

31125

ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FERTİLİTE PROBLEMLİ İNEKLERDE ENFEKSİYÖZ BOVİNE  
RHİNOTRACHEİTİS-ENFEKSİYÖZ PUSTULAR VULVOVAGİNİTİS (IBR-IPV)  
VİRUS İZOLASYONU VE SEROEPİDEMİYOLOJİSİ

Veteriner Hekim  
Mehmet ÇABALAR

DOKTORA TEZİ

MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
VİROLOJİ BİLİM DALI

DANIŞMAN  
Doç. Dr. Yılmaz AKÇA  
T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU  
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

ANKARA - 1993

---

ANKARA ÜNİVERSİTESİ ARAŞTIRMA FONU  
Proje No. : 90. 30. 00. 12.

## İÇİNDEKİLER

Sayfa No

1. GİRİŞ VE AMAÇ .....	7
2. GENEL BİLGİLER .....	9
2.1. Etiyoloji.....	14
2.2. Epidemiyoloji.....	17
2.3. Patogenez ve Patoloji.....	20
2.4. Klinik.....	24
2.5. Teşhis.....	26
2.5.1.Direkt Teşhis.....	27
2.5.2.İndirekt Teşhis.....	29
2.6. İmmunite.....	30
2.7. Korunma ve Kontrol.....	32
3. MATERYAL VE METOT .....	35
3.1. Virus.....	35
3.2. Araştırmada Kullanılan Şüpheli Kan Serumları...35	
3.3. Virus izolasyon Materyalleri.....	35
3.4. Dana Serumu.....	37
3.5. Hücre Kültürleri.....	37
3.5.1.Primer Fötal Dana Böbrek(FDB) hücre kültürünün hazırlanışı.....	37
3.5.2.Sekonder FDB hücre kültürünün hazırlanışı.....	39
3.5.3.Devamlı hücre kültürünün hazırlanışı.....	39
3.6. Virusun Üretilmesi.....	39
3.7. Virusun Mikrotitrasyon Yöntemi ile Titrasyonu..40	
3.8. Şüpheli Kan Serumlarında Nötralizan Antikor aranması.....	41

3.8.1.Mikronötralizasyon testi.....	41
3.8.2.Pozitif serumların Serum Nötralizasyon (SN <sub>50</sub> ) değerlerinin saptanması.....	42
3.9. Virus İzolasyon Çalışmaları.....	43
3.9.1.Vajinal swap ve plasenta örneklerinden virus izolasyonu çalışması.....	43
3.9.2.Lökositlerden virus izolasyonu çalışması..	44
4. BULGULAR .....	45
4.1. Virusun Üretilmesi.....	45
4.2. Virusun Titresi.....	45
4.3. Mikronötralizasyon testi sonuçları.....	45
4.3.1.Mikronötralizasyon testi ile pozitif serumların saptanması.....	45
4.3.2.Pozitif serumların Serum Nötralizasyon (SN <sub>50</sub> ) değerleri.....	48
4.4. Virus İzolasyon Çalışması Sonuçları.....	48
5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....	52
6. ÖZET .....	58
7. İNGİLİZCE ÖZET (SUMMARY) .....	59
8. KAYNAKLAR .....	60
9. TEŞEKKÜR .....	72
10. ÖZGEÇMİŞ .....	73

## TABLO LİSTESİ

	Sayfa No
3.1. IBR/IPV virusu nötralizan antikorlarının tespiti amacıyla toplanan şüpheli kan serumu örnekleri.....	36
3.2. IBR/IPV virusu izolasyonu amacıyla toplanan örnekler.....	37
4.1. Mikronötralizasyon testi sonuçları.....	47
4.2. IBR/IPV virusuna karşı pozitif serumların SN <sub>50</sub> değerleri dağılımı.....	49

## RESİM VE GRAFİK LİSTESİ

Sayfa No

Resim 4.1. IBR/IPV virusu Colorado suşu ile enfekte MDBK hücre kültürünün 3.gündeki görünüşü.....	46
Resim 4.2. MDBK hücre kültürü (Hücre kontrol).....	46
Grafik 4.1. Seropozitif olarak tespit edilen ineklerin işletmelere göre pozitiflik dağılımları.....	50
Grafik 4.2. Seropozitif olarak tespit edilen ineklerin SN <sub>50</sub> değerleri dağılımı.....	51

## KISALTMALAR

BHV-1	: Bovine herpes virus-1
CPE	: Cytopathic effect
DKID <sub>50</sub>	: Doku kültürü enfeksiyon dozu %50
DMSO	: Dimethylsulphoxid
DNA	: Dezoksiribonkleik asit
EDTA	: Ethylene-diamine-tetra-acetic-acid
ELISA	: Enzyme linked immunosorbent assay
EM	: Elektron mikroskopi
FDB	: Fötal dana böbrek
IBR	: Enfeksiyöz bovine rhinotracheitis
IF	: Immunofluoresan
IFT	: Immunofluoresan testi
Ig	: Immunoglobulin
IHA	: İndirekt Hemaglutinasyon
IP	: Immunperoksidaz
IPB	: Enfeksiyöz pustular balanoposthitis
IPV	: Enfeksiyöz pustular vulvovaginitis
Log	: Logaritma
M	: Molar
MDBK	: Madin-Darby Bovine Kidney
MEM	: Minimal essential medium
nm	: Nanometre
RPHA	: Reverse passive haemagglutination
PBS	: Phosphate buffer saline
SN	: Serum nötralizasyon
SN <sub>50</sub>	: Serum nötralizasyon değeri %50

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Hayvancılık işletmelerinin verimliliği fertilitate olgusunun sürekliliği esasına dayanır(9). Bu olgunun bozulması ovaryumlarda graaf follükülünün oluşmasından, gebeliğin şekillenmesi, gelişmesi, doğum ve sonrasına kadar geçen sürenin herhangi bir aşamasında ortaya çıkar(9). Bu aşamalarda fertilitate bozukluklarına neden olan IBR/IPV virus enfeksiyonu enfeksiyöz nedenler arasında önemli bir yer teşkil etmektedir (4,20,27,31,56,67,76).

Enfeksiyöz bovine rhinotracheitis (IBR) (4,16,72,100,119), Enfeksiyöz pustular vulvovaginitis(IPV),(53,58,59,72,94,100,113), Enfeksiyöz pustular balanoposthitis (IPB)(4,24,72,100) ve Coital exanthema(4,37,87,100) gibi sinonimlerle adlandırılan sığırların bu bulaşıcı, latent ve akut seyirli viral enfeksiyonu dünyanın birçok yerinde ve Türkiye’de yaygın olarak bulunmakta, hayvancılık işletmelerinde büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Enfeksiyonun biri solunum, diğeri genital sisteme ait olmak üzere iki klinik seyir şekli vardır (13,46,94). Solunum ve genital sistem hastalıkları, birbirinden ayrı olarak meydana gelebildiği gibi birlikte de görülebilirler (46,57,94). Bunlarla beraber, konjunktivitis (4,53,72,90,94,98,119), enteritis(4,72,86,119), ensefalitis (4,61,72,80,98,119), mastitis(4,5,40,56), endometritis(31,67,78), abortus(72,78,82,100,108,111,117), neonatal ölüm(101) ve embriyonik ölüm(27,72,74) gibi bulgular gözlenmektedir. Ekonomik kayıpların gerçek temelini, ağırlık kaybı ve süt

veriminde azalma(5,57,90) ile abortus(57,72,82,100,108,111,117), neonatal(101) ve embriyonal ölüm(27,57,72,74,119), endometritis(31,67,78), repeat breeding(döl tutmayan)(27,78) gibi fertilitite bozuklukları meydana getirmektedir.

Bugüne kadar Türkiye’de sığırlarda IBR/IPV enfeksiyonunun varlığı birçok araştırmacı tarafından seroepidemiolojik çalışmalar ile tespit edilmiştir(14,15,33,44,45,85).İlk virus izolasyonu ise klinik olarak hasta bir dananın burun akıntısından gerçekleştirilmiştir(16). Ancak ineklerdeki abortus, klinik metritis ve repeat breeding gibi infertilite olgularında IBR/IPV virusunun rolünün araştırıldığı bir çalışma bildirilmemiştir.

Bu araştırmada, bu tür klinik belirti gösteren ineklerde IBR/IPV virusunun izolasyonu ve mikronötralizasyon testi ile seroepidemiolojik yönden pozitiflik durumunun saptanması amaçlanmaktadır.

## 2. GENEL BİLGİLER

İnsan ve hayvanlar için patojen olan birçok herpesvirus vardır(19,37,97,114). Herpesvirusların sığırlarda meydana getirdiği hastalıkların başında BHV-1'in neden olduğu IBR/IPV enfeksiyonu gelmektedir(37,97). Enfeksiyonun Coital exanthem ve Blaschenausschlag olarak isimlendirilen genital formu 19. yüzyılın sonlarında Avrupa'da bilinmekteydi(4,37,59 87,100). Virusun ilk defa 1913 yılında Zwick ve Gminder (59) tarafından filtre edilerek enfeksiyöz bir etken olduğu bildirilmiştir. Bu araştırmacılar genital akıntıdan elde ettikleri filtratın enfeksiyöz olduğunu inekler üzerinde yaptıkları deneysel çalışmalar ile göstermişlerdir. Daha sonra, Zwick ve Gminder'in bu çalışması 1928 yılında Reisinger ve Reimann(59) tarafından tekrarlanarak etiyolojik bir etken olduğu doğrulanmıştır. Greig ve ark.(87) ile Kendrick ve ark.(59) 1958 yılında genital enfeksiyonlara neden olan virüsü hücre kültüründe izole ederek, oluşturduğu hastalığı Enfeksiyöz Pustular Vulvovaginitis(IPV) olarak isimlendirmişlerdir.

Amerika Birleşik Devletleri(ABD)'nde, 1950 yıllarında sığırlarda solunum sistemi enfeksiyonları bildirilmiş(72) ve 1956 yılında Madin ve ark.(59) bu hastalığa neden olan virüsü hücre kültüründe izole etmeyi başararak, oluşturduğu hastalığın ismini Enfeksiyöz Bovine Rhinotracheitis (IBR) olarak tanımlamışlardır.

Bouters ve ark.(37), 1960 yılında Hollanda'da orşitis ve Enfeksiyöz Pustular Balanoposthitis(IPB)'li boğalardan bir herpesvirus izole ettiklerini ve bunun IPV'ye neden olan virus ile aynı olduğunu bildirmişlerdir.

Gillespie ve ark.(87) ile McKercher ve ark.(37) 1959 yılında IBR virusu ile IPV/IPB virusunun serolojik olarak aynı özellikte olduğunu ortaya koymuşlardır. Biyolojik ve biyofiziksel çalışmalar sonucunda aralarında hiçbir fark olmayan IBR virus ve IPV virus suşları günümüzde IBR/IPV virusu olarak isimlendirilmektedir(109,114).

IBR/IPV enfeksiyonunun etkeni olan BHV-1 ile gerek saha, gerekse deneysel çalışmalar sonucunda, akut ve latent seyirli solunum ve genital sistem enfeksiyonları(53,98,100, 113,119) ile birlikte, konjunktivitis(4,53,90,98,119), enteritis(4,86,119), ensefalitis(4,80,98,119), mastitis(4,5,40), endometritis(31,67,78), neonatal ölüm(101), repeat breeding (döl tutmayan)(27,78), embriyonik ölüm(27,72,74) ve abortus (4,78,82,100,108,111,117) ile seyreden bozuklukların oluştuğu saptanmıştır.

Türkiye'de enfeksiyonun varlığı ilk kez 1971 yılında Erhan ve ark.(33) tarafından gerçekleştirilen serolojik bir çalışmada ortaya konmuştur. Bu araştırmada, iki farklı işletmede bulunan sığırlarda %20 ve %29 oranlarında seropozitiflik tespit edilmiştir. İlk virus izolasyonu ise, 1983 yılında, Burgu ve Akça(16) tarafından, klinik olarak hasta bir dananın burun akıntısından FDB hücre kültürüne yapılan inokulasyonlar sonunda gerçekleştirilmiştir.

Gürtürk ve ark.(44) Türkiye'nin farklı bölgelerinden topladıkları 1029 adet sığır serumunun 561 adedini(%54.51), Akça(7) 437 adet sığır serumunun 238 adedini(%54.46), Burgu ve Akça(14) 61 adet sığır serumundan 31 adedini(%55.73), Öztürk ve ark.(85) ise, zaman zaman solunum sistemi enfeksiyonlarının görüldüğü bir işletmede bulunan 238 adet sığır serumunda yaptıkları çalışmada 134 adedini(%56.30) IBR/IPV virusu nötralizan antikorları yönünden pozitif bulduklarını bildirmişlerdir.

Suzan ve ark.(110), Meksika'nın 19 farklı bölgesinden sütçü ve etçi sığırlardan topladıkları serumlardan, 277 sütçü sığırın 158(%57.0) adedinde, 1154 etçi sığırın 601(%52.1) adedinde BHV-1'e karşı nötralizan antikör saptamışlardır.

Elazhary ve ark.(31), abortus ve fertilité problemlerinin görüldüğü bir işletmede yaptıkları çalışmada, tabii tohumlamada kullanılan bir boğaya ait spermadan immünofluoresan testi ile BHV-1 antijeninin varlığını saptamışlar ve virus izolasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Aynı boğa ile tohumlanan ineklerin uterus sekresyonundan BHV-1 izolasyonu da yapılmıştır.

Abraham va ark.(1), 1980 yılında, İsrail'de inek ve boğaları etkileyen yaygın bir enfeksiyonun araştırılmasında, nazal ve konjunktinal akıntı ile prepusyal çalkantı sıvısı ve sperma örneklerinden IBR/IPV virusu izole ettiklerini, ancak vajinal akıntıdan virus izolasyonu gerçekleştiremediklerini bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar, enfeksiyondan etkilenen

bütün hayvanların serumlarında IBR/IPV virusuna karşı oluşan nötralizan antikorları saptamışlardır.

Burgu ve Akça(15), Türkiye'de suni tohumlamada kullanılan damızlık boğalarda IBR/IPV enfeksiyonunun tespiti amacıyla toplanan, 47 boğanın kan serumunun 30(%63.82)' unda nötralizan antikor varlığını saptamışlardır. Aynı çalışmada, latent enfekte boğaların devamlı virus taşıyıcı ve saçıcısı olabilecekleri bildirilmiştir. Bu nedenle suni tohumlama merkezlerinde bulunan aktif durumdaki boğaların, en küçük hastalık belirtilerinde özellikle sperma, prepusyal çalkantı sıvısı, lökosit ve burun akıntısı örneklerinden virus izolasyon çalışmalarının yapılması ve serolojik kontrollerde pozitif bulunan hayvanların damızlıktan çıkartılması gerektiği önerilmiştir.

Collery(20), infertilite olgusunun görüldüğü, 14 inek ve 1 boğanın bulunduğu bir işletmede 2 vajinal swap ile 1 prepusyal çalkantı sıvısından IBR/IPV virusu izole ettiklerini bildirmişlerdir. Bu akut dönem sonrasında tekrar aynı hayvanlardan alınan örneklerden virus izolasyonunun gerçekleştirilemediği, ancak serum antikor titrelerinde 20-70 kat artma görüldüğü tespit edilmiştir.

Kahrs ve Smith(57), IBR, IPV ve abortusların birlikte görüldüğü bir sürüde, iki nazal akıntıdan, bir vajinal mukozadan, bir de plasentadan virus izole etmişler ve bütün serumların antikor titrelerinin akut dönem ile konvalesent dönem arasında 4 kat ve daha fazla düzeyde arttığını saptamışlardır.

Lomba ve ark.(67), bir işletmedeki metritis olgularından IBR virusu izole ettiklerini ve enfeksiyondan 6-10 gün sonra hayvanlara ait serum antikor titrelerinin 1:64 ve daha yüksek düzeylerde olduğunu bildirmişlerdir.

Woernle ve Brunner(118), nötralizasyon testi ile sağlıklı sığırlarda %2.5, solunum yolu enfeksiyonlarının görüldüğü sığırlarda %24, fertilité problemlí sığırlar ile abortus ve neonatal ölüm olgularının görüldüğü sığırlarda %23 oranında IBR virusuna karşı oluşan nötralizan antikorların varlığını tespit ettiklerini bildirmişlerdir.

Manickam ve Mohan(69), 187 abort yapan inekten aldıkları serum örneklerinde, IBR yönünden yaptıkları serolojik çalışmada, 43 adet inegin(%23) 1:8 ve daha yüksek titrede pozitif sonuç verdiğini saptamışlardır.

Allegri ve ark.(8) 49 işletmeden topladıkları 437 adet fertilité problemlí inek serumundan 176 adedini(%40.3) IBR virusu yönünden seropozitif olarak tespit etmişler ve serumların toplandığı işletmelerden 26(%53)'ında seropozitiflik saptadıklarını bildirmekte-dirler.

Hyne ve Johnston(53), yaygın IPV ve konjunktivitis görülen bir işletmede yaptıkları çalışmada, 2 vajinal ve 1 konjunktival akıntıdan IBR/IPV virusu izole ettiklerini bildirmişlerdir.

## 2.1. ETİYOLOJİ

IBR/IPV virusu Herpesviridae familyasının alphaherpes virinae alt familyası içinde yer almaktadır(26,34,37,97,109). Virus, Bovine herpes virus-1 (BHV-1) olarak klasifiye edilmiştir(26,34,37,97,107). Virusun morfolojisini saptamak amacıyla enfekte hücre kesitlerinden ve virus süspansiyonlarından hazırlanan preparatlarla birçok Elektron mikroskopi(EM) çalışmaları yapılmıştır(26,37,38,54,103,113). Etken zarlıdır ve DNA virusları arasında yer alır(34,37,109). İkozahedral simetrik bir kapside sahip olan virus, 120-200 nm çapındadır (34). Çift iplikçikli DNA linear yapıda ve  $90 \times 10^6$  (137 kbp) molekül ağırlığındadır (32,97,109). Kapsid 162 kapsomerden oluşmuştur(34,37). Kapsomerler poligonal yapıda olup, 3.5 nm çapında, 10-12 nm uzunluğunda ve 11.5 nm genişliğinde hekzagonal bir özelliğe sahiptir(37). Zar üzerinde 8 nm uzunluğunda peplomerler bulunur(37).

BHV-1, yapılan çalışmalarda eter, kloroform ve ısıya karşı duyarlı bulunmuştur(26,37). Virus  $-65^{\circ}\text{C}$ 'den aşağı ısı derecelerinde stabildir(26,37). Bu nedenle enfekte sperma içerisinde saklanabilen virus aktivitesini sürekli koruyabilmektedir(26,37).  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de zaman içerisinde inaktive olur (26, 37).  $37^{\circ}\text{C}$ 'de 10 gün,  $56^{\circ}\text{C}$ 'de 21 dakikada inaktive olduğu bildirilmiştir(26,37). Virus, pH 6.0-9.0 değerleri arasında stabil(26,37), pH 4.5-5.0 değerleri arasında labildir(37).

BHV-1'in CsCl içinde yapılan santrifüjü sonunda buoyant dansitesi 1.730 g/ml olarak tespit edilmiştir(18,32,37).

Virus, 0.5M MgCl<sub>2</sub> ihtiva eden sıvı ile karıştırıldığında aktivitesini uzun süre devam ettirir (37). Kalsiyum aljinatın virüsü inaktive ettiği yapılan araştırmalarla saptanmıştır (28). Bu maddenin pamukta bulunması nedeni ile, swap hazırlanması sırasında eküvyonun ucunda kullanılması kontrendikedir(28,37).

Farklı araştırmacılar tarafından, BHV-1 ile diğer herpesviruslar arasındaki ilişkilerin tespiti amacıyla, nötralizasyon testi kullanılarak yapılmış birçok çalışma bildirilmektedir(37). Gibbs ve Rweyemamu(37), equine herpesvirus-1 (EHV-1) ile BHV-1 arasında antijenik bir ilişki olduğunu belirtmişlerdir. Bush ve Pritchett (18) tarafından BHV-1 ile Pseudorabies virus (PRV) genomları arasında %8 oranında benzerlik olduğu tespit edilmiştir. Levings ve ark. (66), 2-dimensional immunoelectrophoresis (2DE) kullanarak BHV-1 antijenleri ile diğer sığır herpesvirusları (Bovine herpesvirus-2, Bovine herpesvirus-3, Suis herpesvirus-1) arasında ortak dört antijenin olduğunu saptamışlardır. Engels ve ark. (32) yaptıkları bir çalışmada Restriction endonuclease analizi ile Bovine Herpesvirus-6 (BHV-6) olarak bilinen keçi herpesvirusunun BHV-1 ile kuvvetli bir antijenik ilişki içinde olduğunu bildirmektedirler. Keçilerin BHV-1'e karşı duyarlı olduğu ancak BHV-1 ile BHV-6'nın birbirlerinden farklı yapıda buldukları tespit edilmiştir(32).

Gibbs ve Rweyemamu (37), tarafından BHV-1 suşları arasındaki ilişkilerin tespiti amacıyla yapılan birçok araştırma bildirilmiştir. Buening ve ark.(12) BHV-1'nin IBR ve Enteri-

tis suşlarını nötralizasyon kinetikleri yönünden karşılaştırmış ve aralarında minimal düzeyde antijenik farklılık olduğunu tespit etmişlerdir. House (51), iki adet solunum sistemi, iki adet genital sistem izolatu olan dört adet BHV-1 suşunu nötralizasyon kinetikleri yönünden incelemiş ve genital sisteme ait bir izolatu diğer üç izolattan antijenik olarak farklı olduğunu saptamıştır. Honda ve ark. (50), BHV-1'in solunum ve genital kanal sistemlere ait Japonya ve Avrupa suşlarını Sodium dodecyl sulphate-Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ve DNA restriction endonuclease analizleri ile karşılaştırmışlar. Aynı araştırmacılar, bu çalışmalarını sonunda Japonya'da vajinadan izole edilen suşun IPV olduğunu tespit etmişlerdir.

IBR/IPV virusu doğal konakçısının dışında hücre kültürlerinde de üretilebilmektedir (4,16,88,113). Hücre kültürü olarak sığırların fotal böbrek, deri, akciğer, turbinata ile koyun ve vizonların fotal akciğer hücre kültürleri kullanılmaktadır(37,88,113). Ayrıca virus, MDBK (Madin-Darby bovine kidney)(37,113), PK15(pig kidney)(88) devamlı hücre kültürlerinde de üretilebilmektedir.

Peterson ve Goyal (88), IBR virusunun 8 değişik hücre kültürüne duyarlılığını ortaya koymak amacıyla yaptıkları çalışmada OFL (ovine fetal lung), ML (mink lung), FK (ferret kidney), PTK (potoroo kidney), TEK (turkey kidney), ED(equine dermal), BT (bovine turbinate), PK15 (pig kidney), hücre kültürlerini kullanmışlar. Çalışmaları sonunda, IBR virusunun üretilmesinde BT hücre kültürünün diğer hücre kültürlerine

oranla yüksek düzeyde duyarlı olduğu tespit edilmiştir.

Sing ve ark. (105), yaptıkları izolasyon çalışmasında f3etal dana b3brek ve t3urbinata h3ücre k3ült3rlerinin MDBK h3ücre k3ült3r3nden daha duyarlı olduğunu belirtmişlerdir.

Deneme hayvanları içinde tavşanlar (11,26) ve kokarcalar (26) virusa karşı duyarlı olup, deneysel çalışmalarda tavşanlar başarıyla kullanılmaktadır(11).

## 2.2. EPİDEMİYOLOJİ

IBR-IPV enfeksiyonu dünyanın birçok yerinde yaygın olan bir enfeksiyondur (1,16,37). Enfeksiyonun nakli virusla enfekte hayvana direkt temas veya indirekt olarak çeşitli mekanik vektörlerle olmaktadır (37). Etken enfekte hayvanlardan gözyaşı(1,53,90,119), burun akıntısı(1,16,119), uteroservikal akıntı(17,24,31,53), sperma(2,6,17,25,31,64,107), gaita (13), süt (5,40), gibi sekret ve ekstremlere ilave olarak f3etal membran ve dokular(61,75,105) ile saçılmaktadır.

Virusun bulaşmasında akut veya latent enfekte evcil ve yabani hayvanlar (36,47,48,79,81,115) ile sperma (2,6,31,64,78,105,107), embriyo transferi (17,39) ve keneler (112) rol oynarlar.

Enfeksiyon çoğunlukla sığırlar arasında görülmesine rağmen birçok evcil ve vahşi hayvan türleri virusa karşı duyarlıdır (36,48,60,79,81,115)). Deneysel çalışmalarda keçiler ve domuzlar enfeksiyona duyarlı bulunmuştur (36,79,81,

115). Fulton ve ark. (36) 38 farklı bölgedeki sürülerden topladıkları 502 keçi serumu üzerinde yaptıkları seroepidemiyoloji çalışmasında, 38 sürüden 5'inde (%13.2) seropozitiflik tespit ederken, toplam 502 keçinin 6'ında(%1.2) seropozitiflik saptamışlardır. Nelson ve ark.(81) 108 domuz çiftliğinden topladıkları 1220 serum örneğinden 139 (%11.38) adedini IBR antikorları yönünden pozitif bulmuşlardır. Mohanty ve ark. (79) solunum sistemi enfeksiyonu görülen 2 keçiden IBR virusu izole etmişlerdir. Lamontagne ve ark.(65), koyun ve keçilerde IBR virusuna karşı oluşan nötralizan antikorlar saptayamadıklarını belirtmişlerdir. Akça (7) Türkiye'nin farklı 16 bölgesinden topladığı 439 adet koyun serumunda pozitiflik tespit edememiştir. Hedger ve Hamblin (48) Afrika'da yaşayan vahşi hayvan türleri arasında yaptıkları seroepidemiyolojik çalışmada, 15 vahşi hayvan türünde IBR/IPV virusuna karşı nötralizan antikorları saptamışlardır.

Taylor ve ark. (112) tarafından sığır ve geyiklerin birlikte otladıkları bölgeden topladıkları kenelerden (*Ornithodoros coriaeus*) BHV-1 izole etmişlerdir. Bu durum virusun kenede replike olabileceği kanısını uyandırmakla birlikte kenenin mekanik vektör olması mümkün görülmektedir (26, 112).

Enfeksiyon, sağlıklı hayvanlara, enfekte, subklinik enfekte veya latent enfekte hayvanlardaki virus vasıtasıyla bulaşır(1,2,6,17,64,84,102). Latent enfekte hayvanlarda virus stres, doğum, nakil, aşılama ve kortikosteroidlerin uygulanması sonucunda yeniden aktive olarak saçılmaya başlar. Bu

nedenle bütün latent enfekte hayvanlar virus rezervuarı olarak tanımlanırlar(17,25,83,102). Akut, subklinik veya latent enfekte boğalara ait sperma likit nitrojende dondurularak saklandığında virusu muhafaza edip, suni tohumlama yoluyla enfeksiyonun yayılmasına neden olmaktadır. Bu nedenle seropozitif olan boğalar epidemiyolojik açıdan virus taşıyıcı ve saçıcısı olarak kabul edilmelidir(6,17,64,107). Burgu ve Akça (15) suni tohumlamada kullanılan 47 boğanın 30'unda(%63.8) IBR/IPV virusu nötralizan antikörlerinin varlığını bildirmişlerdir.

IBR/IPV virusu ile kontamine spermalar yoluyla enfeksiyonun nakledildiğine dair çok sayıda araştırma yapılmıştır(1,6,24,25,31,64)). Saxegarard(99) ve Spradbrow(107) suni tohumlama merkezlerindeki boğalardan hazırlanan dondurulmuş sperma örneklerinden virusu izole etmişlerdir.

Abraham ve ark. (1), İsrail' de yaptıkları araştırma sonucunda, IBR/IPV virusunun izolasyon olasılıklarını, nasal ve konjunktival akıntıdan %41.3 (92/38), prepusiyal çalkantı sıvısından % 26.9 (43/9), semenden % 3.1 (413/13) ve vajinal akıntıdan %0 (11/0) olarak bildirmişlerdir.

Doğal enfeksiyonlarda yada canlı modifiye BHV-1 aşılarının uygulandığı durumlarda, saha ve aşı süşunun latent kalabildiği ve gebe hayvanlarda abortlara neden olabildiği bildirilmektedir(17,72,82,103,111,119).

Tanyı ve ark.(111) 200 adet gebe inegin 157 adedinde 5-9. aylar arasında abortların meydana geldiği bir işletmede, 66 fötüs ve 3 plasenta örneği üzerinde yaptıkları çalışmada,

8 fötusta IBR virusunu izole ettiklerini bildirmişlerdir.

Kirkbride ve ark. (62), 1969-72 yılları arasında abortus olgularının %16'sının IBR/IPV kökenli olduğunu tespit etmişlerdir.

Higgins ve ark. (49) 92 abortus olgusunun %34.8'inin nedeninin tespit edildiğini ve bunun %15.7'sinin IBR enfeksiyonuna bağlı olduğunu saptamışlardır.

Enfekte inek sütlerinin hastalığın epidemiyolojisinde rol oynayabileceği birçok araştırmacı tarafından tespit edilmiştir.(5,40).

IBR/IPV virusunun bulaşmasında diğer önemli bir yolda enfekte inekten yapılan embriyo transferi ile olabilmektedir(10,17,39). Bowen ve ark. (10), yaptıkları deneysel çalışmalarda BHV-1'in farklı suşları ile embriyoların enfekte edilebileceğini bildirmektedirler.

### 2.3.PATOGENEZ VE PATOLOJİ

BHV-1'in organizmaya üst solunum yolları, genital kanal mukoz membranları ve konjunktival epitelyum yoluyla veya arakonakçı keneler vasıtasıyla girebileceği bildirilmektedir (26,31,34,112). Enfeksiyonun sığırlar arasında yayılmasına indirekt olarak su, yem, kullanılan araç ve gereçler neden olmaktadır (26). Organizmada virusun yayılışı viremi yoluyla olmaktadır(34). BHV-1'in replikasyonu konakçıda birkaç saat içinde meydana gelebilir (26). Bu nedenle enfeksiyondan sonra virusun tekrar izole edilmesi 1.günden itibaren mümkün-

dür(26). Virusun atılışının IBR seyir şeklinde 10-16. günler, IPV seyir şeklinde 8-14. günler ve IPB seyir şeklinde 14-22. günler arasında sona erebileceği bildirilmektedir(26). Virus nazal yolla organizmaya girdikten sonra, farenks ve tonsillalara ulaşır(34). Çoğalma fazını takiben lenfohematojen yolla üst solunum yolları epitellerine ve viremiye bağlı olarak solunum sistemi derinliklerine geçer (26,34). Ayrıca viremi sırasında plasentayı geçebilen virus gebeliğin 4-7. ayları arasında abortlara neden olabilir(92,108,111,117).

BHV-1 gerek genital, gerekse solunum sistemi enfeksiyonlarını takiben sakral ve trigeminal ganglionlara yerleşebilmektedir (3,96). Bu latent virus zaman zaman stres faktörleri ve kortikosteroid uygulamalarına bağlı olarak reaktif olabilmektedir (26,34). Ackermann ve Wyler (3) iki buzağıyı, bir ineğin vajinasından izole edilen BHV-1 suşu ile intravajinal olarak enfekte ettikten sonra, sakral ganglionlarda latent olarak bulunan bu IPV suşunun genomlarını tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Rodriguez ve ark. (96) klinik olarak sağlıklı 100 adet sığırın 10'unun trigeminal ganglionlarından BHV-1 izole etmişlerdir.

Miller ve ark. (77), yaptıkları deneysel çalışmada, 6-7 aylık gebe ineklerden 3 ineğe solunum sisteminden izole edilen Colorado suşunu, diğer 3 ineğe abort olmuş fötustan izole edilen FI suşunu, 5 ineğe de vaginadan izole edilen K22 suşunu i.v. olarak inokule ettikten sonra 2-5 gün içinde hayvanlarda ateş yükselmesi ve viremi tablosu meydana geldiğini bildirmişlerdir. Bu hayvanlarda yapılan incelemeler sonunda,

FI ve Colorado suşu verilen ineklerde inokulasyondan 17 ile 85 gün sonra abortus şekillenmiş, ancak K22 suşu ile enfekte ineklerde abortus şekillenmediği saptanmıştır. K22 suşu ile enfekte ineklerin 4'ünün plasentasından virus tekrar izole edilmiş ve 4 buzağının kolostrum öncesi serumlarında BHV-1 nötralizan antikorları tespit etmişlerdir.

BHV-1 trigeminal ganglionun mandibular ve maksillar kollarıyla tonsillar, farenk ve burun boşluğuna buradan da neural yolla direkt olarak merkezi sinir sistemine ulaşarak, ensefalitis tablosu oluştururlar (34,80). Natıra ve ark.(80) yaptıkları çalışmada, 3-5 aylık 5 buzağuyu IBR virusu ile intranazal olarak enfekte ettikten sonra, buzağuların 12.,15. 30.,57.ve 98. günlerde öldüklerini bildirmişlerdir. Buzağılarda yapılan nekroskopilerde, sentral sinir sisteminde non-suppurative yangı ve bilateral trigeminal ganglionitise bağlı olarak neuroglial hücrelerin proliferasyonu tespit edilmiştir. Ayrıca 12.ve 15. günlerde nekroskopisi yapılan buzağuların trigeminal ganglion, medulla oblangata ve serebrumlarından virusun tekrar izole edildiği bildirilmektedir.

Gebeliğin son dönemlerinde veya doğumdan kısa bir süre sonra enfekte olan buzağılarda sistemik bir hastalık tablosu, özellikle enteritis şekillenmekte ve bu tür enfekte buzağılarda ölüm olayları görülmektedir (23,61,72). Bununla birlikte bazı virus suşları ile enfekte gebe ineklerin yeni doğan buzağularında latent bir enfeksiyonun oluşabileceği tespit edilmiştir (72). Palfı ve ark.(86), yeni doğan klinik olarak hasta 11 ve 15 günlük 2 buzağı üzerinde yaptıkları

patolojik ve histopatolojik araştırmada, karaciğerde nekrotik odaklar, akciğer epitel hücrelerinde intranükleer inklüzyon cisimcikleri, intestinal pnemoni, barsaklarda hemoraji, rumende nekrotik değişiklikler, enteritis, peyer plaklarında nekrozlar tespit etmişlerdir. Aynı araştırmada(86) karaciğer, akciğer ve tonsillalardan IBR virusu izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

BHV-1'in genital organlar üzerine etkisi ya direk olarak dış genital organlar aracılığı ile yada sistemik bir enfeksiyona bağlı olarak virusun genital organlara ulaşmasıyla meydana gelmektedir (6,31,72,78). Enfekte sperma ile uterusu ulaşabilen virus şiddetli bir nekrotik endometritis oluşturarak 1-2 hafta süren geçici infertiliteye neden olabilmektedir (27,31,67,72,78). Miller ve ark. (73) ineklerin IBR virusu ile intrauterin enfeksiyonundan sonra endometrium ve myometriumdaki ödem, hemoraji ve nekroz gibi karakteristik bulgular ile ovaryumdaki korpus luteumun kistik bir görünüme sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Modifiye canlı virus aşılırları ile aşılanan hayvanlarda infertilite meydana geldiği araştırıcılar tarafından tespit edilmiştir (17,72,76,106). Smith ve ark. (106) sinkronize ettikleri bir grup ineği modifiye canlı virus aşısı ile aşılamayı takip eden 9. günde hayvanlarda ovaryum nekrozu, hemoraji ve mononükleer lenfosit infiltrasyonu ile karakterize nekrotik ooforitisin şekillendiğini tespit etmişlerdir. Miller ve ark. (76) 8 ineği doğumdan 14 gün sonra BHV-1 modifiye canlı aşısı ile aşılamışlar ve 60. güne kadar hay-

vanların kan progesteron düzeylerini izlemişlerdir. Sonuçta, 8 inekten 4'ünde infertilite meydana gelmiş ve bu 4 inekten 2 tanesi inokulasyonun 10. gününde progesteron azalmasına bağlı olarak östrus belirtisi gösterirken, diğer 2'sinde ise inokulasyon sonrası 40-42. günlerde embriyonik ölüm bulguları saptamışlardır.

#### 2.4.KLİNİK

BHV-1 sığırlarda klinik olarak solunum sistemi enfeksiyonu olan IBR(26,34,56,98,119) genital sistem enfeksiyonu olan IPV (24,34,94,98,100,119) yada IPB (24,72,100,119) ile birlikte konjunktivitis (53,56,72,90,94,119), enteritis (72,119), ensefalitis (56,61,72,80,119), mastitis (4,5,40,56), endometritis (31,56,67,78), abortus (72,78,82,100,108,111,117) ve infertiliteye (4,27,72,76,78,100,119) neden olan bozukluklar meydana getirmektedir. Enfeksiyonun solunum ve genital sisteme ait klinik şekilleri birbirinden ayrı olarak meydana gelebildiği gibi birlikte de görülebilirler (46,57,94). BHV-1 tarafından meydana getirilen klinik tablo virusun 3 alt tipine bağlıdır (119). 1.alt tip, primer olarak solunum sistemi enfeksiyonlarına neden olur; 2.alt tip, primer olarak solunum ve genital sistem enfeksiyonlarına neden olur; 3.alt tip ise, primer olarak nörolojik enfeksiyonlara neden olmaktadır.

Enfeksiyonun solunum seyir şekli, yaygın bir rhinotracheitis ve konjunktivitis şeklinde ortaya çıkıp, sub-

linik, bulaşıcı ve hafif yada şiddetli bir hastalık tablosuna neden olmaktadır (34,119). Enfeksiyonda 3-4 günlük bir inkubasyon süresinden sonra, ilk klinik bulgular, yüksek ateş, depresyon, iştahsızlık, seröz ve mukopurulent bir burun akıntısıdır (26,119). Nazal mukoza hiperemiktir. Nekroza olan ve ülserleşen mukozaya bağlı olarak nefes kötü kokuludur. Birçok durumda hayvanlar hafif bir belirti göstererek, 1-2 hafta içinde tamamen iyileşirler (119). Bununla birlikte hastalık sekonder bakteriyel komplikasyonlara bağlı olarak uzayabilir ve hayvanlar solunum yolları enfeksiyonundan ölebilirler (26,37,119). Enfeksiyonda morbidite %20-100 arasında olurken, mortalite komplikasyonlara bağlı olarak %1-10 arasında değişmektedir (26,34,37).

Solunum sistemi enfeksiyonunda virusun uterus epitelyumundan geçmesi sonucu, embriyonik ölüm, ve resorbsiyon ile abortus meydana gelebilmektedir(27,72,75,82,108). Bunlara bağlı olarak hayvanların fertilitate periyodu bozulup, gebelik oranlarında düşme ve süt veriminde azalma görülmektedir (26, 56,57). Abort olmuş fötusta ise otoliz şekillenir (26,61).

Gastroenteritis, BHV-1 ile enfekte danalarda meydana gelebildiği gibi, neonatal buzağuların generalize enfeksiyonu sonucunda da ortaya çıkmaktadır. Bu tür enfekte buzağularda gastroenteritis en önemli klinik bir bulgudur (23,26,37).

Danalarda ensefalitis tablosu meydana getiren BHV-1 ilk klinik bulguların görülmesinden 5-6 gün sonra ölüme neden olmaktadır (13,26). Morbidite %5-25, mortalite %100'e kadar ulaşabilmektedir(13).

Enfeksiyonun genital seyir şeklinde, hafif bir ateş, dış genital mukozalarda kırmızılık ve şişkinlik görülür (24,53). Bu belirtilere vajinal akıntı eşlik eder (13,24,31,53,87). Genital mukozada veziküller, pustuler ve ülseratif değişiklikler oluşur(13,72). Klinik bulguların şiddetine göre iyileşme genellikle 1-2 hafta içinde meydana gelir (72). İneklerde en şiddetli klinik belirti, yaygın lezyonlarla birlikte ağrıya neden olan zorlamadan dolayı prolapsus uterinin şekillenmesidir (72). Boğalarda şiddetli enfeksiyonlar penis ve prepusyal yaralanmalara ve adhezyonlara neden olabilir (72). Bu da normal üreme fonksiyonlarına engel olur (72). Enfekte boğaların semenleri enfeksiyöz virüsü taşıdığından dolayı, uterus içine giren virus endometritis meydana getirerek geçici infertiliteye neden olabilmektedir (31,67,72,78).

Ayrıca BHV-1'in vezikular meme başı lezyonları(41) ve mastitis(5,37,40) meydana getirdiği bildirilmektedir.

## 2.5.TEŞHİS

Bovine herpesvirus-1 (BHV-1) latent ve akut seyirli IBR, IPV ve IPB enfeksiyonlarını meydana getirmektedir(13,26,34,37,56). Bu enfeksiyonların teşhisinde direkt ve indirekt teşhis yöntemleri kullanılır(29,30,63,89,90,91,93,95). Direkt teşhis yönteminde virus izolasyonu ve identifikasyonu, indirekt teşhis yönteminde ise spesifik antikörlerin tespiti yapılır (29,44,45,89,104,120).

### 2.5.1.Direkt Teşhis

Virus izolasyonu ve identifikasyonu amacıyla hücre kültürleri fazlaca kullanılmaktadır (37,92). Bu amaçla toplanan örneklerin duyarlı hücre kültürlerine inokule edilip, oluşturdukları Cytopathic effect (CPE), fiziksel ve kimyasal özellikleri ile elektron mikroskopik görünümüleri identifikasyonda önemli yer tutmaktadır (29,37,113). BHV-1 enfeksiyonunun direkt teşhisi amacıyla kullanılan testler arasında IP (immunoperoksidaz)(29,95), IF(immunofluoresan)(31,91), ELISA (29,30) ve RPHA(reserve passive haemagglutination)(29,30) teknikleri yer almaktadır.

Enfeksiyonun IBR formunda, gazlı bezden hazırlanan swaplarla burun boşluğu ve konjunktiva mukozasından alınan örnekler +4°C'de muhafaza edilerek kısa sürede teşhis laboratuvarlarına getirilmelidir (26,90,119). Edward ve ark.(29), burun akıntısından BHV-1'in tespiti amacıyla yaptıkları çalışmada IF, IP, ELISA, RPHA ve hücre kültüründe virus izolasyonu tekniklerini kullanmışlar ve çalışmalarının sonunda, hücre kültüründe virus izolasyonunu diğer dört teknikten daha duyarlı olduğunu saptamışlardır. Burgu ve Akça (16) klinik olarak hasta bir dananın burun akıntısından FDB hücre kültürüne yaptıkları inokulasyonla IBR virusunu izole etmişlerdir. Hafez ve Chaudhry(46) solunum ve genital enfeksiyonları ile abortusların birlikte görüldüğü işletmede, ölen bir ineğin tracheal mukozasından FDB hücre kültüründe yaptıkları pasajlarla IBR virusunun izolasyonunu gerçekleştirmişlerdir.

Enfeksiyonun IPV formunda, gazlı bezden hazırlanmış swaplarla vajina mukozasından örnekler alınırken(24,26,58), IPB formunda swaplarla örnek almak mümkün değildir(26,58). Bunun yerine prepusyal çalkantı sıvısı ve suni vajen ile sperma örnekleri alınmalıdır(1,5,24,58,107). Collery (20), bir boğa ve 14 ineğin bulunduğu fertilitite problemlili bir işletmede, iki vajinal swap ile boğaya ait prepusyal çalkantı sıvısından, hücre kültüründe BHV-1 izole ettiğini bildirmiştir. Deas ve ark. (24), Mısra ve ark. (78) ile Singh ve ark. (105) sperma örneklerinin hücre kültürlerine yapılan inokulasyonu ile IBR/IPV virusu izole etmişlerdir.

Enfeksiyona bağlı abortuslarda, virus genellikle inaktive haldedir(26,68). Bu nedenle abort materyallerinden viral antijenlerin tespitinde IF ve IP tekniklerinden faydalanılır(26,68,91). Lucas ve ark. (68) gebe ineklerde meydana gelen abortusların etiyolojik olarak araştırılmasında IF testini kullanmışlar ve 582 adet abort materyalinden bir adedinde IBR antijenini etken olarak saptarken, hücre kültürüne inokule edilen 330 adet örnekten virus izole edememişlerdir.

Rodriguez ve ark. (95), ensefalitisli buzağının beyninden, BHV-1'in tespiti amacıyla, IP ve hücre kültüründe izolasyon tekniklerini karşılaştırmışlar ve araştırmacılar bu çalışmalarının sonunda, monoklonal antikorlarla hazırlanıp kullanılan IP tekniğini hücre kültüründe virus izolasyonu tekniğinden daha duyarlı bulmuşlardır.

Enfeksiyona bağlı mastitis olgularında, toplanan süt örneklerinin santrifüjinden sonra elde edilen sedimentteki

epitel hücrelerinde viral antijenin IF ve IP teknikleri ile identifikasyonu yapılabildiği gibi, hücre kültüründe virus izolasyonu tekniğide kullanılabilmektedir (26,40). Gourlay ve Stott(40), mastitisli 25 inegin süt örneklerinin FDB hücre kültürüne inokulasyonu sonucu 2 süt örneğinde BHV-1'in varlığını saptadıklarını bildirmektedirler.

### 2.5.2.İndirekt Teşhis

IBR/IPV enfeksiyonunun teşhisinde bir diğer gösterge kan serumları (1,26,44,63,93,104,116) ile süt serumlarındaki (63,16) spesifik antikorların tespiti olup, bu amaçla kullanılan en yaygın testler arasında, Serum nötralizasyon(SN) (15,35,46,93,110), ELİSA(63,93,116), Agar jel presipitasyon (AGP)(7,27) ve İndirekt Hemaglutinasyon(IHA) (120,121) bildirilmektedir.

Witte ve ark.(116), 50 inekten aldıkları kan ve süt serumu örneklerinin ELİSA testi ile kontrolü sonucunda, kan örneklerinin %30'unda, süt örneklerinin %34-36'unda BHV-1 e karşı oluşan nötralizan antikor varlığını saptamışlardır.

Akça(7), mikronötralizasyon testinin düşük titredeki nötralizan antikorlarla çalışmasına karşılık, agar jel presipitasyon testinin ancak yüksek titredeki hiperimmun serumlar ile reaksiyon verdiğini saptamıştır. Buna bağlı olarak aynı araştırmacı, IBR/IPV virusu enfeksiyonunda nötralizan antikorların tespiti amacıyla mikronötralizasyon testinin agar jel presipitasyon testine oranla daha çabuk ve kesin sonuç verdiğini bildirmektedir.

Riegel ve ark.(93), 85 adet sığır serumu örneklerinden BHV-1 nötralizan antikorları tespiti amacıyla nötralizasyon ve ELISA testlerini karşılaştırmalı olarak yapmışlar ve nötralizasyon testi ile seronegatif sonuç veren 10 adet serumu ELISA testi ile seropozitif olarak tespit etmişlerdir.

Zambo ve ark. (121), IHA (indirekt hemaglutinasyon) testi ile 432 boğa serumundan 412(%96), 156 inek serumundan 81(%52) adedinin IBR/IPV virusuna karşı 1:32-1:2048 serum sulandırılmalarında hemaglutinasyon aktivitesi gösterdiğini saptamışlardır. Aynı çalışmada 38 fötal serumda IBR/IPV virusuna karşı oluşmuş spesifik antikorların varlığı tespit edilememiştir.

## 2.6.IMMUNİTE

IBR/IPV enfeksiyonunda devamlı bir immunitenin oluşması, enfeksiyonun lokal ve genel olarak şiddeti ile ilgilidir(26). Buna bağlı olarak enfeksiyonun solunum seyir şeklinde genellikle yüksek, genital seyir şeklinde ise daha düşük düzeyde immun yanıt gelişir(26).Immün yanıt hücresel ve humoral olarak tespit edilmiştir(37). Hücresel immün yanıtta T hücre proliferasyonu meydana geldiği ve bu hücrelerin akciğerlerde virusun eliminasyonunda rolü olduğu saptanmıştır(26, 37). Enfeksiyonda lokal koruma etkisine sahip olan IgA iki hafta içinde en yüksek düzeye ulaşmaktadır(26). Humoral immuniteden nötralizan antikorlar sorumludur ve 4 yıl kadar

etkilidirler(13). Fakat bu humoral antikorlar latent enfekte hayvanlarda virusun reaktivasyonundan sonra etkili olmayıp, hayvanlar klinik bir belirti göstermeksizin virusu saçabilirler(119). Guy ve ark. (43) latent enfekte hayvanlara kortikosteroid uygulayarak reaktivasyona bağılı olarak gelişen sekonder immun yanıtta serumda IgG1, IgG2 ve IgM'lerin bulunduğunu saptamışlardır.

Guy ve ark.(42) yaptıkları deneysel çalışmada, BHV-1 infeksiyonuna karşı oluşan primer immun yanıtın inokulasyon sonrası 7.günde oluştuğunu ve aynı zamanda serum antikorunda IgG ve IgM'lerin belirgin bir düzeye geldiği tespit etmişlerdir. Gebe olmayan ineklerde IgG'nin maksimal düzeye inokulasyon sonrası 35.günde, gebe ineklerde ise 14.günde ulaştığı saptanmıştır (42). Maksimal IgM düzeyinin her iki grup hayvanda da inokulasyon sonrası 14.günde meydana geldiği ve hızla düştüğü gözlenirken, IgG düzeyinin uzun süre sabit kaldığı tespit edilmiştir (42). Primer immun yanıtta IgG'nin antikor aktivitesinde spesifik IgG1'lerin, sekonder immun yanıtta ise hem IgG1 hemde IgG2'lerin serumda tespit edildikleri bildirilmiştir(42).

Collins ve ark.(22), BHV-1'e karşı oluşan antikorların Radioimmunopresipitasyon testi ile 4 glikoprotein (102gp, 96gp, 69gp, 55gp molekül ağırlıklı) ve 1 polipeptid (115p molekül ağırlıklı) den oluştuğunu saptamışlardır.

Nötralizan antikorlar kolostrum yolu ile buzağılara nakledilir(26,52). Doğumdan sonraki 12 saat içinde verilen 1000 ml kolostrumun, yeni doğan buzağılarda koruyucu antikor

düzeğine ulaşmada yeterli olduğu belirtilmiştir(26). Kolost-  
rumda farklı düzeylerde IgG, IgM, IgA bulunduğu ve en yüksek  
Ig düzeylerinin doğum sonrası 6-9.saatlerde olduğu tespit  
edilmiştir(26). Bu tür pasif immunite nötralizan antikor mik-  
tarına bağlı olup 1-6 ay kadar etkilidir(26,71).

## 2.7.KORUNMA VE KONTROL

BHV-1 enfeksiyonları etkili bir kontrol ve aşılama  
programından sonra önlenbilir(26,119). Ancak enfeksiyonun  
bütün dünyada yaygın oluşu ve hızla yayılışı nedeniyle kont-  
rolu oldukça zordur. IBR/IPV enfeksiyonunda korunmada genelde  
2 tür aşı uygulanır(119). Bunlar, 1) Modifiye canlı virus  
aşıları ile 2) İnaktive virus aşılarıdır. Modifiye canlı  
virus aşıları intranazal yada intramuskular yollarla uygula-  
nabilir (119). Hızlı bir immun yanıt oluşturur (119). Immuni-  
tenin devamlılığı inaktive aşılara göre daha uzundur(119).  
Bazı intramuskular modifiye canlı virus aşıları abortuslara  
neden olabilmektedir (56,70,119). Bu nedenle gebe hayvanlara  
uygulanmamalıdır(56,119). Ayrıca intramuskuler modifiye canlı  
virus aşıları ile yeni aşılanan hayvanların aşılanmamış ve  
gebe ineklerle temas etmesine izin verilmemelidir (119).  
Modifiye canlı virus aşıları immunsupratif özelliğe sahiptir  
ve aşı virusu latent olarak kalabilir (119). İnaktive virus  
aşıları intramuskuler olarak uygulanır ve gebe hayvanlarda  
rahatlıkla kullanılabilir (119). Aşı virusunun latentliği

oluşmamaktadır(119). McFeely ve ark.(70) modifiye canlı virus aşısı uygulanan sütçülük işletmesindeki ineklerin %70'inde abortusların şekillendiğini bildirmektedir. Smith ve ark. (106), modifiye canlı aşı kullanarak aşıladıkları ineklerin aşılama sonrası nazal ve vajinal sekresyonlarından aşı suşunu izole etmişlerdir. Miller ve ark. (76), 8 ineği doğumdan 14 gün sonra BHV-1 modifiye canlı virus aşısı ile aşılamalarını takiben ineklerde infertilite meydana geldiğini saptamışlardır.

Maternal antikörlerin varlığından dolayı buzağılar 6 aylıktan sonra aşılanmalıdır(71). Menanteau-Horta ve ark.(71) modifiye canlı aşı kullanarak yaptıkları deneysel çalışmada, bir grup buzağıya doğum sonrası 84. ve 196. günlerde aşı uygularken, diğer bir gruptaki buzağılara ise yalnızca 196. günde aşı uygulanmıştır. Çalışma sonunda, 84. günde aşı uygulamasında immun yanıt oluşmadığı, 196. günde ise her iki grupta da yüksek düzeyde bir immun yanıtın oluştuğu tespit edilmiştir.

IBR/IPV kontrolünde en önemli noktalardan biriside, özellikle boğaların virus ve antikor yönünden yoğun bir şekilde taranması ve olabilecek enfekte veya latent enfekte hayvanların merkezlerden uzaklaştırılması yada elimine edilmesini içermektedir(2,6,15,17,64). Damızlık boğalar aşılanmalıdır ve belirli bir ortamda tutularak BHV-1'in saha suşlarına karşı korunmalıdır(119). Çok önemli kontrol sistemlerine rağmen, virus sperma saklamak için kullanılan dondurma şartlarında muhafaza olmakta ve böylece suni tohumlama yapılan

hayvanlara enfeksiyöz virusun bulaşması mümkün olmaktadır(6, 17,64,107). Bu nedenle ithal spermaların virolojik kontrollerinin yapılması gerekmektedir(6,17,64).



### 3. MATERİYAL VE METOT

#### 3.1. Virus

Araştırmada IBR/IPV virusu olan BHV-1'in Colorado referens suşu kullanıldı.

#### 3.2. Araştırmada Kullanılan Şüpheli Kan Serumları

Araştırmada kullanılan kan örnekleri Türkiye'nin değişik bölgelerindeki hayvancılık işletmeleri ile Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum Kliniğine getirilen abortus, klinik metritis ve repeat breeding gibi fertilitate problemi olan ineklerden toplandı(Tablo 3.1). Steril şartlarda kaolinli polystren tüpler<sup>(1)</sup> içine alınan kan örneklerinden serum ayrılarak 30 dakika süre ile 56°C'lik su banyosunda inaktive edildi ve testte kullanılabileceği kadar -20°C'de saklandı

#### 3.3. Virus İzolasyon Materyalleri

Bu amaçla abortus, klinik metritis ve repeat breeding gibi fertilitate problemi olan ineklerden alınan vajinal swap ile abort yapmış ineğin plasenta örnekleri toplanarak, PBS içinde steril ve soğuk şartlar altında laboratuvara getirildi. Ayrıca bu tür klinik belirti gösteren ineklerin kan örnekleri EDTA'lı polystren tüplerde<sup>(2)</sup> toplandı(Tablo 3.2).

---

(1),(2) Greiner, Nuertingen, Germany.

Tablo 3.1 : IBR/IPV virüsü nötralizan antikorlarının tespiti amacıyla toplanan şüpheli kan serumu örnekleri.

İşletme kodu	Materyal toplanan iller ve bölgeler	Serum sayısı
01	Adana-Akdeniz Bölgesi	21
02	Amasya-Karadeniz Bölgesi	17
03	Antalya-Akdeniz Bölgesi	16
04	Ankara/1-İç Anadolu Bölgesi	21
05	Ankara/2-İç Anadolu Bölgesi	50
06	Ankara/3-İç Anadolu Bölgesi	23
07	Ankara/4-İç Anadolu Bölgesi	27
08	Ankara/5-İç Anadolu Bölgesi	30
09*	Ankara/6-İç Anadolu Bölgesi	55
10	Aydın-Ege Bölgesi	14
11	Balıkesir-Marmara Bölgesi	13
12	Bursa-Marmara Bölgesi	28
13	Çanakkale-Marmara Bölgesi	23
14	Eskişehir-İç Anadolu Bölgesi	36
15	Kırklareli-Marmara Bölgesi	37
16	Muğla-Ege Bölgesi	43
17	Sakarya-Karadeniz Bölgesi	12
18	Samsun/1-Karadeniz Bölgesi	42
19	Samsun/2-Karadeniz Bölgesi	39
20	Şanlıurfa-Güneydoğu Anadolu Bölgesi	59
21	Tekirdağ-Marmara Bölgesi	18
TR	TOPLAM	624

\* A.Ü. Vet.Fakültesi Doğum Kliniği'nden toplanan serumlar.

Tablo 3.2 : IBR/IPV virusu izolasyonu amacıyla toplanan örnekler.

Materyal türü	Vajinal swap	Plasenta	Lökosit
Materyal sayısı	381	7	411

#### 3.4.Dana Serumu

Hücre kültürü çalışmalarında gerekli olan dana serumu Et ve Balık Kurumu(EBK) Ankara Et Kombinasyonu'nda kesilen danalardan elde edildi. Serumlar 56°C'lik su banyosunda 30 dakika süre ile inaktive edildikten sonra membran filtrasyon yöntemi ile sterilize edilerek, steril şişelere bölündü ve derin dondurucuda saklandı.

#### 3.5.Hücre Kültürleri

Araştırmada, virus izolasyon çalışmaları FDB ve MDBK hücre kültürlerinde, IBR/IPV virusu Colorado referans suşunun üretilmesi ve mikronötralizasyon testinin uygulaması ise MDBK hücre kültüründe yapıldı.

##### 3.5.1.Primer FDB hücre kültürünün hazırlanışı

FDB hücre kültürünün hazırlanması için mezbahada kesilen gebe hayvanlara ait fötüslerin böbrekleri kullanıldı. Alınan böbrekler PBS içinde laboratuvara getirildi. Steril

şartlarda böbreklerin kapsulaları ayrıldıktan sonra, korteks tabakasından steril makas yardımı ile küçük doku parçaları petri kutusuna alındı. İki bistüri ile doku parçaları petri kutusu içinde mekanik olarak daha küçük parçalara ayrıldı. Bu doku parçaları steril bir erlenmayere alınarak 4 defa PBS ile yıkandı ve %0,25'lik tripsin<sup>(1)</sup> kullanarak 5-6 defa oda derecesinde manyetik karıştırıcı ile 15'er dakika tripsinize edildi. Tripsinizasyon aşamalarında tripsin-hücre karışımı sıvı, ağzı tülbentli steril bir beherglasta toplandı ve santrifüj edilene kadar +4°C'de saklandı. Son tripsinizasyon işleminden sonra elde edilen hücre süspansiyonu 800-1000 devirde 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden sonra elde edilen hücre sedimenti PBS ile süspansiyon yapılarak, aynı şartlarda tekrar santrifüj edildi ve tripsinin hücreler üzerindeki etkisi giderildi. Santrifüjden sonra elde edilen hücreler  $6 \times 10^5$  hücre/ml olacak şekilde %20 inaktif dana serumlu hücre üretme vasatı Hanks ile sulandırılarak hücre kültürü şişelerine aktarıldı ve 37°C'de üremeye bırakıldı. Elde edilen hücrelerin bir kısmı ise  $6 \times 10^6$  hücre/ml hesabı ile eşit miktarda fötal dana serumu ve Hanks vasatı ile sulandırılarak, %10 Dimethylsulfoxid (DMSO) ilave edilip, 1'er ml'lik tüplerde donduruldu. +4 ve -20°C de 30'ar dakika bekletilerek aşamalı olarak dondurulan hücreler, kullanılabildiği kadar -80°C de saklandı. Dondurulan hücreler kullanılacağı zaman 37°C'lik su banyosunda çözülerek %20 inaktif dana serumlu Hanks vasatı ile hücre kültürü şişelerine aktarıldı.

---

(1) Gibco Ltd. P.O.Box 35, Paisley, Scotland, UK.

Hazırlandıktan hemen sonra yada dondurulup çözüldükten sonra hücre kültürü şişelerine aktarılan hücrelerin vasatı 48 saat sonra, hücre yüzeyleri yıkanarak %20 inaktif dana serumu içeren Eagle's MEM<sup>(1)</sup> vasatı ile değiştirildi.

### 3.5.2.Sekonder FDB hücre kültürünün hazırlanışı

Üremesini tamamlamış olan primer fötal dana böbrek hücre kültürlerinde hücre üretme vasatı dökülerek hücre yüzeyleri PBS ile yıkandı. Sonra hücreler PBS-V tripsin ile şişe yüzeyinden çözdürülerek 800-1000 devirde 10 dakika süre ile santrifüj edildi. Elde edilen hücre sedimenti %10 inaktif dana serumu kapsayan hücre üretme vasatı Eagle's MEM ile sulandırılarak hücre kültürü şişelerine aktarıldı ve 37°C'de üremeye bırakıldı.

### 3.5.3.Devamlı hücre kültürünün hazırlanışı

Hannover Veteriner Yüksek Okulu Viroloji Enstitüsü'nden alınan MDBK devamlı hücre kültürleri kullanıldı. Hücre üretme vasatı olarak %10 inaktif dana serumlu Eagle's MEM vasatından yararlanıldı.

### 3.6.Virusun Üretilmesi

IBR/IPV virusunun Colorado suşundan fazla miktarda elde etmek için MDBK devamlı hücre kültüründen yararlanıldı.

---

(1) Gibco Ltd. P.O.Box 35, Paisley, Scotland, UK.

250 ml'lik hücre kültürü şişesinde üretilen MDBK devamlı hücre kültürüne 1 ml IBR/IPV virusunun Colorado suşundan adsorbsiyon tekniği ile inokule edildi. 37°C'de 1 saat, adsorbsiyonu için bekletilen hücre kültürüne, süre sonunda virus üretme vasatı olarak Eagle's MEM ilave edildi. İnkubasyondan 48 ile 72 saat sonra %80 oranında sitopatolojik değişikliklerin görülmesi üzerine, kültür -80°C'de dondurulup, 37°C'de çözülerek viruslu hücre sıvısı 3000 devirde 30 dakika +4°C'de santrifüj edildi. Üstte kalan viruslu sıvının sterilitate kontrolü yapılarak 1 ml'lik porsiyonlar halinde -80°C'de saklandı. Virus üretilmesi hücre kontrolü ile birlikte yürütüldü.

### 3.7.Virusun Mikrotitrasyon Yöntemi ile Titrasyonu

Bu amaçla, Frey ve Liess(35)'in bildirdikleri yöntem kullanıldı. Virus Eagle's MEM içinde log 10 tabanına göre sulandırıldı. Her sulandırma basamağı için mikrotitrasyon tablasının 4 gözü kullanıldı ve gözlere her sulandırma basamağından 0.1 ml konuldu. Ayrıca virus kontrol için 4 göze 0.05 ml serumsuz Eagle's MEM vasatı ve 0.05 ml sulandırılmamış viruslu sıvıdan, hücre kontrol için ise 4 göze 0.1 ml serumlu Eagle's MEM vasatı konuldu. Gözlerdeki virus sulandırmaları ve kontrollerin üzerine özel pipet<sup>(1)</sup> yardımı ile 0.05 ml MDBK hücre kültürü süspansiyonundan(300.000 hücre/ml) damlatıldı. Mikrotitrasyon tablasının üzeri toksik olmayan

---

(1) Firma Greiner und Söhne, Nürtingen/Württ.

yapıştırıcı bant<sup>(1)</sup> ile örtülerek, 37°C'lik CO<sub>2</sub>'li etüvde inkubasyona bırakıldı. Hergün doku kültürü mikroskopunda hücrelerde meydana gelen değişiklikler kontrol edilerek üçüncü gün sonunda sonuçlar, Kaerber yöntemine<sup>(55)</sup> göre hesaplanarak virusun titresini saptandı.

### 3.8.Şüpheli Kan Serumlarında Nötralizan Antikor Aranması

#### 3.8.1.Mikronötralizasyon Testi

Test, Frey ve Liess<sup>(35)</sup>'in bildirdikleri yöntemine göre yapıldı. Kontrol edilecek inaktive edilmiş ve sulandırılmamış serum örneklerinden, mikronötralizasyon tablasındaki 4 göze 0.05 ml kondu. Her bir serum örneği üzerine eşit miktarda bilinen virustan ( $100DKID_{50} : 10^{-3.45}/0.05 \text{ ml}$ ) eklendi. Mikronötralizasyon tablasının üzeri toksik etkisi olmayan özel yapıştırıcı bant ile örtülerek 37°C'lik CO<sub>2</sub>'li etüvde 2 saat süre ile inkubasyona bırakıldı. Süre sonunda tablanın üzerindeki bant kaldırılarak, özel pipet yardımı ile bütün gözlere 0.05 ml MDBK hücre kültürü süspansiyonundan (3000.000 hücre/ml) damlatıldı. Tablanın üzeri tekrar özel yapıştırıcı bant ile örtülerek 37°C'lik CO<sub>2</sub>'li etüve kaldırıldı. Doku kültürü mikroskopunda<sup>(2)</sup> yapılan kontrollerle sonuçlar üçüncü gün sonunda hücrelerde meydana gelen sitopatolojik değişikliklere göre değerlendirildi.

(1) Cooke Engineering Company, Alexandria, USA.

(2) Olympus C-K, Tokyo, Japan.

### 3.8.2.Pozitif serumların serum nötralizasyon değerlerinin (SN<sub>50</sub>) saptanması

Mikronötralizasyon testi sonunda pozitif sonuç veren serum örneklerindeki antikor titreleri yine mikronötralizasyon testi ile saptandı. Pozitif serumlar sulandırılmadan mikronötralizasyon tablasının ilk sırasındaki 4 göze 0.05 ml kondu. Sonra ilk sıra ve altındaki gözlere özel pipet yardımı ile 0.05 ml Eagle's MEM vasatı damlatıldı. Daha sonra özel mikrosulandırıcı pipet<sup>(1)</sup> yardımı ile en üst sırada bulunan serum sulandırmalarından başlamak ve alt sıradaki gözler 0.05 ml taşımak suretiyle serumlar 1/512'ye kadar sulandırıldı. Sulandırma işleminden sonra bütün gözlere titresi bilinen virustan (100DKID<sub>50</sub> : 10<sup>-3.45</sup>/0.05 ml) özel pipet yardımı ile 0.05 ml damlatıldı. Mikronötralizasyon tablasının üzeri toksik etkisi olmayan yapıştırıcı bant ile örtülerek, 37°C'lik CO<sub>2</sub>'li etüvde 2 saat süre ile inkubasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda tablanın üzerindeki bant kaldırılarak her göze özel pipet yardımı ile MDBK hücre süspansiyonundan (300.000 hücre/ml) 0.05 ml damlatıldı. Tablanın üzeri yeniden yapıştırıcı bant ile örtülerek 37°C'lik CO<sub>2</sub>'li etüve kaldırıldı. Sonra doku kültürü mikroskobu altında yapılan kontrollerle üçüncü gün sonunda pozitif serumlardaki antikor titreleri Kaerber yöntemine<sup>(55)</sup> göre hesaplandı.

---

(1) Titertek, Flow Laboratories, Finland.

### 3.9.Virus izolasyon alışmaları

Virus izolasyon çalışmaları, abortus, klinik metritis ve repeat breeding gibi fertilitate problemlilerden alınan vajinal swap ve abort yapmış ineğin plasenta örnekleri ile bu tür klinik belirti gösteren ineklerin lökositlerinden yapıldı.

#### 3.9.1.Vajinal swap ve plasenta örneklerinden virus izolasyonu alışması

Steril şartlarda alınan vajinal swap ve plasenta örnekleri antibiyotikli PBS içinde en kısa sürede laboratuvara getirildi. Vajinal swap örnekleri 3000 devirde 30 dakika +4°C'de santrifüj edilerek st sıvı inokulum olarak kullanıldı. Plasenta rnekleri ise homojenizatörde<sup>(1)</sup> işlenerek inokulum hazırlandı. Virus izolasyon denemelerinde kullanılacak bu örnekler, sterilite kontrolüne alınarak hücre kültürüne inokule edilebilecek duruma getirildi. Sonra her bir örnek için iki hücre kültürü tüpüne 2 ml hücre süspansiyonu (100.000 hücre/ml) konularak 37°C'de 2 gün inkube edildi. Hücre retme vasatı olarak %10 ftal dana serumu içeren Eagle's MEM kullanıldı. Bu süre sonunda hücre yüzeyleri PBS ile yıkandı ve hazırlanan inokulumdan 0.2 ml inokule edilerek, 37°C'de 1 saat adsorbsiyona bırakıldı. Adsorbsiyondan sonra hücre yüzeyleri PBS ile yıkanarak üzerine 2 ml virus üretme vasatı Eagle's MEM kondu. Hücre kltrleri 6 gün süre

---

(1) B.Brown Melsungen AG, Melsungen, Germany.

ile 37°C'de inkubasyona bırakıldı ve hergün doku kültürü mikroskopunda sitopatolojik değişiklikler yönünden kontrol edildi. Daha sonra -80°C'de dondurulan viruslu hücre kültürleri 37°C'de su banyosunda çözülerek, 3000 devirde 30 dakika santrifüj edildi. Üstte kalan sıvı bir sonraki pasaj için inokulum olarak kullanıldı. Her bir numune için en az 3 kör pasaj yapıldı ve 4 tüpte hücre kontrol olarak bırakıldı.

### 3.9.2. Lökositlerden virus izolasyonu çalışması

EDTA'lı polystren tüplere alınan kan örnekleri, lökosit elde etmek amacıyla 1500-2000 devirde 10 dakika süre ile santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında üstte görülen lökosit tabakası pastör pipeti ile alınarak PBS ile karıştırıldı ve yeniden 1500-2000 devirde 10 dakika süre ile santrifüj edildi. Tekrarlanan bu santrifüjden sonra elde edilen lökositler %5 fetal dana serumu ve %10 Dimethylsulfoxid(DMSO) içeren PBS içinde karıştırıldı. Sterilite kontrolü yapılarak kullanma zamanına kadar -20°C'de saklandı.

Lökositler inokulasyondan önce -20°C'den alınarak 37°C'de ani olarak çözündürüldü ve böylece lökosit içindeki muhtemel virusun açığa çıkması sağlandı. İnokulasyon 3.9.1'de uygulanan yöntemle yapıldı. Her lökosit örneği için 3 kör pasaj uygulandı.

#### 4. BULGULAR

##### 4.1. Virusun Üretilmesi

IBR-IPV virusunun Colorado referens suşu hücre kültüründe yapılan inokulasyondan 48-72 saat sonra karakteristik sitopatolojik değişiklikler oluşturdu (Resim 4.1).

##### 4.2. Virusun titresi

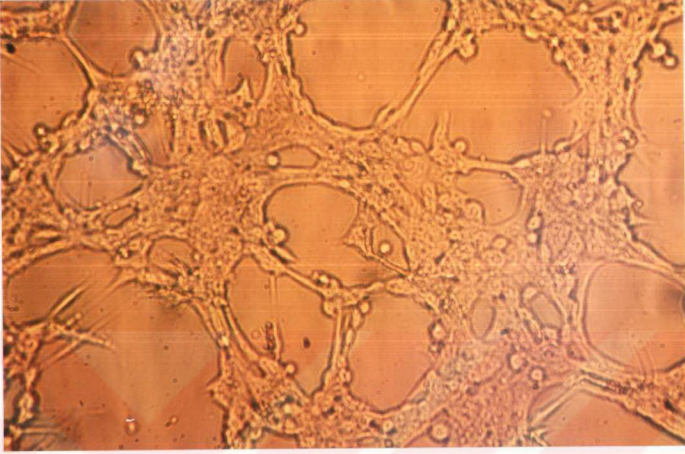
Araştırmada kullanılan IBR-IPV virusu Colorado suşunun MDBK hücre kültüründe, mikrotitrasyon yöntemi ile yapılan titrasyonunda, enfeksiyözite gücü 3. gün sonunda  $DKID_{50} = 10^{-5.75}/0.1$  ml olarak belirlendi.

##### 4.3. Mikronötralizasyon testi sonuçları

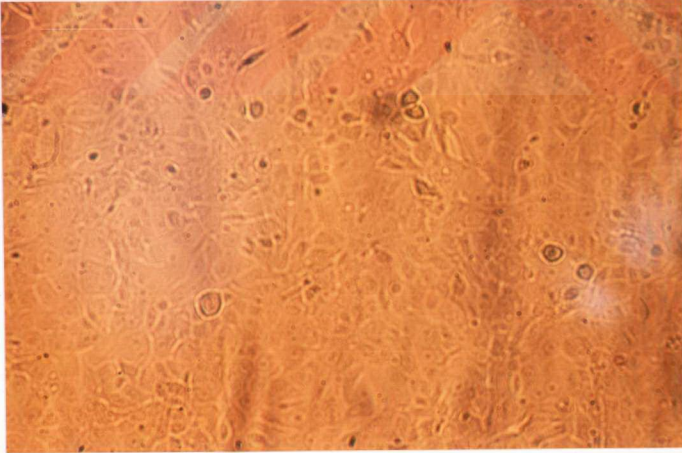
###### 4.3.1. Mikronötralizasyon testi ile pozitif serumların saptanması

Mikronötralizasyon testi ile kontrolü yapılan 624 adet şüpheli kan serumunun sulandırılmamış örneklerinde 425 adedi (%68.10) IBR-IPV virusu nötralizan antikoları yönünden pozitif bulundu (Tablo 4.1 ve Grafik 4.1).

Kontrol edilen işletmelerin tümünde IBR/IPV virusu nötralizan antikoları tespit edilmiş ve işletmelerdeki seropozitiflik oranınının %6.66 ile %100 arasında olduğu saptanmıştır (Tablo 4.1 ve Grafik 4.1).



Resim 4.1 : IBR/IPV virusu Colorado suşu ile enfekte MDBK hücre kültürünün 3.gündeki görünüşü( x500)



Resim 4.2 : MDBK hücre kültürü (Hücre kontrol1)( x500)

Tablo 4.1.: Mikronötralizasyon testi sonuçları.

İşletme kodu	Serum sayısı	IBR/IPV virüsü nötralizan antikorları		
		Pozitif serum sayısı	Pozitiflik oranı(%)	SNso dağılımı
01	21	14	66.66	1:22.4-1:178
02	17	3	17.64	1:12.3-1:31.6
03	16	10	62.50	1:12.3-1:251
04	21	21	100.00	1:12.3-1:316
05	50	48	96.00	1:1.41-1:251
06	23	20	86.95	1:12.3-1:100
07	27	22	81.48	1:3.98-1:100
08	30	2	6.66	1:7.95-1:12.3
09	55	26	47.27	1:1.41-1:63.1
10	14	8	57.14	1:31.6-1:251
11	13	6	46.15	1:12.3-1:63.1
12	28	27	96.42	1:22.4-1:251
13	23	18	78.26	1:12.3-1:316
14	36	34	94.44	1:2.82-1:100
15	37	24	64.86	1:1.41-1:251
16	43	31	72.09	1:1.41-1:178
17	12	10	83.33	1:22.4-1:31.6
18	42	6	14.28	1:12.3-1:63.1
19	39	30	76.92	1:12.3-1:89.2
20	59	56	94.91	1:12.3-1:316
21	18	9	50.00	1:3.98-1:316
TOPLAM	624	425	68.10	1:1.41-1:316

#### 4.3.2. Pozitif serumların serum nötralizasyon (SN<sub>50</sub>) değerleri

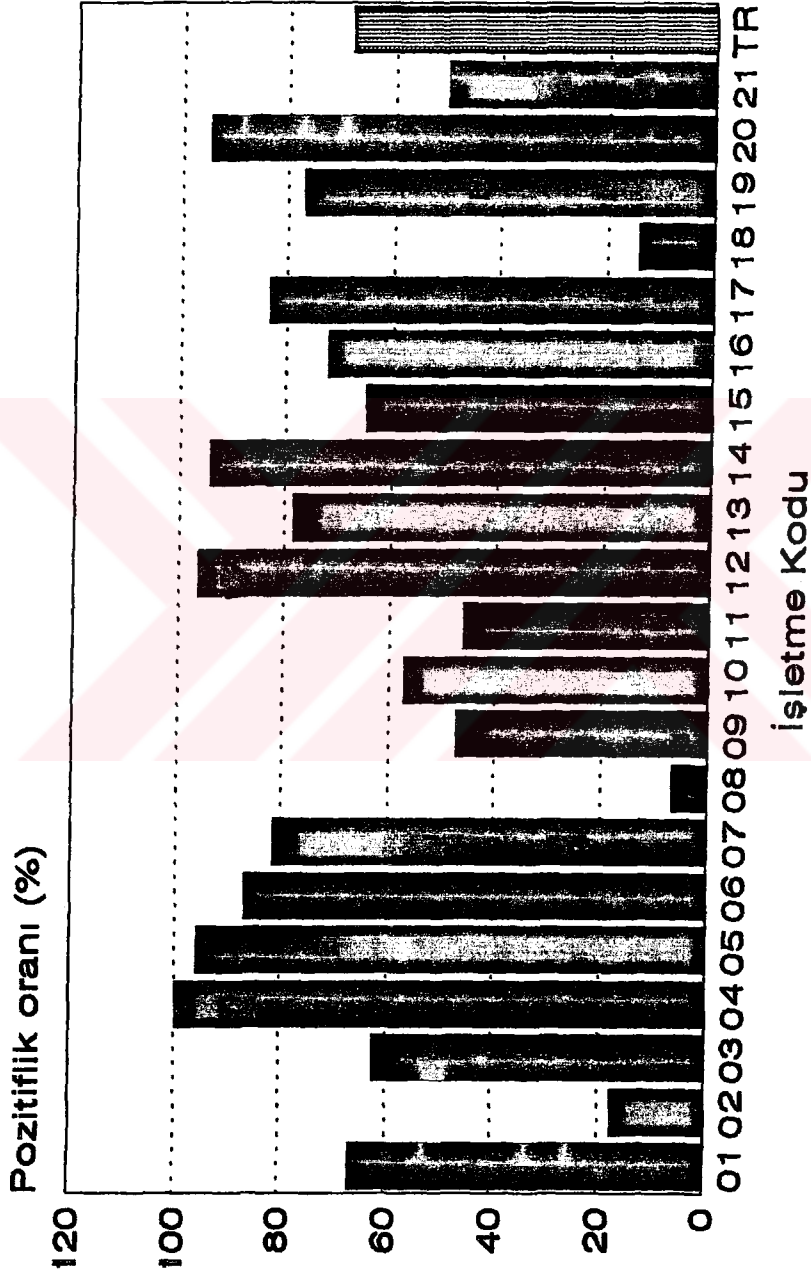
Sulandırılmamış serum örneklerinde pozitif sonuç veren 425 adet serumun mikronötralizasyon testi ile saptanan serum titreleri, işletmeler genelinde, en düşük SN<sub>50</sub> değeri 1:1.41, en yüksek SN<sub>50</sub> değeri ise 1:316 olarak tespit edildi (Tablo 4.2 ve Grafik 4.2).

#### 4.4. Virus izolasyon çalışması sonuçları

Virus izolasyonu amacıyla fertilitte problemlili ineklerden toplanan 381 adet vajinal swap ve 7 adet plasenta ile 411 adet lökosit örneklerinin hücre kültürlerinde yapılan pasajlarında virus izole edilemedi.

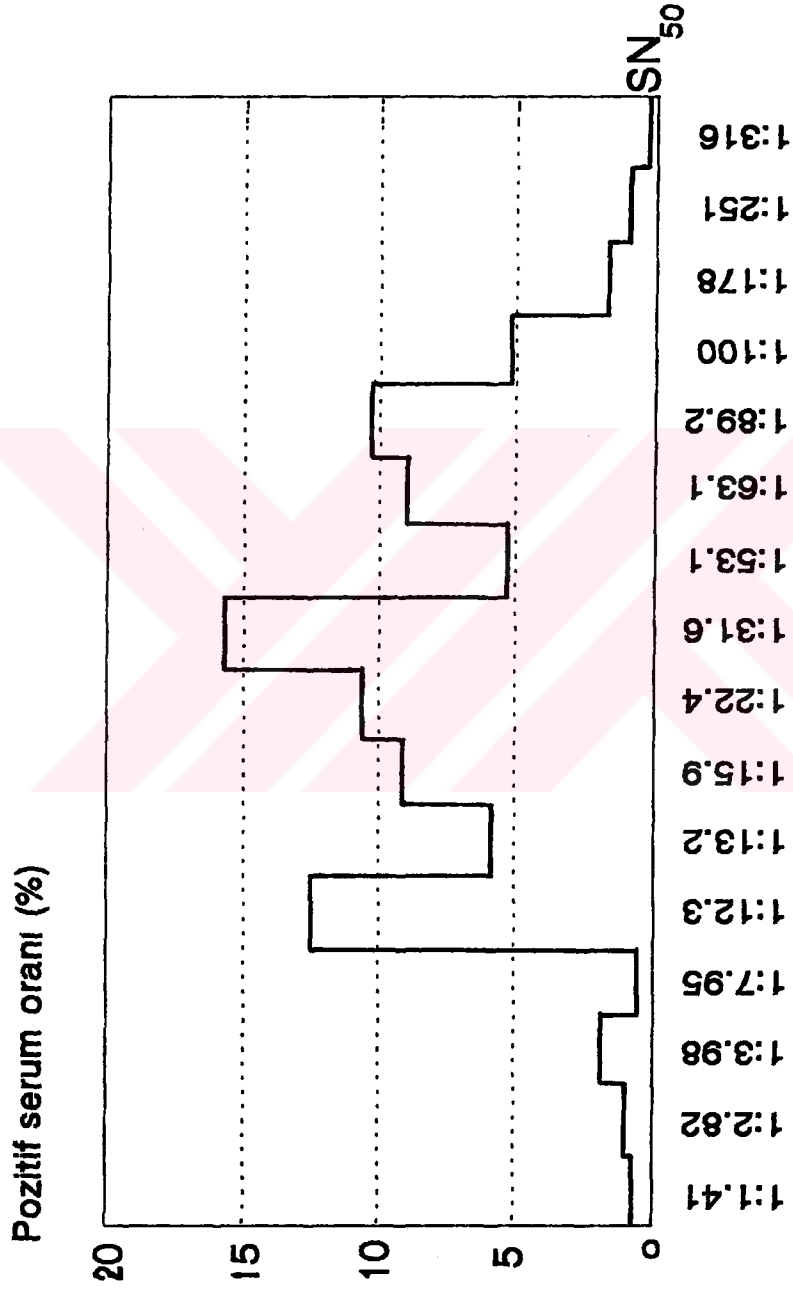
Tablo 4.2.: IBR/IPV virusuna karşı pozitif serumların  
SN<sub>50</sub> değerleri dağılımı.

Serum sulandırmaları	Pozitif serum sayısı	Pozitif serum oranı(%)
1:1.41	6	1.41
1:2.82	7	1.64
1:3.98	15	3.52
1:7.95	5	1.17
1:12.3	54	12.70
1:13.2	29	6.82
1:15.9	37	8.70
1:22.4	49	11.52
1:31.6	71	16.70
1:53.1	24	5.64
1:63.1	36	8.47
1:89.2	46	10.82
1:100	22	5.17
1:178	13	3.05
1:251	8	1.88
1:316	3	0.70



**Grafik 4.1.:** Seropozitif olarak tespit edilen ineklerin işletmelere göre pozitiflik dağılımları.

TR: Türkiye geneli pozitiflik oranı (%)



Grafik 4.2.: Seropozitif olarak tespit edilen ineklerin SN<sub>50</sub> değerleri dağılımı.

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Sığırlarda enfeksiyöz nedenlere bağlı fertilité problemleri içinde IBR/IPV enfeksiyonu önemli bir yer teşkil etmektedir. Bu viral enfeksiyon klinik metritis, repeat breeding ve abortus gibi infertilite olgularına neden olup, yaygın olarak ortaya çıkmakta ve süt ineği yetiştiriciliğinde verimlilik yönünden önemli sorunlardan biri olmaktadır.

Türkiye'de sığırlarda IBR/IPV enfeksiyonunun serolojik ve virolojik olarak araştırıldığı çalışmalar yapılmış olmasına karşılık (14,15,16,33,44,45,85), bu tür fertilité problemlili sığırlarda IBR/IPV enfeksiyonunun varlığını ortaya koyan bir çalışma bildirilmemiştir.

Bu araştırmada, Türkiye'nin çeşitli bölgelerindeki işletmelerden toplanan fertilité problemlili inek serumlarında IBR/IPV virusuna karşı oluşan nötralizan antikorların varlığını saptamak amacıyla mikronötralizasyon testi kullanılmıştır. Ayrıca bu tür ineklere ait vajinal swap, lökosit ve placent örneklerinden virus izolasyonu çalışmaları yapılmıştır.

Araştırmada, fertilité problemlili ineklerden alınan kan serumları mikronötralizasyon testi ile kontrol edilmiş ve 624 adet kan serumunun 425 adedi (%68.10) IBR/IPV nötralizan antikorları yönünden pozitif bulunmuştur. Kontrol edilen işletmelerin tümünde IBR/IPV enfeksiyonu varlığı tespit edilmiş ve işletmelerdeki seropozitiflik oranının %6.66 ile %100 arasında olduğu belirlenmiştir. Pozitif serumların SN<sub>50</sub>

değerlerinin ise 1:1.41 - 1:316 arasında dağılım gösterdiği saptanmıştır.

Türkiye'de IBR/IPV enfeksiyonu üzerindeki çalışmalar genellikle sağlıklı görünüşlü sığırlardan alınan kan serumlarının serolojik kontrolleri ile yapılmıştır. Erhan ve ark. (33) farklı iki işletmede bulunan sığırlarda %20 ve %29 oranında, Gürtürk ve ark.(44) değişik bölgelerden topladıkları 1029 adet sığır serumunun 561 adedinde (%54.51), Akça(7) 437 adet sığır serumunun 238 adedinde (%54.46), Burgu ve Akça (14) 61 adet sığır serumundan 31 adedinde (%55.73) IBR/IPV nötralizan antikorlarının varlığını tespit etmişlerdir. Öztürk ve ark.(85) ise zaman zaman solunum sistemi enfeksiyonlarının görüldüğü bir işletmede bulunan 2 yaşın üzerindeki sığırlarda % 89.70 oranında seropozitiflik saptadıklarını bildirmişlerdir. Bu araştırmada ise, fertilitate problemlili ineklerden alınan 624 kan serumundan 425 adedinde (%68.10) IBR/IPV antikorları tespit edilmiştir. Bu oran daha önce Türkiye'de IBR/IPV enfeksiyonu ile ilgili olarak yapılan çalışmalarda bildirilen oranlardan daha yüksektir.

Araştırmada kullanılan hayvanların özellikleri gözönünde bulundurulduğunda, örneklenen hayvanlarda yüksek antikor titresinin tespiti fertilitate problemleri oluşumunda IBR/IPV virusunun rolü olabileceğini açıkca ortaya koymaktadır. Bu açıdan bakıldığında, Öztürk ve ark.(85)'nin araştırmalarında zaman zaman solunum sistemi enfeksiyonlarının görüldüğü işletmede yüksek pozitiflik tespit etmeleri ile bu araştırma arasında paralellik gözlenmektedir. Nitekim,

Woernle ve Brunner(118), de nötralizasyon testi ile sağlıklı sığırlarda %2.5, solunum yolu enfeksiyonlarının görüldüğü sığırlarda %24, fertilite problemlili sığırlar ile abortus ve neonatal ölüm olgularının görüldüğü sığırlarda %23 oranında IBR virusuna karşı oluşan nötralizan antikörlerin varlığını tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Manickam ve Mohan (69) ise, 187 abort yapan inekten aldıkları serum örneklerinde, IBR yönünden yaptıkları serolojik çalışmada, 43 adet ineğin (%23) 1:8 ve daha yüksek titrede pozitif sonuç verdiğini saptamışlardır. Allegri ve ark.(8) 49 işletmeden topladıkları 437 adet fertilite problemlili inek serumundan 176 adedini (%40.3) IBR virusu yönünden seropozitif olarak tespit etmişler ve serumların toplandığı işletmelerden 26 (%53)'ında seropozitiflik saptadıklarını bildirmektedirler.

Araştırmada ayrıca, fertilite problemlili ineklerden toplanan 381 adet vajinal swap, 411 adet lökosit ve 7 adet plasenta örneği virus izolasyonu amacıyla hücre kültürlerinde pasajlanmış, fakat materyallerden virus izolasyonu yapılamamıştır. Ancak bu durum, örneklenen hayvanlarda fertilite problemlilerinin IBR/IPV virusuna ilgili olmadığını bir kanıtı değildir. Araştırmada kullanılan vajinal swap ve lökosit örneklerinin alındığı dönemde, akut klinik belirtilerin gözlenmemiş olması nedeniyle virus izolasyonu olasılığının düşük olacağı açıktır. IBR/IPV enfeksiyonuna bağlı abortus olgularında ise, virusun genellikle inaktive olması nedeniyle, toplanan 7 adet plasenta örneğinde virus izolasyonu gerçekleştirilememiştir. Bu nedenle teşhiste antijen tespitine

yönelik yöntemlerin kullanılması gerekmektedir. Lucas ve ark. (68), 582 abort materyalinden birinde IF testi ile IBR antijeni tespit ederken, 330 materyalden hücre kültürlerinde yapılan virus izolasyonu çalışmalarında sonuç elde edilememiştir. Bununla birlikte bazı araştırmacılar(117,119) izolasyonun gerçekleştirilemediği durumlarda salgından 2-3 hafta sonra toplanan serum örneklerinde antikor tespiti ile IBR/IPV enfeksiyonunun tanısının yapılabileceğini bildirmektedirler. Bu çalışmada da fertilitate problemlili ineklere ait vajinal swap, lökosit ve plasenta örneklerinden virus izolasyonu yapılamamış olmasına rağmen, bu hayvanlarda yüksek seropozitifliğin tespit edilmiş olması nedeniyle, ineklerin fertilitate problemlerinde IBR/IPV virusunun etiyolojik bir etken olabileceği sonucuna varılmıştır.

Nitekim, Collings ve ark. (21), solunum ve genital sistem enfeksiyonlarının birlikte görüldüğü bir sürüde yaptıkları virolojik ve serolojik çalışmada, konvelesent dönemdeki hayvanlarda belirgin bir IBR/IPV antikor titresinin olduğunu, ancak bu dönemde vulvo-vaginitisli ineklerden virus izolasyonu yapılamadığını bildirmektedirler.

Abraham ve ark.(1) IBR/IPV enfeksiyonunun patlak verdiği bir işletmede yaptıkları çalışmada, 92 nazal ve konjunktival sekresyonun 38'inde (%41.3), 413 semen örneğinin 13'inde(%3.1), 43 prepusyal çalkantı sıvısının 9'unda(%26.9), IBR/IPV virus izolasyonu gerçekleştirilmiş, ancak 11 vajinal sekresyonun hiçbirinden virus izole edilememiştir. Klinik belirtilerin görülmesiyle birlikte kan serumu elde edilen

hayvanların %45-60'ında düşük düzeylerde (1:2-1:8) antikor saptanırken, enfeksiyon sonrası dönemde antikor düzeyinin arttığı belirtilmiştir.

Collery (20), infertilite olgusunun görüldüğü, 14 inek ve 1 boğanın bulunduğu bir işletmede 2 vajinal swap ile 1 prepusyal çalkantı sıvısından IBR/IPV virusu izole ettiklerini bildirmişlerdir. Bu akut dönem sonrasında tekrar aynı hayvanlardan alınan örneklerden izolasyonun gerçekleştirilemediği, ancak serum antikor titrelerinde 20-70 kat artma görüldüğü tespit edilmiştir.

Kahrs ve Smith(57), IBR, IPV ve abortusların birlikte görüldüğü bir sürüde, iki nazal akıntıdan, bir vajinal mukozadan, birde plasentadan virus izole etmişler ve bütün serumların antikor titrelerinin akut dönem ile konvalesent dönem arasında 4 kat ve daha fazla düzeyde arttığını saptamışlardır.

Lomba ve ark.(67), bir işletmedeki metritis olgularından IBR virusu izole ettiklerini ve enfeksiyondan 6-10 gün sonra hayvanlara ait serum antikor titrelerinin 1:64 ve daha yüksek düzeylerde olduğunu bildirmişlerdir.

Sonuç olarak, IBR/IPV nötralizan antikorları yönünden kontrol edilen bütün işletmelerde seropozitifliğin tespit edilmiş olması dikkat çekicidir. Bu hayvanların bir kısmının latent enfekte olabilmeleri, latent virusun çeşitli faktörlerin etkisi ile zaman zaman reaktive olarak yeniden enfeksiyona dönüşebilme ve etrafa saçılması yönünden önem taşımaktadır. Araştırmaların yapıldığı işletmelerde genellikle suni

tohumlama uygulamalarının yapıldığı bilinmektedir. IBR/IPV virusu ile enfekte boğalardan alınan spermaların ineklerde infertiliteye neden olabileceğide bir diğer gerçektir. Bu nedenle özellikle suni tohumlamada kullanılan latent enfekte boğaların serolojik kontrollerden geçirilmesi, sperma, lökosit, prepusyal çalkantı sıvısı ve burun akıntısı örneklerinden virus izolasyonu çalışmalarının yapılması, serolojik kontrollerde pozitif bulunan hayvanların damızlıktan çıkarılması gerekmektedir. Böylece işletmelerdeki akut ve latent enfeksiyonların kontrolleri ile birlikte, sperma kaynaklı IBR/IPV virusuna bağlı oluşabilecek fertilite problemleri en az düzeye indirilecek, ve bu çalışmalar ülke hayvancılığını olumlu yönde etkileyerek, hayvancılıkta verimliliğinin artırılmasında önemli bir etken olacaktır.

## 6. ÖZET

Bu araştırmada Türkiye'nin farklı bölgelerindeki 20 süt ineği yetiştirmesi ve A.Ü. Veteriner Fakóltesi Doğum Kliniğine getirilen, fertilitate problemlili ineklerden alınan 624 adet kan serumu mikronötralizasyon testi ile IBR/IPV antikorları yönünden kontrol edilmiştir. Ayrıca bu ineklere ait 381 adet vajinal swap, 411 adet lökosit ve 7 adet plasenta örneklerinin virus izolasyonu amacıyla hücre kültürlerinde pasajları yapılmıştır.

Mikronötralizasyon testi ile kontrol edilen 624 adet kan serumunun 425 adedi (%68.10) IBR/IPV virusu nötralizan antikorları yönünden pozitif bulunmuştur. Ancak virus izolasyonu amacıyla toplanan örneklerden virus izole edilememiştir. Kontrol edilen işletmelerin tümünde IBR/IPV enfeksiyonu varlığı tespit edilmiş ve işletmelerdeki seropozitiflik oranlarının %6.66 ile %100 arasında olduğu belirlenmiştir. Ayrıca pozitif serumların  $SN_{50}$  değerlerinin 1:1.41 -1:316 arasında dağılım gösterdiği saptanmıştır.

Bu araştırmada, virus izolasyonu yapılamamasına rağmen, işletmelerdeki antikor düzeylerinin yüksekliği nedeniyle, fertilitate problemlili ineklerde IBR/IPV virusunun etiyo-lojik bir etken olabileceği tespit edilmiştir.

## 7. İNGİLİZCE ÖZET (Summary)

### THE ISOLATION AND SEROEPIDEMIOLOGICAL STUDIES OF IBR/IPV VIRUS ON COWS WITH FERTILITY PROBLEMS

In this research, 624 serum samples obtained from both cows with fertility problems which have been brought to Gynecology Clinic of Veterinary Faculty of Ankara University and the animals having same problems of which produced in 20 dairy herds located in various regions of Turkey were tested for IBR/IPV antibodies using microneutralization assay. In addition, 381 vaginal swab, 411 heparinized blood and 7 plasental samples were passaged in susceptible cell lines in order to virus isolation.

425 (%68.10) of tested 624 serum samples by micro-neutralization assay were found to be positive for IBR/IPV virus neutralizing antibodies. However, the effective virus was not able to isolated from the specimens collected for virus isolation. The presence of IBR/IPV infection was detected in all of dairy herds and it was observed that incidence of the infection in selected herds was varied from 6.66% to 100%. Neutralizing dose 50 (ND<sub>50</sub>) values of the antibody carriers were found between 1:1.41-1:316.

Although virus isolation could not be acheived, this research shows that IBR/IPV virus may be an etiological agent in fertility problems of cows, since high incidence against corresponding agent has been detected at herds.

## 8. KAYNAKLAR

1. ABRAHAM,A.,AYOLAN,N.,MARCUS,S.: An outbreak of IBR/IPV infection in bulls and dairy cattle in Israel 1.Clinical and diagnostic aspects. Refuah Veterinarith.39(3):93-98, 1982.
2. ABRAHAM,A.,AYALON,N.,MARCUS,S.: An outbreak of IBR/IPV infection in bulls and dairy cattle in Israel 2.Vaccination of bulls artificial insemination centres. Refuah Veterinarith.39(3):98-103,1982.
3. ACKERMANN,M.,WYLER,R.: The DNA of an IPV strain of bovid herpesvirus-1 in sacral ganglia during latency after intravaginal infection. Vet.Microbiol.9:53-63,1984.
4. AFSHAR,A.: Virus diseases associated with bovine abortion and infertility. Vet.Bull.,35(12):735-749,1965.
5. AFSHAR,A.,BANNISTER,G.L.: Viral infections of the bovine mammary gland. Vet.Bull.40(9):681-686,1970.
6. AFSHAR,A.,EAGLESOME,M.D.: Viruses associated with bovine semen. Vet.Bull.60(2):93-109,1990.
7. AKÇA,Y.: Türkiye'de sığır ve koyunlarda enfeksiyöz bovine rhinotracheitis / enfeksiyöz pustular vulvovaginitis (IBR /IPV) üzerinde serolojik araştırmalar. Ank.Üni.Vet.Fak.Doktora tezi,Ankara,1981.
8. ALLEGRI,G.,CAVIRANI,S.,BOTTARELLI,E.: Infectious bovine rhinotracheitis(IBR) and Bovine virus diarrhea(BVD) virus antibodies in cattle sera from dairy herds with reproductive disorders. Archivio Veterinario Italiano 36(5/6):174-178,1985.
9. ARTHUR,G.H.,NOAKES,D.E.,PEARSON,H.: Veterinary Reproduction and Obstetrics(Theriogenology). Six edition, pp.384-416,1989
10. BOWEN,R.A.,ELSDEN,R.P.,SEIDEL,G.E.: Infection of early bovine embryos with bovine herpesvirus-1. Am.J.Vet.Res.,46(5):1095-1097,1985.
11. BROWN,G.A.,FIELD,H.J.: Experimental reactivation of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) by means of corticosteroids in an intranasal rabbit model. Arch.Virol.,112:81-101,1990.

12. BUENING,G.M.,GRATZEK,J.B.: Comparison of selected characteristics of four stains of Infectious bovine rhinotracheitis virus.  
Am.J.Vet.Res.,28:1257-1267,1967.
13. BURGU,i.: Infeksiyöz bovine rhinotracheitis/infeksiyöz pustular vulvovaginitis(IBR-IPV), Koital exanthem/Infeksiyöz bovine necrotik rhinotracheitis.  
Vet.Hek.Der.Derg.50(1-2):33-40,1980.
14. BURGU,i.,AKÇA,Y.: Gelemen devlet üretme çiftliği sığırlarında bazı viral enfeksiyonlara karşı serolojik araştırmalar.  
A.Ü.Vet.Fak.Dergisi, 29(3-4):506-512,1982.
15. BURGU,i.,AKÇA,Y.: Türkiye'de suni tohumlamada kullanılan bazı damızlık boğalarda IBR/IPV enfeksiyonu.  
A.Ü.Vet.Fak.Dergisi,33(1):113-121,1986.
16. BURGU,i.,AKÇA,Y.: First isolation of IBR virus in Turkey.  
Trop.Anim.Hlth.Prod., 19:56,1987.
17. BURGU,i.,ÖZKUL,A.: Hayvan ve biyolojik madde ithalatının viral hastalıklar yönünden önemi.  
II.Hayvancılık Kongresi.323-333,1991.
18. BUSH,C.E.,PRITCHETT,R.F.: A comparison of the genomes of bovine herpesvirus type 1 and pseudorabies virus.  
J.gen.Virol.,66:1811-1817,1985.
19. CASTRUCCI,G.,FRIGERI,F.,CILLI,V.,DONELLI,G.,FERRARI,M.,CHICCHINI,U.,BORDONI,E.: A study of a herpesvirus isolated from dairy cattle with a history of reproductive disorders.  
Comp.Immun.Microbiol.Infect.Dis.,9(1):13-21,1986.
20. COLLERY,P.: Isolation of the virus Infectious bovine rhinotracheitis / Infectious pustular vulvovaginitis during an outbreak of genital disease.  
Irish.Vet.J.,28:89-92,1974.
21. COLLINGS,D.F.,GIBBS,E.P.J.,STAFFORD,L,P.: Concurrent respiratory and genital disease associated with Infectious bovine rhinotracheitis / Infectious pustular vulvovaginitis (IBR/IPV) virus in a dairy herd in the United Kingdom.  
Vet.Rec.,91:214-219,1972.
22. COLLINS,J.K.,BUTCHER,A.C.,RIEGEL,C.A.: Immuno response to bovine herpes herpesvirus type 1 infections: Virus-specific antibodies in sera from infected animals.  
J.Clin.Microbiol.,21(4):546-552,1985.

23. CORKISH, J.D., RICHARDS, P.A.: IBR infection in calves. *Vet.Rec.*, 17:603-604, 1983.
24. DEAS, D.W., JOHNSTON, W.S.: The isolation and transmission of the virus of Infectious bovine rhinotracheitis/ Infectious pustular vulvo-vaginitis. *Vet.Rec.*, 92:636-639, 1973.
25. DENNETT, D.P., ALLAN, P.J., JOHNSON, R.H.: The use of corticosteroids to aid detection of bulls carrying infectious bovine rhinotracheitis virus. *Aust.Vet.J.*, 49:594-595, 1973.
26. DINTER, Z., MOREIN, B.: Virus Infections of Ruminant. In: Straub, O.C.: Infectious bovine rhinotracheitis virus, pp.78-108, 1990.
27. DOĞAN, İ.: İneklerde erken embriyonik mortalite. *TIGEM*, 34:22-26, 1991.
28. DONERTY, P.C., SIMMONS, G.C., PAYNE, E.: Inactivation of infectious bovine rhinotracheitis virus by calcium alginate wool swabs. *Aust.Vet.J.*, 43:257-260, 1967.
29. EDWARDS, S., CHASEY, D., WHITE, H.: Experimental infectious bovine rhinotracheitis: comparison of four antigen detection methods. *Res.Vet.Sci.*, 34:42-45, 1983.
30. EDWARD, S., GITAO, G.C.: Highly sensitive antigen detection procedures for the diagnosis of infectious bovine rhinotracheitis: Amplified ELISA and reserve passive haemagglutination. *Vet.Microbiol.*, 13:135-141, 1987.
31. ELAZHARY, M.A.S.Y., LAMOTHE, P., SILIM, A., ROY, R.S.: Bovine herpesvirus type 1 in the sperm of a bull from a herd with fertility problems. *Can.Vet.J.*, 21:336-339, 1980.
32. ENGELS, M., GELDERBLUM, H., DARAI, G., LUDWIG, H.: Goat herpesviruses: Biological and physicochemical properties. *J.gen.Virol.*, 64:2237-2247, 1983.
33. ERHAN, M., ONAR, B., CSONTOS, L., HOPKINS, I.G.: Serological survey on some virus and bedsonia diseases of cattle, sheep and horse. *Pendik Vet.Kont.ve Araşt.Enst.Derg.*, 4(2):55-58, 1971.
34. FENNER, F., BACHMANN, P.A., GIBBS, E.P.J., MURPHY, F.A., STUDDERT, M.J., WHITE, D.O.: *Veterinary Virology*, pp.339-373, 1987.

35. FREY, H.R., LIESS, B.: Vermehrungskinetik und verwendbarkeit eines stark zytopatogenen VD-MD virusstammes für diagnostische untersuchungen mit der mikrotiter-methode. Zbl.Vet.med.B., 18:61-71, 1971.
36. FULTON, R.W., DOWNING, M.M., HAGSTAD, H.V.: Prevalence of bovine herpesvirus-1, bovine viral diarrhoea, parainfluenza-3, bovine adenoviruses-3 and-7, and goat respiratory syncytial viral antibodies in goats. Am.J.Vet.Res., 43(8):1454-1457, 1982.
37. GIBBS, E.P.J., RWEYEMAMU, M.M.: Bovine herpesviruses. Part I. Bovine herpesvirus 1. Vet.Bull, 47(5):317-343, 1977.
38. GIBBS, E.P.J., SMALE, C.J., VOYLE, C.A.: Electron microscopy as an aid to the rapid diagnosis of virus diseases of veterinary importance. Vet.Rec., 106:451-458, 1980.
39. GILLESPIE, J.H., SCHLAFER, D.H., FOOTE, R.H., QUICK, S., DOUGHERTY, E. SCHIFF, E., ALLEN, S.: Comparison of persistence of seven bovine viruses on bovine embryos following in vitro exposure. Dtsch.tierarztl.Wschr. 97:65-68, 1990.
40. GOURLAY, R.N., STOTT, E.J.: Isolation of Mycoplasma agalactiae var bovis and infectious bovine rhinotracheitis virus from an outbreak of mastitis in France. Vet.Rec., 7:534-535, 1974.
41. GUY, J.S., POTGIETER, L.N.D., MCCrackEN, M., MARTIN, W.: Isolation of bovine herpesvirus-1 from vesicular lesions of the bovine udder. Am.J.Vet.Res., 45(4):783-785, 1984.
42. GUY, J.S., POTRIETER, L.N.D.: Bovine herpesvirus-1 infection of cattle: Kinetics of antibody formation after intranasal exposure and abortion induced by the virus. Am.J.Vet.Res., 46(4):893-898, 1985.
43. GUY, J.S., POTRIETER, L.N.D.: Kinetics of antibody formation after the reactivation of bovine herpesvirus-1 infection of cattle. Am.J.Vet.Res., 46(4):899-901, 1985.
44. GÜRTÜRK, S., FİNCİ, E., BURGU, İ.: Yurdumuz sığırlarında enfeksiyöz rhinotracheitis (IBR) üzerinde araştırmalar. A.Ü.Vet.Fak.Dergisi, 22(1-2):34-44, 1974.
45. GÜRTÜRK, S., FİNCİ, E., BURGU, İ.: Yurdumuz sığırlarında enfeksiyöz rhinotracheitis (IBR) üzerinde araştırmalar. A.Ü.Vet.Fak.Dergisi, 22(3-4):104-111, 1975.

46. HAFEZ, S.M., CHAUDHRY, R.: Isolation and identification of infectious bovine rhinotracheitis virus in Saudi Arabia. *Arab. Gulf. J. scient. Res.*, 3(2):735-744, 1985.
47. HAFEZ, S.M., FREY, H.R.: Serological evidence for the occurrence of bovine viral diarrhoea-mucosal disease (BVD-MD) and infectious bovine rhinotracheitis (IBR) in Egypt. *Bull. epizoot. dis. of Afr.*, 21(1):6-9, 1973.
48. HEDGER, R.S., HAMBLIN, C.: Neutralizing antibodies to bovid herpes virus 1 (Infectious bovine rhinotracheitis / Infectious pustular vulvo-vaginitis) in African wildlife with special reference to the cape buffalo (*Syncerus caffer*). *J. Comp. Path.*, 88:211-218, 1978.
49. HIGGINS, R., HOQUET, F., MARSOLAIS, G., MONTPETIT, C., ELAZHARY, Y., MORIN, M., BOIS, J.M., ETHIER, R.: Diagnosis of infectious abortion in dairy cattle. *Can. J. Comp. Med.*, 45:159-166, 1981.
50. HONDA, E., KANTU, Y., FUJII, C., OKAZAKI, K., KUMAGAI, T.: A comparison of polypeptides and restriction endonuclease sites of BHV-1 isolates and identification of IPV virus in Japan. *Jpn. J. Vet. Sci.*, 51(6):1143-1149, 1989.
51. HOUSE, J.A.: Bovine herpesvirus IBR-IPV strain differences. *Cornell. Vet.*, 62:431-453-1971.
52. HUBBERT, W.T., BRYNER, J.H., FERNELIUS, A.L., FRANK, G.H., ESTES, P.C: Viral infection of bovine fetus and its environment. *Arch. ges. Virusfor.*, 41:86-98, 1973.
53. HYNE, R.H.J., JOHNSTON, K.G.: An outbreak of Infectious pustular vulvo-vaginitis in dairy cattle in New South Wales. *Aust. Vet. J.*, 40:385-386, 1964.
54. JASTY, V., CHANG, P.W.: Envelopment of Infectious bovine rhinotracheitis viral particles in bovine kidney cell cultures: An electron microscopic study. *Am. J. Vet. Res.* 32(12):1945-1953. 1971
55. KAERBER, G.: In diagnostic procedures for virus and rickettsial disease. *Public. Health. Ass. (New-York)* 3:48-50, 1964.
56. KAHR, R.F.: Infectious bovine rhinotracheitis: A review and update. *J. A. V. M. A.*, 171(10):1055-1064, 1977.

57. KAHRS, R.F., SMITH, R.S.: Infectious bovine rhinotracheitis, Infectious pustular vulvovaginitis, and abortion in a New York dairy herd.  
J.A.V.M.A., 146(3):217-220, 1965.
58. KAMINJOLO, J.S., NYAGA, P.N., OMUSE, J.K., MUTIGA, E.R.: Infectious bovine rhinotracheitis - Infectious pustular vulvovaginitis viral isolates from cattle with epididymitis and vaginitis.  
Am.J.Vet.Res., 36(1):123-125, 1975.
59. KENDRICK, J.W., GILLESPIE, J.H., McENTEE, K.: Infectious pustular vulvovaginitis of cattle.  
Cornell Vet., 48:458-495, 1958.
60. KENDRICK, J.W., SCHNEIDER, L., STRAUB, O.C.: Placental reaction to the Infectious pustular rhinotracheitis-Infectious pustular vulvovaginitis virus.  
Am.J.Vet.Res., 32(7):1045-1051, 1971.
61. KENDRICK, J.W., STRAUB, O.C.: Infectious bovine rhinotracheitis-Infectious pustular vulvovaginitis virus infection in pregnant cows.  
Am.J.Vet.Res., 28(126):1269-1282, 1967.
62. KIRKRIDE, C.A., BICKNELL, E.J., REED, D.E., ROBL, M.G., KNUDTSON, W.U., WOHLGEMUTH, K.: A diagnostic survey of bovine abortion and stillbirth in the Northern plains states.  
J.A.V.M.A., 162(7):556-560, 1973.
63. KRAUSE, H.P., ACHILLES, H., LEHMANN, M., STAMMLER, M.: A comparison of three ELISA systems for the detection of BHV-1 antibodies in serum and milk samples.  
Tierarztl.Umschau, 44:482-488, 1989.
64. KUPFERSCHMIED, H.U., KIHM, U., BACHMANN, P., MULLER, K.H., ACKERMANN, M.: Transmission of IBR/IPV virus in bovine semen: a case report.  
Theriogenology, 25:439-443, 1986.
65. LAMONTAGNE, L., DESCOTEAUX, J-P., ROY, R.: Epizootiological survey of Parainfluenza-3, Reovirus-3, Respiratory syncytial and Infectious bovine rhinotracheitis viral antibodies in sheep and goat flocks in Quebec.  
Can.J.Comp.Med., 49:424-428, 1985.
66. LEVINGS, R.L., KAEBERLE, M.L., REED, D.E.: Cross-reactions of bovine herpes virus-1 antigens with those of other cattle herpesviruses.  
Vet.Microbiol., 9:329-344, 1984.

67. LOMBA, F., BIENFET, V., WELLEMANS, G.: IBR virus and occurrence of metritis at parturition in the bovine belgian blue white breed. *Br. Vet. J.*, 132:178-181, 1976.
68. LUCAS, M. H., WESTCOTT, O. G. F., EDWARDS, S., NEWMAN, R. H., SWALLOW, C.: Immunofluorescence and cell culture techniques in the diagnosis of viral infection of aborted bovine fetuses. *Vet. Rec.*, 118:242-243, 1986.
69. MANICKAM, R., MOHAN, M.: Seroepidemiological studies on infectious bovine rhinotracheitis (IBR) viral abortion in cows *Indian J. Animal Sci.*, 57(9):959-962, 1987.
70. McFEELY, R. A., MERRITT, A. M., STEARLY, E. L.: Abortion in a dairy herd vaccinated for infectious bovine rhinotracheitis. *J. A. V. M. A.*, 153(6):657-661, 1968.
71. MENANTEAU-HORTA, A. M., AMES, T. R., JOHNSON, D. W., MEISKE, J. C.: Effect of maternal antibody upon vaccination with infectious bovine rhinotracheitis and bovine virus diarrhea vaccines. *Can. J. Comp. Med.*, 49:10-14, 1985.
72. MILLER, J. M.: The effect of IBR virus infection on reproductive function of cattle. Symposium on IBR virus. *Veterinary Medicine*, 95-98, 1991.
73. MILLER, J. M., VAN DER MAATEN, M. J.: Reproductive tract lesions in heifers after intrauterine inoculation with infectious bovine rhinotracheitis virus. *Am. J. Vet. Res.*, 45(4):790-794, 1984.
74. MILLER, J. M., VAN DER MAATEN, M. J.: Early embryonic death in heifers after inoculation with bovine herpesvirus-1 and reactivation of latent virus in reproductive tissues. *Am. J. Vet. Res.*, 48(11):1555-1558, 1987.
75. MILLER, J. M., VAN DER MAATEN, M. J., WHETSTONE, C. A.: Effect of a bovine herpesvirus-1 isolate reproductive function in heifer: Classification as a type-2 (infectious pustular vulvovaginitis) virus by restriction endonuclease analysis of viral DNA. *Am. J. Vet. Res.*, 49(10):1653-1656, 1988.
76. MILLER, J. M., VAN DER MAATEN, M. J., WHETSTONE, C. A.: Infertility in heifers inoculated with modified-live bovine herpesvirus-1 vaccinal strains against infectious bovine rhinotracheitis on postbreeding day 14. *Am. J. Vet. Res.*, 50(4):551-554, 1989.

77. MILLER, J.M., WHETSTONE, C.A., VAN DER MAATEN, M.J.: Abortifacient property of bovine herpesvirus type 1 isolates that represent three subtypes determined by restriction endonuclease analysis of viral DNA. *Am.J.Vet.Res.*, 50(3):458-461, 1991.
78. MISRA, P.K., MISHRA, A: Infectious bovine rhinotracheitis virus infection and infertility in cows, heifers and bulls. *Indian J. Animal Sci.*, 57(4):267-271, 1987.
79. MOHANTY, S.B., LILLIE, M.G., CORSELIUS, N.P., BECK, J.D.: Natural infection with infectious bovine rhinotracheitis virus in goats. *J.A.V.M.A.*, 160(6):879-880, 1972.
80. NATIRA, M., INUI, S., NAMBA, K., SHIMIZU, Y.: Trigeminal ganglionitis and encephalitis in calves intranasally inoculated with infectious bovine rhinotracheitis virus. *J.Comp.Path.*, 86:93-100, 1976.
81. NELSON, D.R., MARE, C.J., GLOCK, R.D.: Infectious bovine rhinotracheitis (*Herpesvirus bovis*) infection in swine. *Am.J.Vet.Res.*, 33(6):1209-1215, 1972.
82. NETTLETON, P.F., HERRING, J.A., HOGG, R.A., NICOLSON, T.B.: Laboratory confirmation of IBR virus induced abortion. *Vet.Rec.*, 14:243, 1981.
83. NETTLETON, P.F., SHARP, J.M.: Infectious bovine rhinotracheitis virus excretion after vaccination. *Vet.Rec.*, 107:379, 1980.
84. NIEUWSTADT, A.P.V., VERHOEFF, J.: Epidemiology of BHV-1 virus infections in dairy herds. *J.Hyg.Camb.*, 91:309-318, 1983.
85. ÖZTÜRK, F., TOKER, A., YAVRU, S.: Konya hayvancılık merkez araştırma enstitüsü sığırlarında enfeksiyöz bovine rhinotracheitis / enfeksiyöz pustular vulvovaginitis (IBR/IPV) üzerinde araştırmalar. *Selçuk Üniv.Vet.Fak.Dergisi*, 4(1):53-64, 1988.
86. PALFI, V., GLAVITS, R., HORNYAK, A.: The pathology of concurrent bovine viral diarrhoea and infectious bovine rhinotracheitis virus infection in newborn calves. *Acta Veterinaria Hungarica*, 37(1-2):89-95, 1989.
87. PARSONSON, I.M.: Infectious pustular vulvovaginitis in dairy cattle in Victoria. *Aust.Vet.J.*, 40:257-260, 1964.

88. PETERSON,R.B.,GOYAL,S.M.: Propagation and quantitation of animal herpesviruses in eight cell cultures systems. *Comp.Immun.Microbiol.Infet.Dis.*,11(2):93-98,1988.
89. POSPISIL,Z.,ROZKOSNY,V.,MENSIK,J.: Diagnosis of infectious bovine rhinotracheitis by immunofluorescence. *Acta Vet.Brno.*,41:281-286,1972.
90. REBHUM,W.C.,SMITH,J.S.,POST,J.E.,HOLDEN,H.R.: An outbreak of the conjunctival form of infectious bovine rhinotracheitis. *Cornell Vet.*,68:297-307,1978.
91. REED,D.E.,BICKNELL,E.J.,LARSON,C.A.,KNUDTSON,W.U.,KIRDBRIDE,C.A.: Infectious bovine rhinotracheitis virus-induced abortion: Rapid diagnosis by fluorescent antibody technique. *Am.J.Vet.Res.*,32(9):1423-1426,1971.
92. RICHMAN,D.D.,CLEVELAND,P.H.,REDFIELD,D.C.,OXMAN,M.N.,WAHL,G.M.: Rapid viral diagnosis. *The Journal of Infectious Diseases*,149(3):298-310,1984.
93. RIEGEL,C.A.,AYERS,V.K.,COLLINS,J.K.: Rapid, sensitive, competitive serologic Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for detecting serum antibodies to bovine herpesvirus type-1. *J.Clin.Microbiol.*,25:2418-2421,1987.
94. RODRIGUEZ,L.L.,FERNANDEZ,S.: Isolation of bovine herpesvirus 1 associated with cases of vulvovaginitis, conjunctivitis and rhinitis in dairy cattle herds in Costa Rica. *Ciencias Veterinarias*,9(2-3):105-110,1987.
95. RODRIGUEZ,M.,HEINLEIN,A.S.,RUIZ,M.,METZLER,A.E.,SCHUDEL,A.A.: Detection of bovine herpesvirus type 1 via an immunoperoxidase method, using monoclonal antibodies. *Am.J.Vet.Res.*,50(5):619-621,1989.
96. RODRIGUEZ,L.L.,HOMAN,E.J.,EASTERDAY,B.C.: Characterization of bovine herpesvirus-1 isolated from trigeminal ganglia of clinically healthy cattle. *Am.J.Vet.Res.*45(6):1069-1072,1984.
97. ROIZMAN,B.,BAINES,J.: The diversity and unity of herpesviridae. *Comp.Immun.Microbiol.Infect.Dis.*,14(2):63-79,1991.
98. ROSNER,S.F.: Infectious bovine rhinotracheitis:clinical review, immunity, and control. *J.A.V.M.A.*,153(12):1631-1638,1968.

99. SAXEGAARD, F.: Problems connected with the diagnosis of subclinical infection with infectious pustular vulvovaginitis virus (IPV virus) in bulls. Nord.Vet.Med., 18:452-459, 1966.
100. SAXEGAARD, F.: Infectious bovine rhinotracheitis/ Infectious pustular vulvovaginitis (IBR/IPV) virus infection of cattle with particular reference to genital infections. Vet.Bull, 40(8):605-611, 1970.
101. SCHUH, J., WALKER, S.: Outbreak of neonatal infectious bovine rhinotracheitis. Can.Vet.J., 31:592, 1990.
102. SHEFFY, B.E., RODMAN, S.: Activation of latent infectious bovine rhinotracheitis infection. J.A.V.M.A., 163:850-851, 1973.
103. SHIMIZU, Y., NAKONO, K., INUI, S., MURASE, N.: Isolation of a strain of Infectious bovine rhinotracheitis virus from aborted fetuses. Nat.Inst.Anim.Hlth.Quart., 12:110-111, 1972.
104. SINGH, B.K., KANT, R., TONGAONKAR, S.S.: Serological survey of infectious bovine rhinotracheitis (IBR) in dairy cattle. Indian J.Animal Sci., 55(10):843-846, 1985.
105. SINGH, B.K., SREENIVASAN, M.A., TONAGAONKAR, S.S., KANT, R., CHOUDHURY, P.N.R.: Isolation of infectious bovine rhinotracheitis virus from semen and aborted materials of dairy cattle. Indian J.Animal Sci., 56(8):823-826, 1986.
106. SMITH, P.C., NUSBAUM, K.E., KWAPIEN, R.P., STRINGFELLOW, D.A., DRIGGERS, K.: Necrotic oophoritis in heifers vaccinated intravenously with infectious bovine rhinotracheitis virus vaccine during estrus. Am.J.Vet.Res., 51(7):969-972, 1990.
107. SPRADBROW, P.B.: The isolation of Infectious bovine rhinotracheitis virus from bovine semen. Aust.Vet.J., 44:410-412, 1968.
108. STUBBINGS, D.P., CAMERON, I.R.D.: Bovine abortion associated with infectious bovine rhinotracheitis virus infection. Vet.Rec., 108:101-102, 1981.
109. STUDDERT, M.J.: A brief review of studies of bovine and equine herpesviruses. Aust.Vet.J., 66(12):401-402, 1989.

110. SUZAN, V.M., ONUMA, M., AGUILAR, R.E., MURAKAMI, Y.: Prevalence of bovine herpesvirus-1, parainfluenza-3, bovine rotavirus, bovine viral diarrhoea, bovine adenovirus-7, bovine leukemia virus bluetongue virus antibodies cattle in Mexico.  
*Jpn.J.Vet.Res.*, 31:125-132, 1983.
111. TANYI, J., BAJMOCY, E., FAZEKAS, B., KASZANYITZKY, E.J.: Mass abortion caused by infectious rhinotracheitis (IBR/IPV) virus in a beef cattle herd.  
*Acta Veterinaria Hungarica*, 31(4):135-143, 1983.
112. TAYLOR, R.E., SEAL, B.S., JEOR, S.S.: Isolation of infectious bovine rhinotracheitis virus from the soft-shelled tick, *Ornithodoros coriaceus*.  
*Science*, 216(16):300-301, 1982.
113. THEODORIDIS, A.: Preliminary characterization of viruses isolated from cases of epididymitis and vaginitis in cattle.  
*Onderstepoort, J.vet.Res.*, 45:187-195, 1978.
114. THEODORIDIS, A.: Studies on bovine herpesviruses. Part 1. Isolation and characterization of viruses isolated from the genital tract of cattle.  
*Onderstepoort J.Vet.res.*, 52:239-254, 1985.
115. WAFULA, J.S., MUSHI, E.Z., WAMWAYI, H.: Reaction of goats to infection with infectious bovine rhinotracheitis virus.  
*Res.Vet.Sci.*, 39:84-86, 1985.
116. WITTE, K.H., HANNEMANN, P., DOPATKA, H.D., GIESENDORF, B.: Technical improvement of a commercial ELISA to detect antibodies against bovine herpesvirus 1.  
*Med.Microbiol.Immunol.*, 178:9-20, 1989.
117. WOELFFER, E.A.: Diagnosis of bovine abortion.  
*J.A.V.M.A.*, 161(11):1284-1287, 1972.
118. WOERNLE, H., BRUNNER, A.: Serological studies in cattle herds suffering respiratory diseases, diarrhoea, infertility, abortion and neonatal mortality to investigate the role of virus infections.  
*Tierarztl. Umschau*, 37:100-109, 1982.
119. VAN DONKERSGOED, J., BABIUK, L.A.: Diagnosing and managing the respiratory form of infectious bovine rhinotracheitis. Symposium on IBR virus.  
*Veterinary Medicine*, 86-94, 1991.
120. VENGRIS, V.E., MARE, C.J.: A micro-passive haemagglutination test for the rapid detection of antibodies to infectious bovine rhinotracheitis virus.  
*Can.J.Comp.Med.*, 35:289-293, 1971.

121. ZYAMBO, G.C.N., ALLAN, P.J., DENNETT, D.P., JOHNSON, R.H.: A passive haemagglutination test for the demonstration of antibody to infectious bovine rhinotracheitis / infectious pustular vulvovaginitis virus. Aust.Vet.J., 49:413-417, 1973.



## 9. TEŞEKKÜR

Bana bu konuda çalışma fırsatı veren Sayın hocam Prof.Dr. İbrahim BURGU'ya, çalışmalarım sırasında yardımlarını gördüğüm tez yöneticim Doç.Dr. Yılmaz AKÇA'ya ve Viroloji Bilim Dalı'nın tüm öğretim elemanları ve çalışanlarına, bu araştırmayı proje olarak kabul eden ve maddi açıdan destekleyen Ankara Üniversitesi Araştırma Fonu Müdürlüğü'ne, ayrıca A.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü'ne teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

## 10. ÖZGEÇMİŞ

1963 yılında Gaziantep'te doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi aynı ilde tamamladım. 1981 yılında kazandığım Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nden 6.6.1986 tarihinde mezun oldum. Aynı yıl Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'na Araştırma Görevlisi olarak girdim. Daha sonra 2547 sayılı Yüksek Öğretim kanunu " Bir Üniversite adına başka bir Üniversitede doktora eğitimi yönetmeliğinin 4. maddesi " gereğince A.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü doktora programına başladım. Halen A.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü kadrosunda, A.Ü. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Viroloji Bilim Dalı'nda doktora eğitimime devam etmekteyim.