

## BOĞALARDA BOVİNE HERPES VİRUS TİP 1 (BHV-1) ENFEKSİYONUNUN SEROLOJİK VE VİROLOJİK OLARAK ARAŞTIRILMASI

Sibel Yavru<sup>1</sup>

Atilla Şimşek<sup>1</sup>

Feridun Öztürk<sup>1</sup>

### Investigation of Bovine Herpes Virus Type 1 (BHV-1) Infection by Serologic and Virologic Methods in Bulls

**Summary:** A total of 300 blood sera samples taken from bulls in various ages and breed in Meat and Fish Association's Slaughterhouse in Konya were tested against Bovine Herpes Virus type 1 (BHV-1) antibodies by microneutralisation test. 125 (41.66 %) sera were found to be positive. The neutralising antibody titers of the positive sera were detected between 1:2.37 and 1:200. The highest antibody incidence (91.1%-100%) and titers were observed in bulls over 3 years old. In addition, conjunctival or nasal swap samples from 15 bulls with respiratoric symptoms in Slaughterhouse were taken for virus isolation. A virus was isolated by inoculation onto cell culture. The isolated virus was identified BHV-1 by cross microneutralisation test for used hyperimmun sera obtained from rabbits.

**Key words :** Bovine Herpes Virus type-1, bull, serology, virus izolation.

**Özet:** Konya Et ve Balık Kurumu mezbahasına getirilen farklı ırk ve yaşlardaki toplam 300 adet boğadan alınan kan serumu örnekleri Bovine Herpes Virus type 1 (BHV-1)'e karşı mikronötralizasyon testi ile kontrol edildi. Test sonunda 125 (% 41.66) adet kan serumu seropozitif olarak bulundu. Pozitif serumların nötralizan antikor titrelerinin 1:2.37 ile 1:200 arasında olduğu saptandı. En yüksek antikor dağılımının (% 93.1-%100) ve antikor titrelerinin 3 yaşın üzerindeki boğalarda olduğu tespit edildi. Ayrıca Konya Et ve Balık Kurumu mezbahasına getirilen solunum yolu enfeksiyonuna bağlı klinik belirti gösteren 15 boğadan konjunktival ve nazal swap örnekleri izolasyon materyali olarak alındı. Bu örneklerin hücre kültürlerine inokulasyonu sonucu 1 adet virus izole edildi. İzole edilen virus tavşanlardan hazırlanan hiperimmun serumla çapraz mikronötralizasyon testi sonuçlarına göre BHV-1 olarak tanımlandı.

**Anahtar kelimeler :** Bovine herpes virus tip-1, boğa, seroloji, virus izolasyonu.

### Giriş

Bovine herpes virus tip-1 (BHV-1) herpesviridae ailesinin alphaherpesvirinae alt grubunda yer alır. BHV-1 sığırların solunum ve genital kanallarını etkileyerek Infectious bovine rhinotracheitis (IBR), Infectious pustular vulvovaginitis (IPV) ve Infectious pustular balanoposthitis (IPB) gibi çeşitli klinik belirtilerle seyreden enfeksiyonların oluşmasına neden olur (Kahrs, 1980; Sellers, 1983; Van Engelenburg, 1993).

Madine ve ark. tarafından 1956 yılında üst solunum yolu enfeksiyonu geçiren bir sığırdan BHV-1'in ilk izolasyonundan birkaç yıl sonra pus-

tular balanoposthitisli bir boğadan BHV-1 izole edilmiştir. O tarihten itibaren suni tohumlama istasyonlarında bulunan boğalardan balanoposthitis enfeksiyonu salgınları rapor edilmiştir (Van Oirschot, 1993). Aynı zamanda, klinik olarak sağlıklı görünen boğalardan da BHV-1 izole ve tanımlandı (Seller, 1983; Singh, 1986).

Boğaların genital kanallarının BHV-1 ile enfeksiyonunda, BHV-1 prepusyal, penis ve büyük bir ihtimalle urethranın distal kısmının mukozasında çoğalır. Semen daha çok ejakülasyon sırasında mukozadan saçılan virus ile kontamine olur. BHV-1 ile kontamine semen, tohumlanan inekler için muhtemel enfeksiyon kaynağıdır ve böyle hayvanlar ile tohumlanan ineklerin gebe kalma oranlarında azalma olur, endometritis, abort

ve infertilite problemleri gelişebilir (Ackermann, 1984; Burgu, 1986; Spradbrow, 1968; Van Engelenburg, 1993). Primer enfeksiyon sırasında BHV-1 ile enfekte olan hayvanlarda, virus aksonlar boyunca taşınarak periferik ganglionlarda latent hale gelir, böylece hayvanlar hayatları boyunca persiste olarak kalırlar (Burgu, 1991; Mweene, 1996; Van Engelenburg, 1993; Saxegaard, 1966). Daha sonra stres, nakil veya kortikosteroid uygulamaları gibi sebepler (Kaashoek, 1996.a; Kaashoek, 1996.b; Sheffy, 1973), BHV-1'in reaktif olmasına, virusun aksonlar boyunca geriye yol alarak primer enfeksiyon alanına taşınmasına, burada çoğalmasına ve solunum sistemi, genital kanal (semen dahil) veya göz sekresyonları ile saçılmasına neden olur (Kupferschmied, 1986; Miller, 1991; Sellers, 1983; Van Engelenburg, 1993). Bu nedenle, BHV-1 ile enfekte boğalar hayatları boyunca virusun potansiyel taşıyıcılarıdır (De Gee, 1996; Kupferschmied, 1986; Van Engelenburg, 1993).

Türkiye'de IBR/IPV enfeksiyonunun varlığı ilk kez 1971 yılında Erhan ve ark.(1971) tarafından gerçekleştirilen serolojik bir çalışma ile ortaya konmuştur. İlk virus izolasyonu ise Burgu ve Akça (1987) tarafından , klinik olarak hasta bir dananın burun akıntısından Fötal Dana Böbrek (FDB) hücre kültüründe yaptıkları inokülasyonlar sonucunda gerçekleştirilmiştir. Türkiye'de sığırların IBR/IPV/IPB enfeksiyonu üzerinde yapılan çalışmalar daha çok serolojik olup elde edilen sonuçlar bu enfeksiyonun oldukça yaygın olduğunu göstermektedir (Burgu, 1982; Burgu, 1988 ; Öztürk, 1988).

Semenden BHV-1 izolasyonu Türkiye'de ilk kez Yavru ve ark (1998) tarafından gerçekleştirilmiştir. Araştırmacılar tabii ve suni tohumlamada kullanılan boğalardan alınan 60 semen numunesinden 5 adet virus izole etmişler, tavşanlardan hazırladıkları hiperimmün serum ile çapraz nötralizasyon testine tabi tutarak izole ettikleri virüslerden 3 tanesini BHV-1 olarak tanımlamışlardır.

Suni tohumlama istasyonlarında kullanılan damızlık boğalarda IBR/IPV enfeksiyonunun tespiti amacıyla Burgu ve Akça (1988) , boğalardan

topladıkları kan serumlarında nötralizan antikorların varlığını tespit etmişlerdir.

Bu çalışma; Konya Et ve Balık Kurumu Mezbahasına kesime getirilen çeşitli ırklara ait 1-5 yaş arasındaki boğaların BHV-1 ile enfeksiyonu yönünden mikronötralizasyon testi ile serolojik, solunum yolu enfeksiyonu klinik belirtileri gösteren hayvanlardan alınan konjunktival ve nasal swaplardan virus izolasyonu çalışmaları ile virolojik olarak araştırılması amaçlanmıştır.

### Materyal ve Metot

#### Hayvan Materyalleri :

Bu çalışmada, Konya Et ve Balık Kurumu Mezbahasına kesime getirilen çeşitli ırklara ait toplam 300 boğadan alınan kan serumları ve solunum yolu enfeksiyonuna bağlı klinik belirtiler gösteren 15 boğadan alınan konjunktival ve nasal swap numuneleri çalışma materyali olarak kullanılmıştır. Kan serumu alınan boğalara üst solunum yolları viral enfeksiyonlarına karşı aşılınmayan hayvanlardan seçilmiştir (Tablo 1 ve 2).

#### Hücre kültürleri:

Araştırmada virus izolasyonu amacıyla Fötal Dana Böbrek (FDB) hücre kültürü; izole edilen virusun adaptasyonu, titrasyonu, mikronötralizasyon testi (mNT), IBR/IPV virusu Colorado referans suşunun üretilmesi ve titrasyonu için de MDBK hücre kültürleri kullanıldı.

#### Virus :

Araştırmada serum nötralizasyon testinde kullanılmak ve hiperimmün serum sağlamak amacıyla IBR/IPV virusunun Colorado referans suşu kullanıldı.

#### Kan Serumları :

Kan numuneleri, v.jugularis'den steril vakumlu tüplere alınmıştır. Usulüne uygun olarak ayrılan serumlar su banyosunda 56 °C'de 30 dakika süre ile inaktive edildikten sonra sterilite kontrolleri yapılmış ve 1ml'lik porsiyonlara ayrılarak testte kullanılmaya kadar -20 °C'de derin dondurucuda saklanmıştır.

Tablo 1. Serolojik kontrol amacıyla kan serumu alınan boğaların ırkları ve yaş dağılımları.

Boğaların İrkları	Boğaların Yaşına Göre Serum sayısı					TOPLAM
	1 yaş	2 yaş	3 yaş	4 yaş	5 yaş	
HOLSTEİN	39	75	10	5	5	134
MONTAFON	20	70	8	1	1	100
HEREFORD	2	6	1	1	-	10
YERLİ	10	10	-	2	-	22
MELEZ	10	10	6	2	-	28
MANDA	-	-	4	2	-	6
TOPLAM	81	171	29	13	6	300

#### Virus İzolasyon Materyali İçin Örneklenen Hayvanlar:

Bu araştırmada, Konya Et ve Balık Kurumu Mezbahasına kesime getirilen solunum yolu enfeksiyonu klinik belirtileri gösteren çeşitli ırklara ait toplam 15 boğadan alınan konjunktival ve nasal swap numuneleri izolasyon materyali olarak kullanıldı (Tablo 2).

Tablo 2. Virolojik kontrol amacıyla alınan örneklerin hayvan ırklarına göre dağılımları.

Numunelerin Alındığı Hayvan İrkları	Numune Sayısı		TOPLAM
	Konjunktival swap	Nasal swap	
Holstein	4	2	6
Montafon	1	1	2
Hereford	1	2	3
Yerli	2	2	4
TOPLAM	8	7	15

#### Virusun Mikrotitrasyon Yöntemi ile Titrasyonu:

Bu amaçla, Frey ve Liess (1971)' in bildirdikleri yöntem kullanıldı. Her gün hücre kültürü mikroskobunda hücrelerde meydana gelen değişiklikler (CPE) kontrol edilerek 5. günün sonunda elde edilen sonuçlar, Kaerber (1964) yöntemine göre hesaplanarak virusun titresini tespit edildi.

#### Serum Örneklerinin Mikronötralizasyon Testi:

BHV-1'e karşı serum numunelerinde nötrali-

zan antikorların varlığı Frey ve Liess (1971)' in bildirdikleri mikronötralizasyon testi ile araştırılmıştır. İnaktive edilmiş ve sulandırılmamış serum numuneleri eşit miktarda titresini bilinen test virusun 100 doku kültürü infeksiyöz doz 50 (100 DKID<sub>50</sub> = 10<sup>-4.75</sup>/0.05 ml) oranında sulandırılması ile karşılaştırılarak mikronötralizasyon (mNT) tablasında bulunan gözlere 0.1 ml konuldu. Virus kontrol için dört göze, her göz için 0.05 ml olmak üzere Eagle Minimum Essential Medium (EMEM) vasatı damlatıldı. Üzerine 100 DKID<sub>50</sub> oranında sulandırılmış virustan 0.05 ml ilave edildi. Hücre kontrol için dört göze, her bir göz için 0.1 ml miktarında olmak üzere serumlu EMEM vasatı konuldu. Toksik etkisi olmayan özel yapıştırıcı bir bant ile mNT tablasının üzeri kapatıldı. 37 °C'lik etüvde 1 saat bekletildi. Sonra mNT tablasının üzerindeki yapıştırıcı bant kaldırılarak hücre, serum ve virus kontrol da dahil olmak üzere, bütün gözlere Madin Darby Bovine Kidney (MDBK) hücre süspansiyonundan 0.05 ml (300000 hücre/ml) miktarında özel pipet yardımıyla damlatıldı. mNT tablasının üzeri tekrar yapıştırıcı bant ile kapatılarak 37 °C' de inkübasyona bırakıldı. Doku kültürü mikroskobunda her gün sitopatik efekt (CPE) yönünden kontrolleri yapılarak, sonuçlar 4. günden itibaren değerlendirmeye alındı.

#### Pozitif Serumların Serum Nötralizasyon 50 (SN<sub>50</sub>) Değerlerinin Saptanması:

Mikronötralizasyon testi sonunda pozitif bulunan serum örneklerindeki antikor titreleri mikronötralizasyon testi ile saptandı.

Sulandırılmayan serum numunelerinden mikronötralizasyon tablasının ilk sırada bulunan dört

gözüne 0.1 ml konuldu. Takip eden sıralarda bulunan gözlere ise özel pipet yardımıyla EMEM vasatından 0.05 ml damlatıldı. Sonra özel sulandırıcılar yardımıyla ilk sırada bulunan sulandırılmamış serumdan başlamak üzere, bir sonraki göze 0.05 ml aktarılarak sulandırıldı.

Titresi bilinen virus 100 DKID<sub>50</sub> oranında sulandırılarak özel pipet yardımıyla bütün gözlere 0.05 ml miktarında damlatıldı. Virus kontrol için dört göze, her göz için 0.05 ml olmak üzere EMEM vasatı damlatıldı. Üzerine 100 DKID<sub>50</sub> oranında sulandırılmış virustan 0.05 ml ilave edildi. Hücre kontrol için dört göze, her bir göz için 0.1 ml miktarında olmak üzere serumlu EMEM vasatı konuldu. Toksik etkisi olmayan özel yapıştırıcı bir bant ile mNT tablasının üzeri kapatıldı. 37 °C'lik etüvde 1 saat bekletildi. Sonra mNT tablasının üzerindeki yapıştırıcı bant kaldırılarak hücre, serum ve virus kontrol da dahil olmak üzere bütün gözlere MDBK hücre süspansiyonundan 0.05 ml (300 000 hücre/ml) miktarında özel pipet yardımıyla damlatıldı. mNT tablasının üzeri tekrar özel kapağı ile kapatılarak 37 °C'lik etüvde inkübasyona bırakıldı. Doku kültürü mikroskobunda her gün CPE yönünden kontrolleri yapılarak, sonuçlar 4. günden itibaren Kaerber (1964) metoduna göre hesaplandı.

**Virolojik Kontrol Amacıyla Alınan Örneklerin Hazırlanması:**

Virus izolasyonu amacıyla steril şartlarda alınan konjunktiva ve nasal swap örnekleri antibiyotikli PBS içinde laboratuvara getirildi. Konjunktival ve nasal swap örnekleri 3000 devirde +4°C'de 30 dakika santrifuj edildi. Üstte toplanan sıvıya, virus izolasyonu çalışmalarında inokulum olarak kullanılmadan önce, 2x antibiyotik (100 IU/ml penisilin, 100 mg/ml gama streptomisin ve 0.005 mg/ml kanamisin) ilave edildi. Sterilite kontrolleri yapılarak kullanılıncaya kadar - 80 °C'de saklandı.

**Tavşanlardan Hiperimmün Serum Elde Edilmesi:**

Araştırmada hücre kültürlerinde CPE meydana getiren virusların identifikasyonu amacıyla, IBR/IPV virusuna karşı tavşanlardan hazırlanan

hiperimmün serum kullanıldı. IBR/IPV virusunun Colorado referens suşuna karşı hiperimmün serum elde etmek için 2 adet Yeni Zelanda ırkı tavşan kullanıldı. Virus verilmeden önce, tavşanların bu virusa karşı antikor taşıyıp taşımadıkları kontrol edildi.

Bu tavşanların kulak venalarına titreleri daha önce saptanmış olan virustan (DKID<sub>50</sub>:10<sup>-6.75</sup>/0.05 ml) 3' er gün ara ile 6 enjeksiyon yapıldı. Birinci enjeksiyonda 0.5 ml, ikinci enjeksiyonda 1 ml ve diğer 4 enjeksiyonda ise her defasında 2 ml olmak üzere virus inokule edildi. Son enjeksiyonu izleyen 7. günden başlamak üzere, birer hafta ara ile 4 kez tavşanların kalplerinden kan alındı. Sterilite kontrolleri yapılarak - 20 °C'de saklandı. Bu serumlar, titreleri tespit edilerek izole edilen virusun identifikasyon çalışmalarında kullanıldı.

**Tavşanlardan Elde Edilen Hiperimmün Serumun mNT ve Serum Nötralizasyon 50 (SN<sub>50</sub>) Değerlerinin Saptanması:**

Hiperimmün serumda BHV-1'e karşı oluşan antikorların saptanmasında, Frey ve Liess (1971)'in bildirdikleri yöntem kullanıldı.

Hiperimmün serumun SN<sub>50</sub> değerlerinin tespiti ise serum örneklerinin SN<sub>50</sub> değerlerinin saptanmasında belirtildiği gibi yapılarak, sonuçlar Kaerber (1964)'e göre hesaplandı.

**Virolojik Araştırmalar:**

**Konjunktiva ve Nasal Swap Örneklerinden Virus İzolasyonu:**

Bu amaçla yukarıda bildirildiği şekilde hazırlanan örnekler depolandıkları derin dondurucudan (-80 °C) alınarak 37 °C'lik su banyosunda hızla çözdürüldü. Her bir numune iki adet FDB hücre kültürüne adsorbsiyona bağlı virus ekim yöntemi ile 0.2 ml miktarında inokule edildi. 37 °C'de CO<sub>2</sub>'li etüvde 1 saat inkübasyon süresinden sonra inokulumlar dökülerek hücre yüzeyleri 3 kez PBS-M ile yıkandı. Virus üretme vasatı olarak serumsuz EMEM hücre kültürü tüplerine ilave edildi ve tüpler 37 °C'de inkübasyona bırakıldı. Doku kültürü mikroskobunda her gün kontrolü yapılan hücreler, 7. günün sonunda dondurma-çözme işleminin ardından, 3000 devirde, 4 °C'de, 30 dakika süreyle santrifuj edil-

diler. Santrifüj sonrası hücre sedimentinin üstündeki sıvı, inokulasyon materyali olarak kullanıldı. Örneklerin bu yöntemle FDB hücre kültürlerinde 3 kör pasajı yapıldı. FDB hücre kültüründe virus izolasyonu yapılan örnekler daha sonra MDBK hücre kültürlerine adapte edildi. Doku kültürü mikroskobu ile yapılan kontrollerde, sitopatolojik değişiklik gözlenen tüplerden sağlanan süpernatantlar virus identifikasyonu amacıyla kullanıldı.

#### İzole Edilen Virusların Mikrotitrasyonu:

Boğalara ait konjunktival ve nasal örneklerden izole edilen virusların titrasyonu da Frey ve Liess (1971)'in bildirdiği yöntemle yapıldı.

#### BHV-1 Hiperimmün Serum ile İzole Edilen Virusun Çapraz Nötralizasyon Testi:

Konjunktival ve nasal örneklerden, hücre kültürlerine inokulasyonları sonrasında izole edilen virusun, identifiye edilmesi amacıyla hiperimmün serum kullanıldı. Bu amaçla, tavşanlardan hazırlanan ve SN<sub>50</sub> titre değerinde sulandırılan BHV-1 hiperimmün serum, 100

DKID<sub>50</sub> oranında sulandırılmış olan izolat ile çapraz mNT'ne tabi tutuldu. Testin sonucu hücre kültürü mikroskobunda değerlendirildi.

## Bulgular

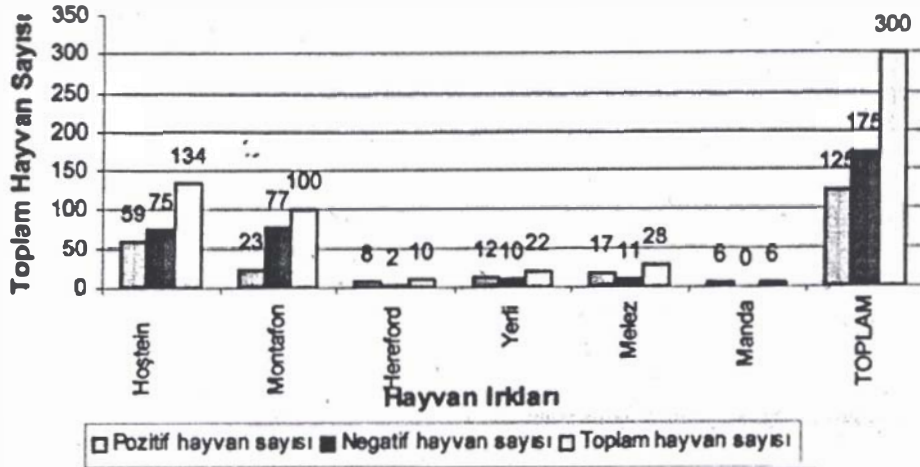
#### Virusun Titrasyonu:

Serolojik çalışmalarda kullanılan BHV-1 Colorado suşunun MDBK hücre kültüründe enfeksiyözite gücü Kaerber (1964)'e göre 100 DKID<sub>50</sub> = 10<sup>-6.75</sup>/0.05 ml olarak hesaplandı.

#### Mikronötralizasyon Testi Sonuçları:

Serum Örneklerinin Mikronötralizasyon Testi Sonucu:

Mikronötralizasyon testi ile yapılan serolojik kontroller sonunda toplam 300 adet boğa kan serumunun 125'inde (%41.66) BHV-1'e karşı nötralizan antikor varlığı tespit edilmiştir (Grafik 1). Boğaların ırklara ve yaşa göre mikronötralizasyon



Şekil 1. Serum Nötralizasyon Testinin Toplu Sonuçları.

Tablo 3. Boğaların ırklara ve yaşa göre mikronötralizasyon testi sonuçları.

Boğaların İrkları	TOPLAM	Boğaların Yaşına Göre Pozitif ve Negatif												
		Serum sayısı										Nötralizan Antikor Pozitif	POZİTİF (%)*	
		1 yaş (+) (-)		2 yaş (+) (-)		3 yaş (+) (-)		4 yaş (+) (-)		5 yaş (+) (-)				
HOLSTEİN	134	39		75		10		5		5		59	75	19.66
		19	20	20	55	10	-	5	-	5	-			
MONTAFON	100	20		70		8		1		1		23	77	7.66
		-	20	15	55	6	2	1	-	1	-			
HEREFORD	10	2		6		1		1		-		8	2	2.66
		-	2	6	-	1	-	1	-	-	-			
YERLİ	22	10		10		-		2		-		12	10	4.00
		4	6	6	4	-	-	2	-	-	-			
MELEZ	28	10		10		6		2		-		17	11	5.66
		5	5	4	6	6	-	2	-	-	-			
MANDA	6	-		-		4		2		-		6	-	2.00
		-	-	-	-	4	-	2	-	-	-			
TOPLAM	300	81		171		29		13		6		125	175	41.66
		28	53	51	120	27	2	13	-	6	-			

\*Toplam hayvan sayısına göre pozitiflik oranları.

Tablo 4. IBR/IPV'ye karşı nötralizan antikorlar yönünden pozitif olarak tespit edilen hayvanların yaşlarına göre pozitiflik oranları.

Boğaların Yaşı	Kontrol Edilen Serum Sayısı	Pozitif Serum Sayısı	Pozitiflik Oranı (%)
1	81	28	% 36.11
2	171	51	% 29.82
3	29	27	% 93.10
4	13	13	% 100
5	6	6	% 100
TOPLAM	300 (% 100)	125	% 41.66

testi sonuçları Tablo 3 ve 4'de özetlenmiştir.

Pozitif Serumların SN<sub>50</sub> Değerleri :

Sulandırılmamış serum örneklerinde pozitif sonuç veren 125 adet serumun mikronötralizasyon testi ile saptanan serum titreleri, boğa ırkları genelinde en düşük SN<sub>50</sub> değeri 1:2.37, en yüksek SN<sub>50</sub> değeri ise 1:200 olarak tespit edildi (Tablo 5).

Hiperimmün Serumların SN<sub>50</sub> Testi Sonuçları:

Mikronötralizasyon testi sonunda su-

landırılmamış serum örneğinde, BHV-1 antikorları yönünden pozitif olduğu saptanan hiperimmün serumun SN<sub>50</sub> değeri 1/32 olarak tespit edildi.

Virolojik Çalışmalar:

Konjunktival ve Nasal Swap Örneklerinden Virus İzolasyonu:

Bu araştırmada, Konya Et ve Balık Kurumu Mezbahasına kesime getirilen solunum yolu enfeksiyonu klinik belirtileri gösteren çeşitli türlere ait toplam 15 boğadan izolasyon materyali olarak alınan konjunktival ve nasal swap örnekleri (Tablo

2) FDB hücre kültüründe 3 kez pasajlandı. FDB hücre kültüründe, 3. pasajlarda CPE gösteren, 1 adet virus izolasyonu gerçekleştirildi. Diğer örneklerin hücre kültürüne yapılan inokulasyonlarında, herhangi bir viral ajan tespit edilemedi. Sitopatik olmayan virus suşları için viral antijen yönünden herhangi bir araştırma yapılmadı.

Tablo 5. Serum nötralizasyon testi ile pozitif olduğu tespit edilen serumların SN<sub>50</sub> değerleri ve yüzdeleri.

SN <sub>50</sub> Değerleri	Pozitif serum Sayısı	Pozitif Serum Oranı (%)
1:2.37	4	3.2
1:5.62	7	5.6
1:6.68	11	8.8
1:7.95	9	7.2
1:11.2	20	16
1:15.8	16	12.8
1:22.4	21	16.8
1:26.6	12	9.6
1:53.1	8	6.4
1:75	5	4
1:126	2	1.6
1:150	3	2.4
1:168	4	3.2
1:178	2	1.6
1:200	1	0.8
Toplam	125	100

#### İzole Edilen Virusun Mikrotitrasyon Testi Sonuçları:

Nasal örnekten izole edilen virusun, MDBK hücre kültüründe enfeksiyözite gücü Kaerber (1964)'e göre DKID<sub>50</sub> = 10<sup>-3.7</sup> /0.05 ml olarak tespit edildi.

BHV-1'e Karşı Hazırlanan Hiperimmün Serum ile İzole Edilen Virusun Çapraz mNT Sonucu: Nasal örnekten izole edilen sitopatojen virus; BHV-1'e karşı hazırlanmış hiperimmün serum ile MDBK hücre kültüründe yapılan çapraz mNT sonunda BHV-1 olarak identifiye edildi .

#### Tartışma ve Sonuç

Sığır yetiştiriciliğinde fertilité problemlerine neden olan enfeksiyonlar içinde BHV-1'in neden olduğu IBR/IPV/IPB enfeksiyonları önemli yer tutar (Kahrs, 1977). Türkiye'de BHV-1 enfeksiyonları yönünden yapılan serolojik araştırmalarda hayvanların yüksek oranda antikor içermesi dikkat çekicidir. Bu durum, BHV-1 enfeksiyonlarında seropozitif hayvanların enfeksiyonu latent olarak taşıyabileceği ve virusun ileride çeşitli faktörlerin etkisi ile aktif hale geçerek çevreye yayılabileceği göz önüne alınırsa oldukça önemlidir (Burgu ve Özkul, 1991; Kaashoek ve ark,1996). Bu nedenle damızlık olarak kullanılan boğaların düzenli aralarla serolojik kontrollerden geçirilmesi gerektiği gibi, sperma, prepusyal çalkantı sıvısı, lökosit, burun ve göz akıntısından virus izolasyonu çalışmalarının yapılması da gerekmektedir. Seropozitif bulunan veya virus izolasyonu yapılan boğaların damızlık olarak kullanılmasından kaçınmak gerekir (Burgu, 1986; Kupferschmied, 1986). Böylece damızlık olarak kullanılan boğaların IBR/IPV/IPB enfeksiyonu yönünden kontrol altına alınması sağlandığı gibi etkenin sperma vasıtası ile hassas hayvanlara bulaşma ihtimali de önlenmiş olacaktır.

BHV-1, sağlıklı hayvanlara akut, subklinik veya latent enfekte hayvanlar vasıtası ile bulaşır (Kupferschmied, 1986; Van Engelenburg, 1986). Latent enfekte hayvanlarda virus stres, nakil, doğum ve kortikosteroid uygulamaları ile reaktif olur ve vücut salgıları ile çevreye saçılmaya başlar (Burgu, 1991; Miller, 1991; Sellers, 1983). Bu nedenle virus izolasyonu yapılmamış ancak seropozitif olan boğalar epidemiyolojik açıdan sürekli virus taşıyıcısı olarak kabul edilirler (De Gee, 1996).

BHV-1 enfeksiyonlarının teşhisi direkt ve indirekt yöntemlerle yapılır (Burgu, 1987; Yavru, 1998). Virusun izolasyonu ve identifikasyonu direkt teşhis yöntemleri ile, virusa spesifik antikorların tespiti ise indirekt teşhis yöntemleri ile yapılır (Burgu, 1982; Miller, 1991; Mohan, 1989; Zyambo, 1973).

Yavru ve ark (1998) ise yine Türkiye'de damızlık olarak kullanılan boğalardan aldıkları semen örneklerinden BHV-1'i ilk kez izole ve tanımladılar. Yine aynı araştırmada virolojik çalışmaların seroloji ile desteklenmesi gerektiğini vurgulamışlardır.

Serum nötralizasyon testi BHV-1 enfeksiyonlarında antikor tespiti amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır (Burgu, 1986; Öztürk, 1988; Mohan, 1989; Zyambo, 1973).

Mohan ve ark (1989) Jersey, Holstein, Friesian, Murrah ve Kongeyam boğalarından topladıkları 210 adet kan serumunu serum nötralizasyon testi ile IBR/IPV/IPB antikorları yönünden test etmişler ve 38'inde (% 18.95) nötralizan antikor varlığını saptamışlardır.

Singh ve ark (1986), serolojik araştırmaların ve epidemiyolojik çalışmaların IBR/IPV enfeksiyonunun Hindistan'da oldukça yaygın olarak bulunduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar (Singh, 1986) yaptıkları çalışmada sütçü sığırların bulunduğu çiftliklerden topladıkları 506 adet kan serumunun 241'inde (% 47.63) IBR/IPV'ye karşı nötralizan antikor tespit ettiklerini, daha da ayrıntılı bir ifade ile % 30.39 oranında boğalarda, % 53.03 oranında tohumlanmış ineklerde ve % 50 oranında abort yapmış ineklerde seropozitiflik bulduklarını ifade etmişlerdir.

Zyambo ve ark. (1973) serum nötralizasyon (SN) ve passive haemagglutination (PH) testlerini kullanarak yaptıkları karşılaştırmalı araştırmada boğa kan serumlarında BHV-1 antikorlarını araştırmışlardır. PH testi ile toplam 432 adet boğa kan serumunun 416'sında (% 96) antikor varlığı tespit ederken, 432 serumdan seçilen 210 serumun %97'sinin SN testi ile pozitif olduğunu bildirmişlerdir. Sonuç olarak her iki testin kalitatif sonuçlarının aynı olduğunu, PH testinin de çalışmalarda rahatlıkla kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Van Oirschot ve ark. (1993) BHV-1 ile subklinik olarak enfekte olan boğaların bulunduğu bir suni tohumlama merkezinde yaptıkları çalışmada; 116 boğa spermasının 43'ünde BHV-1'i tespit ettiklerini, aynı boğaların 84 tanesinden

aldıkları kan serumlarının 40'ında (bu boğalardan 3 tanesi 4 veya 5 kez BHV-1 aşısı ile aşılanmış) nötralizasyon testi ile BHV-1'e karşı antikor tespit ettiklerini bildirmişlerdir.

Türkiye'de boğalar üzerinde BHV-1 yönünden yapılan ilk çalışma serolojik olup Burgu ve Akça (1986) tarafından gerçekleştirilmiştir. Araştırmacılar (Burgu, 1986) suni tohumlamada kullanılan toplam 47 boğadan aldıkları kan serumlarının 30'unda (%63.8) BHV-1'e karşı nötralizan antikorların varlığını saptamışlar, ancak virus izolasyonu yapmadıklarını bildirmişlerdir.

Bu araştırmada, boğalardan alınan 300 adet kan serumu örneğinin mNT ile 125 tanesinin (%41.66) BHV-1'e karşı antikor içerdiği tespit edilmiştir. Elde edilen %41.66'lık pozitiflik oranı, diğer araştırmacıların saptadığı değerler arasında olmasına rağmen Burgu ve Akça'nın tespit ettikleri orandan (% 63.8) biraz daha düşüktür. Her iki araştırmada da enfeksiyonun boğalar arasında yaygın olarak bulunduğu ortaya konulmaktadır.

Zyambo ve ark.(1973) yaptıkları araştırmada, IBR/IPV virusuna karşı pozitif buldukları hayvanların serum titrelerinin 1/32 ile 1/2048 arasında olduğunu bildirmişlerdir. Mohan ve ark. (1989), yedi boğa istasyonundan topladıkları 210 adet kan serumunun 38 tanesini nötralizasyon testi ile IBR antikorları yönünden pozitif bulmuşlar ve serum nötralizasyon titrelerinin 1/4 ile 1/16 arasında olduğunu ifade etmişlerdir. Yapılan bu araştırmada ise 300 boğa kan serumunun BHV-1 yönünden pozitif bulunan 125'inin SN<sub>50</sub> değerlerinin 1:2.37 ile 1:200 arasında dağılım gösterdiği tespit edilmiştir.

Burgu ve Akça (1986) yaptıkları çalışmada nötralizan antikorlar yönünden kontrol edilen serumlarda, boğaların yaşları ile pozitif serum sayısı arasında yaşa bağlı bir artış olduğunu, 3 yaşın üzerindeki boğalarda pozitiflik oranının % 100'e ulaştığını, 1 yaşındaki hayvanlarda ise % 33.3 civarında olduğunu saptamışlardır.

Öztürk ve ark. (1988) Konya Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsünde solunum sistemi enfeksiyonu geçiren ve daha sonra iyileşen sığırlardan topladıkları kan serumlarının yaş durumlarına göre antikor dağılımlarının 2 yaş ve üzerindeki hayvanlarda yoğunlaştığını (% 89.70) ve bu hay-



vanların yüksek antikor titrelerine sahip olduklarını vurgulamışlardır. Jessett ve Rampton (1975) IBR virusuna karşı nötralizan antikorların 2 yaşın üzerindeki sığırlarda daha fazla görüldüğünü bildirmişlerdir.

Bu araştırmada, BHV-1'e karşı pozitif bulunan boğaların, yaşları ile pozitiflik oranlarının aynı doğrultuda arttığı tespit edilmiştir. Nötralizan antikorlar yönünden pozitiflik oranlarının 1 yaşındaki boğalarda % 36.11, 3 yaşın üzerindeki boğalarda % 93.10 ve 4 yaşın üzerindeki boğalarda ise % 100 olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen sonucun diğer araştırmacıların (Burgu, 1986; Öztürk, 1988; Jessett, 1975) bulguları ile uyum içinde olduğu gözlenmiştir.

Virus izolasyon ve identifikasyonu için hücre kültürleri yaygın olarak kullanılmaktadır (Burgu, 1987; Van Engelenburg, 1993; Yavru, 1998). Edward ve ark (1983), burun akıntısından BHV-1'i tespit etmek amacıyla yaptıkları çalışmada immunofloresan (IF), immunoperoksidaz (IP), ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), reverse passive haemagglutination (RPHA) testleriyle viral antijen varlığının araştırılması ile hücre kültürlerinde virus izolasyon tekniğini karşılaştırmışlardır. Elde ettikleri sonuçlara göre, hücre kültürlerinde virus izolasyonunun diğer 4 teknikten daha duyarlı olduğunu bildirmişlerdir.

Burgu ve Akça (1987), klinik olarak entekte bir dananın burun akıntısından FDB hücre kültürlerine yaptıkları inokulasyonla IBR virusunu izole etmişlerdir. Rao ve Char (1991), şiddetli konjunktivitis olgusu ile seyreden bir enfeksiyon geçiren buffaloların konjunktival swap örneklerinden hücre kültürlerinde IBR virusunu izole ettiklerini ifade etmişlerdir. Yavru ve ark. (1998) tabii ve suni tohumlamada kullanılan boğa spermalarından FDB hücre kültürlerinde 3 adet BHV-1'i izole ederek hücre kültürlerinin izolasyondaki hassasiyetini vurgulamışlardır. Yapılan çalışmada solunum yolu enfeksiyonuna bağlı klinik belirtiler gösteren çeşitli ırklara ait toplam 15 boğadan 8 adet konjunktival swap ve 7 adet de nasal swap örneği alınarak virus izolasyonu amacı ile FDB hücre kültürlerinde pasajlanmış ve sadece bir nasal swap örneğinden virus izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen virus BHV-1'e karşı

tavşanlardan hazırlanan hiperimmün serum ile nötralizasyon testine tabi tutularak BHV-1 olarak identifiye edilmiştir. Elde edilen sonuç hücre kültürlerinin virus izolasyonundaki hassasiyetini ortaya koyarak yukarıda belirtilen araştırmaları desteklemektedir.

Sonuç olarak yapılan araştırma, IBR/IPV enfeksiyonunun boğalar arasında oldukça yaygın olarak bulunduğunu göstermiştir. Araştırmada kullanılan 300 boğa kan serumunun .125'inde (%41.66) nötralizan antikor tespit edilmesi ve SN<sub>50</sub> değerlerinin 1:2.37 ile 1:200 arasında dağılım göstermesi enfeksiyonun boğalar arasında yaygınlığını ortaya koyması bakımından oldukça dikkat çekicidir. Pozitiflik oranlarının, yaşa bağlı olarak artması ve hayvanların tohumlamada aktif olarak kullanıldığı yaşlarda daha yüksek oranda tespit edilmesi önem arz etmektedir. Solunum sistemi ile ilgili klinik belirtileri gösteren bir boğadan alınan nasal swaptan BHV-1'in izolasyonu, virolojik kontrollerin yapılmasının önemini ortaya koymaktadır.

Sığırların viral hastalıkları içinde önemli yeri olan IBR/IPV enfeksiyonları solunum, sindirim, merkezi sinir sistemi hastatığı, abort, infertilite ve neonatal ölümlere yol açmaktadır. Bu nedenle seropozitif bulunan hayvanların virus izolasyonu yapılmasa bile işletmeden çıkarılması, bilhassa damızlık olarak kullanılmaması ve tohumlamada kullanılan hayvanların belirli zaman dilimlerinde serolojik ve virolojik kontrollerinin yapılması önerilmektedir.

## Kaynaklar

- Ackermann, M. and Wyler, R. (1984). The DNA of an IPV strain of bovid herpesvirus-1 in sacral ganglia during latency after intravaginal infection. *Vet. Microbiol.* (9), 53-63.
- Burgu, İ. ve Akça, Y. (1982). Gelemen Devlet Üretme Çiftliği sığırlarında bazı viral enfeksiyonlara karşı serolojik araştırmalar. *A.Ü. Vet. Fak. Derg.*, 29 (3-4), 506-512.
- Burgu, İ. ve Akça, Y. (1986). Türkiye' de suni tohumlamada kullanılan bazı damızlık boğalarda IBR/IPV enfeksiyonu. *A.Ü. Vet. Fak. Derg.*, 33 (1), 113-121.
- Burgu, İ. and Akça, Y. (1987). First isolation of IBR virus in Turkey. *Trop. Anim. Hlth. Prod.*, (19), 56.

- Burgu, İ. ve Özkul, A. (1991). Hayvan ve biyolojik madde ithalatının viral hastalıklar yönünden önemi. II Hayvancılık Kongresi. 323-333.
- De Gee AL, Wagter LH, Hage JJ. (1996). The use of a polymerase chain reaction assay for the detection of bovine herpesvirus 1 in semen during a natural outbreak of infectious bovine rhinotracheitis. *Vet. Microbiol*; 53 (1-2), 163-8.
- Edward, S., Chasey, D. And White, H. (1983). Experimental infectious bovine rhinotracheitis: Comparison of four antigen detection methods. *Res.Vet. Sci.*, (34), 42-45.
- Erhan,M., Onar, B., Csontas, L., Hopkins, I.G. (1971). Serological survey on some virus and bedsonia diseases of cattle. *Pendik Vet. Kont. Arş. Derg.*, 4 (2), 55-58.
- Frey, H.R. and Liess,B. (1971). Vermehrungskinetik und verwendbarkeit eines stark zytopatogenen VD-MD virusstammes für diagnostische untersuchungen mit der mikrotiter-methode. *Zbf. Vet. Med. Bul.*, (18), 61-71.
- Jessett, D.M. and Rampton, C.S. (1975). The incidence of antibody to infectious bovine rhinotracheitis virus in Kenya Cattle. *Res.Vet.Sci.*, (18), 225-226.
- Kaashoek MJ, Rijsewijk FA, Oirschot JT.(1996). Persistence of antibodies against bovine herpesvirus 1 and virus reactivation two to three years after infection. *Vet Microbiol*; 53(1-2), 103-10.
- Kaashoek MJ, Straver PH, Van Rooij EM, Quak J, Van Oirschot JT. (1996). Virulence, immunogenicity and reactivation of seven bovine herpesvirus 1.1 strains: clinical and virological aspects. *Vet. Rec.* 26, 139(17), 416-21.
- Kaerber, G. (1964). In diagnostic procedures for virus and rickettsial disease. *Public.Healt.Ass. (New York)*., (3),48-50.
- Kahrs, R.F. (1977). Infectious bovine rhinotracheitis. A review and update. *J.A.V.M.A.*, 171 (10), 1055-1064.
- Kahrs, R.F., Gibbs, E.P.J. and Larsen, R.E. (1980). The search for viruses in bovine semen, A review. *The-riogenology*, (14),151-165.
- Kupferschmied, H.U., Kihm, U., Bachmann, P., Muller, K.H. and Ackermann, M. (1986). Transmission of IBR/IPV virus in bovine semen : A case report. *The-riogenology*, (25),439-44
- Miller, J.M. (1991). The effect of IBR virus infection on reproductive function of cattle. Symposium on IBR virus. *Vet.Med.*, 45 (4), 790-794.
- Mohan, M., Singh, B.K. and Manickam, R. (1989). Seropidemiological studies on infectious bovine rhinotracheitis (IBR) in bulls. *Indian Vet.J.*, 66 (10), 914-916.
- Mweene AS, Okazaki K, Kida H. (1996). Detection of viral genome in non-neural tissues of cattle experimentally infected with bovine herpesvirus 1. *Jpn. J. Vet. Res.* 44 (3), 165-74.
- Öztürk, F., Toker, A. ve Yavru, S. (1988). Konya Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü sığırlarında infectious bovine rhinotracheitis/ infectious pustular vulvovaginitis (IBR/IPV) üzerinde araştırmalar. *S.Ü.Vet.Fak.Derg.*, 4(1), 53-64.
- Rao, M.R.K. and Char, N.L. (1991). An outbreak of infectious bovine rhinotracheitis in Buffaloes affected with conjunctivitis. *Indian Vet. J.*, 68, 696-697.
- Saxegaard, F. (1966): Problems connected with the diagnosis of subclinical infection with infectious pustular vulvovaginitis virus (IPV virus) in bulls. *Nord.Vet.Med.*, 18: 452-459.
- Sellers, R.F. (1983) : Transmission of viruses by artificial breeding techniques: a review. *J. Royal Soc. Med.*, 76 (9): 772-775.
- Sheffy, B.E. and Rodman, S. (1973): Activation of latent infectious bovine rhinotracheitis infection. *J.A.V.M.A.*, (163), 850-851.
- Singh, B.K., Sreenivasan, M.A., Tonagaonkar, S.S. , Kant, and Choudhury, P.N.R. (1986). Isolation of infectious bovine rhinotracheitis virus from semen and aborted materials of dairy cattle. *Indian J. Anim. Sci.*, 56 (8), 823-826.
- Spradbrow, P.B. (1968). The isolation of infectious bovine rhinotracheitis virus from bovine semen. *Aust.Vet.J.*, (44), 410-412.
- Van Engelenburg, F.A.C., Maes, R.K., Van Oirschot, J.T. and Rijsewijk, F.A. (1993). Development of a rapid and sensitive polymerase chain reaction assay for detection of bovine herpesvirus type 1 in bovine semen. *J.Cli.Mic.*, 31 (12), 3129-3135.
- Van Oirschot,J.T., Straver, P.J., Van Lieshout, J.A.H., Quak, J., Westenbrink, F. and Exsel, A.C.A. (1993). A subclinical infection of bulls with bovine herpesvirus type 1 at an artificial insemination centre. *Vet.Rec.*, (9),32-35.
- Yavru, S., Öztürk, F., Şimşek, A., Yapıkçı, O. ve Yıldız, C. (1998). Suni ve tabii tohumlamada kullanılan boğaların spermalarından virus izolasyonu. III. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi, 23-25 Eylül, Bursa, 111-112.
- Zyambo, G.C.N., Allan, P.J., Dennett, D.P. and Johnson,R.H. (1973). A passive haemagglutination test for the demonstration of antibody to infectious bovine rhinotracheitis/ infectious pustular vulvovaginitis virus. *Aust. Vet.J.*, (49), 413-417.