T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KONYA VE ÇEVRESİNDE ABORT PROBLEMLİ KOYUN SÜRÜLERİNDE BORDER DISEASE VİRUS ENFEKSİYONUNUN ARAŞTIRILMASI

Oğuzhan AVCI

DOKTORA TEZİ

VİROLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof.Dr. Sibel YAVRU

KONYA-2010

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KONYA VE ÇEVRESİNDE ABORT PROBLEMLİ KOYUN SÜRÜLERİNDE BORDER DISEASE VİRUS ENFEKSİYONUNUN ARAŞTIRILMASI

Oğuzhan AVCI

DOKTORA TEZİ

VİROLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof.Dr. Sibel YAVRU

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 08102001 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2010

ii. ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasını maddi yönden destekleyen Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederim.

Bu çalışmanın başlangıcından itibaren her aşamasında yakın ilgi ve desteğini esirgemeyen S.Ü. Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Prof.Dr.Feridun ÖZTÜRK Hocama, Prof.Dr.Atilla ŞİMŞEK Hocama, Doç.Dr.Orhan YAPICI Hocama, Doç.Dr.Oya BULUT Hocama teşekkür ederim. İstatistiki hesaplamalardaki yardımlarından dolayı Dr.Kamil ÜNEY'e, fotoğraf çekimlerindeki yardımlarından dolayı meslektaşım Ali Osman ÖZCAN'a, tezin test aşamalarındaki yardımlarından dolayı Araş.Gör.Ela ESİN'e, Gülcan KAYACAN'a, Serpil YANBAKAN'a teşekkür ederim.

Tez örneklemelerimde yardımlarını esirgemeyen meslektaşlarım Ahmet KARAPINAR, Engin BOZDEMİR, Mustafa KAŞIKÇI, öğrencilerimiz Orçun ARKAN ve Salim DERİN'e teşekkür ederim.

Bu günlere gelmemde hem maddi hem de manevi emek ve katkılarından dolayı biricik anneme, babama, ablam ve kız kardeşlerime ayrı ayrı teşekkürü borç bilirim.

Ayrıca tez çalışmalarım süresince göstermiş olduğu ilgisi, anlayışı ve sabrı için sevgili eşim Tülay AVCI'ya çok teşekkür ederim.

iii. İÇİNDEKİLER **iii**

iv. SİMGELER ve KISALTMALAR **vi**

1. GİRİŞ **1-54**

1.1. Genel Bilgiler 1

1.2. Etiyoloji 4-22

1.2.1. Sınıflandırma 4

1.2.2. Morfoloji 5

1.2.3. Kimyasal durum 5

1.2.4. Hücre kültürü 6

1.2.5. Antijenik kompozisyon 9

1.2.6. Yapısal ve yapısal olmayan proteinler 10

1.2.7. Hücreye bağlanma ve hücre içerisine giriş 18

1.2.8. Konakçı Spektrumu 19

1.3. Epizootiyoloji 23

1.4. Patogenez ve Patoloji 27

1.5. Klinik 39

1.6. Teşhis 43-52

1.6.1. Klinik Teşhis 45

1.6.2. Laboratuar Teşhisi 45

Direkt Teşhis 45

Virus izolasyonu 46

İmmunohistokimyasal yöntem 47

Antijen tespiti için ELISA 47

Antijen tespiti için IF, IP ve Flow Sitometri testleri 48

Nükleik asit tespit metotları 48

İndirekt Teşhis 51

1.7. İmmunoloji 52

1.8. Koruma ve Kontrol 54

2. GEREÇ VE YÖNTEM 55-73

2.1. Gereç 55-59

2.1.1. Araştırmada Kullanılan Sürüler 55

2.1.2. Araştırmada Kullanılan Hayvanlar 56

2.1.3. Hücre Kültürü 56

2.1.4. Viruslar 56

2.1.5. Fötal Dana Serumu 57

2.1.6. Serolojik Kontrol Materyali 57

2.1.7. Virolojik Kontrol Materyali 58

2.2. Yöntem 60-73

2.2.1. MDBK Devamlı Hücre Kültürü Hazırlanması 60

2.2.2.Virusların Çoğaltılması 60

2.2.3. Kan Serum Örneklerinin Hazırlanması 60

2.2.4. Lökosit Örneklerinin Hazırlanması 61

2.2.5. Svap Örneklerinin Hazırlanması 61

2.2.6. Doku örneklerinin hazırlanması 61

2.2.7. Serolojik Çalışma 63

Kitin İçeriği 63

İndirekt ELISA 63

Testin uygulanması 63

Testin değerlendirilmesi 64

Testin geçerliliği 64

Sonuçların yorumlanması 64

2.2.8. Virolojik Çalışmalar 65

Direkt ELISA 65

Kitin İçeriği 65
Testin uygulanması 65
Lökosit örneklerinin Direkt ELISA için hazırlanması 65
Testin değerlendirilmesi 66
Testin geçerliliği 66
Sonuçların yorumlanması 67
Direkt immunperoksidaz 68
One Step RT-PZR analizleri 69
Lökosit örneklerinden RNA ekstraksiyonu 69
Svap örneklerinden RNA ekstraksiyonu 70
Doku örnekleriCnden RNA ekstraksiyonu 71
One Step RT-PCR uygulaması 71
One Step RT-PCR ürünlerinin elektroforezi 73
3. BULGULAR **74-92**
3.1. Serolojik Çalışma Sonuçları 74-75
3.1.1. İndirekt ELISA Sonuçları 74
3.2. Virolojik Çalışma Sonuçları 76-92
3.2.1. Direkt ELISA Sonuçları 76
3.2.2. Direkt İmmunperoksidaz Sonuçları 78
3.2.3. Lökosit Örnekleri One Step RT-PCR Sonuçları 83
3.2.4. Svap Örnekleri One Step RT-PCR Sonuçları 84
3.2.5. Doku Örnekleri One Step RT-PCR Sonuçları 84
3.3. Testler Arası Sensitivite ve Spesifite Değerlerinin Hesaplanması 88
3.4. Testlerin İstatistiksel Analizleri 89
4. TARTIŞMA **93-102**
5. SONUÇ VE ÖNERİLER **103-106**
6. ÖZET **107**

7. SUMMARY **108**

8. KAYNAKLAR **109-145**

9. EKLER **146**

EK. A: Etik Kurul Kararı Örneği **146**

10. ÖZGEÇMİŞ **147**

iv. SİMGELER VE KISALTMALAR

aa	Aminoasit
AB	Avrupa Birliği
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
AC-ELISA	Antigen Capture ELISA
AGID	Agar Gel Immunodifüzyon
Ab	Antibody (Antikor)
Ag	Antigen (Antijen)
BD	Border Disease
BDV	Border Disease Virus
bp	Base Pair
β	Beta
BT	Blue Tongue
BVDV	Bovine Viral Diarrhea Virus
°C	Derece Santigrat
CD	Cluster of Determination
CNP	2',3'-cyclic nucleotide–3'phosphodiesterase
cp	Cytopathogenic (Sitopatojenik)
CSFV	Classical Swine Fever Virus
dk	Dakika
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulphoxide
EDTA	Etilendiamin Tetraasetikasit
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EtBr	Ethidium Bromide
FCS	Fetal Calf Sera
FKK	Fötal kuzu kas
FMD	Foot and Mouth Disease
g	gram
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
H_2O_2	Hidrogen peroxide
IF	Immunfloresan
IP	Immunperoksidaz

IRES	Internal Ribosome Entry Sites
IUBN	Intrauterin Büyüme Noksanlığı
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
LDLR	Low Density Lipoprotein Receptor
M	Molar
MAP	Myelin Associated glikoprotein
MDBK	Madin Darby Bovine Kidney
MSS	Merkezi Sinir Sistemi
ml	Mililitre
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
nm	Nanometre
NADL	National Animal Disease Laboratory
ncp	Noncytopathogenic (Nonsitopatojenik)
NCR	Noncoding Regions
NK	Negatif Kontrol
NS	Non Structural (Yapısal olmayan)
OD	Optik Dansite
OIE	Office International des Epizooties (Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü)
ORF	Open Reading Frame
PBS	Phosphate Buffered Saline
pH	Power of Hydrogen
PCR	Polymerase Chain Reaction
PI	Persiste Enfekte
PK	Pozitif Kontrol
PPR	Peste des Petits Ruminants
MBP	Myelin Basic Protein
MD	Mukozal Disease
RdRPs	RNA dependent RNA polymerase (RNA bağımlı RNA Polimeraz)
rpm	Revolutions per minute
RNA	Ribonükleik asit
RT-PCR	Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction

S/P	Sekonder/Primer
sn	Saniye
SNT	Serum Nötralizasyon Testi
TBE	Tris Base Borik asit EDTA
TC	Thermal Cycler
T3	L–3,3',5-triiodothyronine
T4	Thyroxine
UTR	Untranslate Region
%	Yüzde

1. GİRİŞ

1.1. Genel Bilgiler

Koyun; ekonomilerinde hayvancılığın önemli yeri olan ülkelerde, et, süt, yapağı ve deri verimi başta olmak üzere birçok amaç için yetiştirilen bir çiftlik hayvanıdır. Koyun yetiştiriciliği, iklim ve tabiat şartlarına göre, teknik ve ekonomik imkanlar ölçüsünde büyük, orta, küçük sürüler veya birkaç başlık gruplar halinde yapılmaktadır.

Ülkemizde gıda sektöründe önemli yeri olan koyun işletmelerinde ilerleyen yıllarda koyun sayısını arttırmak için sebeplere yönelik olarak spesifik programların geliştirilmesi zorunludur. Bu amaçla toplam koyun sayısında görülen büyük düşüşün nedenleri geniş çapta araştırılmalı ve tespit edilerek tek tek ortadan kaldırılmalıdır. Ülkemizde koyun yetiştiriciliğinin problemleri arasında:

- Yetiştirilen (akkaraman, morkaraman gibi) mevcut yerli koyun ırklarının verimlerinin düşük olması buna bağlı olarak iyileştirme amacı ile yapılan ıslah çalışmalarının yetersiz kalması,
- Mevcut koyun işletmelerinin daha çok küçük ve aile tipi halinde olması,
- Mera alanlarının azalması, kalan mera alanlarının da erken ve aşırı otlatma nedeni ile çoraklaşarak verimsizleşmesi,
- Koyunların meraya çıkamadığı kış aylarında, kaba yem ihtiyaçlarını karşılayacak yem ham maddelerinin yetiştirilememesi,
- Yem fiyatları ile birim ürün maliyet fiyatları arasındaki dengesizlik,
- Kuzuların yeterli canlı ağırlık artışı sağlanmadan kesilmesi,
- Pazarlama zincirinin uzunluğu,
- Çiftçi eğitim-bilgilendirme programlarının azlığı,
- Salgın hastalıklarla gerektiği kadar mücadele edilememesi gibi nedenler sayılabilmektedir (Öztürk 2000).

Koyun populasyonu fazla olan büyük işletmelerde abortlar sonucu hedeflenen kuzu miktarına (dolayısı ile koyun sayıları) ulaşılamamaktadır. Abortların nedeni incelenmediği ve buna yönelik bir kontrol programı

oluşturulmadığı için de hayvan sayısı sürekli olarak daha da azalmaktadır (Tetik 2008).

Küçükbaş hayvan yetiştiriciliğinin yoğun olarak yapıldığı İç Anadolu Bölgesi, koyun yetiştiriciliği açısından ülkemizde önemli bir konumdadır. Konya ise 1 321 192 baş yerli ve 49 638 baş merinos olmak üzere toplam 1 370 830 baş koyun sayısı ile İç Anadolu Bölgesi'nde bulunan şehirlerarasında ilk sırada yer almaktadır (Tetik 2008).

Koyunculuk sektöründe karşılaşılan ve ekonomik önemi olan enfeksiyon etkenleri arasında; bakteriler (*Brucella abortus, Brucella melitensis, Bacillus anthracis, Coxiella burnetti, Chlamydia psittaci, Clostridium perfringens*), mikoplazmalar (*M. agalactia*), parazitler (mide-bağırsak parazitleri, kan parazitleri) ve viruslar (*Aphtovirus, pestivirus, flavivirus, morbillivirus, bunyavirus, orbivirus, lentivirus, adenovirus, sheeppoxvirus, paravaccinia virus*) yer almaktadır (Nettleton ve Entrican 1995).

Viral enfeksiyonlar klinik tanısı, teşhisi ve tedavisinin zorluğu nedeniyle diğer mikroorganizmalar tarafından meydana getirilen enfeksiyonlardan ayrılmaktadır. Koyunlarda enfeksiyon meydana getirerek ekonomik kayıplara yol açan viral enfeksiyonlar arasında Foot and Mouth Disease (FMD, şap), Blue Tongue (BT, mavi dil), Peste des Petits Ruminants (PPR, küçük ruminant vebası), Border Disease (BD), Visna Maedi (VM), Louping ill, Pox (çiçek) ve Papillomatozis sayılabilmektedir (Krametter-Froetscher ve ark 2007).

Border Disease Virus (BDV)'u koyunlarda transplasental enfeksiyonlara neden olabilen viral etkenler arasında yer almaktadır (Nettleton ve ark 1998). Gebe koyunlar ile bunların fötusları BDV'nin biyotipine ve fötusun immun yanıt oluşturup oluşturamamasına bağlı olarak bu enfeksiyondan farklı derecelerde etkilenmektedirler (Hussin ve Woldehiwet 1994, Pratelli ve ark 1999). Border Disease Virus enfeksiyonunda; embriyo ölümü ve rezorbsiyonu, fötal mumifikasyon (Acland ve ark 1972, Barlow 1972, Plant ve ark 1983a, Akkina ve Raisch 1990, Moennig 1990, Fulton ve ark 1999), merkezi sinir sistemi (MSS) bozuklukları (Barlow ve Patterson 1982, Potts ve ark 1985, Terpstra 1985,

Trautwein ve ark 1985, Nettleton 1987, Russo ve ark 1987, Möller ve ark 1993, Becher ve ark 1996, Berriatua ve ark 2004), kongenital anomaliler (Moennig ve Plagemann 1992), abortlar (Plant ve ark 1976, Terpstra 1981, Nettleton ve ark 1992, 1998, Carlsson ve Belak 1994, Fulton ve ark 1999, Baginski ve ark 2000, Loken 2000, Marco ve ark 2007), 'Hairy shaker' görünümlü (Manktelow ve ark 1969, Acland ve ark 1972, Plant ve ark 1976, Vantsis ve ark 1979, Plant ve ark 1983a, Sharp ve Rawson 1986, Burrells ve ark 1989, Sawyer 1992, Nettleton ve ark 1998, Berriatua ve ark 2004, Kittelberger ve Pigott 2008) veya normalden düşük doğum ağırlığına sahip kuzu doğumları, canlı doğan kuzuların 2–3 gün içerisinde ölmeleri gibi sonuçlar ile karşılaşılabilmektedir (Radostits ve ark 1994, Loken 1995, Fulton ve ark 1999, Moen ve ark 2005).

Normalin altında doğum ağırlığına sahip ve canlı kalabilen persiste enfekte (PI) hayvanların belirlenip sürüden çıkarılmaması halinde, belirgin bir klinik bulgu göstermeden seyreden enfeksiyonda, etkenin sürekli etrafa saçılması sonucu virusun tüm sürüye yayılması söz konusudur. Bu nedenle BDV enfeksiyonu ile mücadelede, hastalanan hayvanların bakım ve tedavisinden ziyade koruyucu hekimlik ön plana çıkmaktadır. Bunun için PI hayvanların tespit edilerek sürüden uzaklaştırılması son derece önem kazanmaktadır (Sweasey ve ark 1979, Sharp ve Rawson 1986, Sawyer 1992).

Bu araştırmada, Konya ve çevresinde bulunan abort problemli koyun sürülerinde akut ya da subklinik BDV enfeksiyonunun varlığının araştırılması, varsa PI hayvanların (koyun, kuzu, koç) tespit edilmesi, abort olaylarında BDV'nin rolünün belirlenmesi, tespit edilecek PI hayvanların sürüden uzaklaştırılması sonucu BDV enfeksiyonundan kaynaklanan ekonomik kayıpların azaltılması hedeflenmiştir.

Border Disease Virus ile ilgili yapılan serolojik çalışmalar, antijen ve genom varlığının tespit edilebilmesi için virolojik çalışmalar ile mutlaka desteklenmelidir. Bu amaçla toplanan kan serumu örnekleri BDV'ye karşı oluşan antikor varlığı yönünden indirekt ELISA ile incelenirken, lökosit, vaginal svap ve doku örneklerine BDV antijen varlığını tespit etmek amacı ile direkt enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) ve direkt immunperoksidaz (IP) yöntemleri uygulanmış, viral genom varlığı ise One Step Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) ile araştırılmıştır.

1.2. Etiyoloji

1.2.1. Sınıflandırma

Border Disease Virus'u, Flaviviridae familyasının *Pestivirus* genusunda yer almakta olup aynı genusta bulunan Classical Swine Fever Virus (CSFV)'u ve Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV)'u ile yakın antijenik ilişki içerisindedir (Acland ve ark 1972, Gardiner ve Barlow 1972, Osburn ve ark 1973, Plant ve ark 1973, Huck ve ark 1975, Porterfield ve ark 1978, Harkness ve Vantsis 1982, Potts ve ark 1982a, Hyera ve ark 1985, Terpstra 1985, Wafula 1986, Collett ve ark 1988a, 1989, Wensvoort ve ark 1989, Kelling ve ark 1990, Moennig 1990, Carlsson 1991, Wengler 1991, Moennig ve Plagemann 1992, Katz ve ark 1993, Heckert ve ark 1994, Hewicker-Trautwein ve Trautwein 1994, Horzinek 1994, Hussin ve Woldehiwet 1994, Ridpath ve ark 1994, Nettleton ve Entrican 1995, Shukla ve ark 1995, Waldvogel ve ark 1995, Wengler ve ark 1995a, 1995b, Bruschke ve ark 1996, Meyers ve Thiel 1996, Rice 1996, Thiel ve ark 1996, Vilcek ve Belak 1996, Brownlie ve ark 1997, Caffrey ve ark 1997, Fulton ve ark 1997, Potgieter 1997, Liebler-Tenorio ve ark 1997, Nettleton ve ark 1998, Neyts ve ark 1999, Pringle 1999, Baginski ve ark 2000, Heinz ve ark 2000, Van Regenmortel ve ark 2000, Graham ve ark 2001a, Scherer ve ark 2001, Becher ve ark 2003, Hurdato ve ark 2003, Fauquet ve ark 2005, Thiel ve ark 2005, Evermann 2006, Le Potier ve ark 2006, Vilcek ve Nettleton 2006, Krametter-Froetscher ve ark 2007a, Marco ve ark 2007, Nettleton ve Willoughby 2008, Rasmussen ve ark 2007, 2008).

Flaviviridae familyasında üç genus ve sınıflandırılmamış viruslar yer almaktadır:

1) Flavivirus

2) Pestivirus

Bovine Viral Diarrhea Virus 1, Bovine Viral Diarrhea Virus 2

Border Disease Virus

Classical Swine Fever Virus

3) Hepacivirus

4) Aynı familyada yer alan sınıflandırılmamış viruslar ise GB virus A ve GB virus C'dir (ICTVdB 2009).

1.2.2. Morfoloji

Tek iplikçikli Ribonükleik asit (RNA) (Horzinek 1981, Rice ve ark 1985, Meyers ve Thiel 1996, Baginski ve ark 2000) içeren Pestivirus genomu pozitif polariteli olup 12.3–12.7 kilobase (kb) uzunluğundadır (Malmquist 1968, Horzinek 1981, Renard ve ark 1985, 1987, Moormann 1987, Collett ve ark 1988a, 1989, Meyers ve ark 1989, Moennig 1990, Moormann ve ark 1990, Brock ve ark 1992, Deng ve Brock 1992, De Moerlooze ve ark 1993, Becher ve ark 1994, 1998a, Ridpath ve Bolin 1995, 1997, Bruschke ve ark 1996, Laamanen ve ark 1997, Vilcek ve ark 1997, Heinz ve ark 2000, Kümmerer ve ark 2000, Thabti ve ark 2005, Rasmussen ve ark 2008).

Helikal simetriye sahip olan etken 40–60 nanometre (nm) büyüklüğündedir (Chasey ve Roeder 1981, Horzinek 1981, Bielefeldt Ohmann ve Bloch 1982, Baker 1987, Gray ve Nettleton 1987, Rümenapf ve ark 1991a, Moennig ve Plagemann 1992, Thiel ve ark 1993, Becher ve ark 1998a, Heinz ve ark 2000). 50 nm por çapına sahip filtrelerden geçebilen BDV'u, 35 nm por çapına sahip filtrelerden geçememektedir (Chasey ve Roeder 1981, Harkness ve Vantsis 1982). Bu yüzden BDV partikülleri büyüklük bakımından karşılaştırıldıkları zaman, 30 nm çapında 'çekirdek' içeren 45–54 nm büyüklüğündeki BVDV partikülleri ile benzerlik göstermektedir (Bielefeldt Ohmann ve Bloch 1982).

Etken, kalınlığı 5–7 mikrometre (µm) olan bir zar içermektedir (Gray ve Nettleton 1987). Zarın üzerinde 4–5 µm uzunluğunda ışınsal çıkıntılar bulunmaktadır (Chu ve Zee 1984, Heinz ve ark 2000).

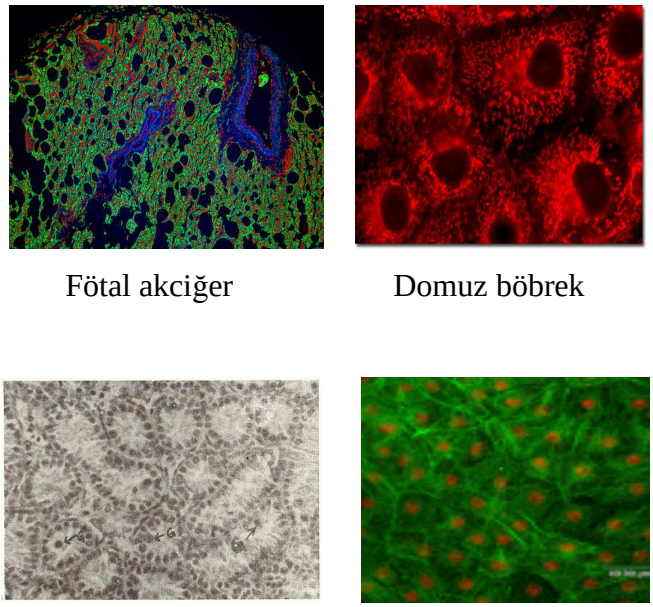
1.2.3. Kimyasal durum

Etken, 56 °C'da 30 dakika (dk)'da inaktive olmaktadır (Rümenapf ve ark 1991a). Ayrıca lipid eriticilere (Collett ve ark 1989), dezenfektanlara, ultraviyole ışınlarına da duyarlıdır (Hafez ve Liess 1972, Barlow 1990, Rümenapf ve ark 1991a). Border Disease Virus, dış ortamda ve nemli yerlerde çok uzun süre canlılığını devam ettirememektedir. Border Disease Virus'unun buoyant yoğunluğu (1.09–1.15 gram(g)/mililitre(ml)), BVDV'nin National Animal Disease Laboratory

(NADL) suşu ile benzerlik göstermektedir (Hafez ve Liess 1972, Laude 1979, Barlow 1990, Rümenapf ve ark 1991a).

1.2.4. Hücre kültürü

Border Disease Virus'u fötal kuzu böbrek (Vantsis ve ark 1976, 1980b, Cay ve ark 1989, Nettleton ve ark 1992), fötal akciğer (Graham ve ark 2001a), domuz böbrek (Dubovi 1999), kuzu testis (Hussin ve Woldehiwet 1994, Woldehiwet ve Hussin 1994) ve sığır testis (Niemi ve ark 1982, Terlecki ve Roeder 1983, Gray ve Nettleton 1987) hücre kültürlerinde çoğaltılabilmektedir. Fötal kuzu kas (FKK) (Russo ve ark 1987, Dutia ve ark 1990), tüm embriyo (Thabti ve ark 2002), koyun ve kuzu choroid plexus (Loken ve ark 1982b, Wafula 1986) hücre kültürleri de BDV'nin çoğaltılması için kullanılabilmektedir (Resim 1.1).



Fötal akciğer Domuz böbrek

Kuzu testis Koyun choroid plexus

Resim 1.1. Border Disease Virus'unun çoğaltılabilmesi için kullanılan hücre kültürlerinin hazırlandığı doku ve organ sistemleri (Bioptechs 2008).

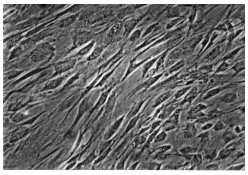
Pestivirus'ların hücre kültürlerindeki çoğalma durumlarına göre cytopathogenic (cp, sitopatojenik) ve noncytopathogenic (ncp, nonsitopatojenik) olmak üzere iki biyotipi belirlenmiştir (Lee ve Gillespie 1957, Underdahl ve ark 1957, Vantsis ve ark 1976, Rossi ve ark 1980, McClurkin ve ark 1984, Donis ve

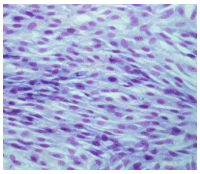
Dubovi 1987, Howard ve ark 1987, Pocock ve ark 1987, Corapi ve ark 1988, Brownlie ve ark 1989, Shimizu ve ark 1989, Dubovi 1990, Dutia ve ark 1990, Meyers ve Thiel 1995, 1996, Nettleton ve Entrican 1995, Paton 1995, Ridpath ve Bolin 1995, Becher ve ark 1996, Fulton ve ark 2005).

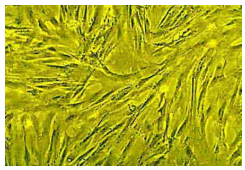
Koyun hücre kültürleri BDV'nin çoğaltılması amacı ile tercih edilen hücre kültürleridir. Ayrıca BVDV–1 ile BVDV–2'nin izole edilmesi ve çoğaltılmasında oldukça başarılı olarak kullanılmaktadırlar (Vilcek ve ark 1997).

Bovine Viral Diarrhea Virus ile enfekte olan koyunların bulunduğu bölgelerde BDV'nin çoğaltılması amacı ile koyun hücre kültürü sistemlerinin yanında sığır hücre kültürü sistemleri de kullanılabilmektedir (OIE 2008).

Border Disease Virus'unun çoğaltılması için kullanılan sığır hücre kültürü sistemleri arasında; fötal dana testis (Hafez ve Liess 1972, Vantsis ve ark 1976, Gray ve Nettleton 1987), embriyonik trakea (Kreeft ve ark 1990), turbinata (Coria ve ark 1984, Lobmann ve ark 1986, Akkina ve Raisch 1990, Ramesh ve Raisch 1990, Carlsson 1991, Laamanen ve ark 1997), fötal dana böbrek (Gillespie ve ark 1967, Malmquist 1968, Vantsis ve ark 1976, Loken ve ark 1982b, Jerrett ve ark 1984, Cay ve ark 1989, Moennig ve ark 1990, Kirkland ve ark 1991), fötal dana dalak (Potts ve ark 1982b, Anderson ve ark 1987a) ve Madin Darby Bovine Kidney (MDBK) (Hussin ve Woldehiwet 1994, Liang ve ark 2003, Yeşilbağ ve ark 2008) gibi hücre kültürü sistemleri yer almaktadır (Resim 1.2).


Embriyonik trakea


Turbinata


Fötal dana böbrek


Fötal dana dalak


MDBK

Resim 1.2. Border Disease Virus'unun çoğaltılabildiği hücre kültürleri (Bioptechs 2008).

Border Disease Virus'unun ilk izolasyonunda primer sığır turbinata hücre kültürü sistemleri ile yapılan çalışmada sığır böbrek hücre kültürlerine oranla %15 daha fazla başarılı sonuçlar elde edilmiştir (Laamanen ve ark 1997).

Bovine Viral Diarrhea Virus'unun cp ve ncp biyotiplerinin (Underdahl ve ark 1957, Gillespie ve ark 1967, Coria ve ark 1984, McClurkin ve ark 1984, 1985, Magar ve ark 1988, Moennig 1990, Castrucci ve ark 1991, Greiser-Wilke ve ark 1991a, Hewicker-Trautwein ve ark 1992, Brock ve ark 1993, Reid 1995, Zhang ve ark 1996, Liebler-Tenorio ve ark 1997, Saliki ve ark 1997, Ridpath 2003) moleküler olarak farklılıkları, enfekte ettikleri hücrelerdeki protein varlığı ile açıklanmıştır (Meyers ve Thiel 1996).

Tüm cp biyotipler 80 kilodalton (kDa) ağırlığında non structural (NS, yapısal olmayan) NS3 proteini içermektedir (Donis ve Dubovi 1987). NS3 proteininin cp BVDV biyotiplerinin tespit edilmesinde belirleyici bir faktör olduğu belirtilmektedir (Kümmerer ve ark 1998).

Sitopatojen BVDV ya da ncp BVDV ile enfekte hücre kültürlerinde ise sadece NS2–3 proteini tespit edilmektedir (Purchio ve ark 1984, Donis ve Dubovi 1987, Pocock ve ark 1987, Collett ve ark 1988a, Corapi ve ark 1988, Meyers ve ark 1991, 1992, Meyers ve Thiel 1996, Tautz ve ark 1999, Ridpath 2003).

Ancak ncp CSFV ve ncp BDV biyotipi ile gerçekleşen enfeksiyonlarda da NS3'ün sentezlendiği bildirilmiştir (Thiel ve ark 1991, Becher ve ark 1995, 1996). Bu yüzden sadece NS3 proteinin varlığı sitopatik etkinin göstergesi olmamaktadır. Aynı zamanda NS3'ün miktarı da önemlidir. Kantitatif verilerde tespit edilemese bile NS3'ün miktarı ile ilgili yapılan protein analizleri hücrelerin cp CSFV veya cp BDV ile enfekte olup olmadıklarının göstergesidir (Becher ve ark 1996).

1.2.5. Antijenik kompozisyon

Border Disease Virus'u antijenik olarak aynı familyada yer alan diğer viruslar (CSFV ve BVDV) ile yakın antijenik ilişki içerisindedir (Fernelius ve ark 1973, Plant ve ark 1973, Porterfield ve ark 1978, Collett ve ark 1989, Carlsson 1991, Horzinek 1994, Wengler ve ark 1995a, Becher ve ark 1997, Fulton ve ark 1997, Giangaspero ve Harasawa 1999, Van Regenmortel ve ark 2000, Scherer ve ark 2001, Hurdato ve ark 2003, Thiel ve ark 2005, Evermann 2006).

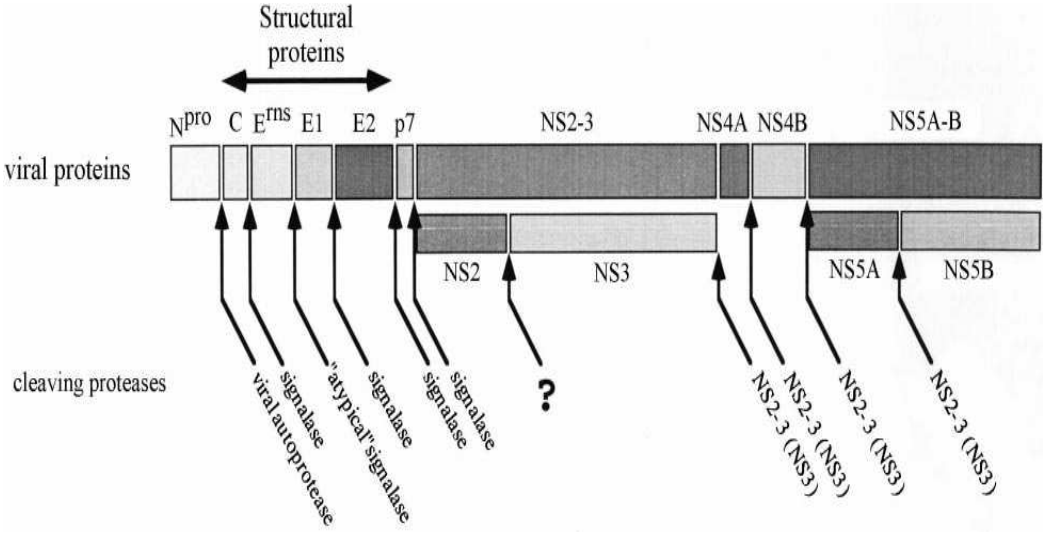
Bugüne kadar izole edilen BDV'ler konakçı türü (Carlsson 1991, Roehe ve ark 1992, Edwards ve ark 1995) ve antijenik özelliklerine göre yapılan filogenetik analizler kapsamında BD1, BD2, BD3 ve BD4 olmak üzere 4 altgrupta toplanmıştır (Becher ve ark 1994, 2003, Ridpath ve Bolin 1997, Vilcek ve ark 1998, Arnal ve ark 2004, Schirrmeier ve ark 2004, Thabti ve ark 2005, Stalder ve ark 2005, Berriatua ve ark 2006, Willoughby ve ark 2006). BD1 altgrubunda koyun ve keçilerden izole edilmiş Moredun (Vantsis ve ark 1976), X818, BD31, BDV L83/84, BDV T1802/1, BDV V2536/2 suşları yer almaktadır. BD1 altgrubu kendi arasında BD1a ve BD1b olmak üzere ikiye ayrılmıştır (Valdazo-Gonzales ve ark 2006). BD2 altgrubunda, Ren geyiklerinden izole edilen V60 suşunun yanında Chemnitz AZ 79, Reindeer 1 ve Bison 1 suşları bulunmaktadır. Domuzlardan elde edilen BDV Gifhorn izolatının (Schirrmeier ve ark 2002) ve İsviçre'den izole edilen BDV izolatının (Stalder ve ark 2005) yer aldığı altgrup BD3'tür (Becher ve ark 1995, 1999, 2003, Stalder ve ark 2005). BD4 altgrubunda (Becher ve ark 1995, Arnal ve ark 2004, Hurtado ve ark 2004, Frölich ve ark 2005, Pioz ve ark 2007, Valdazo-Gonzales ve ark 2006, 2007) bir geyik türü (chamois)'nden izole edilen suş bulunmaktadır. Fransa'da yapılan çalışmada elde edilen 2 yeni koyun Pestivirus izolatı BDV5 ve BDV6 altgrubu olarak sınıflandırılmıştır (Dubois ve ark 2008).

1.2.6. Yapısal ve yapısal olmayan proteinler

Pestivirus proteinleri, bir poliproteinden sentezlenmektedir (Purchio ve ark 1984, Moormann ve Hulst 1988, Rümenapf ve ark 1989, Thiel ve ark 1991). Genomik RNA, 5' ucundan 3' ucuna doğru uzun Open Reading Frame (ORF) (Renard ve ark 1987, Collett ve ark 1988a, Pelletier ve ark 1988, Meyers ve ark 1989, Moormann ve ark 1990, Thiel ve ark 1991, Stark ve ark 1993, Thabti ve ark 2005) ve Noncoding Regions (NCR, kodlama yapmayan bölgeler), [Untranslate Region (UTR)] içermektedir (Racaniello ve Meriam 1986, Collett ve ark 1988a, Meyers ve ark 1989, 1996, Pilipenko ve ark 1989, Moormann ve ark 1990, Boye ve ark 1991, Lipton ve ark 1991, Macadam ve ark 1991, Collett 1992, Deng ve Brock 1992, De Moerlooze ve ark 1993, Ridpath ve ark 1993, 1994, Becher ve ark 1994, Pellerin ve ark 1994, Hamel ve ark 1995, Paton 1995, Ridpath ve Bolin 1995, 1997, 1998, Harasawa 1996, Meyers ve Thiel 1996, Tijssen ve ark 1996, Becher ve ark 1997, Vilcek ve ark 1997, 1998, Harasawa ve Giangaspero 1998, Graham ve ark 2001a, Couvreur ve ark 2002, Hurtado ve ark 2003, Thabti ve ark 2005, Berriatua ve ark 2006, Rasmussen ve ark 2008).

Pestivirus'ların 4.000 aminoasitten (aa) oluşan (Meyers ve ark 1989, Becher ve ark 1998a, Grassmann ve ark 2001, Thabti ve ark 2005) poliprotein kodlayan bir ORF bölgesi bulunmaktadır (Collett ve ark 1988a, Stark ve ark 1990, Wiskerchen ve ark 1991, Kümmerer ve ark 2000).

Virus ve konakçı hücre proteazları tarafından oluşturulan poliproteinlerde NS2-NS3 ve NS5A-NS5B'yi tek protein olarak kabul eden bazı araştırmacılar (Collett ve ark 1988a, Stark ve ark 1990, 1993, Thiel ve ark 1991, Meyers ve ark 1992, Ridpath ve Bolin 1995, Meyers ve Thiel 1996, Lowings ve ark 1996, Tautz ve ark 1997, Xu ve ark 1997, Becher ve ark 1998b, Zhong ve ark 1998, Baginski ve ark 2000) 11 pestiviral protein olduğunu, NS2-NS3 ve NS5A-NS5B'yi ayrı ayrı protein olarak kabul eden bazı araştırmacılar ise 13 pestiviral protein olduğunu bildirmişlerdir (Elbers ve ark 1996, Meyers ve Thiel 1996, Rice 1996).



Şekil 1.1. Pestivirus'ların genom yapısı (Kümmerer ve ark 2000).

Olgun virus partikülüne ait poliproteinde N ucundan C ucuna doğru sırasıyla N^{pro}, C, E^{rns}, E1, E2, p7, NS2–3, (NS2), (NS3), NS4A, NS4B, NS5A-5B, (NS5A) (NS5B) proteinleri (Şekil 1.1.) bulunmaktadır (Collett ve ark 1988a, Stark ve ark 1990, 1993, Thiel ve ark 1991, Meyers ve ark 1992, Ridpath ve Bolin 1995, Elbers ve ark 1996, Lowings ve ark 1996, Meyers ve Thiel 1996, Tautz ve ark 1997, Xu ve ark 1997, Becher ve ark 1998b, Zhong ve ark 1998, Baginski ve ark 2000).

Poliproteinin ilk proteini yapısal olmayan (Thiel ve ark 1991) N^{pro} proteinidir (Collett ve ark 1988a, Wiskerchen ve ark 1991, Rümenapf ve ark 1993, Stark ve ark 1993, Kupfermann ve ark 1996, Tijssen ve ark 1996, Becher ve ark 1997, 2003, Van Rijn ve ark 1997, Vilcek ve ark 1997, Letellier ve ark 1999, Couvreur ve ark 2002, Hurdato ve ark 2003, Park ve ark 2004, De Mia ve ark 2005).

Kapsid proteini olarak düşünülen N^{pro}'nun (Thiel ve ark 1991, Wiskerchen ve ark 1991), daha sonraki yıllarda yapılan çalışma sonucunda yapısal olmayan bir protein olduğu bildirilmiştir (Stark ve ark 1993). N^{pro} proteini otoproteaz enzimi aracılığı ile sentezlenmektedir (Wiskerchen ve ark 1991).

Proteolitik aktivitesi olduğu bilinen N^{pro} proteininin subtilisin benzeri sistein proteaz olarak kullanılabildiği bildirilmiştir (Davison 1991, Dougherty ve ark 1993,

Rümenapf ve ark 1998). Ubiquitin C terminal hidrolaz aracılığı N^{pro} proteininin C ucunda uygun boşluklar açılmakta ve bu bölgeler daha sonra gerekli genomların sentezlenmesinde kullanılabilmektedir (Behrens ve ark 1998, Tratschin ve ark 1998, Tautz ve ark 1999). Ancak N^{pro} proteini, bağımsız RNA replikasyonunda, düzenlenmesinde ve subgenomların sentezlenmesi aşamasında gerekli olmamaktadır (Behrens ve ark 1998, Tratschin ve ark 1998, Moser ve ark 1999).

Bu proteini (N^{pro}), yapısal olan C, E^{rns}, E1 ve E2 proteinleri takip etmektedir (Becher ve ark 1997, Letellier ve ark 1999, Couvreur ve ark 2002, Park ve ark 2004). Pestivirus yapısal proteinleri plazma membranında bulunmamaktadır (Greiser-Wilke ve ark 1991b, Weiland ve ark 1999).

C proteini (Thiel ve ark 1991) nükleokapsid proteini iken diğer yapısal proteinler (E^{rns}, E1 ve E2) zar glikoproteinleridir (Collett ve ark 1988a, Thiel ve ark 1991, Rümenapf ve ark 1993). 14 kDa ağırlığında ve polipeptid yapıda olan C proteini, %21 oranında Lysine içermektedir (Thiel ve ark 1991).

Önceden E0 olarak bilinen E^{rns} glikoproteini glikozilat sonucu 7–9 adet N-bağlı glikolizasyon bölgesi oluşturur. Bu bölgeler de disülfid-bağlı homodimerleri oluşturmaktadır (Thiel ve ark 1991).

E^{rns}, uridine rezidüleri için spesifik olan ribonükleaz aktivitesinde kullanılabilmektedir (Hulst ve ark 1994, Schneiderve ark 1993, Windisch ve ark 1996). E^{rns}'nin ribonükleaz aktivitesindeki rolü tam olarak anlaşılamamıştır. Ancak virusların yaşam döngülerinde önemlidirler. Ribonükleaz aktivitesini engelleyen antikorlar aynı zamanda virusun enfektivitesini de nötralize etmektedirler (Windisch ve ark 1996).

Rekombinant E^{rns} proteini, glikoaminoglikanlar aracılığı ile hücre yüzeylerine çok kuvvetli bir şekilde tutunabilmekte ve virusa spesifik davranış sergileyerek bu yolla enfeksiyonu engelleyebilmektedir (Weiland ve ark 1999, Iqbal ve ark 2000).

E^{rns}'de meydana gelen mutasyonlar ribonükleaz aktivitesini yıkımlamakta ve bunun sonucunda in vivo ortamlarda attenue olan viruslar doku kültürlerinde çok daha fazla sitopatik etki göstermektedirler (Howard ve ark 1987, Ide ve ark 1997, Meyers ve ark 1999). Buna ek olarak rekombinant E^{rns}, in vitro ortamlarda lenfositler için toksik etki gösterebilmektedir (Bruschke ve ark 1998).

Doğal enfeksiyon sonucu gelişen lökopenide rekombinant E^{rns}'nin etkisinin olabileceği bildirilmiştir (Vantsis ve ark 1979, Susa ve ark 1992). Ancak E^{rns}'nin ribonükleaz aktivitesi ile toksik etkisi arasındaki ilişki henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Bu sitotoksisitenin E^{rns}'nin yanında, diğer ribonükleazların özellikleri ile de ilgili olabileceği bildirilmiştir (Schein 1997).

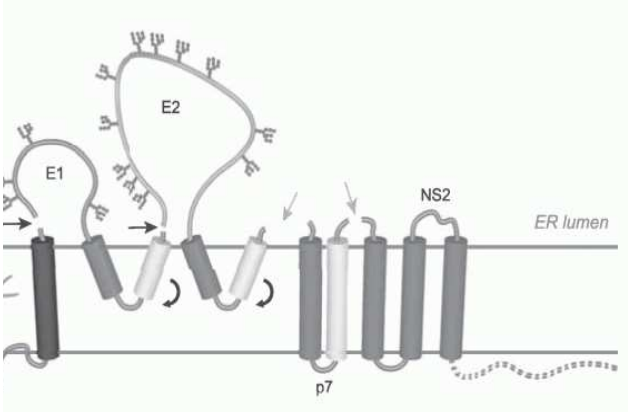
Hem E1 (gp33) hem de E2 (gp55) (Thiel ve ark 1991, Weiland ve ark 1992, Thabti ve ark 2005) integral membran proteini olarak tanımlanmıştır. E2 (58 kDa) proteini Pestivirus'ların hücrelere tutunmasında ve hücreye girişlerinde kullanılmaktadır (Hulst ve Moormann 1997). Yapısal protein olan E1 proteini 2–3 adet, E2 proteini ise 4–6 adet N-bağlı glikolizasyon bölgesi içermektedir (Weiland ve ark 1990).

Viral glikoproteinlerin virusların hücrelere bağlanmaları ve hücreye girişleri esnasındaki bütün rolleri bilinmemekle birlikte E^{rns} (Weiland ve ark 1992) veya E2'ye (Donis ve ark 1988, Wensvoort 1989, Weiland ve ark 1990, Paton ve ark 1992b, Van Rijn ve ark 1993, 1997, Becher ve ark 1997, Letellier ve ark 1999, Couvreur ve ark 2002, Hurdato ve ark 2003, Park ve ark 2004) karşı oluşan monoklonal antikorların virusun enfektivitesini engelleyebildiği ve immunite sağladıkları bildirilmiştir (Rümenapf ve ark 1991b, Van Zijl ve ark 1991, Hulst ve ark 1993).

Bundan sonraki proteinler yapısal olmayan proteinler şeklinde sentezlenir. İlk yapısal olmayan protein p7'dir (Lin ve ark 1994, Mizushima ve ark 1994). Pestivirus'larda yapısal ve yapısal olmayan proteinlerin birleştiği bölgede (Şekil 1.1) yer alan p7 hidrofobik ucu bölen bir merkezden oluşmuştur (Elbers ve ark 1996).
Bu küçük proteinin fonksiyonu tam olarak anlaşılamamış olmasına rağmen enfeksiyöz virusun oluşumunda görev aldığı, RNA replikasyonunda ise rolünün olmadığı düşünülmektedir (Behrens ve ark 1998, Harada ve ark 2000).

Pestivirus p7 yapısal olmayan proteininin, Hepacivirus proteinlerinde olduğu gibi peptidaz sinyalleri sonucunda E2'den ayrılarak oluşabileceği bildirilmiştir (Lin ve ark 1994). Ayrılmamış E2-p7 proteini hücre kültürlerindeki replikasyon için gerekli değildir (Harada ve ark 2000). Hem E2-p7 hem de p7 hücrede değişmeden kalmaktadır (Elbers ve ark 1996).

NS2 proteini (yaklaşık 54 kDa) N ucunda NS2–3 (yaklaşık 125 kDa) (Kümmerer ve ark 2000) bölümünde bulunmaktadır ve olgun ayrılmış şekli sadece ncp BVDV biyotiplerinde yer almaktadır (Meyers ve Thiel 1996). Sitopatojen BVDV biyotiplerinde NS2-3'ün ayrılması (Meyers ve ark 1989, 1992, Qi ve ark 1992, Tautz ve ark 1993) NS2 bölgesi tarafından kodlanan bazı değişiklikler sonucunda gerçekleşmektedir. NS2'nin NS2–3 oluşumundaki görevi tam netlik kazanmamış ve NS2'nin fonksiyonu hakkında çok az bilgi mevcuttur. Ancak RNA replikasyonunda görevli olabileceği tahmin edilmektedir (Behrens ve ark 1998, Moser ve ark 1999, Tautz ve ark 1999). NS2–3 ayrılması ile RNA replikasyonunun seviyesi arasında bir korrelasyon olduğu da bildirilmiştir (Mendez ve ark 1998, Kümmerer ve Meyers 2000).



Şekil 1.2. p7 proteininin E2'den ayrılması (Carrere-Kremer ve ark 2004).

Bütün Flaviviridae familyasında bulunan viruslarda olduğu gibi Pestivirus'ların NS3 yapısal olmayan proteininin N ucunda Serin proteaz bölgesi bulunmaktadır (Bazan ve Fletterick 1989, Gorbalenya ve ark 1989, Chambers ve ark 1990, Wiskerchen ve Collett 1991, Wiskerchen ve ark 1991, Stark ve ark 1993).

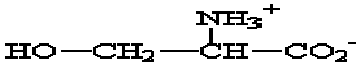
Ayrılmamış NS2–3 proteini Pestivirus replikasyonunda görev alabilirken NS3 proteini ncp BVDV biyotipleri ile enfekte hücre kültürlerinde bulunmamaktadır (Meyers ve Thiel 1995, Kupfermann ve ark 1996, Tautz ve ark 1993, 1996, Becher ve ark 1998b, Kümmerer ve ark 1998, Meyers ve ark 1998, Qi ve ark 1998). NS3 proteaz aktivitesi protein kofaktörü olarak NS4A'ya ihtiyaç duymaktadır (Xu ve ark 1997).

Hidrofobik NS4A ile NS4B proteinleri, benzer boyutta ve kompozisyondadır. Bu proteinlerin bilinen tek fonksiyonları NS4A'nın Serine proteaz kofaktör aktivitesi olarak görev yapmasıdır (Wiskerchen ve ark 1991, Xu ve ark 1997).

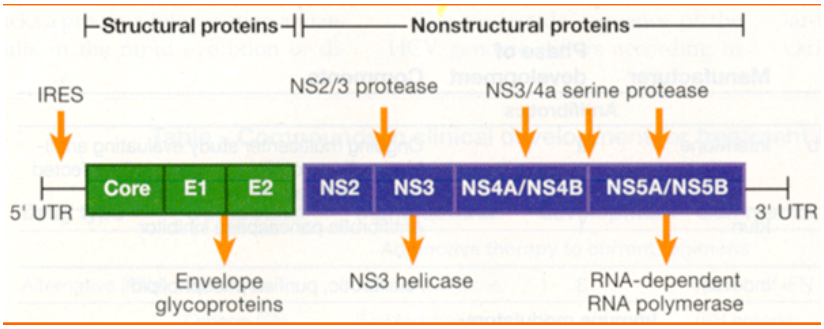
Olgun virionlarda NS5A (yaklaşık 58 kDa) ve NS5B (yaklaşık 75 kDa) şeklinde bulunan iki protein ayrılmamış formda NS5AB şeklinde bulunmaktadır (Collett ve ark 1988b). NS5A'nın fonksiyonu hakkında çok az bilgi bulunmaktadır. Bu protein fosforilize olmuş flavivirus NS5 ve hepacivirus NS5A proteinlerinde olduğu gibi hücresel serine/threonine kinaz tarafından fosforilize olmaktadır (Reed ve ark 1998). NS5B karakteristik olarak RNA dependent RNA polymerase (RdRPs, RNA bağımlı RNA polimeraz) yapısındadır (Dabramo ve ark 2006).

Serine (Şekil 1.3) (Gorbalenya ve ark 1989) aminoasitleri NS3/4A, NS4A/4B, NS4B/5A, NS5A/5B ve NS3 proteaz aracılığı ile sentezlenmektedir (Wiskerchen ve Collett 1991, Tautz ve ark 1997, Xu ve ark 1997). Pestivirus'ların 5' NCR'leri translasyonun başlatılabilmesi için gerekli olan internal ribosome entry sites (IRES, iç ribozom giriş bölgesi) içermektedir (Jang ve ark 1988, Pelletier ve Sonenberg 1988, Jang ve ark 1989, Borman ve Jackson 1992, Tsukiyama-Kohora ve ark 1992, Deng ve Brock 1993, Poole ve ark 1995, Rijnbrand ve ark 1997) (Şekil 1.4). Pestiviral RNA'larının 5' ve 3' sekansları viral replikasyon, transkripsiyon ve translasyon olayları için ek spesifik sinyalleri barındırmaktadır. Spesifik replikaz ve

translasyon kompleksi sırasında hem primer hem de sekonder yapılar sinyal verici olarak kullanabilmektedirler (Strauss ve Strauss 1994).



Şekil 1.3. Serine'nin yapısı (Gorbalenya ve ark 1989).



Şekil 1.4. İç ribozom giriş bölgeleri (Medscape 2008).

Pestivirus'ların 3' NCR'sinin fonksiyonları tam olarak bilinmemektedir (Becher ve ark 1998a). 5' NCR'de; 1, 2 ve 3 olarak isimlendirilen farklı 3 bölge bulunmaktadır (Deng ve Brock 1993). Bölge 2 ve bölge 3'ün farklı filogenetik gruplar (BDV, BVDV–1, BVDV–2) ile karşılaştırıldığı çalışmada, sadece BVDV–1 genotipinde yer alan bölge 2 ve bölge 3'de farklılık tespit edildiği, BDV alttiplerinde (A ve B) ise sadece bölge 3'de ve daha az oranda değişkenlik belirlendiği bildirilmiştir (Vilcek ve ark 1997).

Vilcek ve ark (1997) BDV biyotiplerine ait sekans analizlerini gerçekleştirdikleri çalışmalarında, 5' NCR'lerin nükleotid kimliklendirmesini yaptıklarında %90–99 arasında benzerlik tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Diğer Pestivirus'ların nükleotid kimliklendirmesi ile karşılaştırıldığında ise BDV biyotipleri ile CSFV arasında %72–80, BVDV–1 ile %57–65 ve BVDV–2 ile %53–59 oranında benzerlik tespit edildiği belirtilmiştir (Vilcek ve ark 1997).

Vilcek ve ark (1997) Pestivirus p20 bölgesinin nükleotid ve aa sekans analizini gerçekleştirdikleri çalışmada BDV genotipleri arasında %77–100, BDV ile CSFV arasında %70–86 ve BVDV–1 ile BVDV–2 arasında %62–66 oranında benzerlik tespit ettiklerini bildirmişlerdir.

Pestivirus'ların p20 bölgesinin nükleotid değişkenliği 5' NCR'den daha fazla olmasına rağmen antijenik ilişki içerisindeki virusların filogenetik yönden karşılaştırılacağı çalışmalarda ya p20 bölgesinin ya da 5' NCR'nin kullanılması tavsiye edilmektedir (Vilcek ve ark 1997).

Border Disease Virus genotipi, CSFV ve BVDV genotipleri ile karşılaştırıldığında, CSFV genotipi ile daha çok benzerlik gösterdiği açıklanmıştır (Lowings ve Paton 1992, Roehe ve ark 1992, Becher ve ark 1994, Vilcek ve ark 1997).

Bazı cp BVDV biyotiplerinin viral sekanslarında büyük duplikasyon ve delesyonlar bildirilmesine rağmen BVDV, CSFV ve BDV'lerin ncp biyotiplerinin genomlarında herhangi bir mutasyon bildirilmemiştir (Meyers ve ark 1989, Moorman ve ark 1990, Meyers ve ark 1989, 1991, 1992, Deng ve Brock 1992, Qi ve ark 1992, Tautz ve ark 1993, 1994, Becher ve ark 1994).

Pestivirus genusunda 6 adet virus bulunduğu bildirilmesine rağmen, 4 adet virus (CSFV, BVDV–1, BVDV–2 ve BDV) izole edilebilmiştir (Becher ve ark 1994, 1999, Avalos-Ramirez ve ark 2001, Thiel ve ark 2005, Cranwell ve ark 2007).

Domuzlarda bu familyada yer alan viruslardan sadece CSFV izole edilirken (Van Oirschot ve Terpstra 1977, Meyer ve ark 1981, Harkness 1985, Paton ve ark 1992a, Wengler ve ark 1995a, Vilcek ve Belak 1996, Vilcek ve Nettleton 2006) koyunlarda çoğunlukla BDV olmak üzere diğer 3 virus (BVDV–1, BVDV–2 ve CSFV) da izole edilmiştir (Acland ve ark 1972, Vilcek ve ark 1997). İzole edilen BDV biyotipleri çoğunlukla ncp'dir (Lee ve Gillespie 1957, Vantsis ve ark 1976, Barlow ve ark 1983, Gardiner ve ark 1983, Brockman ve ark 1988, Nettleton ve Entrican 1995).

1.2.7. Hücreye bağlanma ve hücre içerisine giriş

Pestivirus'ların hücreye bağlanmaları ve hücre içerisine girişleri; virionların hücre membranına bağlanmaları, spesifik reseptörler ile interaksiyon, hücre membranının içe doğru kıvrılması ve membranın füzyonu gibi basamaklarından oluşmaktadır (Akkina ve Raisch 1990).

Bugüne kadar Pestivirus'lara spesifik hücre yüzey reseptörü tam olarak belirlenememiştir. Schelp ve ark (1995)'ın yapmış oldukları çalışmada moleküler ağırlıkları 60 kDa ve 93 kDa olan iki proteinin Pestivirus'ların bağlanmaları için spesifik olabileceği bildirilirken antiidiotipik antiserum (E2 spesifik antikorlara karşı) kullanılarak gerçekleştirilen araştırmalarda 50 kDa ağırlığındaki bir proteinin Pestivirus'lara spesifik olabileceği ifade edilmiştir (Xue ve Minocha 1993, Minocha ve ark 1997, Xue ve ark 1997).

Rekombinant E2 ve E^{rns} birbirinden bağımsız olarak hücre yüzeylerine tutunabilmektedirler (Hulst ve Moormann 1997). Bazı Pestivirus'ların hücre içerisine giriş mekanizmaları ile ilgili daha fazla bilgi (RNA transfeksiyonu, replikasyonu ve virus-hücre füzyonu) mutant sığır böbrek hücre kültürleri ile yapılan çalışmadan elde edilmeye çalışılmıştır (Flores ve ark 1996). Ancak bu hücre kültürleri, low density lipoprotein reseptör (LDLR)' lerinin sentezlenmesine yönelik çalışmalarda yetersiz kalmaktadır (Agnello ve ark 1999).

Virus ile enfekte hücreler elektron mikroskopik olarak incelendiğinde, olgun Pestivirus'ların intracellular (hücre içi) veziküllerin içerisinde bulunduğu ve ekzositozis yolu ile hücrelerden ayrıldığı bildirilmiştir (Laude 1977, Bielefeldt Ohmann ve Bloch 1982, Gray ve Nettleton 1987, Moormann ve Hulst 1988).

Enfekte hücrelerdeki virusun hücrelerden ayrılması için dondurma çözdürme işlemi uygulanabilmektedir (Laude 1977, Moormann ve Hulst 1988).

1.2.8. Konakçı Spektrumu

Sınıflandırma amacıyla kullanılmasına rağmen BVDV ve BDV'nin konakçı spektrumunun kesin çizgilerle ayrılamadığı ve türler arasında bulaşmaların gerçekleştiği bildirilmiştir (Snowdon ve French 1968, French ve ark 1974, Harkness ve ark 1978, Barlow ve ark 1980b, Physcik-Sheard ve ark 1980, Barlow ve Patterson 1982, Dahle ve ark 1987, Nettleton 1987, 1990, Terpstra ve Wensvoort 1988, Wensvoort ve Terpstra 1988, Collett ve ark 1989, Jewett ve ark 1990, Moennig 1990, Nettleton 1990, Carlsson 1991, Depner ve ark 1991a, Loken ve ark 1991, Roehe ve ark 1992, Carlsson ve Belak 1994, Paton 1995, Sullivan ve Akkina 1995, Sullivan ve ark 1997, Becher ve ark 1997, 2003, Grondahl ve ark 2003, Hurdato ve ark 2003, Giangaspero ve Harasawa 2004, Evermann 2006, Rasmussen ve ark 2008).

Julia ve ark (2009) Arjantin'de yapmış oldukları çalışmada 54 adet koyun kan örneğini BVDV–1 ve BVDV–2 varlığı yönünden incelemişlerdir. Araştırmacılar (Julia ve ark 2009), örneklerin % 46.3'ünü (25/54) BVDV–1 yönünden, % 13'ünü (7/54) BVDV–2 yönünden, % 20.4'ünü (11/54) hem BVDV–1 hem de BVDV–2 yönünden pozitif, % 14.8'ini (8/54) ise hem BVDV–1 hem de BVDV–2 yönünden negatif tespit ettiklerini bildirmişlerdir.

Benzer şekilde BVDV–1 (Pellerin ve ark 1994, Ridpath ve ark 1994, Vilcek ve ark 2001) ve BVDV–2 (Paton ve ark 1995, Sullivan ve Akkina 1995, Wolfmeyer ve ark 1997, Qi ve ark 1998, Flores ve ark 2000, Bhudevi ve Weinstock 2001, Fulton ve ark 2002, 2005, Giangaspero ve Harasawa 2004) sığırların başlıca Pestivirus'ları arasında yer almasına rağmen aynı zamanda koyunları (Snowdon ve French 1968, Terlecki ve ark 1980, Loken 1987, Pellerin ve ark 1994, Ridpath ve ark 1994, Becher ve ark 1995, 1997, 1999, Thabti ve ark 2002) keçileri (Barlow ve Patterson 1982, Becher ve ark 1997), domuzları (Becher ve ark 1999, Vilcek ve ark 1999) ve farklı vahşi ruminant türlerini de enfekte edebilmektedir (Becher ve ark 1999, Pizarro-Lucero ve ark 2005).

Border Disease Virus, koyun ve keçilerin (Dickinson ve Barlow 1967, Acland ve ark 1972, Gardiner ve ark 1972, Loken 1982, 1990, Terpstra 1985, Russo 1986, Loken ve ark 1991, Loken ve Bjerkas 1991, Paton 1995, Vilcek ve Belak 1996, Vilcek ve ark 1997, Nettleton ve ark 1998, Pratelli ve ark 1999, Tegtmeier ve ark 2000, Krametter-Froetscher ve ark 2006) başlıca kongenital etkenleri arasında yer alırken (Barlow ve Patterson 1982, Bielefeldt-Ohmann 1984, Westaway ve ark 1985, Potts ve ark 1985, Sharp ve Rawson 1986, Anderson ve ark 1987a, Bonniwell ve ark 1987, Brugere-Picoux 1987, Burrells ve ark 1989, Akkina ve Raisch 1990, Nettleton 1990, Carlsson 1991, Moennig ve Plagemann 1992, Nettleton ve ark 1992, Sawyer 1992, McGowan ve Kirkland 1995, Munoz-Zanzi ve ark 2003, Yousif ve ark 2004, Marco ve ark 2007, 2008) aynı zamanda akut ve persiste enfeksiyonlara da neden olabilmektedir (Krametter-Froetscher ve ark 2007).

Etkenin doğal konakçı spektrumunda koyun ve keçiler bulunmaktadır (Fulton ve ark 1982, Barlow ve Patterson 1982, Loken 1982, 1995, Loken ve ark 1982a, Elazhary ve ark 1984, Lamontagne ve Roy 1984, Terpstra 1985, Russo 1986, Depner ve ark 1991b, Loken ve Bjerkas 1991, Taylor ve ark 1997, Nettleton ve ark 1998, Zaghawa 1998, Tegtmeier ve ark 2000, Pratelli ve ark 2001, Stalder ve ark 2004, De Mia ve ark 2005, Krametter-Froetscher ve ark 2006, Marco ve ark 2007). Bunun yanında domuz (Roehe ve ark 1992, Becher ve ark 1995, Loken 1995, Paton 1995, Paton ve ark 1995, Vilcek ve Belak 1996, Vilcek ve ark 1997, Walz ve ark 1999, Graham ve ark 2001b, Schirrmeier ve ark 2002, Krametter-Froetscher ve ark 2006) ve vahşi ruminantlar da BDV'nin konakçı spektrumunda yer almaktadır (Snowdon ve French 1968, Hamblin ve Hedger 1979, Elazhary ve ark 1981, Nettleton 1990, Volker 1990, Motha ve Tham 1992, Frölich 1995, Frölich ve Hoffmann 1995, Fischer ve ark 1998, Zaghawa 1998, Vilcek ve ark 2000, Van Campen ve ark 2001, Becher ve ark 2003, Grondahl ve ark 2003, Arnal ve ark 2004, Schirrmeier ve ark 2004, Uttenthaal ve ark 2005, Vilcek ve Nettleton 2006).

Domuzların BDV enfeksiyonu sonucu BDV'ye karşı oluşacak antikorların CSFV'nin teşhisinde hatalı sonuçlara neden olabildiği bildirilmiştir (Roehe ve ark 1992, Paton ve ark 1995, Vilcek ve Belak 1996).

Çeşitli tek tırnaklılar ve geyiklerde BDV enfeksiyonunun varlığı serolojik olarak belirlenmiş ve bunların evcil hayvanlar için enfeksiyon kaynağı olabilecekleri bildirilmiştir (Moennig ve ark 1990).

Pestivirus'ların konakçıları arasında yer alan vahşi ruminantlar ise kırmızı geyik (Cervus elaphus), karaca (Capreolus capreolus), alageyik (Dama dama), Afrika bizonu (Syncerus caffer), zürafa (Giraffa camelopardalis) (Thiel ve ark 2005), Afrika antilobu (Connochaetes) ve Amerikan geyiği (Alces alces) şeklinde sayılabilmektedir (Pritchard 1963, Moennig ve ark 1990) (Resim 1.3).



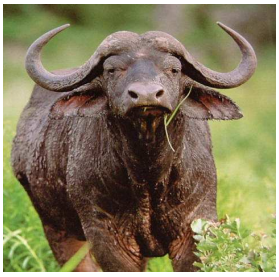
Cervus elaphus



Capreolus capreolus



Dama dama



Syncerus caffer



Giraffa camelopardalis



Connochaetes



Alces alces

Resim 1.3. Pestivirus konakçıları arasında yer alan vahşi ruminantlar (Discoverlife 2008).

Koyunlarda BDV, BVDV–1 veya BVDV–2'nin izole edildiği birçok çalışma bildirilmiştir (Ridpath ve ark 1994, Ridpath ve Bolin 1995, Vilcek ve ark 1997, Wakeley ve ark 2004, Cranwell ve ark 2007). Norveç ve İsveç'de koyunların BVDV–1 ile enfekte oldukları bildirilmiştir (Vilcek ve ark 1997, Sandvik ve ark 2002). İngiltere'de ise koyunların aynı anda hem BDV hem de BVDV–1 ile enfekte olabileceği rapor edilmiştir (Willoughby ve ark 2006).

Koyunların; sığırların Pestivirus enfeksiyonları için rezervuar olarak görev yapabildiği bildirilmiştir (Wakeley ve ark 2004). Bu konuda bir çalışma yapan Vilcek ve ark (1997) İngiltere'de BVDV–2 ile enfekte koyun varlığını tespit etmişlerdir. Bazı araştırmacılar (Sullivan ve Akkina 1995, Sullivan ve ark 1997) ise koyunların Pestivirus genusunda yer alan 3 virus (BDV, BVDV–1 ve BVDV–2) ile enfekte olduğunu rapor etmişlerdir.

Keçilerdeki Pestivirus enfeksiyonları için ana konakçının koyun ve sığırlar olabileceği bildirilmektedir (Loken ve ark 1991, Loken 1995, Krametter-Froetscher ve ark 2006).

Bovine Viral Diarrhea Virus CP7 ve BDV Gifhorn suşlarının, domuzlarda deneysel olarak enfeksiyon meydana getirdiği bildirilmiştir (Reimann ve ark 2004, Uttenthal ve ark 2004).

1.3. Epizootiyoloji

Border Disease Virus enfeksiyonu dünyada ilk defa 1959 yılında İngiltere ile Galler arasındaki sınır bölgesindeki (Şekil 1.5) koyunlarda tespit edildiği bildirilmiştir (Hughes ve ark 1959).



Şekil 1.5. İngiltere ile Galler arasındaki sınır bölgesi (Geoatlas 2009).

Daha sonraki yıllarda ise Yeni Zelanda (Hartley ve Kater 1962, Manktelow ve ark 1969, Terpstra 1985, Vilcek ve ark 1997, 1998), İskoçya (Barlow 1980), İrlanda (Hamilton ve Donnelly 1970), Avustralya (French ve Snowdon 1964, Acland ve ark 1972, Plant ve ark 1976, Becher ve ark 1994, 1997), İsviçre (Cravero ve ark 1975), Yunanistan (Spais ve ark 1975), Norveç (Loken ve Barlow 1981), Güney Fransa (Russo ve ark 1987), İsrail (Abraham ve ark 1991), Hollanda (Vilcek ve Belak 1996) Amerika Birleşik Devletleri (ABD) (Ridpath ve Bolin 1997), İspanya (Hurtado ve ark 2003, Arnal ve ark 2004, Frölich ve ark 2005), İngiltere (Osburn ve ark 1972, Vilcek ve ark 1997), İtalya (Pratelli ve ark 2001, De Mia ve ark 2005), İsviçre (Stalder ve ark 2005), İsveç (Schaller ve ark 2000) ve ülkemizde (Burgu ve ark 1987) BDV enfeksiyonunun varlığı bildirilmiştir.

Border Disease Virus enfeksiyonunun doğal bulaşma yolu ile ilgili ilk bilgiler 1967 yılında İngiltere'de (Dickinson ve Barlow 1967), 1969'da ise Yeni Zelanda'da (Manktelow ve ark 1969) bildirilmiştir.

Border Disease Virus enfeksiyonu ile ilgili yapılan çalışmalarda enfekte ve enfekte olmayan hayvanların bir arada tutulmalarının önemi belirtilmiş ve kapalı alanlarda yetiştirilen hayvanların çayırda otlatılan hayvanlara oranla BDV enfeksiyonundan daha az etkilendikleri bildirilmiştir (Bonniwell ve ark 1987, Nettleton ve ark 1992).

Enfeksiyonun nakli → Direkt → Vertikal (Krametter-Froetscher ve ark 2007a)
→ İndirekt → Horizontal (Shaw 1971)

Etken, enfekte hayvanlardan burun akıntısı (Archbald ve ark 1977, Roeder 1982, Straver ve ark 1983), idrar (Terpstra 1981, Sawyer ve ark 1986, Sawyer 1992), salya (Duffel ve Harkness 1985, Sawyer ve ark 1986, Sawyer 1992), gaita (Archbald ve ark 1977, Terpstra 1981), semen (Kirkland ve ark 1991), gözyaşı (Brownlie ve ark 1989), süt (Brownlie ve ark 1989), genital sistem akıntıları gibi sekret ve ekskretlerin (Archbald ve ark 1977, Barlow ve ark 1980a, Gardiner ve Barlow 1981, Terpstra 1981, Bielefeldt-Ohmann 1984, 1988, Barlow ve ark 1986, Meyling ve Jensen 1988, Fenton ve ark 1991, Nettleton ve ark 1992, Sawyer 1992, Palfi ve ark 1993, Bosch ve ark 1996, Brock ve ark 1998, Houe 1999, Nodelijk ve ark 2001, Kittelberger ve Pigott 2008) yanında abort olan fötus (Barlow ve Patterson 1982, Terpstra 1985, Brugere-Picoux 1987, Nettleton 1987, Russo ve ark 1987, Nettleton ve ark 1992, 1998, Fulton ve ark 1999, Pratelli ve ark 1999, Loken 2000, Krametter-Froetscher ve ark 2007, Marco ve ark 2007, Valdazo-Gonzalez ve ark 2007a, 2007b), fötal membran (Archbald ve ark 1977) ve kan (Archbald ve ark 1977, Nettleton ve ark 1985, Bolin ve ark 1987, Brownlie ve ark 1987, Ohmann 1988, Jensen ve ark 1990, Kelling ve ark 1990) ile de saçılmaktadır. Persiste enfekte koyunların sekret ve ekskretleri ile sadece ncp BDV'nin saçıldığı bildirilmiştir (Gardiner ve ark 1983).

Border Disease Virus ile kontamine olmuş aşıların BDV'nin bulaşmasında oldukça önemli oldukları bildirilmiştir (King ve Harkness 1975, Kniazeff ve ark 1975, Spais ve ark 1975, Liess ve ark 1984, Vannier ve ark 1988, Wensvoort ve Terpstra 1988, Dlissi ve ark 1998, Russo ve ark 1999, Thabti ve ark 2002). Thabti ve ark (2005) Tunus'ta Pestivirus ile kontamine olmuş koyun çiçeği aşısı uygulaması sonucunda BDV enfeksiyonunun ortaya çıktığını belirtmişlerdir.

Persiste enfeksiyon generalize bir enfeksiyondur. Retiküloendotelyal sistem hücreleri, epitelyal ve endotelyal hücreler başta olmak üzere iç organların bir çoğunda virus bulunmaktadır (Niskanen ve ark 1989).

Bovine Viral Diarrhea Virus'unun deneysel olarak kan emen sinekler tarafından da bulaştırılabileceği bildirilmiştir (Tarry ve ark 1991). Ancak BDV'nin bu yolla bulaşabileceğine dair herhangi bir bilgi bulunmamaktadır.

Fötal immun yanıt şekillenmeden önce intrauterin enfeksiyona maruz kalan koyunlardan persiste viremik olarak doğan kuzular yaşamları boyunca sekret ve ekskretleri ile virus saçarak enfeksiyonun bulaştırılmasında büyük rol oynamaktadırlar (Hughes ve ark 1959, Gard ve ark 1976, Westbury ve ark 1979, Barlow ve ark 1980a, 1986, Meyer ve ark 1981, Terpstra 1981, Orban ve ark 1983, Liess ve ark 1984, McClurkin ve ark 1984, Bolin ve ark 1985, Brownlie ve ark 1987, Meyling ve Jensen 1988, Radostits ve Littlejohns 1988, Woldehiwet ve Sharma 1990, Carlsson 1991, Nettleton ve ark 1992, Sawyer 1992, Palfi ve ark 1993, Hussin ve Woldehiwet 1994, Nettleton ve Entrican 1995, Tremblay 1996, Brock ve ark 1998, Fischer ve ark 1998, Houe 1999, Mars ve ark 1999, Nettleton 2000).

Border Disease Virus'unun koyunlardan sığırlara ve BVDV'nin ise sığırlardan koyunlara direkt kontakt yolla geçişinin çok kolay olduğu bildirilmiştir (Radostits ve Littlejohns 1988, Traven ve ark 1991, Houe 1992, Hussin ve Woldehiwet 1994, Nettleton ve Entrican 1995, Houe 1999, Niskanen ve Lindberg 2003).

Ayrıca BDV'nin antijenik ilişkisinden dolayı domuzlara da bulaştığı ifade edilmiştir (Snowdon ve French 1968, Harkness ve ark 1978, Parsonson ve ark 1979, Terlecki ve ark 1980, Dahle ve ark 1987, Loken 1987, Wensvoort ve Terpstra 1988, Carlsson 1991, Depner ve ark 1991a, Roehe ve ark 1992, Paton 1995, Sullivan ve Akkina 1995, Becher ve ark 1997, 1999, Sullivan ve ark 1997, Thabti ve ark 2002, Giangaspero ve Harasawa 2004).

Carlsson (1991), yapmış olduğu çalışmada BVDV ile PI sığırlarla aynı yerde tutulan gebe koyunlarda BDV semptomları gözlemlemiş ve canlı doğan kuzulardan virus izole ettiğini bildirmiştir. BVDV ya da BDV ile enfeksiyona maruz kalmış olan yetişkin sığır populasyonlarında %70 oranında seropozitiflik tespit edilmesine karşın, endemik BDV salgınlarında koyunlardaki seropozitiflik oranının %20'lere ulaşmadığı bildirilmiştir (Barlow 1982). Bu farklılığın temel nedeni tam olarak açıklanamamamıştır. Ancak BDV'nin bazı suşlarının sığırlar arasında koyunlara oranla çok daha kolay yayılabildiği bildirilmiştir (Barlow 1982).

1.4. Patogenez ve Patoloji

Sadece ncp biyotiplerinin plasentayı geçip fötusta enfeksiyon oluşturabildiği bunun aksine cp biyotiplerin ise geçemediği bildirilmiştir (Brownlie ve ark 1989, Moennig ve Liess 1995, Fredriksen ve ark 1999). Bununla birlikte Hewicker-Trautwein ve ark (1994) yaptıkları deneysel araştırma sonucunda cp BDV biyotipi damariçi enjekte ederek enfekte ettikleri gebe koyunların fötuslarında enfeksiyon meydana geldiğini bildirmişlerdir.

Sitopatojen biyotipler ile ilgili 4 farklı görüş bulunmaktadır. Bunlardan birincisi, cp biyotipin plasentadaki maternofötal bariyeri geçemediğidir (Kendrick 1971). İkincisi, cp biyotipin erken dönemlerdeki fötusu enfekte edebildiği fakat daha sonra ncp hale dönüşebildiğidir (Done ve ark 1980). Üçüncü görüş, cp biyotipin fötus gelişiminin erken dönemleri için patojen olduğu ancak bu durumun fazla uzun sürmediğidir (McClurkin ve ark 1984). Dördüncü görüş ise cp biyotipin fötal hücre veya sıvılar tarafından inaktive edilmeye ncp biyotipten daha fazla eğilimli olduğudur (Brownlie ve ark 1989).

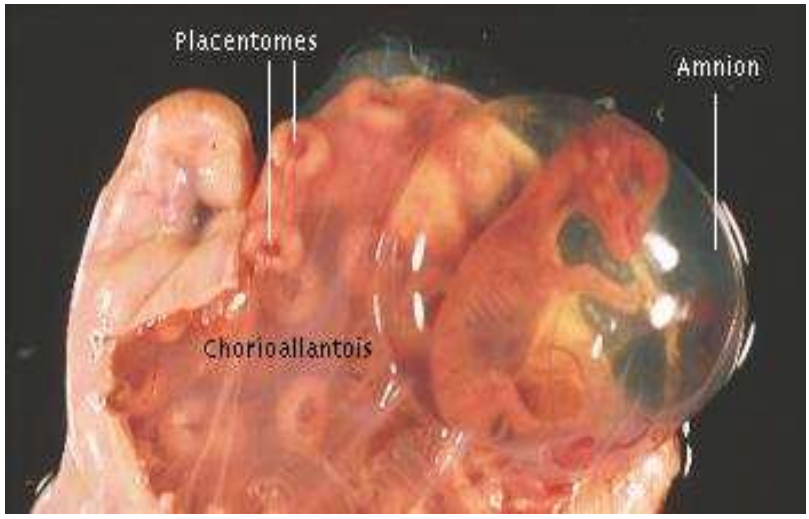
Sitopatojen olmayan BDV ile enfekte koyunlarda; lenfoproliferasyon, mukozal değişiklikler ve diyare ile karakterize ölümcül mukozal disease (MD) benzeri sendromun gelişebildiği belirtilmiştir (Barlow ve ark 1983, Gardiner ve ark 1983, Baker 1987, Nettleton ve ark 1992, Sawyer 1992, Saliki ve ark 1997, Aly ve ark 2003, Hurdato ve ark 2003, Monies ve ark 2004).

Persiste enfekte immuntolerant (Coria ve McClurkin 1978, McClurkin ve ark 1984) bir kuzunun homolog bir Pestivirus ile süperenfeksiyonu (Barlow ve ark 1983, Gardiner ve ark 1983, Baker 1987, Perdrizet ve ark 1987, Radostits ve Littlejohns 1988, Brownlie 1990, Nettleton ve ark 1992) sonucu MSS'de, bağırsaklarda, akciğerlerde, kalpte (Jeffrey ve Roeder 1987, Jeffrey ve ark 1990, Loken ve ark 1990, 1991, Carlsson ve Belak 1994), böbreklerde lenfoproliferatif bir yangıya eşlik eden kalıcı bir diyare ve solunum güçlüğü şekillenmektedir (Barlow ve ark 1983, Jeffrey ve Roeder 1987, Nettleton ve ark 1992, Radostits ve ark 1994).

Süperenfeksiyonun RNA'nın replikasyonu sırasındaki bir mutasyon ya da rekombinasyon sonucunda meydana geldiği ve oluşan cp biyotipin hayvanı ölüme götürdüğü düşünülmektedir (Howard ve ark 1987, Collins ve ark 1999).

Sığır ve koyunların pestivirus enfeksiyonları için benzer patogenez bildirilmiştir (Gardiner ve ark 1983, Nettleton ve ark 1992). Ancak Becher ve ark (1996) yaptıkları araştırmada izole ettikleri BDV'nin ncp biyotip olduğunu ve MD benzeri bir sendrom tespit etmediklerini bildirmişlerdir. Bunun için koyunlardaki ncp BDV'nin patogenezi hakkında bilinmeyen hususlar bulunmaktadır (Becher ve ark 1996).

Koyunlarda plasenta syndesmo-chorial, adeciduata, villosa cotyledonota yapısındadır (Sammin ve ark 2009) (Resim 1.4). Koyun blastositleri preimplantasyon sürecinde Pestivirus enfeksiyonlarının geçişine izin vermez (Evermann ve ark 1981, Sawyer ve ark 1991). Bu süreç içerisinde embriyonun uterusa tutunması tamamlanmamıştır. Embriyonun uterus duvarına tutunması 17. günden itibaren başlamaktadır. Border Disease Virus'unun zona pellucidayı geçemediği bildirilmiştir (Manktelow ve ark 1969, French ve ark 1974).



Resim 1.4. Koyun plasentası (Vivo 2008).

Klinik semptomlar gözlensin ya da gözlenmesin gebe koyunların BDV enfeksiyonu, fötusun enfeksiyonu ile sonuçlanabilmektedir. Bu geçiş:

a) Virusun hematojen yolla plasentayı geçmesi,

b) Virusun genital mukozadan girerek amniyonu geçmesi,

c) Ovaryumdaki gametlerin enfeksiyonu sonucu olabilmektedir.

Karşılaşılacak transplasental enfeksiyonlar; erken embriyo ölümleri (Nettleton ve ark 1998, Pratelli ve ark 1999), intrauterin gelişme azlığı (Caffrey ve ark 1997), MSS deformasyonları (Acland ve ark 1972, Barlow ve Patterson 1982, Plant ve ark 1983a, Potts ve ark 1985), iskelet sistemi bozuklukları (Osburn ve ark 1973, Terlecki ve ark 1973, Barlow ve Patterson 1982, Akkina ve Raisch 1990, Sawyer 1992, Sawyer ve ark 1993), persiste viremik kuzuların doğumu, 'Hairy Shaker' görünümlü kuzuların doğumu (Hartley ve Kater 1962, Manktelow ve ark 1969, Plant ve ark 1976, Terpstra 1981, Terpstra 1985, Nettleton ve ark 1992, 1998, Caffrey ve ark 1997, Monies ve ark 2004), deri ve yünde değişikliklere neden olabilmektedir (Osburn ve ark 1973, Sawyer ve ark 1986, Bonniwell ve ark 1987, Nettleton 1987, Roeder ve ark 1987, Jeffrey ve ark 1990, Wolf ve Buttner 1994).

Border Disease Virus enfeksiyonunun patogenezi; akut enfeksiyon, fötal enfeksiyon, persiste enfeksiyon ve teratojenik etkiler başlıkları altında toplanmaktadır (Thabti ve ark 2002, Giangaspero ve Harasawa 2004, Moen ve ark 2005, Krametter-Frotscher ve ark 2007).

a) Akut enfeksiyonlar

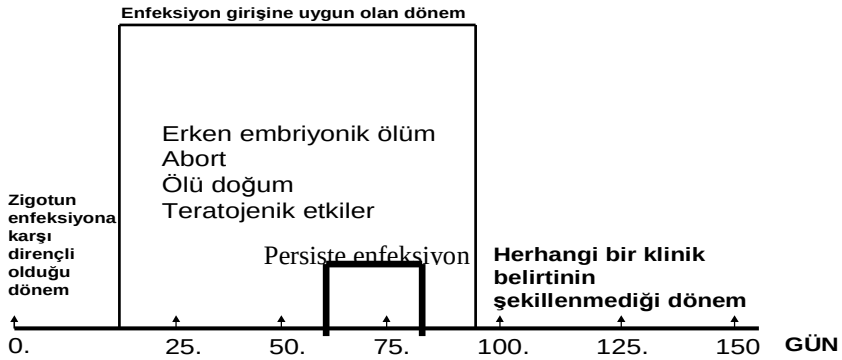
Border Disease Virus'una maruz kalmış yetişkin koyunlar ya da yeni doğmuş sağlıklı kuzular, enfeksiyonu çok az klinik belirti göstererek geçirmektedirler. Enfeksiyondan sonraki 12–24 saat içinde virusun titresi maksimum düzeye ulaşmaktadır (Purchio ve ark 1983, Moormann ve Hulst 1988, Gong ve ark 1996). Ayrıca 4–11. günler arasında görülen hafif ateş ve lökopeni tablosunun kısa süren viremi ile ilişkili olduğu ifade edilmiştir (Vantsis ve ark 1979, Barlow ve Gardiner 1983, Radostits ve Littlejohns 1988, Thabti ve ark 2002).

b) Fötal enfeksiyon

Fötal enfeksiyonun şiddeti; fötusun yaşı (Barlow ve ark 1983, Plant ve ark 1983a, Brownlie ve ark 1984, McClurkin ve ark 1984, Terpstra 1985, Bonniwell ve ark 1987, Jeffrey ve Roeder 1987, Perdrized ve ark 1987, Roeder ve ark 1987 Radostits ve Littlejohns 1988, Nettleton ve ark 1992, Sawyer 1992, Larson 1996), virusun enfeksiyözite gücü (Bonniwell ve ark 1987, Roeder ve ark 1987, Houe 1999), konağın genotipi, fötal immun yanıta bağlıdır (Radostits ve ark 1994). Bunların dışında etkenin diaplasental geçişinde 3 faktör (Agamaglobunemik ortam, gelişmemiş immun sistem ve farklılaşmamış organ sistemi) rol oynamaktadır (Baginski ve ark 2000).

İntrauterin enfeksiyonu takiben, gelişimini sürdüren fötal organogenezis çeşitli aşamalarda etkilenebilmekte ve etkilenen organlar, enfeksiyona maruz kalmayan diğer fötal organlara oranla daha küçük yapıda kalmaktadır (Terlecki ve ark 1973, Radostits ve ark 1994).

Fötal ölüm, genellikle gebeliğin erken dönemlerinde görülse bile herhangi bir döneminde de şekillenebilmektedir. Erken dönemde meydana gelen ölümler plasentanın fötusu rezorbe etmesinden dolayı fark edilmeyebilmektedir. Bu durum gebe koyunda herhangi bir klinik belirtiye neden olmayabilmektedir (Radostits ve ark 1994, Nettleton ve ark 1998).



Şekil 1.6. Border Disease Virus enfeksiyonunun gebelik periyodunda meydana getirdiği etkiler.

Gebeliğin orta dönemlerinde meydana gelecek fötal enfeksiyonlar lokomotor rahatsızlıklara yol açmasının yanında çeşitli sinirsel belirtiler (Barlow ve Patterson 1982) gösteren ve anormal iskelet yapısına sahip kuzuların doğumuna neden olabilmektedir (Nettleton ve ark 1998, Pratelli ve ark 1999). Bu tür kuzularda serebellar hipoplazi ve displaziye ait lezyonlar ile hydroencephali ve porencephaliye bağlı nekrozlaşmış yangılar görülebilmektedir (Barlow 1980, Barlow ve ark 1983, Potts ve ark 1985, Jeffrey ve ark 1990, Loken ve ark 1991, Sawyer 1992, Möller ve ark 1993). Plant ve ark (1983b) BDV'den etkilenen kuzularda fokal lökomalasi tespit ettiklerini bildirmişlerdir.

Eğer fötus gebeliğin son döneminde BDV ile enfekte olursa kuzuların normal ve sağlıklı doğabildiği belirtilmiştir. Bu kuzularda virus bulunmazken BDV'ye karşı oluşan antikorlar bulunabilmektedir. Bazı kuzular ise güçsüz olup yaşamlarının erken dönemlerinde ölebilmektedirler (Barlow ve Patterson 1982).

Kuzulama mevsimi yaklaştığında ise büyük fötusların abortu ya da küçük, zayıf, prematüre kuzu doğumları görülebilmektedir (Şekil 1.6) (Barlow ve Patterson 1982, Nettleton ve ark 1992, Houe 1993, Pratelli ve ark 1999, Moen ve ark 2005).

Radostits ve ark (1994) yaptıkları çalışmada BDV'den etkilenen kuzularda alın-anüs arası uzunlukta kısalma, tibia ve radiusta kısalık tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Caffrey ve ark (1997) ise tibia uzunluğunun enfeksiyondan 35–42 gün sonra belirgin şekilde azaldığını ifade etmişlerdir.

c) Persiste enfeksiyon

Koyun fötusu yaklaşık 150 günlük gebelik süresinin 60–85. günleri arasında immun yanıt oluşturabilme yeteneği kazanmaktadır. Gebeliğin ilk 85 gününde fötusda immunkompotent durum gelişmeden önce (Lewis ve ark 1970, Coria ve McClurkin 1978, Fahey ve Morris 1978, Barlow 1980, Terpstra 1981, McClurkin ve ark 1984, Anderson ve ark 1987b, Burrells ve ark 1989, Carlsson 1991, Nettleton ve ark 1992, Sawyer 1992, Möller ve ark 1993, Thür ve ark 1997, Krametter-Frotscher ve ark 2007) ncp BDV biyotip ile şekillenecek enfeksiyon sonucu kontrolsüz çoğalan virus, fötusun ölümüne veya viremik PI kuzuların doğumuna neden

olmaktadır (Gardiner ve Barlow 1981, Terpstra 1981, 1985, McClurkin ve ark 1984, Nettleton ve ark 1987, 1992, 1998, Pratelli ve ark 1999, Garcia-Perez ve ark 2009).

Garcia-Perez ve ark (2009) yapmış oldukları deneysel çalışmada gebeliğin 55. gününde enfekte ettikleri koyunlardan elde ettikleri kuzuların viremik olduklarını bildirmişlerdir.

Gebeliğin erken dönemlerinde enfeksiyondan kurtulan kuzularda virus tüm organlara yayılmaktadır. Pestivirus'ların özellikle lenf sistemine affinite gösterdiği bilinmektedir (Potts ve ark 1985, Lamontagne ve ark 1989, Lopez ve ark 1993). Persiste enfekte hayvanlar olarak isimlendirilen kuzularda virusa karşı tolerans (Coria ve McClurkin 1978, McClurkin ve ark 1984) şekillenir ve bu durum yaşamları boyunca devam eder. Herhangi bir yangısal reaksiyona ya da MSS ve deride karakteristik patolojik bulgulara rastlanmayabilmektedir. Sinirsel belirtilerle (Barlow ve Patterson 1982, Carlsson 1991, Nettleton ve ark 1992, 1998, Pratelli ve ark 1999) kendini gösteren myelin yetersizliği MSS'nin her yerinde görülebilmektedir (Kurihara ve Tsukada 1967, Fry ve ark 1973, Sprinkle ve ark 1978).

Primer kıl folliküllerinin sayısı artarken sekonder kıl folliküllerinin azalması, kalın tüylü bir görünüme neden olmaktadır. Persiste enfekte kuzular yaşamları boyunca ncp virusu ekskretleri ile etrafa saçabilmektedirler (Gardiner ve ark 1983, Meyling ve Jensen 1988, Palfi ve ark 1993, Brock ve ark 1998, Houe 1999).

Persiste enfekte hayvanların nekropsisinde (bağırsaklarından sitopatojen BDV suşu izole edilebilmektedir) ileum'un distalinde, kolon ve sekum'da fokal hiperplastik enteropati sonucu şekillenen kalınlaşmalar dikkat çekmektedir (Terpstra 1981, Jeffrey ve Roeder 1987, Burrells ve ark 1989, Nettleton 1990, Nettleton ve ark 1992, Pratelli ve ark 1999, Aly ve ark 2003, Hurdato ve ark 2003).

Persiste viremik koçlarda yüksek oranda enfekte ve düşük kalitede semen, fertilitede azalma dikkat çeker (Kirkland ve ark 1991).

d) Teratojenik etkiler

Meydana gelen transplasental enfeksiyonun fötus üzerindeki muhtemel etkileri arasında erken embriyo ölümleri (Sawyer 1992), intrauterin büyüme noksanlığı (IUBN) (Terlecki ve ark 1973), viral persistens ve takiben MD ile fötal immun sistemin supresyonu gelmektedir.

Koyunlardaki syndesmochorial tipteki plasenta maternal antikorların fötusa geçişine izin vermez (Solomon 1971). 16. günden önce zigot BDV enfeksiyonuna karşı dirençlidir.

İmplantasyondan sonraki gebelik dönemlerinde 3. plasentomun bazalinde fokal nekroz karakterinde bir caruncülitis şekillenebilmektedir (Vantsis ve ark 1976). Bu tür lezyonlar 25–30 gün içerisinde çözülebilmektedir. Bazı durumlarda plasentomun derin kısımlarında yaygın nekroz bantları oluşturmak amacıyla genişleyerek birleşebilmektedir ve bu durum fötal dokuyu etkileyerek yüksek oranda fötal ölümlere ve abortlara neden olabilmektedir (Acland ve ark 1972, Barlow 1972, Barlow ve Patterson 1982, Plant ve ark 1983a, Bielefeldt-Ohmann 1984, Terpstra 1985, Nettleton 1987, Russo ve ark 1987, Moennig ve Plagemann 1992, Nettleton ve ark 1992, 1998, Sawyer 1992, Möller ve ark 1993, McGowan ve Kirkland 1995, Pratelli ve ark 1999, Loken 2000, Kittelberger ve Pigott 2008).

16–90. günler arasında; embriyonik ölümler, abort ve ölü doğumlar (Barlow 1972, Barlow ve ark 1975, Plant ve ark 1976, Plant ve ark 1983b, Bielefeldt-Ohmann 1984, Akkina ve Raisch 1990, Vanderkop 1991, Nettleton ve ark 1992, 1998, Sawyer 1992, Carlsson ve Belak 1994, McGowan ve Kirkland 1995, Pratelli ve ark 1999, Belknap ve ark 2000, Loken 2000, Goyal ve ark 2002, Monies ve ark 2004, Marco ve ark 2007, 2008), malformasyonlu, küçük zayıf ve immunsupresyonlu (Roeder 1984) kuzu doğumları gözlenebilmektedir (Barlow ve Patterson 1982, Terpstra 1985, Sawyer ve ark 1986, 1991, Nettleton 1987, 1990, Russo ve ark 1987, Loken ve ark 1991, Pratelli ve ark 1999, Nettleton ve ark 1998, Marco ve ark 2007). 90. günden sonra ise fötus virusu elemine edebilmektedir.

Border Disease Virus, gelişmekte olan koyun fötusu üzerine teratojenik etki gösterebilmekte ve bu etkilerin çoğu fötusta malformasyonlar şeklinde karşımıza çıkmaktadır. Bu malformasyonlar MSS'yi (hydroencephali ve porencephali), iskelet sistemini [kyphoscoliosis (omurga eğriliği) veya arthrogryposis, brachygnathia (mandibulanın normalden kısa, maxillanın ise normalden uzun olması)], deri ve yünleri (Hairy Shaker) etkilemektedir (Plant ve ark 1983a).

Border Disease Virus'u teratojenik etkilerini; normal hücre gelişimini engellemesi, mitotik aktiviteleri yüksek olan fötal hücreleri dejenere etmesi (Elder ve Potts 1987) veya vasküler lezyonların oluşumuna neden olarak göstermektedir (Van Oirschot 1983).

Abort olan fötus genellikle mumifiye olmaktadır. Yeni şekillenmiş abort olaylarında fötus ve amniyotik boşlukta seröz sıvı toplanması gözlenebilmektedir. Gebeliğin hangi döneminde etkenin alındığına bağlı olarak gelişen patolojik bulgular farklılık gösterebilmektedir (Plant ve ark 1976, 1983b).

Karakteristik 'Hairy Shaker' görünümüne sahip kuzu doğumu etkenin 80. gününden önce alındığını göstermektedir. Kuzulardaki temel morfolojik değişiklikler, uterus içi (Houe 1999, Thabti ve ark 2002) beslenme yetersizliğine bağlı olarak gelişme geriliğini de içeren kısa zayıf kemikli bir vücut yapısı ve normalden daha az kemikleşmeyle karakterizedir (Terlecki ve ark 1973, Richardson ve ark 1976, Harkness ve ark 1977, Sweasy ve ark 1979, Richardson 1982).

Normalde koyunların yünleri düz ve parlak görünümlüdür. Yünlerin 'Hairy Shaker' adı verilen şekle dönüşmesi; primer kıl folliküllerinin sayılarında artış görülürken kıl follikülerinin içindeki özün azalması ve sekonder kıl folliküllerinin sayısında azalma meydana gelmesinin bir sonucudur. Sekonder/Primer (S/P) follikül oranı azalmıştır (Orr ve Barlow 1978, Orr 1982, Sawyer 1992).

Kıl örtüsündeki değişiklik kuzunun büyümesi ile birlikte azalsa da deri biyopsileri folliküler değişikliklerin kalıcı olduğunu göstermektedir (Nettleton 1991). Yapağıdaki bozukluğun bir diğer nedeni olarak fötusdaki bakır yetersizliği gösterilmektedir. Bu yetersizlik plasentadaki enfeksiyonun sekonder bir etkisi olarak ortaya çıkabilmektedir ve insanlardaki 'kinky hair' sendromu ile benzerlik göstermektedir (Patterson ve Sweasey 1973, Patterson ve ark 1974).

Bazı kuzularda ise (S/P) follikül oranı normal olup, kongenital hypomyelinogenesis tam olarak belirgin değildir. Bununla birlikte intracranial malformasyonlar normalde de sıklıkla karşılaşılan bir durumdur. Bu malformasyonlar arasında; porencephali, hydranencephali (Barlow 1980, Vantsis ve ark 1980a), cerebellar hypoplasi, cerebellar dysplasi, hydrocephalus, kalıcı cavum septum pellucidum yer almaktadır. Bu tür lezyonların çok sayıda iri makrofaj ihtiva ettiği bildirilmiştir (Loken ve Bjerkas 1991).

Makroskopik olarak normal görünen bazı kuzuların sinir sistemi histolojik olarak incelendiğinde, beyin ve spinal cord'da myelin eksikliğine bağlı yaygın veya düzgün olmayan alanlar dikkati çekmektedir (Cancilla ve Barlow 1968). Enfeksiyondan etkilenen kuzularda çoğunlukla kılıfsız olan aksonlar, çapraz kesitlerinde düzensiz yapı göstermektedirler. Periferal sinirler bu durumdan etkilenmemektedir. Border Disease Virus enfeksiyonunun bu formu genellikle yangısal değildir (Plant ve ark 1983a).

Gebeliğin 50–80. günleri arasında meydana gelen enfeksiyonlarda malformasyonlar fazla görülmektedir. İskelet anomalileri, arthogryposis ve aşırı uzun bacaklar bu malformasyonlar arasında sayılabilmektedir (Thür ve ark 1997). Gebeliğin 80. gününden önce enfeksiyona maruz kalmış 'deve bacaklı' kuzularda, arthrogryposis ve omurga eğriliği gözlenmektedir (Barlow ve Gardiner 1983).

Gebeliğin 80. gününden önce BDV ile enfeksiyon gerçekleşir ise viral replikasyon kontrol edilemez ve fötal ölümler (Barlow ve ark 1975) görülebilir. Erken gebelik dönemindeki enfeksiyon sonucu yaşamaya devam eden PI kuzuların bütün organlarına virus yayılmıştır. Bu kuzularda tipik olarak oligodendrositlerin (Snyder ve ark 1983, Anderson ve ark 1986) farklılaşmasının önlenmesi sonucunda

hypomyelinizasyon (Patterson ve ark 1971, Richardson ve ark 1976, Vantsis ve ark 1976, Barlow ve Storey 1977, Potts ve ark 1982a, Barlow ve ark 1983, Lamontagne ve Roy 1984, Done ve ark 1985, Anderson ve ark 1986, Chamorro ve ark 1986, Jeffrey ve ark 1990, Lipton ve ark 1991, Sawyer 1992, Möller ve ark 1993) ortaya çıkmaktadır. Bunun sonucunda ise MSS bozuklukları şekillenmektedir (Becher ve ark 1996, Berriatua ve ark 2004).

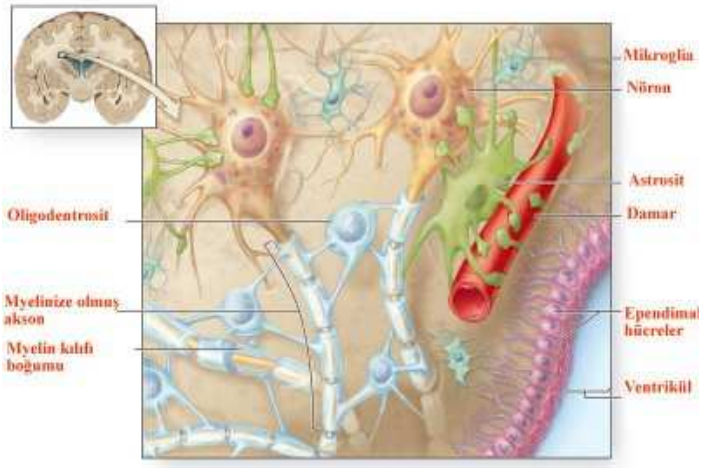
Gebeliğin 80. gününden sonra enfeksiyona maruz kalan annelerden doğan kuzularda makroskobik değişikliklere rastlanmamaktadır. Histolojik olarak incelendiğinde ise birçok dokuda yaygın olarak görülen nodüler periarteritis (Gardiner ve ark 1980) olgusuna MSS'de ve meningslerde sıkça rastlanmaktadır. Lezyonlardaki viral antijen yaklaşık 6 ay kadar canlılığını koruyabilmekte ve bu tür kuzuların serumlarında nötralizan antikor tespit edilebilmektedir (Potts ve ark 1985). Gardiner ve ark (1980) BDV ile enfekte hayvanlarda tespit edilen nodüler periarteritis olgusunun alerjik reaksiyon sonucu geliştiğini bildirmişlerdir.

Gebeliğin 80. gününden sonra meydana gelen enfeksiyonlarda BDV'ye karşı genellikle immunolojik yanıt oluşturulmaktadır. Gebeliğin ileri dönemlerindeki enfeksiyondan sonra gelişen hücresel yanıt (Gardiner ve ark 1980) enfeksiyonun 17. gününde küçük ve orta boyutlu arterlerin adventitia tabakasında gösterilmiş ve açıklanmıştır. Bu durum yeni doğmuş kuzulardaki BDV antijenlerine karşı gelişen spesifik cutaneous hipersensitiviteye bağlı olarak şekillenen hücre ilişkili alerjik bir reaksiyon olarak da doğrulanmıştır (Gardiner ve ark 1980).

Border Disease Virus enfeksiyonunda görülen karakteristik bulgular arasında; mukoza ve submukozada yoğun lenfoid infiltrasyonlar ile seyreden hyperplastic ülceratif typhlocolitis, periventricular encephalitis, iç organlarda fokal lenfoid infiltrasyonlar sayılabilmektedir (Barlow ve ark 1983).

Gebe hayvanlarda enfeksiyondan ortalama 10 gün sonra şekillenen viremi, plasentitise neden olmaktadır (Barlow ve ark 1975, Vantsis ve ark 1979). Erken embriyonik ölümlerin ve abortların nedeni olarak plasentitis gösterilmektedir. Abort şekillenmez ve gebelik devam eder ise şekillenen lezyonlar 15–20 gün içerisinde iyileşmektedir (Nettleton 1991).

Enfeksiyondan sonraki 3. haftada humoral yerine hücresel savunma sistemi etkili olur. Makrofajlar ve ameboid mikroglial hücreler (Resim 1.5) bu görevi yerine getirmekte ve fötusun beyin dokusundan virusun eliminasyonunda rol oynamaktadırlar (Hewickher-Trautwein ve ark 1994).



Resim 1.5. Mikroglia hücreleri (Blogspot 2009).

2',3'-cyclic nucleotide–3'phosphodiesterase (CNP) enzimi (Fry ve ark 1973, Sprinkle ve ark 1978, Anderson ve ark 1982, 1986, Sarlieve ve ark 1983, Sawyer ve ark 1991, Möller ve ark 1993), L–3,3',5-triiodothyronine (T3) ve Thyroxine (T4) hormonlarının kanda normal seviyede olması durumunda myelinizasyonda rol oynamaktadırlar (Balazs ve ark 1969). CNP enzimi aynı zamanda büyüme hormonunun sentezlenmesinde de önemli rol oynamaktadır (Sarlieve ve ark 1983).

Border Disease Virus enfeksiyonunda, tiroid bezinin enfeksiyonuna bağlı olarak T3 ve T4 hormonları seviyesinde ciddi azalmalar meydana geldiği bildirilmiştir (Noguchi ve ark 1982, Anderson ve ark 1987a, Sawyer ve ark 1993). Bu azalma CNP enzimini ters yönde etkilemekte ve bunun sonucu olarak intrauterin gelişmede yavaşlamalar (Sawyer ve ark 1991), myelinizasyonda azalmalar (Barlow 1980, Anderson ve ark 1987a), iskelet ve yapağı gelişiminde bozulmalar görülmektedir (Sawyer 1992).

Persiste enfekte olarak doğan kuzularda doğumda ölçülen T4 değerinin 7 ay içerisinde normal değerlere ulaşabildiği bildirilmiştir. T3'ün ise 12 ay içerisinde normal değerlere ulaşabildiği ifade edilmiştir (Sawyer 1992). Bunun yanında kuzularda görülecek MSS bozuklukları, düşük doğum ağırlığına sahip kuzuların doğması, 'hairy shaker' görünümlü yapağıya sahip kuzuların doğması gibi klinik belirtilerin tümü tiroid hormonunun yetersiz miktarda üretilmesinin bir sonucu olarak karşımıza çıkabilmektedir (Terpstra 1985, Vanderkop 1991).

Persiste enfekte koyunların perifer kanlarında Cluster of Determination (CD) 8 hücrelerinin sayısında artış olduğu bildirilmiştir (Burrells ve ark 1989). Aynı şekilde Woldehiwet ve Sharma (1990), yapmış oldukları çalışmada PI hayvanların CD8/CD4 oranında önemli bir artış tespit etmişlerdir. Entrican ve ark (1992) ise CD1 hücrelerinde artış belirlediklerini rapor etmişlerdir. Araştırmacılar (Entrican ve ark 1992) ayrıca CD4, CD5, CD8 ve $CD4^{-}CD8^{-}CD5^{+}$ (T19) hücrelerinde de artış olduğunu bildirmişlerdir.

T19 molekülü, T hücrelerinde bulunan bir yüzey proteinidir ve gama delta reseptörünü sentezlemektedir (Mackay ve ark 1989). Persiste enfekte koyunların hücrelerindeki T19 molekülünün sentez miktarı normal sağlıklı koyunlara oranla farklılık göstermektedir (Entrican ve ark 1992). Entrican ve ark (1992) yaptıkları çalışmada PI koyunların efferent lenfositlerinde T19 molekülünün sentezinde artış olduğunu ifade etmişlerdir.

1.5. Klinik

Border Disease Virus'u ile enfekte olan kuzular, koyunlar ve koçlar; yetiştirilme şartlarına, virusun virulensine (Shaw ve ark 1969, Vantsis ve ark 1980a, Plant ve ark 1983a, 1983b, Roeder ve ark 1987, Jeffrey ve Roeder 1987, Bonniwell ve ark 1987, Nettleton ve ark 1992, Houe 1999) ve sürüde bulunan diğer enfeksiyonlara bağlı olarak çok değişken klinik belirti gösterebilmektedirler.

Gebe olmayan yetişkin koyunlarda hafif ateş yükselmesi ve geçici lökopeni ile karakterize subklinik enfeksiyon şekillenebilmektedir (Roeder ve ark 1983, Burrells ve ark 1989, Giangaspero ve Harasawa 2004, O'Neill ve ark 2004).

Border Disease Virus enfeksiyonları subklinik (Carlsson ve Belak 1994, Giangaspero ve Harasawa 2004, O'Neill ve ark 2004) seyir şeklinin yanında şiddeti değişkenlik gösteren diyare, vücut ısısında artış (Thabti ve ark 2002), reprodüktif (Hewicker-Trautwein ve ark 1994, Lambot ve ark 1997, Spagnulo-Weaver ve ark 1997, Terpstra ve Wensvoort 1997, Bruschke ve ark 1998, Thabti ve ark 2002, Vilcek ve Nettleton 2006) ve solunum problemleri ile seyreden klinik belirtilere de neden olabilmektedir (Thabti ve ark 2002, Vilcek ve Nettleton 2006). Subklinik seyreden akut enfeksiyonlarda çok net olarak görülmeyen viremi evresi zor tespit edilebilmektedir (Roeder ve ark 1983, O'Neill ve ark 2004).

Border Disease Virus enfeksiyonundan etkilenen kuzular genellikle küçük ve zayıf görünümlü olup bu hayvanların çoğu ayakta duramazlar. Sinirsel belirtiler ve yünde belirgin değişiklikler gözlenmektedir. Border Disease Virus enfeksiyonundan etkilenen hayvanlarda görülen sinirsel belirtiler (Plant ve ark 1983a, Nettleton ve ark 1998, Pratelli ve ark 1999) enfeksiyonun en karakteristik semptomları arasında sayılmakla beraber BDV'den kaynaklandığı tespit edilen bazı salgınlarda ise herhangi bir sinirsel belirti gözlenmediği bildirilmiştir (Bonniwell ve ark 1987). Arka bacaklarda hafiften şiddetli dereceye kadar değişen tremorlar (Harkness ve ark 1977, Barlow ve Patterson 1982, Plant ve ark 1983a, Monies ve ark 2004) baş, kulak ve kuyrukta da görülebilmektedir. Zamanla kademeli olarak azalma gösteren sinirsel belirtiler 3–6 aylık kuzularda tamamen kaybolabilmektedir (Valdazo-Gonzalez ve ark 2007b).

Deride anormallikler görülebilmektedir. Normalde düz görünümlü yüne sahip olan koyunlarda özellikle boyun ve vücudun arka kısımlarında yer alan kıllarda düzensizlikler belirgin olup BDV'den etkilenmiş kuzulardaki yünlerde anormal kahverengi siyah pigmentasyonlar görülebilmektedir (Osburn ve ark 1973, Lamontagne ve Roy 1984, Wolf ve Buttner 1994, Marco ve ark 2008).

Bazı PI hayvanlarda inatçı davranışlar, aşırı zayıflama (Nettleton ve ark 1998, Pratelli ve ark 1999), göz ve burun akıntısı, bazen de solunum güçlüğü ortaya çıkabilmektedir (Jeffrey ve Roeder 1987, Loken ve ark 1991, Nettleton ve ark 1992, Baginski ve ark 2000, Aly ve ark 2003, Hurdato ve ark 2003, Monies ve ark 2004).

Enfeksiyondan etkilenen kuzularda gelişme yavaş olup, normal saha şartlarında sütten kesilme zamanına yakın ölümler gerçekleşebilmektedir (Sweasy ve ark 1979, Richardson 1982). Enfeksiyonu atlatan kuzuların ilerleyen zamanlarda stres faktörlerine maruz kalması durumunda zayıflık, titreme, baş hareketlerinde kontrolsüzlük görülebilir.

Border Disease Virus enfeksiyonunun klinik semptomları çok çeşitlilik göstermektedir. Bir sürüde BDV enfeksiyonu meydana geldiği zaman kuzulama zamanında döl verimi azalmış koyunların sayısında ve abort olaylarında bir artış söz konusu olabilmektedir (Kirkland ve ark 1991). Yaygın olarak gebeliğin 90. gününde şekillenen abort olaylarına gebeliğin her döneminde rastlanabilmektedir. Plasentanın retensiyonu ya da doğum sonrası metritis olayları nadiren şekillenmektedir (Marco ve ark 2007, Valdazo-Gonzalez ve ark 2007b).

Fötus genellikle normalden küçük ve mumifiye olmuştur. Gebeliğin başlangıç dönemlerinde şekillenecek erken embriyonik ölümler, plasentanın fötusu rezorbe etmesi sonucu anneye zarar vermeyebilmektedir. Bundan dolayı sürüde BDV'den kaynaklanacak abort olayları fark edilmeyebilmektedir. Yapısal olarak bozulmuş fötus, gebeliğin sonuna kadar vücutta kalabilmektedir (Fulton ve ark 1999).

Arthrogryposis veya omurga eğriliğinden kaynaklanan güç doğum olayları ile karşılaşılabilmektedir (Plant ve ark 1983a).

Border Disease Virus enfeksiyonunun klinik belirtisi, küçük, zayıf kuzuların doğmasıdır (Sawyer 1992, Loken 2000). Ayrıca PI kuzularda sinir sistemi bozuklukları, iskelet sistemi bozuklukları, malformasyonlar (Manktelow ve ark 1969, Porter ve ark 1972, Richardson ve ark 1976, Harkness ve ark 1977, Barlow 1980, Barlow ve Patterson 1982, Plant ve ark 1983a, Lamontagne ve Roy 1984, Potts ve ark 1985, Brugere-Picoux 1987, Jeffrey ve Roeder 1987, Campbell ve ark 1995, Caffrey ve ark 1997, Nettleton ve ark 1998, Pratelli ve ark 1999, Monies ve ark 2004), değişik derecelerde tremorlar (Osburn ve ark 1973, Vanderkop 1991, Möller ve ark 1993, Wolf ve Buttner 1994, Becher ve ark 1996, Valdazo-Gonzales ve ark 2007, Marco ve ark 2008) ve ataksi (Nettleton ve ark 1992) gözlenebilmektedir.

Border Disease Virus enfeksiyonundan etkilenen kuzular anormal, düzgün olmayan, karışık, kaba bir yüne sahiptirler (Resim 1.6) (Manktelow ve ark 1969, Porter ve ark 1972, Nettleton 1990). Bu kuzular acıklı bir şekilde melerler, eğer ayakta durabilirlerse annelerinin memelerini ararlar ama ayaklarındaki şiddetli tremorlara bağlı olarak bunu gerçekleştirmeleri mümkün olmayabilmektdir. Bununla birlikte bu kuzulara anne sütü biberon yardımıyla verilmelidir (Barlow 1990).



Resim 1.6. Hairy shaker görünümlü kuzu (Teara 2009).

Border Disease Virus enfeksiyonundan etkilenen bazı kuzularda ise yünlerde karışıklık ve tremor dikkati çekmese bile bu hayvanlarda metacarpaller, metatarsaller ve birinci phalanx'da orantısız biçimde uzama görülebilir ve bundan dolayı da 'Deve bacaklı' kuzular diye adlandırılırlar (Barlow ve Gardiner 1983). Deve bacaklı kuzular ayağa kalkabilirlerse süt emmek için annelerinin memelerini

arama çabasına girebilirler ancak başarısız olmaktadırlar. Bu nedenle körmüş gibi algılanabilmektedirler. Bazı kuzularda ise sadece brachygnathia ile birlikte küçük dar bir baş, ince uzun kemik yapısı ve tamamlanmamış karpal uzama gibi anormallikler gözlemlenmektedir. Bunların dışında kalanlar ise fiziksel olarak normal görünseler bile hiçbir zaman tam bir gelişme gösterememektedirler (Barlow 1990).

Border Disease Virus enfeksiyonundan etkilenen kuzular daha birkaç haftalıkken ölebilmektedirler. Yaşamaya devam edebilen 'Hairy Shaker' görünümlü kuzularda 20. haftaya kadar azalan tremorlar tamamen kaybolabilmektedir. Bu sürenin sonunda da genellikle diyare veya solunum güçlüğüne bağlı ölüm olayları görülebilmektedir (Barlow 1990).

Sürüde gözlemlenebilecek ölümler stres faktörlerinin dışında şiddetli diyare ya da solunum rahatsızlıklarıyla ilişkilendirilmektedir (Aly ve ark 2003, Hurdato ve ark 2003, Monies ve ark 2004). Bu durum sekonder enfeksiyonlara bağlanmaktadır (Hussin ve Woldehiwet 1994, Loken 2000). Ancak bunun yanında BDV'nin MD benzeri enfeksiyonların bir parçası olduğunu ortaya konmuştur (Barlow ve ark 1983, Baker 1987, Barlow 1990, Nettleton ve ark 1992, Saliki ve ark 1997, Aly ve ark 2003, Hurdato ve ark 2003, Monies ve ark 2004).

Enfeksiyondan etkilenen erkek kuzularda fertilite problemleri gözlenmektedir. Ayrıca BDV ile enfekte koçlar spermaları ile virusu etrafa saçmaktadırlar (Barlow ve Gardiner 1983). Tohumlamada kullanılacak koçların kan örnekleri BDV'u yönünden kontrol edilmelidir (Barlow ve ark 1986).

1.6. Teşhis

Akut enfeksiyonların serolojik teşhisi sürüdeki koyunlardan alınan çift serum örnekleri ile yapılabilmektedir. Yüksek ateş, ciddi ve uzun süreli lökopeni, anoreksi, konjunktivit, nazal akıntı, dispne, diyare ile ortaya çıkan ve genç kuzularda mortaliteye neden olan salgınlarda BDV izolasyonu gerçekleştirildiği bildirilmiştir (Aly ve ark 2003, Hurdato ve ark 2003). Chappuis ve ark (1986) sütçü koyunlardan BDV izole ettiklerini rapor etmişlerdir.

Abortların ya da erken doğumların BDV'den kaynaklandığını ortaya koymanın güç olduğu ancak bazı vakalarda fötal dokulardan BDV'yi izole etmenin mümkün olabileceği bildirilmiştir (Thür ve ark 1997). Abort olmuş fötuslara ait beyin, tiroid ve diğer dokulardan viral antijen tespiti immunohistokimyasal testler kullanılarak mümkün olabilmektedir (Hewicker ve ark 1990, Haines ve ark 1992, Nettleton ve ark 1992, Waldvogel ve ark 1995, Hurdato ve ark 2004).

Caffrey ve ark (1997), BDV ile deneysel olarak enfekte ettikleri koyunların fötuslarını BDV antijen varlığı yönünden inceledikleri çalışmada, bütün fötusların beyinlerinde enfeksiyonu takip eden 14., 21., 28., 35. ve 42. günlerde BDV antijeni tespit ettiklerini belirtmişlerdir.

Yeni doğmuş kuzular kolostrum aldıktan sonra maternal antikor seviyesi azalıncaya kadar virusun tespiti zor olsa da bu süre içinde dokularda ve lökositlerde viral antijenin belirlenebilmesi mümkün olabilmektedir (Nettleton ve ark 1992, OIE 2008).

Persiste enfekte kuzuların kolostrum almadan önceki kan örnekleri antijen pozitif ve antikor negatiftir. Yaşamın ilk 2 ayı haricinde viral antijen kolaylıkla tespit edilebilmektedir. Çünkü ilk 2 aylık periyotta virus kolostral antikorlar tarafından baskılanmıştır. Buna rağmen bu periyot boyunca virus birkaç kez yıkanmış lökositler içerisinde bulunmaktadır. Her ne kadar akut enfeksiyon süresince kanda virus tespiti zor olsa da enfekte hayvanlardan en az 3 hafta ara ile alınacak kan örneklerinde viral antijen varlığının ortaya konulmasıyla persiste enfeksiyon doğrulanabilmektedir.

Dört yaşından büyük hayvanlarda da viral antijen varlığının tespiti mümkün olup bunlardan bazıları düşük düzeyde BDV'ye karşı oluşmuş spesifik antikora sahiptirler (Nettleton ve ark 1992).

Koyunlardan cp BDV biyotiplerin izolasyonu nadiren gerçekleştirilmiştir (Vantsis ve ark 1976, Laude ve Gelfi 1979, Potts ve ark 1982a, Terpstra 1985).

Kongenital enfeksiyona maruz kalan sağlıklı görünümlü PI koyunlardan alınacak kan örneklerinin hücre kültürlerine inokulasyonları sonrası virusun biyotipinin cp olup olmadığı belirlenebilmektedir. Lökositlerdeki viral antijen varlığı ortaya konarak veya doku biyopsilerinde immunohistokimyasal yöntemlerle viral antijen tespit edilerek PI hayvanlar çabuk ve direkt olarak belirlenebilmektedir (Hewicker ve ark 1990, Haines ve ark 1992).

Ölen hayvanlardan, abort olmuş fötal dokulardan ya da erken doğan kuzulardan virus izolasyonu zor olabilmektedir. Ancak yüksek miktarda virus ihtiva etmekte olan PI hayvanların dokularından direk teşhis yöntemleri kullanılarak BDV izole edilebilmektedir (Waldvogel ve ark 1995, Rasmussen ve ark 2008).

Abort olan keçi fötuslarından Pestivirus izole edilen çalışmalar bulunmaktadır (Orr ve ark 1987, Pearson 1987).

Semenden virus izole edileceği zaman semenin hücre kültürlerinde oluşturacağı toksisite göz önünde bulundurulmalıdır (Barlow ve ark 1986).

1.6.1. Klinik Teşhis

Border Disease Virus enfeksiyonunun klinik bulguları chlamydiosis, listeriosis, toxoplasmosis ve leptospirosis gibi koyunlarda aborta neden olan enfeksiyonlar ile karıştırılabilmektedir. Sinirsel semptomlar ise bakır yetmezliği sonucu oluşan 'swayback' ile karıştırılabilmektedir (Gronstol 1980, Loken ve ark 1991).

1.6.2. Laboratuvar Teşhisi

A. Direkt Teşhis

Border Disease Virus enfeksiyonunun teşhisi ile ilgili olarak Office International des Epizooties (OIE, Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü) tarafından belirlenmiş herhangi bir referens laboratuar bulunmamaktadır. Border Disease Virus'unun teşhisinde en güvenli yol virus izolasyonunun yapılmasıdır (OIE 2008).

Direkt immunfloresan (IF) (Anderson ve ark 1987a), IP (Ward ve Kaeberle 1984), donmuş doku parçalarında gerçekleştirilen immunohistokimyasal yöntemler (Hewicker ve ark 1990, Haines ve ark 1992, Waldvogel ve ark 1995); antijen tespiti için kullanılan ELISA (Fenton ve ark 1990, Mignon ve ark 1991, 1992, Shannon ve ark 1991, Nettleton ve ark 1992, Entrican ve ark 1995) ve RT-PCR (Saiki ve ark 1988, Belak ve Ballagi-Pordany 1991, Boye ve ark 1991, Brock 1991, Hertig ve ark 1991, Liu ve ark 1991, Lopez ve ark 1991, Hooft van Iddekinge ve ark 1992, Alansari ve ark 1993, De Moerlooze ve ark 1993, Katz ve ark 1993, Ridpath ve ark 1993, Wirz ve ark 1993, Sullivan ve ark 1994, Vilcek ve ark 1994, Hamel ve ark 1995, Radwan ve ark 1995, Silva ve ark 1995, Sullivan ve Akkina 1995, Canal ve ark 1996, Lowings ve ark 1996, Becher ve ark 1997, Sandvik ve ark 1997, Ridpath ve Bolin 1998, Drew ve ark 1999, Sakoda ve ark 1999, Bhudevi ve Weinstock 2001, Graham ve ark 2001a, Thabti ve ark 2002, Arnal ve ark 2004, Hurdato ve ark 2004, Krametter ve ark 2004, Frölich ve ark 2005, Thabti ve ark 2005, Berriatua ve ark 2006, Jones ve ark 2006, Cranwell ve ark 2007, Marco ve ark 2007, Jacobson 2008, Krametter-Froetscher ve ark 2008, Rasmussen ve ark 2008, Hasırcıoğlu ve ark 2009,

Oğuzoğlu ve ark 2009) BDV ile enfekte hayvanların tespitinde kullanılabilecek diğer testler arasında yer almaktadırlar.

Virus izolasyonu

Bu metot uygulanacağı zaman laboratuvarlarda Pestivirus yönünden negatif olduğu belirlenen duyarlı hücreler ile FCS kullanılmalıdır. Border Disease Virus'u pek çok primer ya da sekonder koyun hücre kültürlerinde (böbrek, testis, akciğer) izole edilebilir. Border Disease Virus izolasyonu ile ilgili çalışmalarda devamlı olmayan hücre kültürleri; FKK, embriyo ya da koyun choroid plexus hücre kültürlerinden yararlanılmaktadır (Thabti ve ark 2002).

Koyun hücre kültürleri; BDV, BVDV–1 ve BVDV-2'nin izolasyonları için uygun bir ortamdır. Border Disease Virus'unun izolasyonunda kullanılması için çeşitli sığır hücre kültürleri (testis, embriyonik trakea ve solunum yolu hücreleri) de önerilmektedir (Anderson ve ark 1987a, Kreeft ve ark 1990, Carlsson 1991, Hussin ve Woldehiwet 1994, Laamanen ve ark 1997, Liang ve ark 2003).

Pestivirus izolasyonu için; dalak, tiroid, timus, böbrek, beyin ve lenf nodülleri en uygun organ ve dokulardır (Terpstra 1978, Gardiner 1980, Entrican ve ark 1992, Nettleton ve ark 1992, Thür ve ark 1997, OIE 2008).

Abort olan koyun fötuslarından Pestivirus antijeninin tespit edildiği bildirilmiştir (Fraser ve ark 1981, Loken ve ark 1982a, Orr ve ark 1987, Pearson 1987, Thür ve ark 1997).

Monies ve ark (2004) sığır turbinata hücre kültürü kullanarak yaptıkları çalışmada bir kuzunun mezenteriel lenf nodüllerinden ncp Pestivirus izole ettiklerini bildirmişlerdir. Nettleton ve ark (1992) ise fötal kuzu böbrek hücre kültürlerinde yapmış oldukları çalışmada dalak, tiroid, beyin, mezenterik lenf nodülleri, sekum ve kolondan hem cp hem de ncp biyotip BDV izole ettiklerini bildirmişlerdir.

Semen, BDV varlığı yönünden kontrol edilebilir. Fakat koç semeni hücre kültürleri için çok toksik karakterde olduğu için vasat ile sulandırılarak (genellikle 1/10 oranında) kullanılmalıdır (Bulut ve Yavru 2004, OIE 2008).

İmmunohistokimyasal yöntem

Persiste enfekte hayvanlara ait pek çok dokuda viral antijenin tespit edilmesi mümkündür. Bu metot asetonla fikse edilmiş donmuş doku kesitleri üzerinde uygun antikorların kullanılması ile gerçekleştirilmektedir. Beyin, tiroid ve ağız mukozası yüksek miktarda antijen ihtiva eden dokulardır (Hewicker ve ark 1990, Haines ve ark 1992, Thür ve ark 1997, Hurdato ve ark 2004).

Antijen tespiti için ELISA

Direkt ELISA, çok sayıdaki kan örneğinin antijen varlığı yönünden incelenmesinde kullanılabilecek uygun bir yöntemdir (Howard ve ark 1985, Chu ve ark 1985, Bock ve ark 1986, Juntti ve ark 1987, Durham ve Hassard 1990, Fenton ve ark 1990, 1991, Moennig ve Plagemann 1992, Entrican ve ark 1995, Foucras ve ark 1996, Saliki ve ark 1997, Thür ve ark 1997, Graham ve ark 1998, Kramps ve ark 1999, Kittelberger ve Pigott 2008, Nettleton ve Willoughby 2008).

Lökosit örneklerinde antijen tespiti amacıyla 'Antigen Capture' ELISA (AC-ELISA) kullanılmaktadır (Fenton ve ark 1990, 1991, Mignon ve ark 1991, 1992, Shannon ve ark 1991, Sandvik ve ark 1997, Hurdato ve ark 2004, Cranwell ve ark 2007, Valdazo-Gonzales ve ark 2005, 2007, Hasırcıoğlu ve ark 2009, Oğuzoğlu ve ark 2009). Son yıllarda virus izolasyonuna göre daha ucuz olması ve daha kısa sürede sonuç alınmasından dolayı direkt ELISA'nın diğer testlere göre daha avantajlı olduğu ve BDV'nin teşhisinde de tercih edilerek kullanıldığı bildirilmiştir (Kittelberger ve Pigott 2008, Nettleton ve Willoughby 2008).

Antijen tespiti için IF, IP ve Flow Sitometri testleri

Pestivirus antijenlerinin tespiti için IF (Terpstra 1978, Kahrs ve ark 1980, Potts ve ark 1982b, Jerrett ve ark 1984, Bolin ve ark 1985, Anderson ve ark 1986, Baker 1987, Bonniwell ve ark 1987, Russo ve ark 1987, Bezek ve ark 1988, Burrells ve ark 1989, Greiser-Wilke ve ark 1991a, David ve ark 1994, Wolf ve Buttner 1994, Zhang ve ark 1996, Deregt ve Prins 1998, Grummer ve ark 2001, Reimann ve ark 2004), IP (Hyera ve ark 1985, Sharp ve Rawson 1986, Kreeft ve ark 1990, Kirkland ve ark 1991, Heckert ve ark 1992, Mc Gowan ve ark 1993, Carlsson ve Belak 1994, Heckert ve ark 1994, Fulton ve ark 1997, Saliki ve ark 1997, Valdazo-Gonzales ve ark 2005, Marco ve ark 2007, Marco ve ark 2009b) ve Flow Sitometri (Burrells ve ark 1989) testleri de kullanılabilmektedir. Pestivirusların tespitinde gold standart test olarak IP testi kabul edilmektedir (OIE 2008).

Ayrıca Pestivirus'ların tespiti için elektron mikroskopi yöntemi de kullanılabilmektedir (Moormann ve Hulst 1988).

Nükleik asit tespit metotları

Bugüne kadar gerçekleştirilen filogenetik analizler, BDV'nin BVDV'ye göre CSFV ile daha yakın antijenik ilişki içerisinde olduğunu göstermiştir (Van Rijn ve ark 1997, Vilcek ve ark 1997, Avalos-Ramirez ve ark 2001).

Konvensiyonel jel uygulamalı RT-PCR çalışmalarında özellikle genomun 5' UTR bölgesi hedeflenmektedir (Hertig ve ark 1991, Ridpath ve ark 1993, Vilcek ve ark 1994, Hamel ve ark 1995, Radwan ve ark 1995, Becher ve ark 1997, Laamanen ve ark 1997, Sandvik ve ark 1997, Harasawa ve Giangaspero 1998, Hyndman ve ark 1998, McGoldrick ve ark 1998, 1999, Drew ve ark 1999, Letellier ve ark 1999, Pfeffer ve ark 2000, Renshaw ve ark 2000, Bhudevi ve Weinstock 2001, 2003, Weinstock ve ark 2001, Kim ve Dubovi 2003, Risatti ve ark 2003, Heath ve ark 2003).

Border Disease Virus, CSFV ve BVDV genomları arasındaki farklılıkların belirlenmesi amacı ile konvensiyonel ve Real time PCR uygulamaları yapılmaktadır (Schroeder ve Balassu-Chan1990, Boye ve ark 1991, Hertig ve ark 1991, Liu ve ark 1991, Lopez ve ark 1991, Hooft van Iddekinge ve ark 1992, McGoldrick ve ark 1999, Fulton ve ark 1999, Barlic-Maganja ve Grom 2001, Bhudevi ve Weinstock 2001, 2003, Letellier ve Kerkhofs 2003, Willoughby ve ark 2006).

RT-PCR, Pestivirus'ların tanısında yaygın olarak kullanılmaya başlanan testler arasında yer almaktadır (Alansari ve ark 1993, Ridpath ve ark 1993, Becher ve ark 1994, Vilcek ve ark 1994, 1999, Radwan ve ark 1995, Canal ve ark 1996, Ridpath ve Bolin 1998, Letellier ve ark 1999, Rithpath ve ark 2000, Vilcek ve Paton 2000, Langedijk ve ark 2001, Weinstock ve ark 2001, Letellier ve Kerkhofs 2003, Toplak ve ark 2004).

Ruminantlarda Pestivirus'ların teşhisi için kullanılmakta olan birçok RT-PCR protokolü bildirilmiştir (Alansari ve ark 1993, Katz ve ark 1993, Wirz ve ark 1993, Pellerin ve ark 1994, Ridpath ve ark 1994, Vilcek ve ark 1994, 1999, Hamel ve ark 1995, Paton 1995, Radwan ve ark 1995, Canal ve ark 1996, Lowings ve ark 1996, Sandvik ve ark 1997, Ridpath ve Bolin 1998, Letellier ve ark 1999, Renshaw ve ark 2000, Vilcek ve Paton 2000, Weinstock ve ark 2001, Letellier ve Kerkhofs 2003, Toplak ve ark 2004, Willoughby ve ark 2006). Ayrıca BVDV–1 ile BVDV–2'nin (Renshaw ve ark 2000, Bhudevi ve Weinstock 2001, Fulton ve ark 2002, 2005) ayrımının yapılması için Real Time RT-PCR, BVDV–1, BVDV–2 ve BDV'nin ayrımının yapılabilmesi için ise One-tube RT-PCR (Hamel ve ark 1995), Nested Real Time PCR kullanılmaktadır (Sullivan ve Akkina 1995, Fulton ve ark 1999, McGoldrick ve ark 1999). Border Disease Virus'ların çabuk teşhisinde kullanılan spesifik primerler tanımlanmıştır (Fulton ve ark 1999, Vilcek ve Paton 2000).

Border Disease Virus'unun spesifik teşhisi için en uygun materyal enfeksiyondan etkilenen, canlı olarak doğan ve annesini hiç emmemiş kuzulardır. Eğer mümkünse enfeksiyondan etkilenen kuzuların annelerinden ve sürüdeki diğer hayvanlardan kan örnekleri alınmalıdır. Bu örnekler virus izolasyonunda, IF ve IP testlerinde kullanılmak üzere laboratuvara gönderilmelidir (Marco ve ark 2009b).

En hızlı ve kesin teşhis; sıvı nitrogen ya da kuru buz/izopentan kullanılarak dondurulan böbrek, yumurtalık ya da beyincik gibi organlardan hazırlanan kesitlerde viral antijen varlığını ortaya koyan IF testi ile yapılmaktadır. Bu organlar hücre kültürlerinde virus izolasyonu için uygundur ve numuneler sahadan alınmış ise transport sıvısı içerisine konup mümkün olan en kısa sürede laboratuvara gönderilmelidir (Reimann ve ark 2004).

Nöropatolojik incelemeler için MSS çok dikkatli bir şekilde parçalanmadan ayrılmalı ve Baker'ın Kalsiyum formol (%10 formalin+%1 anhydrous calcium chloride)'ü içerisinde fikse edilmelidir. Fikzasyon işleminde, myelin komponentleri ile birleştiğinde sabunsu forma dönüşüp yağ damlalarının kaybına sebebiyet verebildiği için Phosphate Buffered Formalin'den kaçınılmalıdır (Illavia ve ark 1988).

Hem nested RT-PCR (Hyndman ve ark 1998, Fulton ve ark 1999, Gilbert ve ark 1999, Swasdipan ve ark 2002) hem de Real Time PCR testleri PI koyunların tespitinde ve Pestivirus'ların genotiplendirilmesinde kullanılan hızlı yöntemler arasındadır. One-step Real Time PCR'nin virus izolasyonunda; genom tespitindeki artan sensitivitesi, kontaminasyon riskinin az olması, kolay uygulanabilirliliği ve yorumlanması açısından Two-step Real Time PCR'ye göre avantajlara sahip olduğu bildirilmektedir (Willoughby ve ark 2006).

B. İndirekt Teşhis

Sadece maternal antikor miktarını yansıttıkları için annelerinden süt emen kuzulardaki antikor titreleri çok fazla değer taşımayabilmektedir. Kuzuların kolostrum almadan önce kanlarında tespit edilen antikorlar teşhiste önemlidir (Coria ve McClurkin 1978, Terpstra 1981).

Tipik 'Hairy Shaker' görünümlü kuzular BDV'ye karşı immunolojik olarak genellikle tolerans göstermektedirler (McClurkin ve ark 1984).

Pestivirus'lara karşı oluşturulan spesifik antikorların tespit edilmesi amacı ile serum nötralizasyon testi (SNT) (Kendrick 1971, Hopkinson ve ark 1979, Laude ve Gelfi 1979, Vantsis ve ark 1980b, Potts ve ark 1982b, Roeder 1982, Gardiner ve ark 1983, Roeder ve ark 1983, Terlecki ve Roeder 1983, Coria ve ark 1984, Lim ve Carnegie 1984, Lobmann ve ark 1986, Howard ve ark 1987, Russo ve ark 1987, Brockman ve ark 1988, Edwards ve ark 1988, Cay ve ark 1989, Kirkbride ve Johnson 1989, Shimizu ve ark 1989, Bolin ve Ridpath 1990, Jeffrey ve ark 1990, Fenton ve ark 1991, Loken ve Bjerkas 1991, Lees ve ark 1991, Loken ve ark 1991, Nettleton ve ark 1992, Heckert ve ark 1994, Dekker ve ark 1995, Kweon ve ark 1997, Van Rijn ve ark 1997, Letellier ve ark 1999, Hurtado ve ark 2003, Park ve ark 2004, Yeşilbağ ve ark 2008), agar gel immunodifüzyon testi (AGID) (Plant ve ark 1973, Harkness ve ark 1978, Roeder ve ark 1983, Coria ve ark 1984, Kirkland ve ark 1991, Mc Gowan ve ark 1993), indirekt ELISA (Howard ve ark 1985, Chu ve ark 1985, 1987, Bock ve ark 1986, Brugere-Picoux 1987, Juntti ve ark 1987, Durham ve Hassard 1990, Lecomte ve ark 1990, Carlsson 1991, Fenton ve ark 1991, Paton ve ark 1991, Kirkland ve ark 1991, Carlsson ve Belak 1994, Thür ve ark 1997, Graham ve ark 2001a, Thabti ve ark 2002, Berriatua ve ark 2006, Krametter-Froetscher ve ark 2006, 2008, Kittelberger ve Pigott 2008, Hasırcıoğlu ve ark 2009, Marco ve ark 2009a, Oğuzoğlu ve ark 2009) kullanılabilmektedir.

Border Disease Virus'a karşı oluşan antikorların tespitinde AGID'in sensitivitesi diğer testler ile karşılaştırıldığında daha düşük olabilmektedir (OIE 2008).

İndirekt ELISA, serumda bulunan Pestivirus'a spesifik antikor varlığının araştırılmasında sıkça kullanılan yöntemler arasındadır (Berriatua ve ark 2006, Kittelberger ve Pigott 2008). İndirekt ELISA'nın uygulanması sırasında hücre kültürü sistemlerine ihtiyaç duyulmaması, SNT'ye göre daha kısa sürede sonuç alınabilmesi gibi avantajları bulunmaktadır. Bu nedenlerden dolayı çiftliklerde BDV enfeksiyonu ile ilgili yapılacak serolojik taramalarda ELISA'nın kullanılması önerilmektedir (Huck ve ark 1975, Chu ve ark 1987, Fenton ve ark 1991).

Chu ve ark (1987) yaptıkları çalışmada BVDV antijenlerini kullanarak koyun serumlarındaki BDV'ye karşı oluşan spesifik antikorların varlığını tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Domuzlardaki CSFV enfeksiyonunun serolojik olarak teşhisi yapılacağı zaman BDV enfeksiyonu yanlış pozitif sonuçlar alınmasına neden olabilmektedir (Pearson 1992).

1.7. İmmunoloji

Fötustaki immun yanıt etkenin alındığı gebelik yaşına bağlı olarak değişiklik gösterir ve o andaki immun yanıtın gelişme seviyesine bağlıdır. Koyunlar gebeliğin 70–80. günlerinden daha önce etkeni almışlar ise fötus BDV'ye karşı genellikle immunolojik yanıt oluşturamamakta ve fötuslar virusu tolere ederek virus saçıcısı olarak yaşamlarını devam ettirmektedirler. Bazı durumlarda bu erken safhadaki fötuslarda gelişen cevap MSS içinde intracranial malformasyon olarak tanımlanan yoğun yangısal reaksiyonlar şeklinde olabilmektedir. Bu dönemi atlatarak yaşamlarını devam ettirebilen kuzuların, anne sütü almadan önce, kan serumlarında virus nötralizan antikor tespit edilirken virus izole edilemeyebilmektedir (Nettleton ve ark 1992).

Border Disease Virus'unun bir suşuna karşı bağışık olan gebe koyunlar başka bir BDV suşu ile enfeksiyona duyarlı hale gelebilmektedir. Böyle bir durumla karşılaşıldığında intracranial malformasyon ile birlikte 'Deve bacaklı', 'Hairy Shaker' (Terpstra 1981, Gardiner 1982, Nettleton ve ark 1992, 1998) görünümlü kuzuların doğumu söz konusu olabilmektedir.

Koyun fötuslarında antikor oluşumunun gebeliğin ikinci yarısında başladığı bildirilmiştir (Thür ve ark 1997). Kolostral antikorlar, virusun varlığını maskeleyip PI kuzuların belirlenmesini zorlaştırabilmektedir (Sweasey ve ark 1979, Sharp ve Rawson 1986). Border Disease Virus ile gerçekleşen enfeksiyondan sonra en erken 10 gün içinde antikorlar gelişmektedir (Dubovi 1999). Persiste enfekte viremik kuzularda herhangi bir antikora rastlanmazken nötralizan antikorların postnatal enfeksiyondan sonra 14–21 gün içerisinde oluştuğu ifade edilmiştir (Roeder ve ark 1983, Terlecki ve Roeder 1983, Roeder 1984).

Vertikal olarak gerçekleşen ve PI olarak doğan kuzular yaşadıkları sürece BDV enfeksiyonuna karşı seronegatif olarak kalırlar (Sawyer 1992). Bunun yanında PI hayvanların diğer patojenlere karşı normal humoral yanıt göstermeye devam ettikleri bilinmektedir (Sawyer 1992). Horizontal olarak BDV enfeksiyonuna yakalanan immunkompotent kuzuların hayatları boyunca BDV enfeksiyonuna karşı bağışık oldukları bildirilmiştir (Berriatua ve ark 2004).

Persiste enfekte hayvanlarda 20 aylık döneme kadar T hücrelerindeki belirgin azalmanın yanında B hücre oranında önemli derecede bir artış olduğu kaydedilmiştir (Sawyer 1992). Yine PI hayvanlarda (sadece genç yaştaki) yardımcı T4 hücrelerinin sayısında önemli bir azalma tespit edildiği bildirilmiştir (Burrells ve ark 1989). Neonatal dönemde fonksiyonlarında ciddi şekilde azalmalar tespit edilen lenfositlerin zamanla normal değerlere ulaştığı rapor edilmiştir (Sawyer ve ark 1986).

Enfeksiyonun genellikle subklinik (Giangaspero ve Harasawa 2004, O'Neill ve ark 2004) seyrettiği ve kısa süreli görüldüğü yetişkin hayvanlarda BDV'ye karşı zayıf bir immun yanıt geliştiği bildirilmiştir (Barlow 1982).

Border Disease Virus ile enfekte PI hayvanların hücresel immunitelerinin baskılandığı (Roeder 1984, Sawyer ve ark 1986, Larsson ve ark 1988, Lamontagne ve ark 1989) ve diğer bakteriyel enfeksiyonlara karşı (*Escherichia coli, Clostridium perfringens*) daha duyarlı hale geldikleri bildirilmiştir (Nettleton 1990, Hussin ve Woldehiwet 1994, Thiel ve ark 1996, Pratelli ve ark 1999, Baginski ve ark 2000, Loken 2000).

Monies ve ark (2004), MD benzeri semptomların görüldüğü bir kuzuda *Mannheimia haemolytica* izole ettiklerini ifade etmişlerdir.

Border Disease Virus ile enfekte koyun çiftliklerinde yaşa bağlı spesifik antikor oluşumu ile ilgili çok az çalışma bulunmasına (Loken ve ark 1982b) rağmen sürüdeki PI hayvanların belirleneceği seroepidemiyolojik çalışmalar enfeksiyonun kontrolü için kullanılabilmektedir (Berriatua ve ark 2004). Ayrıca PI hayvanların maksimum 5 yaşına kadar yaşadıkları bildirilmiştir (Nettleton ve ark 1992, Marco ve ark 2007).

1.8. Koruma ve Kontrol

Border Disease Virus enfeksiyonu ile ilgili birçok yeni salgın; çiftlik hayvanlarının yetiştirme sezonunun başlangıcında bir yerden başka bir yere nakilleri sırasında oluşan hayvan hareketlerinin bir sonucu olarak karşımıza çıkmaktadır. Akut enfekte hayvanların veya virus taşıyıcısı koyun ya da sığırların sürüye giriş yapması da muhtemel enfeksiyon kaynaklarındandır (Terlecki 1977).

Çeşitli geyik türlerinde yapılan serolojik çalışmalar sonucunda bu hayvanlarda enfeksiyon varlığı tespit edilmiş ise de vahşi hayvanların BDV'nin çiftliğe girişinden sorumlu tutulabileceğine dair bir bilgi bulunmamaktadır.

Kuzulama döneminin başlangıcında BDV enfeksiyonuna bağlı klinik belirtiler olursa bu dönemden sonra doğan kuzular ve doğum yapan koyunlar tamamen ayrı bir yere alınmalıdır. BDV enfeksiyonundan etkilenen ancak yaşamlarını devam ettirebilen bütün kuzular yeni yetiştirme sezonundan önce elden çıkartılmalıdır. Küçük koyunculuk işletmelerinde ya da küçük salgınların gözlendiği sürülerde BDV enfeksiyonundan etkilenen hayvanların tespit edilerek sürüden ayrılmalarının sağlanması, bu hayvanların tamamının kesime sevk edilmesi basit bir metot olarak uygulanabilmektedir. Bu metot BDV enfeksiyonunun kontrolünde çok etkili olmayabilir ancak enfeksiyonun tüm sürüye yayılmasınının önlenmesinde biraz olsun etkili olmaktadır (Nettleton 1987). Bugün için BDV enfeksiyonuna karşı tamamen fötal koruma sağlayacak herhangi bir ticari aşı bulunmamaktadır.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Araştırmada kullanılan sürüler

Araştırmada kullanılan örnekler, Konya ili Karatay ilçesi Göçü, Divanlar ve Karadona Köy'lerinde ayrıca Yarma ve İsmil Kasaba'larında bulunan koyun yetiştiriciliği yapan işletmelerden toplandı (Şekil 2.1).

Bu amaçla yukarıda belirtilen koyunculuk işletmelerinden, 2006-2008 yılları arasında T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Konya İl Tarım Müdürlüğü'ne, Konya Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'ne ve ayrıca Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi'ne başvuruları bulunan ve abort problemleri olan sürüler tercih edilerek örneklemeler yapıldı.



Şekil 2.1. Örnekleme yapılan sürülerin bulunduğu yerler.

2.1.2. Araştırmada kullanılan hayvanlar

Border Disease Virus varlığının ortaya konulabilmesi, abort problemi gözlenen koyun sürülerinde olası PI hayvanların tespit edilebilmesi ve koyun abortlarında BDV'nin rolünün belirlenebilmesi amacı ile Pestivirus yönünden aşı uygulaması yapılmamış sürülerden, 2006–2008 yılları arasında, örneklemeler yapıldı.

Projede adı geçen yerleşim yerlerinde bulunan sürülerin tamamının örneklenmesi, mevcut bütçe kapsamında mümkün olamadığı için öncelikli olarak yoğun abort problemi yaşayan yetiştiriciler tespit edildi. Belirlenen yetiştiricilere (her bir köyden bir yetiştirici) ait sürülerde ise tesadüfi örnekleme yöntemi kullanıldı. Böylece sürülerin ortalama %20'si örneklendi.

Türkiye Cumhuriyeti Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Konya İl Tarım Müdürlüğü tarafından sürülerdeki hayvanlara kulak küpesi takıldığı için 2. kez örneklemelerde herhangi bir zorluk yaşanmadı

2.1.3. Hücre Kültürü

Bu çalışmada BDV'nin izolasyonu için, direkt immunperoksidaz testi ile Pestivirus yönünden negatif olduğu belirlenen, MDBK devamlı hücre kültürü kullanıldı.

2.1.4.Viruslar

Araştırmada BVDV'nin cp referens suşu olan NADL ve ncp BVDV kullanıldı.

2.1.5. Fötal Dana serumu

Hücre kültürü çalışmalarında gerekli olan fetal calf sera (FCS, fötal dana serumu) ticari olarak (Biological Industries, İsrail) temin edildi. Laboratuara gelen steril FCS'ler kullanılıncaya kadar -20°C'lik derin dondurucuda muhafaza edildi. Kullanılmadan önce ise 56°C'de 30 dk süre ile inaktive edildi.

2.1.6. Serolojik kontrol materyali

2.1.1.'de belirtilen yerleşim yerlerindeki (2.1.2'de belirtilen abort geçmişi olan) sürülerde bulunan; koyun (1000 adet), kuzu (500 adet) ve koç (50 adet)'lardan serum için kan örnekleri toplandı (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. Serolojik kontrol için alınan örnek sayıları (kan serumu).

	Koyun	**Kuzu**	**Koç**
1.İşletme	200	100	10
2.İşletme	200	100	10
3.İşletme	200	100	10
4.İşletme	200	100	10
5.İşletme	200	100	10
Toplam	**1000**	**500**	**50**

2.1.7. Virolojik kontrol materyali

2.1.1.'de belirtilen yerleşim yerlerindeki (2.1.2'de belirtilen abort geçmişi olan) sürülerde bulunan; koyun (1000 adet), kuzu (500 adet) ve koç (50 adet)'lardan lökosit için kan ile koyunlardan vaginal svap (50 adet) örnekleri toplandı (Çizelge 2.2).

Ayrıca abort olan fötuslardan alınan iç organların (karaciğer, akciğer, kalp, dalak, beyin, böbrek, ince bağırsak, beyincik, timus, lenf, tiroid) sayısı Çizelge 2.3'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.2. Virolojik kontrol için alınan örnek sayıları (1.örnekleme lökosit).

	Koyun	**Kuzu**	**Koç**
1.İşletme	200	100	10
2.İşletme	200	100	10
3.İşletme	200	100	10
4.İşletme	200	100	10
5.İşletme	200	100	10
Toplam	**1000**	**500**	**50**

2.2. Yöntem

2.2.1. MDBK devamlı hücre kültürü hazırlanması

Madin Darby Bovine Kidney devamlı hücre kültürleri 250 ml'lik flasklarda (Corning, ABD) çoğaltıldı. Hücre üretme vasatı olarak %10 FCS içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Biological Industries, İsrail) kullanıldı.

2.2.2. Virusların Çoğaltılması

Araştırmada kullanılan cp ve ncp BVDV'ler MDBK devamlı hücre kültürlerinde çoğaltıldı. Bu amaçla 250 ml'lik flasklarda üretilen hücrelerin vasatları döküldü ve hücre yüzeyleri PBS-M ile 1 kez yıkandı. Takiben adsorbsiyona bağlı ekim tekniği ile 2.5 ml virus inokule edildi. 37°C'da 1 saat adsorbsiyon için bekletildi, süre sonunda virus üretme vasatı olarak serumsuz DMEM ilave edildi. İnkubasyondan 24–48 saat sonra doku kültürü mikroskobunda (Olympus, Tokyo) yapılan kontrollerde, %80 oranında sitopatik değişikliklerin görülmesiyle, flasklar 3 kere –20°C'da dondurulup, 37°C'da hızla çözdürüldü. Elde edilen virus süspansiyonu +4°C'da 3000 rpm'de (Hettich, Almanya) 30 dk santrifüj edildi. Üstte kalan viruslu sıvının sterilite kontrolü yapılarak 1 ml'lik porsiyonlar halinde –80°C'da saklandı.

2.2.3. Kan serum örneklerinin hazırlanması

Kan örnekleri, proje kapsamında örnekleme amacı ile seçilen koyun, kuzu ve koçların Vena jugularis'in bulunduğu bölge alkol ile silindikten sonra holder kullanılarak, kaolinli ve antikoagulantlı (Etilendiamin Tetraasetikasit, EDTA) tüplere 8'er ml alınarak uygun koşullarda (+4°C'lik soğuk zincir ortamında) işlenmek üzere laboratuara getirildi. 2500 rpm (Hettich, Almanya)'de 20 dk santrifüj edildi. Bu işlemden sonra elde edilen serum, otomatik pipet yardımı ile 1.5 ml'lik steril eppendorf tüplerine aktarıldı. Toplanan serumlar su banyosunda (Kottermann, Almanya) 56°C'de 30 dk süre ile inaktive edildi. Serum örnekleri kullanılıncaya kadar -80°C'lik derin dondurucuda muhafaza edildi.

Tüp içerisinde kalan kanlar, tüplerle birlikte tıbbi atık poşetleri yardımı ile çevreye herhangi bir zarar vermeden uzaklaştırıldı.

2.2.4. Lökosit örneklerinin hazırlanması

Holder yardımı ile steril EDTA'lı tüplere alınan kan örnekleri soğuk zincir altında laboratuara getirildi. 2500 rpm (Hettich, Almanya) +4°C'de 20 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında tüpte üç tabakaya ayrılan (dipte eritrosit, ortada lökosit ve en üstte plazma) kandan, otomatik pipet ile lökosit tabakası Phosphate Buffer Saline-Minus (PBS-M) içinde 3 kez santrifüj edilerek yıkandı. Son yıkama işlemini takiben elde edilen lökositler 1.5 ml DMEM + %10 Dimethylsulphoxide (DMSO) içinde sulandırılarak, kullanılıncaya kadar -80°C'lik derin dondurucuda saklandı.

2.2.5. Svap örneklerinin hazırlanması

Vaginal svap örnekleri içerisinde 5 ml antibiyotikli PBS bulunan steril tüplere alındı. Soğuk zincir altında laboratuara getirildi. Svapta bulunan vaginal akıntının PBS'ye geçmesi amacı ile svap çubuğu tüp çeperine bastırılarak çıkartıldı.

Elde edilen sıvı 2500 rpm (Hettich, Almanya) +4°C'de 20 dk santrifüj edildi. Bu işlemin sonunda tüpün üst kısmında bulunan sıvıdan 2 ml alınarak üzerine 20 µl konsantre antibiyotik (Biological Industries, İsrail) ilave edildi. Antibiyotiğin etkisini gösterebilmesi için +4°C'de 1 saat bekletilen svap örnekleri, kullanılıncaya kadar -80°C'lik derin dondurucuda saklandı. Tüpün içerisinde kalan diğer kısım tüplerle birlikte tıbbi atık poşetleri yardımı ile çevreye herhangi bir zarar vermeden uzaklaştırıldı.

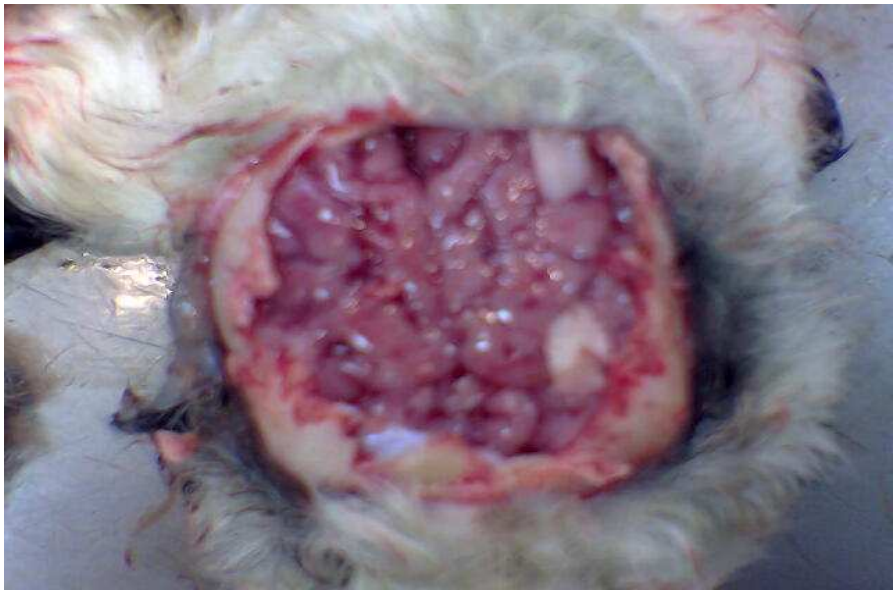
2.2.6. Doku örneklerinin hazırlanması

Araştırma süresince elde edilen fötuslar (Resim 2.1) uygun şartlarda, en kısa sürede laboratuara getirildi. Çalışmada kullanılacak olan organlar (Resim 2.2) steril şartlarda çıkartıldı. Bu organlardan alınan doku örnekleri steril tüplere konulduktan sonra -80°C'lik derin dondurucuda muhafaza edildi. Örnekler kullanılacağı zaman 37°C'lik su banyosunda çözdürüldü. Konsantre antibiyotik (Biological Industries, İsrail)'li PBS içine alınan doku örnekleri (1/10 oranında) homojenizatörde (IKA T–

25 Digital Ultra-Turrax, Almanya) 6000/dk'da 30 sn homojenize edildi. Daha sonra bu homojenizatlar 3000 rpm (Hettich, Almanya) +4°C'de 20 dk santrifüj edildi. Sterilite kontrollerinin yapılması için kanlı agara (Sigma, Almanya) ekimleri yapıldı. Herhangi bir bakteriyel kontaminasyon görülmeyen örnekler kullanıldı.



Resim 2.1. Araştırma süresince elde edilen fötuslardan bir tanesi.



Resim 2.2. Çalışmada kullanılacak olan organların çıkartılması (beyin).

2.2.7. Serolojik çalışma

2.2.3.'de açıklandığı şekilde hazırlanan serum örnekleri BDV'ye karşı oluşan antikor varlığı yönünden İndirekt ELISA (Institüte Pourquer, Fransa) ile incelendi.

Kitin İçeriği

Testte Institut Pourquier (Fransa) firması tarafından üretilen, p80 proteinine karşı gelişen spesifik antikorları tespit etmeye yarayan, ticari İndirekt ELISA kiti (ELISA BVD/MD/BD P80 antibodies screening version: P00645/03) kullanıldı. Her kit; antijenle kaplı 96x5'lik mikropleyt, sulandırma solüsyonu 9 (örnek sulandırması için), sulandırma solusyonu 1 (konjugat sulandırması için), monoklonal anti-P80/peroksidaz konjugatı, negatif kontrol serumu, pozitif kontrol serumu, 20x konsantre yıkama solüsyonu, substrat (Revelation solusyonu) ve stop solüsyonu [0.5 Molar (M) H_2SO_4] içermekteydi.

İndirekt ELISA

Testin uygulanması

Mikropleytdeki bütün gözler 50'şer µl 'sulandırma solüsyonu 9' kondu. Sonra sırasıyla A1 gözüne 50 µl pozitif kontrol (PK), B1 ve C1 gözlerine ise 50'şer µl negatif kontrol (NK) ilave edildi. Diğer gözlere ise 50'şer µl serum örnekleri konuldu. Mikropleyt yavaşça sallanarak gözlerdeki bileşenlerin karışması sağlandı. Pleytin üzeri kapatılarak 21°C'de 1 saat inkubasyona bırakıldı. Süre sonunda mikropleytler ters çevrilerek boşaltıldı. Ardından mikropleytler yıkama solusyonu (her göze 300 µl) ile 3 kez yıkandı. 'Sulandırma solüsyonu 1' ile 1/100 oranında sulandırılarak hazırlanan konjugattan, kontrol gözleri de dahil olmak üzere, bütün gözlere 100'er µl konuldu. Üzeri kapatılan mikropleyt 21°C'de 1 saat inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon süresinin ardından yıkama işlemi 3 kez daha tekrar edildi. Daha sonra bütün gözlere 100'er µl substrat ilave edilerek mikropleytin üzeri kapatıldı ve 20 dk karanlıkta inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon süresinin ardından gözler boşaltılmadan bütün gözlere 100'er µl stop solüsyonu konuldu. Mikropleytler hiç vakit kaybedilmeden değerlendirmeye alındı.

Testin değerlendirilmesi

ELISA okuyucusuna (Rayto RT-2100C, Almanya) yerleştirilen mikropleytler Optik Dansite (OD) değeri 450 nm'ye ayarlanmış filtre ile okundu. Belirlenen absorbans değerleri, prosedüre uygun olarak aşağıda belirtilen şekilde hesaplandı.

Testin geçerliliği

Negatif kontrolün Optik Dansite$_{450}$ (OD_{450}) değeri minimum **0,800;** Pozitif kontrolün karşılaştırmalı yüzdesi **%20'den daha az** ise test geçerli kabul edildi.

Sonuçların yorumlanması

Her bir serum örneğinin inhibisyon yüzdesi negatif kontrol ile karşılaştırılarak hesaplandı.

$$\textbf{İnhibisyon\%} = (OD_{\text{Örnek}} / OD_{\text{Negatif Kontrol}}\ (\text{ORTALAMA})) \times 100$$

Örneğin inhibisyon yüzdesi **≥ 50%** ise BDV'ye karşı spesifik antikor taşımadığına

Örneğin inhibisyon yüzdesi **40%** ile 50% arasında ise şüpheli olduğuna

Örneğin inhibisyon yüzdesi **≤ 40%** ise BDV'ye spesifik antikor taşıdığına karar verildi.

2.2.8. Virolojik çalışmalar

2.2.4.'de açıklandığı şekilde hazırlanan lökosit örnekleri, 2.2.5'de açıklandığı şekilde hazırlanan vaginal svap örnekleri ve 2.2.6'da açıklandığı şekilde hazırlanan doku örnekleri BDV antijen varlığı yönünden direkt ELISA ve direkt IP ile, BDV viral genom varlığı yönünden ise One Step RT-PCR ile incelendi.

Direkt ELISA

Kitin İçeriği

Testte Institut Pourquier (Fransa) firması tarafından üretilen, NSP2/3 ve E0'ı tespit etmeye yarayan, ticari Direkt ELISA kiti (ELISA BVD/MD antigen mix screening version: P00623/04) kullanıldı. Her kit; antikor ile kaplı 96x10'luk mikropleyt, 20x konsantre yıkama solüsyonu (örnek sulandırması için), 5x konsantre hemoliz solüsyonu, sulandırma solüsyonu 9, sulandırma solüsyonu 23 (Örnek inkubasyon solüsyonu hazırlamak için), negatif kontrol, pozitif kontrol, poliklonal anti-E0/NSP2/3 antikor (Örnek inkubasyon solüsyonu hazırlamak için), anti-poliklonal konjugat, substrat (Revelation solüsyonu) ve stop solüsyonu (0.5 M H_2SO_4) içermekteydi.

Testin uygulanması

Lökosit örneklerinin Direkt ELISA için hazırlanması

'Konsantre hemoliz solüsyonu' (5x) 480 ml distile su içerisinde sulandırılarak '1xhemoliz solüsyonu' hazırlandı. Direkt ELISA ile incelenecek lökosit örneklerinden 200'er µl alınarak eppendorflara konuldu. Her bir tüpün üzerine 1xhemoliz solüsyonundan 300'er µl ilave edildi. Tüpler vortekslenerek oda ısısında 15 dk inkubasyona bırakıldı. Süre sonunda 1000 g'de 15 dk santrifüj edildikten sonra süpernatantlar atıldı. Tüpler ters çevrilerek içeriğin tamamen boşalması sağlandı. Her bir tüpe 200'er µl 'Sulandırma solusyonu 9' ilave edilerek pipete edildi.

‘Poliklonal anti E0/NSP2/3 antikoru’, sulandırma solüsyonu 23’ ile 1/10 oranında sulandırılarak ‘örnek inkubasyon solüsyonu’ hazırlandı. ELISA pleytlerindeki bütün gözlere 50’şer µl örnek inkubasyon solüsyonu konuldu. Sonra sırasıyla A1 gözüne 50 µl NK, B1 ve C1 gözlerine ise 50’şer µl PK ilave edildi. Diğer gözlere ise ‘sulandırma solüsyonu 9’ ilave edilmiş örneklerden 50’şer µl aktarıldı. Mikropleyt yavaşça sallanarak gözlerdeki bileşenlerin karışması sağlandı. Pleytlerin üzerleri kapatılarak 21°C’de 90 dk inkubasyona bırakıldı. Ardından mikropleytler ters çevrilerek boşaltıldı. Takiben yıkama solusyonundan bütün gözlere 300’er µl konarak pleytler yıkandı. Bu işlem 3 kez tekrar edildi. Konjugat ‘Sulandırma solüsyonu 1’ ile 1/100 oranında sulandırılarak hazırlandı. Bütün gözlere 100’er µl konjugat konuldu. Üzeri kapatılan mikropleytler 21°C’de 30 dk inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon süresinin ardından ters çevrilerek boşaltılan mikropleytler 4 kez yıkandı. Daha sonra bütün gözlere 100’er µl substrat (Revelation solution 5) ilave edilerek mikropleytlerin üzerleri kapatılarak, 20 dk karanlıkta inkubasyona bırakıldı. Gözler boşaltılmadan bütün gözlere 100’er µl stop solüsyonu konuldu. Mikropleytler hiç vakit kaybedilmeden değerlendirmeye alındı.

Testin değerlendirilmesi

ELISA okuyucusuna (Rayto RT-2100C, Almanya) yerleştirilen mikropleytler Optik Dansite (OD) değeri 450 nm’ye ayarlanmış filtre ile okundu. Belirlenen absorbans değerleri, prosedüre uygun olarak aşağıda belirtilen şekilde hesaplandı.

Testin geçerliliği

Pozitif kontrol OD_{450} değeri minimum **0.800;** Pozitif kontrolün negatif kontrole oranı ≥ **4,5 ise** test geçerli kabul edildi.

Sonuçların yorumlanması

Her bir lökosit örneğinin inhibisyon yüzdesi aşağıda belirtilen formüle uygun olarak hesaplandı.

$$\textbf{İnhibisyon\%} = 100 \times \frac{\text{Örneğin } OD_{450} \text{ değeri - Negatif kontrol } OD_{450} \text{ değeri}}{\text{Pozitif kontrol } OD_{450} \text{ değeri- Negatif kontrol } OD_{450} \text{ değeri}}$$

Örneğin inhibisyon yüzdesi %25'den küçük ya da eşit ise örneğin BDV yönünden negatif olduğuna,

Örneğin inhibisyon yüzdesi %25 ve %35 arasında ise örneğin BDV yönünden şüpheli olduğuna,

Örneğin inhibisyon yüzdesi %30'den büyük ya da eşit ise örneğin BDV yönünden pozitif olduğuna karar verildi.

Direkt İmmunperoksidaz

Hyera ve ark (1987)'nın bildirdiği yönteme göre yapıldı. Bu amaçla 24 gözlü pleytler (Corning, ABD) kullanıldı. BVDV'u yönünden negatif olduğu kontrol edilen MDBK hücre kültürleri $1x10^5$ hücre/ml olacak şekilde DMEM+%5 FCS ile sulandırılarak tüm gözlere 1 ml konuldu. 37°C'lik CO_2'li etüvde inkubasyona bırakıldı. Ertesi gün her numune için (lökosit, vaginal svap ve doku örnekleri) 2'şer göze 200'er µl inokule edilerek pleytler tekrar CO_2'li etüvde 72 saat inkubasyona bırakıldı. Süre sonunda tüm gözlerdeki vasatlar boşaltılarak hücre yüzeyleri PBS ile yıkandı. Yıkama işlemini takiben pleytler kurutma kağıdına ters çevrilerek kurutuldu. Mikropleyt gözlerine 100'er µl %2'lik paraformaldehit (Merck, ABD) ilave edilerek hücrelerin yüzeye fikzasyonu sağlandı. Fikze edilen hücrelerin üzerine 1/20 oranında PBS ile sulandırılan Anti-BVDV monoklonal antikordan (BİO 295, Belçika) 200'er µl ilave edildi. 1 saat nemli bir ortamda inkube edildi. Süre sonunda pleyt gözleri yıkandı. Tüm gözlere 1/20 oranında PBS ile sulandırılan peroxidase rabbit anti-mouse immunglobulinden (BİO 269, Belçika) 200'er µl ilave edilerek 1 saat nemli bir ortamda inkube edildi. Bu sürenin sonunda hücre yüzeyleri PBS ile tekrar yıkandı. Daha sonra her bir göze 200'er µl substrat ilave edilerek 20 dk inkubasyona bırakıldı. Substrat olarak 0.1 M sodyum asetat (Sigma, ABD) tamponu [Power of Hydrogen (pH):5.0] içerisinde 3-amino 9-etil carbazol (Sigma, ABD) + dimetyl formamide (Sigma, ABD) + 2 damla %3'lük H_2O_2 kullanıldı. 20 dk sonra reaksiyon steril distile su ile durduruldu. Hücreler kırmızı kahverengi sitoplazma boyanması yönünden doku kültürü mikroskobu (Olympus, Tokyo) ile kontrol edildi.

One Step RT-PCR analizleri

Lökosit örneklerinden RNA ekstraksiyonu

Ekstraksiyon işlemleri pozitif kontrollerle birlikte yürütüldü. Bu amaçla, virus kontrol olarak BVDV'nin referens suşu olan cp NADL kullanıldı.

Toplanan lökosit örneklerinden RNeasy Mini Kit (QIAGEN, 74106) kullanılarak RNA ekstraksiyonu yapıldı. Test kit prosedürüne göre uygulandı.

Buna göre; lökosit örneklerinden uygun bir tüpe 600 µl alındı ve üzerine 600 µl RLT lyses buffer (1 ml'sinde 10 µl β-Mercaptoethanol içeren) ilave edildi. Karışım 6000 devirde 30 sn homojenize edildi. Homojenizasyondan sonra 3 dk 10.000 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatanttan 600 µl alınıp başka bir eppendorfa aktarıldı ve eşit miktarda %70'lik ethanol ilave edilerek pipete edildi. Bu karışımdan 700 µl alınıp, 2 ml'lik tüpler içerisinde bulunan mini spin column'lara aktarıldı. 15 sn 10.000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası alttaki tüpte toplanan sıvı tüp ile birlikte atıldı ve RNeasy mini spin column'lar yeni tüplere yerleştirildi. 700 µl RW1 wash buffer ilave edilerek 15 sn 10.000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası altta toplanan sıvı atıldı ve mini spin column'lar yeni tüplere yerleştirildi. 500 µl RPE wash buffer ilave edilip 15 sn 10.000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası altta toplanan sıvı atıldı ve mini spin column'lar yeni tüplere yerleştirildi. Tekrar 500 µl RPE wash buffer ilave edilip 2 dk 10.000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası altta toplanan sıvı atıldı ve mini spin column'lar yeni tüplere yerleştirildi. 2 dk 10.000 rpm'de santrifüj edilerek kurutuldu. Mini spin column'lar 1.5 ml'lik yeni eppendorflara aktarıldı. 35 µl RNase içermeyen su ilave edilip 1 dk 10.000 rpm'de sanrifüj edildi. Santrifüj sonrası altta toplanan sıvı kısım viral RNA olarak 500 µl'lik RNase-DNase içermeyen eppendorflara aktarıldı. Ekstraksiyon işlemi sonucunda elde edilen ekstraksiyon ürünlerindeki viral RNA miktarının ve saflığının ölçülmesi için 260–280 nm dalga boylarında spektrofotometrik ölçümleri yapıldı. Bu ölçümler Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalında gerçekleştirildi. Viral $RNA_{260/280}$ oranları 1.59–2.94 arasında tespit edildi.

Svap örneklerinden RNA ekstraksiyonu

2.2.5'de belirtildiği gibi hazırlanan ve -80°C'de bulunan vaginal svap örnekleri, derin dondurucudan alınarak hızla çözdürüldü. Örneklerin RNA ekstraksiyonları QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, 52906)'i kullanılarak yapıldı. Test kit prosedürüne göre uygulandı.

Buna göre; 1.5 ml'lik tüplere 560 µl AVL buffer + Carrier RNA-Buffer AVE (bir örnek için 0.56 ml AVL buffer, 5.6 µl Carrier RNA-Buffer AVE olacak şekilde) alındı ve üzerine hücre kültürü üst sıvılarından 140 µl ilave edildi. Her tüp 15 sn vorteks ile karıştırıldı. Oda ısısında (15–25°C) 10 dk inkübe edildi. Üstlerine %96-98'lik ethanol'den 560 µl ilave edilerek vorteks ile karıştırıldı. Bu karışımdan 630 µl alınarak QIAmp Mini Column'a aktarıldı. 8.000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Takiben mini column'lar yeni tüplere aktarıldı. Bu işlemler daha önce hazırlanan karışımdan 630 µl alınarak tekrar edildi. Temiz tüplere aktarılan mini column'lara AW1 Buffer'dan 500 µl ilave edilerek, 8.000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Takiben mini column'lar yeni tüplere aktarıldı. Mini column'lara AW2 Buffer'dan 500 µl ilave edilerek, 14.000 rpm'de 3 dk santrifüj edildi. Takiben mini column'lar 2 ml'lik yeni tüplere aktarılarak kısa süreli (10.000 rpm'de 30 sn) santrifüj edildi. Mini column'lar 1.5 ml'lik yeni tüplere aktarılarak üzerlerine AVE Buffer'dan 60'şar µl ilave edildi. Oda ısısında 1 dk inkübe edildikten sonra, 8.000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Tüplerin dibinde biriken viral RNA'lar 500 µl'lik tüplere aktarılarak, One Step RT-PCR'da kullanılıncaya kadar -80°C'da saklandı. Ekstraksiyon işlemi sonucunda elde edilen ekstraksiyon ürünlerindeki viral RNA miktarının ve saflığının ölçülmesi için 260–280 nm dalga boylarında spektrofotometrik ölçümleri yapıldı. Viral $RNA_{260/280}$ oranları 1.27–2.18 arasında tespit edildi.

Doku örneklerinden RNA ekstraksiyonu

Toplanan ve homojenize edilerek -80°C'de saklanan doku örneklerinin RNA ekstraksiyonları RNeasy Mini Kit (QIAGEN, 74106)'i kullanılarak gerçekleştirildi. Bu amaçla lökosit örneklerinden RNA ekstraksiyonu amacıyla kullanılan yöntemden yararlanıldı. Ekstraksiyon işlemi sonucunda elde edilen ekstraksiyon ürünlerindeki viral RNA miktarının ve saflığının ölçülmesi için 260–280 nm dalga boylarında spektrofotometrik ölçümleri yapıldı. Viral $RNA_{260/280}$ oranları 1.98–3.19 arasında tespit edildi.

One Step RT-PCR uygulaması

Ekstraksiyonu yapılan örneklerden elde edilen viral RNA ürünleri One Step RT-PCR (QIAGEN, 210212) ticari kiti kullanılarak incelendi.

İçinde, dNTP mix, 5xQiagen one step RT-PCR buffer, Q solusyonu, Qiagen one step RT-PCR enzim karışımı ve RNAse free su bulunan kit, kullanılıncaya kadar -20 °Clik derin dondurucuda muhafaza edildi. Primerler aşağıda belirtildiği gibi ilgili firmadan (Metabion International AG, Martinsried/Almanya) sipariş edildi.

Border Disease Virus için Primer dizilimi:
F: 5' TCGTGGTGAGATCCCTGAG 3'
R: 5' GCAGAGATTTTTTATACTAGCCTATRC 3' (Vilcek ve Paton 2000).

Kit içerisinde bulunan reagentlar (Qiagen one step RT-PCR enzim karışımı hariç) ve viral RNA çözdürülerek, kısa süreli bir santrifüj (10.000 rpm'de 30 sn) işlemi yapıldı. Reaksiyon karışımı (master mix) yukarıda özetlendiği şekilde hazırlanırken tüm reagentlar ve ekstraksiyon ürünleri buz aküsü üzerinde tutuldu.

Bir örnek için miktarları bildirilen reagentlardan, toplam örnek sayısı göz önünde tutularak bir karışım hazırlandı. Son olarak hızla çözülen Qiagen RNase İnhibitor (QIAGEN, Q–129918)'ü ve Qiagen one step RT-PCR enzim karışımı ilave edilen bu solüsyondan, DNAase ve RNase içermeyen eppendorf tüplerine 48'er µl dağıtıldı. Bir tüpün bir örneği ifade ettiği bu testte, her tüpte bulunan karışımın üzerine viral RNA'dan 2'şer µl ilave edildi. Master mix daha sonra Thermal Cycler (TC)'a (MJ Research, ABD) yerleştirildi. Viral RNA içeren master mix karışımlarına test prosedürüne uygun olarak TC'a girilen, reverse transkripsiyon (50 C^0'da 32 dk), başlangıç PCR aktivasyon adımı (95°C'de 15 dk, hot star Taq DNA Polimerazın aktivasyonu içindir. Her bir siklusu denaturasyon (94°C'de 1 dk), annealing (56°C'da 1 dk) ve uzama (72°C'de 1 dk)'dan oluşan 36 siklusu takiben son uzama (72°C'da 7dk) programı uygulandı.

Toplam master mix solüsyonu aşağıda belirtildiği gibi hazırlandı.

Komponent / Master Mix	**Volum / Reaksiyon**
RNase free su	23.64 µl*
5x Qiagen one step RT-PCR buffer	10.0 µl
dNTP Mix	2.0 µl
5x Q solüsyonu	10.0 µl
Primer A	0.1 µl
Primer B	0.1 µl
Qiagen one step RT-PCR enzim karışımı	2.0 µl
RNase inhibitörü	(0.16 µl)
Viral RNA	2.0 µl
TOTAL HACİM	50 µl

* Her tüpe ayrı ayrı örneklerin viral RNA örnekleri konuldu.

One Step RT-PCR ürünlerinin elektroforezi

Her bir One Step RT-PCR ürününün değerlendirilmesi için elektroforez tekniğinden yararlanıldı. Bu amaçla, 5xTBE (54 g Tris-Base, 27.5 g Borik asit ve 4.65 g EDTA-Na_2 1 l distile su ile tamamlandı) tamponunun 1/10'luk sulandırması (0.5xTBE) içinde %1'lik agarose (Vivantis, Malaysia) hazırlanarak mikrodalgada (360°C'de 3 dk) çözdürüldü. 65–70°C'ye kadar soğutulan agarose jel içine Ethidium Bromide (EtBr) (Sigma, Almanya) (100 ml için 10 µl EtBr) ilave edildi. Agaroz jel yatağı elektroforez tankına (Serva, Blue Marine 100, Almanya) yerleştirildi. Pozitif ve negatif kontrol de dahil olmak üzere PCR ürünlerinin de (7 µl) bulunduğu DNase ve RNase free eppendorf tüplerine gel loading solution (Sigma, Almanya)'dan 2 µl konularak pipete edildi. Agarose jeldeki ilk göze 100 base pair (bp)'lik DNA Ladder (Vivantis VC 100 bp plus DNA Ladder, Malezya), 2. göze pozitif kontrol, 3. göze negatif kontrol ve takiben sırasıyla RT-PCR ürünlerinden 9'ar µl kondu.

Elektroforez tankının (Serva Electrophoresis GmBH, Heidelberg, Carl-Benz, Almanya) kapağı kapatılarak güç kaynağı (Serva, Blue Power Plus) (120 V ve 50 mA) ayarlandı ve 45 dk jelde (–)'den (+)'a giden elektrik akımında numuneler yürütüldü. Bu süre sonunda jel Transilluminatör (UVP Inc., Upland CA, ABD) altında incelenerek gelişen bantlar değerlendirildi ve fotoğrafları çekildi.

3. BULGULAR

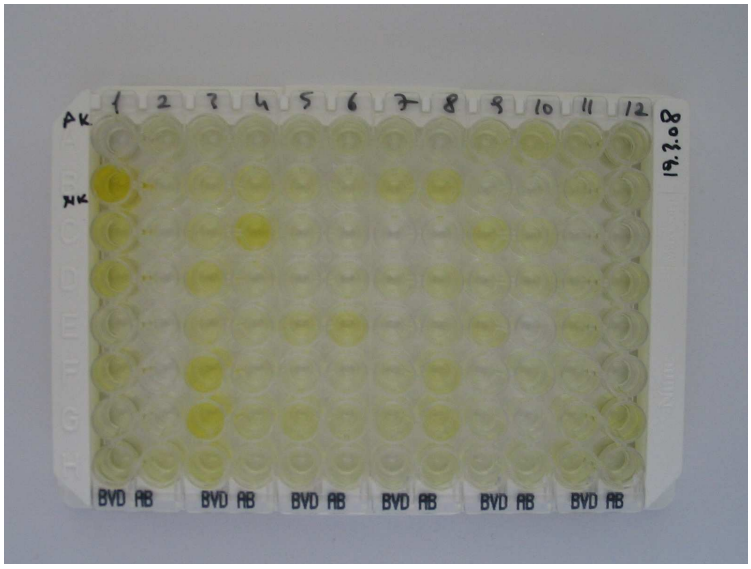
3.1. Serolojik çalışma sonuçları

3.1.1 İndirekt ELISA sonuçları

İndirekt ELISA (Institut Pourquier, Fransa) ile incelenen 1000 adet koyun kan serumundan 790 adedi (%79) BDV'ye karşı oluşan antikor varlığı yönünden pozitif olarak tespit edilirken 210 adedi (%21) negatif bulundu (Resim 3.1.) (Çizelge 3.1).

İncelenen 500 adet kuzu kan serumundan 217 adedi (%43.4) BDV'ye karşı oluşan antikor varlığı yönünden pozitif olarak tespit edilirken 283 adedi (%56.6) negatif bulundu (Çizelge 3.2).

İncelenen 50 adet koç kan serumundan 3 adedi (%6) BDV'ye karşı oluşan antikor varlığı yönünden pozitif olarak tespit edilirken 47 adedi (%94) negatif bulundu (Çizelge 3.3., Çizelge 3.4).



Resim 3.1. Koyun serum örnekleri için İndirekt ELISA.

Çizelge 3.1. Koyun kan serumu örneklerinin İndirekt ELISA sonuçları.

	1.İşletme	2.İşletme	3.İşletme	4.İşletme	5.İşletme	Toplam
BDV (Ab) +	165	158	160	163	144	**790**
BDV (Ab) -	35	42	40	37	56	**210**
Toplam	**200**	**200**	**200**	**200**	**200**	**1000**

Çizelge 3.2. Kuzu kan serumu örneklerinin İndirekt ELISA sonuçları.

	1.İşletme	2.İşletme	3.İşletme	4.İşletme	5.İşletme	Toplam
BDV (Ab) +	36	51	47	41	42	**217**
BDV (Ab) -	64	49	53	59	58	**283**
Toplam	**100**	**100**	**100**	**100**	**100**	**500**

Çizelge 3.3. Koç kan serumu örneklerinin İndirekt ELISA sonuçları.

	1.İşletme	2.İşletme	3.İşletme	4.İşletme	5.İşletme	Toplam
BDV (Ab) +	-	3	-	-	-	**3**
BDV (Ab) -	10	7	10	10	10	**47**
Toplam	**10**	**10**	**10**	**10**	**10**	**50**

Çizelge 3.4. Kan serumu örneklerinin İndirekt ELISA toplu sonuçları.

	1.İşletme	2.İşletme	3.İşletme	4.İşletme	5.İşletme	Toplam
BDV (Ab) +	201	212	207	204	186	**1010**
BDV (Ab) -	109	98	103	106	124	**540**
Toplam	**310**	**310**	**310**	**310**	**310**	**1550**

3.2. Virolojik Çalışma Sonuçları

3.2.1. Direkt ELISA Sonuçları

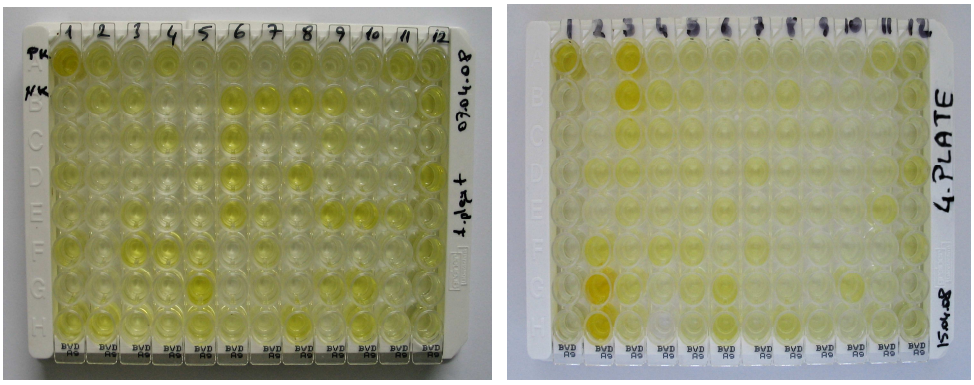
Direkt ELISA (Institut Pourquier) ile incelenen 1000 adet koyun lökosit örneklerinden (1.örnekleme) 11 adedi (%1.1) BDV antijen varlığı yönünden pozitif olarak tespit edilirken 989 adedi (%98.9) ise negatif bulundu (Resim 3.2., Resim 3.3) (Çizelge 3.5). BDV antijen varlığı yönünden pozitif olduğu belirlenen 11 adet hayvan, serolojik olarak BDV'ye karşı oluşan antikor varlığı yönünden negatif tespit edildi. Bu hayvanların 15 gün sonra 2. örneklemeleri gerçekleştirildi. 11 adet örneğin 3 adedi 2. örnekleme sonrasında da BDV antijen varlığı yönünden pozitif BDV'ye karşı oluşan antikor varlığı yönünden ise negatif tespit edilirken, 8 adet örnek ise BDV antijen varlığı yönünden negatif ve BDV'ye karşı oluşan antikor varlığı yönünden ise pozitif olarak tespit edildi (Çizelge 3.6).

İncelenen 500 adet kuzu lökosit örneğinin hepsi BDV antijen varlığı yönünden negatif bulundu (Çizelge 3.7).

İncelenen 50 adet koç lökosit örneğinin hiçbirisinde BDV antijen varlığı tespit edilmedi (Çizelge 3.8).

İncelenen 50 adet vaginal svap örneğinden hiçbirisi BDV antijen varlığı yönünden pozitif olarak tespit edilmedi (Çizelge 3.9).

İncelenen 327 adet doku örneğinden hiçbirisi BDV antijen varlığı yönünden pozitif olarak tespit edilmedi (Çizelge 3.10., Çizelge 3.11).



Resim 3.2. Lökosit örnekleri için Direkt ELISA.

Çizelge 3.5. Koyun lökosit örneklerinin Direkt ELISA sonuçları (1.örnekleme).

1.örnekleme	1.İşletme	2.İşletme	3.İşletme	4.İşletme	5.İşletme	Toplam
BDV (Ag) +	1	5	-	2	3	**11**
BDV (Ag) -	199	195	200	198	197	**989**
Toplam	**200**	**200**	**200**	**200**	**200**	**1000**

Çizelge 3.6. Koyun lökosit örneklerinin Direkt ELISA sonuçları (2.örnekleme).

2.örnekleme	1.İşletme	2.İşletme	3.İşletme	4.İşletme	5.İşletme	Toplam
BDV (Ag) +	-	2	-	-	1	**3**
BDV (Ag) -	7	17	8	14	11	**57**
Toplam	**7**	**19**	**8**	**14**	**12**	**60**

Çizelge 3.7. Kuzu lökosit örneklerinin Direkt ELISA sonuçları.

1.örnekleme	1.İşletme	2.İşletme	3.İşletme	4.İşletme	5.İşletme	Toplam
BDV (Ag) +	-	-	-	-	-	**0**
BDV (Ag) -	100	100	100	100	100	**500**
Toplam	**100**	**100**	**100**	**100**	**100**	**500**

Çizelge 3.8. Koç lökosit örneklerinin Direkt ELISA sonuçları.

1.örnekleme	1.İşletme	2.İşletme	3.İşletme	4.İşletme	5.İşletme	Toplam
BDV (Ag) +	-	-	-	-	-	**0**
BDV (Ag) -	10	10	10	10	10	**50**
Toplam	**10**	**10**	**10**	**10**	**10**	**50**

Çizelge 3.9. Svap örneklerinin Direkt ELISA sonuçları.

	1.İşletme	2.İşletme	3.İşletme	4.İşletme	5.İşletme	Toplam
BDV (Ag) +	-	-	-	-	-	**0**
BDV (Ag) -	10	10	10	10	10	**50**
Toplam	**10**	**10**	**10**	**10**	**10**	**50**

Çizelge 3.10. Doku örneklerinin Direkt ELISA sonuçları.

	1.İşletme	2.İşletme	3.İşletme	4.İşletme	5.İşletme	Toplam
BDV (Ag) +	-	-	-	-	-	**0**
BDV (Ag) -	88	73	48	90	28	**327**
Toplam	**88**	**73**	**48**	**90**	**28**	**327**

Çizelge 3.11. Direkt ELISA toplu sonuçları (lökosit, svap, doku).

	1.İşletme	2.İşletme	3.İşletme	4.İşletme	5.İşletme	Toplam
BDV (Ag) +	1	7	0	2	4	**14**
BDV (Ag) -	414	405	376	422	356	**1973**
Toplam	**415**	**412**	**376**	**424**	**360**	**1987**

3.2.2. Direkt İmmunperoksidaz Sonuçları

Direkt İmmunperoksidaz testinde kullanılan MDBK hücre kontrol, cp NADL ve ncp virus kontrol gözleri doku kültürü mikroskobu altında incelenmiş olup elde edilen görüntüler Resim 3.3., Resim 3.4. ve Resim 3.5.'de verilmiştir.

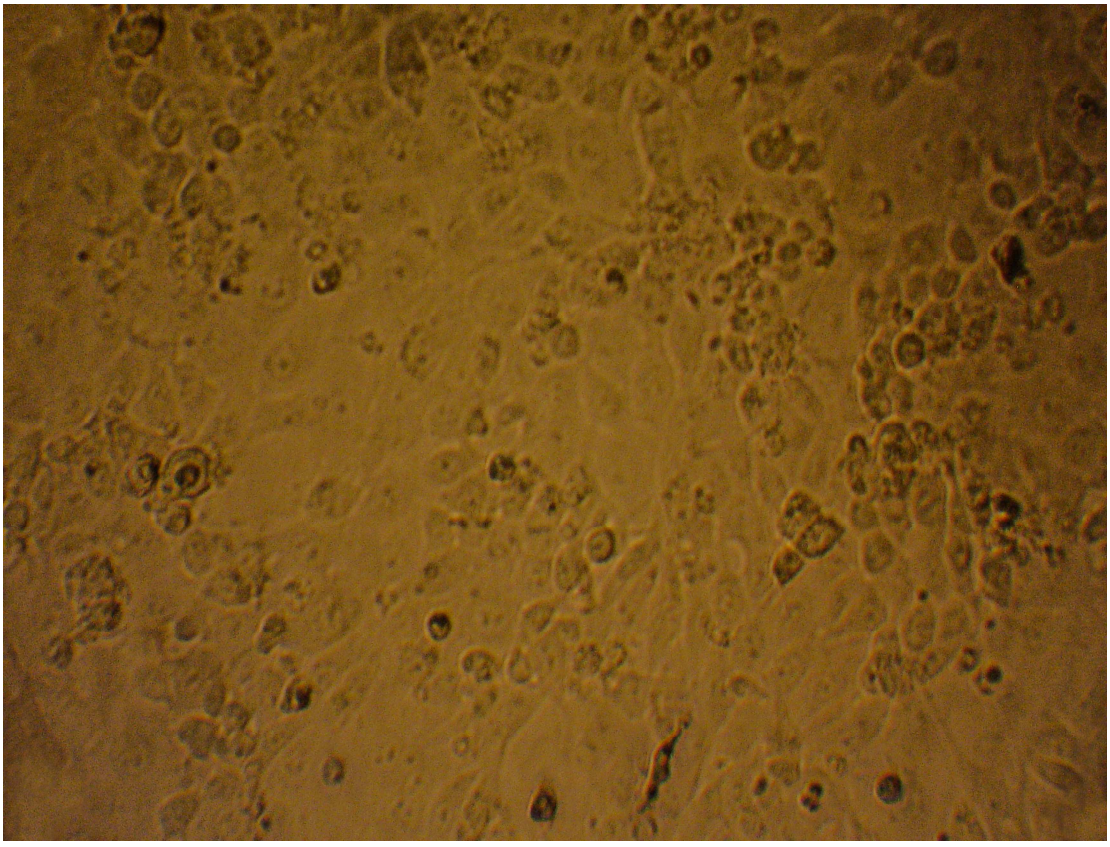
Direkt immunperoksidaz ile incelenen 1011 adet koyun lökosit örneklerinden 14 adedi (%1.38) BDV antijen varlığı yönünden pozitif olarak tespit edildi (Resim 3.6., Resim 3.7., Çizelge 3.12).

İncelenen 500 adet kuzu lökosit örneklerinin hiçbirisinde BDV antijen varlığı tespit edilmedi (Çizelge 3.13).

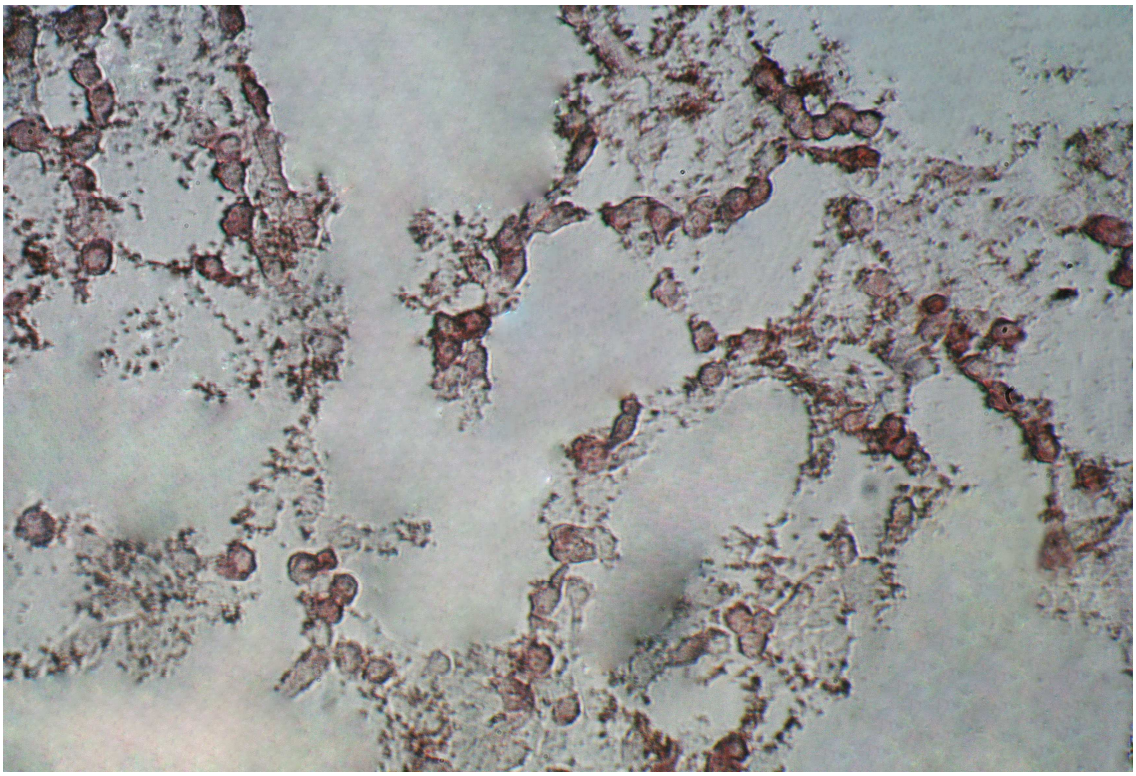
İncelenen 50 adet koç lökosit örneğinden hiçbirisinde BDV antijen varlığı tespit edilmedi (Çizelge 3.14).

İncelenen 50 adet vaginal svap örneğinden hiçbirisi BDV antijen varlığı yönünden pozitif olarak tespit edilmedi (Çizelge 3.15).

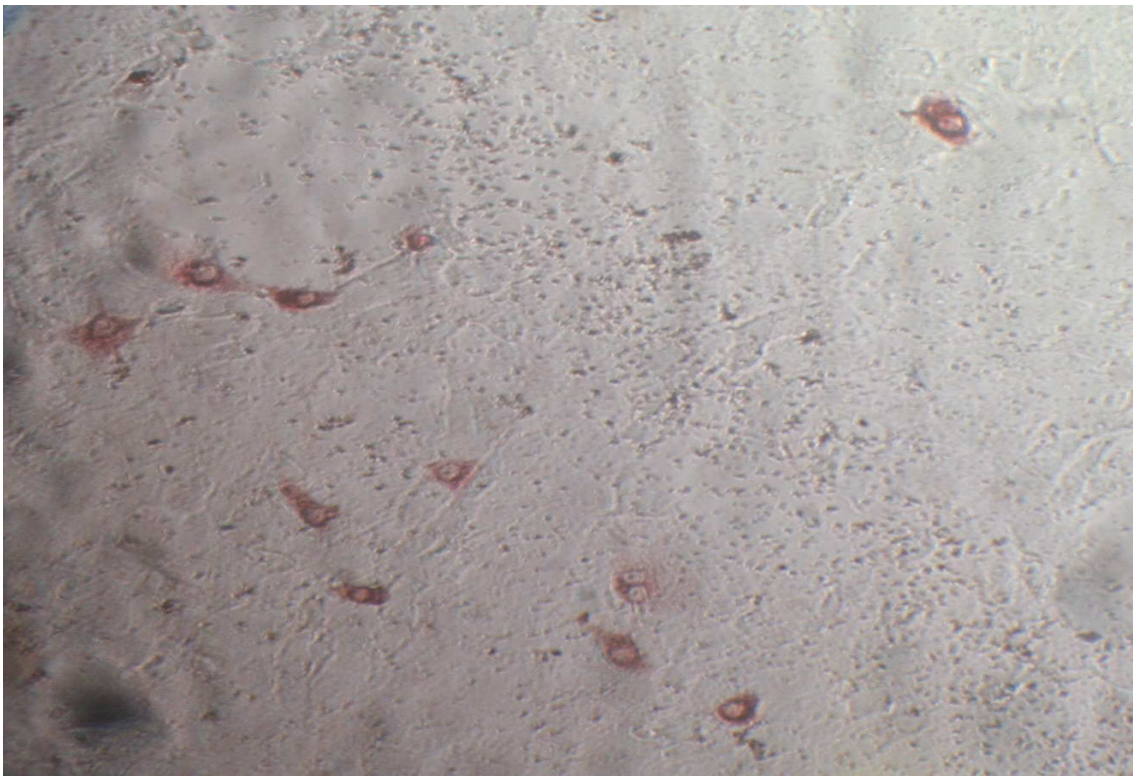
İncelenen 327 adet doku örneğinin 11 adedi (%3.36) BDV antijen varlığı yönünden pozitif olarak tespit edildi (Resim 3.8., Çizelge 3.16., Çizelge 3.17).



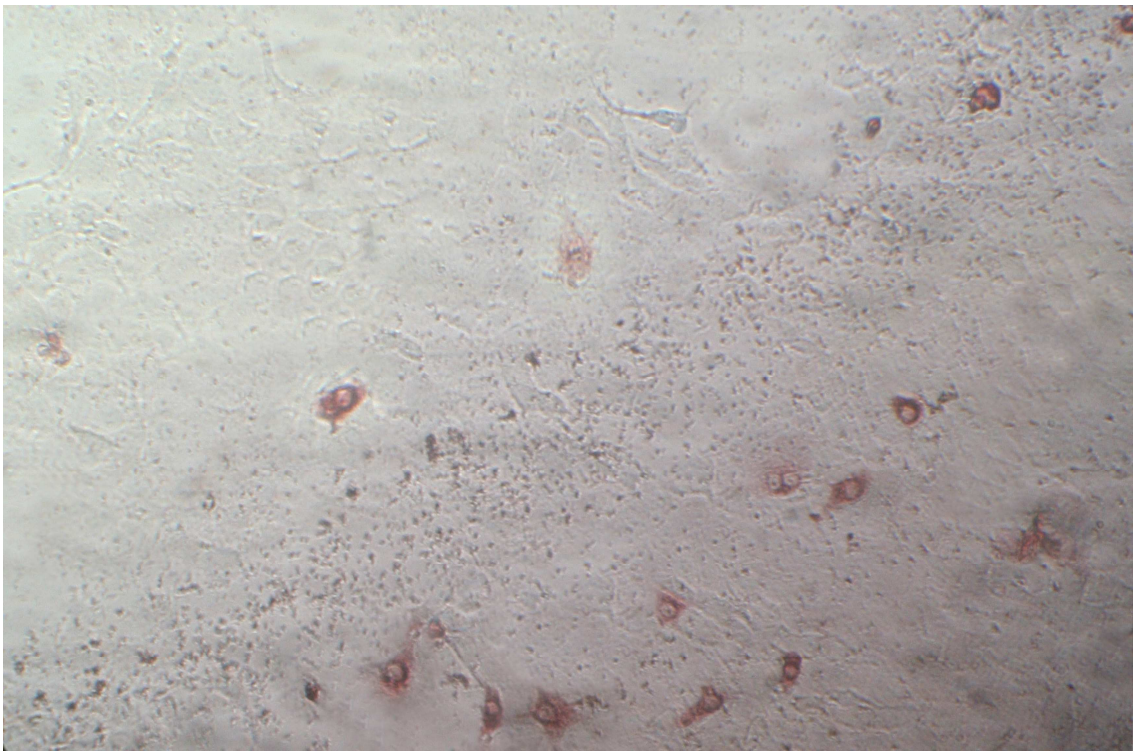
Resim 3.3. Direkt İmmunperoksidaz testi Hücre Kontrol (x 200).



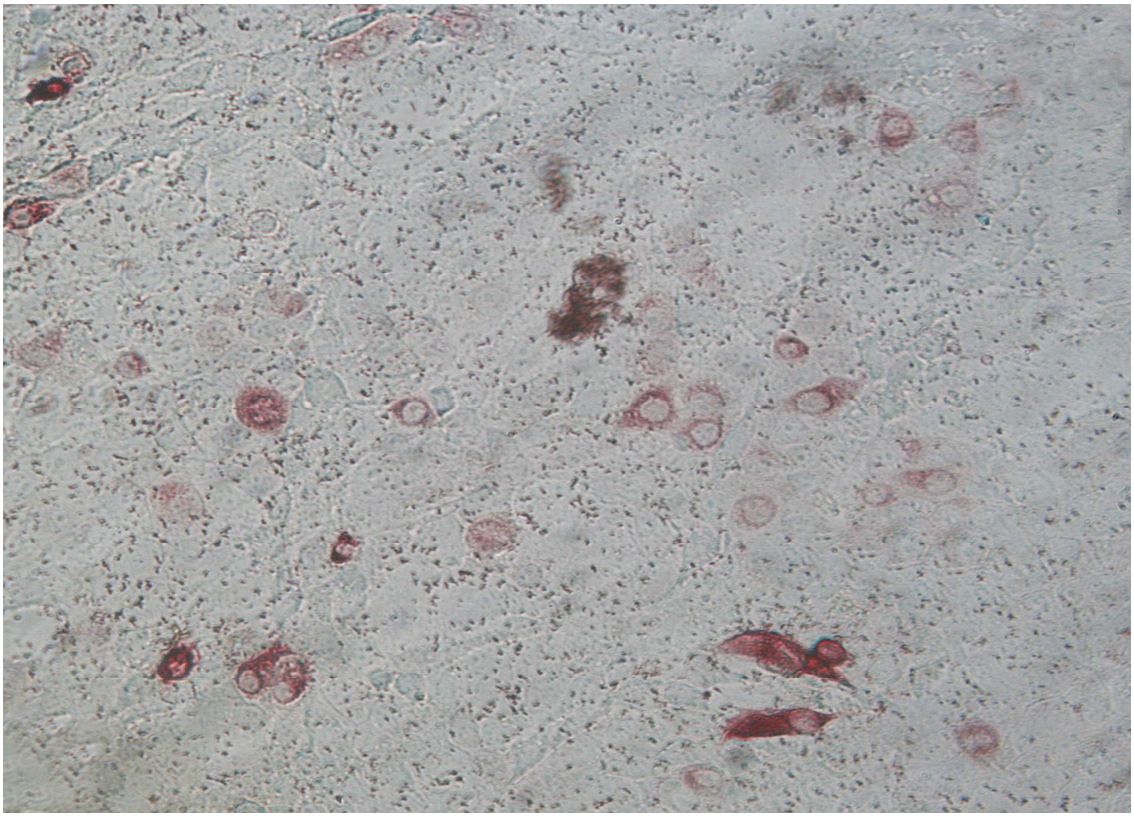
Resim 3.4. Direkt İmmunperoksidaz testi Virus Kontrol (cp NADL suşu) (x 200).



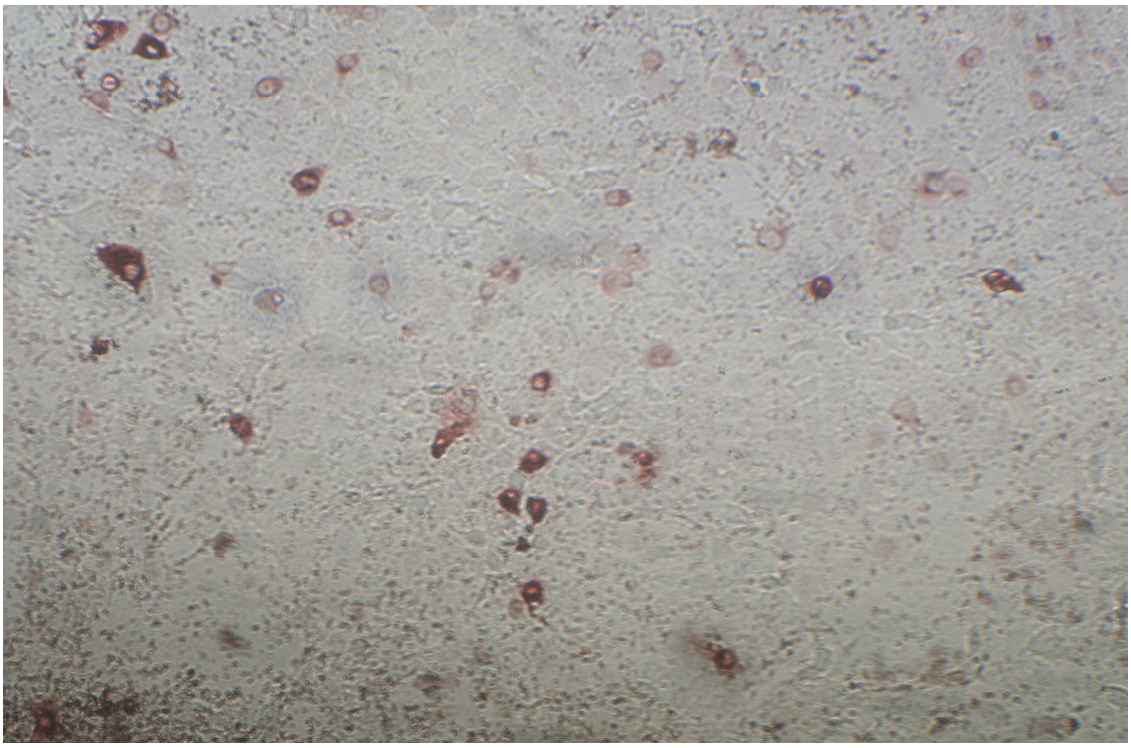
Resim 3.5. Direkt İmmunperoksidaz testi Virus Kontrol (ncp BVDV) (x 200).



Resim 3.6. Direkt İmmunperoksidaz testi Border Disease Virus antijen varlığı yönünden pozitif örnek (351 nolu örnek, Lökosit) (x 200).



Resim 3.7. Direkt İmmunperoksidaz testi Border Disease Virus antijen varlığı yönünden pozitif örnek (828 nolu örnek, Lökosit) (x 200).



Resim 3.8. Direkt İmmunperoksidaz testi Border Disease Virus antijen varlığı yönünden pozitif örnek (Fötus 6, Karaciğer) (x 200).

Çizelge 3.12. Koyun lökosit örneklerinin İmmunperoksidaz sonuçları (1.örnekleme+2.örnekleme).

	1.İşletme	2.İşletme	3.İşletme	4.İşletme	5.İşletme	Toplam
BDV (Ag) +	1	7	0	2	4	**14**
BDV (Ag) -	200	198	200	200	199	**997**
Toplam	**201**	**205**	**200**	**202**	**203**	**1011**

Çizelge 3.13. Kuzu lökosit örneklerinin İmmunperoksidaz sonuçları.

	1.İşletme	2.İşletme	3.İşletme	4.İşletme	5.İşletme	Toplam
BDV (Ag) +	-	-	-	-	-	**0**
BDV (Ag) -	100	100	100	100	100	**500**
Toplam	**100**	**100**	**100**	**100**	**100**	**500**

Çizelge 3.14. Koç lökosit örneklerinin İmmunperoksidaz sonuçları.

	1.İşletme	2.İşletme	3.İşletme	4.İşletme	5.İşletme	Toplam
BDV (Ag) +	-	-	-	-	-	**0**
BDV (Ag) -	10	10	10	10	10	**50**
Toplam	**10**	**10**	**10**	**10**	**10**	**50**

Çizelge 3.15. Svap örneklerinin İmmunperoksidaz sonuçları.

	1.İşletme	2.İşletme	3.İşletme	4.İşletme	5.İşletme	Toplam
BDV (Ag) +	-	-	-	-	-	**0**
BDV (Ag) -	10	10	10	10	10	**50**
Toplam	**10**	**10**	**10**	**10**	**10**	**50**

Çizelge 3.16. Doku örneklerinin İmmunperoksidaz sonuçları.

	1.İşletme	2.İşletme	3.İşletme	4.İşletme	5.İşletme	Toplam
BDV (Ag) +	2	6	-	-	3	**11**
BDV (Ag) -	86	67	48	90	25	**316**
Toplam	**88**	**73**	**48**	**90**	**28**	**327**

Çizelge 3.17. İmmunperoksidaz toplu sonuçları (lökosit, svap, doku).

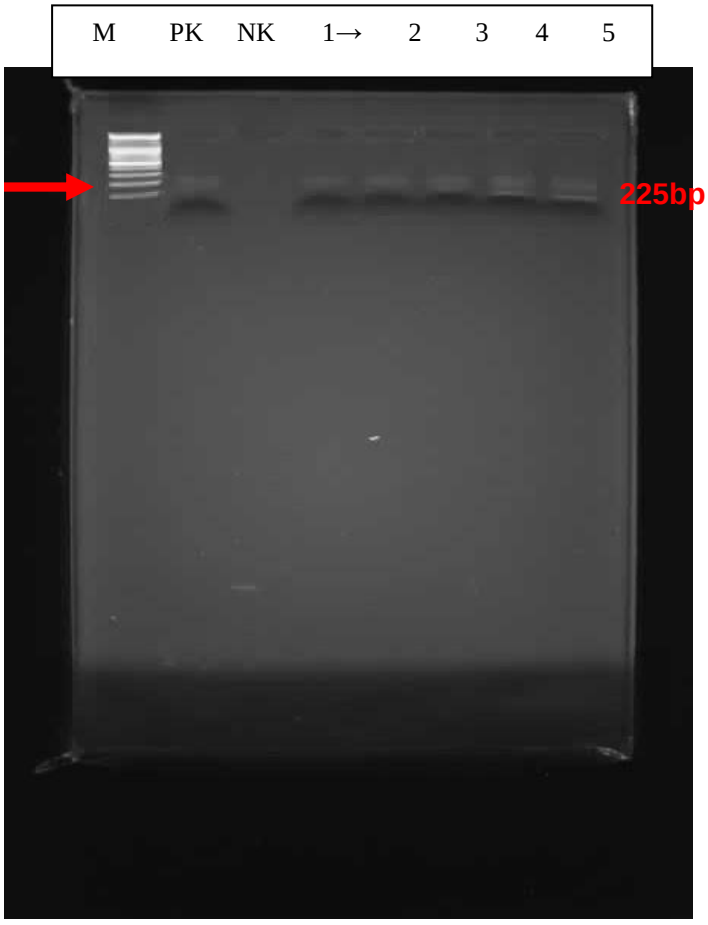
	1.İşletme	2.İşletme	3.İşletme	4.İşletme	5.İşletme	Toplam
BDV (Ag) +	3	13	-	2	7	**25**
BDV (Ag) -	406	385	368	410	344	**1913**
Toplam	**409**	**398**	**368**	**412**	**351**	**1938**

3.2.3. Lökosit Örnekleri One Step RT-PCR Sonuçları

One Step RT-PCR ile incelenen 63 adet koyun lökosit örneklerinden 14 adedi (%22.2) BD viral genom varlığı yönünden pozitif olarak tespit edilirken 49 adedi (%77.7) ise negatif bulundu (Çizelge 3.18., Resim 3.8).

Çizelge 3.18. Koyun lökosit örneklerinin One Step RT-PCR sonuçları

	1.İşletme	**2.İşletme**	**3.İşletme**	**4.İşletme**	**5.İşletme**	**Toplam**
BDV (Viral genom) +	1	7	-	2	4	**14**
BDV (Viral genom) -	6	15	8	12	8	**49**
Toplam	**7**	**22**	**8**	**14**	**12**	**63**



Resim 3.9. Lökosit örnekleri One Step RT-PCR sonuçları.

M: Marker, PK: Pozitif Kontrol, NK: Negatif Kontrol

1: 215 nolu örnek (2.İşletme), 4: 761 nolu örnek (4.İşletme)

2: 351 nolu örnek (2.İşletme), 5: 828 nolu örnek (5.İşletme)

3: 352 nolu örnek (2.İşletme),

3.2.4. Svap Örnekleri One Step RT-PCR Sonuçları

One Step RT-PCR ile incelenen 50 adet vaginal svap örneklerinden hiçbirisi BD viral genom varlığı yönünden pozitif olarak tespit edilmedi (Çizelge 3.19).

Çizelge 3.19. Svap örneklerinin One Step RT-PCR sonuçları.

	1.İşletme	2.İşletme	3.İşletme	4.İşletme	5.İşletme	Toplam
BDV (Viral genom) +	-	-	-	-	-	-
BDV (Viral genom) -	10	10	10	10	10	**50**
Toplam	**10**	**10**	**10**	**10**	**10**	**50**

3.2.5. Doku Örnekleri One Step RT-PCR Sonuçları

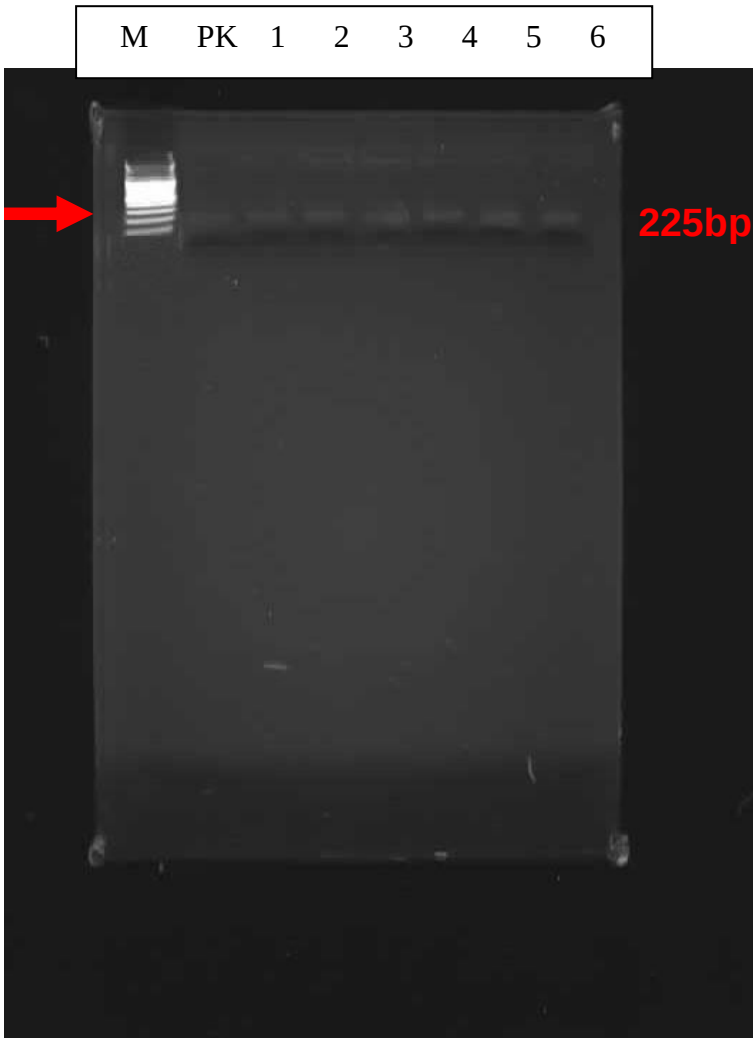
One Step RT-PCR ile incelenen 327 adet doku örneklerinden 11 adedi (%3.36) BD viral genom varlığı yönünden pozitif olarak tespit edilirken 316 adedi (%96.63) ise negatif bulundu (Çizelge 3.20., Çizelge 3.23., Resim 3.9). İmmunperoksidaz pozitif örneklerin işletmelere göre dağılımı Çizelge 3.22'de belirtilmiştir. Çizelge 3.21'de ise One Step RT-PCR testine ait toplu sonuçlar verilmiştir.

Çizelge 3.20. Doku örneklerinin One Step RT-PCR sonuçları.

	1.İşletme	2.İşletme	3.İşletme	4.İşletme	5.İşletme	Toplam
BDV (Viral genom) +	2	6	-	-	3	**11**
BDV (Viral genom) -	86	67	48	90	25	**316**
Toplam	**88**	**73**	**48**	**90**	**28**	**327**

Çizelge 3.21. One Step RT-PCR sonuçları toplam (lökosit, svap, doku).

	1.İşletme	2.İşletme	3.İşletme	4.İşletme	5.İşletme	Toplam
BDV (Viral genom) +	3	13	-	2	7	**25**
BDV (Viral genom) -	102	92	66	112	43	**415**
Toplam	**105**	**105**	**66**	**114**	**50**	**440**



Resim 3.10. Doku örnekleri One Step RT-PCR sonuçları.

M: Marker

PK: Pozitif Kontrol

1: Fötus 2, Karaciğer (2. İşletme)

2: Fötus 2, Akciğer (2. İşletme)

3: Fötus 6, Beyin (2. İşletme)

4: Fötus 6, Dalak (2. İşletme)

5: Fötus 6, Akciğer (2. İşletme)

6: Fötus 6, Karaciğer (2. İşletme)

	Karaciğer			Akciğer		Kalp		Dalak		Beyin		Böbrek		İnce bağırsak		Beyincik		Timus		Lenf		Tiroid	
	+	-	Toplam	+	Toplam	+	Toplam	+	Toplam	+	Toplam	+	Toplam	+	Toplam	+	Toplam	+	Toplam	+	Toplam	+	Toplam
1.İşletme	1	18		1	15	-	15	-	15	-	10	-	6	-	4	-	1	-	1	-	2	-	1
2.İşletme	1	14		1	14	1	14	1	14	1	8	1	6	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-
3.İşletme	-	11		-	7	-	10	-	4	-	3	-	8	-		-	2	-	1	-	1	-	1
4.İşletme	-	17		-	15	-	15	-	15	-	10	-	7	-	5	-	2	-	2	-	1	-	1
5.İşletme	2	10		-	8	-	1	-	-	1	1	-	6	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-
Toplam	**4**	**70**		**2**	**59**	**1**	**55**	**1**	**48**	**2**	**32**	**1**	**33**	**0**	**14**	**0**	**5**	**0**	**4**	**0**	**4**	**0**	**3**

Çizelge 3.22. İmmunperoksidaz pozitif örneklerin işletmelere göre dağılımı.

Çizelge 3.23. İmmunperoksidaz pozitif örneklerin organlara göre dağılımı.

	Karaciğer	**Akciğer**	**Kalp**	**Dalak**	**Beyin**	**Böbrek**	**Toplam**
1.İşletme	1	1	-	-	-	-	**2**
2.İşletme	1	1	1	1	1	1	**6**
3.İşletme	-	-	-	-	-	-	**-**
4.İşletme	-	-	-	-	-	-	**-**
5.İşletme	2	-	-	-	1	-	**3**
Toplam	**4/70**	**2/59**	**1/55**	**1/48**	**2/32**	**1/33**	**11**

3.3. Testler Arası Sensitivite ve Spesifite Değerlerinin Hesaplanması

Araştırmada kullanılan testlerin sensitivite ve spesifite oranları Çizelge 3.24'de belirtilmiştir.

Çizelge 3.24. Testlerin sensitivite ve spesifitesi

		Direkt İmmunperoksidaz				
		+	-	Toplam	Sensitivite	Spesifite
Direkt ELISA	+	12	-	12		
	-	2	986	988	%100	%98.8
Toplam		14	986	1000		

		One Step RT-PCR				
		+	-	Toplam	Sensitivite	Spesifite
Direkt ELISA	+	11	3	14		
	-	3	983	986	% 78.57	% 98.6
Toplam		14	986	1000		

		Direkt İmmunperoksidaz				
		+	-	Toplam	Sensitivite	Spesifite
One Step RT-PCR	+	25	-	25		
	-		975	975	%100	%97.5
Toplam		25	975	1000		

3.4. Testlerin İstatistiksel Analizleri

İndirekt ELISA ile koyunlardan (serum) elde edilen sonuçlar Ki kare testi (Minitab 12.1 version) ile incelendi. Buna göre işletmeler arasında koyunlardaki BDV enfeksiyonunun serolojik olarak varlığı yönünden istatistiki açıdan herhangi bir fark tespit edilmedi (Çizelge 3.1) (P-Value:0.785; P >0.05).

İndirekt ELISA ile incelenen kuzulardan (serum) elde edilen sonuçlar Ki kare testi ile incelendi. Buna göre işletmeler arasında kuzulardaki BDV enfeksiyonunun serolojik olarak varlığı yönünden istatistiki açıdan herhangi bir fark tespit edilmedi (Çizelge 3.2) (P-Value:0.546; P>0.05).

İndirekt ELISA ile koçlardan (serum) elde edilen sonuçlara göre pozitif örnek tespit edilmeyen işletmeler olduğu için istatistiksel olarak herhangi bir karşılaştırma yapılamamıştır (Çizelge 3.3).

İndirekt ELISA ile incelenen koyun (serum) ve kuzulardan (serum) elde edilen sonuçlar toplu olarak işletmeler arasında fark olup olmadığının tespiti amacı ile Ki kare testi ile incelendi. Buna göre işletmeler arasında BDV enfeksiyonunun serolojik olarak varlığı yönünden istatistiki açıdan herhangi bir fark tespit edilmedi (Çizelge 3.4) (P-Value:0.752; P>0.05).

Direkt ELISA (kuzu lökosit, koç lökosit, koyun svap ve doku örnekleri) ile elde edilen sonuçlara göre hiçbir işletmede pozitif örnek tespit edilmediği için istatistiksel olarak herhangi bir karşılaştırma yapılamamıştır (Çizelge 3.7., Çizelge 3.8., Çizelge 3.9., Çizelge 3.10).

Direkt ELISA ile incelenen koyunlardan (lökosit) elde edilen sonuçlar toplu olarak işletmeler arasında fark olup olmadığının tespiti amacı ile Ki kare testi ile incelendi. Buna göre işletmeler arasında BDV antijen varlığı yönünden istatistiki açıdan herhangi bir fark tespit edilmedi (Çizelge 3.11) (P-Value:0.112; P>0.05).

İmmunperoksidaz ile (kuzu lökosit, koç lökosit, koyun svap örnekleri) ile elde edilen sonuçlara göre hiçbir işletmede pozitif örnek tespit edilmediği için istatistiksel olarak herhangi bir karşılaştırma yapılamamıştır (Çizelge 3.13., Çizelge 3.14., Çizelge 3.15).

İmmunperoksidaz ile incelenen koyunlardan (lökosit) elde elde edilen sonuçlar Ki kare testi ile incelendi. Buna göre işletmeler arasında koyunlardaki BDV'nin varlığı yönünden istatistiki açıdan herhangi bir fark tespit edilmedi (Çizelge 3.12) (P-Value:0.112; P>0.05).

İmmunperoksidaz ile incelenen doku örneklerinden elde elde edilen sonuçlar Ki kare testi ile incelendi. Buna göre işletmeler arasında dokulardaki BDV'nin varlığı yönünden istatistiki açıdan herhangi bir fark tespit edilmedi (Çizelge 3.16) (P-Value:0.307; P>0.05).

İmmunperoksidaz ile incelenen koyunlardan (lökosit) ve doku örneklerinden elde edilen sonuçlar toplu olarak işletmeler arasında fark olup olmadığının tespiti amacı ile Ki kare testi ile incelendi. Buna göre işletmeler arasında lökosit veya dokulardaki BDV'nin varlığı yönünden istatistiki açıdan fark tespit edildi (Çizelge 3.17., Çizelge 3.25) (P-Value:0.008; P<0.05).

Çizelge 3.25. İmmunperoksidaz sonuçları.

	n	**BDV varlığı yönünden pozitif hayvan sayısı**
1.İşletme	**409**	**3[b]**
2.İşletme	**398**	**13[a]**
3.İşletme	**368**	**-[c]**
4.İşletme	**412**	**2[b]**
5.İşletme	**351**	**7[ab]**

[a,b]: aynı sütunda farklı harf taşıyan değerler arasındaki fark istatistiki açıdan önemlidir (P<0.05)
n: Hayvan sayısı

One Step RT-PCR ile incelenen svap örneklerinden elde edilen sonuçlara göre hiçbir işletmede pozitif örnek tespit edilmediği için istatistiksel olarak herhangi bir karşılaştırma yapılamamıştır (Çizelge 3.19).

One Step RT-PCR ile incelenen koyunlardan (lökosit) elde elde edilen sonuçlar Ki kare testi ile incelendi. Buna göre işletmeler arasında koyunlardaki BD viral genom varlığı yönünden istatistiki açıdan herhangi bir fark tespit edilmedi (Çizelge 3.18) (P-Value:0.112; P>0.05).

One Step RT-PCR ile incelenen doku örneklerinden elde elde edilen sonuçlar Ki kare testi ile incelendi. Buna göre işletmeler arasında dokulardaki BD viral genom varlığı yönünden istatistiki açıdan herhangi bir fark tespit edilmedi (Çizelge 3.20) (P-Value:0.307; P>0.05).

One Step RT-PCR ile incelenen koyunlardan (lökosit) ve doku örneklerinden elde edilen sonuçlar toplu olarak işletmeler arasında fark olup olmadığının tespiti amacı ile Ki kare testi ile incelendi. Buna göre işletmeler arasında BD viral genom varlığı yönünden istatistiki açıdan fark olduğu tespit edildi (Çizelge 3.21., Çizelge 3.26) (P-Value:0.008; P<0.05).

Çizelge 3.26. İşletmelerden elde edilen One Step RT-PCR sonuçları.

	n	**BDV Viral genom varlığı yönünden pozitif hayvan sayısı**
1.İşletme	**409**	**3[b]**
2.İşletme	**398**	**13[a]**
3.İşletme	**368**	**-[c]**
4.İşletme	**412**	**2[b]**
5.İşletme	**351**	**7[ab]**

[a,b]: aynı sütunda farklı harf taşıyan değerler arasındaki fark istatistiki açıdan önemlidir (P<0.05)
n: Hayvan sayısı

Araştırmada kullanılan örneklere ait test sonuçları elde edilen pozitiflik veya negatiflik değerlerine göre (Direkt ELISA, IP ve One Step RT-PCR) karşılaştırmalı olarak istatistiki açıdan incelendi. Testler arasında farklılığı belirlemek için Ki kare testi kullanıldı. Her üç test arasında istatistiki açıdan bir fark tespit edilmedi (P-Value:0.142; P>0.05).

Araştırmada kullanılan örneklere ait test sonuçları elde edilen % oranlarına göre karşılaştırmalı olarak istatistiki açıdan incelendi. Testler arasında farklılığı belirlemek için 'Two proportions' testi kullanıldı. Testler arasında istatistiki açıdan fark olduğu tespit edildi. Direkt ELISA ile One Step RT-PCR arasında (P-Value:0.000 P<0.05), IP ile One Step RT-PCR arasında (P-Value:0.000 P<0.05) istatistiki açıdan fark tespit edilirken, Direkt ELISA ile IP arasında istatistiki açıdan fark tespit edilmedi (P-Value:0.076; P>0.05).

Organlarda BDV'nin tespit edilme oranı arasında fark olup olmadığı Ki kare testi ile istatistiki açıdan incelendi. Border Disease Virus'unun organlardaki dağılımının istatistiki açıdan farklı olmadığı belirlendi (P-Value:0.142; P>0.05).

4. TARTIŞMA

Sığır, domuz ve koyun populasyonlarında enfeksiyon meydana getiren bütün Pestivirus'ların tüm dünyada ekonomik kayıplara neden oldukları bilinmektedir (Sweasey ve ark 1979, Bennett ve Done 1986, Duffell ve ark 1986, Sharp ve Rawson 1986, Baker 1987, Bonniwell ve ark 1987, Brownlie ve ark 1987, Harkness 1987, Moennig 1990, Moennig ve Plagemann 1992, Houe ve ark 1993, Heckert ve ark 1994, Paton 1995, Nettleton ve Entrican 1995, Alves ve ark 1996, Sockett ve ark 1996, Taylor ve ark 1997, Carman ve ark 1998, Houe 1999, Hurdato ve ark 2003, Vilcek ve Nettleton 2006, Kale ve ark 2006, 2007, Krametter-Froetscher ve ark 2007).

Border Disease Virus enfeksiyonunun teşhisinde direkt IF (Anderson ve ark 1987a), IP (Ward ve Kaeberle 1984), antijen tespiti için ELISA (Entrican ve ark 1995) ve RT-PCR (Marco ve ark 2007, Jacobson 2008) kullanılabilmektedir. Ancak testlerin spesifite ve sensitivite değerleri göz önünde tutulduğunda, BDV ile ilgili çalışmalarda ELISA'nın tek başına kullanılmaması gerektiği, örneklerin mutlaka IP veya RT-PCR testlerinden birisi ile incelenmesi tavsiye edilmektedir (Krametter-Froetscher ve ark 2008, Rasmussen ve ark 2008).

Ülkemizde koyunların Pestivirus enfeksiyonları ile ilgili bugüne kadar yapılan çalışmalar enfeksiyonun neden olduğu ekonomik kayıplardan daha çok serolojik ve virolojik kapsamlı gerçekleştirilmiştir.

Burgu ve ark (1987) yapmış oldukları çalışmada abort yapan 541 adet koyunun 232 adedinde (%42.8) pestivirus antikoru tespit ettiklerini bildirmişlerdir.

Şimşek ve ark (1997) Konya bölgesindeki klinik olarak sağlıklı 440 adet koyundan topladıkları kan örneklerini BVDV'ye karşı oluşan antikorlar yönünden virus nötralizasyon testi ile incelemişler ve 160 adedini (%36.3) seropozitif tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Bu çalışmada koyunlarda %79'luk seropozitiflik elde edilmiştir. Bu oranın yüksek olmasının nedeni BDV enfeksiyonu yönünden şüpheli olan sürülerden örnekleme yapılmış olmasına bağlıyoruz.

Çokçalışkan (2000) yapmış olduğu bir araştırmada 65 adet fötusdan elde edilen kan serumlarının hiçbirisinde BVDV'ye spesifik antikor tespit edilemediğini ancak 75 adet anneye ait kan serumlarının 31 adedinde (%41.33) değişik titrelerde seropozitiflik tespit edildiğini ifade etmiştir. Araştırmacı (Çokçalışkan 2000), annelere ait 91 adet lökosit, 73 adet serum, 106 amniyon sıvısı, 62 adet kotiledon, fötuslara ait 68 adet lökosit, 53 adet serum ve toplam 131 adet organ numunesini hücre kültürlerinde 3 kez kör pasajını gerçekleştirmiş ve bu pasajlar sonucunda herhangi bir cp bulgusuna rastlamadığını bildirmiştir. Ancak örneklerin direkt IP testi ile incelenmesi sonucunda 1 adet fötusa ait lökosit örneğinde Pestivirus tespit edildiğini rapor eden araştırmacı izole ettiği bu virusu immunplak testi ile incelemiş ve ncp karakterde olduğunu kaydetmiştir. Araştırmacı (Çokçalışkan 2000), Pestivirus antijen varlığı yönünden pozitif olduğunu tespit ettiği fötusun diğer organlarından da (karaciğer, akciğer, bağırsak, böbrek, beyin) virus izolasyonu gerçekleştirdiğini ifade etmiştir. 327 adet doku örneği kullanılan bu çalışmada 4 adet fötusa ait toplam 11 adet dokuda (karaciğer 4 adet, akciğer 2 adet, kalp 1 adet, dalak 1 adet, beyin 2 adet, böbrek 1 adet) virus izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Çokçalışkan (2000) yapmış olduğu çalışmada bağırsakta BDV'yi tespit ettiğini bildirmesine rağmen, bu çalışmada 14 adet ince bağırsak örneği incelenmiş ancak herhangi bir pozitiflik tespit edilememiştir. Yine timus (4 adet), lenf (4 adet), tiroid (3 adet) incelenmiş olup bu dokularda da BDV'ye rastlanmamıştır. Bu çalışmada dokulardan elde edilen sonuçlar ışığında istatistiki bir değerlendirme yapıldı. Buna göre BDV'nin tespit edilmesine yönelik dokular arasında istatistiki açıdan herhangi bir fark bulunmamaktadır. Border Disease Virus'unun patogenezine yönelik yapılacak spesifik çalışmalar sayesinde virusun en çok tespit edilebildiği dokuların ortaya konulabileceği düşünülmektedir.

Burgu ve ark (2001) koyunlarda Pestivirus enfeksiyonlarının sonuçları ve patogenezini araştırmak amacı ile yapmış oldukları çalışmada toplam 1634 adet kan örneğini Pestivirus yönünden peroksidaz bağlı antikor testi, immunplak testi ve mikronötralizasyon testi ile incelemişlerdir. Araştırmacılar 1634 adet lökosit örneğinin peroksidaz bağlı antikor testi ile incelenmesi sonucunda 1 adet örnekte Pestivirus varlığı tespit ettiklerini ifade etmişler, bu örneğin immunplak testi ile yapılan biyotip analizi sonucunda sitopatojen olmayan Pestivirus olduğunu bildirmişlerdir. Koçların örneklendiği işletmelerin bir tanesinde %20 diğerinde

ise %30 oranında seropozitivite tespit ettiklerini bildiren araştırmacılar (Burgu ve ark 2001) ayrıca gebeliğin 2–3. aylarında örnekledikleri 174 adet koyundan 44 adedini (%25), doğum anında örneklenen 661 koyundan 142 adedini (%21.5) Pestivirus antikor varlığı yönünden pozitif olduğunu rapor etmişlerdir. Bu çalışmada BDV'ye karşı oluşan antikorlar yönünden incelenen 50 adet koç örneğinin 3 adedi (%6) seropozitif olarak tespit edilmiştir. Bu oran Burgu ve ark (2001)'nın bulguları ile karşılaştırıldığında daha düşük bulunmuştur. Bunun nedenini işletmelerde uygulanan rastgele örnekleme metoduna bağlayabiliriz. Ayrıca bu veri (%6) çalışmanın yapılmış olduğu Konya ve çevresinde koçların Pestivirus enfeksiyonu ile ilgili ilk veridir. Bundan sonra yapılacak çalışmalar için ışık tutması beklenmektedir.

Ataseven ve ark (2006) Van ve Siirt'den elde ettikleri toplam 275 adet keçi serumunu *Caprine arthritis encephalitis virus*, *Brucella spp*., *Toxoplasma gondii*, BVDV ve BDV'ye karşı oluşan antikorlar yönünden incelemişlerdir. Araştırmacılar yaptıkları çalışmada en yüksek seropozitiviteyi *Toxoplasma gondii* (%72.7) için belirlerken, BDV enfeksiyonuna karşı seroprevalansı ise %63.6 oranında bulduklarını ifade etmişlerdir. Araştırmacılar örnekleme yaptıkları hayvanların Pestivirus yönünden aşılanmadığı için bu seroprevalansın doğal enfeksiyon sonucu geliştiğini belirtmişlerdir. Ancak araştırmacılar inceledikleri keçi örneklerinden hiçbirisinde Pestivirus antijen varlığı tespit edemediklerini bildirmişlerdir (Ataseven ve ark 2006). Bu çalışmada ise keçilerden örnekleme yapılmadığı için bu yönde bir karşılaştırma yapılamamıştır.

Okur-Gumusova ve ark (2006) Türkiye'nin 11 ilinden topladıkları 2444 koyun kan örneğini Pestivirus'a karşı oluşan antikor varlığı yönünden mikronötralizasyon testi ile incelemişlerdir. Ordu ve Rize'den elde edilen örneklerde Pestivirus'a karşı herhangi bir antikor tespit edemediklerini ifade eden araştırmacılar, Sinop'da %1.04, Amasya'da %2.30, Samsun'da %3.0, Trabzon'da %4.76, Giresun'da %15.43, Sivas'da %18.08, Kayseri'de %32.26, Tokat'da %50.64, Erzurum'da ise %52.63 oranında seropozitiflik belirlemişlerdir (Okur-Gumusova ve ark 2006). Araştırmacılar (Okur -Gumusova ve ark 2006), Erzurum'da belirledikleri %52.63'lük seropozitivite oranını diğer illerle karşılaştırmış ve aradaki farkı istatistiki açıdan önemli bulduklarını kaydetmişlerdir. Bu çalışmada elde edilen %79'luk seropozitivite oranı hem Ataseven ve ark (2006) hem de Okur-

Gumusova ve ark (2006) tarafından elde edilen değerler ile karşılaştırılmış ve her ikisinden de yüksek olduğu görülmüştür. Örnekleme yapılan işletmelerin önceki yıllarda BDV enfeksiyonu yönünden şüpheli olmaları nedeniyle bu işletmelerin seçilmiş olması böyle bir farkın oluşabileceği ihtimalini akla getirmektedir.

Oğuzoğlu ve ark (2009) yapmış oldukları çalışmada Aydın'dan 173 adet (64 koyun, 109 keçi) Burdur'dan 124 adet (82 koyun, 42 keçi) kan serumu örneğini BDV'ye karşı oluşan antikor varlığı yönünden indirekt ELISA ile, lökosit örneklerini ise BDV antijen varlığı yönünden antijen capture ELISA ile incelemişlerdir. Araştırmacılar (Oğuzoğlu ve ark 2009) 3 adet koyun (3/146) ve 3 adet keçi (3/151) lökosit örneğini (6/297) Pestivirus antijen varlığı yönünden pozitif tespit etmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar ELISA ile BDV antijen varlığı yönünden pozitif tespit edilen 6 örneği RT-PCR ile de pozitif bulduklarını bildirmişlerdir (Oğuzoğlu ve ark 2009). Bu çalışmada direkt ELISA ile BDV antijen varlığı yönünden pozitif tespit edilen 14 adet lökosit örneği One Step RT-PCR ile viral genom varlığı yönünden incelendi ve hepsi pozitif tespit edildi. Elde edilen sonuçlar Oğuzoğlu ve ark (2009)'nın bildirdiği bulgular ile benzerlik göstermektedir.

Yapılan araştırmalarda (Sweasey ve ark 1979, Sharp ve Rawson 1986, Nettleton 1990, Moennig ve Plagemann 1992, Nettleton ve ark 1998, Hurdato ve ark 2003, Arnal ve ark 2004, De Mia ve ark 2005, Thabti ve ark 2005, Valdazo-Gonzalez ve ark 2006, 2007) BDV enfeksiyonlarının koyun populasyonlarında önemli ekonomik kayıplara neden olduğu bildirilmiştir.

Border Disease Virus enfeksiyonunun endemik seyrettiği bölgelerde populasyondan elde edilmesi düşünülen toplam gelirde %20'lik kayıpların oluşabileceği bazı araştırmacılar tarafından ifade edilmektedir (Sweasey ve ark 1979, Sharp ve Rawson 1986).

Koyun ve sığırların bir arada yetiştirildiği çiftliklerde ruminant Pestivirus'larına karşı %60 ile %90 arasında seropozitifliğin tespit edildiği bildirilmiştir (Harkness ve ark 1978, Steck ve ark 1980). Bu çalışmada örnekleme yapılan çiftliklerde sığır yetiştiriciliği yapılmadığı için bu konuda herhangi bir karşılaştırma yapılamamıştır.

Koyunların Pestivirus enfeksiyonlarına yönelik olarak bu bölgede yapılan ilk virolojik çalışma olan bu araştırma sonucunda tespit edilen 3 adet persiste koyun hayvan sahipleri tarafından kesime sevk edilmiş ve böylece örnekleme yapılan çiftliklerde önümüzdeki yıllarda BDV enfeksiyonundan kaynaklanabilecek ekonomik kayıpların önüne geçildiği düşünülmektedir. Ayrıca damızlık olarak kullanılan toplam 50 adet koç da BDV antijen varlığı yönünden incelenmiş ve negatif tespit edilen bu hayvanların kullanılmalarına izin verilmiştir. Ayrıca bu çalışma bu bölgede damızlık olarak kullanılan koçların BDV enfeksiyonu yönünden incelendiği ilk çalışma olma özelliğindedir.

Proje kapsamında toplanan örnekler direkt ELISA, indirekt ELISA, One Step RT-PCR'nin yanında Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü (OIE 2008)'nün Pestivirus enfeksiyonların teşhisinde 'gold standart' olarak kabul ettiği immunperoksidaz testi ile de incelendi.

Border Disease Virus ile enfekte PI hayvanların hücresel immunitelerinin baskılandığı ve diğer bakteriyel enfeksiyonlara karşı (*Escherichia coli, Clostridium perfringens*) daha duyarlı hale geldikleri bildirilmiştir (Nettleton 1990, Hussin ve Woldehiwet 1994, Pratelli ve ark 1999, Loken 2000). Bu çalışmada toplanan örnekler sadece BDV enfeksiyonu yönünden incelenmiş olup herhangi bir bakteriyel enfeksiyon yönünden incelenmedi. Bu nedenle BDV enfeksiyonunun diğer bakteriyel enfeksiyonlara karşı hayvanları daha duyarlı hale getirip getirmediği konusunda herhangi bir yorum yapılamamıştır.

Sands ve Harkness (1978), İngiltere'de yapmış oldukları çalışmada Pestivirus'a karşı oluşan antikor varlığını %10.8 oranında tespit ederken sürülerdeki seroprevalansın %37.4 olduğunu bildirmişlerdir.

Elazhary ve ark (1984) Doğu Kanada'da koyun ve keçilerde yapmış oldukları çalışmada toplam 1074 adet kan serum örneğini BVDV'ye karşı oluşan antikor varlığı yönünden indirekt floresan antikor tekniği ile incelemişler ve %22.2 oranında seropozitiflik tespit ettiklerini rapor etmişlerdir.

Kirkbride ve Johnson (1989) abort olan koyun fötuslarında BDV'ye karşı oluşan antikor varlığını SNT ile araştırdıkları serolojik çalışmada 486 adet koyun fötusunun 80 adedini (%16.46) pozitif tespit ettiklerini bildirmişlerdir.

Heckert ve ark (1994) yapmış oldukları çalışmada Britanya Kolombiya'sı (1 çiftlik), Alberta (2 çiftlik) ve Ontario (12 çiftlik)'da bulunan çiftliklerde elde ettikleri toplam 540 adet koyun kan örneğini BDV'ye karşı oluşan antikor varlığı yönünden peroksidaz ile işaretli antikor testi ve SNT ile incelemişlerdir. Araştırmacılar (1994) 540 adet örneğin 23 adedini (%4.3) peroksidaz ile işaretli antikor testi ile pozitif belirlerken, SNT ile sadece 5 adedini (%0.9) pozitif belirlemişlerdir. Testler arasındaki bu farklılığın nedenini SNT ile sadece nötralizan antikorların, peroksidaz ile işaretli antikor testi ile ise hem nötralizan hem de nötralizan olmayan antikorların belirlenebilmesine bağlayan araştırmacılar peroksidaz ile işaretli antikor testinin SNT'ye göre çok daha duyarlı olduğunu ifade etmişlerdir.

Schaller ve ark (2000), koyun sürülerinde BDV enfeksiyonunun seroprevalansının %20 ile %65 arasında değiştiğini bildirmişlerdir.

Tegmeier ve ark (2000) Danish koyunları arasındaki Pestivirus enfeksiyonuna karşı gelişen seroprevalansı %8.3 olarak tespit ettiklerini bildirmişlerdir.

Graham ve ark (2001b) Kuzey İrlanda'da yapmış oldukları çalışmada 92 adet çiftlikten elde ettikleri toplam 918 adet koyun kan örneğini BDV'ye karşı oluşan antikorlar yönünden ELISA ile incelemişlerdir. Araştırmacılar (2001b) çiftliklerin 28 adedini (%30.4) ve koyunların 49 adedini (%5.3) pozitif tespit ettiklerini ifade etmişlerdir. Koyunlarda belirledikleri düşük seropozitiviteyi bölgelerde uygulanan farklı işletme uygulamalarına, populasyonların yoğunluklarına, çiftliklere alınan yeni hayvanların sayısına bağlayan araştırmacılar (2001b) bu faktörlerin tek başına, bir kısmının veya tamamının prevalansı etkileyebileceğini vurgulamışlardır (Graham ve ark 2001b).

O'Neill ve ark (2004) Kuzey İrlanda Cumhuriyeti'nde koyunlarda Pestivirus'lara karşı oluşan antikorların varlığı belirlemek için 91 çiftlikten toplam 1448 kan örneğini indirekt-ELISA ile incelemişlerdir. Doksan bir çiftliğin 42 adedini (%46) 1448 kan örneğinin ise 81 adedini (%5.6) Pestivirus'a karşı oluşan antikorlar yönünden pozitif bulmuşlardır. Kırk iki çiftliği BDV'ye karşı oluşan antikorların varlığı yönünden SNT ile de inceleyen araştırmacılar (2004) 39 çiftliği pozitif olarak belirlemişlerdir.

Krametter-Froetscher ve ark (2007) Avusturalya'da Pestivirus'a karşı oluşan antikorların varlığı belirlemek için gerçekleştirdikleri çalışmada toplam 4931 adet koyun kan serumunu ELISA ile incelemişler ve 1448 adedini (%29.4) Pestivirus antikor varlığı yönünden pozitif bulmuşlardır.

Monies ve ark (2004), MD benzeri semptomların görüldüğü bir kuzuda *Mannheimia haemolytica* izole ettiklerini ifade etmişlerdir.

Border Disease Virus enfeksiyonunun klinik olarak görüldüğü koyun sürülerinde PI veya viremik koyun varlığının %0.3 ile %20 arasında değiştiğini bildirilmiştir (Buonavoglia ve ark 1994, Braun ve ark 2002, Berriatua ve ark 2004, Valdazo-Gonzalez ve ark 2006). Bu çalışmada BDV antijen varlığı yönünden pozitif olduğu belirlenen 11 adet hayvan aynı zamanda serolojik olarakta incelenmiş ve BDV'ye karşı oluşan antikor varlığı yönünden negatif olarak tespit edilmiştir. Bu hayvanların 15 gün sonra 2. örneklemeleri gerçekleştirilmiştir. 11 adet örneğin 3 adedi 2. örnekleme sonrasında da BDV antijen varlığı yönünden pozitif olarak tespit edilirken, BDV'ye karşı oluşan antikor varlığı yönünden ise negatif olarak belirlenmiştir. 8 adet örnek ise BDV antijen varlığı yönünden negatif, BDV'ye karşı oluşan antikor varlığı yönünden ise pozitif olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlar ışığında, 3 adet (%0.3) koyunun BDV enfeksiyonu yönünden PI olduğuna karar verilmiştir. İkinci örnekleme sonucunda antikor tespit edilen 8 adet koyunun ise BDV enfeksiyonu yönünden akut enfeksiyona maruz kaldıkları belirlenmiştir. Bu çalışma ile elde edilen %0.3'lük PI hayvan oranı daha önceki çalışmalarda belirlenen (Berriatua ve ark 2004, Valdazo-Gonzalez ve ark 2006) oranlara göre düşük bulunmuştur. Elde edilen bu düşük oranın nedenini sürülerde yapılan rastgele örnekleme yöntemine bağlayabiliriz.

Willoughby ve ark (2006) kolostral antikorların; PI hayvanlarda virusun varlığını maskeleyebildiğini ve PI kuzuların tespit edilmesinde hatalı sonuçlara neden olabileceğini ifade etmişlerdir. Bu çalışma kapsamında örnekleme yapılan sürülerin hiçbirisinde PI kuzu tespit edilememesinin nedeni olarak kolostral antikorların BDV varlığını maskelediği düşünülebilir.

Gebeliğin 60–80. gününden önce BDV ile enfeksiyon şekillenir ve PI kuzular doğarsa bu kuzuların bütün organlarına virus yayılmaktadır. Bu çalışmada örnekleme yapılan bir fötusun tüm organlarında (karaciğer, akciğer, beyin) BDV antijen varlığı tespit edilmiş olması bu kuzunun gebeliğin 60–80. gününden önce BDV ile enfekte olduğunu akla getirmektedir.

Barlow ve Storey (1977) yapmış oldukları çalışmada BDV'den etkilenen fötuslar ile diğer fötuslar arasında glial hücrelerin ve astrositlerin toplam sayılarında herhangi bir değişiklik tespit etmediklerini bildirmişlerdir. Bununla birlikte BDV tespit ettikleri fötuslarda glial hücrelerin %30'unun tip III glia olduğunu da ifade etmişlerdir (Vaughn ve ark 1970). Border Disease Virus ile enfekte hayvanlarda olgun oligodendrogliaların sayısının arttığı ve oligodendrogliaların farklılaşmasındaki defektlerin sonucunda hypomyelinizasyonun geliştiği düşünülmektedir (Barlow ve Storey 1977). Bu çalışmada BDV tespit edilen fötuslara ilişkin glial hücrelerin miktarları ile ilgili herhangi bir veri olmadığı için karşılaştırma yapılamamıştır.

Bazı viral enfeksiyonlarda (fare hepatitis virus, papova virus multifokal lökoencephalopati gelişmesine neden olmaktadır) demyelinizasyonun birincil nedeni virus ile enfekte oligodendrioglia (Lampert ve Rodriguez 1984) hücrelerinde sitolizis şekillenmesine bağlanmıştır. Semliki forest virusların da BDV'ye benzer yapıda olduğu, demyelinizasyonun nedeninin ise immun sistemin uyarılması sonucu artan yıkımlanma olduğu düşünülmektedir (Illavia ve ark 1988).

Jeffrey ve ark (1990) yapmış oldukları deneysel çalışmada BDV ile enfekte ettikleri hayvanların beyinlerinde bilateral boşluklar belirlediklerini ancak enfekte ve kontrol grubundaki hayvanlarda glial fibrillary acidic protein (GFAP) ve myelin basic protein (MBP)'lerin lokalizasyonu ve sentezlenmesinde herhangi bir fark

bulamadıklarını bildirmişlerdir. Araştırmacılar (1990) beyinde oluşan bilateral boşlukların ise ince filamentöz yapılarla kaplanmış olduğunu belirtmişlerdir.

Myelin basic protein (Anderson ve ark 1987a, Möller ve ark 1993) sentezleyen hücrelerde BDV viral antijen varlığı Jeffrey ve ark (1990) tarafından gösterilmiştir. Glialarda BDV viral antijen içeren MBP hücrelerinin (BD+ MBP-) yanında, BDV viral antijen içermeyen MBP hücrelerinin (BD- MBP+) bir arada bulunabildiği ve bu durumun simultan olarak şekillendiği belirtilmiştir (Jeffrey ve ark 1990).

Anderson ve ark (1987a) yapmış oldukları çalışmada, BDV ile enfekte kuzularda hem myelin associated glikoprotein (MAP) hem de MBP'nin miktarının azaldığını tespit etmişlerdir. Çalışmada BDV ile enfekte herhangi bir kuzu tespit edilemediği için bu yönde bir karşılaştırma yapılamadı.

Jeffrey ve ark (1990) yapmış oldukları çalışmada BD viral antijen içeren hücrelerin beyin korteksinin altında yer alan beyaz maddede (*Substantia alba*) ve ependimal bölgede bulunduğunu belirtmişlerdir. Viremik hayvanlarda ise viral antijen içeren hücrelerin; hem gri hem de beyaz madde boyunca yayılmış olup nöron, glia, ependimal hücreler, vasküler endotel hücreler ve meningsteki fibrositlerde de lokalize oldukları ifade edilmiştir (Jeffrey ve ark 1990).

Done ve ark (1985) yapmış oldukları çalışmada hem beyaz maddede hem de gri maddede azalmalar tespit etmişlerdir.

Border Disease Virus antijen varlığının ortaya konulmak istendiği çalışmalarda IF testi kullanıldığı zaman kuzuların sinir sisteminde viral antijenin hücresel lokalizasyonunda bir takım farklılıklar bulunmaktadır. Bazı çalışmalarda cerebral korteks ve cerebellumdaki bazı nöronlarda viral antijen varlığı tespit edilirken (Terpstra 1978) bazı çalışmalarda ise (Gardiner 1980) periferal sinir sistemi hücrelerinde, dorsal root perineuronal hücrelerde, beynin subependyma bölgelerindeki hücrelerde BDV varlığı tespit edildiği bildirilmiştir.

Anderson ve ark (1987a) spinal korddaki az sayıda hücrenin BD viral antijenleri ile enfekte olabildiğini ancak bu hücrelerin tipini çok net olarak identifiye edemediklerini bildirmişlerdir. Jeffrey ve ark (1990) ise spinal kord boyunca yayılmış BD viral antijenleri ile enfekte olmuş çok sayıda nöron ve glial hücre tespit ettiklerini ifade etmişlerdir.

Merkezi sinir sitemindeki myelin sadece oligodendroglia hücrelerinden oluşmaktadır. Bu yüzden oligodendroglia hücrelerinin virus ile enfekte olması hypomyelinogenezisin patogenezinde oldukça önemlidir (Jeffrey ve ark 1990). Ancak araştırmacılar (1990), ışık mikroskobu ile inceledikleri enfekte ve kontrol grubu oligodendrogliaları arasında herhangi bir fark tespit edemediklerini bildirmişlerdir.

Jeffrey ve ark (1990), immunohistokimyasal yöntem kullanılarak oligodendroglialarda viral antijen varlığı belirlenen bir kuzuda belirgin bir hypomyelinizasyon tespit edemediklerini bildirmişlerdir. Bunun için hypomyelinizasyonun nedeninin sadece oligodendroglial hücrelerin enfekte olmasına bağlanamayacağını, başka faktörlerin de rol oynayabileceğini vurgulamışlardır (Jeffrey ve ark 1990). Bu çalışmada hypomyelinizasyona yönelik herhangi bir inceleme yapılmadığı için bu açıdan bir değerlendirme yapılamamıştır.

Bu çalışma sonucunda elde edilen sonuçlar bölgede Pestivirus enfeksiyonları ile ilgili yapılacak diğer çalışmalara katkı sağlayacaktır.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Koyun çiftliklerinde BDV enfeksiyonunun kontrolünde BDV ile enfekte hayvanların belirlenip sürüden çıkartılması gerekmektedir. Border Disease Virus enfeksiyonundan etkilenen sürülerde PI hayvanların tespit edilmesi için Direkt ELISA kullanılabilmektedir (Fenton ve ark 1990). Pestivirus enfeksiyonu yönünden çok sayıda hayvanın incelenmesi gerektiği durumlarda ya da koyun ve diğer ruminantların Pestivirus enfeksiyonları ile ilgili ulusal kontrol programlarında direkt ve indirekt ELISA geniş kullanım alanı bulmaktadır (Fenton ve ark 1991). Ancak Pestivirus enfeksiyonları ile ilgili yapılacak çalışmalarda BDV'nin teşhisinde gold standart test olarak kabul edilen IP testi de mutlaka kullanılmalıdır. Ayrıca testin spesifitesi ve sensitivitesi göz önünde tutulduğunda One-Step RT-PCR testi de BDV'nin teşhisinde tercih edilerek kullanılabilir.

Persiste enfekte hayvanların tespit edilmesi halinde bu hayvanların çiftliklerden uzaklaştırılması tavsiye edilmektedir (Sweasey ve ark 1979, Sharp ve Rawson 1986, Nettleton 1987).

İlk örneklemede BDV antijen varlığı yönünden direkt ELISA ile pozitif, İndirekt ELISA ile BDV'ye karşı oluşan antikor yönünden negatif tespit edilen hayvanlardan 15 gün sonra ikinci kez örnekleme yapıldı. Bu çalışmada 3 adet PI koyun tespit edilerek bu hayvanlar kestirildi. Böylece örnekleme yapılan çiftliklerde önümüzdeki yıllarda BDV enfeksiyonundan kaynaklanabilecek ekonomik kayıpların önüne geçilmiş oldu. Ayrıca ikinci örneklemede BDV antijen varlığı yönünden negatif tespit edilen 8 koyun kan serumları indirekt ELISA ile BDV'ye karşı oluşan antikorlar yönünden incelenmiş ve antikor taşıdıkları tespit edilmiştir. Bu yüzden 8 koyun BDV enfeksiyonu yönünden akut enfekte hayvanlar olarak değerlendirildi.

Koçlarda da BDV enfeksiyonu görülebilmektedir. Koçlar, semenleri ile yüksek miktarda virus saçtıkları için enfeksiyonun nakledilmesinde önemlidirler (Kirkland ve ark 1991). Doğal aşımda veya donör olarak kullanılacak olan koçlar BDV varlığı yönünden kontrol edilmelidirler. Bu çalışmada mevcut bütçe kapsamında rastgele örnekleme yöntemi ile koçların %20'si örneklendi. Örneklenen

koçlardan BDV'ye karşı seropozitiflik (%6) tespit edildi. Bu yüzden daha yüksek bütçeli projeler ile damızlık olarak kullanılan koçların tamamının örneklenmesini ve BDV antijen varlığı yönünden incelenmesi gerektiği önermekteyiz.

Sonuç olarak ilimizdeki koyunlarda ve koçlarda BDV enfeksiyonunun varlığı ilk kez ortaya konmuş oldu. Bundan sonraki yıllarda yapılması planlanan araştırmalarda izole edilen virusların Türkiye'de izole edilen diğer viruslar ile karşılaştırılarak filogenetik yerinin belirlenmesi yararlı olacaktır.

Border Disease Virus enfeksiyonu ile ilgili kontrol ve eradikasyon programlarının uzun sürede etkili olması isteniyor ise vahşi ruminantlar Pestivirus varlığı yönünden sürekli takip edilmelidir (Olde Riekerink ve ark 2005, Marco ve ark 2009b). Yabani domuzlarda CSFV'nin varlığının bilinmesi Almanya (Laddomada 2000) ve İtalya (Zanardi ve ark 2003)'da BDV'nin kontrolünde en önemli faktördür.

Avrupa'da BDV enfeksiyonu ile ilgili şu an uygulanan herhangi bir kontrol programı bulunmamaktadır (Olde Riekerink ve ark 2005).

Canlı aşılar, Pestivirus ile kontamine olabildiği için bu aşıların kullanımında güvenlik problemleri karşımıza çıkabilmektedir. Diğer bir komplikasyon ise kullanılmakta olan BVDV aşılarının oluşturdukları antikorların doğal enfeksiyon sonucu oluşan antikorlar ile ayrımının yapılamamasından kaynaklanmaktadır (Van Oirschot 1999).

Kullanımı açısından ölü aşılar daha güvenlidir ancak oluşturdukları immun yanıt yeterli koruma sağlayamamaktadır. Aşı uygulanması genel olarak meydana gelebilecek salgınları önleyebilmektedir. Ancak çiftlikler arasında oluşabilecek bulaşmada ve enfeksiyonun eradikasyonunda etkili değildir (Stegeman 1997, Vannier ve ark 1997).

İdeal bir aşının taşıması gereken özellikler Van Oirschot (1999) tarafından ifade edilmiştir. Buna göre ideal bir aşı: Çeşitli immunojenler içermeli ve böylece tek bir formulasyonla multivalan koruma sağlamalı, hem hücresel hem de humoral

immuniteyi uyarabilme özelliğine sahip olmalı, yan etkiye sahip olmamalı, uzun süreli koruma sağlamalı, maternal immunite tarafından engellenmemeli, sürü immunitesi sağlayabilmeli, enfeksiyonun teşhisinde engel oluşturmamalı, güvenilir olmalı, ucuz olmalıdır.

İnaktif BDV aşılarının deneysel çalışmalarda kullanıldığı bildirilmiştir (Vantsis ve ark 1980a, Brun ve ark 1993). Şu an için BDV enfeksiyonundan korunmak için herhangi bir aşı uygulaması bulunmamaktadır. Sadece İspanya'da BVDV aşıları nadiren kullanılmaktadır fakat bu uygulama kısmen koruma sağlayabilmektedir (Barlow ve ark 1980b, Vantsis ve ark 1980a). Ülkemizde yapılan ve bundan sonra yapılacak Pestivirus ile ilgili çalışmalarda elde edilecek yerel suşlar ile ilgili mutlaka aşı geliştirme çalışmaları yapılmalıdır.

Koyunlarda BD, BVDV–1, BVDV–2 ile enfeksiyonlar bildirildiği için hazırlanacak aşının bu üç etken için de koruma sağlaması gerekmektedir (Julia ve ark 2009).

Bazı koyun çiftliklerinde BDV enfeksiyonunun kontrolü açısından idare eksikliği görülebilmektedir. Tipik 'Hairy Shaker' görünümlü kuzu doğumlarına rastlanmadığı zaman Pestivirus enfeksiyonlarının varlığı gözden kaçırılabilmektedir (Valdazo-Gonzalez ve ark 2006). Çiftlik yönetimi tarafından yapılacak idari program kapsamında koyun sürüleri Pestivirus enfeksiyonları yönünden periyodik olarak kontrol edilmelidir.

Bu çalışmada 'Hairy Shaker' görünümlü kuzu doğumlarının tespit edildiği sürülerin yanında böyle kuzu doğumlarının olmadığı ancak PI koyunların bulunduğu çiftlikler tespit edilmiştir. Bu yüzden Pestivirus yönünden çalışma yapılacağında 'Hairy Shaker' görünümlü kuzu doğumları görülmese dahi çiftliklerin araştırma kapsamında incelenmelerini önerilmektedir.

Sürülere alınması planlanan yeni hayvanların mutlaka pesitivirus yönünden incelemeleri yapılarak BDV Ag (-) hayvanlar sürüye dahil edilmelidir.

Koyunculuk sektöründe suni tohumlama yerine doğal aşımların tercih edildiği göz önünde tutulduğunda bundan sonra yapılması düşünülen çalışmalarda sürülerde bulunan tüm koçlardan da örneklemelerin yapılarak BDV enfeksiyonu yönünden incelenmesi gerektiği vurgulanmaktadır. Border Disease Virus antijen varlığı yönünden negatif olduğu belirlenen koçların damızlık olarak kullanılması tavsiye edilmektedir (Barlow ve ark 1986, Kirkland ve ark 1991).

Bundan sonraki çalışmalarda koyun ve koçların yanı sıra keçi, sığır gibi farklı tür hayvanlardan da örnekleme yapılmasının etkenin türler arasında geçişi hakkında bilgi elde edilmesine yardımcı olacağı düşünülmektedir.

Dünyada vahşi ruminantların Pestivirus enfeksiyonlarına yönelik çalışmalar bulunmaktadır (Depner ve ark 1991b, Frölich ve Hofmann 1995, Frölich ve Flach 1998, Schmitt ve Wittkowski 1999). Ancak ülkemizde bu yönde bir çalışma henüz yapılmamıştır. Önümüzdeki yıllarda ülkemizdeki vahşi ruminantların Pestivirus enfeksiyonlarına yönelik çalışmaların yapılması önerilmektedir.

Ülkemizde BDV enfeksiyonu ile ilgili virolojik veya patolojik çalışma çok fazla bulunmamaktadır. Border Disease Virus'unun antijenik yapısı ile ilgili bundan sonra yapılacak çalışmalar Türkiye'deki küçük ruminant populasyonunun Pestivirus enfeksiyonunun etiyolojisi ile ilgili daha fazla bilgi elde edilmesini sağlayacaktır.

Ayrıca Ülkemizde ilgili birimler tarafından Pestivirus enfeksiyonları ile ilgili mücadele programları hazırlanmalı ve yetiştiricilere bu enfeksiyon hakkında bilgiler verilmelidir.

6. ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Konya ve Çevresinde Abort Problemli Koyun Sürülerinde Border Disease Virus Enfeksiyonunun Araştırılması

Oğuzhan AVCI

Viroloji Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ / KONYA-2010

Konya ve çevresinde abort problemi görülen 5 koyun sürüsünden tesadüfi örnekleme yöntemi kullanılarak elde edilen örnekler Border Disease Virus (BDV)'a karşı oluşan antikor varlığı yönünden indirekt Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ile, BDV antijen varlığı yönünden Direkt ELISA ve Direkt İmmunperoksidaz (IP) testi ile, BDV viral genom varlığı yönünden ise One Step RT-PCR testi ile incelendi.

Araştırmada 1000 adet koyun, 500 adet kuzu, 50 adet koçdan alınan kan serumu, lökosit ve vaginal svap örnekleri, ölen kuzulardan ve abort olan fötuslardan alınan doku örnekleri (karaciğer, akciğer, kalp, dalak, beyin, böbrek, ince bağırsak, beyincik, timus, lenf, tiroid) incelendi.

İndirekt ELISA ile incelenen 1000 adet koyun kan serumundan 790 adedi (%79); 500 adet kuzu kan serumundan 217 adedi (%43.4) ve 50 adet koç kan serumundan 3 adedi (%6) BDV'ye karşı oluşan antikor varlığı yönünden pozitif olarak tespit edildi.

Direkt ELISA incelenen 1000 adet koyun lökosit örneklerinden (1. örnekleme) 11 adedi (%1.1) BDV antijen varlığı yönünden pozitif olarak tespit edilirken 989 adedi (%98.9) ise negatif bulundu. BDV antijen varlığı yönünden pozitif olduğu belirlenen 11 adet hayvanın 15 gün sonra 2. örneklemeleri gerçekleştirildi. 11 adet örneğin 3 adedi 2. örnekleme sonrasında da pozitif olarak tespit edildi. Persiste enfekte olduğu belirlenen 3 adet (%0.3) koyun kestirildi. 500 adet kuzu lökosit, 50 adet koç lökosit, 50 adet vaginal svap ve 327 adet doku örneğinin hiçbirisinde Direkt ELISA ile BDV antijen varlığı tespit edilmedi.

Direkt immunperoksidaz ile incelenen 1011 adet koyun lökosit örneklerinden 14 adedi (%1.38) ve 327 adet doku örneğinin 11 adedi (%3.36) BDV antijen varlığı yönünden pozitif olarak tespit edilirken 500 adet kuzu lökosit, 50 adet koç lökosit ve 50 adet svap örneğinin hiçbirisinde BDV antijen varlığı tespit edilemedi.

One Step RT-PCR ile incelenen 63 adet koyun lökosit örneklerinden 14 adedi (%22.2), 327 adet doku örneklerinden 11 adedi (%3.36) BDV viral genom varlığı yönünden pozitif olarak tespit edilirken, 50 adet vaginal svap örneklerinin hiçbirisinde BD viral genom varlığı tespit edilmedi.

Araştırmada kullanılan testlerden Direkt ELISA ile IP arasındaki sensitivite ve spesifite değerleri sırasıyla %100 ve %98.8, Direkt ELISA ile One Step RT-PCR arasında %78.57 ve %98.6, One Step RT-PCR ile Direkt IP arasında ise %100 ve %97.5 olarak tespit edildi.

Anahtar Sözcükler: Border Disease Virus; Direkt ELISA; İmmunperoksidaz; koyun; One-Step RT-PCR.

7. SUMMARY

Investigation of Border Disease Virus Infection In Sheep Flock With Abortion Problem In Konya and Its Environment

Samples obtained via random sampling method from 5 sheep herds with abortion problem in and around Konya were examined for the presence of Border Disease Virus (BDV) using Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), for the presence of BDV antigen using Direct ELISA and Direct Immunoperoxidase (IP) test and for the presence of BDV Viral genome using One Step Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) test.

In the research, blood serum, leukocyte and vaginal swap samples obtained from 1000 sheep, 500 lambs and 50 rams as well as tissue samples collected from dead lambs and aborted fetuses (liver, lung, heart, spleen, brain, kidney, intestine, cerebellum, thymus, lymph and thyroid) were examined.

Positive results for the presence of antibody against BDV in the examinations were as follows; 790 of 1000 sheep blood samples (79 %) examined via Indirect ELISA, 217 of 500 lamb blood serum (43.4 %) and 3 of 50 ram blood serum (6 %).

While 11 of 1000 sheep leukocyte samples (1.1 %, first sampling) examined using Direct ELISA were found positive for the presence of BDV antigen, 989 samples (98.9 %) were negative. Second sampling studies were performed 15 days following first session in 11 animals found positive for the presence of BDV antigen. Of these 11 samples, 3 were re-found positive as a consequence of second sampling. Three sheep (0.03 %) determined to be PI were sacrificed. BDV antigen could be determined in none of 500 lamb leukocyte, 50 ram leukocyte, 50 vaginal swaps and 327 tissue samples via Direct ELISA.

While BDV antigen positivity was found in 14 of 1011 sheep leukocyte samples (1.38 %) examined using direct IP method and in 11 of 327 tissue samples (3.36 %), BDV antigen could be determined in none of 500 lamb leukocyte, 50 ram leukocyte and 50 swap samples.

While presence of BDV viral genome was found positive in 14 of 63 sheep leukocyte samples (22.2 %), 11 of 327 tissue samples (%3.36) examined using One Step RT-PCR, BDV viral genome was determined in none of 50 vaginal swap samples.

Sensitivity and specifity values between Direct ELISA and IP, among tests used in the research, were respectively 100 % and 98.9 % and the values were, respectively, 78.57 % and 98.6 % between Direct ELISA and One Step RT-PCR and 100 % and 97.5 % between One Step RT-PCR and Direct IP.

Key words: Border Disease Virus; Direct ELISA; Immunoperoxidase; sheep; One-Step RT-PCR.

8. KAYNAKLAR

1. Abraham A, Organ U, Rapoport E, Marcus S. First report of border disease in Israel and the isolation of the virus. Isr J Vet Med. 1991; 46: 138–141.

2. Acland HM, Gard GP, Plant JW. Infection of sheep with a mucosal disease virus. Aust Vet J. 1972; 48(2): 70. DOI: 10.1111/j.1751–0813.1972.tb05127.x

3. Agnello V, Abel G, Elfahal M, Knight GB, Zhang Q-X. Hepatitis C virus and other Flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. Proc Natl Acad Sci USA. 1999; 96(22): 12766–12771.

4. Akkina RK, Raisch KP. Intracellular virus-induced polypeptides of pestivirus border disease virus. Virus Res. 1990; 16: 95–106.

5. Alansari H, Brock KV, Potgieter LND. Single and double polymerase chain reaction for detection of bovine viral diarrhea virus in tissue culture and sera. J Vet Diagn Invest. 1993; 5(2): 148- 153.

6. Alves D, McEwen B, Tremblay R, Godkin A, Anderson N, Carman S, Hazlet M. Population diagnostics from an epidemic of bovine viral diarrhea in Ontario. In Int Symp on Bovine Viral Diarrhoea Virus. A 50 year review, p71–74, 1996, Cornell University, Ithaca, NY, USA.

7. Aly NM, Shehab GG, Abd El-Rahim IH. Bovine viral diarrhoea, bovine herpes virus and parainfluenza–3 virus infection in three cattle herds in Egypt in 2000. Rev Sci Tec. 2003; 22: 879–892.

8. Anderson CA, Higgins RJ, Waldvogel AS, Osburn BI. Tropism of border disease virus for oligodendrocytes in ovine fetal brain cell cultures. In: Barlow RM, Patterson DSP, editors. Border disease of sheep: a virus-induced teratojenic disorder. Berlin: Verlag Paul Parey; 1982. p. 81–87.

9. Anderson CA, Sawyer M, Higgins RJ, East N, Osburn BI. Experimentaly induced ovine border disease: extensive hypomyelination with minimal viral antigen in neonatal spinal cord. Am J Vet Res. 1986; 48(3): 499–503.

10. Anderson CA, Higgins RJ, Smith ME, Osburn BI. Border disease virus-induced decrease in thyroid hormone levels with associated hypomyelination. Lab Invest. 1987a; 57(2): 168–175.

11. Anderson CA, Sawyer M, Higgins RJ, East N, Osburn BI. Experimentally induced ovine border disease: extensive hypomyelination with minimal viral antigen in neonatal spinal cord. Am J Vet Res. 1987b; 48(3): 499–503.

12. Archbald LF, Gibson CD, Schultz RH, Fahning ML, Zemjanis R. Effects of intrauterine inoculation of bovine viral diarrhea-mucosal disease virus on uterine tubes and uterus of nonpregnant cows. Am J Vet Res. 1977; 34(9): 1133–1137.

13. Arnal M, Fernandez de Luco D, Riba L, Maley M, Gilray J, Willoughby K, Vilcek S, Nettleton P. A novel pestivirus associated with deaths in Pyrenean chamois. J Gen Virol. 2004; 85(12): 3653–3657.

14. Ataseven VS, Ataseven L, Tan T, Babur C, Oğuzoğlu TÇ. Seropositivity of agents causing abortion in local goat breeds in Eastern and South-eastern Anatolia, Turkey. Revue Med Vet. 2006; 157(11): 545–550.

15. Avalos-Ramirez R, Orlich M, Thiel H-J, Becher P. Evidence for the presence of two novel pestivirus species. Virology. 2001; 286(2): 456–465.

16. Baginski SG, Pevear DC, Seipel M, Sun SCC, Benetatos CA, Chunduru SK, Rice CM, Collett MS. Mechanism of action of a pestivirus antiviral compound. Proc Natl Acad Sci. 2000; 97(14): 7981–7986.

17. Baker J. Bovine viral diarrhea virus: a review. J Am Vet Med Assoc. 1987; 190(11): 1449–1458.

18. Balazs R, Brooksbank BWL, Davison AN, Eayrs JT, Wilson DA. The effect of neonatal thyroidectomy on myelination in the rat brain. Brain Res. 1969; 15(1): 219–232.

19. Barlic-Maganja D, Grom J. Highly sensitive one-tube RT-PCR and microplate hybridisation assay for the detection and for the discrimination of classical swine fever virus from other pestiviruses. J Virol Methods. 2001; 95(1–2): 101–110.

20. Barlow RM. Morphogenesis of hydranencephaly and other intracranial malformations in progeny of pregnant ewes infected with pestiviruses. J Comp Pathol. 1980; 90(1): 87–98.

21. Barlow RM. Experiments in border disease. IV. Pathological changes in ewes. J Comp Pathol. 1972; 82(2):151–157.

22. Barlow RM. Epidemiology. In: R.M. Barlow and D.S.P.Patterson(Editors), Border Disease of Sheep: A Virus Induced Teratogenic Disorder (Fortschritte der Veterinarmedizin, Heft 36). Paul Parey, Berlin, Hamburg, 1982; 70–71.

23. Barlow RM. Border Disease Virus. In: Dinter Z and Morein B, editors. Virus infections of ruminants, Chapter 24, 3, Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam, The Netherlands, 1990. p.267–278. ISBN: 0–444–87312–0

24. Barlow RM, Storey IJ. Myelination of the ovine CNS with special reference to Border Disease. I. Qualitative aspects. Neuropath Appl Neuro. 1977; 3(4): 237–253. DOI: 10.1111/j.1365–2990.1977.tb00588.x

25. Barlow RM, Gardiner AC. Border disease. In: Diseases of Sheep. Martin WB, editors. Blackwell Scientific Publications, London, 1983. p.129–133. ISBN: 0 632 0108–8.

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

27. Barlow RM, Rennie JC, Keir WA, Gardiner AC, Vantsis JT. Experiments in border disease. VII. The disease in goats. J Comp Path. 1975; 85(2): 291–297.

28. Barlow RM, Vantsis JT, Gardiner AC, Rennie JC, Herring JA, Scott FMM. Mechanisms of natural transmission of Border disease. J Comp Pathol. 1980a; 90(1): 57–65.

29. Barlow RM, Rennie JC, Gardiner AC. Infection of pregnant sheep with the NADL strain of bovine virus diarrhea virus and their subsequent challenge with Border disease IIb Pool. J Comp Pathol. 1980b; 90(1): 67–72.

30. Barlow RM, Gardiner AC, Nettleton PF. The pathology of a spontaneous and experimental mucosal disease-like syndrome in sheep recovered from clinical border disease. J Comp Pathol. 1983; 93(3): 451–461.

31. Barlow RM, Nettleton PF, Gardiner AC, Greig A, Campell JR, Broon JM. Persistent bovine viral diarrhoea virus infection in a bull. Vet Rec. 1986; 118(12): 321–324.

32. Bazan JF, Fletterick RJ. Detection of a trypsin-like serine protease domain in flaviviruses and pestiviruses. Virology. 1989; 171(2): 637–639.

33. Becher P, Shannon AD, Tautz N, Thiel HJ. Molecular characterization of border disease virus, a pestivirus from sheep. Virology. 1994; 198(2): 542–551.

34. Becher P, König M, Paton DJ, Thiel HJ. Further characterization of border disease virus isolates: evidence for the presence of more than three species within the genus pestivirus. Virology. 1995; 209(1): 200–206.

35. Becher P, Meyers G, Shannon AD, Thiel HJ. Cytopathogenicity of Border Disease Virus Is Correlated with Integration of Cellular Sequences into the Viral Genome. J Virol. 1996; 70(5): 2992–2998.

36. Becher P, Orlich M, Shannon AD, Horner G, König M, Thiel HJ. Phylogenetic analysis of pestiviruses from domestic and wild ruminants. J Gen Virol. 1997; 78(6): 1357–1366.

37. Becher P, Orlich M, Thiel HJ. Complete genomic sequence of border disease virus a pestivirus from sheep. J Virol. 1998a; 72(6): 5165–5173.

38. Becher P, Orlich M, Thiel H-J. Ribosomal S27a coding sequences upstream of ubiquitin coding sequences in the genome of a pestivirus. J Virol. 1998b; 72(11): 8697–8704.

39. Becher P, Orlich M, Kosmidou A, Konig M, Baroth M, Thiel HJ. Genetic diversity of pestiviruses: Identification of novel groups ana implications for classification. Virology. 1999; 262(1): 64–71.

40. Becher P, Avalos RR, Orlich M, Cedillo RS, Konig M, Schweizer M, Stalder H, Schirrmeier H, Thiel HJ. Genetic and antigenic characterization of novel pestivirus genotypes: implications for classification. Virology. 2003; 311(1): 96–104.

41. Behrens S-E, Grassmann CW, Thiel H-J, Meyers G, Tautz N. Characterization of an autonomous subgenomic pestivirus RNA replicon. J Virol. 1998; 72(3): 2364–2372.

42. Belak S, Ballagi-Pordany A. Bovine viral diarrhea virus infection: rapid diagnosis by the polymerase chain reaction. Arch Virol Suppl. 1991; 3: 181–190.

43. Belknap EB, Collins JK, Larsen RS, Conrad KP. Bovine viral diarrhea virus in new world camelids. J Vet Diag Invest. 2000; 12(6): 568–570.

44. Bennett RM, Done JT. Control of the bovine pestivirus syndrome in cattle: A case for social cost-benefit analysis? In Soc Vet Epid Prev Med: Conference proceedings, pp. 54–65. Edinburgh, Scotland, April 1986.

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

46. Berriatua E, Barandika JF, Aduriz G, Hurtado A, Estevez L, Atxaerandio R, Garcia-Perez AL. Flock-prevalence of border disease virus infection in Basque dairy-sheep estimated by bulk-tank milk analysis. Vet Microbiol. 2006; 118(1–2): 37–46.

47. Bezek DM, Baker JC, Kaneene JB. Immunoflourescence of bovine virus diarrhea viral antigen in white blood cells fro experimentally infected immunocompotent calves. Can Vet Res. 1988; 52(2): 288–290.

48. Bhudevi B, Weinstock D. Fluorogenic RT-PCR assay (TaqMan) for detection and classification of bovine viral diarrhea virus. Vet Microbiol. 2001; 83(1): 1–10.

49. Bhudevi B, Weinstock D. Detection of bovine viral diarrhea virus in formalin fixed paraffin embedded tissue sections by real-time RT-PCR (Taqman). J Virol Methods. 2003; 109(1): 25–30.

50. Bielefeldt-Ohmann H. An ocular–cerebellar syndrome caused by congenital bovine viral diarrhoea virus infection. Acta Vet Scand. 1984; 25(1): 36–49.

51. Bielefeldt-Ohmann H. BVD virus antigens in tissues of persistently viraemic clinically normal cattle: implications for development of clinically fatal disease. Acta Vet Scand. 1988; 29(1): 77–84.

52. Bielefeldt-Ohmann H, Bloch B. Electron microscopic studies of bovine virus diarrhoea virus in tissues of diseased calves and in cell cultures. Arch Virol. 1982; 71(1): 57–74.

53. Bioptechs (2008). http://www.biotechs.com/movies/research/davidson/mdbk.gif Erişim Tarihi:23.06.2008

54. Blogspot (2009) http://4.bp.blogspot.com/_2U22cKMurcs/SSLlNKBb3JI/AAAAAAAAAH0/M5dJivh1qYo/s400/beyin.jpg Erişim Tarihi: 21.07.2009

55. Bock RE, Burgess GW, Douglas IC. Development of an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of bovine serum antibody to bovine viral diarrhoea virus. Aust Vet J. 1986; 63(12): 406–408.

56. Bosch JC, Kaashoek MJ, Kroese AH, van Oirschot JT. An attenuated bovine herpesvirus 1 marker vaccine induces a better protection than two inactivated marker vaccines. Vet Microbiol. 1996; 52(3–4): 223–234.

57. Bolin SR, Ridpath JF. Range of viral neutralizing activity and moleculer specifity of antibodies induced in cattle by inactivated bovine viral diarrhea virus vaccines. Am J Vet Res. 1990; 51(5): 703–707.

58. Bolin SR, McClurkin AW, Coria MF. Frequency of persistent bovine viral diarrhea virus infection in selected cattle herds. Am J Vet Res. 1985; 46(11): 2385–2387.

59. Bolin SR, Roth JA, Uhlenhoop EK, Pohlenz JF. Immunologic and virologic finding in a bull cronically infected with noncytopathogenic bovine viral diarrhea virus. J Am Vet Med Assoc. 1987; 190(8): 1015–1017.

60. Bonniwell MA, Nettleton PF, Gardiner AC, Barlow RM, Gilmour JS. Border disease without nervous signs or fleece changes. Vet Rec. 1987; 120(11): 246–249.

61. Borman A, Jackson RJ. Initiation of translation of human rhinovirus RNA: Mapping the internal ribosome entry site. Virology. 1992; 188(2): 685–696.

62. Boye M, Kamstrup S, Dalsgaard K. Specific sequence amplification of bovine virus diarrhea virus (BVDV) and hog cholera virus and sequencing of BVDV nucleic acid. Vet Microbiol. 1991; 29(1): 1–13.

63. Braun U, Hilbe M, Ehrensperger F, Salis F, Alther P, Strasser M, Stalder HP, Peterhans E. Border disease in a flock of sheep. Schweiz Arch Tierheilkd. 2002; 144: 419–426.

64. Brock KV. Detection of persistent bovine viral diarrhea virus infections by DNA hybridization and polymerase chain reaction assay. Arch Virol. 1991; 3: 199–208.

65. Brock KV, Deng R, Riblet SM. Nucleotide sequencing of 5' and 3' termini of bovine viral diarrhea virus by RNA ligation and PCR. J Virol Methods. 1992; 38(1): 39–46.

66. Brock KV, Ridpath JF, Deng R. Comparative hybridization and nucleotide sequence informatioın from two noncytopathogenic isolates of bovine viral diarrhea virus. Vet Microbiol. 1993; 36(1–2): 69–82.

67. Brock KV, Grooms DL, Ridpath J, Bolin SR. Changes in levels of viremia in cattle persistently infected with bovine viral diarrhea virus. J Vet Diagn Invest. 1998; 10(1): 22–26.

68. Brockman SJ, Wood L, Edwards S, Harkness JW. Selection of an appropriate pestivirus strain for border disease serodiagnosis. Vet Rec. 1988; 122(24): 586–587.

69. Brownlie J. Pathogenesis of mucosal disease and moleculer aspects of bovine virus diarrhoea virus. Vet Microbiol. 1990; 23(1–4): 371–382.

70. Brownlie J, Clarke MC, Howard CJ. Experimental production of fatal mucosal disease in cattle. Vet Rec. 1984; 114(22): 535–536.

71. Brownlie J, Clarke MC, Howard CJ, Pocock DH. Pathogenesis and epidemiology of bovine virus diarrhoea virus infection of cattle. Ann Rech Vet. 1987; 18(2): 157–166.

72. Brownlie J, Clarke MC, Howard CJ. Experimental infection of cattle in early pregnancy with a cytopathic strain of bovine virus diarrhoea virus. Res Vet Sci. 1989; 46(3): 307–311.

73. Brownlie J, Donis R, Nettleton P, Paton D, Wensvoort G. 1997. In: Edwards S, Paton DJ, Wensvoort G. (Eds.), Proc. the Third ESVV Symp on Pestivirus Infections, Conclusions and Recommendations for Future Research: p.188–189, 19–20 September 1996, Lelystad.

74. Brugere-Picoux J. Border disease in France. Vet Rec. 1987; 120(15): 374.

75. Brun A, Lacoste F, Reynaud G, Kato F, Saint-Marc B. (1993) Evaluation of the potency of an inactivated vaccine against border disease pestivirus infection in sheep. In: Proceedings of the Second Symposium on Pestiviruses, Edwards S., ed. Fondation Marcel Merieux, Annecy, France, 1–3 October 1992, p.257–259

76. Bruschke CJM, Rijn PA, Moorman RJM, van Oirschot JT. Antigenically different pestivirus strains induce congenital infection in sheep: A model for bovine virus diarrhea virus vaccine efficacy studies. Vet Microbiol. 1996; 50(1–2): 33–43.

77. Bruschke CJM, Weedmeester K, VanOirschot JT, Van Rijn PA. Distribution of bovine virus diarrhoea virus in tissues and white blood cells of cattle during acute infection. Vet Microbiol. 1998; 64(1): 23–32.

78. Bulut O, Yavru S. Boğalarda Bovine Herpesvirus 1 (BHV–1) Enfeksiyonunun Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), Polymerase Chain Reaction (PCR) ve Virus İzolasyonu (VI) Metotları ile karşılaştırmalı Teşhisi ve Seroepidemiyolojisi. Vet Bil Derg. 2004; 20(4): 61–70.

79. Burgu I, Ozturk F, Akca Y, Toker A, Frey HR, Liess B. Investigations on the occurence and impact of bovine viral diarrhea (BVD) virus infections in sheep in Turkey. Dtsch Tierarztl Wschr. 1987; 94: 292–294.

80. Burgu İ, Akça Y, Alkan F, Özkul A, Karaoğlu T, Bilge-Dağalp S, Oğuzoğlu TÇ, Yeşilbağ K. The serological and virological investigations and pathogenesis of BVDV infection in sheep during pre- and post-partum periods. Turk J Vet Anim Sci. 2001; 25(4): 551–557.

81. Buonavoglia C, Marsilio F, Tempesta M, Buonavoglia D, Cavalli A. Persistent pestivirus infection in sheep in Apulia (southern Italy). New Microbiol. 1994; 17: 163–165.

82. Burrells C, Nettleton PF, Reid HW, Miller HRP, Hopkins J, McConnell I. Lymphocyte subpopulations in the blood of sheep presistently infected with border disease virus. Clin Exp Immunol. 1989; 76(3): 446–451.

83. Caffrey JF, Dudgeon AM, Donelly WJ, Sheahan BJ, Atkins GJ. Morphometric analysis of growth retadation in fetal lambs following experimental infection of pregnant ewes with border disease virus. Res Vet Sci. 1997; 62(3): 245–248.

84. Campbell JR, Radostits OM, Wolfe JT, Janzen ED. An outbreak of border disease in a sheep flock. Cann Vet J. 1995; 36(5): 307–309.

85. Canal CW, Hotzel I, De Almeida LL, Roehe PM, Masuda A. Differentiation of classical swine fever virus from ruminant pestiviruses by reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR). Vet Microbiol. 1996; 48(3–4): 373–379.

86. Cancilla PA, Barlow RM. An electron microscopic study of the spinal cord in Border disease of lambs. Res Vet Sci. 1968; 9: 88–90.

87. Carlsson U. Border disease in sheep caused by transmission of virus from cattle persistently infected with bovine virus diarrhoea virus. Vet Rec. 1991; 128(7): 145–147.

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

89. Carman S, van Dreumel T, Ridpath J, Hazlet M, Alves D, Dubovi E, Tremblay R, Bolin S, Godkin A, Anderson N. Severe acute bovine viral diarrhea in Ontario, 1993–1995. J Vet Diagn Invest. 1998; 10(1): 27–35.

90. Carrere-Kremer S, Montpellier C, Lorenzo L, Brulin B, Cocquerel L, Belouzard S, Penin F, Dubuisson J. Regulation of hepatitis C virus polyprotein processing by signal peptidase involves structural determinants at the p7 sequence junctions. J Biol Chem. 2004; 279: 41384–41392.

91. Castrucci G, Frigeri F, Ferrari M, Traldi V. The vaccination and challange with bovine viral diarrhea virus (BVDV) of calves previously infected with a non-cytopathogenic BVDV. Comp Immun Microbiol Inf Dis. 1991; 14(1): 31–38.

92. Cay B, Chappuis G, Coulibaly C, Dinter Z, Edwards S, Greiserwilke I, Gunn M, Have P, Hess G, Juntti N, Liess B, Mateo A, McHugh P, Moennig V, Nettleton P, Wensvoort G. Comparative Analysis of Monoclonal Antibodies Against Pestiviruses: Report of an International Workshop. Vet Microbiol. 1989; 20(2): 123–129.

93. Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM. Flavivirus genome organization, expression, and replication. Annu Rev Microbiol. 1990; 44: 649–688.

94. Chamorro M, Aubert C, Brahic M. Demyelinating lesions due to Theiler's virus are associated with ongoing central nervous system infection. J Virol. 1986; 57(3): 992–997.

95. Chappuis G, Brun A, Kato F, Dauvergne M, Reynaud G, Duret C. Etudes serologique et immunologiques realisees a la de l'isolement d'un pestivirus dans un foyer ovina chez des motons de L'Aveyron. In: Pestiviroses des Ovins et des Bovins, Espinasse J and Savey M et all. Ste Francaise de Buiatrie: p.55–66, 1986, Paris, France.

96. Chasey D, Roeder PL. Virus-like particles in bovine turbinate cell infected with bovine virus diarrhoea-mucosal disease virus. Arch Virol. 1981; 67(4): 325–332.

97. Chu HJ, Zee YC. Morphology of bovine diarrhea virus. Am J Vet Res. 1984; 45(5): 845–850.

98. Chu HJ, Zee YC, Ardans AA, Dai K. Enzyme linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to Bovine Viral Diarrhoea virus in bovine sera. Vet Microbiol. 1985; 10(4): 325–333.

99. Chu HJ, Sawyer MM, Anderson CA, Higgins RJ, Zee YC. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to bovine virus diarrhoea virus in sera from Border disease virus-infected sheep. Can J Vet Res. 1987; 51(2): 281–283.

100. Collett MS. Molecular genetics of pestiviruses. Comp Immun Microbiol Infect Dis. 1992; 15(3): 145 – 154.

101. Collett MS, Larson R, Gold C, Strick D, Anderson DK, Purchio AF. Molecular cloning and nucleotide sequence of the pestivirus bovine viral diarrhea virus. Virology. 1988a; 165(1): 191–199.

102. Collett MS, Larson R, Belzer SK, Retzel E. Proteins encoded by bovine viral diarrhea virus: the genomic organization of a pestivirus. Virology. 1988b; 165: 200–208.

103. Collett MS, Moennig V, Horzinek MC. Recent advances in pestivirus research. J Gen Virol. 1989; 70(2): 253–266.

104. Collins ME, Desport M, Brownlie J. Bovine viral diarrhea virus quasispecies during persistent infection. Virology. 1999; 259(1): 85–98. DOI: 10.1006/viro.1999.9697

105. Coria MF, McClurkin AW. Specific immune tolerance in an apparently healthy bull persistently infected with bovine viral diarrhea virus. J Am Vet Med Assoc. 1978; 172(4): 449–451.

106. Coria MF, Schmerr MJF, McClurkin AW, Bolin SR. Differentiation of cytopathic and noncytopathic isolates of bovine viral diarrhea virus by virus neutralization. Am J Vet Res. 1984; 45 (10): 2129–2131. DOI: 10.1007/BF01311200

107. Corapi WV, Donis RO, Dubovi EJ. Monoclonal antibody analyses of cytopathic and noncytopathic viruses from fatal bovine viral diarrhea virus infections. J Virol. 1988; 62(8): 2823–2827.

108. Couvreur B, Letellier C, Collard A, Quenon P, Dehan P, Hamers C, Pastoret PP, Kerkhofs P. Genetic and antigenic variability in bovine viral diarrhea virus (BVDV) isolates from Belgium. Virus Res. 2002; 85(1): 17–28. DOI: 10.1016/S0168–1702(02)00014-X

109. Cranwell MP, Otter A, Errington J, Hogg RA, Wakeley P, Sandvik T. Detection of border disease virus in cattle. Vet Rec. 2007; 161(6): 211–212.

110. Cravero GC, Fatzer R, Fankhauser R. Border-Krankheit hypomyelinogenesis congenita) bei Lammern in der Schweiz. Schweizer Arch Tierheilk. 1975; 117: 119–121.

111. Çokçalışkan C. Gebe koyunlar ve fötuslarında pestivirus enfeksiyonu. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Doktora Tezi. 2000. 54 sayfa.

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

113. Dahle J, Leiss B, Frey HR. Interspecies transmission of pestiviruses: experimental infections with bovine viral diarrhea virus in pigs and hog cholera virus in cattle. In: Harkness JW, ed. Agriculture. Pestivirus Infections of Ruminants. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities. 1987; 195–211.

114. David GP, Crawshaw TR, Gunning RF, Hibberd RC, Lloyd GM, Marsh PR. Severe disease in adult dairy cattle in three U.K. dairy herds associated with BVD virus infection. Vet Rec. 1994; 134(18): 468–472.

115. Davison A. Channel catfish virus: a new type of herpesvirus. Virology. 1991; 186(1): 9–14.

116. De Mia GM, Greiser-Wilke I, Feliziani F, Giammarioli M, De Giuseppe A. Genetic characterization of a caprine pestivirus as the first member of a putative novel pestivirus subgroup. J Vet Med B. 2005; 52(5): 206–210. DOI: 10.1111/j.1439–0450.2005.00850.x

117. De Moerlooze L, Lecomte C, Brown-Shimmer S, Schmetz D, Guiot C, Vandenbergh D, Allaer D, Rossius M, Chappuis G, Dina D, Renard A, Martial JA. Nucleotide sequence of the bovine viral diarrhoea virus Osloss strain: comparison with related viruses and identification of specific DNA probes in the 5' untranslated region. J Gen Virol. 1993; 74(7): 1433–1438.

118. Dekker A, Wensvoort G, Terpstra C. Six antigenic groups within the genus pestivirus as identified by cross neutralization assays. Vet Microbiol. 1995; 47(3–4): 317–329.

119. Deng R, Brock KV. Molecular cloning and nucleotide sequence of a pestivirus genome, noncytopathic bovine viral diarrhea virus strain SD–1. Virology. 1992; 191(2): 867–869.

120. Deng R, Brock KV. 5' and 3' untranslated regions of pestivirus genome: primary and secondary structure analyses. Nucleic Acids Res. 1993; 21(8): 1949–1957.

121. Depner K, Hübschle OJ, Liess B. BVD virus infection in goats experimental studies on transplacental transmissibility of the virus and its effect on reproduction. Arch Virol. 1991a; 3: 253–256.

122. Depner K, Hübschle OJ, Liess B. Prevalence of ruminant pestivirus infections in Namibia. Onderstepoort J Vet Res. 1991b; 58(2): 107–109.

123. Deregt D, Prins S. A monoclonal Antibody-based Immunoperoxidase monolayer (micro-isolation) assay for detection of type 1 and type 2 bovine viral diarrhea virus. Can Vet Res. 1998; 62(2): 152–155.

124. Dickinson AG, Barlow RM. The demonstration of the transmissibility of border disease of sheep. Vet Rec. 1967; 81: 114.

125. Discoverlife (2008). http://www.discoverlife.org Erişim Tarihi: 25.07.2008

126. Dlissi E, Hammami S, Sghaier CH, Russo P, Sanchis R, Lassoued H, Amenallah J, Rekiki A. Incidence comparative des maladies abortives des petits ruminants en Tunisie. Congres Maghrebin Veterinaire, 1998, Hammamet, Tunisia.

127. Done JT, Terlecki S, Richardson C, Harkness JW, Sands JJ, Patterson DSP, Sweasy D, Shaw IG, Winkler CE, Duffel SJ. Bovine Viral Diarrhea-Mucosal Disease Virus: Pathogenicity for the fetal calf following maternal infection. Vet Rec. 1980; 106(23): 473–479.

128. Done JT, Wooley J, Barnard VV, Upcott DH, Hebert CN, Terlecki S. Border disease of sheep: Spinal cord morphometry. J Comp Pathol. 1985; 95(3): 325–333.

129. Donis RO, Dubovi EJ. Differences in virus-induced polypeptides in cells infected by cytopathic and noncytopathic biotypes of bovine virus diarrhea-mucosal disease virus. Virology. 1987; 158(1): 168–173.

130. Donis RO, Corapi W, Dubovi EJ. Neutralizing monoclonal antibodies to bovine viral diarrhoea virus bind to the 56K to 58K glycoprotein. J Gen Virol. 1988; 69(1): 77–86.

131. Dougherty WG, Semler BL. Expression of virus-encoded proteinases: functional and structural similarities with cellular enzymes. Microbiol Rev. 1993; 57(4): 781–822.

132. Drew TW, Yapp F, Paton DJ. The detection of bovine viral diarrhoea virus in bulk milk samples by the use of a single-tube RT-PCR. Vet Microbiol. 1999; 64(2–3), 145–154.

133. Dubois E, Russo P, Prigent M, Thiery R. Genetic characterization of ovine pestiviruses isolated in France, between 1985 and 2006. Vet Microbiol. 2008; 130(1–2): 69–79.

134. Dubovi EJ. The diagnosis of bovine viral diarrhea infections—a laboratory review. Vet Med. 1990; 85: 1133–1139.

135. Dubovi EJ. (1999) Bovine Diarrhea Virus and Border Disease Virus (Flaviviridae). Encyclopedia of Virology, Second Edition, Edited by Granoff A, Webster RG, Academic Pres, A Harcourt Science and Technology Company. ISBN: 012227030–4

136. Duffel SJ, Harkness JW. Bovine virus diarrhoea-mucosal disease infection in cattle. Vet Rec. 1985; 117: 240–245.

137. Duffell SJ, Sharp MW, Bates D. Financial loss resulting from BVD-MD virus infection in a dairy herd. Vet Rec. 1986; 118(2): 38–39.

138. Durham PJK, Hassard LE. An enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for antibodies to bovine virus diarrhoa virus. Vet Microbiol. 1990; 22(1): 1–10.

139. Dutia BM, Entrican G, Nettleton PF. Cytopathic and non-cytopathic biotypes of border disease virus induce polypeptides of different molecular weight with common antigenic determinants. J Gen Virol. 1990; 71(5): 1227–1232.

140. Edwards S, Sands JJ, Harkness JW. The application of monoclonal antibody panels to characterize pestivirus isolates from ruminants in Great Britain. Arch Virol. 1988; 102(3–4): 197–206. DOI: 10.1007/BF01310825

141. Edwards S, Roehe PM, Ibata G. Comparative studies of border disease and closely related virus infections in experimental pigs and sheep. Br Vet J. 1995; 151(2): 181–188. DOI: 10.1016/S0007–1935(95)80008–5

142. Elazhary MASY, Frechette JL, Silim A, Roy RS. Serological evidence of some bovine viruses in caribou (Rangifer tarandus caribou) in Quebec. J Wildl Dis. 1981; 17(4): 609–613.

143. Elazhary MASY, Silim A, Dea SS. Prevalence of antibodies to bovine respiratory syncytial virus, bovine viral diarrhea virus, bovine herpesvirus 1, and bovine parainfluenza–3 virus in sheep and goats in Quebec. Am J Vet Res. 1984; 45(8): 1660–1662.

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

145. Elder GA, Potts BJ. Multiple neural cell types are infected in vitro by border disease virus. J Neuropath Exp Neur. 1987; 46(6): 653–667.

146. Entrican G, Hopkins J, Maclean M, Mcconnell I, Nettleton PF. Cell phenotypes in the efferent lymph of sheep persistently infected with Border disease virus. Clin Exp Immunol. 1992; 87(3): 393–398. DOI: 10.1111/j.1365–2249.1992.tb03008.x

147. Entrican G, Dand A, Nettleton PF. A double monoclonal antibody ELISA for detecting pestivirus antigen in tke blood of viraemic cattle and sheep. Vet Microbiol. 1995; 43(1): 65–74.

148. Evermann JF. Pestiviral infection of Ilamas and Alpacas. Small Rum Res. 2006; 61: 201–206.

149. Evermann JF, Faris MA, Niemi SM, Wright Jr RW. (1981) Pestivirus persistence and pathogenesis: comparative diagnostic aspects of Border disease virus of sheep and bovine viral diarrhea virus. In: Am Assoc Vet Lab Diagn, 24th Annual Meeting Proceedings; pp: 407–426.

150. Fahey KJ, Morris B. Humoral immune response in foetal sheep. Immunology. 1978; 35(4): 651–661.

151. Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff JU. Desselberger, and L. A. Ball, Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses, Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press, 2005, p1162, London.

152. Fenton A, Entrican G, Herring JA, Nettleton PF. An ELISA for detecting pestivirus antigen in the blood of sheep persistently infected with border disease virus. J Virol Methods. 1990; 27(3): 253–260.

153. Fenton A, Sinclair JA, Entrican G, Herring JA, Malloy C, Nettleton PF. A monoclonal antibody capture ELISA to detect antibody to border disease virus in sheep serum. Vet Microbiol. 1991; 28(4): 327–333.

154. Fernelius AL, Amtower WC, Malmquist WA, Lambert G, Matthews PI. Bovine virus diarrhea in swine: neutralizing antibody in naturally and experimentally infected swine. Can J Comp Med. 1973; 37(1): 96–102.

155. Fischer S, Weiland E, Frölich K. Characterization of a bovine viral diarrhoea virus isolated from roe deer in Germany. J Wildlife Dis. 1998; 34(1): 47–55.

156. Flores EF, Kreutz LC, Donis RO. Swine and ruminant pestiviruses require the same cellular factor to enter bovine cells. J Gen Virol. 1996; 77(6): 1295–1303.

157. Flores EF, Gil LHGV, Botton SA, Weiblen R, Ridpath JF, Kreutz LC, Pilati C, Driemeyer D, Moojen V, Wendelstein AC. Clinical, pathological and antigenic aspect of bovine viral diarrhea (BVDV) type 2 isolates identified in Brazil. Vet Microbiol. 2000; 77(1–2): 175–183.

158. Fraser GC, Littlejohns IR, Moyle A. Isolation of a probable pestivirus from a goat. J Aust Vet. 1981; 57(4): 197–198.

159. Fredriksen B, Press CM, Sandvik T, Odegaard SA, Loken T. Detection of viral antigen in plasenta and fetus of cattle acutely infected with Bovine Viral Diarrhea Virus. Vet Pathol. 1999; 36(4): 267–275.

160. French EL, Snowdon WA. Mucosal disease in Autralian cattle. Aust Vet J. 1964; 40(3): 99–105. DOI: 10.1111/j.1751–0813.1964.tb01706.x

161. French EL, Hore DE, Snowdon WA, Parsonson IM, Uren J. Infection of pregnant ewes with mucosal disease virus of ovine origin. Aust Vet J. 1974; 50(2): 45–54. DOI: 10.1111/j.1751–0813.1974.tb05250.x

162. Fry JM, Lehrer GM, Bornstein MB. Experimental inhibition of myelination in spinal cord tissue cultures: enzyme assays. J Neurobiol. 1973; 4(5): 453–459. DOI: 10.1002/neu.480040506

163. Foucras G, Carnero R, Perlier C, Schelcher F. Evaluation of an antigencapture ELISA and practical consequences for diagnosis of BVDV infection. Rev Med Vet. 1996; 147(4): 283–290.

164. Frölich K. Bovine virus diarrhea and mucosal disease in freeranging and captive deer (Cervidae) in Germany. J Wildlife Dis. 1995; 31(2): 247–250.

165. Frölich K, Hofmann M. Isolation of bovine viral diarrhea virus-like pestiviruses from roe deer (Capreolus capreolus). J Wildlife Dis. 1995; 31(2): 243–246.

166. Frölich K, Flach EJ. Long-term viral serology of semi-free-ranging and captive ungulates. J Zoo Wildl Med. 1998; 29(2): 165–170.

167. Frölich K, Jung S, Ludwig A, Lieckfeldt D, Gibert P, Gauthier D, Hars J. Detection of a newly described pestivirus of Pyrenean chamois (Rupicapra pyrenaica pyrenaica) in France. J Wildlife Dis. 2005; 41(3): 606–610.

168. Fulton RW, Downing MM, Hagstad HV. Prevalence of bovine herpesvirus–1, bovine viral diarrhea, parainfluenza–3, bovine adenovirus–3 and 7, and goat respiratory syncytial viral antibodies in goats. Am J Vet Res. 1982; 43(8): 1454–1457.

169. Fulton RW, Saliki JT, Burge LJ, D'offay JM, Bolin SR, Maes RK, Baker JC, Frey MI. Neutralizing antibodies to type 1 and 2 Bovine viral diarrhoea viruses: Detection by inhibition of viral cytopathology and infectivity by immunoperoxidase assay. Clin Diag Lab Immunol. 1997; 4(3): 380–383.

170. Fulton RW, D' Offay JM, Saliki JT, Burge LJ, Helman RG, Confer AW, Bolin SR, Rifpath Ridpath JF. Nested reverse transcripptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) for typing ruminant pestiviruses: bovine viral diarrhea viruses and border disease virus. Can J Vet Res. 1999; 63(4): 276–281.

171. Fulton RW, Ridpath JF, Saliki JT, Briggs RE, Confer AW, Burge LJ, Purdy CW, Loan RW, Duff GC, Payton ME. Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) 1b: Predominant BVDV subtype in calves with respiratory disease. Can J Vet Res. 2002; 66(3): 181–190.

172. Fulton RW, Briggs RE, Ridpath JF, Saliki JT, Confer AW, Payton ME, Duff GC, Step DL, Walker DA. Transmission of bovine viral diarrhoea virus 1b to susceptible and vaccinated calves by exposure to persistently infected calves. Can J Vet Res. 2005; 69(3): 161–169.

173. Garcia-Perez AL, Minguijon E, Estevez L, Barandika JF, Aduriz G, Juste RA, Hurtado A. Clinical and laboratorial findings in pregnant ewes and their progeny infected with Border disease virus (BDV–4 genotype). Res Vet Sci. 2009; 86(2): 345–352.

174. Gard GP, Ackland HM, Plant JW. A mucosal disease virus as a cause of abortion, hairy birth coat, and unthriftiness in sheep: 2. Observations on lambs surviving longer than seven days. Aust Vet J. 1976; 52(2): 64–68. DOI: 10.1111/j.1751–0813.1976.tb13857.x

175. Gardiner AC. The distribution and significance of Border disease viral antijen in infected lambs and foetuses. J Comp Path. 1980; 90: 513–518.

176. Gardiner AC (1982) Immunity and protection. In: R.M.Barlow and D.S.P.Patterson (Editors), Border Disease of sheep: A Virus Induced Teratogenic Disorder (Fortschritte der Veterinarmadizin, Heft 36). Paul Parey, Berlin, Hamburg, 65–69.

177. Gardiner AC, Barlow RM. Experiments in border disease. III. Some epidemiological considerations with reference to the experimental disease. J Comp Path. 1972; 82(1): 29–35.

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

179. Gardiner AC, Barlow RM, Rennie JC, Keir WA. Experiments in border disease. V. Preliminary investigations on the nature of the agent. J Comp Pathol. 1972; 82(2): 159–161.

180. Gardiner AC, Zakarian B, Barlow RM. Periarteritis in experimental border disease of sheep. III. Immunopathological observations. J Comp Pathol. 1980; 90(3): 469–474.

181. Gardiner AC, Nettleton PF, Barlow RM. Virology and immunology of a spontaneous and experimental mucosal disease-like syndrome in sheep recovered from clinical border disease. J Comp Pathol. 1983; 93(3): 463–469.

182. Geoatlas (2009)
http://www.geoatlas.com/maps/countries/europe/united%20kingdom/images/u04phy.gif?Lang=
Erişim Tarihi: 06.07.2009

183. Giangaspero M, Harasawa R. Ovine pestiviruses: their taxonomic status revealed by palindromic nucleotide substitutions. Vet Microbiol. 1999; 70(1–2): 33–39.

184. Giangaspero M, Harasawa R. Genetic variety of bovine viral diarrhea virus 2 strains isolated from sheep. J Vet Med Sci. 2004; 66(3): 323–326.

185. Gilbert SA, Burton KM, Prins SE, Deregt D. Typing of bovine viral diarrhea virus directly from blood of infected cattle by multiplex PCR. J Clin Microbiol. 1999; 37(6): 2020–2023.

186. Gillespie JH, Bartholomew PT, Thomson RG, McEntee K. The isolation of noncytopathic virus diarrhea virus from two aborted bovine fetuses. Cornell Vet. 1967; 57: 564–571.

187. Gong Y, Trowbridge R, Macnaughton TB, Westaway EG, Shannon AD, Gownas EJ. Characterization of RNA synthesis during a one-step growth curve and of the replication mechanism of bovine viral diarrhoea virus. J Gen Virol. 1996; 77(11): 2729–2736.

188. Gorbalenya AE, Donchenko AP, Koonin EV, Blinov VM. N-terminal domains of putative helicases of flavi- and pestiviruses may be serine proteases. Nucleic Acids Res. 1989; 17(10): 3889–3897.

189. Goyal SM, Bouljihad M, Haugerud S, Ridpath JF. Isolation of bovine viral diarrhea virus from an alpaca. J Vet Diag Invest. 2002; 14(6): 523–525.

190. Graham DA, McLaren IE, German A. Evaluation of the suitability of a commercial bovine viral diarrhoea virus antigen capture ELISA for diagnostic testing. Vet J. 1998; 156(2): 149–154. DOİ:10.1016/S1090–0233(05)80045–0

191. Graham DA, McLaren IE, Brittain D, O'Reilly PJ. Genetic typing of ruminant pestivirus strains from Northern Ireland and the Republic of Ireland. Res Vet Sci. 2001a; 71(2): 127–134. DOI:10.1053/rvsc.2001.0499

192. Graham DA, Calvert V, German A, McCullough SJ. Pestiviral infections in sheep and pigs in Northern Ireland. Vet Rec. 2001b; 148: 69–72.

193. Grassmann CW, Isken O, Tautz N, Behrens SE. Genetic analysis of the pestivirus nonstructural coding region: defects in the NS5A unit can be complemented in trans. J Virol. 2001; 75(17): 7791–7802.

194. Gray EW, Nettleton PF. The Ultrastructure of Cell Cultures Infected with Border Disease and Bovine Virus Diarrhoea Viruses. J Gen Virol. 1987; 68(9): 2339–2346.

195. Greiser-Wilke I, Liess B, Schepers J, Stahl-Hennig C, Moennig V. Correlation of bovine viral diarrhoea virus induced cytopathic effect with expression of a biotype-spesific marker. Arch Virol. 1991a; 3: 55–65.

196. Greiser-Wilke I, Dittmar KE, Liess B, Moennig V. Immunofluorescence studies of biotype-specific expression of bovine viral diarrhoea virus epitopes in infected cells. J Gen Virol. 1991b; 72(8): 2015–2019.

197. Grondahl C, Uttenthal A, Houe H, Rasmussen TB, Hoyer MJ, Larsen LE. Characterisation of a pestivirus isolated from persistently infected mousedeer (Tragulus javanicus). Arch Virol. 2003; 148(8): 1455–1463. DOI: 10.1007/s00705–003–0130–9

198. Gronstol H. Listeriosis in sheep. Isolation of Listeria monocytogenes from organs of slaughtered animals and dead animals submitted for post-mortem examination. Acta Vet Scand. 1980; 21: 11–17.

199. Grummer B, Beer M, Liebler-Tenorio E, Greiser-Wilke I. Localization of viral proteins in cells infected with bovine viral diarrhoea virus. J Gen Virol. 2001; 82(11): 2597–2605.

200. Hafez SM, Liess B. Studies on Bovine Viral Diarrhea-Mucosal Disease Virus, I.Cultural behaviour and antigenic relationship of some strains. Acta Virol. 1972; 16(5): 388–398.

201. Haines DM, Clark EG, Dubovi EJ. Monoclonal antibody-based immunohistochemical detection of bovine viral diarrhea virus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. Vet Pathol. 1992; 29(1): 27–32.

202. Hamblin C, Hedger RS. The prevalence of antibodies to bovine viral diarrhea/mucosal disease virus in African wildlife. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 1979; 2(2–3): 295–303.

203. Hamel AL, Wasylyshen MD, Nayar GP. Rapid detection of bovine viral diarrhea virus by using RNA extracted directly from assorted specimens and a one-tube reverse transcription PCR assay. J Clin Microbiol. 1995; 33(2): 287–291.

204. Hamilton AF, Donnelly WJ. A new condition in lambs in Ireland. Vet Rec. 1970; 86(19): 581.

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

206. Harasawa R. Phylogenetic analysis of pestivirus based on the 5' untranslated region. Acta Virol. 1996; 40(1): 49–56.

207. Harasawa R, Giangaspero M. A novel method for pestivirus genotyping based on palindromic nucleotide substitutions in the 5' untranslated region. J Virol Methods. 1998; 70(2): 225–230.

208. Harkness JW. Classical swine fever and its diagnosis: current view. Vet Rec. 1985; 116(11): 288–293.

209. Harkness JW. The control of bovine viral diarrhoea virus infection. Ann Rech Vet. 1987; 18(2): 167–174.

210. Harkness JW, Vantsis JT. 1982. Virology. In: R.M. Barlow and D.S.P.Patterson (Editors), Border Disease of sheep: A Virus Induced Teratogenic Disorder (Fortschritte der Veterinarmadizin, Heft 36). Paul Parey, Berlin, Hamburg, 56–64.

211. Harkness JW, King AA, Terlecki S, Sands JJ. Border disease of sheep: isolation of the virus in tissue culture and experimental reproduction of the disease. Vet Rec. 1977; 100(4): 71–72.

212. Harkness JW, Sands JJ, Richards MS. Serological studies of mucosal disease virus in England and Wales. Res Vet Sci. 1978; 24(1): 98–103.

213. Hartley WJ, Kater J. Observations on diseases of the central nervous system of sheep in New Zealand. N Z Vet J. 1962; 10(6): 128–142.

214. Heath GS, King DP, Turner JL, Wakeley PR, Banks M. Use of an internal standard in a TaqMan nested reverse transcription-polymerase chain reaction for the detection of bovine viral diarrhoea virus. Vet Microbiol. 2003; 96(4): 357–366.

215. Heckert RA, Power CA, Briscoe MR. Pestivirus is a common contaminant in Maedi-Visna and Caprine Arthritis-Encephalitis virus stocks. Can J Vet Res. 1992; 56(4): 370–372.

216. Heckert RA, Dubuc C, Briscoe MR, Ranger M. Prevalence of Border disease virus infection in a small group of Canadian sheep. Can Vet J. 1994; 35(6): 379–381.

217. Heinz FX, Collett MS, Purcell RH, Gould EA, Howard CR, Hougton M, Moormann RJM, Rice CM, Thiel HJ. Family Flaviviridae. In: Virus Taxonomy, Seveth Report of the International Committee on Taxonomy of Virusese. Van Regenmortel MHV et al, es. San Diego: Academic Pres; 2000. p.859–878.

218. Hertig C, Pauli U, Zanoni R, Peterhans E. Detection of bovine viral diarrhea (BVD) virus using the polymerase chain reaction. Vet Microbiol. 1991; 26(1–2): 65–76.

219. Hewicker M, Wohrmann T, Fernandez A, Trautwein G, Liess B, Moennig V. Immunohistological detection of bovine viral diarrhoea virus antigen in the central nervous system of persistently infected cattle using monoclonal antibodies. Vet Microbiol. 1990; 23(1–4): 203–210.

220. Hewicker-Trautwein M, Trautwein G, Moennig V, Liess B. Infection of ovine fetal brain cell cultures with cytopathogenic and noncytopathogenic bovine viral diarrhea virus. Vet Microbiol. 1992; 33(1–4): 239–248.

221. Hewicker-Trautwein M, Trautwein G. Porencephaly, hyroncephaly and lekoencephalopathy in ovine fetuses following transplacental infection with bovine virus diarrhea virus: distribution or viral antigen and characterization of cellular response. Acta Neuropathol (Berl). 1994; 87(4): 385–397.

222. Hewickher-Trautwein M, Liess B, Frey HR, Trautwein G. Virological and pathological findings in sheep fetuses following experimental infection of pregnant ewes with cytopathogenic bovine virus diarrhoea virus. J Vet Med B. 1994; 42(9): 557–567.

223. Hooft van Iddekinge BJL, van Wamel JLB, Van Gennip HGP, Moormann RJM. Application of the polymerase chain reaction to the detection of bovine viral diarrhea virus infections in cattle. Vet Microbiol. 1992; 30(1): 21–34.

224. Hopkinson MF, Hart LT, Segar CL, Larson AD, Fulton RW. An immunodiffusion test for detection of bovine viral diarrhea virus antibodies in bovine serum. Am J Vet Res. 1979; 40(8): 1189–1191.

225. Horzinek MC. Non-Arthropod-Borne Togaviruses. ISBN: 0123565502. London: Academic Press. 1981.

226. Horzinek MC. Pestivirus diversity. Arch Virol. 1994; 134(1–2): 216–217.

227. Houe H. Serological analysis of a small herd sample to predict presence or absence of animals persistently infected with bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in dairy herds. Res Vet Sci. 1992; 53(3): 320–323.

228. Houe H. Survivorship of animals persistently infected with bovine virus diarrhoea virus (BVDV). Prev Vet Med. 1993; 15(4): 275–283.

229. Houe H. Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infections. Vet Microbiol. 1999; 64(2–3): 89–107.

230. Houe H, Pedersen KM, Meyling A. The effect of bovine virus diarrhea virus infection on conception rate. Prev Vet Med. 1993; 15(2–3): 117–123.

231. Howard CJ, Clarke MC, Brownlie J. An enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in cattle sera. Vet Microbiol. 1985; 10(4): 359–369.

232. Howard CJ, Brownlie J, Clarke MC. Comparison by the neutralisation assay of pairs of non-cytopathogenic and cytopathogenic strains of bovine virus diarrhoea virus isolated from cases of mucosal disease. Vet Microbiol. 1987; 13(4): 361–369.

233. Huck RA, Evans DH, Woods DG, King AA, Stuart P. Border disease of sheep. Comparison of the results of serological testing using complement fixation, immunodiffusion, neutralization and immunofluorescent techniques. Br Vet J. 1975; 131(4): 427–435.

234. Hughes LE, Kershaw GF, Shaw IG. "B" or Border Disease: An undescribed disease of sheep. Vet Rec. 1959; 71: 313–317.

235. Hulst MM, Moormann RJ. Inhibition of pestivirus infection in cell culture by envelope proteins E(rns) and E2 of classical swine fever virus: E(rns) and E2 interact with different receptors. J Gen Virol. 1997; 78(11): 2779–2787.

236. Hulst MM, Westra DF, Wensvoort G, Moormann RJ. Glycoprotein E1 of hog cholera virus expressed in insect cells protects swine from hog cholera. J Virol. 1993; 67(9): 5435–5442.

237. Hulst MM, Himes G, Newbigin E, Moorman RJM. Glycoprotein E2 of classical swine fever virus: Expression in insect cells and identification as a ribonuclease. Virology. 1994; 200(2): 558–565.

238. Hurtado A, Garcia-Perez AL, Aduriz G, Juste RA. Genetic diversity of ruminant pestiviruses from Spain. Virus Res. 2003; 92(1): 67–73.

239. Hurtado A, Aduriz G, Gomez N, Oporto B, Juste RA, Lavin S, Lopez-Olvera J, Marco I. Molecular identification of a new pestivirus associated to an outbreak of disease in the Pyrenean chamois (Rupicapra pyrenaica pyrenaica) in Spain. J Wildlife Dis. 2004; 40(4): 796–800.

240. Hussin AA, Woldehiwet Z. Border disease: a review. Vet Bull. 1994; 64: 1131–1151.

241. Hyera JMK, Dahle J, Liess B, Moening V, Frey HR. Production of potent antisera raised in pigs by anamnestic response and use for direct immunofluorescent and immunoperoxidase tecniques. Pestivirus Infections of Ruminants, Commision of the European Communites, EUR, 1985, 10238, p.87–101.

242. Hyera JMK, Liess B, Frey HR. A direct neutralizing peroxidase-linked antibody assay for detection and titration of antibodies to bovine viral diarrhea virus. J Vet Med B. 1987; 34: 227–239.

243. Hyndman L, Vilcek S, Conner J, Nettleton PF. A novel nested reverse transcription PCR detects bovine viral diarrhoea virus in fluids from aborted bovine fetuses. J Virol Methods. 1998; 71(1): 69–76.

244. ICTVdB (2009) Index of Viruses. International Committee on Taxonomy of Viruses. htpp://www.ncbi.nih.gov/ICTVdb

245. Ide Y, Tanimoto A, Sasaguri Y, Padmanabhan R. Hepatitis C virus NS5A protein is phosphorylated in vitro by a stably bound protein kinase from HeLa cells and by cAMP-dependent protein kinase A-a catalytic subunit. Gene. 1997; 201(1): 151–158. DOI:10.1016/S0378–1119(97)00440-X

246. Iqbal M, Flick-Smith H, McCauley JW. Interactions of bovine viral diarrhoea virus glycoprotein E(rns) with cell surface glycosaminoglycans. J Gen Virol. 2000; 81(2): 451–459.

247. Illavia SJ, Webb HE, Colover J. Enhancement of demyelination in the central nervous system of Semliki forest virus infected mice after pretreatment with muramyl dipeptide. Neuropath Appl Neuro. 1988; 14(6): 483–493. DOI: 10.1111/j.1365–2990.1988.tb01339.x

248. Jacobson R. Principles of validation of diagnostic assays for infectious diseases. OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Organization International des Epizooties, Paris, France. 2008; p.34–45.

249. Jang SK, Krausslich H-G, Nicklin MJH, Duke GM, Palemenberg AC, Wimmer E. A segment of the 5’ nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation. J Virol. 1988; 62(8): 2636–2643.

250. Jang SK, Davies MV, Kaufman RJ, Wimmer E. Initiation of protein synthesis by internal entry of ribosomes into the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA in vivo. J Virol. 1989; 63(4): 1651–1660.

251. Jeffrey M, Roeder PL. Variable nature of border disease on a single farm: clinical and pathological description of affected sheep. Res Vet Sci. 1987; 43(1): 22–27.

252. Jeffrey M, Wells GA, Bridges AW, Sands JJ. Immunocytochemical localization of border disease virus in the spinal cord of fetal and newborn lamb. Neuropath Appl Neuro. 1990; 16(6): 501–510.

253. Jensen J, Aiken J, Schultz RD. Detection of bovine viral diarrhea virus genome in leukocytes from persistently infected cattle by RNA-cDNA hybridization. Can J Vet Res. 1990; 54(2): 256–259.

254. Jerrett IV, McOrist S, Waddington J, Browning JW, Malecki JC, McCausland IP. Diagnostic studies of the fetus, placenta and maternal blood from 265 bovine abortions. Cornell Vet. 1984; 74(1): 8–20.

255. Jewett CJ, Kelling CL, Frey ML, Doster AR. Comparative pathogenicity of selected bovine viral diarrhea virus isolates in gnotobiotic lambs. Am J Vet Res. 1990; 51(10): 1640–1644.

256. Jones LR, Zandomeni RO, Weber EL. A long distance RT-PCR able to amplify the Pestivirus genome. J Virol Methods. 2006; 134(1–2): 197–204.

257. Julia S, Craig MI, Jimenez LS, Pinto GB, Weber EL. First report of BVDV circulation in sheep in Argentina. Prev Vet Med. 2009; 90(3–4): 274–277. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2009.05.015

258. Juntti N, Larson B, Fossum C. The use ofmonoclonal antibodies in enzyme linked immunosorbent assays for the detection of antibodies to bovine viral diarrhoea virus. J Vet Med B. 1987; 34(5): 356–363.

259. Kahrs RF, Gibbs EPJ, Larsen RE. The search for viruses in bovine semen: A review. Theriogenology. 1980; 14(2): 151–165.

260. Katz JB, Ridpath JF, Bolin SR. Presumptive diagnostic differentiation of hog cholera virus from bovine viral diarrhea and border disease viruses by using a cDNA nested-amplification approach. J Clin Microbiol. 1993; 31(3): 565–568.

261. Kelling CL, Stine LC, Rump KK, Parker RE, Kennedy JE, Stone RT, Ross GR. Investigation of bovine viral diarrhea infections in a range beef cattle herd. J Am Vet Med Assoc. 1990; 197(5): 589–593.

262. Kendrick JW. Bovine Viral Diarrhea-Mucosal Disease Virus infection in pregnant cows. Am J Vet Res. 1971; 32(4): 533–544.

263. Kim SG, Dubovi EJ. A novel simple one-step single-tube RTduplex PCR method with an internal control for detection of bovine viral diarrhoea virus in bulk milk, blood, and follicular fluid samples. Biologicals. 2003; 31(2): 103–106.

264. King, AA, Harkness JW. Viral contamination of foetal bovine serum. Vet Rec. 1975; 97(1): 16.

265. Kirkbride CA, Johnson MW. Serologic examination of aborted ovine and bovine fetal fluids for the diagnosis of border disease, bluetongue, bovine viral diarrhea, and leptospiral infections. J Vet Diagn Invest. 1989; 1(2): 132–138.

266. Kirkland PD, Richards SG, Rothwell JT, Standley DF. Replication of bovine viral diarrhoea virus in the bovine reproductive tract and axcretion of virus in semen during acute and chronic infections. Vet Rec. 1991; 128(25): 587–590.

267. Kittelberger R, Pigott C. The use of pestivirus antigen ELISA currently available for the detection of hairy shaker disease/border disease virus in sheep New Zeal Vet J. 2008; 56(6): 343–344.

268. Kniazeff AJ, Wopschall LJ, Hopps HE, Morris CS. Detection of bovine viruses in fetal bovine serum used in cell culture. In Vitro. 1975; 11(6): 400–403. DOI: 10.1007/BF02616377

269. Krametter R, Nielsen SS, Loitsch A, Froetscher W, Benetka V, Moestl K, Baumgartner W. Pestivirus Exposure in Free-living and Captive Deer in Austria. J Wildlife Dis. 2004; 40(4): 791–795.

270. Krametter-Froetscher R, Loitsch A, Kohler H, Schleiner A, Schiefer P, Moestl K, Golja F, Baumgartner W. Prevalence of antibodies to pestiviruses in goats in Austria. J Vet Med B. 2006; 53(1): 48–50. DOI: 10.1111/j.1439–0450.2006.00906.x

271. Krametter-Froetscher R, Kohler H, Benetka V, Moestl K, Golja F, Vilcek S, Baumgartner W. Influence of Communal Alpine Pasturing on the Spread of Pestiviruses among Sheep and Goats in Austria: First Identification of Border Disease Virus in Austria. Zoonoses Public Health. 2007; 54(5): 209–213. DOI: 10.1111/j.1863–2378.2007.01049.x

272. Krametter-Froetscher R, Schmitz C, Benetka V, Bago Z, Moestl K, Vanek E, Baumgartner W. First descriptive study of an outbreak of Border disease in a sheep flock in Austria-a high risk factor for Bovine viral diarrhea virus free cattle herds: a case report. Vet Med. 2008; 53(11): 625–628.

273. Kramps JA, van Maanen G, van de Wetering G, Stienstra G, Quak S, Brinkhof J, Ronsholt L, Nylin B. A simple, rapid and reliable enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) specific antibodies in cattle serum, plasma and bulk milk. Vet Microbiol. 1999; 64(2–3): 135–144. DOI: 10.1016/S0378–1135(98)00265-X

274. Kreeft HAJG, Greiser-Wilke I, Moennig V, Horzinek MC. Attempts to characterize bovine viral diarrhea virus isolated from cattle after immunization with a contaminated vaccine. Dtsch Tieraerztl Wochenschr. 1990; 97(2): 63–65.

275. Kupfermann H, Thiel HJ, Dubovi EJ, Meyers G. Bovine viral diarrhea virus: characterization of a cytopathogenic defective interfering particle with two internal deletions. J Virol. 1996; 70(11): 8175–8181.

276. Kurihara T, Tsukada Y. The regional and subcellar distribution of 2',3'-cyclic nucleotide– 3'-phosphodiesterase in the central nervous system. J Neurochem. 1967; 14(12): 1167–1174. DOI: 10.1111/j.1471–4159.1967.tb06164.x

277. Kümmerer BM, Meyers G. Correlation between point mutations in NS2 and the viability and cytopathogenicity of bovine viral diarrhea virus strain Oregon analyzed with an infectious cDNA clone. J Virol. 2000; 74(1): 390–400.

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

279. Kümmerer BM, Tautz N, Becher P, Thiel HJ, Meyers G. The genetic basis for cytopathogenicity of pestiviruses. Vet Microbiol. 2000; 77(1–2): 117–128.

280. Kweon CH, Yoon YD, An SH, Lee YS. Expression of envelope protein (E_2) of bovine viral diarrhea virus in insect cells. J Vet Med Sci. 1997; 59(5): 415–419.

281. Laamanen UI, Neuvonen EP, Yliviuhkola EM, Veijalainen PML. Comparison of RT-PCR assay and virus isolation in cell cultures for the detection of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in field samples. Res Vet Sci. 1997; 63(3): 199–203. DOI:10.1016/S0034–5288(97)90020–5

282. Laddomada A. Incidence and control of CSF in wild boar in Europe. Vet Microbiol. 2000; 73(2–3): 121–130. DOI: 10.1016/S0378–1135(00)00139–5

283. Lambot M, Douart A, Joris E, Letesson JJ, Pastoret PP. Characterization of the immune response of cattle against non-cytopathic and cytopathic biotypes of bovine viral diarrhoea virus. J Gen Virol. 1997; 78(5): 1041–1047.

284. Lamontagne L, Roy R. Presence of antibodies to bovine viral diarrhea-mucosal disease virus (border disease) in sheep and goat flocks in Quebec. Can J Comp Med. 1984; 48(2): 225–227.

285. Lamontagne L, Lafortune P, Fournel M. Modulation of the cellular immune responses to T cell-dependent and T cell-independent antigens in lambs with induced bovine viral diarrhea virus infection. Am J Vet Res. 1989; 50(9): 1604–1608.

286. Lampert PW, Rodriguez M. Virus induced demyelination. In: Notkins AL, Oldstone MS, editors. Concepts in Viral Pathogenesis. Springer-Verlag New York Inc., New York: 1984. p. 260–268.

287. Langedijk JPM, Middel WGJ, Meloen RH, Kramps JA, Smith JA. Enzyme Linked Immunosorbent assay using a virus type spesific peptide based on a subdomain of envelope protein E^{rns} for diagnosis of pestivirus infections in swine. J Clin Microbiol. 2001; 39(3): 906–912.

288. Larson Bob L. Field Investigation of Abortion (1996). http://www.vet.ksu.edu/studentorgs/bovine/pdf/2008/Field_investigation_abortion.pdf

289. Larsson B, Fossum C, Alenius S. A cellular analysis of immunsuppression in cattle with mucosal disease. Res Vet Sci. 1988; 44(1): 71–75.

290. Laude H. Improved method for the purification of hog cholera virus grown in tissue culture. Arch Virol. 1977; 54(1–2): 41–51. DOI: 10.1007/BF01314377

291. Laude H. Nonarbo-togaviridae: comparative hydrodynamic properties of the pestivirus genus. Arch Virol. 1979; 62(4): 347–352. DOI: 10.1007/BF01318109

292. Laude H, Gelfi J. Properties of border disease virus as studied in a sheep cell line. Arch Virol. 1979; 62(4): 341–346. DOI: 10.1007/BF01318108

293. Le Potier MF, Mesplede A, Vannier P. Classical swine fever and other pestiviruses. In: Straw BE, Zimmerman JJ, D'Allaire S, Taylor DJ (eds). Diseases of Swine. Blackwell Publishing Ltf, Oxford, UK. 2006; 309–323.

294. Lecomte C, Pin JJ, DeMoerlooze L, Vandenbergh D, Lambert AP, Pastoret PP, Chappuis G. ELISA detection of bovine viral diarrhoea virus spesific antibodies using recombinant antigen and monoclonal antibodies. Vet Microbiol. 1990; 23(1–4): 193–201.

295. Lee KM, Gillespie JH. Propagation of virus diarrhea virus of cattle in tissue culture. Am J Vet Res. 1957; 18(69): 952–953.

296. Lees VW, Loewen KG, Deregt D, Knudsen R. Isolation of border disease virus from twin lambs in Alberta. Can Vet J. 1991; 32(11): 678–682.

297. Letellier C, Kerkhofs P, Wellemans G, Vanopdenbosch E. Detection and genotyping of bovine diarrhea virus by reverse transcriptionpolymerase chain amplification of the 5' untranslated region. Vet Microbiol. 1999; 64(2–3): 155–167.

298. Letellier C, Kerkhofs P. Real-time PCR for simultaneous detection and genotyping of bovine viral diarrhea virus. J Virol Methods. 2003; 114(1): 21–27.

299. Lewis KH, Porter WL, Manktelow BW. Hairy shaker disease and abortion: immunity and transmission via mucous membranes. Vet Rec. 1970; 86(18): 537–538.

300. Liang D, Sainz IF, Ansari IH, Gil LHVG, Vassilev V, Donis RO. The envelope glycoprotein E2 is a determinant of cell culture tropism in ruminant pestiviruses. J Gen Virol. 2003; 84: 1269–1274.

301. Liebler-Tenorio EM, Greiser-Wilke I, Pohlenz JF. Organ and tissue distribution of the antigen of the cytopathogenic bovinee virus diarrhea virus in the early and advanced phase of experimental mucosal disease. Arch Virol. 1997; 142(8): 1613–1634.

302. Liess B, Orban S, Frey HR, Trautwein G, Wiefel W, Blindow H. Studies on transplacental transmissibility of a Bovine Virus Diarrhea (BVD) vaccine virus in cattle. II. Inoculation of pregnant cows without detectable neutralizing antibodies to BVD virus 90–229 days before parturition (51st to 190th day of gestation). Zbl Vet Med B. 1984; 31(9): 669–681.

303. Lim CF, Carnegie PR. A survey of hairy shaker disease (border disease, hypomyelinogenesis congenita) in sheep. Aust Vet J. 1984; 61(6): 174–177. DOI: 10.1111/j.1751–0813.1984.tb07234.x

304. Lin C, Lindenbach BD, Pragai B, McCourt DW, Rice CM. Processing in the hepatitis C virus E2-NS2 region: Identification of p7 and two distinct E2-specific products with different C termini. J Virol. 1994; 68(8): 5063–5073.

305. Lipton HL, Calenoff M, Bandyopadhyay P, Miller SD, Dal Canto MCD, Gerety S, Jensen K. The 5' noncoding sequences from a less virulent Theiler's virus dramatically attenuate GDVII neurovirulence. J Virol. 1991; 65(8): 4370–4377.

306. Liu ST, Li SN, Wang DC, Chang SF, Chiang SC, Ho WC, Chang YS, Lai SS. Rapid detection of hog cholera virus in tissues by the polymerase chain reaction. J Virol Methods. 1991; 35(2): 227–236.

307. Lobmann M, Carlier P, Klassen CL, Zygraich N. Safety of a temperature-sensitive vaccine of bovine viral diarrhea virus in pregnant cows. Am J Vet Res. 1986; 47(3): 557–560.

308. Loken T. Border disease in goats in Norway. Res Vet Sci. 1982; 33(1): 130–131.

309. Loken T. Experimentally-induced border disease in goats. J Comp Pathol. 1987; 97(1): 85–89.

310. Loken T. Ruminant pestivirus infections in animals other than cattle and sheep. Vet Clin North Am Food Anim Pract. 1995; 11(3): 597–614.

311. Loken T. Border diseases in goats. In: Tempesta M (Ed.), Recent advances in goat diseases, International Veterinary Information Service. 2000. Erişim tarihi: 29.07.2009 On line: http://www.ivis.org/advances/Disease_ Tempesta/Loken/chapter_frm.asp?LA=1.

312. Loken T, Barlow RM. Border Disease in Norway. Acta Vet Scand. 1981; 22(1): 137–139.

313. Loken T, Bjerkas I. Experimental Pestivirus infections in Pregnant Goats. J Comp Path. 1991; 105: 123–140.

314. Loken T, Bjerkas I, Hyllseth B. Border disease in goats in Norway. Res Vet Sci. 1982a; 33(1): 130–131.

315. Loken T, Hyllseth B, Larsen HJ. Border Disease in Norway. Serological examination of affected sheep flocks. Acta Vet Scand. 1982b; 23(1): 46–52.

316. Loken T, Bjerkas I, Larsen HJ. Experimental pestivirus infections in newborn goat kids. J Comp Pathol. 1990; 103(3): 277–288.

317. Loken T, Krogsrud J, Bjerkas I. Outbreaks of border disease in goats induced by a pestivirus-contaminated orf vaccine, with virus transmission to sheep and cattle. J Comp Pathol. 1991; 104(2): 195–209.

318. Lopez OJ, Osorio FA, Donis RO. Rapid detection of bovine viral diarrhea virus by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol. 1991; 29(3): 578–582.

319. Lopez OJ, Osorio FA, Kelling CL, Donis RO. Presence of bovine viral diarrhoea virus in lymhoid cell populations of persistently infected cattle. J Gen Virol. 1993; 74(5): 925–929.

320. Lowings JP, Paton DJ. Amino acid sequence of the border disease virus (Moredun strain) major glycoprotein. Proceedings of the Second Symposium on Pestivirus, Annecy, 1–3 October 1992.

321. Lowings JP, Ibata G, Needham J, Paton DJ. Classical swine fever diversity and evolution. J Gen Virol. 1996; 77(6): 1311–1321.

322. Macadam AI, Stuart PR, Ferguson G, Dunn G, Skuce R, Almond JW, Minor PD. The 5′ noncoding region of the type 2 poliovirus vaccine strain contains determinants of attenuation and temperature sensitivity. Virology. 1991; 181(2): 451–458.

323. Mackay CR, Beya M-F, Matzinger P. T cells express a unique surface molecule appearing late during thymic development. Eur J Immunol. 1989; 19(8): 1477–1483. DOI: 10.1002/eji.1830190820

324. Magar R, Minoncha HC, Montpetit C, Carman PS, Lecomte J. Typing of cytopathic and noncytopathic bovine viral diarrhea virus reference and Canadian field strains using a neutralizing monoclonal antibody. Can J Vet Rec. 1988; 52(1): 42–45.

325. Malmquist WA. Bovine viral diarrhea-mucosal disease: etiology, pathogenesis and applied immunity. J Am Vet Med Assoc. 1968; 152(6): 763–767.

326. Manktelow BW, Porter WL, Lewis KHC. Hairy shaker disease of lambs. New Zeal Vet J. 1969; 17(12): 245–248.

327. Marco I, Lopez-Olvera JR, Rosell R, Vidal E, Hurtado A, Juste R, Pumarola M, Lavin S. Severe outbreak of disease in the southern chamois (Rupicapra pyrenaica) associated with border disease virus infection. Vet Microbiol. 2007; 120(1–2): 33–41.

328. Marco I, Rosell R, Cabezon O, Mentaberre G, Casas E, Velarde R, Lopez-Olvera JR, Hurtado A, Lavin S. Epidemiological study of border disease virus infection in Southern chamois (Rupicapra pyrenaica) after an outbreak of disease in the Pyrenees (NE Spain). Vet Microbiol. 2008; 127: 29–38.

329. Marco I, Rosell R, Cabezon O, Mentaberre G, Casas E, Velarde R, Lavin S. Border disease virus among Chamois, Spain. Emerg Infect Dis. 2009a; 15(3): 448–451.

330. Marco I, Rosell R, Cabezon O, Beneria M, Mentaberre G, Casas E, Hurtado A, Lopez-Olvera JR, Lavin S. Serologic and virologic investigations into pestivirus infection in wild and domestic ruminants in the Pyrenees (NE Spain). Res Vet Sci. 2009b; 87: 149–153.

331. Mars MH, Bruschke CJM, Van Oirschot JT. Airbone transmission of BHV–1, BRSV, and BVDV among cattle is possible under experimental conditions. Vet Microbiol. 1999; 66(3): 197–207.

332. McClurkin AW, Littledike ET, Cutlip RC, Frank GH, Coria MF, Bolin SR. Production of cattle immunotolerant to bovine viral diarrhea virus. Can J Comp Med. 1984; 48(2): 156–161.

333. McClurkin AW, Bolin SR, Coria MF. Isolation of cytopathic and noncytopathic bovine viral diarrhea virus from the spleen of cattle and chronically affected with bovine viral diarrhea. J Am Vet Med Assoc. 1985; 186(6): 568–569.

334. McGoldrick A, Lowings JP, Ibata G, Sands JJ, Belak S, Paton DJ. A novel approach to the detection of classical swine fever virus by RT-PCR with a fluorogenic probe (TaqMan). J Virol Methods. 1998; 72(2): 125–135.

335. McGoldrick A, Bensaude E, Ibata G, Sharp G, Paton DJ. Closed one-tube reverse transcription nested polymerase chain reaction for the detection of pestiviral RNA with fluorescent probes. J Virol Methods. 1999; 79(1): 85–95.

336. McGowan MR, Kirkland PD. Early reproductive loss due to bovine pestivirus infection. Br Vet J. 1995; 151(3): 263–270. DOI: 10.1016/S0007–1935(95)80176–6

337. McGowan MR, Kirkland PD, Richards SG, Littlejohns IR. Increased reproductive losses in cattle infected with bovine pestivirus around the time of insemination. Vet Rec. 1993; 133(2): 39–43.

338. Medscape 2008. http://img.medscape.com/fullsize/migrated/468/215/iim468215.fig2.gif Erişim Tarihi: 25.07.2008

339. Mendez E, Ruggli N, Collett MS, Rice CM. Infectious bovine viral diarrhea virus (strain NADL) RNA from stable cDNA clones: A cellular insert determines NS3 production and viral cytopathogenicity. J Virol. 1998; 72(6): 4737–4745.

340. Meyers G, Thiel HJ. Cytopathogenicity of classical swine fever virus caused by defective interfering particles. J Virol. 1995; 69(6): 3683–3689.

341. Meyers G, Thiel HJ. Molecular characterization of pestiviruses. Adv Virus Res. 1996; 47: 53–118. DOI: 10.1016/S0065–3527(08)60734–4

342. Meyer H, Liess B, Frey HR, Hermanns W, Trautwein G. Experimental transplacental transmission of hog colera virus in pigs. IV. Virological and serological studies in newborn piglets. Zentralbl Veterinarmed B. 1981; 28(8): 659–668.

343. Meyers G, Rumenapf T, Thiel HJ. Molecular cloning and nucleotide sequence of the genome of hog cholera virus. Virology. 1989; 171(2): 555–567.

344. Meyers G, Tautz N, Dubovi EJ, Thiel HJ. Viral cytopathogenicity correlated with integration of ubiquitin-coding sequences. Virology. 1991; 180(2): 602–616.

345. Meyers G, Tautz N, Stark R, Brownlie J, Dubovi EJ, Collett MS, Thiel HJ. Rearrangement of viral sequences in cytopathogenic pestiviruses. Virology. 1992; 191(1): 368–386.

346. Meyers G, Tautz N, Becher P, Thiel HJ, Kummerer BM. Recovery of cytopathogenic and noncytopathogenic bovine viral diarrhea viruses from cDNA constructs. J Virol. 1996; 70(12): 8606–8613.

347. Meyers G, D Stoll, Gunn M. Insertion of a sequence encoding light chain 3 of microtubule-associated proteins 1A and 1B in a pestivirus genome: connection with virus cytopathogenicity and induction of lethal disease in cattle. J Virol. 1998; 72(5): 4139–4148.

348. Meyers G, Saalmuller A, Buttner M. Mutations abrogating the RNase activity in glycoprotein E(rns) of the pestivirus classical swine fever virus lead to virus attenuation. J Virol. 1999; 73(12): 10224–10235.

349. Meyling A, Jensen AM. Transmission of bovine diarrhoea virus (BVDV) by artificial insemination (AI) with semen from persistently infected bull. Vet Microbiol. 1988; 17(2): 97–105.

350. Mignon B, Dubuisson J, Baranowski E, Koromyslov I, Ernst E, Boulanger D, Waxweiler S, Pastoret PP. A monoclonal ELISA for bovine viral diarrhoea pestivirus antigen detection in persistently infected cattle. J Virol Methods. 1991; 35(2): 177–188.

351. Mignon B, Waxweiler S, Thiry E, Boulanger D, Dubuisson J, Pastoret PP. Epidemiological evaluation of a monoclonal ELISA detecting bovine viral diarrhoea pestivirus antigens in field blood samples of persistently infected cattle. J Virol Methods. 1992; 40(1): 85–94.

352. Minocha HC, Xue W, Reddy JR. A 50 kDa membrane protein from bovine kidney cells is a putative receptor for bovine viral diarrhea virus (BVDV). Adv Exp Med Biol. 1997; 412: 145–148.

353. Mizushima H, Hijikata M, Asabe S-I, Hirota M, Kimura K, Shimotohno K. Two hepatitis C virus glycoprotein E2 products with different C termini. J Virol. 1994; 68(10): 6215–6222.

354. Moen A, Sol J, Sampimon O. Indication of transmission of BVDVin the absence of persistently infected (PI) animals. Prev Vet Med. 2005; 72(1–2): 93–98. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2005.08.014

355. Moennig V. Pestiviruses: A Review. Vet Microbiol. 1990; 23(1–4): 35–54.

356. Moennig V, Plagemann G. The pestiviruses. Adv Virus Res. 1992; 41: 53–98.

357. Moennig V, Frey HR, Liebler E, Pohlenz J, Liess B. Reproduction of mucosal disease with cytopathogenic bovine viral diarrhea virus selected in vitro. Vet Rec. 1990; 127(8): 200–203.

358. Moennig V, Liess B. Pathogenesis of intrauterine infections with bovine viral diarrhea virus. Vet Clin North Am Food Anim Pract. 1995; 11(3): 477–487.

359. Monies RJ, Paton DJ, Vilcek S. Mucosal disease-like lesions in sheep infected with Border disease virus. Vet Rec. 2004; 155(24): 765–769.

360. Moormann RJM. Characterization of hog cholera virus (HVC) RNA. Abstracts of the VII[th] International Congress of Virology, Edmonton, Canada, 9–14 August, 1987. p. 81.

361. Moormann RJ, Hulst MM. Hog cholera virus: Identification and characterization of the viral RNA and the virus-specific RNA synthesized in infected swine kidney cells. Virus Res. 1988; 11(4): 281–291. DOI: 10.1016/0168–1702(88)90002–0

362. Moormann RJM, Warmerdam PAM, Van der Meer B, Schaaper WMM, Wensvoort G, Hulst MM. Molecular cloning and nucleotide sequence of hog cholera virus strain Brescia and mapping of the genomic region encoding envelope protein E1. Virology. 1990; 177(1): 184–198.

363. Moser C, Stettler P, Tratschin JD, Hofmann MA. Cytopathogenic and noncytopathogenic RNA replicons of classical swine fever virus. J Virol. 1999; 73(9): 7787–7794.

364. Motha MXJ, Tham K. Pestivirus infection in a llama (lama glama). New Zeal Vet J. 1992; 40(3): 126–126.

365. Möller JR, McLenigan M, Potts BJ, Quarles RH. Effects of congenital infection of sheep with Border disease virus on myelin proteins. J Neurochem. 1993; 61(5): 1808–1812. DOI: 10.1111/j.1471–4159.1993.tb09820.x

366. Munoz-Zanzi CA, Hietala SK, Thurmond MC, Johnson WO. Quantification, risk factors, and health impact of natural congenital infection with bovine viral diarrhea virus in dairy cattle. Am J Vet Res. 2003; 64(3): 358–365.

367. Nettleton PF. Pathogenesis and epidemiology of border disease. Ann Rech Vet. 1987; 18(2): 147–155.

368. Nettleton PF. Pestivirus infection in ruminants other than cattle. Rev Sci Tech Off Int Epizoot. 1990; 9: 131–150.

369. Nettleton PF. Border Disease. In: Martin WB, Aitken ID, editors. Disease of Sheep. Second Ed. Oxford Blackwell Scientific Publications; 1991. p.58–65. ISBN: 0632 02957–9.

370. Nettleton PF. Border Disease. In: Martin WB, Aitken ID, editors. Diseases of Sheep. Third ed. Oxford Blackwell Scientific Publications; 2000.

371. Nettleton PF, Entrican G. Ruminant pestiviruses. Br Vet J. 1995; 151(6): 615–641. DOI: 10.1016/S0007–1935(95)80145–6

372. Nettleton PF, Willoughby K. Border disease. OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Organization International des Epizooties, Paris, France. 2008; 963–973.

373. Nettleton PF, Herring JA, Sinclair JA, Quirie L. The epidemiology of Bovine Viral Diarrhoea Virus. Proc Sos Vet Epid. 1985; 42–53.

374. Nettleton PF, Gilmour JS, Barlow RM, Gardiner AC. Border disease: the different effects of non-cytopathic and cytopathic virus in pregnant sheep. Abstracts of VII International Congress of Virology (Edmonton, Alberta, Canada, August 9–14), 1987; p. 81.

375. Nettleton PF, Gilmour JS, Herring JA, Sinclair JA. The production and survival of lambs persistently infected with border disease virus. Comp Immun Microbiol Infect Dis. 1992; 15(3): 179–188.

376. Nettleton PF, Gilray JA, Russo P, Dlissi E. Border Disease of sheep and goats. Vet Res. 1998; 29(3-4): 327–340.

377. Neyts J, Leyssen P, De Clercq E. Infections with flaviviridae. Verh K Acad Geneeskd Belg. 1999; 61: 661–697.

378. Niemi SM, Evermann JF, Huffman EM, Kirk JH. Border Disease Virus Isolation from Postpartum Ewes. Am J Vet Res. 1982; 43(1): 86–88.

379. Niskanen R, Lindberg A. Transmission of bovine viral diarrhoea virus by unhygienic vaccination procedures, ambient air and from contaminated pens. J Vet. 2003; 165(2): 125–130. DOI: 10.1016/S1090–0233(02)00161–2

380. Niskanen R, Alenius S, Larsson B, Junitti N. Evaluation of an Enzyme-linked Immunosorbent Assay for detection of antibodies to BVDV in milk. J Vet Med B. 1989; 36(2): 113–118.

381. Nodelijk G, de Jong MC, van Leengoed LA, Wensvoort G, Pol JM, Steverink PJ, Verheijden JH. A quantitative assessment of the effectivenessof PRRSV vaccination in pigs under experimental conditions. Vaccine. 2001; 19(27): 3636–3644. DOI: 10.1016/S0264-410X(01)00099–8

382. Noguchi T, Sugisaki T, Tsukada Y. Postnatal action of growth and thyroid hormones on the retarded cerebral myelinogenesis of Snell dwarf mice (dw). J Neurochem. 1982; 38: 257–263. DOI: 10.1111/j.1471–4159.1982.tb10878.x

383. Oğuzoğlu TÇ, Tan MT, Toplu N, Demir AB, Dağalp SB, Karaoğlu T, Özkul A, Alkan F, Burgu İ, Haas L, Greiser-Wilke I. Border disease virus (BDV) infections of small ruminants in Turkey: A new BDV subgroup? Vet Microbiol. 2009; 135(3–4): 374–379.

384. Ohmann HB. BVD virus antigens in tissues of persistently viraemic, clinically normal cattle: implications for the pathogenesis of clinically fetal disease. Acta Vet Scand. 1988; 29(1): 77–84.

385. OIE (2008) Border Disease. Chapter 2.7.1. In Ovidae and Capridae Section 2.7., p.963-973.

386. Okur-Gumusova S, Yazıcı Z, Albayrak H. Pestivirus seroprevalence in sheep populations from inland and coastal zones of Turkey. Revue Med Vet. 2006; 157: 595–598.

387. Olde Riekerink RGM, Dominici A, Barkema HW, de Smit AJ. Seroprevalence of pestivirus in four species of alpine wild ungulates in the High Valley of Susa, Italy. Vet Microbiol. 2005; 108(3–4): 297–303. DOI: 10.1016/j.vetmic.2005.04.014

388. O'Neill GR, O'connor M, O'rolly JP. A survey of antibodies to pestivirus in sheep in the Republic of Ireland. Irish Vet J. 2004; 57(9): 525–530.

389. Orban S, Liess B, Hafez SM, Frey HR, Blindow H, Sasse-Patzer B. Studies on transplacental transmissibility of a bovine virus diarrhoea (BVD) vaccine virus. I. Inoculation of pregnant cows 15 to 90 days before parturition (190th to 265th day of gestation). J Vet Med B. 1983; 31(9): 619–634.

390. Orr MB (1982) Pathology of the skinand fleece. In: R.M. Barlow and D.S.P.Patterson (Editors), Border Disease of sheep: A Virus Induced Teratogenic Disorder (Fortschritte der Veterinarmadizin, Heft 36). Paul Parey, Berlin, Hamburg, 13–21.

391. Orr MB, Barlow RM. Experiments in border disease X. The postnatal skin lesion in sheep and goats. J Comp Pathol. 1978; 88(2): 295–302.

392. Orr MB, Montgomery H, Gill J, Smith R. Abortion in goats: a field study. Surveillance. 1987; 14: 5–6.

393. Osburn BI, Grenshaw GL, Jackson TA. Unthriftiness, hairy fleece, and tremors in newborn lambs. J Am Vet Med Assoc. 1972; 160(4): 442–445.

394. Osburn BI, Clarke GL, Stewart WC, Sawyer M. Border disease like syndrome in Iambs: antibodies to hog cholera and bovine viral diarrhea viruses. J Am Vet Med Assoc. 1973; 163: 1165–1167.

395. Öztürk A. Pratik Koyunculuk. T.C.Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Lalahan Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü Yetiştirici Broşürleri–9. 2000; 1–18.

396. Palfi V, Houe H, Philipsen J. Studies on the decline of bovine diarrhoea virus (BVDV) maternal antibodies and detectability of BVDV in persistently infected calves. Acta Vet Scand. 1993; 34(1): 105–107.

397. Park JS, Moon HJ, Lee BC, Hwang WS, Yoo HS, Kim DY, Park BK. Comporative analysis on the 5'-untranslated region of bovine viral diarrhea virus isolated in Korea. Res Vet Sci. 2004; 76(2): 157–163.

398. Parsonson IM, O'Halloran ML, Zee YC, Snowdon WA. The effects of bovine viral diarrhea-mucosal disease (BVD) virus on the ovine foetus. Vet Microbiol. 1979; 4(4): 279–292.

399. Paton DJ. Pestivirus diversity. J Comp Pathol. 1995; 112(3): 215–236. DOI: 10.1016/S0021–9975(05)80076–3

400. Paton DJ, Simpson V, Done SH. Infection of pigs and cattle with bovine viral diarrhoea virus on a farm in England. Vet Rec. 1992a; 131(9):185–188.

401. Paton DJ, Lowings JP, Barrett AD. Epitope mapping of the gp53 envelope protein of bovine viral diarrhea virus. Virology. 1992b; 190(2): 763–772.

402. Paton DJ, Sands JJ, Lowings JP, Smith JE, Ibata G, Edwards S. A proposed division of the pestivirus genus using monoclonal antibodies, supported by cross-neutralization assays and genetic sequencing. Vet Res. 1995; 26(2): 92–109.

403. Patterson DSP, Sweasey D. Hypocupraemia in experimental border disease. Vet Rec. 1973; 93(18): 484–485.

404. Patterson DSP, Terlecki S, Done JT, Sweasey D, Hebert CN. Neurochemistry of the spinal cord in experimental Border disease (hypomyelinogenesis congenita) of lambs. J Neurochem. 1971; 18(6): 883–894. DOI: 10.1111/j.1471–4159.1971.tb12018.x

405. Patterson DSP, Brush PJ, Foulkes JA, Sweasey D. Copper metabolism and the composition of wool in Border disease. Vet Rec. 1974; 95(10): 214–215.

406. Pearson A. White liver disease and pestivirus infection in goat kids. Surveillance. 1987; 14(3): 21.

407. Pearson JE. Hog cholera diagnostic techniques. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 1992; 15(3): 213–219.

408. Pellerin C, Hurk JVD, Lecomte J, Tijssen P. Identification of a new group of bovine viral diarrhea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. Virology. 1994; 203(2): 260–268.

409. Pelletier J, Sonenberg N. Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. Nature. 1988; 334(6180): 320–325. DOI:10.1038/334320a0

410. Pelletier J, Flynn ME, Kaplan G, Racaniello V, Sonenberg N. Mutational analysis of upstream AUG codons of poliovirus RNA. J Virol. 1988; 62(12): 4486–4492.

411. Perdrizet JA, Rebhun WC, Dubovi EJ, Donis RO. Bovine virus diarrhea clinical syndromes in dairy herds. Cornall Vet. 1987; 77(1): 46–74.

412. Pfeffer M, Freyburg MV, Kaaden OR, Beer M. A universal 'onetube' RT-PCR protocol for amplifying isolates of bovine viral diarrhoea virus. Vet Res Commun. 2000; 24(7): 491–503.

413. Physick-Sheard PW, Hopkins JB, O'Connor RD. A border disease-like syndrome in a southern Ontario sheep flock. Can Vet J. 1980; 21(2): 53–60.

414. Pilipenko EV, Blinov VM, Romanova LI, Sinyakov AN, Maslova SV, Agol VI. Conserved structural domains in the 5'-untranslated region of picornaviral genomes: an analysis of the segment controlling translation and neurovirulence. Virology. 1989; 168(2): 201–209.

415. Pioz M, Loison A, Gibert P, Dubray D, Menaut P, Le Tallec B, Artois M, Gilot-Fromont E. Transmission of a pestivirus infection in a population of Pyrenean chamois. Vet Microbiol. 2007; 119(1): 19–30.

416. Pizarro-Lucero J, Celedon MO, Navarro C, Ortega R, Gonzalez D. Identification of a pestivirus isolated from a free-ranging pudu (Pudu puda) in Chile. Vet Rec. 2005; 157(10): 292–294.

417. Plant JW, Littlejohns IR, Gardiner AC, Vantsis JT, Huck RA. Immunological relationship between border disease, mucosal disease and swine fever. Vet Rec. 1973; 92(17): 455.

418. Plant JW, Gard GP, Acland HM. A mucosal disease virus infection of the pregnant ewe as a cause of a border disease-like condition. Aust Vet J. 1976; 52(6): 247–249. DOI: 10.1111/j.1751–0813.1976.tb00098.x

419. Plant JW, Acland HM, Gard GP, Walker KH. Clinical variations of border disease in sheep according to the source of the inoculum. Vet Rec. 1983a; 113(3): 58–60.

420. Plant JW, Walker KH, Acland HM, Gard GP. Pathology in the ovine foetus caused by an ovine pestivirus. Aust Vet J. 1983b; 60(5): 137–140.

421. Pocock DH, Howard CJ, Clarke MC, Brownlie J. Variation in the intracellular polypeptide profiles from different isolates of bovine viral diarrhea virus. Arch Virol. 1987; 94(1–2): 43–53. DOI: 10.1007/BF01313724

422. Poole TL, Wang C, Popp RA, Potgieter LND, Siddiqui A, Collett MS. Pestivirus translation occurs by internal ribosome entry. Virology. 1995; 206(1): 750–754.

423. Porter WL, Lewis KHC, Manktelow BW. Hairy Shaker Disease of lambs: further studies on acquired immunity, abortion and effects on foetal growth. New Zeal Vet J. 1972; 20 (1-2): 4-7.

424. Porterfield JS, Casals J, Chumakov MP, Gaidamouich SY, Hannovn C, Homes IH, Horzinick MC, Musogay M, Oker-Blum N, Russell RK, Trent DW. Togaviridae. Intervirology. 1978; 9: 129–148.

425. Potgieter LND. Bovine respiratory tract disease caused by bovine viral diarrhea virus. Vet Clin North Am Food Anim Pract. 1997; 13(3): 471–481.

426. Potts BJ, Johnson KP, Osburn BI. Border disease: tissue culture studies of the virus in sheep. Am J Vet Res. 1982a; 43(8): 1460–1463.

427. Potts BI, Osburn BI, Johnson KP. Border disease: Experimental reproduction in sheep, using a virus replicated in tissue culture. Am J Vet Res. 1982b; 43(8): 1464–1466.

428. Potts BJ, Berry LT, Osbourn BI, Johnson KP. Viral persistence and abnormalities of the central nervous system after congenital infection of sheep with border disease virus. J Infect Dis. 1985; 151(2): 337–343.

429. Pratelli A, Bollo E, Martella V, Guarda F, Chiocco D, Buonavoglia C. Pestivirus infection in small ruminants: virological and histopathological findings. New Microbiol. 1999; 22(4): 351-356.

430. Pratelli A, Martella V, Cirone F, Buonavoglia D, Elia G, Tempesta M, Buonavoglia C. Genomic characterization of pestiviruses isolated from lambs and kids in southern Italy. J Virol Methods. 2001; 94(1-2): 81-85.

431. Pringle CR. Virus taxonomy–1999, The universal system of virus taxonomy, updated to include the new proposals ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses during 1998. Arch Virol. 1999; 144(2): 421–429. DOI: 10.1007/s007050050515

432. Pritchard WR. The bovine viral diarrhea-mucosal disease complex. Adv Vet Sci. 1963; 41: 1–47.

433. Purchio AF, Larson R, Collett MS. Characterization of virus-specific RNA synthesized in bovine cells infected with bovine viral diarrhea virus. J Virol. 1983; 48(1): 320–324.

434. Purchio AF, Larson R, Torborg LL, Collett MS. Cell-free translation of bovine viral diarrhea virus RNA. J Virol. 1984; 52(3): 973–975.

435. Qi F, Ridpath JF, Lewis T, Bolin SR, Berry ES. Analysis of the bovine viral diarrhea virus genome for possible cellular insertions. Virology. 1992; 189(1): 285–292.

436. Qi F, Ridpath JF, Berry ES. Insertion of a bovine SMT3B gene in NS4B and duplication of NS3 in a bovine viral diarrhea virus genome correlate with the cytopathogenicity of the virus. Virus Res. 1998; 57(1): 1–9. DOI: 10.1016/S0168–1702(98)00073–2

437. Racaniello VR, Meriam C. Poliovirus temperature-sensitive mutant containing a single nucleotide deletion in the 5'-noncoding region of the viral RNA. Virology. 1986; 155(2): 498–507.

438. Radostits OM, Littlejohns IR. New concepts in the pathogenesis, diagnosis and control of disease caused by Bovine Viral Diarrhea Virus. Can Vet J. 1988; 29(6): 513-528.

439. Radostits OM, Blood DC, Gay CC. Border Disease. Veterinary Medicine, A textbook of the disease of cattle, sheep, pigs, goats and horses. Eighth ed. Bailliere Tindall, London; 1994. p.1121–1125. ISBN: 0 7020 1592-X

440. Radwan GS, Brock KV, Hogan JS, Smith KL. Development of a PCR amplification assay as a screening test using bulk milk samples for identifying dairy herds infected with bovine viral diarrhea virus. Vet Microbiol. 1995; 44(1): 77–91.

441. Ramesh KA, Raisch K. Intracellular virus-induced polypeptides of pestivirus border disease virus. Virus Research. 1990: 16(1): 95–106. DOI: 10.1016/0168–1702(90)90046-E

442. Rasmussen TB, Uttenthal A, Reimann I, Nielsen J, Depner K, Beer M. Virulence, immunogenicity and vaccine properties of a novel chimeric pestivirus. J Gen Virol. 2007; 88: 481–486.

443. Rasmussen TB, Reimann I, Hoffmann B, Depner K, Uttenthal A, Beer M. Direct recovery of infectious pestivirus from a full-length RT-PCR amplicon. J Virol Methods. 2008; 149(2): 330–333.

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

445. Reid HW. Ruminant pestivirus infections-advances in research bring prospects for their control? Br Vet J. 1995; 151(6): 597–598. DOI: 10.1016/S0007–1935(95)80142–1

446. Reimann I, Depner K, Trapp S, Beer M. An avirulent chimeric pestivirus with altered cell tropism protects pigs against lethal infection with classical swine fever virus. Virology. 2004; 322(1): 143–157. DOI: 10.1016/j.virol.2004.01.028

447. Renard A, Guiot C, Schmetz D, Dagenais L, Pastoret PP, Dina D, Martial JA. Molecular cloning of bovine diarrhea virus sequences. DNA. 1985; 4(6): 429–438.

448. Renard A, Schmetz D, Guiot C, Brown-Shimmer S, Dagenais L, Pastoret PP, Dina D, Martial JA. Molecular cloning of the bovine viral diarrhea virus genomic RNA. Ann Rech Vet. 1987; 18(2): 121–125.

449. Renshaw RW, Ray R, Dobovi EJ. Comparison of virus isolation and RT-PCR assay for detection of bovine viral diarrhea virus in bulk milk tank samples. J Vet Diagn Invest. 2000; 12(2): 184–186.

450. Rice CM. Flaviviridae: the viruses and their replication. In: Fields, B.N. (Ed.), Virology, 3rd Edition. Raven, Philadelphia, PA; 1996. p. 931–961.

451. Rice CM, Lenches EM, Eddy SR, Shin SJ, Sheets RL, Strauss JH. Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for flavivirus gene expression and evolution. Science. 1985; 229(4715): 726–733. DOI: 10.1126/science.4023707

452. Richardson C (1982) Morphology. In: R.M. Barlow and D.S.P.Patterson (Editors), Border Disease of sheep: A Virus Induced Teratogenic Disorder (Fortschritte der Veterinarmadizin, Heft 36). Paul Parey, Berlin, Hamburg, 46–52.

453. Richardson C, Hebert CN, Done JT. Experimental Border disease in sheep: dose-response effect. Br Vet J. 1976; 132(2): 202–208.

454. Ridpath JF. BVDV genotypes and biotypes: practical implications for diagnosis and control. Biologicals. 2003; 31(2): 127–131. DOI: 10.1016/S1045–1056(03)00028–9

455. Ridpath JF, Bolin SR. The genomic sequence of a virulent bovine viral diarrhea virus (BVDV) from the type 2 genotype: detection of a large genomic insertion in a noncytopathic BVDV. Virology. 1995; 212(1): 39–46. DOI: 10.1006/viro.1995.1451

456. Ridpath JF, Bolin SR. Comparison of the complete genomic sequence of the border disease virus, BD31 to other pestivirus. Virus Res. 1997; 50(2): 237–243.

457. Ridpath JF, Bolin SR. Differentiation of types 1a, 1b and 2 bovine viral diarrhoea virus (BVDV) by PCR. Mol Cell Probes. 1998; 12(2): 101–106. DOI: 10.1006/mcpr.1998.0158

458. Ridpath JF, Bolin SR, Katz J. Comparison of nucleic acid hybridization and nucleic acid amplification using conserved sequences from the 5' noncoding region for detection of bovine viral diarrhea virus. J Clin Microbiol. 1993; 31(4): 986–989.

459. Ridpath JF, Bolin SR, Dubovi EJ. Segregation of bovine viral diarrhea virus into genotypes. Virology. 1994; 205(1): 66–74.

460. Ridpath JF, Neill JD, Frey M, Landgraf JG. Phylogenetic, antigenic and clinical characterisation of type 2 BVDV from North America. Vet Microbiol. 2000; 77(1–2): 145–155.

461. Rijnbrand R, van der Straaten T, van Rijn PA, Spaan WJM, Bredenbeek PJ. Internal entry of ribosomes is directed by the 59 noncoding region of classical swine fever virus and is dependent on the presence of an RNA pseudoknot upstream of the initiation codon. J Virol. 1997; 71(1): 451–457.

462. Risatti GR, Callahan JD, Nelson WM, Borca MV. Rapid detection of classical swine fever virus by a portable real-time reverse transcriptase PCR assay. J Clin Microbiol. 2003; 41(1): 500–505.

463. Roeder PL. Border disease virus isolation from postpartum ewes. Am J Vet Res. 1982; 43(7): 1322.

464. Roeder PL. Studies on Border disease virus, Ph. D. Thesis, University of London. 1984.

465. Roeder PL, Sweasey D, Terlecki S. Border Disease infection of the newborn lamb. Br Vet J. 1983; 139(2): 129–136.

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

467. Roehe PM, Woodward MJ, Edwards S. Characterization of p20 gene sequences from a border disease-like pestivirus isolated from pigs. Vet Microbiol. 1992; 33(1–4): 231–238.

468. Rossi CR, Bridgman CR, Kiesel GK. Viral contamination of bovine fetal lung cultures and bovine fetal serum. Am J Vet Res. 1980; 41(10): 1680–1681.

469. Russo P. La border disease. Bull Lab Vet. 1986; 21: 43–48.

470. Russo P, Delor V, Giauffret A. Border disease in France. Ann Rech Vet. 1987; 18(1): 103–105.

471. Russo P, Dlissi E, Nettleton PF. Border disease and abortion in small ruminants. Proceedings of 26th World Veterinary Association, 1999, Lyon, France, Mondial Vet.

472. Rümenapf T, Meyers G, Stark R, Thiel HJ. Hog cholera virus-Characterization of specific antiserum and identification of cDNA clones. Virology. 1989; 171(1): 18–27.

473. Rümenapf T, Meyers G, Stark R, Thiel HJ. Molecular characterization of hog cholera virus. Arch Virol Suppl. 1991a; 3: 7–18.

474. Rümenapf T, Stark R, Meyers G, Thiel HJ. Structural proteins of hog cholera virus expressed by vaccinia virus: Further characterization and induction of protective immunity. J Virol. 1991b; 65(2): 589–597.

475. Rümenapf T, Unger G, Strauss JH, Thiel HJ. Processing of the envelope glycoproteins of pestiviruses. J Virol. 1993; 67(6): 3288–3294.

476. Rümenapf T, Stark R, Heimann M, Thiel HJ. N-terminal protease of pestiviruses: Identification of putative catalytic residues by site-directed mutagenesis. J Virol. 1998; 72(3): 2544–2547.

477. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Ehrlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science. 1988; 239(4839): 487–491.

478. Saliki JT, Fulton RW, Hull SR, Dubovi EJ. Microtiter virus isolation and enzyme immunoassays for detection of bovine viral diarrhea virus in cattle serum. J Clin Microbiol. 1997; 35(4): 803–807.

479. Sakoda Y, Ozawa SI, Damrongwatanapokin S, Sato M, Ishikawa K, Fukusho A. Genetic heterogeneity of porcine and ruminant pestiviruses mainly isolated in Japan. Vet Microbiol. 1999; 65(1): 75–86.

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

481. Sandvik T, Paton DJ, Lowings PJ. Detection and identification of ruminant and porcine pestiviruses by nested amplification of the 5' untranslated cDNA region. J Virol Methods. 1997; 64(1): 43–56.

482. Sandvik T, Davis L, Ibata G. Genetic typing of pestiviruses from Norwegian cattle and sheep. In: Proceedings of the Fifth Pestivirus Symposium, Cambridge, UK, August 26–29, 2002. p: 91.

483. Sands JJ, Harkness JW. The distribution of antibodies to Border disease virus among sheep in England and Wales. Res Vet Sci. 1978; 25: 241–242.

484. Sarlieve LL, Bouchon R, Koehl C, Neskovic NM. Cerebroside and sulfatide biosynthesis in the brain of Snell dwarf Mouse: effects of thyroxine and growth hormone in the early postnatal period. J Neurochem. 1983; 40(4): 1058–1062. DOI: 10.1111/j.1471–4159.1983.tb08092.x

485. Sawyer MM. Border disease of sheep: The disease in the newborn, adolescent and adult. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 1992; 15(3): 171–177.

486. Sawyer MM, Schore CE, Menzies PI, Osburn BI. Border disease in a flock of sheep: epidemiologic, laboratory and clinical findings. J Am Vet Med Assoc. 1986; 189(1): 61–65.

487. Sawyer MM, Schore CE, Osburn BI. Border disease of sheep-aspects for diagnostic and epidemiologic consideration. Arch Virol. 1991; 3: 97–100.

488. Sawyer MM, Williams LL, Odeon AC, Giri SN, Osburn BI. Arachidonic acid immunoregulation in lambs persistently infected with Border Disease virus. Comp Immun Microbiol Infect Dis. 1993; 16(4): 281–287.

489. Schaller P, Vogt HR, Strasser M, Nettleton PF, Peterhans E, Zanoni R. Seroprevalance of maedi-visna and border disease in Switzerland. Schweiz Arch Tierheilkd. 2000; 142(4): 145–153.

490. Schelp C, Greiser-Wilke I, Wolf G, Beer M, Moennig V, Liess B. Identification of cell membrane proteins linked to susceptibility to bovine viral diarrhoea virus infection. Arch Virol. 1995; 140(11): 1997–2009. DOI: 10.1007/BF01322688

491. Schein CH. From housekeeper to microsurgeon: The diagnostic and therapeutic potential of ribonucleases. Nat Biotechnol. 1997; 15: 529–536. DOI:10.1038/nbt0697–529

492. Scherer CFC, Flores EF, Weiblen R, Caron L, Irigoyen LF, Neves JP, Maciel MN. Experimental infection of pregnant ewes with bovine viral diarrhoea virus type–2 (BVDV–2): effect on the pregnancy and foetus. Vet Microbiol. 2001; 79(4): 285–299. DOI: 10.1016/S0378–1135(00)00357–6

493. Schirrmeier H, Strebelow G, Depner KR, Beer M. Heterogenicity of pestiviruses: determination and characterisation of novel genotypes and species. In: Proceedings of the 5th European Society of Veterinary Virology Pestivirus Symposium, 2002, Cambridge, England.

494. Schirrmeier H, Strebelow G, Depner K, Hoffmann B, Beer M. Genetic and antigenic characterization of an atypical pestivirus isolate, a putative member of a novel pestivirus species. J Gen Virol. 2004; 85(12): 3647– 3652.

495. Schmitt D, Wittkowski G. Studies of the spread of BVD-virus infections in hoofed game in Bavaia. Tierarztl Umsch. 1999; 54: 284–288.

496. Schneider R, Unger G, Stark R, Schneider-Scherzer E, Thiel HJ. Identification of a structural glycoprotein of an RNA virus as a ribonuclease. Science. 1993; 261(5125): 1169–1171. DOI: 10.1126/science.8356450

497. Schroeder BA, Balassu-Chan TC. Specific sequence amplification of bovine viral diarrhea virus nucleic acid. Arch Virol. 1990; 111(3–4): 239–246. DOI: 10.1007/BF01311057

498. Shannon AD, Richards SG, Kirkland PD, Moyle A. An antigen-capture ELISA detects pestivirus antigens in blood and tissues of immunotolerant carrier cattle. J Virol Methods. 1991; 34(1): 1–12.

499. Sharp MW, Rawson BC. The cost of Border disease infection in a commercial flock. Vet Rec. 1986; 119(6): 128–130.

500. Shaw IG. Border disease of sheep (hypomyelinogenesis). Agriculture. 1971; 78: 373–376.

501. Shaw IG, Winkler CE, Gibbons DF, Terlecki S, Hebert CN, Patterson DSP, Done JT. Border disease of sheep: vaccination or ewes before mating. Vet Rec. 1969; 84(6): 147–148.

502. Shimizu M, Satou K, Nishioka N, Yoshino T, Momotani E, Ishikawa Y. Serological characterization of viruses isolated from experimental mucosal disease. Vet Microbiol. 1989; 19(1): 13–21.

503. Shukla DD, Hoyne PA, Ward CW. Evaluation of complete genome sequences and sequences of individual gene products for the classification of hepatitis-C viruses. Arch Virol. 1995; 140(10): 1747–1761.

504. Silva ND, Zardoya R, Santurde G, Solana A, Castro JM. Rapid and sensitive detection of bovine viral diarrhoea virus genome in semen. J Virol Methods. 1995; 55(2): 209–218.

505. Snowdon WA, French EL. The bovine mucosal disease-swine fever virus complex in pigs. Aust Vet J. 1968; 44(4): 179–184. DOI: 10.1111/j.1751–0813.1968.tb09071.x

506. Snyder DS, Zimmerman TR Jr, Farooq M, Norton WT, Cammer W. Carbonic anhydrase, 5'-nucleotidase, and 2',3'-cyclic nucleotide–3'-phosphodiesterase activities in oligodendrocytes, astrocytes, and neurons isolated from the brains of developing rats. J Neurochem. 1983; 40(1): 120–127. DOI: 10.1111/j.1471–4159.1983.tb12661.x

507. Sockett D, Bolin D, Ridpath J, Bolin S. In Int Symp on Bovine Viral Diarrhoea Virus. A 50 year review., 1996; pp. 207. Cornell University, Ithaca, NY, USA.

508. Solomon JB. The plasental Barrier, Foetal and Neonatal Immunology, North Holland Publishing Company Ltd. London. 1971; 75–95.

509. Spagnulo-Weaver M, Allan GM, Kennedy S, Foster JC, Ader BM. Distribution of cytopathic and noncytopathic bovine viral diarrhea virus antigens in tissues of calves following acute experimental infection. J Vet Diagn Invest. 1997; 9(3): 287–297.

510. Spais AG, Papadopoulos O, Vantsis JT. An extensive outbreak of Border Disease in Greece (A preliminary report). Proceedings 20th World Veterinary Congress, Thessalonika. 1975; p. 622.

511. Sprinkle TJ, Zaruba ME, McKhann GM. Activity of 2',3'-cyclic nucleotide–3'-phosphodiesterase in regions of rat brain during development: quantative relationship to myelin basic protein. J Neurochem. 1978; 30(2): 309–314. DOI: 10.1111/j.1471–4159.1978.tb06531.x

512. Stalder HP, Pfaffen P, Rüfenacht J, Schaller P, Bachofen C, Marti S, Strasser M, Vogt HR, Peterhans E. Genetic heterogeneity of pestiviruses of ruminants in Switzerland. In: Proceedings of the 2nd European Symposium on BVDV Control, Porto, Potugal, 2004; p.16.

513. Stalder HP, Meier PH, Pfaffen G, Wageck-Canal C, Rüfenacht J, Schaller P, Bachofen C, Marti S, Vogt HR, Peterhans E. Genetic heterogeneity of pestiviruses of ruminants in Switzerland. Prev Vet Med. 2005; 72(1–2): 37–41. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2005.01.020

514. Stark R, Rümenapf T, Meyers G, Thiel H-J. Genomic localization of hog cholera virus glycoproteins. Virology. 1990; 174(1): 286–289.

515. Stark R, Meyers G, Rümenapf T, Thiel H-J. Processing of pestivirus polyprotein: Cleavage site between autoprotease and nucleocapsid protein of classical swine fever virus. J Virol. 1993; 67(12): 7088–7095.

516. Steck F, Lazary S, Fey H, Wandeler A, Huggler C, Oppliger G, Baumberger H, Kaderli L, Martig J. Immune responsiveness in cattle fatally affected by bovine virus diarrhea-mucosal disease. Zbl Vet Med. 1980; 27(6): 429–445.

517. Stegeman A. Aujeszky's disease (pseudorabies) virus eradication campaign in the Netherlands. Vet Microbiol. 1997; 55: 175–180.

518. Strauss JH, Strauss EG. The alphavirus: gene expression, replication and evolution. Microbiol Rev. 1994; 58: 491-562.

519. Straver PJ, Journee DLH, Binkhorst GJ. Neurological disorders, virus persistence and hypomyelination in calves due to intrauterine infections with bovine virus diarrhoea virus II. Virology and epizootiology. Vet Quart. 1983; 5(4):156–164.

520. Sullivan DG, Akkina RK. A nested polymerase chain reaction assay to differentiate pestiviruses. Virus Res. 1995; 38(2–3): 231–239. DOI: 10.1016/0168–1702(95)00065-X

521. Sullivan DG, Chang GJ, Trent DW, Akkina RK. Nucleotide sequence analysis of the structural gene coding region of the pestivirus border disease virus. Virus Res. 1994; 33(3): 219–228.

522. Sullivan DG, Chang GJ, Akkina RK. Genetic characterization of ruminant pestiviruses: sequence analysis of viral genotypes isolated from sheep. Virus Res. 1997; 47(1): 19–29.

523. Susa M, König M, Saalmüller A, Reddehase MJ, Thiel HJ. Pathogenesis of classical swine fever: B-lymphocyte deficiency caused by hog cholera virus. J Virol. 1992; 66(2): 1171–1175.

524. Swasdipan S, McGowan M, Phillips N, Bielefeldt-Ohmann H. Pathogenesis of transplacental virus infection: pestivirus replication in the placenta and fetus following respiratory infection. Microb Pathogenesis. 2002; 32(2): 49–60. DOI: 10.1006/mpat.2001.0480

525. Sweasey D, Patterson DSP, Richardson C, Harkness JW, Shaw IG, Williams WW. Border disease: a sequential study of surviving lambs and an assessment of its effect on profitability. Vet Rec. 1979; 104(20): 447–450.

526. Şimşek A, Yavru S, Öztürk F. Konya bölgesindeki koyunlarda bovine viral diarrhea virus enfeksiyonlarının serum nötralizasyon testi ile araştırılması. Veterinarium. 1997; 8(1–2): 45–47.

527. Tarry DW, Bernal L, Edwards S. Transmission of bovine virus diarrhoea virus by blood feeding flies. Vet Rec. 1991; 128(4): 82–84.

528. Tautz N, Meyers G, Thiel HJ. Processing of poly-ubiquitin in the polyprotein of an RNA virus. Virology. 1993; 197(1): 74–85.

529. Tautz N, Thiel HJ, Dubovi EJ, Meyers G. Pathogenesis of mucosal disease: a cytopathogenic pestivirus generated by an internal deletion. J Virol. 1994; 68(5): 3289–3297.

530. Tautz N, Elbers K, Stoll D, Meyers G, Thiel HJ. Serine protease of pestiviruses: determination of cleavage sites. J Virol. 1997; 71(7): 5415–5422.

531. Tautz N, Meyers G, Stark R, Dubovi EJ, Thiel HJ. Cytopathogenicity of a pestivirus correlates with a 27-nucleotide insertion. J Virol. 1996; 70(11): 7851–7858.

532. Tautz N, Harada T, Kaiser G, Rinck S, Behrens E, Thiel HJ. Establishment and Characterisation of Cytopathogenic and Noncytopathogenic Pestivirus Replicons. J Virol. 1999; 73(11): 9422–9432.

533. Taylor LF, Janzen ED, Van Donkersgoed J. Losses over a 2-year period associated with fetal infection with the bovine viral diarrhea virus in a beef cow-calf herd in Saskatchewan. Can Vet J. 1997; 38(1): 23–28.

534. TEARA(2009) http://www.teara.govt.nz/TheSettledLandscape/AnimalFarming/DiseasesOfSheepCattleAndDeer/5/ENZ-Resources/Standard/3/en Erişim tarihi 14.06.2009

535. Tegtmeier C, Stryhn H, Uttenthal A, Kjeldsen AM, Nielsen TK. Seroprevalence of border disease in Danish sheep and goat herds. Acta Vet Scand. 2000; 41(4): 339–344.

536. Terlecki S. Border disease: a viral teratogen of farm animals. Vet Annu. 1977; 17: 74–79.

537. Terlecki S, Roeder PL. Border disease. Effects of virus administered intracerebrally to newborn lambs. J Comp Pathol. 1983; 93(2): 243–249.

538. Terlecki S, Hebert CN, Done JT. Morphology of experimental Border disease of lambs. Res Vet Sci. 1973; 15(3): 310–317.

539. Terlecki S, Richardson C, Done JT, Harkness JW, Sands JJ, Shaw IG, Winkler CE, Duffell SJ, Patterson DS, Sweasey D. Pathogenicity for the sheep foetus of bovine virus diarrhoea-mucosal disease virus of bovine origin. Br Vet J. 1980; 136(6): 602–611.

540. Terpstra C. Detection of Border disease antigen in tissues of affected sheep and in cell cultures by immunofluorescence. Res Vet Sci. 1978; 25(3): 350–355.

541. Terpstra C. Border disease: virus persistence, antibody response and transmission studies. Res Vet Sci. 1981; 30(2): 185–191.

542. Terpstra C. Border disease: a congenital infection of small ruminants. Prog Vet Microbiol Immunol. 1985; 1: 175–198.

543. Terpstra C, Wensvoort G. Natural infections of pigs with bovine viral diarrhoea virus associated with signs resembling swine fever. Res Vet Sci. 1988; 45(2): 137–142.

544. Terpstra C, Wensvoort G. A congenital persistent infection of bovine virus diarrhoea virus in pigs: clinical, virological and immunological observations. Vet Q. 1997; 19(3): 97–101.

545. Tetik A. Koyunculuğun sorunları ve çözüm yolları. 2008; www.konyatarim.gov.tr Erişim tarihi 22.05.2008

546. Thabti F, Fronzaroli L, Dlissi E, Guibert JM, Hammami S, Pepin M, Russo P. Experimental model of border disease virus infection in lambs: comparative pathogenicity of pestiviruses isolated in France and Tunisia. Vet Res. 2002; 33: 35–45. DOI: 10.1051/vetres:2001004

547. Thabti F, Letellier C, Hammami S, Pepin M, Ribiere M, Mesplede A, Kerkhofs P, Russo P. Detection of a novel border disease virus subgroup in Tunusian sheep. Arch Virol. 2005; 150(2): 215–229. DOI: 10.1007/s00705–004–0427–3

548. Thiel HJ, Stark R, Weiland E, Rumenapf T, Meyers G. Hog cholera virus: molecular composition of virions from a pestivirus. J Virol. 1991; 65(9): 4705–4712.

549. Thiel HJ, Meyers G, Stark R, Tautz N, Rumenapf T, Unger G. Conzelmann KK. Molecular characterization of positive-strand RNA viruses: pestiviruses and the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). Arch Virol Suppl. 1993; 7: 41–52.

550. Thiel HJ, Plagemann PGW, Moennig V. Pestiviruses, In Fields BN, Knipe DM, Howley PM (ed.), Fields virology, 3rd ed., vol. 1. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, Pa; 1996. p. 1059-1073.

551. Thiel HJ, Collett MS, Gould EA, Heinz FX, Houghton M, Meyers G, Purcell RH, Rice CM. Genus Pestivirus. In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA. (Eds.), Virus Taxonomy—Eighth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press, 2005, p. 988–998.

552. Thür B, Hilbe M, Strasser M, Ehrensperger F. Immunohistochemical diagnosis of pestivirus infection associated with bovine and ovine abortion and perinatal death. Am J Vet Res. 1997; 58(12): 1371–1375.

553. Tijssen P, Pellerin C, Lecomte J, Van den Hurk J. Immunodominant E2 (gp53) sequences of highly virulent bovine viral diarrhea group II viruses indicate a close resemblance to a subgroup of border disease viruses. Virology. 1996; 217(1): 356–361. DOI: 10.1006/viro.1996.0123

554. Toplak I, Sandvik T, Barlic-Maganja D, Grom J, Paton DJ. Genetic typing of bovine viral diarrhoea virus: most Slovenian isolates are of genotypes 1d and 1f. Vet Microbiol. 2004; 99(3–4): 175–185.

555. Tratschin JD, Moser C, Ruggli N, Hofmann MA. Classical swine fever virus leader proteinase N pro is not required for viral replication in cell culture. J Virol. 1998; 72(9): 7681–7684.

556. Trautwein G, Hewicker M, Liess B, Orban S, Grunert E. Studies on transplacental transmissibility of a bovine virus diarrhoea (BVD) vaccine virus in cattle. III. Occurrence of central nervous system malformations in calves born from vaccinated cows. J Vet Med B. 1985; 33(4): 260–268.

557. Traven M, Alenius S, Fossum C, Larsson B. Primary bovine viral diarrhoea virus infection in calves following direct contact with a persistently viraemic calf. J Vet Med B. 1991; 38(6): 453–462.

558. Tremblay R. Transmission of bovine viral diarrhea virus. Vet Med. 1996; 91(9): 858–865.

559. Tsukiyama-Kohara K, Iizuka N, Kohara M, Nomoto A. Internal ribosomal entry site within hepatitis C virus RNA. J Virol. 1992; 66(3): 1476–1483.

560. Underdahl NR, Grace OD, Hoerlein AB. Cultivation in tissue culture of cytopathogenic agent from Bovine Mucosal Disease. Proc Soc Exp Biol Med. 1957; 94(4): 795–797.

561. Uttenthal A, Nielsen J, Hofmann B, Depner KR. Experimental infection of pigs with BDV Gifhorn. Viral load, hematology and clinical evaluation compared to CSFV Paderborn infection. Abstract in Report on Annual Meeting of National Swine Fever Laboratories. Grange, Ireland, 2004; 80–81.

562. Uttenthal A, Grondahl C, Hoyer MJ, Houe H, van Maanen C, Rasmussen TB. Larsen LE. Persistent BVDV infection in mousedeer infects calves. Do we know the reservoirs for BVDV? Prev Vet Med. 2005; 72(1–2): 87–91. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2005.08.006

563. Valdazo-Gonzalez B, Gonzalez-Fernandez S, Sandvik T, Alvarez-Martinez M. Evaluation of the suitability of a commercial bovine viral diarrhoea virus antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay for detection of border disease virus. 6th ESVV Pestivirus Symposium, p46, September 2005, Thun, Switzerland.

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

565. Valdazo-Gonzalez B, Alvarez-Martinez M, Sandvik T. Genetic and antigenic typing of border disease virus isolates in sheep from the Iberian Peninula. Vet J. 2007; 174(2): 316–324. DOI: 10.1016/j.tvjl.2006.10.002

566. Van Campen H, Frölich K, Hofmann M. Pestivirus infections. In: Williams ES, Barker IK (Eds). Infectious Diseases of Wild Mammals. Manson Publishing Veterinary Pres, London, UK; 2001. p. 232–237.

567. Vanderkop M. Border disease in a flock of commercial sheep. Can Vet J. 1991; 32: 750–751.

568. Van Oirschot JT. Diva vaccines that reduce virus transmission. J Biotechnol. 1999; 73: 195–205.

569. Van Oirschot JT, Terpstra C. A congenital persistent swine fever infection. I.Clinical and virological observations. Vet Microbiol. 1977; 2(2): 121–132.

570. Van Oirschot JT, de Jong D, Huffels NDNHJ. Effects of infection with swine fever virus on the immune functions II. Lymphocyte response to mitogens and enumeration of lymphocyte subpopulations. Vet Microbiol. 1983; 8(1): 81–95.

571. Van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL. Virus taxonomy. In: Classification and Nomenclature of Viruses: Seventh Report of the International committee on taxonomy of viruses. Academic Pres, San Diego, CA, USA. 2000; 867–872.

572. Van Rijn PA, Van Gennip HG, de Meijer EJ, Moormann RJ. Epitope mapping of envelope glycoprotein E1 of hog cholera virus strain Brescia. J Gen Virol. 1993; 74(10): 2053–2060.

573. Van Rijn PA, Van Gennip HGP, Leenclerse CH, Bruschke CJM, Paton DJ, Moormann RJM, Van Oirschot JT. Subdivision of the pestivirus genus based on envelope glycoprotein E2. Virology. 1997; 237(2): 337–348. DOI: 10.1006/viro.1997.8792

574. Van Zijl M, Wensvoort G, de Kluyver E, van der Gulden H, Gielkens A, Berns A, Moormann R. Live attenuated pseudorabies virus expressing envelope glycoprotein E1 of hog cholera virus protects swine against both pseudorabies and hog cholera. J Virol. 1991; 65(5): 2761–2765.

575. Vannier P, Leforban Y, Carnero R, Cariolet R. Contamination of a live virus vaccine against pseudorabies (Aujeszky's disease) by an ovine pestivirus pathogen for the pig. Ann Rech Vet. 1988; 19(4): 283–290.

576. Vannier P, Vedeau F, Allemeersch C. Eradication and control programmes against Aujeszky's disease (pseudorabies) in France. Vet Microbiol. 1997; 55: 167–73.

577. Vantsis JT, Barlow RM, Fraser J, Mould DL. Experiments in border disease VIII. Propagation and properties of a cytopathic virus. J Comp Pathol. 1976; 86(1): 111–120.

578. Vantsis JT, Linklater KA, Rennie JC, Barlow RM. Experimental challenge infection of ewes following a field outbreak of Border disease. J Comp Pathol. 1979; 89(3): 331–339.

579. Vantsis JT, Barlow RM, Gardiner AC, Linklater KA. The effects of challenge with homologous and heterologous strains of Border disease virus on ewes with previous experience of the disease. J Comp Pathol. 1980a; 90(1): 39–45.

580. Vantsis JT, Rennie JC, Gardiner AC, Wells PW, Barlow RM, Martin WB. Immunization against Border Disease. J Comp Pathol. 1980b; 90: 349–354.

581. Vaughn JE, Hinds PL, Skoff RP. Electron microscopic studies of Wallerian degeneration in rat optic nevre. I. The multipotential glia. J Comp Neurol. 1970; 140(2): 175–206.

582. Vilcek S, Belak S. Genetic identification of pestiviruse strain Frijters as a border disease virus from pigs. J Virol Methods. 1996; 60(1): 103–108.

583. Vilcek S, Paton DJ. A RT-PCR assay for the rapid recognition of border disease virus. Vet Res. 2000; 31: 437–445.

584. Vilcek S, Nettleton PF. Pestiviruses in wild animals. Vet Microbiol. 2006; 116(1–3): 1–12.

585. Vilcek S, Herring AJ, Herring JA, Nettleton PF, Lowings JP, Paton DJ. Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. Arch Virol. 1994; 136(3–4): 309–323.

586. Vilcek S, Nettleton PF, Paton DJ, Belak S. Molecular characterization of ovine pestiviruses. J Gen Virol. 1997; 78(4): 725–735.

587. Vilcek S, Bjorklund HV, Horner GW, Meers J, Belak S. Genetic typing of pestiviruses from New Zealand. New Zeal Vet J. 1998; 46(1): 35–37.

588. Vilcek S, Paton DJ, Lowings P, Bjorklund H, Nettleton P, Belak S. Genetic analysis of pestiviruses at the 3' end of the genome. Virus Genes. 1999; 18(2): 107–114. DOI: 10.1023/A:1008000231604

589. Vilcek S, Paton DJ, Rowe LW, Anderson EC. Typing of pestiviruses from eland in Zimbabwe. J Wildlife Dis. 2000; 36(1): 165– 168.

590. Vilcek S, Paton DJ, Durkovic B, Strojny L, Ibata G, Moussa A, Loitsch A, Rossmanith W, Vega S, Scicluna MT, Palfi V. Bovine viral diarrhoea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups. Arch Virol. 2001; 146(1): 99–115.

591. Vivo 2008. http://vivo.colostate.edu./hbooks/pathphys/reprod/placenta/ovfetus.jpg Erişim Tarihi: 23.07.2008.

592. Volker M. Pestiviruses: a review. Vet Microbiol. 1990; 23(1–4): 35–54.

593. Wafula JS. Some antigenic and cultural properties of border disease and bovine viral diarrhoea viruses. Vet Res Commun. 1986; 10(3): 189–194.

594. Wakeley PR, Turner JL, Ibata G, King DP, Sandvik T, Howard P, Drew TW. Characterisation of a type 2 bovine viral diarrhoea virus isolated from cattle in the UK. Vet Microbiol. 2004; 102(1–2): 19–24.

595. Waldvogel AS, Ehrensperger F, Straub OC, Pospischil A. An Immunohistochemical study of the distribution of Border disease virus in persistently infected sheep. J Comp Pathol. 1995; 113(2): 191–200. DOI: 10.1016/S0021–9975(05)80034–9

596. Walz PH, Baker JC, Mullaney TP, Kaneene JB, Maes RK. Comparison of type I and type II bovine viral diarrhoea virus infection in swine. Can J Vet Res. 1999; 63(2): 119–123.

597. Ward ACS, Kaeberle ML. Use of an immunoperoxidase stain for the demonstration of bovine viral diarrhea virus by light and electron microscopes. Am J Vet Res. 1984; 45(1): 165–170.

598. Weiland E, Ahl R, Stark R, Weiland F, Thiel HJ. A second envelope glycoprotein mediates neutralization of a pestivirus, hog cholera virus. J Virol. 1992; 66(6): 3677–3682.

599. Weiland E, Stark R, Haas B, Rümenapf T, Meyers G, Thiel HJ. Pestivirus glycoprotein which induces neutralizing antibodies form part of a disulfide-linked heterodimer. J Virol. 1990; 64(8): 3563–3569.

600. Weiland F, Weiland E, Unger G, Saalmüller A, Thiel HJ. Localization of pestiviral envelope proteins E^{rns} and E2 at the cell surface and on isolated particles. J Gen Virol. 1999; 80(5): 1157–1165.

601. Weinstock D, Bhudevi B, Castro AE. Single-tube single-enzyme reverse transcriptase PCR assay for detection of bovine viral diarrhea virus in pooled bovine serum. J Clin Microbiol. 2001; 39(1): 343–346.

602. Wengler G. Family Flaviviridae. In: Francki RIB, Fauquet CM, Knudson DL, Brown F, editors. Classification and Nomenclature of Viruses, International Committee on Taxonomy of Viruses. Spinger-Verlag, Berlin, Germany; 1991. p. 223–233.

603. Wengler G, Bradley DW, Collet MS, Heinz FX, Schlesinger RW, Strauss JH. Family Flaviviridae. Arc Virol Suppl. 1995a; 10: 415–427.

604. Wengler G, Bradley DW, Collet MS, Heinz FX, Schlesinger RW, Strauss JH. Flaviviridae. In: Murphy FA, Fauquet CM, Bioshop DHL, Ghabrial A, Jarvis AW, Martelli GP, Mayo MA, Summers MD, editors. Virus taxonomy. Sixth Report of the International Commitee on Taxonomy of Viruses. Springer-Verlag, Vienna, Austria; 1995b.

605. Wensvoort G. Topographical and functional mapping of epitopes on hog cholera virus with monoclonal antibodies. J Gen Virol. 1989; 70(11): 2865–2876.

606. Wensvoort G, Terpstra C. Bovine viral diarrhoea virus infection in piglets born to sows vaccinated against swine fever with contaminated vaccine. Res Vet Sci. 1988; 45(2): 143–148.

607. Wensvoort G, Terpstra C, de Kluyver EP. Characterization of porcine and some ruminant pestiviruses by cross-neutralization. Vet Microbiol. 1989; 20(4): 291–306.

608. Westaway EG, Brinton MA, Gaidamovich SYA, Horzinek MC, Igarashi A, Kaariainen L, Lvov DK, Porterfield JS, Russell PK, Trent DW. Togaviridae. 1985; 24(3): 125–139. DOI: 10.1159/000149632

609. Westbury HA, Napthine DV, Straube E. Border disease: persistant infection with the virus. Vet Rec. 1979; 104(18): 406–409.

610. Willoughby K, Valdazo-Gonzalez B, Maley M, Gilray J, Nettleton PF. Development of a real time RT-PCR to detect and type ovine pestiviruses. J Virol Methods. 2006; 132(1–2): 187–194.

611. Windisch JM, Schneider R, Stark R, Weiland E, Meyers G, Thiel HJ. RNase of classical swine fever virus: Biochemical characterization and inhibition by virus-neutralizing monoclonal antibodies. J Virol. 1996; 70(1): 352–358.

612. Wirz B, Tratshin JD, Muller HK, Mitchell DB. Detection of hog cholera virus and differentiation from other pestiviruses by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol. 1993; 31(5): 1148–1154.

613. Wiskerchen MA, Collett MS. Pestivirus gene expression: protein p80 of bovine viral diarrhea virus is a proteinase involved in polyprotein processing. Virology. 1991; 184(1): 341–350.

614. Wiskerchen M, Belzer SK, Collett MS. Pestivirus gene expression: The first protein product of the bovine viral diarrhea virus large open reading frame, p20, possesses proteolytic activity. J Virol. 1991; 65(8): 4508–4514.

615. Woldehiwet Z, Sharma R. Alterations in lymphocyte subpopulations in peripheral blood of sheep persistently infected with border disease virus. Vet Microbiol. 1990; 22(2–3): 153–160.

616. Woldehiwet Z, Hussin AA. Distribution of Border disease virus antigen in lymphocyte subpopulations in the peripheral blood of experimentally infected lambs. Vet Immunol Immunopathol. 1994; 43(4): 389–400.

617. Wolf G, Buttner M. Clinical aspects and diagnosis of border disease. Tierarzl Prax. 1994; 22(1): 35–38.

618. Wolfmeyer A, Wolf G, Beer M, Strube W, Hehnem HR, Schmeer N, Kaaden OR. Genomic (5'UTR) and serological differences among German BVDV field isolates. Arch Virol. 1997; 142(10): 2049–2057. DOI: 10.1007/s007050050222

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

620. Xue W, Minocha HC. Identification of the cell surface receptor for bovine viral diarrhoea virus by using anti-idiotypic antibodies. J Gen Virol. 1993; 74(1): 73–79.

621. Xue W, Zhang S, Minocha HC. Characterization of a putative receptor protein for bovine viral diarrhea virus. Vet Microbiol. 1997; 57(2–3): 105–118.

622. Yeşilbağ K, Förster C, Bank-Wolf B, Yılmaz Z, Alkan F, Ozkul A, Burgu İ, Rosales SC, Thiel HJ, König M. Genetic heterogeneity of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates from Turkey: Identification of a new subgroup in BVDV–1. Vet Microbiol. 2008; 130: 258–267.

623. Yousif AA, Braun LJ, Saber MS, Aboelleil T, Chase CCL. Cytopathic genotype 2 bovine viral diarrhea virus in dromedary camels. Arab J Biotech. 2004; 7(1): 123–140.

624. Zaghawa A. Prevalence of antibodies to bovine viral diarrhoea virus and/or border disease virus in domestic ruminants. J Vet Med B. 1998; 45(6): 345–351.

625. Zanardi G, Macchi C, Sacchi C, Rutili D. Classical swine fever in wild boar in the Lombardy region of Italy from 1997 to 2002. Vet Rec. 2003; 152(15): 461–465.

626. Zhang G, Aldridge S, Clarke MC, Mc Cauley JW. Cell death induced by cytopathogenic bovine viral diarrhea virus is mediated by apoptosis. J Gen Virol. 1996; 77(8): 1677–1681.

627. Zhong W, Gutshall LL, Del Vecchio AM. Identification and Characterization of an RNA-Dependent RNA Polymerase Activity within the Nonstructural Protein 5B Region of Bovine Viral Diarrhea Virus. J Virol. 1998; 72(11): 9365–9369.

10. ÖZGEÇMİŞ

08.12.1979 tarihinde Artvin'in Şavşat ilçesinde doğdu. İlköğrenimini 5.sınıfa kadar Nevşehir 20 Temmuz İlköğretim okulunda, 5.sınıfı Konya İnkılap İlköğretim okulunda, orta ve lise öğrenimini ise yine Konya'da tamamladı. 1997 yılında girmiş olduğu Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi'ni 2002 yılında altıncılıkla bitirdi. 2002 yılında Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi bünyesinde açılan araştırma görevliliği sınavını kazanarak, 26.12.2002 tarihinde Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak göreve başladı. Halen aynı Anabilim Dalında görev yapmakta olup evlidir.