



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**BOLU İLİ VE ÇEVRESİNDE KEÇİLERDE ALPHAHERPESVİRUS
[BovineHerpesvirustip 1(BoHV-1) ve CaprineHerpesvirus tip 1
(CpHV-1)] ENFEKSİYONLARININ SEROLOJİK OLARAK
ARAŞTIRILMASI**

MERVE ÖZGÜR

**VİROLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Seval BİLGE DAĞALP**

2013-ANKARA

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	v
Simgeler ve Kısaltmalar	vi
Şekiller	vii
Çizelgeler	viii
1. GİRİŞ	1
1.1. Etiyoloji	2
1.2. Epidemiyoloji	8
1.3. Patogenez ve Patoloji	11
1.4. Klinik Semptomlar	16
1.5. Teşhis	19
1.5.1. Virolojik Teşhis	19
1.5.2. Serolojik Teşhis	21
1.6. İmmunoloji	23
1.7. Mücadele ve Kontrol	24
1.8. Tezin Amacı	26
2. GEREÇ VE YÖNTEM	28
2.1. Örneklenen İşletmeler	28
2.2. Hücre	30
2.3. Viruslar	30
2.4. Kan Serum Örneklerinin Hazırlanması	30
2.5. Virusların Üretilmesi	30
2.6. Virusların Titrasyonu	31
2.7. ELISA	31
2.8. Mikronötralizasyon Testi	34

2.9. Pozitif Serumların SN ₅₀ Değerlerinin Belirlenmesi	34
2.10. İstatistiksel Analiz	35
3. BULGULAR	37
3.1. Virusların Üretilmesi	37
3.2. Virusların Titrasyon Sonuçları	39
3.3. ELISA Sonuçları	39
3.4. Mikronötralizasyon Testi Sonuçları	41
3.5. ELISA ve Mikronötralizasyon Testi Sonuçlarının Birlikte Değerlendirilmesi	43
3.6. İstatistiksel Analiz	48
4. TARTIŞMA	51
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	59
ÖZET	61
SUMMARY	62
KAYNAKLAR	63
EK-1 Etik kurul kararı	71
ÖZGEÇMİŞ	72

ÖNSÖZ

Türkiye’de keçilerde alphaherpesvirus enfeksiyonlarının (CpHV-1 ve BoHV-1) varlığı daha önceden yapılan çalışmalarla bildirilmiştir. Yapılan çalışmalarda keçilerde her iki etkene karşı antikor varlığı Virus Nötralizasyon Testleri (VNT) ile araştırılmıştır. Ancak son yıllarda yapılan çalışmalarda BoHV-1 ile ilişkili ruminant alphaherpesvirusların antijenik yakınlığından dolayı kros reaksiyon verebildikleri bilgisinden dolayı, belirlenen seropozitiflik oranlarında BoHV-1 ve/veya CpHV-1 etkinliğinin ne oranda olduğu bilinmemektedir. Bu nedenle her iki enfeksiyonun keçilerde varlığının/yaygınlığının araştırılmasına ve oluşturdıkları klinik bulgulara bağlı olarak ekonomik anlamda etkilerinin belirlenmesine ihtiyaç vardır.

Bu amaçla planlanan bu çalışmada, Bolu ve çevresinde yetiştirilen sütçü Saanen keçilerinde CpHV-1 ve BoHV-1 enfeksiyonunun varlığının/yaygınlığının BoHV-1 gB ve gE blocking ELISA kombinasyonu ve her iki virus için ayrı ayrı uygulanacak nötralizasyon testleri ile belirlenmesi amaçlanmıştır.

Yüksek lisans eğitimim ve bu çalışma boyunca benden ilgi, bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen, kendisinden çok şey öğrendiğim Danışman Hocam Prof. Dr. Seval BİLGE DAĞALP’e, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı’nın tüm olanaklarından faydalanmamı sağlayan Prof. Dr. İbrahim BURGU ve Viroloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Yılmaz AKÇA’ya, yardım ve desteklerini esirgemeyen, Viroloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Feray ALKAN, Prof. Dr. Aykut ÖZKUL, Doç. Dr. M. Taner KARAOĞLU ve Doç. Dr. T. Çiğdem OĞUZÖĞLU’na, eğitimim sırasında birlikte çalıştığım tüm araştırma görevlisi ve doktora öğrencisi arkadaşlarıma, çalışmamın laboratuvar aşamasında benden desteklerini esirgemeyen Araş. Gör. Fırat DOĞAN ve Araş. Gör. Ayşegül KUDU’ya, bu çalışma için materyal sağlamakta yardımcı olan Bolu Kalite Yem San. A.Ş. ve Canlı Üretim Müdürü Vet. Hek. Orhan BULUT’a, saha çalışmalarımda bana yön gösteren ve yardımını esirgemeyen Vet.Hek. Mehmet OK’a, tez çalışmam süresince gösterdikleri anlayış ve destek için Bolu Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürü Neşet AKÇAY’a, birim sorumlum Vet. Hek. A. Atalay YILDIZ’a ve tüm çalışma arkadaşlarıma, sabrını ve yardımını hiçbir zaman esirgemeyen meslektaşım Ahmet BAYDIN’a, hayatım boyunca bana verdikleri maddi ve manevi destek ve sınırsız sevgileri için aileme en içten teşekkürlerimi sunarım.

SİMGELER VE KISALTMALAR

BoHV-1: Bovine herpesvirus tip 1
BoHV-5: Bovine herpesvirus tip 5
BuHV-1: Bubaline herpesvirus tip 1
BRD: Bovine Respiratory Disease
CerHV-1: Cervine herpesvirus tip 1
CPE: Cytopathic effect
CpHV-1: Caprine herpesvirus-1
DKID₅₀: Doku kültürü enfektif doz 50
DNA: Deoxiribonucleic acid
ELISA: Enzyme linked immunosorbent assay
gB: Glikoprotein B
gE: Glikoprotein E
HSV-2: Herpes simplexvirus tip 2
IFT: Immunfloresan teknikleri
IBR: Enfeksiyöz bovine rhinotracheitis
IPB: Enfeksiyöz pustular balanopostitis
IPV: Enfeksiyöz pustular vulvovaginitis
Kb: Kilobaz
MDBK: Madine Darby Bovine Kidney
ml: Mililitre
µl: Mikrolitre
Nm: Nanometre
SN₅₀: Serum Nötralizasyon 50
VNT: Virus Nötralizasyon Testi

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. : Herpesvirus morfolojisi

Şekil 1.2. : Herpes virusların replikasyon siklusu

Şekil 1.3. : BoHV-1'in genomik yapısı

Şekil 1.4. : BoHV-1 ve CpHV-1'in gB ve gE gen bölgeleri düzeyinde yakınlıkları

Şekil 1.5. : İntranükleer inklüzyon cisimcikleri

Şekil 1.6. : CpHV-1 ile enfekte bir keçi fötüsünün renal korteksinde fokal nekroz

Şekil 1.7. : CpHV-1 ile enfekte bir keçi sürüsünden bir erkeğe ait ülseratif postitis

Şekil 1.8. : CpHV-1'in neden olduğu vulvovaginitis

Şekil 2.1. : Örneklemeye yapılan köyler

Şekil 3.1. : MDBK hücre kültürü (hücre kontrol) (x800)

Şekil 3.2. : CpHV-1'in BA-1 suşu ile enfekte MDBK hücre kültüründe 18-24. saatte oluşan CPE (x800)

Şekil 3.3. : BoHV-1'in Cooper suşu ile enfekte MDBK hücre kültüründe 18-24. saatte oluşan CPE (x800)

Şekil 3.4. : CpHV-1 ve BoHV-1 antikor titre değerlerinin sayısal dağılımı

Şekil 3.5. : VNT/ELISA sonuçlarına göre CpHV-1 ve BoHV-1 antikor pozitif işletmelerin bulunduğu köyleri gösteren haritalar

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. : Hayvanlarda tespit edilen herpesviruslar ve neden oldukları klinik bulgular

Çizelge 1.2. : BoHV-1 ile ilişkili ruminant alphaherpesvirusları

Çizelge 2.1. : İşletmelere göre örneklenen hayvanlara ait bilgiler

Çizelge 3.1. : İşletmelere göre ELISA sonuçlarının değerlendirilmesi

Çizelge 3.2. : İşletmelere göre CpHV-1 ve BoHV-1 SN₅₀ dağılımları ve ortalamaları

Çizelge 3.3. : Mikronötralizasyon testi sonuçlarının CpHV-1/BoHV-1 yönünden karşılaştırılması

Çizelge 3.4. : İşletmelere göre ELISA ve VNT sonuçlarının CpHV-1 ve BoHV-1 yönünden birlikte değerlendirilmesi

Çizelge 3.5. : ELISA ve VNT sonuçlarının CpHV-1/BoHV-1 yönünden birlikte değerlendirilmesi

Çizelge 3.6. : BoHV-1 yönünden ELISA (+) örneklerin CpHV-1 antikorları ile birlikte değerlendirilmesi

Çizelge 3.7. : BoHV-1 VNT (+) örneklerin CpHV-1 VNT ve gB/gE ELISA sonuçları ile birlikte değerlendirilmesi

Çizelge 3.8. : CpHV-1 VNT sonucu pozitif ve negatif çıkan grupları ayırt etmede alternatif yöntem olarak gB/gE ELISA'nın duyarlılık, seçicilik, pozitif ve negatif tahmini değerleri ve doğruluk oranları

Çizelge 3.9. : BoHV-1 VNT sonucu pozitif ve negatif çıkan grupları ayırt etmede alternatif yöntem olarak gB/gE ELISA'nın duyarlılık, seçicilik, pozitif ve negatif tahmini değerleri ve doğruluk oranları

1. GİRİŞ

Herpesviridae ailesinin üyeleri olağanüstü evrimsel gelişme gösterebilen DNA viruslarıdır. Herpesvirus ismi, Yunanca herpein ‘‘sürünme, sessizce gitme’’ anlamına gelmektedir. Bu aile böcek, sürüngen, amfibya, yumuşakça, kuş ve memelilerden izole edilmiş ikiyüze yakın virusu içermektedir (Murphy ve ark., 1999; Thiry ve ark., 2006a).

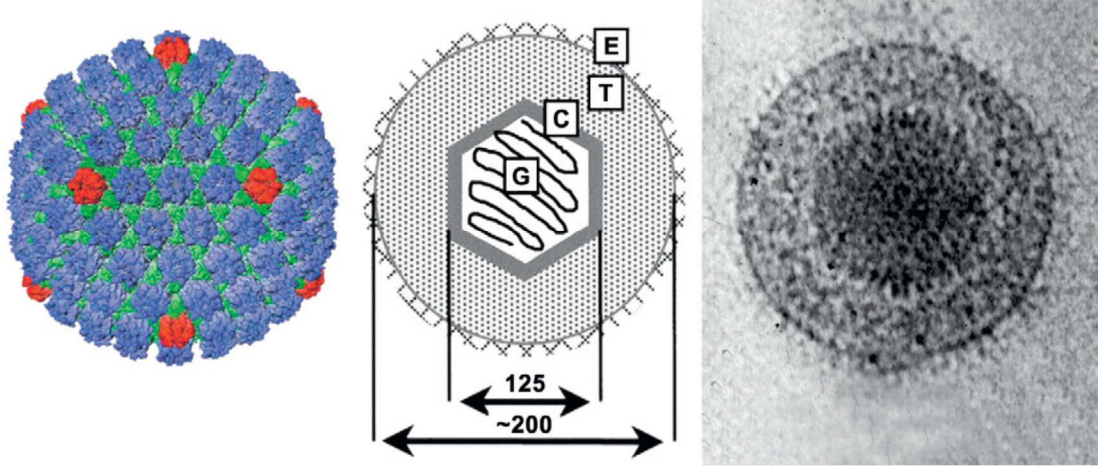
Herpesviridae ailesi, Alpha-, Beta- ve Gammaherpesvirinae olarak üç alt aileden oluşmaktadır. Alphaherpesvirinae alt ailesi de *Simplexvirus*, *Varicellovirus*, *Mardivirus* ve *Iltovirus* olarak üç genusa ayrılır (Knipe ve ark., 2007; Thiry ve ark., 2006a). Bu alt aileye ait viruslar geniş bir konak aralığına ve kısa replikasyon siklusuna sahiptirler. Enfekte hücreleri lize ederek çoğalan alphaherpesviruslar, oluşan immün yanıtı rağmen primer enfeksiyonun ardından sensorik ganglionların nükleusunda latent olarak kalarak, enfekte hayvanın yaşamı boyunca reaktif olup, saçılabilirler (Knipe ve ark., 2007; Murphy ve ark., 1999; Thiry ve ark., 2006a).

Birçok ülkede sığırlarda yaygın olarak enfeksiyon oluşturan alphaherpesviruslardan biri olan Bovine herpesvirus tip 1 (BoHV-1), üç ana sendromla ilişkilidir: Bunlar; enfeksiyöz bovine rhinotracheitis (IBR), enfeksiyöz pustuler vulvovaginitis (IPV) ve enfeksiyöz pustular balanopostitistir (IPB). BoHV-1 ile ilişkili pek çok ruminant alphaherpesvirusları izole ve karakterize edilmiştir. Bunlardan biri olan Caprine herpesvirus tip 1 (CpHV-1), yenidoğan keçi yavrularında sistemik hastalık ve ergin keçilerde abortlara neden olan genital sistem hastalığıyla seyretmektedir (Saito ve ark., 1974; Thiry ve ark., 2006). CpHV-1’in moleküler yapı, vajina epitel dokuya tropizm, genital lezyonların tipleri ve sakral ganglionda latent olarak kalma gibi pek çok biyolojik özelliği Herpes Simplexvirus tip 2 (HSV-2) ve BoHV-1 ile benzerdir (Camero ve ark., 2010; Engels ve ark., 1987).

Bazı araştırmacılar (Berrios ve ark., 1975; Martin ve ark., 1990) BoHV-1 ve CpHV-1'in ortak antijen paylaşımlarına rağmen, immunolojik olarak farklı olduklarını bildirirken, son yıllarda yapılan çalışmalarda BoHV-1 ile ilişkili ruminant alphaherpesvirusların antijenik yakınlıklarından dolayı çapraz reaksiyon verebildikleri ve bu viruslar arasında serolojik olarak ayırım yapılamamasının tanı ve kontrol-eradikasyon programlarında büyük problem olduğu ortaya konulmuştur (Lyaku ve ark., 1992; Nixon ve ark., 1988; Thiry ve ark., 2006a).

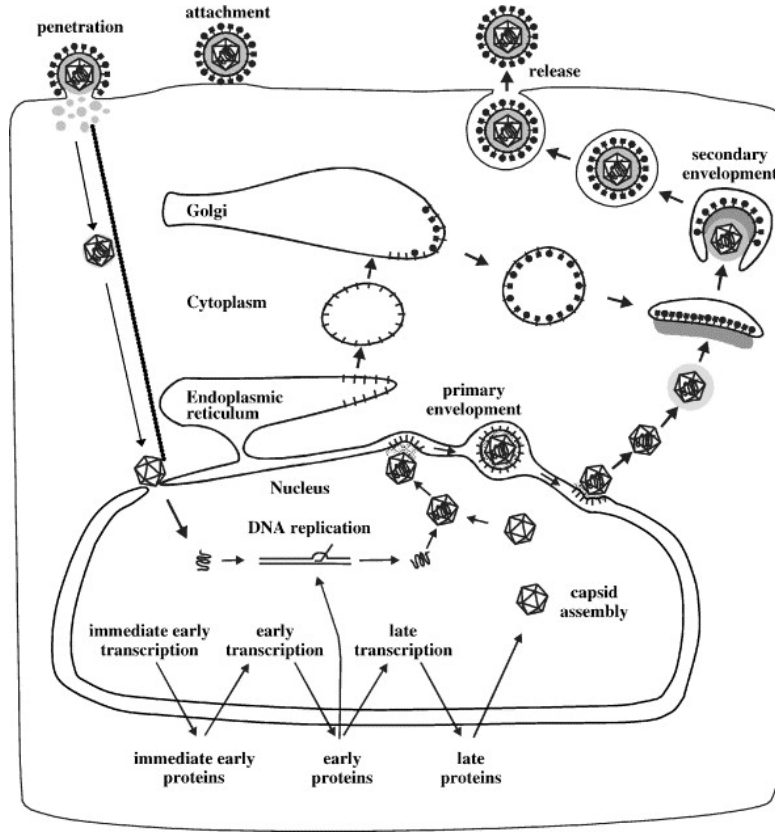
1.1. Etiyoloji

Herpesvirus virionları zarflı ve yaklaşık 150 nm çapındadırlar. İkozahedral simetrik nükleokapsid 100 nm çapında olup, 150 hekzamer ve 12 pentamer olmak üzere 162 kapsomerden oluşur (Nandi ve ark., 2009; Thiry ve ark., 2006a; Tikoo ve ark., 1995). Kapsomerler, 3.5 nm çapında, 10-12 nm uzunluğunda ve 11.5 nm genişliğinde, hekzagonal bir yapıya sahiptirler (Gibbs ve Rweyemamu, 1977). Virus, çift iplikçikli, linear yapıda ve 125-235 kilobase (kb) molekül ağırlığına sahip DNA içerir (Murphy ve ark., 1999; Nandi ve ark., 2009). Nükleokapsid ve zarf arasında "tegument" adı verilen bir protein tabaka bulunmaktadır. Virusun dışında bulunan zarf, büyük oranda virusun glikoproteinleri (g) olan gB, gC ve gD ile normal immünglobulin (Ig) G'leri bağlayan Fc reseptör aktivitesine sahip peplomerleri taşır (Şekil 1.1) (Thiry ve ark., 2006a; Tikoo ve ark., 1995; Nandi ve ark., 2009).



Şekil 1.1. Herpesvirus morfolojisi. (sol) Human herpesvirus 1 (HHV-1) kapsitinin kriyo-elektron mikroskop görüntüsü. Hekzamerler mavi, pentamerler kırmızıdır. (orta) Virionun şematik görünümü ve çapların nm cinsinden ölçüsü. (G) Genom, (C) kapsid, (T) tegument, (E) zarf. (sağ) HHV-1 virionunun kriyo-elektron mikroskobu görüntüsü (Fauquet ve ark., 2005).

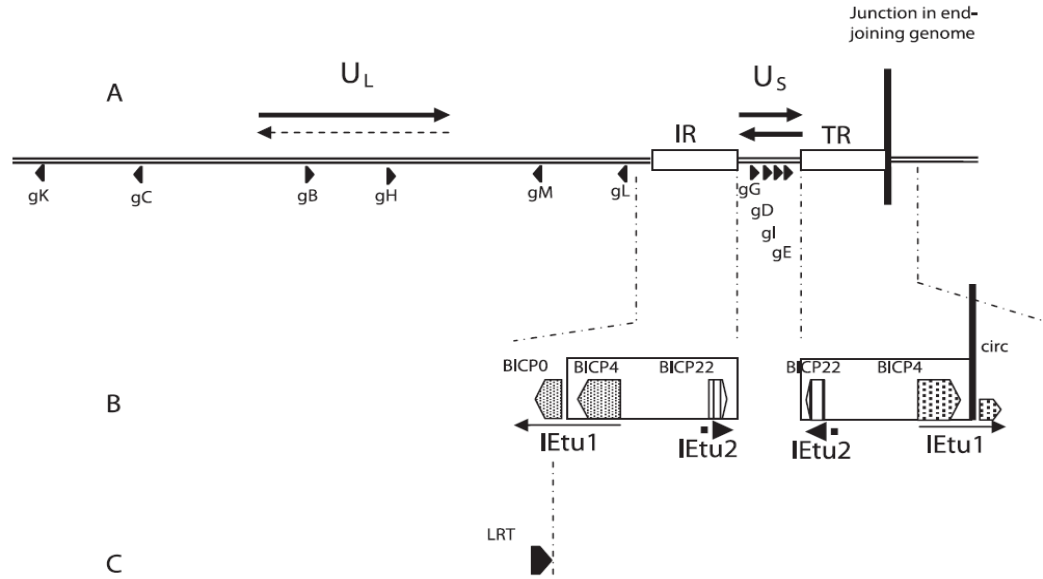
Virus konakçı hücre çekirdeğinde replike olmaktadır. Herpesvirus replikasyonu yaygın olarak, bir alphaherpesvirus olan HSV-1 model alınarak çalışılmaktadır. Beta ve gammaherpesviruslar da hemen hemen buna benzer bir yol izleseler de, daha yavaş replike olurlar. Virusun glikoprotein peplomerlerinin konak hücre reseptörlerine bağlanmasıyla nükleokapsid hücreye girmektedir. Örneğin, Porcine herpesvirus tip 1'in çeşitli hücre tiplerindeki reseptörü heparan sülfat proteoglikandır. Hücreye giriş ise virion zarfının hücre membranına füzyonu ya da endofagositoz yoluyla gerçekleşir. Nükleokapsit stoplazmaya girdikten sonra nükleer membranla birleşir ve DNA nükleer membrandaki porlardan içeri girerek replikasyon bölgesi olan çekirdeğe ulaşır, konak hücre makromolekül sentezini durdurur. Viral DNA replikasyonu çekirdekte gerçekleşir. Herpesviruslarda, nükleokapsit çekirdek içinde bir araya gelir ve tomurcuklanma ile stoplazmaya çıkarken nükleer membrandan da bir kısım alınır. Virus partikülleri golgi aparatına gelir ve burada glikoproteinler oluştuktan sonra ekzositoz ile veya hücrelerin lize olması ile dışarı çıkabilirler (Şekil 1.2). Virus zarfının yüzeyinde lokalize olan peplomerler virus tarafından kodlanır. Yapılarının protein, glikoprotein olması nedeniyle de antijeniktirler ve vücutta antikor sentezini uyarırlar (Murphy ve ark., 1999).



Şekil 1.2. Herpesvirusların replikasyon siklusu. Virusun hücreye girişi, tegumentin ayrılması, içeri giren kapsitlerin nükleer pora taşınması, viral DNA'nın çekirdekte serbest kalması diagramda gösterilmiştir. Sonraki basamaklarda kapsitin birleşmesi ve DNA'nın paketlenmesi gösterilmiştir (Mettenleiter, 2002).

Herpesvirusların viral glikoproteinleri, virus–konak hücre etkileşiminde önemli rol oynamaktadırlar. Viral siklusun tutunma, penetrasyon, olgunlaşma ve dışarı dökülme gibi pek çok basamağıyla ilgilidirler. Bu nedenle konak immün yanıtı için önemli bir hedef oluşturmaktadırlar. Bazı glikoproteinler, aşı veya diagnostik testlerin bir komponenti olarak kullanılabilecek immünolojik özelliklere sahiptirler (Thiry ve ark., 2006a). Yapılan çalışmalarda, BoHV-1 virionunun, 10 tanesi zarfda bulunan glikoproteinler olmak üzere kapsit ve tegumentte bulunan yapısal ve yapısal olmayan yaklaşık 70 adet protein içerdiği tespit edilmiştir. Bunlardan özellikle zarfta bulunan glikoproteinler, (gB, gC, gD, gE, gI, gH, gL, gG, gK, gM) immün sistemin aktivasyonu, konak hücreye adsorbsiyon ve penetrasyon, hücreden hücreye yayılma gibi fonksiyonlara sahiptirler. Bunların dışında bazı enzimler (ribonükleotid redüktaz, DNA polimeraz, dUTPase gibi) ve bir grup düzenleyici protein de (BICP0, 4, 22 ve 27, α TIF) bulunmaktadır (Schwyzer ve Ackermann, 1996). BoHV-1'in

glikoproteinlerinin çoğu karakterize edilmiştir (Thiry ve ark., 2006a; Tikoo ve ark., 1995). Unique long (U_L) segmenti gB (U_L27), gC (U_L44), gH (U_L22), gL (U_L1), gK (U_L53) ve gM (U_L10) glikoproteinlerini kodlayan genleri içerirken, Unique short (U_S) segmenti gG (U_S4), gD (U_S6), gI (U_S6) ve gE (U_S8) ile ilgili dört geni içerir (Thiry ve ark., 2006a; Schwyzer ve Ackermann, 1996).

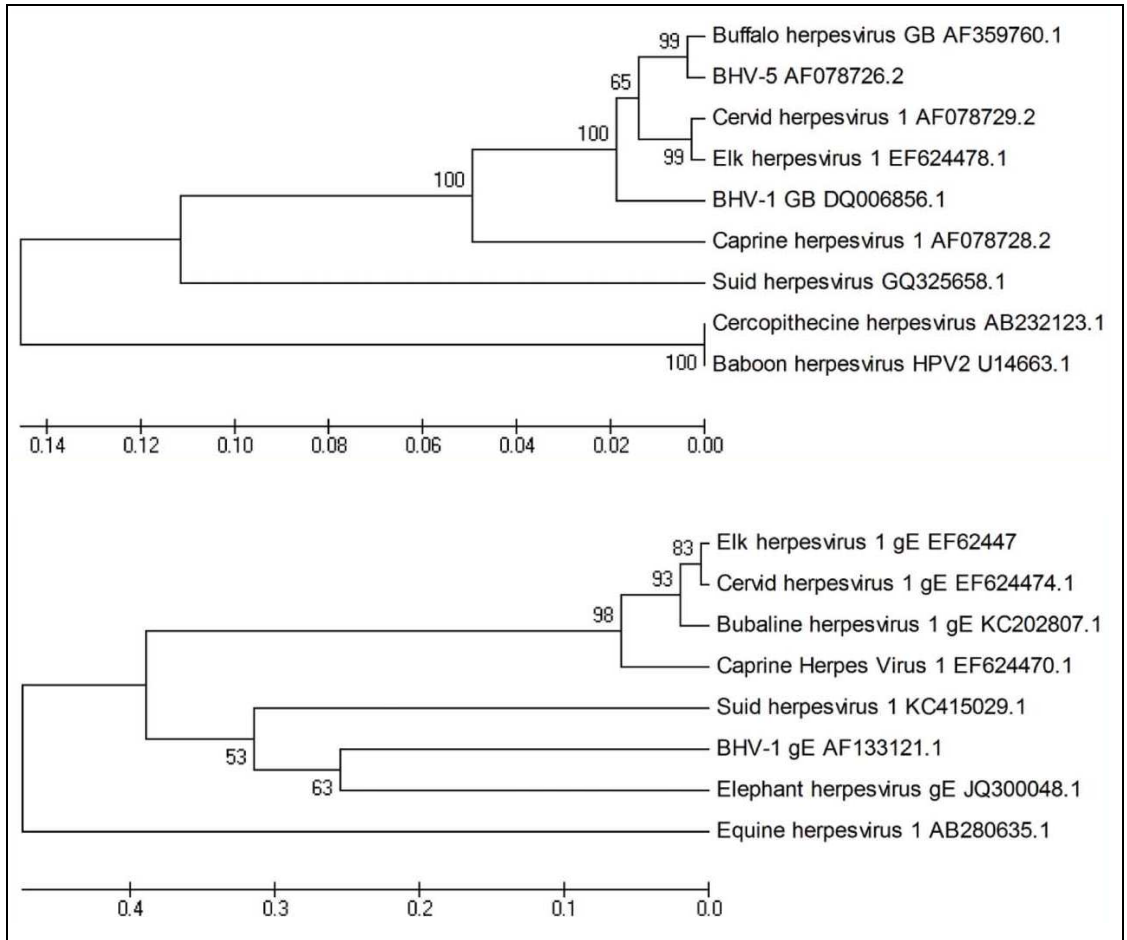


Şekil 1.3. BoHV-1'in genomik yapısı. (A) İki segment içeren BoHV-1 genomunun organizasyonu, unique long (U_L) ve unique short (U_S). Unique shortun iki tarafında internal repeat (IR) ve terminal repeat (TR) bulunur (Muylkens ve ark., 2007).

Virusun gC, gI, gE, gG ve gM proteinleri esansiyel olmayan glikoproteinlerdir (Baranowski ve ark., 1996; König ve ark., 2002). Glikoprotein B, gD ve gH ile birlikte gL ve gK özellikle virusun hücreye girişi için esansiyel olan proteinlerdir (Mettenleiter, 2003). Glikoprotein B, gD ve gH glikoproteinlerini kodlayan genlerin çıkarılması durumunda invitro replikasyon kapasitesi düşmektedir (Fehler ve ark., 1992; Meyer ve ark., 1998). BoHV-1 gB, virusun konakçı hücreye girişinde önemli rol oynayan esansiyel bir protein olmasının yanı sıra, konakçıda koruyucu immunitiyi uyaran dominant bir antijenik determinant bölgedir (Ros ve Belak, 1999). Glikoprotein B antikorları yoğun olarak serolojik tanı testlerinde hedeflenir. Alphaherpesviruslarda değişebilen uzunluklarına rağmen gB homologları tüm

protein motiflerinde dikkate değer bir konservasyon gösterirler (Ros ve Belak, 2002; Thiry ve ark., 2007). Bu durum da ruminantlarda hastalığa neden olan alphaherpesviruslarda (CpHV-1, BuHV-1, BoHV-5, BoHV-1, CerHV-1 ve RanHV-1) gB bölgesinin fonksiyonunun aynı olduğunu ortaya koyar (Ros ve Belak, 2002). BoHV-1 gB bölgesinin CpHV-1 ile ortak çok sayıda epitop içerdiği belirlenmiştir (Thiry ve ark., 2008).

Us8 geninin kodladığı gE'nin yapılan dizin analizlerinde ruminant alphaherpesviruslarda en fazla değişkenlik gösteren bölge olduğu ortaya konulmuştur (Thiry ve ark., 2007). BoHV-1 gE alphaherpesviruslarda işlevsel olarak korunmuş bir bölge olup (Knapp ve Enquist, 1997), hücreden hücreye yayılımda ve virulenste başlıca rol oynamaktadır (Rebordosa ve ark.,1996). Aynı zamanda enfekte hayvanlardaki morbidite ve mortalite oranlarını da yükseltmektedir (Yang ve ark., 1999).



Şekil 1.4. BoHV-1 ve CpHV-1'in gB ve gE gen bölgeleri düzeyinde yakınlıkları (Biswas ve ark., 2013).

BoHV-1'in klasik serolojik testlerde belirlenen antijenik olarak bir serotipi vardır (Edwards ve ark., 1990; 1991). Ancak DNA restriksiyon enzim analizi ile 3 alt tipe ayrılmıştır. Virusun respiratorik izolatları 1.1, genital izolatları 1.2, encephalitise neden olanlar ise 1.3 olarak tiplendirilmiştir (Engels ve ark., 1981; Muylkens ve ark., 2007). Alt tip 2 BoHV-1.2a ve BoHV-1.2b olarak, alt tip 3 ise daha sonra Bovine herpesvirus 5 (bovine encephalitic herpesvirus) olarak tanımlanmıştır (Edwards ve ark., 1990; 1991).

BoHV-1 ve CpHV-1'in fiziksel ve kimyasal özellikleri diğer herpesviruslara benzerdir (Berrios ve ark., 1975). CpHV-1'in DNA yapısının, biyolojik ve biyokimyasal özellikler yönünden BoHV-1 ile çok benzer olduğu ortaya konmuştur (Engels ve ark., 1983; 1987).

Herpesviruslar, -65°C'den düşük ısı derecelerinde stabildir; -60°C'de 9 ay, -20°C'de 2 ay, 4°C'de 1 ay süre ile enfektif kalabilirler (Fenner ve ark., 1993). 60°C'de 15 dakika (Fenner ve ark., 1993), 56°C'de 21 dakika, 37°C'de 10 gün, 22°C'de 50 günde inaktive olurlar (Gibbs ve Rweyemamu, 1977). Zarflı oldukları için eter, kloroform gibi organik solventlere karşı duyarlıdırlar. Birçok dezenfektana karşı da duyarlı olan herpesvirusların inaktivasyonu için %5'lik sodyum hidroksit, %1'lik amonyum, %10'luk Lugol iodini, %5'lik formol yaygın olarak kullanılmaktadır. Herpesviruslar, pH 6.0-9.0'da stabil, pH 4.5-5.0'de labildirler (Gibbs ve Rweyemamu, 1977).

Çizelge 1.1. Hayvanlarda tespit edilen herpesviruslar ve neden oldukları klinik bulgular (Murphy ve ark., 1999).

Virus	Hastalık
Alphaherpesvirinae Alt familyası	
Bovine herpesvirus 1	Enfeksiyöz bovine rhinotracheitis (IBR), Enfeksiyöz pustuler vulvovajinitis (IPV), Enfeksiyöz pustuler balanopostitis(IPB), abort
Bovine herpesvirus 2	Bovine mammillitis, pseudo-lumpyskin hastalığı
Bovine herpesvirus 5	Encephalitis
Caprine herpesvirus 1	Konjunktivitis, respiratorik ve enterik hastalık
Porcine herpesvirus 1	Genç domuzlarda jeneralize hastalık, yetişkinlerde abort, sekonder konaklarda nörolojik hastalık (pseudorabies)
Equine herpesvirus 1	Abort, perinatal tay ölümleri, respiratorik hastalık, nörolojik hastalık
Equine herpesvirus 3	Koital ekzantem
Equine herpesvirus 4	Rhinopneumonitis
Canine herpesvirus 1	Yavru köpeklerin hemorajik hastalığı
Felid herpesvirus 1	Feline viral rhinotracheitis
B virus (Cercopithecine herpesvirus 1)	Makakların herpes simpleks benzeri hastalığı, insanlarda fatal encephalitis
Simian varicellavirus	Maymunların varicella benzeri hastalığı
Gallid herpesvirus 1	Tavukların enfeksiyöz laringotracheitisi
Gallid herpesvirus 2	Tavukların Marek hastalığı
Anatid herpesvirus 1	Ördek vebası
Betaherpesvirinae Alt familyası	
Porcine herpesvirus 2	Rhinitis, jeneralize sitomegalovirus enfeksiyonu
Gammaherpesvirinae Alt familyası	
Alcelaphine herpesvirus 1	Bovine malignant kataral fever
Equine herpesvirus 2	Üst solunum yolu enfeksiyonu
Equine herpesvirus 5	Üst solunum yolu enfeksiyonu

1.2. Epidemiyoloji

Herpesvirus virionları organizmanın dışında çok dayanıklı olmadığı için bulaşma genellikle direkt mukozal temas ve damlacık enfeksiyonu şeklinde (örneğin; koitus, yalama, burun sürtme, doğum esnasında anneden yavruya plasental bulaşma)

oluşmaktadır. İndirekt bulaşma ise kontamine yem ya da su, suni tohumlama esnasında semen ya da sağım makinaları yoluyla gerçekleşmektedir (Engels ve Ackermann, 1996).

BoHV-1'in bulaşması virusla enfekte hayvana direkt temasla veya indirekt olarak çeşitli vektörlerle gerçekleşmektedir. Burun, göz, boğaz akıntısı, gaita, vajinal salgı, sperma, süt gibi sekret ve ekskretlerin yanında fötal membran ve dokular da bulaşmada etkili rol oynarlar. Enfeksiyöz virusun akut solunum sistemi enfeksiyonu sırasında 10-14 gün boyunca saçıldığı bildirilmiştir (Gibbs ve Rweyemamu, 1977).

BoHV-1'in genital formu, çiftleşme ya da suni tohumlama kaynaklıdır ancak bazı durumlarda, özellikle sütçü ineklerde çiftleşme olmadan da meydana gelebilir. Solunum formu ve konjunktivitis ise damlacık enfeksiyonu şeklindedir (Murphy ve ark., 1999).

Enfeksiyonun bulaşmasındaki bir diğer önemli faktör de latent enfekte hayvanlardır. Latentlik mekanizması sayesinde reaktif olan ve saçılan herpesviruslar, bir jenerasyondan diğerine yaşamlarını devam ettirebilirler. Latent enfekte hayvanların sürüde varlığı enfeksiyonun sürü dinamiğinde göz önünde tutulması gereken konulardır; reaktivasyonun herhangi bir klinik bulgu gözlenmeden de gerçekleşmesi nedeniyle latent enfekte hayvanlar sürülerde potansiyel saçıcıdırlar (Murphy ve ark., 1999).

Yapılan çalışmalarda ruminant türleri arasında çapraz enfeksiyonlar tespit edilmiştir. Enfekte koyun ve keçilerin, enfeksiyonun epidemiyolojisinde rol oynayabileceği ve enfeksiyonla mücadelede türler arası geçiş olasılığının da üzerinde durulması gereken bir konu olduğu bildirilmiştir (Taylor ve ark., 1977; Wafula ve ark., 1985; Six ve ark., 2001). Diğer evcil ve vahşi ruminant türleri de potansiyel

BoHV-1 rezervuarlarıdır. Bunun üzerine yapılan seroepidemiolojik çalışmalarda, pekçok ruminant türünde BoHV-1'e karşı antikor saptanmıştır (Çizelge 1.2.).

Çizelge 1.2. BoHV-1 ile ilişkili ruminant alphaherpesvirusları (Thiry ve ark., 2006)

Virus	Doğal konak	Hastalık	Coğrafi dağılım
Bovine herpesvirus 1	Sığır	Enfeksiyöz bovine rhinotracheitis Enfeksiyöz pustular vulvovaginitis	Avrupa, ABD, Asya, Avustralya
Bovine herpesvirus 5	Sığır	Bovine encephalitis	Avrupa, ABD, Avustralya
Bubaline herpesvirus 1	Manda	Subklinik genital enfeksiyon	Avrupa, Avustralya
Caprine herpesvirus 1	Keçi	Vulvovaginitis, abort, neonatal sistemik enfeksiyon	Avrupa, ABD, Avustralya
Cervid herpesvirus 1	Ala geyik	Oküler sendrom	Avrupa
Cervid herpesvirus 2	Rengeyiği	Subklinik genital enfeksiyon	Avrupa
Elk herpesvirus 1	Elk	Subklinik genital enfeksiyon	Kuzey Amerika

Keçilerde BoHV-1/CpHV-1 enfeksiyonlarının varlığı/yaygınlığının araştırıldığı çalışmalar sınırlı sayıdadır. CpHV-1 ilk kez 1975'de California'da enteritis bulguları saptanan yenidoğan keçilerden izole edilmiştir (Saito ve ark., 1974). Daha sonra İsviçre'de benzer hastalık tablosuna sahip keçilerde tespit edilmiştir (Mettler ve ark., 1979). CpHV-1'e karşı antikor varlığı serolojik olarak Norveç, İrlanda, İspanya, İtalya, Yunanistan, Suriye (Kao ve ark., 1985) ve Türkiye'de (Yonguç ve ark., 1990) gösterilmiştir. Bazı ülkelerde keçilerde CpHV-1'e karşı yüksek seropozitiflik saptanmıştır. Seropozitiflik oranları Yunanistan'da %50'den fazla (Koptopoulos ve ark., 1988), İtalya'da %30-60 arası (Guercio ve ark., 1998; Tempesta ve ark., 1994), İspanya'da %21 (Keuser ve ark., 2004) olarak belirlenmiştir. Türkiye'de Yonguç ve ark. (1990) yaptıkları çalışmada, örneklenen keçilerin kan serum örneklerinin %26'sında CpHV-1'e karşı antikor varlığı saptanmış, alınan nasal sürüntülerden de virus izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

Keçilerde BoHV-1 seroprevalansı ise Nijerya'da %11.2 (Taylor ve ark., 1977), Kanada'da %6.9 (Elazhary ve ark., 1984), ABD'de %13.2 (Fulton ve ark., 1982) ve

Mısır'da %27.6 (Mahmoud ve Ahmed, 2009) olarak saptanmıştır. Türkiye'de keçilerde BoHV-1 enfeksiyonu üzerine yapılan çalışmalar sınırlı sayıdadır (Yeşilbağ ve ark., 2003; Ataseven ve ark., 2010; Bolat, Y., 1990). Yeşilbağ ve ark. (2003) yaptıkları çalışmada virus nötralizasyon testi (VNT) ile keçilerde BoHV-1'e karşı %5.52 antikor varlığı tespit etmişlerdir. Ataseven ve ark. (2010) Van ilindeki keçilerde VNT ile %0.7 oranında BoHV-1 antikor varlığı belirlemişlerdir. Bolat (1990) Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgesinde bulunan koyun ve keçilerde BoHV-1 antikor varlığını belirlemek üzere yaptığı çalışmada, 117 keçiden alınan serum örneğinde BoHV-1'e karşı antikor varlığı tespit edememiştir.

1.3. Patogenez ve Patoloji

Herpesvirusların organizmaya ilk giriş yerleri nazal kavite, orofarenks, göz, genital kanal veya deri lezyonları yoluyla deridir. Genellikle, viral replikasyonun ilk basamağı giriş yerindeki epitelyal hücrelerde gerçekleşmektedir. Enfeksiyonun daha sonra izlediği yol, virus ve/veya konak faktörüne göre değişiklik göstermekle beraber, lokal alanlarla sınırlı kalma, viremi ile sistemik yayılım ve nöronal yayılım olarak üç farklı şekilde olabilmektedir (Engels ve Ackermann, 1996).

BoHV-1'in solunum sisteminde, gözde, genital sistemde yayılma yolu lokal alanlarla sınırlı kalma şeklindedir. Hastalık semptomları temelde virusun replikasyonuna bağlı enfekte hücrelerin hasarı ile ilişkili olmaktadır. İmmun yanıt sayesinde bu tip enfeksiyonlar sınırlı kalmakta ve genellikle bir iki hafta içerisinde iyileşme meydana gelmektedir.

BoHV-1 enfeksiyonundaki abort, enteritis ve CpHV-1 enfeksiyonuna bağlı yenidoğanların sistemik hastalığı ise viremiyle sistemik yayılıma örnektir (Engels ve Ackermann, 1996). BoHV-1'in nötralizan antikorların bulunmadığı dönemde

lenfositlere adsorbe olabildiği ve bu şekilde yayıldığı gösterilmiştir. Genel bir kural olarak, pek çok alphaherpesvirus enfeksiyonundan elde edilen bulgulara göre, sistemik yayılımın, lenfosit ilişkili vireminin ardından virusun lenf nodüllerine ve lenf damarlarına yerleşmesi ile gerçekleştiği ileri sürülmektedir (Mettenleiter, 2002).

Zarf glikoproteinleri viral tutunmanın, penetrasyonun, hücreden çıkışın ve hücreden hücreye yayılımın ana mediatörü olarak gösterilirler. Hücre içine viral giriş pek çok glikoprotein ve en az iki hücresel reseptör içeren çok basamaklı bir işlemdir (Spear, 1993; Mettenleiter, 2002). Alphaherpesviruslarda gC hücre yüzeyindeki heparan sülfat proteoglikanlara bağlanarak bu basamakları başlatır. Bu reseptörler pek çok hücrede mevcuttur, böylece herpesvirusların farklı hücre tiplerine adsorbsiyonuna izin verilir. Glikoprotein C'nin heparan sülfat parçalarına bağlanmasını, gD'nin varsayılan ikinci hücresel reseptöre bağlanması takip eder. Glikoprotein D'nin hücresel reseptöre bağlanması viral girişi başlatmak için gereklidir (Karger ve ark., 1995; Thaker ve ark., 1994). Virusun hücreye girişi ve viral zarfın hücre membranı ile füzyonu gB, gH ve gL'nin etkileşimleri sonucunda gerçekleşmektedir. Virusun bazı glikoproteinleri virusun replikasyonunda rol oynamalarına rağmen, *invivo* ve *invitro* koşullarda virus replikasyonu için esansiyel değildirler (Schwyzer ve Ackermann, 1996). Van Engelenburg ve ark. (1994) yaptıkları çalışmada gE gen bölgesi çıkartılmış BoHV-1'in, vahşi tip virus ile aynı bölgedeki dokuları enfekte edebildiğini; ancak enfeksiyonun daha kısa sürdüğünü ortaya koymuşlar ve bu durumun gE'nin hücreden hücreye yayılımdaki fonksiyonunu yansıttığını bildirmişlerdir.

BoHV-1 enfeksiyonunun patogenezi iyi tanımlanmıştır. Keçilerde CpHV-1 enfeksiyonunun patogenezi de, sığırlarda BoHV-1 enfeksiyonunun patogeneziyle oldukça benzerdir. Ancak, CpHV-1 enfeksiyonunda genital yolun virusun organizmaya girişinde en önemli yol olduğu düşünülmektedir (Thiry ve ark., 2006a; Tempesta ve ark., 2000).

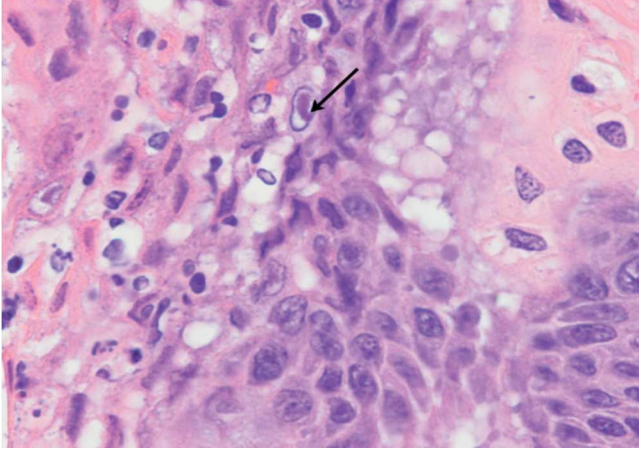
Tüm herpesvirus enfeksiyonlarında, periyodik ya da devamlı saçılmayla persiste enfeksiyon meydana gelir. Alphaherpesvirus enfeksiyonlarında viral DNA'nın birçok kopyası, ya epizomal olarak ya da latent enfekte nöronların kromozomal DNA'sına entegre olarak kalabilir (Murphy ve ark., 1999). Akut BoHV-1 enfeksiyonundan sonra hayvanın yaşamı boyunca devam eden latent enfeksiyon tablosu oluşur. Latentlik, enfeksiyöz virusun izole edilememesi ve latent enfekte hücrelerde viral antijenin tespit edilememesiyle karakterizedir (Engels ve Ackermann, 1996). Latentlik döneminde viral DNA, genital sistem enfeksiyonundan sonra sakral, solunum sistemi enfeksiyonunun ardından da trigeminal ganglionlara yerleşebilir. Stres ve kortikosteroid uygulamaları latent enfeksiyonun reaktivasyonuna neden olur (Murphy ve ark., 1999).

BoHV-1 enfeksiyonunda, reaktif olan virus intra-aksonal olarak organizmaya ilk giriş yerine geri gelerek saçılmaktadır. Reaktivasyon sırasındaki virus replikasyonu, enfeksiyonun tekrarlamasına neden olmaktadır (Engels ve Ackermann, 1996). Latent enfekte hayvanlarda genellikle transport, soğuk, aşılama, doğum, kortikosteroid uygulamaları ya da başka bir enfeksiyondan kaynaklanan stresle ilişkili reaktivasyon meydana gelmektedir. Deneysel yolla reaktivasyon için yüksek doz deksametazon uygulaması (6 gün boyunca 4.4 mg/kg) gerekmektedir (Buonavoglia ve ark., 1996; Thiry ve ark., 2006a). Keçilerde reaktivasyon sonrası saçılım, diğer türlere göre daha düşük antikor titresinin varlığında gerçekleşmektedir (Tempesta ve ark., 1998; Thiry ve ark., 2006a). Reaktivasyon sonrasında virus nasal, genital, rektal ve oküler akıntılardan izole edilebilmektedir. CpHV-1'in saçılım yeri primer enfeksiyonun oluşumuna bağlıdır. Virus intranasal inokule edilirse reaktivasyondan sonra saçılım burun ve vajinadan olur; genital primer enfeksiyondan sonra reaktif CpHV-1 yalnızca vajinadan saçılır (Thiry ve ark., 2006a; Tempesta ve ark., 2000). CpHV-1 enfeksiyonunda, diğer herpesvirusların aksine doğal ya da deneysel çalışmalarla reaktivasyonu göstermek zordur. Stres sonrası etken özellikle genital yolla saçılır (Tempesta ve ark., 2002; Keuser ve ark., 2004). Stres kaynağı olarak çiftleşme dönemleri ve östrusdaki hormonal durum rol oynayabilmektedir

(Donofrio ve ark., 2013). Deneysel olarak ise yetişkin keçilerde reaktivasyon, yüksek dozda deksametazon uygulamasıyla mümkün olmuştur (Marinero ve ark., 2010).

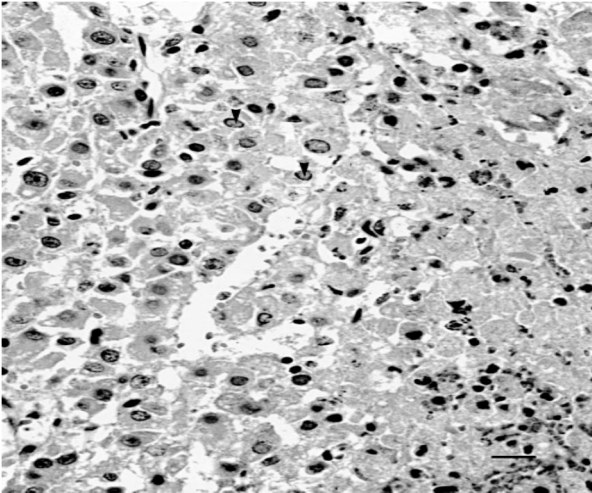
Keçilerde BoHV-1 enfeksiyonu sonrasında latentlik söz konusudur ancak Wafula ve ark. (1985) ile Ackermann ve ark. (1986) deksametazon uygulamasından sonra keçilerde BoHV-1 izolasyonunu gerçekleştirememişlerdir. Buna karşın Tolari ve ark. (1990) BoHV-1'i izole etmiş ve enfekte keçilerin virusu birkaç gün yüksek titrede saçtığını belirlemişlerdir. CpHV-1 sığırlarda da enfeksiyon meydana getirir ve latent kalır. BoHV-1'in keçilerde reaktivasyonu tespit edilirken, CpHV-1'in sığırlarda reaktivasyonu belirlenememiştir (Six ve ark., 2001).

Alphaherpesvirusların çoğu, özellikle deride ya da solunum yolu ve genital kanal mukozalarında lokalize lezyonlar oluştururlar. Jeneralize alphaherpesvirus enfeksiyonları maternal antikorların koruma sağlayamadığı, 3 ay yaşın altındaki hayvanların organ ve dokularında görülen nekroz odaklarıyla karakterizedir. Gebe hayvanlarda virusun plasentaya transferi sonucu fötusta fokal nekrotik lezyonlarla gözlenen, aborta neden olan mononükleer hücre ilişkili viremi oluşabilir (Murphy ve ark., 1999). Eozinofilik intranükleer inklüzyon cisimcikleri (Şekil 1.4) herpesvirus enfeksiyonlarında karakteristiktir (MacLachlan ve Dubovi, 2011; Murphy ve ark., 1999).



Şekil 1.5. İntranükleer inklüzyon cisimcikleri (MacLachlan ve Dubovi, 2011).

Herpesvirus enfeksiyonlarında lezyonlar epitelyal hücre nekrozu şeklindedir. Epitelyal hücreler şişmiştir. Tipik herpesvirus inklüzyonları nekrotik odağın periferinde, çekirdekte bulunabilir. Yoğun bir yangısal yanıt vardır. Atık fötusta makroskobik lezyon yoktur ancak mikroskobik olarak nekrotik odaklar birçok dokuda tespit edilebilmektedir (Şekil 1.5). Özellikle karaciğerde kalıcı hasar gözlenebilmektedir (Murphy ve ark., 1999).



Şekil 1.6. CpHV-1 ile enfekte bir keçi fötusunun renal korteksinde fokal nekroz. Nekrotik odağın periferdeki pek çok hücrede geniş intranükleer inklüzyon cisimcikleri bulunmaktadır (Uzal ve ark., 2004).

1.4. Klinik Semptomlar

BoHV-1 sığırlarda yaygın olarak gözlenen bir enfeksiyondur. Hastalık üst solunum yolu enfeksiyonu ile dişi ve erkeklerde genital kanal enfeksiyonuna neden olmaktadır. Hastalıkta görülen semptomlara bağlı olarak abort, yenidoğanlarda ölüm ve süt veriminde düşme sonrasında önemli ekonomik kayıplar oluşabilmektedir (Muylkens ve ark., 2007).

Hastalığın solunum formu (Enfeksiyöz bovine rhinotracheitis, IBR) subklinik, hafif veya şiddetli olarak seyretmektedir. Morbidite %100, mortalite %10 oranındadır. Hafif seyrinde klinik belirtiler ciddi bir nasal ve oküler akıntıyla sınırlı kalabilmektedir. Klasik IBR ise ateş (40.5- 42°C), iştahsızlık, solunum sayısında artış, dispne, persiste sert öksürük, depresyon ve sütçü ineklerde süt veriminde ciddi düşüşle karakterizedir. İlk olarak seröz daha sonra muko-purulente dönüşen bilateral burun akıntısı mevcuttur. Nasal mukoza hiperemiktir ve lezyonlar pustuler nekrozdan geniş hemorajik ve ülseratif alanlara genişleyebilir (Murphy ve ark., 1999; Nandi ve ark., 2009). Kötü kokulu nefes, ağızdan nefes alma, salya ve derin bir bronşiyal öksürük yaygındır. Sekonder bakteriyel veya viral enfeksiyonlar mortalite oranının yükselmesine neden olabilirler. Hayvanlar bronşit ve pnömonitis belirtileri gösterebilirler. Akut ve karışık olmayan vakalar 5-10 günde sonlanır ve hızlı bir iyileşme olur (Tikoo ve ark., 1995). Oskültasyonda, tracheitis anlaşılır ancak akciğer sesleri normaldir. Etkilenen hayvanların %10'u vücut kondisyonunu kaybeder ve pnömoni sekel olarak kalır (Gibbs ve Rweyemamu, 1977).

BoHV-1, sığır solunum hastalıkları (BRD) kompleksini oluşturan patojenlerden biridir. Kompleksi oluşturan diğer virus ve bakteriler; bovine viral diare virus, bovine parainfluenzavirus-3, bovine respiratory sinsityal virus (BRSV), *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* ve *Histophilus somnus* dir (Yates, 1982).

Hastalığın konjunktival formunda, tipik IBR'li sığırlar bol lakrimasyonlu tek veya çift taraflı konjunktivitis gösterirler. Kornea genellikle etkilenmez ancak sekonder bakteriyel bir enfeksiyon oluştuğunda keratitis ve korneal ülserasyon oluşur (Murphy ve ark., 1999). Karışık olmayan vakalarda, semptomlar 5-10 gün içerisinde geriler. Bu form respiratorik formdan ayrı olarak gelişebilir (Nandi ve ark., 2009).

Hastalığın genital formunda, akut enfeksiyöz pustuler vulvovajinitis (IPV), genellikle çiftleşmeden 1-3 gün sonra gelişir; sık işeme ve kuyruk sallama ilk farkedilen karakteristik belirtileridir. Etkilenen hayvanlarda ateş, depresyon ve anoreksi gelişir ve hayvanlar kuyruklarının vulvayla temasından kaçınırlar. Vulva şişkin ve hiperemiktir, 1-2 mm çapında ufak püstüller içerir. Lezyonlar genellikle hastalığın başlangıcından 10-14 gün sonra iyileşirler; ancak bazı hayvanlarda purulent vajinal akıntı birkaç hafta devam eder (Turin ve Russo, 2003). Enfeksiyöz pustuler balanopostitis (IPB), 1-3 günlük bir inkubasyon periyodunun sonunda ortaya çıkar. Penis ve prepusyum mukozasında gözlenen lezyonlar dişilerde görülenlere benzerdir. İyileşme karışık olmayan vakalarda 10-14 günde gerçekleşir ancak bazı hayvanlarda libido kaybı, ağrılı ereksiyon ve ejakulasyon görülebilir; bu durumda yeniden düzenli çiftleşme için birkaç hafta gerekir. IPV/IPB'nin hafif ve subklinik formları da görülebilir (Tikoo ve ark., 1995). BoHV-1 kaynaklı abortus genellikle doğal enfeksiyon ya da aşılama sonrası gebeliğin 4-7. ayları arasında meydana gelir (Nandi ve ark., 2009).

CpHV-1 keçilerde iki farklı sendromla ilişkilidir (Saito ve ark., 1974). İlki yeni doğan keçilerde, gastroenterik lezyonlarla karakterize, ölümle sonuçlanan sistemik enfeksiyon ve diğeri ise yetişkinlerde balanopostitis (Şekil 1.7), vulvovajinitis (Şekil 1.8) ve aborta yol açan bir genital sistem hastalığıdır (Thiry ve ark., 2006b; Marinaro ve ark., 2010).



Şekil 1.7. CpHV-1 ile enfekte bir keçi sürüsünden bir erkeğe ait ülseratif postitis (Uzal ve ark., 2004).



Şekil 1.8. Caprine herpesvirusun neden olduğu vulvovajinitis (Courtesy of K. Thompson, Massey University).

Genç keçilerin CpHV-1 ile doğal ve deneysel enfeksiyonu jeneralize enfeksiyon sonucu ölümle son bulur (Papanastasopoulou ve ark., 1991; Roperta ve ark., 2000). Etken, ergin hayvanlarda subklinik ya da respiratorik bulgular, vulvovajinitis

(Grewal ve Wells, 1986), balanopostitis (Tarigan ve ark., 1987), repeat breeder (Kouptopoulos ve ark., 1992) ve özellikle gebeliğin son dönemlerinde aborta (Keuser ve ark., 2002; Williams ve ark., 1997) neden olmaktadır. Nasal enfeksiyon sonrası virus viremi ile genital kanala ulaşır ve yüksek titrede saçılım olur. Genital enfeksiyon sonrası virus replikasyonu genital kanalda sınırlı kalır; eritem, ödem ve veziküler nekrotik lezyonlar gözlenir.

BoHV-1 ve CpHV-1 serolojik olarak ilişkilidir. Latentlik mekanizmasını da kapsayan birçok biyolojik özellikleri de ortaktır (Six ve ark., 2001). İki virus da doğal konakçılarında spesifik klinik tablo gösterirken, alternatif türlerde de enfeksiyon meydana getirebilmektedirler (Six ve ark., 2001; Koptopoulos ve ark., 1992). BoHV-1 ile deneysel enfekte keçilerde nasal akıntı, dispne, adenitis ve diyare görülürken, CpHV-1 sığırlarda subklinik seyretmektedir (Six ve ark., 2001).

1.5. Teşhis

Herpesvirus enfeksiyonlarının laboratuvar teşhisi, virolojik ve serolojik metotlar ile yapılabilmektedir (Wyler ve ark., 1989).

1.5.1. Virolojik Teşhis

Bu amaçla virus izolasyonu, antijen ve nükleik asit tespitine dayalı metotlar yaygın olarak kullanılabilmektedir.

BoHV-1 izolasyonu için primer veya sekonder dana böbrek, akciğer, testis, turbinata veya trachea hücreleri ile Madin Darby Bovine Kidney (MDBK) gibi devamlı hücre kültürlerinden yararlanılmaktadır. Virus klinik semptomlarla ilişkili olarak nasal, konjunktival, vajinal sürüntü ve prepüsyal akıntıdan, aborte fötusun

plasental kotiledonlarından, f3tal dalak, akciğer, b3brek, lenf nod3l3, solunum sistemi mukoz membranından ve tonsillerden izole edilebilir (Homan ve Easterday, 1980). İşlenmemiş veya koruyucu maddelerle dondurulmuş semen de virus izolasyonu için kullanılabilir (Snowdon ve ark., 1965). BoHV-1'in h3crede oluşturduğu karakteristik morfolojik değişimler (CPE) virusun inokulasyondan sonra 24-48 saat içinde oluşur. CpHV-1'in izolasyonu için de MDBK h3cre k3lt3r3 kullanılabilmektedir; virus 3remesi BoHV-1'in karakteristik CPE'sine çok benzerdir (Buonavoglia ve ark., 1996).

Antijen tespitine dayalı metotlar s3r3nt3lerden yapılan immunfloresan antikor tekniği (IFAT), immunperoksidaz (IP) ve enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) teknikleridir (Wyler ve ark., 1989).

Viral n3kleik asit tespitine dayanan testler ise genomik DNA'nın polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile tespiti, n3kleik asitin hibridizasyonu ve dizin analizleridir (Nandi ve ark., 2009). PCR, virus izolasyon y3ntemlerinden daha hızlıdır ve latent enfekte ganglionda viral DNA'nın tespitine de olanak sağlamaktadır (Van Engelenburg ve ark., 1993). 3zellikle herpesviruslarda gB, gC, gE ve gD PCR testlerinde hedeflenen genlerdir (OIE, 2008). PCR testleri yakın ilişkili olan alphaherpesvirusların ayırımının yapılmasına olanak sağlamaktadır (Keuser ve ark., 2004). CpHV-1 DNA'sının tespitinde 3zellikle virusun gC b3lgesi yaygın olarak kullanılmaktadır (Tarsitano ve ark., 2010; Elia ve ark., 2008). Bilge Dağalp ve ark. (2013) tarafından Hatay ilinde sık olarak abort olguları tespit edilen bir keçi yetiştiriciliği işletmesinden alınan vajinal s3r3nt3 3rneklerinde CpHV-1 ve BoHV-1 varlığı gC gen b3lgesi hedef alınarak PCR ile araştırılmış ve CpHV-1 y3n3nden pozitiflik tespit edilmiştir. Daha sonra yapılan dizin analizi ile de bu sonuçlar doğrulanmıştır.

1.5.2. Serolojik Teşhis

Serumda spesifik antikor tespiti için virus nötralizasyon testleri (VNT), ELISA ve immunfloresan antikor tekniği (IFAT) kullanılmaktadır (Kramps ve ark., 1993).

BoHV-1 ve CpHV-1 enfeksiyonlarının her ikisinin de serolojik tanısında VNT yaygın olarak kullanılmaktadır. VN testleri yüksek duyarlılığa ve özgüllüğe sahiptir. Diğer yandan VN testleri pahalı olması, 3-4 gün içinde sonuç vermesi açısından her zaman tercih edilmemektedir. Ayrıca tüm virus preparasyonlarının kullanılması testi duyarlı kılsa da, populasyonda hangi virusun bulunduğuyla ilgili olarak diğer ruminant alphaherpesvirus glikoproteinlerinin çapraz reaksiyonları nedeniyle şüpheli sonuçlara neden olabilmektedir (Bertolotti ve ark., 2013). Ruminant herpesvirusları temel olarak kendi konakçılarında enfeksiyon oluşturmalarına rağmen, kros-tür geçişi doğal şartlar altında gelişebilir ve en azından primer enfeksiyon sırasında yeni konakçılara yayılabilirler (Thiry ve ark., 2006). Bu nedenle, populasyonlarda ruminant alphaherpesviruslarına karşı oluşan antikorların ayrımının yapılabilmesi oldukça önemlidir.

ELISA tekniği birçok hastalığın serolojik tanısında yaygın olarak kullanılmaktadır. Basit, hızlı ve çok miktarda örneği test etmesi açısından VN testlerine göre daha avantajlıdır. Keçilerde CpHV-1 antikorlarının tespitinde kullanılan bir ticari ELISA mevcut değildir. Diğer yandan BoHV-1 antikorlarının tespitinde birçok ELISA kiti bulunmaktadır. Son yıllarda serolojik testler ticari BoHV-1 gB ve gE blocking ELISA kullanımına dayanmaktadır; hızlı, ucuz ve büyük miktarda test örneği taramasını sağlayan metotlardır (Kramps ve ark., 2004). Birçok çalışma gB'nin herpesviruslarda iyi korunmuş bir bölge olduğunu göstermiştir (Ros ve Belak, 2002; Thiry ve ark., 2007). Bu gen BoHV-1'in esansiyel zarf proteinidir ve virusun hücreye girişinde önemli rol oynar. Aynı zamanda dominant bir viral antijen olan gB, konakçıda koruyucu immunitiyi uyarmaktadır. Değişebilen uzunluklarına rağmen gB homologları tüm protein motiflerinde dikkate değer bir konservasyon

gösterirler. Bu durum da ruminantlarda hastalığa neden olan alphaherpesviruslarda (CpHV-1, BuHV-1, BoHV-5, BoHV-1, CerHV-1 ve RanHV-1) gB'nin fonksiyonunun aynı olduğunu ortaya koyar (Ros ve Belak, 2002). Böylelikle BoHV-1 gB'sinin CpHV-1 ile ortak çok sayıda epitop içerdiği belirlenmiştir; CpHV-1'e karşı antikorlar, antijen olarak BoHV-1 gB'si kullanılan bir ELISA'da BoHV-5'de olduğu gibi çapraz reaksiyon verebilir (Wellenberg ve ark., 2001). Glikoprotein B blocking ELISA, ruminant alphaherpesvirus enfeksiyonlarının identifiye edilmesini sağlamakta ancak ayırımı yapamamaktadır (Thiry ve ark., 2008).

Ruminant alphaherpesviruslarında gE en fazla değişkenlik gösteren bölgedir. CpHV-1'in gE'si BoHV-1'in gE'sinden oldukça farklı bulunmuştur (Tyborowska ve ark., 2000). BoHV-1 gB/gE ELISA kombinasyonunun tanıda kullanılması BoHV-5 için denenmiştir. BoHV-5 ile deneysel enfekte edilen sığırlar, BoHV-1 gB blocking ELISA ile pozitif ve gE blocking ELISA ile negatif olarak tespit edilmiştir (Wellenberg ve ark., 2001). Bir alphaherpesvirus olan BoHV-5, BoHV-1 ile çok yakın antijenik ilişkili olmasına rağmen (Ros ve Belak, 1999a,2002) gE bölgesi açısından antijenik farklılık göstermektedir (Kaoshoeck ve ark., 1995; Wellenberg ve ark., 2001). Bu sonuç, CpHV-1 için de gE bölgesinde antijenik farklılıklar olabileceğini düşündürmüş ve CpHV-1'e karşı oluşan antikorların BoHV-1 antikorlarından ayırımında gB/gE blocking ELISA tekniklerinin kullanımının mümkün olabileceği bildirilmiştir (Thiry ve ark., 2008).

Uş8 geninin kodladığı gE'nin yapılan son kısmi dizin analizi de, BoHV-1 ilişkili ruminant alphaherpesvirusları arasında genetik farklılık olduğunu doğrulamıştır (Thiry ve ark., 2007). Böylece keçilerden alınan kan örneklerinin BoHV-1 gB ELISA ile pozitif olması halinde, enfeksiyona neden olan etkenin (BoHV-1 veya CpHV-1) ayırıcı tanısında BoHV-1 gE ELISA temeline dayanan bir değerlendirmenin mümkün olduğu bildirilmiştir (Thiry ve ark., 2007; Thiry ve ark., 2008). Bununla birlikte enfeksiyöz durumun gerçek göstergesi için sık sık VNT'nin

kullanımı da önerilmektedir (Thiry ve ark., 2008). Ayrıca, sığır populasyonlarında marker aşılarda kullanımı bu testlerin değerlendirilebilmesini zorlaştırır. Bunun yanı sıra gE spesifik ELISA'nın duyarlılığının yaklaşık %70 olduğu, bu nedenle %30 oranında yanlış negatif değerlendirmeler olabileceği bildirilmiştir (Kramps ve ark., 2004). Bu testin ikinci dezavantajı ise, gE'ye karşı zayıf düzeyde antikor yanıtının olması ve gE antikorlarının tespitinin enfeksiyondan 42 gün sonraya kadar gecikebileceğidir (Beer ve ark., 2003).

1.6. İmmunoloji

Herpesviruslarda primer enfeksiyon, konakta güçlü bir humoral ve hücrel immün yanıtı uyarır. Alphaherpesviruslarda hücrel immün yanıt ilk olarak enfeksiyondan 5 gün sonra ortaya çıkar ve yaklaşık 8-10. günde en yüksek seviyeye ulaşır. Humoral immün yanıtta ise nötralizan antikorlar IgM ve bunu takiben IgG sınıfı, genellikle enfeksiyondan yaklaşık 10 gün sonra tespit edilmektedir. Nötralizan antikorlar hücre dışı virüsü elimine edebilmekte, hücrel immün yanıt ise hastalıktan iyileşmeyi sağlamaktadır (Babiuk ve ark., 1996; Engels ve Ackermann, 1996).

Hücrel immün yanıt makrofajları, interlekin-2 ve interferon γ üretimini, natural killer (NK) hücrelerini ve NK benzeri aktiviteyi, viral gC- ve gD-spesifik CD4+T hücrelerinin proliferasyonu ve sitotoksik T lenfosit aktivitesinin uyarılmasını içerir (Hutchings ve ark., 1990; Tikoo ve ark., 1995b).

BoHV-1 immünsupresyona neden olarak, enfekte sığırları sekonder viral ve bakteriyel enfeksiyonlara karşı duyarlı kılmaktadır (Nandi ve ark., 2009). İmmünsupresyon makrofajların, polimorfnükleer nötrofillerin ve lenfositlerin fonksiyonunun bozulması sonucunda ortaya çıkmaktadır (Tikoo ve ark., 1995a).

Koruyucu antikorlar BoHV-1 enfeksiyonunda gB, gC, gD ve gE glikoproteinlerine karşı üretilmektedir (Tikoo ve ark., 1995a, Mechor ve ark., 1987). BoHV-1 aşılmasını izleyen 3 yıl boyunca antikorlar saptanabilir düzeydedir (Hage ve ark., 1998). BoHV-1'e karşı maternal antikorlar, yavruların 2 aylık yaşta süten kesilmesinden sonra 123. güne kadar tespit edilebilmektedir (Fulton ve ark., 2004). Yeni doğan buzağılar, aşıli annelerin kolostrumunu alarak enfeksiyondan korunabilmektedirler (Mechor ve ark., 1987); ancak maternal antikorlar BoHV-1 ile latent enfeksiyonu tam olarak önleyememektedir (Schaw, 2000).

CpHV-1 ile primer enfeksiyondan 1-2 hafta sonra serumda nötralizan antikorlara rastlanır; 3. ya da 4. haftayı takiben en yüksek seviyelere ulaşırlar ve yaklaşık 6-10 ay sonra azalmaya başlarlar. Bu aşamada hayvanlar strese girerlerse CpHV-1 reaktifte olup, özellikle genital yolla saçılabilir. Reaktivasyona yanıt olarak humoral ve hücrel immun yanıt artmaktadır (Marinaro ve ark., 2010).

1.7. Mücadele ve Kontrol

Alphaherpesvirus altfamilyası, prototip olarak BoHV-1 ile yakın ilişkili viruslardan oluşur. BoHV-1 sığırlarda önemli ekonomik kayıplara neden olan hastalıklardan olan IBR/IPV'ye neden olduğu için BoHV-1'in izolasyonundan bu yana birçok konvansiyonel aşı geliştirilmiştir (Thiry ve ark., 2006b). İnaktif virus aşılı ve modifiye canlı virus aşılarını içeren konvansiyonel aşılarda kullanımı sonrasında oluşan antikor yanıtı enfeksiyon sonrası oluşan antikor yanıtından ayırt edilememektedir. Etkin bir kontrol programı uygulayabilmek için aşıli ve enfekte hayvanların birbirinden ayrılması önemli bir konudur. Bu nedenle esansiyel olmayan genlerden biri olan gE gen bölgesi çıkartılmış mutant aşı virusları ile hazırlanan marker aşılarda geliştirilmiş olup, özellikle eradikasyon amaçlı olarak birçok ülkede yaygın olarak kullanılmaktadır (Kaashoek ve ark., 1994).

IBR'in başarıyla kontrol altına alınması etkin, duyarlı, hassas ve spesifik tanısal testlere dayanır. Bu diagnostik testlerin çoğunun poliklonal serum antikorlarının tespitine dayanmasından dolayı BoHV-1 ve onunla ilişkili ruminant alphaherpesviruslar arasındaki serolojik çapraz-reaksiyon varlığı testlerin özgüllüğünü riske atmaktadır (Thiry ve ark., 2006a). Finlandiya'da yapılan bir çalışmada sığır popülasyonu BoHV-1 yönünden negatif olmasına rağmen, ren geyiklerinde %23 oranında BoHV-1 antikorları saptanmıştır (Ek-Kommonen ve ark., 1981). Daha sonra belirlenen antikorların nedeninin geyiklerde enfeksiyona neden olan yeni bir virus olduğu anlaşılmış ve Cervine herpesvirus tip 2 (CvHV-2) olarak karakterize edilmiştir. Bu örnek BoHV-1 ile potansiyel ilişkili enfeksiyonların ortaya konmasında önemlidir (Ek-Kommonen ve ark., 1986). Her ne kadar keçilerin BoHV-1 ile nadir olarak enfekte oldukları düşünülse de, sığır ve keçilerin birlikte barındırıldığı ya da aynı merayı paylaştıkları durumda enfekte olmaları mümkündür (Thiry ve ark., 2008). Bu özellikle BoHV-1 ilişkili rezervuarları tanımlamak noktasında önem taşımaktadır. CpHV-1 ve diğer ruminant alphaherpesviruslarının epidemiyolojisinin sürekli izlenmesi, IBR kontrol ve eradikasyonunu benimseyen Avrupa ülkelerinde üzerinde önemle durulan bir konudur. Çünkü potansiyel IBR ilişkili virus rezervuarlarını tanımlamak, IBR'nin tanısında karışıklığın önlenmesinde gereklidir (Lyaku ve ark., 1992; Nixon ve ark., 1988; Thiry ve ark., 2006a).

Keçilerde CpHV-1 enfeksiyonuna karşı klasik bir inaktif aşı geliştirilmiş; ancak keçi veteriner tıbbi ürünler piyasasında ikincil türlerden biri olarak görüldüğünden, söz konusu aşı, ekonomik bulunmayıp lisanslandırılmamıştır. Bu nedenle, CpHV-1 enfeksiyonunun kontrolü için yalnızca hijyenik önlemlere başvurulmaktadır (Thiry ve ark., 2006b). Ancak son yıllarda keçilerin enfeksiyondan korunmasında ve klinik bulguların şiddetinin azaltılmasında değişik yaklaşımlarda bulunmaktadır. BoHV-1 ve CpHV-1'in antijenik yakınlığından yola çıkılarak, bir canlı attenüe gE negatif BoHV-1 aşısı keçilerde intranasal olarak uygulanmış ve daha sonra gelişen nasal CpHV-1 enfeksiyonundan sonra viral titrenin düştüğü tespit edilmiştir. Glikoprotein E negatif BoHV-1 aşısının intranasal yolla uygulanmasının keçileri CpHV-1 genital

enfeksiyonundan koruduğu da ortaya konmuştur (Thiry ve ark., 2006b). Donofrio ve ark.'nın (2013) yaptığı bir çalışmada, CpHV-1'in immunodominant proteini olan gD aktarılan Bovine herpesvirus 4 (BoHV-4) vektör olarak kullanılarak geliştirilmiş olan bir aşının (BoHV-4-A-gD_{Cp}gD₁₀₆ΔTK) keçilerde genital forma karşı koruyuculuğu değerlendirilmiştir. Çalışmada bir grup yetişkin keçi 15 günde iki kez aşılanmış ve daha sonra patojen bir CpHV-1 suşuyla intravajinal yolla enfekte edilmişlerdir. Yirmi günlük bir gözlem periyodu boyunca hayvanlar günlük olarak klinik belirtiler (ateş ve viral lezyonlar) ve viral saçılım yönünden kontrol edilmiştir. Antikor ve gamma interferon belirlemek için kan örnekleri toplanmıştır. Aşılı keçilerin aşılanmamışlara oranla CpHV-1'in neden olduğu genital hastalığa karşı korunduğu (vajinal lezyonların olmadığı) görülmüştür. Aşılanmamış keçilerde ise vajinal ödem, eritem ve veziküler-ülseratif lezyonlar ve vajinal akıntı gözlenmiştir.

1.8. Tezin Amacı

Türkiye'de keçilerde alphaherpesvirus enfeksiyonlarının (CpHV-1 ve BoHV-1) varlığı daha önceden yapılan çalışmalarda (Yonguç ve ark.,1990; Yeşilbağ ve ark., 2003; Ataseven ve ark., 2010) bildirilmiştir. Söz konusu çalışmalarda keçilerde her iki etkene karşı antikor varlığı VN testleri ile araştırılmıştır. Ancak son yıllarda yapılan çalışmalarda BoHV-1 ile ilişkili ruminant alphaherpesvirusların antijenik yakınlığından dolayı çapraz reaksiyon verebildikleri tespitinden hareketle, bildirilen çalışmalarda (Thiry ve ark., 2006b) belirlenen seropozitiflik oranlarında BoHV-1 ve/veya CpHV-1 etkinliğinin ne oranda olduğu bilinmemektedir. Bu nedenle her iki enfeksiyonun keçilerde varlığının/yaygınlığının araştırılmasına ve oluşturdıkları klinik bulgulara bağlı olarak ekonomik anlamda etkilerinin belirlenmesine ihtiyaç vardır.

Bu bilgiler ışığında planlanan bu çalışmada, Bolu ve çevresinde yetiştirilen Saanen keçilerinde CpHV-1 ve BoHV-1 enfeksiyonunun varlığının/yaygınlığının

BoHV-1 gB ve gE blocking ELISA kombinasyonu ve her iki virus için ayrı ayrı uygulanacak nötralizasyon testleri ile belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bu amaçla kan serum örnekleri öncelikle gB ELISA ile test edilerek, pozitif olarak belirlenen örnekler daha sonra gE ELISA ile kontrol edilecektir; sadece gB pozitif / gE negatif olarak belirlenen örnekler CpHV-1 yönünden pozitifliği, her iki testte pozitif olarak belirlenen örnekler ise BoHV-1 yönünden pozitifliği ortaya koyacaktır. Tüm örnekler aynı zamanda her iki virus yönünden mikronötralizasyon testine de tabi tutulacak ve ELISA sonuçları mikronötralizasyon testi ile de karşılaştırmalı olarak değerlendirilecektir.

Böylece ülkemizde her ne kadar keçilerde BoHV-1 kullanılarak uygulanan nötralizasyon testi sonuçlarına dayalı pozitiflik oranlarına ilgili veriler var ise de, bu verilerin gerçekte alphaherpesviruslara ilgili olarak değerlendirilmesi gerektiği bilgisi de dikkate alınarak, keçilerde BoHV-1 ve CpHV-1 seroprevalansına ilişkin güncel veriler elde edilebilecektir. Araştırmada ayrıca ELISA ve VN testleri sonucu elde edilen bilgilere dayanılarak, CpHV-1 ve BoHV-1 nötralizan antikor düzeylerine bağlı olarak etkenlerin antijenik ilişki düzeyi gE ELISA tekniğinin keçilerde alphaherpesvirusların ayırıcı tanısında kullanılabilirliğinin sorgulanması ile bu konuda varolan sınırlı sayıda literatüre katkı sağlanması da mümkün olabilecektir.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Örneklenen İşletmeler

Bu çalışmada, daha ekonomik keçi yetiştiriciliği amacıyla süt ve döl verimi açısından ön plana çıkan, İsviçre orijinli bir ırk olan Saanen keçi yetiştiriciliği yapılan Bolu iline ait 14 farklı köyde yeralan 20 işletme örnekledi. Örnekleme yapılan köyler Şekil 2.1’de gösterildi.



Şekil 2.1. Örnekleme yapılan köyler (İşletme numaraları).

A; Bolu, B; Köprucüler Köyü (I), C; Çepni Köyü (II, VIII), D; Kılıçarslan Köyü(III), E; Kürkçüler Köyü (IV), F; Gövem Köyü (V, VI, VII), G; Güneyfelakettin (IX, X), H; Belkaraağaç (XI, XII), I; Yenisefa Köyü (XIII), J; Doğancı Köyü (XIV), K; Seyit Köyü (XV), L; Karaağaç Köyü (XVI, XVII), M; Akçakavak Köyü (XVIII), N; Bahçeköy (XIV), O; Musluklar Köyü (XX).

Örneklenen keçi sürülerinin yetiştiricilik şekli, sürüdeki hayvan sayısı ve klinik bulguları kaydedildi. Çalışmada epidemiyolojik veri elde etme kriterleri göz önünde

bulundurularak, %95 güven aralığında, yapılan örneklemelerde 6 ay yaştın üzerinde 546 adet keçiden (4 teke ve 542 dişi keçi) kan serumu örneği alındı. İşletmelerdeki toplam hayvan sayıları, örneklenen hayvan sayıları, klinik bulgular ve işletmelerde uygulanan besi şekilleri Çizelge 2.1’de gösterildi.

Çizelge 2.1. İşletmelere göre örneklenen hayvanlara ait bilgiler

İşletme No	İşletmenin Bulunduğu Köy	Toplam Hayvan Sayısı	Örneklelen Hayvan Sayısı	Sürü Problemi	Besi Şekli
I	Köprücüler	16	7	SG	A
II	Çepni	105	20	SG	A
III	Kılıçarslan	30	10	SG	A
IV	Kürkçüler	65	11	SG	D
V	Gövem	60	25 (+1 teke)	SG	D
VI	Gövem	50	29 (+1 teke)	SG	D
VII	Gövem	110	30	SG	D
VIII	Çepni	56	21	SG	A
IX	Güneyfelakettin	125	66	SG	A
X	Güneyfelakettin	20	12	SG	A
XI	Belkaraağaç	100	24	SG	D
XII	Belkaraağaç	160	73	Abort	B
XIII	Yenisefa	130	53	Abort	C
XIV	Doğancı	28	28	SG	B
XV	Seyitler	20	12	Abort, Süt verimi düşüklüğü	A
XVI	Karaağaç	50	24	SG	D
XVII	Karaağaç	60	17	SG	D
XVIII	Akçakavak	35	27	SG	A
XIX	Bahçeköy	50	20	SG	A
XX	Musluklar	70	33 (+2 teke)	Abort, yenidoğan ölümleri	B
Toplam		1340	546		

SG:Sağlıklı görünümlü

A: Kapalı; **B:** Açık, sığır-keçi ortak mera; **C:** Kapalı, sığır-keçi birlikte; **D:** Yarı açık

2.2. Hücre

Araştırmada, BoHV-1 ve CpHV-1'in üretilmesinde, titrasyonunda ve mikronötralizasyon testinde Viroloji Anabilim Dalı stoklarında mevcut olan Madin Darby Bovine Kidney (MDBK) devamlı hücre kültüründen yararlanıldı.

2.3. Viruslar

Araştırmada, mikronötralizasyon testinde Viroloji Anabilim Dalı stoklarında mevcut olan BoHV-1'in Cooper suşu ve Dr. Tempesta'dan sağlanan (Parma/İtalya) CpHV-1'in BA-1 suşu kullanıldı. Viruslar MDBK hücre kültüründe üretilip, titreleri belirlendikten sonra -80°C'lik derin dondurucuda stoklandı.

2.4. Kan Serum Örneklerinin Hazırlanması

Silikonlu tüplere alınan kan örnekleri pıhtılaştıktan sonra 2000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilip, serumları ayrıldı ve stok tüplerine alınan serumlar test edilinceye kadar -20°C'de korundu. Mikronötralizasyon testinde kullanmadan önce serumlar, 56°C'lik su banyosunda, 30 dakika süreyle inaktivasyon işlemine tabi tutuldu.

2.5. Virusların Üretilmesi

Her iki virusun üretilmesinde MDBK hücre kültürü kullanıldı. Bu amaçla 75 cm²'lik hücre kültürü şişelerinde üretilen hücrelerin üretme vasatları döküldükten sonra, hücre yüzeyleri yıkandı. Daha sonra adsorbsiyona bağlı yöntem ile şişe hacminin %1'i oranında virus inokule edildi. Bir saat adsorbsiyon süresinin ardından virus süspansiyonunun üzerine serumsuz Dulbecco's Minimal Essential Medium (DMEM)

vasatı ilave edildi. Doku kültürü mikroskopunda yapılan kontroller sonucunda CPE oluşumunun ardından hücre kültürü şişeleri, intraselüler durumda olan virusun ekstraselüler duruma getirilmesi amacıyla önce -80°C'lik derin dondurucularda donduruldu, ardından 37°C'lik su banyosunda çözöldü. Daha sonra viruslu sıvı 3000rpm'de, 4°C'de, 15 dakika santrifüj edilerek hücrelerin çökmesi sağlandı. Santrifüj sonrası elde edilen virus süspansiyonu, 1 ml'lik porsiyonlar halinde steril tüplere bölünerek, testlerde kullanılmak üzere, -80°C'lik derin dondurucularda stoklandı.

2.6. Virusların Titrasyonu

Bu amaçla Frey ve Liess'in (1971) bildirdiğı yöntem kullanıldı. Her iki virus, içinde DMEM vasatı bulunan bir seri deney tüpünde log₁₀ tabanına göre sulandırıldı. Daha sonra sulandırmalar mikrotitrasyon tabletinin gözlerine, her sulandırma basamağı için 4'er göz olacak şekilde 0.1 ml oranında aktarıldı. Virus ve hücre kontrol için ayrılan gözlerden hücre kontrol gözüne 0.1 ml serumlu DMEM, virus kontrol gözüne 0.05 ml serumsuz DMEM ve 0.05 ml saf virus konuldu. Daha sonra tüm gözlerle 300.000 hücre/ml olacak şekilde, %5 fetal dana serumlu hücre üretme vasatı içinde hazırlanan 0.05 ml oranında hücre süspansiyonu aktarıldı. Tabletler, 37°C'lik, %5 CO₂'li etüve kaldırıldı. Üçüncü günün sonunda doku kültürü mikroskopunda virusun enfeksiyözite gücü Kaerber metoduna (1964) göre hesaplandı.

2.7. ELISA

BoHV-1 gE ve gB gen bölgelerinin kodladığı proteinlere karşı oluşan antikorların tespiti amacıyla ticari ELISA kitleri (Herdcheck IBR gB ve gE antikor ELISA, IDEXX) kullanıldı. Testler, üretici firmanın belirttiğı prosedüre göre yapıldı.

BoHV-1 gB spesifik antikor tespiti amacıyla uygulanan test basamakları aşağıda bildirildiği şekilde uygulandı:

1. Tüm reaksiyon bileşenleri oda ısısına alınıp ve vortekslendi.
2. Her göze 50µl yıkama solüsyonu konuldu.
3. 50µl negatif kontrol ve 50µl pozitif kontrol ikşer göz olacak şekilde aktarıldı.
4. Test serumlarından 50µl gözlere konuldu ve çalkalayıcıda (shaker) bir süre tutuldu.
5. Tabletler bir gece (12-18 saat) 4°C'da inkubasyona bırakıldı.
6. Tabletteki sıvı döküldükten sonra, tüm gözler 300'er µl yıkama solüsyonuyla 5'er kez yıkandı ve kurutuldu.
7. 100 µl konjugat (IBR-gB spesifik monoklonal antikor) tüm gözlere konuldu ve 1 saat oda ısısında inkubasyona bırakıldı.
8. Tabletteki sıvı döküldükten sonra, tüm gözler 300'er µl yıkama solüsyonuyla 5'er kez yıkandı ve kurutuldu.
9. Tüm gözlere 100µl tetrametilbenzidin (TMB) substrat konuldu.
10. Tabletler 10 dakika oda ısısında karanlık ortamda tutuldu.
11. Tüm gözlere 100µl durdurma solüsyonu eklendi.
12. İlk tablettten başlayarak tüm tabletler ELISA Okuyucu'da (Titertek) 450 nm'de okunarak sonuçlar değerlendirildi.

Değerlendirme;

1- Negatif kontrollerin ortalamasının hesaplanması (NCX)

NCX= Testte kullanılan iki negatif kontrol OD'sinin ortalaması hesaplandı.

2- Pozitif kontrollerin ortalamasının hesaplanması (PCX)

PCX= Testte kullanılan iki pozitif kontrol OD'sinin ortalaması hesaplandı.

3- Testin değerlendirilmesi: Negatif kontrolün OD'si - test serum örneğinin OD'si X 100 / Negatif kontrolün OD'si.

Hesaplamalar sonucunda çıkan sonuç %45'den küçükse test negatif, %45-%55 arasındaysa şüpheli, %45 ve üzerindeyse pozitif olarak değerlendirilir.

BoHV-1 gE spesifik antikor tespiti amacıyla uygulanan test basamakları aşağıda bildirildiği şekilde uygulandı:

1. Tüm reaksiyon bileşenleri oda ısısına alındı ve vortekslendi.
2. Her göze 100µl sample diluent konuldu.
3. 100µl negatif kontrol ve 100µl pozitif kontrol ikiye göz olacak şekilde konuldu.
4. Test serumlarından 100µl gözlere konuldu ve karıştırıcıda (shaker) bir süre tutuldu.
5. 1:2 oranında sulandırılmış örnekler bir gece (18-24 saat) oda ısısında kapalı olarak tutuldu.
6. Tabletteki sıvı dököldü, tüm gözler 300'er µl yıkama solüsyonuyla 5'er kez yıkandı ve kurutuldu.
7. Tablet gözlerine 100 µl anti-BHV-1-gE konjugatı konularak, 30 dakika oda ısısında inkubasyona bırakıldı.
8. Tabletteki sıvı dököldü, tüm gözler 300 er µl yıkama solüsyonuyla 5'er kez yıkanıp, kurutuldu.
9. Her göze 100µl TMB substrate konuldu.
10. 15 dakika oda ısısında inkubasyona bırakıldı.
11. Tüm gözlere 100µl stop solüsyonu eklendi.
12. Tüm tabletler ELISA Okuyucu'da 650nm'de okunup, sonuçlar değerlendirildi.

Değerlendirme;

1- Negatif kontrollerin ortalamasının hesaplanması (NCX)

NCX= Testte kullanılan iki negatif kontrol OD'sinin ortalaması hesaplandı.

2- Pozitif kontrollerin ortalamasının hesaplanması (PCX)

PCX= Testte kullanılan iki pozitif kontrol OD'sinin ortalaması hesaplandı.

3- Testin değerlendirilmesi: Test serumlarının OD'si / Negatif kontrolün OD'si.

Hesaplamalar sonucunda çıkan sonuç %60'dan küçük ve eşitse test pozitif, %60-%70 arasındaysa şüpheli, %70'in üzerindeyse negatif olarak değerlendirilir.

2.8. Mikronötralizasyon testi

Tüm keçi serum örnekleri her iki virus yönünden mikronötralizasyon testine tabi tutuldu. Bu amaçla, Frey ve Liess (1971) tarafından bildirilen yöntem kullanıldı. ½ oranında sulandırılan inaktive edilmiş serum örnekleri, 96 gözlü mikronötralizasyon tabletlerinin 2 adet gözüne 50µl hacimde aktararak, üzerine eşit hacimde 100DKID₅₀ oranında sulandırılan viruslardan ayrı ayrı konuldu. Virus kontrol için ayrılan gözlere 50µl serumsuz vasat ve 50µl saf virus; hücre kontrol için ayrılan gözlere ise 100µl serumlu vasat konuldu. Tabletler 2 saat süreyle 37°C'de, %5 CO₂'li etüvlerde inkube edildi. Süre sonunda tüm gözlere 300.000 hücre/ml olarak hazırlanan MDBK hücre süspansiyonundan ilave edilerek, 3. günün sonunda doku kültürü mikroskobunda sitopatolojik değişikliklere göre değerlendirme yapıldı.

2.9. Pozitif Serumların Serum Nötralizasyon 50 Değerlerinin (SN₅₀) Belirlenmesi

BoHV-1 ve/veya CpHV-1 antikor varlığı saptanan serum örneklerinde antikor titresinin belirlenmesi amacıyla, bu serumların 2 katlı (1/2, 1/4, 1/8,...1/256) sulandırmalarına VNT uygulandı. Test 2.2.5'de bildirilen şekilde uygulandı.

2.10. İstatistiksel Analiz

CpHV-1 ve BoHV-1 yönünden yapılan VN testi sonucunda pozitif ve negatif çıkan grupları ayırt etmede alternatif yöntem olarak kullanılan gB/gE ELISA sonuçlarının

istatistiksel olarak anlamlı bir belirleyiciliğinin olup/olmadığı SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL, United States) for Windows 11.5 paket programı kullanılarak yapıldı.

CpHV-1 ve BoHV-1 VNT sonuçlarına göre gB/gE ELISA sonuçlarının uyumluluğu κ katsayısı hesaplanarak değerlendirildi. κ katsayısı;

- <0 ise hiç uyuşma olmadığı,
- 0.0-0.20 ise önemsiz uyuşma olduğu,
- 0.21-0.40 ise orta derecede uyuşma olduğu,
- 0.41-0.60 ise ekseriyetle uyuşma olduğu,
- 0.61-0.80 ise önemli derecede uyuşma olduğu,
- 0.81-1.00 ise neredeyse mükemmel uyuşma olduğu kabul edildi.

CpHV-1 ve BoHV-1 VNT negatif ve pozitif çıkan grupları ayırt etmede gB/gE ELISA sonuçlarının tanısal performanslarını incelemek amacıyla duyarlılık, seçicilik, pozitif ve negatif tahmini değerler ve tanısal doğruluk oranları hesaplandı. Ayrıca klinik semptom (abort, solunum sistemi problemleri) bildirilen işletmeler ile sağlıklı görünümlü işletmelerde saptanan CpHV-1 seropozitiflik oranları arasındaki farklılığın önemi incelendi. Kategorik değişkenler Pearson'un Ki-Kare veya Fisher'in Kesin Sonuçlu Ki-Kare testi kullanılarak değerlendirildi. $P < 0.05$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Analizde kullanılan kavramlar:

Duyarlılık (Sensitivity): Gerçekte hasta olduğu bilinen örneklerin alternatif (tarama\tanı) testle de hasta olarak belirlenme olasılığıdır.

Özgüllük (Specificity): Gerçekte sağlıklı olduğu bilinen örneklerin alternatif (tarama\tanı) testle de sağlıklı olarak belirlenme olasılığıdır.

Pozitif Tahmini Değer (Positive Predicted Value): Alternatif (tarama\tanı) test, hasta olarak sonuç verdiği zaman, olgunun gerçekte de hasta olma olasılığıdır.

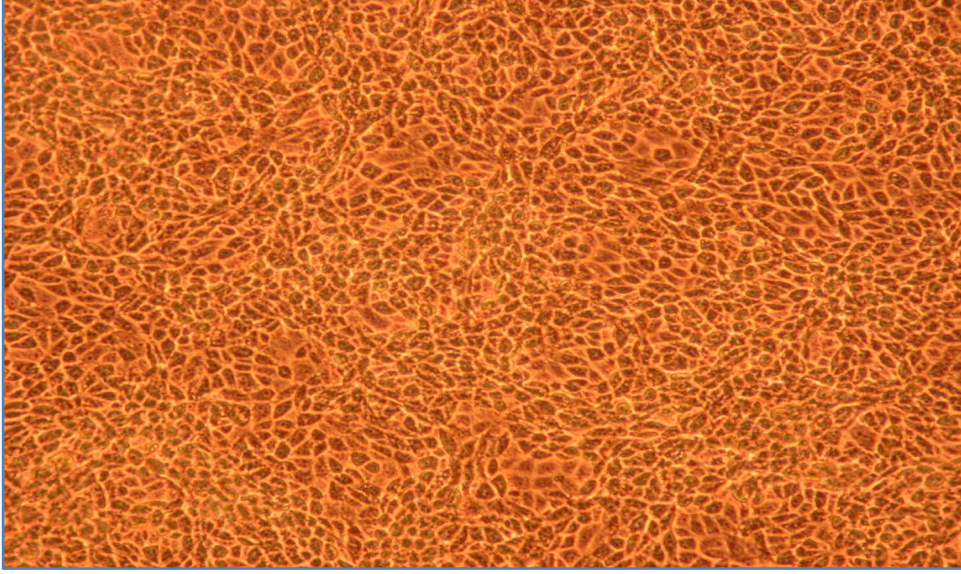
Negatif Tahmini Değer (Negative Predicted Value): Alternatif (tarama\tanı) test sağlıklı olarak sonuç verdiği zaman, olgunun gerçekte sağlıklı olma olasılığıdır.

3. BULGULAR

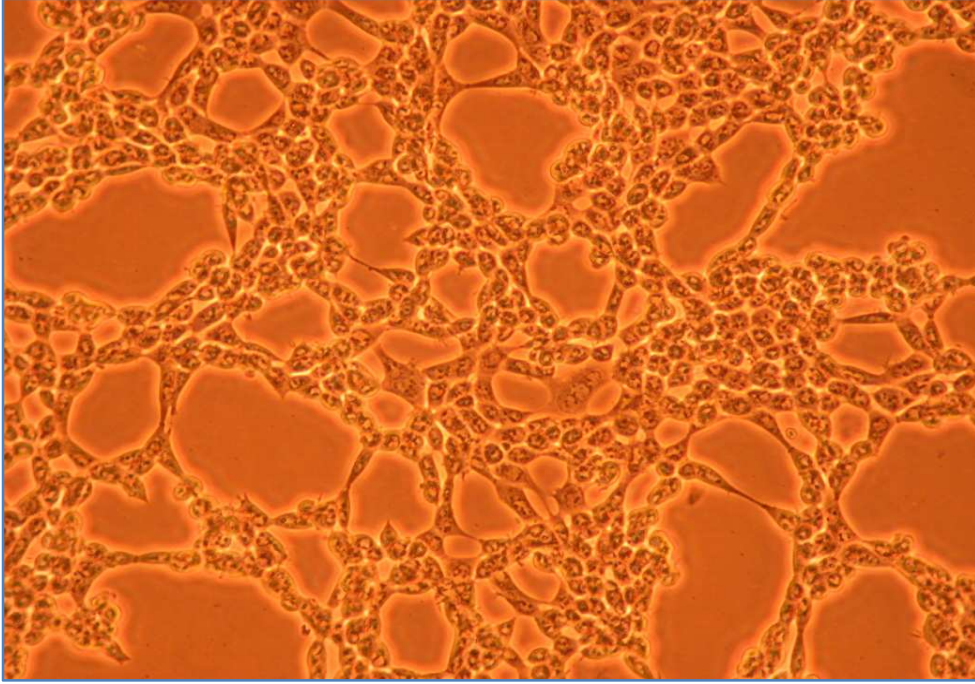
3.1. Virusların Üretilmesi

CpHV-1'in BA-1 suşu ve BoHV-1'in Cooper suşunun MDBK hücre kültürüne yapılan inokulasyonları sonucunda 18-24 saat sonra herpesviruslar için tipik sitopatolojik değişiklikler izlendi. MDBK hücre kontrol Şekil 3.1, CpHV-1 ve BoHV-1'e ait CPE görüntüleri sırasıyla Şekil 3.2 ve Şekil 3.3'de verildi.

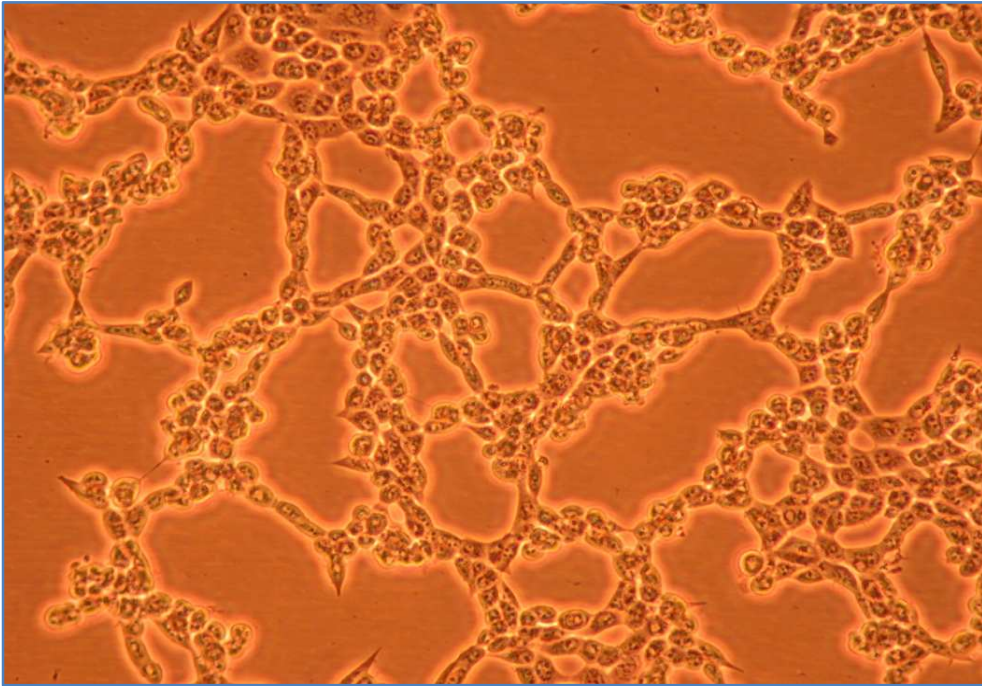
Şekil 3.1. MDBK hücre kültürü (Hücre kontrol) (x 800)



Şekil 3.2. CpHV-1'in BA-1 suşu ile enfekte MDBK hücre kültüründe 18-24. saatte oluşan CPE (x 800)



Şekil 3.3. BoHV-1'in Cooper suşu ile enfekte MDBK hücre kültüründe 18-24. saatte oluşan CPE (x 800)



3.2. Virusların Titrasyon Sonuçları

Araştırmada kullanılan CpHV-1'in BA-1 suşu ile BoHV-1'in Cooper suşunun MDBK hücre kültüründe, mikrotitrasyon yöntemi ile yapılan titrasyonlarında, enfeksiyözite güçleri sırasıyla DKID₅₀: 10^{5.75}/0.1ml ve DKID₅₀: 10^{5.5}/0.1ml olarak belirlendi.

3.3. ELISA Sonuçları

Örneklenen işletmelerin %45'inde (9/20) alphaherpesviruslara (CpHV-1 ve/veya BoHV-1) ait antikor varlığı tespit edildi. Toplam 546 keçiye ait kan serum örneğinin gB ELISA ile kontrolü sonucunda örneklerin %32.78'i (179/546) CpHV-1 ve/veya BoHV-1 yönünden pozitif olarak değerlendirildi. Test edilen örneklerin %32.05'i (175/546) gB(+)/gE(-) olarak bulunurken, % 0.73'ü (4/546) gB(+)/gE(+) olarak değerlendirildi. GB/gE ELISA sonuçları işletmelere göre değerlendirildiğinde, gB(+)/gE(-) örnekler IV, V, VI, VII, XI, XII, XIII, XVIII ve XX numaralı işletmelerde tespit edilirken, gB(+)/gE(+) örnekler yalnızca keçi ve sığırların ortak merayı paylaştıkları ve birlikte barındırıldıkları işletmelerden olan XII ve XIII numaralı işletmelerde tespit edildi. İşletmelere göre pozitiflik oranları, gE spesifik antikor varlığı kriter alınarak CpHV-1 için %20.8-70.0, BoHV-1 için ise %2.73 ve %3.77 olarak bulundu (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. İşletmelere göre ELISA sonuçlarının değerlendirilmesi

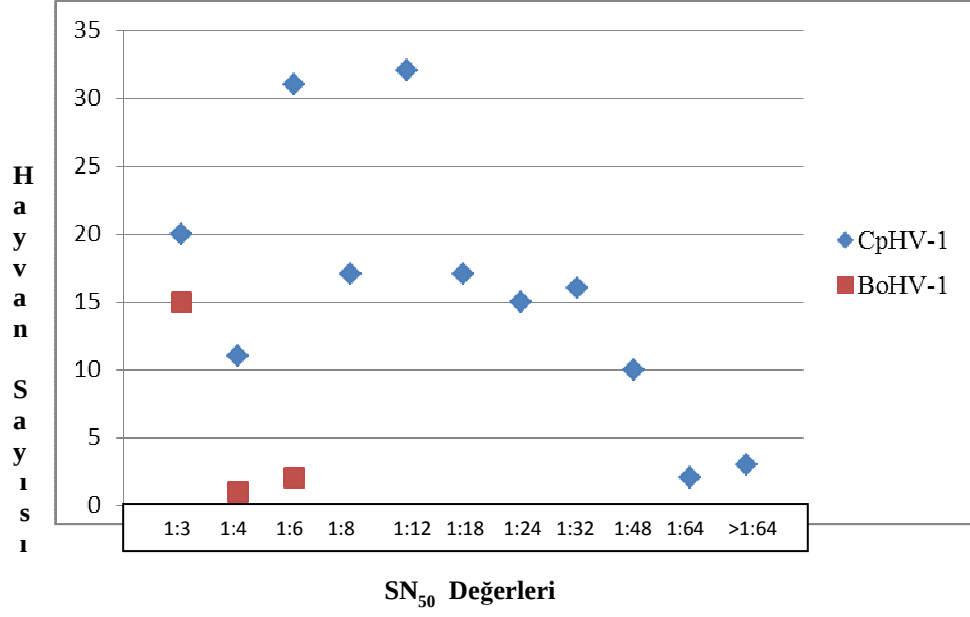
İşletme No	Test Edilen Örnek Sayısı	Antikor		
		gB (+)/gE(-) (%)	gB (+)/gE(+) (%)	gB(-)/gE(-) (%)
I	7	-	-	7
II	20	-	-	20
III	10	-	-	10
IV	11	4 (%36.36)	-	7
V	26	11 (%42.30)	-	15
VI	30	21 (%70.00)	-	9
VII	30	20 (%66.60)	-	10
VIII	21	-	-	21
IX	66	-	-	66
X	12	-	-	12
XI	24	5 (%20.8)	-	19
XII	73	45 (%61.64)	2 (%2.73)	26
XIII	53	34 (%64.15)	2 (%3.77)	17
XIV	28	-	-	28
XV	12	-	-	12
XVI	24	-	-	24
XVII	17	-	-	17
XVIII	27	16 (%59.25)	-	11
XIX	20	-	-	20
XX	35	19 (%54.28)	-	16
Toplam	546	175 (%32.05)	4 (%0.73)	367 (%67.21)

3.4. Mikronötralizasyon Testi Sonuçları

Mikronötralizasyon testi sonucunda örneklenen işletmelerin 9'unda CpHV-1 yönünden pozitiflik tespit edilirken, söz konusu işletmelerin 5'inde BoHV-1 yönünden de pozitiflik belirlendi. Test edilen serumların %31.86'sı (174/546) CpHV-1 antikorları yönünden pozitif bulunurken, %3.29'u (18/546) BoHV-1 antikorları yönünden pozitif olarak değerlendirildi (Çizelge 3.2). İşletmelere göre CpHV-1 antikorları yönünden pozitiflik değerleri %20.83-83.33, BoHV-1 antikorları yönünden pozitiflik değerleri ise %3.70-13.20 olarak tespit edildi. CpHV-1 antikorları yönünden pozitif bulunan 174 kan serum örneğinin mikronötralizasyon testi ile hesaplanan SN_{50} dağılımları 1:3-1:> 64 arasında, geometrik ortalamaları ise 1:31.2 olarak bulundu. BoHV-1 antikorları yönünden pozitif bulunan 18 kan serum örneğinin SN_{50} dağılımları ise 1:3-1:6 arasında bulunurken, geometrik ortalamaları 1:3.43 olarak hesaplandı (Çizelge 3.2). CpHV-1 ve BoHV-1 antikor titre değerlerinin sayısal dağılımı Şekil 3.4'de gösterildi.

Çizelge 3.2. İşletmelere göre CpHV-1 ve BoHV-1 SN₅₀ dağılımları ve ortalamaları

İşletme Kodu	Kan Serumu Sayısı	CpHV-1			BoHV-1		
		VNT (+) Örnek (%)	SN ₅₀ Dağılımı	SN ₅₀ Ortalaması	VNT (+) Örnek (%)	SN ₅₀ Dağılımı	SN ₅₀ Ortalaması
1	7	-			-		
2	20	-			-		
3	10	-			-		
4	11	5 (45.45)	1:6 - > 1:64	1:26.80	-		
5	26	11 (42.30)	1:3 - > 1:64	1:27.72	-		
6	30	21 (70.00)	1:3 - 1:48	1:18.57	-		
7	30	25 (83.33)	1:6 - > 1:64	1:32.56	2 (6.60)	1:3 - 1:6	1:4.5
8	21	-			-		
9	66	-			-		
10	12	-			-		
11	24	5 (20.83)	1:6 - > 1:64	1:42.80	-		
12	73	44 (60.27)	1:6 - > 1:64	1:29.50	4 (5.47)	1:3 - 1:4	1:3.25
13	53	35 (66.03)	1:6 - > 1 :64	1:40.28	7 (13.20)	1:3 - 1:6	1:3.42
14	28	-			-		
15	12	-			-		
16	24	-			-		
17	17	-			-		
18	27	12 (44.44)	1:8 - 1:64	1:32.6	1 (3.70)	1:3 - 1:3	1:3
19	20	-			-		
20	35	16 (45.71)	1:8 - > 1:64	1:30	4 (11 .42)	1:3 - 1:3	1:3
Toplam	546	174 (31.86)		1:31.20	18 (3.29)		1:3.43



Şekil 3.4. CpHV-1 ve BoHV-1 antikor titre değerlerinin sayısal dağılımı

VNT sonuçları değerlendirildiğinde, her iki etken yönünden 18 örnek pozitif olarak bulunurken, yalnızca CpHV-1 yönünden 156 örnek pozitif olarak değerlendirildi (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3. Mikronötralizasyon testi sonuçlarının CpHV-1/BoHV-1 yönünden karşılaştırılması

	CpHV-1 (+)	CpHV-1 (-)	CpHV-1 (D*)
BoHV-1 (+)	18	-	-
BoHV-1 (-)	156	368	4

D* Değerlendirilemeyen örnekler

3.5. ELISA ve Mikronötralizasyon Testi Sonuçlarının CpHV-1 ve BoHV-1 Yönünden Birlikte Değerlendirilmesi

ELISA ve/veya VNT sonuçlarına göre CpHV-1 antikor varlığı 9 işletmede (IV, V, VI, VII, XI, XII, XIII, XVIII, XX) saptanırken, BoHV-1 antikor varlığı ise yine bu 9 işletmenin 5'inde (VII, XII, XIII, XVIII, XX) belirlendi. Bu işletmelerin bulundukları köyler Şekil 3.5'de gösterildi. Bu işletmelerden XII, XIII, XX no'lu

işletmeler keçi ve sığırların ortak merayı paylaştıkları ve birlikte barındıkları işletmeler olup, VII ve XVIII no'lu işletmelerde keçiler ile sığırların bir arada barındırılmadığı ya da ortak merayı paylaşmadığı bilgisi işletme sahiplerinden öğrenildi.

Çalışmada CpHV-1 için VNT ve/veya gB ELISA pozitif örnek sayısı 190 (%34.79), BoHV-1 için VNT ve/veya gE ELISA pozitif örnek sayısı 21 (%3.84) olarak bulundu. BoHV-1 antikorları yönünden pozitif olan bu 21 örnek aynı zamanda CpHV-1 antikorları yönünden de pozitif olarak değerlendirildi.

CpHV-1 yönünden yapılan ELISA ve VN testinde 163 örnek ortak pozitif olarak bulundu. ELISA da pozitif olarak bulunan 12 örnek VNT de negatif bulunurken, ELISA ile negatif bulunan 11 örnek VNT de pozitif olarak değerlendirildi (Çizelge 3.5).

BoHV-1 antikorları yönünden yapılan ELISA ve VNT de 1 örnek ortak pozitif olarak bulunurken (Çizelge 3.6), ELISA'da pozitif olarak belirlenen 3 örnek VNT de negatif olarak değerlendirildi (Çizelge 3.6). ELISA'da negatif olarak değerlendirilen 17 örnek ise, VNT'de pozitif olarak bulundu (Çizelge 3.7).

Çizelge 3.4. İşletmelere göre ELISA ve VNT sonuçlarının CpHV-1 ve BoHV-1 yönünden birlikte değerlendirilmesi

İşletme Kodu	Örneklenen Kan Serum Sayısı	CpHV-1		BoHV-1	
		VNT (+) Örnekler (%)	gB (+)/gE(-) Örnekler (%)	VNT(+) Örnekler (%)	gB (+)/E(+) Örnekler (%)
I	7	-	-	-	-
II	20	-	-	-	-
III	10	-	-	-	-
IV	11	5 (%45.45)	4 (%36.36)	-	-
V	26	11 (%42.30)	11 (%42.30)	-	-
VI	30	21 (%70.00)	21 (%70.00)	-	-
VII	30	25 (%83.33)	20 (%66.60)	2 (%6.60)	-
VIII	21	-	-	-	-
IX	66	-	-	-	-
X	12	-	-	-	-
XI	24	5 (%20.83)	5 (%20.80)	-	-
XII	73	44 (%60.27)	45 (%61.64)	4 (%5.47)	2 (%2.73)
XIII	53	35 (%66.03)	34 (%64.15)	7 (%13.20)	2 (%3.77)
XIV	28	-	-	-	-
XV	12	-	-	-	-
XVI	24	-	-	-	-
XVII	17	-	-	-	-
XVIII	27	12 (%44.44)	16 (%59.25)	1 (%3.70)	-
XIX	20	-	-	-	-
XX	35	16 (%45.71)	19 (%54.28)	4 (%11.42)	-
Toplam	546	174 (%31.86)	175 (%34.79)	18 (%3.29)	4 (%0.73)

Çizelge 3.5. ELISA ve VNT sonuçlarının CpHV-1/BoHV-1 yönünden birlikte değerlendirilmesi

	CpHV-1 VNT		BoHV-1 VNT		Toplam
	+	-	+	-	
gB(+)gE(-)	159	12 + 4 ^{D*}	15	160	175
gB(+)gE(+)	4	-	1	3	4
gB(-)gE(-)	11	356	2	365	367
Ara Toplam	174	368	18	528	542
Toplam	546		546		546

D*.Değerlendirilemeyen örnekler



Şekil 3.5. VNT/ELISA sonuçlarına göre CpHV-1 ve BoHV-1 antikor pozitif işletmelerin bulunduğu köyleri gösteren haritalar (Kırmızı işaretli köylerde CpHV-1, sarı işaretli köylerde de BoHV-1 pozitif serumların saptandığı işletmeler bulunmaktadır.)

ELISA’da sadece dört kan serum örneği gB/gE(+) pozitif olarak değerlendirildi. Serum nötralizasyon testlerinin sonucunda örneklerin hepsi CpHV-1 antikorları yönünden de pozitif bulundu. BoHV-1 antikorları yönünden yapılan ELISA/VN testinde yalnızca bir ortak pozitif örnek tespit edildi (Çizelge 3.6).

Çizelge 3.6. BoHV-1 yönünden ELISA (+) örneklerin CpHV-1 antikorları ile birlikte değerlendirilmesi

İşletme No.	BoHV-1		BoHV-1		CpHV-1	
	gB ELISA	gE ELISA	VNT	SN ₅₀	VNT	SN ₅₀
XII	Pozitif	Pozitif	Negatif	0	Pozitif	1:16
XII	Pozitif	Pozitif	Negatif	0	Pozitif	1:8
XIII	Pozitif	Pozitif	Negatif	0	Pozitif	1:48
XIII	Pozitif	Pozitif	Pozitif	1:3	Pozitif	>1:64

BoHV-1 VNT (+) örneklerin CpHV-1 VNT ve gB/gE ELISA sonuçları ile birlikte değerlendirilmesi sonucunda, BoHV-1 antikorları yönünden pozitif olan tüm örneklerin CpHV-1 antikor yönünden pozitif olduğu ve SN₅₀ değerlerinin 1:24->1:64 arasında olduğu tespit edildi. Söz konusu örneklerde BoHV-1 antikor titre değerlerinin ise 1:3-1:6 arasında olduğu ve CpHV-1'e karşı oluşan antikor titre değerlerinden düşük olduğu görüldü.

Çizelge 3.7. BoHV-1 VNT (+) örneklerin CpHV-1 VNT ve gB/gE ELISA sonuçları ile birlikte değerlendirilmesi

Serum Sıra No	İşletme No	ELISA		SN ₅₀	
		gB	gE	CpHV-1	BoHV-1
108	VII	negatif	negatif	>1:64	1:3
131	VII	POZİTİF	negatif	>1:64	1:6
305	XII	POZİTİF	negatif	>1:64	1:3
315	XII	POZİTİF	negatif	>1:64	1:3
324	XII	POZİTİF	negatif	1:32	1:4
327	XII	POZİTİF	negatif	>1:64	1:3
331	XIII	POZİTİF	negatif	>1:64	1:3
337	XIII	POZİTİF	negatif	1:32	1:3
347	XIII	POZİTİF	negatif	>1:64	1:3
349	XIII	POZİTİF	negatif	1:48	1:3
359	XIII	POZİTİF	POZİTİF	>1:64	1:3
363	XIII	POZİTİF	negatif	>1:64	1:3
380	XIII	POZİTİF	negatif	>1:64	1:6
472	XVIII	POZİTİF	negatif	1:64	1:3
512	XX	negatif	negatif	1:48	1:3
516	XX	POZİTİF	negatif	1:64	1:3
518	XX	POZİTİF	negatif	1:24	1:3
531	XX	POZİTİF	negatif	>1:64	1:3

3.6. İstatistiksel Analiz

CpHV-1 VN testi sonucunda pozitif ve negatif çıkan grupları ayırt etmede alternatif yöntem olarak gB ELISA sonuçlarının istatistiksel olarak anlamlı bir

belirleyiciliğinin olduğu, CpHV-1 ile gB sonuçlarının mükemmel düzeyde uyumlu olduğu görüldü ($\kappa=0.897$ ve $p<0.001$). CpHV-1 VN testinde 4 örnek kontamine olduğu için değerlendirme dışında tutuldu. CpHV-1 VN testi sonucunda pozitif ve negatif çıkan grupları ayırt etmede alternatif yöntem olarak sadece gE ELISA'nın uygun bir yöntem olmadığı istatistiki olarak anlamlı bulundu ($\kappa=0.032$ ve $p=0.010$). CpHV-1 VN testi sonucu pozitif ve negatif çıkan grupları ayırt etmede alternatif yöntem olarak gB/gE ELISA (bir arada değerlendirildiğinde) sonuçlarının istatistiksel olarak anlamlı bir belirleyiciliğinin olduğu, CpHV-1 ile gB/gE sonuçlarının mükemmel düzeyde (gB'nin katkısından dolayı) uyumlu olduğu görüldü ($\kappa=0.897$ ve $p<0.001$). Çizelge 3.8'de gB/gE ELISA'nın tanısal performansına ilişkin göstergeler yer almaktadır.

Çizelge 3.8. CpHV-1 VNT sonucu pozitif ve negatif çıkan grupları ayırt etmede alternatif yöntem olarak gB/gE ELISA'nın duyarlılık, seçicilik, pozitif ve negatif tahmini değerleri ve doğruluk oranları

	Tanımlar	gB	gE	gB+gE #
Örnek Sayısı	N	537	537	537
Duyarlılık	GP/(GP+YN)	159/171 (%93,0)	4/171 (%2,3)	159/171 (%93,0)
Seçicilik	GN/(GN+YP)	354/366 (%96,7)	366/366 (%100,0)	354/366 (%96,7)
PTD	GP/(GP+YP)	159/171 (%93,0)	4/4 (%100,0)	159/171 (%93,0)
NTD	GN/(YN+GN)	354/366 (%96,7)	366/533 (%68,7)	354/366 (%96,7)
Doğruluk	(GP+GN)/(N)	514/537 (%95,5)	370/537 (%68,9)	514/537 (%95,5)
κ Katsayısı		0,897	0,032	0,897
p-değeri		<0,001†	0,010‡	<0,001†

PTD: Pozitif Tahmini Değer, NTD: Negatif Tahmini Değer, #: gB/gE ELISA testlerinin her ikisinin negatif olması negatif olarak, gB/gE ELISA testlerinden birinin pozitif olması pozitif olarak kabul edildi, †: Pearson'un Ki-Kare testi, ‡: Fisher'in Kesin Sonuçlu Ki-Kare testi.

BoHV-1 VN testi sonucunda pozitif ve negatif çıkan grupları ayırt etmede alternatif yöntem olarak gB ELISA sonuçlarının istatistiksel olarak anlamlı bir belirleyiciliğinin olduğu, ancak BoHV-1 VN testi ile gB sonuçlarının önemsiz düzeyde uyumlu olduğu görüldü ($\kappa=0.112$ ve $p=0.010$). BoHV-1 VN testi sonucunda pozitif ve negatif çıkan grupları ayırt etmede alternatif yöntem olarak gE ELISA sonuçlarının istatistiksel olarak anlamlı bir belirleyiciliğinin olmadığı görüldü

($p=0.127$). BoHV-1 VN testi sonucunda pozitif ve negatif çıkan grupları ayırt etmede alternatif yöntem olarak gB/gE ELISA sonuçlarının istatistiksel olarak anlamlı bir belirleyiciliğinin olduğu, ancak BoHV-1 VNT ile gB/gE sonuçlarının önemsiz düzeyde uyumlu olduğu görüldü ($\kappa=0.112$ ve $p=0.010$). Çizelge 3.9’da gB ve gE’nin tanısal performansına ilişkin göstergeler yer almaktadır.

Çizelge 3.9. BoHV-1 VNT sonucu pozitif ve negatif çıkan grupları ayırt etmede alternatif yöntem olarak gB/gE ELISA’nın duyarlılık, seçicilik, pozitif ve negatif tahmini değerleri ve doğruluk oranları

	Tanımlar	gB	gE	gB+gE #
Örnek Sayısı	N	541	541	541
Duyarlılık	GP/(GP+YN)	16/18 (%88,9)	1/18 (%5,6)	16/18 (%88,9)
Seçicilik	GN/(GN+YP)	364/523 (%69,6)	520/523 (%99,4)	364/523 (%69,6)
PTD	GP/(GP+YP)	16/175 (%9,1)	1/4 (%25,0)	16/175 (%9,1)
NTD	GN/(YN+GN)	364/366 (%99,5)	520/537 (%96,8)	364/366 (%99,5)
Doğruluk	(GP+GN)/(N)	380/541 (%70,3)	521/541 (%96,3)	380/541 (%70,3)
κ Katsayısı		0,112	0,080	0,112
p-değeri		<0,001†	0,127‡	<0,001†

PTD: Pozitif Tahmini Değer, NTD: Negatif Tahmini Değer, #: gB ve gE ELISA’ların her ikisinin negatif olması negatif olarak, gB veya gE ELISA’ların birinin pozitif olması pozitif olarak kabul edildi, †: Pearson’un Ki-Kare testi, ‡: Fisher’in Kesin Sonuçlu Ki-Kare testi.

Araştırmada ayrıca sık sık abort, solunum sistemi bulguları bildirilen işletmelerde (XII, XIII, XV, XX no.lu) tespit edilen CpHV-1 pozitiflik oranları (%60,6; 98/173) enfeksiyon bildirilmeyen işletmeler (%20,6; 77/373) ile karşılaştırıldığında, enfeksiyon bildirilen işletmelerdeki pozitiflik oranları istatistiki olarak önemli bulundu ($p<0.001$).

4. TARTIŞMA

Ruminant herpesvirusları temel olarak kendi konakçılarında enfeksiyon oluşturmalarına rağmen, çapraz-tür geçişi doğal şartlar altında gelişebilmekte ve en azından primer enfeksiyon sırasında yeni konakçılara yayılabilmektedirler (Thiry ve ark., 2006). BoHV-1 genomu keçi, koyun, manda, bizon ve birkaç geyik türünde saptanmıştır (Kalman ve Egyed, 2005; Sausker ve Dyer, 2002; Scicluma ve ark., 2010; Thiry ve ark., 2006). Her ne kadar keçilerin BoHV-1 ile nadir olarak enfekte oldukları düşünülse de, sığır ve keçilerin birlikte barındığı ya da aynı merayı paylaştıkları durumda enfekte olmaları mümkün görülmektedir (Thiry ve ark., 2008). CpHV-1 ve diğer ruminant alphaherpesviruslarının epidemiyolojisinin sürekli izlenmesi, IBR kontrol ve eradikasyonunu benimseyen Avrupa ülkelerinde zorunludur. Çünkü potansiyel IBR ilişkili virus rezervuarlarını tanımlamak, IBR'nin tanısında karışıklığın önlenmesinde gereklidir (Lyaku ve ark., 1992; Nixon ve ark., 1988; Thiry ve ark., 2006a).

Bu nedenlerle her iki enfeksiyonun keçilerde varlığının/yaygınlığının araştırılmasına ve oluşturdukları klinik bulgulara bağlı olarak ekonomik anlamda etkilerinin belirlenmesine ihtiyaç olduğu düşüncesiyle planlanan bu çalışmada, Bolu iline ait köylerde yeralan işletmelerde yetiştirilen Saanen keçilerinde BoHV-1 ve/veya CpHV-1 varlığı/yaygınlığı araştırılmış, keçilerde CpHV-1/BoHV-1 enfeksiyonlarının tespitinde BoHV-1 antikor varlığını belirlemede kullanılan gB/gE blocking ELISA sistemlerinin kullanılabilirliği sorgulanmıştır. Ayrıca her iki virus için ayrı ayrı uygulanan virus nötralizasyon testleri ile de sonuçlar karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

Bu amaçla, Bolu ilinin 11 farklı köyünde bulunan 20 işletmede barındırılan 546 keçiden (542 dişi, 4 teke) alınan kan serum örnekleri öncelikle BoHV-1 gB/gE ELISA kombinasyonu ile test edilmiştir. Örneklenen işletmelerin %45'inde (9/20) CpHV-1 ve/veya BoHV-1 antikor varlığı tespit edilmiştir. Toplam 546 keçiye ait kan

serum örneğinin gB ELISA ile kontrolü sonucunda örneklerin %32.78'u (179/546) CpHV-1 ve/veya BoHV-1 yönünden pozitif olarak değerlendirilmiştir. Test edilen örneklerin %32.05'i (175/546) gB(+)/gE(-) olarak bulunurken, % 0.73'ü (4/546) gB(+)/gE(+) olarak belirlenmiştir. ELISA sonuçları işletmelere göre değerlendirildiğinde, gE spesifik antikor varlığının BoHV-1 ile enfeksiyonu gösterdiği görüşüne göre, CpHV-1'e karşı antikor varlığı IV, V, VI, VII, XI, XII, XIII, XVIII ve XX numaralı işletmelerde tespit edilirken, BoHV-1'e karşı antikor varlığı yalnızca keçi ve sığırların ortak merayı paylaştıkları ve birlikte barındırıldıkları işletmelerden olan XII ve XIII no'lu işletmelerde tespit edilmiştir. İşletmelere göre pozitiflik oranları CpHV-1 için %20.80-70.00, BoHV-1 için ise, %2.73 ve %3.77 olarak bulunmuştur (Çizelge 3.1).

Laura ve ark.'nın (2012) yaptığı çalışmada 12 gebe, 6 adet gebe olmayan keçiye CpHV-1 veya BoHV-1'in intranasal olarak inokülasyonu yapılmıştır. Antikor yanıtı, gB/gE-ELISA ile kontrol edilmiş ve hangi virusun kullanıldığına bakılmaksızın tüm keçiler gB ELISA pozitif bulunmuşlardır. BoHV-1 ile enfekte edilmiş bir keçiden alınan örnek dışında diğer tüm örnekler gE ELISA negatif bulunmuşlardır. Bu sonuçlara bakılarak gB ELISA testinin, keçilerde alphaherpesvirus enfeksiyonlarının tanısında güvenilir bir test olduğu belirtilmiştir.

Bu çalışmada alınan tüm örnekler CpHV-1 ve BoHV-1 antikorları yönünden mikronötralizasyon testi ile de kontrol edilmiştir. Mikronötralizasyon testi sonucunda örneklenen işletmelerin 9'unda CpHV-1 yönünden pozitiflik tespit edilirken, söz konusu işletmelerin 5'inde BoHV-1 yönünden de pozitiflik belirlenmiştir. Test edilen serumların %31.86'sı (174/546) CpHV-1 antikorları yönünden pozitif bulunurken, %3.29'u (18/546) BoHV-1 antikorları yönünden pozitif olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 3.2).

CpHV-1 antikorları yönünden pozitif olarak değerlendirilen kan serum örneklerinin SN_{50} dağılımları 1:3->1:64 arasında bulunurken, SN_{50} değerlerinin geometrik ortalamaları 1:31.2 olarak belirlenmiştir. BoHV-1 antikorları yönünden pozitif bulunan kan serum örneklerinin SN_{50} dağılımları ise 1:3-1:6 arasında bulunurken, ortalamaları da 1:3.43 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 3.2). VNT sonuçları değerlendirildiğinde, her iki etken yönünden 18 örnek ortak pozitif olarak bulunurken, yalnızca CpHV-1 yönünden 156 örnek pozitif olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 3.3).

VNT kullanılarak yapılan testlerde, CpHV-1'e karşı antikor varlığı Yunanistan'da %50 den fazla (Koptopoulos ve ark., 1988), İtalya'da %30-60 arası (Guercio ve ark., 1998; Tempesta ve ark., 1994), İspanya'da %21 (Keuser ve ark., 2004) olarak belirlenmiştir. Türkiye'de Yonguç ve ark.(1990) yaptıkları çalışmada örneklenen keçilerin kan serum örneklerinin %26'sında CpHV-1'e karşı antikor varlığı saptanmıştır. Bu çalışmada CpHV-1'e karşı saptanan pozitiflik değeri diğer çalışmalarla benzer oranlarda bulunmuştur.

Keçilerde BoHV-1 seroprevalansı ise Nijerya'da %11.2 (Taylor ve ark., 1977), Kanada'da %6.9 (Elazhary ve ark.,1984), ABD'de %13.2 (Fulton ve ark., 1982) ve Mısır'da %27.6 (Mahmoud ve Ahmed, 2009) olarak saptanmıştır. Türkiye'de Yeşilbağ ve ark. (2003) VNT ile keçilerde BoHV-1'e karşı %5.52, Yeşilbağ ve ark. (2010) başka bir çalışmada %26.6 oranında antikor varlığı tespit ederken, Ataseven ve ark. (2010) Van ilindeki keçilerde %0.7 oranında BoHV-1 antikor varlığı belirlemişlerdir. Bu çalışmada keçilerde BoHV-1'in seroprevalansı düşük oranda (%3.29) bulunmuştur. Keçilerin BoHV-1 ile nadir olarak enfekte oldukları bilgisi de dikkate alınarak, söz konusu sürülerde ortak merayı paylaşan 3 işletme (XII, XII ve XX no'lu) dışında sığır-keçi temasının da bulunmaması -çapraz reaksiyon olasılığı hariç tutulursa- BoHV-1 pozitiflik değerlerinin örneklenen populasyonda çok düşük olmasının önemli bir faktörü olarak görülmüştür.

ELISA ve her iki etken yönünden yapılan VN testlerinin karşılaştırmalı değerlendirilmesi sonucunda, CpHV-1 antikor varlığı 9 işletmede (IV, V, VI, VII, XI, XII, XIII, XVIII, XX) saptanırken, BoHV-1 antikor varlığı ise yine bu 9 işletmenin 5'inde (VII, XII, XIII, XVIII, XX) belirlenmiştir. Bu işletmelerden XII, XIII, XX no'lu işletmeler keçi ve sığırların ortak merayı paylaştıkları ve birlikte barındıkları işletmeler olup, VII ve XVIII no.lu işletmelerde ise keçi ve sığır temasının olmadığı bilgisi işletme sahiplerinden öğrenilmiştir. Söz konusu iki işletmede (VII ve XVIII no.lu) keçi/sığır temasının olmadığı bildirilmesine rağmen, BoHV-1 yönünden yapılan VN testinde saptanan sırasıyla % 6.60 ve %3.70 oranında pozitiflik değeri bir çapraz reaksiyon olabileceğini düşündürmektedir. Bu konu üzerine yapılacak deneysel çalışmalar ile her iki virus arasında olası çapraz reaksiyonların oranı daha gerçekçi olarak irdelenebilecektir.

Çalışmada CpHV-1 için VNT ve/veya ELISA pozitiflik oranı %34.79 (190/546), BoHV-1 için VNT ve/veya ELISA pozitiflik oranı %3.84 (21/546) olarak tespit edilmiştir. BoHV-1 yönünden yapılan VNT de antikor varlığı belirlenen örnekler, CpHV-1 yönünden de pozitif olarak değerlendirilmiştir. Martin ve ark. (1990) keçi orijinli herpesviruslar ile geyik ve sığır orijinli herpesvirusları karşılaştırmış ve farklı bulmuştur. Söz konusu çalışmada CpHV-1'e karşı gelişen antikorlar BoHV-1 suşlarını nötralize edememiş, BoHV-1'e karşı elde edilen antikorlar CpHV-1 suşlarını sınırlı düzeyde nötralize etmiştir. Bu çalışmada da, BoHV-1 antikorları yönünden pozitif bulunan örneklerin hepsinin CpHV-1 antikorları yönünden de pozitif bulunması Martin ve ark.(1990)'nın çalışmasını destekler niteliktedir. Aynı şekilde, Silva ve ark. (2013) da Brezilya'da keçilerde yaptıkları çalışmada VNT ile BoHV-1 yönünden seropozitif buldukları tüm hayvanları aynı zamanda CpHV-1 antikorları yönünden de pozitif bulmuşlardır.

BoHV-1 yönünden yapılan VNT'de pozitif olarak belirlenen örneklerin antikor titre değerlerinin CpHV-1 ile karşılaştırılması durumunda, söz konusu 18 örneğin 13 ünde CpHV-1 antikorlarının 1:64 ve üzerinde olduğu, geri kalan örneklerde de 1:24-

1:48 arasında olduğu görülmektedir (Çizelge 3.2). Özellikle CpHV-1 antikor titresi yüksek olan örneklerde BoHV-1 antikorları tespit edilmesi her iki virus arasında olası çapraz reaksiyonlar açısından irdelenmesi gereken bir konudur. Çapraz nötralizasyon testlerinde homolog türe ait titre, heterolog türden daha yüksek ise pozitif kabul edilmektedir (Thiry ve ark., 2008). Bu çalışmada, gE ELISA (-) olarak belirlenen bu örneklerdeki BoHV-1 antikor pozitifliğinin çapraz reaksiyon varlığına işaret etmesinin yanı sıra, gE spesifik ELISA'nın duyarlılığının yaklaşık %70 olduğu (Kramps ve ark., 2004) ve gE antikorlarının tespitinin enfeksiyondan 42 gün sonraya kadar gecikebilme olasılığı (Beer ve ark., 2003) bilgisiyle de yanlış negatif değerlendirmeler olabileceği akla gelmektedir. Bu olasılıkların yanı sıra, BoHV-1'e karşı tespit edilen düşük antikor titrelerinin, BoHV-1 enfeksiyonu sonrasında kazanılan antikorların 3 yıla kadar tespit edilebilmesi (Kaashoek ve ark., 1995) nedeniyle, daha önceden geçirilen bir BoHV-1 enfeksiyonuna ait olabileceği de düşünülmektedir. Bu konunun daha iyi irdelenebilmesi adına hem CpHV-1, hem de BoHV-1 kullanılarak deneysel çalışmaların gerçekleştirilmesi ve her iki teknik kullanılarak değerlendirme yapılabilmesi gerekli görülmektedir.

CpHV-1 yönünden yapılan her iki testte (VNT ve ELISA) ortak pozitif değerlendirilen örnek oranı % 87,63 (163/190) dır. CpHV-1 yönünden ELISA'da pozitif olarak bulunan 12 örnek VNT de negatif bulunurken, ELISA ile negatif bulunan 11 örnek VNT de pozitif olarak değerlendirilmiştir. CpHV-1 VNT ve gB uyumu yapılan istatistiksel analiz ile de desteklenmiştir. Bu sonuca göre, CpHV-1 antikorlarının tespitinde gB/gE ELISA sisteminin enfeksiyonun hızlı tanısında rahatlıkla kullanılabileceği bir kez daha ortaya konmuştur.

BoHV-1 antikorları yönünden her iki testte ortak pozitif örnek oranı %4.76 (1/21) dir. BoHV-1 yönünden ELISA'da pozitif olarak belirlenen 3 örnek VNT'de negatif olarak bulunmuştur. ELISA'da negatif olarak değerlendirilen 17 örnek VNT de pozitif olarak değerlendirilmiştir. BoHV-1 VNT ve ELISA tekniklerinin arasındaki uyumluluk istatistiksel olarak düşük düzeyde bulunmuştur ($p=0.010$). Bu

duruma etki eden birçok faktör olabileceği düşünülmektedir. Daha önceden de bildirildiği üzere, VN testinde olası çapraz reaksiyonlar, gE ELISA'nın duyarlılığının düşük oluşu, VN testinde kullanılan serumların referenz titrelerinin düşük tutulması (1/2), örneklenen sürülerde yeni kazanılmış bir BoHV-1 enfeksiyonunun söz konusu olmaması bunlardan en önemlileri olarak söylenebilir. Keçilerde BoHV-1 antikorlarının tespitinde bu olasılıklar göz önünde tutularak BoHV-1 varlığının tespitinde ELISA'nın yanı sıra her iki etken yönünden yapılacak VN testi ile antikor titre değerlerinin karşılaştırılması uygun görülmektedir. Ayrıca, keçilerde saptanan alphaherpesvirus spesifik antikorlarının CpHV-1 ve BoHV-1 yönünden ayırıcı tanısı amacıyla uygulanan VNT'de serum sulandırma oranlarının CpHV-1 için 1:2, BoHV-1 için en azından 1:8'den başlayarak uygulanması önerilmektedir.

Örneklenen işletmelerden V, VI ve XX no'lu işletmelerde bulunan toplam 4 tekeden kan serum örneği alınmış olup, söz konusu tekeler CpHV-1 yönünden seropozitif bulunmuşlardır. Bu işletmelerde CpHV-1 antikor pozitifliği sırasıyla, %42.30, %70.00, %54.28 olarak belirlenmiştir. Bu işletmelerde yüksek CpHV-1 seropozitiflik değerinin saptanmasında bir faktör olarak seropozitif tekelerle çiftleşme düşünülmektedir. Nitekim, Silva ve ark. (2013) aynı şekilde enfeksiyonun semen yoluyla bulaşmasından dolayı doğal çiftleşmenin, CpHV-1 seropozitif keçi sürülerindeki prevalans artışıyla ilişkili olduğunu öne sürmüşlerdir. Enfeksiyonun kontrolünde bu konuya dikkat edilmesi önemli görülmektedir.

Örnekleme yapılan bazı işletmelerde (XII, XIII ve XX no'lu) abortlar, yeni doğan ölümleri ve süt veriminde düşme, üst solunum yolu enfeksiyonu bulguları bildirilmiş ve bu işletmelerde belirlenen CpHV-1 pozitiflik oranları istatistiki anlamda da önemli bulunmuştur ($p < 0.001$). Söz konusu bulgularda CpHV-1 enfeksiyonunun rolü olabileceği düşünülmekte; ancak bu konunun ileride yapılabilecek etiyolojik ajanı belirlemeye yönelik çalışmalar ile desteklenmesi uygun görülmektedir.

Bu çalışmada, örneklenen popülasyonda keçilerde alphaherpesvirusların seroprevalansına ilişkin güncel veriler elde edilmiştir. Keçilerde alphaherpesvirus (CpHV-1 ve BoHV-1) enfeksiyonlarının yaygınlığının araştırılması ve buna bağlı oluşan ekonomik kayıpların belirlenmesi amacıyla daha geniş çaplı çalışmaların yapılması gerekli görülmektedir. Keçi popülasyonlarında alphaherpesvirus enfeksiyonlarına bağlı olarak meydana gelen kayıpların belirlenmesi durumunda antijenik yakınlıktan yararlanılarak BoHV-1 enfeksiyonu için kullanılan marker aşılar keçilerde kullanılabilecektir. Bu konu üzerine yapılmış saha çalışmaları (Thiry ve ark., 2007) söz konusu aşılarda keçilerde de klinik semptomları engelleyebildiği yönündedir.

BoHV-1 gB blocking ELISA'nın kullanımı ruminant alphaherpesvirusların tespitinde birçok araştırmacının bildirdiği şekilde en iyi serolojik tanı metodu olarak görülmekle birlikte, enfeksiyona neden olan etkenin (CpHV-1 ve/veya BoHV-1) belirlenmesi amacıyla daha duyarlı metotların geliştirilmesine ihtiyaç olduğu düşünülmektedir. Spesifik etken tespitine yönelik geliştirilen PCR (Nandi ve ark., 1989) ve IF testleri (Wyler ve ark., 1989) bulunmaktadır ancak serolojik tanıda ayırımı sağlayabilecek özgün bir test bulunmamaktadır. Özellikle alphaherpesviruslarda gE bölgesinin farklılığından yararlanılarak CpHV-1 gE bölgesine spesifik duyarlı kitlerin geliştirilmesi durumunda bu karışıklığın önemli ölçüde önlenebileceğini düşünmekteyiz.

Yakın zamana kadar BoHV-1'in varlığı ve yayılmasında yalnızca sığırların önemli olduğu düşünülmüş, evcil, vahşi birçok ruminant türünün de enfekte olabileceği konusu üzerinde fazla durulmamıştır. Son yıllarda, seropozitif olarak saptanan hayvanların epidemiyolojik önemleri halen tam olarak bilinmemesine rağmen, potansiyel rezervuar olarak düşünülmektedirler (Kalman ve Egyed, 2005; Scicluna ve ark., 2010). Bu konu üzerine yapılacak çalışmalar BoHV-1'in epidemiyolojisinin daha iyi anlaşılabilmesine katkıda bulunabilmesinin yanında, enfeksiyonun kontrol/eradikasyonunda daha etkili önlemler alınabilmesine de hizmet

edebilecektir. BoHV-1 enfeksiyonu Türkiye’de sığırlarda yaygın olarak görülmektedir. BoHV-1 antikorlarının sığırlarda yaygınlığının belirlendiği çalışmalarda (Alkan ve ark., 2005; Bilge, S., 1996; Çabalar, M., 1993) değişen oranlarda seropozitiflik saptanmıştır. Türkiye’de ülke genelinde yürütülen bir BoHV-1 eradikasyon programı bulunmamaktadır. Bazı kamu ve özel işletmelerde marker aşı uygulamasına dayalı kontrol programları uygulanmaktadır. Ulusal bir eradikasyon programı uygulandığında, BoHV-1 ile ilişkili virus rezervuarlarının saptanması konusu da gündeme gelebilecektir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu araştırmada,

- Bolu ilinde yetiştirilen Saanen keçilerinde CpHV-1 enfeksiyonunun varlığı/yaygınlığı serolojik olarak ortaya konulmuştur.
- Örnekleme yapılan bazı işletmelerde abortlar, yeni doğan ölümleri ve süt veriminde düşme, üst solunum yolu enfeksiyonu bulguları bildirilmiş ve bu işletmelerde belirlenen CpHV-1'in seroprevalansının istatistiki anlamda önemli olduğu görülmüştür.
- CpHV-1 VNT ve gB blocking ELISA uyumu elde edilen sonuçlar ve yapılan istatistiksel analiz ile desteklenmiş, CpHV-1 antikorlarının tespitinde gB/gE ELISA sisteminin enfeksiyonun hızlı tanısında kullanılabileceği bir kez daha ortaya konmuştur.
- Keçilerde alphaherpesvirus enfeksiyonlarının serolojik tanısında gB blocking ELISA'nın kullanılabileceği ortaya konmuş ancak BoHV-1 antikorlarının belirlenmesinde kullanılan gE blocking ELISA'nın VNT ile uyumu istatistiksel olarak düşük düzeyde bulunmuştur. Bu nedenle, enfeksiyona neden olan etkenin (CpHV-1 ve/veya BoHV-1) belirlenmesi amacıyla daha duyarlı metotların geliştirilmesine ihtiyaç olduğu düşünülmektedir.
- Keçilerde BoHV-1 antikorlarının tespitinde ELISA'nın yanı sıra her iki etken yönünden yapılacak VN testi temelli SN_{50} değerlerinin karşılaştırılması önem arz etmektedir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre, CpHV-1 yönünden yapılacak sulandırmanın 1:2 ile başlaması ve BoHV-1 yönünden yapılacak sulandırmalarda ise

en azından 1:8 sulandırma oranının başlangıç dilusyon olarak kullanılması önerilmektedir.

- Enfeksiyonun semen yoluyla bulaşmasından dolayı doğal çiftleşmenin, CpHV-1 enfeksiyonunun yayılmasında etkili olabileceği, bu nedenle tekelerin sürüye katılmadan önce test edilmesinin enfeksiyonunun kontrolünde önemli olabileceği düşünülmektedir.

- Keçilerde alphaherpesvirus (CpHV-1 ve BoHV-1) enfeksiyonlarının yaygınlığının araştırılması ve buna bağlı oluşan ekonomik kayıpların belirlenmesi amacıyla daha geniş çaplı çalışmaların yapılması gerekli görülmektedir. Keçi populasyonlarında alphaherpesvirus enfeksiyonlarına bağlı oluşan kayıpların belirlenmesi durumunda antijenik yakınlıktan yararlanılarak BoHV-1 enfeksiyonu için kullanılan marker aşılar keçilerde kullanılabilecektir.

ÖZET

Bolu ili ve çevresinde keçilerde alphaherpesvirus (BoHV-1 ve CpHV-1) enfeksiyonlarının serolojik olarak araştırılması

Bu çalışmada, Bolu ili ve çevresinde keçilerde alphaherpesvirus (BoHV-1 ve CpHV-1) enfeksiyonlarının varlığının/yaygınlığının serolojik olarak araştırılması ve keçilerde alphaherpesvirusların tanısında gB/gE ELISA kombinasyonunun kullanılabilirliğinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla, 546 Saanen keçisinden alınan kan serumu örnekleri ELISA ve VNT kullanılarak test edilmiştir. glikoprotein B ve gE ELISA ile test edilen örneklerin %32.05'i (175/546) CpHV-1 antikor pozitifliğini yansıtan gB(+)/gE(-) olarak bulunurken, % 0.73'ü (4/546) BoHV-1 antikorları yönünden pozitifliği yansıtan gB(+)/gE(+) olarak belirlenmiştir. Her iki virus için ayrı ayrı yapılan virus nötralizasyon testi sonuçlarına göre serumların %31.86' sı (174/546) CpHV-1 antikorları yönünden pozitif bulunurken, %3.29'u (18/546) BoHV-1 antikorları yönünden pozitif olarak değerlendirilmiştir. Örneklenen keçilerde CpHV-1/BoHV-1 enfeksiyonlarının varlığı/yaygınlığı serolojik olarak ortaya konulmuştur. Keçilerde alphaherpesvirus enfeksiyonlarının serolojik tanısında gB blocking ELISA'nın alternatif test olarak kullanılabileceği düşünülmekte ancak CpHV-1/BoHV-1 antikorlarının ayırımında kullanılan gE blocking ELISA'nın VNT ile uyumunun düşük düzeyde olması nedeniyle enfeksiyona neden olan etkenin (CpHV-1 ve/veya BoHV-1) belirlenmesi amacıyla daha duyarlı metotların geliştirilmesine ihtiyaç olduğu öngörülmektedir.

Anahtar sözcükler: Bolu, Bovine Herpesvirus 1, Caprine Herpesvirus 1, gB/gE ELISA, keçi, Virus Nötralizasyon Testi

SUMMARY

The serological investigation of alphaherpesvirus (BoHV-1 and CpHV-1) infections in Bolu province

In this study, we aimed to examine the presence/ prevalence of the alphaherpesvirus (BoHV-1 and CpHV-1) infections serologically in Bolu and to determine the availability of gB/gE ELISA combination for the diagnosis of alphaherpesvirus in goats. In this purpose, blood serum samples were collected from 546 Saanen goats and tested by using ELISA and VNT. While 32.05% (175/546) of the samples which are tested by gB and gE ELISA were found gB(+)/gE(-), reflecting CpHV-1 antibody positivity; 0.73% (4/546) of the samples were found gB(+)/gE(+) , reflecting BoHV-1 antibody positivity. According to the VN tests are performed for both virus samples separately, while 31.86% (174/546) of the serum samples were found positive for CpHV-1 antibodies, 3.29% (18/546) of sera were found positive for BoHV-1 antibodies. The presence/prevalence of CpHV-1/BoHV-1 infection was revealed serologically in collected samples. It has been predicted that gB blocking ELISA could be used as an alternative test in serological identification of alphaherpesvirus in goats. However, since gE blocking ELISA shows poor compatibility with VNT, we anticipate that more sensitive methods need to be developed for identification of viral agent causing the infection (CpHV-1 and BoHV-1).

Key words: Bolu, Bovine Herpesvirus 1, Caprine Herpesvirus 1, gB/gE ELISA, goat, Virus Neutralisation Test

KAYNAKLAR

- ACKERMANN, M., METZLER, A. E., MCDONAGH, H., BRUCKNER, L., MILLER, H. K. and KIHLM, U., (1986). Stellen nicht bovine Paarhufer ein IBR-Virus Reservoir dar? BHV-1 und CapHV-1-Infektionen; und-Reaktivierungsversuche an Ziegen. Virustyp- Spezifität der humoralen Antikörper und Charakterisierung der viralen Antigene. *SchweizArchiv. Tierheilkd.* **128**: 557-574.
- ALKAN, F., BURGU, İ., BİLGE-DAĞALP, S., YILDIRIM, Y., GENÇAY, A., GÜNGÖR, B., ATASEVEN, V.S. and AKÇA, Y., (2005). The seroprevalence of BHV-1 infection on selected dairy cattle herds in Turkey. *Revue Med. Vet* **156**: 166-169.
- ATASEVEN, V.S., BAŞARAN, Z., YILMAZ, V., BİLGE DAĞALP, S., (2010). Van bölgesi keçilerinde Parainfluenza Virus-3 (PIV-3) ve Bovine Herpesvirus-1 (BHV-1) enfeksiyonunun seroprevalansı. *Y.Y.Ü.Veteriner Fak., Derg.*, **21 (1)**: 7-9.
- BABIUK, L.A., VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HUNK, S., TIKOO, S.K., (1996). Immunology of Bovine Herpesvirus-1 Infection. *Vet. Microbiol.* **53**: 31-42.
- BARANOWSKI, E., KEIL, G., LYAKU, J., RIJSEWIJK, F.A., VAN OIRSCHOT, J.T., PASTORET, P.-P., THIRY, E., (1996). Structural and functional analysis of bovine herpesvirus 1 minor glycoproteins, *Vet. Microbiol.* **53**: 91-101.
- BEER, M., KÖNIG, P., SCHIELKE, G., TRAPP, S., (2003). Diagnostic markers in the prevention of bovine herpesvirus type 1: possibilities and limitations]. *Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift*, **116**(5-6), 183.
- BERRIOS, P.E., MCKERCHER, D.G., (1975). Characterization caprine herpesvirus. *Am. J. Vet. Res.* **36**: 1755-1762.
- BERRIOS, P.E., MCKERCHER, D.G., KNIGHT, H.D., (1975). Pathogenicity of a caprine herpesvirus. *Am. J. Vet. Res.* **36**: 1763-1769.
- BERTOLOTTI, L., ROSAMILIA, A., PROFITI, M., BROCCHI, E., MASOERO, L., FRANCESCHI, V., TEMPESTA, M., DONOFRIO, G., ROSATI, S., (2013). Characterization of Caprine herpesvirus 1 (CpHV1) glycoprotein E ve glycoprotein I ectodomains expressed in mammalian cells. *Vet. Microbiol.*
- BİLGE DAĞALP, S., FARAJI, A., DOĞAN, F., ATASEVEN, V. S., (2013). Abort yapan keçilerde Caprine herpesvirus 1'in moleküler tanısı. X. Ulusal Veteriner Hekimleri Mikrobiyoloji Kongresi, 24-27 Eylül 2012, Kuşadası-Aydın.
- BİLGE, S., (1996). Kan ve süt serumlarında enfeksiyöz bovine rhinotracheitis-enfeksiyöz pustuler vulvovaginitis (IBR-IPV) antikorlarının nötralizasyon testi ile saptanması ve süt örneklerinden virus izolasyonu. Doktora Tezi, Ankara Üniv. Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- BOLAT, Y., (1990). Doğu ve güneydoğu anadoluda koyun ve keçilerin herpesvirus enfeksiyonları üzerine. *F.Ü.Derg. (Sağlık Bilimleri)*, **4(1)**: 87-92.
- BUONAVOGLIA, C., TEMPESTA, M., CAVALLI, A., VOİGT, V., BUONAVOGLIA, D., CONSERVA, A., CORRENTE, M., (1996). Reactivation of caprine herpesvirus 1 in latently infected goats. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **19**: 275-281.
- CAMERO, M., CRESCENZO, G., MARINARO M., TARSITANO, E., BELLACICCO, A.L., (2010). Cidovir does not prevent caprine herpesvirus type-1 neural latency in goats. *Antivir Ther.* **15**: 785-788.

- ÇABALAR, M., (1993). Fertilité problemlı ineklerde enfeksiyöz bovine rhinotracheitis/ enfeksiyöz pustular vulvovaginitis (IBR/IPV) virus ızolasyonu ve seroepidemiyojisi. Ankara Üniv. Sağlık Bil. Enst., Doktora Tezi, Ankara.
- DONOFRİO, G., FRANCESCHİ, V., LOVERO, A., CAPOCEFALO, A., CAMERO, M., LOSURDO, M., CAVİRANİ, S., MARİNARO, M., GRANDOLFO, E., BUONAVOGLİA, C., TEMPESTA, M., (2013). Clinical protection of goats against CpHV-1 induced genital disease with a BoHV-4 based vector expressing CpHV-1 gD. *Plos ONE* 8.1.
- EDWARDS, S., NEWMAN, R. H., WHİTE, H., (1991). The virulence of British isolates of bovid herpesvirus 1 in relationship to viral genotype. *British Veterinary Journal*, **147(3)**: 216-231.
- EDWARDS, S., WHİTE, H., NİXON, P., (1990). A study of the predominant genotypes of bovid herpesvirus 1 found in the UK. *Veterinary microbiology*, **22(2)**: 213-223.
- EK-KOMMONEN, C., VEİJALAİNEN, P., RANTALA, M., NEUVONEN, E. (1981). Neutralizing antibodies to bovine herpesvirus 1 in reindeer. *Acta Veterinaria Scandinavica*, **23(4)**: 565-569.
- EK-KOMMONEN, C., (1986). Isolation of a herpesvirus serologically related to bovine herpesvirus 1 from a reindeer (*Rangifer tarandus*). *Acta Veterinaria Scandinavica* 27. **2**: 299-301.
- EL-AZHARY, M. S. (Ed.). (1984). The Iran-Iraq War: an historical, economic and political analysis. Routledge.
- ELİA, G., TARSİTANO, E., CAMERO, M., BELLACİCCO, A. L., BUONAVOGLİA, D., CAMPOLO, M., TEMPESTA, M., (2008). Development of a real-time PCR for the detection and quantitation of caprine herpesvirus 1 in goats. *Journal of virological methods*, **148(1)**: 155-160.
- ENGELS, M., ACKERMANN, M., (1996). Pathogenesis of ruminant herpesvirus infections. *Vet. Microbiol.* **53**: 3-15.
- ENGELS, M., GELDERBLOM, H., DARAI, G., LUDGİN, H., (1983). Goat Herpesviruses: Biological and Physicochemical Properties. *J.gen.virol.* **64**: 2237-2247.
- ENGELS, M., LOEPFE, E., WİLD, P., SCHRANER, E., WYLER, R., (1987). The genome of caprine herpesvirus 1: genome structure and relatedness to bovine herpesvirus 1. *J Gen Virol* **68**: 2019-2023.
- FEHLER F., HERRMANN J.M., SAALMULLER A., METTENLEİTER T.C., KEİL G.M., Glycoprotein IV of bovine herpesvirus 1-expressing cell line complements and rescues a conditionally lethal viral mutant, *J. Virol.* 66 (1992) 831–839.
- FENNER, F.J., GİBBS, E.P., MURPHY, F.A. (1993) : Herpesviridae; Disease caused by alphaherpesviruses, *Veterinary Virology* 2nd Ed. Academic Press NewYork. 338-368.
- FREY HR, LİESS B. (1971). Vermehrungskinetik und Verwendbarkeit einer stark zytopathogenen VD-MD Virusstammes für diagnostische Untersuchungen mit der mikrotiter-Methode. *Zentbl vet med*, **18**: 61-71.
- FULTON, R.W., BRİGGS, R.E., PAYTON, M.E., CONFER, A.W., SALİKİ, J.T., RİDPATH, J.F., BURGE, L.J., DUFF, G.C. (2004). Maternally derived humoral immunity to bovine viral diarrhea virus (BVDV) 1a, BVDV1b, BVDV2, bovine herpesvirus-1, parainfluenza-3 virus bovine respiratory syncytial virus, Mannheimia haemolytica and Pasteurella multocida in beef calves, antibody decline by half-life studies and effect on response to vaccination. *Vaccine* **22**: 643-649.

- GIBBS, E.P.J., RWEYEMAMU, M.M. (1977). Bovine herpesviruses. Part I. Bovine herpesvirus 1. *The Veterinary Bulletin* **47**: 317-343.
- GREWAL, A.S., WELLS, R., (1986). Vulvovaginitis of goats due to a herpesvirus. *Aust. Vet. J.* **63**: 79-82.
- GUERCIO, A., GRECO, G., LANIZZOTO, G., DÌ MARCO, V., TODARO, M., (1998). Valutazione della diffusione di anticorpi anti Herpes Virus della capra in allevamenti caprini della Sicilia. *Atti. SIPAOC* **12**,138-142.
- HAGE, J.J., GLAS, R.D., WESTRA, H.H., MARIS-VELDHUIS, M.A., VAN OIRSCHOT, J.T., RIJSEWIJK, F.A. (1998). Reactivation of latent bovine herpesvirus 1 in cattle seronegative to glycoproteins gB and gE. *Veterinary Microbiology* **60**: 87-98.
- HOMAN, E.J., EASTERDAY, B.C., (1980). Isolation of bovine herpesvirus 1 from trigeminal ganglia of clinically normal cattle. *American Journal of Veterinary Research*. **41**: 1212-1213.
- HUTCHINGS, D.L., VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, BABIUK, L.A. (1990). Lymphocyte proliferative responses to separated bovine herpesvirus 1 proteins in immune cattle. *Journal of Virology* **64**: 5114-5122.
- KAASHOEK, M. J., MOERMAN, A., MADIĆ, J., RIJSEWIJK, F. A. M., QUAK, J., GIELKENS, A. L. J., & VAN OIRSCHOT, J. T. (1994). A conventionally attenuated glycoprotein E-negative strain of bovine herpesvirus type 1 is an efficacious and safe vaccine. *Vaccine*, **12**(5): 439-444.
- KAASHOEK, M.J., MOERMAN, A., MADIĆ, J., WEERDMEESTER, K., MARISVELDHUIS, M., RIJSEWIJK, F.A., VAN OIRSCHOT, J.T., (1995). An inactivated vaccine based on a glycoprotein E-negative strain of bovine herpesvirus 1 induces protective immunity and allows serological differentiation. *Vaccine* **13**: 342-346.
- KÁLMÁN, D., EGYED, L., (2005). PCR detection of bovine herpesviruses from nonbovine ruminants in Hungary. *Journal of wildlife diseases*, **41**(3), 482-488.
- KAO, M., LEISKAU, T., KOPTOPOULOS, G., PAPADOPOULOS, O., HORNER G.W., HYLLSETH, B., FADEL, M., GEDÍ, A.H., STRAUB, O.C., LUDWIG, H. (1985). Goat herpesvirus infection: a survey on specific antibodies in different countries. In *Immunity to Herpesvirus Infections of Domestic Animals* (Edited by Pastoret P. P., Thiry E. And Saliki J.), pp. 93-97. C.E.C.
- KARGER, A., SAALMILLER, A., TUFARO, F., BANFIELD, B.W., METTENLEITER, T.C., (1995). Cell surface proteoglycans are not essential for infection by pseudo-rabies virus. *Journal of Virology* **69**: 3482-3489.
- KEUSER, V., DETRY, B., THIRY, J., DE FAYS, K., SCHYNTS, F., PASTORET, P. P., (2006). Vanderplasschen, A., Thiry, E., Characterization of Caprine herpesvirus 1 glycoprotein D gene and its translation product. *Virus Res.* **115**: 112-121.
- KEUSER, V., GOGEV, S., SCHYNTS, F., THIRY, E., (2002). Demonstration of generalized infection with caprine herpesvirus 1 diagnosed in an aborted caprine fetus by PCR. *Vet. Res. Commun.* **26**: 221-226.
- KEUSER, V., ESPEJO-SERRANO, J., SCHYNTS, F., GEORGIN, J.P., THIRY, E., (2004). Isolation of caprine herpesvirus type 1 in Spain. *Vet. Rec.* **154**: 395-399.
- KNAPP, A. C., & ENQUIST, L. W. (1997). Pseudorabies virus recombinants expressing functional virulence determinants gE and gI from bovine herpesvirus 1.1. *Journal of virology*, **71**(4): 2731-2739.

- KNİPE, D. M., HOVLEY, P.M., GRIFFİN, D. E., LAMP, R. A., MARTİN, M. A., ROİZMAN, B., STRAUS, S. E., (2007). *Fields Virology*. 5th Ed. Vol. 2. Section 2. Chapter 21.
- KONİG P., GİESOW K., KEİL G.M., Glycoprotein M of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) is nonessential for replication in cell culture and is involved in inhibition of bovine respiratory syncytial virus F protein induced syncytium formation in recombinant BHV-1 infected cells, *Vet. Microbiol.* 86 (2002) 37–49.
- KOPTOPOULOS, G., (1992). Goat herpesvirus 1 infection : a review. *Vet.Bull.*, **62**, 77-84.
- KRAMPS, J.A., BANKS, M., BEER, M., KERKHOF, P., PERRİN, M., WELLENBERG, G.J., OIRSCHOT, J.T., (2004). Evaluation of tests for antibodies against bovine herpesvirus 1 performed in national reference laboratories in Europe. *Vet. Microbiol.* **102**: 169–181.
- KRAMPS, J.A., QUAK, S., WEERDMEESTER, K., VAN OIRSCHOT, J.T., (1993). Comparative study on sixteen enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of antibodies to bovine herpesvirus 1 in cattle. *Vet. Microbiol.* **35**: 11-21.
- LAURA, M., STEPHEN, V., BENOÎT, C., CRISTINA, G., FLORENCE, S., ERIC, D., (2012). Evaluation of serological and PCR methods for diagnosis of caprine and bovine alphaherpesvirus infections in goats.
- LYAKU, J.R., NETTLETON, P.F., MARDSEN, H., (1992). A comparison of serological relationships among five ruminant alphaherpesviruses by ELISA. *Arch. Virol.* **124**: 333–341.
- MACLACHLAN, N.J., DUBOVÍ, E.J., (2011). *Fenner's Veterinary Virology*. Fourth edition. Chapter 9. Herpesvirales 179-201.
- MAHMOUD, M. A., & AHMED, S. A. (2009). Prevalence of bovine herpesvirus-1 in sheep and goats in Egypt. *Global Veterinaria*, Giza, **3(6)**: 472-479.
- MARINARO, M., BELLACICCO, A. L., TARSITANO, E., CAMERO, M., COLAO, V., TEMPESA, M., BUONAVOGLIA, C., (2010). Detection of CpHV-1 specific antibodies in goat sera using an ELISA and SN Test. *J. Vet. Diagn. Invest.* **22**: 245-248.
- MARTİN, W.B., CASTRUCCI, G., FRIGERİ, F., FERRARİ, M., (1990). A serological comparison of some animal herpesviruses. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **13**: 75–84.
- MECHOR, G.D., ROUSSEAU, C.G., RADOSTITS, O.M., BABIUK, L.A., PETRIE, L. (1987). Protection of newborn calves against fatal multisystemic infectious bovine rhinotracheitis by feeding colostrum from vaccinated cows. *Canadian Journal of Veterinary Research* **51**: 452-459.
- METTENLEITER, T. C., (2002). Herpesvirus assembly and egress. *Journal of virology*, 76(4), 1537-1547.
- METTENLEITER, T.C., (2003). Pathogenesis of neurotropic herpesviruses: role of viral glycoproteins in neuroinvasion and transneuronal spread. *Virus Research.* **92(2)**: 197-206.
- METTLER, F., ENGELS, M., WILD, P., BIVETTI, A., (1979). Herpesvirus-Infektion bei Zicklein in der Schweiz. *Schweiz. Arch Tierheilk.*, **121**: 655-662.
- MEYER G., HANON E., GEORLETTE D., PASTORET P.- P., THIRY E., Bovine herpesvirus type 1 glycoprotein H is essential for penetration and propagation in cell culture, *J. Gen. Virol.* 79 (1998) 1983–1987.

- MURPHY, F., A., GIBBS, E., P., J., HORZINEK, M., C., STUDDERT, M., J. (1999) : Chapter 18; Herpesviridae, Veterinary Virology 3rd Ed. Chapter 18. 301-325.
- MUYLKENS, B., THIRY, J., KIRTEN, P., SCHYNTS, F., THIRY, E., (2007). Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. *Vet. Res.* **38**: 181–209.
- NANDI, S., KUMAR, M., MANOHAR, M., CHAUHAN, R., S., (2009). Bovine herpesvirus infections in cattle, *Animal Health Res.* **10(1)**: 85-98.
- NIXON, P., EDWARDS, S., WHITE, H., (1988). Serological comparisons of antigenically related herpesviruses in cattle, red deer and goats. *Vet. Res. Commun.* **12**: 355–362.
- OIE, TERRESTRIAL MANUAL, (2008). Infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis. Chapter 2.4.13.
- PAPANASTASOPOULOU, M., KOPTOPOULOS, G., LEKKAS, S., PAPADOPOULOS, O., LUDWIG, H., (1991). An experimental study on the pathogenicity of the caprine herpesvirus type 1 (CpHV-1). *Comp. Imm. Microbiol. Inf. Dis.*, **14**: 47-53.
- REBORDOSA, X., PIÑOL, J., PÉREZ-PONS, J. A., LLOBERAS, J., NAVAL, J., SERRA-HARTMANN, X., QUEROL, E. (1996). Glycoprotein E of bovine herpesvirus type 1 is involved in virus transmission by direct cell-to-cell spread. *Virus research*, 45(1), 59-68.
- ROPERTA, F., PRATELLI, A., GUARÌONA, G., AMBROSIO, V., TEMPESTA, M., GALATI, P., IOVANE, G., BUONAVOGLIA, C., (2000). Natural caprine herpesvirus 1 (CpHV-1) infection in kids. *J. Comp. Path.*, **12**: 298-302.
- ROS, C., BELAK, S., (1999a). Studies of genetic relationships between bovine, caprine, cervine, and ruminant alphaherpesviruses and improved molecular methods for virus detection and identification. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 1247–1253.
- ROS, C., BELAK, S., (2002). Characterization of the glycoprotein B gene from ruminant alphaherpesviruses. *Virus Genes.* **24**: 99–105.
- SAITO, J.K., GRIBBLE, D.H., BERRIOS, P.E., KNIGHT, H.D., MC KERCHER, D.G., (1974). A new herpesvirus isolate from goats: Preliminary report. *Am. J. Vet. Res.* **35**: 847–848.
- SAUSKER, E. A., & DYER, N. W. (2002). Seroprevalence of OHV-2, BVDV, BHV-1, and BRSV in ranch-raised bison (*Bison bison*). *Journal of veterinary diagnostic investigation*, 14(1), 68-70.
- SCAHW (2000). Report on Bovine Herpesvirus 1 (BHV1) marker vaccines and the accompanying diagnostic tests. Scientific Committee on Animal Health and Welfare, European Commission Health & Consumer Protection Directorate-General.
- SCHRODER, C., LINDE, G., FEHLER, F., KEIL, G. M., (1997). From essential to benical: glycoprotein D loses importance for replication of bovine herpesvirus 1 in cell culture. *J. Virol.* Vol. 71. **1**: 25-33.
- SCHWYZER, M., ACKERMAN, M., (1996). Molecular virology of ruminant herpesviruses. *Vet. Microbiology.* **53**: 17-29.
- SCICLUNA, M. T., SARALLI, G., BRUNI, G., SALA, M., COCUMELLI, C., CACIOLLO, D., AUTORINO, G. L. (2010). Epidemiological situation of Herpesvirus infections in buffalo herds: Bubaline Herpesvirus 1 or Bovine Herpesvirus 1?. *Italian Journal of Animal Science*, 6(2s), 845-849.
- SILVA, M.L.C.R., PITUCO, E.M., NOGUEIRA, A.H.C., MARTINS, M.S.N., LIMA, M.S., AZEVEDO, S.S., (2013). Serological evidence and risk factors associated with Caprine

- herpesvirus 1 in dairy goat flocks in a semiarid region of northeastern Brazil. *J. Vet. Diagn. Invest.* **25**: 125.
- SIX, A., BANKS, M., ENGELS, M., BASCUNANA, C.R., ACKERMANN, M., (2001). Latency and reactivation of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) in goats and of caprine herpesvirus 1 (CapHV-1) in calves. *Arch.Virol.* **146**: 1325–1335. StataCorp, 2003. Stata Statistical Software: Release 8, Stata Corporation, College Station, TX.
- SNOWDON, W.A., (1965). The IBR-IPV virus: reaction to infection and intermittent recovery of virus from experimentally infected cattle. *Australian Veterinary Journal.* **41**: 135-142.
- SPEAR, P. G., (1993). Entry of alphaherpesviruses into cells. *Seminars in Virology.* Vol. 4. No. 3. Academic Press,.
- TARIGAN, S., WEBB, R.F., KIRKL, D., (1987). Caprine herpesvirus from balanoposthitis. *Aust. Vet. J.* **64**, 321.
- TARSITANO, E., CAMERO, M., BELLACICCO, A. L., DECARO, N., MARTELLA, V., BUONAVOGLIA, C., & TEMPESTA, M., 2010. Glycoprotein C gene of caprine herpesvirus type 1 contains short sequence repeats (SSR). *The open virology journal*, 4, 85.
- TAYLOR, J. HERBERT. "Increase in DNA replication sites in cells held at the beginning of S phase." *Chromosoma* 62.4 (1977): 291-300.
- TEMPESTA, M., BUONAVOGLIA, D., SAGAZIO, P., PRATELLI, A., BUONAVOGLIA, C., (1998). Natural reactivation of caprine herpesvirus 1 in latently infected goats. *Vet. Rec.* 143-200.
- TEMPESTA, M., CAVALLI, A., VOIGT, V., BUONAVOGLIA, D., (1994). Presenza di anticorpi per caprine herpesvirus 1 (CapHV.1) in allevamenti caprini dell'Italia meridionale. *Atti. SIPAOC* **11**: 121–122.
- TEMPESTA, M., GRECO, G., PRATELLI, A., BUONAVOGLIA, D., CAMERO, M., MARTELLA, V., BUONAVOGLIA, C., (2002). Reactivation of caprine herpesvirus 1 in experimentally infected goats. *Vet. Rec.*, **150**: 116-117.
- TEMPESTA, M., PRATELLI, A., GRECO, G., MARTELLA, V., BUONAVOGLIA, C., (1999). Detection of CHV-1 in sacral ganglia of latency infected goats by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 1598-1599.
- TEMPESTA, M., PRATELLI, A., NORMANNO, G., CAMERO, M., BUONAVOGLIA, D., GRECO, G., BUONAVOGLIA, C., (2000). Experimental intravaginal infection of goats with caprine herpesvirus 1. *J. Vet.Med. B Infect. Dic. Vet. Public Health* **47**: 197-201.
- THAKER, S.R., STINE, D.L., ZAMB, T.J. AND SRİKUMARAN, S., 1994. Identification of a putative cellular receptor for bovine herpesvirus 1. *J. Gen. Virol.*, **75**: 2303-2309.
- THİRY, J., KEUSER, V., MUYLKENS, B., MEURENS, F., GOGEV, S., VANDERPLASSCHEN, A., THİRY, E. (2006a). Ruminant alphaherpesviruses related to bovine herpesvirus 1. *Vet. Res.* 37, 169–190.
- THİRY, J., TEMPESTA, M., CAMERO, M., TARSITANO, E., MUYLKENS, B., MEURENS, F., THİRY, E., BUONAVOGLIA, C. (2007). Clinical protection against caprine herpesvirus 1 genital infection by intranasal administration of a live attenuated glycoprotein E negative bovine herpesvirus 1 vaccine. *BMC Vet. Res.* **3**: 33.

- THİRY, J., TEMPESTA, M., CAMERO, M., TARSİTANO, E., BELLACİCCO, A.L., THİRY, E., BUONAVOGLİA, C. (2006b). A live attenuated glycoprotein E negative bovine herpesvirus 1 vaccine induces a partial cross-protection against caprine herpesvirus 1 infection in goats. *Vet. Microbiol.* **113**: 303–308.
- THİRY, J., WİDE'N, F., GRE'GOİRE, F., LİNDEN, A., BELA'K, S., THİRY, E. (2007). Isolation and characterisation of a ruminant alphaherpesvirus closely related to bovine herpesvirus 1 in a free-ranging red deer. *BMC Vet. Res.* **3**, 26.
- THİRY, J., SAEGERMAN, C., CHARTIER, C., MERCIER, P., KEUSER, V., THİRY, E. (2008). Serological evidence of caprine herpesvirus 1 infection in Mediterranean France. *Veterinary Microbiology* **128**: 261–268.
- TIKOO, S.K., CAMPOS, M., BABIUK, L.A. (1995a). Bovine herpesvirus 1 (BHV-1): biology, pathogenesis and control. *Adv. Virus. Res.* **45**: 191–223.
- TIKOO, S.K., CAMPOS, M., POPOWYCH, Y.I., VAN DRUNEN LİTTEL-VAN DEN HURK, BABIUK, L.A. (1995b). Lymphocyte proliferative responses to recombinant bovine herpes virus type 1 (BHV-1) glycoprotein gD (gIV) in immune cattle: identification of a T cell epitope. *Viral Immunology* **8**: 19–25.
- TOLARI, F., WHITE, H., NIXON, P., (1990). Isolation and reactivation of bovid herpesvirus 1 in goats. *Microbiologica* **13**: 67–71.
- TURIN, L., RUSSO, S., (2003). BHV-1 infection in cattle: an update. *Veterinary Bulletin* **73**: 16–21.
- UZAL, F.A., WOODS, L., STILLIAN, M., NORDHAUSEN, R., READ, D.H., KAMPEN, H.V., ODANI, J., HIETALA, S., HURLEY, E.J., VICKERS, M.L., Gard, S.M., (2004). Abortion and ulcerative posthitis associated with caprine herpesvirus-1 infection in goats in California. *J. VET. Diagn. Invest.* **16**, 478.
- VAN ENGELBURG F.A.C., MAES R.K., VAN OIRSCHOT J.T., RIJSEWIJK F.A.M. (1993). Development Of A Rapid And Sensitive Polymerase Chain Reaction Assay For Detection Of Bovine Herpesvirus Type 1 In Bovine Semen. *J. Clin. Microbiol.*, **31**: 3129–3135.
- WAFULA, J.S., MUSHI E.Z. AND WAMWAYI H. (1985). Reaction of goats to infection with infectious bovine rhinotracheitis virus. *Res. Vet. Sci.*, **39**: 84–86.
- WYLER, R., ENGELS, M., SCHWYZER, M. (1989). Infectious Bovine Rhinotracheitis/ Vulvovaginitis, *Advances in Virology*. 1–72.
- YANG, M., CARD, J. P., TİRABASSİ, R. S., MİSELİS, R. R., ENQUİST, L. W. (1999). Retrograde, transneuronal spread of pseudorabies virus in defined neuronal circuitry of the rat brain is facilitated by gE mutations that reduce virulence. *Journal of virology*, **73**(5), 4350–4359.
- YATES, W.D. (1982). A review of infectious bovine rhinotracheitis, shipping fever pneumonia and viral-bacterial synergism in respiratory disease of cattle. *Canadian Journal of Comparative Medicine* **46**: 225–263.
- YEŞİLBAĞ K., BİLGE DAĞALP, S., OKUR GÜMÜŞOVA, S., GÜNGÖR, B. (2003). Studies on Herpesvirus Infections of Goats in Turkey: Prevalence of Antibodies to Bovine herpesvirus 1, *Rev. Med. Vet.*, **154** (12) : 772–774.
- YEŞİLBAĞ, K., ALPAY, G., TUNCER, P., (2010). Gökçeada'daki Sığır, Koyun ve Keçilerde Bazı Viral Enfeksiyonların Seroprevalansı. Ulusal Keçicilik Kongresi. Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı, Bursa.

YONGUÇ, A.D., AKÇORA, A., VURAL, B. (1990). Caprine Herpesvirus Enfeksiyonu Üzerine Serolojik Etiyolojik Çalışmalar, PROJE NO: VHAG-756.

EK 1: Hayvan deneyleri etik kurul kararı

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

18/01/2012

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARAR ÖRNEĞİ

TOPLANTI TARİHİ :18/01/2012
TOPLANTI NO :2012-1
DOSYA NO :2012-5
KARAR NO :2012-1-6

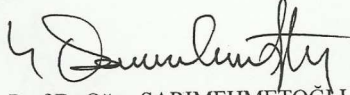
Üniversitemiz Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof.Dr.Seval Bilge Dağalp'in araştırma yürütücüsü olduğu ve Prof.Dr.Seval Bilge Dağalp ile Y.Lisans Öğr.Merve Özgür'ün ortak çalışmaları olan "Bolu ili ve çevresinde keçilerde alphaherpesvirus (BoHV-1 ve CpHV-1) enfeksiyonlarının serolojik olarak araştırılması" başlıklı çalışmaları Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunda incelenmiş, yapılan inceleme sonucunda çalışma Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesine göre;

☒ Uygun bulunarak onaylanmasına,

☐ Düzeltilmesine,

oy birliği ile karar verilmiştir.

ASLININ AYNI DİR
18/01/2012


 Prof.Dr.Oğuz SARİMEHMETOĞLU
 Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri
 Yerel Etik Kurulu Başkanı



ÖZGEÇMİŞ

I. Bireysel Bilgiler

Adı: Merve

Soyadı: ÖZGÜR

Doğum yeri: Ankara

Doğum tarihi: 12.03.1987

Uyruğu: T.C.

Medeni durumu: Bekar

II. İletişim Bilgileri

Bolu Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü,

Mikrobiyoloji Laboratuvarı,

Aktaş Mahallesi, Kaplıca yolu üzeri, D blok, BOLU/Merkez

Tel: 05336344811 e-mail: merveozgur87@gmail.com

III. Eğitimi

2010, Yüksek Lisans, Viroloji Anabilim Dalı, Veteriner Fakültesi, Ankara Üniversitesi

2005, Veteriner Fakültesi, Ankara Üniversitesi

2001, Ankara Atatürk Anadolu Lisesi

1998, Kalaba İlköğretim Okulu, Ankara

1993, Fevziatlıoğlu İlköğretim Okulu, Ankara

Yabancı Dili: İngilizce

IV. Mesleki Deneyimi

2011 yılından bu yana Bolu Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü bünyesinde Mikrobiyolojik Analiz Laboratuvarında Veteriner Hekim olarak görev yapmaktayım.