

BOĞALARDA BAZI ÖNEMLİ PATOJEN ETKENLERİN ARAŞTIRILMASI*

Leyla Güler¹@ Sibel Yavru² Mehmet Ekik¹ Ümran Ok¹

Atilla Şimşek² Kadir Gündüz¹ Yasin Gülcü¹

Investigation of Some Important Pathogens in Bulls

Özet: Bu çalışmada, boğa semen ve prepusyal yıkantı örneklerinde, *Bovine Herpesvirus 1* (BHV-1), *Bovine Viral Diarrhea Virus* (BVDV), *Campylobacter*, *Brucella* ve *Mycoplasma* gibi bazı önemli enfeksiyöz etkenlerin varlığı, viral/bakteriyel izolasyon, PCR/RT-PCR ve serolojik yöntemlerle araştırıldı. Çalışmada, mezbahaya kesime getirilen bir yaşın üzerindeki hayvanlardan alınan 73 adet semen, 94 adet prepusyal yıkantı ve 101 adet kan serumu örneği ile bir suni tohumlama merkezindeki 19 adet boğadan değişik tarihlerde alınan 210 adet dondurulmuş semen ve bu hayvanların kan serumu örnekleri incelendi. Semen örneklerinden PCR/RT-PCR ve virus izolasyon yöntemleri ile BHV-1 ve BVDV; bakteriyolojik muayenelerde ise *Brucella* ve *Campylobacter* etkenleri tespit edilmedi. İncelenen 94 prepusyal yıkantı örneğinin 24 (%25.5)'ünden *Mycoplasma* spp. izole edildi. Serolojik olarak ELISA ile test edilen 120 boğaya ait (19'u suni tohumlama merkezi, 101'i mezbahadan alınan) kan serumlarının 42'sinde (%35) BHV-1, 46 (%39.6)'sında BVDV antikorları tespit edildi. Suni tohumlama merkezine ait 19 boğa kan serumunun tümü BHV-1, 4'ü ise BVDV antikor pozitif bulundu. İncelenen serumların tümünde *Brucella* antikorları negatif bulundu. Çalışmada test edilen hayvanların hiçbirinde klinik olarak herhangi bir bulguya rastlanmadı.

Anahtar Kelimeler: Boğa, Semen, BHV-1, BVDV, PCR, RT-PCR, *Campylobacter*, *Brucella*, *Mycoplasma*

Summary: In this study, presence of some important pathogens such as Bovine Herpesvirus 1 (BHV-1), Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV), *Campylobacter*, *Brucella* and *Mycoplasma* were investigated by viral and bacteriological isolation, PCR/RT-PCR and serological methods in bulls. Seventy three semen, 94 preputial washings and 101 serum samples from bulls above 1 year old brought in slaughterhouse and, 210 extended semen samples collected in different dates from 19 bulls in an artificial insemination center and their sera were examined. BHV-1 and BVDV were not determined by PCR/RT-PCR and virus isolation in semen samples. *Brucella* and *Campylobacter* were not isolated in any of semen and preputial washing samples. *Mycoplasma* spp. was isolated in 24 (25.5%) of 94 preputial washing samples. In 120 bull sera (19 sera from an artificial insemination center, 101 from slaughterhouse) tested by ELISA, 42 (35 %) were positive for BHV-1 and 46 (39.6 %) for BVDV antibodies. Of the 19 bulls in an artificial insemination center all were seropositive for BHV-1 and 4 were seropositive for BVDV. All serum samples were negative for *Brucella* antibodies. None of the bulls examined in this study had any clinical symptoms.

Key Words: Bull, Semen, BHV-1, BVDV, PCR, RT-PCR, *Campylobacter*, *Brucella*, *Mycoplasma*

Giriş

Sığır semenlerinin bazı patojen mikroorganizmaları taşıma ve bulaştırma riski nedeniyle suni tohumlama merkezlerinde veya bireysel olarak yetiştirilen boğaların spesifik patojen etkenlerden arı olarak yetiştirilmesi gerekmektedir. Ayrıca uluslararası ticarete genetik kalitenin yanında mikrobiyolojik kalite yönünden de artan talep, semende bulunmaması gereken patojen etkenler listesini ar-

tırmaktadır. Son zamanlarda ülkeler arası ticarete ürünlerin güvenliğinin daha fazla ön plana çıkma eğilimi, semenin mikrobiyal kalitesinin sağlanması için standart teşhis yöntemlerinin uygulanma ihtiyacını doğurmaktadır.

Boğaların taşımaması gereken bakteriyel patojenlerden biri olan *C. fetus subsp. venerealis*, ineklerde abortus, erken embryo ölümü ve infertilite ile karakterize venereal kampilobakteriozis enfeksiyonuna

Geliş Tarihi : 16.12.2004 @: gulerleyla@hotmail.com

* Bu proje Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, TAGEM tarafından desteklenmiştir.

1. Konya Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, KONYA

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

neden olmaktadır. Etken, hiçbir klinik belirti göstermeksizin boğaların prepusyumuna yerleşerek enfeksiyonun başlıca bulaşma kaynağını oluşturur (OIE, 2000). Ülkemizde boğalardan *C. fetus* subsp. *venerealis*'in izolasyonu ilk olarak Diker ve ark.(1988) tarafından bildirilmiştir.

Sığırların reproduktif sistemi ile ilişkili diğer bir mikroorganizma grubu *Mollicutes* sınıfında yer alan *Mycoplasma* ve *Ureaplasma*'lardır. *Acholeplasma* spp. erkek ve dişi genital sistemden sıklıkla ve nadiren atık fötuslardan izole edilmesine rağmen bu mikroorganizmaların reproduktif sistem hastalıkları ile ilişkisi ortaya konulamamıştır. Birçok ülkede yapılan çalışmalarda suni tohumlamada kullanılan boğa semenlerinin büyük bir oranda *Mycoplasma* ve *Ureaplasma*'larla kontamine olduğu tespit edilmiştir. Semenden izole edilen değişik *Mycoplasma* türlerinin erkek ve dişi genital sisteme kolonize olma yeteneğine sahip olduğu, özellikle *M. bovis* genitalum, *M. bovis* ve *Ureaplasma diversum* gibi bazı türlerin erkek ve dişi reproduktif sistem enfeksiyonları ile ilişkisi ortaya konulmuştur (Eaglesome ve ark., 1992).

Boğaların brusellozisten ari olması gerekmektedir. *Brucella* ile enfekte erkek hayvanlarda genellikle genital organlar etkilenmektedir. Ancak, enfekte boğaların semeni *Brucella* içermesine rağmen tabii tohumlama ile enfeksiyonun bulaştırılması nadiren görülmektedir (Aiello, 1998).

BHV-1, sığırlarda üst solunum sistemi hastalığı (IBR), enfeksiyöz pustular vulvovaginitis (IPV) ve enfeksiyöz pustular balanopostitis, abortus ve fertilitede azalma gibi reproduktif problemlere de neden olmaktadır (OIE, 2000). Genital enfeksiyonu takiben BHV-1 sakral ganglionlarda latent olarak kaldığından enfekte boğalar primer enfeksiyondan uzun süre sonra bile semen ile intermitent olarak virüsü saçma ve yaşam boyu taşıyıcı potansiyeline sahiptirler (Van Oirschot, 1995). Ülkemizde ilk BHV-1 izolasyonu Burgu ve Akça (1987) tarafından bildirilmiş ve Burgu ve Akça (1991) tarafından suni tohumlamada kullanılan boğalarda bu virüsa karşı nötralizan antikorların varlığı tespit edilmiştir. Yavru ve ark. (2001) ise inceledikleri 60 semen örneğinin 3'ünden BHV-1 izole etmişlerdir.

BHV-1 de diğer birçok etken gibi sperm hücrelerinden ziyade çoğunlukla seminal plazmada bulunmaktadır (Van Engelenburg ve ark., 1993; Van Engelenburg ve ark., 1995; Van Oirschot, 1995; Amin ve ark., 2001). BHV-1 ile enfekte boğaların serolojik olarak antikorlar tespit edilmeden önce semen ile virüsü saçtıkları tespit edilmiştir (Xia ve ark., 1995; De Gee ve ark., 1996).

Sığırların bovine viral diarrhoea virus (BVDV) enfeksiyonları dünyada yaygın olarak görülmektedir. BVDV enfeksiyonunun değişik formlarının neden olduğu ekonomik kayıplar, *repeat breeding* problemleri, abortus, embryonal ölüm, fetal mumifikasyon ve konjenital defektler, fetal enfeksiyondan sonra büyümede gecikme, süt veriminde azalma ve diğer bozuklukları içine almaktadır (Houe, 1999). Gebeliğin ilk üçte birlik döneminde oluşan prenatal enfeksiyonlar immunotolerant ve persiste enfekte buzağuların doğumu ile sonuçlanmaktadır. Persiste enfekte hayvanlar yaşam boyu virus taşıyıcısı olarak kalırlar ve sürekli olarak fazla miktarda virüsü saçarlar. BVDV'unun sürüde başlıca bulaşma kaynağının persiste enfekte hayvanlar olduğu kabul edilmektedir. Postnatal BVDV enfeksiyonları genellikle subklinik ve geçici olup uzun süren antikor oluşumuna neden olmaktadır. Akut enfekte hayvanlardan virus akut enfeksiyon süresince ve sadece birkaç gün ve daha az miktarlarda saçılmaktadır (Houe, 1999). Hem akut hem de persiste enfekte hayvanlar semen ile virüsü saçabilir. Ancak, akut enfekte hayvanların virüsün bulaştırılmasında persiste enfekte hayvanlar kadar etkili olmadığı bildirilmektedir (Meyling ve Jensen, 1988; Howard ve ark., 1990; Kirkland ve ark., 1991; Kommisrud ve ark., 1996; Kirkland ve ark., 1997).

Viral etkenlerin izolasyonu zaman alıcı olup semenden virus izolasyonu, semenin hücre üzerine sitotoksik etkisi nedeniyle güç olmaktadır. Son yıllarda BHV-1'in sığır semeninden (Van Engelenburg ve ark., 1993; Xia ve ark., 1995; De Gee ve ark., 1996; Masri ve ark., 1996; Wagter ve ark., 1996; Kataria ve ark., 1997; Rocha ve ark., 1998) ve BVDV'unun hayvanların süt, kan ve iç organ örneklerden RT-PCR ile tespiti konusunda çalışmalar (Hooft van Iddekinge ve ark., 1992; Sandvik ve ark.,1997; El-Kholy ve ark., 1998; Drew ve ark., 1999; Letellier ve ark., 1999; Radwan ve ark., 1999) yapılmıştır.

Bu çalışmada, boğa semen ve prepusyal yıkantı örneklerinde *Campylobacter*, *Brucella* ve *Mycoplasma* izolasyonu ile semende BHV-1 ve BVDV'unun PCR/RT-PCR ve virus izolasyon yöntemleri ile karşılaştırmalı olarak araştırılması ve boğalarda bu etkenlerin yaygınlığının tespiti amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Semen, Prepusyal Yıkantı ve Kan Serumu Örnekleri: Çalışmada Konya Konet Mezbahasında kesime getirilen 1 yaşın üzerindeki erkek hayvanlardan alınan 73 adet semen ve 94 adet prepusyal yıkantı örnekleri ile bir suni tohumlama merkezine ait 19 adet boğadan değişik tarihlerde ve herbir hayvandan en az 2 en fazla 19 adet olmak üzere farklı sayılarda alınan toplam 210 adet dondurulmuş semen (payet) ör-

nekleri kullanıldı. Mezbahaya kesime getirilen 101 boğadan ve suni tohumlama merkezine ait 19 adet boğadan serolojik inceleme amacıyla kan serumu örnekleri alındı. Uygulanan testlere göre örneklerin dağılımı Tablo 1 de özetlenmiştir.

Bakteriyel İzolasyon Yöntemleri: *Campylobacter* izolasyonu amacıyla, semen ve prepusyal yıkantı örneklerinden %7 koyun kanlı agar ve *Campylobacter* selektif supplement (Oxoid) ilaveli kanlı agar besilerine ekim yapılarak 37 °C'de mikroaerofilik ortamda 3-6 gün inkübe edildi (OIE, 2000).

Mycoplasma izolasyonu için, semen ve prepusyal yıkantı örneklerinden Modifiye Hayflick sıvı ve katı besilerine ekimler yapıldı. Ekim yapılan agar pleytleri 37 °C'de %5-10 CO₂'li ve nemli ortamda inkübasyona bırakılarak 48 saatten sonra koloniler mikroskopta x40 büyütmede incelendi. Sıvı besileri ise 37 °C'de aerobik olarak inkübe edilerek, günlük kontrollerde hafif renk değişimi ve bulanıklık görülen tüplerden agar besilerine pasaj yapıldı. 14 güne kadar üreme görülmeyen örnekler negatif kabul edildi (Razin ve Tully, 1983).

Brucella izolasyonu amacıyla, semen ve prepusyal yıkantı örneklerden %7 koyun kanlı agar ve *Brucella* selektif supplement (Oxoid) içeren kanlı agar besilerine ekimler yapılarak %5-10 CO₂'li ortamda 3-7 gün inkübe edildi (Alton ve ark., 1988).

Viral İzolasyon Yöntemleri: Virus izolasyonu için toplanan semen örnekleri, Lowen ve Darcel (1985)'e göre hazırlandı. Virus izolasyonu amacıyla FDB ve MDBK hücre kültürleri kullanıldı.

PCR Testleri için Semenden Viral DNA ve RNA Ekstraksiyonları: Semen örneklerinden BHV-1 DNA ekstraksiyonu amacıyla, bir tüpe alınan 100 µl semen örneği (dondurulmuş semen örnekleri için 200 µl) Proteinase K reagent'i (1.5 mg/ml Proteinase K, %0.75 sodium laurylsarcosine ve 0.15 M NaCl) ile 55 °C'de 1 saat bekletildikten sonra 10 000 rpm de 45 san. santrifüj edilerek spermatozoid içermeyen üst kısım başka bir tüpe alındı ve ekstraksiyon yapıldı (Wagter ve ark., 1996). BVDV RNA ekstraksiyonu için de semen örneği BHV-1 DNA ekstraksiyonunda olduğu gibi Proteinase K reagent'i ile muamele edildikten sonra RNA ekstraksiyonu guanidinium isothiocyanate ve phenol/chloroform ekstraksiyon yöntemi ile yapıldı (Chomczynski ve Sacchi, 1987).

BHV-1 PCR Testi: Semen örneklerinde BHV-1'in PCR yöntemi ile tespiti amacıyla, BHV-1 glikoprotein D geni için spesifik 343 bp bir fragmenti amplifiye eden primer çifti kullanıldı (Smits ve ark.,

2000).

Primerler: P1: 5'- CGG CCG CTG TAC TAC ATG GA- 3'

P2: 5'- GAT ACG TCA GGC GCA GAA CC- 3'

PCR reaksiyonu 10xPCR buffer (500 mM KCl, 100 mM Tris/HCl (pH 8.3), %0.1 gelatine), 250 µM her bir dNTP, 2 mM MgCl₂, %5 glycerol, 1.25 U Taq polymerase (Promega), her bir primerden 1 µM ve 5 µl template ilavesi ile toplam 50 µl hacimde gerçekleştirildi. Thermal cycler'da 94 °C'de 30 san. yi takiben 94 °C'de 1.5 dak. , 67 °C'de 1.5 dak. ve 72 °C'de 1 dak. dan oluşan 35 devir uygulandı. PCR ürünleri %1.5 agarose jelde elektroforezi takiben etidium bromide ile boyanarak UV transilluminatörde görüntüledi (Wagter ve ark., 1996). Testte pozitif kontrol olarak BHV-1 Colorado suşu kullanıldı.

BVDV RT-PCR Testi: Semen örneklerinde BVDV'unun RT-PCR yöntemi ile tespiti amacıyla, tüm pestiviruslarda korunan bir bölge olan 5'non-coding bölgesinden 293 bp bir fragmenti amplifiye eden primer çifti kullanıldı (Drew ve ark., 1999).

Primerler: V324: 5' ATG CCC ATA GTA GGA CTA GCA 3'

A14: 5' CAA CTC CAT GTG CCA TGT ACA GCA G 3'

Reverse Transcription (RT) Reaksiyonu: Ekstrakte edilen RNA'dan 8.5 µl alınarak 75 °C' de 5 dak. bekletildi ve daha sonra buz üzerinde 5 dak. tutularak soğutuldu. Üzerine 5(Reverse transcriptase buffer (Promega), 1 mM dNTPs, 300 ng random hexamer (Promega), 200 U reverse transcriptase M-MLV (Promega), 20 U RNase inhibitörü (Promega) ilave edilerek, reverse transcription işlemi toplam 20 µl hacimde ve 37 °C de 1 saat bekletilerek gerçekleştirildi (Radwan ve ark., 1999).

PCR reaksiyonu 10xPCR buffer (Promega), 250 µM her bir dNTP, her bir primerden 0.5 µM, 2 mM MgCl₂, 1.5 U Taq polymerase (Promega), 10 µl reverse transcription ürünü ile toplam 50 µl hacimde gerçekleştirildi. Thermal cycler'da 94 °C'de 30 san., 57 °C'de 1 dak., 72 °C'de 30 san. olmak üzere 35 devirlik bir program uygulandı. PCR ürünleri %1.5 agarose jelde elektroforezi takiben UV transilluminatörde görüntüledi (Drew ve ark., 1999). Testte pozitif kontrol olarak BVDV NADL suşu kullanıldı.

Serolojik Testler: Kan serumu örneklerinde antikorların tespiti, BHV-1 için Institute Pourquier ve BVDV için ise Bio-X Diagnostics firmasından temin edilen ELISA kiti kullanılarak yapıldı.

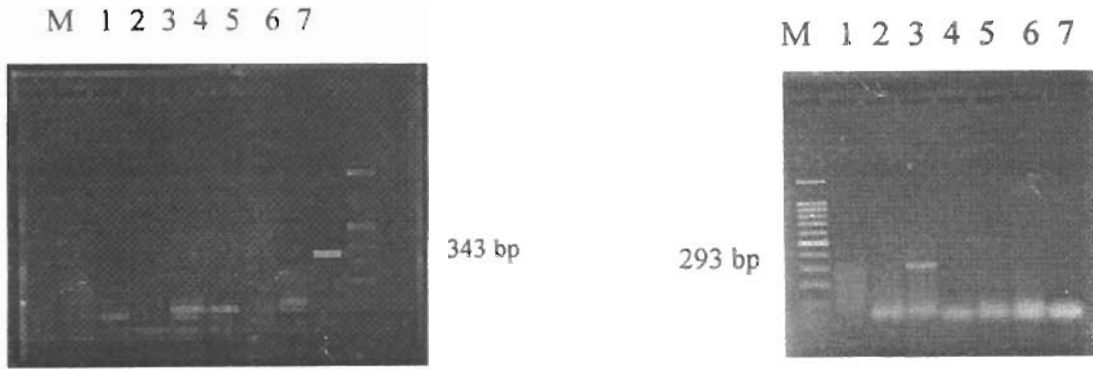
Brucella antikorlarının tespiti için Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsünden temin edilen RBPT antijeni kullanıldı (Alton ve ark. 1988).

Bulgular

Bakteriyolojik Test Sonuçları: Mezbahada kesilen hayvanlardan alınan 73 semen ve 94 hayvana ait prepusyal yıkantı örneklerinden *Brucella* ve *Campylobacter* izole edilemedi. Yetmiş üç adet semen ve 94 prepusyal yıkantı örneklerinin *Mycoplasma* yönünden kültürü sonucu semen örneklerinde *Mycoplasma* izolasyonu olmazken, 24 (%25.5) prepusyal yıkantı örneğinde *Mycoplasma* spp. izole edildi.

PCR ve Virolojik Test Sonuçları: Mezbahadan alınan 73 adet hayvana ait taze semen ve bir suni tohumlama merkezindeki BHV-1 seropozitif 19 adet boğadan alınan toplam 210 adet sperma payetinin virus izolasyonu ve PCR testleri ile incelenmesi sonucu hiçbir örnekte BHV-1 virusu tespit edilmedi (Şekil 1).

Mezbahadan alınan 73 taze semen ve 210 adet sperma payetinin virus izolasyonu, 73 adet taze



Tablo 1. Boğalardan alınan kan serumu, semen ve prepusyal yıkantı örneklerinin serolojik, virolojik, bakteriyolojik, PCR ve RT-PCR test sonuçları

Etken	Yapılan Testler	İncelenen örnekler Test edilen örnek sayısı/pozitif örnek sayısı (%)			
		Kan serumu	Taze semen	Dondurulmuş semen*	Prepusyal yıkantı
BHV-1	ELISA	120/42 (%35)			
	PCR Virus izolasyonu		73/0 73/0	210/0 210/0	
BVDV	ELISA	120/46 (%39.6)			
	RT-PCR Virus izolasyonu		73/0 73/0	31/0 210/0	
Brucella	İzolasyon RBPT	120/0	73/0		94/0
Campylobacter	İzolasyon		73/0		94/0
Mycoplasma	İzolasyon		73/0		94/24 (%25.5)

* Bir suni tohumlama merkezindeki 19 adet boğadan değişik tarihlerde, herbir hayvandan en az 2, en fazla 19 kez alınan payet örnekleri.

semen ve bir suni tohumlama merkezindeki 15 boğaya ait 31 adet sperma payetinin RT-PCR yöntemleri ile incelenmesi sonucunda hiçbir örnekte BVDV'ü tespit edilemedi (Şekil 2).

Serolojik Test Sonuçları: Çalışmada toplam 120 adet (101'i mezbaha, 19'u bir suni tohumlama merkezinden alınan) kan serumu BHV-1 ve BVDV antikorları yönünden ELISA testi ile incelendi ve 42 (%35) hayvanda BHV-1, 46 (%39.6) hayvanda BVDV'una karşı antikor tespit edildi. Sperma payelleri test edilen 19 hayvanın kan serumlarından tümü BHV-1, 4'ü ise BVDV antikor pozitif bulundu. Serumların tümü brusellozis yönünden RBPT ile negatif bulundu.

Tartışma ve Sonuç

Bu çalışmada boğa semen ve prepusyal yıkantı örneklerinde bulunabilen ve boğaların ari olması gereken bazı önemli patojenlerin varlığının araştırılması amaçlandı. Boğaların genital siteminde potansiyel olarak bulunabilen bakteri ve virusların izolasyonları genel olarak güç, zahmetli ve zaman alıcı olup selektif besiyerleri gereklidir. Ayrıca semenin hücre üzerine toksisitesi nedeniyle viral etkenlerin izolasyonunda problemlerle karşılaşmaktadır. Bu nedenle alternatif teşhis yöntemleri konusunda araştırmalar yapılmaktadır. Ayrıca semen ile mikroorganizmaların atılması genel olarak sürekli ve fazla miktarda olmadığından tekrarlayan örnek alınmalarına ve daha sensitif teşhis yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır.

Çalışmada *Mycoplasma* yönünden incelenen semen ve prepusyal yıkantı örneklerinden sadece prepusyal yıkantı örneklerinden %25.5 oranında *Mycoplasma* spp. izole edildi. Ak ve ark. (1992) 100 boğa prepusyum yıkama sıvısından 20 *Mycoplasma* suşu izole etmişler ve bunların 6'sını *M. bovis genitalum*, 14'ünü ise *M. bovis* olarak tanımlamışlardır. Özdemir ve ark. (1999) ise inceledikleri 67 prepusyum yıkantisından 12 *Mycoplasma* ve 6 *Ureaplasma* suşu izole etmişler, izole edilen suşları *M. bovis*, *M. bovirhinis*, *U. diversum* ve *A. laidlawii* olarak tanımlamışlardır. Bu çalışmada klinik ve makroskopik olarak herhangi bir bulguya rastlanmayan hayvanların sadece prepusyal yıkantı örneklerinden izole edilen *Mycoplasma* suşlarının floradan kaynaklandığı düşünülmektedir.

BHV-1 ve BVDV sığırların iki önemli viral hastalığı olup birçok ülkede olduğu gibi ülkemizde de son yıllarda kontrol ve eradikasyonları konusunda

çalışmalara başlanmıştır. Bu virüsün semen ile atılabilmesi nedeniyle tohumlamada kullanılan boğaların IBR ve BVDV enfeksiyonlarından ari olması istenmektedir.

Bu çalışmada BHV-1 ve BVDV'larna karşı sırasıyla %35 ve %39.6 oranlarında seropozitiflik tespit edilirken, semen örneklerinde hem virus izolasyonu yapılamamış hem de PCR yöntemi ile viral DNA/RNA tespit edilememiştir. Aşı uygulamaları nedeniyle serolojik olarak tespit edilen antikorların enfeksiyondan kaynaklanıp kaynaklanmadığının tespiti güçtür. Ülkemizde yapılan çalışmalarda (Akça, 1981; Çabalar ve Akça, 1994; Bilge, 1996; Ertürk ve ark., 2002) BHV-1 ve BVDV'larna karşı yüksek oranlarda (% 60-80) seropozitiflik tespit edilirken virus izolasyonu veya viral antijen tespiti daha az oranlarda bildirilmiştir. BVDV yönünden yapılan çalışmalarda, Burgu ve ark. (1999) persiste virus enfeksiyonunu %0.25 oranında, Özkul ve ark. (1995) ise sütçü işletmelerde ortalama %0.3 oranında tespit etmişlerdir. Ertürk ve ark. (2002) Türkiye genelinde yaptıkları çalışmada BVDV antijeni tespit ettikleri hayvanların oranını %1.4 olarak belirtirken, Şimşek ve Öztürk (1997) 142 hayvanın 2'sinde viral antijen tespit etmişlerdir. Ak ve ark. (2002) ise nispeten yüksek oranda (%13.4) viral antijen varlığını bildirmişlerdir. Semenden ise BVDV tespitini bildiren bir çalışmaya rastlanmamıştır.

BHV-1'in semen örneklerinden PCR yöntemi ile tespiti konusunda çoğunlukla deneysel olarak enfekte edilen boğalardan elde edilen veya doğrudan virus ilave edilen semenlerde (Xia ve ark., 1995; Wagter ve ark., 1996; Kataria ve ark., 1997; Smits ve ark., 2000) ve doğal enfekte boğa semenleri ile (De Geer ve ark., 1996; Rocha ve ark., 1998; Rola ve Zrudzinski, 1999) bir çok çalışma yapılmıştır. Genel olarak PCR tekniğinin virus izolasyonundan daha duyarlı olduğu bildirilmektedir. Bunun nedeni PCR tekniği ile BHV-1'e ait genomun tespiti yapılırken, virus izolasyonu ile enfeksiyöz partiküllerin tespit edilebilmesidir. BHV-1 genom sayısının, enfeksiyöz partiküllere oranının 30-100 arasında olabileceği bildirilmektedir (Van Engelenburg ve ark., 1993; Van Engelenburg ve ark., 1995). Bu nedenle teorik olarak PCR tekniğinin virus izolasyonundan daha duyarlı olabileceği görülmektedir. Ayrıca semen içinde bulunma olasılığı olan nötralizan antikorlar ve dondurulan semenlere katılan çeşitli maddeler virüsün enfektivitesini etkileyebilmektedir. Van Engelenburg ve ark. (1995) BHV-1'i nötralize eden antikorların ilk tespit edilmeye başladığı 6-13. günlerde virus izolasyon oranının azaldığını tespit etmişlerdir. Araştırmacılar aynı zamanda deneysel enfeksiyondan 65 gün sonrasına kadar bazı semen örneklerinde PCR ile BHV-1 tespit edebilirken

virusu izole edememişlerdir. Smits ve ark. (2000) prepusyal boşluklarına BHV-1 inokule ettikleri boğalardan enfeksiyondan sonraki 107. güne kadar haftada iki kez semen örneklerini toplayarak, 3 ayı PCR yöntemiyle incelemişler ve hem taze semen hem de dondurulmuş semen örneklerinde PCR yönteminin virus izolasyonundan daha duyarlı olduğunu, ancak taze semende virus izolasyonu ve PCR'ın dondurulmuş semenden daha duyarlı olduğunu tespit etmişlerdir. De Gee ve ark. (1996) bir suni tohumlama merkezinde boğalarda doğal BHV-1 enfeksiyonu nedeniyle, vakanın tespitinden 2 ay önce ve 2 ay sonraki dönem süresince toplanan, 110 boğaya ait toplam 2383 donmuş semen örneğini PCR ile test etmişler ve 4'ünü pozitif bulmuşlardır. PCR pozitif örneklerin sadece 1'inde virus izolasyonu yapılabilmıştır; seropozitif 23 boğadan alınan toplam 318 taze semen örneğinin ise 11'inde (5 hayvana ait) BHV-1 DNA'sı tespit edilmiştir. Rola ve Zmudzinski (1999) yaptıkları çalışmada, yine BHV-1 enfeksiyonu tespit edilen bir suni tohumlama merkezine ait boğa semenlerinde virus izolasyonu ile PCR tekniğinin duyarlılığını benzer bulmuşlar, ancak nested PCR ile bu duyarlılığın 10 kat arttığını bildirmişlerdir. Yapılan çalışmalarda (Masri ve ark., 1996; Kataria ve ark., 1997; Rocha ve ark., 1998) nested PCR veya PCR ürünlerinin dot blot ile analizinin duyarlılığı artırdığı görülmektedir. Aynı zamanda PCR şartlarının optimizasyonu çok önemli olup, örneklerin hazırlanması ve uygulanan DNA ekstraksiyon yöntemi, PCR amplifikasyonu için seçilen hedef genler testin duyarlılığını etkilemektedir.

Bu çalışmada, Smits ve ark (2000) tarafından yapılan karşılaştırmalı çalışmada duyarlılığı en fazla bulunan primer çifti ile birlikte semende önerilen DNA ekstraksiyon yöntemi uygulandı, ancak incelenen örneklerde virus izolasyonu ve PCR yöntemi ile BHV-1 tespit edilemedi. Belirtilen potansiyele rağmen diğer saha çalışmalarında da doğal vakalardan semen ile virus atılımının yaygın olarak tespit edilemediği görülmektedir. Bu durum enfeksiyonun alınma yolu, enfeksiyonun dönemi, saha suşlarının özellikleri, alınan virus miktarı, ayrıca konakçı direnci veya hayvanların maruz kaldığı stres durumları gibi birçok faktörden etkilenebilir. Ancak BHV-1 ve BVDV'ları düşük de olsa taşıdıkları bu potansiyel nedeniyle uluslar arası hayvan, semen ve embryo ticaretine engeller getirmekte ve eradikasyonları büyük önem taşımaktadır. Suni tohumlama merkezlerinin bu enfeksiyonlardan arı olmak için uluslar arası standart kurallara (OIE Animal Health Code) göre periyodik testleri uygulamaları ve gerekli biyogüvenlik tedbirlerini almaları gerekmektedir.

Kaynaklar

- Aiello, S.E. (1998). Brucellosis. In "The Merck Veterinary Manual", 8th ed. Merck & Co., Inc., 999.
- Ak, S., Ak, K., Beşe, M., Ilgaz, A., İleri, İ.K., Hasöksüz, M. (1992). Marmara Bölgesinde kesime gönderilen boğaların genital sistemlerinde mycoplasmosis. *Pendik Vet. Mikrobiyol. Derg.* 23, 2, 155-164.
- Ak, S., Fırat, İ., Bozkurt, H.H., Gülyaz, V., Ak, K. (2002). The prevalence of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections in cattle and existence of persistently infected cattle in the Trakya Region. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 26, 245-248.
- Akça, Y. (1981). Türkiye'de sığır ve koyunlarda enfeksiyöz bovine rhinotracheitis/enfeksiyöz pustular vulvovaginitis (IBR/IPV) üzerine serolojik araştırmalar. *Ank. Üni. Vet. Fak. Doktora Tezi*, Ankara.
- Alton, G.G., Jones, L.M., Angus, R.D., Verger, J.M. (1988). Techniques for the brucellosis laboratory. *Institut National de la Recherche Agronomique (INRA)*, Paris, 13-60, 82-85.
- Amin, A.S., Hamdy, M.E.R., Ibrahim, A.K. (2001). Detection of *Brucella melitensis* in semen using the polymerase chain reaction assay. *Vet. Microbiol.* 83, 37-44.
- Bilge, S. (1996). Kan ve süt serumlarında IBR-IPV antikorlarının nötralizasyon testi ile saptanması ve süt örneklerinden virus izolasyonu. *Ankara Üniv. Sağlık Bil. Enst. Doktora Tezi*.
- Burgu, İ., Akça, Y. (1987). First isolation of IBR virus in Turkey. *Trop. Anim. Hlth. Prod.* 19, 56.
- Burgu, İ., Akça, Y. (1991). Türkiye'de suni tohumlamada kullanılan bazı damızlık boğalarda IBR/IPV enfeksiyonu. *A.Ü. Vet. Fak. Derg.* 33,1, 113-121.
- Burgu, İ., Aklan, F., Yeşilbağ, K. (1999). Türkiye'de sığırlarda persiste BVD virus enfeksiyonu. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.* 46, 169-177.
- Chomczynski P., Sacchi N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159.
- Çabalar, M., Akça, Y. (1994). Fertilite problemleri ineklerde enfeksiyöz bovine rhinotracheitis-enfeksiyöz vulvovaginitis (IBR-IPV) virus izolasyonları ve seroepidemiolojisi. *A.Ü. Vet. Fak. Derg.* 41, 3-4, 337-349.
- De Gee, A.L., Wagter, L.H., Hage, J.J. (1996). The use of 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, 163-168.
- Diker, S., Yurdaydın, N., Aydın, F. (1988). Boğalardan *Campylobacter fetus* subsp. *veneralis* ve *Campylobacter sputorum* subsp. *bubulus* izolasyonu. *Etlık Vet. Mikrobiyol.*

Derg. 6, 3, 135-142.

Drew, T.W., Yapp, F., Paton, D.J. (1999). The detection of bovine viral diarrhoea virus in bulk milk samples by the use of a single-tube RT-PCR. *Vet. Microbiol.* 64, 145-154.

Eaglesome, M.D., Garcia, M.M., Stewort, R.B. (1992). Microbial agents associated with bovine genital tract infections and semen Part II. *Haemophilus somnus*, *Mycoplasma* spp. and *Ureaplasma* spp., Chlamydia pathogens and semen contaminants; treatment of bull semen with antimicrobial agents. *Vet. Bull.* 62, 9, 887-910.

El-Kholy, A.A., Bolin, S.R., Ridpath, J.F., Arab, R.M.H., Abou-Zeid, A.A., Hamam, H.M., Platt, K.B. (1998). Use of polymerase chain reaction to simultaneously detect and type bovine viral diarrhoea viruses isolated from clinical specimen. *Res.Sci. Tech.Off.Int.Epiz.* 17, 3, 733-742.

Ertürk, A., Tatar, N., Kabaklı, Ö., İnçoğlu, Ş., Akın, A.İ. (2002). BVD-MD yönünden seronegatif sığırlarda, persiste BVD enfeksiyonlarının ELISA ile araştırılması. *Etlık Vet. Mikrob. Derg.* 13, 1, 32-44.

Hooft Van Iddekinge, B.J.L., Van Wamel, J.L.B., Van Gennip, H.G.P., Moormann, R.J.M. (1992). Application of polymerase chain reaction to the detection of bovine viral diarrhoea virus infections in cattle. *Vet. Microbiol.* 30, 21-34.

Houe, H. (1999) Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infections. *Vet. Microbiol.* 64, 89-107.

Howard, T.H., Bean, B., Hillman, R., Monke, D.R. (1990). Surveillance for persistent bovine viral diarrhoea virus infection in four artificial insemination centers. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 196, 12, 1951-1955.

Kataria, R.S., Tiwari, A.K., Gupta, P.K., Mehrotra, M.L., Rai, A., Bandyopadhyay, S.K. (1997). Detection of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) genomic sequences in bovine semen inoculated with BHV-1 by polymerase chain reaction. *Acta Virol.* 41,6, 311-315.

Kirkland, P.D., Richards, S.G., Rothwell, J.T., Stanley, D.F. (1991). Replication of bovine viral diarrhoea virus in the bovine reproductive tract and excretion of virus in semen during acute and chronic infections. *Vet. Rec.* 128, 587-590.

Kirkland, P.D., McGowan, M.R., Mackintosh, S.G., Moyle, A. (1997). Insemination of cattle with semen from a bull transiently infected with pestivirus. *Vet. Rec.* 140, 124-127.

Kommisrud, E., Vatn, T., Lang-Ree, J.R., Loken, T. (1996). Bovine virus diarrhoea virus in semen from acutely infected bulls. *Acta Vet. Scand.* 37, 1, 41-47.

Latellier, C., Kerkhofs, P., Wellemans, G., Va-

nopdenbosch, E. (1999). Detection and genotyping of bovine diarrhoea virus by reverse transcription-polymerase chain amplification of the 5' untranslated region. *Vet. Microbiol.* 64, 155-167.

Lowen, K.G., Darcel, C.Q. (1985). A comparison of two methods for the virus isolation of bovine herpesvirus 1 (BHV 1) from extended bovine semen. *Theriogenology.* 23, 6, 935-943.

Masri, S.A., Olson, W., Nguyen, P.T., Prins, S., Dereg, D. (1996). Rapid detection of bovine herpesvirus 1 in the semen of infected bulls by a nested polymerase chain reaction assay. *Can. J. Vet. Res.* 60, 2, 100-107.

Meyling, A., 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, 2, 97-105.

OIE (2000). Manual of standards for diagnostic tests and vaccines., 4th ed., Office International des Epizooties, Paris, 346-358, 381-391.

Özdemir, Ü., Türkaslan, J. (1999). Damızlık boğalardan izole edilen genital mikoplazmalar. *Pendik Vet. Mikrobiyol. Derg.* 30, 1, 37-39.

Özkul, A., Çabalar, M., Bilge, S., Akça, Y., Burgu, İ. (1995). Süt siğircılığı işletmelerinde rastlanan IBR/IPV ve BVD virus enfeksiyonlarının infertilite olgularındaki rolü. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.* 42, 381-387.

Radwan, G.S., Brock, K.V., Hogan, J.S., Smith, K.L. (1999). Development of a PCR amplification assay as a screening test using bulk milk samples for identifying dairy herds infected with bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Microbiol.* 64, 77-92.

Razin, S., Tully, J.G. (1983). *Methods in Mycoplasmaology.* Academic Press. Newyork, 127-135.

Rocha, M.A., Barbosa, E.F., Guimaraes, S.E., Neto, E.D., Gouveia, A.M. (1998). A high sensitivity-nested PCR assay for BHV-1 detection in semen of naturally infected bulls. *Vet. Microbiol.* 63, 1, 1-11.

Rola, J., Zmudzinski, J.F. (1999). Detection of bovine herpesvirus 1 in bull semen by PCR. *Bull. Vet. Inst. Pulawy.* 43, 119-123.

Sandvik, T., Paton, D.J., Lowings, P.J. (1997). Detection and identification of ruminant and porcine pestiviruses by nested amplification of 5' untranslated cDNA regions. *J. Virol. Methods.* 64, 43-56.

Smits, C.B., Van Manen, C., Glas R.D., De Gee, A.L.W., Dijkstrab, T., Van Oirschot, Rijsewijk, F.A.M. (2000). Comparison of three polymerase chain reaction methods for routine detection of bovine herpesvirus 1 DNA in fresh bull semen. *J. Virol. Methods,* 85, 65-73.

Şimşek, A. Öztürk, F. (1997). Klinik olarak sağlıklı siğir sü-

rülerinde persiste bovine viral diarrhoea virus enfeksiyonlarının araştırılması ve epizootiyolojik önemi. *Vet. Bil. Derg.* 13, 113-119.

Xia, J.Q., Yason, C.V., Kibenge, F.S. (1995). Detection of bovine herpesvirus-1 in the semen of experimentally infected bulls by dot-blot hybridisation, polymerase chain reaction and virus isolation. *Res. Vet. Sci.* 59, 2, 183-185.

Van Engelenburg, F.A., Maes, R.K., Van Oirschot, J.T., 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. Clin. Microbiol.* 31,12, 3129-3135.

Van Engelenburg, F.A., Van Schie, F.W., Rijsewijk, F.A., Van Oirschot, J.T. (1995). Excretion of bovine her-

pesvirus 1 in semen is detected much longer by PCR than virus isolation. *J. Clin. Microbiol.* 33, 2, 308-312.

Van Oirschot, J.T. (1995). Bovine herpesvirus 1 in semen of bulls and the risk of transmission : a brief review. *Vet. Q.* 17, 1, 29-23.

Wagter, L.H., Glas, R.D., Bleumink-Pluym, N., Van Engelenburg, F.A., Rijsewijk, F.A., Houvers, D.J. (1996). A polymerase chain reaction (PCR) assay for the detection of bovine herpesvirus 1 (BHV 1) in selectively digested whole bovine semen. *Vet. Res. Commun.* 20, 4, 401-408.

Yavru, S., Öztürk, F., Şimşek, A., Yapıcı, O., Yıldız, C. (2001). Isolation of bovine herpes virus type-1 from bovine semen. *Revue. Med. Vet.* 152, 8-9, 633-636.