



T.C.
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İNAKTİF PARAPOXVİRUS (İPPVO)'UN, SIĞIRLARDA
INFECTIOUS BOVINE RHINOTRACHEİTİS (İBR) AŞI
UYGULAMASINA İMMUNMODÜLATÖR ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Süleyman ERBASAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**Danışman
Doç. Dr. Nuri MAMAK**

BURDUR-2019

T.C.
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İNAKTİF PARAPOXVİRUS (İPPVO)'UN, SIĞIRLARDA
INFECTIOUS BOVINE RHINOTRACHEİTİS (İBR) AŞI
UYGULAMASINA İMMUNMODÜLATÖR ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Süleyman ERBASAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

Danışman

Doç. Dr. Nuri MAMAK

Bu Araştırma Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 0571-YL-19 proje numarası ile desteklenmiştir.


BURDUR-2019

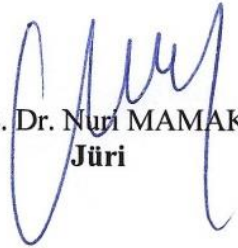
KABUL VE ONAY

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Süleyman ERBASAN tarafından *Doç. Dr. Nuri MAMAK* yönetiminde hazırlanan *İnaktif Parapoxvirus (iPPVO)'un, Sığırlarda Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR) Aşı Uygulamasına İmmunmodülatör Etkisinin Araştırılması* başlıklı tez çalışması jüri üyeleri olarak tarafımızdan okunmuş; kapsamı ve niteliği açısından İç Hastalıkları Anabilim Dalında *Yüksek Lisans Tezi* olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 29.08.2019


Doç. Dr. Mustafa KABU
Başkan


Doç. Dr. Nuri MAMAK
Jüri


Dr. Öğr. Üyesi Ramazan YILDIZ
Jüri

ONAY

Bu tez, Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Lisans Üstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu 04/10/2019 Tarih ve 42 sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. M. Doğa TEMİZSOYLU
Müdür
Sağlık Bilimleri Enstitüsü



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim süresince danışmanlığımı yürüten, çalışmamın her aşamasında bilgi ve deneyimi ile büyük destek ve yardımlarını gördüğüm danışman hocam Sayın Doç. Dr. Nuri MAMAK'a, tezin istatistiksel analiz aşamasında yardımcı olan Sayın Prof. Dr. Halil İbrahim GÖKCE ve Dr. Öğr. Üyesi Ramazan YILDIZ'a tezin laboratuvar aşamasında yardımcı olan ve imkân sağlayan Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı ve öğretim üyelerine, kan örneklerinin santrifüj edilmesinde emeği geçen Tefenni İlçe Hastanesi Müdürü Sayın Sadık CANTÜRK ve laboratuvar teknikerlerine teşekkürlerimi borç bilirim. Maddi ve manevi desteğini esirgemeyen, yüksek lisans eğitimimde hep yanımda olup her aşamada benimle birlikte çalışan EŞİM ve KIZIMA sonsuz teşekkür ederim.



ETİK BEYAN

“İnaktif Parapoxvirus (iPPVO)’un, sığırlarda Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR) aşu uygulamasına immunmodölatör etkisinin araştırılması” başlıklı tezin kendi çalışmam olduğu, tezin plan aşamasından yazım aşamasına kadar bütün aşamalarda etiğe aykırı davranışımın olmadığı, bu tezdeki tüm bilgilere akademik ve etik kurallar dahilinde ulaştığımı, bu çalışmada kendime ait olmayan bütün malumat ve yorumlara kaynak gösterip kaynakçada belirttiğimi, yine bu tezin aşamalarında telif ve patent haklarına aykırı davranışımın olmadığını, Doç. Dr. Nuri MAMAK gözetiminde Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kılavuzuna uygun hazırladığımı bildiririm.

Süleyman ERBASAN

Tarih: 21.10.19

İmza:



İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK SAYFASI	ii
KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ETİK BEYAN	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİLLER	vii
TABLolar	xiii
SİMGELER ve KISALTMALAR	ix
TÜRKÇE ÖZET	x
İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT)	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR)	3
2.1.1. Etken Serotip ve Özellikleri	3
2.1.2. Epidemiyoloji	4
2.1.3. Klinik Bulgular	4
2.1.4. Teşhis Metotları	5
2.1.5. Koruma ve Kontrol	5
2.2. Marker Aşılar	6
2.3. İmmunmodülatörler	8
2.4. Parapox Virüs Etki Mekanizması	9
2.4.1. Parapox Virus Kullanım Alanları	10
2.5. Sitokinler ve İmmun Yanıt	12
2.5.1. İnterferon ve Özellikleri	13
2.6. İmmun Yanıt Baskılanması ve Oluşumu	15
2.6.1. Makrofajlar	15
2.6.2. İnterferon Gamma	16
2.6.3. Virusu nötralize eden antikorlar	17
3. GEREÇ VE YÖNTEM	18
3.1. Gereç	18
3.1.1. Hayvan Materyali	18
3.1.2. ELISA Kitleri	18
3.2. Yöntem	20
3.2.1. Klinik Muayene	20
3.2.2. iPPVO'nun ve IBR aşısı (Rispoval®)'nın uygulaması	20
3.2.3. Kan Örneklerinin Alınması	20
3.2.4. ELISA Testinin Yapılışı	21
3.2.5. Mikronötralizasyon Testi (mNT)	22
3.2.5.1. Virus	22
3.2.5.2. Virus Titresi	22
3.2.5.3. Hücre Kültürleri	22
3.2.5.4. Kullanılan Serumları	22
3.2.5.5. Virusun Üretilmesi	23
3.2.5.6. Virus Mikrotitrasyon	23
3.2.5.7. Mikrotitrasyon	24
3.3. İstatistiksel Analizler	24

4. BULGULAR	26
4.1. Hemogram ve ELISA Sonuçları	26
4.2. Kontrol-1, Kontrol-2 BHV-1 Antikor Titre Sonuçları	32
4.3. Deneme BHV-1 Antikor Titre Sonuçları	33
5. TARTIŞMA	34
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	49
KAYNAKLAR	40
ÖZGEÇMİŞ	44



ŞEKİLLER

Şekil 3.1.	ELISA Kitleri	19
Şekil 3.2.	ELISA Kitleri	19
Şekil 4.1.	Kontrol 1, kontrol 2 ve deneme gurubu 0. gün sitokin ve hemogram parametreleri (Standart ortalama \pm standart hata).	28
Şekil 4.2.	Kontrol 1, kontrol 2 ve deneme gurubu 4. gün sitokin ve hemogram parametreleri (Standart ortalama \pm standart hata).	28
Şekil 4.3.	Pleytlere stop solüsyonu eklenmesi (Sarı renk) ve reaksiyondaki görünümü (Mavi renk). MDBK hücre kültürü (hücre kontrol) (x10)	29
Şekil 4.4.	IBR/IPV virüsü Colorado suşu ile enfekte MDBK hücre kültürünün 3. gündeki görünümü (x10).	30
Şekil 4.5.	MDBK hücre kültürü (hücre kontrol) (x10)	31

TABLÖLAR

Tablo 4.1.	0.gün alınan kan örneklerinin hemogram ve ELISA sonuçları, (Ortalama \pm Standard sapma)	25
Tablo 4.2.	4.gün alınan kan örneklerinin hemogram ve ELISA sonuçları, (Ortalama \pm Standard sapma)	26
Tablo 4.3.	Aşı Grubundaki Sığırların BHV-1 Antikor Titre Değerleri	31
Tablo 4.4.	Deneme Grubundaki Sığırların BHV-1 Antikor Titre Değerleri	32
Tablo 4.5.	Nötralizasyon Değerlendirme	33



SİMGELER ve KISALTMALAR

APC	Antijen Sunan Hücreler
BoHV-1	Bovine herpes virus-1
BVD	Bovine Viral Diarrhea
BVDV	Bovine Viral Diarrhea Virus
CPG	C; sitozin-p; fosfat-G; Guanin
CTL	Sitotoksik T lenfositler
DC	Dentritik Hücreler
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FRC	Fonksiyonel reziduel kapasite
GM-CSF	Granülosit Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör
GRAN	Granulosit
HGB	Hemoglobin
HTC	Hematokrit
IBR	Infectious Bovine Rhinotracheitis
If	İnterferon
IG	İmmunglobulin
IL	İnterlökin
IFN γ	İnterferon Gamma
IL-2	İnterlökin 2
IL-6	İnterlökin 6
IL-12	İnterlökin 12
iPPVO	İnaktif parapoxvirus ovis
LYM	Lenfosit
MCF	Malignant Catarrhal Fever= coryza
MCH	Mean Corpuscular Hemoglobin
MCHC	Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration
MCV	Mean Corpuscular Volume
mNT	Mikronötralizasyon
MHC	Büyük Doku Uygunluk Kompleksi
NK	Natural Killer=Doğal Öldürücü Hücreler
NM	Nanometre
PBMC	Periferik kan mononükleer hücreler
PMN	Polimorfonükleer Nötrofiller
RNA	Ribonükleik Asit
TH	T-yardımcı hücreleri
TNF	Tümör Nekroz Faktör
WBC	White Bloods Celss
%	Yüzde
°C	Santigrat derece
μl	Mikrolitre

ÖZET

İnaktif Parapoxvirus (iPPVO)'un, sığırlarda Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR) aşısı uygulamasına immunmodülatör etkisinin araştırılması

Sunulan çalışmada; İnaktif parapoxvirus ovis (iPPVO)'un, sığırlarda inaktif IBR aşısı uygulamasının, serum virüsü nötralize eden antikor titrelerinde ve sitokin konsantrasyonlarında değişiklikler araştırıldı. Bu amaçla, çalışmada klinik olarak sağlıklı, aşısız, yaşları 3 aylıktan yukarı, farklı ırklardan 40 adet sığır kullanıldı. Kontrol-1 grubu (n=10), kontrol-2 grubu (n=10) ve deneme grubu (20) olarak sığırlar 3 gruba ayrıldı. Kontrol-1 ve deneme grubuna 0.,2.,4. gün iPPVO (Zylexis® flk), kontrol-2 grubuna 4. gün tek doz IBR aşısı (Rispoval®) uygulandı. Hayvanlardan kan örnekleri, 0. gün ve 4. gün aşısı uygulamasından 6. saat sonra alındı. Çalışmada, IFN gamma, IL-2, IL-6, IL-12 düzeylerini belirlemek için ticari ELISA kitleri kullanıldı. Çalışmada, deneme grubunda, kontrol-1 ve kontrol-2 grubuna göre IFN gamma, IL-2, IL-6 ve IL-12 düzeyleri anlamlı derecede yüksek bulunurken, Kontrol-1 ve kontrol-2 grupları arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı bulunmadı. Sonuç olarak; IBR aşısı uygulanan sığırlara iPPVO'un uygulamasının, iPPVO'nun immunmodülatör etkisi ile sitokin konsantrasyonunda artış olduğu tespit edildi. Ayrıca virüsü nötralize eden antikor titreleri aşısı ve iPPVO yapılan grupta diğer grupta yer alan sığırlara göre önemli düzeyde yüksek olduğu belirlendi. IBR aşısının iPPVO ile uygulanmasının, aşısı etkisini arttırmaya yardımcı olabileceği sonucuna varıldı. Bu nedenle; IBR enfeksiyonunun kontrolünde, IBR aşısı ile iPPVO'nun kombinasyonu daha etkili olabilir.

Anahtar Kelimeler: Aşılama, İmmunmodülatör, inaktif Parapoxvirus (iPPVO), Enfeksiyöz Bovin Rinotracheitis (IBR), sığır

ABSTRACT

Investigation of The Immunomodulatory Effect of Inactive Parapoxvirus (iPPVO) on Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR) Vaccine in Cattle

The objective of the present study was to investigate the effects of inactive parapoxvirus ovis (iPPVO) on the virus neutralizing antibody titres and cytokine concentrations in cattle vaccinated with inactive infectious bovine rhinotracheitis (IBR) vaccine. For this purposes, 40 clinically healthy and unvaccinated cattle in different breeds and older than 3 months of ages were used in the study. Animals were divided into three groups as followed; Control-1 Group (10 cattle), Control-2 (10 cattle) and Study Group (20 cattle). iPPVO (Zylexis® flk) was injected to the cattle in Control-1 and Study Groups on days 0, 2nd and 4th, while a single dose of IBR vaccine (Risposal®) was applied to the Control-2 Group and Study Group on the 4th day. Blood samples were collected from all the animals twice on day 0 and 6 hours after 4th days of injections and these samples were then used to prepare sera. In the study, bovine specific ELISA kits were used to determine IFN gamma, IL-2, IL-6 and IL-12 according to the manufacturer instructions. Serum concentrations of IFN gamma, IL-2, IL-6 and IL-12 were significantly higher in Study Group than those of serum samples obtained from Control-1 and Control-2 Groups. There was no significant differences in any of parameter between Control-1 and Control-2 Groups. Furthermore, virus neutralizin antibody titres were higher in cattle injected with BHV-1 vaccine and iPPVO than that of cattle in Control-1 and Control -2. In conclusion, iPPVO increases sitokin concentrations in IBR-vaccinated cattle, indicating the presence of immunomodulator effect of iPPVO. It is suggestive that application of iPPVO at the time of vaccination may help to increase productive efficiency of IBR vaccine in cattle. Thus, in combination of iPPVO and IBR vaccine can be useful to the control of IBR infection in cattle.

Keywords: Cattle, Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR), Immunomodulator, inactive Parapoxvirus (iPPVO), vaccination

1. GİRİŞ

Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR), Bovine herpes virus-1 (BoHV-1) etkeni tarafından oluşturulur. Bovine herpes virus-1 (BoHV-1) sığırlarda, başta solunum sisteminde olmak üzere sinir sistemini ve genital sistemi etkileyerek fertilitte bozukluklarına, abortlara ve yeni doğanlarda ölümcül sistemik hastalıklara neden olmaktadır (Jones ve Chowdhury, 2010; Raaperi ve ark., 2012). BoHV-1 ile enfekte sığırlar, yaşam boyu virüsün taşıyıcısı olarak kalabilirler (Ackermann ve ark., 1982). Bu taşıyıcı hayvanlarda virüs; buzağılama, transport, parazit enfestasyonu ve bazı ilaçların kullanımı gibi stres faktörlerine bağlı olarak tekrar aktif hale gelebilir ve virüs saçılımı olur (Kook ve ark., 2015; Winkler ve ark., 2000). BoHV-1 enfeksiyon kontrolü ve eradikasyonunda iki stratejik yaklaşım bulunmaktadır. Bunlardan ilki hayvanlara test uygulanması ve daha sonra seropozitif hayvanların kesime gönderilerek üretimden çıkarılmasıdır. Bu yaklaşım, hastalığın düşük prevalansa sahip olduğu ülkelerde yararlıdır (Ackermann ve Engels, 2006). Diğer bir strateji ise, ülkemizde (Alkan ve ark., 2005) olduğu gibi seropozitifliğin yüksek olduğu ülkelerde; sürülerde bovin herpes virüs tip 1 (BoHV-1) glikoprotein E (gE)-negatif inaktif marker aşuların kullanılması ve doğal olarak enfekte olmuş hayvanların sürüden eradikasyonunun işletme için ekonomik olarak kabul edilebilir olduğu zaman sürüden çıkartılmasıdır (Ackermann ve Engels, 2006; Raaperi ve ark., 2014). BoHV-1 ile enfekte sığırlar yaşamları boyunca latent olurlar. Strese veya immünosupresyon oluşturan nedenlere bağlı olarak virus yeniden aktif hale gelebilir (Kook ve ark., 2015., Winkler ve ark., 2000). Aşılamada genel olarak stres faktörlerinin ortadan kaldırılması ve immunmodülatörlerin kullanımı, immunizasyonun daha iyi olmasını sağlar. İnaktif Parapoxvirüs ovis D1701 suşu (iPPVO) veteriner sahada immunstimulan ilaç olarak ruhsatlanmıştır. İlaç kedi, köpek, at, büyükbaş hayvanlar ve domuzlarda spesifik olmayan bağışıklık sistemini uyarak enfeksiyon ve/veya stres kaynaklı hastalıkların önlenmesine yardımcı olan liyofilize formda enjeksiyonluk çözelti olarak satışa sunulmuştur. Uygulanan türlerde lenfositlerin proliferasyonunu stimüle ettiği ve lenfositlerden antiviral interferonların ve interleukinlerin salınımını artırdığı prospektüsünde belirtilmiştir (Coşkun, 2017).

Bu alışmada; İnaklıf parapoxvirus ovis (iPPVO)'un, sığırlarda inaklıf IBR aşı uygulaması programında tatbikinin, serum antikor titrelerinde ve sitokin konsantrasyonlarında değişikliklere neden olabileceği hipotezine dayanmaktadır. Çalışmada, sığırlara inaklıf IBR aşı uygulaması programı dahilinde viral bir bağışıklık uyarıcısı olarak iPPVO (Zylexis® flk) ticari ürününün uygulanmasından sonra farklı zamanlarda toplanan serum örneklerinde antikor titreleri, proinflamatuvar ve anti-inflamatuvar sitokin konsantrasyonlarındaki değişiklikler belirlenerek sığırlara inaklıf IBR aşı uygulamasında, inaklıf parapoxvirus ovis (iPPVO)'un immunmodülatör etkisinin araştırılması amaçlandı.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR)

IBR, her yaştan sığırları etkileyen, oldukça bulaşıcı enfeksiyöz viral bir hastalıktır (Scott, 2017). Enfeksiyon inhalasyonla ve hayvanların arasındaki temas olan grup içerisinde hızla yayılarak ortaya çıkar (Scott, 2017). Hastalık üst solunum yollarının enfeksiyonu ile karakterizedir (Scott, 2017). IBR'ye neden olan virüs, bovine herpes virüsü 1 (BHV 1), ayrıca dişi sığırlarda enfeksiyöz pustüler vulvovajinite ve erkeklerde enfeksiyöz balanopostite neden olduğu gibi abortus ve fetal deformasyonlara neden olabilir (Scott, 2017). Enfekte sığır, ilk enfeksiyondan bir kez iyileşmiş olan latent faza geçer ve klinik olarak normal görünmesine rağmen, stres altındayken hastalığın nüksetmesine neden olabilir. Ekonomik yönden önemli bir enfeksiyon olan IBR-IPV'in etkeni olan Bovine Herpesvirus (BHV 1), herpesviridae familyasının alphaherpesvirinae alt grubuna ait bir virusdur. (Scott, 2017). Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü tarafından listelenen IBR, azalan üretim ve doğurganlık nedeniyle önemli ekonomik kayıplardan sorumlu olmuştur (Sayers, 2017).

2.1.1. Etken Serotip ve Özellikleri

IBR sığırların viral bir hastalığıdır. Etkeni Bovine Herpes virus'tur (BoHV-1, BHV 1). Hastalık bulunduğu ve hasar verdiği organa göre isim alır. Sığırların solunum yolu enfeksiyonlarında Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR) adını alırken, dişilerin üreme organlarında IPV=Infectious Pustular Vulvovaginitis, erkeklerin üreme organlarında IBP=Infectious Balanoposthitis adı verilen hastalıklara sebep olur. Etkenin en dış morfolojik yapısında zarf bulunmaktadır. Dış yapısını saran bu zarf proteinlerin önemi nötralizan antikolar, sitotoksik T-lenfositleri ve hücre reseptörleri, hedef canlıya bulaştığında bağlanmasını sağlar. Virusun bazı araştırmalarda -65 °C'den düşük sıcaklıklarda stabil olduğu görülmüştür. +4 °C zamanla inaktif duruma geçmesine rağmen 20 °C de bir yıl stabil kalabilir. 37 °C'de 10 gün, 56 °C 20 dk. süresinde inaktif konuma geçer. BHV-1 virusun alt serotipleri bulunup, DNA, protein ve antijenik yapılarına göre BHV-1.1,

BHV-1.2, BHV-1.3 olmak üzere üç alt tipi mevcuttur. BHV-1.3 genç sığırlarda ensefalitis etkeni ve BHV-1.2, Enfeksiyöz Balanopostitis (IPB) ve Enfeksiyöz Pustular Vulvavaginitis (IPV) etkenidir. IBR enfeksiyonundan genellikle BHV-1.1 sorumlu tutulmuştur. Solunum, sinir, genital organların yanı sıra deri lezyonları, mastitis ve konjunktivitise sebep olur (Yanbakan, 2004).

2.1.2. Epidemiyoloji

BoHV1 solunum yolunun viral hastalık yapıcı etkenlerinden biri olup, diğer viral etkenlerle örneğin, BRSV ve PI3 viruslarıyla, ayrıca, Mannheimia haemolytica, Pasteurella multocida, Histophilus somni (Haemophilus somnus), Trueperella pyogenes, Bibersteinia trehalosi gibi bakterilerle birlikte şiddetli solunum yolu enfeksiyonlarına yol açar. IBR etkeni BoHV1, insanlarda görülen uçuk virusu (Herpes Simplex Virus = HSV) ile akrabadır. Ortak tarafları, strese bağlı olarak ortaya çıkmaları ve hastalık oluşturmalarıdır. BoHV1, 6 önemli klinik bulgu ile ortaya çıkar. Solunum yolu hastalığı (pnömoni, transport, nakliye humması), gözde kızarıklık, aşırı gözyaşı ve yavru atma (abortus), dişi ve erkeklerde cinsel organ enfeksiyonları, beyinde yangısal bozukluklar, buzağılarda beyinde veya genel olarak enfeksiyonlara neden olur (Avcı ve ark., 2016).

2.1.3. Klinik Bulgular

Sağlıklı sığırlarda belirtiler fark edilemeyecek kadar hafif ancak, olumsuz çevre şartlarına maruz kalmış ya da stres altında bağışıklık sistemi baskılanmış sığırlarda ölümlerle sonuçlanan durumlar gözlemlenebilir. Solunum sisteminde Parainfluenza (PI-3) ve Bovine Diarrhoea Virus (BVDV) ile komplike enfeksiyona yol açabilir. Ateş, salivasyon, seröz veya komplike durumunda purülent burun ve göz yaşı akıntısı, öksürük, depresif görünüm oluşabilir. Solunum ve genital bölgede bulunan mukoz membranlarda fokal nekrozlar oluşur. Bu lezyonlar virüs replikasyonu ve buna bağlı oluşan sitopatolojik etki (CPE) sonucu gelişim gösterebilir. Bazı durumlarda membranlarda nekrotik lezyonların püstülleşmesi ve birleşmesi sonucunda erezyonlar görülebilir. Konjunktivada, bilateral kızarıklık ve şiddetli göz akıntısı gözlemlenir. Vagina ve prepsiyum bölgelerinde nekrotik

lezyonlar tipiktir. Nekrotik endometritis, abortuslar, erken embriyonik ölümler, embriyonun rezorbsiyonu sonucu döl tutmama sorunu ortaya çıkabilir. Klinik olarak hastalığa yakalanmış hayvanlarda gelişim ve verim düşüklüğü ortaya çıkar (Yanbakan, 2004).

2.1.4. Teşhis Metotları

IBR enfeksiyonunun teşhisi gizli enfeksiyonlar için seroloji (kan örnekleri) veya aktif enfeksiyonlar için virüsün doğrudan tespiti (oküler veya nazal sekresyonlarda PCR veya floresan antikor testleri) yoluyla yapılır. BHV-1 sığırlarda solunum, sinir, göz ve genital sistem enfeksiyonlarına sebep olabilir. Mastitis ve deri lezyonlarında da identifiye edilmiştir (Scott, 2017).

Sağlıklı hayvanlara göre BHV-1 ile enfekte olmuş sığırların gelişimi arasında dört hafta gecikme görülür. Bazı olgularda süt veriminde azalma (4-24 litre/sığır/gün), meningoenfalitise bağlı körlük, kendi etrafında dönme gibi sorunlarla karşılaşılır. BHV-1 diğer Alfaherpesviruslar gibi mukozal epitellerdeki ilk replikasyonundan sonra periferal sinir sistemi gangliyonik nöronlarında latent enfeksiyonlar oluşturur. Nazal yolla bulaşan etken, solunum sistemi ve tonsillerin yüzeyindeki membranlarda yüksek titrede replike olur. Nöroaksonal yolla taşınır ve trigeminal ganglionların nöronlarına ulaşır. Genital enfeksiyonlarda ise vagina veya prepisyum mukoz membranında replike olur ve sakral ganglionlarda latent enfeksiyonlar oluşturur. Ömür boyu konağında viral DNA'nın ganglion nöronlarında var olduğu düşünülmektedir. Üreme organlarından gelen akıntı, bölgede kızarıklık, aşırı kuyruk sallama, sık sık idrar yapma gibi belirtiler şüphelenmeyi gerektirir. IBR'nin mandalarda da görüldüğü bildirilmektedir Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü tarafından listelenen IBR, azalan üretim ve doğurganlık nedeniyle önemli ekonomik kayıplardan sorumlu olmuştur (Sayers, 2017).

2.1.5. Koruma ve Kontrol

Koruyucu hekimlik uygulamaları hastalığı önler. IBR'nin aşısı vardır. Birçok Avrupa ülkesi BHV-1'in eradikasyonuna büyük önem vermiştir. Bu eradikasyon

çalışması aşılama yoluyla olmayıp sürüde seropozitif olan hayvanlar kesime sevk edilerek yapılır. Etken; sütçü sürülerde, süt tanklarından yılda 4 defa alınan süt örnekleriyle ve etçi sürülerde ise yılda bir defa alınan kan örnekleriyle serolojik olarak tespit edilir. Türkiye’de pozitif bulunanlar hayvanlar kesime sevk edilir. İşletmeye otuz gün karantina uygulanır. Negatif hayvanların kontrolü sağlanır ve infekte sığır ve materyalleriyle teması engellenir. Ticari semenlerden 3 ayda bir örnek alınır. Donör boğalar pozitif çıkarsa kesime sevk edilir. Koruma ve eradikasyon için hastalığın bildirim zorunlu olmalıdır. Küçük yaşta satın alınarak sürüye katılan, suni tohumlama istasyonlarına ve üretim merkezlerine gönderilen hayvanlar maternal antikor taşımaktadır. Maternal antikorları bulduran buzağuların eradikasyonları zorluk çıkarmaktadır. Eradikasyon programını etkileyen diğer durumlar; hayvan popülasyonunun dağınık olması, hayvan hareketlerinin sınırlandırılmaması ve sürülerin kalabalık olmasıdır (Yanbakan, 2004).

2.2. Marker Aşılar

Konvansiyonel veya marker aşı ile ve aynı zamanda, DNA ve subunit gibi aşılarla aşılamanın, doğal olarak enfekte hayvanların seviyesini düşürmede ve ekonomik kayıpları önlemede ya da enfeksiyonu ortadan kaldırmada önemli bir kontrol stratejisi olduğu bilinmektedir (Ackermann ve Engels, 2006). Konvansiyonel aşılar, BoHV-1 tarafından indüklenen klinik semptomlara karşı etkili klinik koruma sağlamaları da, bu aşılama ile veya doğal enfeksiyondan sonra meydana gelen antikor cevabının ayırt edilmesinin imkansızlığı nedeniyle eradikasyon programı yönünden dezavantajları vardır. Bovin herpes virüs tip 1 (BoHV-1) glikoprotein E (gE)-negatif inaktif marker aşıların kullanılması eradikasyon için daha çok avantaj sağlar. Türkiye’de de bir çok AB ülkesinde olduğu gibi BoHV-1 enfeksiyonunun yok edilmesi için gE (-) marker aşılarını kullanılması önerilmektedir (Alkan ve ark., 2018).

Marker aşılar; gen delesyon sonucu veya subunit elde edilen aşılardır. Diagnostik testlerde, aşıli bireyler, infekte veya portörleri saptamada ve/veya birbirinden ayırt etmede kullanılabilir. Bu tip aşılar ülkemizde ve dünyada, sorun

yaratan bulaşıcı hastalıkları kontrol altına almada veya eradikasyonunda kullanılır (Arda, 2000)

Aşıların, hayvanlarda oluşturduğu immunolojik cevabın derecesi, taşıdığı genin türüne, aşının hazırlanış ve verilış tarzına, miktarına, hayvanın genetik tür ve yaşına göre değişiklik gösterdiğine dair çalışmalar mevcuttur. Miyositlerde bulunan MHC-I molekülleri proteinler, bu moleküllerle birlikte hücre yüzeyine çıkarılarak CD8+ (CTL) hücrelerine geçiş yaparlar. Bu şekilde uyarılan CTL'ler sitokin sentezi oluşturur ve böylece hücrenel bağışıklık uyarılır. Fakat, miyositlerde B7-1 yardımcı moleküllerinin bulunmaması, bu uyarım şeklini APC'ler kadar yapamayacağı ortaya koymaktadır. Miyositler, kendisinin sentezlediği, antijenik molekülleri hücre yüzeyine çıkardıktan sonra bunları APC'lere gönderirler. APC'ler bu proteinleri işleyerek ve daha sonra MHC-I ve/veya MHC-II molekülleriyle bağlanarak hücre yüzeyine çıkarılır ve burada, T8+ (CTL) ve T4+ (Th) hücrelerine gönderirler. Böylece, uyarılan T-lenfositleri ve sentezledikleri sitokinler hücrenel ve humoral bağışıklık mekanizmasını uyarır (Arda, 2000).

Normal koşullar altında, kas dokusunda az miktarda makrofaj bulunmasına karşın, enjeksiyon sonrası çok az da olsa meydana gelen zedelenmeler bir yangısal reaksiyona ve buna bağlı olarak bu bölgeye makrofajların gelmesine ve miktarının artmasına sebep olur (Arda, 2000).

Antijen işleyen ve sunan hücreler (makrofajlar, APC) tarafından alınan protein antijenler, kan ve lenf yolu ile sekonder lenfoid organlara (dalak, lenf düğümleri) taşınır ve burada bulunan T-hücrelerine gönderilerek hem bunların ve hem de sentezlenen sitokinlerle B-hücrelerinin ve diğer hücrelerin uyarılmalarına aracılık ederler (Arda, 2000).

Kas içi enjeksiyonlar, bölgede bulunan makrofajlara da plasmid DNA girebilir. Ancak, bu hücrelerin, direkt olarak DNA'yı eksprese edebileceği kanıtı zayıf olarak kabul edilebilmektedir. Bu nedenle de, plasmid DNA'sının esas eksprese edildiği hücreler olarak kas hücreleri (miyositler) uygun bulunmaktadır (Arda, 2000).

Makrofajlarca uyarılan MHC-I ve MHC-II molekülleri ile bağlanarak hücre yüzeyine çıkarılan polipeptidler, hem T hücrelerini ve hem de bu hücrelerin sentezledikleri sitokinlerde B-hücrelerini uyarabildikleri gibi, B-hücreleri de serbest antijenleri alarak aktif hale gelebilir ve antikor sentezleyebilirler. Uyarılan Th-1'ler, IL-2 ve IFN-gammayı, ve Th-2'ler de IL-4,-5,-6 ve 10'u sentezleyerek B ve T hücre aktivitesini artırır. Ayrıca, makrofajlarca sentezlenen IL-1'ler de hem T ve hem de B hücrelerini uyarırlar (Arda, 2000).

Deri içine yapılan enjeksiyonlarda da esas ekspresyonu sağlayan hücreler olarak keratinositler bulunur. Bu hücrelerce sentezlenen antijenik proteinler, Langerhans ve dendritik hücreler ile ayrıca makrofajlar tarafından alınarak MHC molekülleri ile birlikte hücre yüzeyine çıkarılır ve buradan T-hücrelerine taşınırlar (Arda, 2000).

2.3. İmmunmodülatörler

Enfeksiyonlara karşı doğal immün yanıt (nonspesifik, doğal bağışıklık), hastalıklarla mücadelede önemli bir rol oynar. Bağışıklık sistemi üzerindeki etkilerinden dolayı düzenleyici özelliklere sahip olan maddelere “İmmunmodülatörler” denir (Blecha, 1988).

İmmunmodülatörler, genellikle bağışıklık yanıtını arttırmak veya düzenlemek için kullanılan maddelerdir. İmmunmodülatörler için diğer eşanlamlı ifadeler ise immünoaktif maddeler veya immünoaktifatörler gibi terimlerdir (Blecha, 1988). Bu immünoaktifatörlerden biri olan inaktif parapoxvirus ovis (iPPVO) (Zylexis®), immün sistemi uyararak özellikle enfeksiyöz hastalıklara karşı koruyucu olarak kullanılan nonspesifik bir immünoaktifatör olup enfeksiyöz viral hastalıklara karşı doğal bağışıklığı (non-spesifik, innate bağışıklık) stimüle eden güçlü bir mikrobiyolojik kökenli immünoaktifatördür (Schutze ve ark., 2010; Kart ve ark., 2010). iPPVO'nun farelerde herpes simplex ve hepatitis B virusuna karşı sitokin (IFN- γ , IL-12p40, IL-18 ve TNF- α) indüksiyonunu aktive ederek bu virüslere karşı duyarlılığı azalttığı ve antiviral aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir (Weber ve ark., 2003).

2.4. Parapox Virüs Etki Mekanizması

Virüsler; bağışıklık sistemini, bir immün reaksiyonu bypass ederek veya bastırarak veya bağışıklık sistemini aktif hale getirerek manipüle edebilirler (Grandvaux ve ark., 2002; Weber ve ark., 2003). Poxviridae familyasının bir üyesi olan parapoxvirüs ovis (PPVO veya Orf virüsü), dünya genelinde koyun ve keçilerin akut bir deri hastalığına neden olmakta ve insanlarda da enfeksiyon oluşturmaktadır (Haig ve Mercer, 1998). Virüs, konakçıda güçlü bir enflamatuar immün yanıt oluşturmaya rağmen konakçıyı tekrar tekrar enfekte edebilir ve nötralize antikolar tanımlanamamıştır (Haig ve Mercer, 1998; Haig ve McInnes, 2002). PPVO için bir dizi etkili immün kaçış mekanizması olduğu ileri sürülmüştür (Kruse ve Weber, 2001; Weber ve ark., 2003). Diğer virüsler gibi, PPVO da doğal bağışıklık sistemini uyarır. PPVO; fagositozu, NK hücre aktivitesi ve IFN-a, TNFa, IL-2 ve granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF) salınımını uyarır (Buettner ve ark., 1995).

PPVO'nun, immün modüle edici fonksiyonlara sahip gen ürünlerinden olan; IL-10'un virüs ortholog genini (Fleming ve ark., 1997) ve interferon-direnç faktörünü kodlayan vaccinia E3L geni taşıdığı bildirilmiştir (Haig ve ark., 1998). Son zamanlarda, GM-CSF ve IL-2'yi bağlayan ve inhibe eden proteinler tanımlanmıştır (Dean ve ark., 2000). İmmün kaçış mekanizmaları ve immün uyarıcı aktivitenin kombinasyonu, PPVO için çok etkili bir hayatta kalma stratejisidir (Weber ve ark., 2003). iPPVO (Zylexis®) içeren ticari preparat, enfeksiyonlara karşı doğal bağışıklığı uyararak için veterinerlik alanında kullanılmaktadır (Nguyen ve ark., 2002). iPPVO'nun sitokin (IFN, IL-12p40, IL-18 ve TNF- α) üretimini indükleyerek sıçanlarda hepatit B virüsü ve herpes simpleks virüsüne karşı duyarlılığı azalttığı bildirilmiştir (Weber ve ark., 2003).

PPVO biyolojisinin ilginç bir yönü, güçlü bir bağışıklık tepkisi olmasına rağmen konakçıları tekrar enfekte olma yeteneğidir (Anziliero ve ark., 2014). Nötralize edici antikolar nadiren belirlenir ve tekrar re-enfeksiyona karşı koruma sağlamamaktadır. Enfeksiyon oluştuğunda, PPVO, fagositoz, NK hücre aktivitesi ve çeşitli sitokinlerin üretimi (IFN-a, b; TNF-a, GM-CSF) dahil olmak üzere birçok doğal bağışıklık olayını kuvvetle uyarır (Anziliero ve ark., 2014). Öte yandan, bu

ajan için çok sayıda immün kaçış mekanizması gösterilmiştir. 138 kilobaz (kb) PPVO genomu, bir interferon direnç geni, GM-CSF inhibitörleri ve bir Bcl-2 benzeri apoptoz inhibitörü dahil olmak üzere, konakçı doğal tepkisi ile etkileşime giren bir dizi ürünü kodlar (Anziliero ve ark, 2014). PPVO'nun hayatta kalma stratejisi, immün uyarıcı ve kaçış mekanizmaları arasındaki dengeye dayandığı bildirilmektedir (Anziliero ve ark., 2014).

Öncelikle kimyasal olarak inaktive edilmiş PPVO'nun (iPPVO), paraimmünite olarak adlandırılan bir etki ile konakçıda immünmodülatör özellikler sergilediği görülmektedir. Daha sonrasında, iPPVO'nun immünohistimülasyon aktivitesi, farklı deney türlerinde ve klinik pratikte, farklı hayvan türlerinde farklı patojenlere karşı etkisi tespit edilmiştir. Mevcut bilgilere göre, bu etkiler potansiyel olarak kronik bulaşıcı hastalıklar, immünohistimülasyon, patojen kalıcılığı ve hatta kansere bağlı olaylarda dahil olmak üzere çeşitli durumlarda profilaktik ve / veya terapötik araçlar olarak kullanılabilir. Bununla birlikte, immünohistimülasyon iPPVO etkilerinin arkasındaki biyolojik ve moleküler olaylar, tam olarak anlaşılabilir değildir. iPPVO'nun doğal immünite üzerindeki ana etkileri, immün hücrelerin uyarılmasına ve IL-8, IL-12 ve tip I interferonlar gibi sitokinlerin salgılanmasına bağlı görünmektedir. Periferik kan mononükleer hücrelerinde (PBMC) iPPVO'ya cevap olarak IFN- γ indüksiyonunun çeşitli hayvan türleri için in vitro olduğu gösterilmiştir (Adams, 2013).

2.4.1. Parapox Virüs Kullanım Alanları

iPPVO, atlarda, sığırlarda, kedilerde, köpeklerde ve domuzlarda nonspesifik immün sistemi stimüle ederek enfeksiyon ve stres kaynaklı hastalıkların önlenmesine yardımcı olan liyofilize bir enjeksiyon çözeltisidir. Bununla birlikte, literatür taraması, birçok hayvan türünde birçok enfeksiyonun tedavisinde önerilmiş olan iPPVO'nun, inaktif aşılarda aşılamalarda kullanımı ve aşılamayla birlikte bağışıklık sisteminin ilk tepki araçları olan sitokin sentezi üzerindeki etkileriyle ilgili bir araştırma olmadığını göstermiştir (Friebe ve ark., 2004; Weber ve ark., 2003).

iPPVO ile immünomodülasyonu anlamadaki bir diğer önemli husus, immünomodülatör etkilere neyin sebep olduğu sorusu veya başka bir deyişle aktif bileşen (ler) in araştırılması ile ilgilidir. Poxvirüsler, virüs kaynaklı birçok proteine sahip çok karmaşık parçacıkların yanı sıra immünomodülatör etkilerde rol oynayan hücre materyalleridir. Ek olarak, viral nükleik asit veya inaktive PPVO üretim şekline bağlı olarak, "şartlandırılmış" ve enfekte olmuş doku kültüründen elde edilen süpernatant solüsyon tanımlanmış bağışıklık tepkilerini indükleyebilir (Castrucci ve ark., 2000).

Virüs için yüzey reseptörlerine sahip olan B ve T-hücreleri tarafından aracılık edilir. B hücreleri, BHV-1'in nötrleşmesine katılan antikor üreterek BHV-1 enfeksiyonuna cevap verir ve sonuç olarak, enfekte olmuş sığır serumundaki bu aktivite, hastalıktan iyileşme ile ilişkili gibi görünmektedir. Polimorfonükleer nötrofiller (PMN'ler), makrofajlar veya doğal öldürücü (NK) hücreler gibi hücrelerin aracılık ettiği spesifik olmayan bir cevap olarak kabul edilir. Bu hücreler, B ve T hücrelerinin aksine, antijenik hafızayı korumaz, ancak enfeksiyonun erken evresinde etki eder. Bu nedenle, makrofajlar, interferon-a (IFN-a) üretimine katkıda bulunan birincil etkenlerden biridir; bunlar, enfekte olmamış hücrelerde bir antiviral durumu indüklemenin yanı sıra, PMN, NK ve makrofajları etkinlikleri ve etkililiğini de modüle eder. Öte yandan, NK hücreleri, enfekte olmuş hücrelere yönelik sitotoksik aktiviteleri ile viral yayılmayı sınırlandırmada enfeksiyonun erken aşamasında yer alabilir (Castrucci, 2000). Bu yüzden gözlemlerden BHV-1'in neden olduğu enfeksiyonun kesin olarak öncelikle spesifik olmayan savunmanın (NSD) aktivitesine bağlı olduğu açıktır (Castrucci ve ark., 2000).

Metile edilmemiş CpG (guanin önünde bulunan sitozinin metilasyonu) motifleri içeren mikrobiyal DNA'nın bağışıklık sistemini uyarma potansiyeline sahip olduğu tespit edilmiştir (Castrucci ve ark., 2000).

Poxviridae familyası bilinen en büyük DNA virüslerini içerir. Kompleks genetik yapıları nedeniyle, poxvirüsler, konakçı immün tepkisini etkisizleştirebilen virülans proteinlerini kodlayan çeşitli genleri kullanarak immün evasyon için çeşitli mekanizmalara sahiptir. Aksi takdirde zayıflatılmış poxvirüsler, immünojenik

özelliklere sahiptir ve muhtemelen makropinositozla hücrel olarak alımını kolaylaştırması nedeniyle, güçlü doğuştan gelen konak immün tepkisini indükler (Castrucci ve ark., 2000).

İnaktif Parapoxvirüs ovis D1701 suşu (iPPVO) veteriner sahada immunstimulan ilaç olarak ruhsatlanmıştır. İlaç kedi, köpek, at, büyükbaş hayvanlar ve domuzlarda spesifik olmayan bağışıklık sistemini uyararak enfeksiyon ve/veya stres kaynaklı hastalıkların önlenmesine yardımcı olan liyofilize formda enjeksiyonluk çözelti olarak satışa sunulmuştur. Uygulanan türlerde lenfositlerin proliferasyonunu stimüle ettiği ve lenfositlerden antiviral interferonların ve interleokinlerin salınımını artırdığı prospektüsünde belirtilmiştir (Coşkun, 2017).

İmmunstimulan ilaçların kullanım şekilleri ve dozları etki mekanizmalarına uygun biçimde kullanılması gerekmektedir. Örneğin yapılan araştırmalarda levamizolun immün sistemi uyaran dozunun 2-3 mg/kg şeklinde olduğu tesbit edilmiştir. Daha yüksek doz ve sürekli kullanımı bağışıklık sistemini baskılamaktadır. Levamizol lenfosit proliferasyonunu, makrofajların fagositoz yeteneklerini nötrofillerin etki mekanizmalarını pozitif yönde arttırmaktadır (Coşkun, 2017).

Farelerde, sığırlarda, domuzlarda, atlarda, köpeklerde ve kedilerde zayıflatılmış koyun parapoxvirüsünün profilaktik veya metafilaktik tatbikatının, Aujeszky hastalığı virüsü, enfeksiyöz sığır rinotrakeit virüsü, vezikülitis gibi bazı bakteriyel ve viral ajanların neden olduğu klinik semptomların azaltılmasına yardımcı olduğu kanıtlanmıştır (Coşkun, 2017).

2.5. Sitokinler ve İmmun Yanıt

Sitokinlerin sentezi, viral veya bakteriyel faktörler tarafından uyarılır ve sitokinler çoğunlukla fagositler tarafından sentezlenir (Gale ve Wilkins, 2010). Bağışıklık yanıtında başlangıç rolü oynarlar (Gouwy ve ark., 2005; Quinn, 1990). Enfeksiyöz uyarımdan sonra, akut faz proteinleri olarak rol oynayan sitokinler arasında yer alan proinflamatuvar sitokinlerin, ilk 1-2 saat içinde en yüksek düzeye

ulaştığı ve daha sonra 6-8 saat içinde pik seviyeye ulaşan antienflamatuar sitokinlerin 24 saat içinde çok düşük seviyelere ulaştığı belirtilmiştir (Sabat ve ark., 2010). Üretilen TNF miktarı, hastalık sürecinde rolünün kontrol edilmesinde temel faktördür (Arai ve ark., 1990). IL-6 öncelikle T ve B lenfositleri ve diğer bazı hücreler tarafından sentezlenir (Anziliero ve ark., 2014). IL-6; akut faz reaktanlarının (CRP, haptoglobulin, vb.) sentezlenmesine, IgG sentezinin uyarılmasına, B lenfositinin farklılaşmasına, T hücresinin aktivasyonuna ve IL-2 üretiminin uyarılmasına yol açar (Dinarello, 2001). IL-10, çeşitli koşullar altında özellikle immün sistem hücreleri (T hücresi, B hücresi ve monosit / makrofaj) tarafından sentezlenen ve salınan bir anti-inflamatuar sitokindir (Sabat ve ark., 2010; Sharma ve ark., 2011). Th2 tipi sitokin olarak tanımlanan IL-10, inflammatuar yanıtın bastırılmasındaki rolüne ek olarak immün yanıtı dengelemede önemli bir rol oynar (Pestka ve ark., 2004; Villalta ve ark., 2011). IL-12, proinflammatuar bir sitokindir ve aktive edilmiş mononükleer fagositler ve dendritik hücreler tarafından sentezlenir. Hücre içi patojenlere karşı immün yanıtta etkilidir ve doğal öldürücü hücreler (NK)'in sitolitik etkisini artırır. Farelerde yapılan bir çalışmada, iPPOV uygulamasının, TNF- α (16 ve 24. saat) ve IL-6 (12, 16 ve 24. saat) sentezini uyardığı ve IL-10 ve IL-12 konsantrasyonlarında dalgalanmalara neden olduğu ve artan sitokin düzeylerinin, iPPOV'un immünmodülatör aktivitesine bağlanabileceği bildirilmiştir (Dinarello, 2000).

2.5.1. Interferonlar ve Özellikleri

İnterferonlar (İFN), canlı vücudunda lökosit ve fibroblastlar tarafından sentezlenen, molekül ağırlıkları düşük olup, nonspesifik ve indirekt etkiye sahip antimikrobiale substanslardır. Üç temel interferon belirlenmiştir. Alfa ve beta lökosit ve fibroblastlar tarafından sentezlenir. Gamma interferon (immün inteferon) ise antimikrobiyal özellikte, uyarılmış yardımcı T hücrelerince (T4, Th) sentezlenirler. Bu hücrelerin hücresel bağışıklıkta önemli fonksiyonları bulunur. Gama interferonlar, immün sistem hücrelerini (B, T, CTL, NK, makrofaj, lökosit, vs.) uyardığı gibi, bu hücrelerin yeni yüzey molekülleri (MHC, FcR, vs.) kazanmasında da rolleri bulunur. Ancak, antimikrobiale etkinliği yoktur (Ackermann, 2006).

İnterferonlar, sadece vücuda giriş yapan viruslar tarafından değil, bakteri, mantar, parazit, protozoon, mitojenler, sentetik polimerler (polisülfat, polifosfat, vs.) gibi substanslar da İFN sentezini uyarabilirler. Ayrıca, inaktive edilmiş (UV-ışınları, mutajenler, vs ile) viruslar da İFN sentezine yol açabilmektedirler (Ackermann, 2006).

İFN'ler, enfeksiyondan 6-10 saat sonra veya antikor sentezinden önce üretilirler ve antikorlar kanda yükselmeye başlayınca da, interferonların sayısı da azalmaya başlar. Antikor aktivitesine sahip olmayan interferonlar, kendilerinin sentezini indükleyen etkenden farklı olarak, kendisini üreten hücre türüne spesifiktirler. Yani, bir virus tarafından indüklenen interferon, sadece o virusa karşı değil diğer virüslere de etkili olabilmektedir. Bu nedenle de nonspesifik bir fonksiyona sahiptirler. Fakat herhangi bir canlının ve epitel, fibroblast vs. hücrelerde kullanıldığında, bu hüclere ait enfeksiyonlarda etkili olurlar. Bundan dolayı hücre spesifitesi seçicidir. Antikorlardan farklı tarafları ise, antikorlar, kendi sentezini uyaran etkenlere karşı çok spesifiktir ve genlerinin de ayrı kromozom üzerinde ve farklı sekanslara sahip olmasıdır. Etkinlikleri yönünden antikor ve interfeferonlar arasında farklılıklar vardır (Ackermann, 2006).

Son yıllarda, interferon üretiminde hibridoma ve rekombinant DNA teknolojilerinden fazlaca yararlanılır ve fazla miktarda üretimi yapılabilir. Örn, *E.coli* 'de interferon başarılı bir şekilde üretilmektedir (Ackermann, 2006).

İnterferonlardan insan hekimliğinde viral enfeksiyonlarda ve kanserin tedavisinde yararlanılmaktadır. İnsanlarda interferonların etkili olabilmesi için, önce insan orijinli interferonlar bulunması ve hücrelerde virus replikasyonunun başlamaması gereklidir. Ayrıca, veriliş yolunun, miktarının (dozu), süresinin önemleri oldukça fazladır (Ackermann, 2006).

İnterferonların antimikrobiyal etkileri indirekt olmaktadır. Enfekte hüclerden sentezlenmeye başlayan interferonlar, yanında bulunan hüclere girdiğinde, virüslere karşı etkili antiviral protein sentezini indükler. Üretilen bu proteinler viral enfeksiyonlara karşı bağışıklık oluşturur. Hüclerinin replikasyon ve ekspresyon

durumlarını ele geçirebilen viruslar, özellikle yavaş üreme özelliğine sahip virusların enfeksiyonlarında interferon sentezleyen sistemin zedelenmemesi önemlidir. Bu özelliği ve yerleşim yeri olarak farklı sistemlerde bulunabilen viruslar persiste enfeksiyon oluştururlar ve diğer letal enfeksiyonlardan daha fazla enfeksiyon oluşumuna yol açarlar (Ackermann, 2006).

2.6. İmmun Yanıt Baskılanması ve Oluşumu

Inaktive Parapoxvirus ovis (iPPVO) ve Propionibacterium acnes (P. acnes), şu anda profilaktik tedavi için immünmodülatörler olarak veya konvansiyonel tedaviye bağışıklık savunucularını iyileştirmek, bulaşıcı hastalıkları önlemek veya tedavi etmek için immünmodülatörler olarak kullanılmaktadır (Paillot, 2013). Etki biçimleri, doğal ve/veya adaptif immün yanıtlarla antijen spesifik olmayan bir etkileşime dayanır. iPPVO, lökositler tarafından sitokin salgılanmasını uyarır ve düzenler, *P.acnes* ise öncelikle makrofajların aktivasyonu ile etki eder. Aşılama, hastalıkların ve/veya bakteriyel enfeksiyonların gelişimini önlemek veya sınırlamak için esastır (Paillot, 2013). Ne yazık ki, aşılama ile indüklenen koruma her zaman uygun değildir. Aşı, maternal türevli antikör veya patojene doğal maruz kalma ile indüklenen önceden varolan bağışıklığın yokluğunda, mukozal doğal bağışıklık, temel bir savunma hattını temsil eder. Doğal immünite, önceden oluşturulmuş faktörlerden (örneğin, tamamlayıcı proteinler) ve yerleşik mononükleer hücrelerden (örneğin, makrofajlar, dendritik hücreler (DC) oluşan hızlı bir tepki ile başlar) (Paillot, 2013).

2.6.1. Makrofajlar

Makrofajlar, Dendritic hücrelerinin yanı sıra, doğuştan gelen ve adaptif immün yanıtların gelişimi için gerekli olan patern tanıma reseptörleri (PRR'ler) yoluyla istilacı patojenleri tanıyarak, profesyonel antijen sunan hücreler (APC) olarak da işlev görürler. En son önemli işlevleri, interlökinler (IL-1, IL-6, IL-8, IL-12) ve tümör nekroz faktörü alfa (TNF alfa) dahil olmak üzere pro-enflamatuar sitokinlerin sentezi ve lokal bölgelere yeni fagositik hücreler toplayan aracı maddeler ile birlikte olmasıdır. IL-1, IL-6 ve TNF alfa (ayrıca endojen pyrogens olarak da

bilinir) kombinasyonu, vücut sıcaklığında bir artışa neden olur (Paillot, 2013). Diğer sitokinler (örneğin, Tip I İnterferon; IFN alfa ve beta) ayrıca virüs bulaşmış hücreler ve doğuştan gelen bağışıklığa sahip hücreler (örn. Makrofajlar, plazmasitoid hücreler ve DC) tarafından hızlı bir şekilde sentezlenir. Enfeksiyon sırasında lokal olarak üretilen sitokinler ve kemokinler de dentritik hücrelerin adaptif immün yanıtın başlayacağı lenf nodlarının boşalması ve olgunlaşması için gereklidir (Paillot, 2013).

2.6.2. Interferon Gamma

Virüs ile bulaşmış herhangi bir hücre tarafından üretilen glikoptotein yapısındaki sitokinlere interferon denir. NK hücreleri tarafından sentezlenen IFN gama hücre içi patojenlere karşı en etkili, bir T yardımcı 1 (Th1) adaptif bağışıklık tepkisi gelişimini sağlar. Doğuştan gelen cevap sırasında başlatılan sitokin dengesinin modifikasyonu, daha sonra T yardımcı hücrelerinin, T düzenleyici hücrelerin ve sitotoksik lenfosit yanıtlarının, adaptif bağışıklığın tüm ana aktörlerinin gelişimi üzerinde derin bir etkiye sahip olabilir. Spesifik olmayan bağışıklık modülatörleri, doğal ve/veya adaptif bağışıklık tepkisi ile etkileşime giren, ancak bir antijene spesifik olmayan moleküllerdir. Aktiviteleri, doğuştan gelen hücrelerin aktivasyonuna ve ardından sitokin üretimine dayanır. İmmün yeterliliği artırma kabiliyetleri (aktivasyon, bastırma ve/veya düzenleme) sayesinde, immünmodülatörleri, enfeksiyona karşı korumayı sağlama veya iyileştirme ve immün fonksiyonu ve tepkisi bozulmuş/bastırılmış olan hayvanları destekleme rolünü üstlenir. İmmün yeterliliği artırma yetenekleri sayesinde immünmodülatörlerin (aktivasyon, bastırma ve / veya düzenleme), enfeksiyona karşı korumayı sağlama veya iyileştirme ve immün fonksiyonu ve tepkisi bozulmuş/bastırılmış veya düzensiz olan hayvanları destekleme rolleri vardır (Weber ve ark., 2003).

Virüsler, bağışıklık hücrelerini etkilemek için çeşitli stratejilerle, yani fonksiyonel etkisizleşmeye yol açan aşırı aktivasyonla, antijen sunumunu atlayarak veya efektör fonksiyonlarını baskılayarak, onlara karşı bağışıklık tepkisini manipüle edebilir (Weber ve ark., 2003). Poxvirus ailesinin Parapoxvirus cinsinin bir üyesi olan orf virüsü (ORFV), dünya genelinde koyun ve keçilerde yaygın bir patojen

olarak bilinir. Bununla birlikte, etkisizleştirilmiş iPPVO, farklı türlerde veteriner hekimlikte terapötik immünmodülatörün yanı sıra önleyici olarak da kullanılmıştır (Weber O. 2013). iPPVO, farelerde ve insan bağışıklık hücrelerinde sitokin salgılanması üzerinde güçlü etkilere neden olur; bu da, enflamatuvar ve Th1 ile ilişkili sitokinlerin otomatik olarak düzenlenmiş bir başlangıç düzenlenmesi döngüsüne ve ardından immünopatolojiyi azaltan Th2 ile ilişkili sitokinlerin oluşmasına neden olur (Weber ve ark., 2003).

iPPVO enfeksiyonunun ardından, konakçının bağışıklık sistemi virusları yok etmeye yanıt verecek ve ilk adım olarak virüse karşı doğuştan gelen bir yanıt başlatacaktır (Weber, 2013). Bu, doğal immün sistemin çeşitli hücreleri tarafından kemokinlerin ve sitokinlerin uyarılmasını içerir. iPPVO enfeksiyonu, enfeksiyon bölgesinde doğal öldürücü (NK) hücreler, nötrofiller ve dendritik hücreler (DC'ler) birikimine yol açar. Buna ek olarak, iPPVO interferon-a (IFN-a), interlökin-1 β (IL-1b), IL-8, granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF) ve IFN salınımını uyarır (Weber ve ark., 2003).

2.6.3. Virusu nötralize eden antikorlar

Nötralizasyon enfeksiyon meydana getirme gücüne sahip olan bir virusun, in vivo ve in vitro sistemlerde homoloğu olan antikorlar tarafından enfeksiyöz etme gücünün bloke edilmesidir. Virüs nötralizasyon testi epidemiyolojik kontrollerde klinik enfeksiyon teşhisinde serolojik olarak eradikasyon amacıyla, karantina merkezlerinde, aşılama sonrası antikor tesbitinde ve virüs izolatlarının identifiye edilmesinde kullanılmaktadır. Enfeksiyöz viremi dönemlerinde virüsü nötralize eden antikorlar virusun hücre içi reseptörlerine bağlanmalarını engelleyerek enfeksiyonu bloke ederler. Nötralizasyon testlerine serumların içindeki antikor tipleri belirlenmez buna karşın serumun virusun belli konsantrasyonuna karşı canlı sistemlerdeki koruyucu gücü ve serumun etkinlikleri belirlenir (Arda, 2000).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Hayvan Materyali

Bu araştırmanın materyalini; Burdur ilindeki süt sığırı işletmelerinde yaşları 3 aylıktan büyük olan ve genel muayenesi yapılarak klinik olarak sağlıklı olduğu belirlenen 40 adet sağlıklı sığır oluşturdu. Bu sığırlardan Kontrol 1 (n=10), Kontrol 2 (n=10) ve Deneme grubu (n=20) aşağıdaki şekilde oluşturuldu.

1. Kontrol (Zylexis): Kontrol 1 grubu 1 (10 adet klinik olarak sağlıklı sığır)
2. Aşı: Kontrol 2 grubu (10 adet klinik olarak sağlıklı sığır)
3. Zylexis+Aşı: Deneme grubu (20 adet klinik olarak sağlıklı sığır)

3.1.2. ELISA Kitleri

Toplanan serum örneklerindeki IFN, IL2, IL6, IL12 konsantrasyonlarını belirlemek için ticari olarak mevcut olan Bovine Interferon Gamma / IL2 / IL6 / IL12 ELISA antikör test kitleri kullanıldı.



Şekil 3.1 ELISA kitleleri



Şekil 3.2 ELISA kitleleri

3.2. Yöntem

3.2.1. Klinik muayeneler: Sığırların anemnez, cinsiyet, yaşı ve aşısı olup olmadığı gibi kayıt bilgileri alındı. Klinik olarak sağlıklı, IBR yönünden aşısız 3 aylıktan büyük sığırlardan kontrol ve deneme grubunu oluşturdu.

3.2.2. iPPVO (Zylexis® flk)'nun ve IBR aşısı (Risposal®)'nın uygulanması

Kontrol grubundaki 20 adet sığır iki gruba ayrıldı.

1. Kontrol 1. (Zylexis grubu) grubundaki 10 adet klinik olarak sağlıklı sığırlara 0., 2., ve 4. gün intramusküler olarak 2 ml serum Zylexis® uygulandı. 0. Gün ve 4. günün 6. saatinde kan örnekleri alındı.
2. Kontrol 2. (Aşı grubu) grubundaki 10 adet klinik olarak sağlıklı sığırlara 4. gün IBR aşısı (Risposal®) derialtı olarak 2 ml dozda verildi. 0. Gün ve 4. günün 6. saatinde kan örnekleri alındı.
3. Deneme grubundaki (Zylexis+Aşı grubu) 20 adet klinik olarak sağlıklı sığırlara aşılama öncesi 0., 2., ve 4. gün intramusküler olarak 2 ml iPPVO (Zylexis® flk) uygulandı ve 4. gün beraberinde IBR aşısı (Risposal®) derialtı olarak 2 ml dozda tek sefer verildi. 0. Gün ve 4.günün 6. saatinde kan örnekleri alındı.

3.2.3. Kan örneklerinin alınması

Deneme ve kontrol grubundaki 40 adet sığırdan uygulama yapılmadan önce vena jugularis'ten jelli tüp ve EDTA'lı tüplere kan örnekleri alındı. Biyokimyasal analizler için alınan kan örnekleri oda ısısında 15 dakika bekletildikten sonra 5000 rpm'de ve 10 dakika santrifüj edilerek serumu çıkarılacak ve analizler yapılabilecek kadar -20°C'de saklandı. Bu örneklerden proinflatuar ve anti-inflatuar sitokin seviyelerinin (Interferon gamma, IL-2 IL-6, IL-12) ölçümü yapıldı. EDTA'lı tüplere alınan kan örneklerinden hemen hemogram ölçümü yapıldı.

Kontrol 1, Kontrol 2 ve Deneme grubundaki hayvanlardan 4. Gün uygulamaları takiben 6. saatte vena jugularis'ten jelli tüp ve EDTA'lı tüplere kan örnekleri alınarak hemogram ve proinflatuar ve anti-inflatuar sitokin seviyelerinin ölçümü tekrar yapıldı.

Ayrıca Deneme ve kontrol grubundaki sığırlardan aşı uygulamasından 7., 14., 21. günde, virüs nötralizasyon testi için kan örnekleri alındı.

3.2.4. ELISA Testinin Yapılışı

Her birine özel ELISA kitleri standart sekiz bölme ve bir boş kutucuk oluşturacak şekilde oluşturuldu. Her bir standart pleyt %50 daha fazla sulandırılarak 120 µl solüsyon ile başlayıp, 8 standart pleyt bölmeye eklendi. Standartları 8 kat sulandırılmasının sebebi pikogram cinsinden düşük ölçüm sonuçlarını da kapsayabilmektir. 1'den başlayarak 80'e kadar (1 boş) pleytlere 10 µl biotin eklendi. Çözündürülen serum örneklerinden, birden seksene kadar (1 boş hariç) boş pleytlere 40 µl otomatik pipetle serum örneği eklendi. Bir saatlik 37,5 °C inkubasyon süresinden sonra hazır kitlerde bulunan chromojen A solüsyonundan bütün pleytlere 50 ml eklendikten sonra 10 dk karanlık bölgeye inkubasyona alındı. Son olarak stop solüsyonu konularak tepkime durduruldu. Stop solüsyonunu eklendiğinde önce görülen mavi renk stop solüsyonuyla sarı renge dönüştü. 450 nanometrede microreaderda okunacak olan örnekler yıkama solüsyonu uygulandı. Yıkama işlemi 30 kat sulandırılan solüsyon 580 ml su, 20 ml yıkama solüsyonunun saf halinden hazırlanmıştır. Son olarak microreaderdan sonuçlar alınarak değerlendirmeye alındı.

Testte; Interferon gamma konsantrasyonu, standart olarak belirlenen pleytler 2400, 1200, 600, 300, 150, 75, 37.5, 18.75, 9.375 pg/ml oranında her seferinde yarıya düşerek belirlendi. Aynı şekilde interlökin-2; 480, 240, 120, 60, 30, 15, 7.5, 3.75, 1.875, interlökin-6; 3200, 1600, 800, 400, 200, 100, 50 interlökin-12; 240, 120, 60, 30, 15, 7.5, 3.75, 1.875, 0.9375 ng/l olarak sulandırıldı. Standart sulandırmalardan elde edilen grafikten $y=90,512x-9,7593/R^2=0,9986$ formülü elde edilerek örneklerdeki IFN-gamma ve IL2, IL6 ve IL12 konsantrasyonları hesaplandı.

3.2.5. Mikronötralizasyon Testi (mNT)

3.2.5.1. Virus

Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı'ndan sağlanan BHV-1'in referens suşu 'Colorado', Titrasyon ve serum mNT'de için temin edildi (Yanbakan, 2004).

Ependorf tüplerdeki serumlar -80 °C'de derin dondurucuda saklandı. IBR virusunun Colorado referans suşu hücre kültüründe yapılan inkübasyondan 48-72 saat sonra sitopatolojik değişiklikler karakteristik olarak görüldü (Yanbakan, 2004).

3.2.5.2 Virus Titresi

Araştırma kullanılan IBR-IPV virüsü, Colorado suşunun hücre kültüründe mikrotitrasyon yöntemi ile yapılan titrasyonda enfeksiyöz gücü 3. gün sonunda 100 DK 3D₅₀= 10⁻⁷/0.1ml olarak belirlendi (Yanbakan, 2004).

3.2.5.3. Hücre Kültürleri

Pozitif serumların ve mNT antikor titresini belirlenmesi için Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı'ndan sağlanan Madin Darby Bovine Kidney (MDBK) devamlı hücre kültürleri temin edildi. Ticari preparat olarak %10 fetal dana serumu (FDS, Biological Industries, İsrail) içeren Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Biological Industries, İsrail) yararlanıldı (Yanbakan, 2004).

3.2.5.4. Kullanılan Serumlar

Araştırmada kullanılan kan serum örnekleri, Burdur ilinde özel işletmede bulunan 40 adet sığırdan alındı. Kan numuneleri ineklerin V.jugularis'lerinden 10 ml olacak şekilde serum separator jel içeren steril vakumlu tüplere (BD, Vacutainer®, ABD) alındı. Streil şartlarda EDTA'sız tüplere alınan kan örnekleri serumları 30 dk

süre 56 °C'de su sıcaklığında inaktive edildi. Testte kullanılmak üzere 1 ml'lik örnekler halinde -20 °C'de derin dondurucuda saklandı (Yanbakan, 2004).

3.2.5.5 Virusun Üretilmesi

IBR virüsü Colorada suşunu üretmek amacıyla Hücre kültürü şişelerinde (250 ml'lik) üretilen MDBK devamlı hücre kültürüne yüzeyleri Phosphate Buffer Saline-Minus (PBS-M) ile yıkandıktan sonra adsorbsiyona bağlı ekim tekniği ile 2,5 ml virüs inokule edildi. 37 °C'de 1 saat adsorbsiyon için bekletilen hücre kültürü sonunda virüs üretme vasatı olarak DMEM ilave edildi (Duman, 2013). 37 °C'de inkubasyondan 24-48 saat sonra %80 sitopatolojik değişimlerin görülmesi (doku kültürü mikroskobu Olympus C-K, Japonya) ile 80 °C'de dondurulup 37 °C'de hızla çözdürülmüş virüslü hücre kültürü sıvısı 3000 devirde 30 dk +4 °C'de santrifüj edildi. Üstte kalan virüslü sıvının sterilite kontrolü yapılarak 1 ml'lik porsiyonlar halinde -80 °C'de saklandı. Virus üretilmesi hücre kontrol ile birlikte yürütüldü (Yanbakan, 2004).

3.2.2.5.6. Virusun Mikrotitrasyonu

BHV-1'in titresi belirlemek amacıyla Frey ve Liess (1971)'in bildirdikleri yöntem kullanıldı. Buna göre virusun DMEM içerisinde 10 adet epondorf tüpü nde 10^{-10} (log10) tabanına göre virüs süspansiyonu 900 ul (0.9ml) vasat ile sulandırmaları hazırlandı. Her virus sulandırma basamağından mikrotitrasyon pleytinin (Costar, ABD) bir sırasında bulunan 4 gözüne 0,1 ml konuldu (Duman, 2013). Ayrıca virüs kontrol için 4 gözü kullanıldı ve her göz için 0,05 ml serumsuz DMEM ve 0,05 ml saf virusdan, hücre kontrol için ise 4 göze 0,1 ml serumlu DMEM aktarıldı. Gözlerdeki virüs sulandırmaları ve kontrollerin üzerine 300.000 hücre/ml olacak şekilde sulandırılan MDBK devamlı hücre kültürü süspansiyonundan pipet yardımı ile 0,05 ml ilave edildi. Pleyt nontoksik bant ile kapatılarak 37 °C'lik %5 CO₂'li etüvde inkübasyona bırakıldı (Duman, 2013). 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 (Yanbakan, 2004).

3.2.2.5.7. Mikronötralizasyon

Kan serum örneklerinde bulunan BHV-1'e karşı nötralizan antikorların varlığının belirlenmesi Frey ve Liess'in (1971) bildirdikleri mNT ile araştırıldı. İnaktive edilmiş ve kontrol edilecek sulandırılmamış serum numunelerinden mikronötralizasyon pleytinin her sırasında bulunan 2 gözüne 0,05 ml konuldu. Ardından serum örneklerinden sonra BHV-1'in 'Colorado' referens suşunun 100 DKID50 oranındaki sulandırmasından eşit miktarda ilave edildi (Duman, 2013). Virus kontrol için ayrılan 4 gözün her birine 0,05 ml serumsuz DMEM vasatı konuldu. Bunu takiben üzerine 0,05 ml saf virustan konuldu. Hücre kontrol için ayrılan 4 gözün her birine 0,1 ml %10 FDS içeren DMEM kondu. Tablanın üzerine tekrar özel yapıştırıcı nontoksik bant ile pleytin üzeri kapatılarak %5 CO₂ içeren 37 °C'lik etüvde 1 saat inkübasyon için kaldırıldı (Yanbakan, 2004).

Doku kültürü mikroskopunda her gün kontrolleri yapılarak 2. günden itibaren sonuçlar sitopatolojik değişikliklere göre değerlendirmeye alındı. Mikropleyt gözlerinde etkiler incelendiğinde Sitopatolojik Etki (CPE) varlığı nötralizasyon negatif ve CPE yokluğu pozitif olarak adlandırıldı. CPE oluşumu gözlenmediği virusa karşı serum örneği antikor oluşumu durumunda şüpheli kabul edildi. Buna göre nötralizasyon pozitif kabul edildi (Yanbakan, 2004).

Tablo 3.1. Nötralizasyon Değerlendirme.

Şüpheli Virus	CPE	Nötralizasyon
IBR(+)	(-)	(+)
IBR(-)	(+)	(-)

3.3. İstatistiksel Analizler

Farklı örnekleme zamanlarında elde edilen sitokin düzeyleri; bağımsız t testi ile, antikor düzeyleri ise ANOVA ve post-hoc Duncan testleri ile değerlendirildi.

(SPSS 10.0 for Windows/SPSS® Inc., Chicago, IL, U.S.A.). Değerlendirmede $p < 0,05$ önem sınırı kabul edildi.



4. BULGULAR

4.1. Hemogram ve ELISA Sonuçları

Tablo 4.1. 0.gün alınan kan örneklerinin hemogram ve ELISA sonuçları, (Ortalama \pm Standard sapma)

0. Gün	Kontrol Grup 1 (n=10)	Kontrol Grup 2 (n=10)	Deneme Grubu (n=20)
IFN GAMMA (pg/ml)	12,0 \pm 1,09 ^b	14,0 \pm 2,61 ^b	49,5 \pm 6,42 ^a
IL2 (ng/l)	6,1 \pm 0,64 ^b	5,5 \pm 0,38 ^b	14,8 \pm 1,38 ^a
IL6 (ng/l)	45,3 \pm 1,82 ^b	50,0 \pm 3,35 ^b	95,9 \pm 9,33 ^a
IL12 (ng/l)	2,5 \pm 0,46 ^b	1,9 \pm 0,14 ^b	3,6 \pm 0,38 ^a
WBC (x10 ⁹ /L)	8,7 \pm 0,35 ^b	6,8 \pm 0,31 ^a	9,2 \pm 0,39 ^a
LYM (x10 ⁹ /L)	5,8 \pm 0,18 ^b	4,9 \pm 0,20 ^{ab}	5,5 \pm 0,25 ^a
GRAN (x10 ⁹ /L)	1,6 \pm 0,17 ^b	1,0 \pm 0,97 ^a	1,4 \pm 0,10 ^a
HGB (g/dl)	10,9 \pm 0,41 ^b	10,5 \pm 0,40 ^b	10,9 \pm 0,27 ^b
MCH (pg)	19,8 \pm 0,35 ^b	20,9 \pm 0,59 ^{ab}	22,0 \pm 0,51 ^a
MCHC (g/dl)	44,3 \pm 1,39 ^b	48,6 \pm 1,92 ^{ab}	53,5 \pm 1,42 ^a
RBC (x10 ¹² /L)	5,5 \pm 0,23 ^b	5,0 \pm 0,16 ^b	5,0 \pm 0,13 ^b
HTC (%)	24,8 \pm 1,21 ^b	21,8 \pm 0,81 ^b	21,9 \pm 0,47 ^a

IFN (İnterferon Gamma), IL2 (İnterlökin 2), IL6 (İnterlökin 6), IL12 (İnterlökin 12), WBC (lökosit), LYM (lenfosit), GRAN (granulosit), HGB (hemoglobin), MCH (Mean Corpuscular Hemoglobin), MCHC (Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration), RBC (Red Blood Cells), MCV (Mean Corpuscular Volume), HTC (Hematokrit)

Gruplar arasında istatistiksel anlam derecesi harflerle belirtilmiş olup, aynı satırda farklı harf bulunması gruplar arasında istatistiksel anlam(p<0,05) göstermektedir.

Standart sulandırılmalardan elde edilen grafikten $y=90,512x-9,7593/R^2=0,9986$ formülü elde edilerek örneklerdeki IFN-gamma ve IL2, IL6 ve IL12 konsantrasyonları hesaplandı. Kontrol-1, kontrol-2 ve deneme grubundan 0. gün alınan örneklerin hemogram ve ELISA değerlerinin istatistiksel analizi ANOVA testi yapılmış olup Tablo 1’de gösterilmiştir. İnterferon gamma, interlökin 2, interlökin 6, interlökin 12, değerleri deneme grubunda kontrol-1 ve 2 grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulundu. WBC (lökosit) sayımı ise deneme grubu verilerinde yüksek, kontrol-2 grubunda en düşük değerlere sahiptir. Lenfosit (LYM) değerleri, tüm gruplarda yapılan uygulamalar sonucunda doğru orantılı olarak yükselme göstermiştir. İnterferon gamma, interlökin 2, interlökin 6, interlökin 12, değerleriyle de lenfosit sayıları doğru orantılıdır, Deneme ve kontrol 2 grubu istatistiksel açıdan benzer, kontrol-1 grubunu ise farklıdır. 4. gün aşı uygulamalarından 6. saat sonra alınan sonuçlarda İnterferon gamma, interlökin-2, interlökin-6, interlökin-12’nin,

yükseldiği tespit edildi. MCH ve MCHC'nin deneme grubu değerinin kontrol grubuna göre yüksek olduğu görüldü. RBC değerlerinde üç grupta da 0. Gün, anlamlı bir değişikliğe rastlanmadı. MCV parametresinde üç grupta da farklı sonuçlar elde edildi. Deneme grubundaki Hematokrit (HTC) değerleri kontrol gruplarına göre yüksek bulundu.

Tablo 4.2. 4.gün alınan kan örneklerinin hemogram ve ELISA sonuçları, (Ortalama \pm Standard sapma)

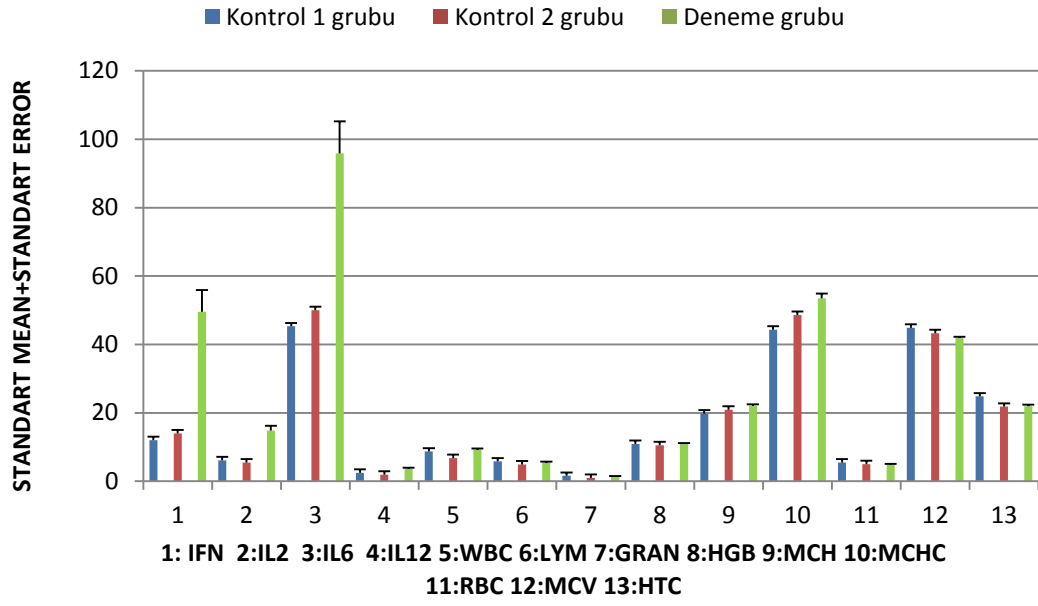
4. Gün	Kontrol Grup 1 (n=10)	Kontrol Grup 2 (n=10)	Deneme Grubu (n=20)
IFN GAMMA (pg/ml)	17,7 \pm 3,88 ^b	9,9 \pm 1,92 ^b	62,6 \pm 5,45 ^a
IL2 (ng/l)	5,9 \pm 0,73 ^b	5,4 \pm 0,78 ^b	16,9 \pm 1,13 ^a
IL6 (ng/l)	49,6 \pm 3,15 ^b	45,2 \pm 2,43 ^b	89,7 \pm 8,62 ^a
IL12 (ng/l)	1,6 \pm 0,16 ^b	1,7 \pm 0,15 ^b	2,8 \pm 0,25 ^A
WBC ($\times 10^9/L$)	9,5 \pm 0,37 ^b	7,9 \pm 0,44 ^b	12,6 \pm 0,57 ^a
LYM ($\times 10^9/L$)	5,7 \pm 0,25 ^b	5,2 \pm 0,15 ^b	7,6 \pm 0,42 ^A
GRAN ($\times 10^9/L$)	2,4 \pm 0,34 ^b	1,5 \pm 0,28 ^b	2,1 \pm 0,24 ^B
HGB (g/dl)	11,8 \pm 0,37 ^b	9,9 \pm 0,33 ^a	11,6 \pm 0,26 ^a
MCH (pg)	20,0 \pm 0,59 ^b	20,9 \pm 0,52 ^{ab}	22,4 \pm 0,45 ^a
MCHC (g/dl)	44,9 \pm 2,07 ^b	48,0 \pm 1,89 ^{ab}	52,5 \pm 1,31 ^a
RBC ($\times 10^{12}/L$)	5,9 \pm 0,24 ^b	4,7 \pm 0,23 ^a	5,7 \pm 0,18 ^A
HTC (%)	28,8 \pm 2,62 ^b	20,9 \pm 1,36 ^b	23,6 \pm 0,70 ^a

IFN (İnterferon Gamma), IL2 (İnterlökin 2), IL6 (İnterlökin 6), IL12 (İnterlökin 12), WBC (lökosit), LYM (lenfosit), GRAN (granulosit), HGB (hemoglobin), MCH (Mean Corpuscular Hemoglobin), MCHC (Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration), RBC (Red Blood Cells), MCV (Mean Corpuscular Volume), HTC (Hematokrit)

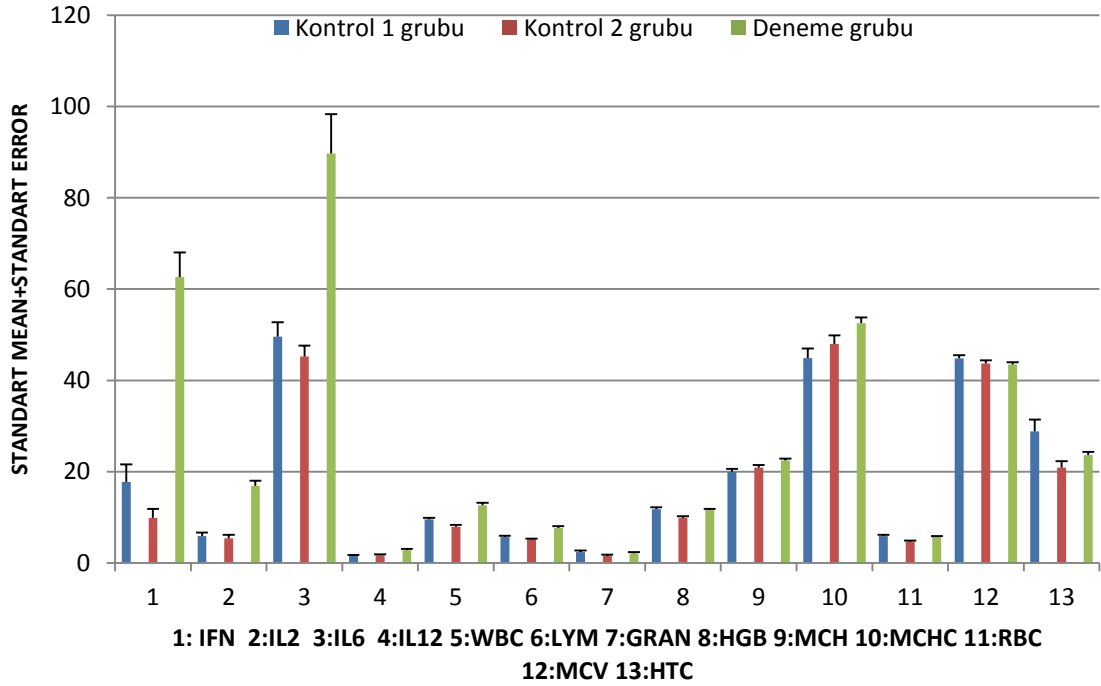
Gruplar arasında istatistiksel anlam derecesi harflerle belirtilmiş olup, aynı satırda farklı harf bulunması gruplar arasında istatistiksel anlam ($p < 0,05$) göstermektedir.

Kontrol-1, kontrol-2 ve deneme grubundan 4. Gün alınan örneklerin ANOVA testi sonuçları Tablo 2'de gösterilmiştir. İnterferon gamma; deneme grubunda kontrol-1 grubuna göre yaklaşık 3 kat, kontrol-2 grubuna göre yaklaşık 6 kat yükselmiştir. İnterlökin-2 değeri, kontrol gruplarına göre yaklaşık 3 kat artış göstermiş, İnterlökin-6 ve interlökin-12, yaklaşık 2 kat artmıştır. WBC ve lenfosit verileri istatistiksel açıdan kontrol 1 ve 2 gruplarında aynı öneme sahipken deneme grubunda farklılık göstermiştir. Granülosit sayılarında ise üç grupta da anlamlı bir değişiklik tespit edilmedi. Hemoglobin miktarı 0. güne göre deneme grubunda yükselmiş, kontrol gruplarında aynı kalmıştır. MCH ve MCHC, 0. güne göre tüm gruplarda anlamlı bir değişiklik göstermemiştir. RBC değerleri 0. gün ile

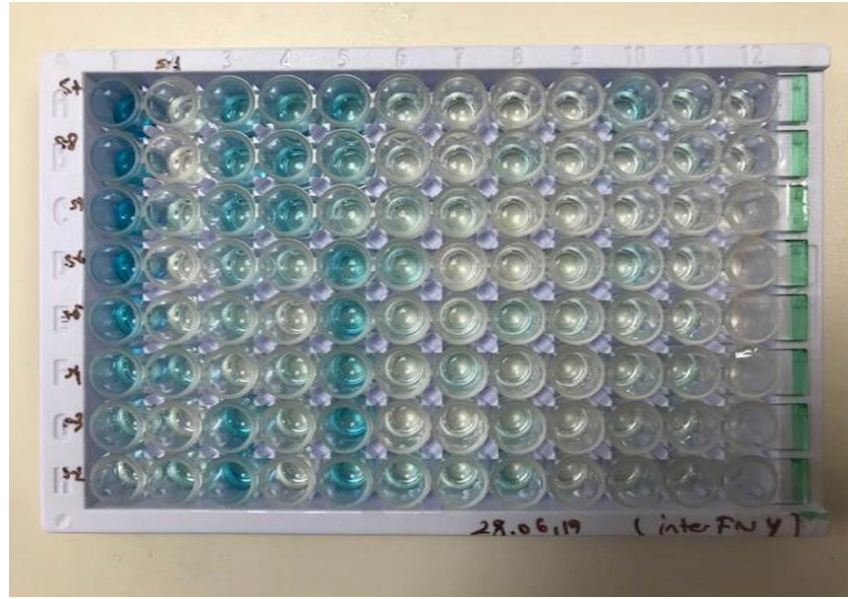
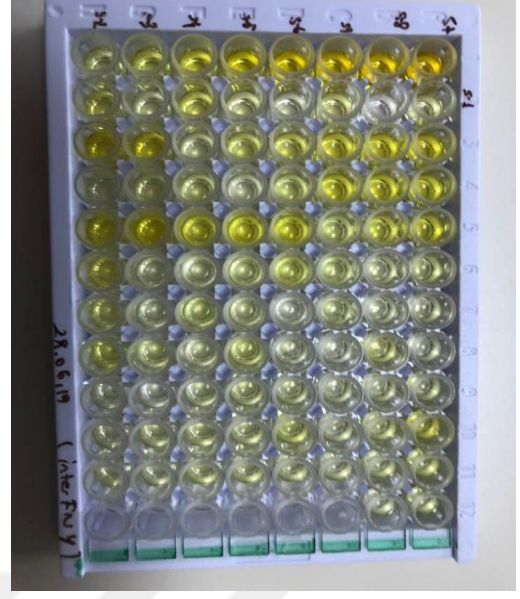
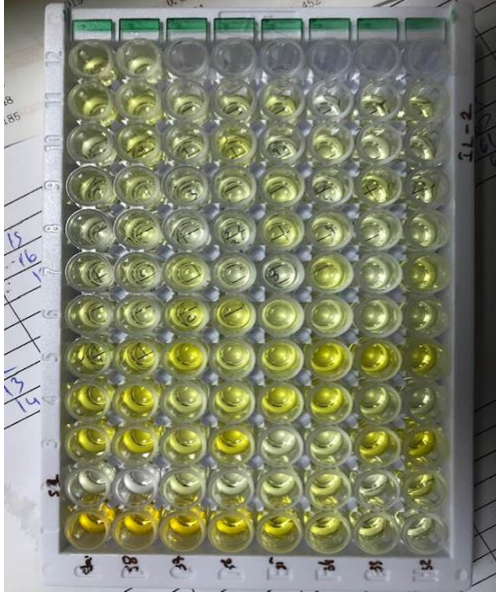
kıyaslandığında sadece kontrol-2 grubunda farklılık görüldü. HTC değerleri 0. güne göre üç grupta da aynı öneme sahiptir.



Şekil 4.1. Kontrol 1, kontrol 2 ve deneme gurubu 0. gün sitokin ve hemogram parametreleri (Standart ortalama ± standart hata).



Şekil 4.2. Kontrol 1, kontrol 2 ve deneme gurubu 4. gün sitokin ve hemogram parametreleri (Standart ortalama ± standart hata).



Şekil 4.3. Pleytlere stop solüsyonu eklenmesi (Sarı renk) ve reaksiyondaki görünümü (Mavi renk).

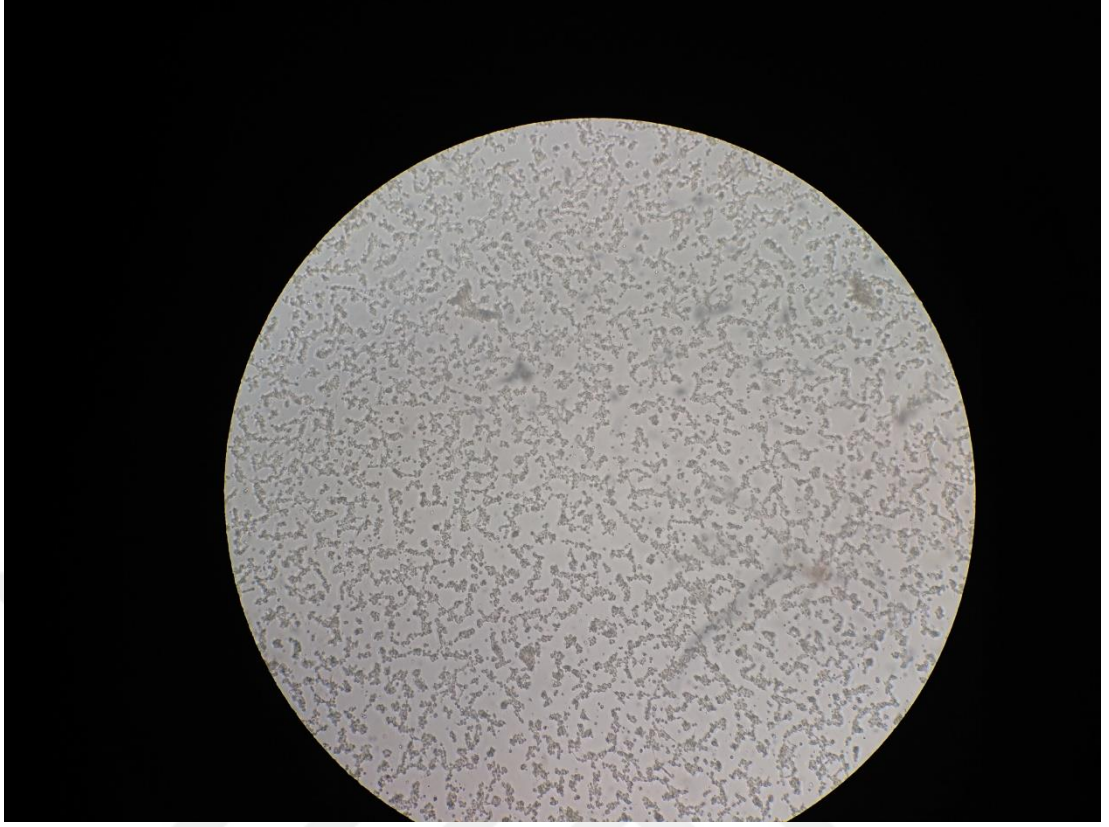
4.2. Kontrol-1, Kontrol-2 BHV-1 Antikor Titre Sonuçları

Kontrol-1 grubundaki sadece Zylexis uygulanan hayvanların kan serumlarında BHV-1 antikor varlığı 7., 14. ve 21. günde tespit edilmedi.

Kontrol-2 grubundaki sadece aşı uygulanan hayvanların kan serumlarında BHV-1 antikor titreleri; 7. günde 1/2 (\log_2 tabanına göre yapılan sulandırmalarda) titrede 1 (%10) hayvan, 1/8 titrede 8 (%80) hayvan ve 1/16 titrede 1 (%10) hayvan tespit edildi. Kontrol-2 grubundaki hayvanların kan serumlarında BHV-1 antikor titreleri; 14. günde, 1/2 (\log_2 tabanına göre yapılan sulandırmalarda) titrede 1 (%10) hayvan, 1/8 titrede 9 (%90) hayvan tespit edildi. Kontrol-2 grubundaki hayvanların kan serumlarında BHV-1 antikor titreleri; 21. günde, 1/2 (\log_2 tabanına göre yapılan sulandırmalarda) titrede 1 (%10) hayvan, 1/4 titrede 1 (%10) hayvan ve 1/16 titrede 8 (%80) hayvan tespit edildi (Tablo 4.3).

4.3. Deneme Gruplarında BHV-1 Antikor Titre Sonuçları

Deneme grubundaki Zylexis+aşı uygulanan hayvanların kan serumlarında BHV-1 antikor titreleri; 7. Günde 1/2 (\log_2 tabanına göre yapılan sulandırmalarda) titrede 2 (%10) hayvan, 1/8 titrede 18 (%80) hayvan tespit edildi. Deneme grubundaki hayvanların kan serumlarında BHV-1 antikor titreleri; 14. günde 1/32 (\log_2 tabanına göre yapılan sulandırmalarda) titrede 20 (%100) hayvan, tespit edildi. Deneme grubundaki hayvanların kan serumlarında BHV-1 antikor titreleri; 21. günde 1/64 (\log_2 tabanına göre yapılan sulandırmalarda) titrede 20 (%100) hayvan tespit edildi (Tablo 4.4).



Şekil 4.4. IBR-IPV virüsü Colorado suşu ile enfekte MDBK hücre kültürünün 3. gündeki görünümü (x10).



Şekil 4.5. MDBK hücre kültürü (hücre kontrol) (x10)

Tablo 4.3. Aşı Grubundaki Sığırların BHV-1 Antikor Titre Değerleri.

BHV-1 Titre	Hayvan Sayısı	%	Gün
1/2	1	10	7. gün
1/4	-	-	7. gün
1/8	8	80	7. gün
1/16	1	10	7. gün
1/128	-	-	7. gün
1/2	1	10	14. gün
1/4	9	90	14. gün
1/8	-	-	14. gün
1/16	-	-	14. gün
1/32	-	-	14. gün
1/64	-	-	14. gün
1/128	-	-	14. gün
1/2	-	-	21. gün
1/4	1	10	21. gün
1/8	1	10	21. gün
1/16	8	80	21. gün
1/32	-	-	21. gün
1/64	-	-	21. gün
1/128	-	-	21. gün

Tablo 4.4. Deneme Grubundaki Sığırların BHV-1 Antikor Titre Değerleri.

BHV-1 Titre	Hayvan Sayısı (n=20)	%	Gün
1/2	2	10	7. gün
1/4	-	-	7. gün
1/8	18	90	7. gün
1/16	-	-	7. gün
1/128	-	-	7. gün
1/2	-	-	14. gün
1/4	-	-	14. gün
1/8	-	-	14. gün
1/16	-	-	14. gün
1/32	20	100	14. gün
1/64	-	-	14. gün
1/128	-	-	14. gün
1/2	-	-	21. gün
1/4	-	-	21. gün
1/8	-	-	21. gün
1/16	-	-	21. gün
1/32	-	-	21. gün
1/64	20	100	21. gün
1/128	-	-	21. gün

5. TARTIŞMA

Son yıllarda yapılan araştırmalarda, Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR)'in, sığırlarda, başta solunum sisteminde olmak üzere sinir sistemini ve genital sistemi etkileyerek fertilitte bozukluklarına, abortlara ve yeni doğanlarda ölümcül sistemik hastalıklara neden olarak büyük ekonomik kayıplara neden olduğu bildirilmiştir (Jones ve Chowdhury, 2010; Raaperi ve ark., 2012). IBR seropozitifliğinin yüksek olduğu (Alkan ve ark., 2005) ölkemizde hastalıktan korunmanın en iyi yolu aşılamadır. Aşılamada yüksek antikor titresinin oluşturulması uzun süreli ve güvenli koruma sağlar. Bu nedenle aşılama programlarında immunmodölatör etkili ajanların kullanımı önemlidir. İmmunmodölatör etkili ajanlardan biri olan inaktif parapoxvirus ovis (iPPVO)'un, sığırlarda inaktif IBR aşı uygulaması programında tatbikinin, serum antikor titrelerinde ve sitokin konsantrasyonlarında değişikliklere neden olabileceği hipotezine dayanan bu projede, iPPVO'un inaktif IBR aşı uygulamasında antikor titreleri, proinflatuar ve anti-inflatuar sitokin konsantrasyonlarındaki değişiklikleri ilk kez bu çalışmada araştırıldı.

Yapılan bir araştırmada, iPPVO ile aşılanmış farelerden toplanan periton makrofajları ile in vitro fagositik aktiviteleri aşılamadan sonra farklı zaman dilimlerinde, önemli derecede artış sağladığı gözlemlenmiştir. İPPVO ile aşılanmış farelerde geçici olarak nötrofillerdeki artışa bağlı olarak solunum artışı görölmüştür. Geçici olmasına rağmen, IFN-I indüksiyonu ve aktivitesi, mikrobiyal direnç ve immün sistem tarafından klirensi içeren aşağı yöndeki mekanizmaları tetikleyebilir. Diğer yandan, IFN-c ve IL-12, mRNA'nın artan ekspresyonu, in vivo ve in vitro olarak gösterilen makrofajlarla arttırılmış fagositik aktivite ile ilgili olduğu bildirilmiştir (Ons, 2014). Yapılan bu çalışmada da, IFN gamma ve interlökin aktivitesinde artışlar saptanmıştır.

Bir çalışmada, buzağılarda Bovine herpesvirus-1 (BHV-1) etkeninin sebep olduğu Infectious bovine rhinotracheitis (IBR) hastalığının yayılmasını engellemek

amacıyla üç farklı deney yapılmıştır. Sonuç olarak iPPVO'nun, hastalığa yakalanmış, hasta olmayan ve hasta buzağılarla temas halinde olan deneklerde etkili olduğu tespit edilmiştir (Kriakis,1998).

Kriakis (1998), iPPVO uygulanmış domuz yavruları ile iPPVO uygulanmamış domuz yavrularıyla ilgili araştırmada; ishal görülme oranında üç kat azalma ve mortalitede altı kat azalma belirlemiştir. Çalışma, iPPVO'nun hastalıklara karşı koruyucu özelliğini ortaya koymaktadır. Yapılan bu çalışmada da, IFN gamma ve interlökin aktivitesindeki artışların olması iPPVO'nun IBR'ye karşı korumayı arttırdığını göstermekte olup her iki çalışmayı destekler niteliktedir.

Bovine herpes virüsü-1 ile enfekte olmuş buzağılarda yapılan küçük bir pilot çalışmada, bir solunum yolu hastalığı salgını başladıktan sonra iPPVO'nun immünomodülasyon olarak kullanılmasının, daha sonra enfekte olabilecek hayvanlarda klinik belirtilerin azaltılmasında önemli derecede yardımcı olabileceğini göstermiştir (Weber O, 2013). Yapılan bu çalışmamada da, marker IBR aşısı ile birlikte iPPVO kullanımının sürü sağlığını koruma açısından faydalı olduğunu ortaya koymaktadır.

iPPVO'nun aynı zamanda, çeşitli türlerde baskın bir Th1 tipi immün tepkiye yol açtığı bildirilmektedir. Bu hipotez, iPPVO'nun in vitro ve ayrıca in vivo immünmodülatör aktiviteyi indüklemeye kabiliyetine sahip olmasıyla açıklanabilir. Yapılan bu çalışmamada da, IBR aşısı ve iPPVO'nun yapıldığı gruptaki hayvanlarda lenfositlerdeki artış bu hipotezi doğrular niteliktedir (Weber O, 2013).

Kyriakis (1998); sığırlarda, domuzlarda, atlarda, farelerde, köpeklerde ve kedilerde zayıflatılmış koyun parapoxvirüsünün profilaktik veya metafilaktik uygulamasının, at herpes virüsü, kedi herpes virüsü, köpek adenovirüs tip 2, Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli veya Pasteurella multocida, Aujeszky hastalığı virüsü, enfeksiyöz sığır rinotrakeit virüsü, vezikülitis gibi bazı bakteriyel ve viral ajanların neden olduğu klinik semptomların azaltılmasında yardımcı olduğunu kanıtlamıştır. Bunun nedenini; interferon, doğal makrofaj hücreler ve lenfositlerin artması gibi erken bağışıklık mekanizmalarının indüklenmesiyle ilişkilendirmiştir.

Yapılan bu çalışmamada da; iPPVO ve IBR aşısı ile iPPVO'nun beraber yapıldığı kontrol 1 ve deney grubundaki hayvanlarda, IFN gamma ve IL 2, IL 6, IL 12 ve lenfosit artışı belirlenmiştir.

Arai ve ark., (1990), sıçanlarda yaptıkları çalışmada, iPPVO uygulamasından sonra, deney grubundaki hayvanlarda IFN gamma ve IL-10 ekspresyonlarının indüklendiğini bildirilmişlerdir. Yapılan bu çalışmamada da, kontrol 1 ve deneme grubundaki hayvanlarda IFN gamma ve IL 2, IL 6, IL 1'de artışlar belirlenmiştir.

İnaktive edilmiş parapoxvirüs ovisinin (iPPVO) immün uyarıcı özellikleri uzun zamandır in vivo ve in vitro olarak gösterilmiştir, ancak içerdiği biyolojik ve moleküler mekanizmalar büyük ölçüde bilinmemektedir (Anziliero, 2014). Yapılan bir çalışmada, iPPVO uygulanmış farelerin serumlarında 6 ve 12 saat sonra, interferon I (IFN-I), 15 misli artarken, uygulamadan 24 ve 48.saat sonra IFN gamma 15 misli ve IL-12, 6 misli artış göstermiştir (Anziliero D. 2014). Yapılan bu çalışmamada ise deneme grubunda 102. saatte IFN gamma, kontrol -1 grubuna göre yaklaşık 3 kat, kontrol-2 grubuna göre yaklaşık 6 kat artarken IL 12, 2 kat artmıştır. Çalışmalar arasındaki bu farklılıklar kullanılan hayvan türü ve metod farklılığından kaynaklanabilir.

Köpeklerde yapılan bir çalışmada, iPPVO ile uyarıldıktan sonra periferik kan lökositleri ile birlikte monositlerde, polimorfonükleer hücrelerde ve fagositotik aktivitede belirgin bir artış olduğu bildirilmiştir (Schütze, 2009). Yapılan bu çalışmamada da; lökositler, iPPVO uygulanan kontrol 1 ve deney grubunda, anlamlı bir şekilde artış göstermiştir.

Taylara süttten kesim öncesi ve sonrası iPPVO uygulandığında, solunum sistemi hastalıklarının insidensinin düştüğü ve aniden süttten kesme ve transport ile oluşabilecek immün baskıyı ortadan kaldıracabileceği, böylece immün baskı sonucu gelişebilecek enfeksiyonlardan korunmada iPPVO'un etkili olabileceği bildirilmiştir (Dreismann G.M. 2010). Taylarda yapılan bir araştırmada, iPPVO uygulaması sonrasında bazı sitokin düzeylerinin yükseldiği ve *Rhodococcus equi* enfeksiyonlarının önlenmesinde faydalı olabileceği ifade edilmiştir (Dreismann G.M.

2010). Yapılan bu çalışmamada da, iPPVO uygulanan kontrol 1 ve deneme grubunda bazı sitokin düzeylerinde (IFN gamma ve IL 2, IL 6, IL 12) artış belirlenmiştir.

Bir araştırmada, Parvoviral enteritisli köpeklere iPPVO uygulamasının lenfosit sayısını artırdığı, ancak hemogram parametreleri, antikor titresi, virüsün saçılma oranı ve iyileşme zamanında bir değişime neden olmadığı ifade edilmiştir (Proksch ve ark., 2014). Yapılan bu çalışmamada, iPPVO uygulanan kontrol 1 ve deney grubunda lenfositler, anlamlı bir şekilde artış göstermiştir.

Bir çalışmada, sağlıklı fareler ve ratlara iPPVO uygulaması sonrasında kan sitokin düzeylerinde yükselmeler gözlemlendiği belirlenmiştir (Anziliero ve rak., 2014)). Yapılan bu çalışmamada da, iPPVO uygulanan kontrol 1 ve deneme grubunda bazı sitokin düzeylerinde (IFN gamma ve IL 2, IL 6, IL 12) artış belirlenmiştir.

Bir araştırmada, iPPVO'nun bazı viral bileşenlerin Toll benzeri reseptör tanıma yoluyla, monositleri veya diğer antijen uyaran hücreleri (APC) aktive ettiği bildirilmiştir. Bu aktivasyonun, T hücreleri ve/veya NK hücreleri tarafından IFN gamma salımına katılan tip I interferonlar ve IL-18 dahil çeşitli sitokinlerin salınımı takiben atlarda benzer etki mekanizmasını meydana getirdiğini öne sürerek, immünmodülatörün, at sitokin üretimi üzerindeki etkisi hem in vitro hem de in vivo olarak değerlendirilmiştir. Toll benzeri reseptörler (TLR), birçok patojene karşı doğal immün cevabın oluşmasını sağlayan bir grup tip 1 transmembran proteindir. Araştırmada; 0., 2., 9. günlerde üç doz iPPVO uygulanması ve 6., 24., 48. saatlerde bölgesel sitokin konsantrasyonları karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak atlarda iPPVO'un, sitokinlerin ortaya çıkışının hızlandırıldığı ve immün cevap oluşturduğu ortaya konmuştur (Horohov, 2008). Yapılan bu çalışmamada da kontrol 1 ve deneme grubunda bazı sitokin düzeylerinde (IFN gamma ve IL 2, IL 6, IL 12) artış belirlenmiştir. Fakat bu çalışmadan farklı olarak araştırmada; sitokinler, gerçek zamanlı PCR tekniği ile sitokin gen ekspresyonunun nispi nicelemesi yapılarak sitokinlerin artışı belirlenmiştir (Horohov, 2008).

Köpeklerin demodikozis hastalığındaki iPPVO etkinliğini gösteren bir araştırmada karşılaştırmalı olarak 0., 2., 9. gün 2 ml subkutan olarak iPPVO

uygulanmıştır. 0., 10., 40., 80.,120. günlerde alınan deri kazıntı örnekleri (etken tesbiti) sonuçlarında iPPVO grubunda etken saçılımının anlamlı derecede azaldığı (20 gün daha önce) ve yine aynı şekilde klinik skorlarında istatistiksel olarak daha olumlu sonuçlar olduğu ortaya konulmuştur. Kan örnekleri 0., 1., 10., 40., 80. günlerde toplanılmıştır. Ancak lenfosit değerleri iPPVO grubunda 10. gün anlamlı şekilde daha yüksek olduğu görülmüştür (Pekmezci ve ark., 2014). Yapılan bu çalışmada da, iPPVO uygulanan kontrol 1 ve deneme grubunda lenfositler, anlamlı bir şekilde artış göstermiştir.

Virüsü nötralize eden antikorlar, virüs spesifik olup virüsün öldürülmesinden sorumlu olan antikorlardır. Bu antikorların yüksek olması virüs spesifik humoral korunmasında güçlü olduğunu göstermektedir. BHV-1 ile ilgili yapılan bir çalışmada, Konya bölgesinde sağlıklı görülen sığırlarda ELISA ve mNT testleri yapılmış ve sırasıyla ELISA testinde %19 ve mNT de ise % 13 oranında pozitiflik belirlenmiştir (Yanbakan, 2004). Bu çalışma sağlıklı görülen hayvanlarda da seropozitifliğin olabileceğini göstermekle birlikte bizim çalışmamızda kullanılan kontrol grubundaki sığırlarda benzer bir seropozitiflik belirlenmemiştir. Yapılan çalışmalarda seropozitifliği belirlemede ELISA testinin virüs nötralizasyon testine göre daha duyarlı olduğu rapor edilmiştir (Bolat ve ark., 1996; Duman R, 2013). Yapılan bu çalışmada ise virüs nötralize eden antikor titreleri belirlenmiş olup sadece aşı yapılmış sığırlarda 7. günde hayvanların %80'inde 1/8 titrede, 14 günde hayvanların %90'ında 1/4 oranında ve 21. günde ise 1/16 titre sığırların %80'inde belirlenmiştir. Buna karşın iPPVO ve aşı yapılmış sığırlarda 7. günde 1/8 titre hayvanların %90'ında, 14. günde hayvanların tamamında 1/32 titre ve 21. günde ise virüsü nötralize eden antikor titresi 1/64 titre olarak yine hayvanların tamamında (%100) belirlenmiştir. Bu sonuçlar göstermektedir ki virüsü nötralize eden antikor titreleri hem aşı grubunda hem de aşı ve iPPVO uygulanmış grupta zamana bağlı

olarak artmaktadır. Bununla birlikte iPPVO ve aşı uygulanan sığırlarda virüsü nötralize eden antikor titreleri çok daha yüksek bulunmuş ve bu titrelerin 21. günde hayvanların büyük bir bölümünde 1/64'e kadar ulaştığı görülmüştür. Sonuç olarak yapılan bu çalışma iPPVO'nun sığırlarda aşı kaynaklı virüsü nötralize eden antikor titrelerini önemli düzeyde artırdığı belirlenmiştir. BHV-1 aşısı ile birlikte iPPVO'nun uygulanması sığırlarda koruyucu immunitiyi güçlendireceği kanısına varılmış olup aşı ile birlikte iPPVO'nun yapılması önerilmektedir.





6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Son yıllarda yapılan araştırmalarda, Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR)'in, sığırlarda, başta solunum sisteminde olmak üzere sinir sistemini ve genital sistemi etkileyerek fertilitte bozukluklarına, abortlara ve yeni doğanlarda ölümcül sistemik hastalıklara neden olarak büyük ekonomik kayıplara neden olduğu bildirilmiştir (Jones ve Chowdhury, 2010; Raaperi ve ark., 2012). IBR seropozitifliğinin yüksek olduğu (Alkan ve ark., 2005) ölkemizde hastalıktan korunmanın en iyi yolu aşlamadır. Serapozitifliği düşük olan ölkelerde kesime sevk edilerek eradikasyon sağlanmaktadır. Aşılama yüksek antikör titresinin oluşturulması uzun süreli ve güvenli koruma sağlar. Bu nedenle aşılama programlarında immunmodölatör etkili ajanların kullanımı önemlidir. Yapılan bu çalışmada, proinflatuar ve anti-inflatuar sitokin konsantrasyonlarındaki değişiklikler deneme grubunda, kontrol-1 ve kontrol-2 grubuna göre daha güçlü immun yanıt geliştiğini ortaya koymuştur. Bu nedenle sürülerin IBR hastalığından korunmasında, aşılama ile birlikte inaktif parapoxvirus ovis (iPPVO) uygulaması birlikte yapılmalıdır.

Sürü sağlığı ve korumaya yardımcı immunmodölatör etkili ajanlardan biri olan inaktif parapoxvirus ovis (iPPVO)'un, sığırlarda inaktif IBR aşısı uygulaması programında tatbikinin, serum antikör titrelerinde ve sitokin konsantrasyonlarında değişikliklere neden olabileceği hipotezine dayanan bu projede, iPPVO'un inaktif IBR aşısı uygulamasında antikör titreleri, proinflatuar ve anti-inflatuar sitokin konsantrasyonlarındaki değişiklikleri ilk kez bu çalışmada araştırılarak literatüre önemli katkı sağlanmıştır. Ayrıca iPPVO'un, inaktif IBR aşısı uygulaması programı için iyi bir immunmodölatör etkisi olduğu ortaya konulmuştur. Bu nedenle, diğer aşılama programlarında ve koruyucu hekimlikte iPPVO'un kullanımını yaygınlaştırılmalıdır.

Ölkemizde IBR hastalığı için yeterli derecede koruma kontrol programları uygulamaya konulmamış olup, IBR aşısı mevcut olmakla birlikte yeteri kadar uygulanmamaktadır. Bu nedenle IBR'ye yönelik koruma, kontrol, aşılama ve eradikasyon programları geliştirilmelidir.

KAYNAKLAR

- Ackermann M, Engels M** (2006): Pro and contra IBR-eradication. *Vet. Microbiol.*, **113**, 293-302.
- Ackermann M, Peterhans E, Wyler R** (1982): DNA of bovine herpes virus type 1 in the trigeminal ganglia of latently infected calves. *Am. J. Vet. Res.*, **43**, 36-40.
- Adams AA, Horohov DW** (2013). The Effect of an Immunomodulator (parapoxvirus ovis) on Cell-Mediated Immunity (CMI) in Abruptly Weaned Foals. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **153(1)**: 118-122. 37
- Alkan F, Bilge-Dagalp S, Karapınar Z, Timurkan MO, Coskun N, Burgu I** (2005–2010): Long-term study on the vaccination with BoHV-1 glycoprotein E-deleted marker vaccine in selected two dairy herds in Turkey. *Trop Anim Health Prod (2018)*, **50**:353-363.
- Alkan F, Burgu I, Bilge-Dagalp S, Yildirim Y, Gencay A, Güngör B, Ataseven VS, Akça Y** (2005): The seroprevalence of BHV-1 infection on selected dairy cattle herds in Turkey. *J Vet Med Sci.*, **156**, 166169.
- Anziliero D, Weiblen R, Kreutz LC, Spilki F and Flores EF** (2014): Inactivated Parapoxvirus ovis induces a transient increase in the expression of proinflammatory, Th1-related, and autoregulatory cytokines in mice. *Braz J Med Biol Res.*, **47**: 110-118.
- Arai KI, Lee F, Miyajima A, Miyatake S, Arai N and Yokota T** (1990): Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses. *Annu Rev Biochem.*, **59**: 783-836.
- Arda M** (2000): Temel Mikrobiyoloji. 4. Baskı, Ankara: Medisan Yayınevi. S: 107-110.
- Avcı O, Bulut O** (2016): Effects of inactive parapoxvirus ovis on cytokine levels in rats. *J Vet Med Sci.*, **78(1)**: 129-131.
- Blecha F** (1988): Immunomodulation: a means of disease prevention in stressed livestock. *J Anim. Sic*, **66**: 2084-2090.
- Buttner M, Czerny CP, Lehner KH, Wertz K** (1995). Interferon induction in peripheral blood mononuclear leukocytes of man and farm animals by poxvirus vector candidates and some poxvirus constructs. *Vet Immunol Immunopathol.*, **46**, 237-250.
- Castruccia G, Osburmb F, Ferraric M, Salvatorid D** (2000): The use of immunomodulators in the control of infectious bovine rhinotracheitis. *Am. J. Vet. Res.*, **59**, 1409-1413.

Coskun D (2017) : Veteriner Destek Tedavi: Tarantula Cubensis Alkolik Ekstraktı, İnaktif Parapoxvirüs Ovis ve Corynebacterium Cutis Lizatı. *Dicle Üniv Vet Fak Dergi.*,;10(1):30.

Deane D, McInnes CJ, Percival A (2000): Orf virus encodes a novel secreted protein inhibitor of granulocytemacrophage colony-stimulating factor and interleukin-2. *J Virol.*, **74**, 1313-1320.

Dinarello CA (2000): Proinflammatory cytokines. *Chest.*, **118**: 503–508.

Dinarello CA (2001): Anti-cytokine therapies in response to systemic infection. *J. Investig. Dermatol. Symp Proc*, **6**: 244-250.

Dreismann GM (2010): Effects of The Homeopathic Preparation Engystol ad us. vet. on Stress Induced Wasting Pig Syndrome of Piglets. *J Vet Med Sci.*, **64 (3)**: 187-190.

Duman R, Yavru S, Bulut O, Avcı O (2013): Sığırlarda Bovine Herpesvirus-1 Enfeksiyonlarının Enzyme-Linked Immunosorbent Assay ve Mikronötralizasyon Testi ile Karşılaştırmalı Tespiti. *J Vet Med Sci.*, **8(2)**: 129-136.

Fleming SB, McCaughan CA, Andrews AE, Nash AD, Mercer AA (1997): A homolog of interleukin-10 is encoded by the poxvirus orf virus. *J Virol.*, **71**, 4857-4861.

Frey HR, Liess B (1971): Vermehrungskinetik and verwendbarkeit eines stark zytopatogenen VD-MD Virusus Ziehl Exp. *Psychol.*, **48(3)** : 239-47.

Friebe A, Siegling A, Friederichs S, Volk HD, Weber O (2004): Immunomodulatory effects of inactivated parapoxvirus ovis (ORF virus) on human peripheral immune cells: induction of cytokine secretion in monocytes and Th1-like cells. *J Virol.*, **78**: 9400–9411.

Gouwy M, Struyf S, Proost P and Van Damme J (2005): Synergy in cytokine and chemokine networks amplifies the inflammatory response. *Cytokine Growth Factor Rev.*, **16**: 561-580.

Grandvaux N, TenOever BR, Servant MJ & Hiscott J (2002): The interferon antiviral response: from viral invasion to evasion. *Curr Opin Infect Dis.*, **1**, 259-267.

Haig, DM, McInnes CJ, Thomson J, Wood A, Bunyan K, Mercer AA (1998): The orf virus OV20.0L gene product is involved in interferon resistance and inhibits an interferon-inducible, double stranded RNA-dependent kinase. *J. Immunol.*, **93**, 335-340.

Horohov DW, Breathnach CC, Sturgill TL, Rashid C (2008): In vitro and in vivo modulation of the equine immuneresponse by parapoxvirus ovis. *Vet Rec.*, **40 (5)** 468-472.

Karatzia MA (2010): Effect of dietary inclusion of clinoptilolite on antibody production by dairy cows vaccinated against *Escherichia coli*. *Vet. Microbiol.*, **64**, 197-222.

Jones C, Chowdhury S, (2010): Bovine herpes virus I (BHV-1) is an important cofactor in the bovine respiratory disease complex. *Vet. Clin. of N Am. Food A.*, **26**, 303-321.

Kaeber G (1964): In Diagnostic Procedures For Virus And Rickettsial Disease. *Public Health Ass New York.*, **3**:48-50.

Kook I, Henley C, Meyer F, Hoffmann FG, Jones C (2015): Bovine herpesvirus 1 productive infection and immediate early transcription unit 1 promoter are stimulated by the synthetic corticosteroid dexamethasone. *J Virol*, **484**, 377-385.

Kyriakis SC, Tzika ED, Lyras DN, (1998): Effect of an inactivated Parapoxvirus based immunomodulator (Baypamun) on post weaning diarrhoea syndrome and wasting pig syndrome of piglets. *Vet. Microbiol.*, **64**, 222-235.

Nguyen KB, Salazar-Mather TP, Dalod MY, Van Deusen JB, Wei X, Liew FY, Caligiuri MA, Durbin JE And Biron CA (2002): Coordinated and Distinct Roles for IFN- $\alpha\beta$, IL-12, and IL-15 Regulation of NK Cell Responses to Viral Infection. *J. Immunol*, **169**: 4279-4287.

Ons E, Van Brussel L, Lane S (2014): Efficacy of a Parapoxvirus Ovis-based Immunomodulator Against Equine Herpesvirus Type 1 and *Streptococcus Equi Equi* Infections in Horses. *J Vet Med Sci.*, **173(3)**: 232-240.

Pekmezci D, Pekmezci GZ, Guzel M, Cenesiz S, Gurler AT, Gokalp G (2014): Efficacy of amitraz plus inactivated parapoxvirus ovis in the treatment of canine generalised demodicosis. *Vet Rec.*, **174**: 556.

Pestka S, Krause CD, Sarkar D, Walter MR, Shi Y, Fisher PB (2004): Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Annu Rev Immunol.*, **22**: 929–979.

Raaperi K, Bougeard S, Aleksejev A, Orro T, Viltrop A (2012): Association of herd BRSV and BHV-1 seroprevalence with respiratory disease and reproductive performance in adult dairy cattle. *Acta Vet Scan.*, **54**, 1-10.

Raaperi K, Orro T, Viltrop A (2014): Epidemiology and control of bovine herpesvirus 1 infection in Europe. *The Vet J.*, **201**, 249-256.

Paillot R (2013): A systematic review of the immune-modulators Parapoxvirus ovis and *Propionibacterium acnes* for the prevention of respiratory disease and other infections in the horse. *Equine vet. J.*, **40 (5)** 468-472.

Proksch A, Unterer S, Truyen U, Hartmann K (2014). Efficacy of The Paramunity Inducer PIND-ORF in The Treatment of Canine Parvovirus Infection. *The Vet j.* **202 (2)**: 340-347. 40

Richard J, Katy M; McNelly T (2017): 1,25-Dihydroxyvitamin D3 modulates the phenotype and function of Monocyte derived dendritic cells in cattle. *Cytokine Growth Factor. Rev.*, **21**: 288-302

Sabat R, Grütz G, Warszawska K, Kirsch S, Witte E, Wolk K and Geginat J (2010): Biology of interleukin-10. *Cytokine Growth Factor. Rev.*, **21**: 331-344.

Sayers RG (2017): Associations between exposure to bovine herpesvirus 1 (BoHV-1) and milk production reproductive performance, and mortality in Irish dairy herds. *J Vet Med Sci.*, 100: 1340-1352.

Schütze N, Raue R, Buttner M and Alber G (2009): Inactivated parapoxvirus ovis activates canine blood phagocytes and T lymphocytes. *Vet. Microbio.*, **137**: 260–267.

Schütze N, Rüdiger R, Büttner M, Alber G (2009) : Inactivated parapoxvirus ovis activates canine blood phagocytes and T lymphocytes. *Vet Microbiol.*, **99**, 51–57.

Scott P (2017) : Reviewed by Dr Rachael Tarlinton. Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR, BHV 1). *Anim. Health Res Rev.*, **6**, 63–74.

Sharma S, Yang B, Xi X, Grotta J C, Aronowski J And Savitz SI (2011): IL-10 directly protects cortical neurons by activating PI-3 kinase and STAT-3 pathways. *Brain Res*, **1373**: 189-194.

Quinn PJ (1990): Mechanisms of action of some immunomodulators used in veterinary medicine. *Adv. Vet. Sci Comp Med*, **35**: 43-99.

Tiwari J, Babra C, Tiwari HK (2013). Trends Intherapeutic and Prevention Strategies for Management of Bovine Mastitis: An Overview. *J Gen Virol.*, **4** (2): 8-11.

Weber O, Mercer A A, Friebe A (2013): Therapeutic immunomodulation using a virus the potential of inactivated orf virüs. *Vet Microbiol.*, **99**, 51–57.

Weber O, Siegling A, Friebe A, Limmer A, Schlapp T, Knolle P, Mercer A, Schaller H, Volk HD (2003): Inactivated parapoxvirus ovis (Orf virus) has antiviral activity against hepatitis B virus and herpes simplex virus. *J Gen Virol.*, **84**, 1843-1852.

Villalta SA, Rinaldi C, Deng B, Liu G, Fedor B And Tidball JG (2011): Interleukin-10 reduces the pathology of mdx muscular dystrophy by deactivating M1 macrophages and modulating macrophage phenotype. *Hum Mol Genet*, **20**: 790-805.

Wilkins C, and Gale MJ (2010): Recognition of viruses by cytoplasmic sensors. *Curr Opin Immunol*, **22**: 41-47.

Winkler MT, Doster A, Jones C (2000): Persistence and reactivation of bovine herpesvirus 1 in the tonsils of latently infected calves. *J Gen Virol.*, **74**, 5337-5346.

Yanbakan S. (2004) : Konya bölgesindeki sığırlarda bovine herpesvirus-1 (BHV-1) enfeksiyonunun nötralizasyon testi ve enzyime-linked immunosorbent assay (ELISA) ile karşılaştırmalı olarak araştırılması. *Konya Vet. Fak. Derg.*, **32**, 56-62.



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Süleyman ERBASAN

Doğum Yeri /
Yılı : BURDUR / 1989

Yabancı Dili : İngilizce

Mail : erbasan@hotmail.com



Eğitim Durumu:

Lisans: Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi (2008-2013)

Yüksek Lisans: Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
(2015-)

