

## BOĞALARDA BOVINE HERPESVIRUS TİP- 1 (BHV-1) ENFEKSİYONUNUN ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA), POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) VE VİRUS İZOLASYONU (VI) METOTLARI İLE KARŞILAŞTIRMALI TEŞHİSİ VE SEROEPİDEMİYOLOJİSİ

Oya Bulut<sup>1</sup>@

Sibel Yavru<sup>1</sup>

### Seroepidemiology and Comparative Diagnosis of Bovine Herpesvirus Type-1 (BHV-1) in Bulls using Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), Polymerase Chain Reaction (PCR) and Virus Isolation (VI)

**Özet:** Araştırmada, Konya ve çevresinden Konya Özel Konet mezbahasına kesim amacı ile getirilen, 100 adet sağlıklı görünümülü, yerli ırk ve 1 yaşındaki boğalardan kan, sperma ve nasal swap örnekleri alındı. Sperma ve nasal swap örnekleri Föetal Dana Böbrek (FDB) ve Madin Darby Bovine Kidney (MDBK) devamlı hücre kültürlerine inokule edildi. İnkubasyon süresi sonunda 26 adet sperma ve 2 adet nasal swap örneğinde sitopatik etki (CPE) gözlemlendi. İzole edilen virüslerin identifikasyonu amacıyla Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA/Ag) kullanıldı ve sperma örneklerinden 15 adedi BHV-1 olarak tanımlanırken, nasal swap örneklerinin hiçbirisi BHV-1 olarak tanımlanamadı. Ayrıca sperma ve nasal swap örneklerinde BHV-1'in tespiti amacıyla ELISA ve Polymerase Chain Reaction (PCR) metodundan yararlanıldı. Direkt ELISA ile 1 adet sperma ve 1 adet nasal swap örneği pozitif bulundu. PCR ile ise 23 adet sperma örneği pozitif olarak belirlenirken, nasal swap örneklerinin hiç birinde pozitif sonuç tespit edilemedi. BHV-1'e karşı oluşan antikorların tespiti amacıyla ELISA/Ab ve serum mikronötralizasyon (serum mNT) testleri kullanıldı. BHV-1'e karşı oluşan antikorların tespiti amacıyla uygulanan ELISA/Ab ile 23 adet kan serumu pozitif olarak belirlenirken, serum mNT testi ile 14 adet kan serumu pozitif bulundu ve antikor pozitif bu örneklerin SN<sub>50</sub> değerleri ise 1:1.78 – 1:22.4 arasında tespit edildi.

**Anahtar Kelimeler:** Bovine Herpesvirus Tip-1 (BHV-1), ELISA, Nötralizasyon Testi, PCR ve Virus İzolasyon

**Summary:** In this study, blood, semen and nasal swap samples were taken from 100 clinically healthy, indigenous and one year old bulls brought to Konya Private Konet abattoir from Konya and its environment with the purpose of slaughter. Semen and nasal swap samples were inoculated into Foetal Bovine Kidney (FBK) and Madin Darby Bovine Kidney (MDBK) cell cultures. At the end of incubation, cytopathogenic effect (CPE) was determined in 26 semen and 2 nasal swap samples. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA/Ag) was used for identification of viruses isolated. Two isolates from nasal swap could not be identified, while 15 out of 26 isolates from semen samples was identified as BHV-1 by ELISA. Following ELISA/Ag and Polymerase Chain Reaction (PCR) method was applied for detection of BHV-1 in semen and nasal swap samples. One semen sample and 1 nasal swap sample were found as positive by ELISA/Ag. No positive result could be detected in any of nasal swap samples while 23 semen samples were detected as positive by PCR. Besides, Enzyme linked Immunosorbent assay (ELISA) and serum microneutralization test (serum mNT) were used for detection of antibodies against to BHV-1. Twenty-three blood sera samples were detected positive by ELISA, while 14 blood sera samples were detected positive by serum mNT. SN<sub>50</sub> values of the positive sera samples were detected between 1:1.78 – 1:22.4.

**Key Words:** Bovine Herpesvirus type-1 (BHV-1), ELISA, Neutralization Test, PCR and Virus Isolation

### Giriş

Infectious Bovine Rhinotracheitis /Infectious Pustuler Vulvovaginitis / Infectious Pustuler Balanopostitis (IBR/IPV/IPB) sığırların solunum, sindirim ve genital sistemlerinin subklinik, akut veya latent seyri önemli bir viral enfeksiyonudur. Enfeksiyon etkeni Bovine Herpesvirus tip-1 (BHV-1)'dir. BHV-1,

yaygın solunum sistemi enfeksiyonlarına, rinotracheitise, konjunktivitise, süt veriminde azalmaya, metritise, artritise, enteritise, dişilerde vulvovaginitise, boğalarda balanopostitise, gebe hayvanlarda abortlara ve nadiren encephalitise sebep olabilmektedir (Smith ve ark 1991, Kit ve ark 1992, Yason ve ark 1995).

Geliş Tarihi : 28.01.2005 @: obulut@sclcu.edu.tr

Bu makale aynı isimli doktora tezinden özetlenmiştir.

1. Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı, KONYA

Bovine Herpesvirus tip-1 (BHV-1)'in en önemli özelliği primer enfeksiyonu takiben virusun bölgesel ganglionlarda latent durumda kalabilmesidir (Engels ve Ackermann 1996, Winkler ve ark 2002). Latent enfekte hayvanlarda çeşitli stres faktörlerinin etkisiyle latent virus reaktif olabilmekte ve sinir yoluyla replikasyonun gerçekleşeceği mukozal yüzeylere ulaşarak buradan saçılmaya devam edebilmektedir (Whetstone ve ark 1986, Jones ve ark 1990, Kasshoek ve ark 1996). Enfeksiyonu bir kez geçiren hayvanlar klinik tablo göstermeksizin yaşam boyu virus taşıyıcısı ve reenfeksiyonlarda virus saçıcısı olarak bir sürede enfeksiyon kaynağı olabilmektedir. Bu nedenle damızlık olarak kullanılan boğaların düzenli aralıklarla serolojik kontrollerden geçirilmesi gerektiği gibi sperma, preputial çalkantı sıvısı, lökosit, burun ve göz akıntısından virus izolasyonu çalışmalarının da yapılması gerekmektedir (Kupferschmied ve ark 1986, Van Oirschot ve ark 1993). Çünkü damızlık olarak kullanılan boğalardan elde edilen spermaların tabii ve suni tohumlama yoluyla duyarlı hayvanlara nakledilmesi bu hayvanların da enfeksiyona yakalanmalarına neden olmaktadır. Bu nedenlerle, suni tohumlama istasyonlarında hem boğaların hem de onlardan elde edilen spermaların virolojik kontrolü büyük önem taşımaktadır (Yavru ve ark 1998b).

Bu çalışmada, Konya ve çevresinden Özel Konet Mezbahasına kesime getirilen boğalarda BHV-1 tarafından oluşturulan IBR/IPV/IPB enfeksiyonlarının seroprevalansının belirlenmesinin yanı sıra sperma ve nasal swap örneklerinde de Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), Polymerase Chain Reaction (PCR) ve hücre kültüründe virus izolasyonu metotları ile virolojik kontroller yapılarak, bu 3 testin birbirlerine olan üstünlüklerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

### Materyal ve Metot

**Araştırmada Kullanılan Hayvanlar:** Araştırmada, Konya ve çevresinden Konya Özel Konet mezbahasına kesim amacı ile getirilen, 100 adet sağlıklı görünümülü, yerli ırk ve 1 yaşındaki boğalardan serolojik araştırmalar amacıyla kan örnekleri, virolojik çalışmalar için ise sperma ve nasal swap örnekleri alındı.

**Serum Örneklerinin Mikronötralizasyon Testi (mNT) ile İncelenmesi:** Usulüne uygun olarak hazırlanan kan serum örneklerinde BHV-1'e karşı nötralizan antikorların varlığı Frey ve Liess'in (1971) bildirdikleri mikronötralizasyon testi (mNT) ile araştırıldı.

**Serum Örneklerinde indirekt ELISA ile Antikor Tespiti:** Bu amaçla, Laboratoire Service International (LSI, LISSIEU, FRANSA) firmasının siğir serumunda bulunan spesifik anti-IBR antikorlarının tespiti için hazırlanmış olduğu ELISA kiti kullanıldı.

**Hücre Kültüründe Virus İzolasyonu ve BHV-1'in İdentifikasyonu:** Usulüne uygun olarak inokulasyona hazır hale getirilen sperma ve nasal swap örneklerinin Fötal Dana Böbrek (FDB) hücre kültürlerinde 3 kör pasajı yapılarak, CPE gözlenen örnekler daha sonra Madin Darby Bovine Kidney (MDBK) devamlı hücre kültürlerine adapte edildi. Doku kültürü mikroskobu ile yapılan kontrollerde, MDBK devamlı hücre kültürlerinde sitopatik etki (CPE) gözlenen hücrelerden toplanan 3. pasaj üst sıvıları, ELISA ile virus identifikasyonu amacıyla kullanıldı.

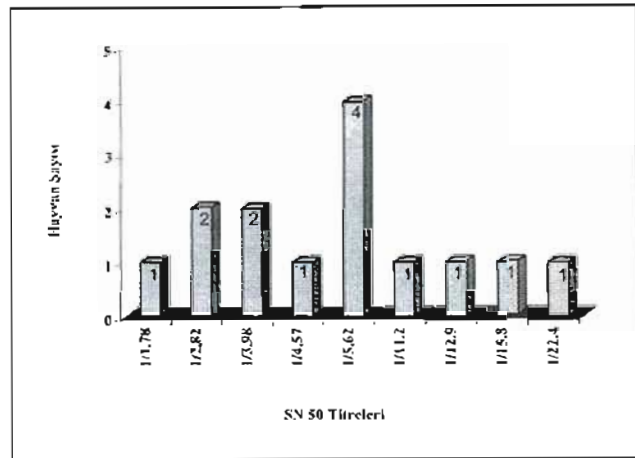
**ELISA ile BHV-1'in Teşhisi:** Gerek hücre kültüründe izole edilen virusların BHV-1 olarak identifikasyonu ve gerekse direkt olarak örneklerde BHV-1 antijen varlığının araştırılması amacıyla Bio-X Diagnostics (Belçika) firması tarafından geliştirilen Bio-X BHV-1 ELISA kiti kullanıldı.

**Polymerase Chain Reaction (PCR) Metodu:** Sperma ve nasal swap örneklerinden DNA ekstraksiyonu amacıyla QIAamp DNA Mini Ekstraksiyon Kiti (QIAGEN, Almanya) kullanıldı. Ekstrakte edilen DNA'lar ticari olarak hazırlanan IBR DNA tespit PCR kiti (NOVENTISTM) kullanılarak amplifiye edildi. PCR ürünlerinin değerlendirilmesi için NOVENTISTM firmasının bildirdiği elektroforez tekniğinden yararlanıldı.

### Bulgular

**Serolojik Çalışma Sonuçları:** Kan örneklerinin serum mNT ve ELISA sonuçları Tablo 1.'de gösterilmiştir.

**Pozitif Serumların Serum Nötralizasyon 50 (SN<sub>50</sub>) Testi Sonuçları :** Çalışmada serum mNT sonunda BHV-1 antikorları yönünden pozitif olarak tespit edilen 14 adet (%14) kan serumu örneğinin mNT ile SN<sub>50</sub> dağılımları 1/1.78 – 1/22.4 arasında tespit edildi (Şekil 1).

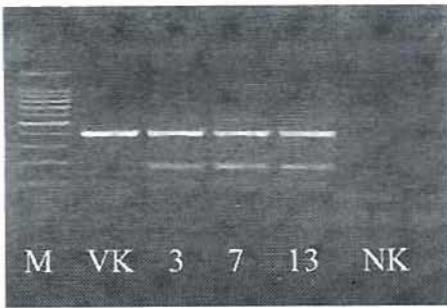


Şekil 1. Pozitif Serumların SN<sub>50</sub> Değerleri

Tablo 1. Mikronötralizasyon ve ELISA ile Pozitif Tespit Edilen Kan Serumları

Serum No	mNT	ELISA
1	+	+
4	+	+
5	-	+
13	-	+
15	+	+
18	+	+
21	+	+
24	+	+
25	-	+
37	-	+
40	-	+
43	+	+
45	+	+
46	+	+
47	-	+
54	-	+
55	-	+
78	-	+
79	+	+
80	+	+
81	+	+
82	+	+
91	+	+
Sonuç	14	23

Virolojik Çalışma Sonuçları: Hücre kültürlerinde virus izolasyonu ve izole edilen virusların ELISA ile BHV-1 olarak identifikasyon sonuçları Tablo 2.'de gösterilmiştir.



Şekil 2. Sperma örneklerinin PCR sonuçları  
M : Marker (390 pb'lik DNA), VK : BHV-1 Kontrol,  
3 : 3'nolu sperma örneği, 7 : 7'nolu sperma örneği,  
13 : 13'nolu sperma örneği, NK : Negatif Kontrol

Tablo 2. Hücre kültürlerinde virus izolasyonu ve izole edilen virusların ELISA ile BHV-1 olarak identifikasyon sonuçları

Örnek No	Hücre Kültüründe Virus İzolasyonu / İzole edilen Virusların ELISA ile BHV-1 Olarak İdentifikasyonu	
	Sperma Örneklerinde	Nasal Swap Örneklerinde
1	+ / (-)*	- / -
3	+ / (+)	- / -
4	+ / (+)	- / -
7	+ / (-)	- / -
13	+ / (+)	- / -
14	+ / (-)	+ / -
15	+ / (+)	- / -
18	+ / (-)	- / -
25	+ / (+)	- / -
34	+ / (-)	- / -
37	+ / (-)	- / -
40	+ / (+)	+ / -
44	+ / (-)	- / -
45	+ / (-)	- / -
47	+ / (+)	- / -
56	+ / (-)	- / -
58	+ / (+)	- / -
62	+ / (-)	- / -
64	+ / (+)	- / -
72	+ / (+)	- / -
82	+ / (-)	- / -
84	+ / (+)	- / -
86	+ / (+)	- / -
93	+ / (+)	- / -
97	+ / (+)	- / -
100	+ / (+)	- / -
Sonuç	26 / (15)	2 / 0

(\*) Hücre kültüründe izole edilen virusların ELISA ile BHV-1 olarak identifiye edilemediğini ifade etmektedir.

Tablo 3. BHV-1 Antijen Varlığı Pozitif Örneklerin ELISA Sonuçları

Örnek No	BHV-1 Antijen Varlığı		Pozitif Örneklerin OD Değerleri
	Pozitif Örneklerin ELISA Sonuçları		
	Sperma	Nasal Swap	
12	-	+	0.179
58	+	-	0.236
Sonuç	1	1	

Tablo 4. Araştırmanın toplu sonuçları

Örnek No	mNT Sonuçları	ELISA/Antikor Sonuçları	Hücre Kültüründen Virus İzolasyonu / ELISA ile İdentifikasyonu		PCR Sonuçları		ELISA/Antijen Sonuçları	
			Sperma	Nasal Swap	Sperma	Nasal Swap	Sperma	Nasal Swap
1	+	+	+/(-)	-/-	-	-	-	-
3	-	-	+/(+)*	-/-	+	-	-	-
4	+	+	+/(+)	-/-	-	-	-	-
5	-	+	-	-/-	-	-	-	-
7	-	-	+/(-)	-/-	+	-	-	-
12	-	-	-	-/-	-	-	-	+
13	-	+	+/(+)	-/-	+	-	-	-
14	-	-	+/(-)	+/-	+	-	-	-
15	+	+	+/(+)	-/-	+	-	-	-
18	+	+	+/(-)	-/-	-	-	-	-
21	+	+	-	-/-	-	-	-	-
24	+	+	-	-/-	-	-	-	-
25	-	+	+/(+)	-/-	+	-	-	-
34	-	-	+/(-)	-/-	+	-	-	-
37	-	+	+/(-)	-/-	-	-	-	-
40	-	+	+/(+)	+/-	+	-	-	-
43	+	+	-	-/-	-	-	-	-
44	-	-	+/(-)	-/-	+	-	-	-
45	+	+	+/(-)	-/-	-	-	-	-
46	+	+	-	-/-	-	-	-	-
47	-	+	+/(+)	-/-	+	-	-	-
54	-	+	-	-/-	-	-	-	-
55	-	+	-	-/-	+	-	-	-
56	-	-	+/(-)	-/-	+	-	-	-
58	-	-	(+)/(+)	-/-	(+)	-	(+)	-
62	-	-	+/(-)	-/-	+	-	-	-
64	-	-	+/(+)	-/-	+	-	-	-
71	-	-	-	-/-	+	-	-	-
72	-	-	+/(+)	-/-	+	-	-	-
78	-	+	-	-/-	-	-	-	-
79	+	+	-	-/-	-	-	-	-
80	+	+	-	-/-	-	-	-	-
81	+	+	-	-/-	-	-	-	-
82	+	+	+/(-)	-/-	-	-	-	-
84	-	-	+/(+)	-/-	+	-	-	-
85	-	-	-	-/-	+	-	-	-
86	-	-	+/(+)	-/-	+	-	-	-
91	+	+	-	-/-	-	-	-	-
93	-	-	+/(+)	-/-	+	-	-	-
97	-	-	+/(+)	-/-	+	-	-	-
100	-	-	+/(+)	-/-	+	-	-	-

(\*) Hücre kültüründe izole edilen virüslerin ELISA ile BHV-1 olarak tanımlanıp tanımlanmadığını ifade etmektedir.



BHV-1 antijen varlığının tespiti amacıyla direkt ELISA ile incelenen ve pozitif olarak tespit edilen sperma ve nasal swap örneklerinin ELISA sonuçları Tablo 3.'de gösterilmiştir.

Polymerase Chain Reaction (PCR) Sonuçları : Araştırmada kullanılan boğalardan elde edilen sperma örneklerinden 23 adedi (%23) PCR metodu ile pozitif olarak belirlenirken, nasal swap örneklerinde PCR metodu ile pozitif sonuç tespit edilemedi (Şekil 2).

### Tartışma ve Sonuç

Bu çalışmada, klinik olarak sağlıklı görünümü, bir yaşında ve yerli ırk olan 100 adet boğadan alınan kan serumu örnekleri mNT ve ELISA ile kontrol edilerek, 14 (%14) adedi mNT ile ve 23 (%23) adedi ELISA ile BHV-1'e karşı oluşan antikorlar yönünden pozitif olarak tespit edilmiştir. Elde edilen seropozitiflik oranları daha önce yapılan çalışmalarda (Florent ve Marnaffe 1986, Burgu ve Akça 1987, Öztürk ve ark 1988, Bolat ve ark 1996, Yavru ve ark 1998b, Bilge-Dağalp ve ark 2001) belirlenen oranlara göre düşük bulunmuştur. Belirlenen düşük seropozitivite oranlarının nedenleri, örnek alınan hayvanların yaşlarının küçük olmasına (1 yaş), büyük bir kısmının hayvan hareketleri az olan ilçelerden gelmesine, örnekleme yapılan ayların ilkbahar sonu ve yaz başına rastlamasına, ırk hassasiyetine (yerli ırk) ve cinsiyete (boğa) bağlanabilir.

Florent ve Marnaffe (1986) BHV-1 virusuna karşı oluşan serum antikorlarının tespiti amacıyla yaptıkları çalışmada, 42 adet sığırdan kan serumu örneklerini almışlar ve bu hayvanlarda IBR/IPV/IPB enfeksiyonlarının serolojik teşhisi için ELISA'yı kullanmışlardır. Araştırmacılar (1986), aldıkları 42 adet kan serumunun 9 (%21.4) tanesini pozitif, 33 (%78.5) tanesi negatif olarak belirlemişlerdir.

Bu çalışmada, özellikle 1 yaşında olan boğaların örneklenmesi nedeniyle enfeksiyonun seroprevalansı her iki testte de düşük bulunmuştur. Enfeksiyonun seroprevalansı ile hayvanların yaşı arasındaki ilişkiyi belirlemek için pek çok çalışma (Burgu ve Akça 1986, Öztürk ve ark 1988, Yavru ve ark 1998b, Bilge-Dağalp ve ark 2001) yapılmıştır. Burgu ve Akça (1986) yaptıkları çalışmada, 3 yaşın üzerindeki boğalarda seropozitiflik oranının %100'e ulaştığını, 1 yaşındaki hayvanlarda ise %33.3 civarında olduğunu ifade etmişlerdir. Latent bir enfeksiyona neden olan BHV-1'in çeşitli faktörlerin etkisi ile reaktivasyonu, enfeksiyonun ileri yaşlarda tekrar görülmesine neden olabilmektedir. Özellikle

2 yaş ve üzeri boğaların damızlık amacıyla kullanılması enfeksiyonun sperma vasıtasıyla bir hayvandan diğerine kolaylıkla bulaşmasının en önemli nedenlerinden birisidir. Öztürk ve ark (1988) Konya Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsünde yaptıkları çalışmada, en yüksek antikor dağılımının 2 yaşın üzerindeki sığırlar arasında olduğunu bildirmişlerdir. Yavru ve ark (1998b) Konya Et ve Balık Kurumu mezbahasına getirilen farklı ırk ve yaşlardaki boğalardan aldıkları kan serumu örneklerinde en yüksek antikor dağılımının (%93.1-100) ve antikor titrasyonlarının 3 yaşın üzerindeki boğalarda olduğunu bildirmişlerdir. Yavru ve ark (1998b) yaptıkları çalışmada, hayvanlarda seropozitiflik oranlarının yaşa bağlı olarak artmasının, özellikle tohumlamada aktif olarak kullanıldığı yaşlarda daha yüksek oranda tespit edilmesinin önem arz ettiğine dikkat çekmişlerdir. Bu çalışmada örneklenen hayvanların 1 yaşında olması belirlenen düşük seropozitifliğin (mNT ile %14 ve ELISA ile %23) bir nedeni olarak belirtilebilir.

IBR/IPV/IPB enfeksiyonlarında, bir bölgedeki hayvan hareketlerinin büyük önem arz ettiğini bildirilmiştir (Singh ve ark 1985). Özellikle bir süreye yeni giren latent enfekte hayvanların enfeksiyonu kolaylıkla o süreye bulaştırabildiği belirtilmektedir (Msolla ve ark 1981). Bu çalışmada, Konya ve çevresinden Konet özel mezbahasına, hayvan hareketlerinin çok yoğun olmadığı tespit edilen işletmelerden kesim amacı ile getirilen hayvanlardan örnekleme yapılmıştır. Bu çalışmada, örneklenen hayvanların geldiği bölgelerin özelliği nedeni ile elde edilen seropozitiflik oranları daha önce yapılan çalışmalara (Cho ve Bohac 1985, Edwards ve ark 1986, Florent ve Marnaffe 1986, Burgu ve Akça 1987, Öztürk ve ark 1988, Bolat ve ark 1996, Yavru ve ark 1998b, Bilge-Dağalp ve ark 2001) göre düşük bulunmuştur. Ancak Msolla ve ark (1981) İskoçya'da mNT ile yapmış oldukları serolojik çalışmada elde ettikleri %12'lik seropozitiflik oranı ile uyum içindedir.

BHV-1 enfeksiyonunun özellikle kış mevsiminde daha sık ortaya çıktığı bilinmektedir. Kış mevsiminde hayvanların kapalı işletmelerde barındırılması, enfeksiyonun temasla bir hayvandan diğerine kolaylıkla nakli, latent enfekte hayvanlarda stres nedeniyle virusun reaktivasyonu ve yayılması enfeksiyonun artışındaki en önemli nedenlerdir. Singh ve ark (1985), yağışlı mevsimlerde abort yapan hayvanlardaki seropozitiviteyi yaz mevsiminden daha yüksek ( $p<0.05$ ) oranda bulmuşlardır. Bu yüksek seropozitiviteyi virusun yazın daha az aktif olmasına bağlamışlardır. Bu çalışmada, örnekleme takviminin özellikle ilkbahar sonu ve yaz başına rastlaması,

elde edilen düşük seropozitiflik oranlarını daha iyi açıklayabilir.

IBR/IPV/IPB enfeksiyonlarında ırk hassasiyeti ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır (Msolla ve ark 1981, Singh ve ark 1985, Yavru ve ark 1998b). Msolla ve ark (1981) yaptıkları çalışmada, sürüye sonradan giren Holstein ırkı dişiler ile enfeksiyonun ortaya çıkışı arasında bir ilişki olduğuna dikkat çekmişlerdir. Singh ve ark (1985), yerli hayvanlardaki seropozitifiteyi (%22.2), Jersey (%50.3) ve Holstein-Friesian (%35.4) ırkı hayvanlardan daha düşük bulmalarına rağmen, çalışmada kullanılan yerli hayvan sayısının az olması nedeniyle tam bir karşılaştırma yapamayacaklarını bildirmişlerdir. Yavru ve ark (1998b) yaptıkları çalışmada, Holstein ırkı hayvanlardaki seropozitifiteyi (%19.66) yerli ırklardan (%4) daha yüksek bulmuşlardır. Bu çalışmada da, örneklenen hayvanların yerli ırklardan oluşması ve yerli ırkların özellikle çevresel şartlara ve iklim koşullarına karşı daha dayanıklı olması ile açıklanan düşük seropozitiflik oranları (%14 ve %23), Singh ve ark. (1986) ile Yavru ve ark (1998b)'nin çalışma sonuçları ile uyumlu bulunmuştur.

ELISA'nın indirekt teşhiste daha duyarlı ve pratik olması nedeniyle, nötralizasyon testi ile karşılaştırıldığında en uygun metot olduğu bildirilmektedir. Bu nedenle, bir çok araştırmacı (Durham ve Sillars 1986, Edwards ve ark 1986, Florent ve Mameffe 1986) duyarlılıklarını ve spesifitelerini belirlemek amacıyla serum mNT ile ELISA'yı birlikte kullanarak bu iki testi karşılaştırmışlardır.

Durham ve Sillars (1986) ELISA prosedürünün hızlı olduğunu ve serum mNT'ne göre daha çok reaktörü tespit ettiğini belirtmişlerdir. Araştırmacılar (1986) aynı zamanda sitotoksik özelliğinden dolayı serum mNT ile incelenmek için uygun olmayan serumların ELISA ile sonuç verebildiğini de bildirmişlerdir. Collins ve ark (1984/85) da ELISA'nın diğer serolojik testlere göre daha duyarlı olduğunu ve çok kısa sürede sonuç verdiğini belirterek, elde edilen sonucun güvenilirliği nedeniyle, bu metodun kullanımının son yıllarda hızla arttığını ifade etmişlerdir.

Bolat ve ark (1996), Elazığ ve çevresindeki toplam 335 adet kültür ırkı sığırdan alınan kan serumlarını mNT ve ELISA ile kontrol etmişler ve test edilen örneklerin 188 (%56.1)'ini ELISA ile 98 (%29.25)'ini de mNT ile BHV-1'e karşı oluşan antikorlar yönünden pozitif bulmuşlardır. Araştırmacılar (1996), serum mNT ve ELISA arasındaki sensitivite

farkını ise mNT'nde uyguladıkları inkubasyon süresine bağlamışlardır. Edward ve ark (1986) da 24 saat süren inkubasyon periyodunun ardından modifiye serum mNT ile ELISA arasında sensitivite farkının olmadığını, 1 saat süren inkubasyon periyodunun ardından standart serum mNT ile ELISA arasında sensitivite farkının olduğunu bildirerek, uygulanan inkubasyon süresine bağlı olarak bu farkın oluştuğunu belirtmişlerdir.

Bu çalışmada, serum mNT'nde 1 saat standart inkubasyon periyodu uygulanmış ve virusa karşı oluşan tüm antikorları belirleyebilen ticari bir ELISA kiti kullanılmıştır. Araştırmada elde edilen sonuçlara göre, ELISA'nın mNT'nden daha duyarlı bulunması, ELISA ile tüm virusa bağlanan antikorların, serum mNT'nde ise sadece virusu nötralize eden antikorların tespit edilmesine bağlanabilir.

Yeterli düzeyde antikor titresi oluşmamış veya seronegatif latent enfekte hayvanlarda, IBR/IPV/IPB enfeksiyonlarının serolojik teşhisinde uygulanan testlerin bazen yetersiz kalabildiği bilinen bir gerçektir (Kahrs 1977). Bu nedenle enfeksiyonun araştırılmasında, serolojik teşhis yanında, direkt olarak etken izolasyonu veya antijen varlığının tespitine yönelik testlerden de faydalanmanın gerekli olduğu belirtilmektedir (Ünver 2002).

Edwards ve ark (1983) intranasal olarak BHV-1'i inokule ettikleri hayvanlardan aldıkları burun swaplarından immunofloresans (IF), immunoperoxidase (IP) ve ELISA ile viral antijen varlığının belirlenmesi ve primer dana böbrek (PDB) hücre kültürlerinde virus izolasyonu ve izole edilen virusların identifikasyonu için ise IP tekniğini kullanmışlar ve bu 4 testin hassasiyetini karşılaştırmışlardır. Araştırmacılar (1983), hücre kültüründe virus izolasyonunun IF, IP ve ELISA'dan daha duyarlı olduğunu belirtmişlerdir.

Yavru ve ark (1998a) Ankara'daki suni tohumlama istasyonundan ve halkın elinde bulunan, Konya Et ve Balık Kurumu Mezbahasında kesime getirilen, aşımında kullanılmış boğalardan aldıkları 60 adet sperma örneğinden virus izolasyonu çalışmalarını yapmışlardır. Araştırmacılar (1998a), izole ettikleri 5 adet virusun 3'ünü nötralizasyon testi ile BHV-1 olarak tanımlamışlar ve hücre kültürlerinin oldukça fazla ekipman gerektirmesine, masraflı olmasına ve sonuçların geç elde edilmesine rağmen teşhis için hassas bir yöntem olduğunu ifade etmişlerdir.

Bu çalışmada, spermaların 26 (%26)'sı, nasal swapların ise 2 (%2)'si virus izolasyonu amacıyla yapılan ekimler sonucunda CPE yönünden pozitif bu-

lunmuştur. Sperma ve nasal swap örneklerinden virus izole edilen örneklerin identifikasyonu için ELISA ile kontrol edilmiştir. CPE pozitif 26 sperma örneğinden 15 adedi BHV-1 olarak tanımlanmıştır. CPE pozitif 2 nasal swap örneği BHV-1 olarak tanımlanmıştır. Elde edilen sonuçlar, hücre kültürlerinde virus izolasyonunun hassasiyetini belirten diğer çalışmalarla (Edwards ve ark 1983, Yavru ve ark 1998a) uyumlu bulunmuştur.

Türkiye'de IBR/IPV/IPB enfeksiyonlarının direkt teşhisinde ELISA'nın kullanıldığı herhangi bir çalışma daha önce bildirilmemiştir. Bu çalışmada, sperma ve nasal swap örnekleri kit prosedürüne uygun olarak ELISA ile kontrol edilmiştir. İncelenen sperma ve nasal swap örneklerinin 1 (%1)'er adedi BHV-1 antijen varlığı yönünden pozitif olarak tespit edilmiştir. Araştırmada, ELISA'nın BHV-1'in antijen varlığının tespiti amacıyla kullanılabilirliğini, ancak hassasiyetinin daha az olduğu ve başka bir test ile sonucun mutlaka desteklenmesi gerektiği ortaya konulmuştur.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda hızı, spesifitesi ve sensitivitesi nedeniyle polimerase chain reaction (PCR) metodu üzerinde yoğunlaşmıştır (Sreenivasa ve ark 1996, Rocha ve ark 1999, Fuchs ve ark 1999). PCR metodunun çok kısa sürede sonuç verebilmesi ve diğer rutin tekniklere oranla daha duyarlı olması nedeniyle büyük bir avantaja sahip olduğu bildirilmiştir (Belak ve ark. 1987, Belak ve Ballagi-Pordany 1993, Çetinkaya 1998).

Birçok araştırmacı (Rola ve Zmudzinski 1989, Van Engelenburg ve ark 1995, Masri ve ark 1996, Wagter ve ark 1996, Rocha ve ark 1998, Smits ve ark 2000)'ya göre PCR metodu klinik numunelerden BHV-1'in tespitinde, hücre kültüründe virus izolasyon metoduna göre daha duyarlıdır.

Rola ve Zmudzinski (1989) yaptıkları bir çalışmada, BHV-1 ile doğal olarak enfekte boğaların sperma örneklerini kullanarak, PCR ve virus izolasyon metodlarının duyarlılıklarını karşılaştırmışlardır. MDBK devamlı hücre kültürlerine virus izolasyonu amacıyla yöntemine uygun olarak hazırladıkları 44 sperma örneğini inokule ederek, IF testi ile 6 (%13.6)'sını BHV-1 olarak tanımlanmıştır. Araştırmacılar (1989), incelenen sperma örneklerinin 21 (%47.7)'ini ise PCR metodu ile pozitif olarak belirleyerek, PCR'in virus izolasyon metodundan 10 kat daha fazla duyarlı olduğunu ifade etmişlerdir.

Rocha ve ark (1998) Brezilya'da bir suni tohumlama merkezinde bulunan 61 boğadan topladıkları 101 sperma örneğini hücre kültüründe virus izolasyonu ve PCR metodu ile inceleyerek her iki testi karşılaştırmışlardır. Araştırmacılar (1998) hücre kültüründe izole ettikleri 20 adet (%19.8) virusu nötralizasyon testi ile, araştırılan örneklerin 32 adedini (%31.7) ise PCR metodu ile BHV-1 olarak tanımlanmıştır.

Bu çalışmada, klinik olarak sağlıklı görünümü ve bir yaşında olan 100 adet boğadan alınan sperma ve nasal swap örnekleri yöntemine uygun olarak hazırlandıktan sonra PCR metodu ile incelenmiş ve elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez ile analizi sonucunda 23 sperma örneği BHV-1 DNA varlığı yönünden pozitif bulunurken, nasal swap örneklerinin hepsi negatif olarak tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre PCR metodu hücre kültüründe virus izolasyonu ve ELISA'ya göre daha duyarlı bulunmuştur. Bu sonuç daha önce yapılan ve PCR metodunun hücre kültüründe virus izolasyonundan daha duyarlı olduğunu gösteren çalışmalar (Rola ve Zmudzinski 1989, Van Engelenburg ve ark 1995, Rocha ve ark 1998, Zhou ve ark 1999, Smits ve ark 2000) ile uyumlu bulunmuştur.

Araştırmada, toplam 25 hayvan virus (hücre kültüründe virus izolasyonu ile 15'i), viral genom (PCR ile 23'ü) veya viral antijen (ELISA ile 1'i) varlığını tespit etmek amacıyla yapılan testler ile pozitif olarak belirlenirken, 23 hayvan BHV-1'e karşı oluşan antikorlar yönünden pozitif (ELISA ile 23 ve mNT ile 14) olarak tespit edilmiştir. Araştırmada virus/ viral genom veya viral antijen varlığı yönünden pozitif bulunan toplam 25 hayvandan 18 adedinde antikor tespit edilememiştir. Bu sonuçlar, 18 hayvanda örneklemenin yapıldığı dönemde enfeksiyonun akut olarak seyrettiğini ve hayvanların virusa karşı henüz antikor oluşturmaya başlamadığını göstermektedir. Böyle bir durumda 2-3 hafta sonra yapılacak olan 2. bir örnekleme ile enfeksiyonun durumu daha açık olarak ortaya konabilir. Bunun yanı sıra, yukarıda belirtilen 18 hayvanda Kahrs (1977)'in da bildirdiği gibi virusun lokal bir enfeksiyon oluşturabileceği ve bu nedenle de lokal enfeksiyon esnasında sirkülasyonda antikorların tespit edilemeyecek kadar düşük seviyede olabileceği de göz ardı edilmemelidir. Hem antikor hem de virus/ viral genom veya viral antijen varlığı yönünden pozitif olarak tespit edilen 7 hayvanda ise BHV-1 rekürrensini (tekrarlama) meydana geldiği düşünülebilir. Bununla ilgili olarak, Güngör (2003) tarafından yapılan bir çalışmada antikor yanıtının mevcut olduğu hayvan po-

pulasyonlarında BHV-1 rekürrensi olduğu saptanmış, 1/24'e kadar olan antikor titre değerlerinin bireylen BHV-1 rekürrens veya reenfeksiyonlarından koruyamadığı önemli bir epidemiyolojik sonuç olarak değerlendirilmiştir. Bu çalışmada da antikor yanıtının mevcut olduğu hayvanların antikor titreleri 1/1.78 ile 1/22.4 arasında tespit edilmiştir. Araştırmada, virus/ viral genom veya viral antijen varlığı yönünden negatif olduğu halde antikor varlığı yönünden pozitif olarak tespit edilen 16 hayvanda ise enfeksiyonun latent bir dönemde olabileceği akla gelmektedir.

Sonuç olarak çalışmada, serolojik teşhiste ELISA'nın mNT'nden, BHV-1'in teşhisinde ise PCR'in ELISA ve virus izolasyon metotlarından daha hassas olduğu görülmektedir. Bu çalışmada, direkt teşhis amacıyla kullanılan sperma örneklerinden tespit edilen virus/ viral genom veya antijen varlığı (PCR ile 23, VI ile 15 ve ELISA ile 1) nasal swap örneklerinde tespit edilenden ( PCR ile 0, VI ile 0 ve ELISA ile 1) çok daha fazladır. Bu durum enfeksiyonun hayvanların büyük çoğunluğunda lokal olarak seyrettiğini göstermektedir. Bu durum, özellikle suni tohumlama merkezlerinde kullanılan ya da bu merkezlerde kullanılmak üzere seçilen boğaların BHV-1 enfeksiyonu yönünden araştırılmasında materyal olarak nasal swaptan çok spermanın seçilmesinin, teşhis açısından daha güvenilir olduğunu göstermektedir. Bu araştırmadan elde edilen sonuçlar, sığırların özellikle boğaların rutin olarak BHV-1 antikor varlığı yönünden belirli periyotlarda incelenmesi ve bu kontrollerin BHV-1 varlığını ortaya koyan direkt teşhis metotlarından birisi ile özellikle de PCR ile mutlaka desteklenmesi gerektiğini göstermiştir.

### Kaynaklar

- Belak S, Rockborn G, Wierup M, Belak K, Berg M and Linne T (1987). Aujeszky's disease in pigs diagnosed by a simple method of nucleic acid hybridization, *J Vet Med B*, 34, 519-529.
- Belak S and Ballagi-Pordany A (1993). Application of the polymerase chain reaction (PCR) in veterinary diagnostic virology, *Vet Res Commun*, 17, 55-72.
- Bilge Dağalp S, Yıldırım Y ve Alkan F (2001). Buzağılarda maternal BHV-1 antikor düzeyinin belirlenmesi, *A Ü Vet Fak Derg*, 48, 117-122.
- Bolat Y, Bulut H, Özdarendeli A and Doymaz MZ (1996). Development of enzyme linked immunosorbent assay for detection of antibodies in infectious bovine rhinotracheitis/ infectious pustular vulvovaginitis virus in cattle, *F Ü Sağ Bil Derg*, 10, 2, 283-288.
- 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 Akça Y (1987). First isolation of IBR virus in Turkey, *Trop Anim Hlth Prod*, 19, 56.
- Cho HJ and Bohac JG (1985). Sensitivity and specificity of a enzyme-linked immunosorbent assay for detection of infectious bovine rhinotracheitis viral antibody in cattle, *Can J Comp Med*, 49, 189-194.
- Collins JK, Bulla AG, Riegel CA and Butcher AC (1984/85). A single dilution enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitative detection of antibodies to bovine herpesvirus type 1, *Vet Microbiol*, 10, 133-147.
- Çetinkaya B (1998). Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) temel prensipleri, *F Ü Sağ Bil Derg*, 12, 2, 149-156.
- Durham PJK and Sillars HM (1986). Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for serodiagnosis of infectious bovine rhinotracheitis infection, with results of a preliminary survey, *New Zealand Vet Journal*, 34, 27-30.
- Edwards S, Chasey D and White H (1983). Experimental infectious bovine rhinotracheitis: comparison of four antigen detection methods, *Res Vet Sci*, 34, 42-45.
- Edwards S, Woods SB, Westcott DG, Emmerson M, Jones PC and Phillips AJ (1986). An evaluation of five serological tests for the detection of antibodies to bovine herpesvirus 1 vaccinated and experimentally infected cattle, *Res Vet Sci*, 41, 378-382.
- Engels M and Ackermann M (1996). Pathogenesis of ruminants herpesvirus infections, *Vet Microbiol*, 53, 3-15.
- Florent G and Marneffe DC (1986). Enzyme linked immunosorbent assay used to monitor serum antibodies to bovine respiratory disease viruses, *Vet Microbiol*, 11, 309-317.
- Frey HR and Liess B (1971). Vermehrungskinetik und verwendbarkeit eines stark zytopatogenen VD-MD-Virusstammes für diagnostische untersuchungen mit der Mikrotiter-Methode, *Zbl Vet Med*, 18, 61-71.
- Fuchs M, Hübert P, Dettner J and Rziha HJ (1999). Detection of bovine herpesvirus type 1 in blood from naturally cattle by using a sensitive PCR that discriminates between wild-type virus and virus lacking



glycoprotein E, J Clin Microbiol, 2498-2507.

Güngör BA (2003). Bir süt sığırcılığı işletmesinde tekrarlayan (rekürrent) BHV-1 enfeksiyon oranı, virus izolasyonu ve karakterizasyonu, A Ü Vet Fak, Doktora Tezi, Ankara.

Jones C, Delhon G, Bratanich A, Kutish G and Rock D (1990). Analysis of the transcriptional promoter which regulates the latency-related transcript of bovine herpesvirus 1, J Virol, 1164-1170.

Kaashoek MJ, Straver PH, Van Rooij EMA, Quak J and Van Oirschot JT (1996). Virulence, immunogenicity and reactivation of seven bovine herpesvirus 1.1 strains: clinical and virological aspects, Vet Rec, 26, 416-421.

Kahrs RF (1977). Infectious bovine rhinotracheitis: a review and update, J Am Vet Med Assoc, 15, 171, 1055-64.

Kit S, Otsuka H and Kit M (1992). Blocking ELISA for distinguishing infectious bovine rhinotracheitis virus (IBRV)-infected animals from those vaccinated with a gene-deleted marker vaccine, J Virol Methods, 40, 45-56.

Kupferschmied HU, Kihm U, Bachmann P, Müller KH and Ackermann M (1986). Transmission of IBR/IPV virus in bovine sperma: A case report, Theorogenology, 25, 3, 439-443.

Masri SA, Olsan W, Nguyen PT, Prins S and Deregt D (1996). Rapid detection of Bovine Herpesvirus 1 in the sperma of infected bulls by a nested polymerase chain reaction assay, Can J Vet Res, 60, 100-107.

Msolla PM, Wiseman A and Selman IE (1981). The prevalence of serum neutralizing antibodies to infectious bovine rhinotracheitis virus in Scotland J Hyg Comb, 86, 209-215.

Öztürk F, Toker A ve Yavru S (1988). Konya Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü sığırlarında infectious bovine rhinotracheitis (infectious pustular vulvovaginitis (IBR/IPV) üzerine araştırma, S Ü Vet Fak Derg. 4, 1, 53-64.

Rocha MA, Barbosa EF, Guimaraes SEF, Dias Neto E and Gouveia AMG (1998). A high sensitivity-nested PCR assay for BHV-1 detection in sperma of naturally infected bulls, Vet Microbiol, 63, 1-11.

Rocha MA, Barbosa EF, Guedes RM, Lage AP, Leite RC and Gouveia AM (1999). Detection of BHV-1 in a naturally infected bovine fetus by a nested PCR assay, Vet Res Commun, 23, 2, 133-141.

Rola J and Zmudzinski JF (1989). Detection of bovine

herpesvirus 1 in bull sperma by PCR, Bull Vet Ins Pulawy, 43, 119-123

Singh BK, Kant R and Tongaonkar SS (1985). Serological survey of infectious bovine rhinotracheitis (IBR) in dairy cattle, Ind J Anim Sci, 55,10, 843-846.

Smith GA, Young PL and Mattick (1991). Nucleotide and amino acid sequence analysis of the thymidine kinase gene of a bovine encephalitis herpesvirus, Arch Virol, 119, 199-210.

Smits CB, Van Maanen C, Glas RD, De Gee AL, Dijkstra T, Van Oirschot JT and Rijsewijk FA (2000). Comparison of three polymerase chain reaction methods for routine detection of bovine herpesvirus 1 DNA in fresh bull sperma, J Virol Methods, 85,1-2, 65-73.

Sreenivasa BP, Rasool TJ and Natarjan C (1996). Direct detection of Bovine Herpesvirus tip-1 DNA from cell culture fluids using polymerase chain reaction, Ind J Exper Biol, 34, 1169-1171.

Ünver A (2002). Sığırlarda BHV-1 enfeksiyonlarının PCR ve ELISA ile saptanması ve risk faktörlerinin belirlenmesi, İ Ü Vet Fak, Doktora Tezi.

Van Engelenburg FAC, Van Schie FW, Rijsewijk FAM and Van Oirschot JT, (1995). Excretion of bovine herpesvirus 1 in sperma is detected much longer by PCR than by virus isolation, J Clin Microbiol, 33, 2, 308-312.

Van Oirschot JT, Straver PJ, Van Lieshout JA, Quak J, Westenbrink F and Van Exsel AC (1993). A subclinical infection of bulls with bovine herpesvirus type 1 at an artificial insemination center, Vet Rec, 9, 132, 32-35.

Wagter LH, Glas RD, Bleumink-Pluym N, Van Engelenburg FA, Rijsewijk FA and Houwer DJ (1996). A polymerase chain reaction (PCR) assay for the detection of bovine herpesvirus 1 (BHV1) in selectively digested whole bovine sperma, Vet Res Commun, 20, 4, 401-408.

Whetstone CA, Wheeler JG and Redd DE (1986). Investigation of possible vaccine-induced epizootics of infectious bovine rhinotracheitis, using restriction endonuclease analysis of viral DNA, Am J Vet Res, 47, 8, 1789-1795.

Winkler MTC, Doster A, Sur JH and Jones C (2002). Analysis of bovine trigeminal ganglia following infection with bovine herpesvirus 1, Vet Microbiol, 86, 139-155.

Yason CV, Harris LM, McKenna PK, Wadowska D and Kibenge FS (1995). Establishment of conditions for the detection of Bovine Herpesvirus tip-1 by polymerase chain reaction using primers in the thymidine kinase re-

gion, Can J Vet Res, 59, 2, 94-101.

Yavru S, Şimşek A ve Öztürk F (1998a). Boğalarda Bovine Herpes Virus tip 1 (BHV-1) enfeksiyonunun serolojik ve virolojik olarak araştırılması, Vet Bil Derg, 14, 2, 101-110.

Yavru S, Öztürk F, Şimşek A, Yapkiç O ve Yıldız C (1998b). Suni ve tabii tohumlamada kullanılan bo-

ğaların spermalarından virus izolasyonu, Vet Bil Derg, 14, 2, 39-46.

Zhou J, Lyaku J, Fredrickson RA and Kibenge FS (1999). Improved detection of bovine herpesvirus 1 in artificially infected bovine sperma by protein amplification, J Virol Methods, 79, 2, 181-9.