute infection with bovine viral diarrhoea virus. *Reproduction*, 123, 281-289.
- FRAZIER K, PENCE M, MAUEL MJ, LIGGETT A, HINES ME, SANGSTER L, LEHMKUHL HD, MILLER D, STYER E, WEST J, BALDWIN CA (2001) Endometritis in postparturient cattle associated with bovine herpesvirus-4 infection: 15 cases. *J Vet Diagn Invest*, 13, 502-508.
- FRENCH AL (1962) A specific virus encephalitis in calves: isolation and characterization of the causal agent. *Aust Vet J*, 38, 216-221.

- FRIDGUT O, Stram Y (2006), Bovine herpesvirus 4 in Israeli dairy cattle: isolation PCR and serology. *Israel J Vet Med*, 61, 56-59,
- FRITZEMEIER J, HAAS L, LIEBLER E, MOENNIG V, GREISER-WILKE I (1997) The development of early vs. late onset mucosal disease is a consequence of two different pathogenic mechanisms. *Arch Virol*, 142, 1335-1350.
- FU Q, SHI H, ZHANG H, REN Y, GUO F, QIAO J, JIA B, WANG P, CHEN C (2013) Autophagy during early stages contributes to bovine viral diarrhea virus replication in MDBK cells. *J Basic Microbiol*, (in press).
- FUCHS M, HUBERT P, DETTERER J, RZIHA HJ (1999) Detection of bovine herpesvirus type 1 in blood from naturally infected cattle by using a sensitive PCR that discriminates between wild-type virus and virus lacking glycoprotein E. *J Clin Microbiol*, 37, 2498-2507.
- FULTON RW, PURDY CW, CONFER AW, SALIKI JT, LOAN RW, BRIGGS RE, BURGE LJ (2000a) Bovine viral diarrhea viral infections in feeder calves with respiratory disease: interactions with *Pasteurella* spp., parainfluenza-3 virus, and bovine respiratory syncytial virus. *Can J Vet Res*, 64, 151-159.
- FULTON RW, SALIKI JT, CONFER AW, BURGE LJ, D'OFFAY JM, HELMAN RG, BOLIN SR, RIDPATH JF, PAYTON ME (2000b) Bovine viral diarrhea virus cytopathic and noncytopathic biotypes and type 1 and 2 genotypes in diagnostic laboratory accessions: clinical and necropsy samples from cattle. *J Vet Diagn Invest*, 12, 33-38.
- FULTON RW, BRIGGS RE, PAYTON ME, CONFER AW, SALIKI JT, RIDPATH JF, BURGE LJ, DUFF GC (2004) Maternally derived humoral immunity to bovine viral diarrhea virus (BVDV) 1a, BVDV1b, BVDV2, bovine herpesvirus-1, parainfluenza-3 virus bovine respiratory syncytial virus, *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* in beef calves, antibody decline by half-life studies and effect on response to vaccination. *Vaccine*, 22, 643-649.
- GALEOTA JA, EF FLORES, S KIT, M KIT, FA OSORIO (1997) A quantitative study of the efficacy of a deletion mutant bovine herpesvirus-1 differential vaccine in reducing the establishment of latency by wildtype virus. *Vaccine*, 15, 123-128.
- GALIK PK, VAN SANTEN VL, STRINGFELLOW DA, BIRD RC, WRIGHT JC, SMITH PC (1992) Development of a DNA probe for identification of bovine herpesvirus 4. *Am J Vet Res*, 54, 653-659.
- GALIK PK, GIVENS MD, STRINGFELLOW DA, CRICHTON EG, BISHOP MD, EILERTSEN KJ (2002) Bovine viral diarrhea virus (BVDV) and anti-BVDV antibodies in pooled samples of follicular fluid. *Theriogenology*, 57, 1219-1227.
- GAMLEN T, RICHARDS KH, MANKOURI J, HUDSON L, MCCAULEY J, HARRIS M, MACDONALD A (2010) Expression of the NS3 protease of cytopathogenic bovine viral diarrhea virus results in the induction of apoptosis but does not block activation of the beta interferon promoter. *J Gen Virol*, 91, 133-144.

- GAO N, JENNINGS P, YUAN D (2008) Requirements for the natural killer cell-mediated induction of IgG1 and IgG2a expression in B lymphocytes. *Int Immunol*, 20, 645-657.
- GAO N, JENNINGS P, GUO Y, YUAN D (2011) Regulatory role of natural killer (NK) cells on antibody responses to *Brucella abortus*. *Innate Immun*, 17, 152-163.
- GAO S, LUO J, DU J, LANG Y, CONG G, SHAO J, LIN T, ZHAO F, BELÁK S, LIU L, CHANG H, YIN H (2013) Serological and molecular evidence for natural infection of Bactrian camels with multiple subgenotypes of bovine viral diarrhoea virus in Western China. *Vet Microbiol*, 163, 172-176.
- GAO Y, WANG S, DU R, WANG Q, SUN C, WANG N, ZHANG P, ZHANG L (2011) Isolation and identification of a bovine viral diarrhoea virus from sika deer in china. *Virology*, 8, 83.
- GARDINER MR, NAIRN ME (1964) Viral meningoencephalitis in calves in Western Australia. *Aust Vet J*, 40, 225-228.
- GAY E, BARNOUIN J (2009) A nation-wide epidemiological study of acute bovine respiratory disease in France. *Prev Vet Med*, 89, 265-271.
- GAZYAĞCI S, AZKUR AK, ASLAN ME (2011) Haematological parameters in blood of maedi-visna virus-infected and uninfected sheep. *Afr J Microbiol Res* 5, 1826-1829.
- GENCAY A, DAĞALP SB, ŞAHNA KC, PINAR D, BAŞARAN Z (2009) Kayseri Bölgesindeki Sığırlarda Bovine Herpesvirus Tip 1 (BHV-1) Enfeksiyonunun Seroprevalansı. *FÜ Sağ Bil Vet Derg*, 23, 47-52.
- GEORGE JW, SNIPES J, LANE VM (2010) Comparison of bovine hematology reference intervals from 1957 to 2006. *Vet Clin Pathol*, 39, 138-148.
- GIAMBARTOLOMEI GH, DELPINO MV, CAHANOVICH ME, WALLACH JC, BALDI PC, VELIKOVSKY CA, FOSSATI CA (2002) Diminished production of T helper 1 cytokines correlates with T cell unresponsiveness to *Brucella* cytoplasmic proteins in chronic human brucellosis. *J Infect Dis*, 186, 252-259.
- GIAMBARTOLOMEI GH, ZWERDLING A, CASSATARO J, BRUNO L, FOSSATI CA, PHILIPP MT (2004) Lipoproteins, not lipopolysaccharide, are the key mediators of the proinflammatory response elicited by heat-killed *Brucella abortus*. *J Immunol*, 173, 4635-4642.
- GIANGASPERO M, HARASAWA R, WEBER L, BELLOLI A (2008). Taxonomic and epidemiological aspects of the bovine viral diarrhoea virus 2 species through the observation of the secondary structures in the 5' genomic untranslated region. *Vet Ital*, 44, 319-345.
- GIANGASPERO M, HARASAWA R (2014) Characterization of genotypes among bovine viral diarrhoea virus type 1 strains according to palindromic nucleotide substitutions in the genomic 5'-untranslated region. *J Virol Methods*, 195, 34-53.

- GIBBS EPJ, RWEYEMAMU MM (1977) Bovine herpesviruses. Part I. Bovine herpesvirus 1. *Vet Bull*, 47, 317-343.
- GIL LH, ANSARI IH, VASSILEV V, LIANG D, LAI VC, ZHONG W, HONG Z, DUBOVI EJ, DONIS RO (2006) The amino-terminal domain of bovine viral diarrhoea virus Npro protein is necessary for alpha/beta interferon antagonism. *J Virol*, 80, 900-911.
- GILBERT SA, BURTON KM, PRINS SE, DEREGT D (1999) Typing of bovine viral diarrhoea viruses directly from blood of persistently infected cattle by multiplex PCR. *J Clin Microbiol*, 37, 2020-2023.
- GILLESPIE JH, BAKER JA, MCENTEE K (1960) A cytopathogenic strain of virus diarrhoea virus. *Cornell Vet*, 50, 73-79.
- GILLET L, MINNER F, DETRY B, FARNIR F, WILLEMS L, LAMBOT M, THIRY E, PASTORET PP, SCHYNTS F, VANDERPLASSCHEN A (2004) Investigation of the susceptibility of human cell lines to bovine herpesvirus 4 infection: demonstration that human cells can support a nonpermissive persistent infection which protects them against tumor necrosis factor  $\alpha$ -induced apoptosis. *J Virol*, 78, 2336-2347.
- GILLET L, DEWALS B, FARNIR F, DE LEVAL L, VANDERPLASSCHEN A (2005) Bovine herpesvirus 4 induces apoptosis of human carcinoma cell lines *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res*, 65, 9463-9472.
- GIVENS MD, HEATH AM, BROCK KV, BRODERSEN BW, CARSON RL, STRINGFELLOW DA (2003) Detection of bovine viral diarrhoea virus in semen after infection of seronegative, ost-pubertal bulls. *Am J Vet Res*, 64, 428-4.
- GLAZOV EA, HORWOOD PF, ASSAVALAPSAKUL W, KONGSUWAN K, MITCHELL RW, MITTER N, MAHONY TJ (2010) Characterization of microRNAs encoded by the bovine herpesvirus 1 genome. *J Gen Virol*, 91, 32-41.
- GLEW EJ, CARR BV, BRACKENBURY LS, HOPE JC, CHARLESTON B, HOWARD CJ (2003) Differential effects of bovine viral diarrhoea virus on monocytes and dendritic cells. *J Gen Virol*, 84, 1771-1780.
- GODFROID J, KASBOHRER A (2002) Brucellosis in the European and Norway at the turn of the twenty- first century. *Vet Microbiol*, 90, 135-145.
- GOLDING B, MUCHMORE A, BLAESE RM (1984) Newborn and Wiskott-Aldrich patient B cells can be activated by TNP-Brucella abortus: Evidence that TNP-Brucella abortus behaves as a T-independent type I antigen. *J Immunol*, 133, 2966-2971.
- GOLDING B, SCOTT DE, SCHARF O, HUANG LY, ZAITSEVA M, LAPHAM C, ELLER N, GOLDING H (2001) Immunity and protection against Brucella abortus. *Microbes Infect*, 3, 43-48.



- GOLTZ M, BROLL H, MANKERTZ A, WEIGELT W, LUDWIG H, BUHK HJ, BORCHERS K (1994) Glycoprotein B of bovine herpesvirus type 4: its phylogenetic relationship to gB equivalents of the herpesviruses. *Virus Genes*, 9, 53-59.
- GOLEM SB (1943) Serological investigation of human and animal brucellosis in Turkey, (in Turkish). *Turk Hij Tec Biyol Derg*, 105.
- GOMES LI, ROCHA MA, SOUZA JG, COSTA EA, BARBOSA-STANCIOLI EF (2003) Bovine herpesvirus 5 (BoHV-5) in bull semen: amplification and sequence analysis of the US4 gene. *Vet Res Commun*, 27, 495-504.
- GOMES MT, CAMPOS PC, DE ALMEIDA LA, OLIVEIRA FS, COSTA MM, MARIM FM, PEREIRA GS, OLIVEIRA SC (2012) The role of innate immune signals in immunity to *Brucella abortus*. *Front Cell Infect Microbiol*, 2, 130.
- GONG Y, TROWBRIDGE R, MACNAUGHTON TB, WESTAWAY EG, SHANNON AD, GOWANS EJ (1996). Characterization of RNA synthesis during a one-step growth curve and of the replication mechanism of bovine viral diarrhoea virus. *J Gen Virol*, 77, 2729-2736.
- GORVEL JP, MORENO E (2002) Brucella intracellular life: from invasion to intracellular replication. *Vet Microbiol*, 90, 281-297.
- GRAHAM DA, MCNEILL GJ, CALVERT V, MAWHINNEY K, CURAN W, BALL NW, TODD D (2005) Virological and serological evidence of bovine herpesvirus type 4 in cattle in Northern Ireland. *Vet Rec*, 157, 539-543.
- GRAHAM DA (2013) Bovine herpes virus-1 (BoHV-1) in cattle-a review with emphasis on reproductive impacts and the emergence of infection in Ireland and the United Kingdom. *Ir Vet J*, 66, 15.
- GREISER-WILKE I, DITTMAR KE, LIESS B, MOENNIG V (1991) Immunofluorescence studies of biotype-specific expression of bovine viral diarrhoea virus epitopes in infected cells. *J Gen Virol*, 72, 2015-2019.
- GRIFFIN TP, HOWELLS WV, CRANDELL RA, MAURER FD (1958) Stability of the virus of infectious bovine rhinotracheitis. *Am J Vet Res*, 19, 990-992.
- GROOMS DL, BROCK KV, WARD LA (1998) Detection of bovine viral diarrhoea virus in the ovaries of cattle acutely infected with bovine viral diarrhoea virus. *J Vet Diagn Invest*, 10, 125-129.
- GROOMS DL, KEILEN ED (2002) Screening of neonatal calves for persistent infection with bovine viral diarrhoea virus by immunohistochemistry on skin biopsy samples. *Clin Diagn Lab Immunol*, 9, 898-900.

- GU B, LIU C, LIN-GOERKE J, MALEY DR, GUTSHALL LL, FELTENBERGER CA, DEL VECCHIO AM (2000) The RNA helicase and nucleotide triphosphatase activities of the bovine viral diarrhea virus NS3 protein are essential for viral replication. *J Virol*, 4, 1794-1800.
- GU X, KIRKLAND PD (2008) Infectious bovine rhinotracheitis, Australia and new zealand standard diagnostic procedures, elizabeth macarthur agricultural institute. Erişim: [[http://www.scahls.org.au/data/assets/pdf\\_file/0003/1280874/ibr.pdf](http://www.scahls.org.au/data/assets/pdf_file/0003/1280874/ibr.pdf)]. Erişim Tarihi:11.05.2014.
- GUTEKUNST DE, MALMQUIST WA (1964) Complement- fixing and neutralizing antibody response to bovine viral diarrhea and hog cholera antigens. *Can J comp Med*, 28, 19-23.
- GÜR S, AKÇA Y (2008) BVD seropozitif mandalarda IBR/IPV ve sığır vebasının seroepidemiolojisi. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 55, 45-50.
- GÜR S, DOĞAN N (2010) The possible role of bovine herpesvirus type-4 infection in cow infertility. *Anim Sci J*, 81, 304-308.
- HAGE JJ, VELLEMA P, SCHUKKEN YH, BARKEMA HW, RIJSEWIJK FA, VAN OIRSCHOT JT, WENTINK GH (1997) Sheep do not have a major role in bovine herpesvirus 1 transmission. *Vet Microbiol*, 57, 41-54.
- HAGE, JJ, GLAS RD, WESTRA HH, MARIS-VELDHUIS MA, VAN OIRSCHOT JT, RIJSEWIJK FA (1998a) Reactivation of latent bovine herpesvirus 1 in cattle seronegative to glycoproteins gB and gE. *Vet Microbiol*, 60, 87-98.
- HAGE JJ, SCHUKKEN YH, DIJKSTRA T, BARKEMA HW, VAN VALKENGOED PH, WENTINK GH (1998b) Milk production and reproduction during a subclinical bovine herpesvirus 1 infection on a dairy farm. *Prev Vet Med*, 34, 97-106.
- HAILING SM, TATUM FM, BRICKER BJ (1993) Sequence and characterization of an insertion sequence, IS711, from *Brucella ovis*. *Gene*, 133, 123-127.
- HALLING SM, PETERSON-BURCH BD, BRICKER BJ, ZUERNER RL, QING Z, LI LL, KAPUR V, ALT DP, OLSEN SC (2005) Completion of the genome sequence of *Brucella abortus* and comparison to the highly similar genomes of *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. *J Bacteriol*, 8, 2715-2726.
- HANON E, VANDERPLASSCHEN A, LYAKU S, KEIL G, DENIS M, PASTORET PP (1996) Inactivated bovine herpesvirus 1 induces apoptotic cell death of mitogen –stimulated bovine peripheral blood mononuclear cells. *J Virol*, 70, 4116-4120.
- HARADA T, TAUTZ N, THIEL HJ (2000) E2-p7 region of the bovine viral diarrhea virus polyprotein: processing and functional studies. *J Virol*, 74, 9498-9506.

- HARDING MJ, CAO X, SHAMS H, JOHNSON AF, VASSILEV VB, GIL LH, WHEELER DW, HAINES D, SIBERT GJ, NELSON LD, CAMPOS M, DONIS RO (2002) Role of bovine viral diarrhoea virus biotype in the establishment of fetal infections. *Am J Vet Res*, 63, 1455–1463.
- HARTMAN A, VAN WUIJCKHUISE L, FRANKENA K, FRANKEN P, WEVER P, DE WIT J, KRAMPS J (1997) Within-herd BHV-1 prevalence prediction from an ELISA on bulk milk. *Vet Rec*, 140, 484-485.
- HE Y, XIANG Z (2010) Bioinformatics analysis of Brucella vaccines and vaccine targets using VIOLIN. *Immun Res*, 6, 5.
- HEIMANN M, ROMAN-SOSA G, MARTOGLIO B, THIEL HJ, RÜMENAPF T (2006) Core protein of pestiviruses is processed at the C terminus by signal peptide peptidase. *J Virol*, 80, 1915-1921.
- HERMAN L, DE RIDDER H (1992) Identification of Brucella spp. by using the polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol*, 58, 2099-2101.
- HERTIG C, PAULI U, ZANONI R, PETERHANS E (1991) Detection of bovine viral diarrhoea (BVD) virus using the polymerase chain reaction. *Vet Microbiol*, 26, 65-76.
- HILBE, M, STALDER H, PETERHANS E, HAESSIG M, NUSSBAUMER M, EGLI C, SCHELP C, ZLINSZKY K, EHRENSPERGER F (2007) Comparison of five diagnostic methods for detecting bovine viral diarrhoea virus infection in calves. *J Vet Diagn Invest*, 19, 28-34.
- HILTON L, MOGANERADJ K, ZHANG G, CHEN YH, RANDALL RE, MCCAULEY JW, GOODBOURN S (2006) The NPro product of bovine viral diarrhoea virus inhibits DNA binding by interferon regulatory factor 3 and targets it for proteasomal degradation. *J Virol*, 80, 11723-11732.
- HODGSON PD, AICH P, STOOKEY J, POPOWYCH Y, POTTER A, BABIUK L, GRIEBEL PJ (2012) Stress significantly increases mortality following a secondary bacterial respiratory infection. *Vet Res*, 43, 21.
- HOFFMANN B, SCHEUCH M, HÖPER D, JUNGBLUT R, HOLSTEG M, SCHIRRMEIER H, ESCHBAUMER M, GOLLER KV, WERNIKE K, FISCHER M, BREITHAUPT A, METTENLEITER TC, BEER M (2012) Novel orthobunyavirus in Cattle, Europe, 2011. *Emerg Infect Dis*, 18, 469-472.
- HORNER GW, ORR DM (1993) An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies against bovine pestivirus. *N Z Vet J*, 41, 123-125.
- HORNER GW, THAM KM, ORR D, RALSTON J, ROWE S, HOUGHTON T (1995) Comparison of an antigen capture enzyme-linked assay with reverse transcription--polymerase chain reaction and cell culture immunoperoxidase tests for the diagnosis of ruminant pestivirus infections. *Vet Microbiol*, 43, 75-84.

- HOUE H (1999) Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infections. *Vet Microbiol*, 64, 89-107.
- HOUE H, BAKER JC, MAES RK, RUEGG PL, LLOYD JW (1995) Application of antibody titers against bovine viral diarrhoea virus (BVDV) as a measure to detect herds with cattle persistently infected with BVDV. *J Vet Diagn Invest*, 7, 327-332.
- HOUSE JA, WILSON TM, EL NAKASHLY S, KARIM LA, ISMAIL L, EL DANAF N, MOUSSA AM, AYOUB NN (1990) The isolation of lumpy skin disease virus and bovine herpesvirus 4 from cattle in Egypt. *J Vet Diagn Invest*, 2, 111-115.
- HOVINGH E (2013) Abortions in Dairy Cattle-I: Common Causes of Abortions, Virginia-Maryland Regional College of Veterinary Medicine, Virginia Tech, 404-288. Erişim:[[http://pubs.ext.vt.edu/404/404-288/404-288\\_pdf.pdf](http://pubs.ext.vt.edu/404/404-288/404-288_pdf.pdf)]. Erişim tarihi:03.08.2013.
- HUANG LY, KRIEG AM, ELLER N, SCOTT DE (1999) Induction and regulation of Th1-inducing cytokines by bacterial DNA, lipopolysaccharide, and heat inactivated bacteria. *Infect Immun*, 67, 6257-6263.
- HUDSON A, WONG T, LAKE R (2003) Pasteurisation of Dairy Products: Times, Temperatures and Evidence For Control Of Pathogens. Erişim: [[http://www.foodsafety.govt.nz/elibrary/industry/pasteurisation\\_dairy-science\\_research.pdf](http://www.foodsafety.govt.nz/elibrary/industry/pasteurisation_dairy-science_research.pdf)] Erişim Tarihi:11.05.2014
- HUGHES ML (1887) Mediterranean, Malta or undulant fever. Macmillan: London;
- HULBERT LE, CARROLL JA, BURDICK NC, RANDEL RD, BROWN MS, BALLOU MA (2011) Innate immune responses of temperamental and calm cattle after transportation. *Vet Immunol Immunopathol*, 143, 66-74.
- ICTV (2013) Virus Taxonomy: Release. International Committee on Taxonomy of Viruses Erişim: [<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>.] Erişim Tarihi:11.05.2014
- IHEDIOHA JI, ONWUBUCHE RC (2007) Artifactual changes in PCV, hemoglobin concentration, and cell counts in bovine, caprine, and porcine blood stored at room and refrigerator temperatures. *Vet Clin Pathol*, 36, 60-63.
- ILHA MR, COARSEY M, WHITTINGTON L, RAJEEV S, RAMAMOORTHY S (2012) The occurrence of Bovine viral diarrhoea virus in hunter-harvested white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) in the state of Georgia, southeastern United States. *J Vet Diagn Invest*, 24, 1052-1056.
- INGULI E, MONDINO A, KHORUTS A, JENKINS MK (1997) *In vivo* detection of dendritic cell antigen presentation to CD4+ T cells. *J Exp Med*, 185, 2133-2141.

- INTISAR KS, ALI YH, KHALAFALLA AI, MAHASIN EA, AMIN AS, TAHA KM (2010) The first report on the prevalence of pestivirus infection in camels in Sudan. *Trop Anim Health Prod*, 42, 1203-1207.
- IQBAL M, FLICK-SMITH H, MCCAULEY JW (2000) Interactions of bovine viral diarrhoea virus glycoprotein Erns with cell surface glycosaminoglycans. *J Gen Virol*, 81, 451-459.
- ISERNHAGEN AJ, COSENZA M, DA COSTA MC, MÉDICI KC, BALARIN MR, BRACARENSE AP, ALFIERI AA, LISBÔA JA (2011) Asymptomatic encephalitis in calves experimentally infected with bovine herpesvirus-5. *Can Vet J*, 52, 1312-1318.
- ISLAM MA, KHATUN MM, BAEK BK (2013) Male rats transmit *Brucella abortus* biotype 1 through sexual intercourse. *Vet Microbiol*, 165, 475-477.
- IVANYI-NAGY R, LAVERGNE JP, GABUS C, FICHEUX D, DARLIX JL (2008) RNA chaperoning and intrinsic disorder in the core proteins of Flaviviridae. *Nucleic Acids Res*, 36, 712-725.
- IZUMI Y, TSUDUKU S, MURAKAMI K, TSUBOI T, KONISHI M, HARITANI M, KAMIYOSHI T, KIMURA K, SENTSU H (2006) Characterization of Bovine herpesvirus type 4 isolated from cattle with mastitis and subclinical infection by the virus among cattle. *J Vet Med Sci*, 68, 189-193.
- İLHAN Z, SOLMAZ H, EKİN IH (2013) *In vitro* antimicrobial susceptibility of *Brucella melitensis* isolates from sheep in an area endemic for human brucellosis in Turkey. *J Vet Med Sci*, 75, 1035-1040.
- İYİSAN AS, AKMAZ Ö, GÖKÇEN DÜZGÜN S (2000) Türkiye’de sığır ve koyunlarda brucellosis’in seroepidemiolojisi. *Pendik Vet Mikrobiyol Derg*, 31, 21-75.
- JACOBSON ER, SUNDBERG JP, GASKIN JM, KOLLIAS GV, O'BANION MK (1986) Cutaneous papillomas associated with a herpesvirus-like infection in a herd of captive African elephants. *J Am Vet Med Assoc*, 189, 1075-1078.
- JAIME-RAMIREZ AC, MUNDY-BOSSE BL, KONDADASULA S, JONES NB, RODA JM, MANI A, PARIHAR R, KARPA V, PAPPENFUSS TL, LAPERLE KM, BILLER E, LEHMAN A, CHAUDHURY AR, JARJOURA D, BURRY RW, CARSON III WE (2011) IL-12 enhances the antitumor actions of trastuzumab via NK cell IFN- $\gamma$  production. *J Immunol*, 186, 3401-3409.
- JAIN NC (1986) Schalm’s Veterinary Hematology, 4th ed. Philadelphia, PA: Lea and Febiger, p. 179.
- JAIN N, BOYLE SM, SRIRANGANATHAN N (2012) Effect of exogenous erythritol on growth and survival of *Brucella*. *Vet Microbiol*, 160, 513-516.

- JAMALUDDIN AA, CASE JT, HIRD DW, BLANCHARD PC, PEAUROI JR, ANDERSON ML (1996) Dairy cattle abortion in California: evaluation of diagnostic laboratory data. *J Vet Diagn Invest*, 8, 210-218.
- JIANG SJ, LIN TM, SHI GY, ENG HL, CHEN HY, WU HL (2004a) Inhibition of bovine herpesvirus-4 replication in endothelial cells by arsenite. *Antiviral Res*, 63, 167-175.
- JIANG SJ, LIN TM, SHI GY, ENG HL, CHEN HY, WU HL (2004b) Inhibition of bovine herpesvirus-4 replication by arsenite through downregulation of the extracellular signal-regulated kinase signaling pathway. *J Biomed Sci*, 11, 500-510.
- JOHNSON B, MOSIER DA, MORTON RJ, CONFER AW (1994) Experimental Brucella abortus strain 19 arthritis in young cattle. *J Vet Diagn Invest*, 6, 56-61.
- JOHNSON GD, CAMPBELL JB, MINOCHA HC, BROCE AB (1991) Ability of Musca autumnalis (Diptera: Muscidae) to acquire and transmit bovine herpesvirus-1. *J Med Entomol*, 28, 841-846.
- JOHNSTON LAY, SIMMONS GC, MCGAVIN MD (1962) A viral meningoencephalitis in calves. *Aust Vet J*, 38, 207-215.
- JONES C (2003) Herpes simplex virus type 1 and bovine herpesvirus 1 latency. *Clin Microbiol Rev*, 16, 79-95.
- JONES C (2009) Regulation of innate immune responses by bovine herpesvirus 1 and infected cell protein 0 (bICP0). *Viruses*, 1, 255-275.
- KAASHOEK MJ, MOERMAN A, MADIĆ J, RIJSEWIJK FA, QUAK J, GIELKENS AL, VAN OIRSCHOT JT (1994) A conventionally attenuated glycoprotein E-negative strain of bovine herpesvirus type 1 is an efficacious and safe vaccine. *Vaccine*, 12, 439-444.
- KALAYCIOGLU AT, RUSSELL PH, HOWARD CR (2012) The characterization of the neutralizing bovine viral diarrhea virus monoclonal antibodies and antigenic diversity of E2 glycoprotein. *J Vet Med Sci*, 74, 1117-1120.
- KALE M, ATA A, KOCAMÜFTÜOĞLU M, HASIRCIOĞLU S (2011) Bovine herpesvirus type 4 (BHV-4) infection in relation to fertility in repeat breeder dairy cows. *Acta Vet*, 61, 13-19.
- KALELI I, KOCOĞLU T, OZEN N, AKSIT F (1999) The prevalence of brucellosis in the Denizli region, (in Turkish). *Inf Derg*, 13, 231-233.
- KÁLMÁN D, JÁNOSI S, EGYED L (2004) Role of bovine herpesvirus 4 in bacterial bovine mastitis. *Microb Pathog*, 37, 125-129.

- KÁLMÁN D, EGYED L (2005) PCR detection of bovine herpesviruses from nonbovine ruminants in Hungary. *J Wildl Dis*, 41, 482-488.
- KAMINJOLO JS, MUGERA GM, ROSTED AF (1972) Isolation of a herpes-type virus from some tumours of bovine origin. *Zentralbl Veterinarmed B*, 19, 626-632.
- KAMPA J, STÅHL K, RENSTRÖM LH, ALENIUS S (2007) Evaluation of a commercial Erns-capture ELISA for detection of BVDV in routine diagnostic cattle serum samples. *Acta Vet Scand*, 49, 7.
- KANG SI, HER M, KIM JW, KIM JY, KO KY, HA YM, JUNG SC (2011) Advanced multiplex PCR assay for differentiation of Brucella species. *Appl Environ Microbiol*, 77, 6726-6728.
- KARABAY O, SERIN E, TAMER A, GÖKDOĞAN F, ALPTEKER H, OZCAN A, GÜNDÜZ H (2004) Hepatitis B carriage and Brucella seroprevalence in urban and rural areas of Bolu province of Turkey: a prospective epidemiologic study. *Turk J Gastroenterol*, 15, 11-13.
- KARAGIANNIS I, MELLOU K, GKOLFINOPOULOU K, DOUGAS G, THEOCHAROPOULOS G, VOURVIDIS D, ELLINAS D, SOTOLIDOU M, PAPADIMITRIOU T, VOROU R (2012) Outbreak investigation of brucellosis in Thassos, Greece. *Euro Surveill*, 17, 20116.
- KARAKAYA E, ALPAY G, YILMAZBAS-MECITOGLU G, ALASONYALILAR-DEMIRER A, AKGÜL B, INAN-OZTURKOGLU S, OZYIGIT MO, SEYREK-INTAS D, SEYREK-INTAS K, YESILBAG K, GUMEN A, KESKIN A (2013) Perosomus elumbis in a Holstein calf infected with bovine viral diarrhoea virus. *Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere*, 41, 387-391.
- KATO Y, MASUDA G, ITODA I, IMAMURA A, AJISAWA A, NEGISHI M (2007) Brucellosis in a returned traveler and his wife: probable person-to-person transmission of Brucella melitensis. *J Travel Med*, 14, 343-345.
- KATTAR MM, ZALLOUA PA, ARAJ GF, SAMAHA-KFOURY J, SHBAKLO H, KANJ SS, KHALIFE S, DEEB M (2007) Development and evaluation of real-time polymerase chain reaction assays on whole blood and paraffin-embedded tissues for rapid diagnosis of human brucellosis. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 59, 23-32.
- KELLER SL, JEFFERSON BJ, JACOBS RM, WOOD RD (2006) Effects of noncytopathic type 2 bovine viral diarrhoea virus on the proliferation of bone marrow progenitor cells. *Can J Vet Res*, 70, 20-27.
- KELLING CL (1996) Planning bovine viral diarrhoea virus vaccination programs. *Vet Med*, 9, 873-877.
- KELLING CL, TOPLIFF CL (2013) Bovine maternal, fetal and neonatal responses to bovine viral diarrhoea virus infections. *Biologicals*, 41, 20-25.

- KENNEDY PC, RICHADS WPC (1964) The pathology of abortion caused by the virus of infectious bovine rhinotracheitis. *Path Vet*, 1, 7-17.
- KEUSER V, SCHYNTS F, DETRY B, COLLARD A, ROBERT B, VANDERPLASSCHEN A, PASTORET PP, THIRY E (2004) Improved antigenic methods for differential diagnosis of bovine, caprine, and cervine alphaherpesviruses related to bovine herpesvirus 1. *J Clin Microbiol*, 42, 1228–1235.
- KHAN MY, MAH MW, MEMISH ZA (2001) Brucellosis in pregnant women. *Clin Infect Dis*, 32, 1172-1177.
- KIBENGE FS, HARRIS LM, MCKENNA PK, WADOWSKA D, YASON CV (1994) Amplification of strains of bovine herpesvirus 1 by use of polymerase chain reaction with primers in the thymidine kinase region. *Am J Vet Res*, 55, 1206-1212.
- KIM KI, ZHANG DE (2003) ISG15, not just another ubiquitin-like protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 307, 431-434.
- KIRCHGESSNER MS, DUBOVI EJ, WHIPPS CM (2013) Spatial point pattern analyses of Bovine viral diarrhoea virus infection in domestic livestock herds and concomitant seroprevalence in wild white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) in New York State, USA. *J Vet Diagn Invest*, 25, 226-233.
- KIRKBRIDE CA (1992) Etiologic agents detected in a 10-year study of bovine abortions and stillbirths. *J Vet Diagn Invest*, 4, 175-180.
- KIRKLAND PD, RICHARDS SG, ROTHWELL JT, STANLEY DF (1991) Replication of bovine viral diarrhoea virus in the bovine reproductive tract and excretion of virus in semen during acute and chronic infections. *Vet Rec*, 128, 587-590.
- KIRKLAND PD, FROST MJ, FINLAISON DS, KING KR, RIDPATH JF, GU X (2007) Identification of a novel virus in pigs-Bungowannah virus: a possible new species of pestiviruses. *Virus Res*, 129, 26-34.
- KIRKLAND PD, POYNTING AI, GU X, DAVIS RJ (2009) Infertility and venereal disease in cattle inseminated with semen containing bovine herpesvirus type 5. *Vet Rec*, 165, 111-113.
- KITTELBERGER R, PIGOTT C (2008) The use of pestivirus antigen ELISA currently available for the detection of hairy shaker disease / border disease virus in sheep. *N Z Vet J*, 56, 343-344.
- KO J, SPLITTER GA (2003) Molecular host–pathogen interaction in brucellosis: current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans. *Clin Microbiol*, 6, 65-78.



- KOCATÜRK M, YEŞİLBAĞ K, YILMAZ Z (2010) Evaluation of red blood cell and platelet indices in cattle naturally infected with bovine viral diarrhoea virus (BVDV). *Uludağ Üni Vet Fak Derg*, 29, 17-21.
- KOFER J, WAGNER P, DEUTZ A (1999) BHV-1 infections in Styria (Austria) caused by intra-community trade. *Dtsch Tierarztl Wochenschr*, 106, 231-233.
- KOSINOVA E, PSIKAL I, ROBESOVA B, KOVARCIK K (2007) Real-time PCR for quantitation of bovine viral diarrhoea virus RNA using SYBR Green I fluorimetry. *Vet Med*, 52, 253-261.
- KRAMPS JA, QUAK S, WEERDMEESTER K, VAN OIRSCHOT JT (1993) Comparative study on sixteen enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of antibodies to bovine herpesvirus 1 in cattle. *Vet Microbiol*, 35, 11-21.
- KRAMPS JA, MAGDALENA J, QUAK J, WEERDMEESTER K, KAASHOEK MJ, MARISVELDHUIS MA, RIJSEWIJK FA, KEIL G, VAN OIRSCHOT JT (1994) A simple, specific, and highly sensitive blocking enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to bovine herpesvirus 1. *J Clin Microbiol*, 32, 2175-2181.
- KRAMPS JA, BANKS M, BEER M, KERKHOF P, PERRIN M, WELLENBERG GJ, OIRSCHOT JT (2004) Evaluation of tests for antibodies against bovine herpesvirus 1 performed in national reference laboratories in Europe. *Vet Microbiol*, 102, 169-181.
- KREY T, MOUSSAY E, THIEL HJ, RÜMENAPF T (2006) Role of the low-density lipoprotein receptor in entry of bovine viral diarrhoea virus. *J Virol*, 80, 10862-10867.
- KUHNE S, SCHROEDER C, HOLMQUIST G, WOLF G, HORNER S, BREM G, BALLAGI A (2005) Detection of bovine viral diarrhoea virus infected cattle--testing tissue samples derived from ear tagging using an Erns capture ELISA. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, 52, 272-277.
- KUMMERER BM, TAUTZ N, BECHER P, THIEL HJ, MEYERS G (2000) The genetic basis for cytopathogenicity of pestiviruses. *Vet Microbiol*, 77, 117-128.
- KUPFERSCHMIED HU, KIHM U, BACHMANN P, MÜLLER KH, ACKERMANN M (1986) Transmission of IBR/IPV virus in bovine semen: A case report. *Theriogenology*, 25, 439-443.
- LALONDE A, BIELANSKI A (2011) Efficacy of the International Embryo Transfer Society (IETS) washing procedure for rendering oocytes matured *in vitro* free of bovine viral diarrhoea virus (BVDV). *Theriogenology*, 76, 261-266.
- LARGO E, GLADUE DP, HUARTE N, BORCA MV, NIEVA JL (2014) Pore-forming activity of pestivirus p7 in a minimal model system supports genus-specific viroporin function. *Antiviral Res*, 101, 30-36.

- LARSSON B, TRAVEN M, HULTEN C, HARD AF SEGERSTAD C, BELAK K, ALENIUS S (1995) Serum concentrations of thyroid hormones in calves with a transient or persistent infection with bovine viral diarrhoea virus. *Res Vet Sci*, 58, 186-189.
- LAWACZECK E, TOPOREK J, CWIKLA J, MATHISON BA (2011) *Brucella canis* in a HIV-infected patient. *Zoonoses Public Health*, 58, 150-152.
- LEASK R, BOTHA AM, BATH GF (2013) Schmallenberg virus--is it present in South Africa? *J S Afr Vet Assoc*, 84, E1-4.
- LECOT S, BELOUZARD S, DUBUISSON J, ROUILLÉ Y (2005) Bovine viral diarrhoea virus entry is dependent on clathrin-mediated endocytosis. *J Virol*, 79, 10826-10829.
- LEE BJ, WEISS ML, MOSIER D, CHOWDHURY SI (1999) Spread of bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) in the rabbit brain after intranasal inoculation. *J Neurovirol*, 5, 474-484.
- LEE JJ, KIM JH, KIM DG, KIM DH, SIMBORIO HL, MIN WG, RHEE MH, LIM JH, CHANG HH, KIM S (2014) Characterization of betaine aldehyde dehydrogenase (BetB) as an essential virulence factor of *Brucella abortus*. *Vet Microbiol*, 168, 131-140.
- LEE SR, PHARR GT, BOYD BL, PINCHUK LM (2008) Bovine viral diarrhoea viruses modulate toll-like receptors, cytokines and co-stimulatory molecules genes expression in bovine peripheral blood monocytes. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 31, 403-418.
- LEE JI, KIM IH (2007) Pregnancy loss in dairy cows: the contributing factors, the effects on reproductive performance and the economic impact. *J Vet Sci*, 8, 283-288.
- LEMON SM; MCKEATING JA; PIETSCHMANN T; FRICK DN, GLENN JS; TELLINGHUISEN TL, SYMONS J, FURMAN PA (2010) Development of novel therapies for hepatitis C. *Antiviral Res*, 86, 79-92.
- LENSCHOW DJ, LAI C, FRIAS-STAHILI N, GIANNAKOPOULOS NV, LUTZ A, WOLFF T, OSIAK A, LEVINE B, SCHMIDT RE, GARCIA-SASTRE A, LEIB DA, PEKOSZ A, KNOBELOCH KP, HORAK I, VIRGIN HWT (2007) IFN-stimulated gene 15 functions as a critical antiviral molecule against influenza, herpes, and Sindbis viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 1371-1376.
- LÉTÉ C, MACHIELS B, STEVENSON PG, VANDERPLASSCHEN A, GILLET L (2012) Bovine herpesvirus type 4 glycoprotein L is nonessential for infectivity but triggers virion endocytosis during entry. *J Virol*, 86, 2653-2664.
- LETELLIER C, KERKHOF S, WELLEMANS G, VANOPDENBOSCH E (1999) Detection and genotyping of bovine diarrhoea virus by reverse transcription-polymerase chain amplification of the 5' untranslated region. *Vet Microbiol*, 64, 155-167.

- LEVINGS RL, ROTH JA (2013a) Immunity to bovine herpesvirus 1: I. Viral lifecycle and innate immunity. *Anim Health Res Rev*, 14, 88-102.
- LEVINGS RL, ROTH JA (2013b) Immunity to bovine herpesvirus 1: II. Adaptive immunity and vaccinology. *Anim Health Res Rev*, 14, 103-123.
- LI Y, VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK S, BABIUK LA, LIANG X (1995) Characterization of cell-binding properties of bovine herpesvirus 1 glycoproteins B, C, and D: identification of a dual cell-binding function of gB. *J Virol*, 69, 4758-4768.
- LI Y, WANG J, KANAI R, MODIS Y (2013) Crystal structure of glycoprotein E2 from bovine viral diarrhoea virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 110, 6805-6810.
- LIANG X, PYNE C, LI Y, BABIUK LA, KOWALSKI J (1995) Delineation of the essential function of bovine herpesvirus 1 gD: an indication for the modulatory role of gD in virus entry. *Virology*, 207, 429-441.
- LIANG X, CHOW B, RAGGO C, BABIUK LA (1996) Bovine herpesvirus 1 UL49.5 homolog gene encodes a novel viral envelope protein that forms a disulfide-linked complex with a second virion structural protein. *J Virol*, 70, 1448-1454.
- LIEBLER-TENORIO EM, RIDPATH JF, NEILL JD (2004) Distribution of viral antigen and tissue lesions in persistent and acute infection with the homologous strain of noncytopathic bovine viral diarrhoea virus. *J Vet Diagn Invest*, 16, 388-396.
- LIM JK, MURPHY PM (2011) Chemokine control of West Nile virus infection. *Exp Cell Res*, 317, 569-574.
- LIN TM, SHI GY, TSAI CF, SU HJ, GUO YL, WU HL (1997) Susceptibility of endothelial cells to bovine herpesvirus type 4 (BHV-4). *J Virol Methods*, 63, 219-225.
- LINDBERG A, BROWNLIE J, GUNN GJ, HOUE H, MOENNIG V, SAATKAMP HW, SANDVIK T, VALLE PS (2006) The control of bovine viral diarrhoea virus in Europe: today and in the future. *Rev Sci Tech*, 25, 961-979.
- LINDBERG AL, ALENIUS S (1999) Principles for eradication of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections in cattle populations. *Vet Microbiol*, 64, 197-222.
- LINDENBACH BD, THIEL HJ, RICE CM (2007) Flaviviridae: The Viruses and Their Replication. pp. 1101-1152. In: Fields Virology (Knipe, D. M., Howley, P. M., ed), Lippincott-Raven Philadelphia.
- LINDNER A, AMBROSIUS H, LIEBERMANN H (1993a) Comparative studies on detection of BHV-5 antibodies in sheep with ELISA, serum neutralization, cell assay and immunofluorescence assay. *Deutsche Tierarz*, 100, 440-442.

- LINDNER A, AMBROSIUS H, LIEBERMANN H (1993b) The development of an ELISA for the detection of antibodies against type-5 bovine herpesvirus (BHV-5) in sheep sera. *Deutsche Tierarz Woch*, 100, 390-395.
- LITTLEJOHNS IR, HORNER GW (1990) Incidence, epidemiology and control of bovine pestivirus infections and disease in Australia and New Zealand. *Rev Sci Tech*, 9, 195-205.
- LITWIŃCZUK Z, FLOREK M, KEDZIERSKA-MATYSEK M, SKALECKI P (2009) Blood haematological profile and meat colour of calves slaughtered in summer and autumn season. *Pol J Vet Sci*, 12, 557-562.
- LLOSA M, ROY C, DEHIO C (2009) Bacterial type IV secretion systems in human disease. *Mol Microbiol*, 73, 141-151.
- LOMONTE P, BUBLLOT M, PASTORET PP, THIRY E (1992) Location and characterization of the bovine herpesvirus type 4 thymidine kinase gene; comparison with thymidine kinase genes of other herpesviruses. *Arch Virol*, 127, 327-337.
- LOMONTE P, FILÉE P, LYAKU JR, BUBLLOT M, PASTORET PP, THIRY E (1997) Analysis of the biochemical properties of, and complex formation between, glycoproteins H and L of the gamma2 herpesvirus bovine herpesvirus-4. *J Gen Virol*, 8, 2015-2023.
- LOPEZ OJ, GALEOTA JA, OSORIO FA (1996) Bovine herpesvirus type-4 (BHV-4) persistently infects cells of the marginal zone of spleen in cattle. *Microb Pathog*, 21, 47-58.
- LUCERO NE, MALDONADO PI, KAUFMAN S, ESCOBAR GI, BOERI E, JACOB NR (2010) *Brucella canis* causing infection in an HIV-infected patient. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 10, 527-529.
- LYAKU JR, VILCEK S, NETTLETON PF, MARSDEN HS (1996) The distinction of serologically related ruminant alphaherpesviruses by the polymerase chain reaction (PCR) and restriction endonuclease analysis. *Vet Microbiol*, 48, 135-142.
- MACHIELS B, GILLET L, NASCIMENTO BRITO SD, DRION P, DELFORGE C, NIZET Y, GIANELLO P, BONA C, COSTES B, MARKINE-GORIAYNOFF N, VANDERPLASSCHEN A (2007) Natural antibody--complement dependent neutralization of bovine herpesvirus 4 by human serum. *Microbes Infect*, 9, 1530-1537.
- MACKAY IM, ARDEN KE, NITSCHKE A (2002) Survey and summary: real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res*, 30, 1292-1305.
- MADIC J, MAGDALENA J, QUAK J, VAN OIRSCHOT JT (1995) Isotype-specific antibody responses in sera and mucosal secretions of calves experimentally infected with bovine herpesvirus 1. *Vet Immunol Immunopathol*, 46, 267-283.

- MAGKOURAS I, MÄTZENER P, RÜMENAPF T, PETERHANS E, SCHWEIZER M (2008) RNase-dependent inhibition of extracellular, but not intracellular, dsRNA-induced interferon synthesis by Erns of pestiviruses. *J Gen Virol*, 89, 2501-2506.
- MAHAJAN V, BANGA HS, DEKA D, FILIA G, GUPTA A (2013) Comparison of diagnostic tests for diagnosis of infectious bovine rhinotracheitis in natural cases of bovine abortion. *J Comp Pathol*, 149, 391-401.
- MAIDANA SS, LADELFA MF, PÉREZ SE, LOMÓNACO PM, DEL MÉDICO ZAJAC MP, ODEÓN A, BLANCO VIERA J, COMBESSIES G, FONDEVILA N, PALACIOS M, THIRY J, MUYLKENS B, THIRY E, ROMERA SA (2011) Characterization of BoHV-5 field strains circulation and report of transient specific subtype of bovine herpesvirus 5 in Argentina. *BMC Vet Res*, 7, 8.
- MAKOSCHEY B, SONNEMANS D, BIELSA JM, FRANKEN P, MARS M, SANTOS L, ALVAREZ M (2007) Evaluation of the induction of NS3 specific BVDV antibodies using a commercial inactivated BVDV vaccine in immunization and challenge trials. *Vaccine*, 25, 6140-6145.
- MARCHESINI G, DE NARDI R, GIANESELLA M, STEFANI AL, MORGANTE M, BARBERIO A, ANDRIGHETTO I, SEGATO S (2013). Effect of induced ruminal acidosis on blood variables in heifers. *BMC Vet Res*, 9, 98.
- MARIN MS, QUINTANA S, FAVERÍN C, LEUNDA MR, ODEÓN AC, PÉREZ SE (2014) Toll-like receptor activation and expression in bovine alpha-herpesvirus infections. *Res Vet Sci*, 96, 196-203.
- MARS MH, DE JONG MC, VAN MANEN C, HAGE JJ, VAN OIRSCHOT JT (2000) Airborne transmission of bovine herpesvirus 1 infections in calves under field conditions. *Vet Microbiol*, 76, 1-13.
- MARSTON JA (1863) Report on fever (Malta). *Army Medical Department Reports*, 3, 486-521.
- MARTINS H, GARIN-BASTUJI B, LIMA F, FLOR L, PINA FONSECA A, BOINAS F (2009) Eradication of bovine brucellosis in the Azores, Portugal-Outcome of a 5-year programme (2002-2007) based on test-and-slaughter and RB51 vaccination. *Prev Vet Med*, 90, 80-89.
- MAURER K, KREY T, MOENNIG V, THIEL HJ, RÜMENAPF T (2004) CD46 is a cellular receptor for bovine viral diarrhea virus. *J Virol*, 78, 1792-1799.
- MAYFIELD JE, GOOD PJ, VANOORT HJ, CAMPBELL AR, REED DE (1983) Cloning and cleavage site mapping of DNA from bovine herpesvirus 1 (Cooper strain). *J Virol*, 47, 259-264.
- MCCLURKIN AW, LITTLEDIKE ET, CUTLIP RC, FRANK GH, CORIA MF, BOLIN SR (1984) Production of cattle immunotolerant to bovine viral diarrhea virus. *Can J Comp Med*, 48, 156-181.

- MCCULLY HM, BASSON P, PIENAAR JG, ERASMUS BJ, YOUNG E (1971) Herpes nodules in the lung of the African elephant [*Loxodonta africana* Blumenbach, 1797]. *Onderstepoort J Vet Res*, 38, 225-236.
- MCGOLDRICK A, BENSAUDE E, IBATA G, SHARP G, PATON DJ (1999) Closed one-tube reverse transcription nested polymerase chain reaction for the detection of pestiviral RNA with fluorescent probes. *J Virol Methods*, 79, 85-95.
- MCLAUGHLIN K, CARR VB, IQBAL M, SEAGO J, LEFEVRE EA, ROBINSON L, PRENTICE H, CHARLESTON B (2011) Hsp110-mediated enhancement of CD4+ T cell responses to the envelope glycoprotein of members of the family Flaviviridae *in vitro* does not occur *in vivo*. *Clin Vaccine Immunol*, 18, 311-317.
- MEGID J, MATHIA LA, ROBLES CA (2010) Clinical manifestations of brucellosis in domestic animals and humans. *Open Vet Sci J*, 4, 119-126.
- MESNER O, RIESENBERG K, BILIAR N, BORSTEIN E, BOUHNIC L, PELED N, YAGUPSKY P (2007) The many faces of human-to-human transmission of brucellosis: congenital infection and outbreak of nosocomial disease related to an unrecognized clinical case. *Clin Infect Dis*, 45, 135-140.
- METZGER DW, BUCHANAN JM, COLLINS JT, LESTER TL, MURRAY KS, VAN CLEAVE VH, VOGEL LA, DUNNICK WA (1996) Enhancement of humoral immunity by IL-12. *Ann NY Acad Sci*, 795, 100-115.
- METZLER AE, MATILE H, GASMAN U, ENGELS M, WYLER R (1985) European isolates of bovine herpesvirus 1: A comparison of restriction endonuclease sites, polypeptides and reactivity with monoclonal antibodies. *Arch Virol*, 85, 57-69.
- METZLER AE, SCHUDEL AA, ENGELS M (1986) Bovine herpesvirus 1: molecular and antigenic characteristics of variant viruses isolated from calves with neurological disease. *Arch Virol*, 87, 205-217.
- METZLER AE, WYLER R (1986) Prevalence of bovine herpesvirus 4 in the Swiss cattle population and possible serologic cross reaction with bovine herpesvirus 1 (IBR/IPV virus) (in German). *Schweiz Arch Tierheilk*, 128, 459-467.
- MEURENS F, SCHYNTS F, KEIL GM, MUYLKENS B, VANDERPLASSCHEN A, GALLEGO P, THIRY E (2004) Superinfection prevents recombination of the alphaherpesvirus bovine herpesvirus 1. *J Virol*, 78, 3872-3879.
- MEYER G, LEMAIRE M, LYAKU J, PASTORET PP, THIRY E (1996) Establishment of a rabbit infection model for bovine herpesvirus type 5 neurological acute infection, *Vet Microbiol*, 51, 27-40.

- MEYER G, HANON E, GEORLETTE D, PASTORET PP, THIRY E (1998) Bovine herpesvirus type 1 glycoprotein H is essential for penetration and propagation in cell culture. *J Gen Virol*, 79, 1983–1987.
- MEYER G, THIRY E (1999) Identification and characterization of bovine herpesvirus type 5 glycoprotein H gene and gene products. *J Gen Virol*, 80, 2849–2859.
- MEYER G, LEMAIRE M, ROS C, BELAK K, GABRIEL A, CASSART D, COIGNOUL F, BELAK S, THIRY E (2001) Comparative pathogenesis of acute and latent infections of calves with bovine herpesvirus types 1 and 5. *Arch Virol*, 146633–146652.
- MEYERS G, EGE A, FETZER C, VON FREYBURG M, ELBERS K, CARR V, PRENTICE H, CHARLESTON B, SCHÜRMAN EM (2007) Bovine viral diarrhoea virus: prevention of persistent fetal infection by a combination of two mutations affecting Erns RNase and Npro protease. *J Virol*, 81, 3327-3338.
- MEYER KF, SHAW EB (1920) Comparison of morphologic, cultural and biochemical characteristics of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*. Studies on genus *Brucella* Nov. Gen. 1. *J Infect Dis*, 27, 173-184.
- MILLER JM, VAN DER MAATEN MJ (1984) Reproductive tract lesions in heifers after intrauterine inoculation with infectious bovine rhinotracheitis virus. *Am J Vet Res*, 45, 790-794.
- MILLER JM, WHETSTONE CA, VAN DER MAATEN MJ (1991) Abortifacient property of bovine herpesvirus type 1 isolates that represent three subtypes determined by restriction endonuclease analysis of viral DNA. *Am J Vet Res*, 52, 458–461.
- MINAS A (2006) Control and eradication of brucellosis in small ruminants. *Small Ruminant Res*, 62, 101-107.
- MISHRA N, VILCEK S, RAJUKUMAR K, DUBEY R, TIWARI A, GALAV V, PRADHAN HK (2008) Identification of bovine viral diarrhoea virus type 1 in yaks (*Bos poephagus grunniens*) in the Himalayan region. *Res Vet Sci*, 84, 507-510.
- MISRA V, BABIUK LA, DARCEL C (1983) Analysis of bovine herpesvirus-type 1 isolates by restriction endonuclease fingerprinting. *Arch Virol*, 76, 341-354.
- MOELLER RB JR, ADASKA J, REYNOLDS J, BLANCHARD PC (2013) Systemic Bovine herpesvirus 1 infections in neonatal dairy calves. *J Vet Diagn Invest*, 25, 136-141.
- MOENNIG V, LIESS B (1995) Pathogenesis of intrauterine infections with bovine viral diarrhoea virus. *Vet Clin of N Am-Food A*, 11, 477-487.
- MOENNIG V, HOUE H, LINDBERG A (2005) BVD control in Europe: current status and perspectives. *Anim Health Res Rev*, 6, 63-74.

- MOHANTY SB, HAMMOND RC, LILLIE MG (1971) A new bovine herpesvirus and its effect on experimentally infected calves. *Arch Ges Virusforsch*, 33, 394-395.
- MOHANTY SB, LILLIE MG, INGLING AL, HAMMOND RC (1972) Effects of an experimentally induced herpesvirus infection in calves. *J Am Vet Med Assoc*, 161, 1008-1011.
- MOLINA V, RISALDE MA, SÁNCHEZ-CORDÓN PJ, PEDRERA M, ROMERO-PALOMO F, LUZZAGO C, GÓMEZ-VILLAMANDOS JC (2013) Effect of infection with BHV-1 on peripheral blood leukocytes and lymphocyte subpopulations in calves with subclinical BVD. *Res Vet Sci*, 95, 115-122.
- MOLINA V, RISALDE MA, SÁNCHEZ-CORDÓN PJ, ROMERO-PALOMO F, PEDRERA M, GARFIA B, GÓMEZ-VILLAMANDOS JC (2014) Cell-mediated immune response during experimental acute infection with bovine viral diarrhoea virus: evaluation of blood parameters. *Transbound Emerg Dis*, 61, 44-59.
- MONGE A, ELVIR AL, GONZALEZ JV, ASTIZ S, WELLENBERG GJ (2006) Bovine herpesvirus 4-associated postpartum metritis in a Spanish dairy herd. *Res Vet Sci*, 80, 120-125.
- MONTAGNARO S, CIARCIA R, PAGNINI F, DE MARTINO L, PUZIO MV, GRANATO GE, AVINO F, PAGNINI U, IOVANE G, GIORDANO A (2013) Bovine herpesvirus type 4 infection modulates autophagy in a permissive cell line. *J Cell Biochem*, 114, 1529-1535.
- MOORE SJ, O'DEA MA, PERKINS N, BARNES A, O'HARA AJ (2014) Mortality of live export cattle on long-haul voyages: pathologic changes and pathogens. *J Vet Diagn Invest*, 26, 252-265.
- MORENO E, STACKENBRANDT E, DORSCH M, WOLTERS J, BUSCH M, MAYER H (1990) Brucella abortus 16S rRNA and lipid A reveal a phylogenetic relationship with members of the alpha-2 subdivision of the Class Proteobacteria. *J Bacteriol*, 172, 3569-3576.
- MORENO E, MORIYÓN I (2006) The genus Brucella. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer KH., Stackebrandt, E. (Eds.). *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria*, Vol 5. Chapter 3.1.16.
- MORENO-LOPEZ J, GOLTZ M, REHBINDER C, VALSALA KV, LUDWIG H (1989) A bovine herpesvirus (BHV-4) as passenger virus in ethmoidal tumours in Indian cattle. *Zentralbl Veterinarmed B*, 36, 481-486.
- MORETTI B, ORFEI Z, MONDINO G, PERSECHINO A (1964) Infectious bovine rhinotracheitis, clinical observations and isolation of virus. *Vet Ital*, 15, 676-702.
- MORIYÓN I, LÓPEZ-GOÑI I (1998) Structure and properties of the outer membranes of Brucella abortus and Brucella melitensis. *Int Microbiol*, 1, 19-26.



- MUKHERJEE F, JAIN J, PATEL V, NAIR M (2007) Multiple genus-specific markers in PCR assays improve the specificity and sensitivity of diagnosis of brucellosis in field animals. *J Med Microbiol*, 56, 1309-1316.
- MULLER-DOBLIES D, ARQUINT A, SCHALLER P, HEEGAARD PM, HILBE M, ALBINI S, ABRIL C, TOBLER K, EHRENSPERGER F, PETERHANS E, ACKERMANN M, METZLER A (2004) Innate immune responses of calves during transient infection with a noncytopathic strain of bovine viral diarrhoea virus. *Clin Diagn Lab Immunol*, 11, 302-312.
- MURPHY FA, GIBBS EPI, HORZINEK MC, STUDDERT MJ (1999) *Veterinary Virology*. 3rd edn. New York: Academic Press.
- MURPHY K, TRAVERS P, WALPORT M (2008) *Janeway's Immunobiology*. New York, NY: Garland Science, p. 887.
- MURRAY CL, MARCOTRIGIANO J, RICE CM (2008) Bovine viral diarrhoea virus core is an intrinsically disordered protein that binds RNA. *J Virol*, 82, 1294-304.
- MUYLKENS B, THIRY J, KIRTEN P, SCHYNTS F, THIRY E (2007) Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. *Vet Res*, 38, 181-209.
- MWEENE AS, OKAZAKI K, KIDA H (1996) Detection of viral genome in non-neural tissues of cattle experimentally infected with bovine herpesvirus 1. *Jpn J Vet Res*, 44, 165-174.
- MYENI S, CHILD R, NG TW, KUPKO JJ 3RD, WEHRLY TD, PORCELLA SF, KNODLER LA, CELLI J (2013) Brucella modulates secretory trafficking via multiple type IV secretion effector proteins. *PLoS Pathog*, 9, e1003556.
- NAGAI M, SAKODA Y, MORI M, HAYASHI M, KIDA H, AKASHI H (2003) Insertion of cellular sequence and RNA recombination in the structural protein coding region of cytopathogenic bovine viral diarrhoea virus. *J Gen Virol*, 84, 447-452.
- NAGALINGAM M, SHOME R, BALAMURUGAN V, SHOME BR, NARAYANARAO K, VIVEKANANDA, ISLOOR S, PRABHUDAS K (2012) Molecular typing of Brucella species isolates from livestock and human. *Trop Anim Health Prod*, 44, 5-9.
- NAKATO G, HASE K, SUZUKI M, KIMURA M, ATO M, HANAZATO M, TOBIUME M, HORIUCHI M, ATARASHI R, NISHIDA N, WATARAI M, IMAOKA K, OHNO H (2012) Cutting Edge: Brucella abortus exploits a cellular prion protein on intestinal M cells as an invasive receptor. *J Immunol*. 189, 1540-4.
- NANDI S, KUMAR M, MANOHAR M, CHAUHAN RS (2009) Bovine herpes virus infections in cattle. *Anim Health Res Rev*, 10, 85-98.

- NARDELLI S, MARANGON S, DALLA POZZA M, PONZONI A, VIEL L, BRICHESE M (1999) Bovine herpesvirus 1 (BHV1) seroprevalence in the breeding cattle population of the Veneto region: prospects for the implementation of a control programme. *Zentralbl Veterinarmed B*, 46, 735-740.
- NELSON DD, DARK MJ, BRADWAY DS, RIDPATH JF, CALL N, HARUNA J, RURANGIRWA FR, EVERMANN JF (2008) Evidence for persistent Bovine viral diarrhoea virus infection in a captive mountain goat (*Oreamnos americanus*). *J Vet Diagn Invest*, 20, 752-759.
- NETA AVC, MOL JPS, XAVIER MN, PAIXÃO TA, LAGE AP, SANTOS RL (2010) Pathogenesis of bovine brucellosis. *Vet J*, 184 146–155.
- NETTLETON PF (1990) Pestivirus infections in ruminants other than cattle. *Rev Sci Tech*, 9, 131-150.
- NETTLETON PF, HERRING JA, HERRING AJ (1983) Evaluation of an immunofluorescent test for the rapid diagnosis of field infections of infectious bovine rhinotracheitis. *Vet Rec*, 112, 298-300.
- NEWCOMER BW, MARLEY MS, GALIK PK, ZHANG Y, RIDDELL KP, BOYKIN DW, KUMAR A, KUHN LA, GARD JA, GIVENS MD (2013) Effect of treatment with a cationic antiviral compound on acute infection with bovine viral diarrhoea virus. *Can J Vet Res*, 77, 170-176.
- NICOLETTI P (2002) A short history of brucellosis. *Vet Microbiol*, 90, 5-9.
- NIELSEN K (2002) Diagnosis of brucellosis by serology. *Vet Microbiol*, 90, 447-459.
- NIESTERS HGM (2001) Quantitation of viral load using real-time amplification. *Methods*, 25, 419-429.
- NIKOLIN VM, DONOFRIO G, MILOSEVIC B, TADDEI S, RADOSAVLJEVIC V, MILICEVIC V (2007) First Serbian isolates of bovine herpesvirus 4 (BoHV-4) from a herd with a history of postpartum metritis. *New Microbiol*, 30, 53-57.
- NISKANEN R, ALENIOUS S, LARSSON B, JACOBSSON SO (1991) Determination of level of antibodies to bovine virus diarrhoea virus (BVDV) in bulk tank milk as a tool in the diagnosis and prophylaxis of BVDV infections in dairy herds. *Arch Virol Suppl*, 3, 245-251.
- N'JAI AU, RIVERA J, ATAPATTU DN, OWUSU-OFORI K, CZUPRYNSKI CJ (2013) Gene expression profiling of bovine bronchial epithelial cells exposed *in vitro* to bovine herpesvirus 1 and Mannheimia haemolytica. *Vet Immunol Immunopathol*, 155, 182-189.
- NOORDEGRAAF AV, JALVINGH AW, DE JONG MC, FRANKEN P, DIJKHUIZEN AA (2000) Evaluating control strategies for outbreaks in BHV1-free areas using stochastic and spatial simulation. *Prev Vet Med*, 44, 21-42.

- NYLIN B, MADSEN KG, RØNSHOLT L (1998) Reintroduction of bovine herpes virus type 1 into Danish cattle herds during the period 1991-1995: a review of the investigations in the infected herds. *Acta VetScand*, 39, 401-413.
- ODEÓN AC, KELLING CL, MARSHALL DJ, ESTELA ES, DUBOVI EJ, DONIS RO (1999) Experimental infection of calves with bovine viral diarrhoea virus genotype II (NY-93). *J Vet Diagn Invest*, 11, 221-228.
- OGUTMAN R (1972) Brucellosis in eastern Turkey. *J Clin Pathol*, 25, 552.
- OĞUZOĞLU TÇ, MUZ D, YILMAZ V, ALKAN F, AKÇA Y, BURGU I (2010) Molecular characterization of Bovine virus diarrhoea viruses species 2 (BVDV-2) from cattle in Turkey. *Trop Anim Health Prod*, 42, 1175-1180.
- OĞUZOĞLU TÇ, MUZ D, YILMAZ V, TIMURKAN MÖ, ALKAN F, AKÇA Y, BURGU I (2012) Molecular characteristics of bovine virus diarrhoea virus 1 isolates from Turkey: approaches for an eradication programme. *Transbound Emerg Dis*, 59, 303-310.
- OHTSUKA H, UEMATSU M, SARUYAMA Y, ONO M, KOHIRUIMAKI M, ANDO T, KAWAMURA S (2009) Age-related alterations in peripheral leukocyte population of healthy Holstein dairy cows during the pre-calving period. *J Vet Med Sci*. 71, 1121-1124.
- OHTSUKA H, ONO M, SARUYAMA Y, MUKAI M, KOHIRUIMAKI M, KAWAMURA S (2011) Comparison of the peripheral blood leukocyte population between Japanese Black and Holstein calves. *Anim Sci J*, 82, 93-98.
- OIE (2008) Bovine Viral Diarrhoea. In: Terrestrial Manual, Chapter 2.4.8.  
Erişim:[[http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2.04.08\\_BVD.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.08_BVD.pdf)]  
Erişim Tarihi: 13.08.2013
- OIE (2009) Bovine brucellosis. In: Manual of Standards Diagnostic Tests and Vaccines, Chapter 2.4.3.  
Erişim:[[http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2.04.03\\_BOVINE\\_BRUCCELL.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.03_BOVINE_BRUCCELL.pdf)] Erişim Tarihi: 13.08.2013
- OIE (2009) Ovine epididymitis (*Brucella ovis*). In: Terrestrial Manual, Chapter 2.7.9. Erişim: [[http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2.07.09\\_OVINE\\_EPID.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.07.09_OVINE_EPID.pdf)]  
Erişim Tarihi: 24.12.2013
- OIE (2010) Infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis. In: Manual of Standards Diagnostic Tests and Vaccines, Chapter 2.4.13.  
Erişim:[[http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2.04.13\\_IBR\\_IPV.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.13_IBR_IPV.pdf)]  
Erişim Tarihi: 03.08.2013.
- OIRSCHOT JV, KAASHOEK MJ, RIJSEWIJK FA (1996) Advances in the development and evaluation of bovine herpesvirus 1 vaccines. *Vet Microbiol*, 53, 43-54.

- OLAFSON P, MACCALLUM AD, FOX A (1946) An apparently new transmissible disease of cattle. *Cornell Vet*, 36, 205–213.
- OLIVEIRA SC, DE OLIVEIRA FS, MACEDO GC, DE ALMEIDA LA, CARVALHO NB (2008) The role of innate immune receptors in the control of *Brucella abortus* infection: toll-like receptors and beyond. *Microbes Infect*, 10, 1005-1009.
- OLIVEIRA SC, DE ALMEIDA LA, CARVALHO NB, OLIVEIRA FS, LACERDA TL (2012) Update on the role of innate immune receptors during *Brucella abortus* infection. *Vet Immunol Immunopathol*, 148, 129-135.
- ORDUÑA A, ALMARAZ A, PRADO A, GUTIERREZ MP, GARCIA-PASCUAL A, DUEÑAS A, CUERVO M, ABAD R, HERNÁNDEZ B, LORENZO B, BRATOS MA, TORRES AR (2000) Evaluation of an immunocapture-agglutination test (Brucellacapt) for serodiagnosis of human brucellosis. *J Clin Microbiol*, 38, 4000-4005.
- ORMSBEE RW (1963) IBR and abortions. *Calif Vet*, 17, 23-28.
- OSORIO F, SRIKUMARAN S, RHODES M, CHRISTENSEN D, SRIKUMARAN P (1989) Detection of bovine herpesvirus-1-specific IgM using a capture enzyme immune assay with isotype-specific monoclonal antibodies. *J Vet Diagn Invest*, 1, 139-145.
- OSORIO FA, REED DE (1983) Experimental inoculation of cattle with bovine herpesvirus-4: evidence for a lymphoid-associated persistent infection. *Am J Vet Res*, 44, 975-980.
- OSORIO FA, ROCK DL, REED DE (1985) Studies on the pathogenesis of a bovine cytomegalo-like virus in an experimental host. *J Gen Virol*, 66, 1941-1951.
- OTLU S, SAHIN M, ATABAY HI, UNVER A (2008) Serological Investigations of Brucellosis in Cattle, Farmers and Veterinarians in the Kars District of Turkey. *Acta Vet Brno*, 77, 117-121.
- OTOMARU K, SAITO S, ENDO K, KOHIRUIMAKI M, FUKUYAMA S, OHTSUKA H (2013) Effect of supplemental vitamin E on antibody titer in Japanese black calves vaccinated against bovine herpesvirus-1. *J Vet Med Sci*, 75, 1671-1673.
- OTTER A, WELCHMAN DD, SANDVIK T, CRANWELL MP, HOLLIMAN A, MILLAR MF, SCHOLE SFE (2009) Congenital tremor and hypomyelination associated with bovine viral diarrhoea virus in 23 British cattle herds. *Vet Rec*, 164, 771–778.
- ÖCAL N, BABÜR C, YAĞCI BB, MACUN HC, ÇELEBİ B, KILIÇ S, PİR YAĞCI İ (2008) Kırıkkale yöresinde süt sığırlarında brusellozis, listeriozis ve toksoplazmozis'in seroprevalansı ve birlikte görülme sıklığı. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg*, 14, 75-81.
- ÖNCÜL S, MERİÇ İ VE KORKUT F (1964) First incidence of mucosal disease in Turkey observed among cattle at Lalahan Animal Breeding Research Institute: Clinical Aspects, *J Anim Breed Res Inst*, 4, 186-199.

- ÖNGÖR H (1999) Elazığ yöresinde atık yapmış koyunlarda brucellosis'in kan serumunda ELISA iletişimi ve diğer serolojik testlerle karşılaştırmalı araştırması. Doktora Tezi. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- ÖZTÜRK D, KALE M, PEHLIVANOĞLU F, HASIRCIOĞLU S, TÜRÜTOĞLU H (2012) Evaluation for some bacterial and viral abortions of dairy cattle farms in Burdur district of Turkey. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 18, 255-258.
- PALOMARES O, YAMAN G, AZKUR AK, AKKOC T, AKDIS M, AKDIS CA (2010) Role of Treg in immune regulation of allergic diseases. *Eur J Immunol*, 40, 1232-1240.
- PALUDAN SR, BOWIE AG, HORAN KA, FITZGERALD KA (2011) Recognition of herpesviruses by the innate immune system. *Nat Rev Immunol*, 11, 143-154.
- PARKS JB, KENDRICK JW (1973) The isolation and partial characterization of a herpesvirus from a case of bovine metritis. *Arch Gesamte Virusforsch*, 41, 211-215.
- PARLAK M, GÜDÜCÜOĞLU H, BAYRAM Y, ÇIKMAN A, AYPAK C, KILIÇ S, BERKTAŞ M (2013) Identification and determination of antibiotic susceptibilities of *Brucella* strains isolated from patients in van, Turkey by conventional and molecular methods. *Int J Med Sci*, 10, 1406-1411.
- PASQUEVICH KA, GARCÍA SAMARTINO C, CORIA LM, ESTEIN SM, ZWERDLING A, IBAÑEZ AE, BARRIONUEVO P, OLIVEIRA FS, CARVALHO NB, BORKOWSKI J, OLIVEIRA SC, WARZECHA H, GIAMBARTOLOMEI GH, CASSATARO J (2010) The protein moiety of *Brucella abortus* outer membrane protein 16 is a new bacterial pathogen-associated molecular pattern that activates dendritic cells *in vivo*, induces a Th1 immune response, and is a promising self-adjuvanting vaccine against systemic and oral acquired brucellosis. *J Immunol*, 184, 5200–5212.
- PASSLER T, WALZ PH, DITCHKOFF SS, GIVENS MD, MAXWELL HS, BROCK KV (2007) Experimental persistent infection with bovine viral diarrhea virus in white-tailed deer. *Vet Microbiol*, 122, 350-356.
- PASSLER T, DITCHKOFF SS, GIVENS MD, BROCK KV, DEYOUNG RW, WALZ PH (2010) Transmission of bovine viral diarrhea virus among white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *Vet Res*, 41, 20.
- PASTORET PP, THIRY E, BROCHIER B, DERBOVEN G (1982) Bovine herpesvirus 1 infection of cattle: pathogenesis, latency, consequences of latency. *Ann Rech Vet*, 13, 221-235.
- PATEL JR (2005) Relative efficacy of inactivated bovine herpesvirus 1 (BHV-1) vaccines. *Vaccine*, 23, 4054-4061.

- PAULSEN IT, SESHADRI R, NELSON KE, EISEN JA, HEIDELBERG JF, READ TD, DODSON RJ, UMayAM L, BRINKAC LM, BEANAN MJ, DAUGHERTY SC, DEBOY RT, DURKIN AS, KOLONAY JF, MADUPU R, NELSON WC, AYODEJI B, KRAUL M, SHETTY J, MALEK J, VAN AKEN SE, RIEDMULLER S, TETTELIN H, GILL SR, WHITE O, SALZBERG SL, HOOVER DL, LINDLER LE, HALLING SM, BOYLE SM, FRASER CM (2002) The *Brucella suis* genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99, 13148-13153.
- PEHLİVANOĞLU F, ÖZTÜRK D, GÜNLÜ S, GÜLDALI Y, TÜRÜTOĞLU H (2011) Prevalence of brucellosis in dairy herds with abortion problems. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 17, 615-620.
- PELLERIN C, VAN DEN HURK J, LECOMTE J, TUSSEN P (1994) Identification of a new group of bovine viral diarrhoea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. *Virology*, 203, 260-268.
- PELLETT PE, ROIZMAN B (2007) The family Herpesviridae: A brief introduction, In *Fields Virology*, 5th ed, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, p. 2479–2500.
- PEREZ SE, BRETSCHEIDER G, LEUNDA MR, OSORIO EA, FLORES EF, ODEÓN AC (2002) Primary infection, latency, and reactivation of bovine herpesvirus type 5 in the bovine nervous system. *Vet Pathol*, 39, 437-444.
- PERRY GH (2007) Risk assessment of transmission of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in abattoir-derived *in vitro* produced embryos. *Theriogenology*, 68, 38-55.
- PESHEV R, CHRISTOVA L (2013) Bovine Herpes virus 4 (BHV4) infection induced by stress in imported cows. *Revue Méd Vét*, 164, 3, 112-119.
- PETER AT (2000) Abortions in Dairy Cows: New Insights and Economic Impact. *Advances in Dairy Technology*, 12, 233. Erişim:[<http://www.wcds.ca/proc/2000/Manuscripts/Chapter19-Peter.pdf>] Erişim tarihi:03.08.2013.
- PETERHANS E, JUNGI TW, SCHWEIZER M (2003) BVDV and innate immunity. *Biologicals*, 31, 107-112.
- PHILIPPEN A; RENOUX G; PLOMMET M (1970) Experimental bovine brucellosis. III. Vaginal excretion of *Br. abortus* before and after calving. *Ann Rech Vet*, 1, 215-224.
- PICHLMAIR A, SOUSA CRE (2007) Innate recognition of viruses. *Immunity*, 27, 370–383.
- PIZARRO-CERDÁ J, MORENO E, GORVEL JP (2000) Invasion and intracellular trafficking of *Brucella abortus* in non phagocytic cells. *Microbes and Infect*, 2, 829–835.
- PLATT R, BURDETT W, ROTH JA (2006) Induction of antigen-specific T-cell subset activation to bovine respiratory viruses by a modified-live virus vaccine. *Am J Vet Res*, 67, 1179-1184.

- PLATT R, COUTU C, MEINERT T, ROTH JA (2008) Humoral and T cell-mediated immune response to bivalent killed bovine viral diarrhoea virus vaccine in beef cattle. *Vet Immunol Immunopathol*, 122, 8-15.
- POESTER FP, NIELSEN K, SAMARTINO LE, YU WL (2010) Diagnosis of Brucellosis. *Open Vet Sci J*, 4, 46-60.
- POESTER FP, SAMARTINO LE, SANTOS RL (2013) Pathogenesis and pathobiology of brucellosis in livestock. *Rev Sci Tech*, 32, 105-115.
- POLAK MP, ZMUDZINSKI JF (1999) Prevalence of bovine viral diarrhoea virus infection in bulls in artificial insemination centers in Poland. *Vet Microbiol*, 64, 253-257.
- POLAK MP, ZMUDZINSKI, JF (2000) Experimental inoculation of calves with laboratory strains of bovine viral diarrhoea virus. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 23, 141-151.
- POOLE PM, WHITEHOUSE DB, GILCHRIST MM (1972) A case of abortion consequent upon infection with *Brucella abortus* biotype 2. *J Clin Pathol*, 25, 882-884.
- PORTE F, NAROENI A, OUAHRANI-BETTACHE S, LIAUTARD JP (2003) Role of the *Brucella suis* lipopolysaccharide O antigen in phagosomal genesis and in inhibition of phagosome-lysosome fusion in murine macrophages. *Infect Immun*, 71, 1481-1490.
- PORTER DD, LARSEN AE, COX NA (1975) Isolation of infectious bovine rhinotracheitis virus from Mustelidae. *J Clin Microbiol*, 1, 112-113.
- QU L, MCMULLAN LK, RICE CM (2001) Isolation and characterization of noncytopathic pestivirus mutants reveals a role for nonstructural protein NS4B in viral cytopathogenicity. *J Virol*, 75, 10651-10662.
- QUEIPO-ORTUÑO MI, COLMENERO JD, REGUERA JM, GARCIA-ORDOÑEZ MA, PACHÓN ME, GONZALEZ M, MORATA P (2005) Rapid diagnosis of human brucellosis by SYBR Green I-based real-time PCR assay and melting curve analysis in serum samples. *Clin Microbiol Infect*, 11, 713-718.
- QUEIPO-ORTUÑO MI, COLMENERO JD, BRAVO MJ, GARCIA-ORDOÑEZ MA, MORATA P (2008) Usefulness of a quantitative real-time PCR assay using serum samples to discriminate between inactive, serologically positive and active human brucellosis. *Clin Microbiol Infect*, 14, 1128-1134.
- QVIST P, AASTED B, BLOCH B, MEYLING A, RØNSHOLT L, HOUE H (1990) Flow cytometric detection of bovine viral diarrhoea virus in peripheral blood leukocytes of persistently infected cattle. *Can J Vet Res*, 54, 469-472.

- QVIST P, HOUE H, AASTED B, MEYLING A (1991) Comparison of flow cytometry and virus isolation in cell culture for identification of cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. *J Clin Microbiol*, 29, 660-661.
- RAAPERI K, BOUGEARD S, ALEKSEJEV A, ORRO T, VILTROP A (2012) Association of herd BHV-1 seroprevalence with respiratory disease in youngstock in Estonian dairy cattle. *Res Vet Sci*, 93, 641-648.
- RAFIEI A, ARDESTANI SK, KARIMINIA A, KEYHANI A, MOHRAZ M, AMIRKHANI A (2006) Dominant Th1 cytokine production in early onset of human brucellosis followed by switching towards Th2 along prolongation of disease. *J Infect*, 53, 315, 324.
- RAMSEY FK, CHIVERS WH (1953) Mucosal disease of cattle. *North Am Vet*, 34, 629-634.
- REDKAR R, ROSE S, BRICKER B, DELVECCHIO V (2001) Real-time detection of *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. *Mol Cell Probes*, 15, 43-52.
- REED KE, GORBALENYA AE, RICE CM (1998) The NS5A/NS5 proteins of viruses from three genera of the family flaviviridae are phosphorylated by associated serine/threonine kinases. *J Virol*, 72, 6199-6206.
- REFAI M (2002) Incidence and control of brucellosis in the Near East region. *Vet Microbiol*, 90, 81-110.
- RENSHAW RW, RAY R, DUBOVI EJ (2000) Comparison of virus isolation and reverse transcription polymerase chain reaction assay for detection of bovine viral diarrhoea virus in bulk milk tank samples. *J Vet Diagn Invest*, 12, 184-186.
- RENUKARADHYA GJ, ISLOOR S, RAJASEKHAR M (2002) Epidemiology, zoonotic aspects, vaccination and control/eradication of brucellosis in India. *Vet Microbiol*, 90, 183-195.
- RHYAN JC, HOLLAND SD, GIDLEWSKI T, SAARI DA, JENSEN AE, EWALT DR, HENNAGER SG, OLSEN SC, CHEVILLE NF (1997) Seminal vesiculitis and orchitis caused by *Brucella abortus* biovar 1 in young bison bulls from South Dakota. *J Vet Diagn Invest*, 9, 368-374.
- RICHTER M, REIMANN I, WEGELT A, KIRKLAND PD, BEER M (2011) Complementation studies with the novel Bungowannah virus provide new insights in the compatibility of pestivirus proteins. *Virology*, 418, 113-122.
- RICHTER M, KÖNIG P, REIMANN I, BEER M (2014) N(pro) of Bungowannah virus exhibits the same antagonistic function in the IFN induction pathway than that of other classical pestiviruses. *Vet Microbiol*, 168, 340-347.
- RIDPATH JF (2010) The contribution of infections with bovine viral diarrhoea viruses to bovine respiratory disease. *Vet Clin. North Am Food Anim Pract*, 26, 335-348.



- RIDPATH JF (2013) Immunology of BVDV vaccines. *Biologicals*, 41, 14-19.
- RIDPATH JF, BOLIN SR, DUBOVI EJ (1994) Segregation of bovine viral diarrhoea virus into genotypes. *Virology*, 205, 66-74.
- RIDPATH JF, BOLIN SR (1995) Delayed onset postvaccinal mucosal disease as a result of genetic recombination between genotype 1 and genotype 2 BVDV. *Virology*, 212, 259-262.
- RIDPATH JF, BOLIN SR (1998) Differentiation of types 1a, 1b and 2 bovine viral diarrhoea virus (BVDV) by PCR. *Mol Cell Probes*, 12, 101-106.
- RIDPATH JF, BENDFELDT S, NEILL JD, LIEBLER-TENORIO E (2006) Lymphocytopathogenic activity *in vitro* correlates with high virulence *in vivo* for BVDV type 2 strains: Criteria for a third biotype of BVDV. *Virus Res*, 118, 62-69.
- RIDPATH JF, NEILL JD, CHIANG YW, WALDBILLIG J (2014) Stability of Bovine viral diarrhoea virus 1 nucleic acid in fetal bovine samples stored under different conditions. *J Vet Diagn Invest*, 26, 6-9.
- RIET-CORREA G, DUTRA DUARTE M, BARBOSA JD, CHAVES OLIVEIRA CM, DUARTE CERQUEIRA V, DE FARIAS BRITO M, RIET-CORREA F (2006) Meningoencefalite e poliencefalomalacia causada por herpesvirus bovino-5 no Estado do Pará. *Pesq Vet Brasil*, 26, 44-46.
- RIJSEWIJK FA, KAASHOEK MJ, LANGEVELD JP, MELOEN R, JUDEK J, BIENKOWSKA-SZEWCZYK K, MARIS-VELDHUIS MA, VAN OIRSCHOT JT (1999) Epitopes on glycoprotein C of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) that allow differentiation between BHV-1.1 and BHV-1.2 strains. *J Gen Virol*, 80, 1477-1483.
- RIOND B, WEISSENBACHER S, HOFMANN-LEHMANN R, LUTZ H (2011) Performance evaluation of the Sysmex poch-100iV Diff hematology analyzer for analysis of canine, feline, equine, and bovine blood. *Vet Clin Pathol*, 40, 84-95.
- RISSI DR, PIEREZAN F, SÁ E SILVA M, FLORES EF, DE BARROS CS (2008) Neurological disease in cattle in southern Brazil associated with Bovine herpesvirus infection. *J Vet Diagn Invest*, 20, 346-349.
- ROBINSON KE, MEERS J, GRAVEL JL, MCCARTHY FM, MAHONY TJ (2008) The essential and non-essential genes of bovine herpesvirus 1. *J Gen Virol*, 89, 2851-2863.
- ROCK D, LOKENSGARD J, LEWIS T, KUTISH G (1992) Characterization of dexamethasone-induced reactivation of latent bovine herpesvirus 1. *J Virol*, 66, 2484-2490.
- ROIZMAN B, DESROSIERS RC, FLECKENSTEIN B, LOPEZ C, MINSON AC, STUDDERT MJ (1992) The family Herpesviridae: an update. *Arch Virol*, 123, 425-449.

- ROIZMAN B, GU H, MANDEL G (2005) The first 30 minutes in the life of a virus: unREST in the nucleus. *Cell Cycle*, 4, 1019-1021.
- ROIZMAN B, TADDEO B (2007) The strategy of herpes simplex virus replication and takeover of the host cell. Chapter 13 In: Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E, Moore PS, Roizman B, Whitley R and Yamanishi K (eds) *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. Cambridge: Cambridge University Press, p. 163–173.
- ROIZMAN B, KNIPE DM, WHITLEY RJ (2007) Herpes simplex viruses, in *Fields Virology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p. 2501-2601.
- ROLA J, LARSKA M, POLAK MP (2005) Detection of bovine herpesvirus 1 from an outbreak of infectious bovine rhinotracheitis. *Bull Vet Inst Pulawy*, 49, 267-271.
- ROMERA SA, HILGERS LA, PUNTEL M, ZAMORANO PI, ALCON VL, DUS SANTOS MJ, BLANCO VIERA J, BORCA MV, SADIR AM (2001) Adjuvant effects of sulfolipocyclodextrin in a squalane-in-water and water-in-mineral oil emulsions for BHV-1 vaccines in cattle. *Vaccine*, 19, 132-141.
- RONECKER S, ZIMMER G, HERRLER G, GREISER-WILKE I, GRUMMER B (2008) Formation of bovine viral diarrhea virus E1-E2 heterodimers is essential for virus entry and depends on charged residues in the transmembrane domains. *J Gen Virol*, 89, 2114-2121.
- ROOP RM II, GAINES JM, ANDERSON ES, CASWELL CC, MARTIN DW (2009) Survival of the fittest: how *Brucella* strains adapt to their intracellular niche in the host. *Med Microbiol Immunol*, 198, 221-238.
- ROS C, BELAK S (1999) Studies of genetic relationships between bovine, caprine, cervine and rangiferine alphaherpesviruses and improved molecular methods for virus detection and identification. *J Clin Microbiol*, 37, 1247-1253.
- ROS C, RIQUELME ME, OHMAN FORSLUND K, BELAK S (1999) Improved detection of five closely related ruminant alphaherpesviruses by specific amplification of viral genome sequences. *J Virol Methods*, 83, 55-65.
- ROSHKHXARI 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.
- ROSSITER PB, GUMM ID, STAGG DA, CONRAD PA, MUKOLWE S, DAVIES FG, WHITE H (1989) Isolation of bovine herpesvirus-3 from African buffaloes (*Syncerus caffer*). *Res Vet Sci*, 46, 337-343.
- RUCKERBAUER GM, GIRARD A, BANNISTER GL, BOULANGER P (1971) Studies on bovine virus diarrhea: serum neutralization, complement-fixation and immunofluorescence. *Can J Comp Med*, 35, 230-238.

- RÜMENAPF T, UNGER G, STRAUSS JH, THIEL HJ (1993) Processing of the envelope glycoproteins of pestiviruses. *J Virol*, 67, 3288-3294.
- RÜMENAPF T, STARK R, HEIMANN M, THIEL HJ (1998) N-terminal protease of pestiviruses: identification of putative catalytic residues by site-directed mutagenesis. *J Virol*, 72, 2544-2547.
- SAGAR M. GOYAL, JULIA F. RIDPATH (2008) Bovine Viral Diarrhea Virus: Diagnosis, Management and Control. John Wiley & Sons, p. 85.
- SALIKI JT, FULTON RW, HULL SR, DUBOVI EJ (1997) Microtiter virus isolation and enzyme immunoassays for detection of bovine viral diarrhea virus in cattle serum. *J Clin Microbiol*, 35, 803-807.
- SALVADOR JC, LEMOS RAA, RIET-CORREA F, ROEHE PM, OSORÍO AR (1998) Meningoencefalite em bovinos causada por herpesvirus bovino-5 no Mato Grosso do Sul e Sao Paulo. *Pesq Vet Brasil*, 18, 75-82.
- SAMARTINO LE, ENRIGHT FM (1993) Pathogenesis of abortion of bovine brucellosis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 16, 95-101.
- SANDVIK T (1999) Laboratory diagnostic investigations for bovine viral diarrhoea virus infections in cattle. *Vet Microbiol*, 64, 123-134.
- SANDVIK T (2005) Selection and use of laboratory diagnostic assays in BVD control programmes. *Prev Vet Med*, 72, 3-16.
- SANDVIK T, KROGSRUD J (1995) Evaluation of an antigen-capture ELISA for detection of bovine viral diarrhea virus in cattle blood samples. *J Vet Diagn Invest*, 7, 65-71.
- SANGARI FJ, AGÜERO J (1994) Identification of Brucella abortus B19 vaccine strain by the detection of DNA polymorphism at the ery locus. *Vaccine*, 12, 435-438.
- SANGARI FJ, GARCÍA-LOBO JM, AGÜERO J (1994) The Brucella abortus vaccine strain B19 carries a deletion in the erythritol catabolic genes. *FEMS Microbiol Lett*, 121, 337-342.
- SANGARI FJ, SEOANE A, RODRÍGUEZ MC, AGÜERO J, GARCÍA LOBO JM (2007) Characterization of the urease operon of Brucella abortus and assessment of its role in virulence of the bacterium. *Infect Immun*, 75, 774-780.
- SANTURDE G, DA SILVA N, VILLARES R, TABARES E, SOLANA A, BAUTISTA JM, CASTRO JM (1996) Rapid and high sensitivity test for direct detection of bovine herpesvirus-1 genome in clinical samples. *Vet Microbiol*, 49, 81-92.

- SARIKAYA B, AZKUR AK, GAZYAGCI S (2011) Inactivated bovine viral diarrhoea virus vaccine trigger leucopenia and lymphopenia on calves. *Acta Sci Vet*, 39, 994.
- SARIKAYA B, AZKUR AK, GAZYAGCI S, ASLAN ME (2012) Genetic Variability of Bovine Viral Diarrhoea Virus in the 5'-UTR in the Central Anatolia of Turkey. *Acta Sci Vet*, 40, 1013.
- SCAHAW (2000) Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare: Report on Bovine Herpesvirus 1 (BHV1) marker vaccines and the accompanying tests. European Commission, Sanco/ C3/AH/R20/2000, p. 2.
- SCHALM OW (1965) *Veterinary Hematology*, 2nd ed. Philadelphia, PA: Lea and Febiger, p.220.
- SCHALM OW (1975) *Veterinary Hematology*, 3rd ed. Philadelphia, PA: Lea and Febiger, p.122.
- SCHANG LM, HOSSAIN A, JONES C (1996) The latency-related gene of bovine herpesvirus 1 encodes a product which inhibits cell cycle progression. *J Virol*, 70, 3807-3814.
- SCHNEIDER R, UNGER G, STARK R, SCHNEIDER-SCHERZER E, THIEL HJ (1993) Identification of a structural glycoprotein of an RNA virus as a ribonuclease. *Science*, 261, 1169-1171.
- SCHRIJVER RS, KRAMPS JA (1998) Critical factors affecting the diagnostic reliability of enzyme-linked immunosorbent assay formats. *Rev Sci Tech*, 17, 550-561.
- SCHROEDER RJ, MOYS MD (1954) An acute upper respiratory infection of dairy cattle. *J Am Vet Med Assoc*, 125, 471-472.
- SCHUDEL AA, CARRILLO BJ, WYLER R, METZLER AE (1986) Infections of calves with antigenic variants of bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) and neurological disease. *Zentralbl Veterinarmed B*, 33, 303-310.
- SCHUSTER P, BOSCHEINEN JB, TENNERT K, SCHMIDT B (2011) The role of plasmacytoid dendritic cells in innate and adaptive immune responses against alpha herpes virus infections. *Adv Virol*, 2011:679271.
- SCHWEIZER M, MÄTZENER P, PFAFFEN G, STALDER H, PETERHANS E (2006) Self and "nonself" manipulation of interferon defense during persistent infection: bovine viral diarrhoea virus resists alpha/beta interferon without blocking antiviral activity against unrelated viruses replicating in its host cells. *J Virol*, 80, 6926-6935.
- SCHWYZER M, ACKERMANN M (1996) Molecular virology of ruminant herpesviruses. *Vet Microbiol*, 53, 17-29.

- SCHYNTS F, BARANOWSKI E, LEMAIRE M, THIRY E (1999) A specific PCR to differentiate between gE negative vaccine and wildtype bovine herpesvirus type 1 strains. *Vet Microbiol*, 66, 187-195.
- SCHYNTS F, MCVOY MA, MEURENS F, DETRY B, EPSTEIN AL, THIRY E (2003) The structures of bovine herpesvirus 1 virion and concatemeric DNA: implications for cleavage and packaging of herpesvirus genomes. *Virology*, 314, 326–335.
- SCOTT DE, AGRANOVICH I, INMAN J, GOBER M, GOLDING B (1997) Inhibition of primary and recall allergen-specific Th2-mediated responses by a Th1 stimulus. *J Immunol*, 159 107-116.
- SELEEM MN, BOYLE SM, SRIRANGANATHAN N (2010) Brucellosis: a re-emerging zoonosis. *Vet Microbiol*, 140, 392-398.
- SHAW MH, REIMER T, KIM YG, NUÑEZ G (2008) NOD-like receptors (NLRs): bona fide intracellular microbial sensors. *Curr Opin Immunol*, 20, 377-382.
- SIKDER S, RAHMAN SMM, ALIM MDA, DAS S (2012) Haematological Variations in *Brucella abortus* Antibody Positive Cross-bred Cattle at Chittagong, Bangladesh. *YYU Vet Fak Derg*, 23, 125-128.
- SILFLOW RM, DEGEL PM, HARMSSEN AG (2005) Bronchoalveolar immune defense in cattle exposed to primary and secondary challenge with bovine viral diarrhoea virus. *Vet Immunol Immunopathol*, 103, 129-139.
- SILVA LF, JONES CJ (2012) Two microRNAs encoded within the bovine herpesvirus 1 latency-related gene promote cell survival by interacting with RIG-I and stimulating NF- $\kappa$ B-dependent transcription and beta interferon signaling pathways. *Virol*, 86, 1670-1682.
- SILVA AM, WEIBLEN R, IRIGOYEN LF, ROEHE PM, SUR HJ, OSORIO FA, FLORES EF (1999) Experimental infection of sheep with bovine herpesvirus type-5 (BHV-5): acute and latent infection. *Vet Microbiol*, 66, 89-99.
- SILVA-FRADE C, GAMEIRO R, MARTINS JUNIOR A, CARDOSO TC (2010b) Apoptotic and developmental effects of bovine herpesvirus type-5 infection on *in vitro*-produced bovine embryos. *Theriogenology*, 74, 1296-1303.
- SILVA-FRADE C, MARTINS JUNIOR A, BORSANELLI AC, CARDOSO TC (2010a) Effects of bovine herpesvirus type 5 on development of *in vitro* produced bovine embryos. *Theriogenology*, 73, 324-331.
- SKENDROS P, PAPPAS G, BOURA P (2011) Cell-mediated immunity in human brucellosis. *Microbes Infect*, 13, 134-142.
- SKENDROS P, BOURA P (2013) Immunity to brucellosis. *Rev Sci Tech*, 32, 137-147.

- SMIRNOVA NP, BIELEFELDT-OHMANN H, VAN CAMPEN H, AUSTIN KJ, HAN H, MONTGOMERY DL, SHOEMAKER ML, VAN OLPHEN AL, HANSEN TR (2008) Acute non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus infection induces pronounced type I interferon response in pregnant cows and fetuses. *Virus Res*, 132, 49-58.
- SMIRNOVA NP, WEBB BT, BIELEFELDT-OHMANN H, VAN CAMPEN H, ANTONIAZZI AQ, MORARIE SE, HANSEN TR (2012) Development of fetal and placental innate immune responses during establishment of persistent infection with bovine viral diarrhoea virus. *Virus Res*, 167, 329-336.
- SMIRNOVA NP, WEBB BT, MCGILL JL, SCHAUT RG, BIELEFELDT-OHMANN H, VAN CAMPEN H, SACCO RE, HANSEN TR (2014) Induction of interferon-gamma and downstream pathways during establishment of fetal persistent infection with bovine viral diarrhoea virus. *Virus Res*, 183, 95-106.
- SMITH H, WILLIAMS AE, PEARCE JH, KEPPIE J, HARRIS-SMITH PW, FITZ-GEORGE RB, WITT K (1962) Foetal erythritol: a cause of the localization of *Brucella abortus* in bovine contagious abortion. *Nature*, 193, 47-49.
- SMITH KC (1997) Herpesviral abortion in domestic animals. *Vet J*, 153, 253-268.
- SNAPPER CM, PAULWE (1987) Interferon- $\gamma$  and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. *Science*, 236, 944-947.
- SOUZA DG, SILVA-FRADE C, MARTINS AJR, CARDOSO TC (2011) Bull semen variables after experimental exposure with Bovine Herpesvirus type 5. *Anim Reprod Sci*, 124, 55-60.
- SPERRY JF, ROBERTSON DC (1975) Erythritol catabolism by *Brucella abortus*. *J Bacteriol*, 121, 619-630.
- SPIPKI FR, ESTEVES PA, DE LIMA M, FRANCO AC, CHIMINAZZO C, FLORES EF, WEIBLEN R, DRIEMEIER D, ROEHE PM (2004a) Comparative pathogenicity of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) subtypes 1 (BHV-1.1) and 2a (BHV-1.2a). *Pesq Vet Brasil*, 24, 43-49.
- SPIPKI FR, SILVA AD, HÜBNER S, ESTEVES PA, FRANCO AC, DRIEMEIER D, ROEHE PM (2004b) Partial protection induced by a BHV-1 recombinant vaccine against challenge with BHV-5. *Ann N Y Acad Sci*, 1026, 247-250.
- SPIPKI FR, ESTEVES PA, DA SILVA AD, FRANCO AC, RIJSEWIJK FA, ROEHE PM (2005) A monoclonal antibody-based ELISA allows discrimination between responses induced by bovine herpesvirus subtypes 1 (BoHV-1.1) and 2 (BoHV-1.2). *J Virol Methods*, 129, 191-193.
- SRIRANGANATHAN N, SELEEM MN, OLSEN SC, SAMARTINO LE, WHATMORE AM, BRICKER B, CALLAGHAN DO, HALLING SM, CRASTA OR, WATTAM AR, PURKAYASTHA A, SOBRAL BW, SNYDER EE, WILLIAMS KP, YU G, FICHT TA, ROOP RM, DEFIGUEIREDO P, BOYLE SM, HE Y, TSOLIS RM (2009) Genome mapping

and genomics in animal-associated microbes V. Nene, C. Kole (Eds.) Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

- STARK R, MEYERS G, RÜMENAPF T, THIEL HJ (1993) Processing of pestivirus polyprotein: cleavage site between autoprotease and nucleocapsid protein of classical swine fever virus. *J Virol*, 67, 7088-7095.
- STARR T, NG TW, WEHRLY TD, KNODLER LA, CELLI J (2008) Brucella intracellular replication requires trafficking through the late endosomal/lysosomal compartment. *Traffic*, 9, 678–694.
- STEFFEN DJ, TOPLIFF CL, SCHMITZ JA, KAMMERMAN JR, HENNINGSON JN, ESKRIDGE KM, KELLING CL (2014) Distribution of lymphoid depletion and viral antigen in alpacas experimentally infected with Bovine viral diarrhoea virus 1. *J Vet Diagn Invest*, 26, 35-41.
- STEFFENS S, THIEL HJ, BEHRENS SE (1999) The RNA-dependent RNA polymerases of different members of the family Flaviviridae exhibit similar properties *in vitro*. *J Gen Virol*, 80, 2583-2590.
- STEVENS MG, HENNAGER SG, OLSEN SC, CHEVILLE NF (1994) Serologic responses in diagnostic tests for brucellosis in cattle vaccinated with Brucella abortus 19 or RB51. *J Clin Microbiol*, 32, 1065-1066.
- STOFFREGEN B, BOLIN SR, RIDPATH JF, POHLENZ J (2000) Morphologic lesions in type 2 BVDV infections experimentally induced by strain BVDV2-1373 recovered from a field case. *Vet Microbiol*, 77, 157-162.
- STOKSTAD M, NISKANEN R, LINDBERG A, THORÉN P, BELÁK S, ALENIUS S, LØKEN T (2003) Experimental infection of cows with bovine viral diarrhoea virus in early pregnancy—findings in serum and foetal fluids. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, 50, 424-429.
- STORZ J, EHLERS B, TODD WJ, LUDWIG H (1984) Bovine cytomegaloviruses: identification and differential properties. *J Gen Virol*, 65, 697-706.
- STRAUB OC (1990) Infectious bovine rhinotracheitis virus. In: Dinter Z and Morein B (eds) Virus Infections of Ruminants. Oxford: Elsevier Science Publishers BV, p. 71–108.
- STRAUB OC (1991) BHV-1 infections: Relevance and spread in Europe. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 14, 175-186.
- SUVAS S, AZKUR AK, KIM BS, KUMARAGURU U, ROUSE BT (2004) CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells control the severity of viral immunoinflammatory lesions. *J Immunol*, 172, 4123-4132.

- SUZICH JA, TAMURA JK, PALMER-HILL F, WARRENER P, GRAKOUİ A, RICE CM, FEINSTONE SM, COLLETT MS (1993) Hepatitis C virus NS3 protein polynucleotide-stimulated nucleoside triphosphatase and comparison with the related pestivirus and flavivirus enzymes. *J Virol*, 67, 6152-6158.
- ŞAHİN M, GENÇ O, UNVER A, OTLU S (2008) Investigation of bovine brucellosis in the Northeastern Turkey. *Trop Anim Health Prod*, 40, 281-286.
- ŞİMŞEK A, ÖZTÜRK F (1997) Klinik olarak sağlıklı sığır sürülerinde persiste Bovine Viral Diarrhea Virus enfeksiyonlarının araştırılması ve epizootiyolojik önemi. *Eurasian J Vet Sci*, 13, 113-119.
- TAKAOKA A, YANAI H (2006) Interferon signalling network in innate defence. *Cell Microbiol*, 8, 907-922.
- TAKEUCHI O, AKIRA S (2010) Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*, 140, 805-820.
- TALESKI V, ZERVA L, KANTARDJIEV T, CVETNIC Z, ERSKI-BILJIC M, NIKOLOVSKI B, BOSNJAKOVSKI J, KATALINIC-JANKOVIC V, PANTELIADOU A, STOJKOSKI S, KIRANDZISKI T (2002) An overview of the epidemiology and epizootology of brucellosis in selected countries of Central And Southeast Europe. *Vet Microbiol*, 90, 147-155.
- TAN MT, YILDIRIM Y, EROL N, GÜNGÖR AB (2006b) The Seroprevalence of Bovine Herpes Virus type 1 (BHV-1) and Bovine Leukemia Virus (BLV) in Selected Dairy Cattle Herds in Aydin Province Turkey. *Turk J Vet Anim Sci*, 30, 353-357.
- TAN MT, KARAOĞLU MT, EROL N, YILDIRIM Y (2006a) Serological and Virological Investigations of Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) Infection in Dairy Cattle Herds in Aydin Province. *Turk J Vet Anim Sci*, 30, 299-304.
- TANG Q, WU YQ, CHEN DS, ZHOU Q, CHEN HC, LIU ZF (2014) Bovine herpesvirus 5 encodes a unique pattern of microRNAs compared with Bovine herpesvirus 1. *J Gen Virol*, 95, 671-678.
- TANYI J, VARGA J (1992) Guidelines for the eradication of infectious bovine rhinotracheitis in Hungary. *Acta Vet Hung*, 40, 165-169.
- TAUTZ N, THIEL HJ, DUBOVI EJ, MEYERS G (1994) Pathogenesis of mucosal disease: A cytopathogenic pestivirus generated by an internal deletion. *J Virol*, 68, 3289-3297.
- TAYLOR RE, SEAL BS, ST JEOR S (1982) Isolation of infectious bovine rhinotracheitis virus from the soft-shelled tick, *Ornithodoros coriaceus*. *Science*, 216, 300-301.
- TELLINGHUISEN TL, PAULSON MS, RICE CM (2006) The NS5A protein of bovine viral diarrhoea virus contains an essential zinc-binding site similar to that of the hepatitis C virus NS5A protein. *J Virol*, 80, 7450-7458.



- TESSARO SV, FORBES LB (2004) Experimental Brucella abortus infection in wolves. *J Wildl Dis*, 40, 60-65.
- TEZOK ÖF, SAĞLAM M, GÜMRÜKÇÜ E, SÖZEN TH (1973) Türkiye’de insan brusella enfeksiyonları. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 04, 341-350.  
Erişim:[[http://www.mikrobiyolbul.org/managete/fu\\_folder/1973-04/1973-07-04-341-350.pdf](http://www.mikrobiyolbul.org/managete/fu_folder/1973-04/1973-07-04-341-350.pdf)]  
Erişim Tarihi:13.05.2014
- THE MERCK VETERINARY MANUAL (2012) Hematologic Reference Ranges, Online. Erişim: [[http://www.merckmanuals.com/vet/appendixes/reference\\_guides/hematologic\\_referen ce\\_ranges.html#top](http://www.merckmanuals.com/vet/appendixes/reference_guides/hematologic_referen ce_ranges.html#top).] Erişim Tarihi:21.05.2014.
- THIRY E, DUBUISSON J, PASTORET PP (1986) Pathogenesis, latency and reactivation of infections by herpesviruses. *Revue Sc Techn Office Intern Epiz*, 5, 809-836.
- THIRY E, SALIKI J, BUBLOT M, PASTORET PP (1987). Reactivation of infectious bovine rhinotracheitis virus by transport. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 10, 59-63.
- THIRY E, DUBUISSON J, BUBLOT M, VAN BRESSEM MF, PASTORET PP (1990) The biology of bovine herpesvirus-4 infection of cattle. *Dtsch Tierarztl Wochenschr*, 97, 72-77.
- THIRY E, BUBLOT M, DUBUISSON J, VAN BRESSEM MF, LEQUARRE AS, LOMONTE P, VANDERPLASSCHEN A, PASTORET PP (1992) Molecular biology of bovine herpesvirus type-4. *Vet Microbiol*, 33, 79-92.
- TIKOO SK, CAMPOS M, BABIUK LA (1995) Bovine herpesvirus 1 (BHV-1): biology, pathogenesis, and control. *Adv Virus Res*, 45, 191-222.
- TIZARD IR (2009) Veterinary Immunology, 8th ed, CBS Publishers & Distributors, p.258.
- TODD WJ, STORZ J (1983) Morphogenesis of a cytomegalovirus from an American bison affected with malignant catarrhal fever. *J Gen Virol*, 64, 1025-1030.
- TOLOMEO M, DI CARLO P, ABBADESSA V, TITONE L, MICELI S, BARBUSCA E, CANNIZZO G, MANCUSO S, ARISTA S, SCARLATA F (2003) Monocyte and lymphocyte apoptosis resistance in acute and chronic brucellosis and its possible implications in clinical management. *Clin Infect Dis*, 36, 1533-1538.
- TOTH RL, NETTLETON PF, MCCRAE MA (1999) Expression of the E2 envelope glycoprotein of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) elicits virus-type specific neutralising antibodies. *Vet Microbiol*, 65, 87-101.
- TRANGADIA B, RANA SK, MUKHERJEE F, SRINIVASAN VA (2010) Prevalence of brucellosis and infectious bovine rhinotracheitis in organized dairy farms in India. *Trop Anim Health Prod*, 42, 203-207.

- TRAPP S, KÖNIG P, BEER M (2003) Conventional and marked BHV-1 vaccines in Germany: a brief review. (In German), *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, 116, 208-15.
- TRATSCHIN JD, MOSER C, RUGGLI N, HOFMANN MA (1998) Classical swine fever virus leader proteinase Npro is not required for viral replication in cell culture. *J Virol*, 72, 7681-7684.
- TRICHARD CJ, HERR S, BASTIANELLO SS, ROUX D (1982) Unilateral orchitis in a bull caused by *Brucella abortus* biotype 1. *J S Afr Vet Assoc*, 53, 60-62.
- TRUMAN D, LUDWIG H, STORZ J (1986) Bovine herpesvirus type 4: Studies on the biology and spread in cattle herds and in insemination bulls. *J Vet Med B*, 33, 485-501.
- TSUBOI T, IMADA T (1998) Bovine viral diarrhoea virus replication in bovine follicular epithelial cells derived from persistently infected heifers. *J Vet Med Sci*, 60, 569-572.
- TURIN L, RUSSO S (2003) BHV-1 infection in cattle: an update. *Vet Bull*, 73, 16-21.
- TURIN L, RUSSO S, POLI G (1999) BHV-1: new molecular approaches to control a common and widespread infection. *Mol Med*, 5, 261-284.
- VALERA AR, FUENTEALBA NA, ZANUZZI CN, CORVA SG, PECORARO MR, BARBEITO CG, GALOSI CM (2013) Systemic infection induced by intranasal inoculation of Bovine herpesvirus 1.1 in pregnant and non-pregnant rabbits. *Res Vet Sci*, 95, 709-716.
- VALLE PS, SKJERVE E, MARTIN SW, LARSEN RB, ØSTERÅS O, NYBERG O (2005) Ten years of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) control in Norway: a cost-benefit analysis. *Prev Vet Med*, 72, 189-207.
- VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK S, TIKOO SK, LIANG X, BABIUK LA (1993) Bovine herpesvirus-1 vaccines. *Immunol Cell Biol*, 71, 405-420.
- VAN ENGELENBURG FA, VAN SCHIE FW, RIJSEWIJK FA, VAN OIRSCHOT JT (1995) Excretion of bovine herpesvirus 1 in semen is detected much longer by PCR than by virus isolation. *J Clin Microbiol*, 33, 308-312.
- VAN ENGELENBURG FA, MAES RK, VAN OIRSCHOT JT, RIJSEWIJK FA (1993) Development of a rapid and sensitive polymerase chain reaction assay for the detection of bovine herpesvirus type 1 in bovine semen. *J Clin Microbiol*, 31, 3129-3135.
- VAN OIRSCHOT JT (1995) Bovine herpesvirus 1 in semen of bulls and the risk of transmission: a brief review. *Vet Q*, 17, 29-33.

- VAN OIRSCHOT JT, KAASHOEK MJ, MARIS-VELDHUIS MA, WEERDMEESTER K, RIJSEWIJK FA (1997) An enzyme-linked immunosorbent assay to detect antibodies against glycoprotein gE of bovine herpesvirus 1 allows differentiation between infected and vaccinated cattle. *J Virol Methods*, 67, 23-34.
- VAN OIRSCHOT JT, BRUSCHKE CJ, VAN RIJN PA (1999) Vaccination of cattle against bovine viral diarrhoea. *Vet Microbiol*, 64, 169-183.
- VAN OPDENBOSCH E, WELLEMANS G, OOMS LA, DEGRYSE AD (1988) BHV4 (bovine herpes virus 4) related disorders in Belgian cattle: a study of two problem herds. *Vet Res Commun*, 12, 347-353.
- VAN SANTEN VL (1993) Characterization of a bovine herpesvirus 4 immediate-early RNA encoding a homolog of the Epstein-Barr virus R transactivator. *J Virol*, 67, 773-784.
- VAN SCHAIK G, SCHUKKEN YH, NIELEN M, DIJKHUIZEN AA, BENEDICTUS G (2001) Risk factors for introduction of BHV1 into BHV1- free Dutch dairy farms: a case-control study. *Vet Q*, 23,71-76.
- VANDERPLASSCHEN A, GOLTZ M, LYAKU J, BENARAF A, BUHK HJ, THIRY E, PASTORET PP (1995) The replication *in vitro* of the gammaherpesvirus bovine herpesvirus 4 is restricted by its DNA synthesis dependence on the S phase of the cell cycle. *Virology*, 213, 328-340.
- VANROOSE G, NAUWYNCK H, VAN SOOM A, VANOPDENBOSCH E, DE KRUIF A (1998) Replication of cytopathic and noncytopathic bovine viral diarrhoea virus in zona-free and zona-intact *in vitro*-produced bovine embryos and the effect on embryo quality. *Biol Reprod*, 58, 857-866.
- VILCEK S, HERRING AJ, HERRING JA, NETTLETON PF, LOWINGS JP, PATON DJ (1994) Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. *Arch Virol*, 136, 309-323.
- VILCEK S, PATON DJ, DURKOVIC B, STROJNY L, IBATA G, MOUSSA A, LOITSCH A, ROSSMANITH W, VEGA S, SCICLUNA MT, PAIFI V (2001) Bovine viral diarrhoea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups. *Arch Virol*, 146, 99-115.
- VILCEK S, DURKOVIC B, KOLESÁROVÁ M, GREISER-WILKE I, PATON D (2004) Genetic diversity of international bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates: identification of a new BVDV-1 genetic group. *Vet Res*, 35, 609-615.
- VITRY MA, DE TREZ C, GORIELY S, DUMOUTIER L, AKIRA S, RYFFEL B, CARLIER Y, LETESSON JJ, MURAILLE E (2007) Crucial role of gamma interferon-producing CD4+ Th1 cells but dispensable function of CD8+ T cell, B cell, Th2, and Th17 responses in the control of *Brucella melitensis* infection in mice. *Vet Immunol Immunopathol*, 120, 148-59.

- VOGEL FS, CARON L, FLORES EF, WEIBLEN R, WINKELMANN ER, MAYER SV, BASTOS RG (2003). Distribution of bovine herpesvirus type 5 DNA in the central nervous systems of latently, experimentally infected calves. *J Clin Microbiol*, 41, 4512-4520.
- WALDROP JG, STRINGFELLOW DA, GALIK PK, RIDDELL KP, RIDDELL MG, GIVENS MD, CARSON RL (2004) Infectivity of bovine viral diarrhea virus associated with *in vivo*-derived bovine embryos. *Theriogenology*, 62, 387-397.
- WALZ PH, BELL TG, STEFICEK BA, KAISER L, MAES RK, BAKER JC (1999) Experimental model of type II bovine viral diarrhea virus-induced thrombocytopenia in neonatal calves. *J Vet Diagn Invest*, 11, 505-514.
- WALZ PH, BELL TG, GROOMS DL, KAISER L, MAES RK, BAKER JC (2001) Platelet aggregation responses and virus isolation from platelets in calves experimentally infected with type I or type II bovine viral diarrhea virus. *Can J Vet Res*, 65, 241-247.
- WANG J, ALEXANDER J, WIEBE M, JONES C (2014) Bovine herpesvirus 1 productive infection stimulates inflammasome formation and caspase 1 activity. *Virus Res*, 185, 72-76.
- WANG P, HURLEY DJ, BRAUN LJ, CHASE CC (2001) Detection of bovine herpesvirus-1 in peripheral blood mononuclear cells eight months postinfection. *J Vet Diagn Invest*, 13, 424-427.
- WARRENER P, COLLETT MS (1995) Pestivirus NS3 (p80) protein possesses helicase activity. *J Virol*, 69, 1720-1726.
- WELLEMANS G, VAN OPDENBOSCH E, MAMMERÏCKX M (1986) Experimental inoculation of bovine herpesvirus 4 (strain LVR 140) in pregnant and nonpregnant cows (in French). *Ann Rech Vet*, 17, 89-94.
- WELLENBERG GJ, VERSTRATEN ER, MARS MH, VAN OIRSCHOT JT (1998) Detection of bovine herpesvirus 1 glycoprotein E antibodies in individual milk samples by enzyme-linked immunosorbent assays. *J Clin Microbiol*, 36, 409-413.
- WELLENBERG GJ, MARS MH, VAN OIRSCHOT JT (2001a) Antibodies against bovine herpesvirus (BHV) 5 may be differentiated from antibodies against BHV1 in a BHV1 glycoprotein E blocking ELISA. *Vet Microbiol*, 78, 79-84.
- WELLENBERG GJ, VERSTRATEN ER, BELÁK S, VERSCHUREN SB, RIJSEWIJK FA, PESHEV R, VAN OIRSCHOT JT (2001b) Detection of bovine herpesvirus 4 glycoprotein B and thymidine kinase DNA by PCR assays in bovine milk. *J Virol Methods*, 97, 101-112.
- WELLENBERG GJ, BRUSCHKE CJ, WISSELINK HJ, BARKEMA HW, VAN OIRSCHOT JT (2002) Simultaneous intramammary and intranasal inoculation of lactating cows with bovine herpesvirus 4 induce subclinical mastitis. *Vet Microbiol*, 86, 115-129.

- WENTINK GH, VAN OIRSCHOT JT, VERHOEFF J (1993) Risk of infection with bovine herpes virus 1 (BHV1): a review. *Vet Q*, 15, 30-33.
- WHATMORE AM (2009) Current understanding of the genetic diversity of *Brucella*, an expanding genus of zoonotic pathogens. *Infect Genet Evol*, 9, 1168-1184.
- WHITE PJ, TREANOR JJ, GEREMIA C, WALLEN RL, BLANTON DW, HALLAC DE (2013) Bovine brucellosis in wildlife: using adaptive management to improve understanding, technology and suppression. *Rev Sci Tech*, 32, 263-270.
- WHO (2006) Brucellosis in human and animal. World Health Organization for Animal Health and FAO. Geneva. Erişim: [<http://www.who.int/csr/resources/publications/Brucellosis.pdf>] Erişim Tarihi: 14.05.2014
- WILD P, SCHRANER EM, PETER J, LOEPFE E, ENGELSM (1998) Novel entry pathway of bovine herpesvirus 1 and 5. *J Virol*, 72, 9561-9566.
- WINDEYER MC, LESLIE KE, GODDEN SM, HODGINS DC, LISSEMORE KD, LEBLANC SJ (2012) The effects of viral vaccination of dairy heifer calves on the incidence of respiratory disease, mortality, and growth. *J Dairy Sci*, 95, 6731-6739.
- WINKLER MT, DOSTER A, JONES C (2000) Persistence and reactivation of bovine herpesvirus 1 in the tonsils of latently infected calves. *J Virol*, 74, 5337-5346.
- WIRTH UV, GUNKEL K, ENGELS M, SCHWYZER M (1989) Spatial and temporal distribution of bovine herpesvirus 1 transcripts. *J Virol*, 63, 4882-4889.
- WOOD D, QUIROZ-ROCHA GF (2010) Schalm's Veterinary Hematology, Vol. 6 Wiley- Blackwell, Ames-USA, P. 833.
- WRATHALL AE, SIMMONS HA, VAN SOOM A (2006) Evaluation of risks of viral transmission to recipients of bovine embryos arising from fertilisation with virus-infected semen. *Theriogenology*, 65, 247-274.
- XAVIER MN, COSTA ÉA, PAIXÃO TA, SANTOS RL (2009a) The genus *Brucella* and clinical manifestations of brucellosis. *Ciência Rural*, 39, 2252-2260.
- XAVIER MN, PAIXÃO TA, POESTER FP, LAGE AP, SANTOS RL (2009b). Pathological, immunohistochemical and bacteriological study of tissues and milk of cows and fetuses experimentally infected with *Brucella abortus*. *J Comp Pathol*, 140, 149-157.
- XAVIER MN, PAIXÃO TA, DEN HARTIGH AB, TSOLIS RM, SANTOS RL (2010) Pathogenesis of *Brucella* spp. *Open Vet Sci J*, 4, 109-118.

- XAVIER MN, WINTER MG, SPEES AM, NGUYEN K, ATLURI VL, SILVA TM, BÄUMLER AJ, MÜLLER W, SANTOS RL, TSOLIS RM (2013) CD4+ T cell-derived IL-10 promotes *Brucella abortus* persistence via modulation of macrophage function. *PLoS Pathog*, 9, e1003454.
- XIA H, LIU L, WAHLBERG N, BAULE C, BELÁK S (2007) Molecular phylogenetic analysis of bovine viral diarrhoea virus: a Bayesian approach. *Virus Res*, 130, 53-62.
- XIA H, VIJAYARAGHAVAN B, BELÁK S, LIU L (2011) Detection and identification of the atypical bovine pestiviruses in commercial foetal bovine serum batches. *PLoS One*, 6, e28553.
- XU J, MENDEZ E, CARON PR, LIN C, MURCKO MA, COLLETT MS, RICE CM (1997) Bovine viral diarrhoea virus NS3 serine proteinase: Polyprotein cleavage sites, cofactor requirements, and molecular model of an enzyme essential for pestivirus replication. *J Virol*, 71, 5312-5322.
- YANG X, SKYBERG JA, CAO L, CLAPP B, THORNBURG T, PASCUAL DW (2013) Progress in *Brucella* vaccine development. *Front Biol (Beijing)*, 8, 60-77.
- YATES WD (1982) A review of infectious bovine rhinotracheitis, shipping fever pneumonia and viral-bacterial synergism in respiratory disease of cattle. *Can J Comp Med*, 46, 225-263.
- YAVRU S, ŞİMŞEK A, YAPKIÇ O, KALE M (2005) Serological evaluation of viral infections in bovine respiratory tract. *Acta Vet Beograd*, 55, 219-226.
- YAZICI Z, SERDAR M.S., GUMUSOVA S.O., ALBAYRAK H (2012) Molecular diagnosis and seroepidemiology of pestiviruses in sheep. *Veterinarski Arhiv*, 82, 35-45.
- YEŞİLBAĞ K, GÜNGÖR B (2008) Seroprevalence of bovine respiratory viruses in North-Western Turkey. *Trop Anim Health Prod*, 40, 55-60.
- YEŞİLBAĞ K, FÖRSTER C, BANK-WOLF B, YILMAZ Z, ALKAN F, OZKUL F, BURGU I, CEDİLLO ROSALES S, THIEL HJ, KÖNIG M (2008) Genetic heterogeneity of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates from Turkey: identification of a new subgroup in BVDV-1. *Vet Microbiol*, 130, 258-267.
- YILDIRIM Y, YILMAZ V, KALAYCIOĞLU AT, DAĞALP SB, MAJARASHIN ARF, ÇELEBİ Ö, AKÇA D (2011) An investigation of a possible involvement of BVDV, BHV-1 and BHV-4 infections in abortion of dairy cattle in kars district of Turkey, *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 17, 879-883.
- YILDIZ K, KUL O, BABUR C, KILIC S, GAZYAGCI AN, CELEBI B, GURCAN IS (2009) Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cattle ranches with high abortion rate: special emphasis to serologic co-existence with *Toxoplasma gondii*, *Brucella abortus* and *Listeria monocytogenes*. *Vet Parasitol*, 164, 306-310.

- YILMAZ H, ALTAN E, RIDPATH J, TURAN N (2012) Genetic diversity and frequency of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) detected in cattle in Turkey. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 35, 411-416.
- YINGST S, HOOVER DL (2003) T cell immunity to brucellosis. *Crit Rev Microbiol*, 29, 313-331.
- YOSHIMA M, SEKI N, ICHIJO M, ABE N, IMAI K (2005) Infiltration of bovine herpesvirus 4 into the Hokkaido district, Japan. *J Japan Vet Med Assoc*, 58, 33-36.
- YOUNG DA (1995) Florence Nightingale's fever. *BMJ*, 311, 1697-1700.
- YUMUK Z, O'CALLAGHAN D (2012) Brucellosis in Turkey-an overview. *Int J Infect Dis*, 16, 228-235.
- ZAHOOR MA, YAMANE D, MOHAMED YM, SUDA Y, KOBAYASHI K, KATO K, TOHYA Y, AKASHI H (2010) Bovine viral diarrhoea virus non-structural protein 5A interacts with NIK- and IKKbeta-binding protein. *J Gen Virol*, 91, 1939-1948.
- ZAMMIT T (1905) Report of the Commission on Mediterranean Fever, part III. Harrison and Sons: London, p. 83.
- ZARKOV IV, JARULLAH B (2012) Comparative evaluation of two tests to determined antibodies against mucosal disease-viral diarrhoea. *Trakia J Sci*, 3, 53-57.
- ZEZAFOUN H, DECREUX A, DESMECHT D (2011) Genetic and splice variations of *Bos taurus* CD46 shift cell permissivity to BVDV, the bovine pestivirus. *Vet Microbiol*, 152, 315-327.
- ZHANG G, ALDRIDGE S, CLARKE MC, MCCAULEY JW (1996) Cell death induced by cytopathic bovine viral diarrhoea virus is mediated by apoptosis. *J Gen Virol*, 77, 1677-1681.
- ZHANG L, VAN SANTEN VL (1995) Interaction of bovine herpesvirus 4 (BHV-4) immediate early 2 gene product with BHV-4 thymidine kinase promoter-regulatory region. *J Gen Virol*, 76, 2433-2445.
- ZHENG K, CHEN DS, WU YQ, XU XJ, ZHANG H, CHEN CF, CHEN HC, LIU ZF (2012) MicroRNA expression profile in RAW264.7 cells in response to *Brucella melitensis* infection. *Int J Biol Sci*, 8, 1013-1022.
- ZHU J, VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK S, BROWNLIE R, BABIUK LA, POTTER A, MUTWIRI GK (2009) Multiple molecular regions confer intracellular localization of bovine Toll-like receptor 8. *Mol Immunol*, 46, 884-892.
- ZIMMERMANN W, BROLL H, EHLERS B, BUHK HJ, ROSENTHAL A, GOLTZ M (2001) Genome sequence of bovine herpesvirus 4, a bovine Rhadinovirus, and identification of an origin of DNA replication. *J Virol*, 75, 1186-1194.

## ÖZGEÇMİŞ

### I. Bireysel Bilgiler

**Adı:** Muhammet Eren

**Soyadı:** ASLAN

**Doğum Yeri ve Tarihi:** Erciş/1986

**Uyruğu:** Türkiye Cumhuriyeti

**Medeni Durumu:** Evli

**Adres:** K.Ü. Veteriner Fakültesi Viroloji A.B.D. Kırıkkale

**Telefon:** 05445687915

**E- posta:**erenaslan06@msn.com

### II. Eğitimi

2004-2009: Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi

2004-2009: Anadolu Üniversitesi İşletme Fakültesi

1998-2004: Bandırma Anadolu Lisesi

1992-1997: Bandırma Cumhuriyet İlköğretim Okulu

**Yabancı Dili:** İngilizce, Almanca

### III. Mesleki deneyimi

2011- : Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Veteriner Hekim



#### IV. Yayınları:

##### Ulusal hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

1. AZKUR AK, ASLAN ME (2012) Akış Sitometri ve Veteriner Hekimlikteki Uygulamaları. *Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg*, 7, 59-66

##### Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

1. AZKUR AK, GAZYAĞCI S, ASLAN ME, ÜNAL N (2011) Molecular and Serological Characterization of Pestivirus Infection Among Sheep in Kirikkale, Turkey. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 17, 83-92.
2. AZKUR AK, GAZYAĞCI S, ASLAN ME (2011) Serological and Epidemiological Investigation of Bluetongue, Maedi-Visna and Caprine Arthritis Encephalitis Viruses in Small Ruminant in Kirikkale District in Turkey. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 17, 803-808.
3. GAZYAĞCI S, AZKUR AK, ASLAN ME (2011) Haematological parameters in blood of maedi-visna virus-infected and uninfected sheep. *Afr J Microbiol Res* 5, 1826-1829.
4. SARIKAYA B, AZKUR AK, GAZYAĞCI S, ASLAN ME (2012) Genetic Variability of Bovine Viral Diarrhea Virus in the 5'-UTR in the Central Anatolia of Turkey. *Acta Sci Vet*, 40, 1013.
5. AZKUR AK, KAYGUSUZ S, ASLAN ME, GAZYAĞCI S, GÖZÜTOK S, TOYRAN K (2013) A survey study on hantavirus, cowpox virus, and *Leptospira* infections in *Microtus hartingi* in Kirsehir Province, Central Anatolia, Turkey. *Turk J Vet Anim Sci*, 37, 434-442.

### **Ulusal Bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler**

1. AZKUR AK, GAZYAĞCI S, ASLAN ME, ÜNAL N, AŞKAR S. Kırıkkale ili koyun sürülerindeki Border hastalığı prevalansının belirlenmesi. 9. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi (Uluslar arası katılımlı). 5-7 Ekim 2010 Kıbrıs, s: 44
2. SARIKAYA B, AZKUR AK, ASLAN ME, GAZYAĞCI S. İnaktif BVDV aşısının kan değerleri üzerine etkisi ve sağladığı bağışıklık düzeyinin tespiti. 9. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi (Uluslar arası katılımlı). 5-7 Ekim 2010 Kıbrıs, s: 206.
3. SARIKAYA B, AZKUR AK, GAZYAĞCI S, ASLAN ME. İnaktif BVDV aşısına bağlı buzağlarda lökopeni ve lenfopeni görülmesinin araştırılması. 9. Ulusal Veteriner İç Hastalıkları Kongresi (Uluslar arası katılımlı). 5-8 Mayıs 2011, Antalya, s: 300.

### **Uluslararası Bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler**

1. GAZYAĞCI S, AZKUR AK, ASLAN ME (2011). Haematological parameters in blood of infected sheep with Maedi-Visna virus and uninfected sheep. 19. International Congress of Mediterranean Federation of Health and Production of Ruminants. 25-26 May, Belgrad, Serbia.
2. AZKUR AK, KAYGUSUZ S, ASLAN ME, GAZYAĞCI S, TOYRAN K (2011). A survey study of zoonotic infections in *Microtus socialis* in Kirsehir Province, Central Anatolia, Turkey. 3. East Mediterranean Iclas Symposium. 13-15 June, İstanbul.
3. KORKUSUZ P, HANALIOĞLU Ş, AZKUR AK, YÖRÜBULUT M, SOYCAN İA, BİLGİÇ E, SARA Y, ASLAN ME, ÇETİNKAYA D, ANLAR B (2013). Mesenchymal stem cell application in cuprizone-induced demyelination. 10. European Paediatric Neurology Society Congress. 25-28 Sep. Brussel, Belgium.

## **V. Projeler**

### **Ulusal Projeler**

1. AZKUR AK, GAZYAĞCI S, ASLAN ME. "Kırıkkale İli ve Çevresindeki Sığırlardan Toplanan Klinik Örneklerden İnfeksiyöz Bovine Rhinotreahitis/İnfeksiyöz Püstüler Vulvovajinitis (IBR/IPV) Virüslerinin İzolasyonu". Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi, 2011/35.
2. AZKUR AK, GAZYAĞCI S, ASLAN ME. " Kırıkkale İlindeki İneklerde BVDV, BHV-1, BHV-4 ve BHV-5 Enfeksiyonlarının Epidemiyolojisi, Genetik Karakterizasyonun Belirlemesi ve Kan Parametrelerinin Karşılaştırılması." TUBITAK TOVAG, 111O871 (Bursiyer olarak çalışmıştır)

### **Diğer Bilgiler**

1. Koyun ve Keçilerde Sünger Uygulaması ile Döl Veriminin Artırılması, AB Mesleki Eğitim Programı Leonardo Da Vinci Hareketlilik Projeleri. 17-30 Haziran 2012, Brüksel, Belçika.
2. FACS Aria II Flow Sitometri Cihazı Kullanıcı Eğitim Kursu. Becton Dickinson Biosciences, 22-26 Şubat 2010, Ankara.