

SUNİ TOHURLAMA MERKEZLERİNDE KULLANILMAK ÜZERE SEÇİLEN BOĞALARDA BHV-1, BVDV VE EBLV ENFEKSİYONLARININ ARAŞTIRILMASI

Orhan Yapkiç¹@

Oya Bulut¹

Atilla Şimşek¹

Sibel Yavru¹

Mehmet Kale²

Oğuzhan Avcı¹

Investigation of BHV-1, BVDV and EBLV Infections in Bulls Selected for Artificial Insemination Centers

Özet: Bu çalışmada, suni tohumlama merkezlerinde kullanılmak üzere seçilen 143 adet boğadan alınan kan serum örnekleri BHV-1, BVDV ve EBLV enfeksiyonlarına karşı oluşan antikorlar yönünden ELISA ile incelendi. Araştırmada kullanılan boğaların 12'si (% 8.3) BHV-1'e, 25'i (% 17.4) BVDV'una ve 14'ü (% 9.7) EBLV'una karşı oluşan antikorlar yönünden pozitif olarak tespit edildi. Ayrıca, BVDV'una karşı oluşan antikorlar yönünden seronegatif olan boğaların tümü BVDV'una spesifik antijenler yönünden de ELISA ile negatif olarak belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Boğa, Suni tohumlama, BHV-1, BVDV, EBLV, ELISA

Summary: In this study, blood samples taken from 143 bulls chosen bulls that using in artificial insemination centers were investigated for antibodies against BHV-1, BVDV and EBLV infections by ELISA/Ab. It was determined as positive that antibodies against 12 bulls (8.3%) for BHV-1, 25 bulls (17.4%) for BVDV and 14 bulls (9.7%) for EBLV. Besides, all seronegative bulls were also detected as antigen negative by ELISA/Ag.

Key Words: Bull, Artificial insemination, BHV-1, BVDV, EBLV, ELISA

Giriş

Siğir populasyonlarında genetik ilerlemenin sağlanması, modern yetiştirme programlarının uygulanabilmesi ve işletmelerin verimliliğinin artırılmasında suni tohumlamanın önemi büyüktür. Ancak enfeksiyöz etkenlerle bulaşık spermaların kullanımı, ülke içinde ve dışında birçok enfeksiyonun yayılma riskini arttırmaktadır (Afshar ve Eaglesome, 1990; Wentink ve ark., 2000). Bu nedenle tüm dünyada suni tohumlama merkezlerinde kullanılacak olan boğaların seçimi oldukça büyük bir önem taşımaktadır. Sperma ile yayılma olasılığı yüksek olan viral etkenlerin başında gelen ve Uluslar arası Salgın Hastalıklar Merkezi (OIE 2006)'nin siğir hastalıkları listesinde yer alan, bovine herpesvirus tip 1 (BHV-1), bovine viral diarrhoea virus (BVDV) ve enzootik bovine leukosis virus (EBLV) enfeksiyonları yönünden boğaların incelenmesi, suni tohumlamada kullanılacak spermaların güvenilirliğini arttırmaktadır.

Akut, sublinik veya kronik enfekte boğalara ait, sıvı azot içinde dondurularak saklanan spermalarda bulunan ve enfeksiyözitesini koruyan viruslar, suni

tohumlama yoluyla enfeksiyonların yayılma ihtimalini arttırmaktadırlar. Bir çok ülkede ekonomik yönden önem taşıyan bu enfeksiyonlar, aynı zamanda siğir yetiştiriciliğinde fertilitate problemlerine de neden olmaktadır (Meyling ve Jensen, 1988, Kirkland ve ark., 1994, Wentink ve ark., 2000, Wrathall ve ark., 2006).

BVDV'nun hem akut hem de persiste enfekte (PI) boğaların spermalarıyla saçıldığı bilinmektedir (Wentink ve ark., 2000). BVDV ile enfekte spermaların kullanılması, alıcı olarak kullanılan ineklerde akut, daha sonraki nesillerde ise persiste enfeksiyonlara neden olabilmektedir (Polak ve Zmudzinski, 1999).

BHV-1; hayvanlarda canlı ağırlık kaybı, süt veriminde azalma, abort ve ölümlere neden olduğu için dünyada yaygın ve ciddi ekonomik kayıpların başında gelmektedir. BHV-1 ile enfekte boğaların spermalarında sıklıkla virus bulunabilmekte ve suni tohumlama yolu ile bulaştırılabilmektedir (Zhou ve ark., 1999).

Etkenin özellikle siğir lenfosit hücrelerine ilgi

göstermesi ve bu nedenle daha çok kan yoluyla bulaşma eğilimine sahip olmasının yanında, boğalara ait spermalar ile alıcı ineklerin enfekte olabilmeleri ihtimalinden dolayı EBLV ile enfekte hayvanlardan elde edilen spermaların da kullanımında uluslar arası kısıtlamalar halen devam etmektedir (Monke, 1986; Santos ve ark., 2006).

BHV-1 ve EBLV ile enfekte boğaların yaşamları boyunca aralıklı veya sürekli olarak virusları etrafa saçabilmeleri nedeniyle, seropozitif boğalar epidemiyolojik açıdan virus taşıyıcısı ve saçıcısı olarak kabul edilmektedirler (Wrathall ve ark., 2006). Ülkemiz de dahil olmak üzere birçok ülkede, BHV-1, BVDV ve EBLV'ünü taşıyan hayvanların ithalatına ve spermaların suni tohumlamada kullanılmasına izin verilmemektedir.

Bu araştırmada, suni tohumlama merkezlerinde kullanılmak üzere seçilecek olan, genetik verimi oldukça yüksek boğalarda BVDV, BHV-1 ve EBLV enfeksiyonlarının görülme olasılığının araştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

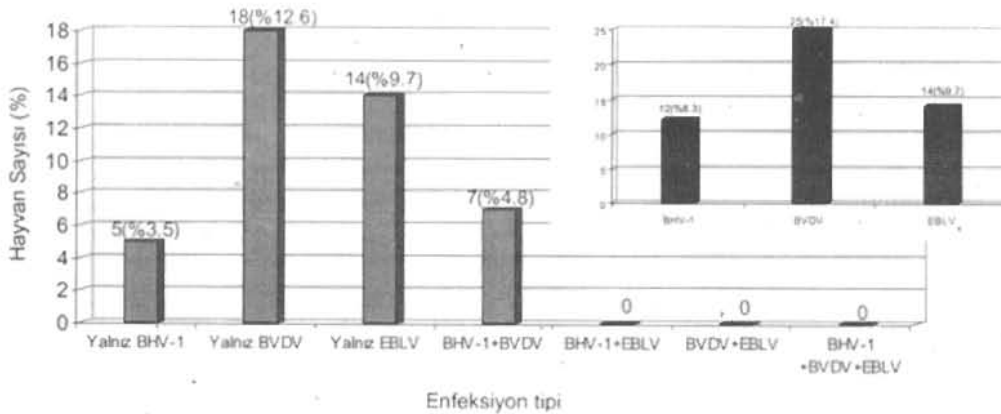
Suni tohumlama merkezlerinde kullanılmak amacıyla Türkiye'nin farklı illerinden seçilen, klinik olarak sağlıklı görünen, genetik verimi yüksek ve araştırılan viruslara karşı hiçbir aşı uygulaması gerçekleştirilmeyen 18-24 aylık, 143 adet boğadan steril kaolinli ve EDTA'lı tüplere kan örnekleri alınarak +4 Co'de laboratuvara getirildi. Serolojik inceleme amacıyla alınan kan örnekleri, 2000 rpm'de 10 dk. santrifüj edildikten sonra elde edilen serumlar steril ependorf tüplerine aktarıldı. Serum örnekleri kullanılıncaya kadar -20 Co'de derin dondurucuda saklandı. Boğa serumlarında; BHV-1, BVDV ve EBLV'larına karşı oluşan antikor varlığı ELISA (Institut Pourquer, Montpellier, Fransa) ile kontrol edildi.

Serum örnekleri, testin prosedüründe belirtilen miktarlarda sulandırıldıktan sonra, üç enfeksiyon yönünden ayrı ayrı antijenle kaplı mikroplyetlerde inkubasyona bırakıldı. Yıkama işlemini takiben horse radish peroxidase enzim konjugatı ilave edilerek tekrar inkubasyona bırakıldı. Substrat ve ardından stop solusyonlarının ilave edilmesinden sonra sonuçlar ELISA cihazı (Anthos II, Avusturya) ile belirtilen dalga boylarında okunarak değerlendirildi.

Hayvanların EDTA'lı tüplere alınan kan numunelerinden elde edilen lökositler, ayrıca BVDV antijenleri yönünden ELISA (Institut Pourquer, Montpellier, Fransa) ile kontrol edildi. Boğalardan elde edilen kan lökosit örnekleri önce hemoliz buffer ile muamele edilip 2500 rpm'de santrifüj işlemine tabi tutuldu. Daha sonra örnekler, BVDV'unun NSP 2-3 (p80) ve E0 (gp48)'e spesifik monoklonal antikorlarla kaplı mikroplyetlere, BVDV'una spesifik poliklonal antikor içeren buffer ile beraber ilave edilerek inkubasyona bırakıldı. Yıkama işlemini takiben anti-poliklonal antikor konjugatı konularak inkubasyona bırakıldı ve substrat ve ardından stop solusyonunun ilave edilmesinden sonra sonuçlar ELISA cihazı ile belirtilen dalga boylarında okunarak değerlendirildi.

Bulgular

Araştırmada ELISA ile 12 adet (% 8.3) serumda BHV-1'e, 25 adet (% 17.4) serumda BVDV'una ve 14 adet (% 9.7) serumda EBLV'una karşı antikor varlığı tespit edildi. Kontrolleri yapılan boğalardan; 5 tanesi (% 3.5) sadece BHV-1, 18 tanesi (% 12.6) sadece BVDV, 14 tanesi (% 9.7) ise sadece EBLV enfeksiyonu yönünden seropozitif bulundu. Ayrıca tek bir enfeksiyon yönünden seropozitif olan boğa sayısı 37 (% 25.8), hem BVDV hem de BHV-1 ile enfekte boğa sayısı 7 (% 4.8) iken, üç enfeksiyon yönünden



Şekil 1. Hayvanların (n=143) enfeksiyonlara göre seropozitiflik oranlarının dağılımı

de seropozitif olan hayvan tespit edilemedi (Şekil 1).

Bu çalışmada ELISA ile incelenen boğaların tümü BVDV'una spesifik antijen yönünden negatif bulundu.

Tartışma ve Sonuç

Enfekte hayvanların spermaları aracılığı ile hassas hayvanlara bulaşma özelliği taşıyan ancak viral yapı ve patogenezi açısından önemli farklılıklar gösteren BHV-1, BVDV ve EBLV'larının en önemli ortak yanlarından birisi de, neden oldukları enfeksiyonlarda klinik belirtilerin ya hiç gözlenmemesi ya da gözden kaçabilecek oranda hafif gerçekleşmesidir. Bu durum, enfekte hayvanların dışarıdan bakıldığında sağlıklı olduğu yanılgısına yol açmakta ve birlikte bulunduğu diğer sağlıklı hayvanlar için büyük bir risk oluşturmaktadır. Suni tohumlama merkezlerinde bu tür enfeksiyona sahip olan bir boğadan, yaşamı boyunca ortalama 100.000-150.000 doz sperma hazırlandığı (Wishwanath, 2003) ve bunun ülke içinde hatta dışında kullanıldığı ihtimali düşünüldüğünde, olayın önemi daha açık bir şekilde ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle suni tohumlama merkezlerinde kullanılacak boğa adaylarının seçiminde, hayvanlarda bulunma ihtimali olan BHV-1, BVDV ve EBLV enfeksiyonlarının saptanmasında klinik teşhisten daha çok laboratuvar teşhisin temel bir unsur olduğu görülmektedir.

Hücre kültüründen bağımsız olarak yapılabilmesi, saha taramalarında kolayca uygulanabilmesi ve test sonuçlarının birkaç saatte okunabilmesi gibi sebepler, ELISA'yı son yıllarda enfeksiyonların hem virolojik hem de serolojik tanısında güncel bir test haline getirmiştir (Niskanen ve ark., 1989, Uysal ve ark., 1998, VanLeeuwen ve ark., 2006). Araştırmada bütün bu avantajlarından dolayı, her üç enfeksiyonun teşhisinde de ELISA tercih edilmiştir. Avrupa'da aşı uygulaması yapılmamış sığır çiftliklerindeki PI hayvanların belirlenmesi amacıyla yapılan tarama testlerinde BVDV'una spesifik antikor ve antijenlerin tespiti için 1990'lı yılların başından beri ELISA'nın kullanıldığı bildirilmektedir. (Greiser-Wilke ve ark., 2003). Aynı şekilde Payment ve ark. (1979) BHV-1'in teşhisinde ELISA'nın spesifik bir test olduğunu, BHV-1'e karşı oluşmuş düşük titredeki antikorların teşhisinde bile çok hassas bir test olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir. Yine EBLV enfeksiyonlarının tanısında yaygın serolojik test olarak agar jel immunodifüzyon (AGID) testi kullanılmasına rağmen, son zamanlarda ELISA'nın tercih edildiği vurgulanmaktadır (Uysal ve ark., 1998).

Bu çalışmada araştırılan BHV-1 ve BVDV'unun dünyadaki sığır popülasyonları arasında yaygın ola-

rak gözlenmesinin bir neticesi olarak enfeksiyona bir şekilde yakalanmış olan boğalar, birçok ülkede faaliyet gösteren suni tohumlama merkezlerinde malesef fark edilmeden kullanılmışlardır (Murphy ve ark., 1999). Polak ve Zmudzinski (1999) Polonya'daki suni tohumlama merkezlerinde yetiştirilen 175 boğadan alınan kan serumu örneklerinde yüksek oranda (% 86) BVDV'una spesifik antikor tespit etmişler, 219 adet boğadan aldıkları birinci tam kan örneklerinin 5 adedinde (% 2.3) BVDV antijeni saptamış, 2 adet (%0.9) boğanın da PI olduğunu ortaya koymuşlardır. Van Oirschot ve ark. (1993) tarafından gerçekleştirilen bir başka çalışmada ise, bir suni tohumlama merkezinde kullanılan ve herhangi bir klinik belirti göstermeyen 116 boğadan alınan sperma örneklerinin 43 tanesinde BHV-1'in saptandığı belirtilmiştir. Hayvanlarda araştırılan diğer bir enfeksiyon etkeni olan EBLV'u hakkında ise, spermada viral antijen ya da proviral DNA'nın bulunabilme ihtimali olmasına rağmen, seropozitif boğalardan elde edilen spermaların bulaşmada önemli bir risk oluşturmadığı yönünde çelişkili bilgiler mevcuttur (Monke, 1986, Santos ve ark., 2006).

BHV-1 ile enfekte olan ve serolojik taramalarda pozitif olarak tespit edilen boğalar daimi virus taşıyıcısı olarak kalmaktadırlar. Seropozitif boğalardaki latent virus, çeşitli nedenlerle (kortikosteroid kullanımı, transport, gebelik vs) reaktifte olabilmekte ve çevreye saçılabilir. Bu nedenle özellikle enfeksiyonun enfekte sperma vasıtasıyla da yayılabildiği göz önünde bulundurularak, boğaların suni tohumlama merkezlerine alınmadan önce BHV-1 antikor varlığı yönünden belirli periyotlarla kontrol edilmesi ve seropozitif boğaların sürüden uzaklaştırılması tavsiye edilmektedir (De Gee ve ark., 1996). Bu bilgiler ışığında yetiştiricilere, araştırmada BHV-1 yönünden seropozitif saptanan 12 adet boğa adayının suni tohumlamada kesinlikle kullanılmaması ve bir an önce sürüden ayırt edilerek kesime sevk edilmeleri gerektiği bildirilmiştir. Aynı bildirim, EBLV yönünden seropozitif belirlenen 14 hayvan için de yapılmıştır. Çünkü bu enfeksiyonda da seropozitiflik, aynı zamanda virus yönünden pozitifliğin bir göstergesi olarak kabul edilmektedir. Ancak BVDV enfeksiyonlarında ise taşıyıcı hayvanların belirlenmesinde antikor tespitinden çok antijen varlığının ortaya konulması önem arz etmektedir. PI hayvanların antikor yönünden genellikle negatif oldukları ve bu hayvanların bulunduğu sürülerde seropozitiflik oranının oldukça yüksek gözlemlendiği düşünüldüğünde serolojik taramanın tek yararı, sürüde PI hayvan olup olmadığı konusunda bir ön bilgi sağlamasıdır. Bu çalışmada, boğa adaylarının genellikle çeşitli sürülerden bireysel olarak seçilmesi ve işletmelerdeki diğer hay-

vanlardan herhangi bir örnekleme yapılmaması sürü bazında bir yorum yapılmasını engellemiştir. Araştırmada BVDV'una spesifik antikor taşıyan toplam 18 hayvan tespit edilmesine rağmen hiçbir hayvanda antijen saptanmaması, BVDV açısından değerlendirildiğinde, suni tohumlama merkezlerinde bu boğaların kullanılmalarının bir risk oluşturmayacağı kanısını uyandırmaktadır. Ancak viremî belirlenemeyen, buna rağmen kan serumunda yüksek titrede antikor bulunduran bir boğanın 11 ay süreyle spermaları aracılığıyla BVDV'unu saçtığı (Voges ve ark., 1998) ve bu boğanın spermalarının seronegatif ineklerin bulunduğu sürülerde kullanılması sonucunda virusun bulaştığı ve bu durumun PI buzağı doğumlarına yol açabileceği (Niskanen ve ark., 2002) yönündeki araştırma sonuçları, BVDV yönünden seropozitif hayvanların da tohumlamada kullanılmalarının risk oluşturabileceği düşüncesini akla getirmektedir. Bu nedenle seropozitif boğaların tohumlamada kullanılmaları gerekiyorsa spermalarının mutlak surette BVDV yönünden test edilmeleri önemli bir zorunluluk olarak ortaya çıkmaktadır.

Ülkemizde Hayvan Islahı Kanununa dayanılarak çıkarılan "Embriyo ve Sperma Üretim Merkezlerinin Kuruluş, Çalışma Esas ve Usulleri Hakkında Yönetmelik" hükümleri gereğince siğir spermaları üreten, sperma üretim merkezlerinin uyması gereken konularla ilgili talimatta, damızlık boğa adaylarının EBLV, BVDV ve BHV-1 enfeksiyonları açısından teste tabi tutulmaları gerektiği üzerinde önemle durulmaktadır. Genetik verimliliğin artırılması amacı güdülen suni tohumlama çalışmalarında, T.C. Tarım ve Köyüşleri Bakanlığının 2002 yılı istatistiklerine göre ülkemizde 1.997.544 doz sperma üretiminin yapıldığı göz önüne alındığında adı geçen viruslar ile kontamine spermaların kullanımının enfeksiyonların yayılmasında büyük bir potansiyel oluşturduğu açıktır. Bu potansiyel düşünüldüğünde uzun uğraşlar sonucunda genetik verimliliği yükseltilecek boğaların, doğdukları andan itibaren daha itinalı ve özellikle hayvan hareketlerinin yoğun olmadığı sürülerde yetiştirilmeleri ve enfeksiyonlar yönünden uygun aralıklarla test edilmelerinin oldukça önemli olduğu ortaya çıkmaktadır.

Kaynaklar

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

De Gee, AL., Wagter, L.H. and Hage J.J. (1996). The use of a polymerase chain reaction assay for the detection of bovine herpesvirus 1 in sperma during a natural outbreak of infectious bovine rhinotracheitis. *Vet. Microbiol.*, 53, 163-168.

Greiser-Wilke, I., Grummer, B. and Moennig, V. (2003). Bovine viral diarrhoea eradication and control programmes in Europe. *Biologicals*, 31, 113-118.

Kirkland, P.D., Mackintosh, S.G. and Moyle, A. (1994). The outcome of widespread use of semen from a bull persistently

infected with pestivirus. *Vet. Rec.*, 135, 527-529.

Meyling, A. and Jensen, A.M. (1988). Transmission of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) by artificial insemination (AI) with semen from a persistently-infected bull. *Vet. Microbiol.*, 17, 97-105.

Monke, D.R. (1986). Noninfectivity of semen from bulls infected with bovine leucosis virus. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 188, 823-826.

Murphy, F., Gibbs, E.P.J., Horzinek, M.C. and Studdert, M.J. (1999). *Vet. Virol.*, 3rd edition, Academic Press, London.

Niskanen, R., Alenius, S., Larsson, B., Juntti, N. (1989). Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to bovine viral diarrhoea virus in milk. *J. Vet. Med. B* 36, 113-118.

Niskanen, R., Alenius, S., Bela'k, K., Baule, C., Bela'k, S., Voges, H. and Gustafsson, H. (2002). Insemination of susceptible heifers with semen from a non-viraemic bull with persistent bovine virus diarrhoea virus infection localized in the testes. *Reprod. Dom. Anim.*, 37, 171-175.

O.I.E. (2006). International Terrestrial Animal Health Code. Office International des Epizooties, Paris, <http://www.oie.int/>.

Payment, P., Assaf, R., Trudel, M. and Marois, P. (1979). Enzyme-Linked immunosorbent assay for serology of Infectious Bovine Rhinotracheitis. *J. Clin. Microbiol.*, 10, 633-636.

Polak, M.P. and Zmudzinski, J.F. (1999). Prevalence of bovine viral diarrhoea virus infection in bulls in artificial insemination centres in Poland. *Vet. Microbiol.*, 64, 253-257.

Santos, M.J.D., Trono, K., Lager, I. and Wigdorovitz, A. (2006). Development of PCR to diagnose BLV genome in frozen semen samples. *Vet. Microbiol.*, (In Press).

Uysal, A., Yılmaz, H., Bilal, T., Berriatua, E., Bakirel, U., Arslan, M., Zerim, M. and Tan, H. (1998). Seroprevalence of enzootic bovine leucosis in Trakya district (Marmara region) in Turkey. *Prev. Vet. Med.*, 37, 121-128.

VanLeeuwen, J.A., Tiwari, A., Plaizier, J.C., Whiting, T.L. (2006). Seroprevalences of antibodies against bovine leukemia virus, bovine viral diarrhoea virus, Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis, and Neospora caninum in beef and dairy cattle in Manitoba. *Can. Vet. J.*, 47, 783-786.

Van Oirschot, J.T., Straver, P.J., Van Lieshout, J.A., Quak, J., Westenbrink, F. and Van Exsel, A.C. (1993). A subclinical infection of bulls with bovine herpesvirus type 1 at an artificial insemination centre. *Vet. Rec.*, 132, 32-35.

Voges, H., Horner, G.W., Rowe, S. and Welleberg, G.J. (1998). Persistent bovine pestivirus infection localized in the testes of immunocompetent non-viremic bull. *Vet. Microbiol.*, 61, 165-175.

Wentink, G.H., Frankena, K., Bosch, J.C., Vandehoek, J.E.D., Van den Berg, T.H. (2000). Prevention of disease transmission by semen in cattle. *Livest. Prod. Sci.*, 62, 207-220.

Wishwanath, R. (2003). Artificial insemination: the state of the art, *Theriogenology*, 59, 571-584.

Wrathall, A.E., Simmons, H.A., Van Soom, A. (2006). Evaluation of viral transmission to recipients of bovine embryos arising from fertilisation with virus-infected semen. *Theriogenology*, 65, 247-274.

Zhou, J., Lyaku, J., Robert, A., Fredrickson, R.A., Kibenge, F.S. (1999). Improved detection of bovine herpesvirus 1 in artificially infected bovine semen by protein amplification. *J. Virol. Methods*, 79, 181-189.