

138243

T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

VİROLOJİ (VET) ANABİLİM DALI

**BURDUR BÖLGESİ SÜT SIĞIRLARINDA ENZOOTİK BOVİNE  
LÖYKOZİS (EBL) ENFEKSİYONUNUN AGAR JEL  
İMMUNODİFFUZYON (AGİD), ENZYME LINKED  
IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA) TESTLERİ VE HEMATOLOJİK  
UYGULAMALAR İLE ARAŞTIRILMASI**

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU  
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

**DOKTORA TEZİ**

**Mehmet KALE**

**DANIŞMAN**

**Prof. Dr. Feridun ÖZTÜRK**

**KONYA-2003**

**T.C.**  
**SELÇUK ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**VİROLOJİ (VET) ANABİLİM DALI**

**BURDUR BÖLGESİ SÜT SIĞIRLARINDA ENZOOTİK BOVİNE LÖYKOZİS (EBL)  
ENFEKSİYONUNUN AGAR JEL İMMUNODİFFUZYON (AGİD), ENZYME LINKED  
IMMUNOSORBENT ASSAY (ELİSA) TESTLERİ VE HEMATOLOJİK  
UYGULAMALAR İLE ARAŞTIRILMASI**

**DOKTORA TEZİ**  
**Arş. Gör. Mehmet KALE**

Bu tez, aşağıda isimleri yazılı tez jürisi tarafından 12.05.2003 günü sözlü olarak yapılan tez savunma sınavında oybirliği ile kabul edilmiştir.

**Tez jürisi**

**Danışman: Prof. Dr. Feridun ÖZTÜRK**

**Üye: Prof. Dr. Hüdaverdi ERER**

**Üye: Prof. Dr. Sibel YAVRU**

**Üye: Doç. Dr. Atilla ŞİMŞEK**

**Üye: Yrd. Doç. Dr. Mustafa ALTINDIŞ**

## İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	I-II
TABLO LİSTESİ .....	III-IV
RESİM LİSTESİ .....	V-VI
KISALTMALAR .....	VII-X
<b>1. GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
<b>2. LİTERATÜR BİLGİSİ.....</b>	<b>3</b>
2.1. Etiyoloji.....	4
2.2. Epizootiyoloji.....	7
2.3. Patogenez .....	12
2.4. Patoloji .....	13
2.5. Histopatoloji.....	16
2.6. Hematoloji.....	17
2.7. Klinik .....	18
2.8. Teşhis .....	20
2.9. Tedavi.....	26
2.10. İmmunite .....	26
2.11. Ekonomik Önem .....	29
2.12. Kontrol .....	30
2.13. Eradikasyon.....	33
<b>3. MATERYAL VE METOT.....</b>	<b>36</b>
3.1. Araştırmada Kullanılan Hayvanlar.....	36
3.2. Serolojik Kontrol Materyalleri .....	36
3.3. Hematolojik Kontrol Materyalleri.....	36
3.4. Kan Serum Örneklerinin Hazırlanması.....	36
3.5. Süt Serum Örneklerinin Hazırlanması .....	36
3.6. Hematolojik Kontrol Materyalleri.....	38
3.7. Agar Jel İmmunodiffüzyon (AGID) Testi.....	38
3.7.1. Antijen.....	38
3.7.2. Pozitif kontrol serum.....	38

3.7.3. Negatif kontrol serum .....	38
3.7.4. Agar'ın hazırlanması .....	39
3.7.5. Test'in uygulanması .....	39
3.8. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	39
3.8.1. Yıkama solusyonunun hazırlanması.....	40
3.8.2. Test'in uygulanması .....	40
3.8.3. Test'in değerlendirilmesi .....	40
3.9. Hematolojik Uygulamalar.....	41
3.9.1. Alfa-Naftil Asetat Esteraz (ANAE) Enziminin Demonstrasyonu.....	41
3.9.2. May-Grünwald Giemsa Boyaması .....	41
3.9.3. Lökosit Sayımı ve Hesaplanması .....	42
<b>4. BULGULAR</b> .....	<b>44</b>
4.1. Agar-Jel Immunodiffüzyon Testi Sonuçları.....	44
4.2. Enzyme Linked Immunosorbent Assay Sonuçları .....	44
4.3. AGID ve ELISA Testlerinin Karşılaştırmalı Sonuçları.....	45
4.4. Hematolojik Test Sonuçları.....	46
4.5. ELISA ve Hematolojik Uygulamaların Karşılaştırmalı Sonuçları.....	47
<b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ</b> .....	<b>63</b>
<b>6. ÖZET</b> .....	<b>84</b>
<b>7. SUMMARY</b> .....	<b>86</b>
<b>8. LİTERATÜR LİSTESİ</b> .....	<b>88</b>
<b>9. ÖZGEÇMİŞ</b> .....	<b>108</b>
<b>10. TEŞEKKÜR</b> .....	<b>109</b>

## TABLO LİSTESİ

Tablo3.1.Örneklenen hayvanların ilçelere göre dağılımları.....	37
Tablo3.2.Örneklenen hayvanların yaşlara göre dağılımları ve yüzde oranları.....	37
Tablo4.1.AGID testinde EBL pozitif bulunan kan örneklerinin ilçelere göre dağılımı. ....	48
Tablo4.2.AGID testinde EBL pozitif bulunan kan örneklerinin yaşa göre dağılımı ve oranları.....	48
Tablo4.3.ELISA testinde EBL pozitif bulunan süt örneklerinin ilçelere göre dağılımı. ....	49
Tablo4.4.ELISA testinde EBL pozitif bulunan süt örneklerinin yaşa göre dağılımı ve oranları.....	49
Tablo4.5.İlçelerdeki AGID ve ELISA testi pozitiflik oranlarının (%) karşılaştırılması. ....	50
Tablo4.6.Hem AGID hem de ELISA testlerinde EBL pozitif bulunan kan ve süt örneklerinin yaşa göre dağılımı.....	50
Tablo4.7. Örneklerin alındığı ilçelerdeki AGID ve ELISA testi karşılaştırılması. ....	51
Tablo4.8. ELISA OD değerleri ile hayvan sayısına göre dağılım sonuçları. ....	51
Tablo4.9. ELISA ve AGID testleri arasında korrelasyon.....	51
Tablo4.10.Çalışmada ELISA ve AGID testleri ile incelenen örneklerin tamamından elde edilen hematolojik kan bulguları ve bunların istatistiksel analiz sonuçları. ....	52
Tablo4.11.ELISA seronegatif ve seropozitif hayvanların yaş gruplarına göre dağılımları ile bu hayvanların hematolojik bulguları.....	53
Tablo4.12.Sığır Löykoz'un teşhisinde yararlanılan ve EEC tarafından belirtilen perifer kan lökosit sayıları esas alınarak hazırlanmış olan kan tablo anahtarı.....	54
Tablo4.13.ELISA testi ile seronegatif ya da seropozitif olarak tespit edilen hayvanların perifer kan lenfosit oranları ve total lökosit sayılarının EEC tablosunda verilen değerlerle karşılaştırılması.....	54

Tablo4.14.Yaş'a göre hayvan sayısının ve yüzdesinin hematolojik uygulamalar ve ELISA ile karşılaştırılması.....	55
Tablo4.15.Hematolojik uygulamalar ve ELISA arasında uyum..	55



## RESİM LİSTESİ

resim 3.1. Agar-Jel İmmunodiffuzyon testi için hazırlanmış petri kutusu.....	43
resim 3.2. Enzyme Linked Immunosorbent Assay testinde kullanılan mikropleyt.....	43
resim 4.1. Agar-Jel İmmunodiffuzyon testinde pozitif kontrol ve 2 adet pozitif örnek reaksiyonu.....	56
resim4.2. Enzyme Linked Immunosorbent Assay testinde işlenen örneklerin kolorimetrik reaksiyonları ( 1 no'lu mikropleyt). .....	56
resim4.3. Tek granüllü bir ANAE+, T-lenfosit ile ANAE- bir B-lenfosit görülmekte. ANAE+lenfositteki iri kiremit kırmızısı-kahverengi granül (ok) belirgin durumda. ANAE enzimi demonstrasyonu, X 1110.....	57
resim4.4. Lokalize granüler (tek granüllü, ok) pozitivite gösteren bir T-lenfosit ile çok sayıda granüllü (diffüz granüler pozitivite gösteren) bir T-lenfosit. ANAE demonstrasyonu, X4500.....	57
resim4.5. Tek granüllü, lokalize granüler tip pozitivite gösteren iki T-lenfosit (ANAE+lenfosit). ANAE enzim demonstrasyonu, X 1540.....	58
resim4.6. Tek granüllü, lokalize granüler tip pozitivite gösteren iki T-lenfosit (ANAE+lenfosit). ANAE enzim demonstrasyonu, X 1530.....	58
resim4.7. Tek granüllü, lokalize granüler tip pozitivite gösteren bir monosit. ANAE enzim demonstrasyonu, X 1480.....	59
resim4.8. T-lenfosit (ANAE+lenfosit) ile diffüz granüler pozitivite gösteren monosit görülmekte. ANAE enzim demonstrasyonu, X 1500.....	59
resim4.9. T-lenfosit (ANAE+lenfosit) ile B-lenfosit (ANAE-lenfosit)'ler ve negatif nötrofil (ok) görülmekte. ANAE enzimi demonstrasyonu, X 1450.....	60
resim4.10. Non T-lenfosit ve non B-lenfosit (ANAE+) görülmekte. Lokalize granüler (ok) tip pozitivite gösteren bir null hücresi. ANAE enzim demonstrasyonu, X 1400.....	60
resim4.11. May-Grünwald Giemsa boyama yöntemi ile lenfosit görülmekte. Lenfositteki iri mavi granüller (ok) belirgin durumda. May-Grünwald Giemsa boyama, X 2000.....	61

- resim4.12.May-Grünwald Giemsa boyama yöntemi ile lenfosit görülmekte.  
Lenfositteki iri mavi granüller (ok) belirgin durumda. May-Grünwald  
Giemsa boyama, X 1500. .... 61
- resim4.13.May-Grünwald Giemsa boyama yöntemi ile eozinofil görülmekte.  
Eozinofilde kırmızı küçük granüller (ok) belirgin durumda. May-  
Grünwald Giemsa boyama , X 1524. .... 62





## KISALTMALAR

<b>AGID</b>	Agar Jel İmmunodiffüzyon
<b>AIDS</b>	Acquired Immunodeficiency Syndrome
<b>AL</b>	Alökemik
<b>ALL</b>	Akut Lenfoid Lökemi
<b>ALS</b>	Adult Lenfosarkoma
<b>ANAE</b>	Alfa Naphthyl Asetate Esterase
<b>ANAE+</b>	Alfa Naphthyl Asetate Esterase pozitif
<b>ANAE-</b>	Alfa Naphthyl Asetate Esterase negatif
<b>BESP</b>	Bovine Embriyonik Dalak Hücre Kültürü
<b>BL</b>	Bovine Löykozis
<b>BLS</b>	Bovine Lenfosarkoma
<b>BLSL</b>	Bovine Lenfosarkoma Lökemi
<b>BLV</b>	Bovine Löykozis Virus
<b>BML</b>	Bovine Malign Lenfoma
<b>bp</b>	Base Pair
<b>°C</b>	Santigrat
<b>CF</b>	Komplement Fikzasyon
<b>CLS</b>	Calf Lenfosarkoma
<b>cm</b>	Santimetre
<b>CMI</b>	Hücrel İmmunite Cevabı
<b>dk</b>	Dakika
<b>dl</b>	Desilitre
<b>DNA</b>	Deoksiribonükleik Asit
<b>dsDNA</b>	Double Stranded Deoksiribonükleik Asit
<b>E</b>	Enhancer
<b>EAC</b>	Eritrosit Amboseptör Komplement Reseptörü
<b>EBL</b>	Enzootik Bovine Löykozis

<b>EEC</b>	Avrupa Ekonomik Topluluğu
<b>EDTA</b>	Ethylendiamine Tetraaceticacide
<b>ELISA</b>	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
<b>EM</b>	Elektronmikroskopi
<b>env</b>	Envelope
<b>EPI</b>	Early Polykaryocytosis Inhibition
<b>FLK</b>	Fötal Lamb Kidney
<b>gp</b>	Glikoprotein
<b>HeLa</b>	İnsan Serviks Karsinoma Hücre Kültürü
<b>HCl</b>	Hidroklorik Asit
<b>HF</b>	Hidroflorik Asit
<b>HRPO</b>	Horseradish Peroksidase
<b>HTLV</b>	Human T-lymphotropic Virus
<b>ICBL</b>	Uluslararası Bovine Löykozis Komitesi
<b>ICSH</b>	Uluslararası Hematoloji Konseyi
<b>IF</b>	Immunofloresans
<b>IgA</b>	Immunglobülin A
<b>IgG</b>	Immunglobülin G
<b>IgM</b>	Immunglobülin M
<b>IP</b>	Immunoperoxidase
<b>IVF</b>	İn Vitro Fertilisation
<b>IVTA</b>	Uluslararası Viroloji Taksonomi Birliği
<b>LC</b>	Lenfosit Miktarı
<b>LS</b>	Lenfosarkoma
<b>LTR</b>	Long Terminal Repeat
<b>M</b>	Molar
<b>mcg</b>	Mikrogram
<b>MDBK</b>	Madin Darby Bovine Kidney

<b>mg</b>	Miligram
<b>MHC</b>	Major Histocompatibility Complex
<b>ML</b>	Malign Lenfoma
<b>mm<sup>3</sup></b>	Milimetreküp
<b>mRNA</b>	Messenger Ribonükleik Asit
<b>MVV</b>	Maedi Visna Virus
<b>N</b>	Normalite
<b>Na</b>	Sodyum
<b>NaCl</b>	Sodyum Klorür
<b>NaNO<sub>3</sub></b>	Sodyum Nitrat
<b>NBC</b>	New Bolton Center
<b>NC<sub>x</sub></b>	Ortalama Negatif Kontrol
<b>nm</b>	Nanometre
<b>OD</b>	Optimal Density
<b>OIE</b>	Office International des Epizootique
<b>p</b>	Protein
<b>P</b>	Promoter
<b>PBL</b>	Peripheral Blood Lymphocyte
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>PC<sub>x</sub></b>	Ortalama Pozitif Kontrol
<b>pH</b>	Asitlik değeri
<b>PI</b>	Pseudotip Inhibisyon
<b>PL</b>	Persiste Lenfositozis
<b>RIA</b>	Radioimmunoassay
<b>RNA</b>	Ribonükleik Asit
<b>SBL</b>	Sporadik Bovine Löykozis
<b>SB</b>	Southern Blot Testi
<b>SIA</b>	Syncytia Induction Assay
<b>sIg</b>	Surface Immunglobulin
<b>SLS</b>	Skin Lenfosarkoma
<b>SN</b>	Serum Nötralizasyon Testi

<b>S/P</b>	Pozitif Örnek Oranı (yüzdesi)
<b>SU</b>	Surface
<b>TAA</b>	Tümör Associated Antigen
<b>TLS</b>	Timik Lenfosarkoma
<b>TM</b>	Transmembran
<b>TMB</b>	Tetramethylbenzidine
<b>TNF</b>	Tümör Nekrosis Faktör
<b>USA</b>	Amerika Birleşik Devletleri
<b>UTR</b>	Untranslated Region
<b>VN</b>	Virus Nötralizasyon
<b>WB</b>	Western Blot Testi
<b>WHO</b>	Dünya Sağlık Örgütü
<b>μ l</b>	Mikrolitre
<b>%</b>	Yüzde

## 1. GİRİŞ

Dünya’da ve Türkiye’de her geçen gün süt ve süt ürünlerine olan ihtiyaç artmaktadır. Süt ve süt ürünleri insan gıdasının temelini oluşturan protein kaynakları içerisinde önemli bir yer tutmaktadır. Çeşitli ülkelerden farklı zamanlarda Türkiye’ye hayvancılık sektörünü geliştirmek amacıyla kültür ırkı sığırlar ithal edilmiştir. Ancak bu hayvanlardan elde edilen süt ve süt ürünlerinin miktarı ve tüketiminin düşük düzeyde gerçekleştiği bilinmektedir. Türkiye’de hayvancılık sektöründe yaşanan çeşitli problemler hayvan sağlığını, yetiştiriciliğini, popülasyonu, elde edilecek hayvansal ürünlerin kalitesini, miktarını ve tüketimini önemli düzeyde etkilemektedir. Bu nedenle ülkemizde enfeksiyöz hastalıklarla mücadele, sağaltım, kontrol, teşhis ve eradikasyon programlarının zaman geçmeden geliştirilmesi ve uygulanması gerekmektedir.

Bovine Löykozis (BL) enfeksiyonuna neden olan Bovine Löykozis Virus (BLV) tüm dünyada yaygındır (Lorenz ve Straub 1987). Virus, sığırlarda Enzootik Bovine Löykozis (EBL) olarak kabul edilen, mononükleer fagositik sistemde yaygın neoplastik lenfosit infiltrasyonları ile karakterize sistemik malign tabiatlı bir hastalığa yol açar. Enfeksiyon, lenfosarkoma ve lenfositosis formlarının belirli coğrafik bölgelerde ortaya çıkması nedeniyle “Enzootik Bovine Löykozis” olarak isimlendirilmiştir (Olson ve Miller 1987, Johnson ve Kaneene 1992).

Bovine Löykozis Virus ile enfekte hayvanlarda; kilo kaybı, iştahsızlık, süt veriminde azalma, kısırılık, abortus, external ve internal lenfadenopati, posterior parezis, bilateral ve unilateral ekzoftalmus, diyare, konstipasyon, dispnea, kardiyovasküler bozukluklar ve iç organlarda fonksiyonel bozukluklar gözlenir (Roberts ve Carter 1981, Parodi 1987, Johnson ve Kaneene 1992).

Bovine Löykozis Virus ile enfekte 2 yaş ve altındaki genç hayvanlarda sporadik form, 3 yaş ve üzerindeki yetişkin hayvanlarda enzootik form şekillenir (Parodi 1987, Van Der Maaten ve Miller 1990, Johnson ve Kaneene 1992).

Hastalığın süt sığırlarında, et sığırlarından daha fazla görüldüğü bildirilmiştir (Brenner ve Trainin 1989a, APHIS 1999).

Ülkemizde bugüne kadar BLV enfeksiyonuna yönelik çeşitli serolojik ve hematolojik araştırmalar yapılmıştır (Kandil ve ark 1989, Şen ve ark 1995, Akça ve ark 1996, İyisan ve ark 1996, Batmaz ve ark 1999, Yavru ve ark 2002).

Bu araştırmada kapalı ve küçük çaplı özel işletmelerde ileri gebelik döneminde (7. ve 9. aylar arasında) bulunan 3 yaş ve üzerindeki sağlıklı görünümde Holstein ırkı süt sığırlarının kan ve süt serumu örneklerinde BLV spesifik antikorları serolojik yönden taranacaktır. Alınan kan örneklerinde antikor varlığı Agar-Jel İmmunodiffüzyon (AGID), süt örneklerinde antikor varlığı Enzim Linked Immunosorbent Assay (ELISA) testleriyle belirlenecektir. Araştırmada kullanılan aynı hayvanlardan Ethylendiamine Tetraaceticacide (EDTA)'li tüplere alınan kan örneklerinden Total lökosit sayımı, May-Grünwald Giemsa boyaması ve Alfa-Naftil Asetat Esterase (ANAE) enzim boyamaları ile hastalığa özgü kan parametrelerindeki değişimler ve T ve B lenfosit oranlarının dağılımı ortaya konacaktır. Ayrıca araştırmada BL enfeksiyonunun teşhisinde kullanılan AGID, ELISA serolojik testler ve hematolojik uygulamalar arasında korrelasyon, sensitivite ve spesifisite oranlarının belirlenmesi, enfeksiyonun yaşa, ilçelere ve bölgeye özgü prevalanslarının ortaya konması amaçlanmıştır.



## 2. LİTERATÜR BİLGİSİ

Löykozis terimi ilk kez Ellerman adlı araştırmacı tarafından kanatlılarda löykozis olgularını tanımlamak için kullanılmıştır. Daha sonra sığırlardaki klinik seyir tablosu, Avian Löykozis'e benzediğinden bu terim sığırlar için Bovine Löykozis (BL) olarak adlandırılmıştır. BL enfeksiyonu, sığırlarda doğal olarak şekillenen, lenfoid kanser, malign lenfoma, persiste lenfositozis ve lenfoid hücrelerin benign proliferasyonu ile karakterize bir hastalıktır. Pandemik seyirli olan BL enfeksiyonunun prevalansı sürülerde %60 ile 90 düzeyine ulaşabilir (Johnson ve Kaneene 1992).

Bovine Löykozis enfeksiyonu Olson ve Miller (1987)'in bildirdiklerine göre ilk olarak 1871 yılında Alman araştırmacılar Leisering ve arkadaşları tarafından bir sığırdaki dalak büyümesi ile karakterize bir hastalık olarak gözlenmiştir. Levy ve ark (1977) 1887 yılında Stewart adlı bir araştırmacının löykoz şüpheli bir inekte klinik olarak jeneralize formda lenf düğümlerinde büyüme ve splenomegali olgusunun varlığını tespit ettiğini bildirmişlerdir. Johnson ve Kaneene (1992) ilk kez 1969 yılında Miller ve arkadaşları lenfosarkomalı ineklerden hazırlanmış lenfosit hücre kültürlerinde BLV'nun C-tipi partiküllerini tespit ettiklerini belirtmişlerdir.

Türkiye'de BLV enfeksiyonunun varlığına ilk kez 1942 yılında A Ü Vet Fak Patoloji Kürsüsü ve Pendik Veteriner Araştırma Enstitüsü kayıtlarında rastlanmıştır.

Türkiye'de enfeksiyonun hematolojik parametrelere dayalı tanısı ilk kez Hakioglu (1962) tarafından yapılmıştır. Hakioglu ve Ulutaş (1968), Karacabey harasında bulunan lökozlu bir inekte yapılan otopside kalp ve abomazumda, Hakioglu (1968) aynı hara'da lökozlu iki inekte yapılan otopside uterusu tümör oluşumlarını gözlediklerini açıklamışlardır.

Kandil ve ark (1989) Güney ve Güneydoğu Anadolu bölgesinde 172 adet sığır kan serumunda BLV enfeksiyonunu AGID testi ile araştırmışlar ve sürü genelinde %24.6'lık pozitiflik tespit ettiklerini bildirmişlerdir.

Burgu ve ark (1990) 4047 adet sığır kan serumunda BLV'una karşı şekillenen antikorların varlığını ortaya koymak için AGID testini uygulamışlardır. Güney Anadolu ve Batı Anadolu bölgelerinde sırasıyla %29.63 ve %33.08'lik seropozitiflik tespit ettiklerini bildirmişlerdir.

Şen ve ark (1995) Bursa mezbahasında kesilen sığırlardan alınan kan serumlarında ELISA testiyle yapılan serolojik taramada %3.06 oranında seropozitiflik tespit etmişlerdir.

Akça ve ark (1996) kamuya ait 9 süt sığırcılığı işletmesinde BLV enfeksiyonunun serolojik açıdan varlığını ortaya koymak için 409 adet sığır kan serumunu AGID ve aynı hayvanlara ait süt serumunu ELISA testleriyle incelemişlerdir. Kontroller sonucu AGID testi ile %7.6 ve ELISA testi ile %14.4 seropozitiflik tespit etmişlerdir.

İyisan ve ark (1996) İstanbul il ve ilçelerinde bulunan toplam 1022 adet süt sığırında BLV enfeksiyonunun varlığını süt ve kan serumlarında araştırmışlardır. Araştırmacılar kan ve süt serumlarında ELISA ile sırasıyla %4.2 ve %4.0, AGID testi ile ise sırasıyla %2.9 ve %2.5 oranlarında seropozitiflik belirlediklerini ifade etmişlerdir.

Batmaz ve ark (1999) Marmara bölgesinin güneyinde bulunan sığırlardan topladıkları süt ve kan serumlarında ELISA ile EBL enfeksiyonuna karşı oluşan antikor varlığını araştırmışlar ve kan serumlarında %5.91, süt serumlarında ise %13.25 oranında seropozitiflik belirlemişlerdir.

Yavru ve ark (2002) Konya bölgesinde bulunan 1014 adet süt sığırından topladıkları kan ve süt serumlarında EBL enfeksiyonunun varlığını AGID ve ELISA testleri ile incelemişlerdir. Araştırmacılar kan serumlarında AGID testi ile % 4.14, süt serumlarında ELISA ile % 26.03 oranlarında seropozitiflik belirlemişlerdir.

## 2.1. Etiyoloji

Bovine Löykozis Virus'u Retroviridae familyasının oncornavirinae tip-C subfamilyasında yer almaktadır (Buxton ve Graser 1977). Uluslararası Viroloji Taksonomi Birliği (IVTA)'nin son raporlarında Retroviridae familyasının Deltaretroviridae ( $\Delta$  retroviridae) subfamilyası içerisinde Human T-lenfotropik virus (HTLV)'ları ile birlikte sınıflandırılmıştır (Murphy ve ark 1999).

Etken 100 nm çapında,  $9-12 \times 10^6$  dalton moleküler ağırlığında ve tek zincirli (+) RNA'ya sahiptir (Buxton ve Fraser 1977).

Bovine Löykozis Virus'u ile HTLV tip-1 ve tip-2 arasında antijenik yakınlık olduğu bildirilmiştir (Klintevall ve ark 1991, Gonda ve ark 1985). BLV'u zarlı, polimorfik, küresel ve 80-100 nm çapındadır. Zar yüzeyi çıkıntılıdır. Nükleokapsitleri isometrik ve nükleusu eşmerkezli'dir. Virus'un %2'sini nükleik asit, %60'ını protein, %35'ini lipid ve %3'ünü karbonhidratlar oluşturur. Genomik nükleik asit enfeksiyöz değildir. Bu virusun iç kısmında matrix proteini, çekirdeği koruyan kapsid, virus genomunu koruyan çekirdek formunda nükleokapsit bulunmaktadır. Virus olgunlaşma evresinde gag proteinini parçalayan proteaz, reverse transkriptaz enzim, pol geni tarafından kodlanmış ve provirusun integrasyonu için gerekli olan integraz enzimlerine sahiptir. Virus'a ait dış zar glikoproteini (en büyük virus



antijeni), yüzey glikoproteini ve olgun iç zar glikoproteini Transmembran glikoprotein (TM)'inden oluşmuştur. Dış zar glikoproteini (SU), virusun en büyük antijeni olup hücre reseptörlerine disülfit bağları ile tutunmadan sorumludur. TM'i ise zarda SU'ni tutar ve hücreye girişte membran füzyonundan sorumludur. Membranın iç kısmını şekilsiz matriks proteini oluşturur. Kapsid, toplam virus ağırlığının %33'üne tekabül eder. Elektronmikroskopi boyamalarında çekirdek kısmı konik şekilde açıkça görülebilirken, matriks ve kapsid amorf halde görülür. Virus'a ait genom zincir uzunluğu 8419 bp birimdir. Genom zincirindeki diziliş ise 5' UTR-gag-pro-pol-rex-env-tax-UTR 3' şeklindedir (Ghysdael ve ark 1984, Petropoulos ve Coffin 1997, Brenner ve Trainin 1989, Rovnak 1999).

Virus'un etere dirençli, non-glikolize polipeptid p24, p15, p12, p10, p70 çekirdek proteinleri ve etere duyarlı glikolize gp51 ve gp30 zar proteinleri vardır. (Ghysdael ve ark 1984, De Boer ve ark 1989, Johnson ve Kaneene 1992, Nguyen ve Maes 1993, Burny ve ark 1980).

Ultrasantrifügasyon, dondurma-çözme işlemleri, 56°C'de 30 dakika ısı uygulamaları ve pastörizasyon işlemlerinin virusun inaktive olmasına neden olduğu bildirilmiştir (Rubino ve Donham 1984, Chung ve ark 1986, Van Der Maaten ve Miller 1990).

+4°C'de saklanan kanda virus'un en az iki hafta süre ile varlığını sürdürebildiği, liyofilizasyon yöntemi ile korunmasına dair yapılan çalışmaların başarısızlıkla sonuçlandığı, viral zarının lipid içerdiğinden ötürü organik çözücülere, eter ve safra tuzlarına duyarlı olduğu, bazı dezenfektanlarla BLV üzerinde yapılan testlerde başarı sağlanamadığı, sadece ethyleneimine, N-acetyleneimine, hafif asit uygulamaları (pH 4.5), %0.5 fenol ve 1/4000'lik formalinin inaktivasyon işleminde etkili olduğu bildirilmiştir (Buxton ve Fraser 1977).

Bovine Löykozis Virus'u yavaş tümör gelişimiyle karakterize HTLV-1, 2, 3, kedi löykoz virusları, kedi sarkoma virusları, fare meme tümörü virusları, murine löykoz virusları, domuz sarkoma virusları, kanatlı löykoz virusları, kanatlı sarkoma virusları benzeri retroviruslar grubu içerisinde yer aldığı ve uzun bir inkubasyon periyodundan sonra Lökemi meydana getirdiği belirtilmiştir (Fenner ve ark 1987, Aksoy 1992, Petropoulos ve Coffin 1997).

Bovine Löykoz virionlarının zar glikoproteinleri ve konak hücrenin reseptörleri arasında meydana gelen reaksiyon sonucu virionların füzyon ile konak hücre içine girdiği bildirilmiştir (Fenner ve ark 1987, Aksoy 1992). Bovine Löykoz virionlarının zar glikoproteinleri ve konak hücrenin reseptörleri arasında meydana gelen reaksiyon sonucu virionların füzyon ile konak hücre içine girdiği bildirilmiştir (Fenner ve ark 1987, Aksoy

1992). Hücre sitoplazmasına bırakılan virion RNA'sı yapısında bulunan reverz transkriptaz enzimi ile DNA sentezlendiği belirtilmiştir (Fields ve ark 1996). Bu işlemin, RNA genomunun 5' ile başlayıp 3' ile sonlanan tek zincirinin uç uca eklenmesi ve reverz transkriptaz enzimi II yardımıyla gerçekleştiği açıklanmıştır (Petropoulos ve Coffin 1997, Rovnak 1999, Buxton ve Fraser 1977). Bu aktivasyonlar sonucu birbirine benzeyen birkaç yüz nükleotid sırasından oluşmuş çizgisel formda dsDNA'nın meydana geldiği ve çizgisel formda bulunan dsDNA'nın sitoplazmadan sirküle forma geçtiği nükleusa göç ettiği belirtilmiştir (Petropoulos ve Coffin 1997). Nükleusta sirküle halde bulunan dsDNA integraz enzimi ile parçalanıp, parça uçlarının hücre DNA'sının belirli bölgelerine entegre olduğu bildirilmiştir (Rovnak 1999). Bu yeni genetik yapının mRNA'ları ve RNA'ları uyararak, yeni protein sentezinin gerçekleştiği açıklanmıştır (Ghydsael ve ark 1984). Yeni sentezlenen viral proteinler ve viral nükleik asit bir araya gelerek virionu oluşturur. Virionun son evresi olan olgunlaşma fazında, env protein sentez esnasında endoplazmik retikulumun sisternasından girerek ve glikolize olduğu golgi kompleksine hareket ederek plazma membranına doğru yöneldiği ve tomurcuklanma ile hücre dışına çıktığı bildirilmiştir (Ghydsael ve ark 1984, Brenner ve Trainin 1989, Bolat 1995, Petropoulos ve Coffin 1997, Rovnak 1999).

Bovine Löykozis Virus ile diğer evcil hayvanlarda görülen Lökemi virusları arasında yapısal, fonksiyonel, antijenik özelliklerin benzerlik gösterdiği ve etkenlerin ortak bir soydan gelmiş retrovirusların yeni bir grubundan köken alabileceği bildirilmiştir (Brenner ve Trainin 1989, Van Der Maaten ve Miller 1990, Cann ve Chen 1996, Rovnak 1999).

Bovine Löykozis Virus'unun lenfositleri enfekte ettiği ve bu nedenle virusun özellikle lenfosit hücre kültürlerinde tespitinin yapılabildiği belirtilmiştir (Dhingra ve ark 1982). Ferrer ve ark (1972) ve Rovnak (1999), sığır hücre kültürlerinde (New Bolton Center (NBC)) tip-C viruslarının antijen varlığını immunofloresans testiyle (IF) belirlemişlerdir.

Cowley ve ark (1992) tarafından BLV ile enfekte sığırların periferik kan lenfositlerinden (PBL) hazırlanan hücre kültürlerinde BLV-antijenlerinin kantitatif olarak tespiti için basit bir ELISA testi geliştirilmiştir. Araştırmada, öncelikle virusun fütal kuzu böbrek hücre kültürlerinde saflaştırıldığı ve PBL hücre kültürlerinin ELISA testine adapte edildiği bildirilmiştir. Kullanılan metodun, seropozitif sığırların tespitinde basit ve güvenilir bir test olarak kullanılabilmesi açıklanmıştır.

Bovine Löykozis Virus enfeksiyonlarında; Canine Osteosarcoma D17, Cervical Carcinoma (HeLa) ve MDBK hücre kültürlerinin kullanılabilmesi bildirilmiştir (Ferrer ve ark 1974, Miller ve Olson 1987).

Ferrer ve ark (1974) NBC-13 tipi devamlı hücre kültürlerinde löykozlu bir ineğin periferal lökositlerinde C-tipi virusları izole ederek, presipitin antijen varlığını immunofloresans (IF), agar-jel immunodiffüzyon (AGID) ve elektronmikroskopi (EM) yöntemleriyle onaylamışlardır. Miller ve Olson (1987) lökosit hücre kültürlerinde BLV-tipC'nin kısa zamanda üretilip, izole edilebileceğini ve presipitin antijen varlığının ortaya konulabileceğini bildirmişlerdir.

Bovine Löykozis Virus'unun nontransforme hücre kültürlerinde syncytium meydana getirebildiği bildirilmiştir (Ferrer ve ark 1977). Ferrer ve ark (1977) BLV'ünü Bovine embriyonik dalak hücre kültürlerine (BESP) inokule ederek 10 kez pasajlamıştır. Bu şekilde virusun önemli ölçüde zayıflatıldığını ve syncytia oluşumlarının görüldüğünü belirtmişlerdir.

Bovine Löykozis Virus'un antijenik subtiplerinin olduğu bildirilmiştir (Van Der Maaten ve Miller 1990, Murphy ve ark 1999). BLV izolatları: BLV-American izolatu FLK (Mamoun ve ark 1990), BLV-American izolatu VDM (Mamoun ve ark 1990), BLV-Australian izolatu (Coulston ve ark 1990), BLV-Belgium izolatu LB285 (Mamoun ve ark 1990), BLV-Belgium izolatu LB59 (Mamoun ve ark 1990) ve BLV-Japanese izolatu BLV-1 (Sagata ve ark 1985) şeklindedir.

## 2.2. Epizootiyoloji

Avrupa'da yetiştirilen sığır (*Bos taurus*) ve zebu (*Bos indicus*) cinslerinin BLV'unun önemli konakçısı olduğu, BLV ile enfekte koyunlarda lenfosarkoma oluşumundan nadiren de olsa kayıplar meydana geldiği bildirilmiştir (Lorenz ve Straub 1987). Ayrıca Güney Amerika'daki su buffalosı, capybara ve rodentlerde enfeksiyonun serolojik olarak varlığı ortaya konulduğu ancak sığırlara göre prevalansının daha düşük oranda bulunduğu ifade edilmiştir (Lorenz and Straub 1987). Ancak kontrol programlarında, hastalığın diğer türlere geçtiği görüşüne yer verilmiştir. Bu yüzden enfeksiyonun enfekte sığır populasyonlarından diğer türlere geçişinin kene ve sokucu sinekler benzeri vektörler aracılığıyla olduğu bildirilmiştir (Buxton ve ark 1985). Özellikle kanda BLV ile enfekte hücrelerin persistent olarak görülmesi, diğer sokucu böceklerinde hastalık yayılımında göz önünde tutulması gerektiğini ortaya koymuştur. BLV ile enfekte sığırlardan beslenen ergin *Ixodes ricinus* cinsi kenelerin enfeksiyonun bulaşmasında rol oynadıkları, arthropodların yalnızca transport vektörler oldukları ve BLV'unun gerçek biyolojik vektörleri olmadıkları ifade edilmiştir (Buxton ve ark 1985).

Deneysel olarak BLV'u ile enfekte edilen koyunlarda, enfeksiyon oluşumunun başarıyla geliştiği ve enfekte edilen koyunlarda sığırlardan daha fazla lökemi ve iç organlarda

solid tümör gelişimi gözleendiği bildirilmiştir (Onuma ve ark 1984). BLV'u ile deneysel olarak enfekte edilmiş keçilerin ve domuzların serumlarında virus'a karşı gelişen antikorlar tespit edilirken, iç organlarda patolojik oluşumların gelişmediği gözlenmiştir (Baumgartener ve Olson, 1982). Enfeksiyonun deneysel olarak kanarya, geyik, guinea domuzları, fare, bildircin, evcil ve yabani tavşan, Sprague-Dawley ratları, kedi ve köpeklerde de oluşturulabildiği açıklanmıştır (Baumgartener ve Olson, 1982).

Johnson ve Kaneene (1992) bildiklerine göre, Baumgartener ve Olson (1982) adlı araştırmacıların 0.5-54 aylık bir sürede geyiklerde, evcil tavşanlarda, kedilerde, köpeklerde, pamuk kuyruk cinsi tavşanlarda ve ratlarda AGID testi ile persistent gp51 antikorunu tespit ettikleri, ayrıca Van Der Maaten ve Miller (1976) ve Romero ve ark (1984) adlı araştırmacıların şempanze ve antiloplarında BLV'una duyarlı olduğunu ve diğer maymunlarda da persistent enfeksiyon gelişimi gözledikleri ifade edilmiştir.

Buxton ve ark (1985) BLV'unu taşıyan 3 Anopheles sivrisinek türünde yaptıkları çalışmada, virus ile enfekte olan koyunlarda persiste lenfositosis gelişimini tespit etmişlerdir. Ayrıca Stomoxys calcitrans, Haematobia irritans, Chrysops ve Tabanus atratus cinsi sokucu sineklerle BLV'unun taşınabildiği bildirilmiştir (Weber ve ark 1988).

Romero ve ark (1984) Boophilus microplus türü kenelerin tropikal bölgelerde BLV enfeksiyonunun yayılımında etkili olduklarını bildirilmişlerdir. Araştırmada BLV enfeksiyonu yönünden pozitif olduğu tespit edilen bir sığırdan alınan kan örneğinden 4 adet BLV-seronegatif koyuna  $4 \times 10^6$  miktarında lökosit subkutan yolla inokule edildiği ve 4 hafta inkubasyon süresi sonunda AGID testi ile koyunların 2 tanesinde BLV'unun gp51 proteinine karşı antikor gelişimi gözlenirken diğer 2 koyunda da antikor tespiti yapılamadığı ifade edilmiştir. Ayrıca enfekte koyunların lökosit hücre kültürlerinde çok az miktarda tip C viral partiküller gözleendiği belirtilmiştir (Romero ve ark 1984). Johnson ve Kaneene (1992) bildirdiklerine göre, Kaaden ve ark (1982) BLV ile enfekte sığırların bulunduğu yerlerde Ixodes ricinus cinsi keneleri ortama bıraktıklarında, enfekte sığırlardan kan emen kenelerde IF ve ELISA testleri ile BLV-p24 antijeni tespit etmişlerdir. Deneysel çalışmalarda kenelerin BLV'unu taşıyıp ve aktarımını sağladığı ortaya konmuş olmasına rağmen, saha şartlarında bu yönlü bir çalışma yapılmadığı bildirilmiştir (Buxton ve ark 1985).

Bulaşmada en önemli yol, enfekte sığırlardan sağlamlara direkt kontakt yolla olan aktarımdır (Evermann ve ark 1987, Van Der Maaten ve Miller 1990). Virusun, en fazla kandaki lenfositlerde bulunduğu ve lenfositler aracılığıyla bir sığırdan başka bir sığıra geçiş yaptığı açıklanmıştır (Dimmock ve ark 1991). Lenfositlerin hayvanlara bulaşmasında insektlerin, kan emici ektoparazitlerin, travmaya bağlı oluşan yaraların, hatalı yapılan rektal

palpasyonların, boynuz kesme işlemlerinin, kastrasyon uygulamalarının, infertilite için yapılan tedavi uygulamalarının, kontamine aletlerle cerrahi müdahalelerin, kulak numarası takma veya deriye yapılan dövme işlemlerinin, kontamine iğnelerle yapılan aşılama ve kan alma uygulamalarının, hatalı yapılan suni tohumlama işlemlerinin ve intradermal tüberkülin uygulamalarının etkili olduğu ifade edilmiştir (DiGacomo ve ark 1985, Lucas ve ark 1985, Evermann ve ark 1987, Straub 1987, Brenner ve Trainin 1989, Lassauzet ve ark 1990).

Virus, kandaki lenfositlerden başka BLV ile enfekte kan içeriği bulunduran süt, kolostrum ve tümör kitlelerinde de tespit edilmiştir (Lassauzet ve ark 1989, Chung ve ark 1986). Doğal şartlarda bulaşmada sütün ve kolostrumun önemli bir rolü olduğu bildirilmiştir (Chung ve ark 1986, Ferrer ve ark 1981). Buzağuların enfekte kolostrum ile beslenmeleri sonucu enfekte olabilecekleri ancak kolostrumdaki spesifik antikorların varlığı ve interferon gibi antikor olmayan faktörlere bağlı olarak enterik antiviral savunma mekanizmaları ile korunabileceği belirtilmiştir (Lassauzet ve ark 1989, Johnson ve Kaneene 1992, APHIS 1999).

Enfekte hayvanların salya, idrar, feçes, tracheal-bronchial sekresyon, burun akıntısı ve soluk alınıp verilmiş hava örneklerinin BLV antijenini içerdiği fakat kan, süt, kolostrum ve tümör kitlelerinden daha az miktarda bulaşma sağladığı açıklanmıştır (Straub 1987, Dimmock ve ark 1991, Çarlı ve ark 1993). Virusun semende bulunmadığı ve suni tohumlamanın bir bulaşma yolu olmadığı ancak hatalı suni tohumlama ve rektal muayene uygulamaları sonucu semenin, üretranın, rektuma yakın cinsel bezlerin ve uterus sıvılarının enfekte kan ile kontamine olmasıyla enfeksiyonun kolayca bulaştırılabileceği bildirilmiştir (Monke 1986, Wentink ve ark 1993, Kaja ve ark 1984). BLV'unun embriyoda bulunan zona pellicida tabakası nedeniyle embriyonun transfer işlemlerinde ve embriyonun gelişim safhalarında etkili olmadığı ifade edilmiştir (Kaja ve ark 1984, DiGiacomo ve ark 1986, Straub 1987a, Bielanski 2000).

En ilgi çekici rapor, İsveç'te BLV ile enfekte sığırlardan hazırlanmış piroplazma aşılılarıyla EBL enfeksiyonunun yayılması (Hugoson ve ark 1968) ve benzer şekilde eski Batı Almanya'da BLV'unun sığırlardan koyunlara aktarımı üzerine yapılan uygulamalardır (Straub 1987a). Enfeksiyon dermal veya aerosol olarak bulaştığı bildirilse de, öncelikli olarak enfekte kan hücreleriyle yayılım göstermektedir (Weinhold ve Straub 1968). Enfeksiyona duyarlılık yollarının intradermal, intramuskuler, intravenöz, intraperitoneal, intranasal, intrauterine, aerosol ve oral olduğu bildirilmiştir (Evermann ve ark 1986, Van Der Maaten ve Miller 1990).

Johnson ve Kaneene (1992) çiftliklerde sığırlar arasında görülen tümörler ile BLV enfeksiyonları arasında herhangi bir direkt korrelasyon görülmediğini ve BLV'unun insanlarda belirlenmesi için yapılan serolojik ve virolojik çalışmalarda (Priester ve ark 1970, Henriksen ve Jensen 1971, Henricson ve Ringertz 1968) negatif sonuçlar elde edildiğini ifade etmişlerdir.

Enzootik Bovine Lökozis enfeksiyonu antikör pozitif sığırlardan kullanılan çiğ sütlerin insanlarda lökemi meydana getirmedeğini ve bunun nedenini sütün pastörizasyonla BLV'unun inaktive olmasına bağlamışlardır (Evermann ve ark 1987). Ancak bazı araştırmacılar (Rubino ve Donham 1984, Sarkar ve Moore 1973, Dmochowski 1973, Schlom ve ark 1975, Donham ve ark 1987) enfekte süt hücrelerinde proviral BLV DNA'sının biyolojik aktivitesini pastörizasyon işleminin inaktive edemediğini ve insanlarda gözlenen akut lenfoid lökemi (ALL) ve meme kanseri ile BLV enfeksiyonu arasında bir ilişkinin olduğu görüşünü savunmaktadırlar.

Her ne kadar BLV'unun hayvandan insana ya da insandan hayvana geçip geçmediğine dair herhangi bir kanıt olmamasına rağmen BLV ile HTLV-1, 2, AIDS (Acquired Immunodeficiency Syndrome) ve Maedi Visna Virus (MVV) arasında genetik bir ilişkinin ve antijenik yakınlığın olması nedeniyle bu konuda şüphelerin devam edeceği açıklanmıştır (Gonda ve ark 1985, Walrand ve ark 1986, Donham ve ark 1987, Van Der Maaten ve Miller 1990, Cann ve Chen 1996).

Bovine Löykozis Virus enfeksiyonları tüm dünyada sığırlar arasında yaygındır. Amerika Birleşik Devletleri (U.S.A)'nde 1975-1980 yılları arasında %14-66, Kanada da 1979-80 yılları arasında %1-59.6, Brezilya da 1981-83 yılları arasında %40.8, Fransa da 1976-77 yılları arasında %0.7-55, İtalya da 1979 yılında %2.6-9.7, Yugoslavya da 1980 yılında %21.4, Yunanistan da 1981-82 yıllarında %0.6, Macaristan da 1984 yılında %0-100 arasında, Batı Almanya da 1979-1983 yılları arasında %0.16-10.6 ve Japonya da 1974-1978 yıllarında %3.3-52.1 arasında BLV (+) prevalans tespit edildiği bildirilmiştir (Lorenz ve Straub 1987, Burny ve ark 1980).

Bovine Löykozis enfeksiyonunda en çok horizontal yolla bulaşma gözlemlendiği (Evermann ve ark 1987) ve vertikal yolla bulaşmanın nadiren şekillendiği belirtilmiştir (DiGiacomo ve ark 1985). DiGiacomo ve ark (1986) BLV ile enfekte sığırlardan uterus yoluyla yavruların enfekte olabilme riskinin %20'den çok düşük düzeylerde gerçekleşebileceğini açıklamıştır. BLV enfeksiyonunda maternal-fetal bulaşma mekanizmasının tam olarak anlaşılmadığı fakat BLV'unun gebelik esnasında annede aralıklı olarak gelişen immunsupresyon nedeniyle sekresyonlarla yayılabileceği bildirilmiştir

(Evermann ve ark 1987). Pelzer ve Sprecher (1993) gebelik esnasında BLV ile enfekte ineklerden %8 oranında enfekte buzağı doğduğunu ve buzağılarda kolostrum almadan önce enfeksiyona karşı şekillenen antikörlerin tespit edilebileceğini belirtmişlerdir. Gebelik esnasında, plasental bariyeri geçen BLV ile enfekte lenfositlerin fetusu enfekte ettiği ve BLV ile enfekte annelerden %17 oranında enfekte buzağı doğduğu açıklanmıştır (Roefeldt 1999). BLV'unun yalnızca lenfosit hücrelerini hedef alarak, enfeksiyonu sadece enfekte lenfositlerle yapacağı bilinmektedir (Schwartz ve ark 1994). Bu yüzden buzağuların enfekte lenfositleri içeren kolostrum veya sütler ile beslenmeleri sonucu enfekte olabilecekleri bildirilmiştir (Brenner ve Trainin 1989). Doğumdan sonra 4 veya 6 ay'a kadar ve kolostrumdaki antikör seviyesinde azalma gözlenene dek buzağuların enfekte kolostrum ve sütlerle beslenmemesinin uygun olacağı belirtilmiştir (Evermann ve ark 1987). BLV'unun genç hayvanlar arasında gelişme dönemlerinde alınmasından ötürü düşük, yetişkin döneme ulaştıklarında yüksek enfeksiyon prevalansı elde edildiği bildirilmiştir (Laussauzet ve ark 1989).

Amerika Birleşik Devletleri (U.S.A)'nde BLV enfeksiyonunun prevalansı sütçü sığırlar arasında etçi sığırlardan daha yüksek oranda gözleendiği bildirilmiştir (Roberts ve Carter 1981). Brenner ve Trainin (1989a) İsrail'de yaptıkları araştırmada, BLV enfeksiyonunun prevalansını et sığırlarında %5.5, süt sığırlarında %18-25 olarak saptamışlardır. BLV enfeksiyonunun seroprevalansını belirlemek için yapılan çalışmalarda U.S.A'da süt sığırlarında %20, Kanada da %6-11, Fransa da %27 ve Venezuela da %37'lik oranlar tespit edildiği rapor edilmiştir (Lorenz ve Straub 1987, APHIS 1999, Brenner ve Trainin 1989). BLV enfeksiyonunun prevalansı ile hayvanlara ait genetik faktörlerin, yaşın, bölgesel konumun, uçucu sineklerin yoğunluğunun, bakım ve yetiştirme koşullarının ilişkili olduğu ifade edilmektedir (Lorenz ve Straub 1987).

Bovine Löykozis Virus ile enfekte hayvanlarda tümörlerin gelişimi üzerinde genetik faktörlerin etkili olabileceği ve tümör şekillenmesinde genetik duyarlılığın etkili olacağı belirtilmiştir (Ghysdael ve ark 1984, Van Der Maaten ve Miller 1990, Johnson ve Kaneene 1992, Alberts ve ark 1994a, Kabeya ve ark 2001). Yamamoto ve ark (1984) BLV genomunda meydana gelen genetik bir mutasyon ile virusun onkojenik forma dönüştüğünü ve bu sayede tümör gelişiminin başladığını açıklamışlardır.

### 2.3. Patogenez

Organizmaya lenfositlerle giren virusun, lenfositler içerisinde replikasyonun başladığı ve in vitro ortamlarda da benzer davranışlar gösterdikleri bildirilmiştir (Ferrer ve ark 1974). Virus replikasyonunun, erken dönemlerde spesifik lenfoid bölgelerde meydana geldiği, enfeksiyonun başlangıçta uzun bir viremi tablosu oluşturmadığı ve birkaç hafta içinde lenfoid dokulara yerleştiği belirtilmiştir (Ghysdael ve ark 1984). Virusun enfekte sığır kanında birkaç gün içinde görülebileceği, virusa karşı gelişen spesifik antikorların tespit edilebileceği ve kanın enfeksiyonda en önemli potansiyel bulaşma kaynağı olduğu açıklanmıştır (Schalm ve ark 1975, Evermann ve ark 1987).

Deneysel olarak yapılan replikasyon çalışmalarında virusun bölgesel lenf yumrularında, kemik iliğinde, timusta ve dalakta üremediği ve 13.-15. haftalar arasında lenfositlerden tekrar izole edilebildiği bildirilmiştir (Straub 1987).

Ferrer ve ark (1981) tarafından lenfositozisli seropozitif sığırların, duyarlı hayvanlar için büyük bir virus kaynağı olabileceği bildirilmiştir. Araştırmada doğal enfekte sığırlardan alınan periferik kan lenfositlerinde BLV'unun varlığını belirlemek için syncytium enfektivite (SI) ve AGID testleri kullanılarak, AGID testi ile antikor varlığında %96 ve SI testi ile antijen varlığında %98 pozitiflik tespit etmişlerdir.

Enfeksiyonunun özellikle tropikal ve subtropikal bölgelerdeki insekt ısırmalarıyla da oluştuğu gözlenmiştir (Buxton ve ark 1985). Doğal ve deneysel uygulamalarda; sivrisinekler (farklı 4 türü), tabanidler (farklı 5 türü), keneler (*Boophilus microplus*, *Ixodes ricinus*, *Tabanus fuscicostatus*, *Tabanus atratus*, *Tabanus nigrovitatus*) ve uçucu sineklerin (*Stomoxys calcitrans*, *Haematobia irritans*, *Chrysops* sp.) BLV enfeksiyonunu bulaştırdıkları bildirilmiştir (Romero ve ark 1984, Buxton ve ark 1985). BLV'unun insektlerle transferinde; 1- Beslenen insektin ağızında kalan kan miktarına 2-Enfeksiyonu taşıyan sığırın enfektivitesine 3-Enfeksiyonu alan hayvanın duyarlılığına 4-Beslenme habitatı ve vektörün diğer özelliklerinin önemli olduğu rapor edilmiştir (Romero ve ark 1984, Buxton ve ark 1985, Weber ve ark 1988, Johnson ve Kaneene 1992). BLV enfeksiyonunun, mevsime göre değişim göstermediği, BLV'unun insidens hızı ile bütün aylar arasında herhangi bir fark olmadığı bildirilmiştir (Romero ve ark 1984, Buxton ve ark 1985, Brenner ve Trainin 1989).

Bovine lökkozis enfeksiyonunun zoonoz bir potansiyel oluşturup oluşturmadığı konusunda bir muammanın devam ettiği belirtilmiştir (Straub 1987a). Enfekte kan lenfositlerini içeren sütlerin kullanılması ile enfeksiyonun insanlara geçebileceği şüphesinden dolayı Straub (1987a) 145 kişiyle enfekte sığırları kontakt ilişkiye tabi tutarak ve 30 BLV-



enfekte sürüden alınan pastörize olmamış sütlerden deneklere içirmişlerdir. Kontrollerde seropozitif sığırlardan insanlara virus geçişi olmadığını belirtmişlerdir. Johnson ve Kaneene (1992) bildirdiklerine göre, Olson ve Baumgartener (1975) Winconsin eyaletinde BLV enfeksiyonu üzerinde çalışan 80 veteriner ve 15 laboratuvar elemanını AGID testi ile p24 antikorları yönünden taranmışlar fakat sonuçların negatif olduğunu bildirilmişlerdir. Deneysel olarak, BLV'unun sütün pastörize edilmesiyle inaktive olmasına rağmen enfekte sığırların sütlerinde BLV partiküllerinin tespit edildiği bildirilmiştir (Blazevic ve ark 1994). Ancak insan lökemi veya lenfoması ile BLV arasındaki genomik benzerlik nedeniyle enfeksiyonun insanlar için risk oluşturabileceği hipotezini ayakta tuttuğu ifade edilmiştir (Rubino ve Donham 1984, Straub 1987).

Bovine Löykozis Virus'unun, sellüler onkojenler (sarkoma virusları) gibi transformasyonu sağlayan genomları taşımadıkları, konak genomunda bulunan spesifik bölgelerde de entegrasyon oluşturmadıkları fakat hücre genomunda çeşitli bölgelerde integre olduğu, genlerinden birinin entegrasyon bölgelerinden belirli bir uzaklıkta inaktivasyonu sağlayan hücresel genlerin üretimini yaptığı ve malignant transformasyonlar meydana getirdiği bildirilmiştir (Buxton ve Fraser 1977, Ghysdael ve ark 1984, Cowley ve ark 1992, Johnson ve Kaneene 1992).

Bovine Löykozis Virus'u, yapılan uzun araştırmalar sonucu koyunlarda, sığırlardan daha çok onkojenik etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Portetelle ve ark 1991). Bu durum, ruminant türlerinin onkojenitesinde meydana gelen farklılıkların belirlenmesi açısından bir ipucu oluşturabileceği belirtilmiştir (Yamamoto ve ark 1984, Schwartz ve ark 1994).

#### **2.4. Patoloji**

Patologlar tarafından löykoz'un tanımı "dokuda şekillenen lökosit çoğalması" veya kontrol edilemeyen proliferasyon (örneğin, neoplasia) durumlarını göstermek için kullanılmıştır (Parodi 1987). BL'in, lenfoid hücrelerde görülen malign neoplastik bir hastalık olduğu, sığırlarda primer kemik iliğinin olaylara karışmasının çok nadir olarak görüldüğü bildirilmiştir (Parodi 1987). Bu enfeksiyon için tümör formları (lenfosarkoma (LS) ya da malign lenfoma (ML) ve persistent lenfositosis'i içine alan bir tanım kullanıldığı belirtilmiştir (Ferrer ve ark 1974). BLV enfeksiyonunda sık olarak gelişen tümör formlarının; lenfosarkomatozis, lenfomatozis ve lenfadenozis olduğu ifade edilmiştir (Parodi 1987). Uluslararası Bovine Löykozis Komitesi (ICBL), epidemiyolojik ve klinik görüntülere dayanarak yaptığı çalışmalarda BLV enfeksiyonunun, Enzootik Bovine Löykozis (EBL) ve Sporadik Bovine Löykozis (SBL) şeklinde sınıflandırıldığını bildirmiştir (Anonymous 1968).

Enzootik Bovine Löykozis formunda, sadece yetişkin sığır lenfosarkomasının (Adult multisentrik tip veya adult lenfosarkoma) (ALS) yer aldığı, Sporadik Bovine Löykozis formunda calf multisentrik tip veya calf lenfosarkoma (CLS), timik tip veya timik lenfosarkoma (TLS) ve skin löykozis veya skin lenfosarkoma (SLS) alt form tipinin görüldüğü bildirilmiştir (Anonymous 1968).

Parodi ve ark (1987) bildirdiğine göre, Bendixen (1965) klinik ve patolojik özellikleri açısından lenfosarkomaları 4 tipe ayırmıştır. Buna göre, Calf formunun genellikle 6 aydan daha küçük buzağılarda görüldüğü ve en belirgin özelliğinin generalize bir yapıya sahip olduğu, hayvanın hemen hemen tüm lenf nodüllerinin büyüdüğü, nekroskopide karaciğer, dalak ve kemik iliğinde lenfoid tümör hücre infiltrasyonlarının gözlemlendiği, nadir olarak bu duruma 2-3 yaşındaki hayvanlarda da rastlanabileceği belirtilmiştir. İkinci form olan timik lenfosarkoma'nın, 6-18 aylık danalarda meydana geldiği, aynı zamanda torasik lenf nodüllerinin büyüebilmesine rağmen primer tümör karışımının timus ile sınırlı olduğu belirtilmiştir. Üçüncü form olan skin ya da deri löykozunun, klinik yönden iyileşmenin olabileceği tek bovine lenfosarkoma formu olduğu, bu tümörlere genellikle lenfadenopatilerin eşlik ettiği ve 1-3 yaşındaki genç sığırlarda görüldüğü, lezyonların sadece birkaç hafta ya da ay devam ettiği ve daha sonra gerileme süreci gösterdikleri bildirilmiştir. Van Der Maaten ve Miller (1990), deri löykoz formundaki sığırlarda lezyonların iyileşmesinden sonra sığırların 12 yıl boyunca sağlıklı kaldıklarını belirtmişlerdir.

Parodi (1987) bildirdiğine göre, Bendixen (1965) dördüncü lenfosarkom formu olan yetişkin (adult) löykozunda, 5-18 yaşlarındaki sığırlarda en yüksek insidense ulaşmakla birlikte 2 yaşın üzerindeki sığırlarda da görüldüğünü, çok sık periferik lenf nodüllerinin bir ya da birkaçında gözle görülebilir şekilde büyüme şekillendiğini, retrobulbar lenfoid dokunun enfekte olması sonucu korneal ülserasyonlar meydana geldiğini ve gözün dışarı doğru çıkmasına (eyeball) neden olduğunu, rektal muayene esnasında retroperitoneal bölgelerde büyümüş nodüllerin ve tümör kitlelerinin tespit edildiğini, klinik muayenede lenfadenopati gözlenmediğini, mezenterik veya retroperitoneal lenf nodüllerinde internal tümörlerin bulunduğunu, beyaz pulpada tümör hücrelerinin proliferasyonu sonucu dalakta kitle büyümesi meydana geldiğini, dalak kapsülünün yırtılması ve internal hemoraji sonucu ölüm görüldüğünü, lenf dokularının sert olmalarından ötürü oluşan kitlelerden etkilenmediğini, kalbin sağ atriumunda tümöral oluşumlar gözlemlendiğini, abomazum, böbrek ve uterus mukozal yüzeylerde gözle görülebilir ülserasyonlar oluştuğunu, nörolojik belirtilerde ve felç olgularında beyin ve spinal kord'un incelenmesi gerektiğini ifade etmiştir.

Burny ve ark (1980) makroskopik ve mikroskopik muayenelerle tümörden şüphelenilen lezyonlarda incelemelerin yapılmasıyla lenfosarkoma teşhisinin, neoplasia (anaplasia, yayılmalar, devamlı çoğalma, metastaz, vb..) ve hücre farklılaşması (retikular, lenfoblastik, lenfositik) açısından sınıflandırılmanın yapılabileceğini belirtmişlerdir.

Bovine Löykozis Virus ile enfekte sığırların %30-70'inde persiste lenfositosis, %0.1-10'unda ise tümör oluşumları gözleendiği bildirilmiştir (Ghysdael ve ark 1984). Bu yüzden perifer kanda bulunan lenfositlerin sayımları yapılarak BLV enfeksiyonunun teşhisinin yapılabileceğini ancak serolojik metotlarında kullanılmasının gerekli olduğu bildirilmiştir (Engvall ve ark 1989, Brenner ve Trainin 1989a).

Parodi (1987) bildirdiğine göre, BL enfeksiyonunda tümörlerin genellikle lenf nodüllerinde lokalize olduğunu belirtmişlerdir. Buna göre lenf nodüllerinin % 76-100'ünde generalize formda şekillenen lezyonlar, lenf nodüllerinin %26-75'inde dissemine formda şekillenen lezyonlar, lenf nodüllerinin %1-25'inde lokalize formda şekillenen lezyonlar olarakda sınıflandırmışlardır.

Burgu ve ark (1990) BLV ile enfekte sığırlarda en fazla tümör gelişiminin olduğu lenf nodüllerinin %65-85 oranında iliak nodüller, %62-74 oranında intratorasik nodüller, %66 oranında mezenterik nodüller ve %41-62 oranında servikal bölgedeki superficial nodüller olduğunu bildirmişlerdir.

Bovine Löykozis enfeksiyonunda lenf nodüllerinde oluşan tümörlerin diffuz halde yayılım gösterdiği ve çaplarının cm'nin onda birine ulaşabildiği bildirilmiştir (Schalm ve ark 1975, Koyama ve ark 1992). Tümör dokularının homojen, yumuşak, nemli, gri-beyaz renkte ve nadiren nodüler tarzda olduğu, bazen hemorajik ve nekrotik bölgelerin görülebildiği, kapsülün yırtılması sonucu nodüllerin etraftaki dokulara yayılım gösterebildikleri belirtilmiştir (Schalm ve ark 1975). Dalakta %10-50 oranında tümörlerin oluştuğu, dalak medullasının kırmızı, yumuşak ve patlamış gri granülasyonlar içerdiği, timus mediastinumunda infiltrasyonların, farengial tonsillerde düzensiz formların, kemik iliğinde az miktarda medullar infiltrasyonların, hemo-lenfopoetik organların parenşiminde tümöral oluşumların, karaciğerde büyümenin (%30-40) ve sarı-gri renkte mermer şeklinde hat oluşumlarının, kalpte atrial duvarlarda ve sağ bölümünde tümör oluşumlarının, subplöral ve peribronşial bölgelerde nodüler oluşumların, abomazumda (%57-84) neoplastik nodüllerin, uterusunda unilateral veya bilateral tümörler sonucu endometriyum-myometriyumun, böbreklerde ve sidik kesesinde diffuz veya nodüler tümörler sonucu hidronefrozisin, perikardiyumda, seröz zarlarda ve iskelet kaslarında tümörlerin, lumbal bölgedeki epidural boşlukta neoplastik tümör yumruların, retro-orbital tümörlerin, dermis tabakasında

subkutanöz lezyonların, gebe ineklerde plasenta infiltrasyonu ve barsaklarda belirgin olmayan lezyonların görüldüğü rapor edilmiştir (Hakioğlu 1968, Hakioğlu ve Ulutaş 1968, Ferrer ve ark 1974, Schalm ve ark 1975, Buxton ve Fraser 1977, Ghysdael ve ark 1984, Mammerickx ve ark 1985a, Parodi 1987, Olson ve Miller 1987, Bolat 1995).

Burgu ve ark (1990) lenfosarkomalı 80 adet sığırdan yapmış oldukları çalışmada, nodüler lenfositik infiltrasyonların lenf nodüllerinde, dalakta, karaciğerde, abomazumda, barsaklarda, böbrekte ve kalpte görüldüğünü bildirmişlerdir.

Sparling (2000) adlı araştırmacı 6 yaşlı Holstein x Simmental melezi bir inekte serolojik testler yardımıyla BLV varlığını tespit ederek yaptığı nekropski sonucunda hayvanın sol böbreğinde, üreterinde ve myocardiumunda lenfosarkoma lezyonlarını tespit ettiğini ve bu organları histolojik yöntemlerle de kontrol ettiğini bildirmiştir.

## 2.5. Histopatoloji

Enzootik Bovine Löykozis (EBL) enfeksiyonunda, lenf nodüllerinde diffüz bir gelişme veya nadiren de olsa folliküler (nodüler) tarzda bovine lenfosarcoma (BLS) ya da bovine malign lenfoma (BML) tümörlerinin şekillendiği belirtilmiştir (Parodi 1987).

Parodi (1987) bildirdiğine göre, Rappaport (1966) isimli araştırmacı bovine lenfosarkomalarında: ML-lenfoplasmositik/lenfoplasmasitoid (LP immunositoma), ML-sentroblastik/sentrositik, ML-sentroblastik monomorfik alt tip, ML-sentroblastik polimorfik alt tip, ML-plazmablastik olmaksızın immunoblastik farklılaşma, ML-lenfoblastik sarılmış hücre tipleri, ML-lenfoblastik sarılmamış hücre tipleri ve ML-belirlenmiş hücre tiplerinin oluştuğunu açıklamıştır.

Bovine Lenfosarkoma'nın farklı formlarında oluşan tümör hücrelerinin ayırtedilmesinde hücre membran reseptörlerinin, yüzey immunoglobülin (sIg)'lerinin ve eritrosit amboseptör komplemant reseptör (EAC)'lerinin kullanıldığı belirtilmiştir (Kajikawa ve ark 1983). Bu reseptörlerin belirlendiği metotlarla Calf Lenfosarkoma (CLS), Timik Lenfosarkoma (TLS)'nin, Skin Lenfosarkoma (SLS) formları, sIg ve EAC reseptörleri ile B ve T lenfosit tiplerinin tespit edilebildiği bildirilmiştir (Takashima ve ark 1977).

Tümör Associated Antijen (TAA)'inin, BL'li hayvanların tümör hücrelerinde ve herhangi bir lenfosarkom olgusu göstermeyen BLV ile enfekte sığırların lenfositlerinde tespit edildiği bildirilmiştir (Onuma ve Olson 1977).TAA'i ile Persiste Lenfositozis (PL)'li veya lökemi/lenfoma gelişimi gösteren sığırlar arasında korrelasyon görülmesi nedeniyle, PL'li veya lökemi/lenfoma gelişimi gösteren sığırların teşhisinde BLV kontrol programının bir

kısımında TAA'ine bakılabileceği açıklanmıştır (Schalm ve ark 1975, Parodi 1987, Johnson ve Kaneene 1992).

## 2.6. Hematoloji

Bovine Löykozis Virus ile enfekte hayvanların kan hücrelerindeki değişimlere bağlı olarak PL, Lökemi ve non-spesifik durumlar geliştiği bildirilmiştir (Schalm ve ark 1975).

Persiste Lenfositozis'in, "löykoz'dan arındırılmış bir sürüde bulunan sağlıklı hayvanların ortalama kan lenfosit değerlerindeki 3 kat ve üzeri artışlar" olarak tanımlandığı ve 3 aydan daha fazla persiste olan hayvanın dolaşımındaki lenfositlerin sayısındaki artış ile karakterize olduğu açıklanmıştır (Anonymous 1968).

Paul ve ark (1979) BLV'unun onkojenik B-lenfositotropik retrovirus olduğunu saptamışlardır. Buna göre BLV yönünden seropozitif olarak tespit edilen sığırların %30-70'inde B lenfositlerdeki artışa bağlı PL şekillendiği bildirilmiştir (Brenner ve Trainin 1989, Taylor ve ark 1992). PL şekillenen hayvanların %10-15'inde tümoral oluşumlarla seyreden lenfosarkomalar görüldüğü ve lenfosarkoma görülen hayvanların bir kısmında ise PL'in gelişmediği belirtilmiştir (Ferrer ve ark 1981, Çarlı ve ark 1992).

Persiste Lenfositozis döneminde bulunan lökozlu sığırlarda herhangi bir klinik semptom gözlenmediği ve hematolojik muayenelerde lenfositozis'e bağlı lökositozis şekillendiği belirtilmiştir (Hakioğlu 1962). BLV ile enfekte lenfosarkomalı hayvanlarda lenfosit oranlarının %65'e hatta %90'nın üzerine çıktığı, total lökosit sayısının  $\text{mm}^3$ 'de 18.000 ve üzerinde seyrettiği rapor edilmiştir (Hakioğlu 1962, Batmaz ve ark 1999).

Bovine Löykozis enfeksiyonunda, PL ve lenfosarkoma dönemlerini belirlemede lenfositozis ve lökositozis değerleri kriter olarak kullanılmaktadır (Schalm ve ark 1975).

Persiste Lenfositozis döneminde bulunan genç hayvanların lenfositleri genel olarak normal formda bulunduğu ancak ileri yaş gruplarındaki hayvanlarda atipik ve anormal formlara dönüştükleri bildirilmiştir (Anonymous 1968). PL döneminde bulunan hayvanların kan dolaşımındaki lenfositlerde ve özellikle B hücrelerinde artışların görüldüğü ve bu artışların belirlenebilmesi için sIg veya Fc membran reseptörlerinin tespitine gidilmesinin gerekli olduğu vurgulanmıştır (Parodi 1987).

Kan dolaşımında tümör hücrelerinin var olduğu ve lenfosarkomaların görüldüğü dönemlerde, BLV enfeksiyonu Bovine Lenfosarkoma Lökemi (BLSL) şeklinde isimlendirilmiştir (Parodi 1987). Parodi (1987) bildirdiğine göre, Bendixen (1965) BLSL'de,  $1 \text{ mm}^3$ 'deki lenfosit sayısının 20.000-30.000, bazı durumlarda 50.000-100.000 veya 400.000-500.000 olabileceğini, şekillenen tümör tiplerinin, lymphoidositler veya polymphositler,

rieder form hücreleri, tümör hücreleri ve lenfoblastik hücreler/paralenfoblastlar olduğunu ve sIg+kan lenfosit oranında ve B hücrelerinde artışların, eozinofili ve anemi gibi hematolojik değişimlerle birlikte kemik iliğinde de lezyonlar görülebileceğini ifade etmişlerdir.

Bovine Löykozis enfeksiyonunun sporadik formunda PL olgusunun oluşmadığı, lökemik hücrelerin ne B hücreleri ne de T hücreleri olarak belirlendiği ve Juvenile formunda lenfoid hücrelerin sayısında ve anormal hücre miktarında artışların tespit edildiği bildirilmiştir (Takashima ve ark 1977).

## 2.7. Klinik

Sığır Löykozis'inde, prelöykoz (tümörsüz) ve klinik olarak tanımlanabilen löykoz diye adlandırılan iki evrenin bulunduğu bildirilmiştir (Olson ve Miller 1987).

İyisan ve ark (1996) bildirdiğine göre, Lucas (1995) Office International des Epizootique (OIE) raporlarında BLV enfeksiyonunun ergin sığırlar arasında kuluçka süresinin 4-5 yıl, inkubasyon periyodunun 7 ay ile 7 yıl arasında değiştiğini ve genellikle 4-6 yaş grubunda görüldüğünü ifade etmiştir. Hastalığın seyrinde genetik, immunolojik ve diğer faktörlerinde etkili olduğu açıklanmıştır (Burny ve ark 1980).

Hastalığın, deri formunda (2-3 yaşındaki sığırlarda) boyunda, sırtta ve uyluklarda 1-5 cm çapında görülen deri plaklarıyla, buzağı formunda (6 aylık danalarda) gittikçe artan ağırlık kaybı, halsizlik ve büyüyen lenf nodülleriyle, timik formunda (1-2 yaşındaki danalarda) kemik iliği ve bölgesel lenf yumrularında görülen lezyonlar şeklinde seyrettiği belirtilmiştir (Parodi 1987). Sığır sürülerinde, prelöykoz safhasında kan lenfositlerinin artışına bağlı olarak, %60-70 oranında kan tablosunun değiştiği ve bu evrenin 1 yıla yakın devam ettiği belirtilmiştir (Olson ve Miller 1987).

Hastalığın, klinik açıdan 2 yaş ve altındaki sığırlarda sporadik, 3 yaş ve üzerindeki sığırlarda enzootik formda görüldüğü, enfekte sığırların %30-70'inde persiste lenfositosis, %0.1-10'unda ise tümör oluştuğu bildirilmiştir (Brenner ve Trainin 1989a, Naif ve ark 1990).

Bovine Löykozis enfeksiyonunun Löykoz safhasında kan tablosunda değişim, lenfatik dokularda ve lenf yumrularında aşırı derecede büyüme, dalakta büyüme, solunum ve yutma güçlüğü, bilateral veya unilateral ekzoftalmus, felçler, kilo kaybı, süt veriminde azalma, bitkinlik, ödemler, eksternal ve internal lenfadenopati, posterior parezis, topallık, kısırılık, yüksek ateş, diyare, konstipasyon ve kardiyovasküler bozukluklar şeklinde klinik belirtilerin görüldüğü rapor edilmiştir (Roberts ve Carter 1981, Johnson ve Kaneene 1992, Bolat 1995).

Bovine Löykozis Virus enfeksiyonunun ilk dönemlerinde lenfositosis, immunoglobulin üretiminde anormallikler, enfekte hedef hücrelere sitotoksik cevaplarda

azalmalar ve klinik belirtilerin görülmediği rapor edilmiştir (Yamamoto ve ark 1984, Meiom ve ark 1985). Thurmond ve ark (1985), BLV ile enfekte sürülerle BLV ile enfekte olmayan sürüleri karşılaştırdıklarında, süt üretiminde ve reprodüktif yaşam uzunluğunda iki sürü arasında fark gözlemediklerini ortaya koymuşlar, kronik sağlık problemleri bulunan sürülerde BLV yönünden antikor taraması yaptıklarında enfeksiyonunun prevalansını yüksek bulduklarını bildirmişlerdir. Bu durumu da, BLV enfeksiyonu ile sağlık problemleri arasındaki ilişkiye bağlamışlardır.

Persiste Lenfositosis genellikle BLV enfeksiyonlarında oluştuğundan, enfeksiyonun varlığını ortaya koymak için hematolojik uygulamalarla lenfosit sayımlarının yapıldığını ancak bu uygulamaların enfeksiyonun tespitinde sınırlı duyarlılığa sahip olduğu bildirilmiştir (Schalm ve ark 1975, Abt ve ark 1969). Schalm ve ark (1975), Persiste lenfositosis'li sığırların klinik olarak normal görünümde, tümör gelişme riskinin yüksek ve PL'in %29-85 oranında geliştiğini belirtmişlerdir. Persiste lenfositosis ve tümör oluşumunun gelişmesinden predispozisyon faktörleri içinde yer alan genetik faktörlerin sorumlu olduğu belirtilmiş olsa da, tüm faktörlerin birlikte daha etkili olabileceği varsayılmaktadır (Straub 1987).

Bovine Löykozis enfeksiyonunda nadir olarak lenfosarkoma oluşumu ve kan dolaşımındaki lenfositlerin sayısında artış şekillendiği bildirilmiştir (Parodi 1987). BL enfeksiyonunda lenfosarkoma geliştiğinde retrobulbar lenf nodüllerinde veya rektal/vajinal bölgedeki lenf nodüllerinde tümör büyümeleri, organlara (Kardial, sindirim ve nörolojik sistem) ait bozukluklar, verim azalması, iştahsızlık, kilo kaybı, zayıflık ve generalize takatsızlık benzeri nedeni bilinmeyen belirtiler şekillendiği bildirilmiştir (Dungworth ve ark 1967). Bu nedenle hastalığın teşhisinde biyopsi, laboratuvar ve klinik muayenelerin birarada uygulanarak sonuca gidilmesinin uygun olacağı belirtilmiştir (Johnson ve Kaneene 1992). Tümörlü löykozis evresine ulaşan enfekte ineğin 7-8 yaşına kadar geldiği, 4-5 yavru doğurduğu, tümör belli bir büyüklüğe ve ağırlığa eriştiğinde ya dalak büyümesi ile yırtılma sonucu ya da sekonder anemi oluşumundan sonra öldüğü rapor edilmiştir (Lorenz ve Straub 1987).

Hakioğlu ve Ulutaş (1968), Karacabey harasındaki löykoz şüpheli bir ineğin klinik muayenesinde progressif zayıflama, anoreksi, zaman zaman hızlı solunum, ayağa kalkamama ve yürümede zorluk, karnının hafif çekik, sırtının kambur, hayvanın kuvvetli bir uyarımla ayağa kaldırıldıktan kısa bir süre sonra hemen yere yatma arzusu gösterdiğini, göz kürelerinin ekzoftalmik görünüşte, çene altı lenf bezleri avuç içini dolduracak kadar büyümüş ve sert kıvamda olduğunu bildirmişlerdir. Bununla birlikte, rektal muayenede iç iliak lenf bezlerinin avuç içini dolduracak derecede büyüdüğünü, iştah ve ruminasyonun düzensiz olduğunu,

rumen motilitesinin zayıf ve kontraksiyonlarının seyrek, tazyike karşı abomasumun az hassas, ağrı deneylerinin pozitif, dışkıının normal görünümlü, kalp seslerinin derinden ve hafif olarak duyulduğunu, nabız sayısının dakikada 70/80, ritmi ve amplitüdünün düzensiz, kalp tepe atımının dakikadaki sayısının nabız sayısına eşit olmadığını, mukozaların ve göz konjunktivalarının solgun ve hafif kirli görünüşte olduğunu, rektal sıcaklığın 24 saatlik müşahadelerde 37.8-38°C'ler arasında olduğunu, müşahade müddetince iyi bir bakıma rağmen kilo kaybının olduğunu, astenia ve bilhassa arka ayaklarda takatsizlik bulunduğunu, müşahade altına alındıktan 24 gün sonra total kalp yetmezliği görüldüğünü rapor etmişlerdir (Hakioğlu ve Ulutaş 1968).

## 2.8. Teşhis

Bovine Löykozis enfeksiyonunun teşhisi için genellikle serolojik testlerin kullanıldığı belirtilmiştir (Burny ve ark 1980). Kolostrumdaki antikör varlığı sonucu meydana gelen pasif immunité, enfekte olan buzağuların serolojik testlerle ayırımını imkansızlaştırması nedenleriyle 6 aylıktan küçük buzağuların test edilmesinin uygun olmayacağı bildirilmiştir (Lassauzet ve ark 1989). BLV enfeksiyonunun prevalansı, yaş ile artış eğiliminde olduğu için enfeksiyonun tespit edilmesinde sürüdeki hayvanların yaş gruplarına göre sınıflandırılmasının uygun olacağı belirtilmiştir (Van Der Maaten ve Miller 1990).

Bovine Löykozis Virus enfeksiyonunun teşhisi için agar-jel immunodiffuzyon (AGID) testi (Mammerickx ve ark 1976, Ferrer ve ark 1977, Graves ve ark 1982, Jacobsen ve ark 1985, Shettigara ve ark 1986, Roberts ve ark 1989, Hafez ve ark 1990), enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) (Poli ve ark 1981, Mammerickx ve ark 1984, Mammerickx ve ark 1985, Wawrzkievicz ve ark 1988, De Boer ve ark 1989, Forschner ve ark 1989, Jorgensen 1989, Eloit ve ark 1990, Have ve Jorgensen 1991, Klintevall ve ark 1991, Nguyen ve Maes 1993, Schoepf ve ark 1997), radioimmunoassay (RIA) (Gupta ve Ferrer 1981, Miller ve ark 1981, Jacobsen ve ark 1985, Walrand ve ark 1986, Miller ve Schmerr 1987), komplement fikzasyon (CF) testi (Levy ve ark 1977, Mammerickx ve ark 1985, Van Der Maaten ve Miller 1990), serum nötralizasyon (SN) testi (Ferrer ve ark 1977, Ferrer ve ark 1981, Miller ve ark 1981, Wawrzkievicz ve ark 1988, Van Der Maaten ve Miller 1990, Bolat 1995, Rodak ve ark 1997), polymerase chain reaction (PCR) testi (Naif ve ark 1990, Have ve Jorgensen 1991, Murtagh ve ark 1991, Naif ve ark 1992, Agresti ve ark 1993, Belak ve Pordany 1993, Kelly ve ark 1993, Poon ve ark 1993, Pieskus ve ark 1995, Feschner ve ark 1996, Xie ve ark 1997), immunofloresans (IF) testi (Ferrer ve ark 1972, Ferrer ve ark 1977, Esteban ve ark 1985, Mammerickx ve ark 1985), immunoperoksidase (IP) testi (Ferrer ve ark 1981, Esteban ve ark



1985, Mammerickx ve ark 1985), syncytia inhibition (SI) testi ( Ferrer ve ark 1977, Ferrer ve ark 1981, Mammerickx ve ark 1985), western-blot (WB) testi (Jacobs ve ark 1991, Banders ve ark 1995, Rodak ve ark 1997), southern-blot (SB) testi (Trono ve ark 2001, Yeon ve ark 2002), early polykaryocytosis inhibisyon (EPI) testi (Graves ve ark 1982, Esteban ve ark 1985, Mammerickx ve ark 1985), pseudotip inhibisyon (PI) testi (Esteban ve ark 1985, Mammerickx ve ark 1985, Wawrzkiwicz ve ark 1988), elektronmikroskopi (EM) (Ferrer ve ark 1972, Mammerickx ve ark 1985) ve hematolojik uygulamalar (Perman ve ark 1970, Mammerickx ve ark 1976, Levy ve ark 1977, Kajikawa ve ark 1983, Straub 1987, Kandil ve ark 1989, Thurmond ve ark 1990, Klintevall ve ark 1997, Batmaz ve ark 1999) kullanılmaktadır. Ayrıca in vitro ortamlarda çeşitli hücre kültürleri kullanılarak virus izolasyonunun da yapılabileceği bildirilmiştir (Ferrer ve ark 1972, Ferrer ve ark 1981, Esteban ve ark 1985, Lucas 2000).

Miller ve ark (1981) BLV enfeksiyonunda meydana gelen nötralizan antikörlerin tespit edilebilmesi için syncytium-inhibisyon testine virus-nötralizasyon (VN) test prosedürünü modifiye etmişlerdir. Bu prosedürde syncytium-inhibisyon testinde BLV’u içermeyen hücrelerdeki nötralizan antikörlerin varlığının ortaya konulduğu bildirilmiştir. Ayrıca araştırmada RIA ve AGID testlerini karşılaştırmalı olarak uygulamışlardır.

Mammerickx ve ark (1985a) BLV antijenlerine karşı oluşan antikörlerin tespitinde SI, VN, EPI ve koyunlarda biyolojik deneme testleri gibi indirekt metotlardan yararlanılabileceğini bildirmişlerdir. Ancak BLV’unun syncytia meydana getirdiği insan, sığır, yarasa, keçi ya da feline kökenli hücrelerden hazırlanan kültürlerin standardize edilmesinin zor ve aseptik şartlar gerektirdiğini de vurgulamışlardır.

Bovine Löykozis Virus’unun lenfosit hücrelerine olan affinitesi ve tropizm göstermesi, hematolojik çalışmaların bu yönde yoğunlaşmasına neden olmuştur (Winqvist ve ark 1969). Özellikle immunohistokimyasal uygulamalar (Pinkus ve ark 1979, Kajikawa ve ark 1983, Raich ve ark 1983, Onuma 1987, Maiti ve ark 1990, Klintevall ve ark 1997, Xie ve ark 1997, Nagy ve ark 2002) enfeksiyonun teşhisinde kullanılmaktadır. Bu uygulamalarda mutlak lenfosit sayısında artış veya lenfoblast, prolenfosit ve anormal/atipik lenfosit formunda immature hücrelerin tespitinin önemli bir bulgu olduğu bildirilmiştir (Pinkus ve ark 1979). Bovine lenfosarkoma olgularında, kandaki lenfosit sayısının %50 arttığı, lenfosarkoma olgularında lenfositlerin şekil ve sayısında değişimlerin gözlemlendiği bildirilmiştir (Takashima ve ark 1977, Raich ve ark 1983, Gatei ve ark 1989).

Schalm ve ark (1975)’larının BLV enfeksiyonlarında hematolojik uygulamalar ile teşhis yapılması konusundaki görüşleri şunlardır: 1-Klinik belirti göstermeyen lenfosarkomlu

hayvanların teşhisinde hematolojik uygulamaların güvenilir olduğunu, 2-Lenfosit sayısına bakılmaksızın, kandaki anormal hücre tiplerinin gözlenmesi teşhis açısından yararlı olabileceği fakat tek bir hücre tipine ve kantitatif değişimlere bakılarak löykoz teşhisi konulamayacağını, bu nedenle kan örneklerinin ve kemik iliğindeki invazyonların mikroskop altında incelenmesinin gerektiğini ve histolojik uygulamalar ile enfeksiyonun kesin teşhisinin yapılacağını bildirmişlerdir.

Tümör Associated Antijen (TAA)'inin BLV enfeksiyonlarında oluşan tümör hücrelerinde ve BLV ile enfekte PL'li sığırların lenfositlerinde tespit edilebildiği açıklanmıştır (Onuma ve Olson 1977). BLV enfeksiyonu yönünden seropozitif bulunan sığırların yalnız %10'unun, BLV ile enfekte PL'li tüm sığırların lenfositlerinin ve BLV ile enfekte lenfosarkomalı tüm sığırların hem lenfositlerinin hem de tümör hücrelerinin TAA yönünden pozitif olduğu belirtilmiştir (Onuma ve Olson 1977). Bu yüzden BLV enfeksiyonuna karşı yapılan kontrol programlarının bir kısmında ve epidemiyolojik çalışmalarda TAA'nin tespit edilmesinin uygun olacağı ifade edilmektedir (Onuma 1987, Johnson ve Kaneene 1992).

Bovine Löykozis Virus'unun koyunlara kolaylıkla geçmesi ve yüksek onkojenik aktiviteye sahip olması nedeni ile bio-assay uygulamalarının direkt teşhis metodu olarak kullanılabilmesi belirtilmiştir (Mammerickx ve ark 1985a, Schwartz ve ark 1994, Cowley ve ark 1992, Lucas 2000).

Van Der Maaten ve Miller (1990) kolostrumdan pasif antikoru alan buzağularda, BLV enfeksiyonunun teşhis edilmesinin önem taşımadığını ve bu durumdaki hayvanlarda BLV'ünü belirlemek için virus belirleme tekniklerinin tercih edilmesinin uygun olduğunu bildirmişlerdir. Bu amaçla, şüpheli hayvanlardan alınan lenfositlerin in vitro ortamlarda kültüre edilmesi, EM tekniği kullanarak C-tipi virus partiküllerinin gözlenmesi, AGID, RIA, antijen-capture ELISA veya diğer serolojik testler ile viral antijenlerin tespit edilmesinin gerekli olduğu ifade edilmiştir (Burny ve ark 1980). Alternatif olarak, BLV yönünden negatif olduğu tespit edilmiş koyun ve sığırlara test materyalinin inokulasyonunun yapılması ile Bio-assay uygulamalarının gerçekleştirilebileceği belirtilmiştir. Ancak bu uygulamanın pahalı, sınırlı, zaman isteyen, çok hassas olmayan, özel durumlarda uygulanabilen ve serolojik testlerle desteklenmesinin gerekli olduğu bildirilmiştir (Mammerickx ve ark 1985a).

Klinik açıdan EBL enfeksiyonunda gelişen lenfosarkomaların teşhisi için patolojik, histolojik ve serolojik uygulamaların gerekli olduğu belirtilmiştir (Pinkus ve ark 1979). Bu nedenle histopatolojik çalışmalar için dokulardan biyopsi veya nekropsi örnekleri alınmasının uygun olacağı ve özellikle SBL formunda yetişkin sığırlarda gelişen lenfosarkoma olgularında

histopatolojik tetkiklerin yapılmasının gerekli olduğu bildirilmiştir (Kajikawa ve ark 1983, Nakashi ve ark 1983).

Bovine Löykozis enfeksiyonunun teşhisinde kullanılan hematolojik metotlar içerisinde löykoz anahtarı (Burny ve ark 1980, Levy ve ark 1977, Straub 1987), asit hidrolaz (Pangalis ve ark 1978, Raich ve ark 1983), E-rozet formasyonu (Raich ve ark 1983, Knowles ve Holck 1978), yüzey immunoglobülinleri (Taylor ve ark 1992, Esteban ve ark 1985), histokimyasal uygulamalar (Peroksidaz, Sudan-Black, May-Grünwald Giemsa ve Alfa Naftil Asetat Esteraz) (Ceccarelli ve ark 1986, Kajikawa ve ark 1983, Ishiguro ve ark 1994, Raich ve ark 1983, Rademacher ve ark 1977) ve flow sitometrik analizlerin (Taylor ve ark 1992, Gatei ve ark 1989, Meiom ve ark 1999, Wu ve ark 1999) olduğu bildirilmektedir.

Löykoz anahtarı, sığırların yaşa göre kandaki değişen lenfosit yüzdelerinin, lökosit miktarlarının normal değerlerini ve BLV enfeksiyonundaki (subklinik veya latent lenfosarkomlar dahil olmak üzere) değerlerini veren teşhis metodu olduğu bildirilmiştir (Lax ve Hofirek 1969, Straub 1987a). Burny ve ark (1980) bildirdiğine göre, Van Der Maaten ve Miller (1977) BLV enfeksiyonlarında kullanılan löykozis anahtarlarının tek başına yeterli olmadığını ancak serolojik testler ve virus izolasyon yöntemleriyle daha yararlı olabileceğini ifade etmişlerdir. Abt ve ark (1969) 25 adet löykozlu sığır sürüsünde PL ile löykoz enfeksiyonunun ilişkisini Löykoz anahtarına göre uygulamışlardır. Araştırmada sürü genelinde %7 oranında PL tespit ettiklerini ve bu sonucun düşük seviyede bulunduğunu bildirmişlerdir. Lax ve Hofrinek (1969) 1963-1966 yılları arasında Çekoslovakya'daki sığırlarda BLV enfeksiyonunu Löykoz anahtarına göre araştırmışlardır. Araştırmada enfeksiyonun yıllara göre insidansını %3 olarak tespit ettiklerini bildirmişlerdir.

Bovine Löykozis Virus'unun lenfositlere ve özellikle B-lenfositlere affinitesinin olduğu bildirilmiştir (Yang ve ark 1979, Domenech ve ark 2000). Bu yüzden BL enfeksiyonun teşhisinde artan B lenfosit oranlarının belirlenmesi önemlidir. Günümüzde, perifer kanda ve diğer dokularda varolan B lenfositlerinin belirlenmesi amacıyla, bu hücrelerin membran yüzeyindeki Fc, komplement reseptörleri ve membran yüzeyindeki immunoglobülin (sIg)'lerin immunofloresans ya da immunoenzimatik yöntemlerle ortaya konduğu açıklanmaktadır (Kajikawa ve ark 1983). T lenfosit oranlarının belirlenmesi amacıyla bu hücrelerin, heterolog alyuvarlarla spontan rozet (E-rozeti) oluşturmaları, sahip oldukları spesifik enzimlerin demonstrasyonu, hücre membranlarının yüzeylerindeki spesifik lektin reseptörlerinin ortaya konması ve işaretli timosit antikolarıyla boyama yöntemleri uygulanmaktadır (Knowles ve Holck 1978). Ayrıca farelerde, insanlarda, kanatlılarda ve sığırlarda rozet oluşturma yöntemleri ile karşılaştırmalı olarak yapılan çalışmalarda, alfa-naftil

asetat esteraz enziminin (ANAE) T lenfositlere spesifik bir enzim olduğu ve bu hücrelerin işaretlenmesinde yararlanılabileceği bildirilmiştir (Mueller ve ark 1975, Dulac ve Yang 1991, Ishiguro ve ark 1994). ANAE enzim boyama yöntemi, başta insanlar olmak üzere (Yang ve ark 1979, Dulac ve Yang 1991, Knowles ve ark 1978), sığırlarda (Yang ve ark 1979, Dhingra ve ark 1982, Kajikawa ve ark 1983, Goranov ve ark 1986, Ishiguro ve ark 1994, Chiba ve ark 1995, Çelik ve ark 1992), tavuklarda (Pruthi ve ark 1987, Maiti ve ark 1990, Sur 2001), köpeklerde (Osbaldiston ve Sullivan 1978, Dulac ve Yang 1991), farelerde (Mueller ve ark 1975) ve domuzlarda (Ramos ve ark 1992) bulunan T lenfositlerin ayrımının yapılmasında kullanılmaktadır. Ayrıca ANAE boyama yöntemi ile sığırlarda löykozis enfeksiyonu sonucu meydana gelen bozuk üretilmiş lenfositlerin belirlenebileceği bildirilmiştir (Müller-Hermelink ve ark 1974, Yang ve ark 1982, Kajikawa ve ark 1983, Nakashi ve ark 1983, Reddy ve Rajan 1983, Esteban ve ark 1985a, Çelik ve ark 1994, Çelik ve ark 1993). Paul ve ark (1979)'ları, sığır löykozis virus (BLV)'u ile enfekte sığırların perifer kanındaki B lenfosit oranının %58.8'e yükseldiğini, E-rozeti oluşturan T lenfosit oranlarının ise %38.7'ye gerilediğini, null hücreleri oranının da %6.5 düzeyinde olduğunu tespit etmişlerdir.

Bovine Löykozis enfeksiyonu teşhisinde AGID testi ile p24, p15 ve gp51 antijenlerine karşı gelişen antikorların tespit edildiği, testin kolay uygulanabilir, basit ve en pratik serolojik test olduğu bildirilmiştir (Van Der Maaten ve Miller 1977). p24 ve p15 antijenlerine karşı oluşan antikorların tespiti için kullanılan AGID testlerinin hematolojik testlerle paralellik gösterdiği açıklanmıştır (Van Der Maaten ve Miller 1977). Burny ve ark (1980) bildirdiğine göre, Kaaden ve ark (1977) farklı çiftliklerde bulunan lenfosit-lökosit oranları belirlenmiş sığırların kan serumlarında BLV enfeksiyonunun varlığını serolojik yönden ortaya koymak için AGID-p15 antikor taraması yapmışlardır. Araştırmada hematolojik yönden pozitif bulunan hayvanlarda %51.5 oranında, şüpheli bulunan hayvanlarda %14.5 ve negatif bulunan hayvanlarda %0.9 pozitif reaksiyon tespit ettiklerini belirtmişlerdir. AGID-gp51 antijenlerine karşı gelişen antikorların tespitinde kullanılan test uygulamalarının hematolojik uygulamalardan, AGID-p24, p15 ve CF testlerinden daha duyarlı olduğu bildirilmiştir (Burny ve ark 1980). AGID-gp51 testinin, antijen-antikor kompleksinin presipitasyon oluşturması ve enfekte sığırlarda güçlü humoral cevapların gelişmesi nedeniyle daha güvenilir ve hassas olduğu belirtilmiştir (Burny ve ark 1980). Bu yüzden BLV enfeksiyonlarında saha şartlarında, eradikasyon ve kontrol denemelerinde AGID-gp51'in kullanılması tavsiye edilmiştir (Straub 1978a, Mammerickx ve ark 1978).

Süt veya kan serumlarında ELISA ile gp51 antijenlerine karşı gelişen antikorların tespit edilmesinin uygun olduğu bildirilmiştir (Ressang ve ark 1978). ELISA ile süt

serumlarındaki antikor varlığının ve titresinin belirlenebileceği ancak sütteki globülin seviyesinin kan serumundaki seviyeden düşük bulunduğu ifade edilmiştir (Ressang ve ark 1978). Straub (1978a) kandan orjin alan IgG'lerin inflamasyon, enfeksiyon, yaş, gebelik vb. faktörler nedeniyle süt serumlarında kan globülinlerinin yoğun olarak bulunacağını, BLV antijenlerine karşı gelişen antikor miktarında ve titresinde artış meydana gelebileceğini belirtmişlerdir. Süt tanklarında toplanan sütlerde BLV enfeksiyonu taramalarında ELISA kullanılmasının uygun olduğu açıklanmıştır (Straub 1978a, Rodak ve ark 1997).

Mammerickx ve ark (1984) süt sığırlarında BLV enfeksiyonunun varlığını tespit etmek için kan ve süt örnekleri kullandıklarında, her iki testte kan serumları uygulandığında uyumlu bir korrelasyon gösterdiğini bildirmişlerdir. Araştırmada AGID testinde süt örnekleri ile hiç reaksiyon gözlenmemesi nedeniyle süt örnekleri için ELISA testinin daha uygun olduğu konusunda hem fikir olduklarını belirtmişlerdir.

Klintevall ve ark (1991) süt sığırlarında BLV enfeksiyonunun varlığını AGID (kan) ve ELISA (kan-süt) testleri ile araştırdıklarında: 1- Süt serumlarında IgG<sub>1</sub> izotipinin yoğun olması ve ELISA testinde monoklonal anti-bovine IgG<sub>1</sub> ve IgG<sub>2</sub> izotiplerinin kullanılması nedeniyle, süt serumlarında BLV'una karşı oluşan antikor varlığını ortaya koymak için ELISA'nın AGID testinden daha avantajlı olduğu, 2- Sütteki antikor seviyesinin kandan düşük olmasına rağmen her iki örneğin ELISA ile kullanılabileceği fakat kan ve süt serumları arasında %100 uyumlu sonuç alınabilmesi için süt örneklerinin iyi santrifüj edilip, uzun bir inkubasyona tabi tutulması ve süt yağının uzaklaştırılmasının gerekli olduğu, 3- Tanklarda toplanan süt örneklerinde ELISA'nın en uygun test metodu olduğu, 4- Bir yaşın altındaki buzağılarda, kuru dönem öncesi, sonrası ve gebelik dönemleri dışındaki kalan evrelerde sütteki antikor seviyesinin düşük olduğu, 5- Mastitisli sığır (veya yağ içeren) süt ve kolostrum serumlarında yalancı pozitifliklerin görülebileceği, 6- Saha şartlarında süt örneklerinin kan örneklerine göre daha rahat toplanabileceği, 7- Dört meme lobunda da sütteki antikor düzeylerinin eşit olduğu sonucuna varmışlardır. Klintevall ve ark (1991) araştırmada elde ettikleri bu sonuçların Portetelle ve ark (1989), Niskanen ve ark (1989), Mammerickx ve ark (1985b) tarafından da bildirildiğini ifade etmişlerdir.

## 2.9. Tedavi

Şu ana kadar BLV enfeksiyonunun kesin tedavisini sağlayacak herhangi bir sağaltım metodu tespit edilememiştir (Van Der Maaten ve Miller 1990). Bugün her ne kadar virus hakkında ileri düzeyde bilgilere sahip olunmasına ve aşı geliştirmeye yönelik birçok deneysel araştırma girişiminde bulunulmasına karşın, henüz BLV enfeksiyonunun kontrolünü sağlayacak uygun bir ticari aşı geliştirilemediği bildirilmiştir (Johnson ve Kaneene 1992, Portetelle ve ark 1991, Ohishi ve ark 1991, Portetelle ve ark 1990). Ekonomisinde hayvancılığın önemli bir yeri olan tüm sanayileşmiş ülkelerde, BLV enfeksiyonunun tedavisinden öte hastalığın yayılımını önlemek için bölgesel, ulusal, uluslar arası düzeylerde kontrol ve eradikasyon programları geliştirildiği rapor edilmiştir (Ghysdael ve ark 1984, Flensburg 1987, Schmidt 1987, Bendixen 1987).

## 2.10. İmmunité

Bovine Löykozis enfeksiyonunda humoral immun cevap gelişiminin gözlendiği belirtilmiştir (Van Der Maaten ve Miller 1990). Deneysel olarak oluşturulan enfeksiyondan sonra ilk antikor gelişiminin 3-9 hafta arasında AGID testinde ortalama 4-6 hafta arasında ve RIA benzeri daha yüksek duyarlılık gösteren serolojik testlerde birkaç gün daha erken antikorların belirlenebildiği bildirilmiştir (Van Der Maaten ve Miller 1990). Miller ve Schmerr (1987) bu enfeksiyonda virus çekirdeğinin büyük yapısal proteini olan p24 ve glikolize zar proteini olan gp51'in önem taşıdığını açıklamışlardır. Gp51 zar proteinine karşı oluşan antikorların, BLV ile enfekte sığır serumunda bulunan virusu nötralize etme aktivitesine sahip olmasına karşın, BLV persiste enfeksiyon özelliğine sahip olmasından ötürü bu hayvanların serumlarında nötralize eden antikorların artışıyla BLV'unun elemine edilemeyeceği açıklanmıştır (Mammerickx ve ark 1985b).

Bovine Löykozis Virus'unun vücuda girmesinden 1-6 ay sonra ilk olarak gp51 ve daha sonra p24 ve p12'ye karşı spesifik antikorlarla bir immun yanıt geliştirdiği belirtilmiştir (Mammerickx ve ark 1985a).

Van Der Maaten ve Miller (1990) Bovine Löykozis enfeksiyonunda oluşan antikorların titreleri enfekte hayvanların yaşamı boyunca yüksek seviyede kaldığını, BLV ile enfekte sığırların çoğunda gp51 antijenine karşı oluşan antikor titrelerinin, p24 antijenine karşı oluşan antikor titrelerinden 10 kat daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. BLV ile enfekte tümörlü sığırlarda her iki antijene karşı oluşan antikor titrelerinin, BLV ile enfekte asemptomatik sığırlardan daha yüksek olduğu ve tümör bulunduran sığırlarda p24 antijenine

karşı oluşan antikor titrelerinde devamlı bir artış gözlemlendiği bildirilmiştir (Ghysdael ve ark 1984, Van Der Maaten ve Miller 1990).

Bovine Löykozis enfeksiyonunda, enfekte sığır serumlarında IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgA ve IgM'in bulunduğu fakat IgM'in serumlarda devamlı olarak tespit edilemediği belirtilmiştir (Meirom ve ark 1985).

Bovine Löykozis enfeksiyonunda, enfekte sığır serumlarındaki antikorların kolostrumdaki immunoglobulinlerin selektif konsantrasyonu nedeniyle buzağılama döneminde azalma gösterdiği fakat birkaç hafta içinde antikor seviyelerinin normale döndüğü ifade edilmiştir (Miller ve Maaten 1982).

Bovine Löykozis enfeksiyonuna karşı belirgin bir hücrel immünite (CMI) cevabının olup olmadığı henüz ortaya konamamıştır (Van Der Maaten ve Miller 1990). Enfeksiyona karşı oluşan hücrel immünite lenfositlerin fizyolojik, morfolojik değişimleri ve viral antijenlerin varlığı ile ilişkili olduğu açıklanmıştır (Onuma 1987, Alberts ve ark 1994, Ressang ve ark 1980).

Gatei ve ark (1989) yaptıkları araştırmada, lenfosarkoma ve PL olgularına sahip sığırların periferik kanlarında B-lenfositlerinin arttığı, bunun aksine T lenfosit alt gruplarından CD<sub>4</sub>, CD<sub>8</sub> oranlarında azalma meydana geldiği bildirilmiştir.

Heeney ve ark (1988) BLV ile enfekte sığırlarda humoral immün yanıtın nasıl etkilendiğini tespit etmek için yaptıkları araştırmada, BLV'una karşı en yüksek IgG ve en düşük IgM düzeyinin lenfomalı sığırlar grubunda bulunduğunu saptamışlardır. Araştırmada IgG<sub>2</sub> titresinin değişiklik göstermediğini ve IgG<sub>1</sub> titresinde ise artış meydana geldiğini bildirmişlerdir.

Gatei ve ark (1990) yaptıkları bir araştırmada, BLV (+) PL (+) ve BLV (+) PL (-) olarak iki gruba ayrılmış sığırlarda, BLV(+) PL (+) grubunun IgM düzeyinin BLV (+) PL (-) ve kontrol grubundan düşük olduğunu ortaya koymuşlardır. Araştırmacılar PL olgusu görülen BLV enfeksiyonlarında, devam eden humoral immün yanıtın IgM oluşumunu azaltığı sonucuna vardıklarını açıklamışlardır.

Çarlı ve ark (1992) BLV ile enfekte ineklerde in vivo T lenfosit cevabı ve T lenfosit bağımlı olmayan antijene karşı humoral immün yanıtındaki değişiklikleri araştırmışlardır. Çalışmada aynı sayıda BLV ile enfekte alökemik (BLV (+) PL (-)) ve enfekte olmayan (BLV (-)) iki inek grubunda in vivo T lenfosit ve humoral immün yanıtların karşılaştırılması yapıldığında, (BLV (+) PL (-)) gruba ait ineklerin in vivo T lenfosit yanıtının, (BLV (-)) grubundaki ineklere göre istatistiki olarak daha düşük olduğu ve T lenfosit bağımlı

olmayan antijenine karşı humoral immun yanıt yönünden iki grup arasında bir fark olmadığını belirlemişlerdir.

Klintevall ve ark (1997) buzağuları deneysel olarak BLV ile enfekte ederek kanda erken dönemde meydana gelen değişimleri araştırmışlardır. Araştırmacılar, B lenfosit hücrelerinde artış, T lenfositlerinin alt gruplarından CD<sub>4</sub> ve CD<sub>8</sub> oranlarında azalma ve CD<sub>2</sub> ve CD<sub>5</sub> oranlarında artış görüldüğünü bildirmişlerdir.

Meirom ve ark (1985) İsrail’de 16 buzağıda BLV antijenlerine karşı gelişen antikorları Kantitatif Radial Immunodiffüzyon tekniğini kullanarak humoral ve hücre sel cevapları tespit etmişlerdir. Araştırmacılar, deneysel olarak enfekte edilen 16 buzağının inokulasyondan 14-24 hafta sonra IgM seviyesini, IgG’den yüksek bulduklarını ve BLV antijenlerine karşı oluşan antikorların düzeyinde devamlı olmayan bir düşüş gözlemlendiğini de bildirilmişlerdir. Araştırmacılar çalışma boyunca tüm buzağuların IgM’in normal değer seviyesinde azalma ve diğer IgG seviyesinin normal değerlerde seyrettiğini bildirmişlerdir.

Kabe ya ve ark (2001) BLV ile konak immun cevabı arasında bilinmeyen bir ilişkinin olduğunu bildirmişlerdir. Yaptıkları çalışmada, BLV ve konak immun cevabı arasındaki bu bilinmeyen ilişkiyi 4 bölümde göstermeye çalışmışlardır. Araştırmacılara göre, konağın kendini BLV enfeksiyonundan korumak için hücre-mediated immuniteyi kullandığını, hastalık seyri ile sitokin proteinleri arasında bir ilişkinin olduğu, BLV’unda bulunan TNF $\alpha$  (Tümör nekrosis faktör) ve iki reseptörün lökemogenez’in gelişiminden sorumlu olduğu, TNF $\alpha$ ’nın çoğalmasında major histocompatibility complex (MHC) haploid’in sorumlu olduğu ve BLV enfeksiyonunun kontrolünde MHC haploid’i temel alınarak üretim stratejileri geliştirilmesinin gerekli olduğunu bildirmişlerdir.

Bovine Löykozis Virus’u ile enfekte sığırlar ve lenfosarkomlu sığırlarda IgM salımının normalden düşük olduğu bildirilmiştir (Onuma 1987).

Ungar-Waron ve Trainin (1987) tarafından humoral cevabın izlenmesi için lökemik sığırlara ve BLV ile enfekte buzağılara sentetik antijen ((Tyr, Glu) poly (ALA)—poly (Lys)) uygulaması yapılmıştır. Araştırma sonucunda, hasta hayvanlardan elde edilen pürifiye antikorlar, IgG ve IgM ile doğal enfeksiyon şartlarında elde edilen pürifiye antikorlar, IgG ve IgM arasında fark gözlenmediği belirtilmiştir. Araştırmacılar lökemik sığırların ve BLV ile enfekte buzağuların serumlarından elde edilen pürifiye immunoglobülin (Ig)’lerin miktarında, IgM düzeyinde azalmaların ve IgM/IgG oranında farklılıkların görüldüğünü bildirmişlerdir.

Bovine Löykozis enfeksiyonunun immun sistem hücrelerine, fonksiyonlarına ve değişik immunolojik parametrelere olan etkileri; virusun T lenfosit alt gruplarında azalma, B-lenfositlerinde onkojenik çoğalma, persiste lenfositozis’li ve lenfomalı sığırlarda IgM



düzeyinde düşüş, IgG<sub>1</sub> titrelerinde yükselme ve IgG<sub>2</sub> düzeyinde ise bir değişiklik olmadığı şeklinde raporlar sunulmuştur (Meirom ve ark 1985, Heeney ve ark 1988, Gatei ve ark 1990, Onuma 1987). Ayrıca PL (-) (Alökemik) sığırlarda immunoglobulin fraksiyonlarının normal sığırlardakinden farklı olmadığı da belirtilmiştir (Onuma 1987).

## 2.11. Ekonomik Önem

Bovine Löykozis enfeksiyonu, ekonomik yönden önemli bir hastalıktır (Burny ve ark 1980, APHIS 1999). U. S. A.'da yıllık BL enfeksiyonundan dolayı süt üretiminde 1.6 milyon dolarlık kayıp, lenfomalı ineklerin sürüden ayrılması ile 40.5 milyon dolarlık kayıp, veteriner hizmetleri için 0.5 milyon dolarlık harcama, semen ve embriyoların dış ticaretinde azalmalar nedeniyle de 1.7 milyon dolarlık kayıplar olduğu bildirilmiştir (Miller ve Maaten 1982, Thurmond 1987, APHIS 1999).

Bovine Löykozis enfeksiyonunun ekonomik yönden yapmış olduğu etkiler iki ana başlık altında toplanmıştır: 1-Direkt etkileri, 2-İndirekt etkileri.

1-Direkt etkileri: a) Süt üretimindeki azalmaya bağlı, b) Enfeksiyonun genital sistemde meydana getirdiği bozukluklara bağlı, (buzağılama miktarı ve süresi, gebe kalma durumu, gelişme ve yetiştirme dönemi) c) Mastitis sonucu, (subklinik mastitisler) d) Enfekte hayvanların veya lenfomalı hayvanların sürüden uzaklaştırılması sonucu, e) Hastalığın teşhis, tedavi, kontrol ve eradikasyon programları için yapılan veteriner hizmetlerinin meydana getirdiği ekonomik kayıplar.

2-İndirekt etkileri: a) Hayvan ithalatında (Uluslararası ya da ulusal) azalmaya, b) Enfeksiyon nedeniyle et ve süt endüstrisinde ürün kayıpları, (Bu kayıplar, hastalığın halk sağlığını etkileyebileceği tezinden dolayı iç pazarda insanların et ve süt ürünlerini tercih etmemesinden kaynaklanan kayıplardır. Ayrıca enfekte hayvanların kanuni yaptırımlarından ötürü sürülerden uzaklaştırılması sonucu et ve süt endüstrisinde meydana gelen ürün kayıplarıdır) c) Enfeksiyon araştırmaları için bilimsel yönde yapılan harcamalardan, (Enfeksiyon tedavisi olmadığı için bu yönde geliştirilen yeni tedavi metotları ve aşılar için yapılan harcamalar, enfeksiyonun tespiti için yapılan sero-survey çalışmaları, yeni ve hızlı teşhis metotlarının geliştirilmesi ve virusun yapısının derinlemesine araştırılması için yapılan bilimsel araştırmalardır) d) Test ve imha uygulamaları, e) Test ve izolasyon uygulamalarına yapılan harcamalar sonucuna bağlı ekonomik kayıplardır (Miller ve Maaten 1982 ,Thurmond 1987).

Bovine Löykozis enfeksiyonunun ekonomik açıdan direkt ve indirekt etkilerinin en az düzeye indirilmesi ve tüm uygulamalarda önceden kar-zarar analizlerinin yapılmasının gerekli olduğu ifade edilmiştir (Thurmond 1987).

## 2.12. Kontrol

Van Der Maaten ve Miller (1990) BLV enfeksiyonu ile enfekte hayvanların teşhislerinde öncelikle hematolojik testlerin kullanıldığını, daha sonra bu metodun yerini asemptomatik BLV ile enfekte hayvanları tespit edebilen hassas ve spesifik serolojik testlerin aldığını belirtmişlerdir. Enfeksiyonun kontrol edilmesinden sonra enfekte sürülerdeki hayvanların ve yavrularının ortadan kaldırılması, BLV enfeksiyonunun yayılmasını engelleyebileceği fakat işletmelerde bu tür işlemlerin güç, işçilik isteyen, zaman gerektiren ve pahalı uygulamalar olduğu bildirilmiştir (Evermann ve ark 1987). Ticari açıdan düşünüldüğünde BLV'u ile enfekte olmamış buzağular elde etmek ve enfekte sürüden izole etmek yerine enfekte olmayan annelerden seçilen buzağularla çalışmanın iyi bir yol olacağı bildirilmiştir (Brenner ve Trainin 1989). Enfekte olmayan buzağular elde etmek için: 1- Serolojik testler uygulandıktan sonra yavruların annelerini emmelerine izin vermek, 2- Kolostral antikorların seviyesinde azalma tespit edilinceye kadar beklemek (4-6 ay) ve nonenfekte buzağuları belirlemek için yapılan serolojik testler sonrası buzağuların annelerini emmelerine izin vermek, 3-Doğum anında enfekte olduğu tahmin edilen buzağularda serolojik testler sonucu negatif saptanan buzağuların BLV-negatif annelerden elde edilen kolostrum ile beslenmelerinin uygun olacağı bildirilmiştir (Evermann ve ark 1987).

Bovine Löykozis Virus ile enfekte ineklerden, enfekte olmamış buzağular elde etmenin embriyo transferi ile olabileceği fakat bu metodun ekonomik ve uygulama zorlukları nedeniyle pek tercih edilmediği bildirilmiştir (Kaja ve ark 1984, Evermann ve ark 1987).

Bovine Löykozis enfeksiyonunun kontrol edilebilmesi için: kan örneklemeleri, aşılamalar ve şirurjikal uygulamalarda sterilite koşullarına uyulmasının, sürü sahiplerinin bu hastalık hakkında bilgilendirilmesinin, insekt (Pest kontrol) vektörlerle mücadele yapılmasının ve işletmelerde BLV taşıyıcısı hayvanların ortadan kaldırılmasının gerekli olduğu açıklanmıştır (Evermann ve ark 1987, Straub 1987).

Sığırlarda BLV enfeksiyonundan korunmak için birkaç kez aşı geliştirme girişiminde bulunulduğu bildirilmiştir (Kaja ve ark 1984). Johnson ve Kaneene (1992) bildirdiğine göre, Miller ve ark (1983) BLV ile enfekte annelerden doğan genç buzağularda gp51 antijeninin BLV enfeksiyonuna karşı korumada önemli olduğunu, inaktive BLV'u ve purifiye gp51 antijenleri ile enfekte FLK (fötal lamb kidney) hücre kültürlerinden hazırlanan aşılarla,

enfekte hayvanlarda kısa süreli bir korunma sağlandığı açıklanmıştır. Altaner ve ark (1991) Bovine Löykozis Virus ile enfekte FLK devamlı hücre kültürlerine p24 antijeni ilave ederek hazırlanmış oldukları canlı aşılarda kısa süreli bir korunma gözlediklerini belirtmişlerdir. Araştırmada, korumanın tümör associated transplantasyon antijeni ile sağlandığı, aşılarda koyun hücrelerinde üretilen env gen glikoproteinleri ve gp51, gp30 ve p24 antijenleri ile hazırlanabileceği ifade edilmiştir.

Ohishi ve ark (1991) rekombinant vaccinia virusu ile aşılanan koyunlarda, BLV gp51 antikorları şekillenerek koruyuculuk sağlandığı bildirilmiştir. Bununla beraber, nötralizan antikorlarının seviyesine bakılmaksızın koruyuculuk sağladığı belirtilmiştir. Portetelle ve ark (1991), anti-gp51 antikorları azalsa bile vaccinia virus rekombinantlarının koyunlarda koruyuculuğu devam ettirdiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar, gp51 antikorunun şekillenmesini rekombinant vaccinia virus ve BLV env-gen zinciri kodlanmış maya ile gerçekleştirerek oluşan cell-mediated immun cevabın, BLV enfeksiyonuna karşı koruyucu immunité sağlayabileceğini açıklamışlardır. Bu uygulamanın, deneysel olarak BLV enfeksiyonu oluşturulmuş koyunlarda da koruyuculuk sağladığı bildirilmiştir (Ohishi ve ark 1991).

Bovine Löykozis enfeksiyonuna karşı hazırlanan aşılarda, non-enfeksiyöz ve non-onkojenik özellikte olmasının uygun olacağı ifade edilmiştir (Van Der Maaten ve Miller 1990). İlk deneme aşılarda fetal kuzu böbrek hücrelerinde hazırlandığı bildirilmiştir (Altaner ve ark 1991). BLV glikoprotein antijenlerinin, bu aşının hazırlandığı FLK hücre kültürlerinden elde edilen kültür sıvılarında tespit edildiği açıklanmıştır (Miller ve Olson 1987). Gp 51 ve p24 antijenlerinin immunojenik özelliklerinin bulunduğu bu nedenle hem gp51 antijenlerinin hem de FLK hücrelerinin, gp51 antikorlarının şekillenmesini sağlayarak koruyuculuk oluşturduğu bildirilmiştir (Altaner ve ark 1991). Altaner ve ark (1991) p24 ve SF28 antijenlerinin, sadece anti-p24 ve anti-SF28 antikorlarının şekillenmesini sağlayarak enfeksiyonun oluşumunu engelleyemediklerini açıklamışlardır. Onuma ve ark (1984) gp51'le immunize edilmiş koyunların FLK hücrelerinden elde edilen ikinci bir protein (BLV-p) ile BLV enfeksiyonuna karşı korunma arasında ilişki bulunduğunu ve BLV enfeksiyonuna karşı korunma titresinin 1/64 olduğu görüşünü ortaya atmışlardır. BLV ile enfekte koyunlar rekombinant vaccinia aşısı ile aşılandıklarında, enfekte hayvanın perifer kan lenfositlerindeki BLV'unun gelişimi baskılanacağından, hazırlanan bu aşının tam olarak enfeksiyona karşı koruyuculuk sağlayamadığı bildirilmiştir (Daniel ve ark 1993).

Bovine Löykozis Virus enfeksiyonuna karşı gp51 subunit aşısı ve p24 diagnostik testlerinin geliştirildiği bildirilmiştir (Van Der Maaten ve Miller 1990). BL enfeksiyonunda

aşılamanın profilaktik ve terapötik amaçla kullanıldığı belirtilmiştir (Daniel ve ark 1993). Terapötik aşılama, rekombinant vaccinia aşısının yapısında bulunan BLV genomunun TAT bölgesi hedef alınarak, aşının latent enfekte hücrelerde bulunan BLV'unun çoğalmasını aktive ederek koruyuculuk sağlayacağı açıklanmıştır (Williams ve ark 1988). Ancak şu ana kadar yapılan aşı geliştirme denemelerinde hastalığı kontrol altına alacak kesin bir sonuç elde edilemediği belirtilmiştir (Williams ve ark 1988, Altaner ve ark 1991).

Bir çok Batı Avrupa ülkesinde ve Amerika Birleşik devletlerinde BLV enfeksiyonunu kontrol altında tutmak için federal yasalar çıkartıldığı bildirilmiştir (Fenner ve ark 1987). Bendixen (1987) BLV enfeksiyonu üzerine yapılan kontrol programında varmış oldukları sonuçlara göre:

1-Enfekte sığırların serolojik ve hematolojik yönden teşhis edilmesi: Tüm sığırların 6 aylıktan itibaren AGID testine tabi tutulması, lenfosit ve lökosit değerlerinin tespit edilmesi ve seropozitif bulunan hayvanların sürüden uzaklaştırılmaları, 2- Doğrudan yapılan uygulamalar: BLV seropozitif sığırların kolostrum ve sütlerinin yavrulara içirilmemesi enfekte kolostrum ve sütlerin pastörizasyon işlemine tabi tutulması, tanklarda toplanan sütlerin seronegatif hayvanlardan alınması, kan örneklemeleri, kastrasyon, boynuz kesme, şirurjikal operasyonlar, rektal uygulama ve tedavi işlemlerinde kullanılan aletlerin steril olması ve Klorheksidine türü dezenfektanların kullanılması, insekt kontrol programlarının (özellikle tabanidler üzerine) uygulanması ve östrus döneminde kanlı vaginal akıntıya sahip ineklerin sürüden ayrılması, 3- Eliminasyon ve doğrudan yapılan uygulamalar: Eğer bir sürüde çok fazla sayıda BLV ile enfekte hayvan mevcutsa seronegatif hayvanların derhal sürüden uzaklaştırılmaları, seronegatif hayvanların 30 ile 60 gün aralıklarla tekrar testlerine tabi tutulmaları, yaşlı ve düşük verime sahip seropozitif hayvanların sürüden uzaklaştırılması, 4- İthalat ve ihracat: Canlı sürülerin ithalatını veya ihracatını yapan sürü sahiplerinin, alım ve satım işletmelerinde sahip oldukları sürüyü en az 4 hafta ayrı bir yerde müşahade altında tutup, serolojik testlere tabi tutmaları, ithalatın yapıldığı ülkelerden sürünün BLV enfeksiyonundan ari olduğuna dair rapor almalarının kontrol programı açısından uygun olacağını açıklamışlardır.

Kontrol programları için çıkartılan yasalarda, enfekte hayvanların testlere tabi tutulup veya kesime gönderilip hastalığın kontrol altına alınmasının amaçlandığı ifade edilmiştir (Fenner ve ark 1987).

Flensburg ve ark (1987) Danimarka'da BLV enfeksiyonu için 25 yıllık süreye yayılmış bir kontrol programı uyguladıklarını bildirmişlerdir. Uygulanan kontrol programında temel prensip olarak, seropozitif hayvanların mezbahaya gönderilmesi, etkilenen hayvanların karantinaya alınması, seropozitif hayvanlar ile diğer hayvanların kontakt ilişkide

bulunmasının engellenmesi ve bulaşmada etkili diğer faktörlerin ortadan kaldırılmasını sağlamak olduğu ifade edilmiştir. Flensburg ve ark (1987) kontrol programı sonucunda, 1960 yılında 2 yaş ve üzerindeki lökemik tümörlü hayvan insidansının %29 iken, 1983'te bu oranın %1.72'ye düştüğünü, 1959-1984 yılları arasında uygulanan BLV kontrol programı sayesinde toplam 173.239 adet hayvandan 1.120 adedinin hastalıktan etkilendiğini, 1959-1968 yılları arasında 603 adet tümör olgusu görülürken, 1970'te 115 adet, 1974'te 20 adet, 1978'de 11 adet, 1981'de 14 adet, 1984'te 3 adet olduğu, 1982-1984 yılları arasında 93.873 adet sığırdaki BLV enfeksiyonu serolojik taramalar sonucunda 3 adet hayvanın (%0.003) BLV (+) bulunduğunu, aynı yıllar arasında 17.692 adet hayvan lökemik tümör yönünden kontrol edildiğinde 3 adet hayvanın (%0.017) pozitif olduğunu rapor etmişlerdir.

### 2.13. Eradikasyon

Bovine Löykozis Virus enfeksiyonunun yapılan epidemiyolojik çalışmalarda canlı hayvan hareketleriyle bir sürüden diğer bir sürüye yayıldığı gösterilmiştir (Schmidt 1987, Evermann ve ark 1987). Bu nedenle Avrupa Ekonomik Topluluğu (EEC)'nin 1 Ocak 1981'de Avrupa ülkeleri arasında EBL enfeksiyonunun kontrol ve eradikasyonu için bazı kanuni kararlar aldığı bildirilmiştir (Bendixen 1987). Bunlar: a) EBL enfeksiyonu bildirim zorunlu bir hastalık olmalıdır: a<sub>1</sub>) Üretim veya yetiştirme amaçlı tüm hayvanlarda 3 yıl esnasında EBL enfeksiyonuna rastlanılmamış olması gereklidir a<sub>2</sub>) 12 aylıktan itibaren tüm hayvanlara serolojik testler uygulanmalıdır b) Erkek sığırlarda, kastre olan sığırlarda, et üretimi için yetiştirilen sığırlarda ve 30 aylıktan küçük erkek sığırlarda test uygulamasına gereksinim duyulmaz. Bu tür hayvanlara sürü içinde özel bir işaretleme yapılmalıdır c) Dişi sığırlar, topluluk içi ülkelerde bireysel olarak testlere tabi tutulmalıdır. Bu sığırlar yaş, cins ve yetiştirme özelliklerine göre kullanılmalıdır d) Özellikle yüksek verim özelliğine sahip saf-ırk besi sığırlarında kontrol programları sıkı şekilde izlenmelidir. Üye ülkeler arasında hayvan ithalat ve ihracatında, sürünün BLV enfeksiyonundan arı olduğuna dair hükümet veteriner'lerinden belge istenmelidir. Üye ülkeler arasında ihracat yapılırken sürüdeki hayvanların yaşının serolojik testlerin uygulanabilmesi için 12 aylık olması istenir. Eğer yükleme periyodundan 30 gün önce sürü test edildi ise 12 aylık ve üzeri hayvanların 30 gün içerisinde ekstra özel serolojik testlere tabi tutulması gerekmektedir e) Topluluk içinde ticari amaç, hayvan hareketlerini ve boğalar için suni tohumlama merkezlerini kanunlara dayalı yönetmek olduğu bildirilmiştir f) Organlarında ve lenfatik sistemlerinde tümör gözlenen sığırların, eyalet veteriner kontrol ve araştırma laboratuvarlarında histolojik muayeneleri yapılmalıdır g) Sürüde bulunan lökemik tümörlü sığırlar ile bunlarla bir arada bulunan diğer

sığırlar eyalet veteriner kontrol ve araştırma laboratuvarlarında AGID testine tabi tutulmalıdırlar h) EBL enfeksiyonunun tespit edildiği sürüler, veteriner hekimlerin denetimi altında imha edilir. Enfeksiyonun tespit edilmediği fakat şüphelenilen sürülerde 24 aylık ve üstü yaşlı hayvanlara 6 aylık aralıklarla 3 kez AGID testi uygulanmalıdır. Bu testler, eyalet veteriner kontrol ve araştırma laboratuvarlarında yapılmalıdır i) Avrupa Ekonomik Topluluğu ülkelerine diğer ülkelerden ithal edilmiş sığırların, ulusal hayvan ıslahını korumak ve hastalık girişini önlemek için pedigree çizelgeleri ve hayvan sağlık sertifikaları gereklidir. İthal edilen sığırlarda Avrupa Ekonomik Topluluğu'nun ticari yasalarına göre sürüler tekrar testlerden geçirilmelidir. Bu süre içerisinde sığırlar karantina altında tutulmalıdır. Ayrıca Topluluk ülkelerine diğer ülkelerden gelen semen ve benzeri sığır materyalleri testlerden geçirilmelidir (Her ne kadar BLV enfeksiyonunun semenle bulaştığına dair kanıt olmamasına rağmen). Sığır popülasyonunda yeni bir genetik materyali kullanmadan önce güvenlik testlerinden geçirmek gerekmektedir j) Avrupa Ekonomik Topluluğu ülkelerinde BLV enfeksiyonunun teşhisinde klasik hematolojik metotlar, AGID ve ELISA serolojik testleri yaygın olarak kullanılmaktadır.

Schmidt (1987) Aşağı Saksonya bölgesinde, 1965-1976 yılları arasında hematolojik testler kullanarak eradikasyon programı uygulamıştır. Bu programda: 1965 yılında 56.174 adet sığır EBL enfeksiyonu yönünden araştırıldığında, 6.211 adet PL ve 1.172 adet tümör vakası, 1968 yılında 81.562 sığırdan 6.270 adet PL ve 820 tümör vakası, 1973 yılında 77.353 adet sığırdan 4.206 adet PL ve 589 tümör vakası, 1976 yılında 86.478 adet sığırdan 3.573 adet PL ve 282 tümör vakası görüldüğü rapor edilmiştir.

Schmidt (1987) Aşağı Saksonya bölgesinde, 1978-1983 yılları arasında AGID testi kullanarak eradikasyon programı uygulanmıştır. Bu programda: 1979 yılında 67.770 adet sığır EBL enfeksiyonu yönünden araştırıldığında, 6.242 adet (%9) pozitif hayvan ve 72 adet tümör vakası, 1980 yılında 63.510 adet hayvandan 2.506 adet (%4) pozitif hayvan ve 43 adet tümör vakası, 1981 yılında 60.108 adet hayvandan 788 adet (%1) pozitif hayvan ve 27 adet tümör vakası, 1982 yılında 58.565 adet hayvandan 273 adet (%0.5) pozitif hayvan ve 33 adet tümör vakası, 1983 yılında 57.000 adet hayvandan 157 adet (%0.3) pozitif hayvan ve 30 adet tümör vakası görüldüğünü rapor etmiştir. Schmidt (1987), EBL enfeksiyonu yönünden Aşağı Saksonya'da, 332 adet sürüde bulunan 15.000 adet sığıra AGID testi kullanarak 6 yıllık bir eradikasyon programı uyguladığında; birinci yıl 1014 adet, 2.yıl 270 adet, 3.yıl 65 adet, 4.yıl 49 adet, 5.yıl 6 adet ve 6.yıl 1 adet hayvan seropozitif bulunduğunu açıklamıştır. Sonuç olarak, A.Saksonya'da uygulanan "serolojik, hematolojik testler ve ayırt etme" eradikasyon

yöntemiyle EBL enfeksiyonunun sürülerden elemine edilebileceği bildirilmiştir (Schmidt 1987).

Almanya'da ve Danimarka'da da eradikasyon programlarında serolojik testlerin ve hematolojik metotların uygulandığı belirtilmiştir (Flensburg 1987, Straub 1987).

Tüm kontrol ve eradikasyon programlarında hayvanlar; BLV (+) PL (-) ve BLV (+) PL (+) olmak üzere gruplara ayırarak daha fazla başarı sağlanabileceği bildirilmiştir (Gatei ve 1989). Özellikle eradikasyon programları için AGID ve ELISA testleri referens testler olarak gösterilmiştir (Mammerickx 1987, Portetelle ve Mammerickx 1987, OIE 2000).

İsrail'de süt ineklerinden elde edilen süt miktarının ve süt ürünlerinden faydalanmanın oldukça yaygın olduğu bunun yanında İsrail'in Avrupa ülkelerine ve diğer ülkelere canlı hayvan ve semen ihracatı yaptığı bildirilmiştir (Brenner ve Trainin 1989). İsrail, Avrupa Birliği pazarına ürünlerini ihraç edebilmek için BLV enfeksiyonundan ari sürüler elde ettiğini, bunun için BLV enfeksiyonunu sürülerden eradike etmek için 2 farklı metot geliştirerek başarıya ulaştıklarını bildirmişlerdir (Huber ve ark 1981, Brenner ve Trainin 1989). Bunlar: 1- BLV enfeksiyonunun düşük oranda bulunduğu sürülerde "test ve imha", 2- BLV enfeksiyonunun yüksek oranda bulunduğu sürülerde "test ve izolasyon" metotlarıdır. Bu programda her iki metodu kullanarak yapılan çalışmada, sürülerde ilk denemelerde hastalığın prevalansını %8-31 arasında gözleendiği ve son denemelerde sürülerde hastalığın 3 yıl boyunca eradike edildiği bildirilmiştir (Brainer ve Trainin 1989).

### **3.MATERYAL VE METOT**

#### **3.1. Araştırmada Kullanılan Hayvanlar**

Burdur-Merkez ve ilçelerinde halk elinde bulunan küçük ve orta çaplı 10 özel işletmeden sağlıklı görünümüne sahip ileri gebelik döneminde (7. ve 9. aylar arasında) bulunan Holstein ırkı sağlıklı süt ineklerinden kan ve süt serum örnekleri toplandı (tablo 3.1). Bu amaçla 3 ile 10 yaş arası toplam 469 adet süt ineği örneklendi. Araştırmada 3 yaşında 124 adet (%26.4), 4 yaşında 19 adet (%4.1), 5 yaşında 180 adet (%38.4), 6 yaşında 90 adet (%19.2), 7 yaşında 47 adet (%10.1), 8 yaşında 5 adet (%1.0), 9 yaşında 2 adet (%0.4) ve 10 yaşında 2 adet (%0.4) hayvandan örnekler alındı. Örneklenen hayvanların yaş durumları ayrıntılı şekilde tablo 3.2'de gösterilmiştir.

#### **3.2. Serolojik Kontrol Materyalleri**

Araştırmada kullanılmak üzere 469 adet süt ineğinin kan örnekleri steril vakumlu tüplere<sup>(a)</sup> alınarak kan serumları ve aynı hayvanların süt örnekleri steril cam tüplere toplanarak süt serumları elde edildi. Daha sonra bu serumlar 56°C'lik benmaride 30 dk inaktivasyon işlemleri ve sterilite kontrolleri yapıldıktan sonra test uygulamasına kadar -25°C'lik dipfrizde saklandı.

#### **3.3. Hematolojik Kontrol Materyalleri**

Araştırmada hematolojik çalışmalarda kullanılmak üzere 469 adet süt ineğinin kan örnekleri steril vakumlu K<sub>3</sub> EDTA'lı<sup>(a)</sup> tüplere alınarak histolojik boyamalarda kullanıldı.

#### **3.4. Kan Serum Örneklerinin Hazırlanması**

Serolojik testler için steril vakumlu tüplere<sup>(a)</sup> alınan kan örnekleri 1500-2000 devirde 15-20 dk santrifüje edildi. Elde edilen serumlar -25°C'lik dipfrizde test uygulamasına kadar saklandı. BLV antikorları yönünden Agar jel immunodiffuzyon testi (AGID) uygulanacak olan bu serumlar test öncesinde 56°C'lik benmaride 30 dk inaktivasyon işlemine ve sterilite kontrollerine tabi tutuldu.

#### **3.5. Süt Serum Örneklerinin Hazırlanması**

Steril cam tüplere 10 ml kadar alınan süt örneklerinin üzerine 0.2 ml rennin ve 0.1 ml doymuş CaCl<sub>2</sub> ilave edildikten sonra 37°C'de 1 saat inkubasyona bırakıldı. Daha sonra 3000 devir de 15-20 dk santrifüje edilip bir spatül yardımıyla krema tabakası uzaklaştırıldı. Pastör pipeti yardımıyla serum alındı. Dipfrize kaldırılmadan önce 56°C'de 30 dk benmaride inaktive edilen ve sterilite kontrolleri yapılan süt serumları, ELISA testi uygulamasına kadar -25°C'lik dipfrizde saklandı.

<sup>(a)</sup>: BD Vacutainer systems, Belliver Industrial Estate, Plymouth, United Kingdom.



Tablo 3.1. Örneklenen hayvanların ilçelere göre dağılımları

İlçeler	İşletme Kodları	Örnek sayısı
Burdur/Merkez	M1	220
	M2	
	M3	
Burdur/Yeşilova	Y1	50
	Y2	
Burdur/Tefenni	T1	120
	T2	
	T3	
Burdur/Ağlasun	A1	79
	A2	
<b>Toplam</b>		<b>469</b>

Tablo 3.2. Örneklenen hayvanların yaşlara göre dağılımları ve yüzde oranları

Hayvan yaşı	Örnek sayısı	Yüzde oranları
3	124	26.4
4	19	4.1
5	180	38.4
6	90	19.2
7	47	10.1
8	5	1.0
9	2	0.4
10	2	0.4
<b>Toplam</b>	<b>469</b>	<b>100</b>

### 3.6. Hematolojik Kontrol Materyalleri

469 adet süt ineğinden steril vakumlu K<sub>3</sub> EDTA'lı tüplere alınan 10 ml'lik kan rneklelerinin her birinden 4 adet frotiler hazırlanarak oda sıcaklığında (22-23°C) kurutuldu ve soğuk (-10°C) gluteraldehit-aseton tespit sıvısında 3 dakika süreyle tespit edildi. Tespit sonunda, frotiler 3 defa distile suyla yıkanarak oda sıcaklığında kurutuldu. Kurutulan frotilerin 2 adedi May Grünwald-Giemsa boyaması, 2 adedi de Alfa-Naftil Asetat Esteraz (ANAE) enzim boyaması amacıyla kullanıldı.

Histolojik boyamalar için steril vakumlu K<sub>3</sub> EDTA'lı tüplere alınan kan rnekleleri frotilerin hazırlanmasından sonra total lökosit sayımı yapıldı. Frotilerin hazırlanıp, boyanması ve total lökosit sayımı işlemleri 24 saat içerisinde gerçekleştirildi.

### 3.7. Agar Jel İmmunodiffüzyon (AGID) Testi

#### 3.7.1. Antijen

Agar-jel immunodiffüzyon testi için hazır olarak kit içerisinde bulunan ticari BL antijeni<sup>(b)</sup> kullanıldı.

#### 3.7.2. Pozitif kontrol serum

Ticari liyofilize halde satılan BL pozitif kontrol serumu<sup>(c)</sup> kullanıldı.

#### 3.7.3. Negatif kontrol serum

Laboratuvarımızda daha önceden bulunan Ftal Dana Serumu<sup>(d)</sup> kullanıldı.

<sup>(b, c)</sup>: Bommeli, Switzerland

<sup>(d)</sup>: Gibco, Scotland.

### 3.7.4. Agar'ın hazırlanması

Agar, Office International des Epizootique (OIE)'in (2000) bildirdiği yönteme göre hazırlandı. 750 ml bidistile su içerisinde 24.23 gr Tris methylamine<sup>(e)</sup> çözündürülüp, pH'sı 7.2'ye 2.5 M'lık HCl ile ayarlandı. 250 ml Tris/HCL solusyonunda 85 gr NaCl<sup>(f)</sup> eritilip, bu iki karışım toplam 1 lt'ye tamamlandı. Son olarak 8 gr Agarose<sup>(g)</sup> ilave edildi. Bu karışım 120°C'de 1 atmosfer basınçta 10 dk tutularak otoklavize edildi. Daha sonra 10 cm çapındaki petri kutularına hazırlanmış agar karışımından dökülerek donduruldu. +4°C'de 1 gece bekletilen agar üzerinde özel delici (22 mm çapında) ile merkezde (4 mm çapında) bir ve bunun periferinde (6 mm çapında) birbirine eşit uzaklıkta 6 delik açıldı. Açılan deliklere elimizdeki sıvı agardan (uygun miktarda delik tabanlarının kapanması için) konuldu (resim 3.1).

### 3.7.5. Test'in uygulanması

AGID testi, kit prosedüründe bildirilen yönteme göre uygulandı. Agar üzerine usulüne uygun olarak açılmış deliklere, merkezdeki deliğe 25 µl antijen, saat yönünde periferdeki 6 adet deliğe sırasıyla BL pozitif kontrol serumu, birinci test edilen kan serumu, ikinci test edilen kan serumu, BL negatif kontrol serumu ve üçüncü test edilen kan serumu 50 µl miktarında konuldu. İşlenen petriyer 22-23°C'lik nemli etüvlere kaldırılarak inkubasyona bırakıldı. Petriyer, karanlık bir odada tek odaklı ışık kaynağı altında 18, 24, 48 ve 96. saatlerde değerlendirmeye alındı.

### 3.8. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

ELISA kiti olarak, HerdCheck IDEXX (Maine, U.S.A) firmasının BLV (süt) gp51 spesifik antikoru saptamak için geliştirilen ticari test ürünü kullanıldı.

Kit içerisinde inaktive edilmiş EBL-viral antijeni ile kaplanmış 5 adet pleyt (resim 3.2), Horseradish-peroksidaz ile işaretlenmiş anti-sığır gammaglobulin (BLV anti-bovine IgG:HRPO konjugatı), BLV pozitif süt kontrol serumu, BLV negatif süt kontrol serumu, BLV süt örnek diluent sıvısı, gentamisin ilave edilmiş (10x) fosfat konsantre/tween yıkama solusyonu, 3, 3', 5, 5' Tetramethylbenzidine (TMB) substrat solusyonu ve %0.125'lik hidroflorik asit (HF) içeren stop solusyonu bulunmaktadır.

<sup>(e, f)</sup> : Merck, Darmstad-Germany

<sup>(g)</sup> : Gibco, Scotland.

### 3.8.1.Yıkama solusyonunun hazırlanması

Yıkama solusyonu, firmanın bildirdiği prosedüre göre hazırlandı. 10x konsantre yıkama (süt) solusyonu, 1/10 oranında bidistile su ile dilue edildi. Her pleyt için 30 ml 10x konsantre yıkama (süt) solusyonu, 270 ml bidistile su ile dilue edilerek yıkama solusyonu hazırlandı.

### 3.8.2.Test'in uygulanması

Test, HerdCheck IDEXX firmasının BLV(süt)-ELISA kitinin prosedürüne göre yapıldı.

İki yüz mikrolitre ( $\mu$ l) test edilen süt serumu, 200  $\mu$ l BLV süt örnek diluent sıvısı ile  $\frac{1}{2}$  oranında sulandırılıp BLV antijeni ile kaplı pleytlerdeki gözlere 200  $\mu$ l bir örnekten iki göze konuldu. 200  $\mu$ l negatif kontrol (süt) ve 200  $\mu$ l pozitif kontrol (süt) serumları ikişer adet olacak şekilde gözlere yerleştirildi. Sulandırılmış örnekler, pleyt gözlerine yerleştirildikten sonra 22-23°C'lik etüvde 90 dk inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon sonrası pleytlerdeki sıvılar boşaltılıp, 300  $\mu$ l miktarında yıkama solusyonu ile 4 defa yıkandı. Yıkama sonrası pleyttteki tüm gözlere 100  $\mu$ l HRPO konjugatı ilave edilip, 22-23°C'lik etüvde 30 dk inkubasyona bırakıldı. HRPO konjugatı boşaltılıp aynı miktarda yıkama solusyonu ile 4 kez yıkandı. Ardından tüm gözlere 100  $\mu$ l TMB substrat solusyonu ilave edildi. 25°C'lik etüvde 15 dk inkube edildikten sonra tüm gözlere 100  $\mu$ l Stop solusyonu ilave edilerek değerlendirmeye alındı.

### 3.8.3. Test'in değerlendirilmesi

Mikropleyt'ler otomatik ELISA okuyucusuna yerleştirilerek optik dansite (OD) değeri 620 nm'ye ayarlanmış filtre ile okundu. ELISA okuyucusu ile absorbands değerler, kullanılan test kitindeki açıklamalar doğrultusunda her süt serumu için yine kite ait özel değerlendirme prosedürü (IDEXX-HerdCheck) ile aşağıdaki şekilde hesaplandı.

1- Ortalama Negatif Kontrol Serum Hesaplanması (NCx)

$$NCx = \frac{A_1 + A_2}{2}$$

2- Ortalama Pozitif Kontrol Serum Hesaplanması (PCx)

$$PCx = \frac{A_3 + A_4}{2}$$

### 3- Test serum için OD değerinin hesaplanması (S/P)

$$S/P = \frac{\text{Örnek A}(620)\text{-NCx}}{\text{PCx-NCx}}$$

Test sonuçlarının değerlendirmeye alınabilmesi için, NCx değerinin 0.200'ye eşit veya küçük olması, PCx değeri ile NCx değeri arasındaki farkın 0.075'e eşit veya büyük olması gerekmektedir.

## 3.9. Hematolojik uygulamalar

Alınan 469 adet süt sığırı kan örneklerinden ANAE enzim boyaması, May-Grünwald Giemsa boyaması ve total lökosit sayımı yapıldı.

### 3.9.1. Alfa-Naftil Asetat Esteraz (ANAE) Enzim Boyaması

Bu metot, Higgy ve ark (1977)'nin bildirdiği yöntemle göre yapıldı. İnkubasyon solusyonu 0.067 M fosfat tamponunun (pH 5.0, Na-dihybrid fosfat+Disodyum hibrid fosfat) 40 ml'sine 2.4 ml heksazotize edilmiş pararozanilin (sigma) solusyonu (2.4 ml %4'lük  $\text{NaNO}_3$ + 2.4 ml pararozaniline) ve 0.4 ml asetonda eritilmiş 10 mg Alfa-naftil asetat (sigma) (0.8 ml aseton içinde 20 mg substrat) eklenerek hazırlandı. Solusyonun pH'sı 2N NaOH ile 5.8'e ayarlandı. Hazırlanan inkubasyon solusyonu içerisine yerleştirilen frotiler oda sıcaklığında 4 saat süreyle bekletildiler.

İnkubasyon süresi biten frotilerin, distile suyla yıkandıktan sonra 0.1M asetat tamponunda (pH 4.2) hazırlanan %1'lik metil green (Merck) ile 10 dakika çekirdek boyaması yapıldı. Distile suyla yıkanan preparatlar, farklı dereceli alkol (70°, 80°, 96°, 96°, 2-absolute alkol) ve ksilol (ksilol I, II, III) serilerinden geçirilerek Entallen (Merck) ile kapatıldı.

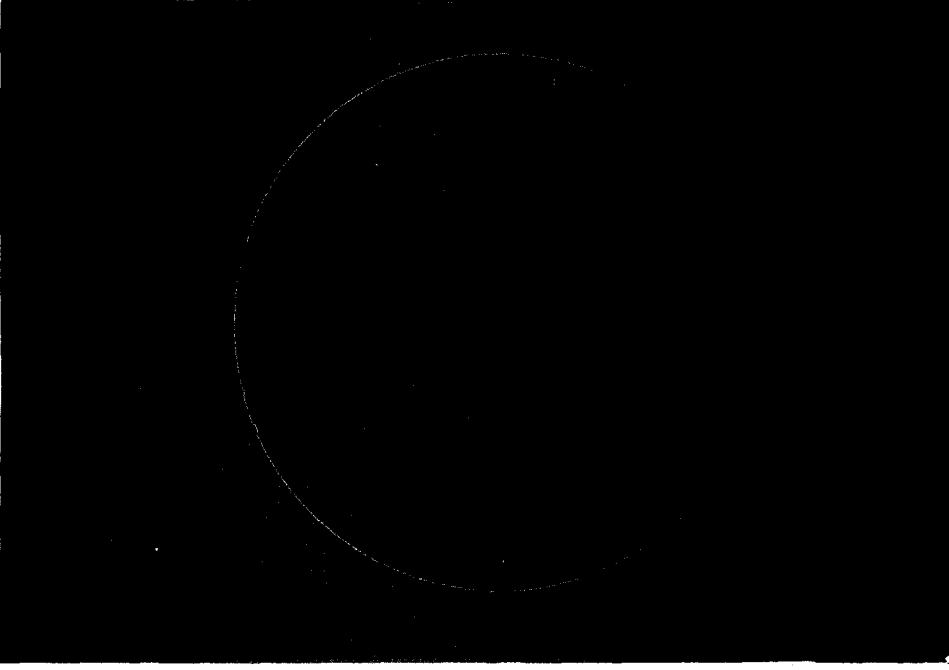
### 3.9.2. May-Grünwald Giemsa Boyaması

Tespit edilen frotiler havada kurutulduktan sonra her bir froti için 5 ml May-Grünwald boyası (Merck, Darmstadt- Germany) dökülerek 3-5 dk beklendi. Ardından froti üzerini kaplayacak şekilde bidistile su ilave edildi ve 1 dk sonra froti üzerindeki su dökülerek üzerine önceden hazırlanan Giemsa boyası (her froti için 5 ml, her ml için 1 damla Giemsa boyası) ilave edilip, 25-30 dk inkubasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda froti üzerindeki boya dökülerek bidistile su ile yıkandı (Culling ve ark 1985).

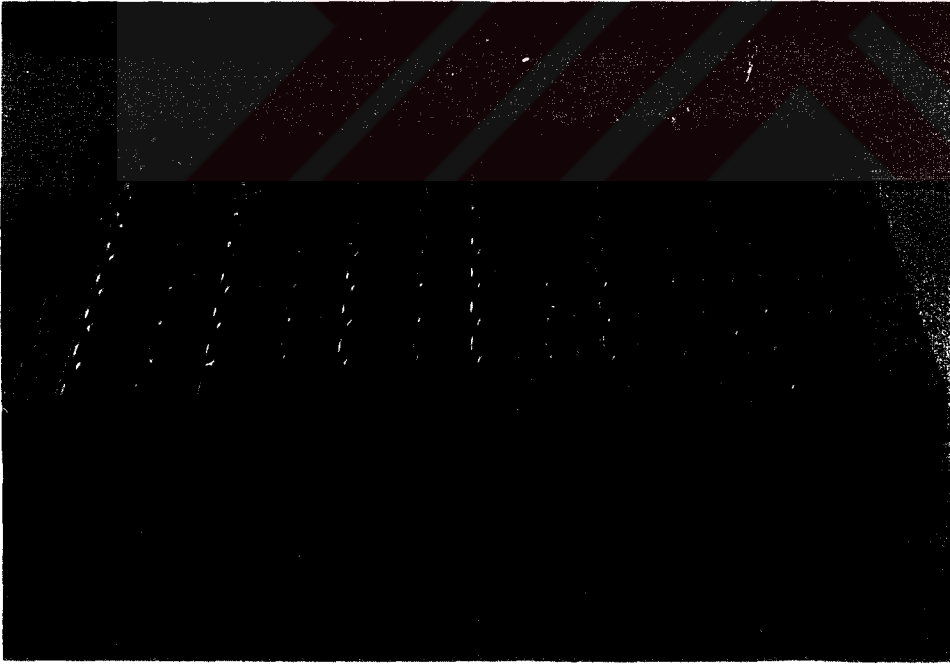
Bu yöntemle boyanan frotiler, ışık mikroskopunda (Olympus) x1000 büyütmede sayımları yapıldı. İncelemelerde her frotide toplam 200 adet lenfosit, monosit, bazofil, eozinofil ve nötrofil hücreleri sayımı yapıldı. Sayımlar sonunda elde edilen sayısal veriler, istatistiki yöntemlerle (Students-T testi) analiz edildi.

### 3.9.3. Lökosit Sayımı ve Hesaplanması

Lökosit sulandırma pipetine (Viteg, Germany) 1 çizgisine kadar kan çekildi. Pipetin ucu temizlendi, 11 çizgisine kadar Türk eriyiği (2 ml buzlu Asetik asit + 2 ml Jansiyen menekşesinin sudaki %1'lik eriyiği + 200 ml saf distile su karışımları ile hazırlandı) çekildi. Pipetin iki ucu baş ve işaret parmakları arasına, serbest kalan lastik kısmı küçük parmak ve yüzük parmağı arasına alınarak 3-5 dk içten dışa, dıştan içe dairesel hareketlerle sallandı. Böylece homojen bir karışım elde edildi. Önceden hazırlanmış olan Thoma lamındaki (Viteg, Germany) sayma kamarasına lam ile lamelin birleştiği yere 45°'lik eğimle pipetin ucu değiştirilerek kamaranın dolması sağlandı. Kapillarite özelliği nedeniyle sayma kamarası kendiliğinden doldu. Thoma lamı mikroskobun tablasına yerleştirilerek hücrelerin çökmesi için 2-3 dakika beklendi. Küçük büyütme ( $\times 10$ 'luk) ile sayım yapılan alan bulundu, kontrol edildi. Homojen bir dağılım sağlandığında sayma işlemine geçildi. Sayım işlemi, Thoma lamı üzerindeki  $1 \text{ mm}^3$ 'lük (5 orta kare yani 80 küçük karede) alanda bulunan hücrelerin tümü sayılarak gerçekleştirildi. Sayım sonunda  $1 \text{ mm}^3$  kanda bulunan lökosit sayısının tespiti, sayılan hücre sayısının 100 ile çarpılması ile belirlendi (Konuk 1981, Eksen 1991, Yılmaz 2000).



**resim 3.1.** Agar-Jel İmmunodiffuzyon testi için hazırlanmış petri kutusu.



**resim 3.2.** Enzyme Linked Immunosorbent Assay testinde kullanılan mikropleyt.

## 4.BULGULAR

### 4.1. Agar-Jel İmmunodiffüzyon Testi Sonuçları

Örnekleme yapıldığı Burdur-Merkez ve ilçelerinde yer alan 10 işletmeden sağlanan 469 adet süt sığırı kan serumunun AGID testi ile BLV spesifik antikorları yönünden yapılan kontrollerinde 23 (%4.9) adedi pozitif bulundu (Tablo 4.1).

Bu testte EBL pozitif bulunan hayvanların ilçelere göre; Burdur-Merkez'de 12 adet (%5.45), Burdur-Yeşilova'da 2 adet (%4.00), Burdur-Tefenni'de 5 adet (%4.16) ve Burdur-Ağlasun'da 4 adet (%5.06) pozitif hayvan tespit edildi (Tablo 4.1). Araştırmada, örneklenen hayvanların yaş durumları dikkate alındığında 3 yaşlıların 4'ünde (%3.23), 5 yaşlıların 12'sinde (%6.67), 6 yaşlıların 3'ünde (%3.33), 7 yaşlıların 4'ünde (%8.51) EBL enfeksiyonuna karşı AGID testi ile seropozitiflik tespit edildi. 4, 8, 9 ve 10 yaşlı hayvanlarda antikor tespit edilemedi (Tablo 4.2).

Bovine Löykozis Virus pozitif kontrol ile antijen konulan gözler arasında presipitasyon hattı şekillenirken, BLV negatif kontrol ile antijen konulan gözler arasında presipitasyon hattı şekillenmedi. BLV'na karşı antikor bulunan kan serumları ile antijen arasında presipitasyon hattı şekillenirken, BLV'na karşı antikor taşımayan kan serumları ile antijen arasında presipitasyon hattı şekillenmedi (resim 4.1).

### 4.2. Enzyme Linked İmmunosorbent Assay Sonuçları

Dört yüz altmış dokuz adet süt sığırından alınan süt serumlarının BLV spesifik antikorlar yönünden ELISA testi ile yapılan kontrolünde 90 (%19.2) adedi pozitif bulundu (Tablo 4.3).

ELISA testinde EBL pozitif hayvanların ilçelere göre; Burdur-Merkez'de 28 adet (%12.70), Burdur-Yeşilova'da 10 adet (%20), Burdur-Tefenni'de 34 adet (%28.30) ve Burdur-Ağlasun'da 18 adet (%22.80) pozitif hayvan tespit edildi (Tablo 4.3). Çalışmada, örneklenen hayvanların yaş'a göre; 3 yaşlıların 27'sinde (%21.77), 4 yaşlıların 4'ünde (%21.05), 5 yaşlıların 29'unda (%16.11), 6 yaşlıların 16'sında (%17.77), 7 yaşlıların 11'inde (%23.40), 8 yaşlıların 3'ünde (%60) seropozitiflik tespit edildi. 9 ve 10 yaşlı hayvanlarda pozitiflik tespit edilemedi (Tablo 4.4).

Her örnek için S/P değerleri hesaplandı. Buna göre, S/P değeri 0.15'ten küçük ise sonuç negatif (-), S/P değeri 0.15'e eşit veya bu değerden büyükse sonuç pozitif (+) olarak değerlendirildi. Hesaplama öncesinde makroskopik yönden renk değişikliğinin pozitif reaksiyonlarda mavi renk aldığı görüldü. Ancak bu değerlendirme tek başına yetersiz ve



yanıltıcı olacağından, OD değerleri dikkate alındı. BLV (süt) pozitif kontrol serum gözlerinde (B1, B2) makroskopik olarak mavi renk oluşumu gözlenirken, BLV (süt) negatif kontrol serum gözlerinde (A1, A2) renk değişimi gözlenmedi. Diğer gözlerde incelenen süt serumu örneklerinde mavi renk oluşumu takip edilmiştir. Özellikle bu pleyt için E5, E6, G5, G6, D7, D8, A11, A12, G11, G12 gözlerinde koyu mavi renk oluşumu, E11, E12, F11, F12, C11, C12, B11, B12, H11, H12, H9, H10 gözlerinde daha açık mavi renk oluşumu gözlenmiştir. Ancak makroskopik değerlendirme tek başına yetersiz ve yanıltıcı olacağından OD değerleri dikkate alınmıştır (resim 4.2).

### 4.3. AGID ve ELISA Testlerinin Karşılaştırmalı Sonuçları

Burdur-Merkez ve ilçelerinde süt sığırları hayvanların tümü Holstein kültür ırkı ineklerden oluştuğu için çalışma materyalini oluşturan 469 adet Holstein kültür ırkında EBL enfeksiyonunun prevalansı AGID (kan) testiyle %4.9 ve ELISA (süt) testiyle %19.2 olarak saptandı (Tablo 4.5).

Her iki testte toplam 9 adet hayvan pozitif olarak tespit edilmiştir. Her iki testte pozitif olan hayvanların yaşa göre dağılımları ve oranları Tablo 4.6'da özetlenmiştir.

Çalışmada örneklerin alındığı ilçelere göre AGID ve ELISA testi karşılaştırılması yapılmıştır. ELISA(+)/AGID(+) test sonuçlarına göre Burdur-Merkez'de 4 adet (%1.81), Burdur-Yeşilova'da 1 adet (%2), Burdur-Tefenni'de 3 adet (%2.5) ve Burdur-Ağlasun'da 1 adet (%1.26); ELISA(+)/AGID(-) test sonuçlarına göre Burdur-Merkez'de 24 adet (%10.90), Burdur-Yeşilova'da 9 adet (%18), Burdur-Tefenni'de 31 adet (%25.83) ve Burdur-Ağlasun'da 17 adet (%21.51); ELISA(-)/AGID(+) test sonuçlarına göre Burdur-Merkez'de 8 adet (%3.63), Burdur-Yeşilova'da 1 adet (%2), Burdur-Tefenni'de 2 adet (%1.66) ve Burdur-Ağlasun'da 3 adet (%3.79) hayvan tespit edildi (Tablo 4.7).

Araştırmada ELISA testinde elde edilen OD değerlerinin hayvan sayısına göre dağılımı tespit edilmiştir (Tablo 4.8).

Çalışmada uygulanan AGID ve ELISA testleri arasında %79.74'lük bir korrelasyon, AGID testinin ELISA'ya göre %10 sensitivite ve %96.3 spesifisite, ELISA'nın AGID testine göre %39.13 sensitivite ve %81.83 spesifisite gösterdiği tespit edildi (Tablo 4.9). Sürü genelinde AGID testi ile 14 adet (%13.46) ineğe ait kan serumunda, ELISA testi ile 81 adet (%77.89) ineğe ait süt serumunda ve hem AGID hem de ELISA testleri ile 9 adet (%8.65) ineğe ait kan-süt serumlarında seropozitiflik tespit edildi (Tablo 4.7).

Örnekleme yapıldığı ilçelerde kan serumu örneklerinin AGID testi ve süt örneklerinin ELISA testi kontrolü sonucunda belirlenen pozitiflik oranları, Burdur-

Merkez'de; %5.45 ve %12.7, Burdur-Yeşilova'da; %4.0 ve %20, Burdur-Tefenni'de; %4.16 ve %28.3, Burdur-Ağlasun'da; %5.06 ve %22.8 olarak saptandı (Tablo 4.5).

Enzootik Bovine Löykozis enfeksiyonunun teşhisinde süt örnekleri kullanılarak yapılan ELISA testinin, kan serumu örneklerinde AGID testine oranla her yaşta daha duyarlı olduğu belirlendi (Tablo 4.2, Tablo 4.4).

#### 4.4. Hematolojik Test Sonuçları

Sürü genelinde ELISA seropozitif hayvanların perifer kan lenfosit oranları, perifer kan T lenfosit (ANAE+ lenfosit) düzeyleri (resim 4.4, 4.5, 4.6), B lenfosit (ANAE -lenfosit) (resim 4.3), null hücresi (resim 4.10), lenfosit (resim 4.11, 4.12), monosit (resim 4.7, 4.8), nötrofil (resim 4.9), eozinofil (resim 4.13), bazofil hücreleri ve total lökosit oranları tespit edildi (Tablo 4.10).

Sürü genelinde AGID seropozitif hayvanların perifer kan lenfosit oranları, ANAE+ T lenfosit oranları (resim 4.4, 4.5, 4.6), ANAE – B lenfosit oranları (resim 4.3), null hücresi (resim 4.10), lenfosit (resim 4.11, 4.12), monosit (resim 4.7, 4.8), nötrofil (resim 4.9), eozinofil (resim 4.13), bazofil hücreleri ve total lökosit oranları tespit edildi (Tablo 4.10).

Sürü genelinde hem ELISA ve hem de AGID seropozitif hayvanların ANAE+ T lenfosit oranları (resim 4.4, 4.5, 4.6), ANAE – B lenfosit oranları (resim 4.3), null hücresi (resim 4.10), lenfosit (resim 4.11, 4.12), monosit (resim 4.7, 4.8), nötrofil (resim 4.9), eozinofil (resim 4.13), bazofil hücreleri ve total lökosit oranları belirlendi (Tablo 4.10).

Yaşa göre hematolojik değerlerde elde edilen sonuçlara göre; 3 yaşlı, 4 yaşlı, 5 yaşlı, 6 yaşlı, 7 yaşlı ve 8 yaşlı hayvanlarda ELISA seropozitivite oranları sırasıyla %21.77, %21.05, %16.11, %17.77, %23.40 ve %60 olarak belirlenmiştir. Bu yaşların tümünde, ELISA seropozitif hayvanların perifer kan lenfosit oranları, perifer kan T lenfosit (ANAE+ lenfosit) düzeyleri, B lenfosit (ANAE- lenfosit) düzeyleri, total lökosit sayıları, kandaki total lenfosit, nötrofil ve null hücresi oranları belirlendi (Tablo 4.11).

Araştırmada yaşa göre bulunan % Lenfosit ve Total Lökosit ( $\text{mm}^3$ ) oranları Avrupa Ekonomik Topluluğunun (EEC) EBL enfeksiyonu için belirlediği standart anahtara göre değerlendirme yapılmıştır (Tablo 4.12, 4.13).

Bu yöntemle boyanan kan frotilerinin ışık mikroskopunda (Olympus) x1000 büyütmede perifer kan T lenfosit (ANAE+lenfosit), B lenfosit (ANAE-lenfosit) ve null hücresi sayımları yapıldı. İncelemelerde tipik, kahverengi-kırmızı granüllere sahip olan lenfositler ANAE-pozitif olarak değerlendirildi. Her frotide 200 lenfosit sayılarak her örnek için pozitif lenfosit yüzdeleri hesaplandı. Monositler tipik çekirdek morfolojileri, büyükleri ve

diffüz, ince granüler pozitive göstermeleriyle ANAE+ lenfositlerden kolayca ayrıldılar. Sayımlar sonunda elde edilen sayısal veriler, Açık (Arc sinus) transformasyon metodu kullanarak istatistiki yöntemlerle (Students-T testi) analiz edildi. Verilerin tablolaştırılmasında transformasyon öncesi gerçek değerler kullanıldı. ANAE pozitivitesi lenfosit, monosit ve makrofajlarda farklı şekillerde gözlenmektedir. İnsan ve sığır perifer kan lenfositlerinde iki farklı pozitive tipi tespit edilmiştir (Higgy ve ark 1977, Knowles ve ark 1978, Pinkus ve ark 1979, Dhingra ve ark 1982, Pigarevski ve Zel'tser 1982, Divanian ve ark 1990). Bu çalışmada da, bir ya da birkaç adet kırmızı-kahverengi lokalize ve diffüz granülden ibaret olan nokta tarzında pozitive (Dot Like Positivity Pattern, T lenfositlerine özgü olan pozitive) tespit edildi (resim 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7). İkinci pozitive tipi olan ince granüler boyama (Fine Granüler Positivity Pattern) lokalize tip pozitive gösteren null hücreleri (resim 4.10), granüllerin oluşmadığı ve ANAE negatif reaksiyon verdiği B lenfositleri (resim 4.3, 4.9) gözlemlendi. Monositler, sitoplazmada diffüz ve güçlü bir pozitive göstererek ANAE+ lenfositlerden ayrımı yapıldı (resim 4.7, 4.8).

May-Grünwald Giemsa boyaması ile lenfositler sitoplazmasında lokal iri mavi granüller (resim 4.11, 4.12), eozinofiller diffüz kırmızı küçük granüller (resim 4.13), bazofiller diffüz mavi küçük granüller ve tipik morfolojide mavi granüllü nötrofiller gözlemlendi.

#### **4.5. ELISA ve Hematolojik Uygulamaların Karşılaştırmalı Sonuçları**

Araştırmada, EBL enfeksiyonunun teşhisinde kullanılan ELISA ve Hematolojik testlerin sensitivite ve spesifitesini tespit etmek için yaş kriter alınarak her iki test arasında karşılaştırma yapılmıştır.

Çalışmada her iki testte pozitif sonuç veren hayvanların yaşlara göre % dağılımları sırasıyla; 3 yaşta (%21.77), 4 yaşta (%21.05), 5 yaşta (%16.11), 6 yaşta (%17.77), 7 yaşta (%23.40), 8 yaşta (%60), 9 yaşta (%0) ve 10 yaşta (%0) tespit edilmiştir. Her iki testte negatif sonuç veren hayvanların yaşlara göre % dağılımları sırasıyla; 3 yaşta (%78.23), 4 yaşta (%78.95), 5 yaşta (%83.89), 6 yaşta (%82.23), 7 yaşta (%76.60), 8 yaşta (%40) , 9 yaşta (%40) ve 10 yaşta (%40) tespit edilmiştir. Çalışmada ELISA (+) Hematoloji (-) ve ELISA (-) Hematoloji (+) test karşılaştırmalarında tüm yaş gruplarındaki hayvanlarda reaksiyon tespit edilememiştir (Tablo 4.14).

Çalışmada her iki test arasında karşılaştırma yapıldığında %100'lük bir uyum olduğu tespit edilmiştir. (Tablo 4.15).

Tablo 4.1. AGID testinde EBL pozitif bulunan kan örneklerinin ilçelere göre dağılımı

İlçeler	Alınan örnek türü	Alınan örnek sayısı	Pozitif	
			n	%
Burdur/Merkez	Kan	220	12	5.45
Burdur/Yeşilova	Kan	50	2	4.00
Burdur/Tefenni	Kan	120	5	4.16
Burdur/Ağlasun	Kan	79	4	5.06
<b>Toplam</b>		<b>469</b>	<b>23</b>	<b>4.90</b>

Tablo 4.2. AGID testinde EBL pozitif bulunan kan örneklerinin yaşa göre dağılımı ve oranları

Hayvan yaşı	Alınan örnek sayısı	Pozitif kan sayısı	Pozitif kan yüzdesi (%)
3	124	4	3.23
4	19	0	0
5	180	12	6.67
6	90	3	3.33
7	47	4	8.51
8	5	0	0
9	2	0	0
10	2	0	0
<b>Toplam</b>	<b>469</b>	<b>23</b>	<b>4.90</b>

Tablo 4.3. ELISA testinde EBL pozitif bulunan süt örneklerinin ilçelere göre dağılımı

İlçeler	Alınan rnek türü	Alınan rnek sayısı	Pozitif	
			n	%
Burdur/Merkez	Süt	220	28	12.70
Burdur/Yeşilova	Süt	50	10	20.00
Burdur/Tefenni	Süt	120	34	28.30
Burdur/Ağlasun	Süt	79	18	22.80
<b>Toplam</b>		<b>469</b>	<b>90</b>	<b>19.20</b>

Tablo 4.4.ELISA testinde EBL pozitif bulunan süt örneklerinin yaşı göre dağılımı ve oranları

Hayvan yaşı	Alınan rnek sayısı	Pozitif süt sayısı	Pozitif süt yüzdesi (%)
3	124	27	21.77
4	19	4	21.05
5	180	29	16.11
6	90	16	17.77
7	47	11	23.40
8	5	3	60.00
9	2	0	0.00
10	2	0	0.00
<b>Toplam</b>	<b>469</b>	<b>90</b>	<b>19.20</b>

Tablo 4.5. İlçelerdeki AGID ve ELISA testi pozitiflik oranlarının (%) karşılaştırılması

İlçeler	Örnek sayısı	AGID (%)	ELISA (%)
Burdur/Merkez	220	5.45	12.7
Burdur/Yeşilova	50	4.00	20.0
Burdur/Tefenni	120	4.16	28.3
Burdur/Ağlasun	79	5.06	22.8
<b>Toplam</b>	<b>469</b>	<b>4.9</b>	<b>19.2</b>

Tablo.4.6.Hem AGID hemde ELISA testlerinde EBL pozitif bulunan kan ve süt örneklerinin yaşa göre dağılımı

Hayvan yaşı	Alınan örnek sayısı kan-süt	Pozitif kan-süt sayısı	Pozitif kan-süt yüzdesi (%)
3	124	2	1.61
4	19	0	0
5	180	3	1.66
6	90	3	3.33
7	47	1	2.12
8	5	0	0
9	2	0	0
10	2	0	0
<b>Toplam</b>	<b>469</b>	<b>9</b>	<b>1.92</b>

Tablo 4.7. Örneklerin alındığı ilçelerdeki AGID ve ELISA testi karşılaştırılması

İlçeler	Örnek sayısı kan-süt	BLV Antikoru			Negatif
		ELISA+ AGID+	ELISA+ AGID-	ELISA- AGID+	
Burdur/Merkez	220	4 (%1.81)	24 (%10.90)	8 (%3.63)	184 (%83.64)
Burdur/Yeşilova	50	1 (%2)	9 (%18)	1 (%2)	39 (%78)
Burdur/Tefenni	120	3 (%2.5)	31 (%25.83)	2 (%1.66)	84 (%70)
Burdur/Ağlasun	79	1 (%1.26)	17 (%21.51)	3 (%3.79)	58 (%73.41)
<b>Toplam</b>	<b>469</b>	<b>9(%8.65)</b>	<b>81 (%77.89)</b>	<b>14 (%13.46)</b>	<b>365(77.83)</b>

Tablo 4.8. ELISA OD değerleri ile hayvan sayısına göre dağılım sonuçları

OD	(-)			(+)							
	0≥	0.05≥	0.1≥	0.15≥	0.2≥	0.25≥	0.5≥	1.0≥	1.5≥	2≥	2.5≥
<b>Hayvan sayısı</b>	190	156	33	20	9	25	8	10	6	2	10

Tablo 4.9. ELISA ve AGID testleri arasında korrelasyon

AGID		ELISA		Toplam
		+	-	
+		9	14	23
-		81	365	446
<b>Toplam</b>		90	379	469

Korrelasyon (%)= %79.74 (374/469)

AGID testinin ELISA testine göre; sensitivite= %10.0 , spesifisite=%96.3

ELISA testinin AGID testine göre; sensitivite= %39.13, spesifisite=%81.83

Tablo 4.10. Çalışmada ELISA ve AGID testleri ile incelenen örneklerin tamamından elde edilen hematolojik kan bulguları ve bunların istatistiksel analiz sonuçları.

	T-lenfosit oranı (%)	B-lenfosit oranı (%)	Null hücreli oranı (%)	Total lenfosit oranı (%)	Monosit oranı (%)	Nötrofil oranı (%)	Eozinofil oranı (%)	Bazofil oranı (%)	Total Lökosit sayısı (mm <sup>3</sup> /kan)
Elisa+ N=90	28.53±12.71	51.82±13.95	19.64±9.69	56.5±13.4	1.70±3.69	33.4±13.0	5.74±5.29	2.70±2.91	10861±2940
Elisa - N=379	49.384±13.382	24.080±11.215	26.726±14.578	30.55±8.31	2.13±3.94	58.6±10.1	5.90±5.55	2.61±3.33	5202±1260
Significant	P=0.0000 **	P=0.0000 **	P=0.0000 **	P=0.0000 **	P=0.33	P=0.0000 **	P=0.81	P=0.80	P=0.0000 **
Agid+ N=23	39.93±16.92	36.91±16.50	23.24±11.91	44.5±16.9	2.00±4.48	47.0±15.5	4.74±4.42	1.70±2.30	8109±3779
Agid- N=446	45.664±15.482	29.017±15.970	25.476±14.151	35.1±13.6	2.05±3.87	54.1±14.5	5.93±5.54	2.67±3.28	6194±2725
Significant	P=0.12	P=0.023 *	P=0.46	P=0.015 *	P=0.96	P=0.043 *	P=0.23	P=0.063	P=0.025 *
Elisa/Agid+ N=9	25.17±9.47	55.06±6.01	19.78±11.14	61.67±9.77	2.22±6.67	31.00±8.34	3.78±3.63	1.33±1.80	12067±2930
Elisa/Agid- N=365	49.382±13.398	24.036±11.325	26.774±14.672	30.44±8.25	2.14±3.99	58.6±10.1	5.92±5.58	2.64±3.35	5188±1267
Significant	P=0.0001 **	P=0.0000 **	P=0.14	P=0.0000 **	P=0.97	P=0.0000 **	P=0.12	P=0.067	P=0.0001 **

\* Aynı sütündeki/satırdaki ortalama değerler arası farklar önemlidir (P<0.05).

\*\* Aynı sütündeki/satırdaki ortalama değerler arası farklar önemlidir (P<0.001).

N: Hayvan sayısı

P: Önemlilik değeri



Tablo.4.11. ELISA seronegatif ve seropozitif hayvanların yaş gruplarına göre dağılımları ile bu hayvanların hematolojik bulguları.

	ELISA (%)	T-lenfosit oranı (%)	B-lenfosit oranı (%)	Null hücre oranı (%)	Tot.Lenf. oranı (%)	Monosit oranı (%)	Nötr. oranı (%)	Eoz. Oranı (%)	Baz. oranı (%)	Tot. Lök. sayısı (mm <sup>3</sup> /kan)
3 yaş ELISA+ N=27	21.77	28.93±12.46	51.09±9.70	19.98±7.23	57.3±14.2	1.56±3.25	33.7±13.4	4.89±4.33	2.63±3.21	10826±2036
ELISA- N=97	78.23	50.25±13.40	26.09±11.80	23.66±11.61	30.95±9.15	2.78±4.57	57.4±11.4	5.25±5.08	2.92±4.01	5425±1321
Significant		P=0.0000 **	P=0.0000 **	P=0.093 *	P=0.0000 **	P=0.12	P=0.0000**	P=0.72	P=0.70	P=0.0000 **
4 yaş ELISA+ N=4	21.05	43.75±10.34	38.25±19.62	18.00±14.31	51.2±17.3	2.25±3.86	38.7±19.7	5.25±3.59	2.50±1.91	8900±483
ELISA- N=15	78.95	59.13±11.86	15.07±9.27	25.80±13.60	27.67±7.07	4.20±6.17	61.3±10.7	6.60±5.14	1.53±2.26	5093±1817
Significant		P=0.050*	P=0.10	P=0.37	P=0.076 *	P=0.46	P=0.11	P=0.57	P=0.43	P=0.0000 **
5 yaş ELISA+ N=29	16.11	26.19±11.77	54.17±17.04	19.64±11.05	54.4±14.8	1.34±2.21	35.3±16.0	6.10±4.69	3.00±2.96	11255±3566
ELISA- N=151	83.89	48.60±13.81	23.225±10.753	28.32±15.43	30.54±8.15	1.84±3.19	59.38±9.67	5.78±5.50	2.57±3.09	5397±1278
Significant		P=0.0000 **	P=0.0000 **	P=0.0020 **	P=0.0000 **	P=0.31	P=0.0000**	P=0.74	P=0.48	P=0.0000 **
6 yaş ELISA+ N=16	17.77	28.75±11.00	54.78±9.14	16.47±9.58	58.9±13.3	1.50±4.98	29.81±9.42	6.31±8.03	3.06±2.86	11994±3491
ELISA- N=74	82.23	50.11±12.30	26.70±11.66	23.86±15.08	31.30±7.86	1.46±3.40	58.61±8.82	5.84±6.42	2.27±2.97	4804±973
Significant		P=0.0000 **	P=0.0000 **	P=0.045 **	P=0.0000 **	P=0.98	P=0.0000**	P=0.83	P=0.33	P=0.0000 **
7 yaş ELISA+ N=11	23.40	22.45±9.52	54.95±3.47	22.59±10.89	58.91±7.66	2.73±5.88	29.73±4.29	6.27±5.41	2.36±2.80	9318±1797
ELISA- N=36	76.60	42.60±10.36	22.64±7.70	34.76±13.98	29.14±7.92	1.89±4.06	57.5±10.04	7.67±5.12	3.25±3.47	4744±1003
Significant		P=0.0000 **	P=0.0000 **	P=0.010 *	P=0.0000 **	P=0.67	P=0.0000**	P=0.46	P=0.40	P=0.0000 **
8 yaş ELISA+ N=3	60	48.5±19.0	26.5±23.9	25.00±5.00	54.33±4.04	3.00±2.65	37.00±1.00	5.67±5.51	0.00	9600±3027
ELISA- N=2	40	64.00±2.83	22.00±12.73	14.00±15.6	39.00±1.41	1.00±1.41	55.00±1.41	4.00±2.83	0.00	4850±1344
Significant		P=0.30	P=0.91	P=0.51	P=0.026 *	P=0.39	P=0.041**	P=0.70		P=0.14

\* Aynı sütundaki/satırdaki ortalama değerler arası farklar önemlidir (P<0.05).

\*\* Aynı sütundaki/satırdaki ortalama değerler arası farklar önemlidir (P<0.001)

Tablo 4.12. Sığır Löykoz'un teşhisinde yararlanılan ve EEC tarafından belirtilen perifer kan lökosit sayıları esas alınarak hazırlanmış olan kan tablo anahtarı (Levy ve ark 1977).

Yaş grupları	Normal	Şüpheli	Lökemik
0-1	<11000	11000-13000	>13000
1-2	<10000	10000-12000	>12000
2-3	<8500	8500-10500	>10500
3-4	<7500	7500-9500	>9500
4-5	<6500	6500-8500	>8500
5-6	<6000	6000-8000	>8000
6 ve üzeri	<5500	5500-7500	>7000

Tablo 4.13. ELISA testi ile seronegatif ya da seropozitif olarak tespit edilen hayvanların perifer kan lenfosit oranları ve total lökosit sayılarının EEC tablosunda verilen değerlerle karşılaştırılması.

Yaş grubu	Pozitif-negatif hayvan sayısı	Lenfosit oranı (%)	Total Lökosit sayısı (hücre/mm <sup>3</sup> kan)	EEC standartlarına göre sonuç
3	27(+)	57.3±14.2	10826±2036	Lökemik
3	97(-)	30.95±9.15	5425±1321	Normal
4	4(+)	51.2±17.3	8900±483	Lökemik
4	15(-)	27.67±7.07	5093±1817	Normal
5	29(+)	54.4±14.8	11255±3566	Lökemik
5	151(-)	30.54±8.15	5397±1278	Normal
6	16(+)	58.9±13.3	11994±3491	Lökemik
6	74(-)	31.30±7.86	4804±973	Normal
7	11(+)	58.91±7.66	9381±1797	Lökemik
7	36(-)	29.14±7.92	4744±1003	Normal
8	3(+)	54.33±4.04	9600±3027	Lökemik
8	2(-)	39.00±1.41	4850±1344	Normal

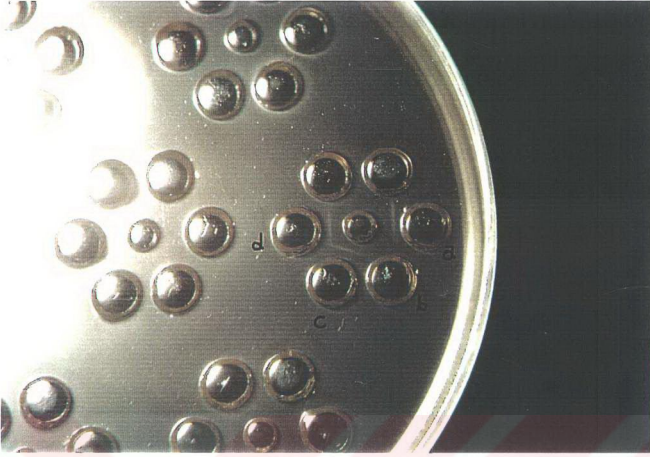
Tablo 4.14. Yaş'a göre hayvan sayısının ve yüzdesinin hematolojik uygulamalar ve ELISA ile karşılaştırılması

Hayvan yaşı	Hematoloji – ELISA -		Hematoloji + ELISA+		Hematoloji + ELISA -		Hematoloji – ELISA+	
		%		%		%		%
3	97	78.23	27	21.77	0	0	0	0
4	15	78.95	4	21.05	0	0	0	0
5	151	83.89	29	16.11	0	0	0	0
6	74	82.23	16	17.77	0	0	0	0
7	36	76.60	11	23.40	0	0	0	0
8	2	40	3	60	0	0	0	0
9	2	40	0	0	0	0	0	0
10	2	40	0	0	0	0	0	0
<b>Toplam</b>	379	100	90	100	0	0	0	0

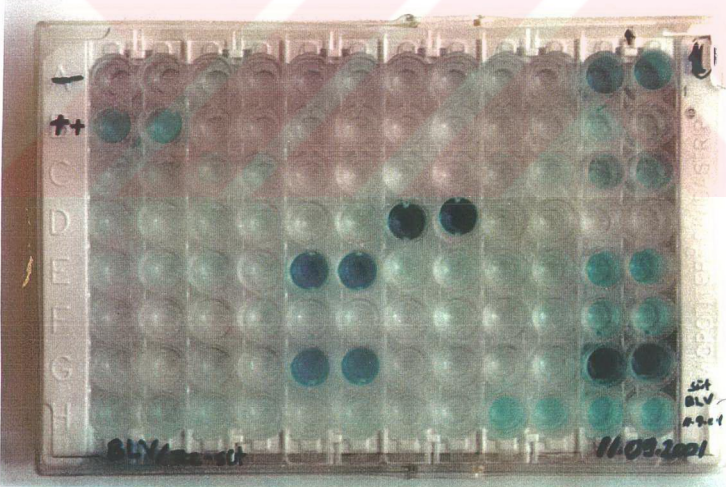
Tablo.4.15. Hematolojik uygulamalar ve ELISA arasında uyum

Hematoloji		ELISA		Toplam
		+	-	
Hematoloji	+	90	0	90
	-	0	379	379
<b>Toplam</b>		90	379	469

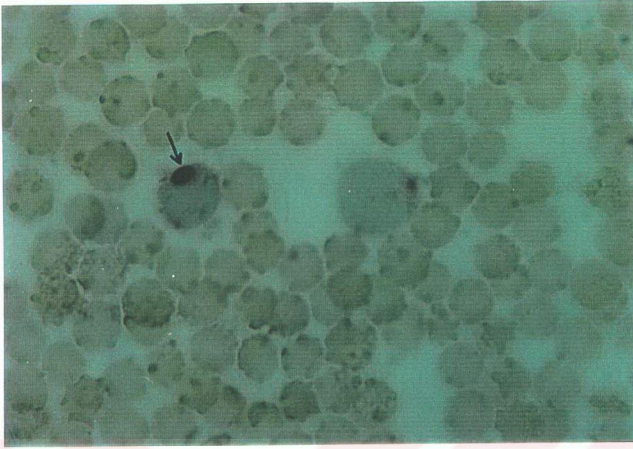
Uyum (%)= %100 (469/469)



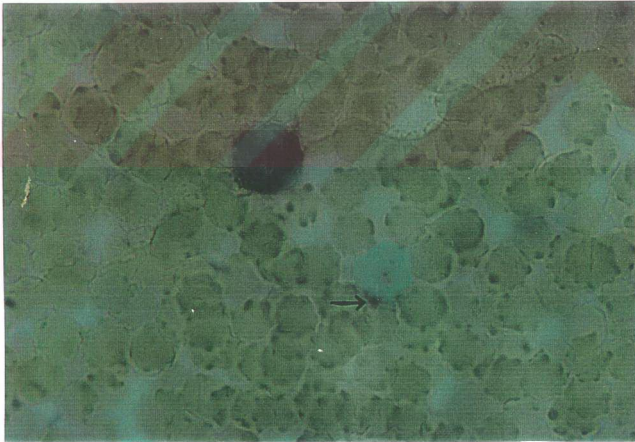
resim 4.1. Agar-Difüzyon testinde pozitif kontrol ve 2 adet pozitif örnek reaksiyonu. a- Pozitif kontrol. b- Negatif kontrol. c, d- Pozitif belirlenen örnekler.



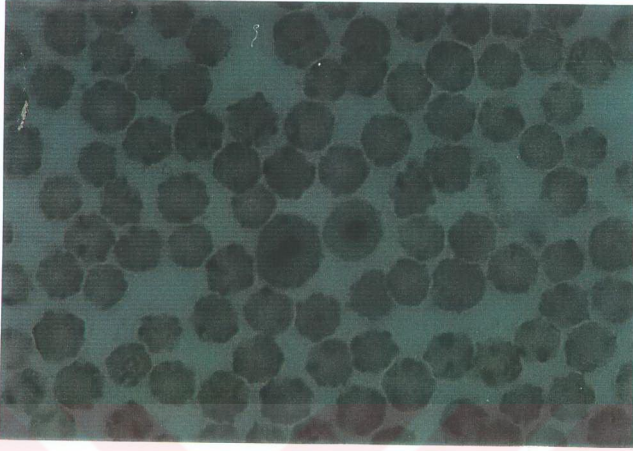
resim 4.2. Enzyme Linked Immunosorbent Assay testinde işlenen örneklerin kolorimetrik reaksiyonları ( 1 no'lu mikroyelle).



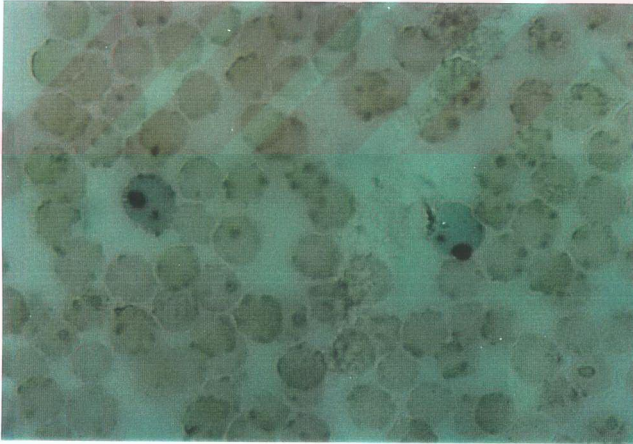
**resim 4.3.** Tek granüllü bir ANAE+, T-lenfosit (soldaki hücre) ile ANAE- bir B-lenfosit görülmekte. ANAE+lenfositteki iri kiremit kırmızısı-kahverengi granül (ok) belirgin durumda. ANAE enzimi demonstrasyonu, X 1110.



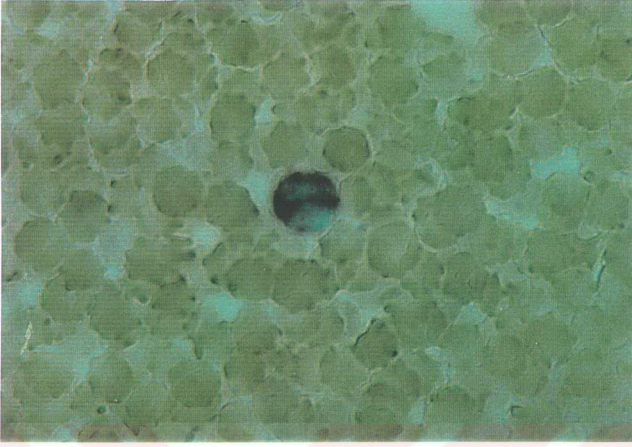
**resim 4.4.** Lokalize granüler (tek granüllü, ok) pozitivite gösteren bir T-lenfosit ile çok sayıda granüllü (diffüz granüler pozitivite gösteren) bir T-lenfosit. ANAE demonstrasyonu, X4500.



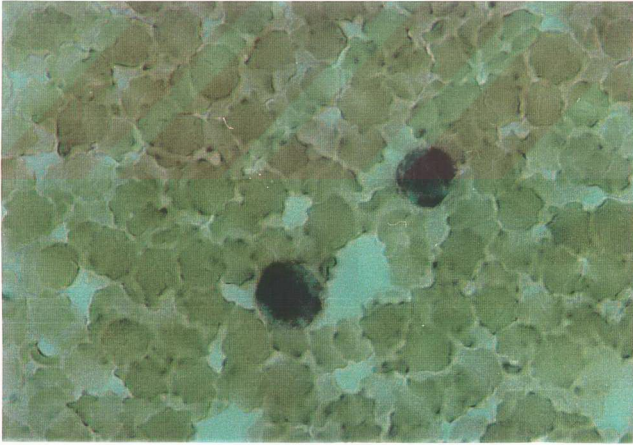
**resim 4.5.** Tek granüllü, lokalize granüler tip pozivitite gösteren iki T-lenfosit (ANAE+lenfosit). ANAE enzim demonstrasyonu, X 1540.



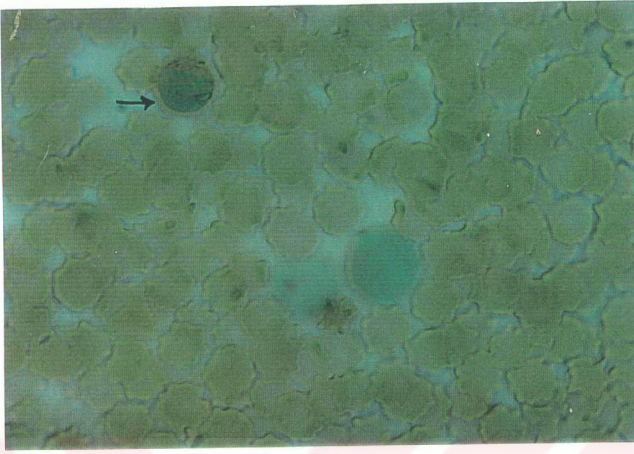
**resim 4.6.** Tek granüllü, lokalize granüler tip pozivitite gösteren iki T-lenfosit (ANAE+lenfosit). ANAE enzim demonstrasyonu, X 1530.



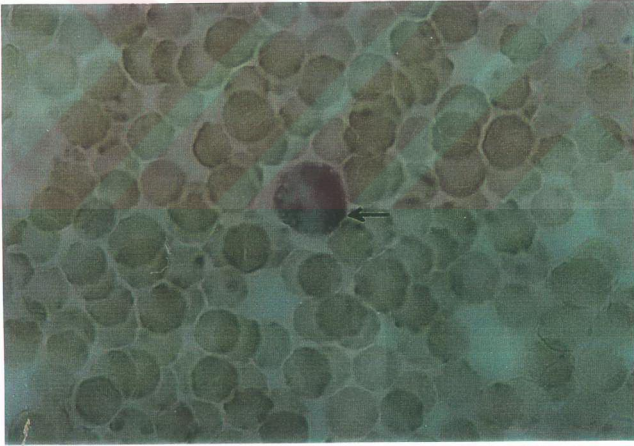
**resim 4.7.** Tek granüllü, lokalize granüler tip pozitivite gösteren bir monosit. ANAE enzim demonstrasyonu, X 1480.



**resim 4.8.** T-lenfosit (ANAE+lenfosit) (üstte) ile diffuz granüler pozitivite gösteren monosit (altta) görülmekte. ANAE enzim demonstrasyonu, X 1500.

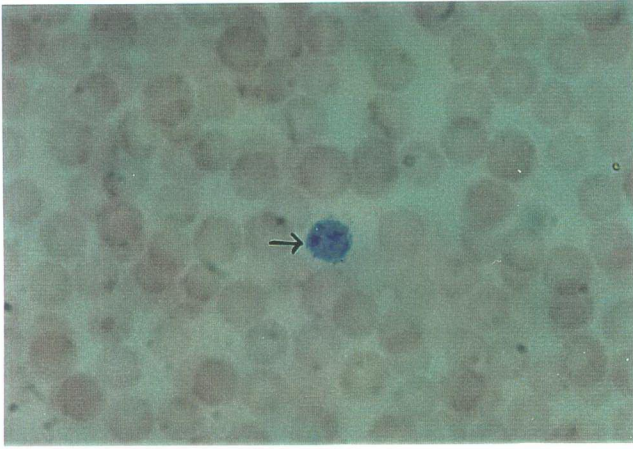


**resim 4.9.** T-lenfosit (ANAE+lenfosit) ile B-lenfosit (ANAE-lenfosit)'ler (altta) ve negatif nötrofil (ok) görülmekte. ANAE enzimi demonstrasyonu, X 1450.

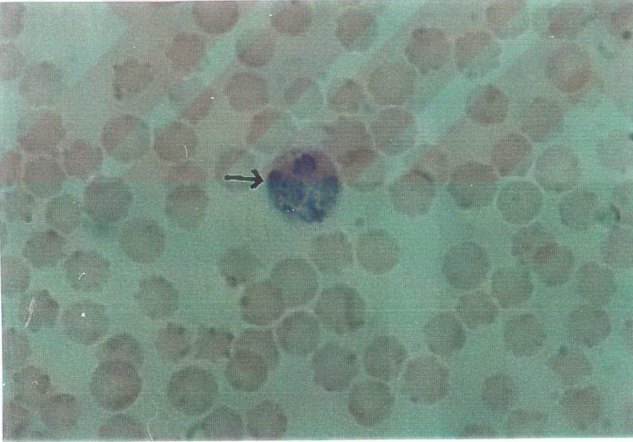


**resim 4.10.** Non T-lenfosit ve non B-lenfosit (ANAE+) görülmekte. Lokalize granüler (ok) tip pozitivite gösteren bir null hücresi. ANAE enzim demonstrasyonu, X 1400.

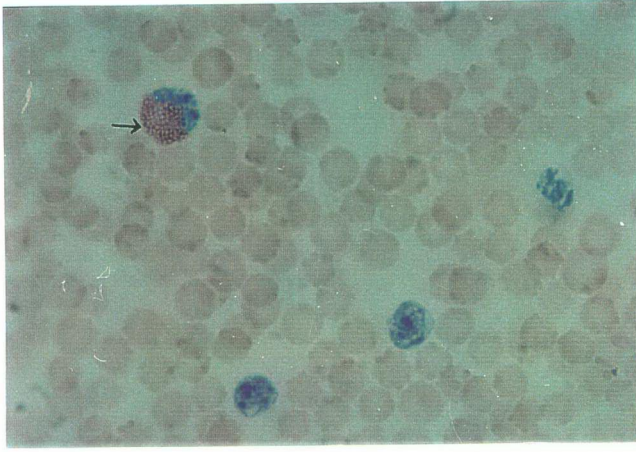




**resim 4.11.** May-Grünwald Giemsa boyama yöntemi ile lenfosit görülmekte. Lenfositteki iri mavi granüller (ok) belirgin durumda. May-Grünwald Giemsa boyama, X 2000.



**resim 4.12.** May-Grünwald Giemsa boyama yöntemi ile lenfosit görülmekte. Lenfositteki iri mavi granüller (ok) belirgin durumda. May-Grünwald Giemsa boyama, X 1500.



**resim 4.13.** May-Grünwald Giemsa boyama yöntemi ile eozinofil görülmekte. Eozinofilde kırmızı küçük granüller (ok) belirgin durumda. May-Grünwald Giemsa boyama , X 1524.

Dr. Tünel  
EKGÜMANTASYON MERKEZİ

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Enzootik Bovine Löykozis, tüm dünyada önemli ekonomik kayıplara yol açan, sütçü ve etçi sığırların önemli viral bir enfeksiyonudur (Garazi ve ark 2001, Ghysdael ve ark 1984, Brenner ve Trainin 1989a, Johnson ve Kaneene 1992). Enfeksiyona neden olan BLV'u enfekte ettiği sığırlarda üreme ve verim kapasitesini önemli derecede düşürmektedir. Tedavisi olmayan bu enfeksiyondan korunmak için geliştirilen kontrol programları, eradikasyon işlemleri, hayvan ve hayvan ürünlerinin ticaretindeki ulusal ve uluslararası sınırlandırmaları da kapsadığından önemli ekonomik kayıplara yol açmaktadır (Evermann ve ark 1987, Thurmond 1987, Bendixen 1987, Flensburg 1987). Enfeksiyon solunum, kardiyovasküler, ürogenital, lenfatik, hemopoetik sistemler ile nervöz sistemde ve bunlara bağlı organlarda tümoral oluşumlarla fonksiyon bozukluklarına neden olmaktadır (Parodi 1987, Johnson ve Kaneene 1992).

Enzootik Bovine Löykozis enfeksiyonu, özellikle sütçü sığırlarda oldukça yaygın olarak seyretmektedir (Perman ve ark 1970, Trono ve ark 2001, Laussauzet ve ark 1989, Thurmond ve ark 1985, Brenner ve Trainin 1989a, Huber ve ark 1981, Shettigara ve ark 1986). Hastalığa neden olan virus süt, tümör kitleleri, lenfositler ve kolostrum ile bulaşmaktadır. Eğer uterusda lezyonlar var ise intrauterin bulaşmanında olası olduğu bildirilmiştir (Evermann ve ark 1987, Chung ve ark 1986, Evermann ve ark 1986, Laussauzet ve ark 1989, Van Der Maaten ve Miller 1990, OIE 2000, Ferrer ve ark 1981a, Dimmock ve ark 1991).

Bovine Löykozis Virus ile enfekte sığırların %30-70'inde persiste lenfositozis ve %0.1-10'unda ise tümör oluştuğu bildirilmiştir (Engvall ve ark 1989, Detilleux ve ark 1991, Parodi 1987, Straub 1987a, Mammerickx ve ark 1985a). EBL enfeksiyonunun, 2 yaşın altındaki hayvanlarda nadiren, 4-8 yaş grubu hayvanlarda yaygın olarak seyrettiği, 3 yaşın üzerindeki hayvanlarda ancak %30'unda lenfositozis ve çok azında iç organlarda lenfosarkoma geliştiği ifade edilmiştir (Parodi 1987, Straub 1987, Flensburg 1987, Van Der Maaten ve Miller 1990, Johnson ve Kaneene 1992).

Dünyanın birçok ülkesinde ve Türkiye'de EBL enfeksiyonunun varlığı ortaya konmuştur (Huber ve ark 1981, Donham ve ark 1987, Jacobsen ve ark 1985, Brenner ve Trainin 1989, Lorenz ve Straub 1987, Burgu ve ark 1990, Kandil ve ark 1989, Akça ve ark 1996, Batmaz ve ark 1999).

Bu çalışmada, EBL enfeksiyonunun sütçü sığırlarda varlığını ortaya koymak ve prevalansını belirlemek amacıyla tesadüfi örnekleme ile alınan kan serumlarında AGID ve süt serumlarında ELISA testi uygulanmıştır. Alınan kan örneklerinde bazı hematolojik parametreler (ANAE enzim boyama yöntemi, May-Grünwald Giemsa boyama yöntemi ve total lökosit sayımı) belirlenerek, serolojik testler ile hematolojik uygulamalar arasındaki bağıntılar tespit edilmiştir.

Kan örnekleri, Burdur-Merkez ve ilçelerinde 10 işletmedeki ileri gebelik döneminde bulunan (7. ve 9. aylar arasında) klinik açıdan sağlıklı görünen 469 adet süt sığırından temin edilmiştir. AGID testi ile yapılan incelemede 23 (%4.9) kan örneğinde seropozitivite tespit edildi. Bu sonuç, aynı yöntemle çalışmış olan Garazi ve ark (2001)'lerinin bulgularına (%3.5) oldukça yakın bulunmuştur. Ancak diğer araştırmalarda AGID ile saptanan BLV seropozitiviteleri Wawrzkievicz ve ark (1988) %63.22-64.37, Hafez ve ark (1990) %20, Shettigara ve ark (1986) %11-30, Kandil ve ark (1989) %24.6 ve Burgu ve ark (1990) %29.63-33.08 olarak bildirilmiştir. Araştırmacılar bu yüksek seropozitivitenin nedenini, sürülerdeki hayvanların bir kısmında lenfoid tümör ve lenfosarkomalı hayvanların bulunmasına (Burgu ve ark 1990), sürülerde bulunan hayvanlar arası kontakt ilişkisinin sıklığına (Shettigara ve ark 1986), EBL enfeksiyonunun yüksek düzeyde seyrettiği Amerika Birleşik Devletleri, Almanya, Avusturya, Kanada ve Hollanda gibi modern süt sığırcılığının yapıldığı ülkelerden ithal edilmiş sürülerde (Hafez ve ark 1990) ve önceden hastalık prevalansının yüksek seyrettiği sürülerde (Kandil ve ark 1989, Wawrzkievicz ve ark 1988, Shettigara ve ark 1986) çalışılmış olmasına bağlamışlardır.

Bu çalışmada 469 adet süt serumunun 90'ında (%19.2) ELISA ile seropozitivite saptandı. Bu sonuç, Akça ve ark (1996)'lerinin sonuçları (%14.4) ve Junitti ve ark (1989)'lerinin sonuçlarıyla (%20) paralellik göstermektedir. ELISA ile süt serumunda antikor tespitine dayanan çalışmalarda Schoepf ve ark (1997) %41, Batmaz ve ark (1999) %5.91, Prevost ve ark (1988) %36, Klintevall ve ark (1991) %11.56 ve Nguyen ve Maes (1993) %43 oranında seropozitivite tespit ettiklerini belirtmişlerdir. Söz konusu çalışmalarda, bazı sürülerde BLV seropozitivitesinin yüksek olması, araştırılan sürü popülasyonunun geniş tutulmasına (Schoepf ve ark 1997), incelenen sürülerin enfeksiyon oranının yüksek düzeyde seyrettiği Avrupa ülkelerinden getirilmiş olmasına (Schoepf ve ark 1997, Nguyen ve Maes 1993), araştırılan sürülerdeki hayvanların ELISA testi uygulanmadan önce klinik tanı ve AGID testine tabi tutularak şüpheli, negatif ve pozitif olarak sınıflandırılmış (Nguyen ve Maes 1993, Prevost ve ark 1988) olmasına bağlamışlardır. Düşük seropozitivitenin görüldüğü çalışmalarda ise ortak emzirme, aşılama ve tedavi uygulamalarının az miktarda yapılması

(Batmaz ve ark 1999), sürüdeki hayvanların bireysel özelliği ve enfeksiyon durumunun etkili olduğu açıklanmıştır (Klintevall ve ark 1991).

Nguyen ve Maes (1993) 150 başlık bir süt sığırı sürüsünde BLV enfeksiyonunun seropozitivitesini ELISA testi kullanarak araştırmışlar, sürü genelinde 65 (%43) adet süt sığırında seropozitivite tespit edildiğini bildirmişlerdir. Nguyen ve Maes (1993) BLV enfeksiyonunu kan ve süt serumu örneklerinde, ELISA ve AGID testleri yardımıyla karşılaştırmalı olarak araştırıldığını açıklamışlardır. Klinik incelemelerde BLV enfeksiyonuna ait semptomların görüldüğü hayvanlardan alınan 45 kan serum örneğinin 25'inde ve 30 süt örneğinin 15'inde ELISA ile seropozitivite tespit edilirken, AGID testi ile bu örneklerin tamamının negatif olduğunu bildirmişlerdir (Nguyen ve Maes 1993). Araştırmacılar, ELISA testinin çok kısa zamanda sonuç vermesi ve sonuçların okunmasının kolay olması nedeniyle AGID testine göre daha avantajlı olduğunu ifade etmişlerdir.

Miller ve ark (1981) BLV enfeksiyonuna karşı RIA, AGID, ELISA ve VN test sonuçlarını karşılaştırarak yaptıkları çalışmada RIA testini, AGID, ELISA ve VN testinden daha hassas bulduklarını ifade etmişlerdir. ELISA testinde sonuçların değerlendirilmesinin fotoelektriksel olarak yapıldığını ancak AGID testinde göz ile yapılan sonuç değerlendirmesinin yanıltıcı olabileceği, sonuçların okunmasında deneyimli laboratuvar personeline ihtiyaç olduğunu vurgulamışlardır. Büyük çapta örneklerle yapılan çalışmalarda, ELISA testinin sonuçları otomatik olarak okuması nedeniyle AGID testinden daha avantajlı bulunduğu belirtilmiştir (Jorgensen 1989, Roberts ve ark 1989, Mammerickx ve ark 1985).

Klintevall ve ark (1991) 614 adet süt sığırının kan serumlarında BLV enfeksiyonunun serolojik taramalarında AGID ve ELISA test sonuçları arasında %99.83 oranında bir korrelasyon tespit etmişlerdir. Her iki test arasında %100 sensitivite ve %99.8 spesifisite belirlemişlerdir. Çalışmada, ELISA ile pozitif, AGID testi ile negatif belirlenen %0.16 (1 adet), AGID testi ile pozitif, ELISA ile negatif %0 ve hem AGID hem de ELISA testi ile pozitif %11.85 (71 adet) BLV seropozitivite oranları tespit ettiklerini bildirmişlerdir.

Sergeant ve ark (1997) 97 adet süt sığırında yaptıkları BLV seropozitivite taramasında uygulamış oldukları AGID ve ELISA testleri arasında %86.59 oranında bir pozitif korrelasyon tespit ettiklerini belirtmişlerdir. Araştırma sonucunda yapılan karşılaştırmada ise, ELISA'nın AGID testine göre daha duyarlı olduğunu (%97 sensitivite ve %62 spesifisite) belirlemişlerdir. BLV enfeksiyonunun seropozitiflik oranlarını ELISA ile %11.34 (11 adet), AGID testi ile %2.06 (2 adet), hem AGID hem de ELISA testleri ile %68.04 (66 adet) bulunduğunu bildirmişlerdir.

İyisan ve ark (1996) 1022 adet süt sığırının kan ve süt örneklerinde AGID ve ELISA testleri kullanarak yaptıkları karşılaştırmada her iki testin sonuçları arasında %98.5 oranında bir korrelasyon tespit etmişlerdir. Her iki test arasındaki karşılaştırmada, AGID testinin ELISA testine göre daha düşük oranda (%63.41 sensitivitesi ve %100 spesifisitesi, ELISA testinin AGID testine göre %100 sensitivite ve %98.49 spesifisitesi) güvenilir sonuçlar ortaya koyduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada, süt serumlarında ELISA testi ile %1.46 (15 adet), kan serumlarında AGID testi ile %0, hem AGID hem de ELISA testi ile belirlenen ortak pozitiflik oranının ise %2.54 (26 adet) olduğu belirtilmiştir.

Akça ve ark (1996) aynı hayvanlara ait 409 adet kan ve süt serumlarında BLV enfeksiyonunu ELISA ve AGID testleriyle kontrol edip, her iki test arasında %92.17 oranında bir korrelasyon belirlediklerini açıklamışlardır. Ayrıca AGID testinin ELISA testine göre %50.8 sensitivite ve %99.42 spesifisite, ELISA testinin AGID testine göre %96.5 sensitivite ve %92.06 spesifisite gösterdiğini bildirmişlerdir. ELISA-süt testi ile %49.2 (30 adet), AGID-kan testi ile %3.3 (2 adet) ve hem AGID-kan hem de ELISA-süt testi ile %47.5 (29 adet) ortak seropozitiflik oranı tespit ettiklerini açıklamışlardır.

Toma ve ark (1984) kan ve süt serumlarında BLV'una karşı gelişen spesifik antikoları ELISA (süt) ve AGID (kan) testleri ile araştırdıklarında 126 adet süt sığırında ortak pozitiflik belirlediklerini bildirmişlerdir. Araştırmada her iki test arasında %88.37 korrelasyon, AGID testinin ELISA testine göre %90.64 sensitivite ve %87.09 spesifisite gösterdiği belirtilmiştir. ELISA testi ile süt serumlarında %7.60, AGID testi ile kan serumlarında %18.71 ve hem AGID hem de ELISA testi kan ve süt serumlarında %73.68 ortak pozitiflik tespit edildiği açıklanmıştır.

Bu çalışmada, 469 adet süt sığırında uygulanan AGID ve ELISA testleri arasında %79.74 oranında bir korrelasyon tespit edildi. Her iki test arasında AGID testinin ELISA testine göre %10 sensitivite ve %96.3 spesifisite, ELISA testinin AGID testine göre %39.13 sensitivite ve %81.83 spesifisite gösterdiği tespit edildi. Sadece ELISA testi ile belirlenen EBL enfeksiyonu oranı %77.89 (81 adet) ve yalnız AGID testi ile belirlenen EBL enfeksiyonu oranı %13.46 (14 adet) ve hem AGID hem de ELISA test ile belirlenen EBL enfeksiyonu oranı %8.65 (9 adet) olarak belirlendi. Çalışmada her iki test arasında bulunan korrelasyon, Sergeant ve ark (1997)'lerinin %86.59 oranında bulunan sonucu ile uyumluluk göstermektedir. Fakat diğer araştırmacıların korrelasyon sonuçları %90'ın üzerinde olup, çalışma sonucuyla uyum göstermemektedir. Çalışmada AGID ve ELISA için sensitivite yüzdesi oldukça düşük bulunmuştur. Bu durumun aksine spesifite yüzdesi Sergeant ve ark (1997)'lerinin çalışma sonuçları hariç diğer çalışmalarla paralellik göstermektedir. Bu

çalışmada elde edilen ELISA (%77.89) ve AGID (%13.46) test sonuçları (Toma ve ark 1984 hariç), diğer araştırma sonuçlarından yüksek bulunmuştur. Diğer araştırmaların yanısıra bu araştırmada da ELISA testinin enfeksiyonu tespit etme yüzdesinin AGID testinden yüksek olduğu tespit edilmiştir. ELISA testi daha düşük düzeydeki protein miktarlarını (mg protein / dl serum) yaklaşık <1 mcg hassasiyetinde, AGID testi ise yaklaşık < 1 mg hassasiyetinde ölçmektedir (Erganiş ve Uçan 2001). Çalışmada her iki testle (AGID ve ELISA) tespit edilen pozitif hayvanların yüzdesi (%8.65), diğer araştırma sonuçlarından düşük bulunmuştur. Bu durum diğer araştırmalarda her iki testte ortak pozitiflik tespit edilen hayvan sayısının yüksek oranda bulunmasına bağlanabilir.

Bovine Löykozis enfeksiyonu, 3 yaşın üzerindeki sığırlarda daha yüksek oranda görülür (Johnson ve Kaneene 1992). Thurmond ve ark (1985) yapmış oldukları çalışmada BLV enfeksiyonu yönünden pozitif bulunan sürülerdeki hayvanların yaş ortalamasının 3.5 olduğunu bildirmişlerdir.

Kandil ve ark (1989) 1-11 yaş arası 172 sığırdaki yaptıkları çalışmada 5 yaş ve yukarısı grupta yüksek oranda pozitiflik saptamışlardır. En yüksek pozitiflik oranını 6 (%25) ve 8 (%27.3) yaş grubundaki hayvanlarda tespit edildiğini açıklamışlardır.

İyisan ve ark (1996) ELISA testi ile süt serumlarında en yüksek pozitifliği 3 yaş grubunda (%34.1), AGID testi ile kan serumlarında en yüksek pozitifliği 5 yaş grubunda (%34.9) belirlediklerini ifade etmişlerdir.

Akça ve ark (1996) EBL enfeksiyonunun tespit edildiği işletmelerde 3 yaş ve üzerinde bulunan sığırlarda enfeksiyonun daha yüksek oranda bulunduğunu bildirmişlerdir. Araştırmada ELISA seropozitif sürülerde, 3 yaşında bulunan süt sığırlarında %88.8, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ve 10 yaşında bulunan süt sığırlarında %100 seropozitiflik, AGID seropozitif sürülerde 3, 4, 9 ve 10 yaşında bulunan süt sığırlarında %50, 5 yaşında %70.5, 6 yaşında %14.5, 7 yaşında %100 ve 8 yaşında %33.3 seropozitiflik tespit etmişlerdir.

Şen ve ark (1995) EBL enfeksiyonunu ELISA testi ile araştırdıkları sürülerde, pozitif hayvanların yaşa göre dağılımlarını; 0-1 yaşında %1.12, 1 yaşında %1.20, 2 yaşında %2.12, 3 yaşında %4.41 ve 6 yaşında %9.09 olarak tespit etmişlerdir. Ancak sürü genelinde sütçü sığırların oranı %58.56, pozitif hayvanlar içinde dağılımı %58.3 olarak tespit edildiği açıklanmıştır.

Mammerickx ve ark (1976) AGID testi ile EBL enfeksiyonunu araştırdıkları sürüde, BLV seropozitif hayvanların yaşa göre dağılımlarını, 0-1 yaşında %2.2, 1-2 yaşında %13.3, 2-3 yaşında %17.8, 3-4 yaşında %20, 4-5 yaşında %6.7, 5-6 yaşında %15.6, 6-7 yaşında %13.3, 7-8 yaşında %2.2, 8 ve üzeri yaşta %8.9 olarak bildirmişlerdir.

Jacobs ve ark (1995) AGID testi ile BLV enfeksiyonunu araştırdıkları 913 adet hayvanda, BLV seropozitif hayvanların yaşa göre dağılımlarını, 3.5 yaşın altında %5.3, 3.5-6 yaş arasında %23.6 ve 6 yaşın üzerinde %26.7 seropozitiflik tespit ettiklerini belirtmişlerdir.

Dimmock ve ark (1991) AGID testi ile BLV enfeksiyonunu 3 sürüde araştırmışlardır. Birinci sürüde 2 yaşın altında %13.3 - %31.3, 2-4 yaş arasında %29.2-%18.2, 4 yaşın üzerinde %20.5 - %20.8, İkinci sürüde 2 yaşın altında %11.1 - %4.0, 2-4 yaş arasında %5.3 - %15.4, 4 yaş üzerinde %14.0 - %21.3, üçüncü sürüde 1 yaşın altında %16.7, 1-2 yaş arasında %11.1, 2-4 yaş arasında %34.4, 4-6 yaş arasında %51.1 ve 6 yaş üzerinde %74.5 bulunduğunu bildirmişlerdir.

Cowley ve ark (1992) ELISA testi ile kan serumunda BLV enfeksiyonuna karşı oluşan antikör varlığını 3 sürüde araştırmışlardır. Araştırmada 3 yaş üzerindeki hayvanlarda %12.90 ve 3 yaşın altındaki hayvanlarda %1.46 oranında seropozitivite tespit edildiği belirtilmiştir.

Garazi ve ark (2001) AGID testi ile kan serumunda BLV spesifik antikörleri 280 adet stc sığırda araştırmışlar, sürü genelinde 2 yaş ve üzerindeki hayvanlarda enfeksiyonun oranını %3.5 olarak tespit etmişlerdir.

Brenner ve Trainin (1989a) tarafından İsrail'de yapılan çalışmada EBL enfeksiyonunun genç yaşlarda (3 yaştan yukarı) %3 oranında, yaşlı hayvanlar arasında da %30 oranında görüldüğünü rapor etmişlerdir.

Bu araştırmada, sadece AGID testinde EBL enfeksiyonu pozitif bulunan hayvanların oranları yaşa göre 3 yaşında %3.23, 5 yaşında %6.67, 6 yaşında %3.33 ve 7 yaşlılarda %8.51 olarak belirlendi. Bu testte, en yüksek seropozitiflik yüzdesi 7 yaşlı hayvanlarda tespit edildi. Ancak sürü genelinde en fazla seropozitif hayvan sayısı 5 yaşlı hayvanlarda bulundu. Bunun nedeni, sürü genelinde en fazla hayvan sayısının bu yaş grubunda bulunmasına bağlanabilir. AGID testi ile yapılan araştırmalarda Kandil ve ark (1989)'ları, Akça ve ark (1996)'ları, Mammerickx ve ark (1976)'ları, Jacobs ve ark (1995)'ları, Dimmock ve ark (1991)'ları ve İyisan ve ark (1996)'ları 5 yaş ve üzerindeki hayvanlarda enfeksiyonu yüksek oranda bulduklarını ve en yüksek seropozitiflik yüzdesini 7 yaşındaki hayvanlarda tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Buna göre araştırma sonuçları önceki yapılan çalışmalarla paralellik göstermektedir.

Çalışmada, sadece ELISA testinde EBL enfeksiyonu pozitif bulunan hayvanların oranları yaşa göre; 3 yaşında %21.77, 4 yaşında %21.05, 5 yaşında %16.11, 6 yaşında %17.77, 7 yaşında %23.40 ve 8 yaşında %60 olarak belirlendi. Bu testte, en yüksek seropozitiflik yüzdesi 7 ve 8 yaşındaki hayvanlarda tespit edildi. Ancak sürü genelinde en fazla seropozitif hayvan sayısı 3 ve 5 yaşındaki hayvanlarda belirlendi. Bunun yanısıra 8 yaşlı



hayvanlarda elde edilen yüksek yüzde oranı, örneklemede az sayıda hayvan bulunmasından kaynaklanmaktadır. ELISA testi ile elde edilen araştırma sonuçları Kandil ve ark (1989)'ları, Cowley ve ark (1992)'ları ve Brenner ve Trainin (1989)'in araştırma bulguları ile uyumluluk göstermektedir.

Araştırmada, AGID ve ELISA testlerinde EBL enfeksiyonu pozitif bulunan hayvanların oranları yaş'a göre 3 yaşında %1.61, 5 yaşında %1.66, 6 yaşında %3.33 ve 7 yaşında %2.12 olarak belirlendi. Her iki testle belirlenen en yüksek seropozitiflik yüzdesi 6 yaşındaki hayvanlarda tespit edildi. Ancak sürü genelinde en fazla seropozitif hayvan sayısı 5 ve 6 yaşındaki hayvanlarda bulundu. Yapılan araştırma sonuçlarına göre her iki testte elde edilen yaşlara göre seropozitiflik oranları çok düşük bulunmuştur. Fakat enfeksiyonun sık görüldüğü yaş aralıkları açısından Dimmock ve ark (1991)'ları, Jacobs ve ark (1995)'ları, Şen ve ark (1995)'ları ve Kandil ve ark (1989)'larının araştırma sonuçları ile paralellik göstermektedir.

Bu çalışmada, serolojik açıdan pozitif reaksiyon gösteren hayvanların sayısı yaşa bağlı olarak artış göstermektedir. Yaş gruplarına göre 5 yaş ve üzeri hayvanlarda pozitiflerin oranı yüksek bulunmuştur. Yaş artışı ile birlikte enfeksiyonun görülme sıklığında artışlar olduğu bir çok araştırmacı tarafından da bildirilmiştir (Thurmond 1987, Lewin ve ark 1988, Jacobs ve ark 1991). Bu artışın nedeni, BLV ile enfekte hayvanların klinik olarak herhangi bir belirti göstermeden sürülerde uzun süre kalmasına, enfeksiyonun inkubasyon süresinin uzun sürmesine ve sürüde bulunan enfekte hayvandan sağlıklı hayvanlara çeşitli yollarla (kontakt, iatrojenik, transplasental, insektler, vb...) enfeksiyonun aktarılmasına bağlanabilir.

Kandil ve ark (1989) serum örneği alınan 3 sürüden 2'sinde AGID testi ile %24.6 oranında seropozitiflik tespit ettiklerini bildirmişlerdir.

Trono ve ark (2001) Arjantin'de 14 bölgeye ait işletmelerde bulunan süt sığırlarında BLV enfeksiyonunun varlığını ortaya koymak için ELISA (kan) testi ile yaptıkları çalışmada en yüksek seropozitivite oranını %46.27 ile Entre Rios eyaletinin batısında tespit ettiklerini ancak sürü genelinde total serum seropozitivite oranını %31.47 olarak belirlediklerini açıklamışlardır.

Batmaz ve ark (1989) G.Marmara bölgesinde 12 yerleşim yerinde bulunan toplam 717 adet sığırı BLV enfeksiyonu yönünden ELISA (kan-süt) testi ile araştırmışlardır. Çalışmada en yüksek seropozitivite oranlarını Bursa ilinde %14.19 ve Karacabey ilçesinde %19.55 olarak saptamışlardır.

Schoepf ve ark (1997) Tanzanya'da 4 bölgede bulunan sütçü ve etçi sığırlarda BLV enfeksiyonunu tespit etmek için ELISA (kan) testi ile yaptıkları çalışmada en yüksek

seropozitivite oranlarını Dae es Salam'da %48.7 ve Mbeya'da %45.8 olarak belirlediklerini açıklamışlardır.

Shettigara ve ark (1986) Kanada da sütçü ve etçi sığırların bulunduğu 9 sürüde BLV enfeksiyonunda antikor varlığını ortaya koymak için AGID (kan) testi ile yaptıkları çalışmada en yüksek seropozitivite oranları I. grupta (düşük dereceli prevalansa sahip) %3.3, II. grupta (orta dereceli prevalansa sahip) %28.5 ve III. grupta (Yüksek dereceli prevalansa sahip) %50 olarak tespit edildiğini belirtmişlerdir.

Hafez ve ark (1990) Suudi Arabistan'da süt sığırlarının bulunduğu 23 sürüde BLV enfeksiyonunun serolojik olarak tespit edilmesinde AGID (kan) testi kullandıkları çalışmada en yüksek seropozitivite oranının %43 ve en düşük seropozitivite oranının %4 olarak belirlendiğini açıklanmıştır.

İyisan ve ark (1996) İstanbul iline bağlı 10 ilçede bulunan süt sığırlarında BLV enfeksiyonunun varlığını ortaya koymak için AGID (kan) testi ile yaptıkları çalışmada en düşük seropozitivite oranı Çatalca ilçesinde %0.4, en yüksek seropozitivite oranı Yalova ilçesinde %16.3, ELISA (süt) testi ile yaptıkları çalışmada en düşük seropozitivite oranı Çatalca ilçesinde %0.4, en yüksek seropozitivite oranı Yalova ilçesinde %20.9 olarak belirlendiğini belirtmişlerdir.

Bu araştırmada, AGID testi ile ilçelere göre yapılmış sonuçlarda elde edilen en yüksek seropozitiflik oranları, ELISA testi sonuçlarına göre düşük bulunmuştur. Ayrıca ilçelere göre AGID testi ile elde edilen seropozitiflik oranları, Shettigara ve ark (1996)'larının I. grup sürülerde elde ettiği sonuçlar ve Hafez ve ark (1990)'larının bildirdiği en düşük seropozitiflik oranları ile paralellik göstermektedir.

Bu çalışmada ilçelere göre ELISA (süt) test ile belirlenen seropozitiflik oranları bölgelere göre yapılan diğer çalışmalarda elde edilen seropozitiflik oranlarından yüksek bulunmuştur. Elde edilen sonuçların farklılık göstermesi hastalığın bölgesel seyrine, çevresel faktörlere ve yetiştirme koşullarına bağlanabilir.

Çalışmada örneklerin alındığı işletmelerde entansif tipte, sıkışık ahır şartlarında süt sığırcılığı yapıldığı gözlemlendi. Ayrıca hayvanların meraya çıkartılmadığı da tespit edildi. Bu yüzden enfeksiyon, kontrol edilen 4 ilçe'nin 4'ünde görülmektedir.

Enzootik Bovine Löykozis enfeksiyonunun sütçü sığır ırklarında daha yaygın olarak seyrettiği, özellikle etkenin anneden yavruya in utero yolla vertikal geçişi ve virus ile enfekte süt veya kolostrumla buzağuların beslenmesi sonucu hayatın ilk birkaç saatinde enfekte lenfositlerin intestinal mukozadan geçtiği ifade edilmiştir (Laussauzet ve ark 1989, Johnson ve Kaneene 1992). Ayrıca son yıllarda, süt endüstrisi gelişmiş ülkelerde "süt havuzu"

sisteminde toplanan karışık sütler BL enfeksiyonu yönünden serolojik testlere tabi tutularak, sürü genelinde enfeksiyon taraması yapıldığı ve enfeksiyon tespit edilen sürülerde sonradan bireysel olarak serolojik taramalara gidildiği bildirilmiştir (Evermann ve ark 1987, Johnson ve Kaneene 1992). Ancak süt sığırcılığının gelişmiş olduğu Burdur bölgesi de dahil olmak üzere tüm Türkiye’de “süt havuzu” sisteminde toplanan karışık sütler serolojik yönden araştırılmamaktadır. Sürü sahipleri, enfeksiyonun tespit edildiği Burdur-Merkez ve ilçelerinde genellikle buzağuların karışık ve ortak emzirme yöntemi ile yetiştirilmesinin yaygın olduğunu bildirmişlerdir. Bu nedenle, Burdur bölgesinde bir çok sağlıklı hayvanda BLV’unun süt aracılığıyla da bulaşmış olabileceği tahmin edilmektedir.

Brenner ve Trainin (1989a) İsrail’de 12 etçi sığırda yaptıkları prevalans çalışmasında, BLV enfeksiyon oranının %5.5 olarak tespit edildiğini ve enfeksiyon prevalansının %18-25 olan süt sığırlarından çok daha düşük olarak belirlendiğini bildirmişlerdir.

Shettigara ve ark (1986) Kanada’da 877 süt sığırında yaptıkları ilk taramalarda BLV enfeksiyonunun prevalansını %23.9 olarak tespit etmişlerdir.

Lorenz ve Straub (1987) bildirdiğine göre, sütçü ve etçi sığırlarda BLV enfeksiyonunun çeşitli ülkelerdeki prevalans dağılımlarının belirlendiği ve enfeksiyon prevalansının sütçü sığırlarda daha yüksek oranda görüldüğü vurgulanmıştır. Buna göre, sütçü sığırlarda enfeksiyonun prevalansı U.S.A’da %10.2-47.8, Kanada’da %12.5-59.6, Venezuela’da %10.4-77.9, Fransa’da %2.2-55.0, İtalya’da %2.6-9.7, Yugoslavya’da %21.4, Batı Almanya’da %1.3-10.6 ve Japonya’da %3.3-36.2 oranlarında bulunduğu bildirilmiştir.

Schoepf ve ark (1997) Tanzanya’da 2047 adet süt sığırında 4 bölgede BLV enfeksiyonunun prevalansını %6.5-48.7 ve 802 adet etçi sığırda farklı dört bölgede %16.2-50 arasında tespit etmişlerdir. Etçi sığırlarda BLV enfeksiyonunun yüksek prevalansta seyretmesinin nedenini insekt ısırıklarına ve ithal edilmiş BLV ile enfekte süt sığırlarıyla bir arada otlatılmalarına bağlanabileceğini bildirmişlerdir.

Kanada’da yaklaşık 38.000 sığır kan serumu BLV enfeksiyonu yönünden AGID testi ile taranmış süt sığırlarında %9.3, et sığırlarında ise %0.5 seropozitivite belirlendiği açıklanmıştır (Shettigara ve ark 1986). Ayrıca bu durumun üretimden oluşan kayıplar, veteriner hizmetleri, karkas kaybı ve diğer kayıpların süt sığırcılığına getirdiği masrafın 529-734 bin dolar, et sığırcılığında ise 49-62 bin dolar olduğu vurgulanmıştır (Lorenz ve Straub 1987, Shettigara ve ark 1986).

Bu çalışmada örnek alınan tüm hayvanlar süt sığırlarından oluşmuştur. Enfeksiyon prevalansı sürü genelinde AGID testi ile %4.9 ve ELISA ile %19.2 oranında bulunmuştur.

Elde edilen sonuçlar, hastalığın prevalansı üzerinde bildirilen diğer araştırma sonuçları ile uyum göstermektedir.

İyisan ve ark (1996) İstanbul ilindeki 1022 süt sığırında ırka göre EBL enfeksiyonunu ELISA (kan-süt) ile Holstein ırkında %4.01-3.91, Jersey ırkında %0.1-0 ve Saf Alman ırkında %0.1-0.1 olarak tespit etmişlerdir.

Şen ve ark (1995) Bursa ilinde 391 süt sığırından 97 Holstein ırkı hayvanda %2.06 (2 adet) ELISA (kan) testi ile seropozitiflik tespit etmişlerdir.

Lorenz ve Straub (1987) bildirdiğine göre OIE (1984) raporunda Holstein ırkı sığırlarda EBL enfeksiyonunun prevalansının ELISA testi ile U.S.A'da %12.5, Venezuela'da %37.2, Meksika'da %36.1 ve Macaristan'da %32.7 olduğu açıklanmıştır.

Graves ve ark (1982) 200 adet Holstein ırkı süt sığırının kan serumlarında ELISA ve AGID testleri ile hastalığın prevalansını %28.5 ve %30.5 oranında belirlemişlerdir.

Kandil ve ark (1989) 172 adet sığır populasyonunda AGID testi ile Holstein ırkı hayvanlarda %13.95 (24 adet) ve Güneydoğu Anadolu Kırmızısı ırkı hayvanlarda %4.06 (7 adet) olarak hastalığın prevalansını tespit etmişlerdir.

Evermann ve ark (1987) 1977-1987 yılları arasında U.S.A'da Holstein ırkı sığırlarda BLV enfeksiyonunun prevalansını AGID ve ELISA testleriyle %11-84 arasında bulunduğunu rapor etmişlerdir.

Bu çalışmada örneklerin alındığı tüm sığırlar Holstein ırkına aittir. EBL enfeksiyonunun prevalansı Holstein ırkı sürülerde AGID testi ile %4.9 ve ELISA testi ile %19.2 oranında tespit edildi. Ancak çalışmada tek ırk hayvan olması nedeniyle diğer ırklar ile karşılaştırma yapılamamıştır. Diğer araştırmalarda elde edilen sonuçlar ise bu çalışmada elde edilen sonuçlardan yüksek bulunmuştur.

Lenfositler, sığır kan şekilli elemanlarının en büyük lökositleridir. Bir yaşındaki hayvanların kan şekilli elemanlarının %70-80'ini oluşturdukları, yaşın ilerlemesi ile birlikte sığırlarda bu oranlarda önemli düşüşler gözlemlendiği ve lenfosarkoma problemi olan sürülerde lökemi durumlarında ve prelökemik hayvanların teşhisinde kan şekilli elemanlarının önem arz ettiği belirtilmiştir (Schalm ve ark 1975).

1960-1980 yılları arasında Danimarka, Almanya ve Belçika gibi Batı Avrupa ülkelerinde löykoz enfeksiyonunun teşhisinde yalnız hematolojik metotlardan yararlanıldığı ancak enfeksiyonunun teşhisinde hematolojik uygulamaların yanında hayvanın klinik muayenesi ve serolojik taramalarında yapılmasının gerekli olduğu bildirilmiştir (Mammerickx ve ark 1976).

Sığır T lenfositlerinin ANAE enzim boyama yöntemleri ile gösterilmesinin bir çok avantajı olduğu açıklanmıştır (Catovsky ve Costello 1979). Bunlar tekniğin basit, duyarlı, ucuz, reagent'larının kolay hazırlanabilmesi, ANAE ile hazırlanmış preparatların uzun süre bozulmadan saklanabilmesi ve tekrar kontrol edilebilmesidir. ANAE içerisinde yer alan kimyasalların birçoğu yüksek kromojenik ve çözülme-yen organik solventler olduğu açıklanmıştır (Knowles ve Halper 1980). Uluslararası Hematoloji Konseyi (ICSH), akut leukemia'nın klasifikasyonunda ANAE enzim boyama metotunun kullanmasını tavsiye etmişlerdir (Scott ve ark 1993).

Osbaldiston ve Sullivan (1978) insan başta olmak üzere birçok hayvanın perifer kan lökositlerinin ANAE enzim boyama metodu kullanarak tespit edilebileceğini bildirmişlerdir. T lenfosit olgunlaşması sırasında kazanılan enzimlerden biri olan alfa-naftil asetat esterase (ANAE), insan, köpek, tavuk, farelerde olduğu gibi sığırlarda da T lenfositleri için spesifik bir enzim olduğundan, ışık mikroskopik seviyede, gerek frotilerde ve gerekse de doku kesitlerinde T ve B lenfositlerinin ayırımında yaygın olarak kullanıldığını ifade etmişlerdir (Osbaldiston ve Sullivan 1978).

Bovine Löykozis enfeksiyonunda, virus başlıca lenfositlerde bulunur. Enfekte lenfositlerle enfeksiyon bir sığırdan diğerine geçer. Bir çok araştırmacı tarafından enfekte hayvanlarda lenfosit infiltrasyonu ile karakterize sistemik ve malign tabiatlı enfeksiyonun olduğu, özellikle B lenfositlerinde ve total lökosit miktarında artışlar, T lenfositleri miktarında azalmalar meydana geldiği bildirilmiştir (Domenech ve ark 2000, Taylor ve ark 1992, Ceccarelli ve ark 1986, Levy ve ark 1977).

Çalışmada sürü genelinde BLV enfeksiyonunun ANAE enzim boyama yöntemi ile araştırılmasında ELISA testiyle pozitif olduğu tespit edilen hayvanların perifer kan ortalama T lenfosit (ANAE+lenfosit) oranı (%28.53±12.71), ELISA negatiflerden (%49.384±13.382) önemli oranda düşük iken, B lenfosit (ANAE-lenfosit) oranlarının (%51.82±13.95) önemli derecede artmış olduğu dikkati çekti. Aynı zamanda araştırmada hem ELISA hem de AGID seropozitif saptanan hayvanların perifer kan T lenfosit (ANAE+lenfosit) oranları (%25.17±9.47) önemli derecede düşük iken, B lenfosit (ANAE-lenfosit) oranları (%55.06±6.01) önemli derecede yüksek bulunmuştur.

Çalışmada ELISA seropozitif hayvanlarda tespit edilen B lenfosit (ANAE-lenfosit) oranlarının artışı ve T lenfosit (ANAE+lenfosit) oranlarının azalışı, Paul ve ark (1979)'larının sığır lökozis virusu ile enfekte sığırların perifer kanındaki ortalama B lenfosit (ANAE-lenfosit) (%58.8) oran artışı ve T lenfosit (ANAE+lenfosit) (%38.7) oran azalışı ile Raich ve

ark (1983)'larının BLV enfekte sığırın perifer kanındaki ortalama T lenfositleri (ANAE+lenfosit) (%45) oran azalışı ve ortalama B lenfosit (ANAE-lenfosit) (%50) oran artışı ile benzerlik göstermektedir. Ancak AGID seropozitif hayvanlarda tespit edilen ortalama B lenfosit (ANAE-lenfosit) oranlarının artışı istatistiki açıdan ( $P<0.05$ ) önemli bulunmuş fakat kantitatif bir artış gözlenmemiştir. T lenfosit (ANAE+lenfosit) oranları da istatistiki açıdan önemli bulunmamıştır.

Schalm ve ark (1975) sağlıklı görünümdeki sığırlarda belirledikleri standart kan değerlerine göre total lökosit  $\text{mm}^3$ 'de 4000-12000 adet, total lökosit miktarı içinde nötrofil %15-45, total lenfosit %45-75, monosit %2-7, eozinofil %2-20 ve bazofil %0-2 olarak bulduklarını ifade etmişlerdir. Aynı araştırmacılar, lenfosarkoma'lı süt sığırlarında total lökosit miktarını  $\text{mm}^3$ 'de 11000-22050 adet ve total lenfosit miktarını %46-85 oranında tespit etmişlerdir.

Nakase ve ark (1984) tarafından ANAE enzim boyama yöntemi ile sağlıklı görünümdeki sığırlarda görülen ortalama nötrofil %12.1 $\pm$ 4.33, ortalama eozinofil %23 $\pm$ 14.49, ortalama monosit %12.6 $\pm$ 4.58 ve ortalama lenfosit %56.1 $\pm$ 5.86 olarak belirlenmiştir.

Stot ve ark (1991) 12 adet süt sığırında analitik flow-cytometre kullanarak tespit ettikleri total lökosit miktarlarını klinik olarak lökemik hayvanlarda  $\text{mm}^3$ 'de 13.100-15.400 arasında, klinik olarak PL'li hayvanlarda  $\text{mm}^3$ 'de 14.600-30.300 ve klinik olarak normal görünümdeki hayvanlarda  $\text{mm}^3$ 'de 7.000-7.500 arasında bulmuşlardır.

Williams ve ark (1988) 3 yaşlı 12 inekte BL enfeksiyonunu araştırmışlardır. Buna göre BLV (-) sığırlarda ortalama total lökosit miktarı  $\text{mm}^3$ 'de 6.700 adet, AL sığırlarda  $\text{mm}^3$ 'de 9.700 adet, PL sığırlarda  $\text{mm}^3$ 'de 26.500 adet, ortalama lenfosit değerleri BLV (-) sığırlarda %33, AL sığırlarda %50 ve PL'li sığırlarda %53 olarak tespit edilmiştir. Student t testiyle yapılan istatistiki işlemlere ( $P<0.05$ ) göre AL ve PL'li sığırların kan lenfosit ve total lökosit değerleri BLV (-) sığırların değerlerinden daha yüksek ve önemli olduğu bildirilmiştir.

Lewin ve ark (1988) yaptıkları araştırmada BLV ile enfekte seropozitif hayvanlarda total lökosit, total lenfosit ve B lenfosit oranları arasında bir korrelasyon tespit ederlerken bu durumun seronegatif hayvanlar arasında gözlenmediğini bildirmişlerdir.

Bu araştırmada, ELISA seropozitif hayvanların ortalama perifer kan lenfosit (%56.5 $\pm$ 13.4) oranlarının seronegatif hayvanlardan önemli derecede ( $P<0.001$ ) yüksek olduğu ve ortalama total lökosit sayılarında (10861 $\pm$ 2940) önemli derecede ( $P<0.001$ ) artışların olduğu tespit edildi. AGID seropozitif hayvanların ortalama perifer kan lenfosit oranları (%44.5 $\pm$ 16.9) seronegatif hayvanlardan önemli derecede ( $P<0.05$ ) yüksek olduğu ve ortalama

total lökosit sayılarında ( $8109 \pm 3779$ ) önemli derecede ( $P < 0.05$ ) artışların olduğu tespit edildi. Hem AGID hem de ELISA seropozitif hayvanların ortalama perifer kan lenfosit oranları ( $\%61.67 \pm 9.77$ ) seronegatif hayvanlardan önemli derecede ( $P < 0.001$ ) yüksek olduğu ve ortalama total lökosit sayılarında ( $12067 \pm 2930$ ) önemli derecede ( $P < 0.001$ ) artışların olduğu tespit edildi. Çalışmada uygulanan tüm testlerde seropozitif hayvanların ortalama perifer kan nötrofil oranlarının ( $\%33.4 \pm 13.0$ ;  $47 \pm 15.5$ ;  $31.0 \pm 8.34$ ) negatiflerden önemli derecede ( $P < 0.001$  ve  $P < 0.05$ ) düşük olduğu tespit edildi.

Tüm testlerde seropozitif hayvanların ortalama perifer kan monosit, eozinofil ve bazofil oranlarının seronegatif hayvanlardan farklı olmadığı istatistiki açıdan da tespit edildi. Sadece ELISA seropozitif hayvanların ortalama null hücresi oranlarının ( $\%19.64 \pm 9.69$ ) negatiflerden önemli derecede ( $P < 0.001$ ) az olduğu tespit edilirken diğer testlerde bir farklılık tespit edilemedi.

Bu çalışmada, tüm testlerde seropozitif hayvanlarda tespit edilen total lenfosit ve total lökosit oranlarının negatif hayvanlardan yüksek ve önemli olduğu belirlendi. Ancak diğer araştırmacıların (Stot ve ark 1991 ve Williams ve ark 1988) tespit ettiği total lenfosit ve total lökosit sayılarındaki artışlar bu çalışmadaki sonuçlardan yüksek bulunmuştur. Tüm testlerde seronegatif ve seropozitif hayvanlarda tespit edilen monosit, eozinofil, nötrofil ve bazofil değerleri Schalm ve ark (1975)'lerinin sağlıklı görünümdeki sığırlarda belirledikleri standart kan değerleri ile paralellik gösterirken, Nakase ve ark (1984)'lerinin bulgularından yüksek bulunmuştur. Çalışmada elde edilen null hücre oranları Paul ve ark (1979)'lerinin  $\%6.5$  oranındaki null hücre değerlerinden yüksek bulunmuştur.

Sonuç olarak bu çalışmada sürü genelinde serolojik açıdan BLV pozitif tespit edilen hayvanlarda B-lenfositlerde, total lökosit ve total lenfosit miktarında artışlar, T lenfositlerde ve nötrofil hücrelerinde azalma, eozinofil, monosit ve bazofil hücrelerinde herhangi bir değişiklik olmadığı belirlendi.

Batmaz ve ark (1999) BLV (+) PL (-) 5 yaşındaki sığırlarda ortalama total lökosit oranını  $8026.87 \pm 385.1/\text{mm}^3$ , ortalama lenfosit oranını  $\%61.45 \pm 2.23$ , BLV (+) PL (+) 5 yaşındaki sığırlarda ortalama total lökosit oranını  $\%78.43 \pm 1.62$  olarak tespit etmişlerdir.

Schalm ve ark (1975) BLV ile enfekte süt sığırlarında 2-5 yaşında;  $12950-22050/\text{mm}^3$  total lökosit ve  $\%46-85$  arasında total lenfosit, 5-9 yaşında;  $11000-20250/\text{mm}^3$  total lökosit ve  $\%57-92$  arasında total lenfosit ve 10-17 yaşında;  $11550-50200/\text{mm}^3$  total lökosit ve  $\%17-86$  total lenfosit tespit etmişlerdir. Aynı araştırmacılar 2 adet BLV-enfekte süt sığırlarında;  $19100$

ve 20700/mm<sup>3</sup> total lökosit, %3 ve %51.5 nötrofil, %79.5 ve %42 total lenfosit, %0 ve %6.5 monosit, %1 ve %0 eozinofil ve %0 oranında bazofil tespit etmişlerdir.

Schalm ve ark (1975) 50 adet BLV pozitif ve sağlıklı süt sığırında 14 ay aralıklarla yaptığı çalışmada, normal sağlıklı görünümdeki hayvanların 1/3'ünde total lökosit miktarında ve 5 yaşından yukarı hayvanların yarısında lenfosit miktarında azalma tespit etmişlerdir. BLV (+) süt sığırlarında total lökosit değerlerini 2-5 yaşında 9700 ile 17700/mm<sup>3</sup>, 5-9 yaşında 9700 ile 18200/mm<sup>3</sup> ve 10-17 yaşında 7400 ile 47200/mm<sup>3</sup> arasında tespit etmişlerdir.

Perman ve ark (1970) Minnesota eyaletinde süt sığırlarında lenfosit değerlerini istatistiki analize tabi tutmuşlardır. Araştırmada 849 adet Holstein-Fresian ırkı süt sığırında yaşa göre total lökosit, nötrofil, eozinofil ve total lenfosit sayılarını tespit etmişlerdir. Araştırma sonucunda total lökosit, total lenfosit, nötrofil ve eozinofil değerlerinin yaş artışı ile birlikte azalışa geçtiğini bildirmişlerdir. Total lökosit, nötrofil ve total lenfosit oranlarında istatistiki açıdan önem tespit edilirken, eozinofil oranları için önemsiz bulunmuştur. Kontrol grubu hayvanlarda normal lenfosit oranları belirlenirken, BLV ile enfekte hayvanlarda yüksek ve normalin üzerinde lenfosit oranları tespit edildiği bildirilmiştir. Perman ve ark (1970) bu çalışmada geliştirilen Minnesota hematoloji anahtarının, Bendixen (1965a) ve Götze ve ark (1954)'nın buldukları hematoloji anahtarları ile uyum sağladığını ifade etmişlerdir. Geliştirilen bu anahtarlar potansiyel lökemik hayvanların belirlenmesi veya klinik olarak lökemia enfeksiyonunun teşhisinde kullanılabileceğini tavsiye etmişlerdir.

Williams ve ark (1988) 3 yaşında 12 adet süt sığırında BLV-enfeksiyonunda ortalama total lökosit miktarını BLV(+) AL sığırlarda 9700 hücre/mm<sup>3</sup> ve BLV (+) PL'li sığırlarda 26500 hücre/mm<sup>3</sup> olarak tespit etmişlerdir. Araştırmada AL ve PL'li sığırlarda total lökosit, total lenfosit ve B lenfosit sayılarında artışların tespit edileceğini bildirmişlerdir.

Lewin ve ark (1988) 240 adet Holstein-Fresian melezi süt sığırında perifer kandaki B lenfositlerinin oranını ve subklinik lökemia arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Araştırmada EEC'nin lökoz anahtarına göre yapılan değerlendirmede seropozitif hayvanların %29'unda B lenfosit oranının seronegatif hayvanlardan yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca BL enfeksiyonunun subklinik seyrettiği sürülerde B lenfosit oranının, total lenfosit oranlarından daha etkin olduğu belirtilmiştir.

Bu çalışmada, sürü genelinde tüm yaşlarda ELISA seropozitif hayvanların ortalama perifer kan total lenfosit, ortalama total lökosit ve ortalama B lenfosit (ANAE-lenfosit) (4 ve 8 yaş hariç) oranlarının seronegatif hayvanlardan önemli derecede yüksek ve ELISA seropozitif hayvanların ortalama perifer kan ortalama T lenfosit (ANAE+lenfosit) (8 yaş hariç), ortalama null hücreleri (4 ve 8 yaş hariç) ve nötrofil hücreleri (4 yaş hariç) oranlarının



seronegatiflerden önemli derecede düşük olduğu tespit edildi. Çalışmada en yüksek ELISA seronegatif hayvanların ortalama perifer kan B lenfosit (ANAE-lenfosit) (%54.95±3.47) ve ortalama total lenfosit (%58.91±7.66) artışı 7 yaşındaki, ortalama total lökosit (11994±3491) artışı 6 yaşındaki hayvanlarda tespit edildi. Bu çalışmada 6 ve 7 yaşlarda elde edilen sonuçlar, Schalm ve ark (1975)'nin sonuçları ile paralellik göstermektedir. Çalışmada en düşük B lenfosit (ANAE-lenfosit) 8 yaş (%26.5±23.9) ve 4 yaş (%38.25±19.62), en düşük ortalama total lenfosit (%51.2±17.3) ve en düşük ortalama total lökosit (8900±483) oranları 4 yaşındaki hayvanlarda tespit edildi. Çalışmada elde edilen veriler, Schalm ve ark (1975)'nin sonuçları ile benzerlik göstermektedir.

Batmaz ve ark (1999) BLV enfeksiyonu saptanan sığırların ortalama yaşını 5.23 olarak tespit etmişlerdir. Yaş arttıkça enfeksiyon oranının arttığını ve özellikle 6 yaşından sonra en yüksek orana ulaştığını bildirmişlerdir.

Bu araştırma da, tüm yaşlarda ELISA seropozitif hayvanların ortalama perifer kan monosit, eozinofil ve bazofil oranları ile seronegatif hayvanlar arasında değişim ve istatistiki açıdan fark tespit edilemedi. Bu durum, Perman ve ark (1970)'lerinin araştırma sonuçları ile benzer bulunmuştur.

Yaşa göre ELISA testi ile BLV (+) tespit edilen hayvanların ortalama total lenfosit ve ortalama total lökosit dağılımı, EEC hematolojik anahtarına dayandırılarak gruplandırılmıştır. Araştırmada elde edilen sonuçlar ile EEC hematolojik anahtarı arasında tam bir benzerlik tespit edilmiştir.

Bovine Löykozis Virus pozitif ve negatif hayvanların ortalama total lenfosit ve ortalama total lökosit değerleri bildirilen standartlara göre (yaş gruplarında) uyumluluk göstermektedir.

Bu çalışmada ELISA seronegatif hayvanların ortalama total lenfosit ve ortalama total lökosit değerleri 3, 4 ve 5 yaşındaki hayvanlar arasında, ELISA seronegatif hayvanların ortalama total lenfosit ve ortalama total lökosit değerleri de 6, 7 ve 8 yaşındaki hayvanlar arasında benzerlik göstermiştir. Fakat ELISA seropozitif hayvanların ortalama total lenfosit ve ortalama total lökosit değerleri 3, 5 ve 6 yaşındaki hayvanlar arasında, ELISA seropozitif hayvanların ortalama total lenfosit ve ortalama total lökosit değerleri de 4, 7 ve 8 yaşındaki hayvanlar arasında benzerlik göstermiştir.

Kajikawa ve ark (1983) sağlıklı Holstein-Fresian ırkı 8 adet sağlıklı sığırdaki T lenfositlerin (ANAE-lenfosit) oranını %44-65 ve B lenfositlerin (ANAE-lenfosit) oranını %39.1-50.6 arasında, BLV enfekte 2 adet Holstein-Fresian ırkı sığırdaki ise T lenfositlerin

(ANAE+lenfosit) oranı %2 ve %8 , B lenfositlerin (ANAE-lenfosit) oranı %56.1 ve %80.6 olarak tespit edildiğini bildirmişlerdir.

Stot ve ark (1991) 12 adet Holstein ırkı süt sığırında BLV enfeksiyonunun varlığını AGID testi ve analitik flow cytometre kullanarak araştırmışlardır. Araştırmada, klinik olarak lökemik olduğu belirlenen hayvanlarda B lenfositlerin oranını %90, 78, 84, 73 ve 60, T-lenfositlerin oranını %8, 16, 14, 19 ve 27 ve total lökosit değerlerinin ( $\text{mm}^3$ ) oranını 14500, 15400, 13750, 14400 ve 13100 olarak tespit etmişlerdir. Klinik olarak PL'li hayvanlarda B lenfositlerin oranını %72, 78, 72, 54 ve 76, T lenfositlerin oranını %21, 13, 21, 28, 36 ve total lökosit değerlerinin  $\text{mm}^3$ 'de 21700, 14600, 23600, 303000 ve 25100 olarak tespit etmişlerdir.

Araştırmada kullanılan tüm hayvanlar Holstein ırkı olup, BLV seropozitif hayvanların ortalama perifer kandaki B lenfosit (ANAE-lenfosit) oranları  $51.82 \pm 13.95$ ,  $36.91 \pm 16.50$ ,  $55.06 \pm 6.01$ , ortalama T lenfosit (ANAE+lenfosit) oranları  $28.53 \pm 12.71$ ,  $39.93 \pm 16.92$ ,  $25.17 \pm 9.47$  ve ortalama total lökosit oranları  $\text{mm}^3$ 'de  $10861 \pm 2940$ ,  $8109 \pm 3779$ ,  $12067 \pm 2930$  olarak tespit edildi. Çalışmada Holstein ırkı süt sığırında ELISA testi ile tespit edilen ortalama B lenfosit (ANAE-lenfosit) oranları, Kajikawa ve ark (1993)'lerinin ve Stot ve ark (1991)'lerinin sonuçlarıyla, ortalama T lenfosit (ANAE+lenfosit) oranları, Stot ve ark (1991)'lerinin PL'li hayvanlardaki oranları ile paralellik göstermektedir. Ancak çalışmada elde edilen ortalama total lökosit oranları, diğer araştırmalardan düşük bulunmuştur.

Bu araştırmada enfeksiyonun teşhisinde ELISA, AGID testleri ve hematolojik metotlar kullanıldı. AGID-ELISA testleri, ELISA-hematolojik yöntemler birbirileri ile karşılaştırıldı. Ancak AGID testinde daha az sayıda seropozitif hayvan tespit edilmesi nedeniyle, hematolojik yöntemlerle aralarında yapılan istatistiki hesaplamalar önemsiz ve hatalı bulundu. Bu yüzden hematolojik metotlar sadece ELISA testi ile karşılaştırıldı.

Bu çalışmada, kan serumları için AGID testi kullanırken, süt serumları için ELISA testi kullanıldı. İyisan ve ark (1996) bildirdiğine göre Bauer (1983) AGID testi ile süt serumunda antikor tespitinin uygun olmadığını ifade etmiştir. Bu yüzden süt serumlarındaki antikorların tespitinde ELISA testi kullandı.

Araştırmada, kan serumu negatif olduğu halde süt serumu pozitif çıkan 81 adet sığır tespit edilmiştir. Başlangıçta testte yapılan bir hata veya nonspesifik reaksiyon olarak düşünülmüş ve test tekrarlanmıştır. Ancak sonuçlar yine değişmemiş, süt serumları pozitif olarak değerlendirmeye alınmıştır.

Bovine Löykozis enfeksiyonu üzerine yapılan serolojik testlerde süt serumlarının pozitif, kan serumlarının negatif olduğu veya süt serumlarındaki antikor miktarının kan

serumlarından çok daha yüksek olduğu bir çok araştırma ile ortaya konulmuştur (Perrin ve ark 1986, Kuzmak 1988, Tekes 1994). Bu durum daha çok buzağılama öncesi ve sonrasında meydana gelmektedir. Perrin ve ark (1986), 20-80 hayvan içeren ve enfeksiyon oranı %4-45 olan 11 adet sürüden kan ve süt serum örnekleri toplamışlar, serolojik ELISA titrelerinde bir yıl boyunca önemli bir değişimin olmadığını ama süt ELISA titrelerinin doğum ve kuru dönemden önce en yüksek seviyeye çıktığını bildirmişlerdir. Klintevall ve ark (1991)'ları yaptığı çalışmada BLV'nun tespitinde süt serumlarında ELISA testi ile antikor tespitinin yapılmasının uygun olacağını bildirmişlerdir. Bunu da süt serumunda IgG<sub>1</sub>'in yüksek düzeyde olmasına bağlamışlardır. ELISA testinde monoklonal anti-bovine IgG<sub>1</sub> ve IgG<sub>2</sub> kullanarak kan serumu kadar süt serumlarında da antikor tespiti yapılabileceğini bildirmişlerdir. Mammerickx ve ark (1985b)'ları süt serumlarında antikor titrelerini kan serumlarına göre düşük bulmalarına karşın, ELISA testinde süt serumlarının kullanılmasının uygun olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca araştırmada "süt havuzu'nda" toplanan sütlerde ELISA testi ile antikor tespiti yapılmasının uygun olduğu da vurgulanmıştır.

İyisan ve ark (1996) sığırlarda EBL oranını ELISA ile kan serumunda %4.2, aynı hayvanların sütlerinde %4 düzeyinde saptamışlardır. Akça ve ark (1996)'ları ise sığırlarda EBL enfeksiyon oranını kan serumlarında AGID ile %7.6, sütte ELISA ile %14.4 olarak tespit etmişler ve bu farklılığı ELISA'nın daha duyarlı olmasına bağlamışlardır.

Özellikle bu çalışmada sütte ELISA ile daha yüksek oranda antikor tespit edilmesi örneklenen hayvanların ileri gebelik döneminde (7. ve 9. aylar arasında) olmalarına bağlanabilir. Çünkü bu dönemde sütteki antikor titresi artmaya başlamaktadır (Perrin ve ark 1986).

Mammerickx ve ark (1976) 245 adet sığır kan serumunu AGID testi ve hematolojik yöntemler (lenfosit sayımı) kullanarak BLV enfeksiyonu yönünden taramışlardır. Hem AGID testi hem de hematolojik yöntemle pozitif olduğu tespit edilen 30 hayvanın 21'i Göttingen anahtarına göre açıkça lökemik ve 3 adedinin tümörlü olduğu bildirilmiştir. Araştırmada, tüm yaş grubu (0-2 yaş grubu hariç) hayvanlarda benzer yüzdeler gözlemlendiği bildirilmiştir. Araştırmada 15 adet hayvan hematolojik testlerle normal olarak gözlenirken, serolojik testlerde antikor taşıdığı bildirilmiştir (45 hayvanın 15'inde-%33).

Mammerickx ve ark (1976)'ları BLV enfeksiyon yüzdesinin 3 yaşından itibaren arttığını ve daha ileri yaşlarda stabil kaldığını bildirmişlerdir. Çalışmada en fazla ELISA testi ile BLV (+) hayvanlar (3 yaş ve üzerinde) tespit edildi.

Çalışmada, ELISA ile 3 yaş ve üzerindeki BLV seropozitif hayvanların hematolojik değerlendirmelerinde % lenfosit ve total lökosit (mm<sup>3</sup>) sonuçları (yaş göre) EEC hematoloji

anahtarına göre değerlendirildi. Seropozitif hayvanların % lenfosit ve total lökosit ( $\text{mm}^3$ ) sonuçlarının EEC hematoloji anahtarına göre (9-10 yaş grubundaki hayvanlar hariç) uyumlu olduğu belirlendi. Levy ve ark (1977)'larında CF testi ve hematolojik uygulamalar ile yaptıkları araştırmada aynı sonuçları elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Bu araştırmada, 469 adet hayvanın AGID testi ve hematolojik yöntemlerle BLV enfeksiyonu incelemesinde 14 adet hayvan hem AGID testi hem de hematolojik yöntemlerle ve 81 adet hayvan hem ELISA hem de hematolojik yöntemlerle pozitif reaksiyon gösterdiği belirlendi. Çalışmada ELISA ve AGID testi ile seronegatif tespit edilen hayvanlar hematolojik yöntemlerle de bulundu. Çalışmada serolojik testler ile hematolojik testler arasında pozitif hayvanları tespit etme açısından %100'lük bir uyum gözlenirken, serolojik testler ve hematolojik yöntemler arasında bir çelişki bulunmadı. Ancak Mammerickx ve ark (1976)'ları yaptıkları araştırmadaki serolojik testler ve hematolojik yöntemler arasındaki oluşabilen çelişkileri şu şekilde açıklamışlardır: AL hayvanlarda hematolojik testlerin öneminin olmadığını, hastalığın erken teşhisi için AGID testinin çok hassas bir test uygulaması olmadığını bildirmişlerdir. Özellikle genç hayvanlarda (0-1 yaş) ne AGID testinin ne de hematolojik metotların hastalığın teşhisinde spesifik metot olarak kullanılamayacağını açıklamışlardır.

Bovine Löykozis Virus enfeksiyonunun teşhisinde kullanılan ANAE enzim boyama yöntemi, May-Grünwald Giemsa boyama ve Total Lökosit sayım teknikleri ile yapılan hematolojik çalışmalarda elde edilen sonuçlar ile en yüksek hassasiyete sahip ELISA testi arasında %100 bir uyum tespit edildi. Bu enfeksiyonun teşhisinde kullanılan hematolojik yöntemlerin tek başına değil, bir bütün olarak (ANAE enzim boyama yöntemleri, May-Grünwald Giemsa boyama tekniği ve total lökosit sayımı) yapılması gerekmektedir. Çünkü sadece BLV enfeksiyonunda değil bir çok enfeksiyonda PL olgusu gelişebilmektedir. Bu nedenle hematolojik yöntemlerde B-lenfosit, total lenfosit ve total lenfosit artışı, T lenfosit azalışı ve diğer kan parametrelerdeki değişimler belirlenmelidir. Sadece bir hematolojik veri ile hastalığın teşhisini koymak hatalı olacaktır. Nitekim Kandil ve ark (1989)'ları ve Mammerickx ve ark (1976)'ları BLV enfeksiyonunun teşhisinde AGID testi ve hematoloji yöntemi (sadece lenfosit sayımı) kullandıklarında çelişkili sonuçlar elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Araştırmada ileri gebelik döneminde bulunan süt sığırlarından örnekler toplandı. Perrin ve ark (1986), Kuzmak (1988), Bauer (1983) ve Perrin ve ark (1986) BLV ile enfekte ileri gebelik dönemindeki hayvanların süt-ELISA titrelerinin, kan-ELISA'dan yüksek

seviyede bulunduğunu bildirmişlerdir. Bu yüzden çalışmada süt serumlarına sadece ELISA testi uygulandı.

Bu araştırmada, daha fazla miktarda BLV (+) olan hayvan ELISA testi ile süt örneklerinde, daha az sayıda hayvan AGID testi ile kan örneklerinde tespit edildi. Bu durum ELISA testinin AGID testinden daha fazla hassas olmasına bağlandı. Ancak örneklerin alındığı hayvanlar, ileri gebelik döneminde (7. ve 9. aylar arasında) olduğundan bu periyotta kolostral döneme girilmesinden dolayı meme dokusunda immunoglobulin sentezleyen hücre sayısında artış gözlemlendiği bildirilmiştir (Heeney ve ark 1988). Bir çok hayvan kolostrumunda bulunan IgG'lerin süt serumundan daha yüksek oranda bulunduğu ve süt sığırlarında predominant olan IgG'lerin (IgG<sub>1</sub> ve IgG<sub>2</sub>) genellikle kandan süte transudasyon yolu ile geçtiği belirtilmiştir (Meirom ve ark 1985). IgG<sub>1</sub>'lerin kandan selektif olarak transfer olmalarına karşın, IgG<sub>2</sub>'lerin (sitofilik olduklarından) Polimorf nükleer lökositlere bağlanarakta pasif olarak bölgeye ulaşabildikleri ve IgG<sub>1</sub>'lerin selektif transportunun laktasyon sırasında yüksek olduğu açıklanmıştır (Gatei ve ark 1990). BLV ile enfekte, PL'li ve lenfomalı sığırların meme dokusunda permeablite artışı ile kandan fazla miktarda protein geldiği ancak enfeksiyonun başlangıcında IgG<sub>1</sub> transferinin çok yavaş olduğu ve sonradan artmaya başladığı, IgG<sub>2</sub> düzeyinin stabil kaldığı ve IgM düzeyinde azalmalar görüldüğü bildirilmiştir (Meiron ve ark 1985, Heeney ve ark 1988, Çarlı ve ark 1992). Ayrıca meme dokusu epiteli submukozasında bulunan plazma hücreleri tarafından sentezlenen IgA ve IgM'lerin, kandan transudasyon yolu ile gelen IgG'lerin meme dokusu hücrelerine pinositozis ile girdikleri ve burada pinositik veziküllerde toplandığı, vezikül hücrelerine yapışan immunoglobülinlerin vezikül apeksine doğru hareketleri sonucunda ekzositozis ile dışarı çıktıkları açıklanmıştır (Meiron ve ark 1985, Gatei ve ark 1990).

Sonuç olarak; ELISA (süt) testinin daha hassas olması, ileri gebelik döneminde bulunan BLV-enfekte sığırlarda kolostral döneme girilmesi, immunoglobulin değişimine bağlı olarak kolostrumun daha fazla antikor bulundurması sonucu bu döneme özgü yapılan diğer araştırmalardaki (Perrin ve ark 1986, Kuzmak 1988) gibi süt örneklerinde daha fazla miktarda seropozitiflik tespit edilmiştir.

Bu çalışma da her ne kadar Ig konsantrasyonlarını tespit edilmesede, araştırmacılar BLV'nun immun sistem hücrelerine, fonksiyonlarına ve değişik immunolojik parametrelere olan etkilerini araştırmışlar ve bunun sonucu virusun, T lenfosit alt gruplarında azalmaya, B lenfositlerinde ise onkojenik bir çoğalmaya neden olduğunu bildirmişlerdir (Gatei ve ark 1989, Stott ve ark 1991).

Bu araştırma sonucunda, BLV enfeksiyonunun teşhisinde ELISA testinin ve hematolojik yöntemlerin, AGID testinden daha hassas olduğu ve ELISA testi ile hematolojik yöntemler arasında %100 bir uyum bulunduğu tespit edildi. Ayrıca BLV enfeksiyonunun teşhisinde kullanılan serolojik metotlar öncesinde saha şartlarında klinik olarak lökosis enfeksiyonu semptomu gösteren veya sağlıklı görünümdeki hayvanların öncelikle hematolojik yöntemlerle araştırılmasının gerekli olduğu tavsiye edilebilir. Çünkü hematolojik metotlar serolojik testlere göre daha ucuz, kolay uygulanabilen, daha az araç-gereç gerektiren, boyama frotileri uzun süre saklanabilen ve ileri dönemlerde boyama frotilerinin tekrar incelenebilme imkanı olan yöntemlerdir. Bu durumda hematolojik yöntemler ile enfekte olduğu belirlenen hayvanlar serolojik testlere tabi tutulmalıdırlar. Bu şekilde yapılacak teşhis, kontrol ve eradikasyon uygulamalarında daha az sayıda hayvan serumları serolojik testlerle inceleneceğinden ekonomik açıdan masraf azalacak ve enfeksiyonun tespitinde güvenilirlik artacaktır. Bu çalışmadaki gibi bir uygulama metodu oturtularak, hayvancılık sektöründe büyük ekonomik kayıplara yol açan bu enfeksiyonla ilgili bir kontrol ve mücadele projesinin yapılması gerek ekonomik açıdan gerekse hastalığın eradikasyonu amacıyla fayda sağlayacaktır. Lenfosit tiplerinin ayırıt edilmesi amacıyla kullanılmakta olan yöntemler oldukça pahalı olup, uzun zaman almaktadır. Bu nedenle frotilerle uygulanabilecek bu tür pratik yöntemlerin kullanılması zaman, ekonomi ve uygulama açısından da faydalı olacaktır.

Çalışmada örneklenen sürülerde entansif beslenmeye dayalı kapalı-bağlı sistem ahırlarda süt sığırcılığı yapılmaktadır. Kullanılan yüksek verimli Holstein kültür ırklarının ihtiyaçları yüksek ve çeşitli olduğu için, bunların kötü çevre koşullarına uyabilme yetenekleri çok sınırlıdır (Aytuğ ve Karaman 2000). Bu nedenle kültür ırkı süt sığırlarında ahır, barınak, beslenme, bakım, sevk, idare, hastalıkları önleme yöntemleri ve koşulları uygun hale getirilmelidir. Araştırmada örneklenen hayvanlar meraya çıkarılmamaktadır. Bu yüzden meradaki kene ve diğer insektlerin bulaşmada rolü yoktur. Ayrıca sürü sahipleri kene enfestasyonu olmadığını bildirmişlerdir. Seropozitif hayvanların bulunduğu işletmelerin düzensiz, sıkışık fakat hijyenik ahır şartlarına sahip olduğu görülmüştür. Virus burun akıntısı ve salyada bulunduğu için enfekte sığırların özellikle PL formundaki sığırların bir arada barındırılması ile bulaşmanın olduğu bildirilmiştir (Van Der Maaten ve Miller 1990, Johnson ve Kaneene 1992, Evermann ve ark 1987).

Enfeksiyon saptanan işletmelerde buzağılarda karışık ve ortak emzirme yapıldığı tespit edilmiştir. Bulaşmada, inek sütünün buzağı beslenmesinde kullanıldığı enfekte işletmelerde, sütün başlıca bulaşma aracı olduğu belirtilmiştir (Chung ve ark 1986). Bu yüzden süt üretiminin ticari düzeyde yapıldığı Burdur-Merkez ve ilçelerinde buzağılara yapılan karışık ve

ortak emzirme uygulamaları terk edilmelidir. Ayrıca gelişmiş ülkelerdeki gibi geçiminin en büyük payını süt sığırcılığı oluşturan Burdur-Merkez ve ilçelerindeki süt sığırı yetiştiriciliğinde kullanılan “süt havuzu” sistemleri serolojik testlere tabi tutulmalıdır. Bu sayede yapılacak bu tür bir uygulama bölgede BL enfeksiyonunun devamlı olarak kontrol altında tutulmasını sağlayıp, ekonomik açıdan da kar sağlayacaktır.

Araştırmada seropozitif bulunan sürülerde daha fazla oranda aşılamanın yapıldığı, her sığıra ayrı iğne kullanılmadığı, aynı eldivenlerle rektal muayene yapıldığı bildirilmiştir. Virus başlıca enfekte lenfositlerde bulunduğundan, bulaşmada en önemli yolun kontamine iğne ve aletlerin kullanılmasıyla meydana geldiği bilinmektedir (DiGiacomo ve ark 1985, Laussauzet ve ark 1989, Wentink ve ark 1993, Evermann ve ark 1986).

Bu çalışma ile ilk defa Burdur il ve ilçelerinde BLV enfeksiyon varlığı ELISA, AGID testleri ve hematolojik uygulamalarla ortaya konulmuştur. Süt sığırcılığının yüksek düzeyde yapıldığı Burdur il ve ilçelerinde BLV enfeksiyonunun düşük bulunduğu ancak sürüde ortak emzirme, aşılama, sık tedavi uygulamaları, kontamine eldiven ve enjeksiyon iğnelerinin enfeksiyonun bulaşmasında etkili olduğu görülmüştür. Bu nedenle BLV enfeksiyonunun tespit edildiği Burdur il ve ilçelerinde bulunan işletmelerde bulaşmada etkili olan bakım ve yetiştirme koşullarının gözden geçirilmesinin, PL’li sığırların sürülerden elemine edilmesinin, daha fazla sayıda süt sığırları üzerinde araştırma yapılmasının, gerekli olduğu kanaatine varılmıştır.

## 6. ÖZET

**T.C.**  
**SELÇUK ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**VİROLOJİ ANABİLİM DALI**  
**Doktora tezi / Konya-2003**

**Mehmet KALE**

**Danışman**

**Prof. Dr. Feridun ÖZTÜRK**

**Burdur Bölgesi Süt Sığırlarında Enzootik Bovine Löykozis Enfeksiyonunun Agar Jel İmmunodiffüzyon (AGID), Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Testleri ve Hematolojik Uygulamalar ile Araştırılması**

Bu çalışma, Burdur ili ve ilçelerinde, halka ait özel işletmelerde yaşları 3-10 arasında bulunan 469 adet klinik olarak sağlıklı görünümde ileri gebelik dönemindeki (7. ve 9. aylar arası) Holstein ırkı süt sığırlarında BLV enfeksiyonunun seropozitivitesinin dağılımını ve bu hayvanların hematolojik verilerini tespit etmek amacıyla gerçekleştirildi. Serolojik incelemeler amacıyla steril tüplere aynı hayvana ait kan ve süt örnekleri, hematolojik incelemeler içinde K<sub>3</sub> EDTA'lı tüplere kan örnekleri alındı.

Kan serumunda BLV spesifik antikor varlığını tespit etmek amacıyla Agar Jel İmmunodiffüzyon (AGID) ve süt serumunda antikor varlığını tespit etmek amacıyla Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) testlerinden yararlanıldı. Kan örneklerinde T lenfosit (ANAE+lenfosit), B lenfosit (ANAE-lenfosit) ve null hücrelerini belirlemek amacıyla Alfa Naftil Asetat Esteraz (ANAE) enzimi demonstrasyonu metodu, hayvanların lökosit formüllerinin belirlenmesi amacıyla May-Grünwald Giemsa boyama metodu ve total lökosit sayılarını belirlemek için de total lökosit sayım yöntemi kullanıldı.

Yapılan incelemeler sonucunda, örnekleme yapıldığı 10 işletmeden alınan 469 kan serumunun 23'ünde (%4.9) AGID ile, süt serumunun 90'ında (%19.2) ELISA testi ile BLV enfeksiyonuna karşı antikor varlığı tespit edildi. AGID testi ile en düşük seropozitivite 3 yaşlı sığırlarda (%3.23), en yüksek seropozitivite 7 yaşlı sığırlarda (%8.51) tespit edilirken, ELISA testi ile en düşük oran 5 yaşlı sığırlarda (%16.11), en yüksek oran ise 8 yaşlı sığırlarda (%60)



saptandı. İlçeler dikkate alındığında; AGID testi ile en düşük seropozitivite oranı Burdur-Yeşilova ilçesinde (%4) tespit edilirken, en yüksek pozitivite ise Burdur-Merkez ilçesinde (%5.45) gözlemlendi. ELISA testi bulguları esas alındığında; en düşük seropozitiflik Burdur-Merkez ilçesinde (%12.7) iken en yüksek oran Burdur-Tefenni ilçesinde (%28.3) tespit edildi. Her iki test ile pozitif sonuç ise 9 (%1.92) olarak tespit edildi. Hayvanların yaşları esas alındığında her iki test sonucu pozitif olan en düşük yaş grubu 3 yaş (%1.61) iken; en yüksek grup 6 yaş (%3.33) grubuydu. İlçeler dikkate alındığında Burdur-Ağlasun ilçesinde her iki test sonucu pozitif olan en düşük oran (%1.26), Burdur-Tefenni ilçesinde ise en yüksek (%2.5) oran tespit edildi. Çalışmada AGID ve ELISA testlerinin pozitiflikleri arasında %79.74'lük bir korrelasyon tespit edildi.

Çalışmada, AGID seropozitif hayvanların T lenfosit (ANAE+lenfosit) (%39.93) oranlarında düşüşler gözlenirken; B lenfosit oranları (ANAE-lenfosit) (%36.91), total lenfosit (%44.5) oranları ile total lökosit ( $8109/\text{mm}^3$ ) sayılarında önemli artışlar tespit edildi. ELISA testi sonuçları dikkate alındığında ise seropozitif hayvanların T-lenfosit (ANAE+lenfosit) (%28.53) oranlarında düşüşler oluşurken; B-lenfosit (ANAE-lenfosit) (%51.82) oranlarında, total lenfosit (%56.5) oranlarında ve total lökosit ( $10861/\text{mm}^3$ ) sayılarında belirgin artışlar dikkati çekti. Hem ELISA hem de AGID seropozitif hayvanların T-lenfosit (ANAE+lenfosit) (%25.17) oranlarında düşüş olduğu halde, B-lenfosit (ANAE-lenfosit) (%55.06) oranları, total lenfosit (%61.67) oranları ve total lökosit ( $12067/\text{mm}^3$ ) sayılarında dikkati çeken artışlar tespit edildi.

Yaş grupları dikkate alındığında; sürü genelinde ELISA seropozitif hayvanların ortalama T lenfositlerin (ANAE+lenfosit) en düşük ve en yüksek oranları; %22.45 ve %48.5, 7 yaşlı ve 8 yaşlı, ortalama B lenfositlerin (ANAE-lenfosit) en düşük ve en yüksek oranları; %26.5 ve %54.95, 8 yaşlı ve 7 yaşlı, ortalama total lenfositlerin en düşük ve en yüksek oranları; %51.2 ve %58.91, 4 yaşlı ve 7 yaşlı ve ortalama total lökosit en düşük ve en yüksek oranları;  $8900/\text{mm}^3$  ve  $11994/\text{mm}^3$ , 4 yaşlı ve 6 yaşlı hayvanlarda tespit edildi.

Çalışmada sürü genelinde hem hematoloji hem de ELISA seropozitif hayvanların en düşük ve en yüksek pozitiflik oranları; %16.11 ve %60, 5 yaşlı ve 8 yaşlı hayvanlarda tespit edildi. Hematolojik metotlar ile ELISA testi arasında %100 uyum gözlemlendi.

Çalışmada BLV enfeksiyonunun teşhisinde ELISA testi ve hematolojik metotların (ANAE enzim boyama metodu, May-Grünwald Giemsa boyama yöntemi ve total lökosit hesaplama metodu birlikte kullanılmak şartıyla), AGID testine göre daha güvenilir ve hassas olduğu kanısına varılmıştır.

## 7. SUMMARY

### **The Investigation of Enzootic Bovine Leucosis Infection by Agar Gel Immunodiffusion (AGID), Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Tests and Haematological Applications on the Dairy Cows in Burdur Region**

In this study, 469 healthy dairy cows (Holstein breed between 3 and 10 years old) that were in the late pregnancy period (between 7. and 9. months) were investigated to determine the distribution of EBL seropositivity taken from 10 different individual managements which belonged to the farmers in Burdur region. Blood and milk samples were taken simultaneously from each animal for serological investigations by sterile tubes and for haematological (only blood samples) investigations by K<sub>3</sub> EDTA tubes.

The presence of specific antibodies to BLV in the blood sera was detected by AGID test and the presence of specific antibodies to BLV in the milk sera was detected by ELISA. T-lymphocytes (ANAE+lymphocyte), B-lymphocytes (ANAE-lymphocyte) and Null cells were determined in blood samples by the histochemical demonstration of ANAE. Leucocyte formule rates and total leucocytes were determined in blood samples by the May-Grünwald Giemsa stain and total leucocytes count methods.

Of 469 serum samples, 23 (4.9 %) were found to be seropositive by AGID test and of 469 milk samples, 90 (19.2 %) were found to be seropositive by ELISA. The lowest prevalence was detected on 3 year old animals (3.23 %) and the highest prevalence was detected on 7 year old animals (8.51 %) by AGID on distribution according to ages. The lowest prevalence was detected on 5 year old animals (16.11 %) and the highest prevalence was detected on 8 year old animals (60 %) by ELISA on distribution according to ages. The lowest prevalence was detected as 4 % in Burdur-Yeşilova district and the highest prevalence was detected as 5.45 % in Burdur-Merkez by AGID on distribution according to managements. The lowest prevalence was detected as 12.7 % in Burdur-Merkez and the highest prevalence was detected as 28.3 % in Burdur-Tefenni by ELISA on distribution according to managements. Sera and milk samples obtained from 9 (1.92 %) dairy cows were found positive both AGID and ELISA tests were performed. The lowest prevalence was detected as 1.61 % in 3 year old animals and the highest prevalence was detected as 3.33 % on 6 year old animals performing both AGID and ELISA tests considering BLV seropositive

on distribution according to the ages. The lowest prevalence was detected as 1.26 % in Burdur-Ağlasun district and the highest prevalence was detected as 2.5 % in Burdur-Tefenni district performing both AGID and ELISA considering BLV seropositive on distribution according to the managements. A correlation between serum AGID and milk ELISA was detected as 79.74 %.

In this study, the results clearly showed that ANAE+ T lymphocytes (39.93 %) appeared in peripheral blood although they were low in number; ANAE- B lymphocytes (36.91 %), total lymphocytes (44.5 %) and total leucocytes (8109 blood cells/ mm<sup>3</sup>) were increased in AGID seropositive animals. Although ANAE+ T lymphocytes (28.53 %) were low in number; ANAE-B lymphocytes (51.82 %), total lymphocytes (56.5 %) and total leucocytes (10861 blood cells / mm<sup>3</sup>) were increased in ELISA seropositive animals. As the same, when ANAE+T lymphocytes (25.17 %) were low in number; ANAE-B lymphocytes (55.06 %), total lymphocytes (61.67 %) and total leucocytes (12067 blood cells / mm<sup>3</sup>) were increased in both AGID and ELISA seropositive animals.

The lowest and highest prevalences were detected on ELISA seropositive animals on distribution according to the ages respectively: ANAE+ T lymphocytes were found 22.45 % (7 year old) and 48.5 % (8 year old), ANAE- B lymphocytes were found 26.5 % (8 year old) and 54.95 % (7 year old), total lymphocytes were found 51.2 % (4 year old) and 58.91 % (7 year old), total leucocytes were found 8900 blood cells/ mm<sup>3</sup> (4 year old) and 11994 blood cells/ mm<sup>3</sup> (6 year old).

According to both haematological and ELISA seropositive animals the lowest and the highest prevalence were founded as 16.11 % and 60 % in all flocks on 5 year and 8 year old animals. An accordance between blood haematological methods and milk ELISA was detected as 100 %.

As a results, it was reached that in the diagnosis of BLV infection ELISA test and haematological methods, with which the ANAE demonstration, May-Grünwald Giemsa stain method and total leucocytes counts were used together, were very reliable and sensitive than that of AGID test.

## 8. LİTERATÜR LİSTESİ

- Abt DA, Marshak RR, Kulp HW and Pollock RJ (1969)** Studies on the relationship between lymphocytosis and bovine leukosis, *Comparative Leukemia Research*, 36, 527-536.
- Agresti A, Ponti W, Rocchi M, Meneveri R, Marozzi A, Cavalleri D, Peri E, Poli G and Ginelli E (1993)** Use of polymerase chain reaction to diagnose bovine leukemia virus infection in calves at birth, *Am J Vet Res* 54 (3), 373-378.
- Akça Y, Alkan F, Bilge S, Karaoğlu T, Özkul A, Burgu İ and Kaaden OR (1996)** Süt sığırlarının süt ve kan serumlarında enzootik sığır löykozuna (EBL) karşı antikor varlığının enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) ve agar jel immunodiffuzyon (AGID) testi ile araştırılması, *Ankara Üniv Vet Fak Derg* 43, 53-59.
- Aksoy E (1992)** Onkolojide retroviral etiyoloji, *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi* 7 (2), 159-178.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K and Watson JO (1994)** *Molecular biology of the cell* (3th ed.) 24, Garland Publishing, N.Y. U.S.A, 1255-1294.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K and Watson JO (1994a)** Immune systems, In. *Molecular biology of the cell* (3th ed.) 24, Garland Publishing, N.Y. U.S.A, 1195-1227.
- Altaner C, Ban J, Alternova V and Janik V (1991)** Protective vaccination against bovine leukemia virus infection by means of cell-derived vaccine, *Vaccine* 9, 889-895.
- Anonymous (1968)** International committee on bovine leukosis. Criteria for the determination of the normal and leukotic state in cattle, *J. Natl. Cancer Inst.*, 41, 243-263.
- APHIS (1999)** High prevalence of BLV in U.S. dairy herds, Centers for Epidemiology and Animal Health, USA, <http://www.aphis.usda.gov>
- Aytuğ CN ve Karaman M (2000)** Süt sığırı yetiştiricisinin el kitabı-1. Süt ineklerinin bakım ve beslenmeleri hakkında pratik bilgiler, 11-12.
- Banders U, Sauka E, Dzenis V, Brizule D, Klingeborn B and Merza M (1995)** An immuno-dot blot assay for the detection of antibodies to bovine leukemia virus envelope protein gp51, *Proc 3rd Congress Europ Soc Vet Virol*, edited by Schwyzer M, Ackermann M, Bertoni G, Kocherhans R, McCullough K, Engels M, Wittek R and Zanoni R, 361-364.

- Batmaz H, Çarlı KT, Şen A, Kennerman E, Minbay A, Yılmaz Z, Caner V ve Baklacı C (1999)** Güney Marmara bölgesi'nde enzootik bovine leukosis'in prevalansı ve bazı bakım-yetiştirme koşullarının incelenmesi, Tr J of Veterinary and Animal Sciences 23 ek sayı 2, 261-268.
- Bauer T (1983)** Diagnosis of enzootic bovine leucosis by ELISA and AGID. Comparative test on blood and milk samples, Thesis, 1-165.
- Baumgartener LE and Olson C (1982)** Host range of bovine leukosis. In fourth international symposium on bovine leukosis. (Current topics in veterinary medicine and animal science), 15, 338-346.
- Belak S and Pordany B (1993)** Application of the polymerase chain reaction (PCR) in veterinary diagnostic virology, Veterinary Research Communications 17, 55-72.
- Bendixen HJ (1965)** Studies of leukosis enzootica bovis: with special regard to diagnosis, epidemiology and eradication, Public Health Service Publication, 1422, Bethesda, U. S. A.
- Bendixen HJ (1965a)** Bovine enzootic leukosis, Advances in Veterinary Sciences, 10, 129-204.
- Bendixen HJ (1987)** Control and eradication of the disease in the EEC. In: Developments in veterinary virology 2, Enzootic Bovine Leukosis and Bovine Leukemia Virus [edited by Burny A and Mammerickx M] Dordrecht, Netherlands, Martinus Nijhoff, 273-277.
- Blazevic A, Cajavec S, Lojkic M, Ergotic N and Sladic D (1994)** The stability of antibodies to bovine leukemia virus in milk and blood sera, Veterinarski Arhiv, 64, 1-3, 19-26.
- Bielanski A (2000)** Development of IVF embryos in the presence of bovine leukemia virus and bovine immunodeficiency virus, Proceedings of the annual conference international embryo transfer society, Maastricht, Netherlands. In. Theriogenology 53 (1), 318.
- Bolat Y (1995)** Retroviridae, Veteriner Viroloji, Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Ders Teksir 11, 291-298.
- Brenner J and Trainin Z (1989)** Bovine leukosis virus-a review, with emphasis on Israeli aspects, Isr J Vet Med 45 (2), 95-105.
- Brenner J and Trainin Z (1989a)** Prevalence of BLV infection in beef cattle in Israel, Isr J Vet Med 45 (4), 229-232.
- Burgu I, Urman HK, Kaaden OR, Truyen U, Akça Y, Alcıgır G, Berkın S, Alkan F and Atasever A (1990)** Sero-epidemiological and pathological studies on enzootic bovine leukosis in Turkey, Dtsch Tierarztl Wschr 98, 226-228.

- Burny A, Bruck C, Chantrenne H, Cleuter Y, Dekegel D, Ghysdael J, Kettmann R, Leclercq M, Leunen J, Mammerickx M and Portetelle D (1980)** Bovine leukemia virus: molecular biology and epidemiology, *Viral Oncology*, 231-289.
- Buxton A and Fraser G (1977)** *Animal Microbiology* 2,(Ed.) U.S.A, 584-587.
- Buxton BA, Hinkle NC and Schultz RD (1985)** Role of insects in the transmission of bovine leukosis virus: potential for transmission by stable flies, horn flies and tabanids, *Am J Vet Res* 46 (1), 123-126.
- Cann AJ and Chen ISY (1996)** Human T-cell leukemia virus types I and II, In. *Retroviridae: the viruses and their replication*, In. *Fields Virology* (3th ed.) 2, 1849-1880.
- Catovsky D and Costello C (1979)** Cytochemistry of normal and leukaemic lymphocytes: a review, *Basic Appl Histochem* 23 (4), 255-270.
- Ceccarelli P, Gargiulo AM, Fagioli O and Pedini V (1986)** Cytochemical identification of lymphocytes and other mononuclear cells in ovine and bovine hemal nodes, *Comp Immun Microbiol Infect Dis* 9 (4), 297-302.
- Chiba T, Hiraga M, Aida Y, Ajito T, Asahina M, Wu D, Ohshima K, Davis WC, Okada K (1995)** Immunohistologic studies on subpopulations of lymphocytes in cattle with enzootic bovine leukosis, *Vet Pathol* 32 (5), 513-520.
- Chung YS, Prior HC, Duffy PF, Rogers RJ and Mackenzie AR (1986)** The effect of pasteurisation on bovine leukosis virus-infected milk, *Australian Veterinary Journal* 63 (11), 379-380.
- Coulston J, Naif H, Brandon R, Kumar S, Khan S, Daniel RC and Lavin MF (1990)** Molecular cloning and sequencing of an Australian isolate of proviral bovine leukemia virus DNA: comparison with other isolates, *J. Gen. Virol.*, 71, 8, 1737-1746.
- Cowley JA, Molloy JB, Dimmock CK, Walker PJ, Bruyeres AG and Ward WH (1992)** Infectivity of bovine leukaemia virus infected cattle: an ELISA for detecting antigens expressed in in vitro cultured lymphocytes, *Veterinary Microbiology* 30, 137-150.
- Culling CFA, Allison RT and Barr WT (1985)** *Cellular pathology technique*, Butterworths Co., Fourth edition, London.
- Çarlı KT, Batmaz H, Şen H ve Minbay A (1992)** Bovine leukemia virusu (BLV) ile doğal olarak infekte aleukemik sığırların humoral immun yanıtı ve in vivo T-hücreci cevabı, *Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 1 (11), 165-170.
- Çarlı KT, Batmaz H, Şen A and Minbay A (1993)** Comparison of serum, milk and urine as samples in an enzyme immunoassay for bovine leukaemia virus infection, *Research in Veterinary Science* 55, 394-395.

- Çelik İ, Aştı RN ve Boyraz M (1992)** Sığır fütal perifer kan lenfositlerinin alfa-naftil asetat esteraz aktivitesi üzerinde ışık mikroskopik çalışmalar, S Ü Vet Fak Derg 8 (2), 41-44.
- Çelik I, Vural Ö, Dönmez HH, Sandıkçı M (1993)** Determination of percentages in peripheral blood and tissue localization of T-lymphocytes in fetal and adult lymphoid tissues of cattle by the histochemical demonstration of alfa-naphthyl acetate esterase, Veterinarium 4 (1), 10-15.
- Çelik I, Aştı RN, Kadak R ve Işık MK (1994)** Farklı yaşlardaki sığırların perifer kan T-lenfosit oranlarında görülen değişiklikler, Hayvancılık Araştırma Dergisi 4 (2), 68-72.
- Daniel RCW, Gatei MH, Good MF, Boyle DB and Lavin MF (1993)** Recombinant viral vaccines for enzootic bovine leucosis, Immunology and Cell Biology 71, 399-404.
- De Boer GF, Boerrigter HM, Akkermans JPWM and Brenner J (1989)** Use of milk samples and monoclonal antibodies directed against BLV-p24 to identify cattle infected with bovine leukemia virus (BLV), Veterinary Immunology and Immunopathology 22, 283-292.
- Detilleux JC, Freeman AE and Miller LD (1991)** Comparison of natural transmission of bovine leukemia virus in Holstein cows of two genetic lines selected for high and average milk production, Am J Vet Res 52 (9), 1551-1555.
- Dhingra VK, Gupta RK and Sadana JR (1982)** Demonstration of acid alpha naphthyl acetate esterase activity in bovine lymphocytes and monocytes or macrophages, Res Vet Sci 33 (1), 26-30.
- DiGiacomo RF, Darlington RL and Evermann JF (1985)** Natural transmission of bovine leukemia virus in dairy calves by dehorning, Can J Comp Med 49, 340-342.
- DiGiacomo RF, Studer E, Evermann JF and Evered J (1986)** Embryo transfer and transmission of bovine leukosis virus in a dairy herd, JAVMA 188 (8), 827-828.
- Dimmock CK, Chung YS and Mackenzie AR (1991)** Factors affecting the natural transmission of bovine leukaemia virus infection in Queensland dairy herds, Australian Veterinary Journal 68 (7), 230-233.
- Divanian KH, Tsanev D and Franke L (1990)** The cytochemical detection of monocytes, lymphocytes, neutrophilic and eosinophilic granulocytes by using marker enzymes, Eksp. Med. Morfol., 29 (1), 27-31.
- Dmochowski L (1973)** Studies on the interrelationship of type B and type C virus particles in breast cancer and in leukemia, Bibl Haemat, 39, 45-60.
- Domenech A, Goyache J, Llames L, Paya MJ, Suarez G and Gomez-Lucia E (2000)** In vitro infection of cells of the monocytic/macrophage lineage with bovine leukaemia virus, Journal of General Virology 81, 109-118.

**Donham KJ, Burmeister LF, VanLier SF and Greiner TC (1987)** Relationship of bovine leukemia virus prevalence in dairy herds and density of dairy cattle to human lymphocytic leukemia, *Am J Vet Res* 48 (2), 235-238.

**Dulac RW and Yang TJ (1991)** Differential sodium fluoride sensitivity of alpha-naphthyl acetate esterase in human, bovine, canine and murine monocytes and lymphocytes, *Exp Hematol* 19 (1), 59-62.

**Dungworth DL, Theilen GH and Ward JM (1967)** Early detection of the lesions of bovine lymphosarcoma, *Proc. 3rd. Int. Symp. Comp. Leukemia Res., Bibl. Haemat.*, 31, 206-211.

**Eksen M (1991)** Hematoloji (Uygulama), S Ü Vet Fak Basımevi- Konya, 61.

**Eloit M, Lamy F, Glevarec M, Galaup F, Turmel R, Vigouroux A, Benet JJ and Toma B (1990)** Detection of bovine leukemia virus antibodies in bulk tank milk using an ELISA test: improvement of the predictive value of results by repeated testing, *Biologicals* 18, 19-23.

**Engvall A, Wierup M and Andersson L (1989)** Prevalence and control of bovine leucosis in Sweden, 11th International symposium of the world association of veterinary microbiologists and specialists in infectious diseases Perugia-Italy, 115.

**Erganiş O ve Uçan US (2001)** Veteriner Epidemiyoloji, 2. Baskı, S.Ü.Veteriner Fakültesi Yayın Ünitesi, Kampüs, Konya, 51.

**Esteban EN, Thorn RM and Ferrer JF (1985)** An amplified immunoperoxidase assay to detect bovine leukemia virus expression: development and comparison with other assays, *Cancer Research* 45, 3231-3235.

**Esteban EN, Thorn RM and Ferrer JF (1985a)** Characterization of the blood lymphocytes population in cattle infected with the bovine leukemia virus, *Cancer Research* 45 (7), 3225-3230.

**Evermann JF, DiGiacomo RF, Ferrer JF and Parish SM (1986)** Transmission of bovine leukosis virus by blood inoculation, *Am J Vet Res* 47 (9), 1885-1887.

**Evermann JF, DiGiacomo RF and Hopkins SG (1987)** Bovine leukosis virus: understanding viral transmission and the methods of control, *Veterinary Medicine*, 1051-1058.

**Fenner F, Bachmann PA, Paul E, Gibbs J, Murphy FA, Studdert MJ and White DO (1987)** *Veterinary Virology*, U.S.A., 563-564.

**Ferrer JF, Avila L and Stock ND (1972)** Serological detection of type C viruses found in bovine cultures, *Cancer Research* 32, 1864-1870.



- Ferrer JF, Abt DA, Bhatt DM and Marshak RR (1974)** Studies on the relationship between infection with bovine C-type virus, leukemia and persistent lymphocytosis in cattle, *Cancer Research* 34, 893-900.
- Ferrer JF, Piper CE, Abt DA and Marshak RR (1977)** Diagnosis of bovine leukemia virus infection: evaluation of serologic and hematologic tests by a direct infectivity detection assay, *Am J Vet Res* 38 (12), 1977-1980.
- Ferrer JF, Cabradilla C and Gupta P (1981)** Use of a feline cell line in the syncytia infectivity assay for the detection of bovine leukemia virus infection in cattle, *Am J Vet Res* 42 (1), 9-14.
- Ferrer JF, Kenyon SJ and Gupta P (1981a)** Milk of dairy cows frequently contains a leukemogenic virus, *Science* 213, 1014-1016.
- Feschner H, Kurg A, Blankenstein P, Mewes G, Geue L, Albrecht C and Ebner D (1996)** Direct use of cell lysates in PCR-based diagnosis of bovine leukemia virus infection, *Berl Münch Tierarztl Wschr* 109, 46-450.
- Fields BN, Knipe DM and Peter MH (1996)** Retroviridae: the viruses and their replication, In: *Fields Virology* (3th ed.) 2, 1767-1847.
- Flensburg JC (1987)** Control of enzootic bovine leukosis in Denmark. In: *Developments in veterinary virology 2, Enzootic Bovine Leukosis and Bovine Leukemia Virus* [edited by Burny A and Mammerickx M] Dordrecht, Netherlands, Martinus Nijhoff, 253-263.
- Forschner E, Bünger I, Krause HP and Küttler D (1989)** Brucellosis and leucosis control of field free dairy cattle herds using bulk milk samples in combination with ELISA, *Dtsch Tierarztl Wschr* 96 (10) 473-512.
- Garazi S, Hoida G, Trainin Z, Ungar-Waron H and Brenner J (2001)** De novo-infection of a large accredited BLV-free dairy herd, *Israel Veterinary Journal* 56 (4), 12-18.
- Gatei MH, Brandon RB, Naif HM, McLennan MW, Daniel RCW and Lavin MF (1989)** Changes in B cell and T cell subsets in bovine leukaemia virus-infected cattle, *Veterinary Immunology and Immunopathology* 23, 139-147.
- Gatei MH, Lavin MF and Daniel RCW (1990)** Serum immunoglobulin concentrations in cattle naturally infected with bovine leukemia virus, *J Vet Med B* 37, 575-580.
- Ghysdael J, Bruck C, Kettmann R and Burny A (1984)** Bovine leukemia virus, *Current Topics in Microbiology and Immunology* 112, 1-19.

- Gonda MA, Wong-Staal F, Gallo RC, Clements JE, Narayan O and Gilden RV (1985)** Sequence homology and morphologic similarity of HTLV-III and Visna Virus, a Pathogenic Lentivirus, *Science* 227, 173-177.
- Goranov KH, Pachev S and Minkov V (1986)** Cytochemical study of acid naphthyl acetate esterase in the lymphocytes of healthy and bovine leukemia virus-infected cows, *Vet Med Nauki*, 23 (9), 23-29.
- Götze R, Rosenberger G and Ziegenhagen G (1954)** Die leukose des rindes ihre hamatologische und klinische diagnose, *Vet Med*, 9, 517-526.
- Graves DC, McQuade M and Weibel K (1982)** Comparison of the enzyme-linked immunosorbent assay with an early polykaryocytosis inhibition assay and the agar-gel immunodiffusion test for the detection of antibodies to bovine leukemia virus, *Am J Vet Res* 43 (6), 960-966.
- Gupta P and Ferrer JF (1981)** Comparison of various serological and direct methods for the diagnosis of BLV infection in cattle, *Int J Cancer* 28, 179-184.
- Hafez SM, Sharif M, Al-Sukaryan A and DeLa-Cruz D (1990)** Preliminary studies on enzootic bovine leukosis in Saudi dairy farms, *Dtsch Tierarztl Wschr* 97 (2), 61-63.
- Hakioğlu F (1962)** Karacabey harası sığırlarında löykozis (lymphomatosis) bakımından yapılan hematolojik araştırmalara ait ilk tebliğ, *Vet Hek Dern Derg*, 107-115.
- Hakioğlu F (1968)** Uterus'ta lokalize olan kısırılık ve abortus'a sebebiyet veren Sığır Leucosis'i vak'aları, *Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Dergisi* 1 (2), 144-145.
- Hakioğlu F ve Ulutaş M (1968)** Karacabey harasında familiyer olarak devam eden bir Holstein inekte kalp ve abomasus leucosis'i vak'ası, *Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Dergisi* 1 (2), 126-136.
- Have P and Jorgensen RK (1991)** Demonstration of antibodies against bovine leukemia virus (BLV) by blocking ELISA using bovine polyclonal anti-BLV immunoglobulin, *Veterinary Microbiology* 27, 221-229.
- Heeney JL, Valli VE and Montesanti J (1988)** Alterations in humoral immune response to bovine leukaemia virus antigens in cattle with lymphoma, *J Gen Virol* 69, 659-666.
- Henricson B and Ringertz N (1968)** Comparative statistical studies on the geographical distribution of human and bovine leukemia in Sweden *Bibl Haemat*, 31, 331-332.
- Henriksen E and Jensen PB (1971)** Kvaegleukose human leukaemi og beslaegtede sygdomme, *Ugeskrift for Laeger*, 133, 1201-1205.

- Higgy KE, Burns GF and Hayhoe FGJ (1977)** Discrimination of B, T and null lymphocytes by esterase cytochemistry, *Scand J Haematol* 18, 437-448.
- Huber NL, DiGiacomo RF, Evermann JF and Studer E (1981)** Bovine leukemia virus infection in a large Holstein herd: Prospective comparison of production and reproductive performance in antibody-negative and antibody-positive cows, *Am J Vet Res* 42 (9) 1477-1481.
- Hugoson G, Vennström R and Henriksson K (1968)** The occurrence of bovine leukosis following the introduction of Babesiosis vaccination, *Bibl Haemat* 31, 157-161.
- Ishiguro N, Matsui T and Shinagawa M (1994)** Differentiation analysis of bovine T-lymphosarcoma, *Veterinary Immunology and Immunopathology* 41, 1-17.
- İyisan AS, Bitgel A ve Özyörük F (1996)** İstanbul ilindeki süt sığırlarında enzootik bovine leukosis'in seroepidemiolojisi, *Pendik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi* 2 (27), 223-245.
- Jacobs RM, Heeney JL, Godkin MA, Leslie KE, Taylor JA, Davies C and Valli V (1991)** Production and related variables in bovine leukaemia virus-infected cows, *Veterinary Research Communications* 15, 463-474.
- Jacobs RM, Pollari FL, McNab WB and Jefferson B (1995)** A serological survey of bovine syncytial virus in Ontario: Associations with bovine leukemia and immunodeficiency-like viruses, production records and management practices, *Can J Vet Res* 59, 271-278.
- Jacobsen KL, Kaneene JB, Miller JM and Bull RW (1985)** Comparison of the commercial agar-gel immunodiffusion test and radioimmunoprecipitation assay for detection of antibodies to bovine leukemia virus, *Am J Vet Res* 46 (7), 1430-1433.
- Johnson R and Kaneene JB (1992)** Bovine leukemia virus and enzootic bovine leukosis, *Veterinary Bulletin* 62 (4), 287-312.
- Jorgensen RH (1989)** An international comparison of different laboratory tests for the diagnosis of bovine leukosis: suggestions for international standardization, *Veterinary Immunology and Immunopathology* 22, 293-297.
- Junitti N, Klintevall K and Klingeborn B (1989)** An indirect ELISA for the diagnosis of bovine leukemia virus-infection in Swedish cattle, based on testing of serum and/or milk, 11th International symposium of the world association of veterinary microbiologists and specialists in infectious diseases Perugia-Italy, 116.
- Kaaden OR, Frenzel B, Dietzschhold B, Weiland F and Mussgay M (1977)** Isolation of a p15 polypeptide from bovine leukemia virus and detection of specific antibodies in leukemic cattle, *Virology*, 77, 501-509.

- Kaaden OR, Fischner W, Meerman A and Liebisch A (1982)** Transmission of BLV by *Ixodes ricinus* ticks. In: Fourth international symposium on bovine leukosis, Bologna 1980 (edited by Straub OC), TheHague, Netherlands, Martinus Nijhoff (Current topics veterinary medicine and animal science) 15, 348-358.
- Kabeya H, Ohashi K and Onuma M (2001)** Host immun responses in the course of bovine leukemia virus infection, *J Vet Med Sci* 63 (7), 703-708.
- Kaja RW, Olson C, Rowe RF, Stauffacher RH, Strozinski LL, Hardie AR and Bause I (1984)** Establishment of a bovine leukosis virus-free dairy herd, *JAVMA* 184 (2), 184-185.
- Kajikawa O, Koyama H, Yoshikawa T, Tsubaki S and Saito H (1983)** Use of alpha-naphthyl acetate esterase staining to identify T-lymphocytes in cattle, *Am J Vet Res* 44 (8), 1549-1552.
- Kandil M, Metin N ve Aksakal M (1989)** Güney ve Güney doğu Anadolu'da sığır lökozu: serolojik ve hematolojik araştırmalar, *Fırat Üniversitesi Dergisi (Sağlık Bilimleri)* 3 (1), 15-25.
- Kelly EJ, Jackson MK, Marsolais G, Morrey JD and Callan RJ (1993)** Early detection of bovine leukemia virus in cattle by use of the polymerase chain reaction, *Am J Vet Res* 54 (2), 205-209.
- Klintevall K, Naslund K, Svedlund G, Hajdu L, Linde N and Klingeborn B (1991)** Evaluation of an indirect ELISA for the detection of antibodies to bovine leukaemia virus in milk and serum, *Journal of Virological Methods* 33, 319-333.
- Klintevall K, Fuxler L and Fossum C (1997)** Bovine leukemia virus: Early reflections in blood after an experimental infection of calves, *Comp Immun Microbiol Infect Dis* 20 (2), 119-130.
- Knowles DM and Holck S (1978)** Tissue localization of T-lymphocytes by the histochemical demonstration of acid  $\alpha$ -naphthyl acetate esterase, *Laboratory Investigation* 39 (1), 70-76.
- Knowles DM, Hoffmann HT, Ferrarini M and Kunkel HG (1978)** The demonstration of acid  $\alpha$ -naphthyl acetate esterase activity in Human lymphocytes: usefulness as a T-cell marker, *Cellular Immunology* 35, 112-123.
- Knowles DM and Halper JP (1980)** Human medullary and cortical thymocytes are distinguishable according to the presence or absence of cytochemically demonstrable acid  $\alpha$ -naphthyl acetate esterase (ANAE) activity, *The Journal of Immunology* 125 (6), 2823-2825.

- Konuk T (1981)** Pratik Fizyoloji I, A Ü Vet Fak Yay 378 II. Baskı, 50.
- Koyama H, Hohdatsu T, Satake M, Kobayashi M, Ashizawa T, Sugimoto K, Yoshikawa H, Okada K, Yoshikawa T and Saito H (1992)** Properties of nine continuous B-cell lines established from enzootic bovine leukosis tumors, Zentralbl Veterinarmed B 39 (1), 32-38.
- Kuzmak J (1988)** Enzootic bovine leucosis. I. Correlation between EBL virus antibodies in serum and udder secretions, Med Vet, 44, 3, 145-148.
- Lassauzet MLG, Johnson WO, Thurmond MC and Stevens F (1989)** Protection of colostral antibodies against bovine leukemia virus infection in calves on a California dairy, Can J Vet Res 53, 424-430.
- Lassauzet MLG, Thurmond MC, Johnson WO, Stevens F and Picanso JP (1990)** Effect of brucellosis vaccination and dehorning on transmission of bovine leukemia virus in heifers on a California dairy, Can J Vet Res 54, 184-189.
- Lax T and Hofirek B (1969)** Haematological pitfalls in cattle leukosis, Comp. Leuk. Res., 36, 544-547.
- Levy D, Deshayes L, Guillemain B and Parodi AL (1977)** Bovine Leukemia virus specific antibodies among French cattle. I. Comparison of complement fixation and hematological tests, Int J Cancer 19, 822-827.
- Lewin HA, Wu MC, Nolan TJ and Stewart JA (1988)** Peripheral B-lymphocytes percentage as an indicator of subclinical progression of bovine leukemia virus infection, J Dairy Sci 71 (9), 2526-2534.
- Lorenz RJ and Straub OC (1987)** The epidemiology of enzootic bovine leukosis. In: Developments in veterinary virology 2, Enzootic Bovine Leukosis and Bovine Leukemia Virus [edited by Burny A and Mammerickx M] Dordrecht, Netherlands, Martinus Nijhoff, 51-70.
- Lucas MH, Roberts DH and Wibberley G (1985)** Ear tattooing as a method of spread of bovine leukosis virus infection, Br Vet J 141, 647-649.
- Lucas MH (1995)** Enzootic bovine leucosis. In. OIE manuel: Amandment.
- Lucas MH (2000)** Enzootic bovine leucosis. In. OIE manuel standarts for diagnostic test and vaccines (4th edition), 371-380.
- Maiti NK, Saini SS and Sharma SN (1990)** Histochemical studies on chicken peripheral blood lymphocytes, Veterinary Research Communications 14, 207-210.

- Mammerickx M, Portetelle D, Kettmann R, Ghysdael J, Burny A and Dekegel D (1976)** Diagnostic tests of bovine leukemia. Comparison between an hematological test and the serological diagnosis, *Europ J Cancer* 12, 433-439.
- Mammerickx M, Dekegel D, Burny A and Portetelle D (1978)** Eradication of enzootic bovine leukosis based on the detection of the disease by the Gp Immunodiffusion test, *Ann. Rech. Vet.*, 9, 885-894.
- Mammerickx M, Portetelle D, Bruck C and Burny A (1984)** Use of an ELISA involving monoclonal antibody for the detection of antibodies against bovine leukemia virus in a herd with a high incidence of enzootic bovine leukosis, *Zbl Vet Med B* 31, 210-218.
- Mammerickx M, Portetelle D and Burny A (1985)** Application of an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) involving monoclonal antibody for detection of BLV antibodies in individual or pooled bovine milk samples, *Zbl Vet Med B* 32, 526-533.
- Mammerickx M, Portetelle D and Burny A (1985a)** The diagnosis of enzootic bovine leukosis, *Comp Immun Microbiol Infect Dis* 8, 3/4, 305-309.
- Mammerickx M, Portetelle D, Nys J and Burny A (1985b)** Rapid detection of bovine leukaemia virus infection in a large cattle population with an ELISA performed on pooled sera grouped by herd, *Zbl Vet Med B* 32, 601-608.
- Mammerickx M (1987)** The immunodiffusion tests for the detection of bovine leukemia virus-infected animals. In: *Developments in veterinary virology 2, Enzootic Bovine Leukosis and Bovine Leukemia Virus* [edited by Burny A and Mammerickx M] Dordrecht, Netherlands, Martinus Nijhoff, 195-200.
- Mamoun RZ, Morison M, Rebeyratte N, Busetta B, Couez D, Kettmann R, Hospital M and Guillemain B (1990)** Sequence variability of bovine leukemia virus env gene and its relevance to the structure and antigenicity of the glycoproteins, *J. Virol.*, 64, 9, 4180-4188.
- Meirom R, Brenner J, Gluckman A, Avraham R and Trainin Z (1985)** Humoral and cellular responses in calves experimentally infected with bovine leukemia virus (BLV), *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 9, 105-114.
- Meirom R, Samina I and Brenner J (1999)** Changes in the cellular subpopulations of peripheral blood leukocytes during the reproductive cycle of dairy cows, *Israel Veterinary Journal*, 54, 4, 1-7.
- Miller JM, Schmerr JF and Van Der Maaten MJ (1981)** Comparison of four serologic tests for the detection of antibodies to bovine leukemia virus, *Am J Vet Res* 42 (1), 5-8.
- Miller JM and Maaten MJ (1982)** Bovine leukosis- its importance to the dairy industry in United States, *J Dairy Science* 65 (11), 2194-2203.

**Miller JM, Van Der MMJ and Schmerr MJF (1983)** vaccination of cattle with binary ethylenimine-treated bovine leukemia virus, *American Journal of Veterinary Research*, 44, 64-67.

**Miller J and Olson C (1987)** Discovery of bovine leukemia virus. In: *Developments in veterinary virology 2, Enzootic Bovine Leukosis and Bovine Leukemia Virus* [edited by Burny A and Mammerickx M] Dordrecht, Netherlands, Martinus Nijhoff, 87-95.

**Miller J and Schmerr MJF (1987)** Detection of bovine leukemia virus infection by immunodiffusion and radioimmunoassay. In: *Developments in veterinary virology 2, Enzootic Bovine Leukosis and Bovine Leukemia Virus* [edited by Burny A and Mammerickx M] Dordrecht, Netherlands, Martinus Nijhoff, 187-193.

**Monke DR (1986)** Noninfectivity of semen from bulls infected with bovine leukosis virus, *JAVMA* 188 (8), 832-826.

**Mueller J, Brun del Re, Buerki HU, Hess MW, Cottier H (1975)** Nonspecific esterase activity: a criterion of differentiation of T and B lymphocytes in mouse lymph nodes, *Eur J Immunol* 5, 270-274.

**Murphy FA, Gibbs EPJ, Horzinek MC, Studdert MJ (1999)** *Veterinary Virology* (2nd Ed). Academic Press, U.S.A, 382-383.

**Murtaugh MP, Lin GF, Haggard DL, Weber AF and Meiske JC (1991)** Detection of bovine leukemia virus in cattle by the polymerase chain reaction, *Journal of Virological Methods* 33, 73-85.

**Müller-Hermelink HK, Heusermann U and Stutte HJ (1974)** Enzyme histochemical observations on the localization and structure of the T cell and B cell regions in the Human spleen, *Cell Tiss Res* 154, 167-179.

**Nagy DW, Tyler JW, Stoker A and Kleiboeker SB (2002)** Association between the strength of serologic recognition of bovine leukosis virus and lymphocyte count in bovine leukosis virus-infected cows, *JAVMA* 220 (11), 1681-1684.

**Naif HM, Brandon RB, Daniel RCW and Lavin MF (1990)** Bovine leukaemia proviral DNA detection in cattle using the polymerase chain reaction, *Veterinary Microbiology* 25, 117-129.

**Naif HM, Daniel RCW, Cogle WG and Lavin MF (1992)** Early detection of bovine leukemia virus by using an enzyme-linked assay for polymerase chain reaction-amplified proviral DNA in experimentally infected cattle, *Journal of Clinical Microbiology* 30 (3), 675-679.

- Nakase Y and Kobayashi K (1984)** Cytochemical studies of leukocytes of some animal species III. esterase stain, *Bull Azabu Univ Vet Med* 5 (1), 1-10.
- Nakashi H, Koyama H, Kajikawa O and Saito H (1983)** Identification of bovine T and B lymphocytes in normal peripheral blood, lymph nodes and spleen, *Jpn J Vet Sci*, 45, 1, 97-107.
- Nguyen VK and Maes RF (1993)** Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection antibodies to bovine leukemia virus in serum and milk, *Journal of clinical microbiology* 31 (4), 979-981.
- Niskanen R, Alénius S, Larsson B and Junitti N (1989)** Evaluation of an ELISA for detection antibodies; to BVDV and BLV in milk, *J. Vet. Med. B.*, 36, 113-118.
- Ohishi K, Suzuki H, Yamamoto T, Maruyama T, Miki K, Ikawa Y, Numakunai S, Okada K, Ohshima K and Sugimoto M (1991)** Protective immunity against bovine leukaemia (BLV) induced in carrier sheep by inoculation with a vaccinia virus-BLV env recombinant: association with cell-mediated immunity, *Journal of General Virology* 72, 1887-1892.
- OIE Manual (2000)** Enzootic bovine leukosis, OIE, 2.3.4, 371-380.
- Olson C and Baumgartener LE (1975)** Lymphosarcoma (leukemia) of cattle, *Bovine practitioner*, 10, 15-22.
- Olson C and Miller J (1987)** History and terminology of enzootic bovine leukosis. In: *Developments in veterinary virology 2, Enzootic Bovine Leukosis and Bovine Leukemia Virus* [edited by Burny A and Mammerickx M] Dordrecht, Netherlands, Martinus Nijhoff, 3-15.
- Onuma M and Olson C (1977)** In: *Bovine leukosis: various methods of molecular virology* (Ed. Burny A.), CEE, Luxembourg, 95-118.
- Onuma M, Hodatsu T, Yamamoto S, Higashihara M, Masu S, Mikami T and Izawa H (1984)** Protection by vaccination against bovine leukemia virus infection in sheep, *Am J Vet Res* 45 (6), 1212-1215.
- Onuma M (1987)** Transforming activity of bovine leukemia virus and properties of tumor-associated antigen on bovine lymphosarcoma. In: *Developments in veterinary virology 2, Enzootic Bovine Leukosis and Bovine Leukemia Virus* [edited by Burny A and Mammerickx M] Dordrecht, Netherlands, Martinus Nijhoff, 145-151.
- Osbaldiston GW and Sullivan RJ (1978)** Cytochemical demonstration of esterases in peripheral blood leukocytes, *Am J Vet Res* 39 (4), 683-685.



- Pangalis GA, Kuhl W, Waldman SR and Beutler E (1978)** Acid hydrolases in normal B and T blood lymphocytes, *Acta Haemat.*, 59, 285-292.
- Parodi AL (1987)** Pathology of enzootic bovine leukosis. Comparison with the sporadic form. In: *Developments in veterinary virology 2, Enzootic Bovine Leukosis and Bovine Leukemia Virus* [edited by Burny A and Mammerickx M] Dordrecht, Netherlands, Martinus Nijhoff, 3-15.
- Paul PS, Senogles DR, Muscoplat CC and Johnson DW (1979)** Enumeration of T cells, B cells and monocytes in the peripheral blood of normal and lymphocytotic cattle, *Clin Exp Immunol*, 35, 300-306.
- Pelzer KD and Sprecher DJ (1993)** Controlling BLV infection on dairy operations, *Veterinary Medicine*, 88, 275-281.
- Perman V, Dirks A, Fangmann G, Synder MM, Sorensen DK, Anderson RK, Goltz DJ, Larson VL and Stevens JB (1970)** Statistical evaluation of lymphocyte values on Minnesota dairy cattle, *Am J Vet Res* 31 (7), 1217-1222.
- Perrin B, Perrin M, Fedida M and Berger B (1986)** Enzootic bovine leucosis: study of 11 herds and different diagnostic techniques, *Rev Med Vet* 137 (12), 839-845.
- Petropoulos CJ and Coffin JM (1997)** *Retroviruses (First Ed.)*, Cold spring harbor laboratory press, NY, U.S.A, 757.
- Pieskus J, Armalis A and Vaiciuniene V (1995)** Detection of bovine leukemia virus (BLV) and its proteins, *Immunobiology of viral infections, Proc 3rd Congress Europ Soc Vet Virol*, edited by Schwyzer M, Ackermann M, Bertoni G, Kocherhans R, McCullough K, Engels M, Wittek R and Zanoni R, 358-360.
- Pigarevskii PV and Zel'tser GL (1982)** Morphological method of differentiating T- and B-lymphocytes by detecting nonspecific alpha-naphthylacetate esterase, *Arkh Patol* 44 (6), 63-65.
- Pinkus GS, Hargreaves HK, McLeod JA, Nadler LM, Rosenthal DS and Said JW (1979)**  $\alpha$ -Naphthyl acetate esterase activity-A cytochemical marker for T-lymphocytes, *American Journal of Pathology* 97 (1), 17-39.
- Poli G, Balsari A, Toniolo A, Ponti W and Vacirca G (1981)** Microplate enzyme-linked immunosorbent assay for bovine leukemia virus antibody, *Journal of Clinical Microbiology* 13 (1), 46-48.
- Poon H, Jimenez E, Jacobs RM, Song Z and Jefferson B (1993)** Detection of bovine leukemia virus RNA in serum using the polymerase chain reaction, *Journal of Virological Methods* 41, 101-112.

**Portetelle D and Mammerickx M (1987)** ELISA, a highly sensitive and specific method for diagnosis of bovine leukemia virus infection. In: *Developments in veterinary virology 2, Enzootic Bovine Leukosis and Bovine Leukemia Virus* [edited by Burny A and Mammerickx M] Dordrecht, Netherlands, Martinus Nijhoff, 201-215.

**Portetelle D, Mammerickx M and Burny A (1989)** Use of two monoclonal antibodies in an ELISA test for the detection of antibodies to bovine leukaemia virus envelope protein gp51, *J. Virol. Methods*, 23, 211-222.

**Portetelle D, Burny A, Desmettre P, Mammerickx M, Paoletti E and Zavada J (1990)** Development of a specific serological test and an efficient subunit vaccine to control bovine leukemia virus infection, *Develop. Biol. Standard.*, 72, 81-90.

**Portetelle D, Limbach K, Burny A, Mammerickx M, Desmettre P, Riviere M, Zavada J and Paoletti E (1991)** Recombinant vaccinia virus expression of the bovine leukaemia virus envelope gene and protection of immunized sheep against infection, *Vaccine* 9, 194-200.

**Prevost P, Eloit M and Toma B (1988)** Despitage de la leucose bovine enzootique par le test elisa applique au lactosermum concentre de tank, *Journal of Biological Standardization* 16, 91-97.

**Priester WA, Oleinick A and Conner GH (1970)** Bovine leukosis and human cancer, *Lancet*, 1, 367-368.

**Pruthi AK, Gupta RKP and Sadana JR (1987)** Acid alpha naphthyl acetate esterase activity in peripheral blood lymphocytes and monocytes of chickens, *J Vet Med A* 34, 390-392.

**Raich PC, Takashima I and Olson C (1983)** Cytochemical reactions in bovine and ovine lymphosarcoma, *Vet Pathol* 20, 322-329.

**Rademacher R, Sodomkova D and Vanasek J (1977)** Nonspecific esterase and naphthol-AS-D-chloroacetate esterase in monocytoïd and myeloid cells of healthy cattle and cattle suffering from leukosis, *Vet Med (Praha)*, 22, 4, 207-215.

**Ramos JA, Ramis AJ, Marco A, Domingo M, Rabanal R and Ferrer L (1992)** Histochemical and immunohistochemical study of the mucosal lymphoid system in swine, *Am J Vet Res* 53 (8), 1418-1426.

**Rappaport H (1966)** Tumors of the hematopoietic system, atlas of tumor pathology. Armed Forces Inst. Pathol., Washington D.C., 3, 8.

**Reddy MV and Rajan A (1983)** Acid alpha naphthyl acetate esterase positive lymphocytes in cattle with carcinoma of the mucosa of the ethymoid, *Res Vet Sci* 34 (2), 138-140.

- Ressang AA, Gielkens ALJ, Quak S, Mastenbroek N, Tuppert C and De castro A (1978)** Studies on bovine leukosis. IV. Enzyme linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to bovine leukosis virus, *Ann. Rech. Vet.*, 9, 663-666.
- Ressang AA, Mastenbroek N and Quak J (1980)** Transmission and immun response in bovine enzootic leukosis, *Trjdschr Diergeneeskd* 105 (16), 657-660.
- Roberts AW and Carter GR (1981)** *Essentials of veterinary virology* (Ed.), Michigan State University Press, U.S.A, 69-70.
- Roberts DH, Lucas MH and Swallow C (1989)** Comparison of the agar-gel immunodiffusion test and ELISA in the detection of bovine leukosis virus antibody in cattle persistently infected with bovine virus diarrhoea virus, *Veterinary Immunology and Immunopathology* 22, 275-281.
- Rodak L, Granatova M, Vesely T and Nevorankova Z (1997)** Monoclonal antibody for the demonstration by ELISA of antibodies to protein p24 of enzootic bovine leukosis virus in individual and pooled blood serum and milk samples, *J Vet Med B* 44, 425-436.
- Roefeldt S (1999)** Stop BLV, *Animal Health*, 17-18.
- Romero CH, Abaracon D, Rowe CA and Silva AG (1984)** Bovine leukosis virus infectivity in *Boophilus microplus* ticks, *The Veterinary Record* 115, 440-441.
- Rovnak J (1999)** The role of bovine leukemia virus in the establishment of enzootic bovine leukosis, Doctorat Thesis, Cornell University, UMI information services, Michigan, U.S.A, 1-129.
- Rubino MJ and Donham KJ (1984)** Inactivation of bovine leukemia virus-infected lymphocytes in milk, *Am J Vet Res* 45 (8), 1553-1556.
- Sagata N, Yasunaga T, Tsuzuku-Kawamura J, Ohishi K, Ogawa Y and Ikawa Y (1985)** Complete nucleotide sequence of the genome of bovine leukemia virus: its evolutionary relationship to other retroviruses, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 82, 3, 677-681.
- Sarkar NH and Moore DH (1973)** Viral transmission in breast cancer. In: Griem ML, Jensen EV, Ultmann JE, Wissler RW (1973) *Breast cancer: a challenging problem* (ed), N.Y., Medical book press, 15-27.
- Sergeant JM, Kelton DF, Martin SW and Mann ED (1997)** Evaluation of a bulk-milk ELISA test for the classification of herd-level bovine leukemia virus status, *Preventive Veterinary Medicine* 31, 223-230.
- Schalm OW, Jain NC and Carroll EJ (1975)** *The leukemia complex*, Veterinary Hematology 3rd edition, Lea&Febiger Press, Philadelphia, 539-550.

**Scholm J, Michalides R, Colcher D, Feldman S and Spiegelman S (1975)** Evidence for an RNA tumor virus in human milk, *Comp. Leuk. Res.*, 40, 471-482.

**Schmidt FW (1987)** Eradication of enzootic bovine leukosis in Lower Saxony. In: *Developments in veterinary virology 2, Enzootic Bovine Leukosis and Bovine Leukemia Virus* [edited by Burny A and Mammerickx M] Dordrecht, Netherlands, Martinus Nijhoff, 265-271.

**Schoepf KC, Kapaga AM, Msami HM and Hyera JMK (1997)** Serological evidence of the occurrence of enzootic bovine leukosis (EBL) virus infection in cattle in Tanzania, *Trop Anim Hlth Prod* 29, 15-19.

**Schwartz I, Bensaid A, Polack B, Perrin B, Berthelemy M and Levy D (1994)** In vivo leukocyte tropism of bovine leukemia virus in sheep and cattle, *Journal of Virology* 68 (7), 4589-4596.

**Scott CS, Den Ottolander GJ, Swirsky D, Pangalis GA, Vives Corrons JL, De Pasquale A, Van Hove L, Bennett JM, Namba K, Flandrin G (1993)** Recommended procedures for the classification of acute leukemias. International council for standardization in Haematology (ICSH), *Leuk Lymphoma* 11 (1-2), 37-50.

**Shettigara PT, Samagh BS and Lobinowich EM (1986)** Eradication of bovine leukemia virus infection in commercial dairy herds using the agar gel immunodiffusion test, *Can J Vet Res* 50, 221-226.

**Sparling AM (2000)** An unusual presentation of enzootic bovine leukosis, *Can Vet J* 41 (4), 315-316.

**Stott ML, Thurmond MC, Dunn SJ, Osburn BI and Stott JL (1991)** Integrated bovine leukosis proviral DNA in T helper and T cytotoxic/suppressor lymphocytes, *Journal of General Virology* 72, 307-315.

**Straub OC (1987)** Detection of bovine leukemia virus infection by non-specific methods: Haematology and tumor screening. In: *Developments in veterinary virology 2, Enzootic Bovine Leukosis and Bovine Leukemia Virus* [edited by Burny A and Mammerickx M] Dordrecht, Netherlands, Martinus Nijhoff, 176-186.

**Straub OC (1987a)** Natural and experimental transmission of bovine leukemia virus. In: *Developments in veterinary virology 2, Enzootic Bovine Leukosis and Bovine Leukemia Virus* [edited by Burny A and Mammerickx M] Dordrecht, Netherlands, Martinus Nijhoff, 229-249.

**Sur E (2001)** Yumurtaya verilen aflatoksin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>)'in tavukların lenfoid organlarının embriyonal gelişimi üzerindeki etkilerinin enzim histokimyasal yöntemlerle araştırılması, S. Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, Konya, 26-32.

**Şen A, Ülgen M, Çarlı KT ve Batmaz H (1995)** Seroprevalance of bovine leukamia virus infection in cattle slaughtered at Bursa abattoir, Tr J of Veterinary and Animal Sciences 19, 325-327.

**Takashima I, Olson C, Driscoll DM and Baumgartener LE (1977)** B-lymphocytes and T-lymphocytes in three types of bovine lymphosarcoma, J Natl Cancer Inst 59 (4), 1205-1209.

**Taylor BC, Stott JL, Thurmond MA and Picanso JP (1992)** Alteration in lymphocyte subpopulations in bovine leukosis virus-infected cattle, Veterinary Immunology and Immunopathology 31, 35-47.

**Tekes L (1994)** Influence of management technology and parturition on antibody levels in cows with bovine leucosis, Acta Veterinaria Hungarica, 42, 1, 57-76.

**Thurmond MC, Maden CB and Carter RL (1985)** Cull rates of dairy cattle with antibodies to bovine leukemia virus, Cancer Research 45, 1987-1989.

**Thurmond MC (1987)** Economics of enzootic bovine leukosis. In: Developments in veterinary virology 2, Enzootic Bovine Leukosis and Bovine Leukemia Virus [edited by Burny A and Mammerickx M] Dordrecht, Netherlands, Martinus Nijhoff, 71-83.

**Thurmond MC, Carter RL, Picanso JP and Stralka K (1990)** Upper-normal predediction limits of lymphocyte counts for cattle not infected with bovine leukemia virus, Am J Vet Res 51 (3), 466-470.

**Toma B, Vuillaume A, Manet G, Duret C, Eloit M, Crespeau F, Chappius G and Parodi AL (1984)** Depistage de la leucose bovine enzootique par application du test ELISA sur le lait, Recueil de Medecine Veterinaire 160 (1), 53-60.

**Trono KG, Perez-Filgueira DM, Duffy S, Borca MV and Carrillo C (2001)** Seroprevalance of bovine leukemia virus in dairy cattle in Argentina: comparison of sensitivity and specificity of different detection methods, Veterinary Microbiology 83, 235-248.

**Ungar-Waron H and Trainin Z (1987)** Immunological aspects of enzootic bovine leukosis. In: Developments in veterinary virology 2, Enzootic Bovine Leukosis and Bovine Leukemia Virus [edited by Burny A and Mammerickx M] Dordrecht, Netherlands, Martinus Nijhoff, 163-171.

- Van Der Maaten MJ and Miller JM (1976)** Serological evidence of Transmission of bovine leukemia virus to chimpanzees, *Vet. Mic.*, 1, 351-357.
- Van Der Maaten MJ and Miller JM (1977)** Recent advances in bovine Leukemia Research. In: *Bestville symposia in agricultural research*, edited by J. A. Romberger. Allanheld, Osmun and Co., Montclair, N.J. and Universe Books, New York, 189-200.
- Van Der Maaten MJ and Miller JM (1990)** Bovine leukosis virus. In. *Virus infections of ruminants 3th Ed.*, Elsevier Science Publishers, N.Y., U.S.A., 419-429.
- Walrand F, Fumoux F, Roelants G, Parodi AL and Levy D (1986)** Incidence of bovine leukemia virus-specific antibodies in West African cattle, *Int J Cancer* 37, 619-621.
- Wawrzkiwicz J, Dziedzic B and Koziol T (1988)** Sensitivity and specificity of a modified agar gel precipitation test and its application to the diagnosis of enzootic bovine leukosis, *Acta Virol* 32, 143-150.
- Weber AF, Moon RD, Sorensen DK, Bates DW, Meiske JC, Brown CA, Rohland NL, Hooker EC and Strand BA (1988)** Evaluation of the stable fly (*Stomoxys calcitrans*) as a vector of enzootic bovine leukosis, *Am J Vet Res* 49 (9), 1543-1549.
- Weinhold E and Straub OC (1968)** Transmission of bovine leukosis by serum, blood, bone-marrow and leukocytes, *Bibl Haemat* 31, 149-153.
- Wentink GH, Van Oirschot JT, Pelgrim W, Wensing Th and Gruys E (1993)** Experimental transmission of bovine leukosis virus by rectal palpation, *Veterinary Record* 132, 135-136.
- Williams DL, Amborski GF and Davis WC (1988)** Enumeration of T and B lymphocytes in bovine leukemia virus-infected cattle using monoclonal antibodies, *Am J Vet Res* 49 (7), 1098-1103.
- Winqvist G, Beran M and Hugoson G (1969)** Bone marrow lymphocytes in bovine leukosis and in apparently healthy cattle with normal or increased blood lymphocyte values, *Comparative Leukemia Research*, 36, 518-526.
- Wu D, Takashi K, Liu N, Koguchi A, Makara M, Sasaki J, Goryo M and Okada K (1999)** Distribution of T-lymphocytes subpopulation in blood and spleen of normal cattle and cattle with EBL, *Journal of Comparative Pathology* 120 (2), 117-127.
- Xie B, Oyamada T, Yoshikawa H, Oyamada T and Yoshikawa T (1997)** Detection of proviral DNA of bovine leukemia virus in cattle by a combination of in-situ hybridization and the polymerase chain reaction, *J Comp Path* 116, 87-96.

**Yamamoto S, Onuma M, Kodama H, Mikami T and Izawa H (1984)** Suppression of natural cytotoxic activity of lymphocytes from cattle and sheep during the progress of bovine leukosis, *Veterinary Microbiology* 9, 105-111.

**Yang TJ, Jantzen PA and Williams LF (1979)** Acid alpha-naphthyl acetate esterase: presence of activity in bovine and human T and B lymphocytes, *Immunology* 38 (1), 85-93.

**Yang K, Bearman RM, Pangalis GA, Zelman RJ and Rappaport H (1982)** Acid phosphatase and alpha-naphthyl acetate esterase in neoplastic and non-neoplastic lymphocytes, *American Society of Clinical Pathologists* 78 (2), 141-149.

**Yavru S, Kale M, Şimşek A, Bulut O ve Öztürk F (2002)** Konya bölgesi kültür ırkı süt ineklerinde enzootik bovine leukemia virus (EBLV) enfeksiyonunun agar jel immunodiffüzyon (AGID) ve enzim linked immunosorbent assay (ELISA) testleriyle serolojik olarak araştırılması, V. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi (Uluslararası katılımlı), Konya, 110-111.

**Yeon Choi K, Liu RB and Buehring GC (2002)** Relative sensitivity and specificity of agar gel immunodiffusion, enzyme immunosorbent assay and immunoblotting for detection of anti-bovine leukemia virus antibodies in cattle, *Journal of Virological Methods* 104 (1), 33-39.

**Yılmaz B (2000)** Fizyoloji, Feryal Matbaacılık-Ankara, 115.

## 9. ÖZGEÇMİŞ

01.04.1973 yılında İzmir'de doğdum. İlkokul, Ortaokul ve Lise eğitimimi İzmir'de tamamladım. 1990 yılında S.Ü. Veteriner Fakültesi'ni kazandım ve 1996 yılında mezun oldum. 1994-1995 yılları arasında Konya Devlet İstatistik Enstitüsü Bölge Müdürlüğünde memur olarak çalıştım. 1996 yılında S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün açmış olduğu doktora sınavını kazanarak S.Ü. Veteriner Fakültesi Viroloji Bilim Dalı'nda Doktora eğitimine başladım. 1999 yılında Akd.Ünv. Veteriner Fakültesi'nin açtığı sınavı kazanarak Viroloji Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak göreve başladım. Halen S.Ü. Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak görev yapmaktayım. Evliyim.



**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU  
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**



## 10.TEŞEKKÜR

Bu konuyu doktora tezi olarak seçmemde bana yardımcı olan ve çalışmalarım süresince yardımlarını esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Feridun ÖZTÜRK'e, laboratuvar çalışmalarım da yardımcı olan sayın hocalarım Prof. Dr. Sibel YAVRU'ya, Doç. Dr. Atilla ŞİMŞEK'e ve Arş.Gör. Oya BULUT'a, Histoloji laboratuvarı'ndaki çalışmalarım da ve değerlendirmelerim de bana yardımcı olan sayın hocam Prof. Dr. İlhami Çelik'e, Arş.Gör.Dr.Emrah SUR'a ve Arş.Gör. Yasemin ÖZNURLU'ya, örneklemelerim de ve histolojik çalışmalarım da bana yardımcı olan Arş.Gör. Oya BULUT'a, Tarım Bakanlığı Burdur İl Kontrol Laboratuvarı Mikrobiyoloji bölümü görevlilerinden Vet. Hek. A.Selcen KALE (AKCAN)'ye, arkadaşım İsmail UYANIK'a ve Arş. Gör. Dr. Orhan YAPKIÇ'a çok teşekkür ederim.