

SUNİ ve TABİİ TOHURLAMADA KULLANILAN BOĞALARIN SPERMALARINDAN VİRUS İZOLASYONU

Sibel Yavru¹

Feridun Öztürk¹

Atilla Şimşek¹

Orhan Yapkiç¹

Cengiz Yıldız²

Virus Isolation From Semen of Bulls that using Artificial and Natural Insemination

Summary: In this study; 60 semen samples from the artificial insemination centre in Ankara and also from the bulls - under the possessions of farmers- brought to be slaughtered in Meat and Fish Foundation Slaughterhouse in Konya were examined for virus isolation on sensitive cell cultures. As a result of inoculation of 60 semen samples onto cell cultures, 5 viruses were isolated. 3 of the isolated viruses were identified as Bovine Herpesvirus Type 1 (BHV-1) according to the results of cross microneutralisation test by rabbit hyperimmun sera.

Key words: Bull, semen, virus isolation.

Özet: Bu araştırmada; Ankara'da bulunan suni tohumlama istasyonundan ve ayrıca halkın elinde bulunan, Konya Et ve Balık Kurumu Mezbahasında kesime getirilen, aşımında kullanılmış boğalardan alınan 60 sperma örneğinden duyarlı hücre kültürlerinde virus izolasyonu çalışmaları yapılmıştır. İncelenen 60 sperma örneğinin hücre kültürlerine inokulasyonu sonucu 5 adet virus izole edilmiştir. İzole edilen virusların 3 tanesi, tavşanlardan hazırlanan hiperimmün serumla yapılan çapraz mikroneutralizasyon testi sonuçlarına göre Bovine Herpesvirus tip-1 (BHV-1) olarak tanımlanmıştır.

Anahtar kelimeler: Boğa, sperma, virus izolasyonu

Giriş

Enfeksiyonlara bağlı olarak spermada, viruslar da dahil olmak üzere çeşitli mikroorganizmalar bulunabilir. Bu etkenler, suni ve tabii tohumlama yoluyla hassas hayvanlara nakledilebilirler. Suni tohumlama istasyonlarında, viral enfeksiyon yönünden kontrolleri yapılmamış enfekte hayvanlardan alınan spermaların dondurularak saklanması sırasında içerdikleri viruslar inaktive olmazlar ve varlıklarını kolaylıkla devam ettirirler. Bu durum enfeksiyonun spermalarla tohumlanan hassas hayvanlara bulaşmasına ve hatta embriyoyu etkileyen çeşitli sonuçlarla karşılaşılmasına neden olur. Bütün dünyada, bu sebeplerden dolayı, suni tohumlama istasyonlarında hem verici boğaların hem de onlardan elde edilen spermaların virolojik

kontrolü büyük önem taşımaktadır. Türkiye'de gerek suni tohumlama istasyonlarında gerekse tabii tohumlamada kullanılan boğalar şimdiki kadar ciddi bir virolojik kontrole tabi tutulmamış ancak serolojik kontrollerle taranmış ve işletmelere gerekli bilgiler verilmiştir.

Spermadan virus izolasyonunun insan, sığır, koyun, at ve domuzlardan yapıldığı bildirilmiştir (Lang ve Kummer, 1975; Sellers, 1983). Sığır spermından izole edilen viruslar arasında; İnfeksiyöz Bovine Rhinotracheitis / İnfeksiyöz Pustular Vulvovaginitis/ İnfeksiyöz Pustular Balanopostitis (IBR/ IPV/ IPB), Foot and Mouth Disease (FMD), Bluetongue (BT), Bovine Viral Diarrhea (BVD), Bovine Leukemia (BL), Ephemeral Fever (EF) ve Lumpy Skin Disease (LSD) virusları sayılabilir (Breckon ve ark., 1980; Cottral ve ark., 1968; Lowen ve Darcel,

Geliş Tarihi : 11.11.1998

1.S.Ü.Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı, KONYA.

2.Y.Y.Ü.Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, VAN.

1985; Parsonson ve Snowdon, 1974; Paton ve ark., 1990; Van Engelenburg ve ark., 1993; Welton ve ark., 1979; Wentink ve ark., 1993). Boğalar üzerinde yapılan bazı araştırmalarda ise, spermadan enteroviruslar, parapoxvirus ve bazı karakterize edilmemiş virusların da izole edildiği bildirilmiştir (Afshar ve Eaglesome, 1990; Afshar ve ark., 1991; Kahrs ve ark., 1980).

Sperma ile nakledilen önemli viruslardan bir tanesi olan İnfeksiyöz Bovine Rhinotracheitis virusunun sağlıklı hayvanlara bulaşmasında akut veya latent enfekte evcil ve yabancı hayvanlar (Abraham ve ark., 1982; Kupferschmied ve ark., 1986; Misra ve Mishra, 1987), suni tohumlamada kullanılan spermalar (Dennett ve ark., 1973; Elazhary ve ark., 1980; Kupferschmied ve ark., 1986), embriyo transferi (Burgu ve Özkul, 1991) ve keneler (Taylor ve ark., 1982) önemli rol oynamaktadır.

IBR ile akut, subklinik veya latent enfekte boğalardan alınan spermalar kullanılıncaya kadar likit nitrojende dondurularak saklandıkları için suni tohumlama yolu ile enfeksiyonun yayılmasına neden olabilmektedirler. Yapılan çalışmalarda seropozitif olduğu tespit edilen boğaların epidemiyolojik olarak virus taşıyıcısı olduğu ve virusun yayılmasında rol oynadığı kabul edilmektedir (Afshar ve Eaglesome, 1990; Burgu ve Özkul, 1991; Paton ve ark., 1990). Saxegaard (1966), Spradbrow (1968) suni tohumlama merkezlerindeki boğalardan elde edilen dondurulmuş sperma numunelerinden virüsü izole ettiklerini bildirmişlerdir. Burgu ve Akça (1986), suni tohumlama istasyonlarında kullanılan damızlık boğalarda IBR/IPV enfeksiyonlarının tespiti amacıyla boğalardan topladıkları kan serumlarında nötralizan antikorların varlığını tespit etmişlerdir.

Boğalarda peniste meydana gelen IPB enfeksiyonu normal üreme fonksiyonuna engel olur (Miller, 1991; Sellers, 1983). Virus ile enfekte boğalar, spermalarında virüsü taşıdığı için tabii döllenmede uterus içine giren virusun, endometritis oluşturarak ineklerde geçici bir infertiliteye neden olabildiği bildirilmektedir (Miller, 1991; Misra ve Mishra, 1987).

Türkiye'de sığır yetiştiriciliğinde suni tohumlamanın önemi ve etkisi g

maktadır. Halkın elinde bulunan yerli ırklar giderek üstün verime sahip ırklarla yer değiştirmektedir. Uygulamanın geniş bir alana yayılmasına rağmen, ülkemizde suni tohumlama istasyonlarından elde edilen spermaların virolojik kontrolleri yapılmamaktadır. Türkiye' de şimdiye kadar suni tohumlama istasyonlarında bulunan verici boğaların serolojik kontrolleri üzerine çalışmalar yapılmış olmasına rağmen, spermadan virus izolasyonunu bildirilen bir araştırma yoktur. Bu çalışmada; Ankara'daki suni tohumlama istasyonunda bulunan ve Konya Et ve Balık Kurumu Mezbahalarında kesime getirilen boğalardan elde edilen spermaların virolojik olarak kontrol edilmesi sonucunda spermanın viral kontaminasyonunun tespiti, uygulanan metodun bundan sonra yapılacak araştırmalara yol göstermesi ve ayrıca viral enfeksiyonların suni tohumlamada kullanılan spermalar vasıtası ile hassas hayvanlara yayılabileceğinin ortaya konulması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Virus İzolasyon Materyali İçin Örneklenen Hayvanlar:

Ankara'daki suni tohumlama istasyonundan payetlenerek dondurulmuş ve Konya'da halkın elinde bulunan, aşımada kullanıldığı tespit edilen, Konya Et ve Balık Kurumu Mezbahasına kesime getirilen 3-10 yaşları arasında çeşitli ırklara ait boğalardan sağlanan toplam 60 adet sperma örneği izolasyon materyali olarak kullanıldı (Tablo 1).

Tablo 1. Virolojik kontrol amacıyla sperma örneklerinin alındığı yerler

Sperma Örneklerinin Alındığı Yer	Önek Sayısı
L.H.A.E.*	29
Konya**	31
TOPLAM	60

* Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü, ANKARA.

** Halk elinde bulunan ve doğal aşımada kullanılan boğalar.

Virolojik Kontrol Amacıyla Sperma Örneklerinin Hazırlanması:

Virus izolasyonu amacıyla toplanan sperma örnekleri Lowen ve Darcel (1985)'in bildirdikleri metottan faydalanılarak hazırlandı. Bu yöntemle göre sperma örnekleri Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) ile 1/10 oranında sulandırıldı. Daha sonra 2x antibiyotik (100 IU/ml penisilin, 100 mg/ml gama streptomisin ve 0.05 mg/ml kanamisin) ilave edildi. Sterilite kontrolleri yapılarak kullanılıncaya kadar -80 °C'de saklandı.

Hücre kültürleri:

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

Virus:

Araştırmada hiperimmün serum sağlamak amacıyla IBR/IPV virusunun Colorado referens suşu kullanıldı.

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 yöntemine (1964) göre hesaplanarak virusun titresi tespit edildi.

Tavşanlardan Hiperimmün Serum Elde Edilmesi:

Araştırmada doku kültürlerinde CPE meydana getiren virusların identifikasyonu amacıyla, IBR/IPV virusuna karşı tavşanlardan hazırlanan hiperimmün serum kullanıldı. IBR/IPV virusunun Colorado referans 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 ($DKID_{50}:10^{-4.75}/0.05$ 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 serumların titreleri tespit edilerek izole edilen virusun identifikasyon çalışmalarında kullanıldı.

Mikronötralizasyon Testi:

Tavşanlardan Elde Edilen Hiperimmün Serumun mNT ve Serum Nötralizasyon SN_{50} Değerlerinin Saptanması:

Hiperimmün serumda BHV-1'e karşı oluşan antikörlerin saptanması Frey ve Liess (1971)'in, SN_{50} değerlerinin tespiti ise Kaerber (1964)'in bildirdikleri metoda göre yapıldı.

Virolojik Araştırmalar:

Sperma Örneklerinden Virus İzolasyonu:

Bu amaçla yukarıda bildirildiği şekilde hazırlanan sperma örnekleri depolandıkları derin dondurucudan (-80 °C) alınarak 37 °C'lik su banyosunda hızla çözdürüldü. Lowen ve Darcel (1985)'in bildirdiği yöntemle uygun olarak hazırlanan her bir sperma numunesi iki adet FDB hücre kültürüne adsorbsiyona bağlı virus ekim yöntemi ile 0.2 ml miktarında inokule edildi. 37 °C'de CO_2 'li etüvde 1 saat inkubasyon 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 inkubasyona 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 edildiler. Santrifuj sonrası hücre sedimentinin üstündeki sıvı, inokulasyon materyali olarak kullanıldı. Sperma örneklerinin bu yöntemle FDB hücre kültürlerinde 3 kör pasajı yapıldı ve 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 sperma örneklerinden izole edilen virusların titrasyonu da Frey ve Liess (1971)'in bildirdiği yöntemle yapıldı.

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

Sperma örneklerinden, hücre kültürlerine inokulasyonları sonrasında izole edilen virusun, identifiye edilmesi amacıyla hiperimmün serum kullanıldı. Bu amaçla, tavşanlardan hazırlanan ve $SN_{50} = 1/32$ titre değerindeki BHV-1 hiperimmün serum, 100 DKID₅₀ oranında sulandırılmış olan her bir izolat ile ayrı ayrı çapraz mNT'ne tabi tutuldu. Testin sonucu doku kültürü mikroskopunda değerlendirildi.

Bulgular**Virusun Titrasyonu:**

Serolojik çalışmalarda kullanılan BHV-1 Colorado suşunun MDBK hücre kültüründe enfeksiyözite gücü Kaerber (1964)'e göre 100 DKID₅₀ $\approx 10^{-4.75}/0.05\text{ml}$ olarak hesaplandı.

Mikronötralizasyon Testi Sonucu:**Hiperimmün Serumların SN₅₀ Testi Sonuçları:**

Mikronötralizasyon testi sonunda sulandırılmamış serum örneğinde, BHV-1 antikoru yönünden pozitif olduğu saptanan hiperimmün serumun SN₅₀ değeri 1/32 olarak tespit edildi.

Virolojik Çalışmalar:**Sperma Örneklerinden Virus İzolasyonu:**

Araştırmada kontrol edilen 60 adet boğa sperması örnekleri FDB hücre kültüründe 3 kez pasajlandı. FDB hücre kültüründe 2. ve 3. pasajlarda karakteristik CPE gösteren 5 adet virus izolasyonu gerçekleştirildi (Tablo 2). Diğer sperma örneklerinin hücre kültürüne yapılan inokulasyonlarında, herhangi bir viral ajan tespit edilemedi. Nonsitopatojen virus suşları için viral antijen yönünden herhangi bir araştırma yapılmadı.

Tablo 2. Virus izole edilen spermaların dağılımı.

Sperma Örneklerinin Alındığı Yer	Örnek Sayısı	Virus İzole Edilen Sperma Sayısı
L.H.A.E.	29	1
Konya	31	4
TOPLAM	60	5

İzole Edilen Virusların Mikrotitrasyon Testi Sonuçları:

Spermadan izole edilen virusların, MDBK hücre kültüründe enfeksiyözite gücü Kaerber (1964)'e göre tespit edildi (Tablo 3).

Tablo 3. İzolatların MDBK hücre kültürlerinde titrasyonu.

İzolat No	100 DKID ₅₀ /0.05 ml.
İzolat 1	10 ^{-2.70}
İzolat 2	10 ^{-2.45}
İzolat 3	10 ^{-1.45}
İzolat 4	10 ^{-1.20}
İzolat 5	10 ^{-1.95}

BHV-1'e Karşı Hazırlanan Hiperimmün Serum ile İzole Edilen Virusun mNT Sonucu:

Sperma örneklerinden izole edilen sitopatojen viruslar BHV-1'e karşı hazırlanmış hiperimmün serum ile MDBK hücre kültüründe yapılan mNT sonunda, izole edilen viruslardan 3 tanesi BHV-1 olarak identifiye edildi (Tablo 4).

Tablo 4. BHV-1'e karşı tavşanlardan hazırlanmış hiperimmün serum ile izolatların çapraz nötralizasyon testi sonuçları.

İzole Edilen Virus Örnekleri	CPE	mNT
İzolat 1	+	-
İzolat 2	-	+
İzolat 3	+	-
İzolat 4	-	+
İzolat 5	-	+

Tartışma ve Sonuç

Suni tohumlama merkezlerinde hazırlanan spermalar -196 °C'de dondurularak saklanır ve gerektiği zaman istenilen yere gönderilir. Çeşitli şekillerde spermaya bulaşan virusların dondurma işlemi sırasında ve sonrasında etkilenmemeleri viral enfeksiyöz hastalıkların sığır populasyonları arasında yayılma ihtimalini artırmaktadır. Spermanın mikrobiyal kontaminasyonunun kontrolü ve engellenmesi ancak bu işten sorumlu laboratuvarlarda çalışan kişiler tarafından yapılabilir. Spermanın kontaminasyonu, sulandırılarak çoğaltılması sırasında ortama katılan antimikrobiyal ajanlar tarafından bir ölçüde engellenebilir. Ancak bu güne kadar, spermadaki virusların kontrolü için kullanılan antimikrobiyal ajanlar viruslara etkili olmamıştır. Suni tohumlama merkezlerinde bulunan ve genetik olarak mükemmel bir yapıya sahip olan boğaların, viral enfeksiyonlardan etkilendiği zaman işletmeden uzaklaştırılması pratik ve ekonomik bir çözüm değildir. Çözüm daha çok bir seferde alınan ve sulandırılarak çoğaltılan spermanın uygun laboratuvarlarda virus mevcudiyeti yönünden araştırılmasında aranmalıdır. Bugüne kadar bu yönde yapılan birçok araştırmada spermadan çok sayıda virus izole edildiği bildirilmiştir (Bowen ve Howard, 1984; Cottral ve ark., 1968; Johnston ve Deas, 1971; Lowen ve Darcel, 1985; Lucas ve ark., 1980; Meyling ve Jensen, 1988; Nussbaum ve ark., 1993; Parsonson ve Snowdon, 1974; Parsonson ve ark., 1994; Weldon ve ark., 1979).

Bu çalışmada, suni tohumlama istasyonunda bulunan ve halkın aşımında kullandığı, Et ve Balık Kurumu Mezbahasına getirilen boğalardan alınan sperma örneklerinin virolojik kontrolleri yapılarak, özellikle sığırlarda viral enfeksiyonlara bağlı fertilité problemleri arasında önemli yer tutan IBR/IPV/IPB enfeksiyonu etkeni olan BHV-1'in izolasyonu amaçlanmıştır.

Burgu ve Akça (1986), suni tohumlamada kullanılan damızlık boğalarda IBR/IPV/IPB enfeksiyonunun varlığını tespit etmek amacıyla, boğalardan topladıkları kan serumlarında nötralizan antikorların varlığını tespit etmişlerdir. Elde ettikleri bulgular sonunda latent enfekte boğaların devamlı

virus taşıyıcısı ve saçıcısı olabilecekleri ve bu nedenle suni tohumlama merkezlerinde aktif durumda bulunan boğaların, en küçük hastalık belirtilerinde bile özellikle sperma, prepusyal çalkantı sıvısı, lökosit ve burun akıntısı örneklerinden virus izolasyon çalışmalarının yapılması ve düzenli yapılan serolojik kontrollerde pozitif bulunan boğaların damızlıktan çıkarılması gerektiğini vurgulamışlardır.

Enfeksiyon, sağlıklı hayvanlara akut, subklinik veya latent enfekte hayvanlar vasıtasıyla bulaşır (Sheffy ve Rodman, 1973). Latent enfekte hayvanlardaki virus stres, doğum, bir yerden başka bir yere nakil, aşılama ve kortikosteroidlerin uygulanması sonucunda yeniden aktive olarak saçılmaya başlar. Bu nedenle tüm latent enfekte hayvanlar virus rezervuarı olarak tanımlanırlar (Den-net ve ark., 1973; Nettleton ve Sharp, 1980). Akut, subklinik veya latent enfekte boğalardan alınan spermalar likit nitrojende dondurularak kullanılıncaya kadar saklandığı için suni tohumlama yolu ile enfeksiyonun yayılmasına neden olurlar. Bu nedenle seropozitif boğaların epidemiyolojik olarak virus taşıyıcısı olduğu ve virusun yayılmasında rol oynadığı kabul edilmektedir (Afshar ve Eaglesome, 1990; Kupferschmied ve ark., 1986).

Burgu ve Akça (1986) tarafından bildirilen ve yukarıda belirtilen araştırmalarda da dikkat çekildiği gibi izolasyon çalışmalarının seroloji ile desteklenmesi büyük bir önem taşımaktadır. Bundan sonra yapılması planlanan çalışmalarda serolojik kontrollerin de yer alması ve araştırmada elde edilen sonuçların, işletmeler tarafından değerlendirilmesi gerekmektedir. Bu görüş Kupferschmied ve ark. (1986) tarafından belirtilen, sperma örneklerinin alınmasından önce boğaların IBR/IPV/IPB enfeksiyonuna karşı seronegatif olması gerektiği düşüncesi ile paralellik göstermektedir.

Elazhary ve ark. (1980) abortus ve fertilité problemlerinin görüldüğü bir işletmede bulunan verici boğalar üzerinde yaptıkları çalışmada, tabii tohumlamada kullanılan bir boğadan aldıkları sperma örneğinden IF testi ile BHV-1 antijeninin varlığını saptamışlar ve virus izolasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Aynı boğa ile tohumlanan ineklerin uterus sekresyonundan BHV-1'in de izolasyonunu gerçekleştirerek suni tohumlama yolu ile

kullanılan spermaların viral enfeksiyonların yayılmasında önemli bir rol oynadığına dikkati çekmişlerdir.

Abraham ve ark. (1982) İsrail'de inek ve boğaları etkileyen ve yaygın olarak seyreden bir enfeksiyonun araştırılmasında nazal, konjunktival akıntı, prepusyal çalkantı sıvısı ve sperma örneklerinden IBR/IPV virusunu izole ettiklerini, ancak vaginal akıntıdan virus izole edemediklerini bildirerek enfeksiyondan etkilenen bütün hayvanların kan serumlarında IBR/IPV virusuna karşı nötralizan antikorlar tespit ettiklerini bildirmişlerdir.

Collery (1974), infertilite problemi görülen 14 inek ve 1 boğanın bulunduğu bir işletmeden aldığı 2 vaginal swap ve 1 prepusyal çalkantı sıvısından IBR/IPV virusu izole ettiğini belirtmiştir.

Bu çalışmada, suni tohumlama merkezinden ve halk elinde bulunan boğalardan alınan sperma numunelerinden virus izole edilerek, IBR/IPV/IPB virusunun spermada bulunabileceği, suni veya tabii tohumlama ile hassas hayvanlara nakledilebileceği ve dondurularak saklanan spermalarda virusun inaktive olmadığı görüşü bir kez daha doğrulanmıştır.

Virusun izolasyon ve identifikasyonu amacıyla immunperoksidaz (IP), immunfloresan (IF), reserve passive haemagglutination (RPHA), ELISA, polymerase chain reaction (PCR), deney hayvanları ve hücre kültürleri yaygın olarak kullanılmaktadır (Edward ve Gitao, 1987; Elazhary ve ark., 1980; Reed ve ark., 1971).

IBR/IPV/IPB virusu doğal konakçıları dışında sığırlardan orijin alan fetal dana böbrek, akciğer, türbinat ve deri ile koyunların fetal akciğer ve devamlı hücre kültürlerinden MDBK hücre kültürlerinde de üretilmektedir (Nettleton ve Sharp, 1980; Theodoridis, 1978).

Singh ve ark. (1986), IBR/IPV/IPB virusunun izolasyon çalışmalarında FDB ve türbinat hücre kültürlerinin ilk izolasyonda MDBK hücre kültüründen daha duyarlı olduğunu bildirmişlerdir. Kahrs ve ark. (1980), hücre kültürü ile virus izolasyonunun yaygın olarak kullanılmasına rağmen oldukça zaman alan ve pahalı bir yöntem olduğunu belirtmişlerdir. Loewen ve Darcel (1985) BHV-1'in

teşhisinde, spermayı iki ayrı metot ile hazırlayarak hücre kültürüne inokule etmişler ve bu iki tekniğin birbirine olan üstünlüğünü araştırmışlardır. Sonuçta hangi metot olursa olsun hücre kültürü tekniğinin virus izolasyon çalışmalarında tercih edilmesi gereken bir yöntem olduğunu ifade etmişlerdir. Van Engelenburg ve ark. (1993) PCR tekniğinin pahalı bir yöntem olmasına rağmen, sonucun 1 gün gibi kısa bir sürede alınması diğer izolasyon metodlarında bu sürenin en kısa 7 gün olması nedeniyle, izolasyon tekniklerine alternatif olabileceğini belirtmişlerdir. Spermanın hücre üzerine olan toksik etkisi, hücre kültürü tekniğinin diğer bir dezavantajı olarak belirtilmiş olup, yapılan çalışmalarda bu toksik etkinin spermanın sulandırılması ile giderilebileceği bildirilmiştir (Lowen ve Darcel, 1985). Ayrıca araştırmacılar, spermada bulunan virus miktarı az ise, numunenin hücre kültüründe minimum 3 kör pasajının yapılması gerektiği, bazen de az toksik etkinin hücre kültürlerinde CPE olarak gözlenebileceğini bu yüzden kör pasajların mutlaka yapılması ve hiç değilse hücrelerin boyanarak virusa özel sitoplazmik inklüzyon cisimciklerinin tespit edilmesi gerektiğini önemle vurgulamışlardır.

Bu çalışmada, spermadan virus izolasyonu amacıyla hücre kültürü tekniği kullanılmıştır. Diğer araştırmacıların da belirttiği gibi pahalı bir yöntem olmasına ve oldukça uzun bir zaman almasına rağmen izolasyon çalışmalarındaki hassaslığı tartışılmazdır. Çalışmada spermanın hücre kültürleri üzerindeki toksik etkisi 1/10 oranında sulandırılarak giderilmiş ve kör pasaj sayısı 3 olarak tespit edilerek diğer araştırmalar ile uyumlu olması sağlanmıştır.

Sığır yetiştiriciliğinde fertilité problemlerine neden olan enfeksiyonlar içinde IBR/IPV/IPB/ enfeksiyonları önemli bir yer alır. Türkiye'de yapılan serolojik çalışmalarda IBR enfeksiyonları yönünden hayvanların yüksek oranlarda antikor içermesi dikkat çekicidir. Bu durum hayvanların enfeksiyonu latent olarak taşıyabileceğini, virusun çeşitli faktörlerin etkisi ile aktif hale geçerek enfeksiyonu çevreye yayabileceğini göstermektedir. IBR/IPV/IPB virusu ile enfekte boğalardan alınan sperma ile tohumlanan ineklerde geçici de olsa kısa süreli bir infertilite oluşabileceği bilinen bir sonuçtur.

Her tür hayvan yetiştiriciliğinde olduğu gibi sığır yetiştiriciliğinde de enfeksiyon hastalıklardan korunma önemli yer tutar. Bu nedenle suni tohumlamada ve tabii döllemede kullanılan boğaların düzenli periyodlarla serolojik kontrollerden geçirilmesi, sperma, prepusyal çalkantı sıvısı, lökosit, burun ve göz akıntısı numunelerinden virus izolasyon çalışmaları yapılması gerekmektedir. Serolojik olarak pozitif olan veya virus izolasyonu yapılan boğaların damızlık olarak kullanılmasından kesinlikle vazgeçmek gereklidir. Böylece suni tohumlama merkezlerindeki viral enfeksiyonların kontrol altına alınması sağlandığı gibi, spermada bulunan bir virusa bağlı enfeksiyonun hassas hayvanlara bulaşma ihtimali de kesin olarak önlenmiş olacaktır. Bu araştırma, Türkiye'de bundan sonra yapılacak olan çalışmalara yol göstereceği gibi, hayvan yetiştiriciliğinde verimin artmasını sağlayarak, suni tohumlama merkezlerinin enfeksiyonlar yönünden güvenilirliğinin artmasına neden olacaktır.

Kaynaklar

Abraham, A., Ayolan, N. and Marcus, S. (1982). An outbreak of IBR/IPV infection in bulls and dairy cattle in İsrail . 1. Clinical and diagnostic aspects . Refuah Veterinarith, 39 (3), 93-98.

Afshar, A. and Eaglesome, M.D. (1990). Viruses associated with bovine semen, Vet. Bull., 60 (2), 93-109.

Afshar, A., Dulac, G.C., Dubuc, C. And Howard, T.H. (1991). Comparative evaluation of the fluorescent antibody test and microtiter immunoperoxidase assay for detection of bovine viral diarrhoea virus from bull semen. Can.J.Vet.Res.,(55), 91-93.

Bowen, R.A. and Howard, H.T. (1984). Transmission of bluetongue virus by intrauterine inoculation or insemination of virus- containing bovine semen. Am.J.Vet.Res., 45 (7), 1386-1388.

Breckon, R.D., Luedke, A.J. and Walton, T.E. (1980). Bluetongue virus in bovine semen: Viral isolation. 41 (3), 439-441.

Burgu, İ. (1980). İnfeksiyöz bovine rhinotracheitis/ infeksiyöz pustular vulvovaginitis (IBR/IPV), Koital exanthem/ infeksiyöz bovine necrotic rhinotracheitis, Vet.

Hek.Der.Derg., 50 (1-2), 33-40.

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. ve Özkul, A. (1991). Hayvan ve biyolojik madde ithalatının viral hastalıklar yönünden önemi. II Hayvancılık Kongresi. 323-333.

Collery, P. (1974). Isolation of the virus infectious bovine rhinotracheitis / Infectious pustular vulvovaginitis during an outbreak of genital disease. Irish.Vet.J., (28), 89-92.

Cottral, G.E., Gailunas, P. and Cox B.F. (1968). Foot-and-Mouth disease virus in semen of bulls and its transmission by artificial insemination. Archiv für die gesamte Virus forschung.(23), 362-377.

Dennett, D.P., Allan, P.J. and Johnson, R.H. (1973). The use of corticosteroids to aid detection of bulls carrying infectious bovine rhinotracheitis virus. Aust. Vet. J., (49), 594-595.

Dinter, Z. And Morein, B. (1990). Virus Infections of Ruminant. In: Straub, O.C.: Infectious bovine rhinotracheitis virus, pp.78-108.

Edward, S. and Gitao, G.C. (1987). Highly sensitive antigen detection procedures for the diagnosis of infectious bovine rhinotracheitis : Amplified ELISA and reserve passive hemagglutination. Vet. Mic., (13), 135-141.

Elazhary, M.A.S.Y., Lamothe, P., Silim, A. and Roy, R.S. (1980). Bovine herpes virus type 1 in the sperm of a bull from a herd with fertility problems. Can.Vet.J., (21), 336-339.

Frey, H.R. and Liess, B. (1971). Vermehrungskinetik und verwendbarkeit eines stark zytopatogenen VD-MD virusstammes für diagnostische untersuchungen mit der mikrotiter-methode. Zbl.Vet.Med.Bul., (18), 61-71.

Johnston, W.S. and Deas, D.W. (1971). Isolation of paravaccinia virus from bovine semen. Vet.Rec., (10), 450.

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.

Kaminjolo, J.S., Nyaga, P.N., Omuse, J.K. and Mutiga, E.R. (1975). Infectious bovine rhinotracheitis- Infectious

- pustular vulvovaginitis viral isolates from cattle with epididymis and vaginitis. *Am.J.Vet.Res.*, 36 (1), 123-125.
- 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. *Theorogenology*, (25),439-44
- Lang, D.J. and Kummer, J.F. (1975). Cytomegalovirus in semen: Observations in selected populations. *J.Infec.Dis.*, 132 (4), 472-473.
- Lomba, F., Bidniet, V. and Wellemans, G. (1976). IBR virus and occurrence of metritis at parturition in the bovine Belgian blue , white breed. *Br.Vet.J.*, (132), 178-181.
- Lowen, K.G. and Darcel, C.le Q. (1985). A comparison of two methods for the isolation of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) from extended bovine semen. *Theorogenology*,23 (6), 935-943.
- Lucas, M.H., Dawson, M., Chasey, D., Wibberley, D.H. and Roberts, D.H. (1980). Enzootic bovine leucosis virus in semen. *Vet.Rec.*, (2), 128.
- Meyling, A. and Jensen, A.J. (1988). Transmission of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) by artificial insemination (AI) with semen from a persistently-infected bull. *Vet.Mic.* (17), 97-105.
- 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.
- Misra, P.K. and Mishra, A. (1987). Infectious bovine rhinotracheitis virus infection and infertility in cows, heifers and bulls. *Indian J. Ani. Sci.*, 57 (4), 267-271.
- 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.
- Nettleton, P.F. and sharp, J.M. (1980). Infectious bovine rhinotracheitis virus excretion after vaccination. *Vet.Rec.*,(107), 379.
- Nussbaum, O., lasler, J. And Loyter, A. (1993). Fusion of enveloped viruses with sperm cells: Interaction of sendai, influenza and semliki forest viruses with bull spermatozoa. *Exp.Cell Res.*, (206), 11-15.
- Parsonson, I.M., Thompson, L.H. and Walton, T.E. (1994). Experimentally induced infection with bluetongue virus serotype 11 in cow. *Am. J. Vet. Res.*, 55 (11), 1529-1534.
- Paton, D.J., Brockman, S. and Wood, L. (1990). Insemination of susceptible and preimmunized cattle with bovine viral diarrhoea virus infected semen. *Br.Vet.J.*, 146 (2), 171-174.
- Reed, D.E., Bicknell, E.J., Larson, C.A., Knudtson, W.U. and Kirdbride, C.A. (1971). Infectious bovine rhinotracheitis virus induced abortion: Rapid diagnosis by fluorescent antibody technique. *Am.J.Vet.Res.*, 32 (9), 1423-1426.
- 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.P. (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.
- Taylor, R.E., Seal, B.S. and Jeor, S.S. (1982). Isolation of infectious bovine rhinotracheitis virus from the soft-shelled tick, *Ornithodoros coriaceus*. *Science*, 216 (16), 300-301.
- Theodoridis, A. (1978). Preliminary characterisation of viruses isolated from cases of epididymitis and vaginitis in cattle. *J.Vet.Res.*, 45, 187-195.
- 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.
- Weldon, S.L., Blue, J.L., Wooley, R.E. and Lukert, P.D. (1979). Isolation of picornavirus from feces and semen from infertile bull. *J.A.V.M.A.*, 174 (2), 168-169.
- Wentink, G.H., Van Oirschot, J.T., Pelgrim, W., Wensing, T. And Gruys, E. (1993). Experimental transmission of bovine leucosis virus by rectal palpation. *Vet.Rec.*, (2), 135-136.