

40870

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KLİNİK OLARAK SAĞLIKLI SIĞIR SÜRÜLERİNDE
PERSİSTE BOVİNE VİRAL DİARRHEA VİRUS ENFEKSİYONLARININ
ARAŞTIRILMASI VE EPİZOOTİYOLOJİK ÖNEMİ**

DOKTORA TEZİ

Veteriner Hekim
Atilla ŞİMŞEK

MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
VİROLOJİ BİLİM DALI

Danışman
Prof. Dr. Feridun ÖZTÜRK

KONYA-1994

İÇİNDEKİLER

Tablo Listesi

Resim Listesi

Simge ve Kısaltmalar

	Sayfa
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR BİLGİSİ	2
2.1. Etiyoloji	5
2.2. Epizootiyoloji	8
2.2.1. Persiste Enfekte Sığırlar	9
2.2.2. Geçici Viremik Sığırlar	12
2.2.3. Enfekte Boğa ve Sperma	12
2.2.4. Embriyo Transferi	14
2.2.5. Çeşitli Enfekte Malzemeler	15
2.2.6. Hayvan Türleri Arasında Bulaşma	16
2.2.7. Canlı BVDV Aşılarda	17
2.2.8. BVDV İle Kontamine Aşılarda	17
2.2.9. Çeşitli Sinek Türleri	18
2.3. Patoloji, Patogenez ve Klinik	19
2.3.1. Postnatal Enfeksiyonlar	19
2.3.1.1. Subklinik Enfeksiyon	19
2.3.1.2. Akut Enfeksiyon	19
2.3.1.3. İmmüno-supresyon	20
2.3.1.4. Neonatal Buzağalarda BVDV Enfeksiyonu	21
2.3.1.5. Üreme Bozuklukları	21

2.3.2. Transplental Enfeksiyonlar	22
2.3.2.1. Erken Embriyo Ölümleri, Abort ve Mumifikasyon	23
2.3.2.2. Konjenital Defektler	24
2.3.2.3. Normalden Küçük ve Zayıf Buzağlar	25
2.3.2.4. Seronegatif Doğan Normal Görünümlü Buzağlar	26
2.3.3. Persiste Enfeksiyon ve Mucosal Disease	26
2.3.3.1. BVDV'na Karşı İmmüntolerans ve Persiste Enfeksiyon	26
2.3.3.2. Mucosal Disease (MD)	28
2.4. Teşhis	31
2.5. İmmunoloji	34
2.6. Koruma ve Kontrol	36
3. MATERYAL VE METOT	39
3.1. Virus	39
3.2. Hücre Kültürü	39
3.3. Dana Serumu	39
3.4. Konjugat	39
3.5. Araştırmada Kullanılan Hayvanlar	39
3.6. Virus İzolasyon Materyalleri	41
3.7. Araştırmada Kullanılan Serum Numuneleri	41
3.8. Hücre Kültürünün Hazırlanması	41
3.9. Virusun Üretilmesi	42
3.10. Virusun Mikrotitrasyon Yöntemi İle Enfeksiyözite Gücünün Saptanması	43
3.11. Lökositlerden Virus İzolasyonu	44
3.12. Konjugat Titresinin Hesaplanması	45
3.13. Direkt İmmunofloresan Testi	45

3.14. İzolatların FDB Hücre Kültürlerindeki Sitopatojenik Özelliklerinin Saptanması	46
3.15. Serolojik Testler	46
3.15.1. Mikronötralizasyon Testi	46
3.15.2. Pozitif Serumların Serum Nötralizasyon (SN₅₀) Değerlerinin Saptanması	47
4. BULGULAR	48
4.1. Virusun Üretilmesi	48
4.2. Virusun Titresi	48
4.3. Konjugat Titresi	48
4.4. Direkt İmmunofloresan Testi Sonuçları	48
4.5. İzolatların Sitopatojenik Özellikleri	48
4.6. Serum Nötralizasyon Testi Sonuçları	49
4.6.1. Mikronötralizasyon Testi İle Pozitif Serumların Saptanması	49
4.6.2. Pozitif Serumların Serum Nötralizasyon (SN₅₀) Değerleri	49
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	55
6. ÖZET	61
7. SUMMARY	62
8. LİTERATÜR LİSTESİ	63
9. ÖZGEÇMİŞ	79
10. TEŞEKKÜR	80

TABLO LİSTESİ

Tablo no		Sayfa
1.	Çeşitli ülkelerde yapılan çalışmalarda persiste BVDV enfeksiyonu yönünden araştırılan hayvanların test sonuçları ve yüzdeleri	11
2.	Araştırmada kullanılan hayvanlar	40
3.	IFT ile BVDV antijeni yönünden kontrol edilen sığır adedi ve PI yüzdeleri	53
4.	Mikronötralizasyon testi ile BVDV'una karşı kontrol edilen sığır kan serumlarının ilk örneklemedeki toplu sonuçları ve yüzdeleri	53
5.	İlk örneklemede BVDV'una karşı seropozitif olan serumların SN ₅₀ değerleri	54

RESİM LİSTESİ

Resim no.	Sayfa
1. FDB hücre kültürü kontrol (x200)	50
2. NADL suşunun FDB hücre kültüründe 72. saatte meydana getirdiği CPE'nin görünümü (x200)	50
3. FDB hücre kültürü kontrol (İmmunofloresan mikroskopta) (x250)	51
4. III'üncü sürüde tespit edilen 56 nolu akut enfekte hayvana ait lökosit numunesi inokule edilmiş FDB hücre kültüründe immünofloresan (x250)	51
5. IV'üncü sürüde tespit edilen 99 nolu akut enfekte hayvana ait lökosit numunesi inokule edilmiş FDB hücre kültüründe immünofloresan (x250)	52

SİMGE VE KISALTMALAR

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
BDV	Border Disease Virus
BVD	Bovine Viral Diarrhea
BVDV	Bovine Viral Diarrhea Virus
CCSC	Cell Culture Staining Chamber
CO ₂	Karbondioksit
cp	Cytopathogen - sitopatojen
CPE	Cytopathologic Effect
DKID ₅₀	Doku kültürü enfektif doz % 50
DMSO	Dimethylsulphoxide
EBK	Et ve Balık Kurumu
EDTA	Ethylendiamine tetraaceticacide
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EMEM	Eagle's Minimum Essential Medium
FDB	Fötal Dana Böbrek
FDS	Fötal Dana Serumu
gp	Glikoprotein
HCV	Hog Cholera Virus
HLA	Hank's Laktalbumin
IBRV	Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus
IF	İmmunofloresan
IFT	İmmunofloresan Testi
IgG	İmmunoglobulin G
IUGN	İntrauterin Gelişme Noksanlığı

kb	Kilobase
kD	Kilodalton
LiCl	Lityum klorür
Log	Logaritma
M	Molar
MD	Mucosal Disease
MDBK	Madin Darby Bovine Kidney - Devamlı sığır böbrek hücre kültürü
MEM	Minimum Essential Medium
NADL	National Animal Disease Laboratory
nep	non cytopathogenic - sitopatojen olmayan
nm	Nanometre
p	Protein
PBS	Phosphat Buffer Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PHA	Phytohemaglutinin
PI	Persiste enfekte
PI-3	Parainfluenza 3
PK-15	Pig Kidney 15 - Devamlı domuz böbrek hücre kültürü
PLA	Peroxidase Linked Antibody Assay
RNA	Ribonükleik asit
RNase A	Ribonükleaz A
SN	Serum Nötralizasyon
SNT	Serum Nötralizasyon Testi
SN ₅₀	Serum nötralizasyon değeri % 50
Vero	Afrika yeşil maymun böbrek hücre kültürü

1. GİRİŞ

Gebe ineklerin Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) ile enfekte olmalarından sonra meydana gelebilecek sonuç; ineğin immun durumu, fötüsün yaşı, enfekte eden virusun biyotipine bağlı olarak değişiklik göstermektedir (7,18,24,82,107,137). Seronegatif gebe ineklerin, gebeliğin bütün dönemleri boyunca BVDV'una maruz kalmaları sonucu transplasental enfeksiyona duyarlı olan fötusun enfeksiyonu; erken embriyonik ölüm ve föetal rezorbsiyon, mumifikasyon ve föetal ölüm, abort ve föetal malformasyonlar, klinik olarak normal görünüme sahip fakat bazen zayıf yapılı persiste enfekte buzağı doğumları ve fötusta immun bağışıklığın gelişmesini takiben meydana gelen enfeksiyona bağlı spesifik antikor taşıyan normal görünümlü buzağı doğumları ile sonuçlanabilmektedir (4,27,38,39,108).

Türkiye'deki sığırlarda meydana gelen persiste BVDV enfeksiyonlarının araştırılması ile ilgili Alkan (3), Gelfert (50) ve Özkul (112) yaptıkları araştırmalarda çok az sayıda hayvanın persiste enfeksiyona sahip olabileceğini bildirmişlerdir. Fakat araştırmacıların (3,50,112) persiste enfeksiyondan şüphelendikleri hayvanlardan ikinci örnekleme yapamamaları, hayvanların persiste enfekte olup olmadıklarının kesin olarak kanıtlanamamasına neden olmuştur.

Bu araştırmada, hayatları boyunca BVDV'unu taşıyan ve etrafa saçan, buldukları sürü içinde devamlı bir enfeksiyon kaynağı olarak görev yapan, hatta çiftleşme yaşına ulaşabilen ve enfeksiyonu yavrularına taşıyabilen ayrıca Mucosal Disease (MD)'e maruz kalma oranı çok yüksek olan persiste enfekte hayvanların prevalansının, virus izolasyonu ve serolojik testlerin desteğiyle sürü içindeki rollerinin ortaya konulması amaçlanmıştır.

2. LİTERATÜR BİLGİSİ

Bovine Viral Diarrhea (BVD) enfeksiyonu ilk olarak 1946 yılında Amerika Birleşik Devletleri (ABD) 'nin New York eyaletinde Olafson ve ark. (108) tarafından sığırlarda görülmüş; canlı ağırlıkta ve süt veriminde azalma, % 4-8 oranında ölüm, lökopeni, yüksek ateş, salivasyon, burun akıntısı, diyare, depresyon ve bazı gebe ineklerde abortlarla karakterize bir hastalık olarak tanımlanmıştır. Aynı araştırmacılar (108) tarafından hastalıklı hayvanların kan ve dalaklarından hazırlanmış süspansiyonların, hassas hayvanlara derialtı olarak verilmesi sonucu hastalık semptomlarının şekillenmesi nedeniyle enfeksiyon ilk kez "New Transmissible Disease" adı ile anılmış daha sonra etkenin virus olduğunun tespit edilmesiyle "Virus Diarrhea" adını almıştır (109). Hastalığın ilk defa tanımlandığı araştırmada (108), yaklaşık 1941'den itibaren Amerika'da bilinen ve 1946 yılında Childs (28) tarafından da Kanada'da bildirilen "X-Disease" hastalığının çeşitli semptomlarının bu yeni enfeksiyondan farklı olduğu ileri sürülmüş, fakat daha sonraki araştırmacılar (61,90) her iki hastalığın aynı olduğunu belirtmişlerdir. 1953'de Ramsey ve Chivers (122), yine ABD 'nde sonradan BVDV ile yakın antijenik ilişkiye sahip olduğu tespit edilen (52) birçok yönden "Virus Diarrhea" ye benzeyen ancak mukozal lezyonların daha şiddetli olarak gözlenmesi nedeniyle "Mucosal Disease" adı verilen bir enfeksiyonu tanımlamışlardır. Günümüzde Mucosal Disease (MD) 'in sadece fetal hayatın erken döneminde virusun sitopatojenik olmayan (ncp) suşu ile konjenital enfeksiyon sonucu doğan persiste viremik hayvanlarda meydana geldiğini ileri süren patolojik mekanizmayı destekler mahiyette önemli deliller mevcuttur (7,13,61).

Underdahl (137) 1957 yılında yapmış olduğu bir araştırmada, MD'li iki hayvana ait lenf yumrusu ve doku materyallerinden, sığır böbrek hücre kültürü için

sitopatojenik (cp) olan etkeni izole etmiştir. Ancak Malmquist (90) hastalığa sebep olan bu etkenin cp bir virus olarak tanımlanması, Gillespie ve ark. tarafından 1960 yılında Oregon'da BVD'den ölen bir buzağının dalağında gerçekleştirildiğini ve bu suşun (C24V) dünyadaki bir çok laboratuvarında prototip virus olarak kullanıldığını bildirmiştir.

Gillespie ve ark. (51) tarafından viral antijen yönünden incelenen, 1963-1964 yılları arasında abort olmuş, 54 sığır fütusuna ait çeşitli dokuların hiçbirisinin fetal dana böbrek hücre kültüründe cp etki meydana getiren bir etken içermediği saptanırken hücrel rezistans tekniği kullanılarak bir fütusun akciğer ve barsağından Fox suşu ve diğer bir fütusun ise karaciğer ve dalağından Studdert suşu adı verilen iki ncp BVDV'nun izole edildiği bildirilmiştir.

Fernelius (43) tarafından 1964 yılında ilk defa immunofloresan tekniği kullanılarak ncp BVDV'nun tespiti ve titrasyonu gerçekleştirilmiştir. Yine Fernelius ve Lambert (45) tarafından 1969'da yapılan bir araştırmada BVDV'nun NADL (National Animal Disease Laboratory) suşu ile deneysel enfekte edildikten sonra teste tabi tutulan 11 buzağıya ait çeşitli dokularda immunofloresan yöntemiyle antijen tespit edilmiş, fetal dana böbrek hücre kültürüne yapılan inokulasyonlarda bu buzağuların sadece ölmüş olan beş tanesine ait dokularda enfeksiyöz virus saptanmıştır.

Coria ve McClurkin (31) tarafından 1978 yılında, klinik olarak sağlıklı bir boğada persiste enfeksiyon ile beraber immuntoleransın tespit edildiği BVD formu bildirilmiştir. Bu araştırmada (31), hayvanın BVDV'una karşı antikor taşımadığı halde lacrima-nazal sekresyon, seminal sıvı ve sperma ile virüsü saçtığı aynı zamanda lökositlerden de virüsün izole edildiği bildirilmiştir.

Mucosal Disease Türkiye'de 1964 yılında ilk defa Öncül ve ark. (111) tarafından hayvanlarda gözlenen klinik belirtilere dayanılarak tanımlanmıştır.

1971'de Erhan ve ark. (41) tarafından iki farklı işletmede bulunan sığırlar üzerinde yapılan serolojik çalışmada BVDV'una karşı ayrı ayrı % 40 ve % 70 oranında seropozitiflik saptanması ile Türkiye'de enfeksiyonun gerçek manada varlığı ortaya konmuştur. Finci (46) toplam 2360 adet sığır kan serumunda % 9.6 oranında BVDV antikoru tespit etmiş, iki kan numunesi ve bir oviduct içeriğinden Türkiye'de ilk kez BVDV'unun izolasyonunu bildirmiştir.

Alkan (3)'ün gerçekleştirdiği araştırmada, biri abort yapmış, diğeri konjenital anomalili buzağı doğurmuş iki inekte ncp BVDV antijeninin tespit edilmiş olması ve hayvanların antikor yönünden seronegatif olmaları, bu iki hayvanda persiste enfeksiyonun varlığı konusunda şüphelenilmesine neden olmuştur.

Gelfert (50) tarafından Türkiye'de 1986-1989 yılları arasında güney ve güneydoğu Anadolu'daki illere ait 20 farklı işletmeden toplanan sığır kan serumlarının ortalama % 60'ında BVDV'una karşı nötralizan antikorlar tespit edilirken, bu oranın sürülere göre % 18-100 arasında değişiklik gösterdiği bildirilmiş ve sun'i tohumlamada kullanılan bu işletmelere ait 12 boğanın 4'ü BVDV antikoru yönünden pozitif olarak saptanmıştır. Aynı araştırmacı (50) tarafından güneydoğu Anadolu'daki bir işletmeye ait bir adet sığırın incelenen serum örneğinden virus izole edilmiş fakat bu sığırdan ikinci kez örnek alınmaması sebebiyle persiste enfeksiyona sahip olup olmadığı kanıtlanamamıştır.

Özkul (112) tarafından 1992 yılında yapılan bir araştırmada, 50 adet gebe inek ve bunlara ait immunolojik olarak gelişimini tamamlamış 16 adet fõtusa ait kan serumu örnekleri, serum nötralizasyon (SN) testi ile BVDV'una karşı spesifik antikorlar yönünden test edilmiştir. Test edilen gebe ineklerin % 80'inde sözkonusu antikorlar saptanırken fõtâl serum örneklerinin hiçbirisinde spesifik antikorların tespit edilmediği bildirilmiştir. Aynı araştırmacı (112), 50 adet gebe ineğe ve bunların

fötuslarına ait toplam 353 adet kan ve farklı organ numunelerini BVDV antijeni yönünden incelemiştir. Bu inceleme sonunda seronegatif bir anneye ait lökosit ve bu annenin fötüsüne ait kan ve organ numunelerinde BVDV antijeni saptanmış, bu annenin hemen kesilmesi sebebiyle ikinci kez örnekleme yapılamamıştır. Özkul (112), çeşitli araştırmacıların (27,76,138) bildirdiği sonuçlar ışığında bu hayvanın persiste bir enfeksiyona sahip olabileceği kanısına varmış ve araştırmada kullanılan inekler arasındaki persiste enfeksiyon oranını % 2 olarak bildirmiştir.

BVDV'unun sebep olduğu sendromlar her ne kadar değişmese de çok çeşitli klinik formların şekillenmesi, virusun immün sistemin fonksiyonunu baskılama yeteneği ve kompleks yapıya sahip epidemiyolojisi hakkındaki bilgiler zamanla artmıştır. Son araştırmalar (15,21,22,101), BVDV ile persiste enfekte ve immuntolerant doğan sığırlar ile bu hayvanların MD'in patogenezindeki rolleri üzerinde odaklanmıştır.

2.1. Etiyolojisi

En küçük RNA virusları arasında yer alan BVDV; lipid zara ve ortalama 40-60 nm çapında ikozahedral simetrik kapsite sahip bir etkidir (33,61,100). Etkenin içerdiği RNA; 12.5 kb moleküler ağırlıkta, pozitif polariteye ve tek iplikcikli linear yapıya sahiptir (29,61,100,139).

Hafez ve ark. (57) tarafından 1968 yılında yapılan bir araştırmada, farklı elektron mikroskopik teknikler kullanılarak BVDV partiküllerinin çapının ayrı ayrı 46 (\pm 16) nm, 50 (\pm 20) nm ve 60 (\pm 26) nm olarak tespit edildiği bildirilmiştir.

Horzinek (61) tarafından antijenik olarak yakın ilişkili Avrupa domuz vebası virusu (HCV) ve BVDV'unun 1973 yılında "Pestiviruslar" olarak isimlendirildiği, ayrıca koyunların Border Disease virusunun BVDV ile antijenik ilişkisinin tesbiti

sonucu 1982 yılında Uluslararası Virus Taksonomi Komitesi tarafından bu üç virusun aynı grup altında toplandığı bildirilmiştir.

Uzun yıllar Togaviridae familyası içinde sınıflandırılan (29,61,100,139) Pestivirusların moleküler özelliklerini ortaya koyan son gelişmeler ışığında, BVDV'unun sınıflandırılması tartışmaları yeniden başlamıştır. Pestivirusların Togaviridae familyasındaki diğer virüslerden farklı olduğunu gösteren ilk moleküler verilerin virusa spesifik RNA'nın özellikleriyle ilgili olduğu bildirilmiştir. Enfekte hücrelerde yüksek moleküler ağırlıkta 3' poly A bölümü içermeyen tek bir zincir bulunmuş ve enfeksiyondan sonra herhangi bir subgenomik RNA tespit edilememiştir (61,117). Bu özellikler, Pestivirusların Flaviviruslara benzerlik gösterdiğini ortaya koymaktadır (29,61,99). Hatta son zamanlarda yapılan araştırmalarda (9,30) Pestiviruslar Flaviviridae familyası içinde sınıflandırılmıştır.

Ayrıca konakçı hücre RNA'sının sentezini tamamen durduran actinomicine D konsantrasyonunun Pestivirus RNA sentezini etkilemediği belirtilmiştir (117). Bu durum pestivirusların kendi RNA'larının sentezi için konak hücre enzimlerine bağımlı olmadıklarını göstermekte ve kendi enzimlerini direkt olarak sahip oldukları pozitif iplikcikli RNA'dan sentezlediklerini ortaya koymaktadır. BVDV'una ait RNA'nın, 2M LiCl'de çözülmüş olarak kalabilmesi ve hatta küçük konsantrasyonda RNase A ile hidrolize olmaması yeteneğinden dolayı çift iplikcikli RNA'ya benzer bir yapı sergilediği, fakat yüksek enzim konsantrasyonlarına duyarlılığı ile gerçek çift iplikcikli RNA yapısından farklı olduğu ortaya konmuştur (29,117).

BVDV'unun doku kültürlerindeki aktivitesini yansıtan, sığırlardaki patojenitesiyle kesin olarak ilişkisi olmayan, cp ve ncp biyotiplerin varlığı bildirilmiştir (51,91,100,137). Bu iki biyotip

arasında invitro olarak interferensin meydana geldiği ise ilk defa Gillespie ve ark.(51) tarafından tespit edilmiştir.

BVDV'unun stabilitesi ve bazı fizikokimyasal özelliklerinin araştırıldığı çeşitli çalışmalar (36,37,55) sonucunda eter, kloroform, tripsin ve ısıya duyarlı olduğu, 5.7 - 9.3 pH değerleri arasında stabil kaldığı saptanmıştır . Fernelius (44) tarafından ortalama por genişliği 100 nm ve 220 nm olan milipor filtrelerden cp biyotiplerin ncp biyotiplerden daha kolaylıkla geçebildiği tespit edilmiş, Hafez ve Liess (56) tarafından yapılan bir başka çalışmada ise 4 ayrı BVDV suşunun 50 nm çapındaki milipor filtrelerden geçirilmeleri sonucu titrelerinde hafif bir düşüşün gözlemlendiği bildirilmiştir . Ayrıca Rae ve ark. (121) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, 3 adet persiste enfekte sığırın 3 farklı biçimde hazırlanmış (EDTA'lı, lityum heparinli ve antikoagulanlı) tüplere alınan kanlarından elde edilen, 5 gün 22 °C de ve karanlık odada saklanan ve bu süre boyunca IF yöntemiyle teste tabi tutulan serum ya da plazma numunelerinin ihtiva ettikleri BVDV'unun titresinde bir düşüş gözlenmediği belirtilmiştir.

BVDV'unun yapısında bulunan proteinlerin tesbiti amacıyla yapılan incelemelerde; virusun hücre kültürlerindeki düşük titresi, hücre membranına bağımlılık, viral partiküllerin fragilitesi, farklı yöntem ve virus suşlarının kullanılması gibi nedenlerden dolayı birbirinden değişik sonuçlar elde edilmiştir. Coria ve ark. (33), 2 tanesi glikoprotein yapısında olmak üzere 4 temel polipeptid, Purchio ve ark. (117), 3 tanesi temel 2 tanesi daha küçük yapıda toplam 5 adet protein, Pocock ve ark. (116) 5 tanesi glikoprotein olmak üzere toplam 8 protein, Collet ve ark.(29) Donis ve Dubovi'nin BVDV'una spesifik toplam 12 adet polipeptid tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Günümüzde pestivirusların temel proteinleri; p20, gp25, gp48, gp53, gp62, p80, p125 olarak kabul edilmiştir (29).

MD'li sığırlardan, serolojik olarak ayırt edilemeyen hem cp hem de ncp BVDV'unun izole edilmesi (15,21) bu iki biyotip arasında küçük farklılıkların olduğu kanısını uyandırmış; cp biyotiplerin diğer proteinlerle birlikte p80 ve p125 proteinini, ncp biyotiplerin ise sadece p125 proteinini taşıdıkları tespit edilmiştir (20,29,100). Daha sonra viral replikasyon sırasında p125 proteininin parçalanmasıyla p53 ve p80'in meydana geldiğinin belirlenmesi bu proteinlerin fonksiyonları ile biyotiplerin orijini arasındaki ilişki hakkında bazı şüpheleri ortaya çıkarmıştır (29,100). Buna bağlı olarak bazı araştırmacılar (21,22) tarafından persiste enfekte hayvanlarda bulunan ncp biyotiplerin mutasyonu sonucu, cp biyotiplerin oluştuğu fikri savunulmuştur .

BVDV'unun en iyi çoğaldığı ortam hücre kültürleri olup, bu amaçla fotal dana testis (55,77), primer dana testis (55,56,95), fotal dana böbrek (44,51,90,101,121), fotal dana deri (133), fotal dana kemik iliği (18), dana türbinat (32,80,81), fotal dana kas(129), fotal dana akciğer (97), dana endokardial (4) hücre kültürleri kullanılmaktadır. Ayrıca etkenin adapte edilebildiği devamlı hücre kültürleri ise PK-15 (44,56,90), MDBK (101,105) ve Vero (5)'dur.

2.2 Epizootyoloji

Bulaşma genellikle BVDV ile persiste ya da geçici olarak enfekte hayvanlarla direkt veya indirekt temas sonucu meydana gelmektedir (39,90,124). Enfekte hayvanlara ait kan (10,17,70,75,95,104,106), burun akıntısı (4,11,92,104,108), tükürük (39,108), gözyaşı (92), sperma (8,31,74), süt (102,120), gaita (4,53,71), idrar (45,133), uterus akıntıları (4), amniotik sıvı ve yavru zarları (4,68) ile virus saçılabilir.

Görünüşte sağlıklı persiste enfekte sığırlar, BVDV'nun epizootiyolojisinde, özellikle hassas sürüler içine enfeksiyonun direkt olarak girişinde çok büyük öneme sahiptirler (2,39,75,124,128,133). Ayrıca enfeksiyon kaynağı olarak, geçici enfekte hayvanlar, enfekte sperma, embriyo transferi, çeşitli enfekte malzemeler, canlı BVDV aşuları, BVDV ile kontamine olmuş aşular, çeşitli sinek türleri ve diğer enfekte hayvan türleri sayılabilir.

2.2.1. Persiste Enfekte Sığırlar

Persiste enfeksiyonun gelişmesindeki en büyük sebep BVDV'nun ncp biyotipi ile fötusun intrauterin enfeksiyonudur. Bu biyotip plasentayı geçebilmekte ve her yaştaki fötusu enfekte edebilmektedir. Enfeksiyon, gebeliğin 90 -125. gününden önce meydana gelirse virus persiste olabilir (23,75,84,90,92,127,128,135). Bu süreden önce immun sistem fonksiyonel değildir (18,127) ve virus fetal dokularda yaygın olarak saptanabilir (7,96). Sonradan immun sistem gelişmesine rağmen organizma, virusu kendinden bir materyal olarak kabul eder ve immuntolerans şekillenir. Spesifik antikorların eksikliğiyle ortaya çıkan bu tolerans, postnatal yaşamda da virusun persiste kalmasına olanak vermekte ve bu hayvanların sekret ve ekstrektleriyle virusu devamlı olarak etrafa saçmalarına sebep olmaktadır (96,133). Bu nedenle persiste enfekte hayvanların bulunduğu sürülerde immunité düzeyi yüksek olarak tespit edilmektedir (14,62,96).

Persiste enfekte hayvanların, büyümelerinde gerileme ve neonatal ölüm oranlarında bir yükselme olmasına rağmen, normal görünümlü olup seksüel olgunluğa kadar uzun süre farkedilmeden yaşayabilmeleri, BVDV enfeksiyonlarının epidemiyolojisinde anahtar role sahip olduklarını ortaya koymaktadır (2,8,11,92,110). Seksüel olgunluğa ulaşmış çiftleşen hayvanlardan doğan yavrular

büyük ihtimalle klinik olarak sağlıklı görünmelerine rağmen persiste enfekte olarak doğmaktadırlar (12,133). Bu hayvanların da çiftleşmeleri sonucu nesiller boyu sürecektir maternal viremik aileler oluşabilmekte ve sürü içinde virusun endemik olarak muhafazası için temel mekanizmalardan biri sağlanmış olmaktadır (92,120,133).

Farklı ülkelere ait sürülerde çeşitli araştırmacılar (2,14,65,67,96,115,128) tarafından yapılan taramalarda persiste enfekte sığırların insidansının düşük olduğu tespit edilmiştir (Tablo 1). Fakat bireysel sürülerde bu oranın daha büyük olabileceği bildirilmiştir (23).

ÜLKE ADI	SÜRÜ SAYISI	TEST EDİLEN HAYVAN SAYISI	I TESTTE BVDV(+) HAYVAN SAYISI	II. TESTTE BVDV(+) (PI) HAY. SAYISI	PI HAY.LARIN YÜZDESİ (%)	ANTİKOR TAŞIYAN HAYVAN SAYISI (%)	LİTERATÜR
İsveç	114	711	12	9	1.3	41	2
ABD	1	55	9	8	-	-	10
ABD	66	3157	60	54	1.7	89	14
İngiltere	-	3151	56	-	-	-	40
ABD	-	1538	-	12	0.78	-	65
İngiltere	-	924	7	4	0.4	-	67
Danimarka	19	2570	37	28	1.4	64	96
Almanya	-	3741	235	19	0.57	-	115
Danimarka	7	143	-	37	-	-	119
Japonya	-	154* 112**	18 0	12 -	8.1 -	- -	128

* Epidemik sahadan seçilmiş hayvanlar

** BVD görülmemiş bölgelerden seçilmiş hayvanlar

Tablo 1. Çeşitli ülkelerde yapılan çalışmalarda persiste BVDV enfeksiyonu yönünden araştırılan hayvanların test sonuçları ve yüzdeleri.

2.2.2. Geçici Viremik Sığırlar

Akut BVDV enfeksiyonları sonucu hayvanlarda geçici viremi şekillenir ve virus; nazal, lakrimal ve urinal sekresyon gibi tüm vücut sekresyonlarıyla saçılabilir. Gaitanın, barsaklarda şiddetli hasarların meydana geldiği olaylarda bile zayıf bir virus kaynağı olduğu bildirilmektedir (23,96). Akut enfeksiyonu takiben virusun saçılma süresi 4 - 10 gün kadar olmakla birlikte, enfeksiyondan 19 gün sonra virusun nazal svaptan izole edilebildiği ve deneysel olarak enfekte edilen hayvanların akciğer ve bronşiyal lenf yumrularında 56. güne kadar kalabildiği bildirilmiştir (23).

Akut enfekte hayvanların saçtığı virus miktarının düşük olması nedeniyle duyarlı hayvanlara bulaşma olasılığı genellikle azdır. Fakat akut enfeksiyonun bir solunum sistemi enfeksiyonu ile birlikte seyrettiği durumlarda meydana gelen aerosol bulaşmanın BVDV'unun yayılmasında büyük bir rolü olduğu bildirilmektedir (96).

Enfeksiyon, kapalı işletmecilik yapılan sürülerde hızla yayılma eğilimi göstermektedir. Ancak hafif seyreden BVDV enfeksiyonlarında dönüme 0.2 - 1 hayvanın düştüğü mera şartlarında bulaşmanın görülmediği tespit edilmiştir (120).

2.2.3. Enfekte Boğa ve Sperma

BVDV'u ile persiste enfekte olan veya akut bir enfeksiyon geçiren boğaların spermalarında etkenin bulunabileceği bildirilmektedir. Virus taşıyıcısı olarak görev yapan bu hayvanlar, aynı sürüde bulunan diğer hayvanlarla ya da çiftleşme anında dişi sığırlarla temas sonucu direkt; sun'i tohumlama yoluyla da indirekt olarak hassas hayvanlara ve sürülere enfeksiyonu taşıyabilmektedirler (1,8,74,77,97,123).

Barlow ve ark.(8) sun'i tohumlama ve ovum transplantasyonu sonucu BVDV ile persiste enfekte olarak doğan bir boğadan alınan kan ile beraber nazal ve okuler

svaplarından ncp BVDV izole ettiklerini, ayrıca spermamın $10^4 - 10^{5.5} / 0.2$ ml. gibi yüksek titrede virus içerdiğini bildirmişlerdir.

Revel ve ark. (123) sun'i tohumlama merkezine gelen ve taramalar sonucu BVDV ile persiste enfekte olduğu saptanan iki adet boğadan alınan spermaların kalitelerini incelemişler, dansisitelerinin ve motilitelerinin zayıf olduğunu tespit etmişlerdir. Bu iki boğadan birine ait spermada % 1, diğerine ait spermada ise %28-45 oranında iri başlı spermatozoit görülmüş ve BVDV antijenleri çeşitli sperma fraksiyonlarında saptanmıştır.

Kirkland ve ark. (77) deneysel olarak geçici akut enfeksiyon oluşturulan 5 adet boğamın 3'üne ait spermadan BVDV'ünü izole etmişler fakat sperma kalitesinde herhangi bir değişiklik saptayamamışlardır. Enfeksiyon periyodunun bitiminden sonra aynı hayvanların reproduktif sisteminde virusun replikasyonu sonucu seminal sıvı ile virusu saçmaya devam ettikleri tespit edilmiştir. Araştırmacıların (77) reproduktif sistem üzerinde yaptıkları virolojik çalışmalar sonucu virusun en çok çoğaldığı dokuların seminal vesiküller ve prostat bezi olduğu gösterilmiştir.

Meyling ve Jensen (97), persiste enfekte bir boğadan alınan $10^4 - 10^{6.5} / 0.1$ ml. titrede virus içerdiği tespit edilen sperma ile tohumlama yapılan 12 adet seronegatif düvenin iki hafta içinde BVDV spesifik antikorlar yönünden sepozitif hale geldiğini saptamışlardır. Araştırmacılar (97) aynı zamanda düvelerin tümünün normal olarak gebe kaldığını ve buzağılardan bir tanesinin persiste enfeksiyona sahip olarak doğduğunu belirtmişlerdir.

Mc Clurkin ve ark. (92) tarafından gerçekleştirilen diğer bir araştırmada ise PI bir boğa, 4 aylık zaman içinde BVDV'una karşı spesifik antikor titresi $\geq 1:512$ olan 17 inekle çiftleştirilmiştir. 17 inekten 14'ü her gebelik için ortalama 2.3

çiftleştirmeden sonra gebe kalmış ve normal doğum yapan 12 adet inekten 3 tanesi ikiz olmak üzere 15 sağlıklı buzağı doğmuştur. Prekolostral serum numunelerinin spesifik antikor yönünden, lökosit numunelerinin ise BVDV yönünden negatif olduğunun saptanması buzağuların intrauterin enfeksiyona maruz kalmadıklarını göstermiştir. Araştırmacılar (92) aynı boğanın BVDV'una karşı spesifik antikor yönünden seronegatif olan 5 adet düve ile çiftleştirilmesi sonucu düvelerin seropozitif hale geldiklerini ve bunlardan 3 tanesinin serum antikor titresi $\geq 1:128$ oluncaya kadar gebe kalmadıklarını fakat sonuçta normal buzağular doğurduklarını bildirmişlerdir. Neticede BVDV'unun repeat breeding problemleri ve neonatal hastalıklara katkıda bulunan bir faktör olabileceği fakat BVDV antikorları yönünden seropozitif ineklerin uterus ve vaginal sıvıları içinde antikor bulunabileceği ve muhtemelen spermadaki virusun nötralizasyonu sonucu ovumun enfekte olmasını engelleyebileceği savunulmuştur.

2.2.4. Embriyo Transferi

Embriyo transferinin BVDV'unun bulaşmasında önemli bir yol olduğu bildirilmektedir. Etkenin zona pellucida'yı geçemediği ve standart yıkama işlemlerinin BVDV'unu embriyonun yüzeyinden uzaklaştırabileceği tespit edilmiştir. Bu durumda muhtemelen virusun embriyoyu direkt olarak enfekte etmediği fakat hassas alıcı hayvanların enfekte olması ve implantasyonu takiben embriyolara virusun nakledilmesi ihtimalinin fazla olduğu fikri savunulmaktadır (1,6,13).

BVDV ile persiste enfekte ineklerin oositlerinin etkilenip etkilenmediği tam olarak bilinmemesi nedeniyle herhangi bir olasılığa karşı verici (donör) ineklerin

viremi açısından test edilmeleri koruyucu bir önlem olarak düşünölmektedir (96). Bununla beraber Ssentongo ve ark.(130) tarafından gerçekleştirilen ilginç bir araştırmada, serokonverte olduktan sonra sığırların ovaryumlarından BVDV'unun uzun süre izole edildiği bildirilmiştir.

Embriyo transferinde kullanılan yöntemlerin, üretme çiftliklerine virusun girişinde bir vektör olarak rol aldığı gösterilmiştir. Örneğin BVDV ile kontamine fetal dana serumu kullanılmasıyla hazırlanan yıkama solüsyonları alıcı inek ve fetusun enfeksiyonu için gerçek bir risk oluşturmaktadır (1,124).

Howard ve ark.(65) sun'i tohumlamada kullanılan 12 adet persiste enfekte boğanın 10 tanesinin embriyo transferi sonucu doğduğunu bildirmişlerdir.

Çeşitli araştırmalarda (1,65) embriyo transferi sonucu PI doğan buzağıların önemli sayıda olduğu ortaya konmuştur. Bunun sebebi tam olarak bilinmemekle beraber embriyo transferinin daha çok persiste enfeksiyonun hakim olduğu şartlar altında yapılması ve yanlış üretme tekniklerinin kullanılması en büyük etkidir (96). Genellikle alıcı hayvanların, buldukları sürülerden embriyo transferi yapılan merkezlere getirilerek bir arada toplanmaları BVD riskini artırmaktadır. Bu nedenle embriyo transferinden önce sadece alıcı hayvanların viremi yönünden test edilmesi değil, alıcıların toplandığı ahırda bulunan tüm hayvanların da özgeçmişlerinin incelenmesi gerektiği tavsiye edilmektedir (96).

2.2.5. Çeşitli Enfekte Malzemeler

BVDV'unun sürüden sürüye veya çiftlikten çiftliğe yayılmasında diğer önemli bir yolun da veteriner hekim ve hayvan bakıcılarına ait kontamine olmuş giysiler, ayakkabılar ve çeşitli veteriner aletleri olduğu tahmin edilmektedir.

Özellikle veteriner hekimlikte şırınga ve iğnelerin değiştirilmemesi ve sürü içinde kullanılan ilaç şişelerinin imha edilmemesinin bulaşmada rol alabileceği düşünülmektedir (54,124).

2.2.6. Hayvan Türleri Arasında Bulaşma

Pestivirus cinsi içinde yer alan BVDV, HCV ve BDV'larının antijenik olarak birbiriyle yakın ilişkilerinden dolayı türler arası bulaşmanın olabileceği bildirilmektedir (26,35).

Burgu ve ark. (25) tarafından 1982-1984 yılları arasında abort yapan koyunlardan toplanan 478 adet kan örneğinden 14 adet, 74 adet abort olmuş kuzu fötusundan alınan 132 organ materyalinden ise 8 adet BVDV identifiye edilmiştir.

Carlson (26) BVDV ile persiste enfekte sığırlarla aynı yerde kapalı tutulan gebe koyunlarda Border disease semptomlarını gözlemiş ve canlı doğan kuzulardan virus izole etmeyi başarmıştır.

Depner ve ark. (35), BVDV'una karşı nötralizan antikor içermeyen 25 adet gebe keçide virusun transplasental bulaşmasının sonuçlarını gözlemek amacıyla bir araştırma gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmada, gebeliğinin 50-90. günleri arasında BVDV ile inokule edilen keçilere ait yedi fötusun çeşitli organlarından etkenin izole edilebildiği, ayrıca gebeliğinin 78. gününden önce virus inokule edilen keçilerde % 100'e yakın abort ve fötal ölüm gözlemlendiği bildirilmiştir.

Vahşi ruminantlarda da BVDV enfeksiyonlarının görüldüğüne dair serolojik delillerin bulunması, bu hayvanların da etkenin bulaşmasında rezervuar olarak görev yapabileceklerini akla getirmiştir(13,96).

2.2.7. Canlı BVDV Aşıları

Canlı virus aşı suşlarının gebe hayvanlarda plasentayı geçme yeteneğine sahip oldukları ve fetal enfeksiyonların bilinen sonuçlarının tümüne sebep olabilecekleri bildirilmiştir (7).

Orban ve ark. (110), BVDV'una karşı spesifik nötralizan antikor yönünden seronegatif olan 36 adet ineğe gebeliklerinin 190-265. günlerinde canlı BVDV aşısının uygulanmasını takiben doğan buzağuların 31 tanesinin prekolostral kan örneklerinde spesifik nötralizan antikorların tespit edildiğini bildirmişlerdir.

Liess ve ark. (86), gebeliklerinin 51-118. günlerinde aşılanan 21 anneden 9'unun viremik buzağular; gebeliğin 90-113. günlerinde aşılanan 5 annenin ise merkezi sinir sistemi bozukluğu gösteren buzağular doğurduğunu gözlemişler ve bir buzağının serebrospinal sıvısından BVDV'unu izole etmeyi başarmışlardır.

Yapılan diğer bir araştırmada (84), gebeliklerinin 90-120. günlerinde canlı virusla yapılan aşılama sonucunda annelerinden doğan 5 buzağıda merkezi sinir sistemi semptomları, 2 buzağıda persiste viremi ve muhtemelen aşı virusuna bağlı olan 2 adet abort olayı görülmüştür.

Ayrıca BVDV aşılama çalışmalarının buzağularda respiratorik sistem hastalıklarından dolayı meydana gelen ölüm olaylarının artması ile ilişkili olduğu ve canlı aşılar ile aşılamadan sonra MD salgınlarının meydana geldiği bildirilmiştir (7).

2.2.8. BVDV ile Kontamine Aşılar

Çeşitli viral aşuların hazırlanmasında kullanılan hücre kültürlerinin vasatlarına katılan BVDV ile kontamine olmuş fetal dana serumları da bulaşmada rol oynayabilmektedir (124). Araştırmacılar (65,112), solunum yolunun viral enfeksiyonlarına karşı hazırlanan doku kültürü aşularının kullanıldığı hayvanlardan

BVDV'unun izole edildiğini, ayrıca yetiştirme sürülerinde BVDV'u ile kontamine olmuş rotavirus ve coronavirus aşılarının kullanılması sonucu persiste enfekte buzağuların doğduğunu (65) bildirmektedirler.

Howard ve ark. (67) tarafından İngiltere'deki sığırlarda BVDV viremisinin prevalansını tespit etmek amacıyla yapılan bir araştırmada, en az 3 yıl -20 °C de saklandıktan sonra teste tabi tutulan 3 adet serum numunesinden etken izole edildiğini bildirmişlerdir. Bu durum doku kültürü ve embriyo transferi çalışmalarında sık olarak kullanılan ve -20 °C de saklanan fetal dana serumlarının, bulaşmada ne kadar büyük rol oynayabileceğini göstermektedir.

2.2.9. Çeşitli Sinek Türleri

Uzun yıllar BVDV'unun yayılmasında kan emici sineklerin rolü olmadığı düşünülmüş (107), ancak son yıllarda bu görüş çürütülmüş ve BVDV'unun epidemiyolojisinde anlaşılamayan, özellikle kaynağı açıklanamayan enfeksiyonların aydınlatılması sağlanmıştır (54,134).

Tarry ve ark. (134) serumunda DKID₅₀ 10^{4.5}/ml. titrede ncp BVDV içeren PI bir tosun üzerinde üç değişik türdeki kan emici sineğin (*Stomoxys calcitrans*, *Haematopota pluvialis* ve *Hydrotaea irritans*) beslenmesini sağlamışlar; *Stomoxys calcitrans*, *Haematopota pluvialis* türü sineklerden, beslenmeyi müteakip 96. saate, *Hydrotaea irritans* türü sineklerden ise ancak ikinci saate kadar BVDV izolasyonu yapmışlardır. Ayrıca *Stomoxys calcitrans* ve *Hydrotaea irritans* türü sinekler PI hayvan üzerinde tutulduktan sonra BVD virusu taşımayan ve spesifik antikoruna sahip olmayan iki buzağı; *Haematopota pluvialis* türü sinekler ise bir koyun ile karşı karşıya getirilmişlerdir. *S. calcitrans* ile karşılaştırılan buzağulardan bir tanesinde üçüncü gün, *H. pluvialis* ile karşılaştırılan koyunda 5-10. gün arasında BVDV'u izole edildiğini bildirmişlerdir.

Gunn (54) tarafından 1993 yılında yapılan bir başka araştırmada ise persiste enfekte bir sığırın okuler sekresyonu ile beslenen *Musca autumnalis* türü sineklerden ncp BVDV'unun izole edildiği bildirilmiştir.

2.3. Patoloji, Patogenez ve Klinik

BVDV tarafından oluşan enfeksiyonların patogenezi birtakım koşullar tarafından yönlendirilir. Bunlar arasında, enfeksiyon sırasında vireminin oluşumu, virusun immün sisteme adaptasyon yeteneği, transplental enfeksiyonların meydana gelmesi, immün toleransın şekillenmesi ve gebeliğin ortalama 120. gününde fetal immün yanıtın oluşması gibi koşullar yer almaktadır.

2.3.1. Postnatal Enfeksiyonlar

2.3.1.1. Subklinik Enfeksiyon

BVDV'una hassas yetişkin sığırların enfeksiyonlarında genellikle nötralizan antikorlarının oluşumu sonucu virus elemine edilir (73,120). Böylece virusun uzun süre saçılımı olmadan hayvanlar doğal enfeksiyonlardan başarıyla korunurlar. Subklinik enfeksiyon geçiren sığırlarda hafif ateş ve lökopeni görülebilir (7).

2.3.1.2. Akut Enfeksiyon

Enfeksiyonun bu formu birkaç günlük iştahsızlık, depresyon, ateş, hafif bir ishal, geçici bir lökopeni ile seyreder ve bazen birkaç gün içinde iyileşme ile sonuçlanabilir (13,114). Enfeksiyonu takiben yaklaşık 4-7. günlerde virus lökositlerden izole edilebilir. Yaklaşık ikinci haftada başlayan, 10-12. hafta civarında maksimuma ulaşan ve yavaş gelişen spesifik bir antikor yanıtı mevcuttur (23).

2.3.1.3. Immunsupresyon

Sahada meydana gelen salgınlarda BVDV'unun immunsupresif etkisinden şüphelenilmiş, yapılan postmortem incelemelerde BVDV'unun lenf yumruları, payer plakları ve dalak gibi lenfoid organlara karşı affinitesi olduğu ve immun fonksiyonları engellediği gözlenmiştir (114). BVDV'unun lenfosit ve makrofajlarda da çoğalma yeteneği tespit edilmiştir (17,99,119).

Ohmann (103) akut ve kronik olarak enfekte sığırlarda immunfloresan ve immunperoksidaz testlerinden yararlanarak, mononükleer fagosit sistemi ile gastrointestinal, deri ve solunum sistemi epitel hücrelerinde BVDV antijenlerinin varlığını bildirmiştir.

BVDV'unun immun sistem üzerindeki etkilerini incelemek amacıyla çok sayıda araştırma yapılmıştır. Bu araştırmalar (24,32,71,79,80,125,126) invivo ve invitro olarak enfekte lenfosit ve polimorf nükleer fagositlerin fonksiyonları üzerine yoğunlaştırılmıştır.

Johnson ve Muscoplat (71) nazal ve rektal svaplarından ncp BVDV izole edilen kronik enfeksiyona sahip 5 adet dananın serumunda çok düşük seviyede nötralizan antikor tespit edilmesini lenfositlerin humoral immun sisteminin; periferik kan lenfosit kültürlerinin Phytohemagglutinin'e (PHA) karşı olan yanıtlarındaki düşüşünü ise lenfositlerin sellüler immun sisteminin yanıt verememesine bağlamışlardır.

Yapılan araştırmalarda (79,125) da PI hayvanlarda nötrofil fonksiyonunun ve mononükleer hücrelerin mitojenlere karşı proliferatif cevabının azaldığı belirtilmiştir.

Roth ve ark. (126) BVDV ile enfekte sığırlara ait polimorf nükleer lökositlerin oksidatif metabolizmalarının normal olduğunu fakat bakterisit, fungusit ve virusit

etkilerinde önemli role sahip myeloperoksidaz-hidrojen peroksit sistemini zayıflattığını ortaya koymuşlardır.

Bütün bu bulgulara rağmen Brownlie ve ark.(24) tarafından BVDV ile deneysel olarak enfekte edilen 2-4 aylık danalara ait lenfositlerin yüzde oranının ve ölü Br. abortus'un intravenöz inokulasyonu sonucu meydana gelen antikor titrelerinin normal hayvanlara göre çok büyük bir farklılık göstermediği ortaya konulmuştur.

Ayrıca konakçıdaki immunsupresyon etkisinden dolayı bu virusun Bovine Respiratory Disease Kompleksi'nin oluşumunda rolü olduğu muhtemeldir (7,120).

2.3.1.4. Neonatal Buzağılarda BVDV Enfeksiyonu

BVDV altı aylıktan küçük buzağılarda nadiren doğal hastalığa sebep olur (13). Bu konuda bazı tartışmalar olsa da buzağılar neonatal dönemde enfekte olabilir ve bazen ölümcül seyreden şiddetli enteritis şekillenebilir (7,60). Ayrıca virus taşıyıcısı olarak doğan danaların yaşama gücü zayıftır ve bu tür hayvanlar kısa zamanda hastalanıp diyare semptomu göstererek veya göstermeyerek ölürlere (120).

Lambert ve ark.(78) BVDV ile deneysel enfeksiyonu takiben yeni doğan danalarda öldürücü, enterik bir enfeksiyon şekillendiğini ve bu hayvanlardan 103. güne kadar virusun izole edilebildiğini bildirmişlerdir.

Araştırmacılar (13,120) tarafından buzağılarda meydana gelen BVDV ile ilgili diyarenin, virusun immunosupresif etkisi nedeniyle diğer enterik enfeksiyonların artışına bağlı olarak meydana geldiği düşüncesi öne sürülmüştür.

2.3.1.5. Üreme Bozuklukları

Çiftleşme zamanında BVDV ile enfeksiyon, döllenmeyi engelleyebilmektedir (92,94). McClurkin ve ark. (92) tarafından yapılan bir araştırmada PI bir boğa ile

çiftleşen 5 duyarlı düvenin 3 tanesinin antikor titresi 1:128 veya daha yüksek oluncaya kadar gebe kalmadıkları saptanmıştır.

Seronegatif hayvanlarda BVDV ile enfeksiyon genital yolla olursa repeat breeding ile karakterize sürü problemleri ortaya çıkabilir. En çok dikkate değer bulgu tohumlama/gebelik oranındaki artıştır. Ancak böyle bir problem en azından immun cevap oluşuncaya kadar geçicidir ve eğer sürüde BVDV enfeksiyonuna ilişkin başka belirtiler yoksa bu durumu BVDV'una atfetmek oldukça zordur (7).

2.3.2. Transplasental Enfeksiyonlar

Enfekte gebe hayvanlarda BVDV, temel olarak üç yoldan fütusa ulaşabilir:

- 1) Hematojen yol ile etken vücuda yayılabilir ve plasentayı geçebilir (18,21,27,76,86,101,110).
- 2) Genital mukoza yoluyla vücuda girerek fütusa geçebilir (4,114).
- 3) Ovaryumdaki gamet enfekte olabilir (130).

Gebelikte BVDV enfeksiyonunun başlıca önemi, yukarıdaki yollardan virusun transplasental olarak yayılması sonucu fütal enfeksiyonun ortaya çıkmasıdır.

Transplasental enfeksiyonlarda meydana gelecek olan netice, özellikle enfeksiyon esnasında fütal gelişimin safhasına bağlıdır. Genellikle fütus için risk, gebeliğin ilk dönemlerinde en yüksek seviyededir (64,100,125,127).

Sonuçta fütus üzerinde meydana gelebilecek etkiler arasında embriyo ölümleri, abort ve mumifikasyon; konjenital defektler; intrauterin gelişme noksanlığına (IUGN) bağlı zayıf ve normalden küçük buzağı doğumları; seropozitif normal görümlü buzağı doğumları; immuntolerans ve persiste enfeksiyonlar görülebilir (4,18,27,38,39,94,108,127).

2.3.2.1. Erken Embriyo Ölümleri, Abort ve Mumifikasyon

Erken embriyo ölümleri ve fötusun rezorbsiyonu, iskelet sisteminin henüz gelişmediği gebeliğin ilk dönemlerinde meydana gelebilir (107). Archbald ve Zemjanis (4) sun'i tohumlama ile birlikte intrauterin olarak BVDV infüzyonu yaptıkları 21 ineğin 16 tanesinin (%76) muhtemelen erken embriyonik ölümlere bağlı olarak gebe kalmadığını belirtmişlerdir.

Casaro ve ark. (27) ise 51-99 günlük beş adet sığır embriyosunun, virus inokule edilmesinden 10-21 gün sonra öldüğünü, daha büyük yaştaki fötusların hiçbirisinin bu zaman süresince ölmediğini belirtmişlerdir.

Diğer taraftan çiftleşmeden iki saat önce oronazal olarak enfekte edilen inekler normal gebelik oranı gösterirken (107), Kendrick (76) tarafından BVDV'unun gebeliğin 58. gününden önce plasentayı geçemediği ileri sürülmüştür.

Doğal ve deneysel transplasental enfeksiyonlarda abort ve mumifikasyonların da yaygın olarak görüldüğü bildirilmiştir (27,39,51, 76,89,92,108,114).

BVD ilk tanımlandığında, Olafson ve ark. (108) gebe olan 95 inek ve 32 düve arasında 20 adet abort olayının meydana geldiğini belirtmişlerdir. Abortlar klinik bulguların başlamasından sonra üçüncü aya kadar sürmüş, bu arada sekonder metritis ve annelerin ölümü gözlenmiştir. Daha sonra meydana gelen birçok BVD salgını abortlarla birlikte seyretmiş ve çoğu araştırmacı (39,76) BVDV'unu abortların etiyolojik etkeni olarak kabul etmiştir.

Gillespie ve ark. (51) abort olmuş 54 fötusun çeşitli organlarını böbrek hücre kültürlerinde pasajlamak suretiyle test etmeleri neticesinde, 225 ve 265 günlük iki fötustan ncp BVDV izole etmişlerdir. Her iki fötusun subkutan dokularında , iskelet

kaslarında, konjunktiva, ümus, tükürük bezleri, özefagus ve trakeasında hemorajiler tespit edilmiştir. Göğüs, inguinal bölge, boyun ve iskelet kaslarında subkutan ödemler görülmüştür. Mikroskopik olarak hafif veya orta derecede vaskulitis, meningitis ve nadir olarak beyinde fokal gliazis tablosu saptanmıştır. Beyin kan damarlarında mukoid dejenerasyon tespit edilmiştir. Ayrıca retikuloendotelial sistemin hiperplazisi ve proliferasyonu da saptanmıştır.

Lucas ve ark.(89) İngiltere'de bir süt işletmesinde saptanan 149 adet abort olayının % 4'ünün BVDV'una bağlı olarak meydana geldiğini, Kendrick (76) 23 adet seronegatif gebe inekte BVDV inokulasyonu sonucu 3 abort olayı tespit edildiğini bildirmişlerdir.

2.3.2.2. Konjenital Defektler

Gebeliğin yaklaşık 90-180. günleri arasındaki fetal enfeksiyonlar, farklı konjenital defektlerle sonuçlanabilir (13,27,39,114). Fötus tarafından kabul edilen BVDV, sistematik kan dolaşım ile veya hücreden hücreye bulaşma ile yayılabilmektedir. Virus hızlı mitoz ve farklılaşmaya sahip, metabolik olarak aktif olan fetal hücrelerde replikasyon için uygun bir ortam bulmaktadır. Fötusun yaşı, virusun virulensi ve dozu, konakçının genotipi ve fötusun meydana gelen tabirbatı telafi edebilme yeteneği gibi faktörler konjenital enfeksiyonun sonucunu etkilemektedir (107).

Virus replikasyonunun; fetal dokuların oluşumunu, gelişmesini ve farklılaşmasını etkileyerek malformasyonun şekillenmesini sağlaması için enfeksiyonun organogenezis döneminde olması gerekmektedir. Ayrıca virusun fötusu öldürmeksizin enfekte edebilmesi için yeterince düşük virulenste olması gerekliliği de ortaya çıkmaktadır (107).

Yapılan çeşitli araştırmalar (3,12,85,133,136) sonucunda BVDV enfeksiyonlarının meydana getirdiği konjenital defektler arasında serebellar hipoplazi, hidranensefali, mikroensefali, hidrosefali, spinal hipomiyelinizasyon, okuler bozukluklar, demiyelinizasyon, artrogrippois, brahignatizm, alopesi ve timus hipoplazisi sayılabilir.

Serebellar hipoplazi ile doğan danalar doğumu takiben ayakta duramazlar, zayıflar ve yürüyemezler. Gözdeki defektler değişen derecelerde körlük oluşturur, daha sonra katarakt meydana gelebilir (120).

Gebeliğin 90-118. günleri arasında seronegatif ineklere modifiye canlı aşı uygulayan Trautwein ve ark. (136) buzağlarda konjenital serebellar hipoplazi ve hidranensefali şekillenebileceğini saptamışlar, bu aşının teratojenik etkilerinin gebeliğin 90-118. günleri arasında sınırlı kaldığını gözlemişlerdir. Aynı araştırmacılar (136) doğan buzağlarda ataksi, tortikollis ve opistotonus gibi merkezi sinir sistemi bozukluğu semptomlarının görüldüğünü de bildirmişlerdir.

Alkan (3) tarafından Türkiye'de yapılan bir araştırmada, 6'sı kör buzağlara, 4'ü kör buzağların annelerine ait lökosit örneklerinde olmak üzere toplam 10 adet cp BVDV; biri kör bir buzağya ait, diğer ikisi ise abort yapmış ve kör buzağı doğurmuş annelere ait lökosit örneklerinde olmak üzere toplam 3 adet ncp BVDV izole edilmiştir.

2.3.2.3. Normalden Küçük ve Zayıf Buzağılar

Bu tür buzağılar özellikle BVDV enfeksiyonuna bağlı IUGN sonucu doğan buzağlardır. IUGN da BVDV enfeksiyonunun diğer yaygın bir özelliğidir (107). Gebeliğin her döneminde BVDV ile meydana gelen enfeksiyon büyümede gerileme ile sonuçlanabilir (39).

IUGN, gebelik döneminde düşük ağırlık kazancı olarak da tanımlanmaktadır. Bu olaydan sadece belirli organların etkilenebileceği de bildirilmiştir (107).

Done ve ark. (38) gebeliğin 100. gününde BVDV'una maruz kalan analardan doğan tüm buzağularda IUGN bulguları saptamış, aynı zamanda timus ağırlıklarının da önemli derecede düştüğünü belirtmişlerdir.

Kelling ve ark. (75) persiste viremik olduğunu tespit ettikleri 5 adet buzağıdan 4 tanesinin sürü içinde bulunan diğer buzağılara oranla vücut ağırlığı açısından en hafif hayvanlar olduğunu tespit etmişlerdir.

2.3.2.4. Seropozitif Doğan Normal Görünümlü Buzağular

Gebeliğin son dönemlerinde özellikle fetal immünkompetensin şekillendiği ortalama 120. günden sonra meydana gelebilecek enfeksiyonların fötus tarafından önlenilebileceği ileri sürülmektedir (18,27,39,64,82,86,127). Bu durumda doğan buzağular normal görünümlü ve BVDV'una karşı nötralizan antikora sahip olarak doğarlar. Eğer bu antikolar tespit edilmek istenirse test edilecek serumun, kolostrum verilmeden önce (prekolostral dönemde) alınması gerekmektedir (7,93).

Ward ve ark. (138) 5-7.5 aylık gebe iken BVDV ile enfekte olan analardan doğan 11 danadan dört tanesinde prekolostral antikor saptamışlardır.

2.3.3. Persiste Enfeksiyon ve Mucosal Disease

2.3.3.1. BVDV'una Karşı Immüntolerans ve Persiste Enfeksiyon

Yapılan çeşitli araştırmalar (18,27,38,86) sonucunda sığır fötusunun BVDV'una karşı gebeliğin yaklaşık 90-120.gününde immunolojik olarak yanıt verebilir (kompetens) hale geldiği saptanmıştır . Bu süreden önce fetal hücrelerle

karşı karşıya gelen virus, herhangi bir immunolojik cevapla karşılaşmadığı için rahatlıkla çoğalmakta ve ileride fötüs immun yanıt verebilme yeteneğine ulaşsa bile organlarına yerleşen bu etkeni yabancı bir materyal olarak tanıyamamaktadır. Neticede bu hayvanlar BVDV'una karşı immuntolerant, persiste viremik ve klinik yönden normal ya da zayıf yapılı olarak doğmakta, bünyelerine yerleşen virüsü sekret ve ekstrektleriyle etrafa saçmaktadırlar (6,8,18,31,40,46,115,121).

Gerçekleştirilen araştırmalarda (21,27,84,93,101,114,136) cp BVDV'unun sığırlarda altı katlı sindesmokoriyal yapıdaki plasentayı geçememeleri, fötüsün sadece erken dönemleri için çok kısa bir süre patojen olmaları ve daha çabuk inaktive edilebilmeleri gibi ileri sürülen özelliklerinden dolayı, persiste enfeksiyonların ncp BVDV'lar tarafından meydana geldiği bildirilmiştir .

Persiste enfeksiyon ile sonuçlanan BVDV'una karşı immuntolerans, doğal olarak meydana gelebildiği gibi deneysel olarak da meydana getirilebilir (31,93,133). McClurkin ve ark. (93) gebeliğin 42. gününden 125. gününe kadar BVDV'unun ncp bir izolatu ile fötüslerin deneysel inokulasyonu sonucu persiste viremik buzağuların doğduğunu bildirmişlerdir.

Persiste enfekte sığırların BVDV'una karşı immuntolerant olmalarına karşın IBRV, PI-3 virus ve P. haemolytica gibi diğer birçok antijene karşı immunkompetent oldukları gözlenmiştir. Bununla beraber PI sığırların heterolog BVDV suşlarına karşı immun yanıt verebilme yeteneğinde olmaları, meydana gelen immuntoleransın, virüsün enfekte ncp biyotipine karşı spesifik olduğunu ortaya koymuştur (15,16,83,131)

Poor Doers Sendromu, Weak Calf Sendrom veya büyümede gecikme gibi

isimler alan özel durumları sergileyen PI buzağular, yaşlılarından daha küçük yapıda doğabilmekte ve normal vücut gelişimleri daha yavaş olabilmektedir (75,114). Bu tür PI hayvanların çoğu, yetişkin yaşa erişmeden önce diğer bakteriyel ve viral etkenlere maruz kalmaları sonucu ölebilirler (114,124). Tüm PI buzağular bu şekilde etkilenmeyebilir ve çiftleşme ya da kesim yaşına ulaşabilirler (31,133).

Küçük vücut yapısına sahip PI buzağularda büyüme oranının düşük oluşu hücre mitozunun viral inhibisyonuna atfedilmekle beraber (75), PI buzağuların bir kısmının normal, bir kısmının ise zayıf yapılı olmalarının sebebi anlaşılmamıştır (7).

Hewicker ve ark. (59) BVDV ile PI 14 adet sığırdaki yaptıkları patolojik çalışmalarda çeşitli glomeruler lezyonlar gözlemişlerdir. Ohmann (104) tarafından yapılan bir çalışmada, klinik olarak sağlıklı BVDV ile PI olan 6-22 aylık danaların birçok organlarında ne sitopatoloji ne de yangısel cevap açısından hiçbir değişiklik saptanmamıştır. Fernandez ve ark.(42) tarafından gerçekleştirilen diğer bir çalışmada ise 25 adet PI sığırın merkezi sinir sistemindeki viral antijenlerin dağılımı incelenmiş, bu inceleme sonucunda BVDV antijeninin serebral korteks, hipokampus ile beyin ve omiriliğin değişik bölgelerinde küçük nöron grupları içinde lokalize olduğunu, fakat nöronlarda herhangi bir morfolojik değişiklik gözlenmeyip sadece nervöz dokularda perivasküler lenfosit infiltrasyonu şekillendiği tespit edilmiştir.

2.3.3.2. Mucosal Disease (MD)

MD, genellikle yaşamlarının 6-24. ayları arasındaki sığırlarda meydana gelen BVDV enfeksiyonunun sporadik formudur. Hastalık şiddetli klinik belirtiler, düşük morbidite ve yüksek mortalite ile karakterizedir. Yapılan araştırmalar

(15,22,82,87,91,132), PI ve immuntolerant sığırlar ile MD arasında yakın bir ilişki olduğunu göstermiştir .

MD'li sığırlardan hem cp hem de ncp BVDV biyotiplerinin izole edilmesi (15, 21) sonucu MD'in patogenezi biraz da olsa aydınlatılabilmektedir. Diğer bir deyişle MD, ncp virus ile persiste enfekte sığırların, cp virus ile süperenfekte olması sonucu gelişmektedir. Gerçekleştirilen deneysel araştırmalar ve saha gözlemleri bu hipotezi desteklemektedir (15,21). Modifiye canlı BVDV aşuları ile PI sığırların aşılınmaları sonucu MD olaylarının meydana geldiği bildirilmekle (120) beraber Bolin ve ark.(16) tarafından yapılan bir araştırmada bu şekilde aşılanan PI sığırlarda MD oluşumu başlanmamıştır. Böylece tüm cp biyotiplerin PI hayvanlarda MD meydana getirme yeteneğine sahip olamayacağı ortaya çıkmıştır.

PI hayvanlarda MD'e sebep olan cp BVDV biyotipinin nereden orijin aldığına dair iki görüş mevcuttur:

1) cp BVDV, sığır sürüleri içine dışarıdan girebilir (23,120). Fakat MD'in genellikle kapalı sürülerde meydana geldiği ve akut enfeksiyonlarda cp biyotip izolasyonunun çok nadir olarak gerçekleştirildiği düşünülürse bu görüşün geçerli olmadığı ortaya çıkmaktadır. Bununla beraber süperenfeksiyon meydana getiren cp biyotipin immun yanıtla karşılaşmaması için persiste olan ncp virusa antijenik benzerlik göstermesi gerekmektedir. Çeşitli BVDV suşları arasındaki serolojik farklılıklardan dolayı süperenfeksiyon meydana getirecek uygun antijenik yapıya sahip virusun sürüye dışarıdan girme ihtimali de çok azdır (23).

2) Diğer bir görüşe göre, cp BVDV orijini sürü içindeki viral mutasyondan almaktadır (22,66,116). Ncp virusun cp virusa mutasyonu hakkında yapılan laboratuvar çalışmalarında başarı elde edilememesine rağmen konuyla ilgili saha

çalışmaları bu olayın meydana gelebileceği fikrini vermiştir (23). Deneysel ve sahada meydana gelen MD olaylarından alınan serumların enfeksiyonun ortaya çıkmasına neden olan ne cp ne de ncp virusa karşı antikor taşımadıkları görülmüştür (15,23,101). Ancak bu tür serumlarda heterolog BVD viruslarına karşı düşük seviyede antikora rastlanabilmektedir. Bu nedenle PI hayvanlar, sahip oldukları virusa karşı immuntolerant olmalarına karşın diğer BVDV suşlarındaki belirli epitoplara tanıyabilme özelliğinde olabilmektedirler (22,83).

Howard ve ark. (66) dört adet, Pocock ve ark. (116) bir adet MD vakasından elde ettikleri cp ve ncp BVDV arasında antijenik homoloji tespit etmişler ve heterolog BVDV'unun sebep olduğu vakaya rastlanmadığını bildirmişlerdir. Fakat Stock ve ark. (132) MD'in şekillenmesi için cp ve ncp BVDV'ları arasında serotipik özdeşliğin her zaman gerekli olmadığını ileri sürmüşlerdir.

BVDV'una karşı gelişen maternal kolostral antikorların 6-8 ay kalabilmesi sebebiyle bu antikorların PI buzağuları MD'den koruyup korumadıkları tam olarak bilinmemektedir (13,120).

Akut MD, 6-24 aylık PI hayvanlarda aniden ortaya çıkan klinik bir hastalıkla karakterizedir. Morbidite düşük, mortalite genellikle % 100'dür (13,114). Enfeksiyonu geçiren hayvanlarda vücut ısısında 40-41 °C ye varan bir yükselme, solunum sayısında artış, taşikardi, rumen hareketlerinde durma, klinik belirtilerin başlamasından 2-4 gün sonra sulu, cıvık, kötü kokulu, değişik miktarda kan ve nadiren fibrinöz barsak parçaları içeren gaita, ayrıca defekasyonda zorlanma ve gaitayla daima bulaşık bir perineal bölge gözlenebilmektedir (15,90,101,111). Dudakların iç kısmında, diş etlerinde, sert damağın arka kısımlarında, commissura labiarumlarda ve dilde mukozal lezyonlara rastlanır (101,103). Oral lezyonlar,

MD'li hayvanların çok az bir kısmında görülmeyebilir. Burun delikleri civarında ise küçük erezyonlarla birlikte mukopurulent bir burun akıntısı vardır. Lakrimasyon ve korneal ödem bazen tespit edilebilir. Bazı hayvanlarda laminitis, coranitis ve çoğunlukla dört ayağı da etkileyen interdigital bölge derisinin eroziv lezyonlarına bağlı topallama görülür. Hayvanlarda çoğunlukla ilerleyen dehidrasyon ve zayıflama vardır, hastalık belirtilerinin görülmesinden 5-7 gün sonra ölüm meydana gelir. Klinik bulguların görülmesinden çok kısa süre içinde ölümlerle sonuçlanan perakut olaylarda muhtemelen paralitik ileusa bağlı olarak, barsaklar aşırı sıvı ile şişmiş olsa bile diyare görülmeyebilir (120).

Kronik MD, hastalığa yakalanan hayvanların beklenen süre içinde ölmemesi sonucu şekillenir. Arasına ortaya çıkan bir ishal, iştahsızlık, ilerleyen zayıflama, tüylerde matlık ve kuruma, tırnak deformiteleri, kronik timpani, ağız boşluğu ve deride kronik erezyonlar bulunabilir. Perineum, scrotum çevresi, preputial orificium ve vulvada, bacak aralarında, boynuz-deri birleşme bölgelerinde, parmak aralarında ve topukta üzeri kabukla kaplanmış yüzeysel eroziv lezyonlara rastlanabilmektedir. Bu deri lezyonlarının iyileşme oranlarındaki yüzdenin düşük oluşu, kronik MD'yi gösteren önemli klinik bulgulardır. Kronik olaylar bazen haftalar hatta aylarca sürebilir ve bu süre içinde hayvanlar gittikçe zayıflarlar (7,23,120).

2.4. Teşhis

Persiste BVDV enfeksiyonlarının kesin teşhisi direkt olarak yapılmakta, bu tür enfeksiyona sahip hayvanların serolojik durumları ise indirekt metodlarla tespit edilmektedir. PI hayvanların identifikasyonu amacıyla genellikle lökosit (10,47,48,83,99,106,118,) veya kan serumu (65,67,95,121)

örneklerinde virus ya da viral antijenlerin teşhisine yönelik yöntemler kullanılmaktadır. BVDV ya da antijenlerinin tespiti için yaygın olarak kullanılan testler arasında immunofloresan testi (IFT) (2,10,11,45,65,83,121), immunperoksidaz testi (Peroxidase Linked Antibody Assay - PLA) (48,65,67,95,119), interferens (52,128), monoklonal ELISA (99), hibridizasyon metodu (70), elektron mikroskopi (106), sentetik oligonükleotid yöntemi (81), flow cytometry (118,119) ve polymerase chain reaction (PCR) (88) bulunmaktadır. Ncp biyotip tarafından meydana getirilen ve buldukları sürüyü BVDV enfeksiyonu yönünden devamlı tehdit eden persiste enfeksiyona sahip hayvanların tespitinde en çok kullanılan testler IFT ve PLA'dır (2,10,13,45,48,119,121).

Sürü içerisindeki PI sığırların ayırt edilmesinde kullanılan en büyük kriter hayvanların serolojik durumlarına bakılmaksızın en az 3 hafta arayla iki kez lökosit numunelerinden BVDV veya antijeninin tespit edilmesidir (11). Akut BVDV enfeksiyonlarının viremi dönemindeki sığırlara ait kan numunelerinden BVDV'ünü izole etmek mümkün olacağından dolayı ikinci kez kan alınamayan sığırlarda persiste enfeksiyon olup olmadığı tam olarak kanıtlanmış olmaz (90).

Meyling (95) tarafından Danimarka'daki iki mezbahada kesilen yetişkin 1332 sığra ait serumun 12'sinde (% 0.9) indirekt peroksidaz yöntemiyle BVDV tespit edilmiş ve bu serumların 1042'sinin (%78) BVDV'una karşı nötralizan antikor taşımadığı ortaya konulmuştur. Aynı araştırmada (95) BVD'ye bağlı kayıpların görüldüğü 13 sürüdeki 363 sığrın 317'sinin (%87) BVDV'una karşı nötralizan antikor taşıdığı ve 46 seronegatif hayvanın 38'inin (%83) viremik olduğu saptanmıştır. Ayrıca BVD'den şüpheli 1313 sığırdan teşhis materyali olarak alınan

kan numunelerinin BVDV'una karşı nötralizan antikor taşıyan 620 adedinin 7 tanesinde , seronegatif olan 693'ünün ise 462'sinde BVDV izole edilmiştir.

Bolin ve ark. (14) 3157 adet sığırdan elde edilen lökositleri interferens ve IFT ile test etmeleri sonucu 60 sığıra ait lökositlerden BVDV izole etmişler, ilk örneklerin alınmasından iki ay sonra 60 sığırın 54'ünden elde edilen ikinci lökosit örneklerinde tekrar BVDV saptamışlardır. 3157 adet sığırdan alınan kan serumu örneklerinin ise % 89'unda immunodiffuzyon ve nötralizasyon testleriyle spesifik antikor tespit edilmiş ve nötralizasyon testinin presipitasyon testine göre daha duyarlı olduğu bildirilmiştir.

Howard ve ark. (67) serum numunesi alınan toplam 924 adet hayvanın 4 tanesinde PLA yöntemiyle persiste enfeksiyon saptamışlardır.

Alenius ve ark. (2) tarafından ilk tohumlamadan önce örneklenen 711 adet düvenin 12'sinden ncp BVDV izole edilmiş, bunlardan 3 tanesi ikinci kan örneği alınmadan kesime gönderilmiş ve BVDV antijeni yönünden pozitif olan diğer 9 düveden 4 ay sonra alınan kan örneklerinde virus tekrar izole edilmiştir. 711 düvenin % 41'inde serum nötralizasyon testi ile spesifik antikor tespit edilmiştir.

Shimizu ve Satou (128) tarafından Japonya'da interferens metodu kullanılarak gerçekleştirilen bir çalışmada, konjenital anomali salgını görülen bölgelerde yer alan 154 buzağıya ait lökositlerin incelenmesi sonucu 12 adet buzağıda persiste enfeksiyon saptanmış, epidemik olmayan bir bölgede yer alan 112 buzağıda ise persiste enfeksiyon tespit edilememiştir. Ayrıca PI buzağuların hiçbirinde BVDV'una karşı nötralizan antikor tespit edilmediği bildirilmiştir.

Jensen ve ark. (70) PI hayvanların daha kısa sürede tespiti amacıyla periferik kan mononükleer lökositlerinden hücre kültürlerine ekim yapılmaksızın direkt olarak BVDV RNA'sını saptamak için kullandıkları hibridizasyon yöntemi sonuçlarının,

IFT ve seronegatif sığırlara BVDV inokulasyonu sonuçlarıyla tutarlı olduğunu bildirmişlerdir.

Qvist ve ark. (119) lökositlerde lokalize olan viral antijenleri kantitatif olarak saptama ilkesine dayanan flow cytometry ile klasik immunperoksidaz yöntemini karşılaştırarak 143 adet kan örneğini incelemişlerdir. PI sığıra ait olduğu gösterilen 37 lökosit örneğinin hepsi flow cytometry ile, bu örneklerden 33 tanesi immunperoksidaz metodu ile pozitif bulunmuştur.

Mignon ve ark. (99) tarafından basit, duyarlı ve çabuk sonuç verdiği ileri sürülen, BVDV'unun 48 kD glikoprotein ve 120/80 kD proteinine karşı hazırlanmış monoklonal antikor kullanılarak üç adet PI buzağının lökositlerindeki antijenin tespit edilmesinde bir sandviç ELISA yöntemi geliştirilmiştir.

2.5. İmmunoloji

İneklerdeki sindesmokoriyal yapıdaki plasenta gebelik süresince maternal antikorların yavruya geçişine izin vermez. Bu nedenle maternal antikorlar, yeni doğan buzağılara ananın kolostrumu ile aktarılır (107,127).

Sığırlar fetal hayat esnasında immun kompetens hale gelirler ve gebeliğin hemen hemen ortasından itibaren antikor oluşturabilirler. BVDV'una karşı nötralizan antikorlar, çeşitli araştırmacıların (18,27,38,86) yaptıkları deneysel ve saha çalışmalarında gebeliğin 90-168. gününden itibaren tespit edilebilmiştir .

Gebeliğin erken dönemlerinde virusa maruz kalan fötuslarda immuntolerans şekillenir (31,93,133). Bu durum genelde spesifik antijene karşı reaktif lenfositlerin sayıca azalması, fonksiyon eksikliği veya inaktivasyonunun bir sonucu olabilir (107).

Pestivirüslerin, immun sistem hücrelerinde de ürediklerinden virus

persistensine olanak sağlayacak şekilde konakçı savunma mekanizmasında değişiklikler meydana getirdikleri düşünülmektedir. BVDV ile meydana gelen konjenital enfeksiyonlarda lenfoid doku harabiyetine bağlı bulgular da mevcuttur. Enfekte hayvanlarda timik involüsyon, atrofi, deplesyon, histiyosit hiperplazisi ve retikuloendoteliyal proliferasyon saptanabilmektedir. Bir diğer etki adrenal hiperplazi olup sonuçta artan glukokortikosteroid miktarı PI hayvanlarda lenfosit tahribatından sorumludur (107).

Viral persistensteki önemli diğer faktör interferon yanıtıdır. Bazı araştırmacılar (90) tarafından BVDV ile enfekte edilen hücre kültürlerinde interferon üretiminin baskılandığı bildirilirken, diğer bazı araştırmacılar (107) tarafından BVDV ile gebeliğinin 95. ya da 149-150. günlerinde intrauterin olarak enfekte edilen danaların dokularında yetişkin sığırların dokularındakilerle aynı oranda interferon üretildiği gözlenmiş ve yetersiz interferon yanıtının BVDV'unun persistensinde bir faktör olmadığı ileri sürülmüştür.

BVDV enfeksiyonunu takiben meydana gelen humoral immuniteden sorumlu olan en önemli antikorlar nötralizan antikorlardır. Enfeksiyondan 3-4 hafta sonra saptanacak düzeye ulaşan nötralizan antikorlar, yaklaşık bir yıl süre ile etkili olurlar (39,124).

BVDV ilk olarak sindirim sistemine affinite gösterse de lenforetiküler dokulara karşı güçlü affiniteye sahiptir. Enfeksiyondan sonra lenf düğümü ve dalakta nekroz odakları tespit edilebilir. İnce barsaklarda payer plaklarının harabiyeti, lenf düğümlerinin kortikal ve medullar bölgeleri arasındaki farklılığın azalması ve lenfotik dokuların genel olarak atrofisi şekillenebilir (7). Hastalığın erken döneminde haftalarca kalan lökopeni ve anemi gözlenir. BVDV ile enfekte hayvanların

%85'inden fazlası bakteriyemik de olabilir. Bu durumu, virusun meydana getirdiği immunosupresyonu desteklemektedir (7). Son yıllarda yapılan araştırmalarda BVDV'unun neden olduğu immunosupresyon hakkındaki bilgiler; farklı mitojenlere karşı periferel lenfositlerin cevap verebilme özelliklerinin düşmesini (71,79,125), T lenfositlerin yüzdesi ve sirküle olan B ve T lenfositlerinin absolut miktarlarında (17,80), humoral antikor üretiminde (32,34) ve periferel lenfositler tarafından gerçekleştirilen Ig sekresyonunda azalmayı (71), spontanöz bakteriyeminin indüklenmesi ve vücudun bakteriden arındırılması mekanizmasındaki düşüşü (7), bovine respiratory disease kompleksinin meydana gelmesinde BVDV ile Pasteurella hemolytica arasındaki sinerjizmi (7) kapsamaktadır.

Brown ve ark. (19) tarafından 1991 yılında gerçekleştirilen bir araştırmada BVDV ile PI sığırlardan elde edilen nötrofillerin, enfekte edilmemiş kontrol grubu ile karşılaştırıldığında agaroz içindeki migrasyonları, sitokrom-C redüksiyonu, iodinasyon, hücreye bağımlı sitotoksiste, oxidant üretimi ve sitoplazmik kalsiyum değişiminde önemli düşüş gözlemlendiği bildirilmiştir.

Coulibaly ve ark. (34) tarafından gebeliğin 50-265. günü arasında aşılanan analardan doğan buzağılara ait serum örneklerinin incelenmesi sonucu 44 adet BVDV'una karşı virolojik açıdan negatif, serolojik açıdan pozitif buzağılarda Ig G₁ miktarı ortalama 106.36 mg/100 ml. , Ig G₂ miktarı 10.49 mg/100 ml.; 27 adet serolojik ve virolojik açıdan negatif buzağılarda Ig G₁ 18.47 mg/100 ml., Ig G₂ 6.63 mg/100 ml. olarak tespit edilirken, viremik ve seronegatif 10 adet buzağıda ise Ig G₁ 34.78 mg/100 ml., Ig G₂ 8.34 mg/100 ml. olarak tespit edilmiştir.

2.6. Koruma ve Kontrol

Çeşitli ruminantlarla kontakt (26,35), PI sığırlar (27,92,124), virüsle

kontamine sperma (1,8,74,96,123), embriyo transferi (1,65), virüsle enfekte malzemeler (54,124), çeşitli sinek türleri (54,134) vasıtasıyla bulaşmanın meydana gelebilmesi ve gebe hayvanlarda modifiye canlı aşuların kullanılması (86,110) gibi birçok sebepten dolayı BVDV'undan tamamen arındırılmış bir sürüyü uzun süre enfeksiyondan korumak oldukça zor olmaktadır.

Enfeksiyonun en iyi kontrolü; PI hayvanların identifikasyonu ve sürüden eradike edilmesi, bununla beraber transplasental enfeksiyonların önlenmesi ile sağlanabilir(7).

Birçok araştırmacıya (11,102,124) göre, vücut sekresyon ve ekskresyonları ile büyük miktarda virüsü devamlı olarak etrafa saçan ve enfeksiyonu yeni meydana gelen generasyonlara aktaran PI hayvanlar, BVDV enfeksiyonlarının yayılmasında ve sürüler içinde enfeksiyonun devamında en önemli rolü üstlenmektedirler . Bu durum karşısında BVDV enfeksiyonlarının kontrol ve eradikasyonunda ilk adım, PI hayvanların saptanması ve sürüden çıkarılmasıdır.

Çiftleşmeden önce yapılacak aşılanmanın yeterli koruma vereceği söylenebilir. Canlı modifiye BVDV aşısı ile aşılanmayı takiben muhtemelen sadece PI hayvanlarda MD benzeri bazı klinik semptomlar şekillenir (120). Bu tür hayvanlar sürüden hemen uzaklaştırılmabılır. Fakat tek aşılanma tüm serotiplere karşı etkili olmayacağından enfeksiyonu elemine etmek ya da tekrar sürüye girmesini engellemek için diğer tedbirlerin alınması gerektiği tavsiye edilmektedir (120).

PI hayvanların eliminasyonunu takiben, BVDV'undan arındırılmış bu sürü, dikkatli bakım ve sürüye yeni girecek hayvanların iyi seçimi ile idame ettirilmelidir. Pratikte bir sürünün tamamıyla negatif olarak korunması zor olabilir, bu nedenle sürü en az bir sene müddetle yeni hayvan katılımına kapatılmalıdır. Bu yönde

herhangibir şüphe mevcutsa antikor negatif hayvanlar virus yönünden kontrol edilmeli veya viremik olmayan seronegatif test hayvanlarıyla yakın temasta bırakılmalıdır (120).

Sun'i tohumlama ünitelerine alınacak boğalar da serolojik ve virolojik yönden test edilmelidirler. Persiste viremik hayvanlar bu ünitelerden uzak tutulmalıdır (124).

PI hayvanların ayırt edilmesinden sonra, çiftleşme zamanında immunité sağlanarak immuntolerans ve persiste enfeksiyonun oluşmasına neden olan transplasental enfeksiyonların önlenmesine önem verilmelidir (7).

Fötusun ve damızlık dişilerin BVDV enfeksiyonundan başarıyla korunmasında anahtar ilke damızlıkların çiftleşmeden 3-4 hafta önce aşılmasıdır (7,120). Çiftleşmeden önce anaların virusa maruz kalmaları, serum nötralizan antikorlarının oluşumunu stimüle eder ve meydana gelen antikorlar, belirli bir süre fötusu homolog virusla enfekte olduğunda, transplasental enfeksiyona karşı korur. Non-immun annelerde fetal ölüm ve intrauterin gelişme noksanlığı insidansı daha fazla bulunmuştur. Bu nedenle maternal immunitenin varlığı fötusu homolog enfeksiyonlardan koruyacaktır (120). Fötusun korunmasına yönelik immunizasyon, aşının içerdiği farklı serotiplere karşı etkili olmayabilir. Meyling ve ark. (98) tarafından yapılan bir araştırmada inaktive BVDV aşısı kullanımının, koruma tam olmasa bile enfekte eden suşun heterojenitesine bağlı olarak fötusu koruyacağı iddia edilmektedir. Buna karşılık sığırlarda tohumlama öncesi serolojik yanıt oluşturan inaktive quadrivalan bir aşı, fötusların yaklaşık 1:3'ünü multiple heterolog challenge suşlarına karşı transplasental enfeksiyondan korumada başarısız kalmıştır (58).

Gebe ineklerin aşılması genel olarak tavsiye edilmemektedir (98). Modifiye canlı BVDV aşısı ile gebe ineklerin aşılması, aynen doğal BVDV enfeksiyonlarında olduğu gibi fötusun yaşına bağlı olarak fötus üzerinde çeşitli etkiler oluşturabilmektedir (86,110).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Virus

Direkt immunofloresan testi (IFT) ve serum nötralizasyon (SN) testlerinde cp BVDV'unun referans NADL suşu kullanıldı.

3.2. Hücre Kültürü

Virus izolasyonu, IF ve SN testlerinde; kullanılmadan önce BVDV kontaminasyonu yönünden direkt IFT ile kontrol edilerek negatif olduğu tespit edilen fetal dana böbrek (FDB) hücre kültürü kullanıldı.

3.3. Dana Serumu

Hücre kültürü çalışmalarında gerekli olan dana serumu Et ve Balık Kurumu (EBK) Konya Et Kombinasyonu'nda kesilen danalardan sağlandı. Serumlar, 56°C de 30 dakika inaktive edildikten sonra filtrasyon yöntemiyle sterilize edildi. Şişelere bölünen serumlar, sterilite kontrolünden sonra -20°C lik derin dondurucuda saklandı. Serumlar, kullanılmadan önce BVDV antijeni yönünden direkt IFT, BVDV antikoruna yönünden SN testi ile kontrol edildi.

3.4. Konjugat

Araştırmada direkt IFT'nde kullanılan BVDV konjugatı, A.Ü. Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalından temin edildi.

3.5. Araştırmada Kullanılan Hayvanlar

Araştırmada Konya Merkez Araştırma Enstitüsü'ne ait 4 sürüde yer alan 112 sığır ve özel bir işletmeye ait 1 sürüde yer alan 30 sığır olmak üzere 6-24 aylık , klinik olarak sağlıklı , toplam 142 adet hayvan kullanıldı (Tablo 2).

Sürü No	Hayvan No	Cinsi	İlk Örneklemdeki Yaşı (Ay)	Bulunduğu İşletme	Yetiştirme Amacı	Sürü No	Hayvan No	Cinsi	İlk Örneklemdeki Yaşı (Ay)	Bulunduğu İşletme	Yetiştirme Amacı
I	1	E	14	H.M.A.E.	Etçi	III	72	D	14	H.M.A.E.	Sütçü
I	2	E	15	*	*	III	73	D	10	*	*
I	3	E	24	*	*	III	74	D	14	*	*
I	4	E	11	*	*	IV	75	D	21	*	*
I	5	E	14	*	*	IV	76	D	20	*	*
I	6	E	15	*	*	IV	77	D	15	*	*
I	7	E	14	*	*	IV	78	D	16	*	*
I	8	E	15	*	*	IV	79	D	20	*	*
I	9	E	21	*	*	IV	80	D	18	*	*
I	10	E	16	*	*	IV	81	D	21	*	*
I	11	E	10	*	*	IV	82	D	19	*	*
I	12	E	12	*	*	IV	83	D	20	*	*
I	13	E	12	*	*	IV	84	D	20	*	*
I	14	E	14	*	*	IV	85	D	23	*	*
I	15	E	15	*	*	IV	86	D	22	*	*
I	16	E	20	*	*	IV	87	D	21	*	*
I	17	E	19	*	*	IV	88	D	19	*	*
I	18	E	14	*	*	IV	89	D	19	*	*
I	19	E	14	*	*	IV	90	D	24	*	*
I	20	E	10	*	*	IV	91	D	21	*	*
I	21	E	14	*	*	IV	92	D	20	*	*
I	22	E	6	*	*	IV	93	D	24	*	*
I	23	E	14	*	*	IV	94	D	22	*	*
I	24	E	14	*	*	IV	95	D	23	*	*
I	25	E	14	*	*	IV	96	D	14	*	*
I	26	E	11	*	*	IV	97	D	18	*	*
I	27	E	14	*	*	IV	98	D	21	*	*
I	28	E	14	*	*	IV	99	D	22	*	*
II	29	D	6	*	Sütçü	IV	100	D	18	*	*
II	30	D	6	*	*	IV	101	D	21	*	*
II	31	D	6	*	*	IV	102	D	24	*	*
II	32	E	6	*	Etçi	IV	103	D	21	*	*
II	33	E	7	*	*	IV	104	D	17	*	*
II	34	E	6	*	*	IV	105	D	21	*	*
II	35	E	7	*	*	IV	106	D	24	*	*
II	36	D	6	*	Sütçü	IV	107	D	19	*	*
II	37	E	6	*	Etçi	IV	108	D	19	*	*
II	38	D	6	*	Sütçü	IV	109	D	24	*	*
II	39	D	6	*	*	IV	110	D	24	*	*
II	40	E	6	*	Etçi	IV	111	D	10	*	*
II	41	E	7	*	*	IV	112	D	23	*	*
II	42	E	12	*	*	V	113	E	18	Özel İşletme	Etçi
II	43	E	14	*	*	V	114	E	18	*	*
II	44	E	13	*	*	V	115	E	18	*	*
II	45	D	6	*	Sütçü	V	116	E	18	*	*
II	46	E	9	*	Etçi	V	117	E	18	*	*
II	47	E	9	*	*	V	118	E	18	*	*
II	48	E	8	*	*	V	119	E	18	*	*
II	49	E	11	*	*	V	120	E	18	*	*
II	50	E	6	*	*	V	121	E	18	*	*
III	51	D	16	*	Sütçü	V	122	E	18	*	*
III	52	D	14	*	*	V	123	E	18	*	*
III	53	D	11	*	*	V	124	E	18	*	*
III	54	D	9	*	*	V	125	E	18	*	*
III	55	D	12	*	*	V	126	E	24	*	*
III	56	D	18	*	*	V	127	E	18	*	*
III	57	D	15	*	*	V	128	E	16	*	*
III	58	D	9	*	*	V	129	E	17	*	*
III	59	D	18	*	*	V	130	E	24	*	*
III	60	D	15	*	*	V	131	E	18	*	*
III	61	D	14	*	*	V	132	E	18	*	*
III	62	D	15	*	*	V	133	E	18	*	*
III	63	D	18	*	*	V	134	E	19	*	*
III	64	D	14	*	*	V	135	E	16	*	*
III	65	D	15	*	*	V	136	E	17	*	*
III	66	D	15	*	*	V	137	E	17	*	*
III	67	D	12	*	*	V	138	E	18	*	*
III	68	D	18	*	*	V	139	E	18	*	*
III	69	D	14	*	*	V	140	E	18	*	*
III	70	D	18	*	*	V	141	E	18	*	*
III	71	D	10	*	*	V	142	E	18	*	*

H.M.A.E.: Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü

D: Dişi E: Erkek

Tablo 2. Araştırmada kullanılan hayvanlar.

3.6. Virus İzolasyon Materyalleri

Virus izolasyonu amacıyla arařtırmada kullanılan beř sűrtűye ait klinik olarak saęlıklı toplam 142 adet sığırın lűkosit űrnemleri, FDB hűcre kűltűrűnde yapılan bir kűr pasajı takiben IFT ile BVDV antijeni yűnűnden kontrol edildi. Test sonucunda pozitif olduęu ortaya çıkan sığırardan yaklaşık 2 ay sonra ikinci kez alınan lűkosit űrnemleri BVDV antijeni yűnűnden tekrar IFT ile kontrol edildi.

3.7. Araştırmada Kullanılan Serum Numuneleri

Arařtırmada lűkosit numunelerinden virus izole etmek için kan alınan 142 adet sığırdan aynı zamanda kan serum numuneleri alınarak SN testi ile BVDV antikoru yűnűnden kontrol edildi. Alınan serum numuneleri SN testinden űnce, 56°C lik su banyosunda 30 dakika inaktive edilerek sterilite kontrolűnden sonra kullanılmaya kadar -20°C de saklandı.

3.8. Hűcre Kűltűrűnűn Hazırlanması

FDB hűcre kűltűrűnűn hazırlanmasında kullanılan sığır fűtus bűbrekleri EBK Konya Et Kombinasyonu'nda ve űzel Konet Mezbahası'nda kesilen gebe ineklerden saęlandı.

Konsantre antibiyotik içeren Phosphat Buffer Saline (PBS) içinde laboratuvara getirilen bűbrekler, steril űartlarda kapsulalarından ayrıldıktan sonra medulla tabakasına ulařmayacak biçimde kortekslerinden kűuk parçalar alındı. Steril bir petri kutusuna alınan bu doku parçaları, makas ve bistűri kullanılarak daha kűuk parçalara bűlűndű. Bir erlenmayer içerisinde en az 3-4 kez PBS ile yıkanan parçacıklar, % 0.25 lik tripsin* ile oda ısısında ve magnetik karıřtırıcıda 20'űer dakikalık sűreyle 6-7 kez

*Difco, Detroit-Michigan, USA.

tripsinizasyona tabi tutuldu. Her tripsinizasyon aşamasında toplanan tripsin ve hücre karışımı +4°C de saklandı.

Tripsinizasyon işleminin sonunda elde edilen karışım 800-1000 devirde +4°C de 10 dakika süreyle santrifüj edildi. Santrifüj sonunda elde edilen hücreler 3.5×10^5 hücre/ml olacak şekilde % 10 inaktif dana serumu ya da fetal dana serumu* (FDS) ve % 50 Hank's + % 50 Eagle's MEM** vasatı ile sulandırılarak hücre kültürü şişelerine aktarıldı ve 37 °C lik etüvde üremeye bırakıldı. Üreyen hücreler, testlerde kullanılmadan önce BVDV antijeni yönünden direkt IFT ile kontrol edildi. Santrifüj işlemi sonunda elde edilen hücrelerin bir kısmı ise 6×10^6 hücre/ml. olacak şekilde % 50 FDS'lu Hank's vasatı ile sulandırılarak % 10 dimethylsulphoxide*** (DMSO) ilavesini takiben birer ml.lik tüplere**** dolduruldu. +4 °C ve -20 °C de 30'ar dakika bekletilerek dondurulan hücreler, kullanılıncaya kadar sıvı azot içinde saklandı.

Dondurulan hücreler kullanılacağı zaman 37°C de su banyosunda çözüldü. % 20 FDS içeren Hank's + Eagle's MEM vasatı ile sulandırılarak hücre kültürü şişelerine aktarıldı. Hazırlandıktan hemen sonra ya da dondurulup çözüldükten sonra hücre kültürü şişelerine aktarılan hücrelerin vasatı 48 saat sonra, hücre yüzeyleri PBS ile yıkanarak % 10 FDS'lu Hank's + Eagle's MEM vasatı ile değiştirildi. Hücreler tek katlı üremelerini tamamlayıncaya kadar vasat değiştirme işlemi 2-3 günde bir tekrarlandı.

3.9. Virusun Üretilmesi

250 ml.lik hücre kültürü şişesinde üretilen FDB hücre kültürüne, 0.5 ml.

* Sigma, St. Louis, USA.

** Gibco, P.O.Box 35, Paisley-Scotland, UK.

*** Merk, Germany.

****Nunc, Denmark.

BVDV'unun cp biyotipi olan NADL suşu inokule edildi. 37°C de 1 saat virusun adsorbsiyonu için bekletilen hücre kültürlerine eşit hacimlerde Eagle's MEM (EMEM) ve Hank's Laktalbumin (HLA) kombinasyonundan oluşan vasattan ilave edildi. Hücre kültürleri tekrar 37°C de inkubasyona bırakıldı. 72-96. saatte % 90 oranında CPE gösteren hücre kültürleri dondurma çözündürme işleminden sonra +4°C de 30 dakika santrifüj edildi. Elde edilen virus süspansiyonu 1 ml. olarak virus saklama tüplerine taksim edilerek likit nitrojen tankında muhafaza edildi. Virus türetilmesi, hücre kontrolü ile birlikte yürütüldü.

3.10. Virusun Mikrotitrasyon Yöntemi İle Enfeksiyözite Gücünün Saptanması

BVDV'unun NADL referens suşunun titresini Frey ve Liess (49)'in bildirdikleri yöntemle yapıldı.

Virus, EMEM + HLA vasatı içinde log 10 tabanına göre sulandırıldı. Her sulandırma basamağından mikrotitrasyon tablasında 4'er göze 0.1 ml. kondu. Virus kontrol için 4 göze serumsuz 0.05 ml. EMEM + HLA vasatı ve 0.05 ml. sulandırılmamış virusdan, hücre kontrol için ise 4 göze 0.1 ml. serumlu EMEM + HLA vasatı konuldu. Virus sulandırmaları ve kontrollerin üzerine çok kanallı pipet* yardımıyla 3×10^5 /ml. olacak şekilde hazırlanan FDB hücre kültürü süspansiyonundan 0.05 ml. damlatıldı. Mikrotitrasyon tablasının üzeri toksik olmayan, şeffaf bant** ile kapatılarak 37°C lik CO₂'li etüvde inkubasyona bırakıldı. Her gün doku kültürü mikroskopunda hücrelerde meydana gelen sitopatolojik değişiklikler kontrol edilerek, 4. günün sonunda elde edilen sonuçlara göre, Kaerber (72) metodu ile virus titresini saptandı.

* Socorex, Swiss.

** Titertek, Flow Laboratories, Finland.

3.11. Lökositlerden Virus İzolasyonu

EDTA'lı tüplere* alınan kan 2000 devirde 10 dakika süreyle santrifüj edildi. Santrifüj sonunda oluşan lökosit tabakası pastör pipeti ile toplanarak 5 ml. hacminde PBS ile 3 kez yıkandı. Son yıkamayı takiben, lökositler 3 ml. PBS içinde sulandırıldıktan sonra sterilite kontrolü yapıldı. % 10 DMSO ilave edilen numuneler kullanılana kadar derin dondurucuda saklandı.

Virus izolasyonu amacıyla hazırlanan lökosit örnekleri, daha önce BVDV yönünden kontrol edilerek negatif olduğu saptanan FDB hücre kültüründe bir kez pasajlandı. Bu amaçla hücre kültürü tüplerine** % 5 FDS kapsayan EMEM + HLA vasatı içinde 1×10^5 /ml olacak şekilde sulandırılmış FDB hücresinden 2 ml. konularak 37°C de 24 saat bekletildi. Bu süre sonunda hücre yüzeyleri 37°C de ısıtılmış PBS ile yıkandıktan sonra her numuneden 0.2 ml. hacimde olmak üzere, birer adet tüpe inokule edilip, üzerine EMEM+HLA vasatı eklendikten sonra 24 saat süreyle inkubasyona bırakıldı. Inkubasyonu takiben içerikleri dökülen tüpler PBS ile yıkandıktan sonra tekrar 2 ml. hacimde idame vasatı ilave edilerek 5-7 gün süreyle 37°C de tekrar inkubasyona bırakıldı. Daha sonra hücreler dondurulup çözülerek 3000 devirde santrifüj edildi. Üstte kalan sıvı, BVDV antijenlerinin tespiti amacıyla IFT'ne tabi tutuldu.

IFT sonucunda lökositlerinde BVDV antijeni tespit edilen hayvanlardan, enfeksiyonun akut ya da persiste enfeksiyon olup olmadığını ayırt etmek amacıyla ilk örneklemeden yaklaşık 2 ay sonra ikinci kez lökosit numuneleri toplandı. Bu örnekler de FDB hücre kültürlerinde bir kez pasajlandıktan sonra IFT'ne tabi tutuldular.

* Greiner, Germany

**Greiner, Germany

3.12. Konjugat Titresinin Hesaplanması

Bu amaçla Hyera ve ark. (69) 'nın bildirdiği yöntem kullanıldı.

CCSC sistemi lamellerinde üretilen FDB hücresine daha önceden titresi hesaplanan ve 1000 DKID₅₀ oranında sulandırılan stok virustan lamellere 0.1 ml. miktarında inokule edildi. 24 saat süren inkubasyondan sonra virus üretme vasatı dökülerek 0.1 M PBS ile yıkanan hücreler 10 dk. müddetle aseton ile fikse edildi. Konjugat, 0.1 M PBS ile 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50 oranlarında sulandırılarak her bir sulandırma için bir göze 0.1 ml. miktarında inokule edildi. 37°C de nemli ortamda 1 saat inkubasyondan sonra 3 kez 0.1 M PBS ile yıkanan lameller %20 gliserin kullanmak suretiyle lam üzerine kapatıldı ve IF mikroskopunda kontrol edildi. Spesifik floresan parlamanın en iyi olduğu konjugat sulandırması tespit edildi.

3.13. Direkt İmmunofloresan Testi

Bu amaçla Orban ve ark. (110) 'nın bildirdikleri yöntemden yararlanıldı.

Tabanına lamel yerleştirilmiş altı gözlü pleytlere* EMEM + HLA vasatı ve % 5 FDS içeren, 1×10^5 /ml. olacak şekilde hazırlanan BVDV yönünden negatif FDB hücre süspansiyonundan 2 ml. kondu. 37 °C de 24 saat süren inkubasyonu takiben lökositlerin pasajından sağlanan sıvılardan 0.2 ml. miktarında inokule edildi. 72 saat inkubasyondan sonra 0.1 M NaCl + Tween 20 ile yıkanan hücreler aseton ile 10 dak. fikzasyona bırakıldı. Titresi oranında sulandırılan (1:30) konjugat 0.2 ml. oranında lamellerin üzerine damlatıldı ve 37°C lik nemli ortamda 1 saat süreyle inkube edildi. 0.1 M NaCl + Tween 20 ile yıkanan lameller %20 gliserin yardımıyla lamlara

*Linbro, Flow Laboratories Inc., Hamden-Connecticut, USA.

kapatılarak floresan mikroskopta 25'lik objektif kullanılarak değerlendirildi. Test, hücre kontrol ve virus kontrolleri ile birlikte yürütüldü.

3.14. İzolatların FDB Hücre Kültürlerindeki Sitopatojenik Özelliklerinin Saptanması

Bu amaçla yine BVDV yönünden negatif olduğu bilinen FDB hücre kültürleri kullanıldı. IFT ile viral antijenin varlığı tespit edilen hayvanlara ait izolatların, IFT'ne tabi tutulmadan önce bu hayvanlardan alınan lökosit örneklerinin hücre kültürlerine ekilmesinde izlenen metotla, 5 kör pasajı yapıldı. Herbir pasajdan sonra doku kültürü mikroskobu ile hücreler CPE yönünden incelendi.

3.15. Serolojik Testler

3.15.1. Mikronötralizasyon Testi

Test, Frey ve Liess (49)'ün bildirdikleri yöntemine göre yapıldı. Kontrol edilecek serumlar deney tüplerinde 1:5 oranında sulandırıldı. Her bir serum sulandırmasından mikronötralizasyon tablasındaki 4 göze 0.05 ml. kondu. Bu sulandırmalar üzerine eşit miktarda titresi bilinen virustan ($100DKID_{50}=10^{-3.5}/0.1$ ml.) eklendi.

Mikronötralizasyon tablasının üzeri hücreler için toksik olmayan yapıştırıcı bant ile kapatılarak 37°C lik CO₂'li etüvde 1 saat inkubasyona bırakıldı. Süre sonunda tablanın üzerindeki bant kaldırılarak özel pipet yardımıyla gözlere 0.05 ml. FDB hücresi (3×10^5 hücre /ml.) damlatıldı. Tablanın üzeri tekrar özel şeffaf bant ile örtülerek 37°C lik etüve kaldırıldı. Doku kültürü mikroskobunda yapılan kontrollerle sonuçlar 5. günde hücrelerde meydana gelen sitopatolojik değişikliklere göre değerlendirildi.

3.15.2 Pozitif Serumların Serum Nötralizasyon (SN₅₀) Değerlerinin Saptanması

Mikronötralizasyon testi sonunda 1:5 sulandırmada pozitif bulunan serum örneklerindeki antikor titreleri, yine mikronötralizasyon yöntemi ile tespit edildi. Bu amaçla pozitif bulunan 1:5'lik serum sulandırmalarının herbirinden ayrı ayrı mikronötralizasyon tablasının ilk 4 gözüne 0.1 ml. kondu. Daha sonra alttaki diğer gözlerle özel pipet yardımıyla 0.05 ml. EMEM + HLA + %5 FDS içeren vasat damlatıldı. Çok kanallı mikropipet yardımıyla ilk gözlerden başlayarak alt sıradaki gözlerle 0.05 ml. taşımak suretiyle, serumlar 1:320'ye kadar sulandırıldı. Sulandırma işleminden sonra titresi bilinen virustan ($100 \text{ DKID}_{50} = 10^{-3.5}/0.1 \text{ ml.}$) özel pipet yardımıyla tablanın bütün gözlerine 0.05 ml. damlatıldı. Mikronötralizasyon tablasının üzeri özel yapıştırıcı bant ile kapatıldı ve 37°C lik CO₂'li etüvde 1 saat inkubasyona bırakıldı. Bu süre sonunda tablanın üzerindeki bant kaldırılarak her göze özel pipet yardımı ile FDB hücre süspansiyonundan (3×10^5 hücre/ml.) 0.05 ml. konuldu. Tablanın üzeri yeniden özel yapıştırıcı bant ile kapatıldı ve 37°C lik CO₂'li etüvde inkubasyona bırakıldı. 5. günde doku kültürü mikroskobu ile yapılan kontrollerden sonra sitopatolojik değişikliklere göre değerlendirilerek pozitif serumlardaki antikor titreleri Kaerber'e (72) göre saptandı.

4. BULGULAR

4.1. Virusun Üretilmesi

BVDV'unun cp NADL suşu, FDB hücre kültürüne yapılan inokulasyonlarda 72-96. saatlerde karakteristik sitopatolojik değişiklikler meydana getirdi (Resim 1,2).

4.2. Virusun Titresi

BVDV'unun NADL suşunun FDB hücre kültüründe, mikrotitrasyon yöntemiyle yapılan titrasyonunda enfeksiyözite gücü $DKID_{50}=10^{-5.5}/0.1$ ml. olarak belirlendi.

4.3. Konjugat Titresi

CCSC sisteminde, FDB hücre kültüründe ve $1000 DKID_{50}/0.1ml.$ oranında sulandırılmış NADL suşu ile yapılan IFT sonucunda konjugat titresi 1:30 olarak saptandı.

4.4. Direkt İmmunofloresan Testi Sonuçları

Birinci örneklemede IFT'ne tabi tutulan 142 adet hayvandan; bir tanesi III üncü sürüye ait 56 nolu, diğeri IV üncü sürüye ait 99 nolu hayvan olmak üzere, toplam 2 adedinde BVDV antijeni tespit edildi (Resim 3,4,5). BVDV antijeni yönünden pozitif bulunan bu 2 hayvanın akut bir enfeksiyon mu geçirdikleri yoksa persiste bir enfeksiyona mı sahip olduklarını ayırt etmek amacıyla ilk örneklemeden yaklaşık 2 ay sonra alınan lökosit numunelerinin ikinci kez IFT'ne tabi tutulmaları sonucu her iki hayvanda da BVDV antijeni tespit edilemedi (Tablo 3). İkinci örneklemede BVDV antijeni tespit edilemeyen bu hayvanların birinci örnekleme esnasında akut subklinik bir enfeksiyon geçirmekte oldukları kanısına varıldı.

4.5. İzolatların Sitopatojenik Özellikleri

İlk örnekleme sırasında IFT ile BVDV antijeni yönünden pozitif bulunan 2 hayvana ait izolatin, FDB hücre kültüründe beş kör pasajı neticesinde CPE meydana getirmedikleri gözlemlendi. Bu iki izolatin nec karakterde olduğu kanısına varıldı.

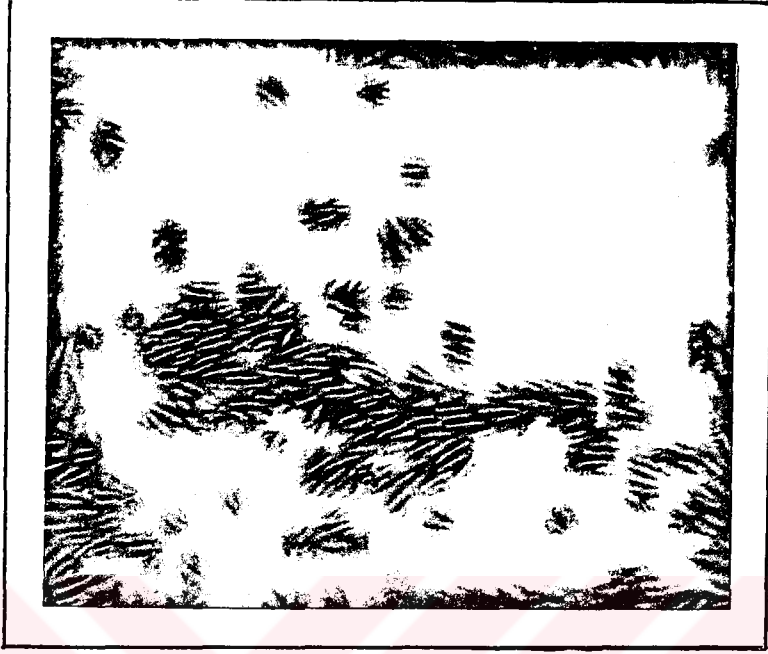
4.6. Serum Nötralizasyon Testi Sonuçları

4.6.1. Mikronötralizasyon Testi İle Pozitif Serumların Saptanması

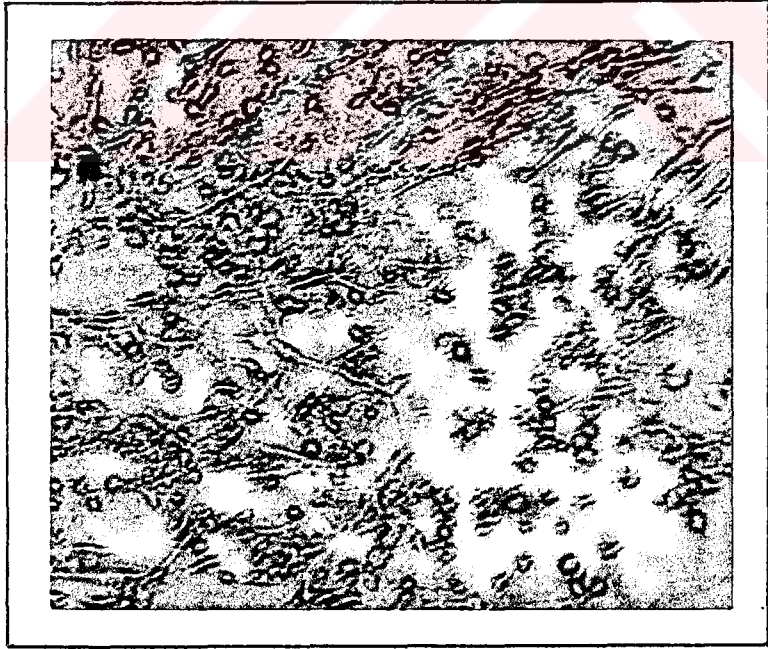
Mikronötralizasyon testi ile BVDV antikorları yönünden kontrolü yapılan 142 sığır kan serumunun 113 adedi (% 79.5) 1:5 sulandırmada pozitif bulundu. Pozitif serumların kan serumu alınan sürülere göre dağılımı Tablo 4'de gösterildi. İlk örneklemede BVDV antijeni yönünden pozitif olan iki hayvandan, ikinci kez test edilmesi amacıyla lökosit örnekleriyle beraber serum örnekleri de alındı. İkinci örneklemede, III üncü sürüye ait 56 nolu hayvanda BVDV'una karşı 1:56.3 oranında antikor tespit edilirken, IV üncü sürüye ait 99 nolu hayvanda ise 1:112 oranında spesifik antikorlar saptandı.

4.6.2. Pozitif Serumların Serum Nötralizasyon (SN₅₀) Değerleri

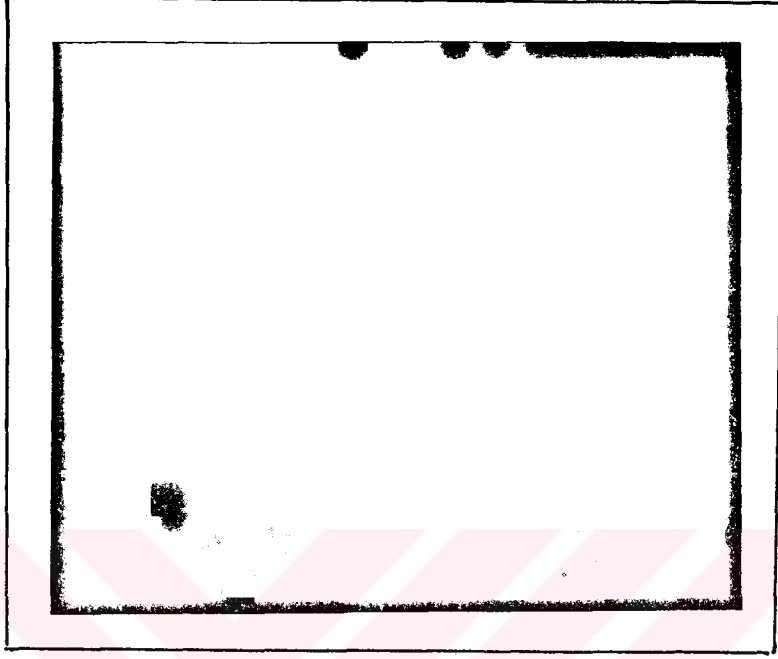
İlk örneklemede mikronötralizasyon test yöntemi ile 1:5 sulandırmada pozitif sonuç veren 113 serumun, serum nötralizasyon değerleri ve bunların dağılımları Tablo 5'de gösterildi.



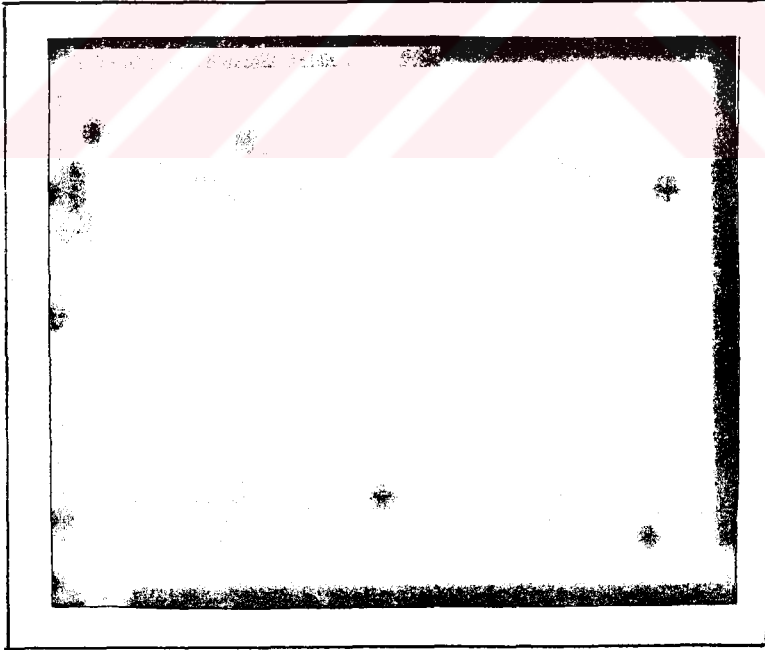
Resim 1. FDB hücre kültürü kontrol (x200).



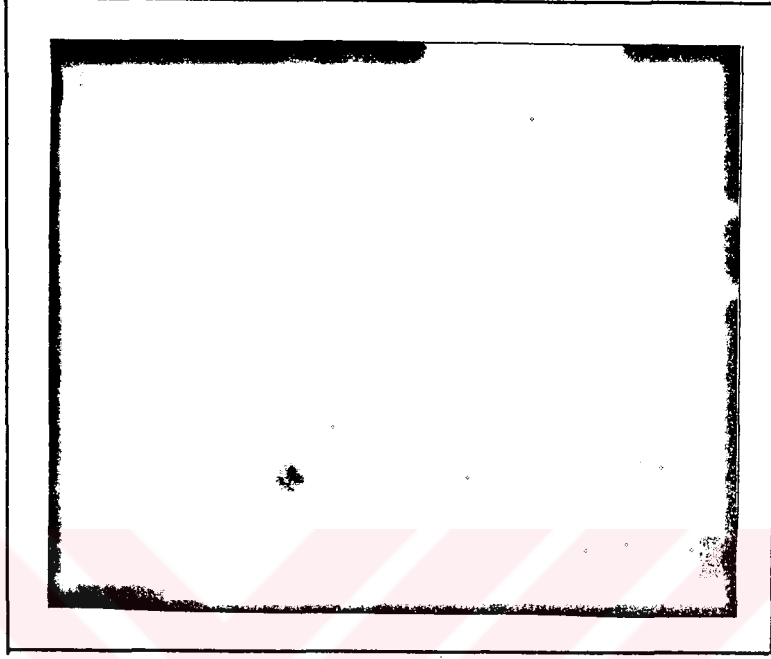
Resim 2. NADL suşunun FDB hücre kültüründe 72.saatte meydana getirdiği CPE'nin görünümü (x200).



Resim 3. FDB hücre kültürü kontrol (IF mikroskopta) (x250).



Resim 4. IIIüncü sürüde tespit edilen 56 nolu akut enfekte hayvana ait lökosit numunesi inokule edilmiş FDB hücre kültüründe immunofloresan (x250).



Resim 5. IV'üncü sürüde tespit edilen 99 nolu akut enfekte hayvana ait lökosit numunesi inokule edilmiş FDB hücre kültüründe immunofloresan (x250).

SÜRÜ NO	LÖKOSİTLERİ İZOLE EDİLEN HAYVAN SAYISI	LTEST	II.TEST	PI (%)
I	28	0	-	-
II	22	0	-	-
III	24	1	0	0
IV	38	1	0	0
V	30	0	-	-
TOPLAM	142	2	0	0

Tablo 3. IFT ile BVDV antijeni yönünden kontrol edilen sığır adedi ve PI yüzdeleri.

SÜRÜ NO	SERUMU ALINAN HAYVAN SAYISI	POZİTİF SERUM SAYISI (1:5 sulandırma)	%
I	28	17	60.7
II	22	19	86.3
III	24	22	91.6
IV	38	37	97.3
V	30	18	60
TOPLAM	142	113	79.5

Tablo 4. Mikronötralizasyon testi ile BVDV'una karşı kontrol edilen sığır kan serumlarının ilk örneklemedeki toplu sonuçları ve yüzdeleri.

Sıra No	Hayvan No	SN ₅₀ Değeri	Sıra No	Hayvan No	SN ₅₀ Değeri
I	1	-	III	72	1:224
I	2	-	III	73	1:47.3
I	3	1:9.9	III	74	1:159
I	4	1:8.2	IV	75	1:224
I	5	1:23.7	IV	76	1:47.3
I	6	-	IV	77	1:11.6
I	7	-	IV	78	1:11.6
I	8	1:11.6	IV	79	1:133
I	9	1:33.5	IV	80	1:47.3
I	10	1:33.5	IV	81	1:224
I	11	1:28.2	IV	82	1:316 ≤
I	12	1:133	IV	83	1:23.7
I	13	-	IV	84	1:47.3
I	14	-	IV	85	1:316 ≤
I	15	1:47.3	IV	86	1:224
I	16	1:23.7	IV	87	1:94.4
I	17	-	IV	88	1:56.3
I	18	1:316 ≤	IV	89	1:226
I	19	1:112	IV	90	1:8.2
I	20	1:28.2	IV	91	1:133
I	21	-	IV	92	1:11.6
I	22	-	IV	93	1:224
I	23	-	IV	94	1:316 ≤
I	24	-	IV	95	1:66.8
I	25	1:9.4	IV	96	1:159
I	26	1:5.7	IV	97	1:226
I	27	1:23.7	IV	98	1:316 ≤
I	28	1:16.8	IV	99*	-
II	29	1:23.7	IV	100	1:39.8
II	30	1:39.8	IV	101	1:226
II	31	1:9.4	IV	102	1:159
II	32	1:133	IV	103	1:316 ≤
II	33	1:19.9	IV	104	1:316 ≤
II	34	1:224	IV	105	1:8.2
II	35	1:33.5	IV	106	1:133
II	36	-	IV	107	1:28.2
II	37	1:94.4	IV	108	1:47.3
II	38	1:14.1	IV	109	1:9.9
II	39	1:9.9	IV	110	1:94.4
II	40	1:19.9	IV	111	1:159
II	41	1:23.7	IV	112	1:9.9
II	42	1:56.3	V	113	1:316 ≤
II	43	1:66.8	V	114	-
II	44	1:56.3	V	115	-
II	45	1:28.2	V	116	1:226
II	46	1:66.8	V	117	1:47.3
II	47	1:47.3	V	118	-
II	48	1:94.4	V	119	-
II	49	-	V	120	1:316 ≤
II	50	-	V	121	1:159
III	51	1:47.3	V	122	1:16.8
III	52	1:112	V	123	1:133
III	53	1:133	V	124	1:112
III	54	1:14.1	V	125	1:33.5
III	55	-	V	126	1:112
III	56*	-	V	127	1:66.8
III	57	1:159	V	128	1:159
III	58	1:8.2	V	129	-
III	59	1:28.2	V	130	1:133
III	60	1:94.4	V	131	-
III	61	1:39.8	V	132	1:94.4
III	62	1:159	V	133	1:23.7
III	63	1:14.1	V	134	-
III	64	1:224	V	135	-
III	65	1:159	V	136	-
III	66	1:56.3	V	137	-
III	67	1:316 ≤	V	138	1:159
III	68	1:47.3	V	139	1:224
III	69	1:28.2	V	140	1:39.8
III	70	1:316 ≤	V	141	-
III	71	1:28.2	V	142	-

* Akut subklinik enfeksiyona sahip olan hayvanlar

Tablo 5. İlk örneklemede BVDV'una karşı seropozitif olan serumların SN₅₀ değerleri

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Seronegatif gebe ineklerin Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) ile gebeliklerinin çeşitli dönemlerinde enfekte olmaları sonucu fütusa ulaşan etken, erken embriyonik ölüm (3,4,107), abort (51,76,89,108), mumifikasyon (38) ve konjenital defektlere (3,13,27,39,133,136) neden olmakta fütusun immunolojik olarak cevap verebilecek yeteneğe ulaştığı gebeliğin yaklaşık 90-125. gününe kadar ncp BVDV'u ile meydana gelen enfeksiyonlarda ise persiste enfekte hayvanların doğmasına (6,8,67,93,115,121) yol açmaktadır.

BVDV ile PI hayvanlar; özellikle homolog virusa karşı immuntolerant olup, etkeni yaşam boyu taşımaları ve tüm vücut salgılarıyla etrafa saçmaları (6,8,11,14,18,40,119,128) nedeniyle BVDV'unun en önemli kaynağı olarak rol oynamaktadırlar. Aynı zamanda cp BVDV ile süperenfeksiyon sonucu meydana gelebilecek olan MD'e karşı hassas olmaları (15,22,61,82,87,101), PI hayvanları bu enfeksiyon açısından da önemli kılmaktadır.

Bugüne kadar Türkiye'de; Alkan (3) tarafından BVDV'unun konjenital anomalili buzağı doğumlarından sorumlu etiyolojik bir etken olduğunun ortaya konulduğu, Özkul (112) tarafından gebe ineklerde doğal yolla meydana gelebilecek BVDV enfeksiyonları sırasında etkenin transplasental geçiş olasılığı ve fütustaki organ lokalizasyonunun tespit edildiği, Gelfert (50) tarafından Türkiye'de BVDV'unun varlığının saptanıldığı araştırmaların hepsinde birkaç hayvanın persiste enfeksiyona sahip olabileceğinden şüphelenilmekle beraber çeşitli sebeplerden ikinci kez örnek alınamaması, bu hayvanların gerçekten persiste enfekte oldukları düşüncesini ihtimalden öteye götürememiştir.

Bu araştırma, sınırlı sürü ve hayvan sayısına rağmen, PI hayvanların varlığının ve bu hayvanların sürü içerisindeki rollerinin araştırılmasına yönelik bir çalışma

olarak düşünölmüştür. Araştırma, test edilen sürü ve hayvan adedi az olmakla beraber Konya bölgesindeki BVDV enfeksiyonlarının seroepidemiolojisi hakkında da bir bilgi vermektedir.

Araştırmada özellikle 6-24 aylık sığırların seçilmesinin nedeni, yeni doğan buzağların yaşamlarının ilk aylarında annelerinden aldıkları kolostrum ile serum antikor seviyelerinin yükselmesine (107,113,127) bağılı yanıtıcı sonuçlar alınmasını ve PI sığırların iki yaşına ulaşmadan diğere enfeksiyonlara (13,120) özellikle MD'e (21,93,101) bağılı olarak ölmeleri sebebiyle sığır popülasyonu içindeki persiste enfeksiyonların gerçek yüzdesinin saptanmasındaki hataları mümkün olabildiğince önlemektir.

BVDV enfeksiyonlarının sığırlarda genellikle akut subklinik enfeksiyon şeklinde seyrettiği bildirilmektedir (2,128). BVDV ile PI sığırların ise MD dışında genellikle klinik bir belirti göstermedikleri bir çok araştırmacı (14,106,124,128) tarafından belirtilmiştir. Lökositlerden her zaman virusun tespit edilebildiği Pfların aksine, akut enfeksiyonları takiben sadece ortalama 4-7. günlerde lökositlerden virus izole edilebilmekte ayrıca akut enfeksiyona sahip hayvanlar immün cevap verebilme yeteneğinde olduklarından serumlarındaki antikor seviyelerinde ikinci haftadan itibaren başlayan ve 10-12. hafta civarında maksimuma ulaşan bir yükselme gözlenmektedir (23). Bu nedenle araştırmada BVDV antijeni yönünden pozitif, serolojik yönden negatif olduğu tespit edilen 2 sığırın akut subklinik bir enfeksiyona mı yoksa gerçekten persiste bir enfeksiyona mı sahip olduklarını saptamak amacıyla ilk örnekleme tarihinden yaklaşık 2 ay sonra ikinci kez alınan lökosit ve serum numuneleri tekrar teste tabi tutulmuştur. Bezek ve Mechor (11) sürülerdeki PI hayvanların identifikasyonunda kullanılan en büyük kriterin en az 3 hafta arayla iki kez lökosit numunelerinden BVDV veya antijeninin tespit edilmesi olduğunu bildirmişlerdir. Persiste enfekte hayvanları saptamak amacıyla iki örnekleme arasındaki süreyi Alenius ve ark. (2) 4 ay, Bolin ve

ark. (14) 2 ay, Howard ve ark. (67) 2-4 ay, Qvist ve ark.(119) 3 hafta, Shimizu ve Satou (128) 1-2 ay tutmuşlardır.

Araştırmada kullanılan III üncü sürüye ait 56 nolu ve IV üncü sürüye ait 99 nolu hayvanlardan ikinci kez alınan lökositlerin IF ile test edilmesi sonucu BVDV antijeni saptanamamış ve aynı hayvanların kan serumlarında mikronötralizasyon testi sonucu 56 nolu hayvanda 1:56.3, 99 nolu hayvanda 1:112 oranında nötralizan antikor titresi elde edilmiş olması nedeniyle, bu hayvanların ilk örnekleme tarihi esnasında akut subklinik bir enfeksiyona sahip oldukları; ikinci örnekleme sırasında ise viremi döneminin atlatılarak antijen yönünden negatif, serumdaki antikor yönünden ise pozitif hale geldikleri kanısına varılmıştır. Böylece araştırmada kullanılan 142 hayvan arasında PI hayvan tespit edilememiştir.

Meyling (95)'in BVDV salgını görülen 13 sürüde yer alan klinik olarak sağlıklı hayvanların % 10.5 'unda viremi tespit etmesi ve Shimizu ve Satou (128)'nun epidemik sahadan seçtiği 154 hayvandan 12'sinin (% 8.1) persiste enfeksiyona sahip olduğunu saptamaları, BVDV salgını görülen sürü ya da bölgelerde persiste enfeksiyonun şaşırtıcı derecede yüksek oranda seyrettiğini gösterirken, BVDV enfeksiyonu görülmeyen bölgelerden seçilen sürülerde PI hayvana çok düşük oranda rastlanmış (67,115), hatta bu tür sürülerde PI hayvan tespit edilememiştir (128). Bu araştırmada da test edilen sürülerin hiçbirisinde BVDV salgınından şüphelenilecek bir belirti gözlenmemiştir.

Alenius ve ark. (2) 711 düvenin arasında 1:5 ya da daha az antikor titresine sahip olanların serum numunelerini BVDV antijeni yönünden teste tabi tutmaları sonucu 9'unun persiste viremik olduğunu, Bolin ve ark. (14) 3157 sığırdan BVDV'una karşı presipitan antikorlar yönünden negatif olan serum numuneleri içinde 54 tanesinin BVDV antijeni taşıdığını saptamışlardır.

Bu son iki çalışmada (2,14) araştırmacılar, PI hayvanların tespiti amacıyla antijenik yönden lökosit örneklerinin yerine serum numunelerini teste tabi tutmuşlardır. Fakat

persiste enfekte hayvanların homolog virüslere karşı immuntolerant olmalarına rağmen heterolog BVDV'larına karşı düşük seviyede antikor oluşturabilmeleri (15,16,83,131) ve serumda bu antikorların varlığı durumunda yine serumda yer alan virüsün nötralize olabilmesi, BVDV'unu ya da antijenini tespit etmek amacıyla serumun iyi bir materyal olarak kullanılamayacağını ortaya koymuştur. Bu nedenle bu araştırmada antijen tespiti amacıyla lökosit örnekleri kullanılmıştır .

Bu araştırmada, sığırlardan elde edilen lökosit numunelerinin BVDV antijeni yönünden IFT'ne tabi tutulmadan önce FDB hücre kültürlerinde sadece bir tek pasaj yapılmıştır. Alkan (3) ncp BVDV izole ettiği 3 materyalin tümünün birinci pasajdan sonra IF testinde pozitif sonuç verdiğini, Meyling (95) BVDV yönünden pozitif olarak tespit ettiği 462 numuneden 455'inin (% 98) birinci pasajda pozitif olarak belirlendiğini, Özkul (112) IFT ile antijen tespit ettiği 12 numuneden 11 tanesinin birinci pasajda, kalan bir tanesinin ise ikinci pasajda pozitif olarak saptandığını bildirmişlerdir.

IFT ile BVDV antijeninin varlığı tespit edilen akut subklinik enfekte bu iki hayvana ait lökosit numunelerinin FDB hücre kültüründe yapılan 5 kör pasajı neticesinde, herhangi bir CPE bulgusunun saptanamamasından dolayı bu izolatların ncp karakterde oldukları kanısına varılmış olması, bir çok araştırmada (21,27,84,93,101,114) belirtilen cp BVDV'larının genellikle MD'den sorumlu olduğu ve akut enfeksiyonlarda daha çok ncp virüsünün izole edildiği görüşüyle paralellik arz etmiştir.

Araştırmada kullanılan III ve IV nolu sürüdeki hayvanların yaz aylarında bir iki kez aynı yerde bulundurulmaları nedeniyle, bu iki sürüde yer alan hayvanlardan izole edilen BVDV'larının homolog virüsler olabileceği düşünülebilir. Ancak sözkonusu iki hayvandan elde edilen bu izolatların sitopatojeniteleri hakkında güvenilir kesin bir bilgi edinilebilmesi için spesifik monoklonal antikorlar kullanılarak virüsün nötralizasyonuna dayanan yöntemlerle test edilmeleri gerekmektedir.

Beş sürüye ait 142 hayvanın serolojik durumlarının saptanması amacıyla yapılan SN testi sonuçlarına göre ilk örneklemede 113 hayvanın (% 79.5) seropozitif olduğu tespit edildi. Elde edilen bu sonuçların Bolin ve ark. (14)'nın % 89'luk, Erhan ve ark.(41)'nin % 70'lik, Gelfert (50)'in % 60'lık, Meyling ve ark. (96)'nın % 64'lük, Özkul (112)'un tespit ettiği % 80'lik oranlara yakınlık gösterdiği saptanmıştır.

Straver ve ark. (133), PI buzağı ile temas halinde bulunan bir buzağıda subklinik bir enfeksiyon sonucu üç hafta içinde BVDV antikorlarının tespit edildiğini bildirmişlerdir. Bolin ve ark. (14) ile Meyling ve ark.(96) da sürülerde persiste enfekte hayvanların varlığının devamlı bir virus sirkülasyonunun göstergesi olduğunu ve böyle sürülerde antikor düzeyinin yüksek oranda saptandığını belirtmişlerdir. Ayrıca Houe ve Meyling (63) 10 sürü üzerinde yaptıkları araştırmada PI hayvan içeren sürülerde nötralize eden antikor yönünden pozitif hayvanların prevalansını %87 oysa PI hayvan içermeyen sürülerde prevalansın %43 olduğunu saptamışlardır. Bununla beraber Houe (62) sürülerde PI hayvanların yer alıp almadığını tahmin etmek için sürüdeki BVDV antikoru bulunan hayvan prevalansının bir ölçü olarak kullanılabileceğini ancak çok genç PI hayvan içeren sürülerde seronegatif olan hayvanları enfekte etmek için yeterli zaman olmadığı için seropozitiflik oranının düşük, PI hayvanların test örnekleri alınmadan kısa bir süre önce sürüden ayrılmaları durumunda ise seropozitiflik oranının yüksek olabileceği nedeniyle bu yöntemle yanıltıcı sonuçlar alınabileceğini vurgulamıştır. III ve IV nolu sürülerde seropozitiflik oranının yüksek olması ve bu sürülerde akut enfekte hayvanlara rastlanması ölüm yada satış nedeniyle sürülerden ayrılan hayvanların arasında PI hayvan olabileceği düşüncesini akla getirmiş olsa da ülkemiz şartlarında enfeksiyonun bulaşmasında birçok faktör rol aldığından dolayı enfeksiyonun kaynağı kesin olarak tespit edilememiştir. Bu araştırmada olduğu gibi bir çok araştırmada karşılaşılan, test tarihinden önce ölüm, satış gibi çeşitli sebeplerden dolayı sürülerden hayvanların ayrılması ve yine test edilecek hayvanların ikinci

örneklemelerinin yapılmasındaki değişik zorluklar nedeniyle PI hayvanları bir an önce tespit etmek amacıyla pratik bir yöntem olmasa da yeni doğan buzağılardan prekolostral kan örneklerinin alınmasının ve lökositlerinde BVDV antijeni tespit edilen buzağuların PI yönünden şüpheli sayılıp sürüden hemen ayırt edilmelerinin en etkili yol olacağı düşünülebilir.

Serolojik kontroller sonucu ilk örneklemede pozitif olduğu tespit edilen 113 hayvanın 73 tanesi (% 64.6) 1:39.8 ve daha yüksek oranda serum nötralizasyon titresi vermiştir. Bu oran Türkiye'de daha önce Alkan (3), Gelfert (50) ve Özkul (112) tarafından yapılan çalışmalarda elde edilen serolojik sonuçlara benzerlik göstermektedir. Alkan (3) tarafından yapılan çalışmada pozitif bulunan serumların büyük bir kısmı 1:39.8 ve daha yüksek serum sulandırılmaları için nötralizan aktivitesi göstermiş, Gelfert (50) teste tabi tuttuğu kan serumlarında 1:40 ve daha yüksek nötralizan antikor titresi gösteren hayvanların oranlarını ortalama % 74 olarak bildirmiştir. Özkul (112) ise 1992 yılında yaptığı çalışmada 40 adet seropozitif hayvanın 35 tanesinin 1:30 ve daha yüksek oranda nötralizan antikor titresi verdiğini tesbit etmiştir.

Sonuç olarak, ülkemizde BVDV enfeksiyonlarının önlenmesi amacıyla, tüm yurt genelindeki daha büyük hayvan popülasyonlarının, BVDV'unun yayılmasında primer rol oynadığı sanılan persiste enfeksiyon yönünden sistemik olarak test edilmeleri ve bu işlemde çabukluk sağlamak amacıyla ucuz ve az zaman alan yöntemlerin kullanılması önerilebilir. Persiste enfeksiyona sahip olduğu saptanan sığırların izole edilip hemen kesime gönderilmeleri ile, serolojik araştırmalar neticesinde oldukça yüksek yayılıma sahip olduğu saptanan BVDV enfeksiyonlarının önüne geçilebileceği düşünülmektedir. Ayrıca, sığır sürüleri içinde oldukça düşük oranda tespit edilebilen PI hayvanları, enfeksiyonun epizootiyolojisindeki rollerini üstlenmeden, mümkün olduğu kadar küçük yaşta yakalayabilmek için önlemler geliştirilmelidir.

6.ÖZET

Konya Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü'ne ait 4 sürüde yer alan 112, özel bir işletmeye ait 1 sürüde yer alan 30 sığır olmak üzere klinik olarak sağlıklı, toplam 142 adet hayvan persiste BVDV enfeksiyonu ve BVDV antikorları yönünden incelendi. Bu amaçla sığırlardan lökosit ve kan serumu örnekleri alındı.142 adet lökosit numunesinin IFT ile incelenmesi sonucu bir adet III nolu sürüde, bir adet IV nolu sürüde olmak üzere toplam iki sığırdan BVDV antijenleri tespit edildi. İlk örneklemeden iki ay sonra bu 2 sığırdan alınan ikinci lökosit örneklerinde BVDV antijenlerine rastlanamadı. Bunun sonucunda 142 sığırdan hiçbirisinin persiste enfeksiyona sahip olmadığı belirlendi. İlk örneklemede BVDV antijeni tespit edilen 2 sığırdan alınan lökosit örneklerinin FDB hücre kültüründe beş kör pasajı takiben ncp karakterde virus içerdikleri saptandı.

142 adet kan serumu örneği BVDV antikorları yönünden serum nötralizasyon testine tabi tutuldu. İlk örneklemede 142 numuneden 113 tanesi (% 79.5) BVDV antikorları yönünden pozitif bulundu.

Araştırmada, iki sürüde viremik hayvanlar saptanmış ve seropozitiflik oranı oldukça yüksek bulunmuş olmasına rağmen PI hayvan tespit edilememiştir.

7. SUMMARY

Investigation of persistent bovine viral diarrhoea virus infection in clinically healthy cattle herds and its epizootiologic importance.

A total of 142 clinically healthy cattle, 112 cattle in four herds from Central Animal Research Enstitute and 30 cattle in one herd from a private farm were examined serologically and for persistent infection with BVDV in Konya. For this aim, leucocyte and blood sera samples were obtained from the animals. BVDV antigens were determined in a total of two animals, one in herd III and one in herd IV, after examination by IFT of the 142 leucocyte samples. Second leucocyte samples were obtained from 2 cattle two months after the initial sampling and BVDV antigens were not detected again. Thus, anyone of 142 cattle was considered as persistently infected with BVDV. In the first leucocyte samples from two cattle detected BVDV antigens were determined noncytopathogenic BVDV following five blind passages in foetal bovine kidney cell culture.

The 142 first blood sera samples were tested against BVDV by SN test. Antibodies to BVDV were detected in 113 (% 79.5) of 142 samples.

Although viremic cattle and high seropositivity were found in two herds, PI cattle couldn't be detected in this study.

8. LİTERATÜR LİSTESİ

1. Afshar, A. and Eaglesome, M.D. (1990): Viruses associated with bovine semen. *Vet.Bull.*, 60, 2, 93-109.
2. Alenius, S., Jakobsson, S.O. and Cafaro, E. (1986): Frequency of bovine viral diarrhoea virus infections in Sweden among heifers selected for artificial insemination. In "Proc. 14 th World Cong.Dis.of Cattle", 204-207, Dublin.
3. Alkan, F. (1989): Arthrogrippythypso ve hydranencephaly'li buzağı doğumlarında bovine viral diarrhoea-mucosal disease (BVD-MD)'in insidensi üzerende araştırmalar. A.Ü.Sağ.Bil.Enst., Doktora tezi, Ankara.
4. Archbald, F.L. and Zemjanis, R. (1977): Intrauterin infusion of the virus of bovine virus diarrhoea and artificial insemination in the cow at estrus. *Vet.Med.Small Anim.Clinic.*, 72, 221-225.
5. Axthelm, M.K. and Philips, R. (1980): Congenital internal hydrocephalus in calves associated with bovine virus diarrhoea-mucosal disease virus. *Bovine Pract.*, 1,6,19-27.
6. Bak. A., Callesen, H., Meyling, A. and Greve, T. (1992): Calves born after embryo transfer from donors persistently infected with BVD virus. *Vet.Rec.*, 131, 37.
7. Baker, J. (1987): Bovine viral diarrhoea virus: a review. *J.A.V.M.A.*, 190, 1449-1458.
8. Barlow, R.M., Nettleton, P.F., Gardiner, A.C., Greig, A., Campbell, J.R. and Bonn, J.M. (1986): Persistent bovine virus diarrhoea virus infection in a bull. *Vet.Rec.*, 118, 321-324.
9. Berry, E.S., Lewis, T.L., Ridpath, J.F., Evermann, J.F., Rupnow, B.A. and Qi, F. (1992): Genomic comparison of ruminant pestiviruses, In "Proceedings of the Second Symposium on Pestiviruses", 53-59, Veyrier-Du-Lac, France.

10. Bezek, D.M., Baker, J.C. and Kaneene, J.B. (1988): Immunofluorescence of bovine virus diarrhoea viral antigen in white blood cells from experimentally infected immunocompetent calves. *Can.J.Vet.Res.*, 52, 288-290.
11. Bezek, D.M. and Mechor, G.D. (1992): Identification and eradication of bovine viral diarrhoea virus in a persistently infected dairy herd. *J.A.V.M.A.*, 201, 4, 580-586.
12. Binkhorst, G.J., Journee, D.L.H., Wouda, W., Straver, P.J. and Vos, J.H. (1983): Neurological disorders, virus persistence and hypomyelination in calves due to intrauterine infections with bovine virus diarrhoea virus. *Vet.Quart.*, 5, 4, 145-155.
13. Blood, D.C., Radostits, O.M. and Henderson, J.A. (1983): "Veterinary Medicine". 6th Ed., Bailliere Tindal, London.
14. Bolin, S.R., McClurkin, A.W. and Coria, M.F. (1985): Frequency of persistent bovine viral diarrhoea virus infection in selected cattle herds. *Am.J.Vet.Res.*, 46, 11, 2385-2387.
15. Bolin, S.R., McClurkin, A.W., Cutlip, R.C. and Coria, M.F. (1985a): Severe clinical disease induced in cattle persistently infected with noncytopathic bovine viral diarrhoea virus by superinfection with cytopathic bovine viral diarrhoea virus. *Am.J.Vet.Res.*, 46, 3, 573-576.
16. Bolin, S.R., McClurkin, A.W., Cutlip, R.C. and Coria, M.F. (1985b): Response of cattle persistently infected with noncytopathic bovine viral diarrhoea virus to vaccination for bovine viral diarrhoea and to subsequent challenge exposure with cytopathic bovine viral diarrhoea virus. *Am.J.Vet.Res.*, 46, 12, 2467-2470.
17. Bolin, S.R., Roth, J.A., Uhlenhoop, E.K. and Pohlenz, J.F. (1987): Immunologic and virologic findings in a bull chronically infected with noncytopathogenic bovine viral diarrhoea virus. *J.A.V.M.A.*, 190, 8, 1015-1017.

18. Braun, R.K., Osburn, B.I. and Kendrick, J.V. (1973): Immunologic response of bovine fetus to bovine viral diarrhoea virus. *Am.J.Vet.Res.*, 34, 9, 1127-1132.
19. Brown, G.B., Bolin, S.R., Frank, D.E. and Roth, J.A. (1991): Defective function of leucocytes from cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus, and the influence of recombinant cytokines. *Am.J.Vet.Res.*, 52, 3, 381-387.
20. Brownlie, J. (1990): Pathogenesis of mucosal disease and molecular aspects of bovine virus diarrhoea virus. *Vet.Microbiol.*, 23, 371-382.
21. Brownlie, J., Clarke, M.C. and Howard, C.J. (1984): Experimental production of fatal mucosal disease in cattle. *Vet.Rec.*, 114, 535-536.
22. Brownlie, J., Clarke, M.C. and Howard, C.J. (1987): Clinical and experimental mucosal disease-defining a hypothesis for pathogenesis. In "Pestivirus infections of ruminants" Ed. J.W. Harkness, 147-157, CEC, Luxemburg.
23. Brownlie, J., Clarke, M.C., Howard, C.J. and Pocock, D.H. (1987): Pathogenesis and epidemiology of bovine virus diarrhoea virus infection of cattle. *Am.Rech.Vet.*, 18, 157-166.
24. Brownlie, J., Nuttall, P.A., Stott, E.J., Taylor, G. and Thomas, L.H. (1980): Experimental infection of calves with two strains of bovine virus diarrhoea virus: certain immunological reactions. *Vet.Immun. Immunopath.*, 1, 371-378.
25. Burgu, İ., Öztürk, F., Akça, Y., Toker, A., Frey, H.R. ve Liess, B. (1990): Türkiye'de koyunlarda bovine viral diarrhoea (BVD) enfeksiyonlarının varlığı ve önemi. *A.Ü.Vet.Fak.Derg.*, 37, 1, 121-127.
26. Carlson, U. (1991): Border disease in sheep caused by transmission of virus from cattle persistently infected with bovine virus diarrhoea virus. *Vet.Rec.*, 128, 145-147.

27. Casaro, A.D.E., Kendrick, J.W. and Kennedy, P.C. (1971): Response of the bovine fetus to BVD-MD virus. *Am.J.Vet.Res.*, 32, 10, 1543-1562.
28. Childs, T. (1946): X disease of cattle-Saskatchewan. *Can.J.Comp.Med.*, 10, 316-319.
29. Collet, M.S., Moennig, V. and Horzinek, M.C. (1989): Recent advances in pestivirus research. *J.gen.Virol.*, 70, 253-266.
30. Collet, M.S., Tamura, J.K., Warrenner, P., Poole, T., Potgieter, L.N.D. and Wiskerchen, M. (1992): Pestivirus protein biogenesis and enzymatic activities associated with viral proteins. In "Proceedings of the Second Symposium on Pestiviruses", 7-15, Veyrier-Du-Lac, France.
31. Coria, M.F. and McClurkin, A.W. (1978): Specific immune tolerance in an apparently healthy bull persistently infected with bovine viral diarrhea virus. *J.Am.Vet.Med.Assoc.*, 172, 449-451.
32. Coria, M.F., McClurkin, A.W. and Bolin, S.R. (1983): Total protein and immunoglobulins G₁, G₂ and M in serum of calves persistently infected with bovine viral diarrhea virus. *Am.J.Vet.Res.*, 44, 10, 1938-1939.
33. Coria, M.F., Schmerr, M.J.F. and McClurkin, A.W. (1983): Characterization of the major structural proteins of purified bovine viral diarrhea virus. *Arch.Virol.*, 76, 335-339.
34. Coulibaly, C.O.Z., Liess, B., Trautwein, G. and Schleuter, G. (1986): Quantitative analysis of immunoglobulins G₁ and G₂ in blood samples of cattle persistently infected with bovine virus diarrhoea virus. *J.Vet.Med.B*, 33, 685-696.
35. Depner, K., Hübschle, O.J.B. and Liess, B. (1991): BVD-virus infection in goats-experimental studies on transplacental transmissibility of the virus and its effect on reproduction. *Arch.Virol.*, 3, 253-256.

36. Dinter, Z. (1963): Relationship between bovine virus diarrhea virus and hog cholera virus. *Zentralbl.Bakt.*, 187, 475-486.
37. Ditchfield, J. and Doane, F.W. (1964): The properties and classification of bovine viral diarrhea virus. *Can.J.Comp.Med.*, 28, 148-152.
38. Done, J.T., Terlecki, S., Richardson, C., Harkness, J.W., Sands, J.J., Patterson, D.S.P., Sweasey, D., Shaw, I.G., Winkler, C.E. and Duffel, S.J. (1980): Bovine virus diarrhea-mucosal disease virus: pathogenicity for the fetal calf following maternal infection. *Vet.Rec.*, 106, 473-479.
39. Duffel, S.J. and Harkness, J.W. (1985): Bovine virus diarrhoea-mucosal disease infection in cattle. *Vet.Rec.*, 117, 240-245.
40. Edwards, S., Drew, T.W. and Bushnell, S.E. (1987): Prevalence of bovine virus diarrhoea virus viremia. *Vet.Rec.*, 120, 3, 71.
41. Erhan, M., Onar, B., Csantos, L. and Hopkins, I.G. (1971): Serological survey on some virus and babesia diseases of cattle, sheep and horse. *J.Vet.Cent.Res.Inst.(Pendik)*, 4, 2, 56-58.
42. Fernandez, A., Hewicker, M., Trautwein, G., Pohlenz, J. and Liess, B. (1989): Viral antigen distribution in the central nervous system of cattle persistently infected with bovine viral diarrhea virus. *Vet.Pathol.*, 26, 1, 26-32.
43. Fernelius, A.L. (1964): Noncytopathogenic bovine viral diarrhea viruses detected and titrated by immunofluorescence. *Can.J.Comp.Med.Vet.Sci.*, 28, 121-126.
44. Fernelius, A.L. (1968): Characterization of bovine viral diarrhea viruses II. Ultrafiltration properties of different strains after various treatment. *Arch.Virusforsch.*, 25, 219-226.
45. Fernelius, A.L. and Lambert, G. (1969): Detection of bovine viral diarrhea virus and antigen in tissues of experimentally infected calves by cell inoculation and fluorescent antibody techniques. *Am.J.Vet.Res.*, 30, 9, 1551-1559.

46. Finci, E. (1972): Türkiye'de mucosal disease (Virusi Diyare) üzerinde araştırmalar. A.Ü.Vet.Fak.,Doç.Tezi, Ankara.
47. Frey, H.R., Depner, K.R., Gelfert, C.C. und Liess, B. (1991a): Bovine virus diarrhoea (BVD) diagnostisch ermittlung von rindern mit persistenter BVD-virus infektion. Dtsch.tierärztl.Wschr., 98, 64-66.
48. Frey, H.R., Depner, K.R., Gelfert, C.C. and Liess, B. (1991b): BVD virus isolation techniques for routine use in cattle herds with or without previous BVD history. Arch.Virol., 3, 257-260.
49. Frey, H.R. und Liess, B. (1971): Vermehrungskinetik und verwendbarkeit einer stark zytopathogenen VD-MD virusstammes für diagnostische untersuchungen mit der mikrotiter-methode. Zbl.Vet.Med.B, 18, 61-71.
50. Gelfert, C.C. (1991): Epidemiological investigation of the distribution of BVD virus among cattle in Turkey. Inavgural-Dissertation, Tierärztliche Hochschule, Hannover.
51. Gillespie, J.H., Bartholomew, P.T., Thomson, R.G. and McEntee, K. (1967): The isolation of noncytopathic virus diarrhoea virus from two aborted bovine fetuses. Cornell.Vet., 57, 564-571.
52. Gillespie, J.H., Coggins, J.L., Thompson, J. and Baker, K. (1961): Comparison by neutralization tests of strains of virus isolated from virus diarrhoea and mucosal disease. Cornell.Vet., 51, 155-159.
53. Gunn, H.M. (1987): Observations on natural exposure to bovine viral diarrhoea in cattle. In "Pestivirus infections of ruminants", Ed. J.W. Harkness, 111-118, CEC, Luxemburg.
54. Gunn, H.M. (1993): Role of fomites and flies in the transmission of bovine viral diarrhoea virus. Vet.Rec., 132, 584-585.

55. Hafez, S.M. and Liess, B. (1972a): Studies on bovine viral diarrhoea-mucosal disease virus I. Cultural behaviour and antigenic relationship of some strains. *Acta.Virol.*, 16, 388-398.
56. Hafez, S.M. and Liess, B. (1972b): Studies on bovine viral diarrhoea-mucosal disease virus II. Stability and some physico-chemical properties. *Acta.Virol.*, 16, 339-408.
57. Hafez, S.M., Petzoldt, K. and Reczko, E. (1968): Morphology of bovine viral diarrhoea virus. *Acta.Virol.*, 12, 471-473.
58. Harkness, J.W., Roeder, P.L., Drew, T., Wood, L. and Jeffrey, M. (1987): The efficacy of an experimental inactivated BVDV-MD vaccine. In "Pestivirus infections of ruminants" , Ed. J.W.Harkness, 233-251, CEC, Luxemburg.
59. Hewicker, M., Trautwein, G., Stahl, C. and Liess, B. (1987): Kidney lesions in cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. *J.Vet.Med.B.*, 34, 1-12.
60. Holland, R.E., Bezek, D.M., Sprecher, D.J., Patterson, J.S., Steficek, B.A and Trapp, A.L. (1993): Investigation of epizootic of bovine viral diarrhoea virus infection in calves. *J.A.V.M.A.*, 202, 11, 1849-1854.
61. Horzinek, M.C. (1990): Bovine virus diarrhoea virus : an introduction. *Rev.Sci.tech.Off.int.Epiz.*, 9, 1, 13-23.
62. Houe, H. (1992): Serological analysis of a small herd sample to predict presence or absence of animals persistently infected with bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in dairy herds. *Res.Vet.Sci.*, 53, 320-323.
63. Houe, H. and Meyling, A. (1991): Prevalence of bovine virus diarrhoea (BVD) in 19 Danish dairy herds and estimation of incidence of infection in early pregnancy. *Prev.Vet.Med.*, 11, 9-16.
64. Howard, C.J. (1990): Immunological responses to bovine virus diarrhoea virus infections. *Rev.Sci.tech.Off.int.Epiz.*, 9, 1, 93-103.

65. Howard, T.H., Bean, B., Hillman, R. and Manke, D.R. (1990): Surveillance for persistent bovine viral diarrhoea virus infection in four artificial insemination centers. *J.A.V.M.A.*, 196, 12, 1951-1955.
66. Howard, C.J., Brownlie, J. and Clarke, M.C. (1987): Immunoenzyme techniques for bovine viral diarrhoea virus. In "Pestivirus infections of ruminants", Ed. J.W. Harkness, 69-79, CEC, Luxemburg.
67. Howard, C.J., Brownlie, J. and Thomas, L.H. (1986): Prevalence of bovine viral diarrhoea virus viraemia in cattle in the UK. *Vet.Rec.*, 119, 628-629.
68. Hubbert, W.T., Bryner, J.H., Fernelius, A.L., Frank, G.H. and Estes, P.C. (1973): Viral infection of the bovine fetus and its environment. *Arch. ges.Virusforsch.*, 41, 86-98.
69. Hyera, J.M.K., Dahle, J., Liess, B., Moennig, V. and Frey, H.R. (1987): Gewinnung hochtitriger antiseren gegen BVD-virus aus schweinen und ihre verwendung für direkte immufluoreszenz-und immunoperoxidase techniken. *Dtsch.tierärztl.Wschr.*, 94, 576-580.
70. Jensen, J., Aiken, J. and Schultz, R.D. (1990): Detection of bovine viral diarrhoea virus genome in leukocytes from persistently infected cattle by RNA-cDNA hybridization. *Can.J.Vet.Res.*, 54, 2, 256-259.
71. Johnson, D.W. and Muscoplant, C.C. (1973): Immunologic abnormalities in calves with chronic bovine viral diarrhoea. *Am.J.Vet.Res.*, 34, 9, 1139-1141.
72. Kaerber, G. (1964): In diagnostic procedures for virus and rickettsial disease. *Public.Health Assoc.*, 3, 48-50.
73. Kahrs, R.F. (1981): *Viral Disease of Cattle*. 1st ed., Iowa State University Press, Ames, Iowa.
74. Kahrs, R.F., Gibbs, E.P.J. and Larsen, R.E. (1980): The search for viruses in bovine semen. *Theriogenology*, 14, 151-165.

75. Kelling, C.L., Stine, L.C., Rump, K.K., Parker, R.E., Kennedy, J.E., Stone, R.T. and Ross, G.R. (1990): Investigation of bovine viral diarrhoea infections in a range beef cattle herd. *J.A.V.M.A.*, 197, 5, 589-593.
76. Kendrick, J.W. (1976): Bovine viral diarrhoea virus-induced abortion. *Theriogenology*, 5, 91-93.
77. Kirkland, P.D., Richards, S.G., Rothwell, J.T. and Stanley, D.F. (1991): Replication of bovine viral diarrhoea virus in the bovine reproductive tract and excretion of virus in semen during acute and chronic infections. *Vet.Rec.*, 128, 587-590.
78. Lambert, G., McClurkin, A.W. and Fernelius, A.L. (1974): Bovine viral diarrhoea in the neonatal calf. *J.A.V.M.A.*, 164, 287-289.
79. Larsson, B. (1988a): Increased suppressor cell activity in cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. *J.Vet.Med.B*, 35, 271-279.
80. Larsson, B., Fossum, C. and Alenius, S. (1988): A cellular analysis of immunosuppression in cattle with mucosal disease. *Res.Vet.Sci.*, 44, 71-75.
81. Lewis, T.L., Ridpath, J.F., Bolin, S.R. and Berry, E.S. (1991): Detection of BVD viruses using synthetic oligonucleotides. *Arch.Virol.*, 117, 3-4, 269-278.
82. Liess, B. (1985): The significance of immune tolerance for the pathogenesis of bovine viral diarrhoea (BVD). *Berl.Münc.h.tierärztl.Wschr.*, 98, 420-423.
83. Liess, B., Frey, H.R., Orban, S. und Hafez, M. (1983): Bovine virusdiarrhoe (BVD)-'mucosal disease':persistente BVD-feldvirusinfektionen bei serologisch selektierten rindern. *Dtsch.tierärztl.Wschr.*, 90, 261-266.
84. Liess, B., Frey, H.R., Orban, S. and Trautwein, G. (1987): Impact of intrauterine bovine viral diarrhoea (BVD) virus infection in cattle. *A.Ü.Vet.Fak.Derg.*, 34, 3, 555-561.

85. Liess, B., Frey, H.R., Trautwein, G. und Peters, W. (1987): Häufigkeit des Auftretens persistierender BVD-virus infektionen und ihre Auswirkungen in der rinderpopulation. *Dtsch.terärztl.Wschr.*, 94, 583-585.
86. Liess, B., Orban, S., Frey, H.R., Trautwein, G., Wiefel, W. and Blindow, H. (1984): Studies on transplacental transmissibility of a bovine virus diarrhoea (BVD) vaccine virus in cattle. II. Inoculation of pregnant cows. *Zbl.Vet.Med.B*, 31, 669-681.
87. Littlejohns, E.R. and Walker, K.H. (1985): Aetiology and pathogenesis of mucosal disease of cattle:current concepts, observation and speculation. *Aust.Vet.J.*, 62, 101-103.
88. Lopez, O.J., Osorio, F.A. and Donis, R.O. (1991): Rapid detection of bovine viral diarrhoea virus by polymerase chain reaction. *J.Clin.Microbiol.*, 29,3, 578-582.
89. Lucas, M.H., Westcott, D.G.F., Edwards, S., Newman, R.H. and Swallow, C. (1986): Immunofluorescence and cell culture techniques in the diagnosis of viral infection of aborted bovine fetuses. *Vet.Rec.*, 118, 242-243.
90. Malmquist, W.A. (1968): Bovine viral diarrhoea-mucosal disease : etiology, pathogenesis, and applied immunity. *J.A.V.M.A.*, 152, 6, 763-767.
91. McClurkin, A.W., Bolin, S.R. and Coria, M.F. (1985): Isolation of cytopathic and noncytopathic bovine viral diarrhoea virus from the spleen of cattle acutely and chronically affected with bovine viral diarrhoea. *J.A.V.M.A.*, 186, 6, 568-569.
92. Clurkin, A.W., Coria, M.F. and Cutlip, R.C. (1979): Reproductive performance of apparently healthy cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. *J.A.V.M.A.*, 174, 10, 1116-1119.
93. McClurkin, A.W., Littledike, E.T., Cutlip, R.C., Frank, G.H., Coria, M.F. and Bolin, S.R. (1984): Production of cattle immunotolerant to bovine viral diarrhoea virus. *Can.J.Comp.Med.*, 48, 156-161.

94. McGowan, M.R., Kirkland, P.D., Richards, S.G. and Littlejohns, I.R. (1993): Increased reproductive losses in cattle infected with bovine pestivirus around the time of insemination. *Vet.Rec.*, 133, 39-43.
95. Meyling, A. (1984): Detection of BVD virus in viremic cattle by an indirect immunoperoxidase technique. Recent Advances in virus diagnosis. CEC seminar, Belfast, Sept.22-23, 37-46.
96. Meyling, A., Houe, H. and Jensen, A.M. (1990): Epidemiology of bovine virus diarrhoea virus. *Rev.sci.tech.Off.int.Epiz.*, 9, 1, 75-93.
97. Meyling, A. and Jensen, A.M. (1988): Transmission of bovine virus diarrhoeavirus (BVDV) by artificial insemination (AI) with semen from a persistently infected bull. *Vet.Microbiol.*, 17, 97-105.
98. Meyling, A., Ronsholt, L., Dalsgaard, K. and Jensen, A.M. (1987): Experimental exposure of vaccinated and non-vaccinated pregnant cattle to isolates of bovine viral diarrhoea virus (BVDV). In "Pestivirus infections of ruminants", Ed.J.W.Harkness, 225-232, CEC, Luxemburg.
99. Mignon, B., Dubuisson, J. Baranowski, E., Koromyslov, I., Ernst, E., Boulanger, D., Waxweiler, S. and Pastoret, P.P. (1991): A monoclonal ELISA for bovine viral diarrhoea pestivirus antigen detection in persistently infected cattle. *J.Virol.Meth.*, 35, 177-188.
100. Moennig, V. (1990): Pestiviruses: a review. *Vet.Microbiol.*, 23, 35-54.
101. Moennig, V., Frey, H.R., Liebler, E., Pohlenz, J. and Liess, B. (1990): Reproduction of mucosal disease with cytopathogenic bovine viral diarrhoea virus selected in vitro. *Vet.Rec.* 127, 200-203.
102. Morvan, H., Leforban, Y., L'Hostis, B., Caquineau, L., Lecoane, J. et Douart, A.(1991): Comparaison de cinq tests sérologiques pour la détection des anticorps anti-maladie des muqueuses dans les sérums bovins. *Rec.Méd.Vét.*, 167, 6, 501-505.

103. Ohmann, H.B. (1983): Pathogenesis of bovine viral diarrhoea-mucosal disease: distribution and significance of BVDV antigen in diseased calves. *Res. Vet. Sci.*, 34, 5-10.
104. Ohmann, H.B. (1988): BVD virus antigens in tissues of persistently viraemic, clinically normal cattle: implications for the pathogenesis of clinically fatal disease. *Acta. Vet. Scand.*, 29, 1, 77-84.
105. Ohmann, H.B. and Babiuk, L.A. (1988): Influence of interferons α_1 and T and of tumour necrosis factor on persistent infection with bovine viral diarrhoea virus in vitro. *J. gen. Virol.*, 69, 1399-1403.
106. Ohmann, H.B., Ronsholt, L. and Bloch, B. (1987): Demonstration of bovine viral diarrhoea virus in peripheral blood mononuclear cells of persistently infected clinically normal cattle. *J. gen. Virol.*, 68, 1971-1982.
107. Oirschot, J.T.V. (1983): Congenital infections with nonarbo Togaviruses. *Vet. Microbiol.*, 8, 321-361.
108. Olafson, P., McCallum, A.D. and Fox, F.H. (1946): An apparently new transmissible disease of cattle. *Cornell Vet.*, 36, 205-213.
109. Olafson, P. and Rickard, C.G. (1947): Further observations on the virus diarrhoea (New Transmissible Disease) of cattle. *Cornell Vet.*, 37, 104-106.
110. Orban, S., Liess, B., Hafez, S.M., Frey, H.R., Blindow, H. and Patzer, B.S. (1983): Studies on transplacental transmissibility of a bovine virus diarrhoea (BVD) vaccine virus. *Zbl. Vet. Med. B.*, 30, 619-634.
111. Öncül, S., Meriç, İ. and Korkut, F. (1964): First incidence of mucosal disease in Turkey observed among cattle at the Lalahan Animal Breeding Research Institute: clinical aspects. *J. Anim. Breed. Res. Inst. (Lalahan)*, 4, 186-199.
112. Özkul, A. (1992): Gebe ineklerde ve fütüslerinde bovine viral diarrhoea-mucosal disease (BVD-MD). A.Ü. Sağ. Bil. Enst., Doktora tezi, Ankara.

113. Palfi, V., Houe, H and Philipsen, J. (1993): Studies on the decline bovine viral diarrhoea virus (BVDV) maternal antibodies and detectability of BVDV in persistently infected calves. *Acta vet.scand.*, 34, 105-107.
114. Perdritzet, J.A., Rebhun, W.C., Dubovi, E.J. and Donis, R.O. (1987): Bovine virus diarrhea-Clinical syndromes in dairy herds. *Cornell Vet.*, 77, 46-74.
115. Peters, W., Liess, B., Frey, H.R. and Trautwein, G. (1987): Incidence and impact of persistent infections with BVD virus in the field. In "Pestivirus infections of ruminants", Ed. J.W. Harkness, 133-144, CEC, Luxemburg.
116. Pocock, D.H., Howard, C.J., Clarke, M.C. and Brownlie, J. (1987): Molecular variation between BVD virus isolates. In "pestivirus infections of ruminants", Ed.J.W. Harkness, 43-52, CEC, Luxemburg.
117. Purchio, A.F., Larsson, R. and Collett, M.S. (1983): Characterization of virus-specific RNA synthesized in bovine cells infected with bovine viral diarrhea virus. *J.Virol.*, 48, 320-324.
118. Qvist, P., Aasted, B., Bloch, B., Meyling, A., Ronsholt, L. and Houe, H. (1990): Flow cytometric detection of bovine viral diarrhea virus in peripheral blood leucocytes of persistently infected cattle. *Can.J.Vet.Res.*, 54, 469-472.
119. Qvist, P., Houe, H., Aasted, B. and Meyling, A. (1991): Comparison of flow cytometry and virus isolation in cell culture for identification of cattle persistently infected with bovine viral diarrhea virus. *J.Clin.Microbiol.*, 29, 3, 660-661.
120. Radostits, O.M. and Littlejohns, I.R. (1988):New concepts in the pathogenesis, diagnosis and control of diseases caused by the bovine viral diarrhea virus. *Can.Vet.J.*, 29, 513-528.
121. Rae, A.G., Sinclair, J.A. and Nettleton, P.F. (1987): Survival of bovine viral diarrhoea virus in blood from persistently infected cattle. *Vet.Rec.*, 120, 504.

122. Ramsey, F.K. and Chivers, W.H. (1953): Mucosal disease of cattle. *North Am.Vet.*, 34, 629-633.
123. Revell, S.G., Chasey, D., Drew, T.W. and Edwards, S. (1988): Some observations on the semen of bulls persistently infected with bovine virus diarrhoea virus. *Vet.Rec.*, 123, 122-125.
124. Roeder, R.L. and Harkness, J.V. (1986): BVD virus infection : prospects for control. *Vet.Rec.*, 118, 143-147.
125. Roth, J.A., Bolin, S.R. and Frank, D.E. (1986): Lymphocyte blastogenesis and neutrophil function in cattle persistently infected with bovine viral diarrhea virus. *Am.J.Vet.Res.*, 47, 5, 1139-1141.
126. Roth, J.A., Kaeberle, M.L. and Griffith, R.W. (1981): Effect of bovine viral diarrhea virus infection on bovine polymorphonuclear leukocyte function. *Am.J.Vet.Res.*, 42, 2, 244-250.
127. Schultz, R.D. (1973): Developmental aspects of the fetal bovine immun response:a review. *Corn.Vet.*, 63, 507-535.
128. Shimizu, M. and Satou, K. (1987): Frequency of persistent infection of cattle with bovine viral diarrhea-mucosal disease virus in epidemic areas. *Jpn.J.Vet.Sci.*, 49, 6, 1045-1051.
129. Shimizu, M., Watanabe, H., Satou, K. and Mukarami, S. (1989): Antigenic diversity of bovine viral diarrhea-mucosal disease (BVD-MD) viruses recently isolates from persistently infected cattle and mucosal disease, and serologic survey on bovine sera using antigenically different BVD-MD viruses. *Jpn.J.Vet.Sci.*, 51, 6, 1115-1122.
130. Ssentongo, Y.K., Johnson, H.R. and Smith, J.R. (1980): Association of BVD-MD virus with ovaritis in cattle. *Austr. Vet.J.*, 56, 272-273.

131. Stahl, C., Liess, B., Dahle, J., Frey, H.R. and Grunert, E. (1987): Intraherd control of bovine viral diarrhoea infections in cattle breeding herds. *Dtsch.tierärztl.Wschr.*, 94, 594-596.
132. Steck, F., Lazary, S., Frey, H., Wandeler, A., Haggler, C.H.R., Oppliger, G., Baumberger, H., Kaderli, R. und Martig, J. (1980): Immune responsiveness in cattle fatally affected by bovine virus diarrhoea-mucosal disease. *Zbl.Vet.Med B*, 27, 429-445.
133. Straver, P.J., Journee, D.L.H. and Binkhorst, G.J. (1983): Neurological disorders, virus persistence and hypomyelination in calves due to intrauterine infections with bovine virus diarrhoea virus II. *Virology and epizootiology. Vet.Quart.*, 5, 4, 156-164.
134. Tarry, D.W., Bernal, L. and Edward, S.S. (1991): Transmission of bovine virus diarrhoea virus by blood feeding flies. *Vet.Rec.*, 128, 82-84.
135. Thomson, R.G. and Savan, M. (1963): Studies on virus diarrhoea and mucosal disease of cattle. *Can.J.Comp.Med.*, 27, 207-214.
136. Trautwein, G., Hewicker, M., Liess, B., Orban, S. und Peters, W. (1987): Kleinhirnhypoplasie und hydranenzephalie beim rind nach transplazentarer boviner virusdiarrhoe-infektion. *Dtsch.tierärztl.Wschr.*, 94, 588-590.
137. Underdahl, N.R., Grace, O.D. and Hoerlein, A.B. (1957): Cultivation in tissue culture of cytopathogenic agent from BMD. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.*, 94, 795-797.
138. Ward, G.M., Roberts, S.J., McEntee, K. and Gillespie, J.H. (1969): A study of experimentally induced bovine viral diarrhoea-mucosal disease in pregnant cows and their progeny. *Cornell.Vet.*, 59, 525-538.

139. Westaway, E.G., Brinton, M.A., Gaidamouich, S.Y., Horzinek, M.C., Igarashi, A., Kääriäinen, L., Lvov, D.K., Porterfield, J.S., Russel, P.K. and Trent, D.W. (1985): Togaviridae. *Intervirology*, 24, 125-139.



9. ÖZGEÇMİŞ

26.8.1966 tarihinde Konya'da doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Konya'da tamamladım. 1988 yılında S.Ü.Veteriner Fakültesi'nden mezun oldum. Aynı yıl bu fakültenin Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Viroloji Bilim Dalında Veteriner Hekim olarak göreve başladım. Bu görevde 1991 yılına kadar çalıştıktan sonra aynı bilim dalında açılan Araştırma Görevlisi kadrosuna atandım ve halen aynı görevde bulunmaktayım. Evli ve bir çocuk babasıyım.

10.TEŞEKKÜR

Bana bu konuda çalışma fırsatı veren Sayın Hocam Prof. Dr. Feridun Öztürk'e; çalışmalarım sırasında, virus ve konjugat temininde yardımlarını gördüğüm A.Ü.Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Hocam Prof. Dr. İbrahim Burgu ve aynı anabilim dalının, ön çalışmalarında bana büyük yardımcı dokunan başta Araş.Gör.Dr.Aykut Özkul, Doç.Dr.Yılmaz Akça ve Doç.Dr.Feray Alkan olmak üzere tüm çalışanlarına; S.Ü.Veteriner Fakültesi Viroloji Bilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Sibel Yavru ve diğer elemanlarına; numune sağlamamda yardımcı dokunan Konya Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü yetkililerine; bu araştırmayı destekleyen S.Ü. Araştırma Fonu'na ve S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü'ne yardımlarından dolayı teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.