T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

SIĞIR ve İNSAN RESPİRATÖR SİNSİTYAL VİRUSLARIN FİLOGENETİK ANALİZİ ve SIĞIRLARDAN RESPİRATÖR SİNSİTYAL VİRUSUN İZOLASYONU

Özge AYDIN

DANIŞMAN
Prof. Dr. Hüseyin YILMAZ

Viroloji Anabilim Dalı

Viroloji Programı

Mayıs, 2022

Hedeflerine ulaşmak için emek veren, emeğin önemini bilen ve emeği değerli kılan herkese ithaf ediyorum.

BÜTÇE DESTEKLERİ

SIĞIR ve İNSAN RESPİRATÖR SİNSİTYAL VİRUSLARIN FİLOGENETİK ANALİZİ ve SIĞIRLARDAN RESPİRATÖR SİNSİTYAL VİRUSUN İZOLASYONU

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi - Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje numarası: 31182

TEŞEKKÜR

Tez çalışmanın her aşamasında bilgi ve deneyimleri ile yanımda olan saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Hüseyin YILMAZ'a, Viroloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Nuri TURAN, Prof. Dr. Mustafa HASÖKSÜZ'e ve tez süresince hücre kültürü çalışmaları, moleküler ve istatistik analizlerde bana yardımcı olan ve tecrübelerini paylaşan Anabilim Dalımız öğretim üyesi Prof. Dr. Aysun YILMAZ'a teşekkür ederim. Laboratuvar ve diğer çalışmalarda yardımlarını esirgemeyen Anabilim Dalımız Doktor Öğretim Üyesi Utku Yusuf ÇİZMECİGİL, Araş. Gör. Hasan Emre TALİ, doktora öğrencisi Semaha Gül YILMAZ ve Laborant Gülden GÜNAYDIN'a teşekkür ederim.

Ayrıca, tez çalışmasında incelediğim örneklerin toplanmasında yardımcı olan arkadaşım Veteriner Hekim Cihan GÜNEŞ ve İlkay DÖNER'e yardımları için teşekkür ederim.

Tüm eğitim-öğretim hayatım boyunca desteğini esirgemeyen annem Gülfer AYDIN, babam Mehmet AYDIN, kardeşim Can Ozan AYDIN ve doktora tezim süresince hep yanımda olan eşim Fahri Onur AYDIN'a teşekkür ederim.

Mayıs 2022 Özge AYDIN

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

BÜTÇE DESTEKLERİ ..... **iii**
TEŞEKKÜR ..... **iv**
İÇİNDEKİLER ..... **v**
ŞEKİL LİSTESİ ..... **viii**
TABLO LİSTESİ ..... **xi**
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ ..... **xii**
ÖZET ..... **xv**
ABSTRACT ..... **xvii**
1. GİRİŞ VE AMAÇ **1**
2. GENEL BİLGİLER **3**
2.1. TARİHÇE 3
2.2. ETKEN 4
2.2.1. Sınıflandırma ve Virusun Yapısı 4
2.2.2. Viral Proteinler ve Fonksiyonları 5
2.2.3. Yapısal Proteinler 6
2.2.4. Yapısal Olmayan Proteinler (NS1 ve NS2) 8
2.2.5. BRSV'nin Dayanıklılığı 8
2.2.6. Viral Replikasyon 9
2.2.7. Antijenik ve Genotipik Gruplar 9
2.2.8. BRSV ve Diğer Türlerdeki Respiratorik Sinsityal Viruslarla Benzerlikler ve Zoonotik İlişki 12
2.3. EPİDEMİYOLOJİ 14
2.3.1. Bulaşma, Saçılma ve Yayılma 14
2.3.2. Konak Duyarlılığı 15
2.3.3. Morbidite ve Mortalite 15
2.3.4. BRSV İnfeksiyonlarının Türkiye'deki Sıklığı 16
2.3.5. BRSV İnfeksiyonlarının Diğer Ülkelerdeki Sıklığı 17
2.4. PATOGENEZ 18

2.5. İMMUN YANIT 20
2.5.1. Doğal Bağışıklık 20
2.5.2. Kazanılmış Bağışıklık 22
2.6. KLİNİK BELİRTİLER 24
2.7. TANI 25
2.7.1. Virus İzolasyonu 25
2.7.2. Elektron Mikroskopi 27
2.7.3. Moleküler Yöntemler 27
2.7.4. Serolojik Yötemler 29
2.7.5. İmmunofloresans ve İmmunohistokimyasal Yöntemler 29
2.8. NEKROPSİ VE HİSTOPATOLOJİK BULGULAR 30
2.8.1. Makroskopik Bulgular 30
2.8.2. Mikroskopik Bulgular 31
2.9. KORUMA, KONTROL ve ERADİKASYON 32
2.9.1. BRSV İnfeksiyonu Oluşumunu Etkileyen Risk Faktörleri 32
2.9.2. BRSV İnfeksiyonlarının Önlenmesine Katkıda Bulunan Uygulamalar 33
2.9.3. Aşılama ve Aşılama Stratejileri 34
2.9.4. Biyogüvenlik Uygulamaları 38
3. GEREÇ VE YÖNTEM 40
3.1. GEREÇ 40
3.1.1. Çiftlikler ve Toplanan Örnekler 40
3.1.2. Hücre Kültüründe Kullanılan Gereçler 42
3.1.3. Hücre Kültürü Çalışmalarında Kullanılan Cihazlar 44
3.1.4. Moleküler Çalışmalarda Kullanılan Gereçler 45
3.1.5. Moleküler Çalışmalarda Kullanılan Kimyasallar 48
3.1.6. Moleküler Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar ve Programlar 49
3.1.7. Serolojik Çalışmalarda Kullanılan Gereçler 49
3.2. YÖNTEM 50
3.2.1. Hücre Kültürü Çalışmaları 50
3.2.2. Moleküler Çalışmalar 52
3.2.3. Serolojik Çalışmalar 64
3.2.4. İstatistiksel Analizler 65
4. BULGULAR 66
4.1. Klinik ve Nekropsi Bulguları 66

4.2. Real Time RT-PCR Bulguları 67
4.2.1. Real Time RT PCR Optimizasyon ve Saptama Limiti 67
4.2.2. Saha Örneklerinin Real Time RT-PCR Sonuçları 68
4.2.3. Real Time RT-PCR Sonuçlarının İstatistik Verileri 69
4.3. RT-PCR ve Sekans Analizi Sonuçları 70
4.3.1. BRSV ve HRSV benzerlik bulguları 77
4.4. Hücre Kültürü Bulguları 85
4.5. ELISA Bulguları 87
4.5.1. ELISA Sonuçlarının İstatistik Verileri 88
5. TARTIŞMA 92
KAYNAKLAR 106
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI 125

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 1: BRSV sınıflandırma ve taksonomik gösterimi (Russel ve Hurwitz, 2021) 4

Şekil 2: Bovine respiratorik sinsityal virusun şematik görünümü (ViralZone, 2011) 5

Şekil 3:Virusun genom organizasyonu ve viral proteinler (King ve ark., 2011)..... 6

Şekil 4: BRSV replikasyonu (Valarcher ve Taylor, 2007). 9

Şekil 5: 2018 yılında yapılan soy ağacına göre şekillenen 8 farklı (I–VIII) subgrup (Krešić ve ark., 2018). 11

Şekil 6: 2021 yılında yapılan soy ağacına göre şekillenen 10 farklı (I–X) subgrup (Kumagai ve ark., 2021). 12

Şekil 7: BRSV infeksiyonu ve doğal immünite (Makoschey ve Berge, 2021). 21

Şekil 8: Sıvısal ve hücresel immun yanıtın infeksiyona karşı savunma ve virus saçılımına etkisi (Makoschey ve Berge, 2021). 24

Şekil 9: BSR T7/5 hücrelerde sinsityum ve dev hücre oluşumu (Buchholz ve ark., 1999) 27

Şekil 10: İmmunohistokimyasal test ile akciğer dokusunda sapatanan BRSV ve sinsityum oluşumu (Makoschey ve Berge, 2021). 30

Şekil 11: BRSV oluşumunu etkileyen faktörler (Zeineldin ve ark., 2019). 33

Şekil 12: Çalışmada kullanılan MDBK hücrelerinin monolayer görüntüsü (Ters ışık mikroskobu-20X büyütme) 43

Şekil 13: SnapGene 6.0.2 programı ile BRSV-G geni için daha önce yapılan çalışmada (Bidokhti ve ark., 2012) tasarlanan ve bu çalışmada sekans analizi amacıyla yapılan konvansiyonel RT-PCR'da kullanılan primerlerin gen dizlimi üzerindeki yerleşimi 47

Şekil 14: SnapGene 6.0.2 programı ile BRSV-G geni için daha önce yapılan çalışmada (Boxus ve ark., 2005) tasarlanan ve bu çalışmada real time RT-PCR'da kullanılan primerlerin gen dizlimi üzerindeki yerleşimi 47

Şekil 15: Nazal/orofarengeal svab ve kan numuneleri için Invitrogen PureLink RNA Mini Kit ekstraksiyon akış şeması..... 53

Şekil 16: Akciğer doku numuneleri için Invitrogen PureLink RNA Mini Kit ekstraksiyon akış şeması 54

Şekil 17: β-actin dizisinde primerlerin yerleşimi 55

Şekil 18: RNA saflık çalışması verileri ve hesabı 57

Şekil 19: RNA saflık çalışması real time RT-PCR amplifikasyon eğrileri ve Melting Curve değerleri 58

Şekil 20: BRSV-G geni için daha önceki çalışmada (Bidokhti ve ark., 2012) tasarlanan ve bu çalışmada kullanılan primerler ile konvansiyonel RT-PCR sonrası hedeflenen ürün büyüklüğü ve jel görüntüsü. 60

Şekil 21: Bu çalışmada, real time RT-PCR ve RT-PCR sonucu BRSV pozitif olarak saptanan bir buzağıda baş aşağıya doğru uzatılmış, hırıltılı nefes alıp verme, güç solunum ve bunun sonucu ağızdan gelen köpüklü akıntı ile seyreden bir olgu. 66

Şekil 22: İnterlobüler ve subpleural bölgede hava dolu veziküller (ok), konsolidasyon alanları (yıldız) ve yaygın interstisiyel amfizem. 67

Şekil 23: Real time RT-PCR etkinliği için yapılan pozitif kontrol dilusyonlarının CT değerleri 68

Şekil 24: Trakya bölgesindeki çiftliklerden alınan nazal/orofarengeal svab ve akciğer örneklerinin real time RT-PCR analizi sonucu elde edilen CT değerleri 68

Şekil 25: Uşak ilindeki çiftlikten alınan nazal/orofarengeal svab ve akciğer örneklerinin real time RT-PCR analizi sonucu elde edilen CT değerleri 69

Şekil 26: Aşılı ve aşısız hayvanların real time RT-PCR sonuçlarının grafiği 69

Şekil 27: Aşılı ve aşısız hayvanların real time RT-PCR sonuçlarının Ki-Kare testi 70

Şekil 28: RT-PCR analizi ile çoğaltılan BRSV G gen bölgesi ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü 71

Şekil 29: RT-PCR sonucunda pozitif olarak tespit edilen ve sekans analizleri tamamlanan örneklerin ülkemiz ve diğer ülkelerden Gen Bankası'na bildirilen BRSV-G genotipleri ile birlikte MEGA11 programı kullanılarak Clustal W ile hizalanması sonucu elde edilen dizilimler 72

Şekil 30: RT-PCR sonucunda pozitif olarak tespit edilen ve sekans analizleri tamamlanan örneklerin ülkemiz ve diğer ülkelerden Gen Bankası'na bildirilen BRSV-G geni dizilimleri ile birlikte oluşturulan soyağacı 73

Şekil 31: RT-PCR sonucunda pozitif olarak tespit edilen ve sekans analizleri tamamlanan örneklerin ülkemiz ve diğer ülkelerden Gen Bankası'na bildirilen HRSV-A genotipleri ile birlikte MEGA11 programı kullanılarak Clustal W ile hizalanması sonucu elde edilen dizilimler 77

Şekil 32: RT-PCR sonucunda pozitif olarak tespit edilen ve sekans analizleri tamamlanan örneklerin ülkemiz ve diğer ülkelerden Gen Bankası'na bildirilen HRSV-B genotipleri ile

birlikte MEGA11 programı kullanılarak Clustal W ile hizalanması sonucu elde edilen dizilimler.....78

Şekil 33: RT-PCR sonucunda pozitif olarak tespit edilen ve sekans analizleri tamamlanan örneklerin ülkemiz ve diğer ülkelerden Gen Bankası'na bildirilen HRSV-A G geni dizilimleri ile birlikte oluşturulan soyağacı.....79

Şekil 34: RT-PCR sonucunda pozitif olarak tespit edilen ve sekans analizleri tamamlanan örneklerin ülkemiz ve diğer ülkelerden Gen Bankası'na bildirilen HRSV-B G geni dizilimleri ile birlikte oluşturulan soyağacı.....80

Şekil 35: MDBK monolayer hücreler ve monolayer hücre kültürüne inokulasyon sonrası hücrelerin görünümü.....87

Şekil 36: BRSV ile aşılanmamış buzağı ve genç sığırlardan alınan kan serumu örneklerinin ELISA testi ile analizi sonucu elde edilen OD değerleri.....88

Şekil 37: BRSV ile aşılanmış buzağı ve genç sığırlardan alınan kan serumu örneklerinin ELISA testi ile analizi sonucu elde edilen OD değerleri.....88

Şekil 38: Aşılı ve aşısız hayvanların ELISA sonuçlarının grafiği.....89

Şekil 39: ELISA OD değerlerinin histogramı 89

Şekil 40: ELISA OD verilerinin Grubbs testi ve Tukey testi ile sapan değer kontrolü verileri 90

Şekil 41: ELISA OD değerlerinin box-plott grafiği 90

Şekil 42: Aşılı ve aşısız hayvanların ELISA sonuçlarının Ki-Kare testi.....91

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 1: Ülkemizde sığırlarda kullanılan BRSV aşıları (Tarım ve Orman Bakanlığı) 36

Tablo 2: Çalışmada kullanılan örneklerin toplandığı hayvanlar ve çiftlik bilgileri 41

Tablo 3: Çalışmada kullanılan Primerler ve Prob'un hedefledği bölge, dizilimi, ürün büyüklüğü ve gen dizilimindeki yeri 46

Tablo 4: Ekstraksiyon etkinliğinde kullanılan örneklerin RNA miktar ve saflıkları 54

Tablo 5: SYBR Green PCR bileşenleri ve cihaz koşulları 56

Tablo 6: BRSV-G geni için farklı ülkelerden gen bankasına rapor edilen genotipler 61

Tablo 7: HRSV-A G geni için farklı ülkelerden gen bankasına rapor edilen genotipler 62

Tablo 8: HRSV-B G geni için farklı ülkelerden gen bankasına rapor edilen genotipler..... 63

Tablo 9: ELISA testi sonucu elde edilen OD değerlerinin pozitif veya negatif değerlendirilmesi 65

Tablo 10: RT-PCR sonucu pozitif olarak tespit ettiğimiz ve sekans analizleri tamamlanan örneklerin Gen Bankası'na bildirilen diğer BRSV-G genotipleri ile yüzde benzerlikleri 74

Tablo 11:RT-PCR sonucu BRSV pozitif olarak tespit edilen ve sekans analizleri tamamlanan örneklerin Gen Bankası'na bildirilen HRSV-A G geni dizilimleri ile benzerlik oranları..... 81

Tablo 12:RT-PCR sonucu BRSV pozitif olarak tespit ettiğimiz ve sekans analizleri tamamlanan örneklerin Gen Bankası'na bildirilen HRSV-B G geni dizilimleri ile benzerlik oranları..... 83

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Kısaltmalar **Açıklama**

AA: Aminoasit

ABD: Amerika Birleşik Devletleri

AMPV: Avian metapneuomovirus

BAL: Bronkoalveolar lavaj

BALT: Bronchus associated lymphoid tissue

bp: Basepair

BRDC:Bovine respiratory disease complex

BRSV:Bovine respiratory syncytial virus

BSA: Bovine serum albumin

CDC: Conventional dendritic cell

cDNA: Complementer deoxyribonucleic acid

CPE: Cytopathic effect

CPV: Canine pneumovirus

CRSV:Caprine respiratory syncytial virus

DMEM: Dulbecco modified Eagle medium

DMSO: Dimethil sülfoksit

DNA: Deoxyribonucleic acid

dNTP: Deoxynucleotide triphosphat

ELISA:Enzyme-linked immunoSorbent assay

EMEM: Eagle's minimum essential medium

FBS: Fetal bovine serum

GAG: Glikozaminoglikanlar

GE: Gene end

GS: Gene start

Hep2: Human epithelial type 2

HMPV: Human metapneuomovirus

HRSV:Human respiratory syncytial virus

IFN: Interferon

IgA: Immunoglobulin A

IgG: Immunoglobulin G

IgM: Immunoglobulin M

IL: Interleukin

mAb: Monoclonal antibody

MDA: Malondialdehit

MDBK: Madin-Darby bovine kidney

$MgCl_{2:}$ Magnezyum klorür

MHC: Major histocompatibility complex

MPV:Murine pneumovirus

mRNA: Messenger ribonucleic acid

NGS: Next generation sequencing

NK: Natural killer

NLRs: NOD-like receptors

nm: Nanometre

NS: Nonsitrüktürel

ORSV: Ovine respiratory syncytial virus

PAMPs: Pathogen-associated molecular patterns

PBS: Phosphate-buffered saline

PCR:Polymerase chain reaction

PFU: Plaque-forming unit

pmol: picomoles

PRRs: Pattern recognition receptors

RHLs: Retionic acid inducible gen-I like helicase

RNA: Ribonucleic acid

RNP: Ribonucleoprotein

RPM: Revolutions per minute

RT-PCR:Reverse transcriptase polymerase chain reaction

SEM: Scanning electron microscopy

SOV: Swine orthopneumovirus

STAT2: Signal transducer and activator of transcription 2

TAE: Tris-acetate-EDTA

Taq: Thermus aquaticus

TCID: Tissue culture infective dose

TEM: Transmission electron microscopy

TLRs: Toll like receptors

TNF: Tumor necrosis factor

ÖZET

DOKTORA TEZİ

SIĞIR ve İNSAN RESPİRATÖR SİNSİTYAL VİRUSLARIN FİLOGENETİK ANALİZİ ve SIĞIRLARDAN RESPİRATÖR SİNSİTYAL VİRUSUN İZOLASYONU

Özge AYDIN

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Viroloji Anabilim Dalı

Viroloji Programı

Danışman : Prof. Dr. Hüseyin YILMAZ

Sığır Respiratörik Sinsityal Virus (Bovine respiratory syncytial virus=BRSV) tüm yaş grubu sığırlarda solunum sistemi infeksiyonlarına ve özellikle buzağı ve genç sığırlarda ölüm ve tedavi masrafları sonucu ekonomik kayıplara neden olmaktadır.

Bu tez çalışmasında; BRSV'nin real time RT-PCR (Reverse transcriptase polymerase chain reaction=RT-PCR) ile hızlı tanısı, BRSV-G geninin RT-PCR ile kısmi çoğaltılması, sekans ve filogenetik analizleri yapılarak ülkemiz ve diğer ülkelerdeki sığır ve insan respiratörik sinsityal virusları (BRSV ve HRSV) ile karşılaştırılması ve soy ağacı oluşturulması amaçlandı. RT-PCR sonucu BRSV pozitif olduğu tespit edilen örneklerden aşı ve diğer çalışmalarda kullanılmak üzere virus izolasyonu çalışmaları da planlandı. Ayrıca BRSV'ye karşı oluşan spesifik antikorlar saptanarak hayvanların bağışıklık durumunun araştırılması amaçlandı. Bu amaçlara yönelik olarak Trakya bölgesi ve Uşak ilinde lokalize olmuş çiftlikler ziyaret edilerek, solunum sistemi bozukluğu görülen buzağı ve genç sığırlardan örnekler alındı. BRSV-N genini hedefleyen real time RT-PCR ile pozitiflik saptanan örneklerde sekans amacıyla BRSV-G geni hedeflenerek RT-PCR yapıldı. Sekans ve filogenetik analizler sonucunda elde edilen dizilimler ülkemiz ve diğer ülkelerde tespit edilen BRSV ve HRSV genotipleri ile karşılaştırıldı ve soy

ağacı oluşturuldu. RT-PCR sonucu BRSV yönünden pozitif olduğu tespit edilen örneklerden BRSV izolasyonu amacıyla MDBK hücre kültürü kullanıldı. BRSV'ye karşı oluşan antikorlar ELISA ile tespit edildi.

Çalışmada real time RT-PCR ile incelenen toplam 314 örnekten 14 örnekte (%4.4) BRSV-RNA saptandı. BRSV-N geni hedeflenerek yapılan real time RT-PCR ile pozitif bulunan örneklerden BRSV-G geni hedeflenerek yapılan RT-PCR çalışmaları sonucunda 4 nazal/orofarengeal svab ve 1 akciğer örneğinin sekans analizi yapıldı. Sekans ve filogenetik analizler sonucu oluşturulan soyağacı verilerine göre bu çalışmada saptanan genotiplerin daha önce ülkemizde tespit edilen ve Gen Bankası'na bildirilen BRSV-G geni dizilimleri ile %89-%98 oranında benzer olduğu ve BRSV Subgrup III'e ait olduğu bulundu. Diğer ülkelerde saptanan BRSV genotipleri ile karşılaştırıldığında Amerika'da ve Çekya'da bildirilen genotipler ile arasında %90-%93 oranında en yüksek benzerlik saptandı. Bu çalışmada saptanan BRSV genotipleri, ülkemizde tespit edilen ve Gen Bankası'na bildirilen HRSV-G geni ile karşılaştırıldığında %43-%48 benzerlik bulundu. MDBK hücre kültüründe yapılan virus izolasyon çalışmalarında RT-PCR ile BRSV pozitif olarak tespit edilen örneklerden virus izole edilemedi. Aşısız ve aşılı buzağı ve genç sığırlardan alınan toplam 162 kan serumu örneğinden 76 örnekte (%46,9) BRSV seropozitifliği saptandı.

Sonuç olarak, BRSV'nin hızlı tanısı amacıyla prob temelli real time RT-PCR, BRSV'de olabilecek değişiklik ve mutasyonların takibi için ise BRSV-G geni hedeflenerek sekans analizleri ve filogenetik analizler kullanılabilir. Aşılamalara rağmen ülkemizde virus sirküle olmaktadır bu nedenle BRSV infeksiyonlarına yönelik araştırmalar, aşılamalar ve eradikasyon çalışmalarının devam etmesinde yarar vardır.

Mayıs 2022 , 150. sayfa.

Anahtar kelimeler: Sığır Respiratör Sinsityal Virus, Real time RT-PCR, Filogenetik Analiz, Virus izolasyonu, ELISA

ABSTRACT

Ph.D. THESIS

Phylogenetic Analysis of Bovine and Human Respiratory Syncytial Viruses and Isolation of Bovine Respiratory Syncytial Virus.

Özge AYDIN

İstanbul University-Cerrahpaşa

Institute of Graduate Studies

Department of Virology

Virology PhD Programme

Supervisor : Prof. Dr. Hüseyin YILMAZ

Bovine Respiratory Syncytial Virus (BRSV) causes respiratory system infections in cattle of all age groups and economic losses as a result of death and treatment costs, especially in calves and young cattle.

The aim of this PhD thesis was rapid diagnosis of BRSV by real time RT-PCR, partial amplification of the BRSV- G gene by RT-PCR, sequence and phylogenetic analyses and comparison with other BRSV and HRSV (Human Respiratory Syncytial Virus) genotypes in the GenBank from our country and other countries by generating phylogenetic trees. Virus isolation from BRSV positive samples was also planned to be used in vaccine research and other studies. It was also aimed to investigate the immune status of animals by detecting specific antibodies against BRSV. For this aims, farms localized in Trakya regions and Usak province were visited, samples were taken from calves and young cattle which shows respiratory system disorders. These samples were analyzed by real time RT-PCR using BRSV-N gene specific primers and probe. Samples found positive by real time RT-PCR were further analyzed for sequencing by RT-PCR using BRSV-G gene specific primers. The results of the sequence and

phylogenetic analyzes were compared with the genotypes BRSV and HRSV reported from our country and other countries, and phylogenetic trees were generated. Virus isolation studies were performed by inoculating RT-PCR positive samples in MDBK cell cultures. Antibody response to BRSV was measured in sera by ELISA.

In this study, BRSV-RNA was detected in 14 (4,4%) of the 314 samples by real time RT-PCR. RT-PCR was performed by targeting BRSV-G gene specific primers on 4 nasal/oropharyngeal swab and 1 lung sample for sequencing. Phylogenetic analysis of these sequences indicated that the BRSVs were clustered in Subgroup III and were closely related (89%-98%) to previously identified Turkish genotypes. Sequences of 4 nasal/oropharyngeal swab and 1 lung sample compared with the BRSV genotypes reported from other countries, 90%-93% the highest similarity was found with the genotypes reported in the USA and Czechia. When sequences of 4 nasal/oropharyngeal swab and 1 lung sample compared with the HRSV genotypes reported from our country, 43%-%48 similarity was found. No virus could be isolated from the samples tested. Antibodies to BRSV were detected in 76 of a total of 162 vaccinated and unvaccinated calves sera (46,9%).

In conclusion, probe based real time RT-PCR can be applied for rapid diagnosis. BRSV-G gene sequence analyzes and phylogenetic analyzes can be used to detect mutations in BRSV G gene. It is important that BRSV infections are detected in spite of vaccination. For this reason, further studies are necessary on surveyans, vaccination and eradication of BRSV infections.

May 2022, 150. pages.

Keywords: Bovine Respiratory Syncytial Virus, Real time RT-PCR, Phylogenetic analysis, Virus Isolation, ELISA

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Sığırların respiratorik sinsityal virusu (Bovine Respiratorik Sinsityal Virus, Bovine respiratory syncytial virus=BRSV), buzağı ve genç sığırlarda solunum sistemi hastalıklarına neden olan viral etkenlerin başında gelmektedir. BRSV, sığırların kompleks solunum yolu hastalığının (Bovine respiratory disease complex=BRDC) oluşumunda önemli rol oynar ve en sık saptanan etkenlerdendir. Virus çiftlik hayvanları endüstrisinde önemli ekonomik kayıplara yol açmaktadır (Timurkan ve ark., 2019; Jia ve ark., 2021). Ölüme bağlı kayıplar, tedavi ve aşılama maliyetleri nedeniyle hastalığın ekonomik etkisi büyüktür (Snowder ve ark., 2006). BRSV infeksiyonu, ülkeler arası ithalat ve ihracata bağlı gelişen sığır hareketliliği sonucu Dünya çapında yaygın olarak görülen bir infeksiyon halini almıştır (Brodersen, 2010). Bu nedenle hastalıkla mücadele için gerekli koruma, kontrol ve eradikasyona yönelik uygulamaların ve araştırmaların yapılmasında yarar vardır.

BRSV infeksiyonu, 2016 yılından itibaren "Sığırların *Orthopneumovirus* İnfeksiyonu" olarak isimlendirilmiştir (International Committee on Taxonomy of Viruses, 2016). BRSV *Orthopneumovirus* genusu, *Pneuomoviridae* ailesinde yer alır. Virus zarflı yapıdadır ve genom segmentsiz negatif polariteli RNA içerir. N geni proksimalinde promotör olan NS1 ve NS2 dahil olmak üzere 10 gen bölgesi içermektedir. Bu gen bölgeleri NS1, NS2, N, P, M, SH, G, F, M2 ve L viral proteinlerini kodlamaktadır (Rima ve ark., 2017). Virus P ve L proteinleri ile birlikte, sarmal bir kompleks içinde nükleokapsid (N) proteini tarafından korunan RNA genomunu içerir. Virion küresel ya da filamentöz bir yapıdadır (Larsen, 2000).

Virus ilk olarak İsviçre'de 1970 yılında sığırlardan izole edilmiştir (Paccaud ve Jacquier, 1970) ve yayılarak küresel çapta birçok ülkede endemik hale gelmiştir (Sarmiento-Silva ve ark., 2012; Kumagai ve ark 2021). Virus her yaş grubu sığır için infektif özelliktedir fakat erişkin sığırlar genellikle hastalığa karşı spesifik antikora sahiptir bu sebeple hastalık daha çok buzağı ve genç sığırları etkilemektedir (Larsen ve ark., 1999). BRSV infeksiyonu subklinik seyredebildiği gibi ölümle sonuçlanan şiddetli infeksiyon tablosu da gözlenmektedir (Brodersen, 2010; Sarmiento-Silva ve ark., 2012). İnfeksiyona bağlı hem üst hem alt solunum yolunda patolojik etkiler sonucu klinik belirtiler gözlenir (Johnston ve ark., 2019). Klinik belirtilere yönelik tedavi genellikle semptomatiktir (Viuff ve ark., 2002). Etkin ve güvenli aşılama hastalığın önlenmesinde büyük önem taşımaktadır. İyi bakım ve besleme koşulları,

yeterli ve temiz hava sirkülasyonu, hijyen ve biyogüvenlik önlemleri BRSV infeksiyonu oluşumunun önlenmesinde önemli noktalardır (Gershwin, 2012). Şiddetli seyreden bir BRSV infeksiyonu, infekte sığırlarda ciddi bozukluklar oluşturduğu ve yaşamını olumsuz yönde etkilediği için hayvan refahı açısından da önemlidir (Hägglund ve ark., 2014).

Orthopneumovirus genusu üyeleri olan BRSV, HRSV ve Murine Pneumovirus (MPV) ile keçi (Rima ve ark., 2017), koyun ve köpek (Renshaw ve ark., 2011) ve domuz (Hause ve ark., 2016) pneumoviruslarının benzerlik gösterdiği bildirilmiştir. Yapılan elektron mikroskobi incelemeleri, serolojik ve moleküler analizler sonucunda CRSV (Caprine Respiratorik Sinsityal Virus=CRSV) ve BRSV'nin ruminant pneumovirusları arasında en yakın ilişkili iki virus olduğu tespit edilmiştir (Trudel ve ark., 1989; Alansari ve ark., 1999). Ayrıca, BRSV genetik özellikleri, etkilediği popülasyonun yaş grubu, patogenezi ve mevsimsel seyri ile insan respiratorik sinsityal virus (Human respiratory syncytial virus=HRSV) ile benzerlik taşımaktadır (Sacco ve ark., 2012). Sekans analizleri ve filogenetik çalışmalar sonucunda BRSV ile HRSV arasında %81 genetik benzerlik saptanmıştır (Rima ve ark., 2017). Bu benzerliğin RSV ile ilgili veteriner hekimlik ve tıp alanındaki multidisipliner çalışmalarda katkı sağlayacağı vurgulanmaktadır.

Bu çalışmanın amacı sığırlarda önemli infeksiyonlara neden olan BRSV'nin real time RT-PCR ile hızlı tanısı, real time RT-PCR sonucu pozitif olarak saptanan suşların RT-PCR ile BRSV-G ve BRSV-N geninin kısmi çoğaltılması, sekans ve filogenetik analizleri yapılarak ülkemiz ve diğer ülkelerden Gen Bankası'na bildirilen diğer sığır ve insan respiratörik sinsityal virusları (BRSV ve HRSV) ile karşılaştırılmasıdır. Real time RT-PCR ve RT-PCR sonucu BRSV yönünden pozitif olduğu tespit edilen örneklerden aşı ve diğer çalışmalarda kullanılmak üzere virus izolasyonu çalışmaları planlandı. Ayrıca, BRSV'ye karşı oluşan spesifik antikorların ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) ile saptanarak hayvanların bağışıklık durumunun araştırılması amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. TARİHÇE

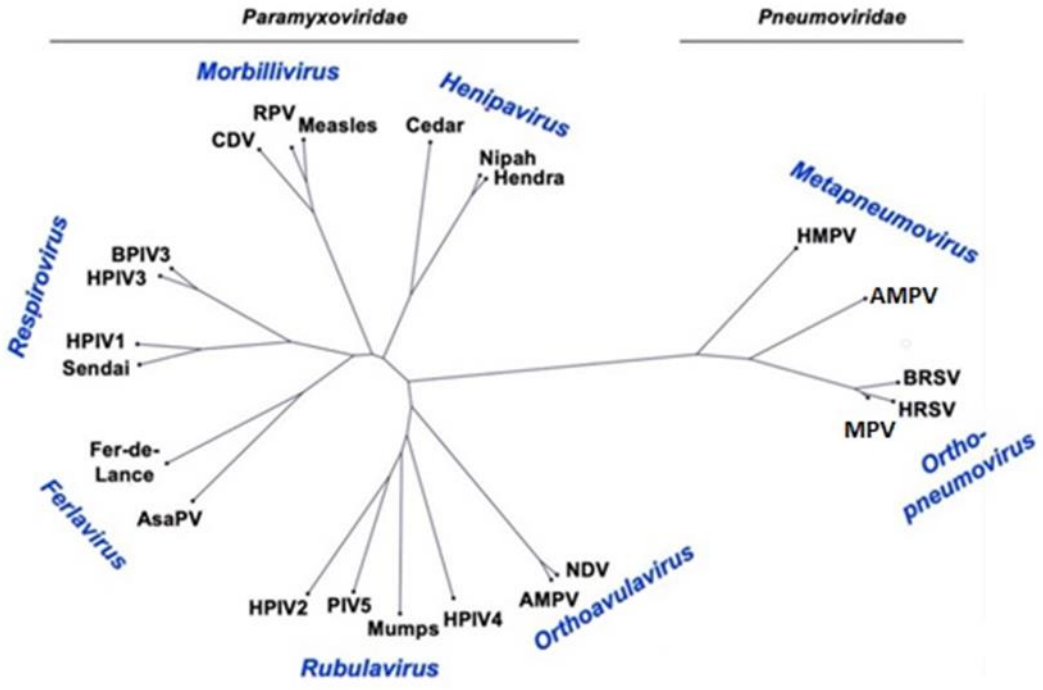
Respiratorik Sinsityal Virus (Respiratory Syncytial Virus=RSV) ilk olarak 1956 yılında, solunum yolu hastalığı olan bir laboratuvar şempanzesinde saptanmış ve şempanzelerde *Coryza* etkeni olarak adlandırılmıştır (Morris ve ark., 1956). Benzer bir etkenin 1957 yılında çocuklarda solunum yolu hastalıklarına neden olduğu tespit edilmiştir. Bronş, bronşiol ve alveol lümenlerinde bolca bulunan dökülmüş epitel hücre çekirdeklerinin sinsityumu (birleşmesi) ile oluşan sinsityal hücrelerin tespiti sonucunda etken "sinsityal virus" olarak isimlendirilmiştir (Chanock ve Finberg,1957). Sığırların respiratorik sinsityal virusunun ilk olarak tespit edilmesi insan resiratorik sinsityal virusun bulunmasından sonra olmuştur. Dogget ve ark., (1968) tarafından yılında yapılan çalışmada sığır serumlarında insan respiratorik sinsityal virusa karşı nötralizan antikorlar tespit edilmiştir (Doggett ve Gallop, 1968). Bu buluşlardan sonra, Paccaud ve Jacquier, (1970) solunum yolu problemi görülen sığırlardan RSV izole etmişlerdir (Paccaud ve Jacquier, 1970). Aynı tarihlerde Inaba ve ark., (1970) Japonya' daki sığırlarda görülen akut solunum yolu vakalarında yeni bir virus saptamıştır. Başlangıçta Nomi virusu olarak adlandırılan etken daha sonra BRSV olarak identifiye edilmiştir (Inaba ve ark., 1970).

Avrupa ülkelerinde 1970'li yılların başında sığırlarda solunum yolu hastalığı salgınları bildirilmiş ve hasta sığırlardan izole edilen etkenin HRSV ile yakından ilişkili olduğu saptanmıştır (Valarcher ve ark., 2000). Amerika Birleşik Devletleri'nde 1974 ve 1975 yıllarını kapsayan zamanda yayınlanan çalışmalarda sığır solunum yolu hastalığı salgınlarına sebep olan etkenin BRSV olduğu doğrulanmıştır (Stott ve Taylor, 1985; Wellemans., 1990). Yapılan ilk çalışmalardan bu zamana kadar BRSV Dünya çapında birçok ülkede tespit edilmiştir ve sığırlarda solunum yolu infeksiyonu oluşturan sebeplerin arasında ilk sıralarda yer almaktadır (Inaba ve ark., 1972; Motha ve Hansen, 1997; Sarmiento-Silva ve ark., 2012; Kumagai ve ark., 2021). Ülkemizde de sığır işletmelerinde, özellikle buzağılarda solunum sistemi hastalıklarına bağlı kayıpların en önemli sebeplerindendir (Hacıoğlu ve ark., 2019; Timurkan ve ark., 2019; Yazici ve ark., 2020; İnce ve ark., 2022).

2.2. ETKEN

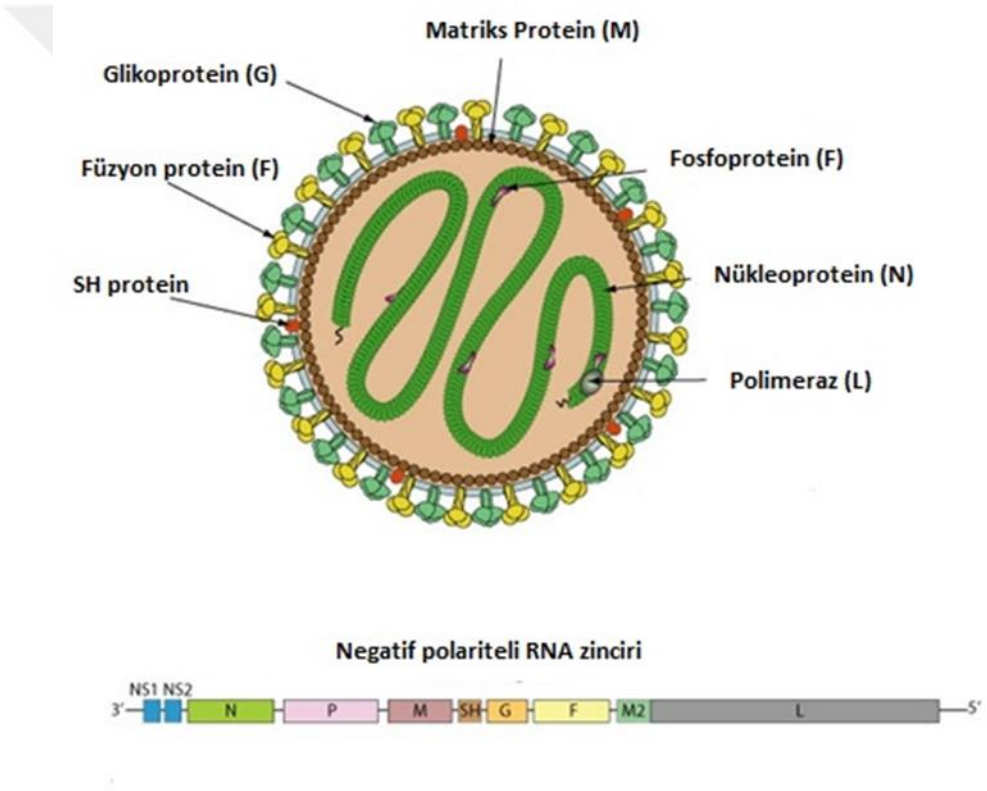
2.2.1. Sınıflandırma ve Virusun Yapısı

BRSV, büyük bir takım olan ve içinde *Pneumoviridae, Paramyxoviridae, Bornaviridae, Rhabdoviridae* ve *Filoviridae* ailelerinin de bulunduğu *Mononegavirales* takımı içinde yer almaktadır (International Committee on Taxonomy of Viruses, 2021). *Pneumoviridae* ailesi *Mononegavirales* takımı içerisindeki diğer üyelerden L geni dizilimindeki farklılıklar ile ayrılmaktadır (Hause ve ark., 2016). Korunmuş M2 geninin varlığı da ayrılmayı destekler niteliktedir (Makoschey ve Berge, 2021). *Orthopneumovirus* ve *Metapneumovirus* genusları *Pneumoviridae* ailesini oluşturur. *Orthopneumovirus* genusu insan (HRSV), sığır (BRSV) ve murine pneumovirusları (MPV) içermektedir. *Metapneumovirus* genusu ise insan (HMPV) ve kanatlı (AMPV) pneumovirusları içermektedir (Rima ve ark., 2017). (Şekil 1). Sınıflandırılmamış keçi, koyun, köpek ve domuz pneumovirusları, *Orthopneumovirus* genusunda bulunan HRSV, BRSV ve MPV ile genetik olarak benzerlik göstermektedir (Renshaw ve ark., 2011; Hause ve ark., 2016; Rima ve ark., 2017). Sığırların respiratorik sinsityal virusu infeksiyonu, 2016 yılından itibaren "Sığırların *Orthopneumovirus* İnfeksiyonu" olarak isimlendirilmiştir (International Committee on Taxonomy of Viruses, 2016).



Şekil 1: BRSV sınıflandırma ve taksonomik gösterimi (Russel ve Hurwitz, 2021)

BRSV zarflı, segmentsiz, negatif polariteli RNA içeren genoma sahip bir virustur (Şekil 2). BRSV virionu, konakçı plazma membranından köken alan lipit bir zarf ile çevrilmiştir. BRSV elektron mikroskop altında 35-150 nm çapında kabaca yuvarlanmış bir şekilde oldukça pleomorfik bir yapıda görünür. Elektron mikroskobundaki filamentöz yapıdaki görüntüsü ise 5 µm uzunluğunda, 60-100 nm çapındadır. 5 X 10^6 Dalton molekül ağırlığına sahiptir. Yapısından bağımsız olarak infeksiyöz virus partikülleri genomun tek bir fonksiyonel kopyasını içerir (Easton ve ark., 2004; Valarcher ve Taylor, 2007). Virus P ve L proteinleri ile birlikte sarmal bir kompleks içinde nükleokapsid (N) proteini tarafından korunan RNA genomunu içerir. Virion küresel ya da filamentöz bir yapıdadır (Larsen, 2000).

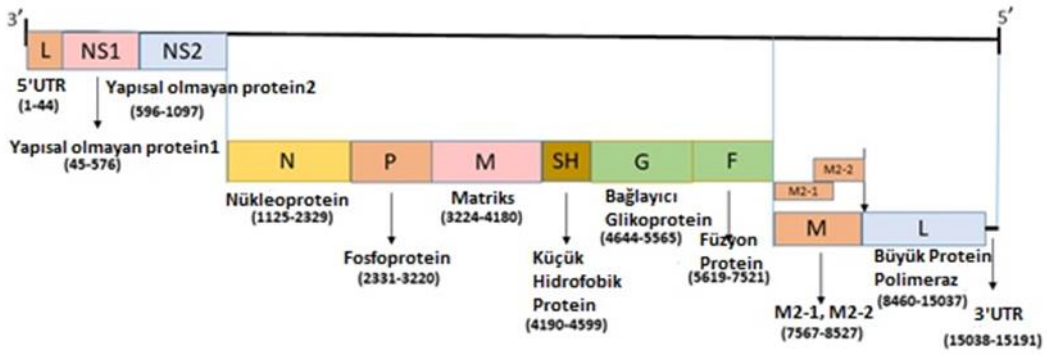


Şekil 2: Bovine respiratorik sinsityal virusun şematik görünümü **(ViralZone, 2011)**

2.2.2. Viral Proteinler ve Fonksiyonları

Virusun yapısal ve yapısal olmayan proteinleri vardır. Üçü transmembran glikoproteini olmak üzere viral genom tarafından kodlanan toplam 11 adet viral proteini bulunmaktadır (Şekil 3). Hücre reseptörüne bağlanmayı sağlayan Glikoprotein (G), Füzyon protein (F) ve küçük hidrofobik protein (SH) viral zarf üzerinde bulunan proteinlerdir (Şekil 2 ve Şekil 3). Zarf yapısal olarak, nükleoprotein (N), fosfoprotein (P), RNA bağımlı polimeraz protein (L) ve

15000 nükleotitden oluşan genomik RNA'nın oluşturduğu sarmal yapıdaki nükleokapsidi sarar (Bukreyev ve ark., 2000). Virionun yüzeyinde bulunan spike (çıkıntı)ların içinde, sorumlu gen bölgelerince kodlanmış 3 adet transmembran yüzey glikoproteini bulunmaktadır. Matrix protein (M) zarfın altında konumlanmıştır (Şekil 2). İnfeksiyon sürecinde yapısal olmayan NS1 ve NS2 proteinleri oluşur (Şekil 3). İnfekte hücrelerde yapısal olmayan (Nonsitrüktürel) NS1 ve NS2 proteini kodlanmaktadır. Yapısal olmayan proteinler infekte hayvanları ayırmada olanak sağlar. M2 ve L proteini arasında oluşan ve M2-1 ve M2-2 proteinlerinin sentezi ile sonuçlanan örtüşme *Orthopneumovirus*ların karakteristik özelliğidir (Şekil 3). (Easton ve ark., 2004). BRSV *Paramyxoviridae* üyelerinden farklı olarak Hemaglütinin ve Nörominidaz aktivitesinden yoksundur. Viral partikül, aktin, cave olin-1 ve MHC sınıf 1 molekülleri gibi hücresel proteinleri de içermektedir (Valarcher ve Taylor, 2007).



Şekil 3: Virusun genom organizasyonu ve viral proteinler (King ve ark., 2011)

2.2.3. Yapısal Proteinler

2.2.3.1. Glikoprotein (G)

Glikoprotein (G), tip 2 türevinde bir glikoproteindir. BRSV izolatlarının farklılığına bağlı olarak 257 veya 263 aminoasite sahiptir (Mallipeddi ve Samal, 1993). G proteini virusun hücreye tutunmasını yani reseptöre bağlanmasını sağlar. HRSV-G ve BRSV-G proteini, virion yüzeyindeki heparin bağlayıcı bölgelerin hücre membranlarında bulunan glikozaminoglikanlar (GAG) ile etkileşimi sonucu virionun hücre yüzeyine tutunmasını destekler. Bu bağlamda, G proteinine özgün antikorlar, virusun hücrelere bağlanmasını bloke eder ve bu antikorlar BRSV'ye karşı korunmayı sağlar (Teng ve ark., 2001). BRSV-G proteini, diğer Paramyxoviruslarda bulunan benzer proteinlerden (Hemaglutinin ve Nörominidaz) farklıdır ve

hücresel müsinlere yoğun şekilde glikolize olmuş bir nonglobular proteindir. G proteininin %80'i infeksiyondan 24 saat sonra sentezlenir (Valarcher ve Taylor, 2007).

2.2.3.2. Füzyon Proteini (F)

Füzyon proteini, virusun hücrelere penetrasyonunda görev almaktadır. Nükleokapsidi sitoplazmaya ileterek viral membran ve konak hücre membranı arasında füzyon yoluyla hücre penetrasyonundan sorumludur. BRSV-F proteini, sinsityum ve çok çekirdekli dev hücreler oluşturan infekte ve infekte olmayan hücreler arasında zarların kaynaşmasından da sorumludur. BRSV-F proteini, nötralize edici antikorları indükler ve BRSV infeksiyonuna direnci artırır (Valarcher ve ark., 2000; Taylor ve ark., 2005). BRSV-F proteini 574 aminoasitten oluşmaktadır. BRSV'nin farklı izolatları arasında yapılan kısmi F proteini dizi analizleri sonucu %0.8 oranında nükleotid ve %1.8 oranında aminoasit varyasyonları saptanmıştır (Valarcher ve Taylor, 2007). BRSV-F proteini, öncelikle inaktif öncü F0 olarak sentezlenir. Füzyon aktivasyonu ile disülfid bağlı heterodimerlere proteolitik olarak bölünerek F1 ve F2 alt ünitelerini oluşturur. Bunlar replikasyonda önemli görevler üstlenirler (Zimmer ve ark., 2001).

2.2.3.3. Küçük Hidrofobik SH Proteini

SH proteini, kısa bir integral membran proteinidir ve *in vivo* ya da *in vitro* virus replikasyonu için fonksiyonel değildir. SH proteini 81 aminoasitten meydana gelmiştir. BRSV' nin farklı izolatları arasında %13' e varan değişkenlik barındırır (Rontved ve ark., 2000). BRSV-SH proteininin BRSV-F proteini ile etkileşerek virus aracılı hücre füzyonunda rol oynayabileceğine dair veriler bulunmaktadır (Feldman ve ark., 2000).

2.2.3.4. Matriks Proteinleri

Paramyxoviridae ailesindeki viruslardan farklı olarak BRSV üç matriks proteinine sahiptir. BRSV Matriks (M) proteini 256 aminoasitten oluşur ve *Paramyxoviridae* M proteinleri ile dizi benzerliği çok az düzeydedir. BRSV-M proteini viral zarfın iç yüzeyinde bulunur. Virus benzeri partiküllerin oluşumunda önemli rol oynar. M2-1 ve M2-2 proteinlerinin her ikisi de M2 mRNA tarafından kodlanmaktadır. M2-1 proteini transkripsiyonel zincir uzamasını teşvik eder ve gen bölgelerindeki okuma sıklığını arttırır. M2-2 proteinin transkripsiyondan RNA replikasyonuna kadar düzenleyici görev aldığı bildirilmiştir (Valarcher ve Taylor, 2007).

2.2.3.5. Nükleokapsid Proteinleri

Nükleoprotein (N), fosfoprotein (P) ve polimeraz (L) proteinleri nükleokapsidi oluşturur. Nükleoprotein, 391 aminoasit uzunluğundadır ve BRSV izolatları arasında %1.5 oranında nükleotid ve %0.7 oranında aminoasit farklılıkları içerir (Valarcher ve Taylor, 2007).

BRSV-N protein, virion ve infekte hücrelerde çok miktarda bulunmaktadır ve birçok görevi vardır. BRSV-N proteinin P, L ve M2-2 ile kombinasyonu nükleokapsidin temel unsurunu oluşturur ve viral genomu RNAse'dan koruyucu rolü vardır. BRSV-N proteini, viral RNA' nın transkripsiyon ve replikasyon aşamaları arasındaki geçişte rol oynar. BRSV-P proteini 241 aminoasitten oluşmaktadır. Viral transkripsiyon ve replikasyonda düzenleyici göreve sahiptir. BRSV-L proteini 2162 aminoasitten oluşur ve RNA bağlı bir polimerazdır. Viral transkripsiyon ve replikasyondan sorumlu olduğu bulunmuştur (van den Hoogen ve ark., 2002; Easton ve ark., 2004).

2.2.4. Yapısal Olmayan Proteinler (NS1 ve NS2)

BRSV ile Paramyxoviruslar arasındaki önemli fark iki adet yapısal olmayan proteine sahip olmasıdır. Bunlar NS1 ve NS2 proteinleridir ve sırasıyla 136 ve 124 aminoasit içermektedir. BRSV ile infekte hücrede, ilgili genler tarafından NS1 ve NS2 yüksek miktarda kodlanır fakat saflaştırılmış virionlarda bu proteinler eser miktarda tespit edilmektedir. HRSV-NS1 proteini HRSV-M proteini ile ortak presipitasyon oluşturmaktadır. Bu durum viral RNA transkripsiyonu ve replikasyonu açısından güçlü bir inhibitör özellik kazandırır (Schlender ve ark., 2000; Guzman ve Taylor, 2015). BRSV-NS2 proteini BRSV-NS1 proteinine kıyasla daha az seviyede transkripsiyonu inhibe edici özelliktedir. BRSV-NS2 proteini infekte hücrelerde BRSV-P ve BRSV-N proteini ile birlikte lokalize olur fakat herhangi bir yapısal protein ile presipitasyon oluşturmaz. Yapısal olmayan NS1 ve NS2 proteinlerinin *in vitro* virus replikasyonu için gerekli olmadığı fakat bu proteinlerden yoksun rekombinant virusların hücre kültüründeki çoğalmalarının yavaşladığı bildirilmiştir (Valarcher ve Taylor, 2007). NS1 ve NS2 proteinleri IFNα/β salgılanması ve immünitede önemli role sahiptir. Bu proteinler *in vitro* olarak infekte hayvanların ayırt edilmesinde kullanılabilecek testlerin geliştirilmesinde yardımcı olabilir (Valarcher ve Taylor, 2007).

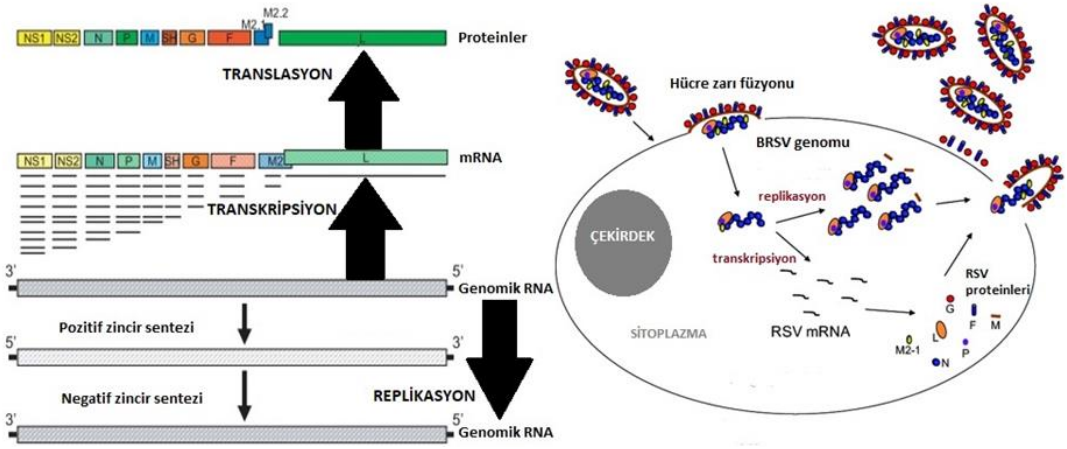
2.2.5. BRSV'nin Dayanıklılığı

BRSV zarflı bir virustur ve zarfsız viruslara oranla inaktivasyona daha duyarlıdır (Baker ve ark., 1997). Genomun içerdiği nükleik asit ısı değişimlerine karşı hassastır (Larsen, 2000). Etken eter, kloroform, %0,25 tripsin ve %0,1 sodium deoxycholate'a duyarlıdır. PH 3 ve altı değerlerde inaktive olmaktadır. 56 °C' de 30 dakika ısı ile inaktive olur. Yarı ömrü, 56°C'de 30 saniye-3 dakika ve 37°C'de 1-7 saattir. İnorganik tuzlar; özellikle magnezyum ve kalsiyum gibi iki değerli katyonlar, glukoz ve sukroz, virusu inaktivasyona karşı korumaktadır. %20 sukroz

ve magnezyum iyonları ilavesi BRSV'nin kararlılık ve purifikasyonunu arttırmaktadır (Stott ve Taylor, 1985; Wellemans, 1990).

2.2.6. Viral Replikasyon

BRSV replikasyonu konak hücre sitoplazmasında meydana gelmektedir (Şekil 4). Viral zarfın hücre membranına penetrasyonunu takiben ribonükleoprotein kompleksi (RNP) sitoplazma içerisinde serbest kalır ve polimeraz enzimi viral RNA' nın transkripsiyonunu başlatır (Şekil 4). Transkripsiyon sıralı bir başlama-sonlanma mekanizması ile subgenomik RNA üretimidir. Transkripsiyon ile gen başlangıç (GS) sinyali ve gen sonlandırma (GE) sinyali tarafından her bir mRNA kodlama birimini çevreleyen kısa korunmuş sinyal bölgeleri yönlendirilir. RNA replikasyonu öncelikle bir şablon görevi gören pozitif polariteli ara ürün sentezi ardından negatif polariteli genomik RNA iplikçiğinin sentezlenmesi ile meydana gelir. Nükleokapsid proteinleri sitoplazmada toplanır. Daha sonra M proteini ile birlikte viral glikoproteinlerin bulunduğu hücresel membrana göç eder (Şekil 4). Genomik ve genomik olmayan RNA paketlenir (Viuff ve ark., 2002; Valarcher ve Taylor, 2007). Viral replikasyon doğrudan hücre zarının yüzeyinde veya sitoplazmik veziküller sayesinde tamamlanır (Zhang ve ark., 2020).

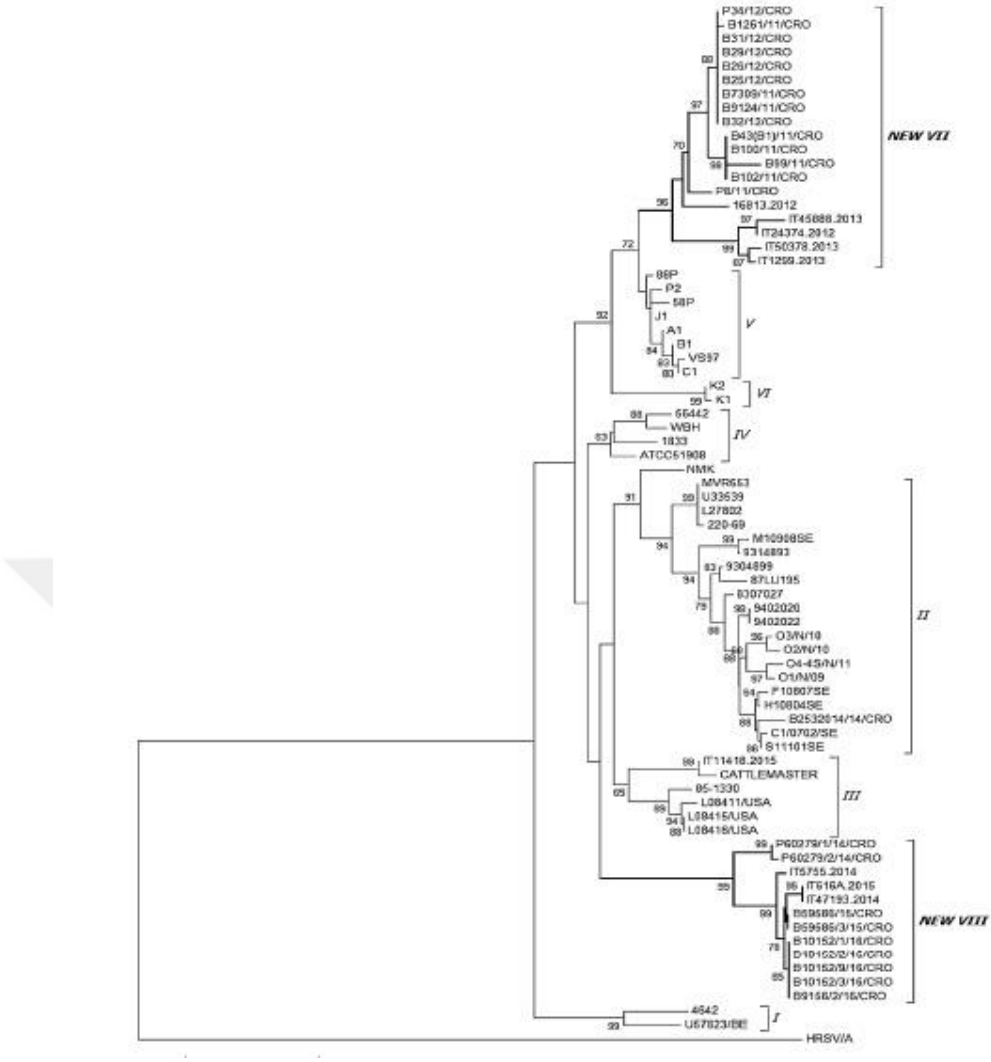


Şekil 4: BRSV replikasyonu (Valarcher ve Taylor, 2007).

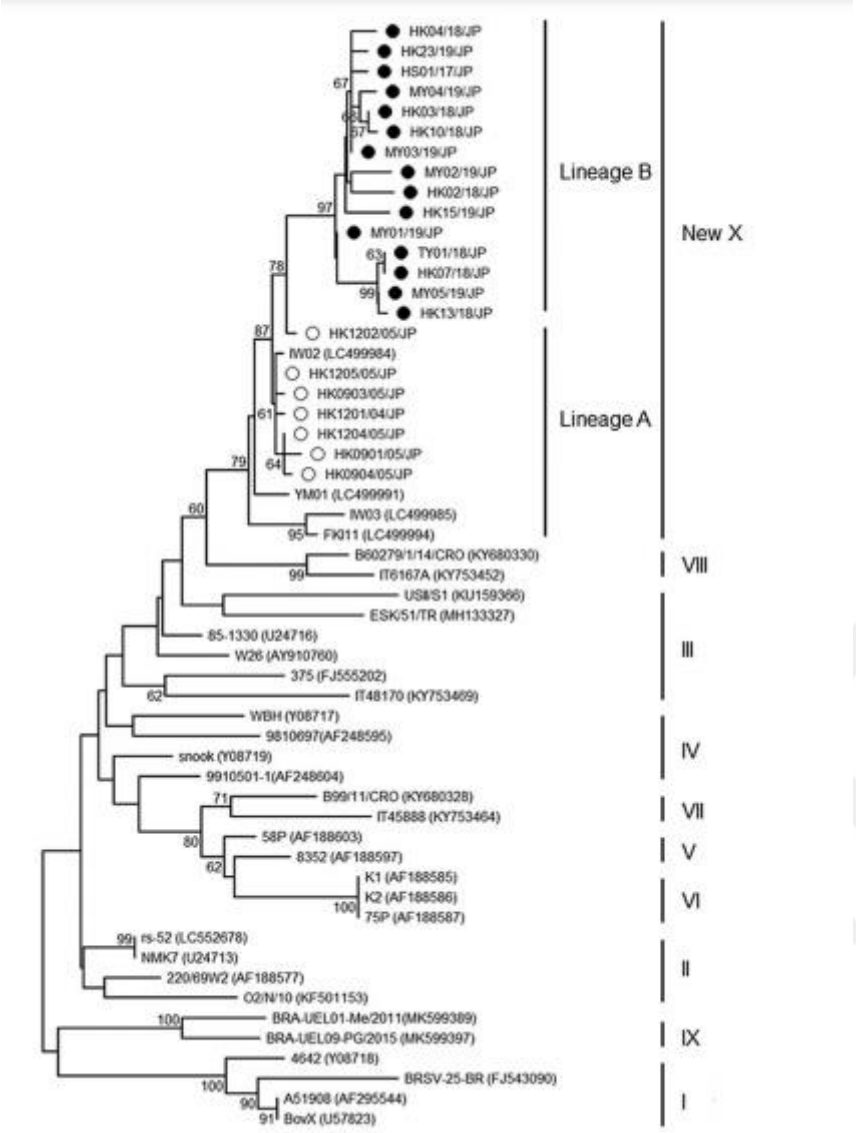
2.2.7. Antijenik ve Genotipik Gruplar

BRSV-G proteinine karşı oluşan monoklonal antikorlar (mAb) esas alınarak antijenik sınıflandırma yapıldığında A, B, AB ve tiplendirilmemiş olmak üzere 4 antijenik alt grup belirlenmiştir (Furze ve ark., 1994; Schrijver ve ark., 1996). Yapılan moleküler testler ve filogenetik analizler sonucu genetik farklılıklar antijenik farklılıkları destekler niteliktedir

(Valarcher ve ark., 2000). BRSV yüksek oranda genetik stabiliteye sahiptir ve coğrafi koşullara göre genetik çeşitlilik barındırır (Bertolotti ve ark., 2018; Krešić et al., 2018). Konak bağışıklık yanıtını indükleyen ve güçlü bir yanıt oluşumunu sağlayan BRSV-G proteininde oluşacak mutasyonların antijenik olarak önem taşıdığı bildirilmiştir (Giammarioli ve ark., 2020). BRSV-G proteininin immunodominant bölgesindeki mutasyonlar (AA 174-188) sonucu aşı ve saha izolatları arasında çapraz koruma yetersiz kalabilmektedir. Bu durumun antijenik veya genotipik farklılıklara uygun şekilde aşıların geliştirilmesi ile çözümlenebileceği vurgulanmıştır (Valarcher ve ark., 2000). BRSV-N proteini kodlayan gen bölgesine kıyasla daha az korunmuş ve mutasyon görülme sıklığı daha yüksek olan immunodominant BRSV-G ve BRSV-F proteinini kodlayan gen bölgeleri hedeflenerek yapılan filogenetik analizler neticesinde ile 6 farklı subgruba sahip BRSV (Valarcher ve ark., 2000) 2018 yılında yapılan çalışmalar sonucunda 8 farklı (I–VIII) subgrup olarak güncellenmiştir (Şekil 5) (Krešić ve ark., 2018; Bertolotti ve ark., 2018). 2021 yılında Kumagai ve arkadaşlarının BRSV-G geni hedeflenerek yaptığı sekans analizleri ve filogenetik çalışmalar sonucunda 10 farklı (I–X) subgrup tespit edilmiştir (Şekil 6).



Şekil 5: 2018 yılında yapılan soy ağacına göre şekillenen 8 farklı (I–VIII) subgrup (Krešić ve ark., 2018).



Şekil 6: 2021 yılında yapılan soy ağacına göre şekillenen 10 farklı (I–X) subgrup (Kumagai ve ark., 2021).

2.2.8. BRSV ve Diğer Türlerdeki Respiratorik Sinsityal Viruslarla Benzerlikler ve Zoonotik İlişki

Orthopneumovirus genusu üyeleri olan BRSV, HRSV ve MPV ile keçi (Rima ve ark., 2017), koyun ve köpek (Renshaw ve ark., 2011) ve domuz (Hause ve ark., 2016) pneumoviruslarının benzerlik gösterdiği bildirilmiştir. HRSV-G proteini ve koyun respiratorik sinsityal virus (Ovine Respiratorik Sinsityal Virus=ORSV) G proteini arasında %30 benzerlik bulunmaktadır (Rima ve ark., 2017). ORSV ve BRSV arasındaki genetik yakınlık neticesinde, HRSV'nin iki subgruba (HRSV-A ve HRSV-B) ayrılmasına benzer şekilde, ruminantlarda RSV'nin; BRSV ve ORSV olarak iki subgrup şeklinde ayrılması uygun görülmüştür (Renshaw ve ark., 2011). HRSV, BRSV ve CRSV'nin elektron mikroskobi ile virion morfolojisi

incelemeleri ve nötralizasyon testi ile her bir virusa karşı oluşan antiserumların nötralize etme yetenekleri karşılaştırıldığında BRSV ve CRSV daha benzer olarak saptanmıştır (Trudel ve ark., 1989). BRSV, ORSV ve CRSV arasında yapılan hibridizasyon analizleri sonucunda BRSV ve CRSV'nin ruminant pneumovirusları arasında en yakın ilişkili iki virus olduğu tespit edilmiştir (Alansari ve ark., 1999). *Orthopneumovirus* genusunda yer alan MPV-G geni ve domuz orthopneumovirusları (Swine Orthopneumovirus=SOV) G geni ile yapılan filogenetik çalışmalar sonucu %88 benzerlik saptanmıştır. Aynı çalışmada köpek pneumovirusları (Canine Pneumovirus=CPV) G geni ve MPV-G geni arasındaki benzerlik oranı %91.9 olarak tespit edilmiştir (Hause ve ark., 2016). *Orthopneumovirus* genusunda yer alan HRSV ile BRSV arasında da benzerlik saptanmış ve bu yakın genetik ve antijenik ilişki serolojik ve moleküler testler ile doğrulanmıştır (Buchholz, 2000; Meyerholz ve ark., 2004; Sacco ve ark., 2012). BRSV ile HRSV tüm genom dizilimleri arasında %81 genetik benzerlik saptanmıştır. HRSV-G proteini ve BRSV-G proteini amino asit dizilimleri %21-29 oranında benzerdir. HRSV ve BRSV antiserumları ile 6-64 titrelerinde kros nötralizasyon şekillenmektedir (Rima ve ark., 2017).

BRSV ve HRSV infeksiyonlarının türlerdeki epidemiyolojisi ve patogenezi de benzemektedir. Her iki virus da her yaş grubunda infeksiyon oluşturmakla birlikte genellikle erken yaş dönemlerinde şiddetli infeksiyonlar oluşturmaktadır. Buzağılarda 0-6 ay, çocuklarda ise 0-5 yaş infeksiyon şiddetinin en yüksek olduğu dönemdir. Yetişkinlerde genellikle hafif seyirli infeksiyonlar şekillenmektedir (Thonur ve ark., 2012; Taylor, 2017). Ilıman iklime sahip ülkelerde, iki virus da daha çok sonbahar ve kış aylarında salgın oluşturmaktadır (Van der Poel ve ark., 1995). Maternal antikorların varlığı BRSV ve HRSV infeksiyonlarının oluşmasını engellemez fakat hastalığın şiddeti maternal antikor düzeyi ile ters orantılıdır (van der Sluijs ve ark., 2010). BRSV ve HRSV infeksiyonlarında re-infeksiyon şekillenmektedir (Sacco ve ark., 2012). HRSV ve BRSV infeksiyonlarına bağlı oluşan patolojik etkiler de benzerdir. Bronşiyal epitelyal nekroz, paranşimal inflamasyon, lenfositik bronşiolit, alveolar eksudasyon görülen patolojik etkilerdir (Woolums ve ark., 1999; Meyerholz ve ark., 2004).

Bu iki virus birçok yöndeki benzerliğine karşın virusların *in vitro* ve *in vivo* infeksiyonlarda replikasyon hızı ve miktarı, F proteininin ayrılma bölgelerindeki furin proteininin ayrılmasına bağlı oluşan peptid salınımı, tip-1 interferon indiksiyonunun inhibisyonunda NS1 ve NS2' ye bağlı fonksiyonlar gibi farklılıkları içermektedir. BRSV antijenik olarak heterojen G proteinlerine sahip olmasına rağmen nükleotid çeşitliliğinin HRSV' den az olduğu gösterilmiştir (Easton ve ark. 2004; Taylor, 2017).

2.3. EPİDEMİYOLOJİ

2.3.1. Bulaşma, Saçılma ve Yayılma

Virus kapalı bakım koşullarında aerosol ya da damlacık yol ile direkt olarak, infekte ekipman ya da insan teması sonucu indirekt olarak bulaşmaktadır (Mars ve ark., 1999; Ohlson ve ark., 2010).Yapılan bir çalışmada 5-6 aylık yaş grubundaki 36 buzağı aerosol yol ile deneysel infekte edilmiştir. Bu çalışmada daha önceden BRSV pozitif olduğu tespit edilen sığırların konka hücrelerinden hazırlanan inokulum süpernatantı, maskeler vasıtasıyla nebülazatör kullanılarak buzağılara aerosol yol ile verilmiştir. Yapılan bu çalışmada BRSV infektif doz 3.9×10^5–9.7×10^5 PFU olarak bildirilmiştir (Lebedev ve ark., 2021). Virusun inkubasyon süresi 2-5 gündür. İnkubasyon süreci sonrası infekte olan hayvanlar virusu saçmaya başlar (Valarcher ve Taylor, 2007). Virus saçılımı nazal ve üst solunum yolu sekresyonlarıyla olmaktadır (Urban-Chmiel ve ark., 2014). BRSV ile deneysel infekte sığırlarda, infeksiyondan 10 gün sonrasına kadar virusun nazal sekresyonlar ile damlacık şeklinde saçıldığı tespit edilmiştir (Castleman ve ark., 1985). Yapılan başka bir çalışmada, deneysel BRSV infekte sığırların infeksiyon sonrası 3-9 gün süresince virusu bulaştırdığı saptanmıştır (Grissett ve ark., 2015). Valarcher ve ark., (2001) buzağılarda deneysel BRSV infeksiyonu sonrası etkenin 71 güne kadar lenf nodüllerinde kaldığını tespit etmişlerdir (Valarcher ve ark., 2001).

Virus saçılımı ve yayılması genellikle sürü içinde sınırlı kalmaktadır ancak diğer sürülerle temas veya kontamine canlı-cansız materyallerle virus sürüler arası da bulaşabilmektedir (Ohlson ve ark., 2010). Sürüler arasında doğrudan bulaşma daha çok sürüye infekte bir hayvanın katılmasıyla olmaktadır. Sürüye yeni bir hayvan katılacağı zaman kontrol ve testlerin yapılması, iyi bir sürü yönetimi ve genel hijyen kurallarına dikkat edilmesi bulaşma, saçılma ve yayılmayı doğrudan etkileyen faktörlerdir (Ohlson ve ark., 2010; Saa ve ark., 2012).

İn vivo koşullarda BRSV ve HRSV'nin doğal persiste infeksiyon oluşturduğu bildirilmemiştir (Valarcher ve ark., 2001). *İn vivo* HRSV ile deneysel persiste infeksiyon çalışmaları kobaylarda gerçekleştirilmiştir (Hegele ve ark., 1994; Streckert ve ark., 1996). Laringeal karsinom hücreler (Hep2) (Balbridge ve Senterfit, 1976), dönüştürülmüş insan B hücre serileri (Bangham ve McMichael, 1986) kullanılarak *in vitro* koşullarda HRSV ile deneysel persiste infeksiyon oluşturulmuştur. *Pneumoviridae* ailesi ile aynı takımda bulunan *Paramyxoviridae* familyasının üyelerinde de *in vivo* persiste infeksiyon oluşumu bildirilmiştir. Measles virus sinir ve lenfoid doku hücrelerinde persiste olabilmektedir (Chen ve ark., 1969; Brown ve ark., 1989). Parainfluenza tip1 virusun farelerde işitme merkezi hücrelerinde persiste infeksiyon oluşturduğu saptanmıştır (Mori ve ark., 1995).

2.3.2. Konak Duyarlılığı

BRSV ile doğal infeksiyon oluşumu üzerine yapılan bazı çalışmalarda virusun esas konağı olan sığırlardan farklı olarak koyun (Larios Mora ve ark., 2018), keçi (Citterio ve ark., 2003), alpaka (Rivera ve ark.,1987) ve vahşi ruminantlarda (Sausker ve Dyer, 2002) infeksiyon oluşturduğu saptanmıştır.

BRSV sığır testis, trakea, kalp, dalak, böbrek ve akciğer gibi birçok primer hücre kültüründe izole edilmektedir (Inaba ve ark., 1970, Jacobs ve Edington, 1971; Openshaw, 1995; Bastien ve ark., 1997). BRSV'nin deneysel olarak farklı organlardan köken alan koyun ve insan hücre kültürlerinde adaptasyonunu gösteren çalışmalar mevcuttur (Matumoto ve ark., 1974; Al Darraji ve ark., 1982). Yapılan deneysel çalışmalarda HRSV'nin buzağılarda hafif seyirli solunum yolu infeksiyonuna neden olduğu bildirilmiş ve makroskopik lezyonlar tespit edilmiştir (Jacobs ve Edington, 1971; Thomas ve ark., 1984). Karaca, kedi ve domuzdan alınan kan numunelerinde RSV'ye spesifik antikor saptanmıştır (Van der Poel ve ark., 1995; Allan ve ark., 1998).

RSV'nin infeksiyon oluşturduğu hedef hayvan grupları iki temel grup altında incelenebilir. İlki heterolog gruplar, ikincisi aynı kökenli gruplardır. RSV heterolog olarak şempanze (Belshe ve ark., 1977), babun (Papin ve ark., 2013), koyun (Olivier ve ark., 2009; Sow ve ark., 2011), gelincik (Stittelaar ve ark., 2016) gibi birçok farklı türlerde infeksiyon oluştururken *Orthopneumovirus*larda olduğu gibi soydaş ya da benzer kökenli hayvan gruplarında da infeksiyon oluşturmaktadır. MPV'nin fare ve sıçanlarda (Rosenberg ve ark., 2008), BRSV' nin sığırlarda (Valarcher ve ark., 2003; Blodörn ve ark., 2015) infeksiyon oluşturması bu duruma örnektir.

2.3.3. Morbidite ve Mortalite

Buzağılar genellikle yaşamlarının ilk yılında BRSV ile infekte olmaktadır ve bu süreçte BRSV'ye karşı spesifik antikor yanıtı gelişmektedir. Genç ve yetişkin sığırlarda infeksiyon asemptomik, hafif seyirli olabildiği gibi %20'lere varan mortalite gözlenebilir (Urban-Chmiel ve ark., 2014). İnfeksiyonun şiddeti, maruz kalınan virus yükü, infektif partikül sayısı, hayvanın yaşı ve kondisyonu, bakım ve beslenme koşulları ile doğrudan ilişkilidir (Sarmiento-Silva ve ark., 2012).

BRSV evrensel olarak oldukça yaygın gözlenen bir infeksiyondur, coğrafi bölgelere göre değişmekle birlikte bazı bölgelerde BRSV seroprevalansı %100'e ulaştığı bildirilmiştir. Yaş ve seroprevalans arasında doğru orantı bulunması dikkat çekilen bir konudur (Ohlson ve

ark., 2010). BRSV görülme sıklığı ile mevsimsel değişiklikler arasında da ilişki saptanmıştır (Larsen ve ark., 1999). BRSV infeksiyonunun insidensi sonbahar ve kış aylarında artış göstermektedir (Elvander, 1996; Norström ve ark., 2000).

2.3.4. BRSV İnfeksiyonlarının Türkiye'deki Sıklığı

Dünyanın birçok ülkesinde salgınlar oluşturan BRSV ülkemizde de sığır işletmelerinde özellikle buzağı ve genç sığırlarda görülen solunum sistemi infeksiyonlarında ilk sıralarda rol alan etkenlerden biridir. Virusun oluşturduğu hastalığa bağlı, ülkemizde çiftlik hayvanları endüstrisinde önemli ekonomik kayıplar şekillenmektedir (Yazıcı ve ark., 2020). Türkiye'de BRSV seroprevalansı ile ilgili ilk çalışma Burgu ve ark., (1990) tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada küçük aile işletmelerinde ve kamu işletmelerinde yetiştirilen 490 sığırdan alınan kan örneklerinde serum nötralizasyon testi ile %46.12 oranında BRSV'ye spesifik antikor tespit edilmiştir. Bir başka çalışmada 1997 yılında 10 farklı işletmeden toplanan 480 sığır kan serumunda %44.6 oranında BRSV seropozitifliği bildirilmiştir (Alkan ve ark., 1997). Diğer bir çalışmada 2000 yılında Doğu ve Güneydoğu Anadolu Bölgelerinde bulunan kamusal (5 adet) ve özel (12 adet) işletmelerde yetiştirilen süt sığırlarından alınan 471 kan serum örneğinde BRSV seropozitifliği %67.3 olarak saptanmıştır. Bu işletmelerin %88.2'sinde (15 işletmede) seropozitiflik tespit edilmiştir (Çabalar ve Şahna, 2000). Yavru ve arkadaşlarının (2005) yaptıkları araştırmada ise ülkemizde BRSV seropozitifliği %46.06 oranında saptanmıştır. Marmara Bölgesinde bulunan 7 farklı ilden 2008 yılında toplanan sığır kan numunelerinde BRSV antikor düzeyi %73 olarak bulunmuştur (Yeşilbağ ve Güngör, 2008). Aydın ili ve çevresinde yetiştirilen süt sığırlarında 2016 yılında yapılan araştırmada BRSV seropozitifliği %98.6 olarak tespit edilmiştir. Saptanan seropozitiflik işletmeler bazında değerlendirildiğinde %97.1- %100 oranında olduğu bildirilmiştir (Güdek, 2016). Başka bir çalışmada 6-15 aylık besi sığır kan serumlarında 2018 yılında yapılan araştırma sonucu BRSV spesifik antikor pozitifliği %97.1 olarak saptanmıştır (Öner ve Yeşilbağ, 2018). Ekim 2017- Mart 2018 tarihleri arasında hayvancılığın yoğun olarak yapıldığı Denizli ilinde farklı ilçelerden toplam 271 adet sığırdan kan numunesi alınarak BRSV spesifik antikor yönünden araştırılmıştır. Toplanan kan örneklerinin indirekt ELISA ile analizleri sonucunda BRSV seropozitifliği %76.38 olarak bulunmuştur (Karaotcu ve Yıldırım., 2019). Afyonkarahisar ve Uşak illerimizde 2022 yılında yapılan çalışmada BRSV'ye karşı oluşan antikor varlığının araştırılması amacıyla 43 farklı çiftlikten 557 kan serumu toplanmış ve BRSV seropozitifliği %58.48 olarak saptanmıştır (İnce ve ark., 2022).

Moleküler saptamaya yönelik olarak 2018 yılında yayınlanan bir çalışmada Erzurum ve civarındaki işletmelerde bulunan sığırlardan akciğer ve nazal svab numuneleri alınmıştır. Dokuz aylık ve 5 yaş arasında Montofon, Holştayn ve Simmental ırkı sığırlardan 28 akciğer numunesi ve 127 nazal svab olmak üzere toplam 155 örnek toplanmıştır. Örnekler BRSV-F gen bölgesini saptayacak uygun primerler ile RT-PCR ile analiz edilmiştir. Bu çalışmada 2 nazal svab numunesi BRSV pozitif olarak tespit edilmiştir. Pozitif olarak tespit edilen numunelerin sekans analizleri sonucu BRSV Subgrup III içerisinde olduğu ve 375/Brazil/ ve USII/S1/USA suşları ile benzerlik gösterdiği bildirilmiştir (Timurkan ve ark. 2019). Aralık 2018 ile Ocak 2019 tarihleri arasında Samsun ilindeki sığırlarda pneumoni ile seyreden şiddetli solunum yolu infeksiyonu rapor edilmiştir. Hasta olan sığırların BRSV de dahil olmak üzere BRDC etkenlerine karşı aşılanmadığı bildirilmiştir. Nekropsi sonrası üç sığırdan alınan akciğer numuneleri BRSV-N genini hedef alan primerler kullanılarak real time RT-PCR, BRSV-F genini hedef alan primerler kullanılarak nested RT-PCR ile analiz edilmiştir. PCR sonucu pozitif olarak saptanan akciğer numunelerinin filogenetik analizleri sonucu BRSV Subgrup III'e ait oldukları, aynı subgrup içerisindeki diğer Türk suşu ile %99.49 benzerlik gösterdiği bildirilmiştir (Yazıcı ve ark., 2020). Afyonkarahisar ve Uşak illerimizde 2022 yılında yapılan bir çalışmada 21 nazal svab toplanmış ve BRSV varlığı moleküler yöntemle araştırılmıştır. Alınan 21 nazal svabın 2'sinde BRSV-RNA tespit edişmiştir (İnce ve ark., 2022).

2.3.5. BRSV İnfeksiyonlarının Diğer Ülkelerdeki Sıklığı

BRSV, Dünyanın birçok ülkesinde buzağı ve genç sığırlarda oluşturduğu önemli infeksiyonlar nedeniyle ciddi ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Ellis, 2017; Yazıcı ve ark., 2020). BRSV infeksiyonu ülkeler arası ithalat ve ihracata bağlı gelişen sığır hareketliliği sonucu Dünya çapında yaygın olarak görülen bir infeksiyon halini almıştır (Brodersen, 2010).

Seroprevalansa yönelik çalışmalar kapsamında, 2017 Eylül ve 2018 Eylül zaman aralığında Irak'ta farklı yaş gruplarında ve aşısız hayvanlarda BRSV spesifik antikor taraması yapılmıştır. Toplam 450 kan serumu örneğinde %83.11 BRSV seroprevalansı saptanmıştır (Hussain ve ark., 2019). Norveç'te 2014 yılında sığır sürülerinde görülen solunum sistemi hastalıklarında BRSV'nin etiyolojik rolü araştırılmıştır ve sığırlarda görülen 21 solunum yolu infeksiyonu salgınının 18'inde (%86) BRSV serolojik veya moleküler testler ile saptanmıştır (Klem ve ark., 2014). Yılda yaklaşık 44.6 milyon buzağının yetiştirildiği Brezilya'da 26 çiftlikten toplanan 1243 kan serumu örneğinde BRSV spesifik antikorlarının varlığı virus nötralizasyon testi ile araştırılmış ve %79.5 oranında seropozitiflik tespit edilmiştir.

Numunelerin alındığı 26 çiftlikte BRSV seroprevalansının %40 ile %100 arasında değişkenlik gösterdiği bildirilmiştir (Hoppe ve ark., 2018). Ferella ve arkadaşları 2018 yılında yaptıkları çalışma sonucu Arjantin'de BRSV seroprevalansını %78.64 olarak tespit etmiştir. Sürülerde tespit edilen yüksek pozitiflik oranının yaş, klinik bulgularının mevcudiyeti ve sürü büyüklüğü gibi faktörler ile doğrudan bağlantılı olduğunu bildirmişlerdir (Ferella ve ark., 2018).

Moleküler saptama çalışmaları kapsamında, 2021 yılında İsveç'te yapılan bir çalışmada, mezbahaya gidecek sığırlardan toplanan numuneler BRSV yönünden araştırılmıştır. Toplam 764 svab numunesinde 16 tanesi (%21) BRSV-RNA tespit edilmiştir (Studer ve ark., 2021). Fransa'dan Güney İtalya'ya nakledilen 231 sığırdan sığırların kompleks solunum yolu hastalığını (BRDC) oluşturan etkenlerle mücadele kapsamında numune alınmış ve BRDC yönünden tarama yapılmıştır. Alınan 138 orofarengeal svab örneğinden 20 tanesi (%14.5) real time RT-PCR ile BRSV yönünden pozitif bulunmuştur (Padalino ve ark., 2021). Brezilya' da 2020 yılımda meydana gelen BRDC salgınında, yaşları 6 ve 90 gün arasında değişen düvelerden bronkoalveolar lavaj numuneleri alınmıştır. Semptomatik 15 düve, asemptomatik 6 düve toplam 21 düveden alınan örneklerde %38.1 oranında BRSV pozitifliği saptanmıştır (Oliveira ve ark., 2020). Hindistan' da 2016 Mart ve 2018 Haziran ayları arasında 166 sığır ve 240 bufalo olmak üzere toplam 406 hayvandan nekropsi sonrası akciğer, mediastinal/bronşial lenf nodülü ve trakea numuneleri alınmış ve 406 numunenin immunofloresan testleri ve moleküler testler ile analizleri sonucu 12'si (%2.95) BRSV yönünden pozitif olarak bulunmuştur (Kamdi ve ark., 2020).

2.4. PATOGENEZ

Sığır respiratörik sinsityal virus, nazal sekresyonlarla temas ya da aerosol yol ile vücuda girdikten sonra, trakea ve akciğer parankimi dahil olmak üzere siliyar ve siliyar olmayan solunum yolu epitel hücrelerinde çoğalabilmektedir. Virusun hücrelere tutunması ve hücre içine girişi BRSV-G proteininin hücre membranındaki glikoz-aminoglikanlar (GAG) ve sialik asit ile bağ oluşturması ve BRSV-F proteininin F1 ve F2 alt ünitelere bölünmesi sonucu oluşan virus hücre ilişkisi ile gerçekleşir. F2 alt biriminin türe spesifik, yüksek afiniteli bağlanma bölgelerinin reseptöre bağlanması ile hücre sitoplazmasına penetrasyon gerçekleşir ve replikasyon başlar (Valarcher ve Taylor, 2007; Ellis, 2009). İnfeksiyonun başlangıç döneminde virus nazofarenkste çoğalmaktadır. Üst solunum yolunda infeksiyon oluşturmasını takiben, primer infeksiyonun yayılması neticesinde pnömoni, bronşit ve bronşiyolit ile seyreden alt solunum yolu infeksiyonu da şekillenebilir (Philippou ve ark., 2000). BRSV'nin solunum yolu

epitel hücreleri dışında başka hücrelerde *in vivo* infeksiyon oluşturduğuna dair bir kanıt bulunamamıştır (Viuff ve ark., 2002). Yapılan bazı çalışmalarda sığır solunum yolu epitel hücre kültürlerinde *in vitro* infeksiyon oluşturmadığı belirtilmiştir (Goris ve ark. 2009). Bu çalışmalar neticesinde *in vivo* çevresel ve fizyolojik uyaranların virusun duyarlı hedef hücrelere tutunmasını kolaylaştırdığı düşünülmektedir (Harris ve Werling, 2003).

Sitoplazmik RNA transkripsiyonu, translasyonu ve viral mRNA'nın translasyonu ardından sitoplazmada virusun nükleokapsid formu oluşur ve M proteini ile birlikte glikoprotein F ve G' nin gömülü olduğu hücresel membrana göç eder. Viral partiküller apikal membrandan tomurcuklanır. Bu tomurcuklanma hücrede belirgin bir sitopatoloji olmadan gerçekleşmektedir. Bu durum *in vivo* BRSV infeksiyonlarında oluşan karakteristik ve geniş lezyonların oluşumunun farklı bir mekanizma sonucu oluştuğunu göstermektedir (Valarcher ve Taylor, 2007). Viuff ve arkadaşlarının (2002) yaptıkları *in vivo* ve Eckardt-Michel ve arkadaşlarının (2008) yaptıkları *in vitro* çalışmalar sonucu üst solunum yolu ve akciğer parankim hücrelerindeki (Tip 1 ve Tip 2 pnömosit) progresif hücre kaybının birincil sebebinin infekte hücrelerin apoptozis yolu ile ölmesi nedeniyle olduğunu tespit edilmiştir (Viuff ve ark., 2002; Eckardt-Michel ve ark., 2008).

İn vivo ve *in vitro* BRSV sitopatolojisinin karakteristik özelliği olan sinsityum oluşmasında virusun hücreye girişinde rol alan füzyon proteininin F2 alt birimi aracılık etmektedir. Füzyon proteininin translasyonu sonrası oluşan modifikasyonu ile ortaya çıkan virokin BRSV ile infekte sığırlarda düz kasların kasılmasını indükleyerek bronkokonstriksiyon oluşumuna neden olmaktadır (Groskreutz ve ark., 2007). Ayrıca, BRSV infeksiyonunun sitopatolojik etkileri ile rumen kaynaklı pneumotoksik maddeler arası bir bağlantı olduğu saptanmıştır (Ellis, 2009).

Virus suşu, hayvanın yaşı, ırka bağlı anatomik farklılıklar gibi faktörler viral genomun üst ya da alt solunum yolunda replike olma değişkenliğini meydana getirmektedir (Antonis ve ark., 2010). BRSV ile doğal infekte üç buzağıda virusun yayılımını saptamak amacıyla immünohistokimyasal analizler sonucu BRSV antijenine solunum yolu ve alveoler hücre epitellerinde saptanmıştır. Lenfoid dokular, bronşiyol lenf nodülleri ve dalakta BRSV antijenine rastlanmamıştır (Viuff ve ark., 1996). İnfeksiyon sonucu bronşla ilgili lenfoid dokuda (Bronchus associated lymphoid tissue- BALT) hiperplazi şekillenmiştir. BRSV ile infeksiyon sonucu bronş ve bronşiyol epitel hücrelerinde virusun replikasyonuna bağlı nekroz ve dökülme şekillenir. Virus bronşiyol lümende siliyar motilite hasarına neden olmaktadır. Bu durum akciğerdeki savunma mekanizmasını bozar ve ikincil bakteriyel infeksiyonların oluşumuna

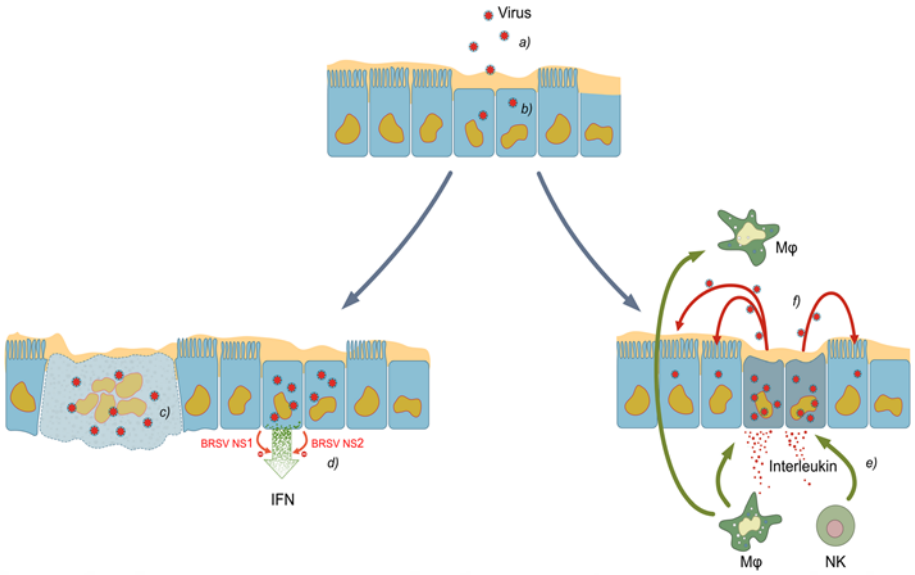
sebep olur (Sacco ve ark., 2012). Virusun doğrudan patolojik etkilerinin yanında indirekt etkileri de bulunmaktadır. Virusun çoğalmasına bağlı olarak oluşan sitokin yanıtı alveolar hasara sebep olur. Bronş ve bronşiyol lümendeki eksudat artışına bağlı olarak alveolde kollaps gerçekleşir (Viuff ve ark., 2002; Grell ve ark., 2005).

İnfeksiyonun solunum sisteminde sınırlı kalması virusun viremi ile yayılmadığını düşündürmektedir ancak kanda virus varlığı tespit edilmiştir (Johnston ve ark., 2021). Replikasyonun belirli fokal bölgelerde oluşu, BRSV'nin hücreden hücreye yayılımının bir sonucudur. Yapılan bir çalışmada deneysel infekte edilen hayvanların solunum yolu dışı doku ve organlarında BRSV varlığı PCR ile araştırılmıştır. Diğer dokularda az miktarda tespit edilen virusun makrofajlarla solunum sistemi dışındaki doku ve organlara taşındığı ve lenf sisteminde birkaç ay kalabildiği bildirilmiştir (Van der Poel ve ark., 1995).

2.5. İMMUN YANIT

2.5.1. Doğal Bağışıklık

Sığırlarda doğal olarak var olan fiziksel ve kimyasal bariyerler virusun organizmaya girişini engellemeye yardımcı olur. Bu doğal engeller aşılırsa, virus epitel hücrelerine girip çoğaldıktan sonra bu hücrelerde hasar oluşturur ve sinsityum oluşumuna neden olur. Daha sonra viral infeksiyon doğal antiviral immüniteyi uyarır ve doğal savunma başlar. NS1 ve NS2 proteinleri interferon yanıtını başlatır. İnfeksiyon alanına makrofaj ve doğal öldürücü hücrelerin göçü başlar ve bu hücreler virus ile infekte hücreleri öldürürler ve doku hasarı şekillenir (Şekil 7). (Guzman ve Taylor, 2015; Makoschey ve Berge, 2021). NK hücreler infeksiyonun ilk iki günlük seyri döneminde tespit edilir. NK hücreler sitokin üretme yetenekleri ile doğal bağışıklık sisteminin temel bileşenleridir. Sığır NK hücreleri NKP46+-CD3 lenfositleri olarak karakterize edilmiştir (Boysen ve Storset, 2009). RSV ile infekte farelerde yapılan çalışmalarda NK hücrelerinin RSV replikasyonu kontrolünde ve akciğer patoloji gelişiminde önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Makrofajlar virus ve virusla infekte hücrenin fagositozu, tümör nekroz faktör-α (TNF-α), nitrik oksit ve IFNχ gibi antiviral moleküllerin üretilmesinden sorumludurlar (Li ve ark., 2021).



Şekil 7: BRSV infeksiyonu ve doğal immünite (Makoschey ve Berge, 2021). a: Virus sialik asit reseptörleri ile mukoza epitel hücrelerine tutunur; b-c: Virus epitel hücrelerine girer çoğalmaya başlar. Bu hücrelerde hasar oluşturur ve sinsityum oluşumuna neden olur; d:Viral infeksiyon doğal immuniteyi uyarır ve doğal savunma başlar. NS1 ve NS2 proteinleri interferon yanıtını başlatır; e:İnfeksiyon alanına makrofaj ve doğal öldürücü hücrelerin göçü başlar ve bu hücreler virus ile infekte hücreleri öldürürler. İnfeksiyon sonucunda doku hasarı da oluşur.

Doğal bağışıklığın başlaması, bağışıklıkta rol alacak virus ile ilişkili moleküllerin (Pathogen-associated molecular patterns=PAMPs) tanınması ve tanıma reseptörlerine (Pattern recognition receptor=PRRs) bağlanması ile gerçekleşir (Guzman ve Taylor, 2015). Virus ile ilişkili molekülerin tanınması en az üç farklı reseptör grubunu içermektedir. Bunlar, Toll benzeri reseptörler (Toll like receptors=TLRs), retinoik asiti indükleyebilen gen-I benzeri helikazlar (Retionic acid inducible gen-I like helicase= RHLs) ve nükleotid bağlayıcı oligomerizasyon alanı benzeri (NOD-like receptors= NLRs) reseptörlerdir. RSV infeksiyonlarında tanıma TLR2, TLR3, TLR4, TLR7 ve TLR8 olmak üzere birkaç TLR tarafından gerçekleştirilir. RSV' nin TLR3 ve RHLs aracılığıyla hava yolu epitel hücrelerini uyardığı gösterilmiştir (Bendelja ve ark., 2010; Zeng ve ark., 2012). Ayrıca, BRSV-F proteininin TLR4'e bağlanarak MD2 ve CD14 ile uyumlu biçimde NF-kβ aktivasyonuna aracılık ettiği bildirilmiştir (Liu ve ark., 2007; Lizundia ve ark., 2008). PRRs aracılığı ile viral etkenin tanınması tip-1 IFN üretimi ve IFN ile uyarılan genlerin indüksiyonu ile sonuçlanmaktadır.

Pneumoviruslar IFN sinyalizasyonu için farklı mekanizmalar kullanabilmektedir. HRSV ve BRSV yapısal olmayan proteinlerine bağlı olarak IFN ile indüklenen hücresel yanıtı inhibe etmek için stratejiler geliştirmiştir. BRSV yapısal olmayan proteinlerini kodlayan 2 gene

sahiptir. BRSV ve HRSV'nin yapısal olmayan NS1 ve NS2 proteinleri IFN'nin indüksiyonu sonucu oluşan immun yanıta karşı direnç oluşumunda rol oynar. BRSV'nin yapısal olmayan proteinleri interferon düzenleyici faktör 3(IRF)'ün fosforilasyonunu ve aktivasyonunu bloke eder. HRSV NS1 ve NS2 proteinleri IFN indüksiyonunda STAT2 inhibisyonunu başlatır (Lo ve ark., 2005). IFN yanıtına ek olarak PAMPs tarafından uyarılan PRRs ligasyonu, kazanılmış bağışıklık başlamadan önce gerekli olan proinflamatuvar ve diğer bazı sitokinlerin erkenden salınımına neden olur. Bu salınım, özellikle makrofajlar ve dendritik hücreler gibi antijen sunan hücrelerin aktivasyonu için önemlidir (Sacco ve ark., 2014).

2.5.2. Kazanılmış Bağışıklık

Viral infeksiyon doğal bağışıklığın sıvısal ve hücresel bileşenleri tarafından durdurulamaz ise kazanılmış immun yanıt başlar. Virusa özgün olan bu spesifik yanıtta, sitokinler ve antikorlar gibi sıvısal faktörler, antijen sunan hücreler, T ve B lenfositler gibi önemli hücreler görev almaktadır (Bueno ve ark., 2008). Attenue virus aşıları ile aşılanan buzağılarda oluşan kazanılmış bağışıklıkta, hem hücresel hem sıvısal yanıtın daha iyi oluştuğu ve virus saçımının azaldığı bildirilmiştir (Şekil 8) (Makoschey ve Berge, 2021).

2.5.2.1. Antijen Sunan Hücreler

Vücuda giren virusun proteinlerinin immun sistem hücreleri tarafından tanınması ve ileriye yönelik hafıza hücrelerinin oluşması için antijen sunum işlemine gerek vardır. Makrofajlar ve dendritik hücreler antijen sunulmasında rol alan en önemli hücrelerdir. Antijenler MHC-II aracılığıyla yardımcı T hücrelerine sunulduktan sonra diğer hücrelerin aktive edilmesi ve hücresel iş birliğinin sağlanabilmesi için gamma interferon, IL-2 ve IL-4 gibi önemli sitokinler salgılanır. Vücutta oluşan bu tanıma ve immun sistem hücrelerinin aktivasyonu sonucu virusa karşı T ve B hücresi yanıtı başlar (Meyer ve ark., 2008).

2.5.2.2. T Hücresi Yanıtı ve Virusun Öldürülmesi

Viral infeksiyonlarda T hücreleri konak hücre savunmasında önemli role sahiptir. BRSV infeksiyonunun oluşması ile buzağıların akciğerlerinde yardımcı CD4 ve sitotoksik CD8 T hücrelerinde artış olduğu bildirilmiştir (Antonis ve ark., 2006; Antonis ve ark., 2010). Yardımcı T hücreleri antijen sunan hücreler tarafından MHC-II aracılığıyla viral antijenleri tanıdıktan sonra T ve B hücresi yanıtı başlar. Bu bağlamda viral infeksiyonlara karşı sitotoksik yani öldürücü T hücresi aktivasyonu ve öldürme işleminin başlaması virusa karşı savunmada önemlidir (Gaddum ve ark., 1996; Gaddum ve ark., 2003). BRSV'ye özgü MHC-I aracılı sitotoksik T hücrelerinin infeksiyondan 7-10 gün sonra akciğerde ve periferik kanda tespit

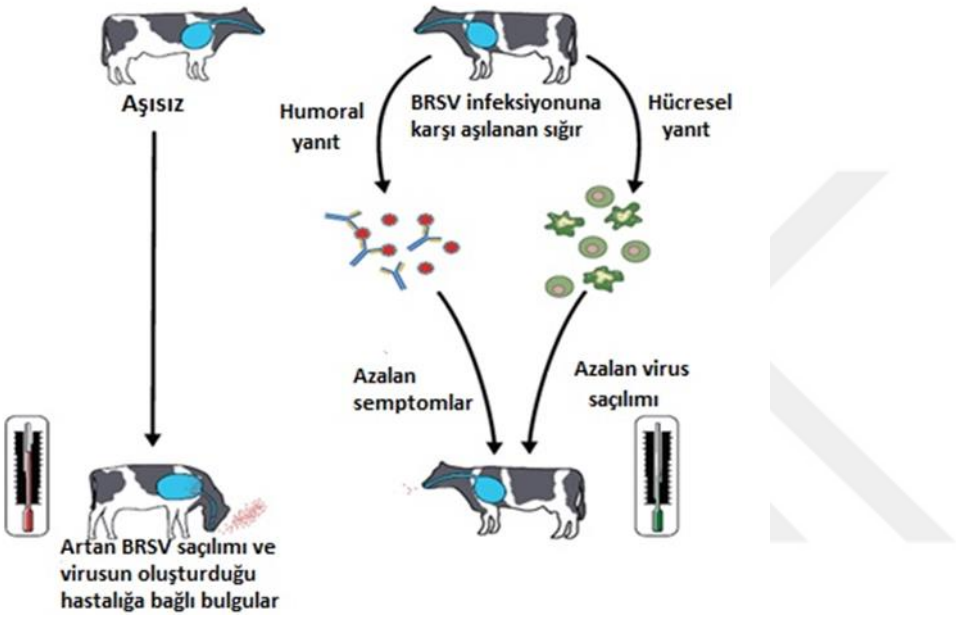
edilebildiği bildirilmiştir (Gaddum ve ark., 1996). Ayrıca, BRSV ile infekte sığırlarda yapılan çalışmalarda infeksiyondan 3-4 gün sonra akciğerlerde hızlı ve geçici bir IL-4 ve IL-13 ekspresyon artışı, 5-8 gün sonra geç bir IFNχ ekspresyon artışı saptanmıştır (Gershwin ve ark., 2011). HRSV'de olduğu gibi BRSV infeksiyonu sonrası oluşan immun yanıt ömür boyu koruyucu nitelikte değildir ve sığırlar tekrar infekte olabilir. Bir başka deyişle T hafıza hücreler uzun süre kalıcı değildir. Buna karşın, BRSV ile tekrar infekte olan sığırlarda infeksiyon genellikle hafif seyirli ya da subklinik seyretmektedir (Van der Poel ve ark., 1995).

2.5.2.3. B Hücresi Yanıtı ve Antikor Oluşumu

Virusun epitel hücrelerine girip infeksiyonun başlamasıyla beraber B hücrelerinin plazma hücresine dönüşmesiyle plazma hücrelerinden bol miktarda antikor sentezlenir. Mukozaların korunmasında IgA yanıtı sistemik koruma için IgG ve IgM'ler önemlidir (Guzman ve Taylor, 2015). BRSV infeksiyonu daha çok 0-6 aylık buzağılarda görülmektedir. Buzağılarda solunum yolu infeksiyonu görülme sıklığı ve şiddeti serumdaki maternal antikor seviyesi ile ters orantılıdır. Buzağılar maternal antikorları transplasental olarak değil doğumdan hemen sonra anne sütü ile ağız yoluyla almaktadır. Buzağıların anneden aldığı kolostrum yolu ile edindiği maternal antikor düzeyi, annenin BRSV infeksiyonunu geçirmesi ya da BRSV infeksiyonuna karşı aşılanmış olması durumuna göre değişiklik göstermektedir (Kimman ve Westenbrink, 1990).

Nötralizan antikorlar, virusun yüzey glikoproteinleri olan F ve G ye karşı oluşmaktadır. F proteinine özgü nötralizan monoklonal antikorların (mAb) pasif transferi buzağıları BRSV infeksiyonuna karşı korumaktadır. BRSV-F proteini BRSV-G proteinine oranla virusun daha stabil bölgesidir (Thomas ve ark., 1998). Buzağının maternal antikorları F proteinin 255-275 ve 417-438 aminoasit dizilimlerini içeren antijenik bölgelerini tanır ve sinsityum oluşumunu inhibe eder (Arbiza ve ark., 1992; Thomas ve ark., 1998). BRSV-G proteini daha az korunur bir bölgedir. BRSV-G proteini daha heterojen bir yapıya sahiptir ve tanımlanmış 3 antijenik alt grup içermektedir. Maternal antikordan yoksun BRSV ile deneysel infekte buzağılarda infeksiyondan 10-14 gün sonra kan serumunda BRSV spesifik IgM, bronkoalveolar lavaj (BAL) ve nazal sekresyonlarda BRSV spesifik IgA tespit edilmiştir (Kimman ve ark., 1987; Furze ve ark., 1997). BRSV'ye özgü oluşan IgA 3 ay boyunca nazal sekresyonlarda saptanabilmektedir. BRSV'ye özgü yüksek seviye malondialdehit (MDA) içeren kolostrum ile beslenen buzağılarda hem serumda hem mukozada bulunan antikorların etkinliği baskılanmaktadır (Ellis ve ark., 2018). Lokal bir yanıt olan salgısal antikor ve sistemik antikor yanıtın baskılanma derecesi kolostrum ile beslenen buzağılarda kolostrumda bulunan BRSV

spesifik MDA seviyesi ile ilişkili bulunmuştur (Kimman ve ark., 1987; Kimman ve ark., 1988). Bu durumdan farklı olarak, kolostrum alan buzağılarda re-infeksiyon durumlarında hızlı bir sistemik ve mukozal antikor yanıtı oluşmaktadır. B ve T hücreleri olgunlaşmış ve re-infeksiyona hazırdır ve virusun tekrar infeksiyon oluşturmasını engeller (Şekil 8). BRSV'ye karşı korumada yeterli bir IgA yanıtının önemli olduğu vurgulanmaktadır (Guzman ve Taylor, 2015).



Şekil 8: Sıvısal ve hücresel immun yanıtın infeksiyona karşı savunma ve virus saçılımına etkisi (Makoschey ve Berge, 2021).

2.6. KLİNİK BELİRTİLER

BRSV infeksiyonunun inkübasyon süresi 2-5 gün arasında değişmektedir (Valarcher ve Taylor, 2007). İnfeksiyon subklinik seyredebildiği gibi şiddetli infeksiyonlar da şekillenmektedir (Urban-Chmiel ve ark., 2014). Virus sadece üst solunum yolunu etkileyebildiği gibi hem üst hem alt solunum yolunu etkileyerek infeksiyonun şiddetinin artmasına neden olmaktadır (Verhoeff ve ark., 1984). Virusun etkilediği bölge ve organlara bağlı olarak klinik belirtilerin şekillendiği bildirilmiştir (Jia ve ark., 2021). Bu bağlamda, infeksiyonun klinik belirtileri hafif olabileceği gibi solunum güçlüğü ve pneumoni ile seyreden ciddi belirtiler sonucu ölümle sonlanabilir (Gershwin ve ark., 2008). Genel olarak infekte sığırlarda 40°C'nin üzerinde ateş, öksürükle birlikte seyreden taşipne, solunum güçlüğü, seröz göz ve burun akıntısı, ağız kuruluğu, iştahsızlık, depresyon, yürümede zorlanma ve sütçü

sığırlarda süt veriminde azalma gözlemlenmiştir (Valarcher ve Taylor, 2007). Şiddetli infeksiyonlarda solunum güçlüğü ön plandadır. Akciğerlerin oskültasyonunda bronkopnömoni veya bronşiyolite bağlı anormal solunum sesleri saptanmıştır. İnfekte hayvanlarda boynun gergin ve baş aşağıya doğru uzatılmış olduğu, hırıltılı nefes alıp verme ve dilin dışarı çıkarılarak güç solunumu işaret eden tipik vakalar bildirilmiştir (Woolums ve ark., 1999). Bazı vakalarda deri altı amfizem, ödem ve kilo kaybı bildirilmiştir (Bryson, 1993; Belknap, 1995).

2.7. TANI

Hastalığın tanısında virus izolasyonu, elektron mikroskopi, moleküler, serolojik ve immunohistokimyasal yöntemler kullanılmaktadır (Philippou ve ark., 2000; Kovarcik, 2001; Boxus ve ark., 2005; Bidokhti ve ark., 2012; Kamdi ve ark., 2020). Virusun hücre kültürlerine adaptasyonu ve izolasyonunun zor olduğu araştırıcılar tarafından vurgulanmıştır (Ellis, 2009; Goris ve ark., 2009). Bunun başlıca nedeni, *in vivo* BRSV infeksiyonu oluşmasında çevresel ve fizyolojik uyaranların ve hücresel faktörlerin katkısı olduğu için *in vitro* ortamlarda bu faktörlerin eksikliği nedeniyle virusun hedef hücrelere tutunmasının zor olmasıdır (Harris ve Werling, 2003). Moleküler yöntemlerden RT-PCR ve real time RT-PCR tanıda en çok kullanılan yöntemdir. Real time RT-PCR hızlı ve prob kullanıldığında spesifikliği arttırılabilen bir tanı yöntemidir (Boxus ve ark., 2005). RT-PCR daha çok sekans ve filogenetik çalışmalarda kullanılan bir yöntemdir (Bidokhti ve ark., 2012; Jia ve ark., 2021). Serolojik tanıda daha çok ELISA ve virus nötralizasyon testleri kullanılmaktadır ve ELISA en sık kullanılan yöntemdir (Akça ve ark., 2004; Yazıcı ve ark., 2020). Serolojik testler tanıdan çok antikor düzeylerinin ölçülmesi ve infeksiyon veya aşı sonucu oluşan immun yanıtın değerlendirilmesinde yararlı olmaktadır. Serolojik yöntemlerden virus nötralizasyon testi BRSV subgruplar arası çapraz reaksiyon çalışmalarında öne çıkmaktadır (Graham ve ark., 1998).

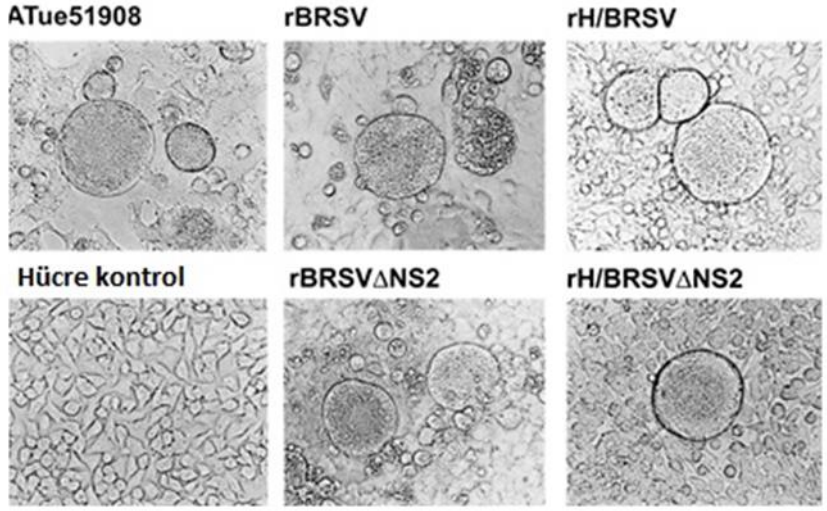
2.7.1. Virus İzolasyonu

BRSV izolasyonu amacıyla sığır kökenli birçok hücre kullanılabilmektedir. Bunlar fötal buzağı trakea hücresi, fötal buzağı akciğer hücresi, fötal buzağı böbrek hücresi, sığır böbrek, testis, tiroid, timüs, duedonum ve rektum hücreleridir. Bunların dışında hamster akciğer ve böbrek hücresi, Afrika yeşil maymun böbrek hücresi (Vero) ile HeLa hücreleri de BRSV izolasyonunda kullanılan hücrelerdir (Spilki ve ark., 2006). Virusun hücre kültürlerine adaptasyonu ve izolasyonunun zor olması, virus replikasyon hızının yavaşlığı, virusun oluşturduğu sitopatik efektin görülebilmesi için birden çok pasaj gerekmektirmesi gibi

zorluklar sebebi ile virus izolasyonu rutin tanı yöntemi olarak kullanılmamaktadır (Arns ve ark., 2003). Daha çok araştırma ve aşı amaçlı çalışmalarda virus izolasyonu çalışmaları yapılmaktadır.

BRSV izolasyonu çalışmalarında en çok tercih edilen MDBK (Madin-Darby Bovine Kidney) epitel hücreleridir (Arns ve ark., 2003; Sudaryatma ve ark., 2018; Jia ve ark., 2021). MDBK hücrelerindeki izolasyonlarda; Minimal Essential Medium (MEM) (Yazıcı ve ark., 2020), Dulbecco modified Eagle medium (DMEM) (Goris ve ark., 2009), Eagle's minimum essential medium (EMEM) (Spilki ve ark., 2006) gibi farklı hücre vasatları kullanılmaktadır. Hücrelerin çoğalmasını hızlandırmak amacıyla hücre vasatının içerisine %2.5 (Schlender ve ark., 2000), %5 (Goris ve ark., 2009), %10 (Spilki ve ark., 2006) değişen oranlarında fötal sığır serumu (Fetal bovine serum=FBS) eklenmesi izolasyon şansını arttırmıştır. Hücrelerde oluşabilecek olası bakteriyel kontaminasyonu önlemek amacıyla hücre vasatına penisilin/streptomisin eklenmektedir (Yazıcı ve ark., 2020). Hücreler canlı kalması ve çoğalması için %5 CO_2 içeren 37 °C sıcaklığında inkübatörde muhafaza edilir (Jia ve ark., 2021). Hücreler genellikle 75 cm^2 yüzey alanına sahip flasklarda çoğaltılmaktadır, bu büyüklükteki bir flaskta çoğaltılacak virus konsantrasyonu 2×10^6 hücre/ml'dir. Hücre flaskın %80-%100'ünü kaplar hale gelip tek sıra (monolayer) görüntü oluşturduğunda BRSV inokulasyonu için hazır haldedir (Spilki ve ark., 2006; Warner ve ark., 2015).

Virusun hücreye inokulasyonu için BRSV yönünden şüpheli ya da pozitif materyalden inokulum hazırlanması gerekmektedir. BRSV izolasyonu için; nazal ve orofarengeal svab (Kirsten Tjrnehoj ve ark., 2003), bronkoalveolar lavaj (BAL) (Valarcher ve ark. 2003) ve akciğer doku (Jia ve ark., 2021) numunelerinden inokulum hazırlanmaktadır. Hazırlanan homojenat steril filtrelerden (0.22 µm) geçirilir, bakteriyel kontaminasyonu önlemek amaçlı penisilin/streptomisin ilavesi ardından inokulasyon için hazır hale gelir (Yazıcı ve ark., 2020). Homojenat 100 doku infektif doz 50 (TCID50 =%50 tissue culture infective dose) oranında monolayer hücrelere adsorpsiyon metodu ile inokule edilmektedir ve inokulasyon sonrası 37°C inkübatörde 1 saat beklenerek virusun hücreye tutunması ve hücre içine girişi beklenmesi önerilmiştir. İnkübasyon sonrası virus ihtiva eden homojenat hücreden uzaklaştırılak hücrelerin canlılığını koruması için optimal koşulların devamlılığı sağlanmaktadır. Hücreler invert mikroskop altında günlük olarak takip edilerek, virusun hücrelerde oluşturduğu sitopatik etki (Cytopathic effect=CPE), sinsityum ve dev hücre oluşumu gözlenmelidir (Şekil 9) (Spilki ve ark., 2006; Warner ve ark., 2015).



Şekil 9: BSR T7/5 hücrelerde sinsityum ve dev hücre oluşumu. Sol alt: kontrol hücreler. Diğerleri: infekte hücreler ve sinsityum oluşumu (Buchholz ve ark., 1999)

2.7.2. Elektron Mikroskopi

Scanning Electron Microscopy (SEM) ve Transmission Electron Microscopy (TEM) kullanılarak virus ile infekte hücreler incelenerek virusun görünümü ve hücrelerdeki durumu araştırılmaktadır. Elektron mikroskopi spesifik bir tanı metodu değildir, daha çok araştırma amaçlı kullanılan bir yöntemdir (Phlippou ve ark., 1996; Philippou ve ark., 2000).

2.7.3. Moleküler Yöntemler

2.7.3.1. Eş Zamanlı Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real time RT-PCR)

Real time RT-PCR hızlı, sensitivitesi ve spesifitesi yüksek olan bir yöntem olup birçok araştırıcı tarafından farklı metotlar geliştirilerek kullanılmış ve BRSV saptanmasında en sık kullanılan moleküler yöntemlerdendir (Timsit ve ark., 2010; Thonur ve ark., 2012; Zhang ve ark., 2020). SYBR-Green, EVA-Green gibi boyalarla direkt olarak yapılabildiği gibi spesifiteyi artırmak için prob temelli real time RT-PCR da tanısal amaçla kullanılmaktadır. Validasyon çalışmaları yapılmış prob temelli real time RT-PCR daha spesifiktir ve rutin olarak tanıda önerilen bir yöntemdir (Nefedchenko ve ark., 2020). Real time RT-PCR'ın bir başka avantajı alınan örneklerde siklus eşiği (Cycle Threshold=CT) değerleri ve dolayısıyla viral yük hakkında veri elde edilip, farklı doku ve farklı hayvanlarda karşılaştırmalar yapabilmeye fırsat tanımasıdır. Bu açıdan bakıldığında patogenez çalışmalarında virusun doku-organ dağılımı hakkında veriler elde edilebilmektedir (Boxus ve ark., 2005; Yilmaz ve ark 2020).

2.7.3.2. Ters Transkriptaz-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (revers transcriptase polymerase chain reaction= RT-PCR)

RT-PCR hem tanısal hem de sekans çalışmaları için kullanılan bir yöntemdir (Klem ve ark., 2014; Jia ve ark., 2021; İnce ve ark., 2022). Real time RT-PCR yönteminde olduğu gibi bu yöntemde de hangi genin hedeflendiği tanısal ve sekanslama açısından önemlidir. BRSV-F ve BRSV-G genleri hedeflenerek RT-PCR (Vilcek ve ark., 1994; Larsen ve ark., 1999; Valarcher ve ark., 2001; Bidokthi ve ark., 2012), BRSV-N gen bölgesi hedeflenerek nested RT-PCR (Valarcher ve ark., 1999; Socha ve Rola, 2011), BRSV-F geni hedeflenerek nested RT-PCR (Oberst ve ark., 1993; Valentova ve ark., 2003) ile doğal ve deneysel BRSV infeksiyonlarının tespitinde kullanılmak üzere RT-PCR testleri geliştirilmiştir.

2.7.3.3. Sekans Analizleri

Sekans analizleri ile virusun kısmi ve tüm genom analizleri yapılabilmektedir. Sekans analizlerinde dizileme yapılacak genin en çok değişen veya mutasyona uğrayan bölgesi seçilir ve RT-PCR ile bu bölge çoğaltılır. Bu amaçla daha çok BRSV-G geni ve BRSV-F geni hedeflenmiştir (Larsen ve ark., 1999; Bidokthi ve ark., 2012). BRSV-G geni ve BRSV-F geninin bir kısmı veya tamamı sekanslama yapılarak genlerin dizilimi hakkında veriler elde edilebilir. Hedeflenen genlerdeki 1000 bp kadar olan kısımlar Sanger sekanslama ile yapılabilmektedir (Klem ve ark., 2014). Daha büyük bölgeler veya virusunu tamamının sekanslanabilmesi için yeni nesil dizileme (next generation sequencing=NGS) yönteminden yararlanılmaktadır. NGS pahalı bir yöntem olması nedeniyle lokal veya bölgesel değişikliklerin saptanması amacıyla daha çok Sanger sekanslama yöntemi kullanılmaktadır (Kubacki ve ark. 2021).

2.7.3.4. Filogenetik Analizler

Filogenetik çalışmalar BRSV genomunun moleküler ayrıntılarının ortaya çıkarılmasına ve dolayısıyla farklı BRSV genotiplerinin belirlenmesine, saptanan genotiplerin hangi yerlerde sirküle olduğunu ve bu genotiplerin bulaşmadaki rollerinin anlaşılmasına olanak sağlamaktadır (Bertolotti ve ark., 2018, Kresic ve ark., 2018; Kumagai ve ark. 2021). Filogenetik analizler, virusun kökenini ve sonraki değişimlerini anlamamıza yardımcı olur (Valarcher ve ark., 2000). Filogenetik analizlerdeki son gelişmeler sayesinde sekans bilgilerinin daha detaylı analizleriyle BRSV infeksiyon modelleri oluşturulmuştur. Mevcut filogenetik analizler sonucunda ortaya çıkan mutasyonlar, yeni virus alt tiplerinin identifikasyonu, viral rekombinasyonlarının belirlenmesi, orijin ve tarihi gelişim süreci, virusun yayılma kabiliyeti gibi bilgiler saptanabilmektedir. Bu nedenle filogenetik analizlerden elde edilen bilgiler BRSV yayılımını

engellemeyi amaçlayan önlemlerin tasarım ve uygulamasında yardımcıdır (Sarmiento-Silva ve ark., 2012; Tamura ve ark., 2021).

Yapılan RT-PCR analizleri sonucunda çoğaltılan hedef genlerinin dizilimleri ile soyağacı oluşturulması için BioEdit, MEGA, Geneious, SnapGene ve PhyML programları kullanılmaktadır. Referans gen dizilimleri ile RT-PCR sonucu pozitif bulunan örneklerin gen dizilimleri Clustal W ile hizalanarak ve istatistiksel modeller kullanılarak Maximum Likelihood metoduyla soyağacı oluşturulmaktadır (Hussain ve ark., 2019; Jia ve ark., 2021).

Filogenetik analizler, daha önce serolojik çalışmalarla belirlenen antijenik farklılıkların genom bazında belirlenip genotipik farklılıkların sapatanmasına ve farklı genotip ve varyantların ortaya konulmasında yardımcı olmuştur. Bu nedenle son yıllarda sıkça kullanılmakta virusun genotipik farklılıkları hakkında ve Gen Bankası'na veri sağlanmaktadır.

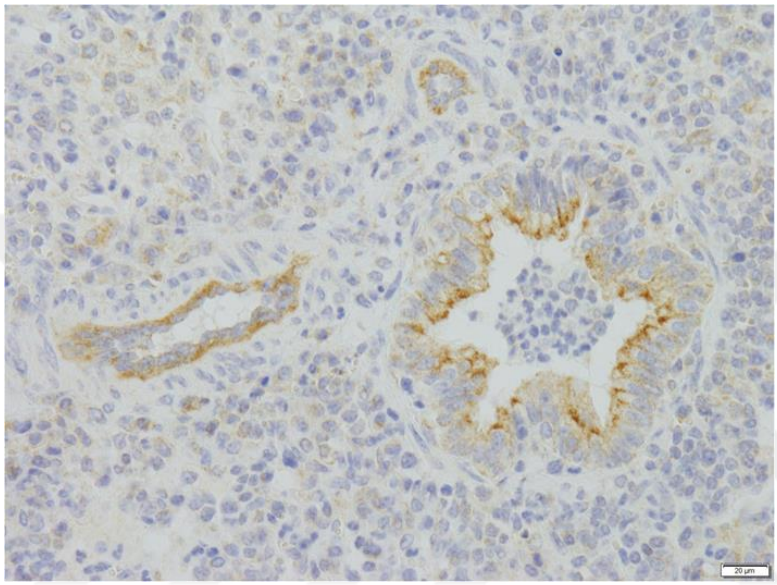
2.7.4. Serolojik Yötemler

BRSV infeksiyonlarına karşı gelişen antikor yanıtı, serum ve sekresyonlardaki nötralizan veya komplementi bağlayan antikorların ölçülmesi ile serolojik olarak tayin edilmektedir. Serolojik teşhis amacıyla nötralizasyon, komplement fikzasyon, indirekt immunfloresans, indirekt hemaglutinasyon, ELISA ve radioimmunassay gibi testler kullanılmaktadır (Graham ve ark., 1998; Akça ve ark., 2004; Bugarski ve ark., 2011; Yazıcı ve ark., 2020). Özellikle aşısız hayvanlarda oluşan infeksiyonların tanısında kullanılmaktadır (Hoppe ve ark., 2018). Aşılı hayvanlarda da aşılama sonrası oluşan antikor yanıtının araştırılmasında önemlidir. Aşılı hayvanlarda tanısal amaçla kullanılması için 3-4 hafta arayla çift serum örneği alınıp incelenmesi gerekmektedir (Ellis, 2017). BRSV spesifik antikor ve titresini saptamak amacıyla serolojik yöntemler arasında en sık ELISA ve virus nötralizasyon testi kullanılmaktadır (Akça ve ark., 2004; Ferella ve ark., 2018). Nötralizasyon testi ile antikor tespiti ve titresinin belirlenmesinde test edilecek serum sayısının sınırlı oluşu ve hücre kültürü çalışmaları gerektirmesinden dolayı hızlı tanı ve tespit gerektiren durumlarda tercih edilmemektedir (Verhoeff ve ark., 1984).

2.7.5. İmmunofloresans ve İmmunohistokimyasal Yöntemler

BRSV ile infekte materyallerde BRSV antijenlerinin saptanması amacıyla immunofloresans ve immunohistokimyasal yöntemler kullanılmaktadır. İmmunohistokimyasal testlerle peroksidaz ve floresan işaretli antikorlar aracılığı ile oluşan antijen-antikor reaksiyonu görüntülenmektedir (Özyıldız ve ark., 2017; Kamdi ve ark., 2020). Virusun doku ve organlardaki dağılımını incelemek ve hücrelerin durumunu yani sinsityum oluşumunu görmek

açısından oldukça faydalı bir testtir (Şekil 10). Akciğer dokusu ve bronkoalveolar lavaj (BAL) BRSV'nin imuunhistokimyasal testlerle tanısında en sık kullanılan numunelerdir (Rontved ve ark., 2000; Jia ve ark., 2021). Ancak testler subjektif hatalara açık testler olup RT-PCR veya real time RT-PCR gibi moleküler bir yöntemle doğrulanmasının yararlı olduğu bildirilmiştir (Vilcek ve ark., 1994). Deneysel çalışmalarda direkt lmmunfloresans (IF) testi ile RSV antijenleri inokulasyondan 16-18 saat sonra tespit edilebilmektedir (Wellemans, 1990).



Şekil 10: İmmunohistokimyasal test ile akciğer dokusunda sapatanan kahverengi boyanmış BRSV ve sinsityum oluşumu (sağ taraf) (Makoschey ve Berge, 2021).

2.8. NEKROPSİ VE HİSTOPATOLOJİK BULGULAR

2.8.1. Makroskopik Bulgular

BRSV ile infekte sığırların çoğunda akciğerlerde kraniyoventral bölgede atelektazi, kollaps, koyu kırmızı-mor lekeler ile karakterize lezyonlar görüldüğü bildirilmiştir (Sacco ve ark., 2014). Palpasyonda akciğer lastik kıvamındadır. Akciğerlerde sertleşme kraniyal, orta ve aksesuar loblar boyunca mevcut olabilir. Pulmoner ödem olan alanlar açık pembe şişkin alanlarla çevrilidir. Burun deliği, trake, bronş ve bronşiollerde köpüklü mukopürülant akıntı gözlenmiştir. Lobüler, interlobüler, subpleural amfizem ve ödem şekillenmesi ile kaudo-dorsal lobların gergin halde oldukları görülmüştür. Kaudo-dorsal lobların amfizeme bağlı olarak soluk renkte olabileceği rapor edilmiştir (Philippou ve ark., 2000; Viuff ve ark., 2002; Tjornehoj ve ark., 2003). Kraniyo-ventral bölgede şekillenen sertleşme ve kaudo-dorsal loblardaki ödem ve amfizem arasındaki sınır belirgin bir haldedir. İnterlobüler veya subpleural amfizem sonucu

şiddetli solunum problemi olan hayvanlarda bu durumun pnömotoraks, pnömomediastunum veya pnömoperikardiyum ile sonuçlanabileceği bildirilmiştir (Woolums ve ark., 1999). Bazı olgularda omuzlarda, sırtta, boyunda veya perineumda subkutan (deri altı) amfizem veya ödem saptanmıştır (Bryson, 1993). Pulmoner lenf nodüllerinde (mediastinal ve trakeabronşiyal) büyüme, ödem ve hemoraji gözlenen makroskopik bulgulardır (Kimman ve ark., 1987).

2.8.2. Mikroskopik Bulgular

BRSV infeksiyonu sonucu kraniyoventral loblarda bronkointerstisyel pnömoni, nekroz alanları ile karakterize bronşiyolit, sinsityum oluşumu, tip 2 pnömosit hiperplazisi, eksudatif veya proliferatif alveolit gibi mikroskobik lezyonların oluştuğu bildirilmiştir (Tjornehoj ve ark., 2003). Alveolar lümende proteinden zengin sıvı, fibrin kümeleri, hücre döküntüleri, alveolar makrofajlar ve bazen nötrofil birikimleri gözlenmiştir (Sacco ve ark., 2014). BRSV ile infekte hayvanlarda saptanan en yaygın mikroskobik lezyonların siliyar veya siliyar olmayan bronşiyol epitellerinin dejeneratif ve nekrotik hasarı ile karakterize bronşiyolittir. Bronşiyolit sonucu oluşan epitel hücre nekrozu, nekrotik hücre kümeleriyle çevrili ülseratif odakların oluşmasına yol açabileceği vurgulanmıştır. Erozyon ve ülserasyon nedeni ile bazal membranı kaplayan epitel tabaka incelmiştir. Bu durumda bronşlar düzleşmiş hücrelerle kaplanmış halde görülür. Bronşiyol lümen ya da bronş duvarlarında çok çekirdekli sinsityal hücrelerin bulunması BRSV infeksiyonuna işaret eder. Sinsityal hücrelere alveolar boşluklarda da rastlanılmaktadır (Caswell ve ark., 2012). Alveolar septumlarda lobüler yaygın interstisyel kalınlaşmalar görülebilir. Alveollerde görülen kılcal konjesyonun inflamatuvar hücrelerin infiltrasyonu ve tip-2 pnömosit hiperplazisinin sonucu olarak şekillendiği bildirilmiştir. Lezyonların yaygınlığı ve oluşan doku hasarının viral infeksiyondan ziyade konağın infeksiyona karşı oluşturduğu immun yanıtın şekli, şiddeti ve süreci ile ilgili olduğu bildirilmiştir (Gershwin ve ark., 2008).

BRSV infeksiyonunda görülen diğer mikroskobik bulgular interlobüler septumların lenfatik damarların ödemi sonucu genişlemesidir. Etkilenen sığırların trakeabronşiyal lenf nodülleri, folikülleri belirginleşen kortikal alanlar ile karakterizedir. Medullar sinuslarda sayıca değişiklik gösteren lenfosit, plazma hücresi, makrofaj ve nadiren nötrofil ve eozinofil gözlendiği rapor edilmiştir. İnfeksiyon ilerledikçe nekroze olan bronşiyol epitellerinin dokusu onarılmaya çalışılır fakat onarımla birlikte epitelyal hiperplazi ve obliteratif bronşiyolit gelişebilmektedir (Johnston ve ark., 2019). İnfeksiyondan yaklaşık 10 gün sonra kadar kısa bir süre içinde solunum yolları lümenine kadar uzanan, hava geçişi ve alveolar ventilasyonda kalıcı azalmalara neden olan fibröz polipler oluşabildiği bildirilmiştir (Sacco ve ark., 2014).

2.9. KORUMA, KONTROL ve ERADİKASYON

2.9.1. BRSV İnfeksiyonu Oluşumunu Etkileyen Risk Faktörleri

BRSV genellikle 0-6 aylık buzağılarda infeksiyon oluşturmasına rağmen tüm yaş gruplarının etkilendiği salgınlar bildirilmiştir (Thonur ve ark., 2012). Yaş faktörü infeksiyona duyarlılık açısından önemlidir (Şekil 11). İnfeksiyon etkeni ile daha önce karşılaşmış sürülerde, BRSV sadece duyarlı genç hayvanlarda genellikle buzağılarda infeksiyon oluşturmaktadır. Coğrafi bölgeye göre değişmekle birlikte buzağıların %70'inin 1 yaşına kadar BRSV ile karşılaştığı bildirilmiştir (Hagglund ve ark., 2014). Yaş grupları heterojen olan hayvanların bir arada tutulması, infeksiyonu subklinik geçiren ileri yaşlardaki sığırların virusu genç sığır ve buzağılara bulaştırmasına neden olmaktadır (Antonis ve ark., 2010).

İnfeksiyonun seroprevalansı iklim ve atmosferik basınca bağlı olarak farklı coğrafi bölgeler arasında büyük farklılıklar göstermektedir. Salgınların ılıman iklime sahip bölgelerde genellikle düşük atmosferik basıncın hakim olduğu sonbahar-kış aylarında daha fazla görüldüğü bildirilmiştir (Kimman ve ark., 1988; Elvander, 1996).

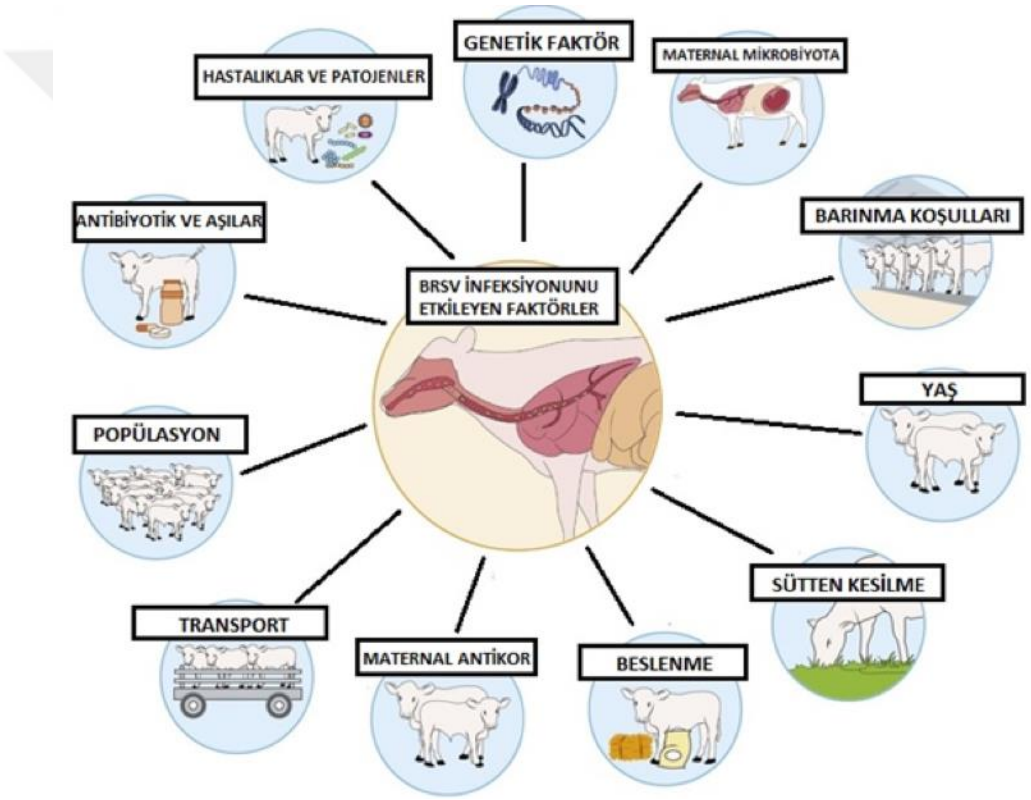
Hayvanlarda BRSV sıklığını ve salgınların çıkışını etkileyen bazı risk faktörleri bildirilmiştir. Sığırların üst solunum yolu mikrobiyotası, stres yaratan durumlar, iklim değişiklikleri (özellikle ani sıcaklık düşüşü), yetersiz kolostrum alımı , sütten kesilme, yüksek ya da düşük sıcaklıktaki barınma koşulları, yetersiz ve kalitesiz beslenme, dehidrasyon, sürüye dışardan hayvan katımı, genç sığırlarla yaşlıların bir arada bulunması, yetersiz ve etkisiz aşılamalar ve bir yerden bir yere kötü koşullarda taşımak infeksiyon oluşumu ve sıklığını arttıran en önemli faktörlerdir (Şekil 11) (Bidokthi ve ark., 2012; Hagglund ve ark., 2014; Zeineldin ve ark., 2019; Padalino ve ark., 2021). Bu faktörlerin BRSV ile infekte hayvanlarda ikincil bakteriyel infeksiyonların görülme sıklığını artırdığı rapor edilmiştir (Sarmiento-Silva ve ark., 2012). Bu durumda sığırların kompleks solunum yolu hastalığının oluştuğu ve mortalite oranının arttığı bildirilmiştir (Sarmiento-Silva ve ark., 2012). İnfeksiyon oluşumunu arttıran risk faktörleri virusa karşı oluşan immun yanıtı da olumsuz etkilemektedir (Virtala ve ark., 1999; Callan ve Gary, 2002). BRSV infeksiyonlarına karşı oluşan immun yanıt hastalık oluşumunu, şiddetini, klinik seyri ve prognozu etkileyen önemli bir faktördür.

Hastalığın oluşması ve klinik seyrinde infektif doz önemlidir. Bu nedenle, yoğun yetiştirme yapılan çiftliklerde ve havalandırma sisteminin kötü olduğu barınaklarda yetersiz havalandırma ve ortamdaki yüksek nem miktarı virus partikül sayısının artmasına sebep olmakta ve bulaşmayı kolaylaştırmaktadır (Wathes ve ark., 1983; Stärk, 1999). Sürülerin sağlık

ve bakımından sorumlu kişiler hastalığı, sürüler ve çiftlikler arası bulaştırabilir. Kontamine materyal kullanımı da virusun yayılımında etkilidir (Hay ve ark., 2016).

İnfeksiyon oluşumunu etkileyen en önemli faktörlerden biri hayvanların nakli sırasında artan strestir. Hayvanların kötü koşullarda taşınması, nakil sırasında olumsuz hava koşulları, su ve beslenme eksikliğine bağlı oluşan stres sonrası erken dönemde hastalık oluşmakta ve virusun yayılması açısından risk oluşturmaktadır (Dixit ve ark., 2001).

Duff ve Galyean (2007) iyi beslenme koşullarının solunum yolu hastalıkları görülme sıklığı ve immunoglobulin üretimi arasındaki doğrudan ilişkiyi ortaya koymuştur. Düşük enerji ve protein içerikli beslenme immun yanıt oluşumunu ve direnci olumsuz yönde etkilemektedir.



Şekil 11: BRSV oluşumunu etkileyen faktörler (Zeineldin ve ark., 2019).

2.9.2. BRSV İnfeksiyonlarının Önlenmesine Katkıda Bulunan Uygulamalar

Yukarıda açıklanan risk faktörlerine bağlı olarak BRSV infeksiyonlarının önlenmesi amacıyla yönetsel bazı uygulamalar yapılmasının yararlı olduğu rapor edilmiştir (Dixit ve ark. 2001; Duff ve Galyean 2007; Antonis ve ark., 2010; Urban-Chmiel ve Grooms, 2012; Stokstad ve ark., 2020). Bunlar:

- Enerji ve protein yönünden zengin, Zn, Cu, Fe, Se ve vitamin E, B, C içeren yemler ile beslenmesi
- Sürüye yeni katılacak hayvanların subklinik infekte olabileceği düşünülerek BRSV yönünden negatif olduğunun teyit edilmesi
- Sürüye yeni katılacak hayvanların mevcut hayvanlarla temas etmemesi ve izole edilmesi
- Hastalık tespit edilen hayvanların tedavi süresince izole edilmesi
- Hayvan nakilleri sırasında oluşacak stresi en aza indirmek amacıyla elverişli hava koşullarında taşınması, su ve beslenme ihtiyaçlarının giderilmesi
- İşletmedeki hayvanların yaş grubuna göre kategorize edilerek barındırılması
- Barınma koşullarında yeterli hava sirkülasyonu, hijyen, sıcaklık, nem koşullarının sağlanması
- Bir arada bulunan hayvan sayısının optimal kapasiteyi aşmaması
- Bakım ve beslenmede kullanılan materyallerin dezenfeksiyon ve sterilizasyonuna özen gösterilmesi
- Çoklu sürüler ile çalışan ve farklı çiftliklerde görev alan yetkili personelin virusu bulaştırma riskini gözeterek hijyen kurallarına dikkat etmesi ve hijyen eğitimlerinin verilmesi
- Güvenilir ve etkili aşılama programları oluşturulması ve hayvanların aşılanması

2.9.3. Aşılama ve Aşılama Stratejileri

BRSV aşılamalarında inaktif, modifiye canlı ve rekombinant aşılar kullanılmaktadır (Tablo 2.1) (Woolums ve ark., 2014; Vangeel ve ark., 2007; Blodorn ve ark.,2014). Bu aşılar parenteral ve mukozal yolla uygulanmaktadır (Ellis, 2017). İnaktif RSV aşıları 1960 yıllarının sonuna doğru geliştirilmiş ve formalinle inaktive edilen virusun ya direkt olarak ya da alüminyum adjuvantla birlikte hazırlanmasıyla elde edilmiştir (Kim ve ark., 1969). Modifiye canlı BRSV aşıları ilk olarak 1978 yılında Avrupa'da kullanılmaya başlanmış olup (Delforge ve Zygraich, 1978) kısa zaman sonra 1980'lerin başında Kuzey Amerika'da uygulanmıştır.

Geleneksel BRSV aşıları inaktif aşılar ve modifiye canlı virus aşıları olarak iki kategoride incelenebilir. Modifiye canlı virus aşıların daha uzun ömürlü ve daha güçlü bir immun yanıt oluşturma özelliği ile inaktif aşılara göre avantaj sağladığı bildirilmiştir (Ellis, 2017). Modifiye canlı aşıların avantajlarının yanında potansiyel riskleri de mevcuttur. Aşının içeriğinde bulunan virusun virülensi, aşının uygulandığı hayvanda virusun persiste olma riski,

virusun popülasyona yayılarak daha virulent suşlar oluşturma ihtimali kritik önem taşımaktadır (Ellis ve ark., 2018).

İnaktif aşıların oluşturduğu immun yanıtın şiddeti ve süresi daha az olmakla birlikte inaktivasyon süreçleri sonrası virusun fonksiyonel olarak kritik öneme sahip epitopları değişkenlik gösterebilmektedir (Ellis ve ark., 1995). Antijenik kısımlarda oluşan bu değişkenlik oluşan immun yanıtı etkilemekte ve attenue aşılarla aşılanan hayvanlardaki düzeyde immun yanıt oluşturamamaktadır (Ellis ve ark., 1995).

BRSV aşıları tekli veya diğer aşılarla birlikte kombine olarak uygulanabilmektedir. Sığırlarda infeksiyon oluşturan çok sayıda virus bulunmaktadır. Bu virusların her biri için tekli aşılar uygulanması maliyet, aşı tekrar takipleri ve depolanma açısından zordur. Uygulanan mevcut kombine aşılar da tekli aşılar kadar etkili olmakla birlikte birden çok etkene karşı oluşan total immun yanıtın, tek bir etken bazında değerlendirildiğinde daha düşük seviyede olduğu bildirilmiştir (Peters ve ark., 2004).

BRSV aşılamalarında aşılama zamanı önemlidir. Buzağıların RSV infeksiyonuna en duyarlı olduğu 0-6 aylık olduğu dönemde parenteral aşı uygulamaları, maternal antikor düzeyine bağlı olarak etkileşim nedeniyle beklenen etkiyi göstermemektedir (Mawhinney ve Burrows, 2005; van der Sluijs ve ark., 2010). Aşılama yapılması gereken bu dönemde, buzağıların kolostrum yoluyla aldığı antikor miktarları heterojendir (Fulton ve ark., 2014). Buzağılarda anneden kolostrumla alınan IgG'lerin yarı ömrü ortala 23 gündür ve buzağıları BRSV infeksiyonuna karşı birkaç ay korumaktadır (Kimman ve Westenbrink, 1990). Buzağılarda maternal antikorların düzeyini belirlemek için ELISA veya nötralizasyon testi ile ölçümler yapılmasında yarar vardır. Maternal antikorların aşı ile etkileşimlerine önlem olarak mukozal aşı geliştirme ve mukoza yoluyla immunizasyon çalışmaları yapılmıştır (Xue ve ark., 2010; Ellis ve ark., 2013). İntranazal olarak mukozal yol ile uygulanan BRSV aşısı sonucu mukozal IgA yanıtı oluşumu hedeflenmiştir. Oluşan IgA yanıtı ile üst solunum yolunda infeksiyonun önlendiği ve BRSV spesifik T hücre yanıtının uyarıldığı bildirilmiştir (Ellis ve ark., 2013).

Yeni doğan buzağılarda BRSV infeksiyonlarının şiddeti nedeniyle üst solunum yollarındaki mukoza ilişkili lenfoid dokunun (MALT) ilk haftadan itibaren gelişimini tamamlaması özelliğinden faydalanarak, özellikle yeni doğanların korunması amacıyla intranazal canlı aşılar geliştirilmiştir. Geliştirilen bu aşılar maternal antikor varlığından etkilenmeksizin lokal bağışıklık oluşturmaktadır (Meyer ve ark., 2008; Xue ve ark., 2010). İntranazal aşılar ile sağlanan lokal bağışıklığın kısa ömürlü olması nedeniyle, 2 aylıktan sonra

maternal antikorların azalmasıyla birlikte buzağıların parenteral yolla aşılanması ve uzun süreli bir bağışıklığın oluşturulması hedeflenmektedir (Patel ve ark., 2004). Buzağılarda aktif bağışıklığı sağlamak için 10 günden sonra intranazal aşılar uygulanmaktadır. Intranazal aşı sonrası hızlı bir aktif bağışıklığa sahip olan buzağı maternal antikorların aşı etkinliğini azaltıcı etkisi ortadan kalkıtığında parenteral yol ile aşılanarak uzun süreli koruycu etki sağlanmaktadır (Xue ve ark., 2010; Valarcher ve ark., 2021).

Nötralizan antikorların varlığında infeksiyon oluşmasına rağmen BRSV spesifik antikor düzeyinin yüksek olduğu durumlarda hastalığın oluşturduğu semptomların ve hastalığın şiddetinin az olduğu gözlenmiştir (Englund, 1994). Bu verilerden çıkarak gebeliğin son 3 ayında yapılan aşılama ile kolostrumdaki spesifik antikor miktarının artırılması yenidoğanları BRSV infeksiyonuna karşı koruduğu rapor edilmiştir (Ellis ve ark. 2018).

Gebeliğin son 3 ayında yapılacak aşı ile pasif immunizasyon sağlanmış olur. Doğum sonrası annede mevcut olan BRSV spesik antikorların yavruya geçerek korumayı artırdığı ve yavru aşılanana kadar olan zamanda yavruyu daha iyi koruduğu bildirilmiştir (Englund, 1994). Bu nedenle buzağıları korumak amacıyla annelerin gebelik döneminde inaktif aşılarla aşılanması sağlanabilir.

Tablo 1: Ülkemizde sığırlarda kullanılan BRSV aşıları (Tarım ve Orman Bakanlığı)

Aşı	**Suş**	**Aşı Tipi**	**İçerdiği viral etkenler**	**Canlı/ İnaktif**	**Uygulama Yolu**	**Uygulama Şekli**
Rispoval Intra-Nasal (Zoetis)	BRSV 375	Kombine	BRSV, PI3	Canlı	burun içi	10 günlük buzağılara burun içi yolla uygulandıktan sonra 21 gün koruyucu özelliktedir. Maternal antikorların aşı etkinliğini azaltıcı etkisi ortadan kalkıtığında parenteral aşı önerilmektedir.
Rispoval 4 (Zoetis)	BRSV 375	Kombine	BVDV, BRSV, PI3, IBR	Canlı	kas içi	3 aydan büyük sığırlara kas içi yolla 3-4 hafta arayla iki doz uygulanmaktadır. 12 haftalıktan önce aşılanmış olan buzağıların, 12 haftalıkken tekrar aşılanmaları önerilmektedir.
NASYM (Hipra)	Lym-56	Tekli	BRSV	Canlı	burun içi kas içi	10 günlük buzağılara burun içi yolla uygulandıktan 2 ay sonra kas içi uygulanır. 6 ayda tekrar önerilir. 10 haftalıktan büyük buzağılara kas içi yolla uygulandıktan 2 ay sonra kas içi uygulanır. 6 ayda tekrar önerilir.

BioBos Respi 4 (interhas)	BIO-24	Kombine	BRSV, BVDV, PI3	İnaktif	deri altı	8 haftalıktan itibaren buzağılara 2-4 hafta ara ile iki doz uygulanmaktadır. 6 ay sonra tekrar dozu önerilir. (2 haftalık buzağıların aşılanması mümkündür).
Bovilis Bovipast RSP (MSD)	EV908	Kombine	PI3, BRSV	İnaktif	deri altı	2 haftalık buzağılara 4 haftalık ara ile iki doz önerilmektedir.
Hiprabovis 4 (Hipra)	Lym-P56	Kombine	IBR, PI3, BVDV, BRSV	Canlı	kas içi deri altı	İlk doz kas içi yada deri altı uygulanmakla birlikte buzağı ve genç sığırlara 21-30 gün sonrası tekrar doz ve senelik tekrar önerilmektedir.
Hiprabovis Balance (Hipra)	Lym-56	Kombine	BRSV, BVDV, PI3	Canlı	kas içi deri altı	4 haftalık yaştan itibaren ilk doz kas içi yada deri altı uygulanmakla birlikte buzağı ve genç sığırlara 21-30 gün sonrası tekrar doz ve senelik tekrar önerilmektedir.
Vac-Sules Feedlot (Simurg)		Kombine	BRSV, PI3, IBR, BVDV	İnaktif	deri altı	Aşılanmamış hayvanlarda 1 aylıktan büyük hayvanlara 4 hafta arayla iki defa önerilmektedir. İlk aşılama programından sonra her yıl bir defa tek doz yapılması önerilmektedir.

BRSV'ye karşı etkili bir aşılama için dikkat edilmesi gereken noktalar:

1. Aşılama sonrası güçlü bir immun yanıt oluşmalıdır ve tesadüfi örneklemelerle aşı titreleri sürü bazında ölçülmelidir (Ellis ve ark., 2018).
2. Buzağıların BRSV infeksiyonuna en duyarlı olduğu dönemde maternal antikorların varlığı parenteral aşıların (özellikle canlı aşıların) etkilerini inhibe etmektedir (Valarcher ve ark., 2021). Bu nedenle canlı aşılar maternal antikorların en düşük olduğu dönemde yapılmalıdır.
3. Maternal antikor etkileşiminden kurtulmak için doğumdan 10 gün sonra intranazal aşı yapıp maternal antikor düzeyi düşünce parenteral aşılar uygulanabilir.
4. BRSV dört antijenik alt grup ve 10 farklı subgrup içermektedir. Antijenik farklılık daha çok BRSV-G proteini bölgesinde saptanmıştır (Kumagai ve ark., 2021. Uygulanan aşılarda bu noktanın hatırda tutulması gerekir.
5. Yeni nesil BRSV aşılarındaki temel amaç daha güçlü bir immun yanıt oluşturmak ve Th1 tip (T helper-1) CDC (conventional dendritic cell) T hücre yanıtını

uyarmaktır. Bu hedef antijen olarak bilinen CDC T hücresi hedefli proteinler veya Th1 aktive edici adjuvantlar ile gerçekleştirilebilmektedir (Kolb ve ark., 2020).

6. Rekombinant aşı teknolojisi geleneksel aşıların sunduğu dezavantajların teorik olarak üstesinden gelebilecek rasyonel bir immunojen tasarlama olasılığı sunmaktadır (Gershwin, 2012).
7. Rekombinant aşı geliştirirken temel hedef BRSV-F ve BRSV-G glikoroteinleri, daha az ölçüde BRSV-N ve BRSV-M proteinleridir. Bu proteinler tek başına ya da kombine halde kullanılabilir. Virusa ait bu proteinler nötralizan antikorları ve T hücre yanıtını uyarıcı özelliğe sahiptir (Thomas ve ark., 1998). Bu bağlamda hücre aracılı immun yanıtın koruyuculuk özelliği vurgulanmaktadır (Letellier ve ark., 2008).

2.9.4. Biyogüvenlik Uygulamaları

Biyogüvenlik, infeksiyon ya da hastalıkların bir popülasyon içerisine girişini, yayılmasını ve diğer popülasyonlara bulaşmasını kısıtlamak için tasarlanmış bir dizi yönetimsel, fiziksel ve kimyasal önlemlerin bütünüdür (OIE Glossary of Terms, 2019).

Hastalıkların önlenmesi ile ilgili alınan önlemlerde, çiftlik hayvanları endüstrisindeki sistem farklılıkları küresel olarak farklı stratejilerin ortaya çıkmasına neden olmuştur. Tüm bu farklılıkların yanı sıra bakım beslenme koşullarının iyileştirilmesi, bağışıklığın güçlendirilmesi, patojenlere maruz kalmanın en aza indirilmesi gibi temel unsurlar evrensel yaklaşımlardır (Stokstad ve ark., 2020). Çiftlik yararına olarak, virusun doğal persiste infeksiyon oluşturmaması, BRSV re-infeksiyonlarının yeni virus girişinden kaynaklandığını düşündürmektedir (Larsen,2000; Bidokthi ve ark., 2012; Ohlson ve ark., 2013).

Biyogüvenlik önlemleri temel hatları ile iç ve dış olarak iki kategori altında incelenmektedir. Dış biyogüvenlik önlemleri sürüye dışarıdan patojen girişini engelleyen önlemleri kapsar. İç biyogüvenlik ise sürü içerisinde patojenlerin yayılımını ve hastalığın bulaşmasını sınırlandırmak ile ilgili önlemlerdir (Callan ve Garry, 2002). BRSV'nin sürüler arası bulaşmasının en önemli sebepleri canlı hayvan hareketliliği, insan hareketliliği ve kullanılan malzeme, alet ve ekipmanlardır (Hay ve ark., 2016; Oma ve ark., 2018). Sürüye yeni bir hayvan katılmadan önce dikkat edilecek hususlar dış biyogüvenlik önlemleri kapsamındadır. Sığırların doğru ve güvenli bir şekilde transportu, stres faktörü oluşturmaması açısından oldukça kritiktir. Yeni gelen sığırların popülasyondan farklı bir ortamda izole edilmesi, ülkede

sirküle olan ve risk oluşturan patojenler yönünden negatif olduğunun tespiti sonrasında sürüye katılması gerekliliği vurgulanmaktadır (Ohlson ve ark., 2010).

Sürü içi popülasyonunda hastalık kontrolü ve izlenebilirlik iç biyogüvenlik önlemleri kapsamındadır. Belirli zaman aralıklarla numuneler alınarak virusu ya da antikor yanıtını tespit etmek amaçlı taramalar yapılmalıdır. Bu taramalar sonucu subklinik hayvanların virusu sürü içerisinde bulaştırmasının önlendiği bildirilmiştir (Brodersen, 2010). ELISA testleri ile yapılacak antikor tayini bağışıklık durumunun takibi için önem taşımaktadır (Ohlson ve ark., 2010). Havalandırma, iyi bakım ve beslenme koşulları güvenilir ve etkili aşılama popülasyonu hastalıktan korumada kritik önem taşır. Hastalıktan koruma hayvan refahının da temel bir parçasıdır (Antonis ve ark., 2010; Urban-Chmiel ve Grooms, 2012). Çoklu sürüler ile çalışan veteriner hekimlerin, teknikerlerin, hayvan bakıcı ve diğer görevli kişilerin kıyafet, ekipman ve ayakkabılarını değiştirmesi sürüler arası kontaminasyonu önlemek için önemli olduğu belirtilmiştir (Stokstad ve ark., 2020).

Biyogüvenlik uygulamalarında maliyet, fayda algısı, iş yükü, önlemlerin nasıl uygulanacağı ile ilgili bilgi ve aksiyon yetersizliği biyogüvenlik aşısından sıkıntılar yaratmaktadır (Gunn ve ark., 2008; Kristensen ve Jakobsen, 2011; Brennan ve Christley, 2013; Sayers ve ark., 2013). Bu nedenle biyogüvenliğin uygulanabilmesi için iyi bir yönetime ve ekibe ihtiyaç vardır.

Yukarıdaki bilgiler ve veriler ışığında, bu çalışmada, buzağı ve genç sığırlarda önemli infeksiyonlara neden olan BRSV'nin real time RT-PCR ile BRSV-N geni spesifik primerler ve prob kullanılarak hızlı tanısı, real time RT-PCR sonucu pozitif olarak saptanan suşların RT-PCR ile BRSV-G geni kısmi çoğaltılarak sekans ve filogenetik analizleri yapıldı ve ülkemiz ve diğer ülkelerden Gen Bankası'na bildirilen diğer sığır ve insan respiratörik sinsityal virusları (BRSV ve HRSV) ile karşılaştırıldı. Real time RT-PCR ve RT-PCR sonucu BRSV yönünden pozitif olduğu tespit edilen örneklerden aşı ve diğer çalışmalarda kullanılmak üzere virus izolasyonu çalışmaları yapıldı. Ayrıca, BRSV'ye karşı oluşan spesifik antikorlar ELISA ile saptanarak hayvanların bağışıklık durumu araştırıldı.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇ

3.1.1. Çiftlikler ve Toplanan Örnekler

Bu tez çalışmasında infeksiyonun sık görüldüğü sonbahar ve kış aylarında, Trakya bölgesinde ve Uşak ilinde bulunan çiftliklere gönüllülük esasına dayalı olarak ziyaretler yapıldı ve solunum sistemi bozukluğu olan buzağı ve genç sığırlar örnek popülasyonu olarak hedeflendi. Bu hedefe yönelik olarak öncelikle çiftliğin sorumlu veteriner hekimlerinden hayvanlarda solunum bozuklukları olup olmadığı öğrenildi ve solunum sistemi bozukluğu olan buzağı ve genç sığırlardan numuneler toplandı. 19 adet entegre tesis işletmesi, 43 adet halk elindeki küçük işletmeler olmak üzere toplam 62 farklı işletmeden örnekler alındı. Yeni ölen hayvanlardan akciğer, canlı hayvanlardan ise moleküler analizler ve virus izolasyonu için, ikişer adet nazal/orofarengeal svab, moleküler ve serolojik testler için antikoagulanlı tüp ve kuru tüp olarak ikişer kan örneği alındı (BD Vacutainer, Kat. No: 367896). Alınan doku-organ örnekleri kuru şekilde, moleküler analizlerde kullanılan svab numuneleri RNAlater stabilizasyon solüsyonu içerisinde (Kat. No: AM7020), izolasyon için kullanılacak svab örnekleri hücre vasatı içerisinde (Gibco MEM, Kat. No:11095080) soğuk koşullarda (4-8°C) laboratuvara ulaştırıldı. Örnek alınan çiftliğin adı, bölgesi, hayvanların yaş grubu ve klinik bulguları kaydedildi (Tablo 2). Örnekler ya hemen işlendi ya da çalışmada kullanılmak üzere -80 ^{0}C'de derin dondurucuda muhafaza edildi.

Tablo 2: Çalışmada kullanılan örneklerin toplandığı hayvanlar ve çiftlik bilgileri

Örnek Alma Tarihi	Örnek alınan yer	Yaş grubu	Örnekler			Klinik Bulgular
			Kan	Nazal/Orofarengeal Svab	Akciğer	
21.01.2019	Kırklareli	0-6 aylık	10	10		Solunum güçlüğü, öksürük, burun akıntısı, halsizlik
20.02.2019	Kırklareli	0-6 aylık	2	2		Solunum güçlüğü, öksürük, burun akıntısı, halsizlik
20.02.2019	İstanbul	0-6 aylık	18	18		Solunum güçlüğü, öksürük, burun akıntısı, halsizlik
21.02.2019	Kırklareli	0-6 aylık	11	11	2	Buzağı ölümleri
26.02.2019	Uşak	0-6 aylık	20	20		Solunum güçlüğü, öksürük, burun akıntısı, halsizlik
13.01.2021	Tekirdağ	0-6 aylık	18	18		Solunum güçlüğü, öksürük, burun akıntısı, halsizlik
14.01.2021	Kırklareli	0-3 aylık	9	9		Öksürük, burun akıntısı, halsizlik
26.01.2021	Kırklareli	0-6 aylık	40	25		Solunum güçlüğü, öksürük, burun akıntısı, halsizlik
10.02.2021	Edirne	0-3 aylık	15	15		Öksürük, burun akıntısı, halsizlik
13.02.2021	İstanbul	0-12 aylık	13	10		Ateş, öksürük
22.02.2021	Kırklareli	0-6 aylık	23	19		Solunum güçlüğü, öksürük, burun akıntısı, halsizlik
23.02.2021	Kırklareli	0-12 aylık	3	1		Solunum güçlüğü, öksürük, burun akıntısı, halsizlik
24.02.2021	Kırklareli	0-6 aylık	12	5		Solunum güçlüğü, öksürük, burun akıntısı, halsizlik

Örnek Alma Tarihi	Örnek alınan yer	Yaş grubu	Örnekler			Klinik Bulgular
			Kan	Nazal/Orofarengeal Svab	Akciğer	
04.03.2021	Kırklareli	0-6 aylık	25	25	1	Buzağı ölümleri
09.03.2021	Kırklareli	0-6 aylık	14	4		Solunum güçlüğü, öksürük, burun akıntısı, halsizlik
18.03.2021	Kırklareli	0-6 aylık	9	9		Solunum güçlüğü, öksürük, burun akıntısı, halsizlik
02.04.2021	Kırklareli	0-6 aylık	20	5		Solunum güçlüğü, öksürük, burun akıntısı, halsizlik
02.04.2021	İstanbul	6-18 aylık			5	Klinik bulgu yok
07.04.2021	İstanbul	0-12 aylık	7	7		Ateş, öksürük
19.04.2021	Edirne	0-12 aylık	12	12		Öksürük, burun akıntısı, halsizlik
07.06.2021	Balıkesir	12-24 aylık			19	Klinik bulgu yok
04.11.2021	Edirne	0-6 aylık	6	6		Öksürük, burun akıntısı, halsizlik
17.12.2021	Edirne	0-6 aylık	11	11		Öksürük, burun akıntısı, halsizlik
05.01.2022	İstanbul	12-24 aylık			9	Klinik bulgu yok
20.01.2022	Uşak	0-6 aylık	3	3	1	Buzağı ölümleri, öksürük, burun akıntısı, halsizlik
01.03.2022	Edirne	0-3 aylık		2		Öksürük, burun akıntısı, halsizlik
04.03.2022	Uşak	0-6 aylık	20	20		Öksürük, burun akıntısı, halsizlik
07.03.2022	Kırklareli	0-3 aylık	10	10		Ateş, burun akıntısı, halsizlik
Toplam			331	277	37	

3.1.2. Hücre Kültüründe Kullanılan Gereçler

3.1.2.1. Taşıma Vasatı

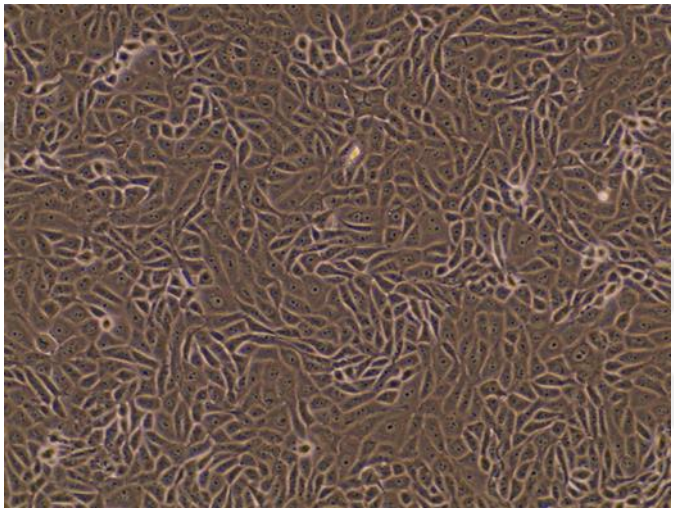
BRSV'nin hücre kültüründe izolasyonu için kullanılacak nazal/orofarengeal svab örnekleri %5 penisillin-streptomisin içeren Dulbecco's MEM (DMEM) içerisinde laboratuvara getirildi.

3.1.2.2. İnokulum Hazırlama Vasatı

Sahadan elde edilen örneklerin hücre kültürlerine inokulasyona hazır hale getirilmesi için yapılan homojenizasyon işleminde %5 penisillin-streptomisin içeren Dulbecco's MEM (DMEM) kullanıldı.

3.1.2.3. Hücre Kültürleri

Bu çalışmada BRSV izolasyonu amacıyla Anabilim Dalımızda mevcut olan MDBK (Madin-Darby bovine kidney) (ATCC CLL 22) hücreleri kullanıldı (Sudaryatma ve ark., 2018; Jia ve ark., 2021). Hücrelerin üretilmesi için Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Kat. No: 21969035, Gibco), fötal sığır serumu (FBS-Kat. No: 10270106, Thermofisher), antibiyotik/antimikotik (Kat. No: 15240062, Gibco) kullanıldı. Çalışmaya başlamadan önce fötal sığır serumunda BVDV ve BRSV bulunup bulunmadığı real time RT-PCR ile incelendi ve negatif olduğu teyit edildi.



Şekil 12: Çalışmada kullanılan MDBK hücrelerinin monolayer görüntüsü (Ters ışık mikroskobu-20X büyütme)

3.1.2.4. Hücre Kültürü Vasatı

Hücre kültürü çalışmalarında hücrelerin çoğaltılması amacıyla Dulbecco's MEM kullanıldı. Hücrelerin flasklarda çoğalmaları için Dulbecco's MEM içerisine %10 FBS, %1 penisillin-streptomisin çözeltisi ilave edildi (Yazıcı ve ark., 2020).

3.1.2.5. Virus izolasyon Vasatı

Bu amaçla %1 penisillin-streptomisin solüsyonu içeren ve FBS içermeyen Dulbecco's MEM kullanıldı.

3.1.2.6. Hücre Dondurma Vasatı

Çalışmada kullanılan hücrelerin dondurulup saklanması amacıyla %10 Dimethil Sülfoksit (DMSO-Kat. No:0B64749, Bioshop) içeren fötal sığır serumu kullanıldı.

3.1.2.7. Hücre Kültürü Plastik Sarf Malzemeleri

Hücre kültüründe BRSV izolasyonu 25 cm^2 (Kat. No:IS/TCF25V-1, SUNUB) ve 75 cm^2 (Kat. No:IS/TCF75V-1, SUNUB) flasklar ve 6 kuyucuklu hücre kültürü plakaları (Kat. No:CCP1-1, SUNUB) kullanılarak yapıldı. 25 cm^2 ve 75 cm^2 flasklar hücrelerin çoğaltılmasında, 25 cm^2 flask ve 6 kuyucuklu hücre kültürü plakaları virusların izolasyonu çalışmalarında kullanıldı.

3.1.2.8. Hücre Kültüründe kullanılan Kimyasallar

Dulbecco's MEM (DMEM)

Birçok memeli hücresi vasatı olarak kullanılmaktadır (Goris ve ark., 2009). Dulbecco's MEM, Eagle's MEM ile kıyaslandığında 4 kat daha fazla amino asit ve vitamin konsantrasyonu içermektedir. DMEM düşük glikoz (1 g/L) ve sodyum piruvat içeriğine sahiptir. Renk görünümü içerdiği fenol kırmızı ile ilişkilidir. L-glutamine ve HEPES (4-(2-hidroksietil)-1-piperazineetansulfonik asit) içermez. Dulbecco's MEM içeriğinde protein, lipid, büyüme faktörü bulunmadığından %10 FBS ilave edilerek kullanıldı. DMEM içeriğinde bulunan sodyum bikarbonat tampon sistemine (3.7 g/L) uygun olarak %5 CO_2 içeren inkübatör kullanıldı (UNB 400 Etüv Memmert).

Antibiyotik/antimikotik Solüsyonü

Çalışmada kullanılan Gibco 100X antibiyotik/ antimikotik solüsyonun kimyasal içeriği; 10.000 ünite/ml penisillin, 10.000 µg/ml streptomisin ve 25 µg/ml amfoterisin B şeklindedir.

Tripsin EDTA (%0.25)

Solüsyonunun kimyasal içeriğinde; litrede 0,5 gram Trypsin (1:250) ve 0,2 gram EDTA (Etilendiamin tetraasetik asit) bulunmaktadır. PH değeri 7.2-8.0 aralığındadır.

Fosfat Tampon Solüsyonu (Phosphate Buffer Saline -PBS)

Çalışmada 2800-3100 mOsm/kg ozmotik basınca sahip, 7.4 PH değerinde, magnezyum, kalsiyum, sodyum piruvat ve fenol kırmızısı içermeyen fosfat tampon solüsyonu kullanıldı (Kat. No:70011044, Gibco).

3.1.3. Hücre Kültürü Çalışmalarında Kullanılan Cihazlar

3.1.3.1. Ters Işık Mikroskobu (Inverted Mikroskop)

Hücrelerin sayımı, pasajlanması, her pasaj sonrası hücrelerin takibi ve monolayer hücre hattı oluşumunun kontrolü amacıyla ayrıca hücrelere virus inokulasyonu sonrası hücrelerde

oluşan değişikliklerin takibi ve sitopatik etkilerin izlenmesi amacıyla ters ışık mikroskobu (EVOS^{TM} XL Core, Invitrogen) kullanılmıştır.

3.1.3.2. Karbondioksit (CO2) İnkübatörü

MDBK hücreleri pasajlanarak 25 cm^2, 75 cm^2 flasklara ve 6 kuyucuklu hücre kültürü plakalarına alındı. Hücrelerin in vitro ortamda çoğalarak monolayer hücre serilerinin oluşmasında %5 CO_2 içeren 37°C'lik karbondioksit (CO_2) inkübatörü kullanıldı (Incomed 108 CO_2 Incubator, Memmert).

Kontaminasyonu önlemek amacıyla virus izolasyonu çalışmalarında başka bir inkübatör kullanıldı. Hücre kültürüne inokulasyon için hazır hale gelen (%80-%100 monolayer) 25 cm^2'lik flasklara ve 6 kuyucuklu hücre kültürü plakalarına inokulasyonlar yapılmasının ardından virusun hücre kültüründe çoğalması için %5 CO_2 içeren 37°C'lik karbondioksit (CO_2) inkübatörü kullanıldı (MCO-5AC, Sanyo).

3.1.4. Moleküler Çalışmalarda Kullanılan Gereçler

3.1.4.1. Kitler, Primerler, Prob ve Kontroller

RNA Ekstraksiyon Kiti

Çalışma için toplanan nazal/orofarengeal svab, kan, akciğer örneklerinden ve hücre kültüründe izolasyon çalışmaları sonucunda hücrelerden toplanan virus ile infekte hücre üst sıvısından RNA ekstraksiyonu için PureLink™ RNA Mini Kit (Kat. No: 12183018A, Invitrogen) kullanıldı.

Elde edilen RNA miktarları ve saflıkları Nanodrop spektrofotometre (Thermo Scientific) cihazı ile ölçüldü.

c-DNA Kiti

Elde edilen RNA örneklerinden komplementer DNA (cDNA) elde edilmesi aşamasında High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Kat. No: 4368814, Applied Biosystems) kiti kullanıldı.

Master Mix

Real time RT-PCR ve konvansiyonel RT-PCR için Maxima Probe/ROX qPCR Master Mix (2X) (Kat. No: K0231, Thermo Scientific), $MgCl_2$ (25mMol) (Kat No: R0971, Thermo Scientific), primer çiftleri ve yalnızca real time RT-PCR'da olmak üzere TaqMan TAMRA Prob (Kat. No:450025, Applied Biosystems) kullanıldı.

Primerler ve Prob

Real time RT-PCR için daha önce yapılan çalışmada (Boxus ve ark., 2005) kullanılan primerler ve prob seti, sekans analizi amacıyla yapılan konvansiyonel RT-PCR'da ise Bidokthi ve arkadaşlarının (2012) tasarladığı primer çifti kullanıldı (Tablo 3). Kullanılan primerler ve probun gen üzerindeki yerleşimi Şekil 13 ve Şekil 14'de gösterildi.

Tablo 3: Çalışmada kullanılan Primerler ve Prob'un hedeflediği bölge, dizilimi, ürün büyüklüğü ve gen dizilimindeki yeri

Primer ve Prob	Hedef bölge	Primer Dizilimi	Ürün Büyüklüğü (bp)	Gen Dizilimindeki Yeri	Kaynak
B5A	G geni	5′-CCACCCTAGCAATGATAACCTTGAC-3′	603	110-134	Bidokhti ve ark., 2012
B6A		5′-AAGAGAGGATGC(T/C)TTGCTGTGG-3′		691-712	
BRSV-F	N geni	5′-GCAATGCTGCAGGACTAGGTATAAT-3′	123	977-1001	Boxus ve ark., 2005
BRSV-R		5′-ACACTGTAATTGATGACCCCATTCT-3′		1076–1100	
BRSV-Prob		5′-FAM-ACCAAGACTTGTATGATGCTGCCAAAGCA-TAMRA-3′		1028-1056	



Şekil 13: SnapGene 6.0.2 programı ile BRSV-G geni için daha önce yapılan çalışmada (Bidokhti ve ark., 2012) tasarlanan ve bu çalışmada sekans analizi amacıyla yapılan konvansiyonel RT-PCR'da kullanılan primerlerin gen dizlimi üzerindeki yerleşimi



Şekil 14: SnapGene 6.0.2 programı ile BRSV-G geni için daha önce yapılan çalışmada (Boxus ve ark., 2005) tasarlanan ve bu çalışmada real time RT-PCR'da kullanılan primerlerin gen dizlimi üzerindeki yerleşimi

Pozitif Kontrol

Bu çalışmanın ilk döneminde İstanbul Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü tarafından BRSV yönünden pozitif olarak saptanan RNA ekstraktı real time RT-PCR ve konvansiyonel RT-PCR testlerinde pozitif kontrol olarak kullanıldı. İlerleyen süreçte, aldığımız örneklerden pozitif olduğunu tespit ettiğimiz nazal/orofarengeal svab numunesi kontrol olarak kullanıldı.

3.1.5. Moleküler Çalışmalarda Kullanılan Kimyasallar

3.1.5.1. Agaroz Jel Elektroforez

Konvansiyonel RT-PCR sonucu elde edilen ürünlerin jelde yürütülmesi amacıyla yapılan agaroz jel elektroforez yönteminde kullanılan jelin hazırlanmasında 10X TAE Solüsyonu (Kat. No: 15558042, Invitrogen) ve Agaroz LE (Kat. No:M3044.0100, Genaxxon) kullanıldı.

Jele yüklenen ürünlerin içerdiği nükleik asit RedSafe Nükleik Asit Boyama Solüsyonu ile tespit edildi (Intronbio, Kat. No:21141). PCR ürünleri DNA jel yükleme boyası (Kat. No: R0611, Thermo Scientific) varlığında jele yüklendi. Jel sonuçları 100-1000 bp (basepair) işaretli ürün büyüklük cetveli (Kat. No: SM0243, Thermo Scientific) baz alınarak değerlendirildi.

3.1.5.2. 10X TAE Solüsyonu

Çalışmada kullanılan 10X TAE; filtre edilmiş ve steril 400 mM Tris-acetate ve 10 mM EDTA solüsyonu içermektedir. Solüsyonun PH değeri 8.3'tür.

3.1.5.3. Agaroz LE

Kullanılan Agarose LE, 100-15000bp (baz çifti) aralığındaki DNA'nın ayrımı için standart bir agarozdur. Jel elektroforezde nükleik asitlerin elektroforezi için uygundur. Agaroz LE konsantrasyonuna bağlı olarak, nükleik asit ayrımının boyut aralığı 100-15000 bp arasında değişmektedir.

3.1.5.4. RedSafe Nükleik Asit Boyama Solüsyonu

Bu çalışmada kullanılan nükleik asit boyama solüsyonu, agaroz jellerde nükleik asit tespiti için geleneksel etidyum bromid (EtBr) boyamasına bir alternatiftir. Etidyum bromid'e kıyasla çok düşük mutajen özelliktedir. DNA veya RNA'ya bağlandığında yeşil floresan yayılır. RedSafe nükleik asit boyama solüsyonu DNA'ya bağlandığında 537 nm'de floresan ışıma yapar. 20000x konsantrasyona sahiptir.

3.1.5.5. DNA ladder

Çalışmada kullanılan değerlendirme cetveli agaroz veya poliakrilamid jellerde 100-1000 bp aralığında çift sarmallı bir DNA'nın boyutlandırılması ve yaklaşık miktar tayini için kullanılmaktadır. Cetvel 10 DNA parçasından oluşur ve 6X TriTrack DNA Yükleme Boyası (ksilen siyanol FF, bromofenol mavisi, Turuncu G) ile görünür kılınmaktadır. %1-2 agaroz konsantrasyonu ile hazırlanmış jellerde kullanıma uygundur.

3.1.5.6. 6X DNA Yükleme Solüsyonu

Bu çalışmada kullanılan DNA Yükleme Solüsyonü, agaroz veya poliakrilamid jellere PCR ürünlerini yükleme aşamasında kullanılır. Elektroforez sırasında jeldeki DNA hareketinin görsel takibi için iki farklı boya (bromofenol mavisi ve ksilen siyanol FF) içerir. 10 mMTris-HCl (pH: 7.6) 0.03% bromophenol blue, 0.03% xylene cyanol FF, 60% glycerol 60 mM EDTA kompozisyonuna sahiptir. Boyada bulunan gliserol DNA'nın jelin kuyucuğun tabanında bir tabaka oluşturmasını sağlar. Çözeltiye dahil edilen EDTA iki değerli metal iyonlarını bağlar ve metale bağlı nükleazları inhibe eder.

3.1.6. Moleküler Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar ve Programlar

Alınan akciğer örneklerinin ekstraksiyonu için mekanik parçalama ve dokunun homojenizasyonu amacıyla homojenizatör (Bullet Blender Storm, Next Advance) kullanıldı.

Toplanan örneklerin ekstraksiyonu sonrası elde edilen RNA miktarlarının ölçümü için Nanodrop (Thermo Scientific) cihazı kullanıldı. RNA'lardan komplementer DNA elde edilmesi (cDNA), primer ve ısı koşullarının optimizasyonu ve real time RT-PCR ve konvansiyonel RT-PCR aşamaları qTOWER^3 G (Analytik Jena) ve Chromo-4 (Biorad) termosiklus cihazları ile yapıldı.

Sekans çalışmaları için yapılan konvansiyonel RT-PCR ürünlerinin jelde yürütülmesiyle yapılan agaroz jel elektroforez çalışmasında Cleaver yatay jel elektroforez tankı kullanıldı. Jeldeki bantların görüntülenmesi Invitrogen iBright 1500 (Thermo Fisher Scientific) görüntüleme sistemi ile yapıldı.

Primer doğrulaması için SnapGene 6.0.2 programı kullanıldı. Soy ağacı oluşturulması için sekans analizi sonucu elde edilen veriler kullanıldı. Bu işlemler için Windows tabanlı bilgisayar ve BioEdit ve MEGA11 programlarından yararlanıldı.

3.1.7. Serolojik Çalışmalarda Kullanılan Gereçler

Toplanan serum örneklerinde BRSV-F proteinine spesifik antikorları saptamak amacıyla ticari Monoscreen AbELISA BRSV ELISA Kiti (Bio-X Diagnostics, Kat. No:BIO K 061/2) kullanıldı. Yöntemde belirtilen yıkama basamakları otomatik ELISA plaka yıkama cihazı (ROBONIK washwell plate) kullanılarak tamamlandı. Plakaların okunması için ELISA okuma cihazı (Spectra SLT Classic) kullanıldı ve testin değerlendirilmesi için gerekli olan optik dansite (OD) değerleri elde edildi.

ELISA Kitinin içeriği:

• BRSV antijeni ile kaplanmış 96 kuyulu mikroplaka
• BRSV'ye spesifik antikor içeren pozitif kontrol
• Negatif kontrol
• Referens serum
• Horseradish-peroxidase ile işaretlenmiş anti-bovine IgG1 monoklonal antikor içeren konjugat
• Substrat solüsyonu (Tetramethylbenzidine)
• Durdurma solüsyonu (Phosphoric acid)
• Konsantre yıkama solüsyonu (20X)
• Örnek sulandırma solüsyonu (5X)

Kitte bulunmayan ancak ELISA testi için kullanılan diğer malzemeler:

• Tek ve çok kanallı otomatik pipet ve pipet uçları
• Deiyonize su
• Otomatik ELISA plaka yıkama cihazı (ROBONIK washwell plate)
• ELISA okuma cihazı (Spectra SLT Classic)

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Hücre Kültürü Çalışmaları

3.2.1.1. Hücrelerin Çözündürülmesi

DMSO içeren donmuş hücreler 37 °C su banyosunda çözündürüldü. DMSO'yu hücrelerden uzaklaştırmak amacıyla çözünmüş hücre peleti (1ml) 9ml hücre vasatıyla homojen olarak pipetleme ile karıştırıldıktan sonra 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst sıvı uzaklaştırıldı. Dipte kalan hücre peleti 10ml hücre vasatı ile pipetlenerek homojen hale getirildi ve 75 cm^2'lik flasklara aktarıldı. Üzerlerine 25 ml DMEM eklenerek, hücreler 37°C %5 CO_2'li etüvde inkübasyona bırakıldı (Warner ve ark. 2015).

3.2.1.2. Hücrelerin Sayımı ve Pasajlanması

MDBK hücrelerinin flaskın taban alanında %80-%100 oranında monolayer oluşturması beklendi ve monolayer oluşumundan sonra hücreler pasajlandı. Bu işlem için DMEM alındıktan sonra 75 cm2 flaskın içerisinde kalmış olabilecek hücre toksinlerini uzaklaştırmak amacıyla taban yüzeyi 10 ml PBS ile yıkandı. Yıkamadan sonra 5 ml %0.25 Tripsin-EDTA ilave edilerek flaskın tüm taban yüzeyine yayıldığı gözlendi ve 37°C'lik %5 CO_2 ortamlı etüve konuldu. Hücreler 5 dakika arayla kontrol edilerek, hücrelerin flask tabanından ayrılması için nazikçe çalkalama işlemi uygulandı. İnkübasyon sonrası flaskın tabanından tamamen ayrılan

hücreler pipet ile alınarak 15 ml'lik falkon tüplere konuldu ve üzerlerine 5 ml DMEM ilave edildi. Hücreler 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edildikten sonra üst sıvı döküldü. Hücre peletinden 100µl (mikrolitre) alındı 900µl DMEM ile pipetleme yapılarak karıştırıldı. Bu hücre karışımından 20µl alınarak eşit oranda Tripan mavisi (Tripan blue) ile homojen şekilde karıştırıldı ve hücreler Thoma lamında sayıldı. Hücreler, 6 kuyucuklu plaka için 0.3 x 10^6 hücre/ml, 25 cm^2'lik flask için 0.7 x 10^6 hücre/ml, 75 cm^2'lik flask için 2 x 10^6 hücre/ml olacak şekilde hazırlandı ve 37 °C de %5 CO_2 ortamlı etüve konuldu (Warner ve ark. 2015).

Flasklara tutunmayan hücrelerin uzaklaştırılması için pasajdan 24 saat sonra hücrelerin vasatı değiştirildi. MDBK hücre kültürlerinde monolayer oluşup oluşmadığı her gün kontrol edildi. %80-%100 oranında monolayer gözlenen 75 cm^2'lik flasklardan hücre kültürünün devamlılığı için yeni pasajlar yapıldı. Hazırlanan 25 cm^2'lik flask ve 6 kuyucuklu plakalar ise virus inokulasyonu amacıyla kullanıldı.

3.2.1.3. Hücrelerin Dondurulması ve Saklanması

Hücrelerin dondurulması amacıyla, hücre pasajlandıktan sonra elde edilen hücre peleti üzerine 1/10 oranında DMSO içeren FBS ilave edildi ve pipetleme yapılarak homojenizasyon sağlandı. Kriyotüplere (1ml) alınan hücreler sırayla 4 °C'de 30 dk, -20 °C'de 1 saat inkübe edilerek kademeli olarak donduruldu. Dondurulan hücreler daha sonra sıvı azot tankına kaldırıldı (Warner ve ark. 2015).

3.2.1.4. İnokulum Hazırlanması

Örneklerin toplanması aşamasında, BRSV'nin moleküler tanısı ve hücre kültüründe izolasyonu için alınan ikişer svab örneğinden birisi inokulum hazırlanması için kullanıldı. Hücre kültüründe izolasyon için alınan svab örnekleri %5 penisillin-streptomisin içeren Dulbecco's MEM içerisinde laboratuvara getirildi. Bu örneklerden inokulum hazırlamak için öncelikle svablar vortekslendi (IKA Vortex Genius 3). Homojenat 0,22 µm'lik filtreden (Kat. No: ASF33PVI22S, Aisimo) geçirilerek ve %5 penisillin-streptomisin ilavesiyle inokulasyona hazır hale getirildi (Payment ve Trudel, 1985).

Akciğerden inokulum hazırlamak için, 10 g akciğer dokusu bistüri ile mekanik olarak parçalandı ve steril bir havana alındı. Havandaki akciğer doku parçalarına 10 katı miktarda inokulum vasatı ve 1 g steril cam bilye eklendi ve doku mekanik yolla homojenize edildi. Homojenat 4 °C'de 5000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra üst sıvı 0,22 µm'lik filtreden (Kat. No: ASF33PVI22S, Aisimo) geçirilerek ve %5 penisillin-streptomisin ilavesiyle inokulasyona hazır hale getirildi (Payment ve Trudel, 1985).

3.2.1.5. Örneklerin Monolayer Hücre Kültürüne İnokule Edilmesi

Örneklerden hazırlanan inokulumdan direk olarak, 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4} olacak şekilde seri dilüsyonlar hazırlandı. Hücre kültürüne inokulasyon için hazır hale gelen (%80-%100 monolayer) 25 cm^2'lik flasklara ve 6 kuyucuklu hücre kültürü plakalarına inokulasyonlar yapıldı. İnokulasyon için adsorbsiyona bağlı inokulasyon yöntemi kullanıldı (Payment ve Turdel 1993). Öncelikle hücre vasatı pipet yardımıyla kuyucuklardan alındı. Daha sonra hücre toksinleri PBS ile kuyucuklardan uzaklaştırıldı. Stok inokulum, inokulum dilusyonları ve negatif kontrol ikişer kuyucuğa 200 µl olacak şekilde inokule edildi. İnokulum kuyucuk yüzey alanına yayılarak 1 saat 37 °C de %5 CO_2 ortamlı etüvde inkübe edildi. İnkübasyon sırasında 15 dakika arayla flask ya da plaka nazikçe çalkalanarak inokulumun tüm hücreler ile teması sağlandı. İnkübasyon sonunda inokulum pipet yardımı ile toplandı ve hücrelerin üzerine 2 ml FBS içermeyen hücre vasatı ilave edilerek 37°C'de %5 CO_2 içeren etüve konuldu.

Hücrelerde oluşabilecek sitopatik etki (cytopathic effect=CPE) ve değişiklikler inverted mikroskopla 7 gün süreyle her gün kontrol edildi. Yedi günlük periyodun sonunda infekte olduğu düşünülen ama CPE saptanmayan hücrelerden kör pasaj yapıldı. Kör pasaj amacıyla 7. günün sonunda flask ya da plakalar -80°C'de 2 saat bekletilerek donduruldu ve daha sonra 37°C'lik etüvde 30 dakika inkübe edilerek ısı değişimi ile hücrelerin parçalanması ve hücre içindeki virusun dışarı çıkması sağlandı. Santrifüj işleminden sonra üst sıvı alınarak %80-%100 monolayer formunda 25 cm^2'lik flask veya 6 kuyucuklu hücre plakasına inokule edildi.

3.2.2. Moleküler Çalışmalar

3.2.2.1. RNA Ekstraksiyonu

Nazal/orofarengeal svab ve kan numunelerinden RNA ekstraksiyonu için PureLink RNA Mini kit kullanıldı ve kitte önerilen yöntem uygulandı. Kısaca, moleküler analizler için alınan svab örnekleri 500 µl RNAlater solüsyonu içerisinde laboratuvara getirildi. Svab tüpleri 1 dakika boyunca vortekslendikten sonra RNA ekstraksiyonu için bu sıvıdan 200 µl alınarak 400 µl Lizis solüsyonu ve 4µl beta-merkaptoetanol ile pipetlenerek homojen hale getirildi. Kitte önerilen yöntem takip edilerek homojenatın ekstraksiyon aşamaları tamamlandı. Son aşamada 50 µl RNase içermeyen su eklenerek RNA elde edildi.

EDTA'lı kan tüplerine alınan kanlar 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra "buffy coat" ayrıştırılarak ependorflara alındı. RNA ekstraksiyonu için "buffy coat" örneklerinden 200 µl µl alınarak 400 µl Lizis solüsyonu ve 4µl beta-merkaptoetanol ile pipetlenerek homojen hale getirildi. Kitte önerilen yöntem takip edilerek homojenatın

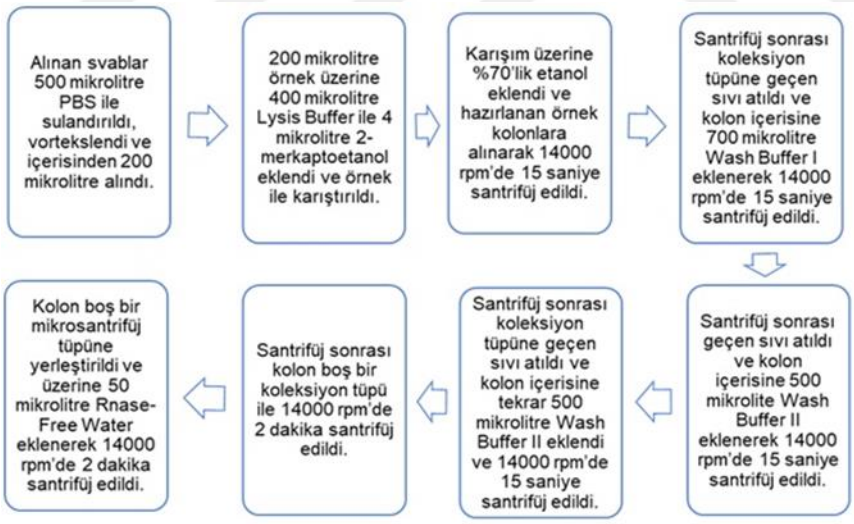
ekstraksiyon aşamaları tamamlandı. Son aşamada 50 µl RNase içermeyen su eklenerek RNA elde edildi.

Akciğer doku örneklerinden viral RNA ekstraksiyonu için PureLink RNA Mini kit (Invitrogen) kullanıldı. İlk olarak, 10-30 mg akciğer dokusu 600 µl Lizis solüsyonu ve 6 µl beta-merkaptoetanol, içerisinde steril cam bilye bulunan vidalı kapaklı ependorflara konularak 12.000 rpm hızında 5 dakika süre ile ribolyser (Bullet Blender Storm, Next Advance) cihazında homojenize edildi. Homojenat 14.000 rpm'de 5 dakika santrifüje edildi ve üst sıvı alınarak kitte önerilen yöntem uygulandı. Son aşamada 50 µl RNase içermeyen su eklenerek RNA elde edildi.

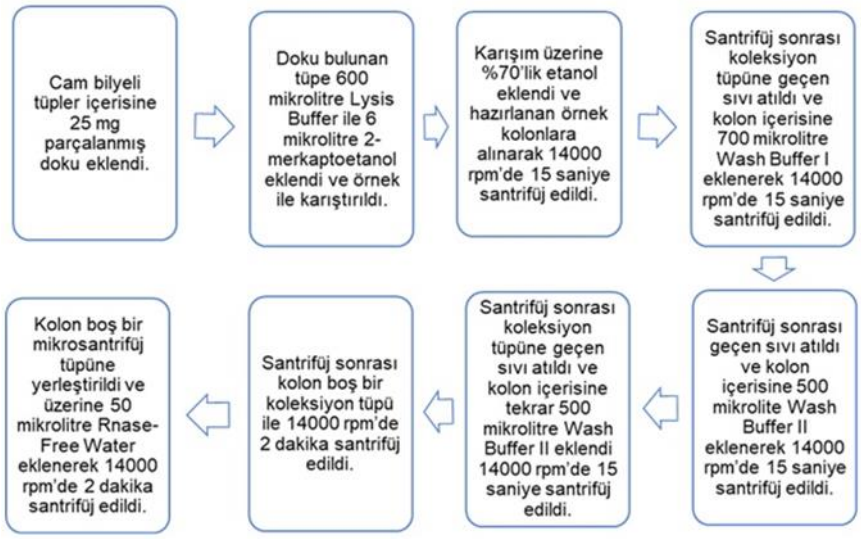
RNA örneklerindeki RNA miktarları ve saflıkları Nanodrop cihazında ölçüldü. Ekstraksiyon sonrası ya hemen cDNA elde edildi ya da cDNA yapılmayan ekstraktlar -80°C'de tutuldu.

3.2.2.2. RNA Ekstraksiyon Yönteminin Değerlendirilmesi

Tez çalışmalarında RNA ekstraksiyonu için Invitrogen PureLink RNA Mini Kit (Kat No:12183018A) kullanıldı. RNA ekstraksiyonu kitin uygulama talimatına uygun olarak aşağıdaki şekilde yapıldı (Şekil 15 ve Şekil 16).



Şekil 15: Nazal/orofarengeal svab ve kan numuneleri için Invitrogen PureLink RNA Mini Kit ekstraksiyon akış şeması



Şekil 16: Akciğer doku numuneleri için Invitrogen PureLink RNA Mini Kit ekstraksiyon akış şeması

Alınan örnekler için RNA ekstraksiyon kitinin uygunluğunu değerlendirmek amacıyla iki aşamalı bir çalışma ile belirlendi.

RNA Konsantrasyonu Çalışması

Tüm örnek gruplarından 6'şar tane örnek seçilerek kitin önerdiği şekilde RNA ekstrasksiyonu yapıldı ve Nanodrop cihazıyla A_{260}/A_{280} oranları ile RNA miktarları ölçüldü. Genel uygulama rehberlerinde, yüksek saflıkta RNA A_{260}/A_{280} değerlerinin 1.8–2.1 arasında olması beklendiği ancak örneğin yapısının kompleks oluşuna göre bunun değişebileceği belirtilmektedir (Hougs ve ark., 2017).

Tablo 4'de belirtildiği gibi ekstraksiyon A_{260}/A_{280} oranları en düşük 1,46 en yüksek 2,85 olarak ölçüldü. Bu nedenle saflığı düşük olan tüm örneklerde BRSV metodu öncesinde, β-actin hücre geni (housekeeping gene) ile ekstraksiyonun kontrol edilmesine ve pozitif bulunmayan örneklerde örnek miktarı artırılarak yeniden ekstraksiyon yapılmasına karar verildi.

Tablo 4: Ekstraksiyon etkinliğinde kullanılan örneklerin RNA miktar ve saflıkları

Örnek çeşidi	RNA saflık oranı A260/A280 oranı (2.0-2.1)	RNA miktarı ng/µl
1301-2 K	1,85	0.42
1301-9 K	1,54	1.54
1401-1 K	2,26	1.38
1401-8 K	1,71	2.38
1301-4 K	1,80	0.44
1301-1 K	1,67	3.33

Örnek çeşidi	RNA saflık oranı A260/A280 oranı (2.0-2.1)	RNA miktarı ng/µl
2601-2 OS	1,51	24.35
1712-2 OS	2,27	330.9
1712-3 OS	2,03	353.44
411-3 OS	1,70	9.22
411-2 OS	1,85	14.14
1712-5 OS	2,16	415.06
1301-9 DS	1,82	57.48
1512-8 DS	1,46	54.62
411-6 DS	1.53	16.76
1512-15 DS	1,46	20.88
703-3 DS	2,85	304.82
703-10 DS	2,82	278.44
N4 AC	2,07	153.80
N6 AC	2,02	294.95
AC 18.01.22	2,02	743.47
N8 AC	2,08	196.12
N9 AC	2,00	263.10
N7 AC	2,00	92.87

RNA Saflığı Çalışması

RNA izolasyonu sırasında PCR aşamasını inhibe edebilecek maddelerin varlığının kontrolü için RNA saflığı çalışması yapıldı. Bu amaçla bir örneğin RNA'sı 10 katlı dilüsyonlar halinde çift paralel olarak β-actin analiz SYBR-Green real Time RT-PCR metodu ile çalışıldı (Seçkin ve ark., 2018). β-actin dizisinde primerlerin yerleşimi Şekil 17'de gösterildi.

Çalışmada kullanılan primerler SnapGene 6.0.2 programında kontrol edildi (Genbankası Erişim Numarası: AY141970.1) ve cDNA elde edilmesi için High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Kat. No: 4368814, Applied Biosystems) kullanıldı. Kitin talimatına göre 20µl cDNA elde edildi.



Şekil 17: β-actin dizisinde primerlerin yerleşimi (Genbankası Erişim Numarası: AY141970.1)

Elde edilen cDNA ile Seçkin ve ark., (2018) tarafından belirtilen metoda uygun olarak SYBR-Green real time PCR yapıldı (Tablo 5).

Tablo 5: SYBR Green PCR bileşenleri ve cihaz koşulları

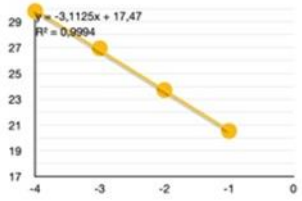
Bileşen	Son konsantrasyon	Hacim (µl)
Master Mix 2x	1x	12,5
Primer F (10µM)	400 nM	1
Primer R (10µM)	400 nM	1
SYBR-Green		0,5
$MgCl_2$		0,25
Su	-	6,75
cDNA	-	3
Toplam hacim	25	25
PCR cihaz koşulları		
1. basamak	95°C 10 dak.	
2. basamak	95°C 15 sn	45siklus
3. basamak	63°C 20 sn	
4. basamak	72°C 15 sn	
Meting curve	60°C - 99°C boyunca 1°C her 10 s.	

Çalışma ile ilgili değerlendirme kriterleri rehberlerde aşağıdaki şekilde verilmiştir (Hougs ve ark., 2017).

1. Elde edilen kalibrasyon eğrisinin eğim değeri -3.6 ile -3.1 arasında,
2. Kalibrasyon doğrusundan elde edilen linear regresyon (R^2) değeri ≥0.98,
3. Çalışma solüsyonuna ait beklenen Ct değeri ile elde edilen Ct değeri arasındaki fark 0.5 in altında olması gereklidir.

Ölçüm sonuçları ile kalibrasyon eğrisi çizildi ve regresyon katsayısı hesaplandı. Hesaplamalar sonucunda eğim -3,1125 olarak, R^2 değeri 0,9994 olarak, ve Extrapo-Ct değeri -0,47 olarak <0,5 olarak hesaplandı (Şekil 18 ve Şekil 19).

Dilution Factor	Measured Ct	Ct ortalama	Δ Ct	Beklenen Δ Ct	Log	Ct ortalama
1E-01	20,12	20,53	2,59	3,32	-1,000	20,53
	20,94					
1E-02	23,66	23,71	3,18	3,32	-2,000	23,71
	23,75					
1E-03	27	26,945	3,24	3,32	-3,000	26,95
	26,89					
1E-04	29,77	29,825	2,88	3,32	-4,000	29,83
	29,88					

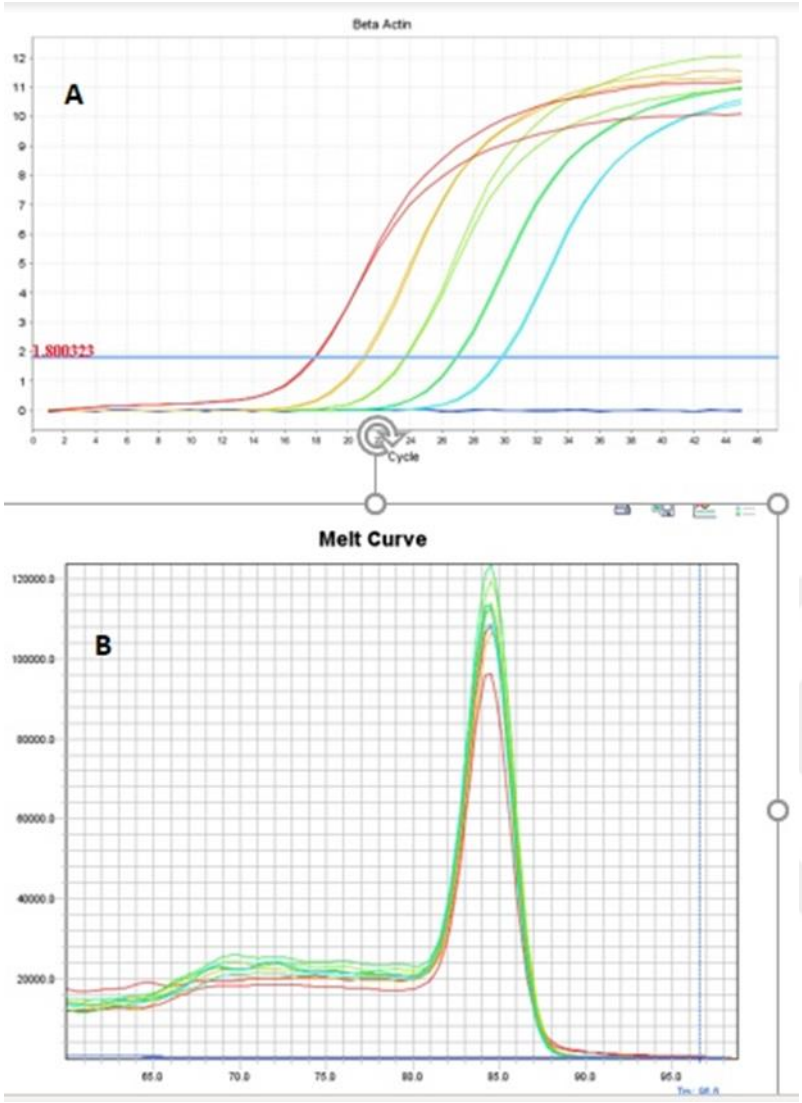


	Measured Ct	Ct ortalama	Extrapol Ct	Extrapo-Ct	
Direk	17,99	17,94	17,47	-0,47	OK
Direk	17,89				
Slope	-3,1125				
Intercept	17,47				
Efficiency	%109,55				
R²	0,9994				

Results Table

Well	Sample	Target	Task	Quantity	Cт	Tm1	Tm2	Tm3
A1	Direct a	Beta Actin	UNKNOWN		17.9874	84.5035		
A2	Direct b	Beta Actin	UNKNOWN		17.8866	84.3541		
B1	-1 a	Beta Actin	UNKNOWN		20.1204	84.5035		
B2	-1 b	Beta Actin	UNKNOWN		20.9383	84.5035		
C1	-2 a	Beta Actin	UNKNOWN		23.664	84.5035		
C2	-2 b	Beta Actin	UNKNOWN		23.7465	84.5035		
D1	-3 a	Beta Actin	UNKNOWN		26.9987	84.5035		
D2	-3 b	Beta Actin	UNKNOWN		26.895	84.3541		
E1	-4 a	Beta Actin	UNKNOWN		29.7669	84.3541		
E2	-4 b	Beta Actin	UNKNOWN		29.8808	84.3541		
F1	NTC a	Beta Actin	NTC		Undetermined	74.3445	77.7806	84.2047
F2	NTC b	Beta Actin	NTC		Undetermined	96.6046	68.518	91.5251

Şekil 18: RNA saflık çalışması verileri ve hesabı



Şekil 19: RNA saflık çalışması real time RT-PCR amplifikasyon eğrileri (A) ve Melting Curve değerleri (B)

3.2.2.3. cDNA Elde Edilmesi (Ters Transkripsiyon, Revers Transcription-RT)

RNA'dan komplementer DNA (cDNA) elde edilmesi amacıyla High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kiti kullanıldı. Kitte belirtildiği şekilde, 2 µl 10X RT Buffer, 2 µl 10X RT Random Primers, 0,8 µl 25X dNTP Mix (100Mm), 1 µl Reverse Transcriptase ve 4,2 µl nükleaz içermeyen su kullanılarak karışım hazırlandı. Ekstraksiyon sonrası elde edilen RNA örneklerinden 10 µl hazırlanan karışıma eklendi. Toplam 20 µl olan bu son karışım 25°C'de 10 dakika, 37°C'de 2 saat, 85 °C'de 5 dakika şeklinde ayarlanmış olan termosiklus cihazında inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 20 µl cDNA elde edildi ve cDNA örnekleri ya hemen real time RT-PCR ile incelendi ya da -80°C'de tutuldu.

3.2.2.4. Real time RT-PCR ve Optimizasyon Çalışmaları

Real time RT-PCR'da BRSV Nükleoprotein genini (N geni) hedefleyen primerler ve bu primerlere özgün prob kullanıldı. Real time RT-PCR için Boxus ve arkadaşları (2005) tarafından bildirilen primerler ve yöntemler kullanıldı (Tablo 3). Primer optimizasyonu için 5 pmol, 10 pmol ve 20 pmol primer konsantrasyonları denendi. Hazırlanan karışımlara farklı cDNA miktarları eklenerek çalışmalar yapıldı. Optimizasyon çalışmaları sonrası elde edilen veriler doğrultusunda; real time RT-PCR için, 12,5 µl Maxima Probe/ROX qPCR Master Mix, 2 µl F primer (10 pmol/µl), 2 µl R primer (10 pmol/µl), 1 µl probe (10 pMol/µl), 5,5 µl nükleaz içermeyen su ve 2 µl cDNA olmak üzere toplam 25 µl'lik karışım hazırlandı. Hazırlanan bu karışım termosiklus cihazına yerleştirildi (qTOWER^3 G-Analytik Jena). Real time RT-PCR analizi; DNA polimeraz enzim aktivasyonunu (95°C'de 10 dakika) takiben, denatürasyon aşaması 95°C'de 15 saniye ve bağlanma aşaması 59°C de 60 saniye toplam 45 siklus olacak şekilde tamamlandı. Pozitif kontrol olarak çalışmanın ilk döneminde İstanbul Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü tarafından BRSV yönünden pozitif olarak saptanan RNA örneği pozitif kontrol olarak kullanıldı. İlerleyen süreçte, çalışmamızda toplanan örneklerden pozitif olduğunu tespit ettiğimiz nazal/orofarrengeal svab numunesi kontrol olarak kullanıldı. Negatif kontrol olarak ise nükleaz içermeyen su kullanıldı.

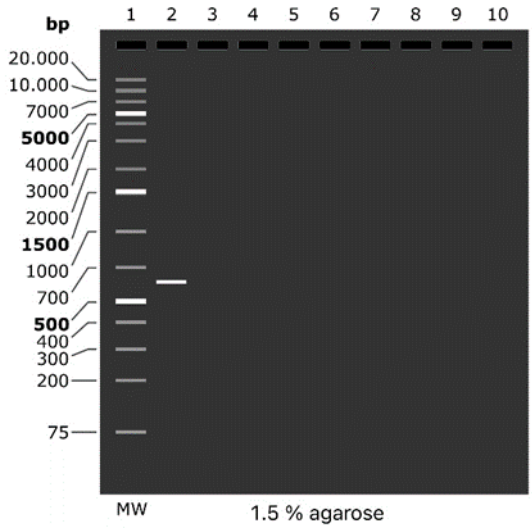
3.2.2.5. BRSV-G Geni Kısmi Sekans Analizi İçin RT-PCR ve Optimizasyon Çalışmaları

RT-PCR ve sekans analizleri amacıyla BRSV-G geni için Bidokthi ve arkadaşları (2012) tarafından bildirilen primerler ve yöntemler kullanıldı. Bu gene yönelik sekans analizi için kullanılan primerler Tablo 3'de verildi. RT-PCR optimizasyonu amacıyla, farklı primer konsantrasyonları kullanılarak karışımlar hazırlandı. Primer optimizasyonu için 5 pmol, 10 pmol ve 20 pmol primer konsantrasyonları denendi. Hazırlanan karışımlara farklı cDNA miktarları eklenerek çalışmalar yapıldı. Optimizasyon çalışmaları sonrası elde edilen veriler doğrultusunda; toplam 25 µl'lik karışım için, 12,5 µl Maxima Probe/ROX qPCR Master mix, 1,25 µl F primer, 1,25 µl R primer, 2 µl BSA (Bovine serum albümin-1 mg/ml), 2 µl MgCl2 (25 mMol), 4 µl nükleaz içermeyen su kullanıldı ve 2 µl cDNA eklendi. Hazırlanan karışım termosiklus cihazına yerleştirildi (Chromo4-Biorad). RT-PCR analizi; DNA polimeraz enzim aktivasyonunu (95°C'de 10 dakika) takiben, denatürasyon aşaması 94°C'de 45 saniye, bağlanma aşaması 50°C de 45 saniye, uzama aşaması 72°C'de 90 saniye toplam 35 siklus ve son uzama 72°C'de 7 dakika olacak şekilde tamamlandı. Pozitif kontrol olarak aldığımız örneklerden pozitif olduğunu tespit ettiğimiz nazal/orofarengeal svab numunesi kontrol olarak kullanıldı. Negatif kontrol olarak ise nükleaz içermeyen su kullanıldı.

3.2.2.6. Agaroz Jel Elektroforez

RT-PCR analizinden sonra amplifiye edilen hedef gen bölgeleri agaroz jel elektroforez yöntemi kullanılarak görüntülendi. Bu amaçla %1,5 agaroz içeren jel hazırlandı. Jel hazırlık aşamasında 50 ml 1X TAE solüsyonu ve 750 mg agaroz LE erlenmayer içerisinde karıştırıldı ve agaroz partikülleri tamamen eriyene kadar mikrodalga fırında ısıtıldı. Mikrodalga fırın sonrası homojen ve sıvı formda olan jele 2,5 µl RedSafe nükleik asit boyama solüsyonu ilave edilerek jel elektroforez tankına döküldü ve jel kuyucuklarını içeren yükleme tarağı yerleştirildi. Jel katılaşması için oda ısısında bekletildi. Jelin donmasının ardından yükleme tarağı çıkarılarak 1 µl 6X DNA yükleme solüsyonu (Loading Dye 6X, Kat. No: R0611, Thermo Scientific) ve 5 µl DNA karıştırılarak jele yüklendi. RT-PCR analizi sonucunda oluşan ürünün büyüklüğünü saptamak amacıyla 2.5 µl 100bp'lik DNA Marker (DNA Ladder, Kat. No: SM0243, Thermo Scientific) aynı zamanda jele yüklendi. Daha sonra elektroforez için 100 voltluk elektrik akımı yarım saat süresince uygulandı.

Bu sürenin sonunda, agaroz jel görüntüleme sistemi kullanılarak amplifiye edilen RT-PCR ürünlerinin oluşturduğu bantlar görüntülendi (Invitrogen iBright 1500). Güçlü görünen, istenilen basepair(bp) büyüklükte ve çoklu bant yapısına sahip olmayan örneklere ait RT-PCR ürünleri sekans analizleri yapılmak üzere ticari firmaya (MedSanTek, Mahmut Bey Mah. Taşocağı Yolu, No:19 C Blok D:92 Güneşli, 34218 Bağcılar/İstanbul) gönderildi.



Şekil 20: BRSV-G geni için daha önceki çalışmada (Bidokhti ve ark., 2012) tasarlanan ve bu çalışmada kullanılan primerler ile konvansiyonel RT-PCR sonrası hedeflenen ürün büyüklüğü ve jel görüntüsü (SnapGene 6.0.2 programı kullanıldı).

3.2.2.7. Filogenetik Analizler ve Soyağacı Oluşturulması

Yapılan RT-PCR analizleri sonucunda çoğaltılan BRSV-G geni ve HRSV-G geni dizilimleri ile soyağacı oluşturulması için BioEdit ve MEGA11 programlarından yararlanıldı. Analizleri yapabilmek amacıyla gerekli olan referans genler, önceki yıllarda Türkiye ve diğer ülkelerden Gen Bankası'na rapor edilmiş genler arasından seçildi (Tablo 6, 7 ve 8). Bu çalışmada pozitif olarak örneklere ait gen dizilimleri ile seçilen diğer gen dizilimleri CLUSTAL W ile hizalandı ve Koichiro Tamura ve ark., 2021 istatistiksel modeli kullanılarak Maximum Likelihood metoduyla soyağacı oluşturuldu.

Tablo 6: BRSV-G geni için farklı ülkelerden gen bankasına rapor edilen genotipler

Ülke	GenBank Erişim Numarası	Kaynaklar	Suş Adı (BRSV Glikoprotein (G) Geni hedef bölgesi)
Çekya	AY910756.1	Valentova ve ark., 2005	V41
Çekya	AY910765.1	Valentova ve ark., 2005	Odijk
Çekya	AY910755.1	Valentova ve ark., 2005	NY487834
Amerika	AF295543.1	Yunus ve ark., 2000	ATCC51908
Danimarka	AF248593.1	Larsen ve ark., 2000	9710455-3
İngiltere	Y11205.1	Furze ve ark., 1997	
Brezilya	KM982441.1	Oliveira ve ark., 2014	BRSVUEL1-BR/11
Norveç	KF501149.1	Klem ve ark., 2014	A1/N/76
Norveç	KF501172.1	Klem ve ark., 2014	R1/N/11
Amerika	L08416.1	Stine ve ark., 1997	
Irak	MN129181.1	Hussain ve ark., 2019	KhMM1G3-2019
Hırvatistan	KY680337.1	Kresic ve ark., 2018	B9156/2/16/CRO
Hırvatistan	KY680336.1	Kresic ve ark., 2018	B10152/9/16/CRO
Amerika	L08414.1	Stine ve ark., 1997	
Amerika	M58307.1	Lerch ve ark., 1990	BRS virus G gene
Brezilya	FJ555202.1	Silva ve ark., 2008	375 G
İngiltere	Y08719.1	Furze ve ark., 1997	SNOOK
Almanya	AF092942.1	Buchholz ve ark., 1998	ATue51908
Türkiye	MH133326.1	Hacioglu ve Alkan 2018	ESK/25/TR
Türkiye	MH133327.1	Hacioglu ve Alkan 2018	ESK/51/TR
Türkiye	MW881233.1	Sevik ve Ince 2021	TR/AFYONKARAHISAR/2018
Türkiye	MW881234.1	Ince ve ark., 2021	TR/AFYONKARAHISAR/2019
Belçika	U57823.1	Prozzi ve ark., 1997	
Amerika	AF295544.1	Yunus ve ark., 2001	A51908
Danimarka	U92100.1	Larsen 1997	87LU195
Belçika	U24714.1	Prozzi ve ark., 1997	MVR553
Hırvatistan	KY660261.1	Kresic ve ark., 2017	B2532014/14/CRO
Norveç	KF501153.1	Klem ve ark., 2014	O2/N/10
Italya	KY753468.1	Bertolotti ve ark., 2017	IT11418
Amerika	L08411.1	Stine ve ark., 1997	
Amerika	L08415.1	Stine ve ark., 1997	
Belçika	U24716.1	Prozzi ve ark., 1997	85-1330
Italya	KY753469.1	Bertolotti ve ark., 2017	IT48170
Fransa	AF188584.1	Valarcher ve ark., 2000	V347
Fransa	AF188582.1	Valarcher ve ark., 2000	VC464
Fransa	AF188583.1	Valarcher ve ark., 2000	5761
İngiltere	Y08717.1	Furze ve ark., 1997	WBH
Fransa	AF188604.1	Valarcher ve ark., 2000	88P
Fransa	AF188603.1	Valarcher ve ark., 2000	58P
Fransa	AF188588.1	Valarcher ve ark., 2000	A1
Fransa	AF188597.1	Valarcher ve ark., 2000	8352
Fransa	AF188585.1	Valarcher ve ark., 2000	K1
Fransa	AF188586.1	Valarcher ve ark., 2000	K2
Fransa	AF188587.1	Valarcher ve ark., 2000	75P
Italya	KY753456.1	Bertolotti ve ark., 2017	IT16813
Italya	KY753464.1	Bertolotti ve ark., 2017	IT45888
Italya	KY753463.1	Bertolotti ve ark., 2017	IT1299

Hırvatistan	KY680318.1	Kresic ve ark., 2018	B1261/11/CRO
Hırvatistan	KY680327.1	Kresic ve ark., 2018	B102/11/CRO
Hırvatistan	KY680328.1	Kresic ve ark., 2018	B99/11/CRO
Hırvatistan	KY680331.1	Kresic ve ark. 2018	B59586/1/15/CRO
Hırvatistan	KY680333.1	Kresic ve ark., 2018	B10152/1/16/CRO
Italya	KY753452.1	Bertolotti ve ark., 2017	IT6167A
Italya	KY753451.1	Bertolotti ve ark., 2017	IT47193
Brezilya	MK599389.1	Leme ve ark., 2019	BRA-UEL01-Me/2011
Brezilya	MK599397.1	Leme ve ark., 2019	BRA-UEL09-PG/2015
Japonya	LC499984.1	Kumagi ve ark., 2019	IW02
Japonya	LC499991.1	Kumagi ve ark., 2019	YM01
Japonya	LC499994.1	Kumagi ve ark., 2019	FKI11
Japonya	LC499985.1	Kumagi ve ark., 2019	IW03

Tablo 7: HRSV-A G geni için farklı ülkelerden gen bankasına rapor edilen genotipler

Ülke	GenBank Erişim Numarası	Kaynaklar	Suş Adı (HRSV-A Glikoprotein (G) Geni hedef bölgesi
Kanada	JN257694.1	Eshaghi ve ark., 2012	ON138-0111A
Kanada	JN257693.1	Eshaghi ve ark., 2012	ON67-1210A
Türkiye	MF177910.1	Bayrakdar ve ark., 2018	ANK/64/2014
Türkiye	KM266879.1	Bayrakdar ve ark., 2014	ANK/2012/95
Amerika	AF233914.1	Peret ve ark., 2000	MO48
Amerika	AF233902.1	Peret ve ark., 2000	AL19471-5
Amerika	AF233917.1	Peret ve ark., 2000	NY108
Yeni Zelanda	DQ171789.1	Matheson ve ark., 2006	NZA_89_03
Yeni Zelanda	DQ171790.1	Rich ve ark., 2006	NZA_91_10
Amerika	AF065254.1	Peret ve ark., 2000	CH09
Amerika	AF233907.1	Peret ve ark., 2000	CN2851
Güney Afrika	AF348804.1	Venter ve ark., 2001	SA99V360
Amerika	AF233904.1	Peret ve ark., 2000	CN1973
Amerika	AF233901.1	Peret ve ark., 2000	AL19452-2
Amerika	AF233918.1	Peret ve ark., 2000	NY20
Güney Afrika	AF348808.1	Venter ve ark., 2001	SA99V1239
Güney Afrika	AF348809.1	Venter ve ark., 2001	SA97D669
Güney Afrika	AF348810.1	Venter ve ark., 2001	SA98D707
Amerika	AF233909.1	Peret ve ark., 2000	MO01
Amerika	AF065255.1	Peret ve ark., 2000	CH17
Amerika	AF233916.1	Peret ve ark., 2000	NY103
Amerika	AF233922.1	Peret ve ark., 2000	TX69343
Amerika	AF233905.1	Peret ve ark., 2000	CN2395
Amerika	AF233911.1	Peret ve ark., 2000	MO13
Amerika	AL19376-1	Peret ve ark., 2000	AF233900.1
Güney Afrika	AF348806.1	Venter ve ark., 2001	SA98V173
Japonya	AB603445.1	Yamaguchi ve ark., 2011	NG-073-08
Japonya	AB603443.1	Yamaguchi ve ark., 2011	NG-115-07
Japonya	AB470479.1	Shobugawa ve ark., 2009	NG-082-05
Japonya	AB470478.1	Shobugawa ve ark., 2009	NG-016-04
Çin	DQ289605.1	Zhang ve ark., 2007	Beijing/A/04/07
Çin	DQ289633.1	Zhang ve ark., 2007	Beijing/A/04/58
Almanya	FJ391425.1	Reiche ve ark., 2009	GER/0897/06-07
Almanya	FJ391441.1	Reiche ve ark., 2009	GER/3897/06-07
Brezilya	FJ210829.1	Souza ve ark., 2013	SP(IAL)1691/2007
Türkiye	KM266850.1	Bayrakdar ve ark., 2014	ANK/2011/180
Türkiye	KM266813.1	Bayrakdar ve ark., 2014	ANK/2010/241
Türkiye	KM266852.1	Bayrakdar ve ark., 2014	ANK/2011/238
Çin	GU550471.1	Zhang ve ark., 2010	Chongqing/A/08/03
Çin	KC297277.1	Cui ve ark., 2013	BJ/29240
Çin	KC297248.1	Cui ve ark., 2013	BJ/27569
Çin	KC297374.1	Cui ve ark., 2013	BJ/36578
Çin	KC297324.1	Cui ve ark., 2013	BJ/33852
Türkiye	KM266874.1	Bayrakdar ve ark., 2014	ANK/2013/390
Türkiye	KM266875.1	Bayrakdar ve ark., 2014	ANK/2013/508
İran	KU716108.1	Mojarrad ve ark., 2016	A/Shiraz/12/2016
İran	KU716109.1	Mojarrad ve ark., 2016	A/Shiraz/19/2016

Hırvatistan	JQ844861.1	Ivancic ve Forcic, 2012	HR6931-08
Almanya	KJ710379.1	Tabatabai ve ark., 2014	HD12206
Almanya	KJ710395.1	Tabatabai ve ark., 2014	HD11257
Almanya	KJ710371.1	Tabatabai ve ark., 2014	HD12259
Rusya	MH142221.1	Komissarova ve ark., 2018	5577/2014
Rusya	MH142238.1	Komissarova ve ark., 2018	15849/2014
Rusya	MK386440.1	Komissarova ve ark., 2019	5133/2014
Rusya	MK386445.1	Komissarova ve ark., 2019	8951/2014
İspanya	KM402661.1	Gimferrer ve ark., 2015	VH192457
İspanya	KM402625.1	Gimferrer ve ark., 2015	VH14205
İspanya	KM402663.1	Gimferrer ve ark., 2015	VH220557
Pakistan	KF437514.1	Aamir ve ark., 2013	RSVA/PG/05/12

Tablo 8: HRSV-B G geni için farklı ülkelerden gen bankasına rapor edilen genotipler

Ülke	GenBank Erişim Numarası	Kaynaklar	Suş Adı (HRSV-B Glikoprotein (G) Geni hedef bölgesi
Japonya	HM459879.1	Dapat ve ark., 2010	NG-040-07
Türkiye	KM266965.1	Bayrakdar ve ark., 2014	ANK/2012/55
Türkiye	MF177951.1	Bayrakdar ve ark., 2018	ANK/2311/2014
Japonya	AB603470.1	Yamaguchi ve ark., 2011	NG-108-05
Japonya	AB603469.1	Yamaguchi ve ark., 2011	NG-247-06
Çin	KC297440.1	Cui ve ark., 2013	BJ/22850
Çin	KP336540.1	Yu ve ark., 2015	HZ12-s284
Çin	KP336534.1	Yu ve ark., 2015	HZ13-s38
Japonya	HM459864.1	Dapat ve ark., 2010	NG-068-05
Japonya	HM459867.1	Dapat ve ark., 2010	NG-025-05
Japonya	HM459869.1	Dapat ve ark., 2010	NG-063-07
Japonya	HM459873.1	Dapat ve ark., 2010	NG-013-07
Japonya	HM459875.1	Dapat ve ark., 2010	NG-120-07
Çin	KC297492.1	Cui ve ark., 2013	BJ/F9981
Güney Kore	HQ699304.1	Baek ve ark., 2012	B/Korea/CB757/09 G
Güney Kore	HQ699289.1	Baek ve ark., 2012	B/Korea/CB1119/10 G
İskoçya	HQ731765.1	Gaunt ve ark., 2011	NL20752400/07-08
Amerika	JN032123.1	Rebuffo-Scheer ve ark., 2011	B/WI/629-DC10/08-09
Japonya	HM459885.1	Dapat ve ark., 2010	NG-135-07
Japonya	HM459889.1	Dapat ve ark., 2010	NG-025-07
Japonya	HM459884.1	Dapat ve ark., 2010	NG-042-07
Malezya	JX256976.1	Khor ve ark., 2013	MY-2255824-09
Malezya	JX256974.1	Khor ve ark., 2013	MY-2134333-09
Belçika	AY751110.1	Zlateva ve ark., 2005	BE/46/03
Belçika	AY751111.1	Zlateva ve ark., 2005	BE/210/03
Japonya	AB603480.1	Yamaguchi ve ark., 2011	NG-147-02
Japonya	AB175819.1	Sato ve ark., 2005	NG-004-03
Japonya	AB175820.1	Sato ve ark., 2005	NG-006-03
İspanya	DQ227408.1	Trento ve ark., 2006	BA/1526/04
İspanya	DQ227396.1	Trento ve ark., 2006	BA/524/04 G
İspanya	DQ227407.1	Trento ve ark., 2006	BA/493/04 G
İspanya	DQ227370.1	Trento ve ark., 2006	BA/495/02 G
İspanya	DQ227376.1	Trento ve ark., 2006	BA/1004/02 G
İspanya	DQ227375.1	Trento ve ark., 2006	BA/998/02 G
İspanya	DQ227393.1	Trento ve ark., 2006	BA/5140/03 G
Türkiye	KM266959.1	Bayrakdar ve ark., 2014	ANK/2012/29
Türkiye	KM266955.1	Bayrakdar ve ark., 2014	ANK/2011/644
Japonya	HM459856.1	Dapat ve ark., 2010	NG-008-09
İspanya	AY333364.1	Trento ve ark., 2003	BA4128/99B
Türkiye	KM266986.1	Bayrakdar ve ark., 2014	ANK/2012/182
Türkiye	KM266970.1	Bayrakdar ve ark., 2014	ANK/2012/70
İspanya	DQ227371	Trento ve ark., 2006	BA/505/02 G
Uruguay	AY488804.1	Blanc ve ark., 2005	mon/7/01
Uruguay	AY488794.1	Blanc ve ark., 2005	mon/1/99
Uruguay	AY488803.1	Blanc ve ark., 2005	mon/6/01
İspanya	AY333361.1	Trento ve ark., 2003	Mon/15/90
Kenya	AY660682.1	Scott ve ark., 2004	Ken/12/03
Güney Afrika	AF348826.1	Venter ve ark., 2001	SA98D1656

Güney Afrika	AF348821.1	Venter ve ark., 2001	SA99V800
İspanya	AF309676.1	Roca ve ark., 2001	Moz/198/99
Güney Afrika	AF348813.1	Venter ve ark., 2001	SA99V429
Güney Afrika	JF704216.1	Venter ve ark., 2001	SA98V192
Kamboçya	JN119979.1	Arnott ve ark., 2011	Cam2009-1013
Kamboçya	JN119987.1	Arnott ve ark., 2011	Cam2009-2145
Amerika	M73542.1	Sullender ve ark., 1991	WV15291
Amerika	AF065250.1	Peret ve ark., 1998	CH10b
Amerika	AF065251.1	Peret ve ark., 1998	CH93-9b
Güney Afrika	AF348826.1	Venter ve ark., 2001	SA98D1656
Belçika	AY751275.1	Zlateva ve ark., 2005	BE/400/91
Amerika	AF233933.1	Peret ve ark., 2000	TX69208
Arjantin	AY672698.1	Galiano ve ark., 2005	BA/3976/99
Amerika	AF233924.1	Peret ve ark., 2000	AL19734-4
Belçika	AY751276.1	Zlateva ve ark., 2005	BE/2003/84
Belçika	AY751281.1	Zlateva ve ark., 2005	BE/1932/84
Tayland	KC342343.1	Auksornkitti ve ark., 2014	CU2011/81
Tayland	KC342336.1	Auksornkitti ve ark., 2014	CU2010/5 G

3.2.3. Serolojik Çalışmalar

3.2.3.1. ELISA Test Metodu

Serum tüplerine alınan kan örnekleri, 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve elde edilen kan serumu BRSV-F proteinine spesifik antikor varlığı yönünden ELISA ile araştırıldı. Bu amaçla ticari olarak temin edilen Monoscreen AbELISA BRSV Kiti (BioX) kullanıldı. Çalışmada üretici firma tarafından bildirilen yöntem aşağıdaki gibi uygulandı.

1. Kitin içerdiği tüm kimyasallar teste başlamadan önce oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi.
2. Test edilecek kan serum örneklerinde dilüsyon yapıldı. Bu amaçla 96 kuycuklu steril mikroplaka kullanıldı. Her bir örnekten 20 µl kuyucuklara konuldu. Her bir serum örneği, negatif kontrol, pozitif kontrol ve referans serum ikişer kuyucukta olacak şekilde planlandı.
3. Serumların bulunduğu mikroplakadaki tüm kuyucuklara 180 µl dilüsyon sıvısı eklendi ve pipetleme ile homojen hale getirildi (1/10 dilüsyon).
4. Kitin içerdiği BRSV antijeni ile kaplı mikroplakadaki her bir kuyucuğa 90 µl dilüsyon sıvısı konuldu ve üzerine 1/10 dilüe edilmiş kan serumu örnekleri eklendi. Pipetleme ile karıştırılarak homojen hale getirildi. (1/100 dilüsyon)
5. Mikroplaka 25 °C'de 1 saat inkübe edildi.
6. Otomatik ELISA plaka yıkama cihazı her bir kuyucuğa 300 µl 3 tekrar olacak şekilde ayarlandı ve mikroplakadaki tüm kuycuklar yıkama solüsyonu ile yıkandı.
7. Dilüsyon solüsyonu ile 1/50 oranında sulandırılan horseradish-peroxidase ile konjuge anti-bovine IgG1 monoklonal antikor içeren konjugat her kuyucuğa 100 µl eklendi.
8. Mikroplaka 25 °C'de 1 saat inkübe edildi.
9. Otomatik ELISA plaka yıkama cihazı her bir kuyucuğa 300 µl 3 tekrar olacak şekilde ayarlandı ve mikroplakadaki tüm kuycuklar yıkama solüsyonu ile yıkandı.

10. Her kuyucuğa 100 µl substrat solüsyonu (Tetramethylbenzidine-TMB) ilave edildi.
11. Mikroplaka 25 °C'de 10 dakika karanlık ortamda inkübe edildi.
12. Her kuyucuğa 100 µl durdurma solüsyonu (Phosphoric acid) ilave edilerek mikroplaka ELISA okuma cihazında 450 nm dalga boyunda okundu.

3.2.3.2. ELISA'nın Değerlendirilmesi

ELISA ile elde edilen OD değerleri kit protokolünde belirtilen şekilde değerlendirildi. Testin doğru şekilde uygulandığını gösteren pozitif kontrol OD değerinin 0.800'den büyük olması, negatif kontrol OD değerinin de 0.300'dan küçük olması konusuna dikkat edildi.

Her bir kan serumu örneğinin OD değeri formüle göre hesaplandı ve pozitiflik-negatiflik durumu değerlendirilmesi Tablo 9'da belirtildiği şekilde yapıldı.

% değer= Her bir serum örneğinin ortalama OD değeri X 100 / Pozitif kontrolün ortalama OD değeri

Tablo 9: ELISA testi sonucu elde edilen OD değerlerinin pozitif veya negatif değerlendirilmesi

0		+		++		+++		++++		+++++
Değer≤	%20	< Değer ≤	%40	< Değer ≤	%60	< Değer ≤	%80	< Değer ≤	%100	< Değer

3.2.4. İstatistiksel Analizler

ELISA için öncelikle ELISA OD değerlerinin dağılımı Minitab programında histogram analizi yapıldı. Histogram verilerinde iki alanda gruplaşmalar olduğu görüldü ve bunun için MedCalc programında Grubbs testi ve boxplot çizilerek "sapan değerler kontrolü" yapıldı.

ELISA ve real time RT-PCR ile pozitif bulunan hayvanlarda pozitifliğin aşılı ve aşısız olma ile ilişkisinin istatistiksel analizi MedCalc programı kullanılarak Ki-Kare testi ile yapıldı. P değeri <0.005'den küçük olanlar istatistiksel açıdan önemli kabul edildi.

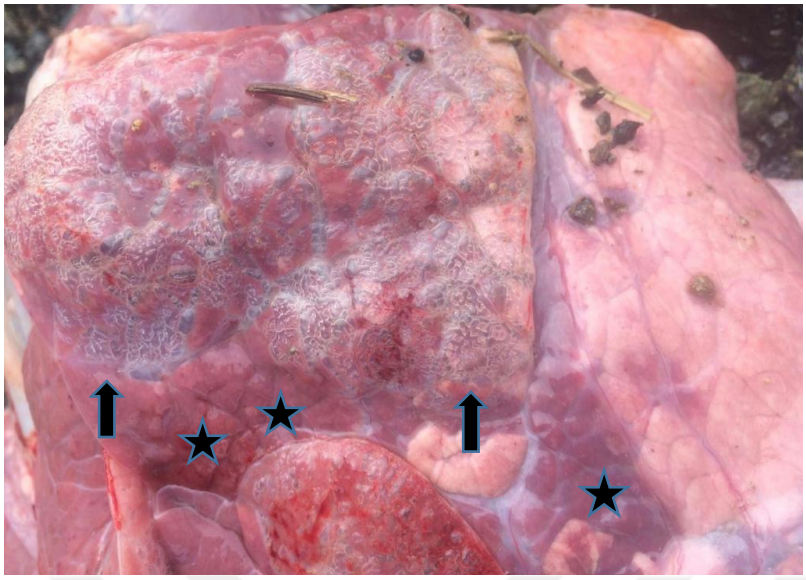
4. BULGULAR

4.1. Klinik ve Nekropsi Bulguları

Bu çalışmada incelenen örneklere ait çiftlik bilgileri, örnek alınan hayvanların yaş grubu ve klinik bulgularla ilgili bilgiler Tablo 2'de verildi. Nazal/orofarengeal svab (277) ve kan (331) örneği alınan hayvanlarda klinik bulgu olarak ateş, halsizlik, iştahsızlık, depresyon, solunum güçlüğü, öksürük, seröz göz ve burun akıntısı gibi belirtilerden bir veya birkaçı gözlendi (Tablo 2). Bu hayvanlardan real time RT-PCR ve RT-PCR ile BRSV yönünden pozitif olarak saptanan bir buzağıda hırıltılı nefes alıp verme, güç solunum ve bunun sonucu ağızdan gelen köpüklü akıntı ile seyreden bir vaka görüldü (Şekil 21). Şiddetli pnömoni sonucu ölen hayvanlardan ve mezbahada kesim öncesi veya sonrası pnömoni tablosu gözlenen sığırlardan alınan 37 akciğer örneğine ait ilgili bilgiler de Tablo 2' de verildi. Real time RT-PCR ile pozitif bulunan akciğer örneklerinde sertleşme (konsolidasyon), lokal veya yaygın konjesyon alanları, ödem, interlobüler veya interstisyel amfizem tespit edildi (Şekil 22).



Şekil 21: Bu çalışmada, real time RT-PCR ve RT-PCR sonucu BRSV pozitif olarak saptanan bir buzağıda baş aşağıya doğru uzatılmış, hırıltılı nefes alıp verme, güç solunum ve bunun sonucu ağızdan gelen köpüklü akıntı ile seyreden bir olgu.



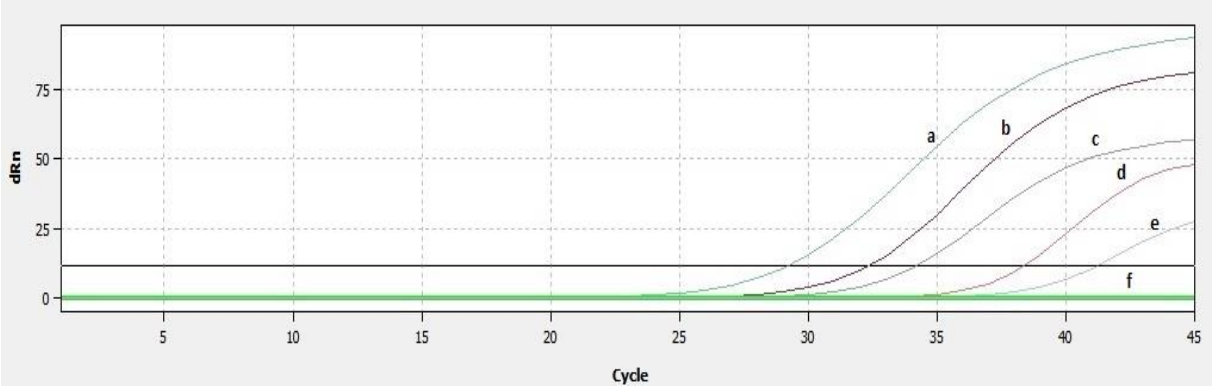
Şekil 22: İnterlobüler ve subpleural bölgede hava dolu veziküller (ok), konsolidasyon alanları (yıldız) ve yaygın interstisiyel amfizem.

4.2. Real Time RT-PCR Bulguları

4.2.1. Real Time RT PCR Optimizasyon ve Saptama Limiti

Real time RT-PCR optimizasyonu çalışmasında kullanılan primerler (BRSV-N geni) ve prob için en uygun protokolün 12,5 µl Maxima Probe/ROX qPCR Master Mix, 2 µl F primer (10 pmol/µl), 2 µl R primer (10 pmol/µl), 1 µl probe (10 pMol/µl), 5,5 µl nükleaz içermeyen su ve 2 µl cDNA içeren karışım olduğu saptandı. Hazırlanan bu karışım için en uygun ısı protokolünün DNA polimeraz enzim aktivasyonunu (95°C'de 10 dakika) takiben, denatürasyon aşaması 95°C'de 15 saniye ve bağlanma aşaması 59°C de 60 saniye toplam 45 siklus olduğu görüldü.

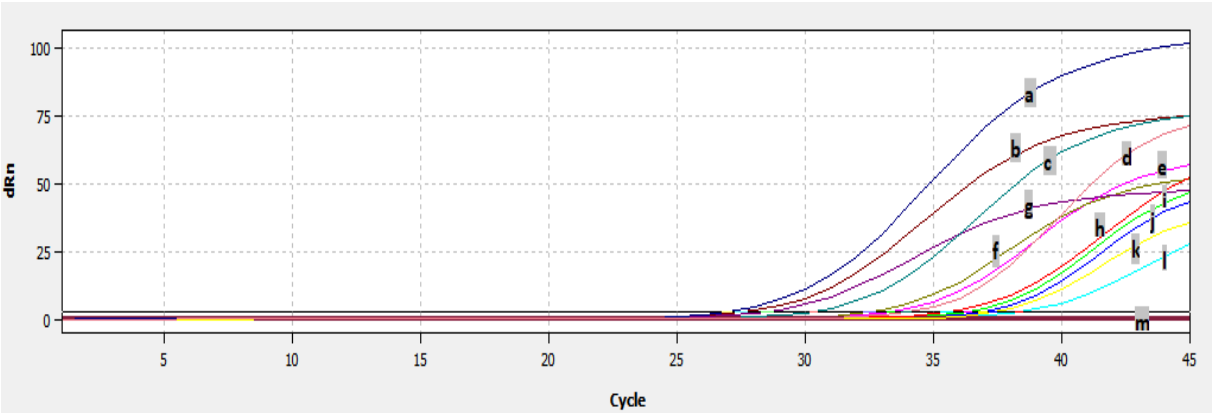
Real time RT-PCR etkinliğinin saptanması amacıyla, bu çalışmadaki moleküler testlerde pozitif kontrol olarak kullanılan örneğin 10 katlı dilusyonları hazırlanarak (10^{-1} ile 10^{-6} aralığında) yapılan real time RT-PCR analizleri sonucunda, pozitif kontrolün CT (Threshold Cycle= CT) değeri stok cDNA'dan itibaren sırasıyla 29, 32, 35, 38, 41 olarak saptandı. Pozitif kontrolün 10^{-4} dilüsyona kadar pozitiflik saptanırken negatif kontrolde artış (amplifikasyon) saptanmadı (Şekil 23).



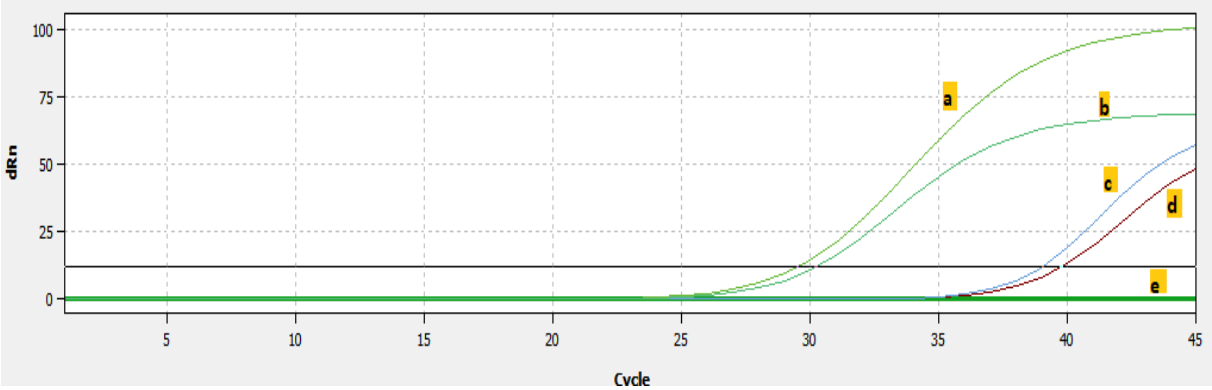
Şekil 23: Real time RT-PCR etkinliği için yapılan pozitif kontrol dilusyonlarının CT değerleri. a: Stok pozitif kontrol, b: Pozitif kontrol 10^{-1} dilusyon, c: Pozitif kontrol 10^{-2} dilusyon, d: Pozitif kontrol 10^{-3} dilusyon, e: Pozitif kontrol 10^{-4} dilusyon, f:Pozitif kontrol 10^{-5} ve 10^{-6} dilusyonları, ve negatif kontrol

4.2.2. Saha Örneklerinin Real Time RT-PCR Sonuçları

Bu çalışmada toplam 277 nazal/orofarengeal svab ve 37 akciğer örneğinin BRSV-N geni hedeflenerek yapılan real time RT-PCR incelenmesi sonucunda 10 adet svab ve 4 akciğer örneği olmak üzere toplam 14 örnek BRSV yönünden pozitif bulundu (Şekil 24 ve Şekil 25). Pozitif olarak saptanan örneklerin CT değerlerinin 26-39 aralığında olduğu tespit edildi (Şekil 24 ve Şekil 25). Trakya'daki çiftliklerden toplanan nazal/orofarengeal svabların 8 tanesinde akciğerlerin ise 3 tanesinde (Şekil 24); Uşak'tan alınan nazal/orofarengeal svabların 2 tanesinde akciğerlerin ise 1 tanesinde BRSV RNA saptandı (Şekil 25). Real time RT-PCR ile pozitif olarak tespit edilen toplam 14 örneğin 6 farklı çiftlikten köken aldığı görüldü.



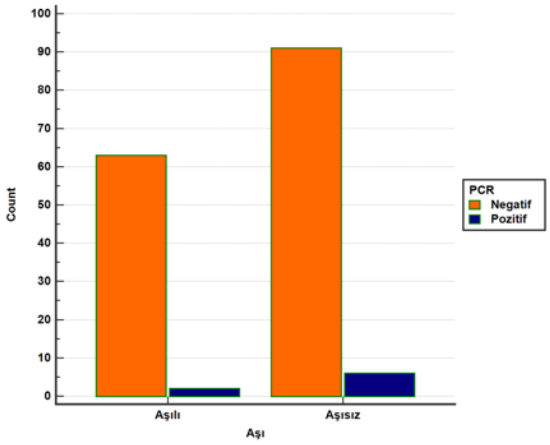
Şekil 24: Trakya bölgesindeki çiftliklerden alınan nazal/orofarengeal svab ve akciğer örneklerinin real time RT-PCR analizi sonucu elde edilen CT değerleri. a:9716 svab; b:4351 svab; c:7578 svab; d:4343 akciğer, e:4346 akciğer; f:2601-12 svab; g:pozitif kontrol; h;4372 svab; i:sep akciğer; j:1501 bom svab; k:7592 svab; l:4391 svab; m:negatif kontrol



Şekil 25: Uşak ilindeki çiftlikten alınan nazal/orofarengeal svab ve akciğer örneklerinin real time RT-PCR analizi sonucu elde edilen CT değerleri. a:akciğer; b:pozitif kontrol; c:svab1; d:svab3; e:negatif kontrol

4.2.3. Real Time RT-PCR Sonuçlarının İstatistik Verileri

Real time RT-PCR ile BRSV yönünden pozitif ve negatif bulunan aşılı ve aşısız hayvanların sonuçlarının grafiği Şekil 26'da verildi.



Şekil 26: Aşılı ve aşısız hayvanların real time RT-PCR sonuçlarının grafiği (MedCalc)

Real time RT-PCR ile pozitif bulunan hayvanlarda pozitifliğin aşılı ve aşısız olma ile ilşkisinin istatistiksel analizi yapıldığında istatistiki yönden anlamlı bir ilişki saptanamadı (p=0.3722) (Şekil 27).

Classification X	Aşı
Classification Y	PCR

PCR	Aşı		
	Aşılı	Aşısız	
Negatif	63	91	154 (95,1%)
Pozitif	2	6	8 (4,9%)
	65 (40,1%)	97 (59,9%)	162

☐ Show all percentages

Chi-squared test

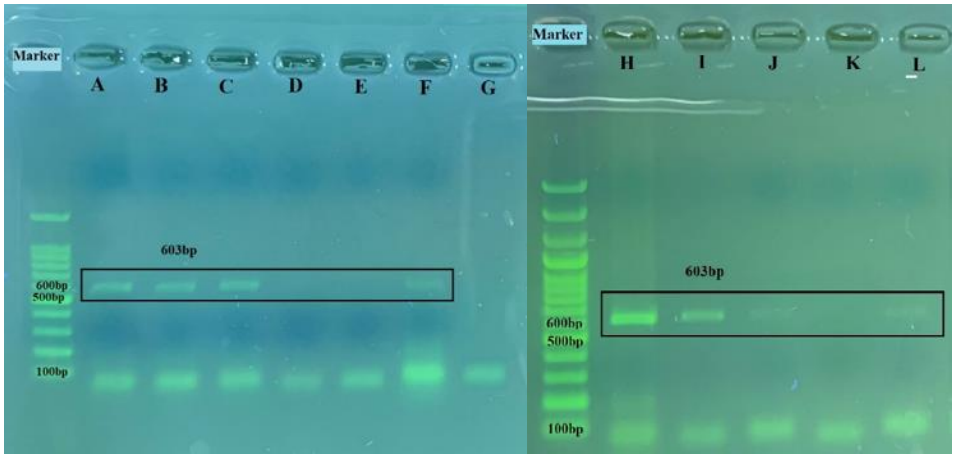
Chi-squared	0,796
DF	1
Significance level	P = 0,3722
Contingency coefficient	0,070

Şekil 27: Aşılı ve aşısız hayvanların real time RT-PCR sonuçlarının Ki-Kare testi (MedCalc)

4.3. RT-PCR ve Sekans Analizi Sonuçları

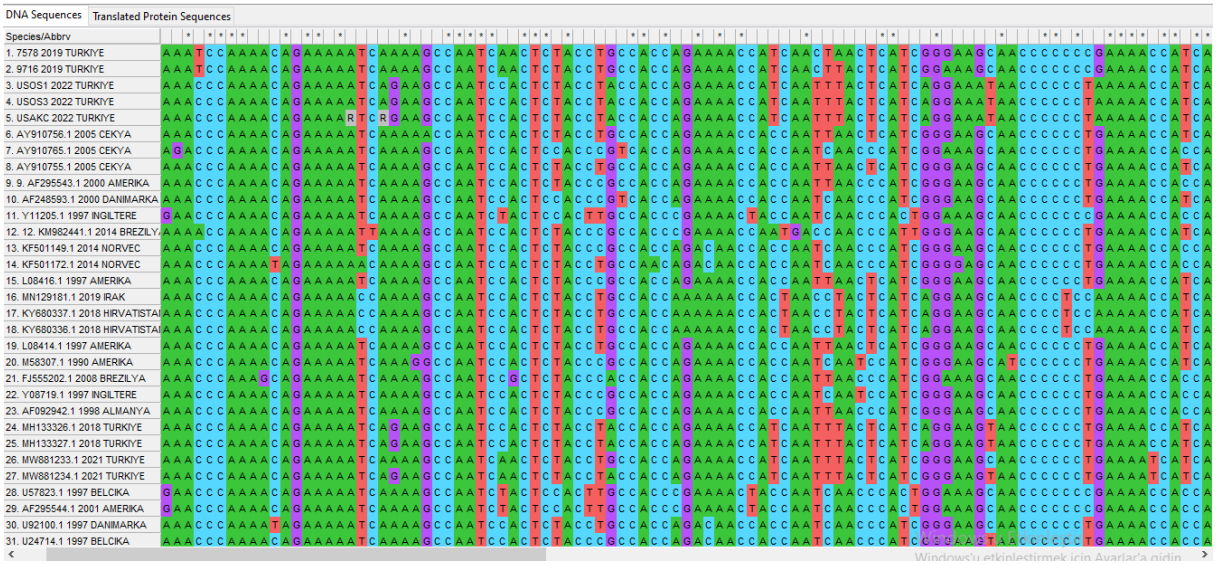
RT-PCR optimizasyonu çalışmasında kullanılan primerler (BRSV-G geni) için en uygun protokolün 12,5 µl Maxima Probe/ROX qPCR Master Mix, 1,25 µl F primer (10 pmol/µl), 1,25 µl R primer (10 pmol/µl), 2 µl BSA (Bovine serum albümin-1 mg/ml), 2 µl $MgCl_2$ (25 mMol), 4 µl nükleaz içermeyen su ve 2 µl cDNA içeren karışım olduğu saptandı. Hazırlanan bu karışım için en uygun ısı protokolünün DNA polimeraz enzim aktivasyonunu (95°C'de 10 dakika) takiben, denatürasyon aşaması 94°C'de 45 saniye ve bağlanma aşaması 50°C de 45 saniye, uzama aşaması 72 °C de 90 saniye toplam 35 siklus ve son uzama 72°C de 7 dakika şeklinde olduğu görüldü.

Real time RT-PCR ile pozitif bulunan 10 adet nazal/orofarengel svab ve 4 adet akciğer örneği, sekans analizi amacıyla BRSV-G genini hedef alan primerler kullanılarak (Tablo 3) RT-PCR ile incelendiğinde, agaroz jel elektroforezde 4 adet nazal/orofarengeal svab ve 1 adet akciğer örneğinde 603 bp'lik ürün (bant) görüldü (Şekil 28).

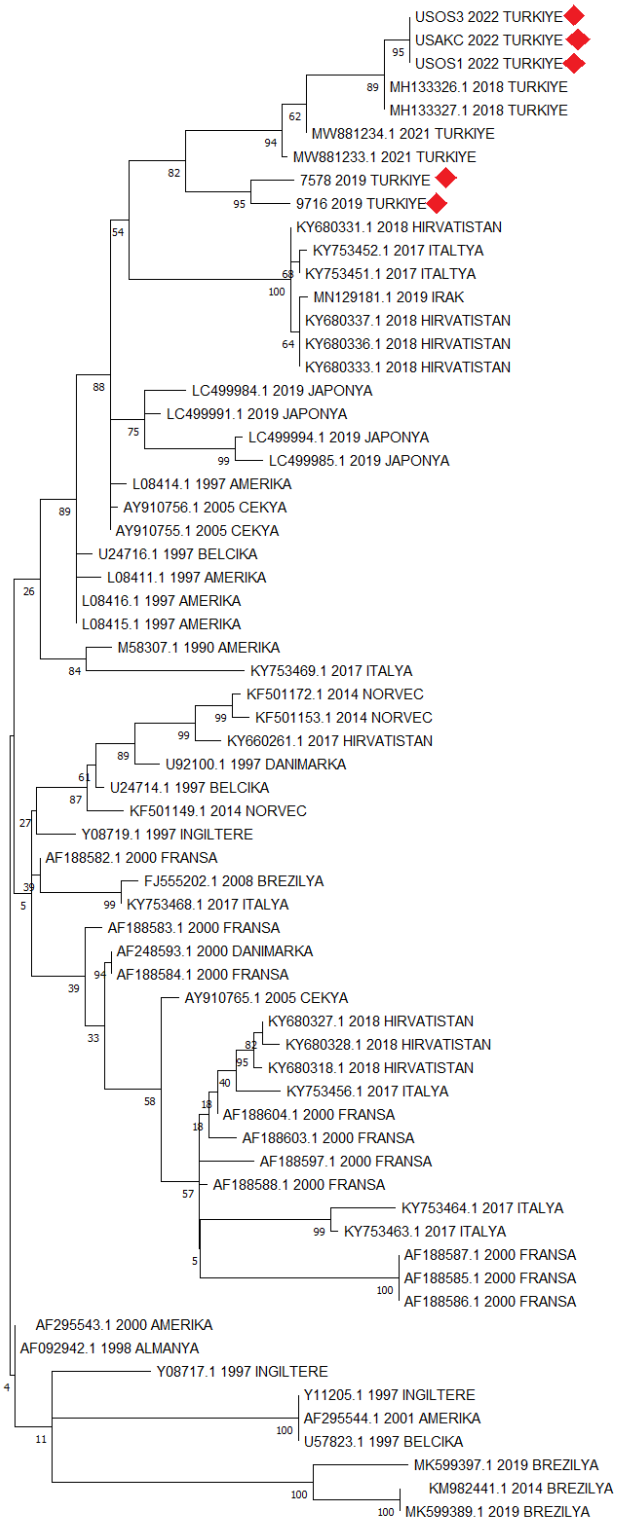


Şekil 28: RT-PCR analizi ile çoğaltılan BRSV G gen bölgesi ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü. A:7578 svab; B:9716 svab; C:4343 akciğer; D:4346 akciğer; E:4351 svab; F:pozitif kontrol; G:negatif kontrol; H:US akciğer; I:US svab1; J:US svab3; K:negatif kontrol; L:pozitif kontrol

Ürün varlığı tespit edilen örneklerin sekans analizi "forward" ve "reverse" şeklinde çift taraflı olarak incelendi. Sekans analiz sonuçları NCBI-BLAST'ta kontrol edildi ve Bioedit 7.2 programında forward ve reverse dizilimler karşılaştırıldıktan sonra sekans analizinde karşılaşılabilecek hatalı okumalar en aza indirildi. Yapılan sekans analizi sonucunda toplam 5 örneğe ait gen dizilimleri, ülkemiz ve diğer ülkelerden Gen Bankası'na bildirilen BRSV-G geni dizilimleri ile birlikte MEGA11 programı kullanılarak Clustal W ile hizalanması sonucu elde edilen veriler Şekil 29'da verildi. Bu verilerle Maximum Likelihood metodu kullanılarak oluşturulan soy ağacı ve saptanan genotiplerin hangi gruba ait olduğu ile ilgili veriler Şekil 30'da verildi.



Şekil 29: RT-PCR sonucunda pozitif olarak tespit edilen ve sekans analizleri tamamlanan örneklerin ülkemiz ve diğer ülkelerden Gen Bankası'na bildirilen BRSV-G genotipleri ile birlikte MEGA11 programı kullanılarak Clustal W ile hizalanması sonucu elde edilen dizilimler



Şekil 30: RT-PCR sonucunda pozitif olarak tespit edilen ve sekans analizleri tamamlanan örneklerin ülkemiz ve diğer ülkelerden Gen Bankası'na bildirilen BRSV-G geni dizilimleri ile birlikte oluşturulan soyağacı

Bu çalışmada RT-PCR sonucu pozitif olarak tespit edilen ve sekans analizleri sonucunda BRSV-G geni dizilimleri saptanan örnekler, soyağacı oluştururken kullanılan diğer gen dizileri ile Geneious Prime programı kullanılarak karşılaştırılarak benzerlik yüzdeleri belirlendi ve bu benzerlik yüzdeleri çalışmasından elde edilen veriler Tablo 10'da verildi.

Tablo 10: RT-PCR sonucu pozitif olarak tespit ettiğimiz ve sekans analizleri tamamlanan örneklerin Gen Bankası'na bildirilen diğer BRSV-G genotipleri ile yüzde benzerlikleri

	7578_2019_ TURKIYE	9716_2019_ TURKIYE	USOS1_2022_ TURKIYE	USOS3_2022_ TURKIYE	USAKC_2022 _TURKIYE
7578_2019_TURKIYE		96.36	89.07	89.07	88.26
9716_2019_TURKIYE	96.36		89.88	89.88	89.07
USOS1_2022_TURKIYE	89.07	89.88		100.00	99.19
USOS3_2022_TURKIYE	89.07	89.88	100.00		99.19
USAKC_2022_TURKIYE	88.26	89.07	99.19	99.19	
AY910756.1_2005_CEKYA	92.71	92.31	91.09	91.09	90.28
AY910765.1_2005_CEKYA	85.83	87.04	87.04	87.04	86.23
AY910755.1_2005_CEKYA	93.12	92.71	91.50	91.50	90.69
AF295543.1_2000_AMERIKA	89.07	89.07	87.45	87.45	86.64
AF248593.1_2000_DANIMARKA	88.26	88.26	87.45	87.45	86.64
Y11205.1_1997_INGILTERE	81.38	82.59	81.38	81.38	80.57
KM982441.1_2014_BREZILYA	83.40	82.19	80.57	80.57	79.76
KF501149.1_2014_NORVEC	87.85	87.04	86.23	86.23	85.43
KF501172.1_2014_NORVEC	85.02	84.21	82.59	82.59	81.78
L08416.1_1997_AMERIKA	92.31	91.90	90.69	90.69	89.88
MN129181.1_2019_IRAK	87.85	89.07	87.85	87.85	87.04
KY680337.1_2018_HIRVATISTAN	88.26	89.47	88.26	88.26	87.45
KY680336.1_2018_HIRVATISTAN	88.26	89.47	88.26	88.26	87.45
L08414.1_1997_AMERIKA	93.12	92.71	90.69	90.69	90.08
M58307.1_1990_AMERIKA	87.45	87.45	86.64	86.64	85.83
FJ555202.1_2008_BREZILYA	86.23	87.04	86.23	86.23	85.43
Y08719.1_1997_INGILTERE	88.26	87.45	87.45	87.45	86.64

AF092942.1_1998_ALMANYA	89.07	89.07	87.45	87.45	86.64
MH133326.1_2018_TURKIYE	89.47	90.28	98.79	98.79	97.98
MH133327.1_2018_TURKIYE	89.47	90.28	98.79	98.79	97.98
MW881233.1_2021_TURKIYE	91.90	91.09	93.93	93.93	93.12
MW881234.1_2021_TURKIYE	90.69	89.88	95.14	95.14	94.33
U57823.1_1997_BELCIKA	81.38	82.59	81.38	81.38	80.57
AF295544.1_2001_AMERIKA	81.38	82.59	81.38	81.38	80.57
U92100.1_1997_DANIMARKA	86.23	86.23	86.23	86.23	85.43
U24714.1_1997_BELCIKA	87.85	87.85	87.04	87.04	86.23
KY660261.1_2017_HIRVATISTAN	85.43	85.43	83.81	83.81	83.00
KF501153.1_2014_NORVEC	85.43	83.81	82.19	82.19	81.38
KY753468.1_2017_ITALYA	87.04	87.85	87.04	87.04	86.23
L08411.1_1997_AMERIKA	91.09	90.69	89.47	89.47	88.66
L08415.1_1997_AMERIKA	92.31	91.90	90.69	90.69	89.88
U24716.1_1997_BELCIKA	91.50	91.09	90.69	90.69	89.88
KY753469.1_2017_ITALYA	83.81	85.43	84.62	84.62	83.81
AF188584.1_2000_FRANSA	88.26	88.26	87.45	87.45	86.64
AF188582.1_2000_FRANSA	88.26	88.26	86.64	86.64	85.83
AF188583.1_2000_FRANSA	87.04	87.04	87.04	87.04	86.23
Y08717.1_1997_INGILTERE	86.23	86.64	86.64	86.64	85.83
AF188604.1_2000_FRANSA	85.02	85.43	86.23	86.23	85.43
AF188603.1_2000_FRANSA	84.21	84.62	85.43	85.43	84.62
AF188588.1	85.43	85.83	85.83	85.83	85.02
AF188597.1_2000_FRANSA	83.40	83.81	83.81	83.81	83.00
AF188585.1_2000_FRANSA	81.78	81.38	82.19	82.19	81.38
AF188586.1_2000_FRANSA	81.78	81.38	82.19	82.19	81.38
AF188587.1_2000_FRANSA	81.78	81.38	82.19	82.19	81.38
KY753456.1_2017_ITALYA	83.81	84.21	85.02	85.02	84.21
KY753464.1_2017_ITALYA	83.81	84.21	83.00	83.00	82.19
KY753463.1_2017_ITALYA	85.02	84.62	83.81	83.81	83.00
KY680318.1_2018_HIRVATISTAN	84.62	84.21	84.21	84.21	83.40
KY680327.1_2018_HIRVATISTAN	83.81	83.40	84.21	84.21	83.40
KY680328.1_2018_HIRVATISTAN	83.40	83.00	83.81	83.81	83.00

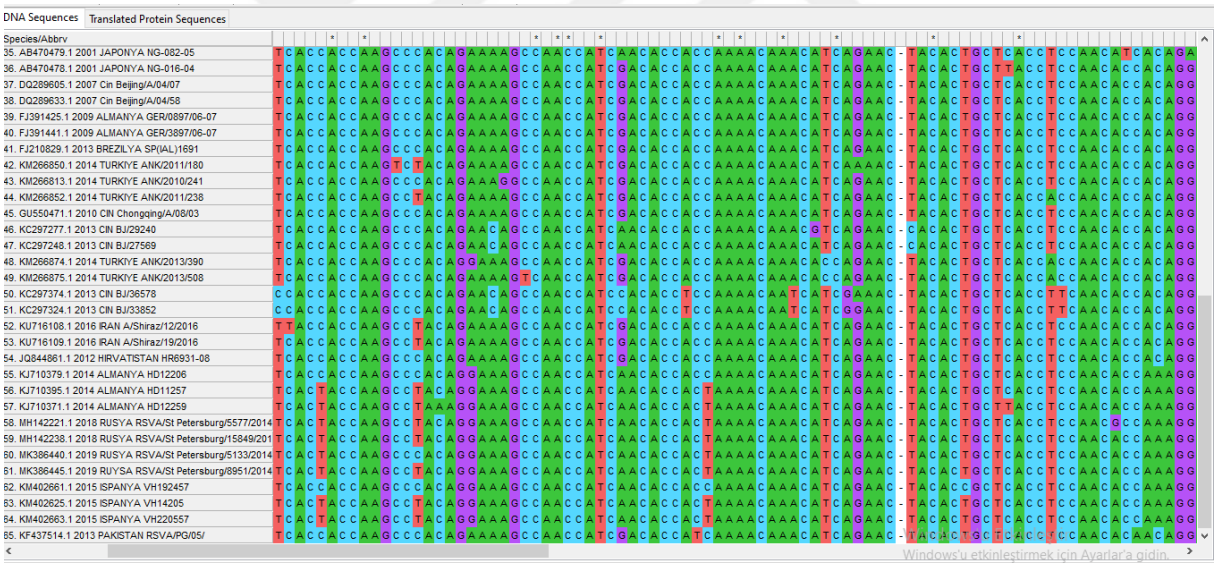
KY680331.1_2018_HIRVATISTAN	88.66	89.88	88.66	88.66	87.85
KY680333.1_2018_HIRVATISTAN	88.26	89.47	88.26	88.26	87.45
KY753452.1_2017_ITALTYA	87.85	89.07	88.66	88.66	87.85
KY753451.1_2017_ITALTYA	88.26	89.47	88.26	88.26	87.45
MK599389.1_2019_BREZILYA	83.40	82.19	80.57	80.57	79.76
MK599397.1_2019_BREZILYA	84.21	83.81	82.59	82.59	81.78
LC499984.1_2019_JAPONYA	90.28	89.88	89.47	89.47	88.66
LC499991.1_2019_JAPONYA	92.31	91.09	89.88	89.88	89.07
LC499994.1_2019_JAPONYA	88.66	88.26	88.66	88.66	87.85
LC499985.1_2019_JAPONYA	88.66	89.07	87.85	87.85	87.04

Bu çalışmada real time RT-PCR ile düşük CT değerine sahip olduğu belirlenen ve RT-PCR analizleri sonucu pozitif olarak saptanan 4 adet nazal/orofarengeal svab 1 adet akciğerin BRSV-G geni kısmi sekans analizi sonucu elde edilen dizilimden 247 nükleotidi içeren gen bölgesi Geneious Programı kullanılarak ülkemiz ve diğer ülkelerden Gen Bankası'na bildirilen genotipler ile benzerlik ve farklılık yönünden karşılaştırıldığında; bu çalışmada RT-PCR ile pozitif bulunan ve aynı çiftlikten alınan 2 adet nazal/orofarengeal svab 1 adet akciğer örneğinin kendi arasındaki benzerlik oranı %88-%100 (Tablo 10: USOS1,USOS3,USAKC) ve RT-PCR ile pozitif bulunan ve aynı çiftlikten alınan 2 adet nazal/orofarengeal svab akciğer örneğinin benzerlik oranı %96 (Tablo 10:7578, 9716) olarak bulundu. RT-PCR ile pozitif bulunan örneklerdeki çiftlikler arası benzerlik oranı ise %88-%89 olarak tespit edildi. BRSV pozitif olarak bulunan akciğer örneğindeki dizilimin, daha önce ülkemizde tespit edilen ve Gen Bankası'na bildirilen akciğer örneğindeki BRSV genotipi ile %97.98 oranında benzer olduğu saptandı (Tablo 10: MH133326.1). Pozitif olarak tespit edilen 4 nazal/orofarengeal svab örneğinin daha önce ülkemizde tespit edilen ve Gen Bankası'na bildirilen BRSV-G geni dizilimleri ile %89-%98 oranında benzer olduğu (Tablo 10: MH133326.1, MH133327.1, MW881233.1, MW881234.1) ve bu çalışmada saptanan BRSV genotiplerinin Subgrup III'e ait olduğu bulundu . Diğer ülkelerde saptanan BRSV genotipleri ile karşılaştırıldığında Amerika'da bildirilen genotip (Tablo 10: L08414.1) ve Çekya'da bildirilen genotip arasında (Tablo 10: AY910755.1) %90-%93 oranında en yüksek benzerlik saptandı. Pozitif bulunan toplam 5 örneğe ait gen dizilimleri ile komşu ülkemiz olan Irak'tan Gen Bankası'na bildirilen genotip (Tablo: MN129181.1) arasında %87-%89 benzerlik tespit edildi. En düşük benzerlik oranı ise Brezilya'da saptanan genotip (Tablo 10: MK599389.1) arasında bulundu.

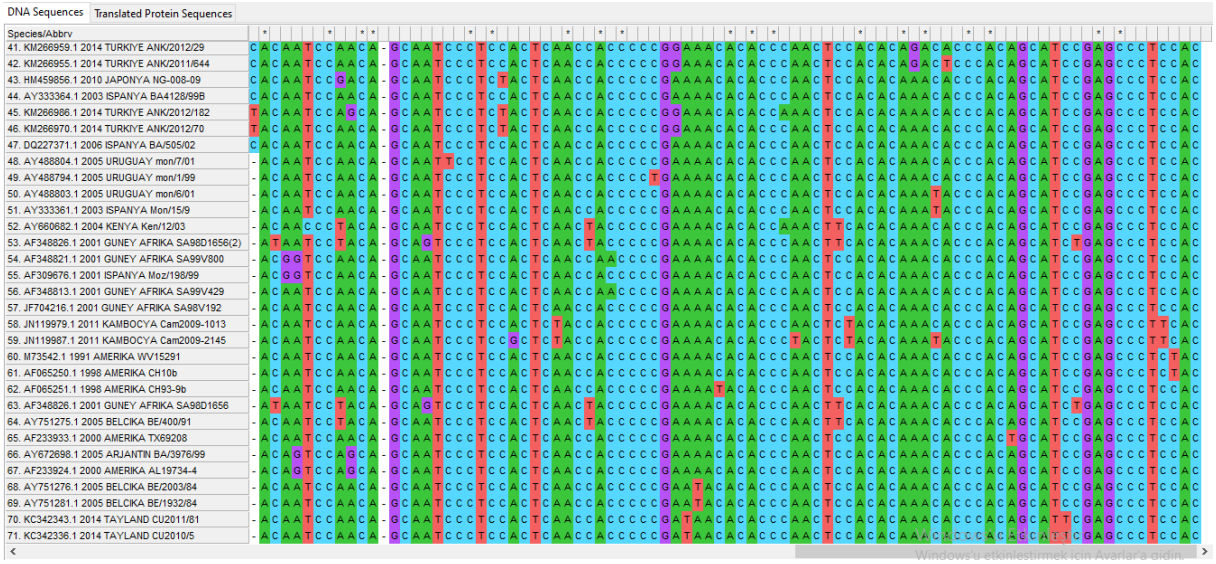
RT-PCR analizleri sonucu pozitif olarak saptanan 4 adet svab ve 1 adet akciğerin BRSV-G geni kısmi sekans analizi sonucu elde edilen dizilimden 247 nükleotit içeren gen bölgesi daha önce ülkemizden Gen Bankası'na bildirilen BRSV-G geni dizilimleri ile karşılaştırıldığında en az 3 nükleotit ve en fazla 26 nükleotit içeren dizilim farklılığı bulundu. Benzerlik oranı en düşük olan Brezilya'da saptanan genotip (Tablo 10: MK599389.1) ile 44-52 nükleotid farklılığı saptandı. Komşu ülkemiz Irak'ta tespit edilen genotip (Tablo 10: MN129181.1) dizilimi ile karşılaştırıldığında 30-34 nükleotit farklılığı bulundu.

4.3.1. BRSV ve HRSV benzerlik bulguları

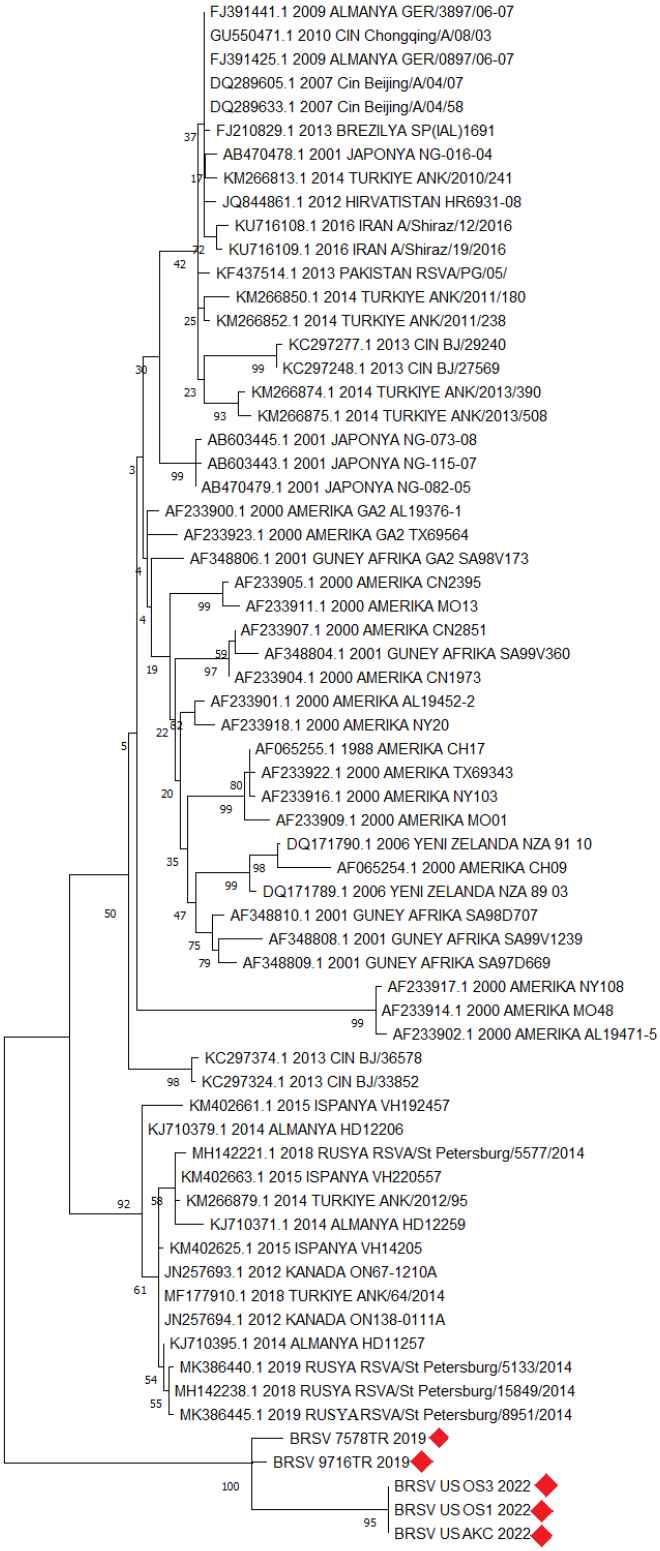
Yapılan sekans analizleri sonucunda toplam 5 örneğe ait gen dizilimleri, ülkemiz ve diğer ülkelerden Gen Bankası'na bildirilen HRSV-A ve HRSV-B G geni dizilimleri ile birlikte MEGA11 programı kullanılarak Clustal W ile hizalanması sonucu elde edilen veriler Şekil 31 ve Şekil 32'de verildi. Elde edilen veriler ile Maximum Likelihood metodu kullanılarak oluşturulan soyağacı Şekil 33 ve Şekil 34'de yer almaktadır.



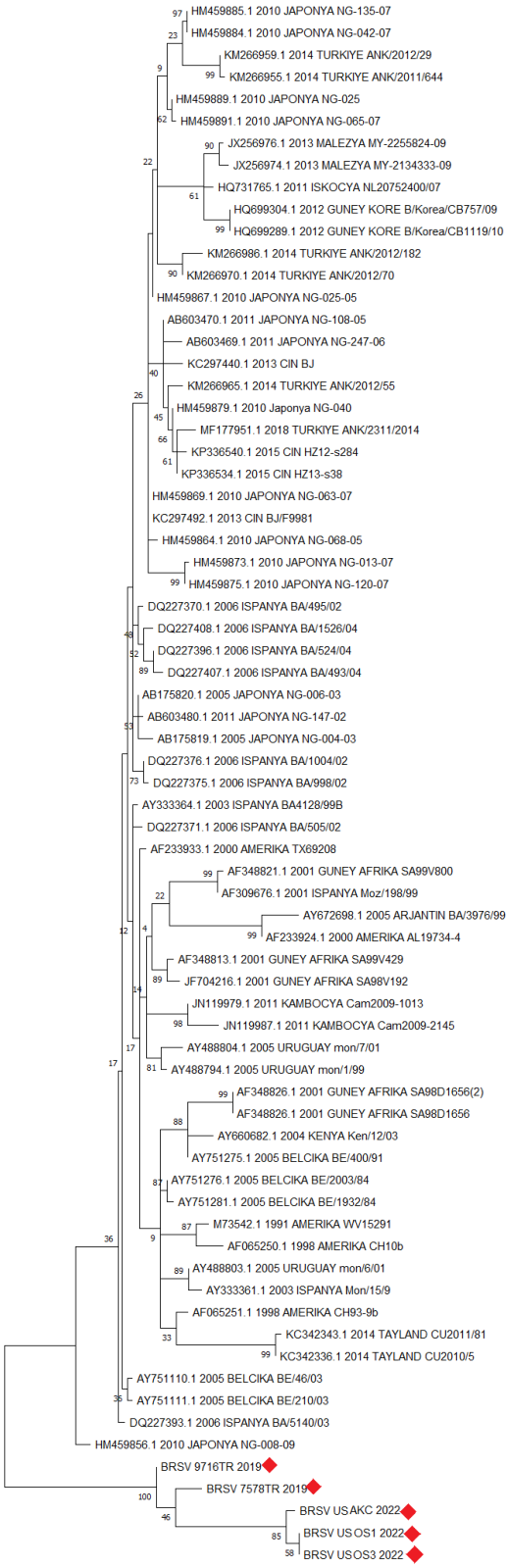
Şekil 31: RT-PCR sonucunda pozitif olarak tespit edilen ve sekans analizleri tamamlanan örneklerin ülkemiz ve diğer ülkelerden Gen Bankası'na bildirilen HRSV-A genotipleri ile birlikte MEGA11 programı kullanılarak Clustal W ile hizalanması sonucu elde edilen dizilimler



Şekil 32: RT-PCR sonucunda pozitif olarak tespit edilen ve sekans analizleri tamamlanan örneklerin ülkemiz ve diğer ülkelerden Gen Bankası'na bildirilen HRSV-B genotipleri ile birlikte MEGA11 programı kullanılarak Clustal W ile hizalanması sonucu elde edilen dizilimler



Şekil 33: RT-PCR sonucunda pozitif olarak tespit edilen ve sekans analizleri tamamlanan örneklerin ülkemiz ve diğer ülkelerden Gen Bankası'na bildirilen HRSV-A G geni dizilimleri ile birlikte oluşturulan soyağacı



Şekil 34: RT-PCR sonucunda pozitif olarak tespit edilen ve sekans analizleri tamamlanan örneklerin ülkemiz ve diğer ülkelerden Gen Bankası'na bildirilen HRSV-B G geni dizilimleri ile birlikte oluşturulan soyağacı

BRSV-G geni ve HRSV-G geni arasındaki yakınlık ilişkisini belirlemek amacıyla soyağacı oluştururken kullanılan gen dizileri Geneious Prime programı kullanılarak yapılan karşılaştırmalar sonucu elde edilen benzerlik yüzdeleri Tablo 11 ve Tablo 12'de verildi.

Tablo 11:RT-PCR sonucu BRSV pozitif olarak tespit edilen ve sekans analizleri tamamlanan örneklerin Gen Bankası'na bildirilen HRSV-A G geni dizilimleri ile benzerlik oranları

	BRSV_7578 TR_2019	**BRSV_9716 TR_2019**	**BRSV_USOS_2022**	**BRSV_OS3_2022**	**BRSV_USAKC_2022**
BRSV_7578TR_2019		96.18	89.69	89.69	88.40
BRSV_9716TR_2019	96.18		90.08	90.08	88.78
BRSV_USOS1_2022	89.69	90.08		100.00	98.67
BRSV_USOS3_2022	89.69	90.08	100.00		98.67
BRSV_USAKC_2022	88.40	88.78	98.67	98.67	
JN257694.1_2012_KANADA_ON138-0111A	46.64	47.39	45.52	45.52	44.96
JN257693.1_2012_KANADA_ON67-1210A	46.64	47.39	45.52	45.52	44.96
MF177910.1_2018_TURKIYE_ANK/64/2014	45.53	45.93	44.72	44.72	44.11
KM266879.1_2014_TURKIYE_ANK/2012/95	45.12	45.12	44.72	44.72	44.11
AF233914.1_2000_AMERIKA_MO48	44.74	45.86	45.49	45.49	45.11
AF233902.1_2000_AMERIKA_AL19471-5	43.98	45.11	44.74	44.74	44.36
AF233917.1_2000_AMERIKA_NY108	44.74	45.86	45.49	45.49	45.11
DQ171789.1_2006_YENI ZELANDA	45.11	45.49	45.86	45.86	45.30
DQ171790.1_2006_YENI ZELANDA	44.74	45.11	45.11	45.11	44.55
AF065254.1_2000_AMERIKA_CH09	43.98	44.36	44.74	44.74	44.17
AF233907.1_2000_AMERIKA_CN2851	45.86	46.24	45.86	45.86	45.30
AF348804.1_2001_GUNEY AFRIKA	45.86	46.24	45.86	45.86	45.30
AF233904.1_2000_AMERIKA_CN1973	45.49	45.86	45.49	45.49	44.92
AF233901.1_2000_AMERIKA_AL19452-2	44.74	45.11	44.74	44.74	44.17
AF233918.1_2000_AMERIKA_NY20	44.74	45.11	44.74	44.74	44.17
AF348808.1_2001_GUNEY AFRIKA	46.62	46.99	46.62	46.62	46.05
AF348809.1_2001_GUNEY AFRIKA	45.49	45.86	45.49	45.49	44.92
AF348810.1_2001_GUNEY AFRIKA	46.99	47.37	46.99	46.99	46.43
AF233909.1_2000_AMERIKA_MO01	45.49	45.86	45.49	45.49	44.92
AF065255.1_1988_AMERIKA_CH17	45.49	45.86	45.49	45.49	44.92
AF233916.1_2000_AMERIKA_NY103	45.49	45.86	45.49	45.49	44.92
AF233922.1_2000_AMERIKA_TX69343	45.11	45.49	45.11	45.11	44.55

AF233905.1_2000_AMERIKA_ CN2395	45.11	45.86	44.74	44.74	44.17
AF233911.1_2000_AMERIKA_MO13	45.11	45.86	45.49	45.49	44.92
AF348806.1_2001_GUNEY AFRIKA	45.11	45.49	45.86	45.86	45.30
AF233900.1_2000_AMERIKA_ GA2_AL19376-1	45.11	45.49	45.11	45.11	44.55
AF233923.1_2000_AMERIKA_ GA2_TX69564	46.24	46.99	45.86	45.86	45.30
AB603445.1_2001_JAPONYA_ NG-073-08	45.86	46.24	46.24	46.24	45.68
AB603443.1_2001_JAPONYA_ NG-115-07	45.86	46.24	45.49	45.49	44.92
AB470479.1_2001_JAPONYA_ NG-082-05	45.86	46.24	45.49	45.49	44.92
AB470478.1_2001_JAPONYA_ NG-016-04	46.62	47.37	45.86	45.86	45.30
DQ289605.1_2007_ Cin_Beijing/A/04/07	46.24	46.99	45.49	45.49	44.92
DQ289633.1_2007_ Cin_Beijing/A/04/58	45.86	46.62	45.86	45.86	45.30
FJ391425.1_2009_ALMANYA_ GER/0897/06-07	46.24	46.99	45.49	45.49	44.92
FJ391441.1_2009_ALMANYA_ GER/3897/06-07	46.24	46.99	45.49	45.49	44.92
FJ210829.1_2013_BREZILYA_ SP(IAL)1691	45.86	46.62	45.11	45.11	44.55
KM266850.1_2014_TURKIYE_ ANK/2011/180	44.44	44.44	44.87	44.87	44.23
KM266813.1_2014_TURKIYE_ ANK/2010/241	44.35	44.77	43.51	43.51	42.89
KM266852.1_2014_TURKIYE_ ANK/2011/238	44.44	44.44	44.44	44.44	43.80
GU550471.1_2010_CIN_ Chongqing/A/08/03	46.24	46.99	45.49	45.49	44.92
KC297277.1_2013_CIN_ BJ/29240	45.49	45.86	45.86	45.86	45.30
KC297248.1_2013_CIN_ BJ/27569	45.86	46.24	46.24	46.24	45.68
KM266874.1_2014_TURKIYE_ ANK/2013/390	45.34	45.34	46.19	46.19	45.55
KM266875.1_2014_TURKIYE_ ANK/2013/508	45.76	45.76	46.61	46.61	45.97
KC297374.1_2013_CIN_ BJ/36578	45.86	45.86	45.49	45.49	44.92
KC297324.1_2013_CIN_ BJ/33852	45.11	45.11	44.74	44.74	44.17
KU716108.1_2016_IRAN_ A/Shiraz/12/2016	45.14	45.91	43.97	43.97	43.39
KU716109.1_2016_IRAN_ A/Shiraz/19/2016	45.14	45.91	43.97	43.97	43.39
JQ844861.1_2012_ HIRVATISTAN_HR6931-08	45.86	46.62	45.11	45.11	44.55
KJ710379.1_2014_ALMANYA _HD12206	47.39	48.13	47.01	47.01	46.46
KJ710395.1_2014_ALMANYA _HD11257	46.27	47.01	45.15	45.15	44.59
KJ710371.1_2014_ALMANYA _HD12259	46.64	47.01	46.27	46.27	45.71
MH142221.1_2018_RUSYA_ RSVA/St	46.27	46.64	45.52	45.52	44.96
MH142238.1_2018_RUSYA_ RSVA/St	45.90	46.64	44.78	44.78	44.22
MK386440.1_2019_RUSYA_ RSVA/St	46.27	47.01	45.15	45.15	44.59

MK386445.1_2019_RUSYA_ RSVA/St	45.52	46.27	44.40	44.40	43.84
KM402661.1_2015_ISPANYA_ VH192457	48.51	48.88	48.51	48.51	47.95
KM402625.1_2015_ISPANYA_ VH14205	46.64	47.39	45.52	45.52	44.96
KM402663.1_2015_ISPANYA_ VH220557	46.64	47.01	45.90	45.90	45.34
KF437514.1_2013_PAKISTAN_RSVA /PG/05/	45.14	45.53	45.14	45.14	44.55

Tablo 12:RT-PCR sonucu BRSV pozitif olarak tespit ettiğimiz ve sekans analizleri tamamlanan örneklerin Gen Bankası'na bildirilen HRSV-B G geni dizilimleri ile benzerlik oranları

	BRSV_7578 TR_2019	**BRSV_9716 TR_2019**	**BRSV_USOS1_2022**	**BRSV_USOS3_2022**	**BRSV_USAKC_2022**
BRSV_7578TR_2019		96.06	89.96	89.96	89.00
BRSV_9716TR_2019	96.06		89.37	89.37	88.39
BRSV_USOS1_2022	89.96	89.37		100.00	99.03
BRSV_USOS3_2022	89.96	89.37	100.00		99.03
BRSV_USAKC_2022	89.00	88.39	99.03	99.03	
HM459879.1_2010_Japonya_ NG-040	48.00	47.12	47.33	47.33	46.50
KM266965.1_2014_TURKIYE_ ANK/2012/55	48.00	48.47	48.00	48.00	47.17
MF177951.1_2018_TURKIYE_ ANK/2311/2014	47.33	46.44	46.67	46.67	45.83
AB603470.1_2011_JAPONYA_ NG-108-05	48.33	47.46	47.67	47.67	46.83
AB603469.1_2011_JAPONYA_ NG-247-06	49.00	48.14	48.33	48.33	47.50
KC297440.1_2013_CIN_BJ	48.33	47.46	47.67	47.67	46.83
KP336540.1_2015_CIN_ HZ12-s284	47.67	47.12	47.00	47.00	46.17
KP336534.1_2015_CIN_ HZ13-s38	48.00	47.12	47.33	47.33	46.50
HM459864.1_2010_JAPONYA_ NG-068-05	47.33	46.44	46.67	46.67	45.83
HM459867.1_2010_JAPONYA_ NG-025-05	48.00	47.12	47.33	47.33	46.50
HM459869.1_2010_JAPONYA_ NG-063-07	48.00	47.12	47.33	47.33	46.50
KC297492.1_2013_CIN_ BJ/F9981	48.00	47.12	47.33	47.33	46.50
HM459873.1_2010_JAPONYA_ NG-013-07	46.00	45.08	45.33	45.33	44.50
HM459875.1_2010_JAPONYA_ NG-120-07	46.33	45.42	45.67	45.67	44.83
HQ699304.1_2012_GUNEY AFRIKA	48.67	47.80	48.00	48.00	47.17
HQ699289.1_2012_GUNEY AFRIKA	48.67	47.80	48.00	48.00	47.17
HQ731765.1_2011_ISKOCYA_ NL20752400/07	47.77	46.22	47.11	47.11	46.29

HM459885.1_2010_JAPONYA_ NG-135-07	47.67	46.78	47.00	47.00	46.17
HM459889.1_2010_JAPONYA_ NG-025	47.33	46.10	47.00	47.00	46.17
HM459891.1_2010_JAPONYA_ NG-065-07	47.33	46.10	47.00	47.00	46.17
HM459884.1_2010_JAPONYA_ NG-042-07	47.67	46.78	47.00	47.00	46.17
JX256976.1_2013_MALEZYA_ MY-2255824-09	48.33	47.46	47.67	47.67	46.83
JX256974.1_2013_MALEZYA_ MY-2134333-09	49.00	48.14	47.67	47.67	46.83
AY751110.1_2005_BELCIKA_ BE/46/03	49.00	48.14	48.33	48.33	47.50
AY751111.1_2005_BELCIKA_ BE/210/03	48.67	47.80	48.00	48.00	47.17
AB603480.1_2011_JAPONYA_ NG-147-02	49.33	48.14	48.33	48.33	47.50
AB175819.1_2005_JAPONYA_ NG-004-03	50.00	48.81	49.00	49.00	48.17
AB175820.1_2005_JAPONYA_ NG-006-03	49.33	48.14	48.33	48.33	47.50
DQ227408.1_2006_ISPANYA_ BA/1526/04	48.67	47.80	48.00	48.00	47.17
DQ227396.1_2006_ISPANYA_ BA/524/04	48.00	47.12	47.33	47.33	46.50
DQ227407.1_2006_ISPANYA_ BA/493/04	47.67	46.78	47.00	47.00	46.17
DQ227370.1_2006_ISPANYA_ BA/495/02	48.67	47.80	48.00	48.00	47.17
DQ227376.1_2006_ISPANYA_ BA/1004/02	48.67	47.80	48.00	48.00	47.17
DQ227375.1_2006_ISPANYA_ BA/998/02	48.67	47.80	48.00	48.00	47.17
DQ227393.1_2006_ISPANYA_ BA/5140/03	49.00	48.14	48.33	48.33	47.50
KM266959.1_2014_TURKIYE_ ANK/2012/29	47.67	46.78	47.00	47.00	46.17
KM266955.1_2014_TURKIYE_ ANK/2011/644	47.67	47.12	47.00	47.00	46.17
HM459856.1_2010_JAPONYA_ NG-008-09	48.33	47.46	47.00	47.00	46.17
AY333364.1_2003_ISPANYA_ BA4128/99B	48.00	47.12	47.33	47.33	46.50
KM266986.1_2014_TURKIYE_ ANK/2012/182	47.67	46.78	47.00	47.00	46.17
KM266970.1_2014_TURKIYE_ ANK/2012/70	47.33	46.44	46.67	46.67	45.83
DQ227371.1_2006_ISPANYA_ BA/505/02	47.67	47.46	47.00	47.00	46.17
AY488804.1_2005_URUGUAY_ mon/7/01	46.91	45.56	46.91	46.91	46.00
AY488794.1_2005_URUGUAY_ mon/1/99	46.55	45.19	46.18	46.18	45.27
AY488803.1_2005_URUGUAY_ mon/6/01	45.82	45.19	46.18	46.18	45.27
AY333361.1_2003_ISPANYA_ Mon/15/9	45.82	45.19	46.18	46.18	45.27
AY660682.1_2004_KENYA_ Ken/12/03	46.55	45.19	46.18	46.18	45.27
AF348826.1_2001_GUNEY AFRIKA	46.55	45.19	45.45	45.45	44.55
AF348821.1_2001_GUNEY AFRIKA	44.73	44.07	44.36	44.36	43.45
AF309676.1_2001_ISPANYA_ Moz/198/99	45.09	44.44	44.73	44.73	43.82

AF348813.1_2001_GUNEY AFRIKA	46.91	45.56	46.55	46.55	45.64
JF704216.1_2001_GUNEY AFRIKA	46.55	45.19	46.18	46.18	45.27
JN119979.1_2011_KAMBOCYA_ Cam2009-1013	45.09	44.07	44.73	44.73	43.82
JN119987.1_2011_KAMBOCYA_ Cam2009-2145	43.27	42.22	42.91	42.91	42.00
M73542.1_1991_AMERIKA_ WV15291	45.09	44.07	44.36	44.36	43.45
AF065250.1_1998_AMERIKA_ CH10b	45.45	44.44	45.09	45.09	44.18
AF065251.1_1998_AMERIKA_ CH93-9b	46.18	45.19	46.18	46.18	45.27
AF348826.1_2001_GUNEY AFRIKA	46.55	45.19	45.45	45.45	44.55
AY751275.1_2005_BELCIKA_ BE/400/91	46.18	44.81	45.82	45.82	44.91
AF233933.1_2000_AMERIKA_ TX69208	46.91	45.56	46.55	46.55	45.82
AY672698.1_2005_ARJANTIN_ BA/3976/99	43.27	42.22	42.91	42.91	42.00
AF233924.1_2000_AMERIKA_ AL19734-4	44.36	43.33	44.36	44.36	43.45
AY751276.1_2005_BELCIKA_ BE/2003/84	46.18	44.81	45.82	45.82	44.91
AY751281.1_2005_BELCIKA_ BE/1932/84	46.55	45.19	45.45	45.45	44.55
KC342343.1_2014_TAYLAND_ CU2011/81	44.36	43.33	44.00	44.00	43.09
KC342336.1_2014_TAYLAND_ CU2010/5	44.73	43.70	44.36	44.36	43.45

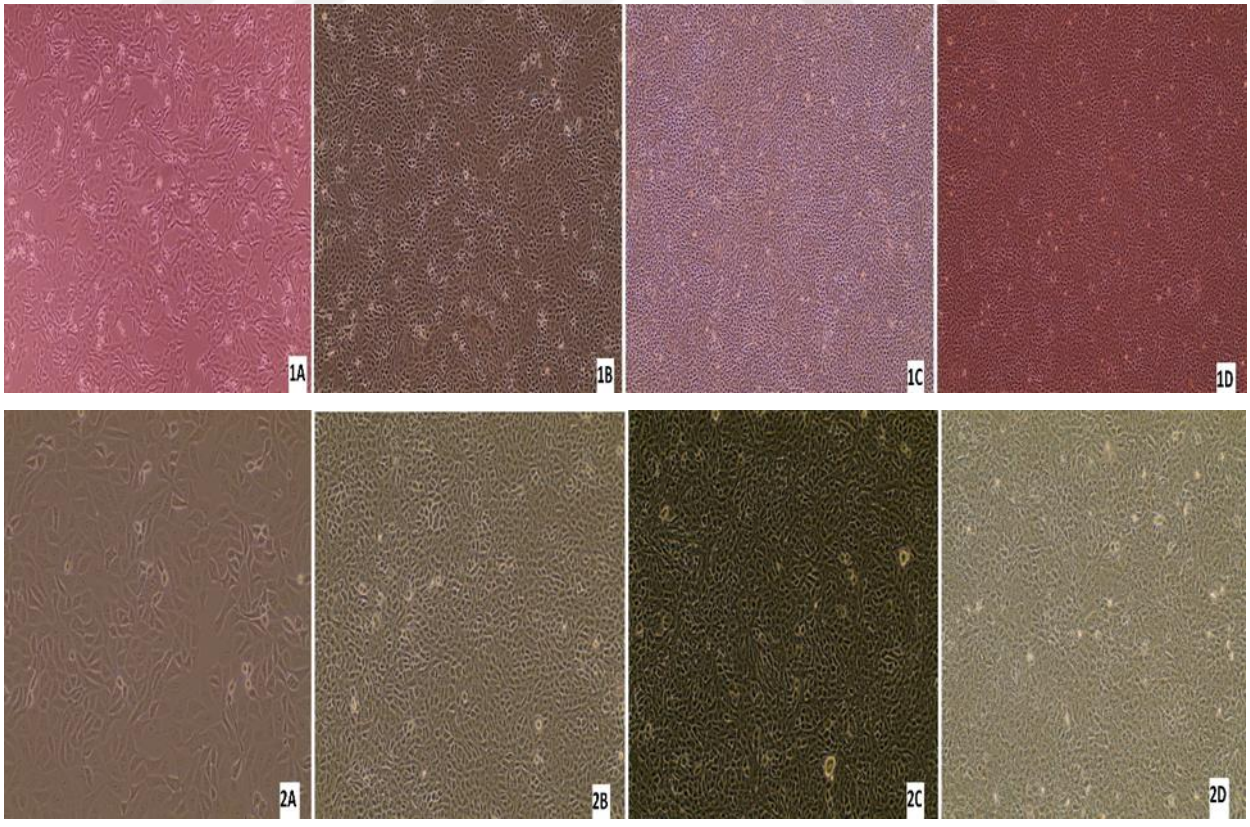
Bu çalışmada RT-PCR analizleri sonucu pozitif olarak saptanan 4 adet nazal/orofarengeal svab ve 1 adet akciğer örneğinin ülkemizden ve diğer ülkelerden Gen Bankası'na bildirilen HRSV-A G geni dizilimleri ile %43-%48 ve HRSV-B G geni dizilimleri ile %42-%50 benzerlik gösterdiği bulundu (Tablo 11 ve Tablo 12). Ülkemizde tespit edilen ve Gen Bankası'na bildirilen HRSV-A G geni dizilimleri ile karşılaştırıldığında %43-%46 oranında, HRSV-B G geni ile karşılaştırıldığında ise %46-%48 oranında benzerlik saptandı (Tablo 11 ve Tablo 12). Benzerlik oranları karşılaştırıldığında, en yüksek Japonya'dan bildirilen genotip ile %50 (Tablo 12**:** AB175819.1), en düşük Arjantin'den (Tablo 12: AY672698.1) ve Kamboçya'dan (Tablo 12: JN119987.1) bildirilen genotip ile %42 oranında benzerlik bulundu.

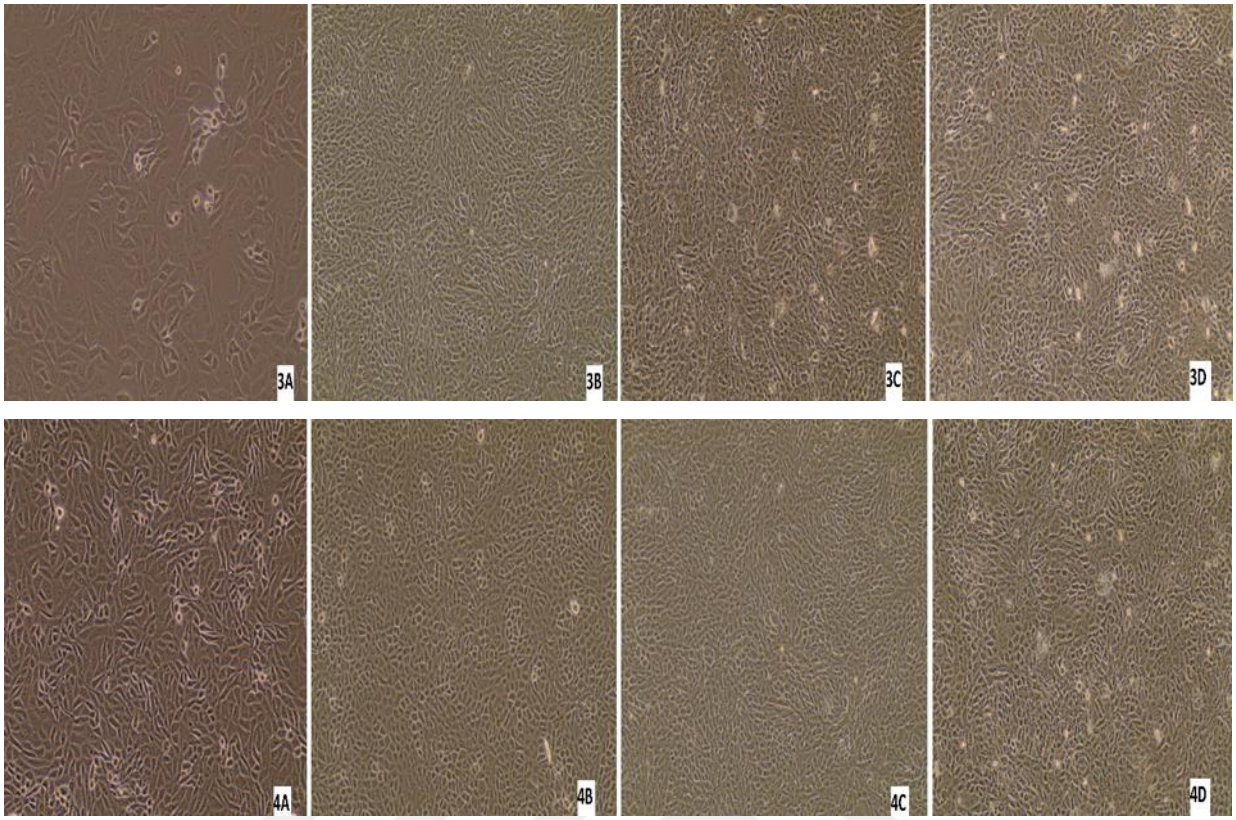
4.4. Hücre Kültürü Bulguları

BRSV izolasyonu amacıyla anabilim dalımızda mevcut olan MDBK (Madin-Darby bovine kidney) (ATCC CLL 22) hücreleri kullanıldı. Hücreler çözündürüldükten ve pasajlandıktan sonra monolayer oluşturma durumu her gün izlendi ve %80-%100 monolayer olana kadar inkübasyona devam edildi. Bu çalışmalar sonunda, 6 kuyucuklu flask

kullanıldığında 18 saat, 25 cm^2 flask kullanıldığında 1 gün, 75 cm^2 flask kullanıldığında 3 gün süresinde hücrelerin monolayer oluşturdukları gözlendi.

Real time RT-PCR ile BRSV yönünden pozitif bulunan ve CT değeri sırasıyla 30, 26 ve 38 olan 7578, 9716 ve UHsvab1 kodlu 3 adet nazal/orofarengeal svab örneği ve 29 CT değerine sahip UHakc kodlu akciğer örneğinden virus izolasyon çalışmalarında; ilk inokulasyon sonrası 7 günlük inkübasyon süresince hücrelerde herhangi bir sitopatik etki (Cytopathic Effect=CPE) görülmedi (Şekil 29:1B,2B,3B,4B). Hücre üst sıvıları real time RT-PCR ile BRSV yönünden analiz edildiğinde; UHsvab1 kodlu svab örneğine ait hücre üst sıvısında 33. siklusta artış (amplifikasyon) saptanırken diğer örneklere ait hücre üst sıvılarında herhangi bir artış gözlenmedi. Sitopatik etki saptanmayan tüm örneklere ait hücre kültürlerinde kör pasaj yapılarak 7 günlük inkübasyon süresince oluşan değişiklikler takip edildiğinde; inkübasyon süresi sonunda hücrelerde CPE görülmedi (Şekil 29:1C,2C,3C,4C) ve bu pasaja ait hücre üst sıvılarında BRSV-RNA saptanmadı. Kör pasaj uygulaması tüm örnekler için tekrarlandı ve toplam 21 günü kapsayan sürede yapılan pasajlar sonucunda MDBK hücre kültüründe herhangi bir sitopatik etki gözlenmedi (Şekil 29:1D,2D,3D,4D). Virus izolasyon çalışmasında kullanılan tüm örnekler 0-3 aylık buzağılardan alınan örneklerdir.



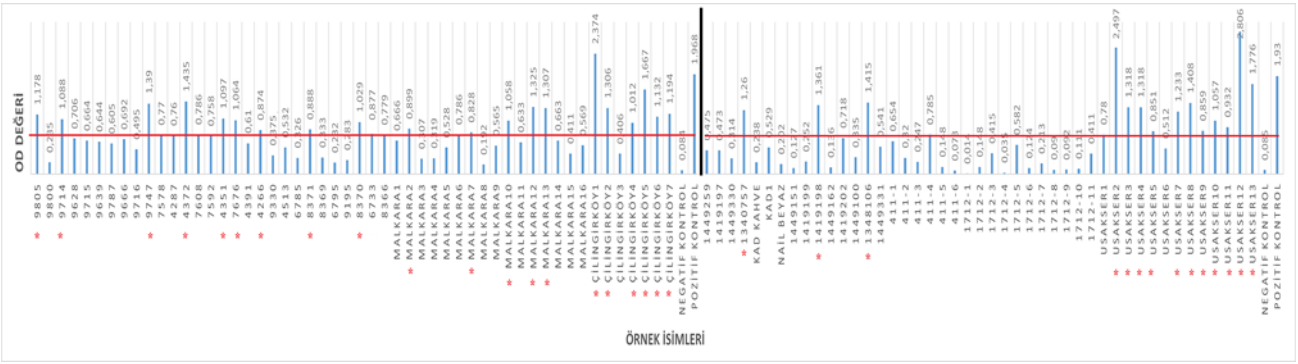


Şekil 35: MDBK monolayer hücreler ve monolayer hücre kültürüne inokulasyon sonrası hücrelerin görünümü. 1A: MDBK monolayer hücreler; 1B:7578 svab örneğinin inokulasyonu sonrası 7. Gün (1. kör pasaj); 1C: 2. kör pasaj 7. gün; 1D: 3. kör pasaj 7.gün; 2A: MDBK monolayer hücreler; 2B:9716 svab örneğinin inokulasyonu sonrası 7. gün (1. kör pasaj); 2C: 2. kör pasaj 7. gün; 2D: 3. kör pasaj 7.gün; 3A: MDBK monolayer hücreler; 3B: UHakciğer örneğinin inokulasyonu sonrası 7. gün (1. kör pasaj); 3C: 2. kör pasaj 7. gün; 3D: 3. kör pasaj 7.gün, 4A: MDBK monolayer hücreler; 4B:UHsvab1 örneğinin inokulasyonu sonrası 7. gün (1. kör pasaj); 4C: 2. kör pasaj 7. gün; 4D: 3. kör pasaj 7.gün

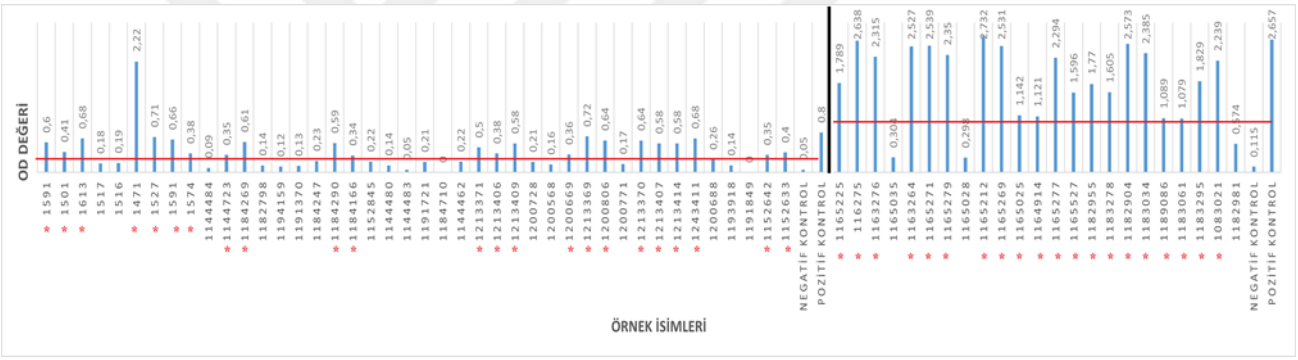
4.5. ELISA Bulguları

Bu çalışmada ELISA ile incelenen, 19 adet entegre sığır çiftliği, 43 adet halk elindeki küçük işletmeler olmak üzere toplam 62 farklı işletmeden solunum sistemi bozukluğu olan ve BRSV'ye karşı aşılı ve aşısız buzağı ve genç sığırlardan toplam 162 kan serumu örneğinden 76 örnekte (%46,9) BRSV seropozitifliği saptandı. Aşısız hayvanlardan alınan 97 kan serumu örneğinden 33 örnek (%34), aşılanmış hayvanlardan alınan 65 kan serumu örneğinden 43 örnek (%66) BRSV spesifik antikor yönünden pozitif bulundu (Şekil 36 ve Şekil 37). Aşısız hayvanlardan alınan ve pozitif bulunan 33 kan serumu örneğinden 11'i Uşak ilinden alınan ve 22'si Trakya bölgesinden alınan örnekleri içermektedir, 8 örnek 6-12 aylık genç buzağı ve 25 örnek 0-6 aylık yaş grubuna aittir. Aşı uygulaması yapılmış hayvanlardan alınan ve pozitif

bulunan 43 kan serumu örneğinin tamamı Trakya bölgesinden alınan örneklerdir, 13 örnek 6-12 aylık genç buzağı ve 30 örnek 0-6 yaş grubuna aittir.



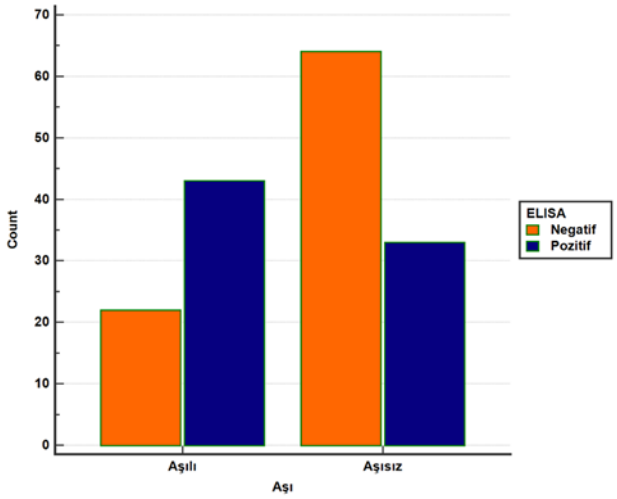
Şekil 36: BRSV ile aşılanmamış buzağı ve genç sığırlardan alınan kan serumu örneklerinin ELISA testi ile analizi sonucu elde edilen OD değerleri (Kırmızı çizginin üst tarafı seropozitif değerleri göstermektedir).



Şekil 37: BRSV ile aşılanmış buzağı ve genç sığırlardan alınan kan serumu örneklerinin ELISA testi ile analizi sonucu elde edilen OD değerleri (Kırmızı çizginin üst tarafı seropozitif değerleri göstermektedir).

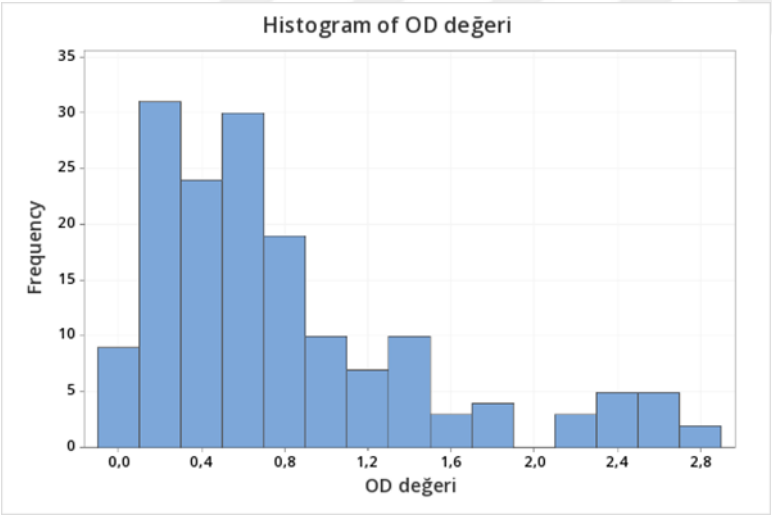
4.5.1. ELISA Sonuçlarının İstatistik Verileri

ELISA ile BRSV antikorları yönünden pozitif ve negatif bulunan hayvanların sonuçlarının grafiği Şekil 38'de verildi.



Şekil 38: Aşılı ve aşısız hayvanların ELISA sonuçlarının grafiği (MedCalc)

ELISA OD verilerinin dağılımı Minitab programında histogram analizi yapılarak incelendi ve bu veriler Şekil 39'da verildi.



Şekil 39: ELISA OD değerlerinin histogramı (Minitab)

Histogram verilerine göre, iki alanda gruplaşmalar olduğu için MedCalc programında Grubbs testi ve boxplot çizilerek yapılan sapan değerler kontrol edildiğinde elde edilen veriler Şekil 40 ve 41'de verildi.

Variable	OD_değeri_son OD değeri son

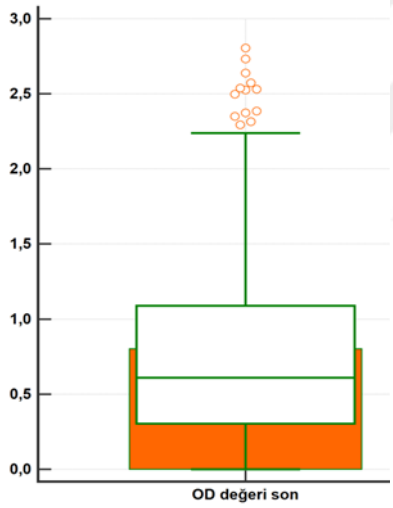
Sample size	162
Lowest value	0,0000
Highest value	2,8060
Arithmetic mean	0,8023
Median	0,6100
Standard deviation	0,6842
Coefficient of Skewness	1,2962 (P<0,0001)
Coefficient of Kurtosis	0,9954 (P=0,0360)
D'Agostino-Pearson test for Normal distribution	reject Normality (P<0,0001)

Suspected outliers

Grubbs - double-sided (alpha-level 0.05)
None

Tukey, 1977	
Outside values	2,294 2,315 2,35 2,374 2,385 2,497 2,527 2,531 2,539 2,573 2,638 2,732 2,806
Far-out values	None

Şekil 40: ELISA OD verilerinin Grubbs testi ve Tukey testi ile sapan değer kontrolü verileri



Şekil 41: ELISA OD değerlerinin box-plott grafiği

Tüm sapan değerlerin pozitif kontrollerin ortalamasının (OD 2,185) üzerinde olması nedeniyle bu verilerin aşılı ve aşısız hayvanlardaki durumu incelendiğinde sadece bir tane verinin aşısız hayvana ait olduğu diğerlerinin aşılı hayvanların serumları olduğu görüldü. Sapan verilerin aşılı hayvanlarda görülmesi nedeniyle herhangi sonuç veri setinden çıkarılmadan aşılı olan ve aşılı olmayan hayvanların ELISA ve PCR sonuçları MedCalc programında Kİ-Kare testi yapılarak karşılaştırıldı.

ELISA verilerinin Kİ-Kare testi ile incelenmesi sonucunda aşılı ve aşısız olan gruplar arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($p<0,05$) (Şekil 42). İki grup

arasındaki ELISA pozitif sonuçlarda oran farkı %32,1 olup %95 güven aralığında %17,3 ile %47 arasında olduğu bulundu.

Classification X	Aşı
Classification Y	ELISA ELISA

ELISA	Aşı		
	Aşılı	Aşısız	
Negatif	22	64	86 (53,1%)
Pozitif	43	33	76 (46,9%)
	65 (40,1%)	97 (59,9%)	162

☐ Show all percentages

Chi-squared test

Chi-squared	16,036
DF	1
Significance level	P = 0,0001
Contingency coefficient	0,300

Şekil 42: Aşılı ve aşısız hayvanların ELISA sonuçlarının Ki-Kare testi (MedCalc)

5. TARTIŞMA

Bovine Respiratör Sinsityal Virus infeksiyonları ülkemiz ve diğer ülkelerde buzağı ve genç sığırlarda ciddi solunum yolu infeksiyonlarına ve ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Timurkan ve ark., 2019; Jia ve ark., 2021). BRSV'nin özellikle genç hayvanlarda infeksiyonlara neden olduğu, aşılanmayan hayvanlar arasında çabuk yayılım gösterdiği ve ciddi hastalık tabloları oluşturduğu bildirilmiştir (Sarmiento-Silva ve ark., 2012) İnfeksiyonun özellikle aşılanmayan sürülerde sık görülmesi ve ekonomik önemi nedeniyle bu çalışmada Trakya bölgesinde ve Uşak ilinde lokalize olmuş çiftliklerde bulunan sığırlarda BRSV sıklığı, tanısı, izolasyonu, moleküler karakterizasyonu, sığırlar arasında sirküle olan genotiplerin araştırılması ve diğer genotiplerle karşılaştırılması planlandı.

Bu çalışmada, hedeflenen çalışmaların yapılması için serolojik yöntemler, virus izolasyonu, moleküler yöntemler, dizileme ve filogenetik analizlerden yararlanılmıştır. Bu yöntemler BRSV'nin araştırılmasına yönelik çalışmalarda diğer araştırıcılar tarafından da kullanılmış ve önerilen yöntemlerdendir (Socha ve Rola, 2011; Yazıcı ve ark., 2020; Nefedchenko ve ark., 2020). Bu bağlamda, çalışmada Trakya bölgesinde bulunan çiftlikler ve köylerdeki küçük yetiştiriciler ziyaret edildi ve solunum sistemi bozukluğu olan buzağı ve genç sığırlardan nazal/orofarengeal svab ve kan örnekleri alındı. BRSV sıklığının belirlenmesi için hem serolojik hem de moleküler yöntemlerden yararlanıldı. Alınan kan serumu örneklerinde BRSV'ye karşı oluşan spesifik antikorların saptanması amacıyla ELISA testi kullanıldı. ELISA birçok araştırıcı tarafından bu amaçla kullanılmış ve virus nötralizasyon testi ile beraber en sık kullanılan serolojik testler arasındadır (Akça ve ark., 2004; Ferella ve ark., 2018). ELISA'nın nötralizasyon testine göre, kısa zamanda yapılması, fazla laboratuvar işgücü gerektirmemesi ve yorumlamasının kısmen objektif olması nedeniyle diğer çalışmalarda da tercih nedeni olduğu vurgulanmıştır (Verhoeff ve ark., 1984). Ancak serolojik testlerin aşılı hayvanlardaki antikorların infeksiyon sonucu mu yoksa aşılama sonucu mu oluştuğunun saptanmasında yetersiz kalması testin yorumlamasında sıkıntılar doğurmaktadır. Bu durumda 2-3 hafta arayla kan serumu örneği alınarak serokonversiyona bakılır ve titre-OD değerlerindeki artış incelenir. BRSV sıklığının ELISA testi ile saptanmasına yönelik çalışmalarda ve bu tez çalışmasında tek serum örneği incelenmiş ve serokonversiyona bakılmamıştır. BRSV seroprevalansının belirlenmesine yönelik ülkemizde ve diğer ülkelerde çalışmalar yapılmış ve %100'e varan

değerler bildirilmiştir (Ohlson ve ark., 2010). Avrupa ülkelerinde 1970'li yılların başından bu zamana BRSV infeksiyonu salgınlar oluşturmaktadır (Valarcher ve ark., 2000). İspanya'nın güneyinde yer alan Doñana Ulusal Parkı'nda bulunan sığır ve vahşi ruminant populasyonunda BRSV seroprevalansı araştırılmıştır. Bu amaçla 2015 yılında 138 sığır ve 203 geyikten (kızıl geyik ve ala geyik) kan serumu örnekleri toplanmıştır. Örneklerde %11.6 oranında BRSV seropozitifliği saptanmıştır (Jimenez-Ruiz ve ark., 2021). İtalya'da 2001-2004 yılları arasında yapılan bir çalışmada 59 farklı çiftlikten toplam 573 sığırdan kan serumları alınarak BRSV antikor varlığı yönünden incelenmiştir ve 396 (%69.1) serum örneğinde BRSV antikorları tespit edilmiştir (Luzzago ve ark., 2010). İrlanda'da 2018, 2019, 2020 yıllarını kapsayacak şekilde bir tarama yapılmış ve 120 farklı sığır çiftliğindeki aşısız hayvanlardan, farklı zamanlarda süt örnekleri alınmıştır. Süt örneklerinde BRSV'ye karşı antikorlar araştırılmış ve alınan örneklerin hepsinde (%100) seropozitiflik bildirilmiştir (McCarthy ve ark., 2021). Sırbistan'da 2012 yılında tamamlanan bir çalışmada BRSV seroprevalansının yaş ve pnömoni ile olan ilişkisi değerlendirilmiştir. Yapılan çalışmada 14 haftalıktan küçük buzağılarda BRSV seroprevalansı düşük bulunurken, 1 yaş üstü sığırlarda %100 olarak tespit edilmiştir. Bu durumun maternal antikorlarla ilişkili korumadan kaynaklandığı vurgulanmıştır. Ayrıca pnömoni geçmişi olan sığırlarda %90 oranında BRSV seroprevalansı tespit edilmiştir (Bugarski ve ark., 2011). Bu veriler pnömonili vakaların BRSV yönünden incelenmesi gerektiğini göstermektedir. Bu tez çalışmasında da antikor saptanan aşısız hayvanların çoğu pnömoni saptanan hayvanlardır.

BRSV infeksiyonlarının seroprevalansı Amerika Birleşik Devletleri'nde araştırılmıştır. ABD'de BRSV infeksiyonlarının tespit edilmeye başladığı ilk dönemlerde 559 sığırdan alınan kan serumu örneklerinde %65.5 oranında BRSV antikorları saptanmıştır (Baker ve ark., 1985). ABD'de 2000'li yılların başında yapılan bir çalışmada ise BRSV seroprevalansı ABD'nin güneyinde %69.5 olarak tespit edilirken, kuzeyinde bu oran %40.9 olarak saptanmıştır (Grubbs ve ark., 2001). ABD'de 2008 yılında yapılan başka bir çalışmada, sığırlarda BRSV seroprevalansının mevsime göre değiştiği görülmüş ve Ocak-Mart ayları arasında seropozitifliğin daha yüksek seyrettiği bildirilmiştir (Crawshaw ve ark., 2008).

Amerika kıtasında yer alan Güney Amerika ülkelerinde de ABD'deki gibi seroprevalansa yönelik çalışmalar yapılmıştır. Arjantin'de 2018 yılında yapılan çalışmada BRSV seroprevalansı %78.64 olarak bulunmuştur (Ferella ve ark., 2018). Başka bir Güney Amerika ülkesi olan Brezilya'da 2018 yılında 26 farklı çiftlikten toplanan 1243 kan serumu örneğinde BRSV antikorlarının varlığı araştırılmış ve %79.5 oranında seropozitiflik saptanmıştır (Hoppe ve ark., 2018).

Komşu ülkelerde de BRSV buzağı ve genç sığırlarda yaygın olarak tespit edilmektedir. Eylül 2017 ve Eylül 2018 zaman aralığında Irak'ta farklı yaş gruplarını içeren aşısız hayvanlarda BRSV antikorları taraması yapılmıştır ve 450 kan serumu örneğinde %83.11 oranında BRSV seroprevalansı bulunmuştur (Hussain ve ark.,2019). Bulunan bu yüksek değer hayvanların aşısız olmasından kaynaklanabileceğini düşündürmektedir çünkü bu tez çalışmasında da aşısız hayvanlarda seropozitiflik saptanması bu durumun bir göstergesidir. İran'da 2012 yılında yapılan bir çalışmada 25 farklı sığır çiftliğinden toplam 642 sığırdan kan serumu örneği BRSV antikorları yönünden araştırılmış ve %51.1 oranında seropozitiflik saptanmıştır (Shirvani ve ark., 2012). İran'da yapılan başka bir çalışmada ise 22 endüstriyel ve yarı endüstriyel sığır çiftliğinden Mayıs 2012 ve Eylül 2012 arasında BRSV aşısı uygulanmamış sığırlardan toplam 736 kan serumu örneği alınmıştır. Çalışma sonucunda %89.1 oranında BRSV seropozitifliği tespit edilmiştir (Farzinpour ve ark., 2016). Irak'ta yapılan çalışmaya benzer şekilde (Hussain ve ark.,2019) komşumuz İran'da da aşısız hayvanlarda seroprevalans yüksek bulunmuştur. Benzer sonuçlar bu tez çalışmasında da alınmıştır.

Ülkemizde de BRSV seroprevalansı ile ilgili çok sayıda çalışma yapılmıştır. BRSV seroprevalansına yönelik ilk çalışma Burgu ve arkadaşları (1990) tarafından bildirilmiştir. Bu çalışmada küçük işletmelerde ve kamu işletmelerinde yetiştirilen ve BRSV'ye karşı aşılanmamış 490 sığırdan alınan kan serumu örneklerinde %46.12 oranında BRSV antikorları saptanmıştır (Burgu ve ark., 1990). Bir başka çalışmada, 1997 yılında BRSV'ye karşı aşı uygulaması yapılmamış 10 farklı işletmeden toplanan 480 sığır kan serumunda %44.6 oranında BRSV seropozitifliği bildirilmiştir (Alkan ve ark., 1997). Diğer bir çalışmada, 2000 yılında Doğu ve Güneydoğu Anadolu Bölgelerinde bulunan kamusal (5 adet) ve özel (12 adet) işletmelerde yetiştirilen süt sığırlarından alınan 471 kan serumu örneğinde %67.3 oranında BRSV antikorları saptanmıştır. Örnek alınan çiftliklerde BRSV'ye karşı aşı uygulanmamıştır (Çabalar ve Şahna, 2000). Yavru ve arkadaşlarının (2005) BRSV aşısı uygulanmamış sığırların kan serumları ile yaptıkları taramada ise BRSV seropozitifliği %46.06 olarak bildirilmiştir. Marmara Bölgesinde 2008 yılında yapılan bir çalışmada, 7 farklı ilden toplanan sığır kan serumlarında BRSV antikor pozitifliği %73 olarak bulunmuştur. Bu çalışmada BRSV'ye karşı aşı uygulanmamış sığırlardan kan serumu örneği alınmıştır (Yeşilbağ ve Güngör, 2008). Aydın ili ve çevresindeki BRSV aşısı uygulanmayan çiftliklerde yetiştirilen süt sığırlarından alınan kan serumlarında 2016 yılında yapılan araştırmada ise BRSV seropozitifliği %98.6 olarak tespit edilmiştir (Güdek, 2016). Adıyaman'da 2018 yılında yapılan bir çalışmada 6-15 aylık aşılanmamış besi sığırlarında BRSV antikor pozitifliği %97.1 olarak saptanmıştır (Öner ve

Yeşilbağ, 2018). Ekim 2017- Mart 2018 tarihleri arasında Denizli ve Burdur ilinde farklı ilçelerdeki yetiştiricilerden BRSV'ye karşı aşısı olmayan toplam 271 adet sığırdan toplanan kan serumlarında BRSV seropozitifliği %76.38 olarak bulunmuştur (Karaotcu ve ark., 2019). Afyonkarahisar ve Uşak illerimizde 2022 yılında yapılan çalışmada, BRSV'ye karşı oluşan antikorların araştırılması amacıyla 43 farklı çiftlikten BRSV'ye karşı aşı uygulanmamış sığırlardan 557 kan serumu toplanmış ve seropozitiflik %58.48 olarak saptanmıştır (İnce ve ark., 2022).

Yukarıda bildirilen çalışmaların verilerine göre ülkemiz ve diğer ülkelerde düşük ve yüksek seropozitiflik saptanmıştır. Bildirilen çalışmalardaki örnek alınma zamanı bu tez çalışmasına benzer şekildem infeksiyonun sık görüldüğü sonbahar ve kış aylarıdır. Ülkemizde daha önce bildirilen çalışmalarda örnek alınan popülasyon hastalık şüpheli hayvanlar ve genel tarama amacıyla örnek alınan sağlıklı hayvanları içermektedir. Bu tez çalışmasında BRSV infeksiyonu şüphesi olan hem aşılı hem aşısız hayvanlardan kan serumları toplanmış ve ELISA ile incelenmiştir. İncelenen toplam 162 kan serumu örneğinden 76 (%46,9) örnekte BRSV spesifik antikor tespit edilmiştir. Bu değer İspanya'da ve ABD'nin kuzeyinde tespit edilen seroprevalans değerlerine göre yüksek ve ABD'nin güneyi, İtalya, İrlanda, Estonya, Sırbistan, Arjantin, Brezilya, Irak ve İran'a göre düşük bulunmuştur. Ülkemizde yapılan seroprevalans çalışmaları BRSV'ye karşı aşılanmamış hayvanlardan alınan kan serumu örnekleriyle yapılmıştır. Bu tez çalışmasında aşılanmamış buzağı ve genç sığırlardan alınan 97 kan serumu örneğinden 33 örnek (%34) BRSV antikorları yönünden pozitif olarak saptanmıştır. Bu değer ülkemizde daha önce tespit edilen seropozitiflik değerlerine göre düşüktür.

Bu çalışmada, aşılanmış buzağı ve genç sığırlardan alınan 65 kan serumu örneğinden 43 örnekte (%66) BRSV antikoru saptanmıştır. Aşılı hayvanlarda saptanan bu pozitifliğin çoğunluğu aşı sonucu oluşan antikorlardan kaynaklandığı düşünülmektedir. Aşılı hayvanlarda saptanan BRSV antikorlarının aşıdan mı yoksa infeksiyon sonucu mu oluştuğunun saptanabilmesi için çift serum örneği alınması ve serokonversiyon oluşup oluşmadığına bakılması gerekmektedir. Bu tez çalışmasında aşılı ve aşısız hayvanlardan sadece tek serum örneği alınarak seropozitifliğin incelenmesi planlandı, serokonversiyon çalışması hedeflenmemiştir.

BRSV tanısı ve moleküler araştırmalarda real time RT-PCR ve RT-PCR sık kullanılmaktadır (Klem ve ark., 2014; Jia ve ark., 2021). RT-PCR, amplifikasyonun görülebilmesi için jel gerektirmesi, özgüllük ve duyarlılık problemleri nedeniyle çabuk tanıdan çok sekans analizlerinde sık kullanılan bir yöntem olmasına karşın prob temelli real time RT-PCR hızlı tanıda kullanılan özgül ve duyarlı bir yöntemdir. Bu nedenle prob temelli real time RT-PCR hem bu çalışmada hem de birçok araştırıcı tarafından BRSV pozitif hayvanların saptanması ve sürülerde hızlı taramalarının yapılması amacıyla kullanılmıştır (Willoughby ve ark., 2008; Thonur ve ark., 2012; Nefedchenko ve ark., 2020). Bu sayede sürüden ayrı tutulması gereken hayvanlar erken dönemde saptanabilmekte ve virusun diğer hayvanlara bulaşması engellenebilmektedir. Mevcut çalışmada, Boxus ve arkadaşları (2005) tarafından tasarlanan ve kullanılan primerler ve prob kullanılarak prob temelli real time RT-PCR kullanılmıştır. Boxus ve arkadaşlarının (2005) bildirdiği sonuçlar ve bu çalışmanın verilerine göre kullanılan yöntemin BRSV-RNA'sını saptamada başarılı olduğu görülmüştür.

Real time RT-PCR ile yapılan çalışmalarda, hedef gene yönelik primer ve prob seçiminin özgüllük ve duyarlılık açısından önemli olduğu bildirilmiştir (Timsit ve ark., 2010). BRSV-F ve BRSV-G geni hedef alınarak yapılan real time RT-PCR çalışmaları mevcuttur (Hakhverdyan ve ark., 2005;Selim ve Gaede, 2013), ancak BRSV-N geni daha değişmez (conserved) bir gen olduğu için özellikle tarama testlerinde BRSV-N genine yönelik primerler ve probun kullanılması önerilmektedir (Boxus ve ark., 2005; Willoughby ve ark., 2008; Nefedchenko ve ark., 2020). Bu nedenle bu çalışmada real time RT-PCR için BRSV-N geni hedeflenmiştir. Primerlerin ve probun BRSV için spesifikliği Gen Bankası'ndan alınan sekanslar kullanılarak SNAPGene programıyla analiz edildikten sonra ve optimizasyon çalışmaları yapıldıktan sonra çalışmalara başlanmıştır. Testin saptama limitini görebilmek için sahadan saptanan pozitif örnek ile yaptığımız 10 katlı dilusyon çalışmalarında 10^{-4} dilusyonda BRSV-RNA amplifikasyonu/eğri saptanmıştır.

Real time PCR ile farklı ülkelerde yapılan saptama çalışmalarında düşük ve yüksek saptama değerleri elde edilmiştir (Klem ve ark., 2014; Studer ve ark., 2021). Bu çalışmalarda çoğunlukla nazal ve orofarengeal svablar, bronkoalveolar sıvı ve akciğer incelenmiştir. Bu tez çalışmasında da canlı hayvanlardan nazal/orofarengeal svab, ölü hayvanlardan ise akciğer dokusu incelenmiştir. Bu tez çalışmasında, 277 nazal/orofarengeal svab ve 37 akciğer BRSV RNA saptanması amacıyla real time RT-PCR ile incelenmiştir. Svabların 10 tanesinde (%3.6) ve akciğerlerin 4 tanesinde (%10.8) BRSV-RNA saptanmıştır.

Avrupa ülkelerinde BRSV sıklığının real time RT-PCR ile belirlenmesine yönelik pek çok çalışma bulunmaktadır. İtalya'da 2020 yılında yapılan bir çalışmada solunum yolu hastalığı belirtisi gösteren ve BRSV'ye karşı aşılanmamış sığırlardan nazal/orofarengeal svab ve bronkoalveolar lavaj örneği, hastalığa bağlı ölüm şekillenen sığırlardan nekropsi sonrası akciğer örneği alınmıştır. Toplam 35 hayvandan alınan örnekler real time RT-PCR ile incelenmiştir. Alınan tüm nazal/orofarengeal svab ve bronkoalveolar lavaj ve akciğer örnekleri BRSV yönünden pozitif olarak tespit edilmiştir (Giammarioli ve ark., 2020). Fransa' dan Güney İtalya'ya nakledilen 231 sığırdan orofarengel svablar alınarak BRDC hastalığını oluşturan etkenler yönünden tarama yapılmıştır. Alınan 138 orofarengeal sürüntüden 20 tanesinin (%14.5) real time RT-PCR sonucu BRSV pozitif olarak bildirilmiştir (Pratelli ve ark., 2021). Belçika'da yapılan bir çalışmada, 2016-2018 yılları arasında kış aylarında solunum sistemi bozukluğu gösteren 128 sığırdan bronkoalveolar sıvı örnekleri alınmıştır. Alınan örnekler real time RT-PCR ile BRSV yönünden araştırılmış ve örneklerde %29.4 oranında pozitiflik bulunmuştur (Pardon ve ark.,2020). Kuzey Avrupa ülkesi olan İsveç'te 2021 yılında yapılan bir çalışmada, mezbahadaki sığırlardan nazal svablar alınmış ve BRSV yönünden araştırılmıştır. Toplam 764 nazal svabın 16 tanesinde (%21) BRSV-RNA'sı saptanmıştır (Studer ve ark., 2021). Diğer Kuzey Avrupa ülkesi olan Norveç'te 2014 yılında yapılan bir çalışma ile sığır sürülerinde görülen solunum sistemi hastalıklarında BRSV'nin etiyolojik rolü real time RT-PCR ile araştırılmış ve sığırlarda görülen 21 solunum yolu infeksiyonu salgınının 18'inin (%86) BRSV kaynaklı olduğu saptanmıştır (Klem ve ark., 2014). Avrupa'daki bu çalışmaların verileri ile tez çalışmasında elde edilen veriler karşılaştırıldığında tez çalışmasında daha düşük pozitiflik saptandığı dikkat çekmektedir. Bunun nedeni çalışmada örnek alınan hayvanların bir kısmının aşılı olmasından kaynaklanabileceği gibi ülkemizde BRSV saçımı ve sirkülasyonu düşük düzeyde seyrediyor olabileceğini düşündürmektedir.

İngiltere ve ABD'de BRSV sıklığının real time RT-PCR ve RT-PCR ile tespitine yönelik çalışmalar bulunmaktadır. İngiltere'de 2012 yılında yapılan bir çalışmada BRDC hastalığını oluşturan etkenlerin görülme sıklığı araştırılmıştır. Toplanan akciğer, nazal svab ve bronkoalveolar lavaj örnekleri RT-PCR ile incelenmiştir. Toplam 541 örnekten 28 örnekte BRSV-RNA'sı saptanmıştır (Thonur ve ark., 2012).

ABD'de Mayıs 2015-Temmuz 2016 yıllarında yapılan bir taramada, sığırlarda solunum yolu hastalıklarına neden olan etkenler araştırılmıştır. Toplam 3,215 nazal/ofarengeal svab örneğinin real time RT-PCR ile analizi sonucunda 122 örnekte (%3.81) BRSV saptanmıştır (Lubbers ve ark., 2017). Bu değer bu tez çalışmasında saptanan değere yakındır. ABD'de 2015

yılında yapılan başka bir çalışmada, 114 nazal svab ve 7 nekropsi sonrası akciğer numunesi olmak üzere toplam 121 örnek real time RT-PCR ile BRSV varlığı yönünden araştırılmış ve 11 örnek(%9.1) BRSV pozitif olarak bildirilmiştir (Fulton ve ark., 2016).

Ülkemize komşu ülkelerden Irak'ta yapılan bir çalışmada 2017-2018 yılları arasında farklı ırk ve yaş grubuna sahip sığırlardan alınan nazal svablarda BRSV varlığı RT-PCR ile incelenmiş ve 50 svabtan %37.31'i BRSV yönünden pozitif bulunmuştur (Hussain ve ark., 2019). Diğer bir komşu ülkemiz olan İran'da 2015 yılında yapılan bir taramada 384 serum örneğinin real time RT-PCR ile analizi sonucunda 200 (%78.12) serum örneği BRSV pozitif olarak bulunmuştur (Tajbakshs ve ark., 2015).

Ülkemizde real time RT-PCR veya RT-PCR ile yapılan çalışmalarda, BRSV RNA pozitifliği açısından farklı değerler bulunmuştur (Timurkan ve ark. 2019; Yazıcı ve ark.,2020; İnce ve ark., 2022). Erzurum'da 2018 yılında yapılan bir çalışmada bölgedeki işletmelerde bulunan sığırlardan örnekler alınmıştır. Sığırlardan 28 akciğer numunesi ve 127 burun svabı olmak üzere toplam 155 örnek toplanmıştır. Örnekler RT-PCR ile analiz edilmiş ve 2 nazal svab BRSV pozitif olarak tespit edilmiştir Akciğerlerde ise pozitiflik saptanmamıştır (Timurkan ve ark. 2019). Bu tez çalışmasında nazal/orofarengeal svab ve akciğer örneklerinde saptanan pozitiflik daha yüksektir. Aralık 2018 ile Ocak 2019 tarihleri arasında Samsun ilindeki şiddetli solunum yolu infeksiyonu ve pnömoni sonucu ölen 3 sığırdan nekropsi sonrası alınan akciğer örneklerinde BRSV varlığı real time RT-PCR ve nested RT-PCR ile araştırılmış ve 3 örnek BRSV RNA yönünden pozitif bulunmuştur (Yazıcı ve ark., 2020). Bu tez çalışmasında incelenen 37 akciğer örneğinden 4 tanesi BRSV pozitiftir. Afyonkarahisar ve Uşak illerimizde 2022 yılında yapılan bir çalışmada 21 burun svabı toplanmış ve BRSV yönünden real time RT-PCR ile analiz edilmiştir. Alınan 21 burun svabının 2'sinde BRSV-RNA tespit edilmiştir (İnce ve ark., 2022). Bu çalışmada elde edilen pozitiflik bu tez çalışmasında elde edilen pozitifliğe göre daha yüksektir. Ülkemizde elde edilen düşük ve yüksek pozitiflik değerleri örnek alınan hayvanların yaşına, aşılı aşısız olmalarına, klinik durumlarına (örnek alma zamanı) ve örneklerin incelenmesi sırasındaki etkileyen faktörlere bağlı olabileceği gibi virus sirkülasyonu farklılıkları nedeniyle coğrafik nedenlerden de kaynaklanabilir.

Bu tez çalışmasında ELISA testi ile seropozitif olduğu saptanan 43 aşılı hayvana ait nazal/orofarengeal svab örneği real time RT-PCR ile incelendiğinde 2 örnekte BRSV-RNA tespit edilmiştir. Buna karşın ELISA testi ile seropozitif olduğu saptanan 33 aşısız hayvana ait nazal/orofarengeal svab örneği real time RT-PCR ile incelendiğinde 6 örnekte BRSV-RNA

saptanmıştır. Her ne kadar bu sonuçlar oransal olarak aşısız hayvanlarda daha fazla BRSV-RNA saptandığını gösterse de aşılı ve aşısız hayvanlardaki BRSV-RNA saptanma ilişkisi istatistiki olarak önemsiz bulunmuştur.

BRSV ile ilgili sekans analizi çalışmaları tüm genoma yönelik ya da belirli bir genin tamamı ya da bir kısmını hedefleyen araştırmalar tarzındadır. Tüm genom analizleri için son yıllarda yeni nesil dizileme teknikleri kullanılmaktadır. Hedef genin tamamı veya bir kısmının sekans analizi için BRSV-F geni (Sarmiento-Silva ve ark., 2012; Timurkan ve ark., 2019), BRSV-N geni (Bertolotti ve ark., 2018; Giammarioli ve ark., 2020) hedeflenerek çalışmalar yapılmıştır ancak BRSV-G geninde oluşan mutasyonlar daha fazla olduğu için BRSV-G geninin sekanslanmasına yönelik çalışmalar daha fazladır (Hacıoğlu ve ark., 2019; Jia ve ark., 2021; Kumagai ve ark., 2021). BRSV-G geni ile yapılan çalışmalarda çoğunlukla Bidokthi ve arkadaşlarının (2012) tasarladığı primerlerin kullanıldığı görülmektedir. Bu nedenle bu tez çalışmasında, BRSV-G geninin sekans analizi için adı geçen primerler kullanılmıştır ve bu primerlerin spesifikliği Gen Bankası'ndan alınan sekanslar kullanılarak SNAPGene programıyla analiz edildikten ve optimizasyon çalışmaları yapıldıktan sonra çalışmalara başlanmıştır.

BRSV-F ve BRSV-G geni ile yapılan filogenetik çalışmalar sonucu genotipik olarak birbirinden farklı toplam 10 subgrup bildirilmiştir (Valarcher ve ark., 2000; Kresic ve ark., 2018; Kumagai ve ark., 2021). BRSV Subgrup I BRSV'nin ilk izolasyonundan 1980'li yılların başına kadar tespit edilen genotipleri içermektedir (Paccaud ve Jacquier, 1970; Inaba ve ark., 1972; Stott ve Taylor, 1985). BRSV Subgrup I benzeri dizilme sahip genotip en son Belçika'da 1997 yılında bildirilmiştir (Prozzi ve ark., 1997) ve 2000'li yıllardan sonra Subgrup I benzeri genotipe rastlanmamıştır (Valentova ve ark., 2005). Subgrup II Danimarka, İsveç, Norveç gibi kuzey Avrupa ülkelerinde saptanan genotipleri içermektedir (Valarcher ve ark., 2000; Valentova ve ark., 2005) ve Japonya'da tespit edilen BRSV genotiplerinin bir kısmının de Subgrup II'ye ait olduğu bildirilmiştir (Valarcher ve ark., 2000). Son zamanlarda Subgrup II genotiplerinin Norveç'te (Klem ve ark., 2014) ve Japonya'da (Kumagai ve ark., 2021) sirküle olduğu bildirilmiştir. Ülkemizde saptanan suşların da yer aldığı Subgrup III ağırlıklı olarak ABD'den bildirilen genotipleri içermektedir (Valarcher ve ark., 2000; Mitra ve ark., 2016). Yapılan son çalışmaların verilerine göre subgrup III'e ait genotiplerin ülkemizde (İnce ve ark., 2022) ve ABD'de (Mitra ve ark., 2016) sirküle olduğu bulunmuştur. Subgrup IV Valarcher ve arkadaşlarının 2000 yılında yaptığı çalışma ile IA ve IB şeklinde iki alt sınıfa ayrılmıştır. Subgrup IV IA 1971 ve 1976 yılında İngiltere'de izole edilen Dorset ve Snook genotiplerini

kapsarken, IB ise 1980'li yıllarda Hollanda'da izole edilen BRSV genotiplerini içermektedir (Valarcher ve ark., 2000). BRSV Subgrup V ve VI Belçika ve Fransa'nın da içinde bulunduğu batı Avrupa ülkelerinde tespit edilmiştir (Valarcher ve ark., 2000; Valentova ve ark., 2005). Son yıllarda batı Avrupa'da saptanan BRSV genotipleri genellikle Subgrup V ve Subgrup VI kapsamındadır (Valentova ve ark., 2005). Hırvatistan'da 2018'de yapılan bir çalışmada BRSV-G geni hedeflenerek yapılan moleküler testler ve filogenetik analizler neticesinde yeni alt grupların bulunduğu bildirilmiştir (Kresic ve ark., 2018). Bu durumda, daha önceki yıllarda 6 farklı subgrup olan kategorizasyona 2 farklı subgrup (VII ve VIII) eklenmiştir (Kresic ve ark., 2018). Hırvatistan'da yapılan çalışmalar sonucu tespit edilen Subgrup VII ve VIII genotipleri aynı dönemde izole edilen ve filogenetik analizleri tamamlanan İtalya'da saptanan genotiplerle benzer bulunmuştur (Bertolotti 2018). Kumagai ve arkadaşlarının(2021) BRSV-G genini hedef alan primerler ile yaptığı filogenetik çalışmalar sonucu 2 farklı subgrup daha eklenerek (IX, X) BRSV toplam 10 farklı subgrup şeklinde güncel halini almıştır.

Bu tez çalışmasında BRSV-G genini hedef alan primerler kullanılarak 277 nazal/orofarengeal svab ve 37 akciğer örneği RT- PCR ile analiz edilmiştir. RT-PCR sonucu 4 nazal/orofarengeal svab ve 1 akciğer örneği pozitif olarak saptanmıştır. Pozitif örneklerin sekans analizi forward ve reverse şeklinde çift taraflı olarak ticari firmaya yaptırıldıktan sonra filogenetik analizler yapılarak Trakya bölgesi ve Uşak ilimizde sirküle olan BRSV genotipleri ortaya konulmuştur. Aşağıda açıklandığı gibi ülkemizde saptanan diğer genotiplerle karşılaştırılmış ve ülkemizdeki genotiplerle benzer olduğu bulunmuştur.

Ülkemizde 2019 yılında Eskişehir'de yapılan bir çalışmada 2 akciğer örneği BRSV yönünden pozitif olarak tespit edilmiştir. Pozitif olduğu saptanan akciğer numunelerinin BRSV-G geni kodlayan gen bölgesi hedef alınarak yapılan filogenetik analizleri sonucu Subgrup III'e ait olduğu bildirilmiştir (Hacıoğlu ve ark., 2019). Bu tez çalışmasında akciğerde saptanan BRSV ile %97.98 oranında genotipik benzerlik bulunmuştur.

Ülkemizde aynı yıl (2019) Erzurum'da yapılan bir çalışmada 127 nazal svab ve 28 akciğer örneği BRSV-F genini hedefleyen primerler kullanılarak RT-PCR ile analiz edilmiştir. Analiz sonucu 2 nazal svab pozitif olarak saptanırken akciğer örneklerinde pozitiflik tespit edilememiştir. RT-PCR sonucu pozitif olarak tespit edilen nazal svab örneklerinin sekans ve filogenetik analizleri sonucu Subgrup III içerisinde yer aldığı bildirilmiştir (Timurkan ve ark., 2019). Bu veriler Gen Bankası'na bildirilmediği için tez çalışmasında saptanan genotiplerle karşılaştırılamamıştır.

Ülkemizde 2022 yılında Uşak'ta yapılan diğer bir çalışmada ise benzer şekilde BRSV-G geni hedeflenerek RT-PCR çalışmaları ve sekans analizleri yapılmıştır. Sığırlardan alınan 21 burun svabından 2 örnek RT-PCR ile pozitif olarak saptanmıştır ve dizi analizleri sonucu örneklerin Subgrup III ile benzerlik gösterdiği bildirilmiştir. Saptanan bu genotipler bu tez çalışmasında BRSV pozitif olarak saptanan nazal/orofarengeal svab örneklerindeki BRSV genotiplerine %89-95 oranında benzer bulunmuştur (İnce ve ark., 2022).

Bu çalışmada saptanan 5 adet BRSV'nin sekans ve filogenetik analizleri verilerine göre genotiplerin BRSV Subgrup III'e ait olduğu ve diğer ülkelerde saptanan BRSV genotiplerine benzer olduğu ve özellikle Amerika'da bildirilen genotiplerle (Stine ve ark., 1997) ve Çekya'da bildirilen genotiplerle (Valentova ve ark., 2005) %90-93 oranında en yüksek benzerlik gösterdiği görülmüştür. Bu tez çalışmasında saptanan genotipler ile ülkemizde bildirilen genotiplerden bazıları arasında ise %98'e yakın benzerlik bulunmuştur (Hacıoğlu ve ark., 2019).

Orthopneumovirus genusunda yer alan HRSV ile BRSV arasında yakın genetik ve antijenik ilişki serolojik ve moleküler testler ile tespit edilmiştir (Buchholz, 2000; Meyerholz ve ark., 2004; Sacco ve ark., 2012). Sekans analizleri ve filogenetik çalışmalar sonucunda BRSV ile HRSV arasında %81 genetik benzerlik saptanmıştır ve HRSV-G proteini ve BRSV-G proteini amino asit dizilimleri %21-29 oranında benzerdir. (Rima ve ark., 2017).

BRSV ve HRSV infeksiyonlarının türlerdeki epidemiyolojisi ve patogenezi de benzemektedir. Her iki virus da her yaş grubunda infeksiyon oluşturmakla birlikte genellikle erken yaş dönemlerinde şiddetli infeksiyonlar oluşturmaktadır. Buzağılarda 0-6 ay, çocuklarda ise 0-5 yaş infeksiyon şiddetinin en yüksek olduğu dönemdir. Yetişkinlerde genellikle hafif seyirli infeksiyonlar şekillenmektedir (Thonur ve ark., 2012; Taylor, 2017). Ilıman iklime sahip ülkelerde, iki virus da daha çok sonbahar ve kış aylarında salgın oluşturmaktadır (Van der Poel ve ark., 1995). HRSV ve BRSV infeksiyonlarına bağlı oluşan patolojik etkiler de benzerdir. Bronşiyal epitelyal nekroz, paranşimal inflamasyon, lenfositik bronşiolit, alveolar eksudasyon görülen ortak patolojik etkilerdir (Woolums ve ark., 1999; Meyerholz ve ark., 2004). Bu bilgiler varlığında, bu tez çalışmasında RT-PCR sonucu pozitif olarak tespit edilen ve sekans analizleri sonucunda BRSV-G geni dizilimleri saptanan örnekler, Gen Bankası'na bildirilen 60 farklı HRSV-A G geni dizilimi ve 65 farklı HRSV-B G geni dizilimi ile Geneious Prime programı kullanılarak karşılaştırıldı ve benzerlik yüzdeleri belirlendi. RT-PCR ile pozitif olarak saptadığımız örnekler HRSV-A G geni dizilimleri ile %42-%48 ve HRSV-B G geni dizilimleri ile %42-%50 benzerlik göstermektedir. Bu benzerlik RSV ile ilgili veteriner hekimlik ve tıp

alanındaki multidisipliner çalışmaların katkı sağlayacağını düşündürmektedir. Yapılan bir çalışmada, HRSV tanısı için kullanılan hızlı tanı test kitlerinin BRSV hızlı tanısı için de kullanılmasının elverişli olduğu bildirilmiştir (Socha ve Rola, 2011).

BRSV izolasyonu tanısal yöntemden çok araştırma, sahada sirküle olan suşların aşı suşu olarak kullanılması ve arşiv oluşturmak amacıyla yapılmaktadır (Arns ve ark., 2003). Bu kapsamda bu çalışmada da RT-PCR ile pozitif bulunan hayvanlarda saptanan ve sahada sirküle olan farklı genotiplerin izolasyonu hedeflenmiştir. Günümüze kadar yapılan çalışmaların sonuçlarına göre BRSV izolasyonunun çok pasaj gerektirmesi, hücre spesifikliği-tutunma ve adaptasyon zorluklarından dolayı zor olduğu bildirilmiştir (Socha ve Rola, 2011). Bu çalışmalarda izolasyon için örnekteki virus yükü, örneğin tazeliği, örnek alınan hayvanın klinik durumu ve ölmüş ise patolojisi (pnömoni) virus izolasyonunu etkilediği vurgulanmıştır (Flores ve ark., 2000; Arns ve ark., 2003; Klem ve ark., 2019). Bu tez çalışmasında izolasyon için alınan örneklerin klinik olarak solunum yolu hastalığı belirtileri gösteren ve ölmüş ise akciğer lezyonları (pnömoni) olmasına dikkat edildi. Keza alınan örneklerin tazeliğine özen gösterildi ve taşınma esnasındaki etkileyecek faktörler minimuma indirildi.

BRSV'nin hücre kültürlerinde izolasyonu için sığır kökenli birçok hücre kullanılabilmektedir. Bunlar fötal buzağı trakea hücresi, fötal buzağı akciğer hücresi, fötal buzağı böbrek hücresi, sığır böbrek, testis, tiroid, timüs, duedonum ve rektum hücreleridir. Bunların dışında embriyonik tavuk fibroblast hücresi, hamster akciğer ve böbrek hücresi, Afrika yeşil maymun böbrek hücresi (Vero) ile HeLa hücreleri de BRSV izolasyonunda kullanılan hücrelerdir (Valarcher ve ark.,2001; Spilki ve ark., 2006; Ellis ve ark., 2020). Ancak kolay temin edilmesi ve canlılığının devam ettirilmesinin diğer hücrelere göre daha kolay olması nedeniyle hem bu çalışmada hem de diğer çalışmalarda MDBK hücreleri kullanılmıştır (Sudaryatma ve ark., 2018; Jia ve ark., 2021). MDBK hücre külrürü ile yapılan çalışmalarda virus izolasyonu için canlı hayvanlardan nazal svab, orofarengeal svab, kan, bronkoalveolar lavaj (Tjrnehoj ve ark., 2003; Valarcher ve ark., 2003) ve ölmüş hayvanlardan da akciğer, lenf yumrusu, dalak ve karaciğer kullanılmıştır (Valarcher ve ark., 2001; Johnston ve ark., 2019; Yazici ve ark., 2020) Bu tez çalışmada da viral yükün fazla olduğu düşünülen solunum yolu hastalığı belirtileri olan hayvanlardan nazal/orofarengeal svablar ve ölen hayvanlardan akciğerler virus izolasyonu amacıyla kullanılmıştır.

Ülkemizde ve diğer ülkelerde BRSV'nin MDBK hücre kültüründe izolasyonu ile ilgili çalışmalar mevcuttur. Ülkemizde 2020 yılında, BRDC hastalığını oluşturan etkenlerin

izolasyonu ve identifikasyonu ile ilgili yapılan bir çalışmada; 133 nazal svab ve 60 adet akciğer örneğinde BRSV varlığı RT-PCR ile araştırılmış ve 5 adet svab örneği pozitif olarak saptanmıştır. Pozitif saptanan örneklerde, MDBK hücre kültürü kullanılarak virus izolasyon çalışmaları yapılmıştır ve bu amaçla yapılan 3 kör pasaj sonunda MDBK hücrelerinde herhangi bir CPE saptanmamıştır (Toker ve Yeşilbağ, 2021). Ülkemizde yapılan diğer bir virus izolasyon çalışmasında, RT-PCR ile BRSV RNA'sı tespit edilen 3 adet akciğer örneğinin MDBK hücre kültüründe virus izolasyon çalışmaları yapılmıştır. İnokulasyondan 72 saat sonra tüm akciğer örneklerine ait hücre kültürlerinde sinsityum ve hücre lizisi saptanmıştır (Yazıcı ve ark.,2020). BRDC hastalığını oluşturan etkenlerin hücre kültüründe izolasyonu ile ilgili yapılan diğer bir çalışmada, hastalık şüpheli hayvanlardan alınan nazal svab ve akciğer örneklerinden hazırlanan inokulumların MDBK hücre kültürüne inokulasyonunu takiben 3 kör pasaj yapılmıştır ve herhangi bir sitopatolojik etki saptanmamıştır (Mahmoud ve Salem, 2012). BRSV'nin izolasyonu ve identifikasyonu ile ilgili diğer bir çalışmada ise pnömoni bulguları gösteren 33 farklı hayvandan alınan BRSV şüpheli nazal/trakeal svablar MDBK hücre kültürüne inokule edilmiştir. Toplamda 20 kör pasaja kadar ulaşan çalışmaların ardından 33 örnekten yalnızca 1 svab örneğinin 9. kör pasajında sinsityum oluşumu tespit edilmiştir ve RT-PCR ile BRSV varlığı doğrulanmıştır (Arns ve ark., 2003).

Bu çalışmada toplam 4 hayvana ait 3 nazal/orofarengeal svab ve 1akciğer örneğinden MDBK hücre kültürüne 7'şer günlük inkübasyon periyodunu içerecek şekilde 3 kez kör pasaj işlemi uygulandı. Hücreler her inokülasyon ve pasajlamadan sonra CPE ve sinsityum oluşumu yönünden izlendi ve hiçbir hücre kültüründe CPE ve sinsityum oluşumu saptanmadı. Ayrıca hücre kültürlerinden alınan tüm hücre sıvıları real time RT-PCR ile de negatif bulundu. Bu çalışmada virusun izole edilememesinin nedeni örneğin alındığı hayvandaki viral yük, örnek alınma zamanı, taşıma ve virusun laboratuvar çalışmaları sırasında (dondurma-çözündürme) stabilitesini kaybetmesi ile ilgili olabilir. Virus izolasyonun başarısız olduğu çalışmalarda bu tür problemlerin olabileceği konusuna dikkat çekilmiştir (Toker ve Yeşilbağ, 2021).

BRSV infeksiyonlarının koruma, kontrol ve eradikasyon çalışmalarında biyogüvenlik ve aşı uygulamaları en sık kullanılan yöntemlerdir (Ellis ve ark., 2018; Stokstad ve ark., 2020). Bu çalışmada aşılı ve aşısız hayvanlarda BRSV sıkığını saptamak amacıyla alınan örnekler ELISA ve real time RT-PCR ile incelenmiştir. Elde edilen verilere göre aşılı hayvanlardaki antikor pozitifliği istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ve bu hayvanlarda BRSV-RNA tespit oranı aşısızlara göre daha düşüktür. Elde edilen veriler aşılamanın hastalıkla mücadeledeki önemini göstermektedir. Bu nedenle hem entegre çiftliklerde hem de halk elindeki küçük

işletmelerdeki sığırların aşılanmasında yarar vardır. Bu aşılamalarda özellikle canlı aşı yapılması durumunda maternal antikorların varlığı ve etkileşimi konusuna dikkat edilmelidir. Son zamanlarda ülkemizde de kullanıma giren intranazal aşıların maternal antikorlardan minimum etkilenmesi nedeniyle tercih edildiği bildirilmiştir (Marzo ve ark., 2021).

Sonuç ve Öneriler

- Aşılamalara rağmen Türkiye'nin Avrupa sınırı olan Trakya bölgesinde ve ülkemizin diğer bölgelerinde BRSV infeksiyonlarının devam etmesi nedeniyle BRSV infeksiyonlarına yönelik araştırmaların, aşılamaların ve eradikasyon çalışmalarının devam etmesinde yarar vardır.
- Bu çalışmada yürütülen ve halk elindeki küçük işletmelerde bulunan sığırların aşısız olduğu görülmüştür. Aşısız hayvanlarda BRSV infeksiyonları daha sık görüldüğü için bu hayvanları hem hastalıktan korumak hem de virus saçılımını engellemek için aşılama uygulamaları ve kontrol programları oluşturularak belirli bir program dahilinde hastalıkla mücadeleye dahil edilmesi gerekmektedir.
- Real time RT-PCR ile RT-PCR'a göre daha fazla sayıda pozitiflik saptanabilmektedir. Bu nedenle hızlı tanı amacıyla hem sensitivite hem de spesifite yönünden avantajlı olan prob temelli real time RT-PCR kullanılmasında yarar vardır.
- BRSV-N geninin BRSV-F genine göre daha değişmez bir gen olması nedeniyle virus saptama amacıyla real time RT-PCR çalışmalarında BRSV-N genini hedefleyen primerlerin ve probun kullanılması daha doğrudur.
- Virus izolasyonu için MDBK hücrelerine alternatif hücrelerin de izolasyon çalışmalarında denenmesinde yarar vardır
- Çalışmada sekanslama için kullanılan primerlerin bu konuda başarılı olduğunu ancak gelecek çalışmalarda yeni nesil sekanslama (NGS) tekniğinin kullanılarak tüm genom sekans analizlerinin yararlı olacağı kanısındayız.
- Yeni doğan buzağılarda BRSV infeksiyonlarının şiddeti nedeniyle üst solunum yollarındaki mukoza ilişkili lenfoid dokunun (MALT) ilk haftadan itibaren

gelişimini tamamlaması özelliğinden faydalanarak, doğumdan bir hafta sonra yeni doğanlara intranazal canlı aşılar uygulanmalıdır.

- Intranazal aşı sonrası hızlı bir aktif bağışıklığa sahip olan buzağı maternal antikorların aşı etkinliğini azaltıcı etkisi ortadan kalkıtığında parenteral yol ile aşılanarak uzun süreli koruycu etki sağlanmalıdır.
- Sığırların doğru ve güvenli bir şekilde transportu, stres faktörü oluşturmaması açısından oldukça kritiktir. Yeni gelen sığırların popülasyondan farklı bir ortamda izole edilmesi, BRSV yönünden negatif olduğunun tespiti sonrasında sürüye katılmalıdır.
- Havalandırma, iyi bakım ve beslenme koşulları popülasyonu hastalıktan korumada kritik önem taşır. Sürüler arası kontaminasyonu önlemek amacıyla, çoklu sürüler ile çalışan veteriner hekimlerin, teknikerlerin, hayvan bakıcı ve diğer görevli kişilerin kıyafet, ekipman ve ayakkabılarını değiştirmesi gereklidir.
- BRSV ve HRSV arasındaki benzerliğin, RSV ile ilgili veteriner hekimlik ve tıp alanındaki multidisipliner çalışmalarda, katkı sağlayacağı kanısındayız.

KAYNAKLAR

Akca, Y., I. Burgu, S. Gur ve S. Bilge Dagalp (2004). "A study on investigation of occurrence of some virus infection in Buffaloes in Turkey." Revue de Médecine Vétérinaire 155(5): 268-271.

Alansari, H., R. B. Duncan, J. C. Baker and L. N. Potgieter (1999). "Analysis of ruminant respiratory syncytial virus isolates by RNAse protection of the G glycoprotein transcripts." Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 11(3): 215-220.

Al Darraji, AM., RC. Cutlip, HD. Lehmkuhl, DL. Graham, JP Klug ve GH Frank (1982). "Experimental infection of lambs with bovine respiratory syncytial virus and Pasteurella haemolytica: clinical and microbiologic studies" American Journal of Veterinary Research (43):236- 240.

Alkan, F. (1997). "Sığırlarda viral nedenli solunum sistemi enfeksiyonlarinin seroepidemiyolojisi." Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 44(01).

Allan, G., F. McNeilly, I. Walker, J. Young, S. Fee, A. Douglas ve B. Adair (1998). "Serological evidence for pneumovirus infections in pigs." Veterinary Record 142(1): 8-12.

Antonis, A. F., E. A. Claassen, E. J. Hensen, R. J. De Groot, J. D. de Groot-Mijnes, R. S. Schrijver ve R. G. Van Der Most (2006). "Kinetics of antiviral CD8 T cell responses during primary and post-vaccination secondary bovine respiratory syncytial virus infection." Vaccine 24(10): 1551-1561.

Antonis, A. F., M. C. de Jong, W. H. van der Poel, R. G. van der Most, N. Stockhofe-Zurwieden, T. Kimman ve R. S. Schrijver (2010). "Age-dependent differences in the pathogenesis of bovine respiratory syncytial virus infections related to the development of natural immunocompetence." Journal of General Virology 91(10): 2497-2506.

Arbiza, J., G. Taylor, J. A. López, J. Furze, S. Wyld, P. Whyte, E. J. Stott, G. Wertz, W. Sullender ve M. Trudel (1992). "Characterization of two antigenic sites recognized by neutralizing monoclonal antibodies directed against the fusion glycoprotein of human respiratory syncytial virus." Journal of General Virology 73(9): 2225-2234.

Arns, C., J. Campalans, S. Costa, H. Domingues, R. D'Arce, R. Almeida ve L. Coswig (2003). "Characterization of bovine respiratory syncytial virus isolated in Brazil." Brazilian Journal of Medical and Biological Research 36(2): 213-218.

Baker, J., T. Ames ve R. Markham (1985). "Serologic studies of bovine respiratory syncytial virus in Minnesota cattle." American Journal of Veterinary Research 46(4): 891-892.

Baker, J. C., J. A. Ellis ve E. G. Clark (1997). "Bovine respiratory syncytial virus." Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice 13(3): 425-454.

Baldridge, P. ve L. B. Senterfit (1976). "Persistent infection of cells in culture by respiratory syncytial virus." Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine 151(4): 684-688.

Bangham, C. R. ve A. J. McMichael (1986). "Specific human cytotoxic T cells recognize B-cell lines persistently infected with respiratory syncytial virus." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 83(23): 9183-9187.

Bastien, N., G. Taylor, L. H. Thomas, S. G. Wyld, C. Simard ve M. Trudel (1997). "Immunization with a peptide derived from the G glycoprotein of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) reduces the incidence of BRSV-associated pneumonia in the natural host." Vaccine 15(12-13): 1385-1390.

Belknap, E. B., D. K. Ciszewski ve J. C. Baker (1995). "Experimental respiratory syncytial virus infection in calves and lambs." Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 7(2): 285-298.

Belshe, R. B., L. S. Richardson, W. T. London, D. L. Sly, J. H. Lorfeld, E. Camargo, D. A. Prevar ve R. M. Chanock (1977). "Experimental respiratory syncytial virus infection of four species of primates." Journal of Medical Virology 1(3): 157-162.

Bendelja, K., V. Vojvoda, N. Aberle, J. Cepin-Bogovic, A. Gagro, G. Mlinaric-Galinovic ve S. Rabatic (2010). "Decreased Toll-like receptor 8 expression and lower TNF-alpha synthesis in infants with acute RSV infection." Respiratory Research 11(1): 1-10.

Bertolotti, L., M. Giammarioli ve S. Rosati (2018). "Genetic characterization of bovine respiratory syncytial virus strains isolated in Italy: evidence for the circulation of new divergent clades." Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 30(2): 300-304.

Bidokhti, M. R., M. Tråvén, A. Ohlson, B. Zarnegar, C. Baule, S. Belák, S. Alenius ve L. Liu (2012). "Phylogenetic analysis of bovine respiratory syncytial viruses from recent outbreaks in feedlot and dairy cattle herds." Archives of Virology 157(4): 601-607.

Blodörn, K., S. Hägglund, J. Fix, C. Dubuquoy, B. Makabi-Panzu, M. Thom, P. Karlsson, J.-L. Roque, E. Karlstam ve J. Pringle (2014). "Vaccine safety and efficacy evaluation of a recombinant bovine respiratory syncytial virus (BRSV) with deletion of the SH gene and subunit vaccines based on recombinant human RSV proteins: N-nanorings, P and M2-1, in calves with maternal antibodies." PLoS One 9(6): e100392.

Blodörn, K., S. Hägglund, D. Gavier-Widen, J.-F. Eléouët, S. Riffault, J. Pringle, G. Taylor ve J. F. Valarcher (2015). "A bovine respiratory syncytial virus model with high clinical expression in calves with specific passive immunity." BMC Veterinary Research 11(1): 1-14.

Boxus, M., C. Letellier ve P. Kerkhofs (2005). "Real Time RT-PCR for the detection and quantitation of bovine respiratory syncytial virus." Journal of Virological Methods 125(2): 125-130.

Boysen, P. ve A. K. Storset (2009). "Bovine natural killer cells." Veterinary Immunology and Immunopathology 130(3-4): 163-177.

Brennan, M. L. ve R. M. Christley (2013). "Cattle producers' perceptions of biosecurity." BMC Veterinary Research 9(1): 1-8.

Brodersen, B. W. (2010). "Bovine respiratory syncytial virus." Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice 26(2): 323-333.

Brown, H. R., N. L. Goller, R. D. Rudelli, J. Dymecki ve H. M. Wisniewski (1989). "Postmortem detection of measles virus in non-neural tissues in subacute sclerosing panencephalitis." Annals of Neurology 26(2): 263-268.

Bryson, D. (1993). "Necropsy findings associated with BRSV pneumonia." Veterinary Medicine 88(9):894.

Buchholz, U. J., S. Finke ve K.-K. Conzelmann (1999). "Generation of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) from cDNA: BRSV NS2 is not essential for virus replication in tissue culture, and the human RSV leader region acts as a functional BRSV genome promoter." Journal of Virology 73(1): 251-259.

Buchholz, U. J., H. Granzow, K. Schuldt, S. S. Whitehead, B. R. Murphy ve P. L. Collins (2000). "Chimeric bovine respiratory syncytial virus with glycoprotein gene substitutions from human respiratory syncytial virus (HRSV): effects on host range and evaluation as a live-attenuated HRSV vaccine." Journal of Virology 74(3): 1187-1199.

Bueno, S. M., P. A. González, R. Pacheco, E. D. Leiva, K. M. Cautivo, H. E. Tobar, J. E. Mora, C. E. Prado, J. P. Zúñiga, J. Jiménez, C. A. Riedel ve A. M. Kalergis (2008). "Host immunity during RSV pathogenesis." International Immunopharmacology 8(10): 1320-1329.

Bugarski, D., T. Petrović, D. Milanov ve S. Lazić (2011). "Seroprevalence of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) in Vojvodina [Serbia]." Arhiv Veterinarske Medicine 4(2):23-29.

Bukreyev, A., B. R. Murphy ve P. L. Collins (2000). "Respiratory syncytial virus can tolerate an intergenic sequence of at least 160 nucleotides with little effect on transcription or replication in vitro and in vivo." Journal of Virology 74(23): 11017-11026.

Burgu, I., A. Toker, Y. Akca ve F. Alkan (1990). "A seroepidemiologic study of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) in Turkey." DTW. Deutsche Tierarztliche Wochenschrift 97(2): 88-89.

Callan, R. J. ve F. B. Garry (2002). "Biosecurity and bovine respiratory disease." Veterinary Clinics: Food Animal Practice 18(1): 57-77.

Castleman, W. L., S. K. Chandler ve D. O. Slauson (1985). "Experimental bovine respiratory syncytial virus infection in conventional calves: ultrastructural respiratory lesions." American Journal of Veterinary Research 46(3): 554-560.

Caswell, J. L., J. Hewson, Đ. Slavić, J. DeLay ve K. Bateman (2012). "Laboratory and postmortem diagnosis of bovine respiratory disease." Veterinary Clinics: Food Animal Practice 28(3): 419-441.

Chanock, R. ve L. Finberg (1957). "Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA). II. Epidemiologic aspects of infection in infants and young children." American Journal of Hygiene 66(3): 291-300.

Chen, T. T., I. Watanabe, W. Zeman ve J. Mealey, Jr. (1969). "Subacute sclerosing panencephalitis: propagation of measles virus from brain biopsy in tissue culture." Science 163(3872): 1193-1194.

Citterio, C., C. Luzzago, M. Sala, G. Sironi, P. Gatti, A. Gaffuri ve P. Lanfranchi (2003). "Serological study of a population of alpine chamois (Rupkapra rrupkapra) affected by an outbreak of respiratory disease." Veterinary Record 153(19): 592-596.

Crawshaw, T. R., I. H. Brown, S. C. Essen ve S. C. Young (2008). "Significant rising antibody titres to influenza A are associated with an acute reduction in milk yield in cattle." The Veterinary Journal 178(1): 98-102.

Çabalar, M. ve K. Can-Şahna (2000). "Doğu ve güneydoğu anadolu bölgesinde süt sığırlarında parainfluenza virus-3, bovine herpes virus-1 ve respiratory syncytial virus enfeksiyonlarının seroepidemiyolojisi." Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 11(2): 101-105.

Delforge, J. ve N. Zygraich (1978). "Field evaluation of a live attenuated bovine respiratory syncytial virus vaccine." Annales de Medecine Veterinaire 122(6):545-554.

Dixit, V., M. Marahrens ve N. Parvizi (2001). "Transport stress modulates adrenocorticotropin secretion from peripheral bovine lymphocytes." Journal of Animal Science 79(3): 729-734.

Doggett, J. E., D. Taylor-Robinson ve R. G. Gallop (1968). "A study of an inhibitor in bovine serum active against respiratory syncytial virus." Archiv fur die Gesamte Virusforsch 23(1): 126-137.

Duff, G. C. and M. L. Galyean (2007). "Board-invited review: recent advances in management of highly stressed, newly received feedlot cattle." Journal of Animal Science 85(3): 823-840.

Easton, A. J., J. B. Domachowske ve H. F. Rosenberg (2004). "Animal pneumoviruses: molecular genetics and pathogenesis." Clinical Microbiology Reviews 17(2): 390-412.

Eckardt-Michel, J., M. Lorek, D. Baxmann, T. Grunwald, G. M. Keil ve G. Zimmer (2008). "The fusion protein of respiratory syncytial virus triggers p53-dependent apoptosis." Journal of Virology 82(7): 3236-3249.

Ellis, J., N. Erickson, S. Gow, K. West, S. Lacoste ve D. Godson (2020). "Infection of calves with in-vivo passaged bovine parainfluenza-3 virus, alone or in combination with bovine respiratory syncytial virus and bovine coronavirus." Canadian Journal of Veterinary Research 84(3): 163-171.

Ellis, J., S. Gow, A. Berenik, S. Lacoste ve N. Erickson (2018). "Comparative efficacy of modified-live and inactivated vaccines in boosting responses to bovine respiratory syncytial

virus following neonatal mucosal priming of beef calves." The Canadian Veterinary Journal 59(12): 1311.

Ellis, J., L. Hassard ve P. Morley (1995). "Bovine respiratory syncytial virus-specific immune responses in calves after inoculation with commercially available vaccines." Journal of the American Veterinary Medical Association 206(3): 354-361.

Ellis, J. A. (2009). "Update on viral pathogenesis in BRD." Animal Health Research Reviews 10(2): 149-153.

Ellis, J. A. (2017). "How efficacious are vaccines against bovine respiratory syncytial virus in cattle?" Veterinary Microbiology 206: 59-68.

Ellis, J. A., S. P. Gow, S. Mahan ve R. Leyh (2013). "Duration of immunity to experimental infection with bovine respiratory syncytial virus following intranasal vaccination of young passively immune calves." Journal of the American Veterinary Medical Association 243(11): 1602-1608.

Elvander, M. (1996). "A study of bovine respiratory syncytial virus infections in Swedish cattle."

Englund, J. A. (1994). "Passive protection against respiratory syncytial virus disease in infants: the role of maternal antibody." The Pediatric Infectious Disease Journal 13(5): 449-453.

Farzinpour, M., K. Badiei, M. Pourjafar, M. Ghane ve Z. Karim (2016). "Antibody Tracing, Seroepidemiology and Risk Factors of Bovine Respiratory Syncytial Virus and Bovine Adenovirus-3 in Dairy Holstein Farms." İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 42(1): 5-10.

Feldman, S. A., S. Audet ve J. A. Beeler (2000). "The fusion glycoprotein of human respiratory syncytial virus facilitates virus attachment and infectivity via an interaction with cellular heparan sulfate." Journal of Virology 74(14): 6442-6447.

Ferella, A., M. S. P. Aguirreburualde, C. Margineda, N. Aznar, A. Sammarruco, M. J. D. Santos ve M. Mozgovoj (2018). "Bovine respiratory syncytial virus seroprevalence and risk factors in feedlot cattle from Córdoba and Santa Fe, Argentina." Revista Argentina de Microbiología 50(3): 275-279.

Flores, E. F., R. Weiblen, M. Medeiros, S. A. Botton, L. F. Irigoyen, D. Driemeier, L. F. Schuch ve M. Moraes (2000). "A retrospective search for bovine respiratory syncytial virus (BRSV) antigens in histological specimens by immunofluorescence and immunohistochemistry." Pesquisa Veterinária Brasileira 20: 139-143.

Fulton, R., J. d'Offay, C. Landis, D. Miles, R. Smith, J. Saliki, J. Ridpath, A. Confer, J. Neill ve R. Eberle (2016). "Detection and characterization of viruses as field and vaccine strains in feedlot cattle with bovine respiratory disease." Vaccine 34(30): 3478-3492.

Fulton, R. W., G. B. Rezabek, R. Grant, J. F. Ridpath ve L. J. Burge (2014). "Diverse outcomes of bovine viral diarrhea virus (BVDV) infections in a herd naturally infected during pregnancy-a case study." The Bovine Practitioner 48(2).

Furze, J. M., S. R. Roberts, G. W. Wertz ve G. Taylor (1997). "Antigenically distinct G glycoproteins of BRSV strains share a high degree of genetic homogeneity." Virology 231(1): 48-58.

Gaddum, R., S. Ellis, A. Willis, R. Cook, K. Staines, L. Thomas ve G. Taylor (1996). "Identification of potential CTL epitopes of bovine RSV using allele-specific peptide motifs from bovine MHC class I molecules." Veterinary Immunology and Immunopathology 54(1-4): 211-219.

Gaddum, R. M., R. S. Cook, J. M. Furze, S. A. Ellis ve G. Taylor (2003). "Recognition of bovine respiratory syncytial virus proteins by bovine CD8+ T lymphocytes." Immunology 108(2): 220-229.

Gershwin, L. J. (2012). "Immunology of bovine respiratory syncytial virus infection of cattle." Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases 35(3): 253-257.

Gershwin, L. J., M. L. Anderson, C. Wang, L. J. Berghaus, T. P. Kenny ve R. A. Gunther (2011). "Assessment of IgE response and cytokine gene expression in pulmonary efferent lymph collected after ovalbumin inhalation during experimental infection of calves with bovine respiratory syncytial virus." American Journal of Veterinary Research 72(1): 134-145.

Gershwin, L. J., R. A. Gunther, W. J. Hornof ve R. F. Larson (2008). "Effect of infection with bovine respiratory syncytial virus on pulmonary clearance of an inhaled antigen in calves." American Journal of Veterinary Research 69(3): 416-422.

Giammarioli, M., P. Mangili, A. Nanni, I. Pierini, S. Petrini, S. Pirani, P. Gobbi ve G. M. De Mia (2020). "Highly pathogenic Bovine Respiratory Syncytial virus variant in a dairy herd in Italy." Veterinary Medicine and Science 6(4): 740-745.

Goris, K., S. Uhlenbruck, C. Schwegmann-Wessels, W. Köhl, F. Niedorf, M. Stern, M. Hewicker-Trautwein, R. Bals, G. Taylor ve A. Braun (2009). "Differential sensitivity of differentiated epithelial cells to respiratory viruses reveals different viral strategies of host infection." Journal of Virology 83(4): 1962-1968.

Graham, D., J. McShane, K. Mawhinney, I. McLaren, B. Adair ve M. Merza (1998). "Evaluation of a single dilution ELISA system for detection of seroconversion to bovine viral diarrhea virus, bovine respiratory syncytial virus, parainfluenza-3 virus, and infectious bovine rhinotracheitis virus: comparison with testing by virus neutralization and hemagglutination inhibition." Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 10(1): 43-48.

Grell, S. N., U. Riber, K. Tjørnehøj, L. E. Larsen ve P. M. Heegaard (2005). "Age-dependent differences in cytokine and antibody responses after experimental RSV infection in a bovine model." Vaccine 23(26): 3412-3423.

Grissett, G. P., B. J. White ve R. L. Larson (2015). "Structured literature review of responses of cattle to viral and bacterial pathogens causing bovine respiratory disease complex." The Journal of Veterinary Internal Medicine 29(3): 770-780.

Groskreutz, D. J., M. M. Monick, T. O. Yarovinsky, L. S. Powers, D. E. Quelle, S. M. Varga, D. C. Look ve G. W. Hunninghake (2007). "Respiratory syncytial virus decreases p53 protein to prolong survival of airway epithelial cells." Journal of Immunology 179(5): 2741-2747.

Grubbs, S. T., S. A. Kania ve L. Potgieter (2001). "Prevalence of ovine and bovine respiratory syncytial virus infections in cattle determined with a synthetic peptide-based immunoassay." Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 13(2): 128-132.

Gunn, G., C. Heffernan, M. Hall, A. McLeod ve M. Hovi (2008). "Measuring and comparing constraints to improved biosecurity amongst GB farmers, veterinarians and the auxiliary industries." Preventive Veterinary Medicine 84(3-4): 310-323.

Guzman, E. ve G. Taylor (2015). "Immunology of bovine respiratory syncytial virus in calves." Molecular Immunology 66(1): 48-56.

Güdek, M. (2016). Aydın ili ve çevresindeki süt sığırcılığı işletmelerinde bovine respiratory syncytial virus (BRSV) enfeksiyonunun serolojik olarak araştırılması, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.

Hacıoğlu, İ. K., N. Coşkun, S. D. Yelken, S. Sevinc ve F. Alkan (2019). "Phylogenetic analysis of bovine respiratory syncytial virus from calves with respiratory disorders." Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 25(2).

Hägglund, S., K. Hu, K. Blodörn, B. Makabi-Panzu, A. L. Gaillard, K. Ellencrona, D. Chevret, L. Hellman, K. L. Bengtsson, S. Riffault, G. Taylor, J. F. Valarcher ve J. F. Eléouët (2014). "Characterization of an experimental vaccine for bovine respiratory syncytial virus." Clinical and Vaccine Immunology 21(7): 997-1004.

Hakhverdyan, M., S. Hägglund, L.-E. Larsen ve S. Belák (2005). "Evaluation of a single-tube fluorogenic RT-PCR assay for detection of bovine respiratory syncytial virus in clinical samples." Journal of Virological Methods 123(2): 195-202.

Harris, J. ve D. Werling (2003). "Binding and entry of respiratory syncytial virus into host cells and initiation of the innate immune response." Cellular Microbiology 5(10): 671-680.

Hause, B. M., A. Padmanabhan, K. Pedersen ve T. Gidlewski (2016). "Feral swine virome is dominated by single-stranded DNA viruses and contains a novel Orthopneumovirus which circulates both in feral and domestic swine." Journal of General Virology 97(9): 2090-2095.

Hay, K., T. S. Barnes, J. Morton, J. L. Gravel, M. Commins, P. F. Horwood, R. Ambrose, A. Clements ve T. Mahony (2016). "Associations between exposure to viruses and bovine respiratory disease in Australian feedlot cattle." Preventive Veterinary Medicine 127: 121-133.

Hegele, R. G., S. Hayashi, A. M. Bramley ve J. C. Hogg (1994). "Persistence of respiratory syncytial virus genome and protein after acute bronchiolitis in guinea pigs." Chest 105(6): 1848-1854.

Hoppe, I. B. A. L., A. S. R. d. Medeiros, C. W. Arns ve S. I. Samara (2018). "Bovine respiratory syncytial virus seroprevalence and risk factors in non-vaccinated dairy cattle herds in Brazil." BMC Veterinary Research 14(1): 1-6.

Hougs, L., F. Gatto, O. Goerlich, L. Grohmann, K. Lieske, M. Mazzara, F. Narendja, J. Ovesna, N. Papazova ve I. Scholtens (2017). "Verification of analytical methods for GMO

testing when implementing interlaboratory validated methods." Testing and Analysis of GMO-containing Foods and Feed: 245-266.

Hussain, K. J., M. I. Al-Farwachi ve S. D. Hassan (2019). "Seroprevalence and risk factors of bovine respiratory syncytial virus in cattle in the Nineveh Governorate, Iraq." Veterinary World 12(11): 1862.

Inaba, Y., Y. Tanaka, T. Omori ve M. Matumoto (1970). "Isolation of bovine respiratory syncytial virus." Jikken Igaku Zasshi= Japanese Journal of Experimental Medicine 40: 473-474.

Inaba, Y., Y. Tanaka, K. SATO, T. Omori ve M. Matumoto (1972). "Bovine respiratory syncytial virus studies on an outbreak in Japan, 1968-1969." Japanese Journal of Microbiology 16(5): 373-383.

İnce, Ö. B., M. Şevik, E. G. Özgür ve A. Sait (2022). "Risk factors and genetic characterization of bovine respiratory syncytial virus in the inner Aegean Region, Turkey." Tropical Animal Health and Production 54(1): 1-10.

Jacobs, J. ve N. Edington (1971). "Isolation of respiratory syncytial virus from cattle in Britain." The Veterinary Record 88(26): 694.

Jia, S., X. Yao, Y. Yang, C. Niu, Y. Zhao, X. Zhang, R. Pan, X. Jiang, S. Xiaobo, X. Qiao, X. Guan ve Y. Xu (2021). "Isolation, identification, and phylogenetic analysis of subgroup III strain of bovine respiratory syncytial virus contributed to outbreak of acute respiratory disease among cattle in Northeast China." Virulence 12(1): 404-414.

Jiménez-Ruiz, S., I. García-Bocanegra, P. Acevedo, J. Espunyes, R. Triguero-Ocaña, D. Cano-Terriza, M. J. Torres-Sánchez, J. Vicente ve M. Á. Risalde (2021). "A survey of shared pathogens at the domestic–wild ruminants' interface in Doñana National Park (Spain)." Transboundary and Emerging Diseases 69(3):1568-1576.

Johnston, D., B. Earley, M. S. McCabe, J. Kim, J. F. Taylor, K. Lemon, M. McMenamy, C. Duffy, S. L. Cosby ve S. M. Waters (2021). "Elucidation of the Host Bronchial Lymph Node miRNA Transcriptome Response to Bovine Respiratory Syncytial Virus." Frontiers in Genetics 12: 633125.

Johnston, D., B. Earley, M. S. McCabe, K. Lemon, C. Duffy, M. McMenamy, S. L. Cosby, J. Kim, G. Blackshields, J. F. Taylor ve S. M. Waters (2019). "Experimental challenge with bovine respiratory syncytial virus in dairy calves: bronchial lymph node transcriptome response." Journal of Scientific Reports 9(1): 14736.

Kamdi, B., R. Singh, V. Singh, S. Singh, P. Kumar, K. P. Singh, N. George ve K. Dhama (2020). "Immunofluorescence and molecular diagnosis of bovine respiratory syncytial virus and bovine parainfluenza virus in the naturally infected young cattle and buffaloes from India." Microbial Pathogenesis 145: 104165.

Karaotcu, A. ve Y. Yildirim (2019). "Denizli ve Burdur yörelerindeki sığırlarda bovine respiratory syncytial virus enfeksiyonunun serolojik olarak araştırılması." Mehmet Akif Ersoy University Journal of Health Sciences Institute 7(2): 114-123.

Kim, H. W., J. G. CANCHOLA, C. D. BRANDT, G. PYLES, R. M. CHANOCK, K. JENSEN ve R. H. PARROTT (1969). "Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine." American Journal of Epidemiology 89(4): 422-434.

Kimman, T. ve F. Westenbrink (1990). "Immunity to human and bovine respiratory syncytial virus." Archives of Virology 112(1): 1-25.

Kimman, T., F. Westenbrink, B. Schreuder ve P. Straver (1987). "Local and systemic antibody response to bovine respiratory syncytial virus infection and reinfection in calves with and without maternal antibodies." Journal of Clinical Microbiology 25(6): 1097-1106.

Kimman, T., G. Zimmer, F. Westenbrink, J. Mars ve E. Van Leeuwen (1988). "Epidemiological study of bovine respiratory syncytial virus infections in calves: influence of maternal antibodies on the outcome of disease." The Veterinary Record 123(4): 104-109.

King, A. M., E. Lefkowitz, M. J. Adams ve E. B. Carstens (2011). Virus taxonomy: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Elsevier.

Klem, T. B., E. Rimstad ve M. Stokstad (2014). "Occurrence and phylogenetic analysis of bovine respiratory syncytial virus in outbreaks of respiratory disease in Norway." BMC Veterinary Research 10(1): 1-9.

Klem, T. B., S. K. Sjurseth, S. Sviland, B. Gjerset, M. Myrmel ve M. Stokstad (2019). "Bovine respiratory syncytial virus in experimentally exposed and rechallenged calves; viral shedding related to clinical signs and the potential for transmission." BMC Veterinary Research 15(1): 1-11.

Kolb, E. A., R. E. Buterbaugh, C. L. Rinehart, D. Ensley, G. A. Perry, K. W. Abdelsalam ve C. C. L. Chase (2020). "Protection against bovine respiratory syncytial virus in calves vaccinated with adjuvanted modified live vaccine administered in the face of maternal antibody." Vaccine 38(2): 298-308.

Kovaøèík, K. (2001). "The development and application of an indirect ELISA test for the detection of antibodies to bovine respiratory syncytial virus in blood serum." Veterinární medicína 46: 29-34.

Krešić, N., T. Bedeković, D. Brnić, I. Šimić, I. Lojkić ve N. Turk (2018). "Genetic analysis of bovine respiratory syncytial virus in Croatia." Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases 58: 52-57.

Kristensen, E. ve E. B. Jakobsen (2011). "Danish dairy farmers' perception of biosecurity." Preventive Veterinary Medicine 99(2-4): 122-129.

Kubacki, J., C. Fraefel ve C. Bachofen (2021). "Implementation of next-generation sequencing for virus identification in veterinary diagnostic laboratories." Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 33(2): 235-247.

Kumagai, A., K. Kawauchi, K. Andoh ve S. Hatama (2021). "Sequence and unique phylogeny of G genes of bovine respiratory syncytial viruses circulating in Japan." Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 33(1): 162-166.

Larios Mora, A., L. Detalle, J. M. Gallup, A. Van Geelen, T. Stohr, L. Duprez ve M. R. Ackermann (2018). "Delivery of ALX-0171 by inhalation greatly reduces respiratory syncytial virus disease in newborn lambs." MAbs 10(5): 778-795.

Larsen, L. E. (2000). "Bovine respiratory syncytial virus (BRSV): a review." Acta Veterinaria Scandinavica 41(1): 1-24.

Larsen, L. E., K. Tjørnehøj, B. Viuff, N. E. Jensen ve A. Uttenthal (1999). "Diagnosis of enzootic pneumonia in Danish cattle: reverse transcription-polymerase chain reaction assay for detection of bovine respiratory syncytial virus in naturally and experimentally infected cattle." Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 11(5): 416-422.

Lebedev, M., H. A. McEligot, V. N. Mutua, P. Walsh, F. R. Carvallo Chaigneau ve L. J. Gershwin (2021). "Analysis of lung transcriptome in calves infected with Bovine Respiratory Syncytial Virus and treated with antiviral and/or cyclooxygenase inhibitor." PLoS One 16(2): e0246695.

Letellier, C., M. Boxus, L. Rosar, JF. Toussaint, K. Walravens, S. Roels, G. Meyer, JJ. Leterson ve P. Kerkhofs (2008). “Vaccination of calves using the BRSV nucleocapsid protein in a DNA prime-protein boost strategy stimulates cell-mediated immunity and protects the lungs against BRSV replication and pathology” Vaccine 26(37):4840-4848.

Li, Y., D. Hodgson, X. Wang, K. E. Atkins, D. R. Feikin ve H. Nair (2021). "Respiratory syncytial virus seasonality and prevention strategy planning for passive immunisation of infants in low-income and middle-income countries: a modelling study." The Lancet Infectious Diseases 21(9): 1303-1312.

Liu, P., M. Jamaluddin, K. Li, R. P. Garofalo, A. Casola ve A. R. Brasier (2007). "Retinoic acid-inducible gene I mediates early antiviral response and Toll-like receptor 3 expression in respiratory syncytial virus-infected airway epithelial cells." Journal of Virology 81(3): 1401-1411.

Lizundia, R., K.-S. Sauter, G. Taylor ve D. Werling (2008). "Host species-specific usage of the TLR4-LPS receptor complex." Innate Immunity 14(4): 223-231.

Lo, M. S., R. M. Brazas ve M. J. Holtzman (2005). "Respiratory syncytial virus nonstructural proteins NS1 and NS2 mediate inhibition of Stat2 expression and alpha/beta interferon responsiveness." Journal of Virology 79(14): 9315-9319.

Lubbers, B. V., D. G. Renter, R. A. Hesse, L. G. Peddireddi, M. T. Zerse, E. A. Cox ve B. D. Meyer (2017). "Prevalence of respiratory viruses and Mycoplasma bovis in US cattle and variability among herds of origin, production systems and season of year." The Bovine Practitioner: 159-164.

Luzzago, C., V. Bronzo, S. Salvetti, M. Frigerio ve N. Ferrari (2010). "Bovine respiratory syncytial virus seroprevalence and risk factors in endemic dairy cattle herds." Veterinary Research Communications 34(1): 19-24.

Mahmoud, N. ve G. Salem (2012). "Isolatıon and molecular identification of BHV-1 from cattle suffering from respiratory signs." Kafrelsheikh Veterinary Medical Journal 10(2): 119-140.

Makoschey, B. ve A. C. Berge (2021). "Review on bovine respiratory syncytial virus and bovine parainfluenza–usual suspects in bovine respiratory disease–a narrative review." BMC Veterinary Research 17(1): 1-18.

Mallipeddi, S. K. ve S. K. Samal (1993). "Analysis of the ovine respiratory syncytial virus (RSV) G glycoprotein gene defines a subgroup of ungulate RSV." Journal of General Virology 74(12): 2787-2791.

Mars, M. H., C. J. Bruschke ve J. T. van Oirschot (1999). "Airborne transmission of BHV1, BRSV, and BVDV among cattle is possible under experimental conditions." Veterinary Microbiology 66(3): 197-207.

Marzo, E., C. Montbrau, M. C. Moreno, M. Roca, M. Sitjà, R. March, S. Gow, S. Lacoste ve J. Ellis (2021). "NASYM, a live intranasal vaccine, protects young calves from bovine respiratory syncytial virus in the presence of maternal antibodies." Veterinary Record 188(11).

Matumoto, M., Y. Inaba, H. Kurogi, K. Sato, T. Omori, Y. Goto ve O. Hirose (1974). "Bovine respiratory syncytial virus: host range in laboratory animals and cell cultures." Archiv für die Gesamte Virusforschung 44(3): 280-290.

Mawhinney, I. ve M. Burrows (2005). "Protection against bovine respiratory syncytial virus challenge following a single dose of vaccine in young calves with maternal antibody." Veterinary Record 156(5): 139-143.

McCarthy, M.-C., L. O'Grady, C. G. McAloon ve J. Mee (2021). "Longitudinal Prevalence of Antibodies to Endemic Pathogens in Bulk Tank Milk Samples From Dairy Herds Engaged or Not in Contract Heifer Rearing." Frontiers in Veterinary Science: 1415.

Meyer, G., M. Deplanche ve F. Schelcher (2008). "Human and bovine respiratory syncytial virus vaccine research and development." Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases 31(2-3): 191-225.

Meyerholz, D. K., B. Grubor, S. J. Fach, R. E. Sacco, H. D. Lehmkuhl, J. M. Gallup ve M. R. Ackermann (2004). "Reduced clearance of respiratory syncytial virus infection in a preterm lamb model." Microbes and Infection 6(14): 1312-1319.

Mitra, N., N. Cernicchiaro, S. Torres, F. Li ve B. M. Hause (2016). "Metagenomic characterization of the virome associated with bovine respiratory disease in feedlot cattle identified novel viruses and suggests an etiologic role for influenza D virus." The Journal of General Virology 97(8): 1771.

Mori, I., T. Komatsu, K. Takeuchi, K. Nakakuki, M. Sudo ve Y. Kimura (1995). "Parainfluenza virus type 1 infects olfactory neurons and establishes long-term persistence in the nerve tissue." Journal of General Virology 76(5): 1251-1254.

Morris, J. A., R. E. Blount ve R. E. Savage (1956). "Recovery of Cytopathogenic Agent from Chimpanzees with Goryza." Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine 92(3): 544-549.

Motha, J. ve M. Hansen (1997). "Serological survey for bovine respiratory syncytial virus in New Zealand." Surveillance 24(4): 28.

Nefedchenko, A., A. Glotov, S. Koteneva ve T. Glotova (2020). "Developing and testing a real-time polymerase chain reaction to identify and quantify bovine respiratory syncytial viruses." Molecular Genetics, Microbiology and Virology 35(3): 168-173.

Norström, M., E. Skjerve ve J. Jarp (2000). "Risk factors for epidemic respiratory disease in Norwegian cattle herds." Preventive Veterinary Medicine 44(1-2): 87-96.

Oberst, R., M. Hays, K. Hennessy, L. Stine, J. Evermann ve C. L. Kelling (1993). "Identifying bovine respiratory syncytial virus by reverse transcription-polymerase chain reaction and oligonucleotide hybridizations." Journal of Clinical Microbiology 31(5): 1237-1240.

Ohlson, A., S. Alenius, M. Tråvén ve U. Emanuelson (2013). "A longitudinal study of the dynamics of bovine corona virus and respiratory syncytial virus infections in dairy herds." The Veterinary Journal 197(2): 395-400.

Ohlson, A., C. Heuer, C. Lockhart, M. Tråvén, U. Emanuelson ve S. Alenius (2010). "Risk factors for seropositivity to bovine coronavirus and bovine respiratory syncytial virus in dairy herds." Veterinary Record 167(6): 201-206.

Oliveira, V. H. S., A. M. Dall Agnol, J. T. T. Fritzen, E. Lorenzetti, A. A. Alfieri ve A. F. Alfieri (2020). "Microbial diversity involved in the etiology of a bovine respiratory disease outbreak in a dairy calf rearing unit." Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases 71: 101494.

Olivier, A., J. Gallup, M. M. De Macedo, S. M. Varga ve M. Ackermann (2009). "Human respiratory syncytial virus A2 strain replicates and induces innate immune responses by respiratory epithelia of neonatal lambs." International Journal of Experimental Pathology 90(4): 431-438.

Oma, V. S., T. Klem, M. Tråvén, S. Alenius, B. Gjerset, M. Myrmel ve M. Stokstad (2018). "Temporary carriage of bovine coronavirus and bovine respiratory syncytial virus by fomites and human nasal mucosa after exposure to infected calves." BMC Veterinary Research 14(1): 1-8.

Openshaw, P. J. (1995). "Immunity and immunopathology to respiratory syncytial virusAmerican Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 152:59-62.

Öner, E. B. ve K. Yesilbag (2018). "Besi sığırlarında solunum sistemi virüslerinin seroprevalansı ve persiste BVD virüs enfeksiyonu tespiti." Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 65(1): 1-7.

Özyıldız, Z., Ö. Özmen ve D. Hüseyin (2017) "Buzağılarda respiratuar sinsityal virus (BRSV) enfeksiyonlarında patolojik ve immunohistokimyasal incelemeler." Veterinary Journal of Mehmet Akif Ersoy University 2(2): 131-138.

Paccaud, M. F. ve C. Jacquier (1970). "A Respiratory syncytial virus of bovine origin." Archiv für die Gesamte Virusforschung 30(4): 327-342.

Padalino, B., F. Cirone, M. Zappaterra, D. Tullio, G. Ficco, A. Giustino, L. A. Ndiana ve A. Pratelli (2021). "Factors affecting the development of bovine respiratory disease: a cross-sectional study in beef steers shipped from France to Italy." Frontiers in Veterinary Science 8: 672.

Papin, J. F., R. F. Wolf, S. D. Kosanke, J. D. Jenkins, S. N. Moore, M. P. Anderson ve R. C. Welliver Sr (2013). "Infant baboons infected with respiratory syncytial virus develop clinical and pathological changes that parallel those of human infants." American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology 304(8): L530-L539.

Pardon, B., J. Callens, J. Maris, L. Allais, W. Van Praet, P. Deprez ve S. Ribbens (2020). "Pathogen-specific risk factors in acute outbreaks of respiratory disease in calves." Journal of Dairy Science 103(3): 2556-2566.

Patel, J. R. ve S. A. Didlick (2004). "Evaluation of efficacy of an inactivated vaccine against bovine respiratory syncytial virus in calves with maternal antibodies." American Journal of Veterinary Research 65(4): 417-421.

Payment, P. ve M. Trudel (1985). "Influence of inoculum size, incubation temperature, and cell culture density on virus detection in environmental samples." Canadian Journal of Microbiology 31(11): 977-980.

Peters, A. R., S. J. Thevasagayam, A. Wiseman ve J. S. Salt (2004). "Duration of immunity of a quadrivalent vaccine against respiratory diseases caused by BHV-1, PI3V, BVDV, and BRSV in experimentally infected calves." Preventive Veterinary Medicine 66(1-4): 63-77.

Philippou, S., P. Otto, P. Reinhold, M. Elschner ve H.-J. Streckert (2000). "Respiratory syncytial virus-induced chronic bronchiolitis in experimentally infected calves." Virchows Archiv 436(6): 617-621.

Philippou, S., H.-J. Streckert, P. Otto, P. Reinhold, M. Elschner, H. Werchau ve K. Morgenroth (1996). "Morphological studies of the respiratory syncytial virus induced bronchiolitis in experimentally infected calves." Pathology-Research and Practice 192(10): 1045-1056.

Pratelli, A., F. Cirone, P. Capozza, A. Trotta, M. Corrente, A. Balestrieri ve C. Buonavoglia (2021). "Bovine respiratory disease in beef calves supported long transport stress: An epidemiological study and strategies for control and prevention." Research in Veterinary Science 135: 450-455.

Prozzi, D., K. Walravens, J. P. Langedijk, F. Daus, J. A. Kramps ve J.-J. Letesson (1997). "Antigenic and molecular analyses of the variability of bovine respiratory syncytial virus G glycoprotein." Journal of General Virology 78(2): 359-366.

Renshaw, R., M. Laverack, N. Zylich, A. Glaser ve E. Dubovi (2011). "Genomic analysis of a pneumovirus isolated from dogs with acute respiratory disease." Veterinary Microbiology 150(1-2): 88-95.

Rima, B., P. Collins, A. Easton, R. Fouchier, G. Kurath, R. A. Lamb, B. Lee, A. Maisner, P. Rota, L. ve C. Wang (2017). "ICTV Virus Taxonomy Profile: Pneumoviridae." Journal of General Virology 98(12): 2912-2913.

Rivera, H., B. R. Madewell ve E. Ameghino (1987). "Serologic survey of viral antibodies in the Peruvian alpaca (Lama pacos)." American Journal of Veterinary Research 48(2): 189-191.

Røntved, C. M., K. Tjørnehøj, B. Viuff, L. E. Larsen, D. L. Godson, L. Rønsholt ve S. Alexandersen (2000). "Increased pulmonary secretion of tumor necrosis factor-alpha in calves experimentally infected with bovine respiratory syncytial virus." Veterinary Immunology and Immunopathology 76(3-4): 199-214.

Rosenberg, H. F. ve J. B. Domachowske (2008). "Pneumonia virus of mice: severe respiratory infection in a natural host." Immunology Letters 118(1): 6-12.

Russell, C. J. ve J. L. Hurwitz (2021). "Sendai Virus-Vectored Vaccines That Express Envelope Glycoproteins of Respiratory Viruses." Viruses 13(6): 1023.

Saa, L. R., A. Perea, D. V. Jara, A. J. Arenas, I. Garcia-Bocanegra, C. Borge ve A. Carbonero (2012). "Prevalence of and risk factors for bovine respiratory syncytial virus (BRSV) infection in non-vaccinated dairy and dual-purpose cattle herds in Ecuador." Tropical Animal Health and Production 44(7): 1423-1427.

Sacco, R. E., J. L. McGill, A. E. Pillatzki, M. V. Palmer ve M. R. Ackermann (2014). "Respiratory syncytial virus infection in cattle." Veterinary Pathology 51(2): 427-436.

Sacco, R. E., B. J. Nonnecke, M. V. Palmer, W. R. Waters, J. D. Lippolis ve T. A. Reinhardt (2012). "Differential expression of cytokines in response to respiratory syncytial virus infection of calves with high or low circulating 25-hydroxyvitamin D3." PLoS One 7(3): e33074.

Sarmiento-Silva, R. E., Y. Nakamura-Lopez ve G. Vaughan (2012). "Epidemiology, molecular epidemiology and evolution of bovine respiratory syncytial virus." Viruses 4(12): 3452-3467.

Sausker, E. A. ve N. W. Dyer (2002). "Polymerase chain reaction and DNA sequencing for detection of ovine herpesvirus 2 in American bison (Bison bison)." Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 14(1): 40-46.

Sayers, R., G. Sayers, J. F. Mee, M. Good, M. L. Bermingham, J. Grant ve P. Dillon (2013). "Implementing biosecurity measures on dairy farms in Ireland." The Veterinary Journal 197(2): 259-267.

Schlender, J., B. Bossert, U. Buchholz ve K. K. Conzelmann (2000). "Bovine respiratory syncytial virus nonstructural proteins NS1 and NS2 cooperatively antagonize alpha/beta interferon-induced antiviral response." Journal of Virology 74(18): 8234-8242.

Schrijver, R. S., J. P. Langedijk, W. H. van der Poel, W. G. Middel, J. A. Kramps ve J. T. van Oirschot (1996). "Antibody responses against the G and F proteins of bovine respiratory syncytial virus after experimental and natural infections." Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology 3(5): 500-506.

Seckin, C., G. Alpun Kalayci, N. Turan, A. Yilmaz, U. Y. Cizmecigil, O. Aydin, J. A. Richt ve H. Yilmaz (2018). "Immunomodulatory effects of Echinacea and Pelargonium on the innate and adoptive immunity in calves." Food and Agricultural Immunology 29(1): 744-761.

Selim, A. ve W. Gaede (2013). "Evaluation of reverse transcription-PCR protocols based on the fusion gene for diagnosis of bovine respiratory syncytial virus infections." Biotechnology in Animal Husbandry 29(1): 53-64.

Shirvani, E., M. Lotfi, M. Kamalzadeh, V. Noaman, M. Bahriari, H. Morovati ve A. Hatami (2012). "Seroepidemiological study of bovine respiratory viruses (BRSV, BoHV-1, PI-3V, BVDV, and BAV-3) in dairy cattle in central region of Iran (Esfahan province)." Tropical Animal Health and Production 44(1): 191-195.

Snowder, G. D., L. D. Van Vleck, L. V. Cundiff ve G. L. Bennett (2006). "Bovine respiratory disease in feedlot cattle: environmental, genetic, and economic factors." Journal of Animal Science 84(8): 1999-2008.

Socha, W. ve J. Rola (2011). "Comparison of four RT-PCR assays for detection of bovine respiratory syncytial virus." Polish Journal of Veterinary Sciences 14(3):449-51.

Sow, F. B., J. M. Gallup, A. Olivier, S. Krishnan, A. C. Patera, J. Suzich ve M. R. Ackermann (2011). "Respiratory syncytial virus is associated with an inflammatory response in lungs and architectural remodeling of lung-draining lymph nodes of newborn lambs." American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology 300(1):12-24.

Spilki, F. R., R. S. de Almeida, J. Campalans ve C. W. Arns (2006). "Susceptibility of different cell lines to infection with bovine respiratory syncytial virus." Journal of Virological Methods 131(2): 130-133.

Stärk, K. (1999). "The role of infectious aerosols in disease transmission in pigs." The Veterinary Journal 158(3): 164-181.

Stine, L. C., D. K. Hoppe ve C. L. Kelling (1997). "Sequence conservation in the attachement glycoprotein and antigenic diversity among bovine respiratory syncytial virus isolates." Veterinary Microbiology 54(3-4): 201-221.

Stittelaar, K. J., L. De Waal, G. Van Amerongen, E. J. Veldhuis Kroeze, P. L. Fraaij, C. A. Van Baalen, J. J. Van Kampen, E. Van der Vries, A. D. Osterhaus ve R. L. De Swart (2016). "Ferrets as a novel animal model for studying human respiratory syncytial virus infections in immunocompetent and immunocompromised hosts." Viruses 8(6): 168.

Stokstad, M., T. B. Klem, M. Myrmel, V. S. Oma, I. Toftaker, O. Østerås ve A. Nødtvedt (2020). "Using biosecurity measures to combat respiratory disease in cattle: The Norwegian control program for bovine respiratory syncytial virus and bovine coronavirus." Frontiers in Veterinary Science 7: 167.

Stott, E. J. ve G. Taylor (1985). "Respiratory syncytial virus. Brief review." Archives of Virology 84(1-2): 1-52.

Streckert, H. J., S. Philippou ve F. Riedel (1996). "Detection of respiratory syncytial virus (RSV) antigen in the lungs of guinea pigs 6 weeks after experimental infection and despite of the production of neutralizing antibodies." Archives of Virology 141(3-4): 401-410.

Studer, E., L. Schönecker, M. Meylan, D. Stucki, R. Dijkman, M. Holwerda, A. Glaus ve J. Becker (2021). "Prevalence of BRD-related viral pathogens in the upper respiratory tract of swiss veal calves." Animals 11(7): 1940.

Sudaryatma, P. E., K. Nakamura, H. Mekata, S. Sekiguchi, M. Kubo, I. Kobayashi, M. Subangkit, Y. Goto ve T. Okabayashi (2018). "Bovine respiratory syncytial virus infection enhances Pasteurella multocida adherence on respiratory epithelial cells." Veterinary Microbiology 220: 33-38.

Tajbakhsh, E., F. Khamesipor ve M. Momeni (2015). "Evaluate the frequency of respiratory syncytial virus (RSV) in dairy herds in the Chaharmahal va Bakhtyari province-Iran." Iranian Journal of Medical Microbiology 9(2): 32-38.

Tamura, K., G. Stecher ve S. Kumar (2021). “MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11”. Molecular Biology and Evolution 38(7):3022-3027.

Taylor, G. (2017). "Animal models of respiratory syncytial virus infection." Vaccine 35(3): 469-480.

Taylor, G., C. Bruce, A. F. Barbet, S. G. Wyld ve L. H. Thomas (2005). "DNA vaccination against respiratory syncytial virus in young calves." Vaccine 23(10): 1242-1250.

Teng, M. N., S. S. Whitehead ve P. L. Collins (2001). "Contribution of the respiratory syncytial virus G glycoprotein and its secreted and membrane-bound forms to virus replication in vitro and in vivo." Virology 289(2): 283-296.

Thomas, L., E. Slott, A. Collins ve J. Jebbett (1984). "Experimental pneumonia in gnotobiotic calves produced by respiratory syncytial virus." British Journal of Experimental Pathology 65(1): 19.

Thomas, L. H., R. S. Cook, S. G. Wyld, J. M. Furze ve G. Taylor (1998). "Passive protection of gnotobiotic calves using monoclonal antibodies directed at different epitopes on the fusion protein of bovine respiratory syncytial virus." Journal of Infectious Diseases 177(4): 874-880.

Thonur, L., M. Maley, J. Gilray, T. Crook, E. Laming, D. Turnbull, M. Nath ve K. Willoughby (2012). "One-step multiplex real time RT-PCR for the detection of bovine respiratory syncytial virus, bovine herpesvirus 1 and bovine parainfluenza virus 3." BMC Veterinary Research 8: 37.

Timsit, E., C. Maingourd, E. L. Dréan, C. Belloc, H. Seegers, A. Douart ve S. Assié (2010). "Evaluation of a commercial real-time reverse transcription polymerase chain reaction kit for the diagnosis of bovine respiratory syncytial virus infection." Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 22(2): 238-241.

Timurkan, M. O., H. Aydin ve A. Sait (2019). "Identification and Molecular Characterisation of Bovine Parainfluenza Virus-3 and Bovine Respiratory Syncytial Virus - First Report from Turkey." Journal of Veterinary Research 63(2): 167-173.

Tjørnehøj, K., Å. Uttenthal, B. Viuff, L. E. Larsen, C. Røntved ve L. Rønsholt (2003). "An experimental infection model for reproduction of calf pneumonia with bovine respiratory

syncytial virus (BRSV) based on one combined exposure of calves." Research in Veterinary Science 74(1): 55-65.

Toker, E. ve K. Yeşilbağ (2021). “Molecular characterization and comparison of diagnostic methods for bovine respiratory viruses (BPIV-3, BRSV, BVDV, and BoHV-1) in field samples in northwestern Turkey” Tropical Animal Health and Production 53(1):79.

Trudel, M., F. Nadon, C. Simard, F. Bélanger, R. Alain, C. Séguin ve G. Lussier (1989). "Comparison of caprine, human and bovine strains of respiratory syncytial virus." Archives of Virology 107(1-2): 141-149.

Urban-Chmiel, R. ve D. Grooms (2012). "Prevention and control of bovine respiratory disease." Journal of Livestock Science 3(3): 27-36.

Urban-Chmiel, R., A. Wernicki, B. Majer-Dziedzic, S. Gnat, A. Puchalski ve M. Dec (2014). "Use of different cell lines for in vitro cultures of bovine respiratory syncytial virus." Journal of Virological Methods 204: 62-64.

Valarcher, J.-F., J. Furze, S. Wyld, R. Cook, K.-K. Conzelmann ve G. Taylor (2003). "Role of alpha/beta interferons in the attenuation and immunogenicity of recombinant bovine respiratory syncytial viruses lacking NS proteins." Journal of Virology 77(15): 8426-8439.

Valarcher, J.-F. ve G. Taylor (2007). "Bovine respiratory syncytial virus infection." Veterinary Research 38(2): 153-180.

Valarcher, J.-F. O., H. Bourhy, J. Gelfi ve F. O. Schelcher (1999). "Evaluation of a nested reverse transcription-PCR assay based on the nucleoprotein gene for diagnosis of spontaneous and experimental bovine respiratory syncytial virus infections." Journal of Clinical Microbiology 37(6): 1858-1862.

Valarcher, J. F., H. Bourhy, A. Lavenu, N. Bourges-Abella, M. Roth, O. Andreoletti, P. Ave ve F. Schelcher (2001). "Persistent infection of B lymphocytes by bovine respiratory syncytial virus." Virology 291(1): 55-67.

Valarcher, J. F., S. Hägglund, K. Näslund, L. Jouneau, E. Malmström, O. Boulesteix, A. Pinard, D. Leguéré, A. Deslis ve D. Gauthier (2021). "Single-Shot Vaccines against Bovine Respiratory Syncytial Virus (BRSV): Comparative Evaluation of Long-Term Protection after Immunization in the Presence of BRSV-Specific Maternal Antibodies." Vaccines 9(3): 236.

Valarcher, J. F., F. Schelcher ve H. Bourhy (2000). "Evolution of bovine respiratory syncytial virus." Journal of Virology 74(22): 10714-10728.

Valentova, V., A. Antonis ve K. Kovarcik (2005). "Restriction enzyme analysis of RT-PCR amplicons as a rapid method for detection of genetic diversity among bovine respiratory syncytial virus isolates." Veterinary Microbiology 108(1-2): 1-12.

Valentova, V., K. Kovařčík ve I. Pšikal (2003). "Detection of Bovine respiratory syncytial virus in cell cultures by nRT-PCR and use of the method for virus identification in clinical samples." Acta Veterinaria Brno 72(1): 115-122.

Van den Hoogen, B. G., T. M. Bestebroer, A. D. Osterhaus ve R. A. Fouchier (2002). "Analysis of the genomic sequence of a human metapneumovirus." Virology 295(1): 119-132.

Van der Poel, W., J. Langedijk, J. Kramps, W. Middel, A. Brand ve J. Van Oirschot (1995). "Bovine respiratory syncytial virus antibodies in non-bovine species." Archives of Virology 140(9): 1549-1555.

Van der Sluijs, M. T., E. M. Kuhn ve B. Makoschey (2010). "A single vaccination with an inactivated bovine respiratory syncytial virus vaccine primes the cellular immune response in calves with maternal antibody." BMC Veterinary Research 6(1): 1-7.

Vangeel, I., A. F. Antonis, M. Fluess, L. Riegler, A. R. Peters ve S. S. Harmeyer (2007). "Efficacy of a modified live intranasal bovine respiratory syncytial virus vaccine in 3-week-old calves experimentally challenged with BRSV." The Veterinary Journal 174(3): 627-635.

Verhoeff, J., M. Van der Ban ve A. Van Nieuwstadt (1984). "Bovine respiratory syncytial virus infections in young dairy cattle: clinical and haematological findings." The Veterinary Record 114(1): 9-12.

Vilcek, S., M. Elvander, A. Ballagi-Pordany ve S. Belak (1994). "Development of nested PCR assays for detection of bovine respiratory syncytial virus in clinical samples." Journal of Clinical Microbiology 32(9): 2225-2231.

Virtala, A.-M., Y. Gröhn, G. Mechor ve H. Erb (1999). "The effect of maternally derived immunoglobulin G on the risk of respiratory disease in heifers during the first 3 months of life." Preventive Veterinary Medicine 39(1): 25-37.

Viuff, B., K. Tjørnehøj, L. E. Larsen, C. M. Røntved, A. Uttenthal, L. Rønsholt ve S. Alexandersen (2002). "Replication and clearance of respiratory syncytial virus: apoptosis is an important pathway of virus clearance after experimental infection with bovine respiratory syncytial virus." The American Journal of Pathology 161(6): 2195-2207.

Viuff, B., Å. Uttenthal, C. Tegtmeier ve S. Alexandersen (1996). "Sites of replication of bovine respiratory syncytial virus in naturally infected calves as determined by in situ hybridization." Veterinary Pathology 33(4): 383-390.

Warner, D. R., D. Sakai ve L. L. Sandell (2015). "Mammalian cell culture." Current Protocols Essential Laboratory Techniques 10(1): 4.3. 1-4.3. 33.

Wathes, C., C. Jones ve A. Webster (1983). "Ventilation, air hygiene and animal health." The Veterinary Record 113(24): 554-559.

Wellemans, G. (1990). “Bovine Respiratory Syncytial Virus. In: Dinter, Z., Morein, B, (Eds.), Virus Infections of Ruminants” Elsevier Science : 377-378.

Willoughby, K., K. Thomson, M. Maley, J. Gilray, S. Scholes, F. Howie, G. Caldow ve P. F. Nettleton (2008). "Development of a real time reverse transcriptase polymerase chain reaction for the detection of bovine respiratory syncytial virus in clinical samples and its comparison with immunohistochemistry and immunofluorescence antibody testing." Veterinary Microbiology 126(1-3): 264-270.

Woolums, A. R., R. D. Berghaus, D. R. Smith, B. J. White, T. J. Engelken, M. B. Irsik, D. K. Matlik, A. L. Jones ve I. J. Smith (2014). "A survey of veterinarians in 6 US states regarding their experience with nursing beef calf respiratory disease." The Bovine Practitioner: 26-35.

Woolums, A. R., R. S. Singer, G. A. Boyle ve L. J. Gershwin (1999). "Interferon gamma production during bovine respiratory syncytial virus (BRSV) infection is diminished in calves vaccinated with formalin-inactivated BRSV." Vaccine 17(11-12): 1293-1297.

Xue, W., J. Ellis, D. Mattick, L. Smith, R. Brady ve E. Trigo (2010). "Immunogenicity of a modified-live virus vaccine against bovine viral diarrhea virus types 1 and 2, infectious bovine rhinotracheitis virus, bovine parainfluenza-3 virus, and bovine respiratory syncytial virus when administered intranasally in young calves." Vaccine 28(22): 3784-3792.

Yavru, S., A. Simsek, O. Yapkic ve M. Kale (2005). "Serological evaluation of viral infections in bovine respiratory tract." Acta Veterinaria 55(2-3): 219-226.

Yazici, Z., E. Ozan, C. Tamer, B. Muftuoglu, G. Barry, H. N. Kurucay, A. E. Elhag, A. A. Cagirgan, S. Gumusova ve H. Albayrak (2020). "Circulation of indigenous bovine respiratory syncytial virus strains in Turkish cattle: the first isolation and molecular characterization." Animals 10(9): 1700.

Yeşilbağ, K. ve B. Güngör (2008). "Seroprevalence of bovine respiratory viruses in North-Western Turkey." Tropical Animal Health and Production 40(1): 55-60.

Yilmaz, A., S. Umar, N. Turan, O. Aydin, H. E. Tali, T. C. Oguzoglu, H. Yilmaz, J. A. Richt ve M. F. Ducatez (2020). "First report of influenza D virus infection in Turkish cattle with respiratory disease." Research in Veterinary Science 130: 98-102.

Zeineldin, M., J. Lowe ve B. Aldridge (2019). "Contribution of the mucosal microbiota to bovine respiratory health." Trends in Microbiology 27(9): 753-770.

Zeng, R., Y. Cui, Y. Hai ve Y. Liu (2012). "Pattern recognition receptors for respiratory syncytial virus infection and design of vaccines." Virus Research 167(2): 138-145.

Zhang, M., J. E. Hill, D. L. Godson, M. Ngeleka, C. Fernando ve Y. Huang (2020). "The pulmonary virome, bacteriological and histopathological findings in bovine respiratory disease from western Canada." Transboundary and Emerging Diseases 67(2): 924-934.

Zimmer, G., L. Budz ve G. Herrler (2001). "Proteolytic activation of respiratory syncytial virus fusion protein. Cleavage at two furin consensus sequences." Journal of Biological Chemistry 276(34): 31642-31650.

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

SIĞIR ve İNSAN RESPİRATÖR SİNSİTYAL VİRUSLARIN FİLOGENETİK ANALİZİ ve SIĞIRLARDAN RESPİRATÖR SİNSİTYAL VİRUSUN İZOLASYONU

ORİJİNALLİK RAPORU

%10	%9	%1	%1
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	%6
2	dergipark.org.tr İnternet Kaynağı	%1
3	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	%1
4	www.acarindex.com İnternet Kaynağı	<%1
5	uu245-71.uludag.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
6	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	<%1
7	Submitted to Erciyes Ãniversitesi Öğrenci Ödevi	<%1
8	hdl.handle.net İnternet Kaynağı	<%1