

**AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SAĞLIKLI VE KLİNİK-SUBKLİNİK MASTİTİS TEŞHİSİ KONMUŞ
İNEKLERDE INFECTIOUS BOVINE RHINOTRACHEİTİS-INFECTIOUS
PUSTULER VULVOVAGİNİTİS (IBR) ENFEKSİYONUNUN
ARAŞTIRILMASI**

VET. HEK. MUTLU KARADUMAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tez No:2008-034

**DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. Sibel GÜR**

Afyonkarahisar©2008

KABUL VE ONAY

Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Viroloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı

Çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından

Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 19.06.2008



Yrd.Doç.Dr.Sibel GÜR

ÜYE



Yrd.Doç.Dr. Esra ŞBKER

ÜYE



Yrd.Doç.Dr.Ayşe GENÇAY

ÜYE

Viroloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Öğrencisi Mutlu KARADUMAN'ın "Sağlıklı ve Klinik-Subklinik Mastitis teşhisi konmuş ineklerde IBR/IPV enfeksiyonunun araştırılması" başlıklı tezi 23/06/2008 günü saat 09:30'de Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.



Doç.Dr.Yavuz DEMİR

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR), Infectious Pustuler Vulvovaginitis (IPV) ve Infectious Balano-Posthitis (IBP) kompleks enfeksiyonunun etkeni Herpesviridae ailesinde yer alan Alphaerpesvirinae alt ailesinde sınıflandırılmış olan Bovine Herpesvirus tip 1'dir (BHV1).

Dünyanın bir çok ülkesinde olduğu gibi Türkiye'de de yüksek oranlarda görüldüğü bir çok araştırmayla ortaya konulan BHV-1 enfeksiyonu yenidoğan ve gençlerde daha çok generalize enfeksiyon şeklinde seyretmekle birlikte yetişkinlerde çok sayıda sistem ve organda klinik bozukluklarla seyredebilir. Sığırlarda meme bezi de klinik bozukluğun görüldüğü dokulardan biridir.

Bu çalışmada, İzmir ilindeki mastitis oranlarının yüksek olduğu 7 damızlık süt sığırı işletmesindeki 269 sağmal inekten kan ve her meme lobundan süt örnekleri alınarak BHV1 yönünden ve ve süt örnekleri Somatik Hücre Sayısı yönünden incelenmiş ve enfeksiyonun normal, subklinik mastitis ve klinik mastitis'li hayvanlardaki dağılımı incelenmiştir.

Bu araştırmanın gerçekleşmesinde büyük katkısı olan sevgili danışman hocam, Sayın Yrd. Doç. Dr. Sibel Gür'e teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Ayrıca mesleki alanda beni yetiştiren, her konuda olduğu gibi tez kapsamında kullandığım De Laval DCC kitlerinin finansmanında da benden yardımlarını esirgemeyen Ege Vet San. Tic. Ltd. Şti.'ne ve yine De Laval DCC'un kullanımında göstermiş oldukları ilgiden dolayı De Laval Türkiye'ye teşekkürlerimi sunuyorum.

Örnekleri toplama konusunda bana işletmelerini açan İzmir iline bağlı damızlık işletmesi sahibi çiftçi dostlarıma da çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL ONAY	HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.
ÖNSÖZ	İİİ
İÇİNDEKİLER	İV
SİMGELER VE KISALTMALAR	Vİ
TABLOLAR VE GRAFİKLER	Vİİ
ÖZET	Vİİİ
ABSTRACT	İX
1.GİRİŞ	1
1.1. INFECTIOUS BOVINE RHINOTRACHEİTİS (İBR)	1
1.1.1. Tanım.....	1
1.1.2. Etiyoloji.....	2
1.1.3. Latentlik.....	3
1.1.4. Epidemiyoloji.....	3
1.1.5. Patogenez ve Patoloji.....	4
1.1.6. Klinik.....	5
1.1.7. Teşhis.....	7
1.1.7.1. Direkt Teşhis.....	7
1.1.7.2. İndirekt Teşhis.....	7
1.1.8. İmmunite.....	8
1.1.9. Korunma ve Kontrol.....	9
1.2. AMAÇ	10
2. GEREÇ VE YÖNTEM	11
2.1. GEREÇ	11
2.1.1. Örneklenen Hayvanlar.....	11
2.1.2. Hücre Kültürü.....	11
2.1.3. Viruslar.....	12
2.1.4. Somatik Hücre Sayısının (SHS) Belirlenmesi.....	12

2.2. YÖNTEM.....	13
2.2.1. Virusun üretilmesi ve titresinin belirlenmesi	13
2.2.2. Lökosit örneklerinin işlenmesi	14
2.2.3. Serum örneklerinin işlenmesi	14
2.2.4. Süt örneklerinin işlenmesi	14
2.2.4.1. Serolojik kontrol için süt örneklerinin hazırlanması	14
2.2.4.2. Virolojik kontrol için süt örneklerinin hazırlanması	14
2.2.5. Virolojik Araştırmalar	15
2.2.5.1. Kan örneklerinde Virus İzolasyon Çalışmaları.....	15
2.2.5.2. Süt örneklerinde virus izolasyon çalışmaları.....	15
2.2.6. Virus Nötralizasyon ve Nötralizasyon 50 (SN ₅₀) testi	15
2.2.7. Somatik Hücre Sayısının (SHS) Belirlenmesi.....	16
3. BULGULAR	17
3.1. Titrasyon Test Sonucu.....	17
3.2. Kan ve süt örneklerinden virus izolasyon sonuçları.....	17
3.3. Kan serumlarında Virus Nötralizasyon ve Nötralizasyon 50 (SN ₅₀) testi.....	17
3.4. Süt serumlarında Virus Nötralizasyon ve Nötralizasyon 50 (SN ₅₀) testi	19
3.5. Somatik Hücre Sayısı (SHS) verileri.....	20
3.6. İstatistiksel Analiz	22
4. TARTIŞMA	23
SONUÇ	31
5. KAYNAKLAR.....	33

SİMGELER VE KISALTMALAR

BHK-21	:Baby Hamster Kidney
BHV1	:Bovine Herpesvirus Tip 1
BVDV	:Bovine Viral Diarrhea Virus
Cp	:Sitopatojen
DKID ₅₀	:Doku Kültürü Enfektif Doz %50
DMEM	:Dulbecco's Minimal Essential Medium
EDTA	:Ethylene-Diamine-Tetra-Acetic-Acid
FDS	:Fötal Dana Serumu
FMD	: Foot and Mouth Disease
IBP	:Infectious Balonoposthitis
IBR	:Infectious Bovine Rhinotracheitis
IBRV	:Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus
Ig	:Immunglobulin
IPV	:Infectious Pustuler Vulvovaginitis
Kb	:Kilobase
MDBK	:Madine Darby Bovine Kidney
Ncp	:Nonsitopatojen
NPLA	:Nötralizasyon Peroksidaz Linked Antibody
PI	:Persistent Infection
PI3	:Para Influenza 3
PLA	:Peroxidaz Linked Antibody
RSV	:Respiratory Syncytial Virus
RT-PCR	:Revers Transcriptase-Polimerase Chain Reaction
SN ₅₀	:Serum Nötralizasyon %50
VNT	:Virus Nötralizasyon Test

TABLolar ve GRAFİKLER

Tablo 1:Hayvan sayısı, SHS ortalamaları ve Kan serum örneklerinde BHV1 antikor verileri	18
Tablo 2:Pozitif süt örneklerinin işletmelere göre dağılımı	19
Tablo 3:Örneklenen hayvanların IBR pozitifliğe göre sınıflandırılması(100.000h/ml).....	20
Tablo 4:Örneklerin IBR pozitif ve negatiflerin SHS ortalamaları	21
Tablo 5:BHV1 Antikor Pozitif Hayvanlarda Titreye göre SHS Dağılımı.....	22
Grafik 1:BHV1 seropozitif hayvanlardaki antikor titre dağılımı	18

ÖZET**Sağlıklı Ve Klinik-Subklinik Mastitis Teşhisi Konmuş İneklerde Infectious Bovine Rhinotracheitis-Infectious Pustuler Vulvovaginitis (IBR) Enfeksiyonunun Araştırılması**

Bu çalışmanın amacı, sütçü işletmelerde Bovine Herpesvirus type 1 (BHV1) enfeksiyonunun subklinik ve klinik mastitis olgularındaki rolünü araştırmaktır. Bu amaçla 269 inekten kan ve her lobdan süt örnekleri elde edildi. Yedi çiftlikten 4 ile 118 arasında hayvan örneklendi. Lökosit ve süt örnekleri virus izolasyonu için hücre kültürlerine inokule edildi fakat tüm inokulumların negative olduğu belirlendi. Süt örneklerindeki Somatik Hücre Sayısının (SHS) belirlenmesi için DeLaval yöntemi kullanıldı, 44 lob kör olduğu için süt örneği alınamadı. Toplam 1032 lob ölçüldü. Hayvanlar ortalama 100.000 hücre/mL değerine göre 3 guruba ayrıldı. Kan ve süt serum örneklerine (n=1.270) Virus Nötralizasyon test uygulandı. Kan örneklerinde çiftliklere göre BHV1 için 0 ile %75 arasında oranlar belirlendi, ortalama değer %36.8 (99/269) olarak belirlendi. Antikor titrelerinin 1/2 ile 1/256 arasında düzenli bir düşüş gösterdiği belirlendi. Süt örneklerinin kontrolünde, hayvanların sadece %26.4'ünün (265/1001) pozitif olduğu görüldü. BHV1'in serolojik olarak teşhisi için süt örneklerinin kullanımının kan göre daha az duyarlı olduğu belirlendi. SHS'na göre, 269 hayvanın 68'i sağlıklı olarak kategorize edildi ve bunların 15'inin (%22) BHV1 pozitif olduğu belirlendi. En büyük grup (186) subklinik mastitisli olanlardı, enfeksiyon oranı %40.9 (76/186) olarak tespit edildi. Klinik mastitis 15 inekte teşhis edildi, bunların 8'inin (%53.3) BHV1 pozitif olduğu görüldü. Üç guruptaki hayvanlar istatistiksel olarak karşılaştırıldı ve sağlıklı hayvanlarla hem klinik hem de subklinik mastitisli hayvanlar arasında bağıntı olduğu saptandı.

Anahtar Kelimeler: BHV1, Seroloji, İzolasyon, Somatik Hücre Sayısı

ABSTRACT**The Investigation of Infectious Bovine Rhinotracheitis-Infectious Pustular Vulvovaginitis (IBR/IPV) Infection in Healthy, Subclinical and Clinical Mastitis Diagnosed cows**

Aim of this study was to investigate the role of Bovine Herpesvirus type 1 (BHV1) infections in subclinical and clinical mastitis events in Dairy enterprises. For this purpose blood and milk samples from every quarter were obtained from 269 cows. The number of sampled animals in 7 farms was between 4 and 118. Blood clots and milk samples were inoculated to cell cultures for virus isolation but all of the inoculums were found to be negative. DeLaval method was used for determine the Somatic Cell Counts (SCC) in milk samples, 44 quarter was blind and the milk samples not obtained. Total of 1032 quarter were measured. According to 100.000cell/mL average value, the animals were divided to three groups. Virus Neutralisation Test was applied to blood and serum samples (n=1.270). The proportion of BHV1 in blood samples were among 0 and 75% in farm basis, average value was 36.8% (99/269). Antibody titer showed ordinary decrease between 1/2 and 1/256. On the controlling milk samples, only 26.4% (265/1001) of the animals has been detected as seropositive. Using milk samples for serodiagnosis of BHV1 was found to be less sensitive comparing blood. According to SCC, out of 269 animals, 68 was categorised as healthy and 15 of them (22%) was found to be BHV1 positive. The biggest group (186) was the animals with subclinical mastitis, the proportion of the infection was found to be 40.9% (76/186). Clinical mastitis was diagnosed in 15 cows, 8 of them (53.3%) showed positivity for BHV1. The values of three groups were compared statistically and correlation was determined among both healthy and clinical and subclinical mastitis diagnosed cows.

Key Words: BHV1, Serology, Isolation, Somatic Cell Count

1.GİRİŞ

1.1. INFECTIOUS BOVINE RHINOTRACHEITIS (IBR)

1.1.1. Tanım

Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR), Infectious Pustuler Vulvovaginitis (IPV) ve Infectious Balano-Posthitis (IBP) kompleks enfeksiyonunun etkeni Herpesviridae ailesinde yer alan Alphaerpesvirinae alt ailesinde sınıflandırılmış olan Bovine Herpesvirus tip 1'dir (BHV1). Aerosol bulaşma yanında yakın temas, kontamine materyallerle temas ve veneral yollarla bulaşır. Semptomlar başlıca virusun replike olduğu hücrelerde meydana getirdiği dejenerasyona bağlıdır. Enfekte olan hayvanlardan yüksek titrede virus saçılımı söz konusudur. Enfekte hayvanlarda virus intra-aksonal taşınmayla latent kaldığı bölgesel gangliyonlara yerleşir. Sık görülmemekle birlikte virus kan-beyin bariyerini geçerek ensefalitis meydana getirebilir, ensefalitis hem doğal hem de deneysel enfeksiyonlarda meydana gelebilir (1).

IBR enfeksiyonu yenidoğan ve gençlerde daha çok generalize enfeksiyon şeklinde seyretmekle birlikte yetişkinlerde çok sayıda sistem ve organda klinik bozukluklarla seyredebilir. Görülebilen semptomlardan bazıları; solunum sistemi bozuklukları (2, 3), sindirim sistemi bozuklukları ve ishal, konjunktivitis (4), ensefalomyelitis (5), endometritis, infertilite ve mastitis (6), abort (7) ve dermatitis'dir (8). Morbiditesi çok yüksek ancak mortalitesi çok düşük olan enfeksiyon gençleri daha fazla etkilerken yetişkinlerde tamamen subklinik seyredilmektedir. Dünyanın birçok ülkesinde olduğu gibi (9, 10, 11, 12) Türkiye'de de yüksek oranlarda görüldüğü birçok araştırmayla ortaya konulmuştur (13, 14, 15).

IBR enfeksiyonunda diğer tüm herpesviral hastalıklarda olduğu gibi latentlik söz konusudur, virusun IBR formunda trigeminal gangliyon, IPV/IBP formunda ise sakral gangliyonlar latentlik alanlarıdır.

Özellikle akut IBR enfeksiyonunda mastitis geliştiği (16), enfeksiyonun yüksek insidensle seyrettiği sürülerde mastitis vakalarının daha yüksek oranlarda seyrettiği bildirilmiştir (17). Deneysel araştırmalarda da BHV1'in klinik mastitise yol açtığı Greig ve Bannister (18), Straub ve Kielvein (19) ve Corner ve ark., (20) gibi bir çok araştırıcı tarafından bildirilmiştir.

1.1.2. Etiyoloji

Almanya'da ondokuzuncu yüzyılda bu gün BHV1 veya IBR olarak bilinen enfeksiyon "Blaschenausschlag" adıyla Büchner ve Trommsdorf tarafından tanımlanmış, enfeksiyonun etiyojisi ise ilk kez Reisinger ve Reimann tarafından 1928'de belirlenmiştir (21).

Etken Herpesviridae familyasının üç alt familyasından biri olan Alphaherpesvirinae grubunda sınıflandırılmıştır. IBR, Bovid Herpesvirus-1 olarak da bilinir (BHV-1) (22, 23). Genom tek linear molekül halinde 135.3kbp'lik çift iplikcikli DNA'dan oluşmuştur. Zarlı olan virionlar ikozahedral simetridir. Kapsit 150 heksamer ve 12 pentamerden oluşan 162 kapsomerden şekillenmiştir.

Virus 33 farklı yapısal protein kodlar, bunlardan 13'ünün viral zar, 14'ünün nükleokapsit ile ilişkili olduğu gösterilmiş, 6'sı ise sınıflandırılmamıştır. Virusun kodladığı enzimler timidin kinaz, deoksiridib trifosfataz, ribonükleotid reduktaz ve DNA polimeraz'dır.

IBR sahada kış aylarında 30 gün, bahar aylarında 5-9 gün, 37°C'de 10 gün, -20°C'de bir yıl, -65°C'de ise uzun süre inaktive olmazlar (24, 25). Nemli ortamlarda daha uzun süre canlılığını devam ettirebilir. Virus zarlı olduğundan liposolventlerden çabuk etilenirler, ayrıca %0,5 NaOH, %0,01 HgCl₂, % 1 CaCl ve %1 fenol solüyonları ile muamele edildiklerinde kısa sürede inaktive olur (26 Straub ve ark., 1990). Etkenin pH duyarlılığı enfeksiyozitesi açısından çok önemlidir çünkü etken mukozal yolla bulaşmaktadır. Solunum sistemi mukozasında pH'sı 7 civarında, genital kanalda ise 8 kadardır, virusun pH toleransı ise 6 ile 9 arasındadır (27), bu durum etkenin bulaşmasında etkilenmemesini sağlamaktadır.

1.1.3. Latentlik

Tüm herpesvirusların latent kalma özelliği vardır. Enfekte hayvanlarda olgun virion bulunmayabilir ancak viral DNA'nın lokal sensorik ganglionlardaki varlığı gösterilmiştir (28, 29). BHV1'in tüm suşları ile attenüe canlı aşılar latentliğe neden olur. Virusun latent kaldığı bölge bulaşma yoluna göre değişiklik gösterir. Akut IBR enfeksiyonu durumunda virus trigeminal ganglionlarda (30), IPV enfeksiyonu durumunda sakral ganglionlarda latent kalır (29). Daha sonra yapılan çalışmalarda etkenin lenf nodüllerinde ve burun mukozasında da latentliğin olduğu bildirilmiştir (31). BHV1'in latent kaldığı doku tipleri ortalama ömrü uzun, replike olmayan ve iyi diferensiyel olmuş dokulardır.

Akut enfeksiyonu takiben oluşan antikorların yarıömürleri uzun değildir, herhangi bir nedenle gelişen immunsupresyon sonucu veya zamanla kendiliğinden antikor titresinin azalması ile latent olarak bulunan viral proviral DNA'lar reaktif olup tekrar virus saçılımını sağlarlar (32). Antikor seviyesi yüksek olan hayvanlarda bile kortikosteroid uygulamalarını takiben virus reaktif edilip, saçılım sağlanabilir.

1.1.4. Epidemiyoloji

Konak spektrumu fazla geniş olmayan BHV1 enfeksiyonu, ülke, bölge ve özellikle sürü büyüklüğüne bağlı olarak değişik oranlarda bulunmakla birlikte varlığı birçok ülkede bildirilmiştir. Ana konakço sığır ve mandalardır ancak koyun ve keçi başta olmak üzere spesifik antikor varlığı bir çok ruminant türünde belirlenmiştir. Virusun Avrupa'da görülmesi bazı ruminant türlerinin Afrika'dan getirilmesi sonrası olduğu bildirilmiştir (33). Hemen tüm Avrupa ülkelerinde yaygın görülmüş olan enfeksiyonun eradikasyonu için yoğun mücadele yapılmaktadır. Türkiye'de enfeksiyonun ne zamanda beri var olduğu bilinmemektedir ancak virus izolasyonu ilk kez Burgu ve Akça tarafından 1987'de, spesifik antikorlar ise 1971'de Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Viroloji laboratuvarında belirlenmiştir (34). İzleyen yıllarda konu ile ilgili çok sayıda araştırma yürütülmüştür. Seroprevalansa yönelik çalışmalarda 1974 yılında %54 (35), 1997 yılında %59 (14) 1994 yılında

%68 (13) ve 1998 yılında %74 (15) oranları tespit edilmiş, bildirilen oranlara bakıldığında enfeksiyonun giderek yaygınlaştığı gözlenmiştir.

BHV1 enfeksiyonunun mortalitesi yüksek olduğundan, insidens sürü büyüklüğüne bağlı olarak önemli ölçüde farklılık gösterebilir (36). İnsidensin artışı üzerinde pozitif etkili faktörler sürü büyüklüğü yanında kontrolsüz hayvan hareketleri, yaş ve cinsiyet'tir (37). Yaşın artmasıyla birlikte enfeksiyona yakalanma oranı da artar. Doğal aşımında kullanılan boğalarda da venereal bulaşma olasılığı da fazladır. BHV1'in latent yapısı nedeniyle virusun reaktivasyonu özellikle miks enfeksiyon, doğum, çiftleşme ve transport gibi immunsistemi baskılayan unsurların varlığında her zaman oluşabilir (38).

1.1.5. Patogenez ve Patoloji

BHV1'in organizamaya girişi mukoz membranlar yoluyla olur. Genital ve üst solunum sistemi mukozası dışında konjunktival mukozalardan da bulaşma gerçekleşebilir. Direkt temas bulaşmanın en kolay olduğu yoldur ancak kısa mesafelerde aerosol yolla da bulaşma şekillenebilir (39). Venereal bulaşma kontamine semen veya enfekte boğa kullanımı yoluyla gelişir (40).

Bulaşmanın ardından virus duyarlı hücrelerde hızla replike olur ve hücrede apoptosis mekanizmasını başlatarak ve nekroza neden olarak hücrenin ölümüne neden olur. Hem canlı hem de inaktif virus apoptosise yol açabilir (41). BHV1 giriş bölgesinde hızla çoğalır ve mukozal mukus ile yüksek titrede virus saçılımına yol açarak sürüde insidensin hızla artmasına neden olur. Bu arada üst solunum sisteminde konjestiyon ve ödem gözlemlenebilir. Rhinitis ve laringitis yanında (1, 8), akciğerlerin ödematoz yapıda olduğu belirlenebilir (42). Virusun önce perifer sinirlere ardından trigeminal ganglionlara yerleşir, sık görülmemekle birlikte daha sonra medulla oblongata, pons ve cerebrumda da replike olabilir ve ensefalitise neden olabilir (30, 42).

Özellikle akut IBR enfeksiyonlarında sindirim sisteminde erozyon, ülserasyon ve enterit tespit edilebilir, bu lezyonlara ayrıca özefagus, ön mide, abomazum ve ağız içinde de rastlanabilir. da rastlanır. İnce bağırsaklarda kataral enteritis genellikle vardır, lokal lenfoid dokularda etkilenmiştir. Peyer plakları gibi lokal lenfoid dokuların histopatolojik muayenesinde nekrozis ve dejenerasyon belirlenebilir (6, 43).

Virus primer çoğaldığı yerden viremi yoluyla organizamaya yayılır ve birçok dokuya ulaşarak çok sayıda organda klinik bozukluklar meydana getirebilir. Bunlardan başlıcaları; gebe ineklerde abort ve gençlerde mortaliteyle seyredabilen generalize klinik enfeksiyon, mastitis ve fetal enfeksiyondur (3, 6). Abort olmuş fetüslerde patolojik bulgulara karaciğer ve böbreklerde rastlanır.

Enfeksiyonun veneral formu olan IPV ve IBP'de patolojik bozukluklar oldukça çeşitlidir. Dişi hayvanlarda vagina, vulva ve servikste ödem ve veziküller görülebilir, IBP'de ise benzer bozukluklar penis ve prepuyum mukozalarında gözlenir (1). Mukozalardaki lezyonların çapı zamanla artar ve yangısal değişiklikler şiddetlenir ancak antikör yanıtın kanda oluşumu ve artışı sonucunda dokulardaki virionlar da nötralize edilerek yok edilir. Sekunder enfeksiyonların var olmadığı durumlarda kısa sürede iyileşme meydana gelir (19). Mastitis, hem IBR hem IPV enfeksiyonu durumunda hemde virusun meme içi verilmesiyle şekillenebilir (18, 19, 20).

BHV1 ile enfekte hayvanlarda sıklıkla diğer patojenler de izole edilmiştir. Bunlardan bazıları Pasteurella Haemolytica ve BVDV enfeksiyonudur (44, 45). IBRV enfeksiyonu sonucunda pnömoni sık rastlabilen bulgulardandır. Virusun alveolar makrofaj, polimorfnükleer ve lenfosit fonksiyonlarını bozduğu bildirilmiştir (46). Bu nedenle sekunder bakteriyel enfeksiyon genellikle klinik tabloya eşlik eder.

1.1.6. Klinik

BHV1 enfeksiyonunun klinik şiddetini belirleyen ana faktörler virusun suşu (47), kanakçının direnci ve yaşı ile potansiyel miks etken varlığıdır. Hastalığın subklinik formuna oldukça sık rastlanır. Doğal enfeksiyonda bulaşma mukoz

membranları yoluyla olur. Deneysel enfeksiyonda virusun intranazal verildiği seronegatif danalarda 2–4 günlük inkubasyonu takiben 41°C'ye varan ateş görülür ve 4–5 gün kadar devam eder. Buna bağlı olarak hayvanlar depresif ve anoreksiktir. Yetişkin hayvanlarda aynı dönemde önemli oranda süt verimine düşme görülür (48). Burunda pembeleşme, serözden mukopurulent doğru değişen burun akıntısı ve salivasyon artışı gözlenebilir. Virusun replike olduğu mukozalarda yangısal belirtiler artarak devam eder. Solunum sistemi bozuklukları yaygındır (2, 3). Öksürük, solunum sisteminde özellikle farinks ve trahea mukozasında kızarıklık, nekrotik odaklar ve fibrinöz eksudat birikimi gözlenir (21). Abort genellikle seronegatif hayvanların akut enfeksiyonu durumlarında meydana gelir, deneysel enfeksiyonlarda abortların daha çok gebeliğin 4 ile 8. ayları arasında şekillendiği ancak gebeliğin ilk 3 ayındaki enfeksiyonlarda embriyonik ölümler geliştiği tespit edilmiştir (49, 50, 51). Canlı aşıların kullanımının da abortlara yol açabildiği bildirilmiştir (52). Yaygın görülebilen diğer klinik semptomlar; konjunktivitis (4), ensefalomyelitis (5), Repeat Breeding, mastitis, enteritis (6) ve dermatitis'tir (8). Enfeksiyonun IBR formunda virus trigeminal gangliyonlarda yerleştikten sonra ensefalitis gelişimi de söz konusu olabilmektedir (53, 54, 55, 56). Yetişkin hayvanlarda klinik bulgular ilk 4-5 gün boyunca devam eder. Ateşin normale dönmesiyle diğer genel bulgularda düzelme görülür ve iyileşme dönemine girilir.

Yenidoğan seronegatif buzağı ve danalarda enfeksiyon genellikle sistemik seyrederek (6, 57), kolstrum alamayan yavrular büyük risk altındadırlar (58). Aşırı salivasyon, ateş, ishal, göz ve burun akıntısı genellikle vardır (59, 60, 61). Sindirim kanalında yaygın patolojik değişiklikler vardır örneğin glossitis, özefagitis ve akut nekrotik rumenitis. Yaklaşık 4–5 gün içinde hayvanlar agoni durumuna gelebilirler.

Koital egzantem olarak bilinen hastalığın veneral formu dişilerde Infectious Pustuler Vulvovaginitis (IPV), erkeklerde Infectious Balano-Posthitis (IBP) olarak bilinmektedir. Bu formlarda bulaşma çiftleşme, suni tohumlama ve diğer hayvanlar ile kuruklarının temasları sonucu olabilir. Bu durumda inkubasyon IBR ile aynıdır, 2-4 gün sürer. Ateşin yükselmesine yine ilk bulgudur ancak genellikle IBR formundan biraz daha düşüktür, bu yüzden tespit edilemeyebilir. Etkilenen bireylerde iştah pek etkilenmez, süt verim kaybı yine vardır ancak IBR'den daha azdır (19). Klinik evre

IPV'de 1 hafta kadar sürer ve 2. haftada iyileşme büyük ölçüde şekillenir. Sekunder özellikle bakteriyel enfeksiyon dejenere olan genital mukozadaki yangı şiddetini arttırabiliri bu durumda iyileşme süreci uzayabilir. IPV'li hayvanlarda mukozal lezyonlar yanında diğer genital sistemde endometritis ve ovaryal patolojiler de tespit edilmiş, ovaryumdan virus izole edildiği bildirilmiştir (62). IBP'de iyileşme süresi daha uzundur, 4. haftaya kadar devam edebilir (63).

1.1.7. Teşhis

1.1.7.1. Direkt Teşhis

Direkt teşhiste antijenin tespit edilebilmesi için kullanılacak materyaller; kan, süt, abort materyalleri ve mukozal svaplardır (64). Uygun yöntemle alınacak örnekler +4°C'nin sağlandığı şartlarda kısa süre içinde laboratuara gönderilmelidir.

Virusun teşhis edilebilmesi kullanılacak testler arasında; hücre kültüründe virus izolasyonu, PCR (65, 66, 67)., Immun Floresan (68), Immun Peroksidaz ve ELISA (69) bulunmaktadır.

Sürüde semptom gösteren hayvanlardan virus izolasyonu için birden fazla yolla örnek alınmalı, olası subkinik enfekteksiyonu geçiren bireylerin tespiti için de çalışma yapılmalıdır. Ancak önerilen tüm hayvanların örneklenmesidir (26).

1.1.7.2. İndirekt Teşhis

BHV1 spesifik antikorların teşhisinde bir çok testten yararlanmak mümkündür. İndirekt hemaglutinasyon test (70), immundifüzyon (50), counterimmunoelctrophoresis (71) ve komplement fiksasyon test (72) kullanılabilmele birlikte ELISA (73) ve Virus Nötralizasyon testi (74) en çok tercih edilen yöntemlerdir. Serolojik çalışmalarda kan serumu en önemli materyal olmakla birlikte süt serumu da kullanılabilir (75). Akut evredeki hayvanlarda sütte tespit edilen antikor titreleri kan serumunda tespit edilenlere yakın ancak biraz daha azdır, kronik vakalarda ise sütteki antikor titreleri çok azalmaktadır. Antikor teşhisi için sperma kullanmak da mümkündür.

1.1.8. İmmunite

Primer enfeksiyon sonrasında organizamada nonspesifik yangısal ve hücrel reaksiyonlar meydana gelir. Nonspesifik mekanizmalar arasında komplement aktivasyonu ve INF salgısı sayılabilir. İlk salgılanan sitokinler; makrofajlar, polimorf nükleer nötrofiller ve NK hücreler gibi davranan büyük granular lenfositler gibi yapıları aktive eder ve bu faktörlerin antiviral etkinlikleri özellikle enfekte hücrelere yöneliktir. Ayrıca bu mekanizmalar daha sonra spesifik immunfaktörlerin gelişimini başlatır (76).

Spesifik hücrel immunité enfeksiyonun 5. gününde tespit edilebilir ve 7 ile 10. günlerde pik seviyeye ulaşır. T lenfositlerinin de önemli bir rolü vardır. INF γ ve IL₂ salgılanması NK ve makrofaj sistemlerini harekete geçirir ve daha sonra spesifik sitotoksik T lenfositlerinin aktivasyonuna yol açar (76).

Akut BHV1 enfeksiyonunun meydana gelmesini takiben sentezlenen Ig A ve IgM 2. haftada pik seviyeye ulaşır yaklaşık 2–4. haftalarda ise IgG seviyesi en yüksek noktaya ulaşır. Guy ve Potgieter (77), akut enfeksiyonda Ig G1, reenfeksiyonda ise IgG2'nin sentezlendiğini bildirmişlerdir. IBR enfeksiyonunu sonucu ortaya çıkan titrenin veneral formlarda şekillenenden daha yüksek olduğu ortaya konulmuştur (50).

Akciğer dokusunda lenfositlerin sayısında artış söz konusudur. Deride aşırı duyarlılık reaksiyonları ile serotonin ve depomin salgılanması sonucu akciğerlerde alerjik semptomlar görüldüğü bildirilmiştir. Ayrıca maternal antikor alan yavrularda, aldıkları IgE nedeniyle aşırı duyarlılık reaksiyonları görülebilmektedir.

Bağışık annelerden doğan yavrular yaklaşık 3–4 ay süre ile enfeksiyondan korunurlar (78). Enfekte hayvanlarda kanda şekillenen antikorlar süte de aynı dönemde geçerler (79). Anneleri immun olmayan yenidoğanlar veya annelerinden kolostrum-süt alamayan yavrularda enfeksiyon şiddeti ve mortalite daha yüksektir (2, 80).

1.1.9. Korunma ve Kontrol

BHV1 enfeksiyonunu mücadele için yöntem seçilirken enfeksiyonun sürü bazında yaygınlığı göz önüne alınmalıdır. Latent enfekte hayvanlarda virus proviral DNA olarak bulunmakla birlikte her zaman virus saçılımı olmaz ancak immunsupresyona neden olabilecek faktörlerin varlığı durumlarda veya bireyde antikor titresinin azalmasına bağlı olarak virusun reaktivasyonu ve yeniden saçılımı mümkündür. Enfekte hayvanlarda spesifik antikorların her zaman bulunduğu bilgisine dayanarak pozitif hayvanlar belirlenirken hayvanların aşı durumları da bilinmesi şartıyla serolojik durumlarının belirlenmesi yoluna gidilmesi önerilmektedir.

Enfekte hayvan sayısının az olduğu sürülerde enfekte bireylerin sürüden çıkarılması hatta kesime gönderilmesi ve kalan hayvanların aşılanması önerilmektedir. Ancak enfekte hayvan sayısının yüksek olduğu sürülerde aynı uygulama yapılamayacağından enfeksiyonun exacerbation, diğer bir deyişle virusun reaktivasyon göstermesinin engellenmesi amacıyla uygun aşılarla aşılanması gerektiği bildirilmiştir. Bu yolla ekonomik kayıpların azaltılması hedeflenmektedir (47). Aşılama uygulaması için maternal antikorların kaybolduğu dönemin bilinmesi gerekmektedir. Bunun için aşılamadan önce tüm hayvanların serolojik olarak kontrol edilmesi gereklidir ve maternal antikor alan yavruların postnatal 5–6. aya kadar korunabileceği unutulmamalıdır. Enfeksiyonla mücadeleyi ülke çapında yapan birçok Avrupa ülkesinde seropozitif hayvanların kesime gönderilmesi yoluna gidilmektedir. Eradikasyonu başarmış ülkeler arasında İsviçre, Danimarka ve Finladdiya gibi ülkeler bulunmaktadır (81).

BHV1 enfeksiyonunun önlenmesi ve varsa kontrol altına alınması için aşılama uygulamaları yaygın olarak kullanılmaktadır. İnaktif aşılar koruyuculuk sürelerinin az olması nedeniyle fazla tercih edilmezler fakat gençlerde ve gebe hayvanlarda enfeksiyon oluşturma olasılıklarının almaması nedeniyle önerilmektedir. Canlı aşılar daha yüksek antikor oluşumunu sağladıkları için tercih edilmektedir. Aşı uygulanan hayvanlarda, özellikle damızlık niteliği olanlarda enfeksiyon olup olmadığı düzenli serolojik tarama yoluyla belirlenmekte ve bu hayvanların negatif olması istenmektedir. Canlı aşı yapılmış hayvanlarda aşı ve doğal enfeksiyon ayrımının

yapılamaması büyük probleme neden olmaktadır. Daha sonra geliştirilen marker aşılar bu problemi gidermiştir (47, 82).

1.2. AMAÇ

Bu çalışmada organize sütçü sığır yetiştiriciliği yapılan işletmelerde BHV1 enfeksiyonunun klinik ve subklinik mastitis olgularındaki rolünü araştırmak amaçlanmıştır. Bunun için BHV1 için aşı yapılmamış laktasyondaki ineklerde, subklinik ve klinik mastitisli inekleri sağlıklı olanlardan ayırmak için sütte Somatik Hücre Sayısı incelemesi yapılmış elde edilen kan serum örneklerinde antikor taraması ile BHV1 varlığı ve oranı incelenmiştir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. GEREÇ

2.1.1. Örneklenen Hayvanlar

Bu araştırmada, hayvanların belli zootekni kriterleri uyarınca sahadan toplanarak bir araya getirildiği ve enfeksiyon kontrolüne yönelik her hangi bir koruma kontrol mücadelesinin yapılmadığı organize işlemelerde yetiştirilen sütçü sığırlar rastgele örneklendi. Sürülerin bir kısmında düzenli kayıt sistemi olduğu bildirilmiş ancak çalışılan sürülerin tümünde ortak sürü problemi olarak mastitis vakalarının yüksek oranda görüldüğu bildirildi. Toplam olarak 7 sürüden 269 hayvan örneklenmiş olup hayvanların tümü laktasyonun değişik dönemlerindeki ineklerdir. Sürü 1, 2, 3, 5 ve 6'da örnekleme sırasında klinik mastitis geçiren 15 adet hayvan bulunmakla birlikte hayvanların çoğunluğu klinik açıdan normal görünümlü idiler. Klinik mastitis bulguları belirlenen hayvanların 9 tanesi sürü 2'de, 1'er tanesi sürü 1, 5 ve 6'da ve 3 tanesi ise sürü 3'te tespit edildi. Daha önce geçirilmiş mastitis nedeniyle 40 hayvanın bir meme lobunun, iki hayvanın ise 2 meme lobu kör olduğundan toplam 44 meme lobundan süt örneği alınamadı, sonuç olarak örneklenen 269 hayvandan 1032 adet serum örneği elde edildi.

2.1.2. Hücre Kültürü

Madin Derby Bovine Kidney (MDBK) hücre kültürü BHV1 virusunun üretilmesi, Virus Nötralizasyon ve Serum Nötralizasyon₅₀ testlerinde kullanıldı. Medium olarak Eagle'ın Modified Minimal Essential Medium (DMEM) ile %5–10 oranlarında Fötal Dana Serumu (FDS) kullanıldı.

2.1.3. Viruslar

Serolojik testlerde BHV1 virusunun referens suşu olan “Colorado suşu” kullanıldı.

2.1.4. Somatik Hücre Sayısının (SHS) Belirlenmesi

Sütün mililitresindeki SHS'nın belirlenmesi için ticari olarak sağlanan portatif DeLaval Cell Counter (DCC; DeLaval International AB, Tumba, İsveç) cihazı ve cihaza uygun olarak üretilmiş tek kullanımlık kasetler kullanıldı.

2.2. YÖNTEM

2.2.1. Virusun üretilmesi ve titresinin belirlenmesi

BHV1 virusunun referans suşu olan “Colorado”nun üretilmesinde MDBK hücre kültürü kullanıldı, monolayer olarak üretilmiş olan kültüre virus adsorbsiyonsuz yöntemle inokule edilerek %5CO₂'li etüve kaldırıldı. Yaklaşık 24 saat sonra yoğun olarak virus üremesine bağlı dejenerasyonun görülmesinin ardından flasklar -80°C'de donduruldu. Daha sonra oda ısısında eritilen içerik 4.000rpm'de 20dk süreyle santrifüj edildi, santrifüj tüpündeki süpernatantın üst kısmından belli bir miktar alınan virus süspansiyonu ayrı bir erlende iyice pipete edilip steril cryo tüplerde 1'er cc'lik porsiyonlara ayrıldı ve -80°C'ye kaldırıldı.

Porsiyonlanarak dondurulmuş olan virus tüplerinden bir tanesi alınarak steril tüplerde medium içerisinde Logaritma 10 tabanına göre 10⁻⁶'ya kadar bir dizi sulandırmaları hazırlandı. Daha sonra pleytin aynı sırada bulunan dört gözüne her sulandırma basamağından 100'er µl konuldu. Hazırlanan sulandırmalara ek olarak kontroller de 4'er göz olarak hazırlandı. Virus kontrol için 50µl serumsuz medium ile 50µl saf virus, hücre kontrol için ise ayrılan gözlere Fötal Dana Serum katkılı medium 100µl olarak konuldu. Daha sonra beklenilmeden tüm gözlere hücre süspansiyonu (300.000 hücre/ml) 50µl hacimde ilave edilerek 37°C'lik CO₂'li etüve kaldırıldı. Pleytler 24 ve 48. saatlerde kontrol edildi ve sitopatolojik efekt gelişimine göre değerlendirildikten sonra titre hesaplamaları yapıldı.

2.2.2. Lökosit örneklerinin işlenmesi

Vakumlu steril EDTA'lı tüplere alınan kan örnekleri soğuk zincir altında laboratuara ulaştırıldıktan sonra 1000rpm'de 10dk santrifüj edildi. Lökosit tabakası pastör pipetiyle alınarak 1ml PBS içerisine konuldu ve lökosit yıkama işlemi için tekrar santrifüj edildi. Toplam 3 yıkama yapılmasının ardından, lökosit örnekleri 1ml vasat içine konularak, hücre kültürüne inokulasyonları yapılmıncaya kadar -80°C 'de saklandılar.

2.2.3. Serum örneklerinin işlenmesi

Silikonlu kan tüplerine alınmış olan kan örnekleri 3000 rpm devirde 10dk süreyle soğutmalı santrifüjde tutuldu, ayrışan serumlar steril stok tüplerine aktarıldıktan sonra inaktivasyon için benmaride 56°C 'de 30dk süreyle tutuldu ve serumlar testlerde kullanılmıncaya kadar -20°C 'de saklandılar.

2.2.4. Süt örneklerinin işlenmesi

2.2.4.1. Serolojik kontrol için süt örneklerinin hazırlanması

Örneklenen hayvanların her bir meme lobundan 10ml'lik iki steril cam tüpe süt örnekleri alındı. Alınan Örneklerden bir adedi serolojik muayene için soğuk zincir altında laboratuara kısa süre içinde ulaştırıldı. Süt örnekleri serolojik muayene için laboratuarda 3000rpm'de 20dk santrifüj edilerek süt serumları ayrıştırıldı ve ayrı bir tüpe aktarıldı. Süt serumları daha sonra serum örneklerinde olduğu gibi inaktive edildi ve %1 oranında antibiyotik ilave edildikten sonra sonra test edilinceye kadar -20°C 'de saklandılar.

2.2.4.2. Virolojik kontrol için süt örneklerinin hazırlanması

Virolojik muayene için ise yağ tabasının altında kalan süt örnekleri pastör pipeti yardımıyla alındı ve 0.22 milimikron por çapı olan tek kullanımlık filtrelerden geçirildi. Süzülen örneklere penisilin-streptomisin (1.000.000 IU Penisilin G ve 1g Streptomisin 100ml bidistile steril su içinde çözdürüldü) kombinasyonundan oluşan

antibiyotik solusyonu %10 oranında ilave edildi, bu örnekler hücre kültürlerine inokule edilinceye kadar -20°C 'de tutuldular.

2.2.5. Virolojik Araştırmalar

2.2.5.1. Kan örneklerinde Virus İzolasyon Çalışmaları

Daha önce işlenerek dondurulmuş olan lökosit örnekleri çözdürüldükten sonra, 1 ml MDBK hücre süspansiyonu (200.000hücre/ml) konulmuş ve monolayer kaplamış olan 12ml'lik doku kültür tüplerine 100 μl oranında adsorbsiyonlu yöntemle inokule edildi Yaklaşık olarak 1–3 gün süre ile her gün doku kültür mikroskobunda incelendi. Virus üremesi gözlenmemesinin üzerine dondurulup çözülen tüpler, 3000rpm'de 15-20dk süre ile santrifüj edildi. Süpernatanttan 100 μl alınıp tekrar doku kültür tüplerine inokule edildi ve her gün doku kültür mikroskobunda incelendi. Toplam 2 pasaj yapıldı.

2.2.5.2. Süt örneklerinde virus izolasyon çalışmaları

Çözdürülen süt serum örnekleri monolayer hücre kaplamış ve vasatı dökülmüş olan doku kültür tüplerine 200 μl hacimde inokule edildi. Etüvde 90dk inkube edildikten sonra inokulumlar dökülerek Phosphate Buffer Solution (PBS) ile 3 kez yıkandı ve virus üretme vasatı konularak %5 CO_2 'li 37°C 'lik etüve kaldırıldı. Her gün doku kültür mikroskobunda incelendi. Birinci pasajların süpernatantları bir kez daha hücre kültürüne inokule edildi.

2.2.6. Virus Nötralizasyon ve Nötralizasyon 50 (SN₅₀) testi

Elde edilen kan ve süt serum örneklerinde BHV1 spesifik antikor varlığının belirlenmesi için Virus Nötralizasyon Test (VNT) uygulandı (74). Bu amaçla saf serum örnekleri (50 μl) hücre kültür pleytinin iki gözüne konuldu. Titresi daha önce belirlenmiş olan referens virus 100DKID₅₀/0,05ml oranında sulandırılarak eşit miktarda serum örneklerinin üzerine konuldu. Virus kontrol için 50 μl virus ve eşit miktarda serumsuz vasat, hücre kontrol için ise 100 μl %5 serumlu medium konuldu. Nötralizasyon işleminin gerçekleşmesi için pleytler 2 saat süreyle 37°C ve %5 CO_2 'li etüvde 2 saat tutuldu. Süre sonunda tüm gözlemlere mililitrede 300.000 hücre olacak

şekilde hazırlanmış olan hücre süspansiyonu ilave edildi ve etüvde inkübasyona bırakıldı. Yaklaşık 24 sonra pleytler doku kültürü mikroskopunda sitopatojenitenin varlığına göre değerlendirildi. Seropozitif olduğu saptanan kan serumlarındaki titrenin belirlenmesi amacıyla Serum Nötralizasyon 50 (SN₅₀) testi uygulandı.

SN₅₀ testinde, daha önce pozitif oldukları belirlenen serumlar 2'şer gözde Logaritma 2 tabanına göre vasat içinde 1/1, 1/2,..... 1/512 aralığında bir dizi sulandırması hazırlandı. Eşit miktarda (50µl) titresi oranında sulandırılmış virus ilave edildikten sonra 2 saat süreyle nötralizasyona bırakıldı. Süre sonunda tüm gözlerle hücre süspansiyonu konularak etüve kaldırıldı. Yaklaşık 24 saatlik inkübasyondan sonra test doku kültürü mikroskopunda incelenerek titre değerleri belirlendi (83).

2.2.7. Somatik Hücre Sayısının (SHS) Belirlenmesi

Sütün mililitresindeki SHS'nın belirlenmesi için DeLaval SCC cihazına uygun olarak üretilmiş tek kullanımlık kasetlerle çalışıldı. İçinde florasan boya olarak propidyum iodid (PI) bulunan kasetlere taze elde edilmiş süt örnekleri piston yardımıyla konuldu. Kasetler cihazın uygun bölmesine yerleştirildi, süt örneklerinin konulduğu kasetlerin üzerinde kısa süreyle yanan ışık kaynağı (LED) yardımıyla hücre nükleuslarından alınan florasan sinyaller kayıt edilerek matematiksel değerler mikrolitre birimiyle okundu, okunan değerler bin ile çarpılarak mililitre cinsinden veriler elde edildi.

3. BULGULAR

3.1. Titrasyon Test Sonucu

Tapılan titrasyon mikrotitrasyon test sonucuna göre, BHV1'in 100DKID₅₀/0,05ml değeri 10^{-3.5} olarak bulundu.

3.2. Kan ve süt rneklelerinden virus izolasyon sonuçları

Toplam 269 hayvana ait lökosit ve 1032 süt rneği, 12ml'lik doku kültür tüplerinde üretilmiş olan MDBK hücre kültürlerine inokule edildi. Virus spesifik sitopatojenik efekt gözlenmeyen örneklere 2 pasaj daha ekim uygulandı. Sonuç olarak 1301 numunenin hiç birinde virus üremesi saptanamadı.

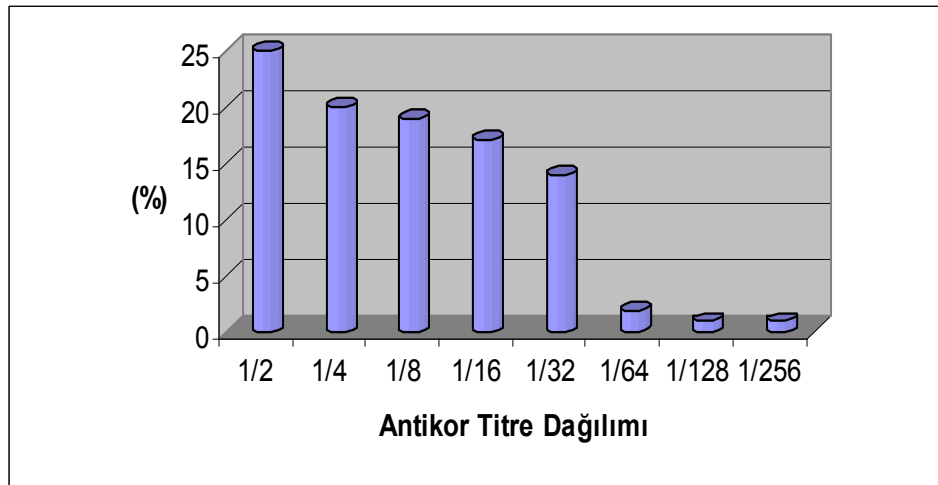
3.3. Kan serumlarında Virus Nötralizasyon ve Nötralizasyon 50 (SN₅₀) testi

Örnekleme yapılan 7 işletmeden sadece birinde 9 hayvanın tamamı negatif olarak belirlenirken, diğer sürülerde %3.4 ile %75 arasında değişen oranlarda BHV1 spesifik antikor varlığı tespit edildi. En düşük oran 1 numaralı sürüde belirlendi ve 29 hayvanın bir adedinin pozitif olduğu saptandı. Diğer en düşük değer 4 numaralı sürüde %25 (10/40) olarak tespit edildi. Sürü 5'te %28.5 (8/28), sürü 3'te %43.9 (18/41), sürü 2'de %50 (59/118) ve sürü 6'da %75 (3/4) seropozitiflik oranları tespit edildi (Tablo 1).

Tablo 1: Hayvan sayısı, SHS ortalamaları ve Kan serum örneklerinde BHV1 antikor verileri

Çiftlikler	Örneklenen	Hayvanların	SHS	BHV1
	Hayvan Sayısı	ortalaması (hücre/ml)	Ab(+)	(%)
1	29	172000	1	3.4
2	118	461600	59	50
3	41	451690	18	43.9
4	40	298140	10	25
5	28	389710	8	28.5
6	4	392870	3	75
7	9	168300	0	0
Toplam	269		99	36.8

VNT ile pozitif oldukları belirlenen toplam 99 (%36.8) hayvana ait örneklerde, yapılan SN₅₀ test sonucuna göre 1/2 ile 1/256 arasında değişen titrelere antikor varlığı belirlendi. Grafik 1’de pozitiflik yüzdelere göre titre dağılımı gösterilmiştir.

**Grafik 1: BHV1 seropozitif hayvanlardaki antikor titre dağılımı**

3.4. Süt serumlarında Virus Nötralizasyon ve Nötralizasyon 50 (SN₅₀) testi

Toplam 269 hayvandan elde edilen 1032 süt örneğinde yapılan VNT test sonucuna göre 1001 örneğin 265'inde BHV1 için pozitiflik tespit edildi. Örneklerden 31 adedi testin tekrarlanmasına rağmen sitotoksik etki nedeniyle değerlendirilemedi. Bir numaralı işletmede kan serumunda 1:2 titrede antikor taşıdığı belirlenen hayvanın süt serumunun negatif olduğu tespit edildi. İki numaralı sürüde kan örneklerinde %50 oranında antikor varlığı belirlenirken, süt serum örneklerinde pozitifliğin 1:2 ile 1:32 titre aralığında %36.8 olduğu saptandı. Üç numaralı sürüde ise %43.9 olan kan verilerinin sütte %37'ye düştüğü ve titrenin 1:2 ile 1:8 aralığında olduğu belirlendi. Dört numaralı işletmede süt örneklerinin %16.7'si ile 5 nolu işletmede %21.2'sinde seropozitiflik belirlendi. Genel itibariyle süt serumlarında belirlenen antikor titrelerinin, kan serumlarına göre daha düşük olduğu gözlemlendi.

Tablo 2:Pozitif süt örneklerinin işletmelere göre dağılımı

<i>İşletme No</i>	<i>Hayvan Sayısı</i>	<i>Süt Serum Sayısı</i>	<i>IBR antikor pozitif Serum sayısı</i>	<i>SN50 Dağılımı</i>
1	29	111	-	-
2	118	442	163 (%36.8)	1:2-1:32
3	41	151	56 (%37)	1:2-1:8
4	40	149	25 (%16.7)	1:4-1:16
5	28	99	21 (%21.2)	1:2-1:8
6	4	16	-	-
7	9	33	-	-
Toplam	269	1001	265 (%26.4)	

3.5. Somatik Hücre Sayısı (SHS) verileri

Bu çalışmada 269 hayvanın her bir meme lobundan süt örnekleri alındı ancak 40 hayvanın bir meme lobu ve iki hayvanın 2 meme lobu daha önce geçirilmiş olan tedavisi mümkün olmamış mastitis nedeniyle kör olduğu için süt örneği alınamadı ve toplam olarak 1032 süt örneği elde edildi. Somatik hücre sayılarının belirlenmesi için çiğ süt örnekleri taze olarak test edildi. Örneklerde mililitrede 7.500 ile 4.530.000 aralığında değişen SHS rakamları belirlendi. Her hayvandan elde edilen meme loblarına ait veriler toplanıp süt örneği alınan meme sayısına bölünerek hayvanların SHS sayıları tespit edildi. Buna göre BHV1 pozitif 99 ineğin SHS ortalamasının 434.617 ve negatif 170 ineğin ortalamasının 351.340 olduğu, enfeksiyonu taşıyan hayvanlardaki ortalamanın biraz daha yüksek olduğu tespit edildi. Ayrıca tüm hayvanların SHS sayısı incelendiğinde 100.000/ml'in altında değerlere sahip 68 hayvanın 15'inin (%22) BHV1 pozitif olduğu belirlendi. SHS 100.000/ml'in üstünde olan ancak klinik mastitis bulguları göstermeyen 186 hayvanın 76'sının (%40) ve klinik mastitisli 15 hayvanın 8'inin (%53.3) IBR pozitif olduğu belirlendi (Tablo 2), buna göre normal sınırların üstünde SHS'na sahip olanlarda enfeksiyon pozitiflerin oranının yaklaşık iki kat daha fazla olduğu görüldü.

Tablo 3:Örneklenen hayvanların IBR pozitifliğe göre sınıflandırılması(100.000h/ml)

Sürü No	Toplam Örnek Sayısı	Sağlıklı			Subklinik Mastitis			Klinik Mastitis		
		Hay. Say	IBR Ab(+)	(%)	Hay. Say	IBR Ab(+)	(%)	Hay. Say	IBR Ab(+)	(%)
1	29	12	-	-	16	1	6.25	1	-	
2	118	23	10	43.4	86	44	51.1	9	5	55.5
3	41	6	1	16.6	32	15	46.8	3	2	66.6
4	40	12	1	8.3	28	9	32.1	-	-	
5	28	10	2	20	17	6	35.2	1	-	
6	4	1	1	100	2	1	50	1	1	100
7	9	4	-	-	5	-	-	-	-	
Toplam	269	68	15	22	186	76	40.9	15	8	53.3

Sütlerin "Sağlıklı" kabul edildiği 100.000h/ml sınırının altında, subklinik mastitis ve klinik mastitisli sığırların bireysel olarak SHS sayıları ile IBR pozitiflik

arasındaki bağıntının belirlenmesi için yapılan bireysel hesaplamalar Tablo 4'te verilmiştir. Sağlıklı 68 hayvanın IBR seropozitif olan 15'inin SHS 66.123h/ml olarak bulunurken, negatif hayvanlarda bu değer 52.015h/ml olduğu belirlendi. Hayvanlarının çoğunluğunun bulunduğu subklinik mastitis grubunda ise SHS ortalamalarının çok yakın olduğu, IBR pozitiflerde 409.026h/ml, negatiflerde 414.269h/ml olduğu saptandı. Klinik mastitis belirlenmiş 15 ineğin IBR pozitif olan 8'inde ortalama 1.426.375h/ml değeri bulundu ancak IBR negatiflerde ise SHS biraz daha yüksek olarak (1.514.571h/ml) tespit edilmiştir (Tablo 4).

Tablo 4: Örneklerin IBR pozitif ve negatiflerin SHS ortalamaları

<i>SHS SHS</i> (<i>Hücre/ml</i>)	<i>Sağlıklı</i>		<i>Subklinik Mastitis</i>		<i>Klinik Mastitis</i>	
	IBR (+)	IBR (-)	IBR (+)	IBR (-)	IBR (+)	IBR (-)
	66.123	52.015	409.026	414.269	1.426.375	1.514.571

Klinik Mastitis tespit edilen meme loblarında 2.377.000/ml ile 4.53.000/ml arasında değişen oranlarda SHS deterleri belirlendi. Bu hayvanların 8'inde diğer lobların SHS değeri normal sınırlarda iken, 7 hayvanın diğer meme loblarında normalin oldukça üstünde değerler belirlendi. Ayrıca klinik mastitis belirlenen 4 ineğin 1'er meme lobunun daha önce klasik tedaviye cevap vermeyen mastitis nedeniyle kör olduğu belirlendi.

Tablo 5: BHV1 Antikor Pozitif Hayvanlarda Titreye göre SHS Dağılımı

<i>Sıra No</i>	<i>BHV1 Antikor Titreleri</i>	<i>BHV1 Antikor Pozitif İnek Sayısı</i>	<i>SHS Ortalaması</i>
1	1/2	25	466.620
2	1/4	20	555.130
3	1/8	19	365.860
4	1/16	17	375.250
5	1/32	15	391.520
6	1/64	2	315.120
7	1/128	1	407.000
8	1/256	1	480.580
Tolam		99	419.635

Tablo 5’te BHV1 pozitif hayvanlardaki titrelere göre birey bazında 4 meme lobunun ortalaması, sürü ortalamasına dönüştürülerek verilmiştir. En çok hayvan sayısı 25 ile 1/2 titresinde antikor taşıyan grupta belirlenmiştir. İkinci olarak ise 20 hayvanın 1/4 titresinde taşıdığı saptanmış olup, bu gruptaki SHS ortalamaları çalışmada belirlenen en yüksek değer olarak 555.130 olarak hesaplanmıştır, 1/8 ve artan titre gruplarında ise titrenin daha az olmakla birlikte gittikçe arttığı görülmüştür.

3.6. İstatistiksel Analiz

Sağlıklı, subklinik ve klinik mastitisli hayvanlardaki IBR enfeksiyon oranları Ki-Kare analizi ile incelendiğinde, sağlıklı ve subklinik mastitisli hayvanlar ($p < 0.01$) ile sağlıklı ve klinik mastitisli hayvanlar arasında ($p < 0.05$) farklılık belirlenirken, subklinik ve klinik mastitisli grup arasında anlamlı bir farklılık belirlenmedi ($p > 0.05$).

4. TARTIŞMA

Mastitis tüm dünyada süt ineği yetiştiriciliğinin en büyük problemlerinden biridir (84, 85). Çok yaygın görülmesi ve büyük ekonomik kayba yol açması nedeniyle süt üreticilerine dünyada yıllık olarak yaklaşık 35 milyar dolar gibi zarara neden olmaktadır. Klinik mastitis yanında Somatik Hücre Sayısındaki (SHS) artış ile bağlantılı olarak subklinik mastitisin de ayrıca 960 milyon dolarlık bir kayba yol açtığı tahmin edilmektedir (86).

Mastitis, meme bezinin bir veya daha fazla lobunun parenkim dokusunda toksik, travmatik veya enfeksiyona bağlı nedenlerle gelişen yangı olarak tanımlanmaktadır. Mastitisin karakteristik özelliği glandular meme bezinde patolojik bozukluklar ile sütte fiziksel, kimyasal ve sıklıkla da bakteriyolojik değişiklikler ile karakterizedir. Başlıca klinik semptomlar depresyon, meme bezinde ödem, duyarlılık artışı ve ateştir. Yangıya bağlı olarak sütte lökosit artışı söz konusu olduğu için teşhiste lökosit sayısının belirlenmesi rutin teşhiste kullanılmaktadır (87).

Mastitise yol açan birçok enfeksiyöz etken vardır, bakteriler yanında mikoplazma, mantar, maya ve klamidyalar da etiyolojik etkenler arasındadır (87, 88). Viral ajanların mastitise neden olabileceği ilk kez Afshar ve Bannister tarafından 1970 tarihli araştırmalarında bildirilmiştir (79). Mastitis olgularında etiyolojinin tespitine yönelik yapılan çok sayıda araştırmada vakaların %20 ile %35'inde etiyolojik bir ajan tespit edilemediği bildirilmiştir (89, 90). Araştırmacılar bu durumda meme patojenlerinin düşük konsantrasyonda bulunabileceğini veya etkenin bakteri dışındaki mantar, maya veya klamidyaya gibi izolasyonu güç olan ajanların söz konusu olabileceğini öne sürmüşlerdir. Mastitise neden olabilecek 137 değişik mikrobiyal ajan olduğunu belirleyen Watts (88), çalışmasında viral etiyolojiye yer vermemiştir. Viral enfeksiyonların mastitis olgularındaki rolü birçok nedenle araştırılmamış, çalışmalar ağırlıklı olarak bakteri ve diğer etkenler üzerinde yoğunlaşmıştır. Örneğin BHV1'in mastitise yol açtığı bilinmesine rağmen, viral patogenez ile ilgili araştırmalar daha çok danalarda yapılmış, ekonomik olmaması nedeniyle laktasyondaki inekler ihmal edilmiştir. Mastitis vakalarında viral teşhis için örnekleme, örneklerin korunması ve işlenmesi, depolanması teknik bilgi ve çaba gerektirmektedir, ayrıca izolasyon çalışması güç ve pahalı işlemler olup duyarlı

hücre kültürleri kullanımını gerektirmektedir. Bu nedenlerle mastitis ile ilgili viral çalışma sayısı fazla değildir. Çalışmaların ağırlıklı olarak diğer etkenler için yürütülmesi, mastitise yol viral etkenlerin spesifik ayırıcı klinik teşhisinin güç olması ve genellikle miks seyretmesi gibi nedenlerle virusların etiyolojik ajan olarak rolleri yeterince incelenmemesine yol açmıştır.

Bir çok viral enfeksiyon direkt veya indirekt olarak mastitise yol açmaktadır (79). Bunların başında Bovine Herpesvirus 1 (BHV1) (16), Bovine Herpesvirus 4 (91), Şap (92, 93) ve Parainfluenzavirus 3 (94) gelmektedir.

BHV1 gerek tek başına gerekse diğer viral, bakteriyel ve diğer patojenlerle birlikte mastitis olgularında izole edilmiştir. BHV1 bir mastitis vakasında izole edilmiş, başka patojenin belirlenmediği vakada süt örneğinin canlı IBR aşılmasından 3 gün sonra alındığı bildirilmiştir (16). Siegler ve arkadaşları (17) IBRV ve BVDV enfeksiyonunun birlikte bulunduğu sürülerde mastitis insidensinin normalden daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. BHV1 ve BVDV açısından kontrol altına alınan sürülerde, stafilokok ve streptokok nedenli mastitislerin varlığına rağmen mastitis oranlarının düşük olduğu gözlenmiştir. Birçok araştırmacı (18, 19, 20) BHV1'in meme içi inokule edildiği durumlarda virusun meme bezinde çoğaldığını ve klinik mastitisin geliştiğini bildirmişlerdir. Semptom olarak virusun inokule edildiği meme loblarında şişkinlik, duyarlılık, şertleşme belirlenmiş, sütün kompozisyonun bozulduğu ve süt veriminin önemli ölçüde düştüğü bildirilmiştir. Greig ve Bannister (18), enfeksiyonun başlatılabilmesi için virusun 10^3 DKID₅₀/ml titrede verilmesi gerektiğini, inokulasyondan sonraki 2. ile 14. güne kadar virusun inokule edildiği loblarda 10^{6-7} DKID₅₀/ml titrede virus izole edilebildiğini ve IBR ile IPV suşlarının benzer semptomlara yol açtığını bildirmişler, titrenin 14–15. günlerde 10^{-2} veya 0'a düştüğü bildirilmiştir. Aynı çalışmada virusun süttten elimine olmasından hemen sonra, spesifik antikorların kanda 15., sütte 16. günlerde tespit edilebildiği belirtilmiştir. BHV1 nedeniyle gelişen enfeksiyon sonucunda alveolar epitel hücrelerde nekroz, polimorfik ve mononükleer hücre infiltrasyonları ile meme bezi epitel hücrelerinde intranükleer inklüzyon cisimcikleri tespit edilebilir patojilerdendir.

Klinik mastitis semptom gelişimi nedeniyle kolayca tespit edilebilirken subklinik mastitislerin tespiti oldukça güçtür (95). Hem klinik hem de subklinik

mastitis durumlarında sütteki SHS sayısında artış görülmektedir. Sütteki somatik hücre sayısını etkileyen birçok faktör bulunmaktadır, bunlar; günlük değişim ve sağıım sırasındaki değişim, laktasyon dönemi, laktasyon sayısı, sağıım makinaları, sağıım aralığı, buzağılama sezonu ve genetik etki. Mekanik travmalar da ayrıca somatik hücre sayısını arttırabilmektedir (96–99). Ancak akut veya kronik yangı sonucu SHS sayısında bu faktörlerin varlığı sonucu belirlenen değerlerden çok daha yüksek oranda artış meydana gelmektedir.

“Sağlıklı Süt”ün taşınması gereken SHS sayısı hakkında farklı rakamlar bildirilmiştir. Her ne kadar sınır yangı göstergesi olarak sınır değerin 250.000/ml olabileceği bildirilse de (100), daha sonra yapılan çalışmalarda (101, 102) sınır değerin 200.000/ml olarak kabul edildiği görülmektedir. Ancak son yıllarda bu rakam daha da düşürülmüş, her hangi bir nedenle yangı durumunda SHS'nın mililitrede 100.000 SHS olması gerektiği belirtilmiştir (102–104). Bu çalışmada da sınır SHS değeri 100.000/ml olarak kabul edilmiş, bu değer ve altındaki loblar sağlıklı kabul edilmiştir. Avrupa birliği ülkelerinde 500.000/ml ve üstü SHS taşıyan sütün insan gıdası olarak kullanılması yasaklanmıştır.

Bu çalışmada, BHV1 enfeksiyonunun mastitis olgularındaki rolünün araştırılması hedeflendi ve bu amaçla ortalamaların üstünde mastitis olguları görülen 7 farklı sütçü sığıır yetiştiriciliği yapılan işletmede 15'i klinik mastitisli olmak üzere toplam 269 hayvandan EDTA'lı ve Silikonlu tüplere kan ve süt örnekleri alındı. Kan ve süt serum örneklerinde VNT kullanılarak BHV1 spesifik antikor varlığı ile titre değerleri belirlendi. Kan serumları incelendiğinde, 7 nolu sürüde hiç pozitiflik tespit edilemezken, bir nolu sürüde 1 adet hayvanın pozitif olduğu belirlendi, aynı sürüdeki klinik mastitis görülen bir adet hayvanın ise bir meme lobunda SHS 3016 olarak bulundu be hayvanın başka bir etken ile enfekte olmuş olabileceği sonucuna varıldı. Elde edilen kan serumları incelendiğinde 7 nolu sürüde hiç pozitiflik tespit edilemezken, 1 nolu sürüde ise sadece 1 (%3.4) hayvanın pozitif olduğu tespit edildi. Diğer sürülerde ise endeksiyon oranları sırasıyla 4 nolu sürüde %25 (10/40), 5 nolu sürüde %28.5 (8/28), 3 nolu sürüde %43.9 (18/41), 2 nolu sürüde %50 (59/118) ve 6 nolu sürüde ise %75 (3/4) olarak belirlendi (Tablo 1).

Örneklenen hayvanların her bir meme lobundan süt örnekleri alındı ancak daha önce geçirilmiş tedavi edilememiş mastitis nedeniyle 40 ineğin 1, 2 ineğin ise 2'şer

meme lobunun kör olması 44 lobdan süt örneğinin alınamamasına neden oldu. Elde edilen toplam 1032 süt örneğinde yapılan serolojik inceleme sonucunda 1001 örnek için değerlendirme yapılabildi. Değerlendirilebilen süt serumlarında bir nolu işletmede kan serumunda 1:2 titre belirlenen bir hayvanın süt örneğinin negatif olduğu belirlendi ancak diğer işletmelerde biraz daha düşük oranlarda olmakla birlikte kan örneklerindeki pozitiflik ile süt serumlarındaki pozitifliğin paralellik gösterdiği, süt serumunda pozitiflik belirlenen tüm hayvanların kan örneklerinin de pozitif olduğu tespit edildi. İki numaralı sürüde kan örneklerinde %50 oranında antikor varlığı belirlenirken, süt serum örneklerinde pozitifliğin 1:2 ile 1:32 titre aralığında %36.8 olduğu saptandı. Üç numaralı sürüde ise %43.9 olan kan verilerinin sütte %37'ye düştüğü ve titrenin 1:2 ile 1:8 aralığında olduğu belirlendi. Dört numaralı işletmede ise kan örneklerinde %25, süt örneklerinde %16.7, 5 nolu işletmede ise kanda %28.8 sütte %21.2 seropozitiflik belirlendi. Genel itibariyle süt serumlarında belirlenen antikor titrelerinin, kan serumlarına göre daha düşük olduğu gözlemlendi. Sütteki antikor varlığı laktasyondaki ineklerin kan dolaşımından süte antikor geçişi sonucu olmaktadır. Doğal enfeksiyonda viremi ile meme dokusuna virusun ulaşması sonucu, enfeksiyonun erken dönemlerinde memede IgA'ların da oluşabildiği (105), ancak bu antikorların yarıömürlerinin uzun olmadığı bildirilmiştir (106). Kan ve süt serum örneklerinin daha önce Türkiye'de araştırıldığı tek çalışmada Bilge (15), benzer veriler elde etmiş, konu ile ilgili dünyada yapılan araştırmalarda sütteki titrenin genel olarak daha düşük olduğu bildirilmiştir (107). Her ne kadar, materyal elde etmenin kolaylığı nedeniyle, süt serumu ile çalışmak daha kolay ise de, elde edilecek antikor titresinin kandan belirlenecek değere göre daha düşük olabileceği veya örneğin negatif bulunabileceği riski göz önünde bulundurulmalıdır. Akut enfeksiyon sonrası sütteki titrenin kandaki titreye yakın olduğu ancak kronik olgularda sütteki titrenin önemli ölçüde düştüğü belirlenmiştir. Bu faktörler göz önüne alınarak, sadece süt örneği ile çalışılmaması ve mutlaka kan örneklerinin de incelenmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

Sütçü çiftliklerde, süt tankından alınan örneklerde SHS belirlenmesi, özellikle gelişmiş ülkelerde rutin uygulanan bir işlemdir (84, 85). SHS'nın yüksek olduğu

sürülerin sütleri, durum düzeline kadar kullanılmamaktadır. Sürüde klinik mastitis olmadığı veya mastitisli hayvanların sütlerinin ayrıldığı sürülerde bile sık karşılaşılan böyle durumlarda, ineklerin bireysel olarak incelenmesi ve subklinik mastitis geçirenlerin belirlenmesi büyük önem taşımaktadır. Sığırlarda meme lobları bağımsız olduğu için, yangı bir veya daha fazla meme lobunda olabilmektedir. Bu çalışmada laktasyondaki 269 inekten elde edilen 1032 süt örneğinin SHS verileri belirlendi ve klinik mastitis tespit edilen 15 hayvanın birer meme loblarında 2.377.000h/ml ile 4.53.000h/ml arasında değişen oranlarda SHS deterleri belirlendi. Diğer hayvanlar ise 100.000/ml SHS'na göre sınıflandırıldığında 68 hayvanın (%25.27) sağlıklı, 186 hayvanın ise (%69.14) subklinik mastitis tanısı için en önemli ölçütlerden biri olan yüksek SHS'na sahip olduğu belirlendi.

Sürü 1'de 29 hayvanın sağlıklı olan 12'sinin IBR için seronegatif olduğu görüldü, pozitif olan tek hayvanın ise subklinik mastitis olarak tanımlanmış 16 ineğin bulunduğu gurupta olduğu saptandı. Enfeksiyonun en yüksek olduğu guruplardan biri olan 2 nolu sürüde bulunan 118 hayvanın sadece 10'unun normal SHS'na sahip olduğu, bu gurubun IBR pozitiflik oranının %43.4 (10/23) olduğu ve subklinik mastitis belirlenen 86'sında IBR enfeksiyon oranının %51.1 (44/86) olduğu belirlendi. Bu çalışmada örneklenen ineklerden 15'inde klinik mastitis tespit edildi, IBR pozitif olan 8 hayvanın 5 adedinin 2 nolu sürüde bulunduğu saptandı. Üç nolu sürü yine enfeksiyon oranının yüksek olduğu sürülerden biri olup, IBR seropozitiflik oranının sağlıklı ve subklinik mastitisli olan ineklerde sırasıyla %16.6 (1/6) ve %46.8 (15/32) olduğu belirlendi. Aynı sürüde klinik mastitis semptomlarına sahip 3 ineğin 2'sinin (%66.6) IBR pozitif olduğu saptandı. Dört nolu sürüde ise enfeksiyon oranı %25 olarak bulundu. Bu sürüde hiç klinik mastitisli hayvan bulunmazken, normal sınırlarda SHS'na sahip olan 12 hayvanın 1'inin (%8.3) ve subklinik mastitis belirlenen 28 hayvanın 9'unun (%32.1) IBR pozitif olduğu görüldü. Toplam 28 hayvanın bulunduğu 5 nolu sürüde sağlıklı ve subklinik mastitisli hayvanlardaki enfeksiyon oranları sırasıyla %20 (2/10) ve %35.2 (6/17) olarak bulundu ve bu sürüde bulunan tek klinik mastitisli hayvanın IBR negatif olduğu belirlendi. En az örnek 6 nolu işletmeden alındı, 4 örneğin biri sağlıklı, 2'si subklinik ve 1'i de klinik mastitisli olarak sınıflandırıldı, enfeksiyon oranlarının sırasıyla %100, 50 ve 100 olduğu tespit edildi. IBR için seropozitifliğin belirlenmediği tek sürüde ise elde

edilen 9 örneğin 4'ü sağlıklı ve %5'i de subklinik mastitisli olarak sınıflandırılmıştır.

Toplamda, sağlık hayvanlardaki IBR enfeksiyon oranı %22 (15/68) iken subklinik mastitisli hayvanlarda oranın yaklaşık 2 kat daha fazla olarak %40 (76/186) oranında bulunduğu belirlendi. Klinik mastitisli hayvanlarda ise en yüksek oran olan %53.3 (8/15) değeri tespit edildi (Tablo 3).

IBR pozitif ve negatif ineklerin meme loblarının SHS'lerinin ortalamalarına göre sınıflandırıldığında, en düşük değer IBR negatif olan sağlıklı hayvanlarda 52.015h/ml olarak belirlendi. Normal sınırlarda SHS'na sahip olan IBR pozitif hayvanlardaki ortalama değer hafife daha fazla olduğu görüldü (66.123 h/ml). Subklinik mastitisli hayvanlardaki SHS'nın IBR pozitif (409.026h/ml) ve negatif hayvanlarda (414.269 h/ml) oldukça yakın değerlerde olduğu görüldü. Yine klinik mastitisli hayvanlardan IBR pozitif olan 8 hayvanın SHS ortalamasının 1.426.375 h/ml, negatiflerin ortalamalarının ise bu değere yakın ancak biraz daha fazla olarak mililitrede 1.514.571 hücre olduğu belirlendi (Tablo 4).

Bu çalışmada elde edilen verilere dayanarak IBR enfeksiyonunun en az görüldüğü gurubun normal sınırlarda SHS'na sahip olan sınıfta oluşu, subklinik ve klinik mastitisli hayvanlarda pozitifliğin düzenli olarak artış göstermesi, enfeksiyonun mastitis olgularında etiyolojik ajan olarak rolü olabileceğini göstermektedir. Konu ile ilgili yapılan çalışmalar (18, 19, 20) daha çok akut IBR vakalarında mastitis olgularının görülebildiğini göstermektedir. Bu çalışmada hem kan hem de süt örneklerinden virus izolasyon çalışması yapıldı ancak örneklerin hiç birinde antijen varlığı belirlenmedi. IBR'de kan materyalinden daha çok enfeksiyonun akut döneminde veya viral reaktivasyon döneminde kısa bir dönem içinde virus izole edebilmek mümkün olmakta, süttten izolasyon için ise yine enfeksiyonun akut evresinde örnekleme yapılması gerekmektedir. Antijen varlığının tespit edilememiş olması, enfeksiyonun daha önce alındığını ve akut dönemin daha önce geçirilmiş olduğunu göstermektedir. Dolayısıyla bu çalışmada klinik ve subklinik mastitisli hayvanlarda etiyolojik ajan olarak tek başına IBR'nin gösterilmesi mümkün değildir. Tablo 4'te gösterilen IBR pozitif ve negatif hayvanların SHS'ları incelendiğinde, değerlerin birbirlerine oldukça yakın oluşu, diğer viral ve özellikle bakteriyel ajanların da etiyolojik ajan olarak incelenmesini zorunlu hale getirmektedir (86–91, 95, 97).

BHV1 enfeksiyonunun prevalansının belirlenmesine yönelik yapılmış olan birçok araştırma bulunmaktadır (11, 33, 53, 61). Birçok Avrupa ülkesinde BHV1 için eradikasyon uygulamış veya uygulamaya devam edilmektedir. IBR spesifik antikolar ilk kez 1971 yılında pendik veteriner kontrol ve araştırma enstitüsünde Erhan ve arkadaşları tarafından 1971 yılında (108), virus varlığı ise 1987'de Burgu ve Akça, (109) tarafından tespit edilmiştir. Günümüze kadar konu ile ilgili yapılan çalışmalar enfeksiyonun gittikçe yaygınlaşmaya devam ettiğini göstermektedir. Gürtürk ve ark., 1974'te (35) % 54, Alkan ve ark., 1997'de (14) %59.7, Bilge 1998'de (15) %74 seropozitiflik bildirmişlerdir. Enfeksiyon oranları bölge ve işletme bazında da farklılık göstermektedir, Yeşilbağ ve Güngör (110) Marmara bölgesinde %17.1, Tan ve arkadaşları (111) Aydın ili ve çevresinde %19.5, Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgesinde %52.4 Çabalar ve Can şahna, (112) oranlarını belirlemişlerdir. Bu çalışmalar prevalansın bölgelere göre değişmekle birlikte oldukça yüksek olduğu bildirilmiştir. Enfeksiyonun latent karakteri nedeniyle, sürüde seropozitif hayvan varlığında sürüde insidensin kısa sürede artabileceği, enfeksiyonun morbiditesinin yüksek oluşu nedeniyle seronegatif sığırlarda eş zamanlı akut enfeksiyonlar görülebileceği açıktır. Laktasyondaki hayvanların akut enfeksiyonu veya yeterince inaktive edilememiş canlı aşılarla aşılması veya aşılama döneminde var olabilecek immun supresyon varlığı durumlarında klinik mastitis, en azından subklinik mastitis gelişmesi önemli bir olasılık olarak ortaya çıkmaktadır. Subklinik mastitis sütçü sığırcılık işletmelerinin en önemli problemlerinden biridir. Sütün pazarlanmasında en önemli kriter olarak süt toplama tanklarındaki SHS seviyesine bakılmakta ve normal sınırların üstündeki sütler tüketime sokulmamaktadır. Klinik teşhis güçlüğü ve meydana getirdiği ekonomik kayıplar nedeniyle subklinik mastitisler artık en az klinik mastitisler kadar önem taşımaktadır.

Sonuç olarak bu çalışmada, IBR/IPV enfeksiyonunun varlık ve oranları, sağlıklı klinik ve subklinik mastitisli ineklerde araştırıldı ve sağlıklı kabul edilen normal sınırların altında SHS'na sahip olan hayvanlarla subklinik ve klinik mastitisli hayvanlar arasında IBR/IPV enfeksiyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu ve enfeksiyonun mastitisin etiyolojisinde önemli olabileceği belirlendi. Ancak mastitisin etiyolojisinde önemli olan bir çok viral, bakteriyel, mikoplazmal, klamidyal, maya ve mantar orjinli etkenin de araştırılması ve sıklıkla görülen mik

enfeksiyon varlık ve oranlarının belirlenmesi mücadelenin esasını oluşturması açısından büyük önem taşımaktadır.

SONUÇ

Bu çalışmada sütçü işletmelerde Bovine Herpesvirus type 1 (BHV1) enfeksiyonunun subklinik ve klinik mastitis vakalarındaki rolünü araştırmak amaçlandı. Bunun için, İzmir'de ortalamaların üstünde mastitis vakalarının görüldüğü 7 farklı işletmeden 4 ile 118 arasındaki hayvan örneklendi, toplam 269 inekten kan ve her meme lobundan süt örnekleri elde edildi. Lökosit ve süt örnekleri virus izolasyonu için hücre kültürlerine inokule edildi, fakat örneklerin hiç birinde antijen varlığı belirlenmedi.

Toplam 269 kan ve 1032 Süt serum örneği BHV1 antikor varlığının belirlenmesi için Virus Nötralizasyon test kullanılarak kontrol edildi. Kan serum örneklerinin test sonucuna göre, örnekleme yapılan 7 işletmeden sadece birinde elde edilen 9 hayvana ait numunenin negatif olduğu belirlenirken, diğer sürülerde %3.4 ile %75 arasında değişen oranlarda BHV1 spesifik antikor varlığı tespit edildi. En düşük oran 1 numaralı sürüde belirlendi ve 29 hayvanın bir adedinin pozitif olduğu saptandı. Diğer en düşük değer 4 numaralı sürüde %25 (10/40) olarak tespit edildi. Sürü 5'te %28.5 (8/28), sürü 3'te %43.9 (18/41), sürü 2'de %50 (59/118) ve sürü 6'da %75 (3/4) seropozitiflik oranları tespit edildi. Toplamda 269 hayvanın 99'unun pozitif olduğu (%36.8) görüldü. Antikor titrelerinin ise 1/2 ile 1/256 arasında düzenli bir düşüş gösterdiği belirlendi. Değerlendirilebilen süt örneklerinin kontrolünde, sadece %26.4'ünün (265/1001) pozitif olduğu görüldü, antikor titrelerinin de kan örneklerine göre daha düşük olduğu tespit edildi.

Kör olan 44 meme lobu dışındaki 1032 lobdan alınan süt örneklerindeki Somatik Hücre Sayısının (SHS) belirlenmesi için DeLaval cihazı ve tek kullanımlık tabletleri elde edildi. Hayvanların meme loblarından belirlenen SHS verilerinin ortalamaları alındı ve hayvanlar mililitredeki hücre sayısına göre (100.000h/mL) 3 gruba ayrıldı. Buna göre 269 hayvanın 68'i sağlıklı olarak kategorize edildi ve bu gruptaki 15 inek (%22) BHV1 için seropozitif tespit edildi. Hayvanların çoğunluğu subklinik mastitisli olarak belirlendi ve enfeksiyon oranı bu grupta %40.9 (76/186) olarak belirlendi. Klinik mastitis 15 inekte teşhis edildi ve bunların 8'inin (%53.3) BHV1 pozitif olduğu tespit edildi.

Üç gurubun verileri istatistiksel olarak incelendi ve sağlıklı hayvanlarla hem klinik hem de subklinik mastitisli hayvanlar arasında bağıntı olduğu saptandı, subklinik ve klinik mastitisli guruplar arasında ise anlamlı bir farklılık belirlenmedi.

Bu çalışmada, IBR/IPV veya BHV1 olarak adlandırılan Herpesviral enfeksiyonun klinik ve subklinik mastitis olgularında rolü olabileceği ancak, diğer meme patojenlerinin de araştırılması, tek veya miks enfeksiyonların birlikte değerlendirilmesi gerektiği sonucuna varıldı.

5. KAYNAKLAR

1. McKERCHER, D. G., (1973). Bovine Herpesvirus-1 Infections: Infectious Bovine rhinotracheitis, Infectious pustular Vulvovaginitis. In: Kaplan, A. S. (Editor): The Herpesviruses. *Academic Pres* 428–442
2. ROSNER, S. F., (1968). IBR: Clinical Review, Immunity and Control. *J A V M A* **153**(12), 1631–1638
3. VAN DONKERSGOED, J., BABIUK, L. A., (1991). Diagnosis and managing the infectious bovine rhinotracheitis. *Vet Med* **1**, 86–94
4. WOELFFER, E. A., (1972). Diagnosis of bovine abortion. *J A V M A* **161**(11), 1284–1287
5. BRUNER, W. D., GILLESPIE, J. H., (1973). Herpesviruses. *Hogan's Infectious Diseases of Domestic Animals (sixth edition) Cornell University Press, Ithaca, New York* p968–974
6. BAKER, J. A., McENTEE, K., GILLESPIE, J. H., (1960). Effects of infectious infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustuler vuvovaginitis virus in newborn calves. *Cornell Vet* **5**, 156–170
7. KENDRICK, J. W., (1973). Effects of infectious bovine rhinotracheitis on the fetus. *J A V M A* **163**(7), 852–854
8. STUDDERT, M. J.,(1989). A brief review of studies of bovine and equine herpesviruses. *Aust Vet J* **66**(12), 401–402
9. BRAKE, F., STUDDERT, M. J., (1985). Molecular epidemiology and pathogenesis of ruminant herpesviruses including bovine, buffalo and caprine herpesviruses 1 and bovine encephalitis herpesvirus. *Aust Vet J* **62**(10), 331–334
10. ULBRICH, F., (1991). Demonstration of antibodies to IBR/IPV, BVD and PI-3 viruses in Viatnamese water buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Monatshefte fur Veterinarmedizin* **46**(10), 374–375
11. SURESH, K. B., SUDHARSHANA, K. L., RAJASEKHAR, M., (1999). Seroprevalance of infectious bovine rhinotracheitis in India. *Indian Vet J* **76**, 5–9

12. GALIERO, G., GIORDANELLI, M. P., FRAULO, P., (2001). Infectious bovine rhinotracheitis (IBR). Note 1: serum epidemiological survey in buffalo herds of southern Italy. *Bubalus-Bubalis* 7(4), 69–74
13. ÇABALAR, M., AKÇA, Y., (1994). Fertilité problemlé ineklerde enfeksiyöz bovine rhinotracheitis, enfeksiyöz pustular vulvovaginitis (IBR/IPV) virus izolasyonu ve seroepidemiolojisi. *A Ü Vet Fak Derg* 41(3–4), 337–349
14. ALKAN, F., ÖZKUL, A., KARAOĞLU, M. T., BILGE, S., AKÇA, Y., BURGU, I., YEŞİLBAĞ, K. OĞUZOĞLU, T.Ç., (1997). Sığırlarda viral nedenli solunum sistemi enfeksiyonlarının seroepidemiolojisi. *A Ü Vet Fak Derg* 44(1), 73–80
15. BILGE, S., (1998). Kan ve süt serumlarında IBR/IPV antikorlarının nötralizasyon testi ile saptanması ve süt örneklerinden virus izolasyonu. *A Ü Vet Fak Derg* 45, 313–321
16. ROBERTS, A.W., CARTER, G.R., (1974) : Infectious Bovine Rhinotracheitis Recovered from the Milk of a Cow with Mastitis. *J A V M A* 164, 413.
17. SIEGLER, H.H., MARSCHANG, F., MORSHER, H., (1984). Beobachtungen über Zusammenhänge zwischen Virusinfektionen und boviner Mastitis. *Tierarztl Umschau* 39, 602–604
18. GREIG, A.S., BANNISTER, G.L., (1965). Infection of the bovine udder with bovine herpesvirus. *Can J Comp Med Vet Sci* 29, 57–62.
19. STRAUB, O. C., KIELWEIN, G., (1966). Experimentelle Mastitiden durch das Blaschenausschlagvirus des Rindes. *Berl Münchn Tierarztl Wochenschr* 79, 310–312
20. CORNER, A.H., GREIG, A.S., HILL, D.P., (1967). A histological study of the effects of the herpesvirus of infectious bovine rhinotracheitis in the lactating bovine mammary gland. *Can J Comp Med Vet Sci* 31, 320–330
21. MUYLKENS, B., THIRY, J., KIRTEN, P., SCHYNTS, F., THIRY, E., (2007). Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. *EDP Sciences*, 181, 209
22. KAPLAN, A. S., (1973). The Herpesviruses. *Acad Press New York*

23. ROIZMAN, B., CARMICHAEL, L. E., DEINHART, F., DE-THE, G., NAHMIAS, A. J., PLOWRIGHT, W., RAPP, F., TAKAHASHI, M., WOLF, K., (1981). Herpesviridae. Definition, provisional nomenclature and taxonomy. *Intervirology* **16**, 201–217
24. HAHNEFELD, E., HANTSCH, H., HAHNEFELD, H., (1963). Die Stabilität des Virus des Bläschenausschlages des Rindes (*Exanthema coitale vesiculosum bovis*) bei verschiedenen Temperaturen und Wasserstoffionenkonzentrationen sowie bei Einwirkung organischer Lösungsmittel und Natriumdesoxycholat. *Arc Exp Veterinarmed* **17**, 433–488
25. STRAUB, O. C., (1970). Allergische Sofort und Spatreaktionen bei IBR-IPV immunen Rindern. *Zentralbl Bakteriol I Orig* **214**, 483–494
26. STRAUB, O. C., BENGELDORFF, H. J., WIZIGMANN, G., (1990). Untersuchung zum Nachweis des bovinen Herpesvirus Type 1 (BHV1) mittels Intrakutanest. II. Mitteilung: Experimentelle Untersuchungen. *J Vet Med B* **37**, 35–46
27. GRIFFIN, T. P., HOWELLS, W. V., CRANDELL, R. A., MAURER, F. D., (1958). Stability of the virus of infectious bovine rhinotracheitis. *Am J Vet Res* **19**, 990–992
28. ACKERMANN, M., PETERHANS, E., WYLER, R., (1982). DNA of bovine herpesvirus 1 in the trigeminal ganglia of latently infected calves. *Am. J Vet Res* **43**, 36–40.
29. ACKERMANN, M., WYLER, R., (1984). The DNA of an IPV strain of bovine herpesvirus in sacral ganglia during latency after intravaginal infection. *Vet Microbiol* **9**, 53–63.
30. NARITA, M., INUI, S., MURAKAMI, Y., NAMBA, K., SHIMIZU, Y., (1982). Pathological changes in young and adult cattle after intranasal inoculation with infectious bovine rhinotracheitis virus. *J Comp Pathol* **92**, 41–49

31. VAN ENGELENBURG, F.C.A., KAASHOEK, M.J., VAN OIRSCHOT, J.T., RIJSEWIJK, F. A. M., (1994). A glikoprotein E deletin mutant of bovine herpesvirus 1 infects the same limited number of tissues in calves as wild-type virus, but for a shorter period. In: Pathogenesis of bovine herpesvirus 1 infections. Prospects for a gE-negative marker vaccine and molecular diagnosis. *Vet Med Thesis (FAC Engelenburg) University of Utrecht The Netherlands* p33–50
32. HUCK, R. A., MILLAR, P. C., WOODS, D. G., (1973). Experimental infection of maiden heifers by the vagina with infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvo-vaginitis virus. *J Comp Pathol* **83**, 271–279
33. DOYLE, L. G., HESCHELE, W. P., (1983). Prevalance of antibody to bovine herpesvirus 1 in wild ruminants captive in United States zoos. *J Am Vet Med Assoc* **183**, 1255–1256
34. ERHAN, M., ONAR, B., CSONTOS, L., HOPKINS, I.G., (1971). Serological survey on some virus and bedsonia diseases of cattle, sheep and horse. *Pendik Vet Kont Ve Araşt Enst Derg* **4**(2), 55–58
35. GÜRTÜRK,S., FİNCİ, E., BURGU, İ., (1974). Yurdumuz sığırlarında enfeksiyöz rhinotracheitis üzerinde araştırmalar. *A Ü V F D* **8**, 1–2
36. VONK NOORDEGRAAF, A., LABROVIC, A., FRANKENA, K., PFEIFFER, D.U., NIELEN, M., (2004). Simulated hazards of loosing infection-free status in a Dutch BHV1 model. *Prev Vet Med* **62**, 51–58.
37. BOELAERT, F., SPEYBROECK, N., de KRUIF, A., AERTS, M., BURZYKOWSKI, T., MOLENBERGHS, G., BERKVENS, D.L., (2005). Risk factors for bovine herpesvirus–1 seropositivity. *Prev Vet Med* **69**, 285–295
38. THIRY, E., SALIKI, J., BUBLLOT, M., PASTORET, P.P., (1987). Reactivation of infectious bovine rhinotracheitis virus by transport. *Comp. Immunol. Microbiol Infect Dis* **10**, 59–63
39. MARS, M.H., de JONG, M., FRANKEN, P., van OIRSCHOT, J.T., (2000). A gE-negative BHV1 vaccine virus strain cannot perpetuate in cattle populations, *Vaccine* **19**, 1924–1930

40. KUPFERSCMIED, H.U., KIHM, U., BACHMANN, P., MULLER, K.H., ACKERMANN, M., (1986). Transmission of IBR/IPV virus in bovine semen. *A case report Theriogenology* **25**, 439–443
41. HANON, E., VANDERPLASSCHEN, A., LYAKU, S., KEIL, G., DENIS, M., PASTORET, P.P., (1996). Inactivated bovine herpesvirus 1 induces apoptotic cell death of mitogen –stimulated bovine peripheral blood mononuclear cells. *J Virol* **70**, 4116–4120.
42. McKERCHER, D. G., WDA, E.M., STRAUB, O.C., (1963). Distribution and persistence of Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus in experimentally infected cattle. *Am J Vet Res* **24**(100), 10–14
43. FENNER, F., (1987). Herpesviruses. *Veterinary Virology, Academic Press, London* p339–373
44. JERICHO, K.W.F., (1983). Histological changes in the respiratory tract of calves exposed to bovine herpesvirus 1 and *Pasteurella haemolytica*. *J Comp Pathol* **93**, 73–82
45. POTGIETER, L.N.D., McCRACKEN, M.D., HOPKINS, F.M., WALKER, R.D., (1984). Effect of bovine viral diarrhea virus infection on the distribution of infectious bovine rhinotracheitis virus in calves. *Am J Vet Res* **45**, 687–690
46. BIELEFELDT-OHMANN, H., BABIUK, L.A., (1985). Viral-bacterial pneumonia in calves: effect of bovine herpesvirus–1 on immunologic functions. *J Infect Dis* **151**, 937–947
47. KAASHOEK, M.J., MOERMAN, A., MADIC, J., RIJSEVIJK, F.A.M., QUAK, J., GIELKENS, A.L.J., VAN OIRSCHOT, J.T., (1994). A conventionally attenuated glycoprotein E-negative strain of bovine herpes type 1 is an efficacious and safe vaccine. *Vaccine* **12**, 439–444
48. HAGE, J.J., SCHUKKEN, Y.H., DIJKSTRA, T., BARKEMA, H.W., VAN VALKENGOED, P.H., WENTINK, G.H., (1998). Milk production and reproduction during a subclinical bovine herpesvirus 1 infection on a dairy farm. *Prev Vet Med.* **34**, 97–106.

49. CHOW, T.L., MOLELLO, J.A., OWEN, N.V., (1964). Abortion experimentally induced in cattle by infectious bovine rhinotracheitis virus. *J Am Vet Med Assoc* **144**, 1005–1007
50. STRAUB, O. C., WETTKE, K., WEILAND, F., (1982). Seuchenhaftes Auftreten von IBR-IPV Virus Aborten. *Tierarztl Umschau* **37**, 613–617
51. BOWEN, R.A., ELSDEN, R.P., SEIDEL, G.E., (1985). Infection of early bovine embryos with bovine herpesvirus-1. *Am J Vet Res* **46**, 1095–1097
52. CRANE, C.S., LUKAS, G.N., WATKINS, W.W., (1964). Infectious bovine rhinotracheitis abortion in california beef cattle. *J Am Vet Med Assoc* **144**, 13–18
53. BARTHA, A., HADJU, G., ALDASY, P., PACZOLAY, G., (1969). Occurrence of encephalitis caused by infectious bovine rhinotracheitis virus in calves in hungary. *Acta Vet Acad Sci Hung* **19**, 145–151
54. BAXTER, G. M., (1984). Neonatal meningoencephalitis associated with infectious bovine rhinotracheitis virus. *Bovine Pract* **19**, 41–44
55. HILL, B.D., HILL, M.W.M., CHUNG, Y.S., WHITTLE, R.J., (1984). Meningoencephalitis in calves due to bovine herpesvirus type 1 infection. *Aust Vet J* **61**, 242–243
56. WYLER, R., ENGELS, M., SCHWYZER, M., (1989). Herpesvirus Diseases of Cattle, Horses and Pigs. *Kluwer Academic Publishers Boston* p345
57. BRYAN, L.A., FENTON, R.A., MISRA, V., HAINES, D.M., (1994). Fatal, generalized bovine herpesvirus type-1 infection associated with a modified-live infectious bovine rhinotracheitis parainfluenza-3 vaccine administered to neonatal calves. *Can Vet J* **35**, 223–228
58. MECHOR, G.D., ROUSSEAU, C.G., RADOSTITS, O.M., BABIUK, L.A., PETRIE, L., (1987). Protection of newborn calves against fatal multisystemic infectious bovine rhinotracheitis by feeding colostrum from vaccinated cows. *Can J Vet Res* **51**, 452–459

59. BURKHARDT, E., PAULSEN, J., (1978). Nachweis von Bovinem Herpesvirus 1 (IBR/IPV) bei Rindern mit Affektionen des Verdauungstraktes. *Berl Münch Tierarztl Wochenschr* **91**, 480–482
60. MILLER, R.B., SMITH, M.W., LAWSON, K.F., (1978). Some lesions observed in calves born to cows exposed to the virus of infectious bovine rhinotracheitis in the last trimester of gestation. *Can J Comp Med* **42**, 438–445
61. EVERMANN, J.F., CLEMM, D.L., (1980). Re-emergence of infectious bovine rhinotracheitis virus associated with calf enteritis. *Bovine Prac* **1**, 45–47
62. MILLER, J.M., VAN DER MAATEN, M.J., (1984). Reproductive tract lesions in heifers after intrauterine inoculation with infectious bovine rhinotracheitis virus. *Am J Vet Res* **45**, 790–794
63. STRAUB, O.C., (1990). Virus Infections of ruminants. *Elsevier Science Publisher Amsterdam-Oxford-New York-Tokyo* Chapter 11
64. EDWARDS, S., CHASEY, D., WHITE, H., (1983). Experimental infectious bovine rhinotracheitis: Comparison of four antigen detection methods. *Res Vet Sci* **34**, 42–45
65. BELAK, S., BALLAGI-PORDANY, A., (1993). Application of the polymerase chain reaction (PCR) in veterinary diagnostic virology. *Vet Res Commun* **17**, 55–72
66. VAN ENGELBURG, F.C.A., MAES, R.K., VAN OIRSCHOT, J.T., RIJSEWIJK, F.A.M., (1993). Development of a rapid and sensitive polymerase chain reaction assay for the detection of bovine herpesvirus type 1 in bovine semen. *J Clin Microbiol* **31**, 3129–3135
67. KIBENGE, F.S.B., HARIS, L.M., McKENNA, P.K., WADOWSKA, D., YASON, C.V., (1994). Amplification of strains of bovine herpesvirus 1 by use of polymerase chain reaction with primers in the thymidine kinase region. *Am J Vet Res* **55**, 1206–1212
68. SILIM, A., ELAZHARY, M.A.S.Y., (1983). Detection of infectious bovine rhinotracheitis and bovine viral diarrhoea in the nasal epithelial cells by the direct immunofluorescence technique. *Can J Comp Med* **47**, 18–22

69. COLLINS, J.K, BUTCHER, A.C., RIEGEL, C.A., (1985). Immune response to bovine herpesvirus type 1 infections: virus specific antibodies in sera from infected animals. *J Clin Microbiol* **21**, 546–552
70. KARADZHOV, I., IGNATOV, G., KHRISTOVA, V., (1979). Serological diagnosis of IBR. *Veterinarnomed Nauki* **16**, 65–71
71. AGUILAR-SETIEN, A., PASTORET, P.P., SCHWERS, A., (1980). Etude chez le bovin par neutralisation et immunoprecipitation des reactions serologiques croisees entre le virus de la rhinotracheite infectieuse bovine (Bovine Herpesvirus-1, BHV-1) et celui de la maladie d'Aujeszky (Sus Herpesvirus-1, SHV-1). *Ann Med Vet* **124**, 199–209
72. KARADZHOV, I., KHRISTOVA, V., (1980). Preparation of antigen from IBR/IPV virus and its use in the microcomplement fixation test for bovine infectious rhinotracheitis. *Veterinarnomed Nauki* **17**, 17–22
73. HERRING, A.J., NETTLETON, P.F., BURRELS, C., (1980). A micro-enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to infectious bovine rhinotracheitis virus. *Vet Rec* **107**, 155–156
74. FREY, H.R., LIES, B., (1971) Vermehrungskinetik und Verwendbarkeit eines stark zytotropen VD-MD Virus stammes für diagnostische Untersuchungen mit der Mikrotitermethode. *Zentbl Vet Med* **18**, 61–71
75. STUKER, G., HAAB, P., GIGER, T., (1980). Nachweis von IBR/IPV Antikörpern aus der Milch *Schweiz Arch Tierheilk* **122**, 707–710
76. BABIUK, L.A., VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S., TIKOO, S.K., (1996). Immunology of bovine herpesvirus 1 infection. *Vet Microbiol* **53**, 31–42
77. GUY, J.S., POTGIETER, L.N.D., (1985). Bovine herpesvirus-1 infection of cattle. Kinetics of antibody formation after intranasal exposure and abortion induced by the virus. *Am J Vet Res* **46**, 893–898
78. STRAUB, O.C., (1978). Herpesvirusinfektionen. *VEB Gustav Fischer Verlag Jena* p211

79. AFSHAR, A., BANNISTER, G.L., (1970). Viral infections of the bovine mammary gland. *Vet Bull* **40**(9), 681–686
80. KAHRS, R.F., JOHNSON, M.E., BENDER, G.M., (1977). Studies on the detection of infectious bovine rhinotracheitis (IBR) virus in bovine semen. *Proc Am Assoc Vet Lab Diagn* **20**, 187–208
81. BOSCH, J.C., VAN LIESHOUT, J.A., DE WIT, J.J., GRAAT, E.A., SOMERS, M.J., (2000). The serological BHV1 status of dams determines the precolostral status of their calves. *Vet Q.* **22**, 99–102
82. BAKER, J.C., RUST, S.R., WALKER, R.D., (1989). Transmission of a vaccinal strain of infectious bovine rhinotracheitis virus from intranasally vaccinated steers commingled with nonvaccinated steers. *Am J Vet Res* **50**(6), 814–816
83. KAERBER, G., (1964). In diagnostic procedures for viral and rickettsial disease. *Public Health Ass New York* **3**, 48–50
84. MILLER, G.Y., DORN, C.R., (1990). Costsof dairy cattle diseases to producers in Ohio. *Prev Vet Med* **8**, 171–182
85. SCHAKENRAAD, A.H.W., DIJKHUIZEN, A.A., (1990). Economic losses doe to bovine mastitis in Dutch dairy herds. *Neth J Agri Sci* **38**, 89–92
86. WELLS, S.J., OTT, S.L., HILLBERG SEITZINGER, A., (1998). Key health issues for dairy cattle- new and old. Symposium: emerging health issues. *J Dairy Sci* **81**, 3029–3035.
87. RADOSTITS, O.M., BLOOD, D.C., GAY, C.C., (1994). *Mastitis. In: Veterinary Medicine. Bailliere Tindal, London* p563–627
88. WATTS, J.L., (1988). Etiological agents of bovine mastitis. *Vet Microbiol* **16**, 41–66
89. MILTENBURG, J.D., DE LANGE, D., CRAUWELS, A.P., BONGERS, J.H., TIELEN, M.J., SCHUKKEN, Y.H., ELBERS, A.R., (1996). Incidence of clinical mastitis in a random sample of dairy herds in the southern Netherlands. *Vet Rec* **139**, 204–207

90. WEDDERKOPP, A., (1997). Haemophilus somnus-unlikely to be a causative microbiological agent in bovine clinical mastitis Denmark. *Acta Vet Scand* **38**, 193–195
91. KALMAN, D., JANOSI, S.Z., EGYED, L., (2004). Role of bovine herpesvirus 4 in bacterial bovine mastitis. *Microbial. Pathogenesis* **37**, 125–129
92. FIROOZI, M.R., AMIGHI, M., MASTAN, M.B., MALEKNEZAD, P., (1974). In: Proceedings of the X Congress Reg. OIE-FAO sur less Epiz. En Asie en Extr. Orient. Tehran (Iran), October 20–27
93. BURROWS, R., MANN, J.A., GREIG, A., CHAPMANN, W.G., GOODRIDGE, D., (1971). The growth and persistence of foot-and-mouth disease virus in the bovine mammary gland. *J Hyg Camb* **69**, 307–321.
94. AWAKAMI, Y., KAJI, T., KUME, T., OMURO, M., HIRAMUNE, T., MURASE, N., MATUMOTO, M., (1966). Infection of cattle with parainfluenza 3 virus with special reference to udder infection. Virus isolation from milk. *Jpn J Microbial* **10**, 159–169.
95. IDF, (1999). Suggested interpretation of mastitis terminology. *Bull Int Dairy Fed* **338**, 3–26.
96. BROLUND, I., (1985). Cell counts in bovine milk-causes of variation and applicability for diagnosis of subclinical mastitis. *Acta Vet Scand Suppl* **80**, 1–123
97. BUELOW, K.L., GOODGER, W.J., COLLINS, M.T., CLAYTON, M.K., NORDLUND, K.V., THOMAS, C.B., (1996). A model to determine sampling strategies and milk inoculum volume for detection of intramammary Staphylococcus aureus infections in dairy cattle by bacteriological culture. *Prev Vet Med* **25**, 343–355
98. LESLIE, K.E., DOHOO, I., MEEK, A.H., (1983). Somatic cell counts in bovine milk. *Compend Contin Educ PRact Vet* **5**, 601–612
99. SCHULTZ, L.H., (1977). Physiologic aspects and relationship to amount of milk. *J Food Prot* **40**, 125–131

100. DOHOO, I.R., LESLIE, K.E., (1991). Evaluation of changes in somatic cell counts as indicators of new intramammary infections. *Prev Vet Med* **10**, 225–237
101. DeGraves, F.J., Fetrow, J., (1993). Economics of mastitis and mastitis control. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* **9**, 421–434
102. HARMON, R.J., (1994). Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. *J Dairy Sci* **77**, 2103–2112
103. HAMANN, J., (2002). Relationship between somatic cell count and milk composition. *Bull Int Dairy Fed* **379**, 56–59
104. HILLERTON, J.E., (1999). Redefining mastitis based on somatic cell count. *IDF Bull* **345**, 4–6
105. MCKERCHER, D.G., (1973). Bovine Herpesvirus–1 infections: Infectious Bovine Rhinotracheitis, Infectious Pustular Vulvovaginitis. *The Herpesviruses*, Academic Pres, New York, pp. 428–442
106. OIE Manuel (1990). IBR, Volume II, France, pp. 1–6
107. NEWBY, T.J., BOURNE, F.J., (1977). The nature of the local immune system of the bovine mammary gland. *J Immunol* **2**, 461–465
108. ERHAN, M., ONAR, B., CSONTOS, L., HOPKINS, I. G., (1971). Serological survey on some virus and bedsonia diseases of cattle, sheep and horse. *Pendik Vet Kont Araşt Enst Derg* **4**, 55–58.
109. BURGU, I., AKÇA, Y., (1987). First isolation of IBR virus in Turkey. *Trop Anim Health Prod* **19**, 56
110. YEŞİLBAĞ, K., GÜNGÖR, B., (2008). Seroprevalence of bovine respiratory viruses in North-Western Turkey. *Trop Anim Health Prod* **40**, 55–60
111. TAN, M.T., YILDIRIM, Y., EROL, N., GÜNGÖR, A.B., (2006). The seroprevalence of Bovine Herpesvirus 1 (BHV1) and Bovine Leukemia virus (BLV) in Selected Dairy Cattle Herds in Aydın Province, Turkey. *Turk J Vet Anim Sci* **30**, 353–357.
112. ÇABALAR, M., CAN ŞAHNA, K., (2000). Doğu ve Güneydoğu Anadolu Bölgesinde süt sığırlarında Parainfluenza 3, ve Respiratory syncitial virus enfeksiyonlarının seroepidemiyojisi. *YY Vet Fak Derg* **11**, 101–105