



Sığırlarda Bovine Herpesvirus-1 Enfeksiyonlarının Enzime-Linked Immunosorbent Assay ve Mikronötralizasyon Testi ile Karşılaştırmalı Tespiti

Rüstem DUMAN¹, Sibel YAVRU², Oya BULUT², Oğuzhan AVCI²✉

1. Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Konya.

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

Özet: Bovine Herpesvirus-1 (BHV-1)'in neden olduğu Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR) tüm dünyada görülmekte ve sığırcılık endüstrisinde ciddi ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Bu çalışma sığır kan serum örneklerinde BHV-1'e karşı gelişen antikor varlığının Enzime-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ve mikro Nötralizasyon Test (mNT)'i ile tespit edilmesi ve enfeksiyonun serolojik teşhisinde kullanılan bu iki testin sensitivite ve spesifite değerlerinin belirlenmesi amaçları ile yapıldı. Çalışmada Konya'daki özel işletmelerden rastgele örnekleme ile temin edilen 301 adet sığır (BHV-1 yönünden aşılınmamış) kan örnekleri kullanıldı. Kan serum örnekleri BHV-1'e karşı oluşan antikor varlığı yönünden ELISA ve mNT ile incelendi. Titrasyon ve mNT testlerinde BHV-1'in 'Colorado' referens suşu kullanıldı. Virusun çoğaltılması ve titresinin belirlenmesi için Madin-Darby Bovine Kidney (MDBK) devamlı hücre kültürleri kullanıldı. BHV-1'e karşı oluşan antikor varlığı yönünden 26 adet (%8,6) kan serumu örneği ELISA ile 22 (%7,3) adedi ise mNT ile seropozitif tespit edildi. Pozitif bulunan serumların Serum Nötralizasyon 50 (SN₅₀) değerleri 1/1,7 – 1/31,6 arasında belirlendi. Sonuç olarak, elde edilen değerlere göre testlerin sensitivite ve spesifiteleri ile avantajları karşılaştırıldı. ELISA için sensitivite %100, spesifite %98 olarak belirlenirken; mNT için sensitivite %84, spesifite ise %100 bulundu.

Anahtar kelimeler: BHV-1, ELISA, Mikro Nötralizasyon Test, Sığır.

Comparative Detection of Bovine Herpesvirus-1 Infection in Cattle by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Micro Neutralisation Test

Abstract: Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR) is caused by Bovine Herpesvirus-1 (BHV-1) that shows a worldwide distribution and results in severe economic losses in the cattle industry. The aims of this study were to; detect the antibodies against the BHV-1 in cattle blood sera samples by the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and micro Neutralisation Test (mNT) and determine the specificity and sensitivity values of these serologic diagnostic tests. Blood samples were randomly collected from 301 cattle (unvaccinated for BHV-1) from the private farms located in Konya. The ELISA and mNT tests were used for detection of antibodies against the BHV-1. The Colorado reference strain of BHV-1 was used for the titration and mNT tests. The virus was propagated and titrated in the permanent Madin-Darby Bovine Kidney (MDBK) cells. Twenty-six (8.6 %) sera samples were detected positive by the ELISA applied for the detection of antibodies against the BHV-1. 22 (7.3 %) of totaly 301 cattle blood samples for antibodies to the BHV-1 as seropositive by the mNT. Serum Neutralisation 50 (SN₅₀) values of positive samples ranged between 1/1.7 and 1/31.6. In conclusion, the sensitivity and spesifity of tests were detected by the values obtained and their advantages were compared. For the ELISA, the sensitivity and spesifity were determined as 100 % and 98 %, respectively while the corresponding values were 84 % and 100 % for the mNT.

Key words: BHV-1, Cattle, ELISA, Micro Neutralisation Test.

✉ Oğuzhan AVCI

Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı, Konya.
e-posta: oavci@selcuk.edu.tr

GİRİŞ

Bovine Herpesvirus tip-1 (BHV-1)'in neden olduğu İnfeksiyöz Bovine Rhinotracheitis (IBR), İnfeksiyöz Pustuler Vulvovaginitis (IPV), İnfeksiyöz Pustuler Balanopostitis (IPB); sığırların solunum, sindirim ve genital sistemlerinin subklinik, akut veya latent seyirli, önemli ekonomik kayıplara neden olan ve ülkemizde de yaygın olarak gözlenen viral bir enfeksiyondur. İlk defa 1950'lerde izole edilen BHV-1 solunum sistemi enfeksiyonları, rhinotracheitis, konjunktivitis, süt veriminde azalma, metritis, enteritis, ensefalitis ve aborta sebep olabilmektedir (Nandi ve ark., 2009). Etken, sürülerde genellikle yüksek morbidite ve düşük mortaliteye sahip latent bir seyir göstermektedir (Ackermann ve Engels, 2006).

Etken Herpesviridae familyasının Alphaherpesvirinae alt familyasında (Meurens ve ark., 2004) *Varicellovirus* genusunda yer almaktadır (Rana ve ark., 2011). Herpesvirus virionu zarlı ve 120-150 nm çapındadır. 100 nm çapındaki kapsid kübik simetrik ve 12 pentamerik, 150 heksomerik olmak üzere toplam 162 kapsomerden oluşmaktadır. Zar yaklaşık 8 nm uzunluğunda peplomerler içermektedir. BHV-1 genomu linear çift iplikli DNA molekülüdür. Herpesvirus'lar 35'den fazla yapısal protein bulundurmaktadır. Bunların 6 tanesi nükleokapsitte, 10-20 tanesi tegumentte ve 10 tanesi ise zarla yer almaktadır (Muylkens ve ark., 2007).

BHV-1'in teşhisi amacıyla laboratuarlara burun, göz, vaginal ve prepusyal svaplar, trachea, akciğer, böbrek ve abort olmuş hayvanların organları gönderilmektedir (Belak ve Ballagi-Pordany, 1993). BHV-1'in izolasyonu ve identifikasyonu amacıyla çeşitli hücre kültürleri kullanılmaktadır. BHV-1 inokulasyondan sonra 16 saat gibi erken bir sürede cytopathogenic effect (CPE) meydana getirirken, bazı suşları sınırsız çoğaltmakta ve karakteristik eosinofilik intranükleer inklüzyon cisimcikleri enfekte hücrelerde kolayca saptanabilmektedir (Fenner ve ark., 1987).

BHV-1'in direkt teşhisi amacıyla virus nötralizasyon (VN) (Weigler ve ark., 1997; Wellenberg ve ark., 1998), komplement fikzasyon (KF) (Collins ve ark., 1985), immunperoksidaz (IP) (Straub, 1991; Bulut ve ark., 1998), immunfloresan (IF) (Schyns ve ark., 1999), agar jel immundifüzyon (AGID) (Ileri ve ark., 1989), Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) (Straub, 1991), reverse pasif hemaglutinasyon (RPHA) (Edwards ve Gitao, 1987), elektron mikroskopi (EM) (Murphy ve ark., 1999), dot-blot hibridizasyon (Vilcek ve ark., 1993), polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) (Smits ve ark., 2000; Rana ve ark., 2011), ve poliakrilamid jel elektroforezis (PAGE) (Gupta ve ark., 1998) teknikleri kullanılmaktadır. IBR enfeksiyonunun indirekt teşhisinde kullanılan testler arasında serum nötralizasyon (SN), KF, indirekt ELISA, indirekt immunperoksidaz (IIP), indirekt immunfloresan (IIF), AGID ve indirekt hemaglutinasyon sayılabilmektedir (Zhou ve ark., 1999).

Bu araştırma Konya ve çevresindeki özel işletmelerde bulunan sığırlarda BHV-1'e karşı gelişen antikor varlığının ELISA ve mikro mNT'i ile belirlenmesi ve enfeksiyonun serolojik teşhisinde kullanılan bu iki testin BHV-1'e karşı gelişen antikorların tespitindeki sensitivite ve spesifite değerlerinin belirlenmesi amacı ile yapıldı.

MATERYAL ve METOT

Virus

Titrasyon ve serum mNT'de, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı'ndan temin edilen BHV-1'in referans suşu 'Colorado' kullanıldı.

Hücre Kültürleri

BHV-1'in çoğaltılması ve titrasyonu, mNT ve pozitif serumların antikor titresini belirlemek amacı ile Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı'ndan temin edilen Madin Darby Bovine Kidney (MDBK) devamlı hücre kültürleri kullanıldı. Hücre üretme vasatı olarak ticari olarak

temin edilen %10 fetal dana serumu (FDS, Biological Industries, İsrail) içeren Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Biological Industries, İsrail) kullanıldı.

Kan Serum Örnekleri

Araştırmada kullanılan kan serum örnekleri Konya ve çevresindeki özel işletmelerde bulunan 301 adet sığırdan alındı. Kan numuneleri ineklerin V.jugularis'lerinden 10 ml olacak şekilde serum separator jel içeren steril vakumlu tüplere (BD, Vacutainer®, ABD) alındı.

Kan Serum Örneklerinin Hazırlanması

Soğuk zincir altında Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı laboratuvarlarına getirilen kan numuneleri 3000 devirde 10 dk santrifüj edildikten sonra serumlar eppendorf tüplere aktarıldı. Serum örnekleri 56 °C'de 30 dk bekletilerek inaktive edildi ve test edilinceye kadar -20 °C'de muhafaza edildi.

Virusun Üretilmesi

Hücre kültürü şişelerinde (250 ml'lik) üretilen MDBK devamlı hücre kültürlerinin hücre üretme vasatları döküldükten sonra yüzeyleri Phosphate Buffer Saline-Minus (PBS-M) ile 1 kez yıkanarak, adsorbsiyona bağlı ekim tekniği ile 2,5 ml virus inokule edildi. 37 °C'de 1 saat adsorbsiyon için bekletilen hücre kültürüne süre sonunda virus üretme vasatı olarak serumsuz DMEM ilave edildi. İnkubasyondan 24-48 saat sonra doku kültürü mikroskobu (Olympus C-K, Japonya) ile yapılan kontrollerde, %80 oranında CPE görülmesiyle hücre kültürü şişeleri -20 °C'de dondurulup 37 °C'de hızla çözdürüldü. Bu işlem 3 kez tekrarlandı. Elde edilen viruslu hücre sıvısı +4 °C'de 3000 devirde 30 dk santrifüj edildi. Üstte kalan viruslu sıvının sterilite kontrolü yapılarak 1 ml'lik porsiyonlar halinde -80 °C'de saklandı. Virus üretilmesi hücre kontrol ile birlikte yürütüldü.

Virusun Mikrotitrasyon Yöntemi ile Titrasyonu

BHV-1'in titresi Frey ve Liess (1971)'in bildirdikleri yöntem ile belirlendi. Buna göre virusun DMEM içerisinde \log_{10} tabanına göre sulandırılmaları hazırlandı. Her virus sulandırma basamağından mikrotitrasyon pleytinin (Costar, ABD) bir sırasında bulunan 4 gözüne 0,1 ml konuldu. Ayrıca virus kontrol için 4 göze 0,05 ml serumsuz DMEM ve 0,05 ml saf virusdan, hücre kontrol için ise 4 göze 0,1 ml serumlu DMEM aktarıldı. Gözlerdeki virus sulandırılmaları ve kontrollerin üzerine 300.000 hücre/ml olacak şekilde sulandırılan MDBK devamlı hücre kültürü süspansiyonundan 0,05 ml ilave edildi. Pleyt nontoksik bant ile kapatılarak 37 °C'lik %5 CO₂'li etüvde inkübasyona bırakıldı. Her gün doku kültürü mikroskobunda CPE oluşumu yönünden kontrol edilerek 5. günün sonunda virusun titresi (doku kültürü infektif doz 50-DKID₅₀) Kaerber yöntemine (1964) göre hesaplandı.

Kan Serumu Örneklerinin Mikro NT ile İncelenmesi

Kan serum örneklerinde BHV-1'e karşı nötralizan antikorların varlığı Frey ve Liess'in (1971) bildirdikleri mNT ile araştırıldı. İnaktive edilmiş ve sulandırılmamış serum numunelerinden mikronötralizasyon pleytinin her sırasında bulunan 2 gözüne 0,05 ml konuldu. Takiben serum örneklerinin üzerine BHV-1'in 'Colorado' referens suşunun 100 DKID₅₀ oranındaki sulandırmasından eşit miktarda ilave edildi. Virus kontrol için ayrılan 4 gözün her birine 0,05 ml serumsuz DMEM ve üzerine 0,05 ml saf virustan konuldu. Hücre kontrol için ayrılan 4 gözün her birine 0,1 ml %10 FDS içeren DMEM kondu. Nontoksik bant ile pleytin üzeri kapatılarak %5 CO₂ içeren 37 °C'lik etüvde 1 saat inkübe edildi. Süre sonunda hücre ve virus kontrol da dahil olmak üzere bütün gözlere 300.000 hücre/ml olacak şekilde sulandırılan MDBK hücre süspansiyonundan 0,05 ml konuldu. Pleyt 37 °C'de inkübasyona bırakıldı. Doku kültürü mikroskobunda her gün

kontrolleri yapılarak 2. günden itibaren sonuçlar değerlendirilmeye alındı.

Pozitif Serumların Serum Nötralizasyon 50 (SN₅₀) Değerlerinin Saptanması

BHV-1 antikorları yönünden pozitif bulunan kan serumu örneklerinde antikor titrelerinin saptanması amacıyla mNT'den yararlanıldı. Pozitif serum örnekleri pleytin ilk sırasında bulunan 4 göze sulandırılmadan 0,1 ml konuldu. Pleytde bulunan diğer gözlere ise 0,05 ml DMEM ilave edildi. İlk sırada bulunan sulandırılmamış serumdan 0,05 ml miktarında alınarak alt sırada bulunan gözlere aktarılacak suretiyle pozitif serumlar log₂ tabanına göre 1/128'e kadar sulandırıldı. Daha sonra bütün gözlere 100 DKID₅₀ oranında sulandırılan virustan 0,05 ml ilave edildi. Virus kontrol için ayrılan 4 gözün her birine 0,05 ml saf virus ve 0,05 ml serumsuz DMEM konuldu. Hücre kontrol için ayrılan 4 gözün her birine 0,1 ml %10 FDS içeren DMEM konuldu. Nontoksik bant ile pleytin üzeri kapatılarak %5 CO₂ içeren 37 °C'lik etüvde 1 saat inkübe edildi. Takiben hücre ve virus kontroller de dahil olmak üzere bütün gözlere 300.000 hücre/ml olacak şekilde DMEM ile sulandırılan MDBK hücre süspansiyonundan 0,05 ml ilave edildi. Pleyt tekrar kapatılarak %5 CO₂ içeren 37 °C'lik etüvde inkübasyona bırakıldı. Doku kültürü mikroskopunda her gün kontrolleri yapılarak 2. günden itibaren sonuçlar değerlendirilmeye alındı.

Kan Serum Örneklerinde ELISA ile BHV-1 Antikor Varlığının Tespiti

Bu amaçla spesifik anti-gB antikorlarının tespiti için hazırlanmış ticari olarak temin edilen (Institut Pourquier Montpellier, Fransa) ELISA kiti kullanıldı. Test, kit içerisinde bildirilen test prosedürüne uygun olarak yapıldı.

Testin Değerlendirilmesi Geçerliliği ve Sonuçların Yorumlanması

Optik dansite (OD) değeri 450 nm'ye ayarlanmış filtre ile okundu. Belirlenen absorban

değerleri her kan serumu aşağıda belirtilen şekilde hesaplandı.

Pozitif kontrolün (PK) doğrulanmamış OD 450 değeri 0,350'den büyük olmalı. PK'nın doğrulanmış OD 450 değerinin negatif kontrolün (NK) doğrulanmış OD 450 değerine oranı 3,5'a eşit veya büyük olmalı.

$\%S/P = \frac{\text{Örneğin doğrulanmış OD 450 değeri}}{\text{PK'nın doğrulanmış OD 450 değeri}} \times 100$

$\%S/P \leq \%45$ ise örnek negatif, $\%S/P \%45$ ile $\%55$ arasında ise şüpheli, $\%S/P \geq \%55$ ise örnek pozitif olarak değerlendirildi.

Testlerin Sensitivite ve Spesifitesi

Araştırmada kullanılan serolojik testlerin sonuçlarına göre sensitivite ve spesifite oranları aşağıda belirtildiği şekilde hesaplandı.

KONTROL TEST	REFERANS TEST		Toplam
	+	-	
+	Gerçek pozitif	Yalancı negatif	
-	Yalancı pozitif	Gerçek negatif	
Toplam			

Sensitivite oranı = Gerçek pozitif / Toplam pozitif X 100

Spesifite oranı = Gerçek negatif / Toplam negatif X 100

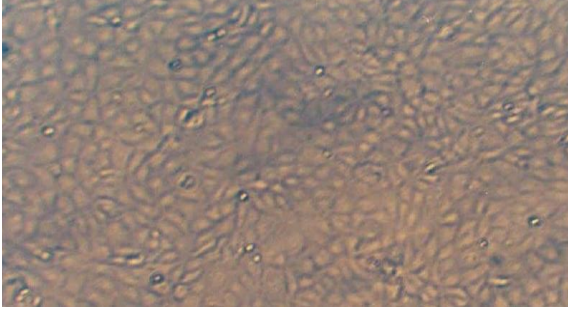
İstatistiksel Analiz

Araştırmanın sonuçları Minitab (Minitab 14,0 Inc., State College, PA, ABD) programında yer alan ki-kare (X²) testi ile değerlendirildi. P<0.05 değeri istatistiki açıdan önemli kabul edildi.

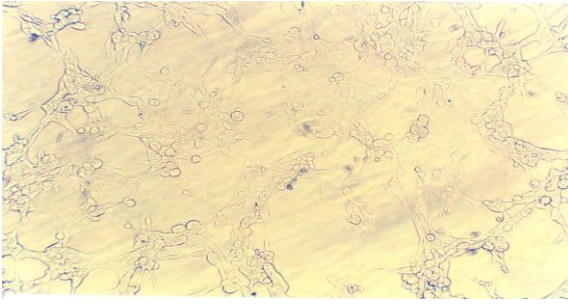
BULGULAR

Virus

Hücre kontrol (Şekil 1) olarak kullanılan MDBK hücre kültürlerinde herhangi bir değişiklik gözlenmedi. BHV-1'in 'Colorado' referans suşunun inokulasyonu sonucu 24-48 saat içerisinde hücrelerde tipik kümeleşmeler ve granüller ile birlikte hücrelerin büzülmesi ve yuvarlaklaşması ile karakterize CPE gözlemlendi (Şekil 2).



Şekil 1. MDBK hücre kontrol (x40).
Figure 1. MDBK cell control (x40).



Şekil 2. BHV-1'in MDBK hücre kültüründe oluşturduğu CPE (24. saat, x40).
Figure 2. CPE in MDBK cell cultures infected with BHV-1 (24th hour, x40).

Virusun Titresi

BHV-1'in 'Colorado' referans suşunun MDBK devamlı hücre kültürlerinde yapılan mikrotitrasyon yöntemi sonucunda, enfeksiyözite gücü Kaerber (1964) metoduna göre $DKID_{50} = 10^{-4,25} / 0,1$ ml olarak hesaplandı.

Kan Serum Örneklerinin Mikro NT Sonuçları

Araştırmada 22 adet (%7,3) kan serum örneği BHV-1'e karşı oluşan antikor varlığı yönünden mNT ile pozitif tespit edildi.

Pozitif Serumların SN₅₀ Değerleri

Araştırmada, BHV-1 antikorları yönünden mNT ile pozitif tespit edilen 22 adet kan serumu örneğinin SN₅₀ değerleri 1/1,7-1/31,6 arasında bulundu.

Kan Serum Örneklerinde BHV-1 Antikor Varlığının ELISA ile Tespiti

Araştırmada 26 (%8,6) kan serum örneği BHV-1'e karşı oluşan antikor varlığı yönünden ELISA ile pozitif tespit edildi.

Testlerin Sensitivite ve Spesifitesi

Araştırmada kullanılan testlerden ELISA'nın sensitivitesi %100 spesifitesi %98 olarak belirlenirken mNT'nin sensitivitesi %84 spesifitesi ise %100 olarak belirlendi. ELISA ile mikro NT'i arasında elde edilen sonuçlar açısından istatistiksel fark tespit edilmedi ($P > 0.05$; χ^2 test).

TARTIŞMA

BHV-1 tarafından oluşturulan IBR, Office International Epizootica tarafından uluslararası ticarete önemli olan hastalıklar listesinde yer alan enzootik bir enfeksiyondur (OIE, 2013).

Türkiye'de IBR/IPV/IPB enfeksiyonunun varlığı ilk kez 1971 yılında Erhan ve ark. (1971) tarafından gerçekleştirilen serolojik bir çalışma ile ortaya konmuştur. İlk virus izolasyonu Burgu ve Akça (1987); semenden PCR ile BHV-1 izolasyonu ise Bulut ve Yavru (2004) tarafından gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışmada 22 adet (%7,3) kan serum örneği BHV-1'e karşı oluşan antikor varlığı yönünden mNT ile pozitif tespit edildi. Bu örneklerin SN₅₀ dağılımları 1/1,7 – 1/31,6 arasında bulundu. 26 (%8,6) adet kan serum örneği ise ELISA ile pozitif belirlendi. Örnekleme yapılan hayvanlara BHV-1 yönünden aşı uygulaması yapılmadığı için tespit edilen antikorlar işletmelerdeki enfeksiyon varlığının göstergesi olarak kabul edildi. Araştırmada kullanılan testlerden ELISA'nın sensitivitesi %100 spesifitesi %98 belirlenirken SNT'nin sensitivitesi %84 spesifitesi ise %100 tespit edildi.

Bu çalışmada mNT ile pozitif tespit edilen örnek sayısı (22; %7,3) ELISA ile elde edilenden (26; %8,6) daha az belirlendi. Bunun nedeni mNT'de toksik etki gösteren ve değerlendirilemeyen

örneklerin ELISA ile pozitif tespit edilmesine bağlandı. Benzer durum Durham ve Sillars (1986) tarafından da bildirilmiştir.

Bulut ve Yavru (2004) BHV-1'e karşı oluşan antikor varlığının tespit edilmesi amacı ile ELISA ve serum mNT testlerini kullandıkları çalışmada 23 adet kan serumunu ELISA ile 14 adet kan serumunu ise serum mNT testi ile pozitif bulduklarını bildirmişlerdir. Araştırmacılar (2004) BHV-1 ile ilgili yapmış oldukları çalışmada düşük seropozitivite oranlarının nedenleri, örneklenen hayvanların yaşlarına (1 yaş), örnekleme yapılan mevsime, ırk hassasiyetine ve cinsiyete bağlamışlardır. Ülkemizde hayvanların yaşları ile BHV-1 enfeksiyonunun seroprevalansı arasındaki ilişkiyi belirlemek için yapılan çalışmalarda ileri yaşlarda daha yüksek seroprevalans belirlendiği bildirilmiştir (Öztürk ve ark., 1988; Dağalp ve ark., 2001). Bu çalışmada elde edilen düşük seropozitivite oranları (%7,3-8,6) örneklenen hayvanların yaşlarının küçük olması (<2) ve rastgele örnekleme yönteminin kullanılmasına bağlandı. Bu çalışmada BHV-1 antikor varlığı yönünden pozitif belirlenen 22 örneğin titreleri 1/1,7-1/31,6 arasında tespit edildi. Bu sonuçlar Bulut ve Yavru (2004)'nin yaptığı çalışmada tespit ettikleri SN₅₀ değerleri (1:1,78-1:22,4) ile benzer bulundu.

Bolat ve ark. (1996) 335 adet kültür ırkı sığırdan aldıkları kan serumlarını ELISA ve serum mNT ile incelemişler ve örneklerin 188 (%56,1)'ini ELISA ile 98 (%29,25)'ini ise mikro NT ile BHV-1'e karşı oluşan antikorlar yönünden pozitif bulduklarını bildirmişlerdir. Araştırmacılar (1996) ELISA'nın sensitivitesini %92 olarak tespit ettikleri çalışmada ELISA ile tüm virusa bağlanan antikorları belirleyebildiklerini serum mNT'nde ise sadece virusu nötralize eden antikorların tespit edilebildiğini ifade etmişlerdir. Bu çalışmada kan serum örneklerinde BHV-1'e karşı oluşan antikor varlığının belirlenmesi yönünden ELISA'nın mNT'ye göre daha sensitif (%100) olduğu tespit edildi. Yapılan çalışmada BHV-1'e karşı oluşan

antikorların belirlenmesinde ELISA'nın serum mNT'ne göre daha sensitif bir teşhis metodu olduğu bir kez daha ortaya konarak elde edilen sonuçların daha önce yapılan çalışma bulguları (Cho ve Bohac, 1985; Collins ve ark., 1985; Durham ve Sillars, 1986; Bolat ve ark., 1996; Bulut ve Yavru, 2004) ile benzer olduğu gözlemlendi.

Sonuç olarak ELISA ile mikro NT'i arasında elde edilen sonuçlar açısından istatistiksel fark tespit edilememesine karşın bu araştırma sonuçlarına göre örnekleme yapılan işletmelerde BHV-1 enfeksiyonunun varlığı ortaya konuldu. BHV-1'e karşı oluşan antikor varlığının belirlenmesi yönünden ELISA'nın mNT'ye göre daha sensitif (%100) olduğu tespit edildi. Elde edilen sonuçlar örnekleme yapılan işletmelerde BHV-1 enfeksiyonunun varlığını göstermektedir. Rastgele örnekleme yapılmasına rağmen aşısız hayvanlarda enfeksiyonun tespit edilmiş olması örnekleme yapılan işletmelerin BHV-1 varlığı yönünden belirli periyotlarla kontrol edilmeleri gerekliliğini ortaya koymuştur.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından 2004/024 numaralı proje ile desteklenmiştir. Mevcut araştırmanın özeti 16th International Symposium of the World Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians'da sunuldu. Özet kongre kitapçığında basıldı.

KAYNAKLAR

- Ackermann M., Engels M., 2006. Pro and contra IBR-eradication. *Vet. Microbiol.*, 113, 293-302.
- Belak S., Ballagi-Pordany A., 1993. Application of the polymerase chain reaction (PCR) in veterinary diagnostic virology. *Vet. Res. Commun.*, 17, 55-72.
- Bolat Y., Bulut H., Ozdarendeli A., Doymaz MZ., 1996. Development of enzyme linked immunosorbent assay for detection of

- antibodies infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis virus in cattle. F.Ü. Sađ. Bil. Derg., 10, 283-288.
- Bulut H., Bolat Y., Özdarendeli A., Doymaz MZ., Gürhan Sİ., 1998. Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR) virus antijenlerinin lokalizasyonunun immunoperoksidaz boyama ile gösterimi. Tr. J. Vet. Anim. Sci., 267-271.
- Bulut O., Yavru S., 2004. Boğalarda Bovine Herpesvirus Tip-1 (BHV-1) enfeksiyonunun Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), Polymerase Chain Reaction (PCR) ve Virus İzolasyonu (VI) metotları ile karşılaştırmalı teşhisi ve seroepidemiolojisi. Eurasian J. Vet. Sci., 20, 61-70.
- Burgu I., Akça Y., 1987. First isolation of IBR virus in Turkey. Trop. Anim. Health. Prod., 19, 56.
- Cho HJ., Bohac JG., 1985. Sensitivity and spesificity of a enzyme-linked immunosorbent assay for detection of infectious bovine rhinotracheitis viral antibody in cattle. Can. J. Comp. Med., 49, 189-194.
- Collins JK., Butcher AC., Teramoto YA., Winston S., 1985. Rapid detection of bovine herpesvirus type 1 antigens in nasal swap specimens with an antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay. J. Clin. Microbiol., 21, 375-380.
- Dağalp SB., Yıldırım Y., Alkan F., 2001. Buzağılarda maternal BHV-1 antikor düzeylerinin belirlenmesi. Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg., 48, 117-122.
- Durham PJK., Sillars HM., 1986. Evaluation of an enyzme-linked immunosorbent assay (ELISA) for serodiagnosis of infectious bovine rhinotracheitis infection with results of a preliminary survey. New Zealand Vet. J., 34, 27-30.
- Edwards S., Gitao GC., 1987. Higly sensitive antigen detection procedures for the diagnosis of infectious bovine rhinotracheitis: Amplified ELISA and reverse passive haemagglutination. Vet. Microbiol., 13, 135-141.
- Erhan M., Onar B., Csontas L., Hopkins IG., 1971. Serological survey on some virus and bedsonia diseases of cattle. Pendik Vet. Kont. Arş. Derg., 4, 55-58.
- Fenner F., Bachman PA., Gibbs EPJ., Murphy FA., Studdert MJ., White DO., 1987. Herpesviridae. In "Veterinary Virology", Academic Press, London.
- Frey HR., Liess B., 1971. Vermehrungskinetik und verwendbarkeit eines stark zytopatogenen VD-MD-Virusstammes für diagnostische untersuchungen mit der Mikrotiter-Methode. Zbl. Vet. Med., 18, 61-71.
- Gupta PK., Saini M., Bandyopadhyay SK., Garg SK., 1998. Bovine herpesvirus type 1 glycoprotein C expression in MDBK cells and its reactivity in enzyme-linked immunosorbent assay. Acta Virol., 42, 397-400.
- Ileri RG., Mirangi PK., Mbugua N., 1989. Rapid detection of bovid herpes virus 1 antigens by counter immunoelectrophoresis and agar-gel immunodiffusion. Trop. Anim. Health. Prod., 21, 50-54.
- Kaerber G., 1964. In diagnostic procedures for virus and rickettsial disease. Public Health Ass., 3, 48-50.
- Meurens F., Schynts F., Keil GM., Muylkens B., Vanderplasschen A., Gallego P., Thiry E., 2004. Superinfection prevents recombination of the alphaherpesvirus bovine herpesvirus 1. J. Virol., 78, 3872-3879.
- Murphy FA., Gibbs EPJ., Horzinek MC., Studdert MJ., 1999. Herpesviridae. In "Veterinary Virology", Eds., FA Murphy, EP Gibbs, MJ Studdert, MC Horzinek, 6th ed., Academic Press, San Diego, California, USA, Chapter 18, 301-311.
- 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 RS., 2009. Bovine herpes virus infections in cattle. *Anim. Health Res. Rev.*, 10, 85-98.
- OIE, 2013. <http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-code/access-online/> [Erişim Tarihi 27.03.2013]
- Öztürk F., Toker A., Yavru S., 1988. Konya Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü sığırlarında infectious bovine rhinotracheitis infectious pustuler vulvovaginitis (IBR/IPV) üzerine araştırma. *Eurasian J. Vet. Sci.*, 4, 53-64.
- Rana SK., Kota SN., Samayam PN., Rajan S., Srinivasan VA., 2011. Use of real-time polymerase chain reaction to detect bovine herpesvirus 1 in frozen cattle and buffalo semen in India. *Vet. Ital.*, 47, 313-322.
- Schynts F., Baranowski E., Lemaire M., Thiry E., 1999. A specific PCR to differentiate between gE negative vaccine and wildtype bovine herpesvirus type 1 strains. *Vet. Microbiol.*, 66, 187-195.
- Smits CB., Van Manen C., Glas RD., De Gee AL., Dijkstrab T., Van Oirschot JT., Rijsewijk FA., 2000. Comparison of three polymerase chain reaction methods for routine detection of bovine herpesvirus 1 DNA in fresh bull sperma. *J. Virol. Methods.*, 85, 65-73.
- Straub OC., 1991. BHV 1 infections: Relevance and spread in Europe. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.*, 14, 175-186.
- Vilcek S., Deliova I., Strojny L., Forgac O., Havran M., 1993. The effect of the mode of sampling on BHV-1 detection in infected cattle by dot-blot hybridization. *Vet. Microbiol.*, 36, 335-358.
- Weigler BJ., Babineau CA., Sherry B., Nasisse MP., 1997. High sensitivity polymerase chain reaction assay for active and latent feline herpesvirus 1 infections in domestic cats. *Vet. Rec.*, 29, 335-338.
- Wellenberg GJ., Verstraten E., Mars MH., Van Oirschot JT., 1998. Detection of bovine herpesvirus 1 glycoprotein E antibodies in individual milk samples by enzyme-linked immunosorbent assays. *J. Clin. Microbiol.*, 36, 409-413.
- Zhou J., Lyaku J., Fredrickson RA., Kibenge FS., 1999. Improved detection of bovine herpesvirus 1 in artificially infected bovine sperma by protein amplification. *J. Virol. Methods.*, 79, 181-189.