

DÖL TUTMAYAN İNEKLERDE BOVİNE HERPESVİRUS 1 İNFEKSİYONLARININ SIKLIĞI

Hakan BULUT¹Ali RIŞVANLI²Şükrü TONBAK¹İrem GÜLAÇTI¹A. Kürşat AZKUR¹Yusuf BOLAT¹¹Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı Elazığ-TÜRKİYE²Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı Elazığ-TÜRKİYE

Geliş Tarihi:19.06.2002

Frequency of Bovine Herpesvirus 1 Infections in Cows with Repeat Breeding

Summary

Frequency of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) infections in cows with repeat breeding was studied by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Results indicated that 85 (70.8%) of 120 cows with repeat breeding were seropositive for BHV-1 where as 35 (29.1%) were found to be seronegative. In control group without repeat breeding, 59 (73.7%) of 85 cows were found to be seropositive whereas 21 (26.2%) were seronegative. These results revealed that there was no significant relation ($P>0.05$) between seropositivity of BHV-1 and repeat breeding.

Key Words: BHV-1, repeat breeding, ELISA, cattle

Özet

Bu çalışmada döl tutmayan ineklerde bovine herpesvirus 1 (BHV-1) infeksiyonlarının sıklığı araştırılmıştır. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) ile döl tutmayan toplam 120 hayvanın 85'i (%70.8) seropozitif, 35'i (%29.1) ise seronegatif bulunmuştur. Aynı çalışmada, kontrol grubu olarak test edilen döl tutma probleminin görülmediği toplam 80 ineğin 59'unda (%73.75) BHV-1'e karşı seropozitiflik belirlenmiş ve 21'inde (%26.25) ise bu virusa karşı antikorlara rastlanmamıştır. Bu bulgulara göre, döl tutan ve tutmayan gruptaki hayvanlarda BHV-1 seropozitifliği açısından istatistiki bir fark tespit edilmemiştir ($P>0.05$).

Anahtar Kelimeler: BHV-1, döl tutmama, ELISA, sığır

Giriş

Bovine herpesvirus 1 (BHV-1) *Herpesviridae* familyasının *alphaherpesvirinae* alt familyasında yer almaktadır. Sığırlarda, solunum (infectious bovine rhinotracheitis; IBR), genital (infectious pustular vulvovaginitis-infectious pustular balanopostitis; IPV/IPB) ve generalize seyirli infeksiyonlara neden olabilmektedir (18).

Döl verimi özelliği, ekonomik sığır yetiştiriciliği için oldukça önemlidir ve bir inekten her yıl bir yavru elde edilmesi istenilmektedir. Bu nedenle, döl tutmama olgusu ekonomik sığır yetiştiriciliği için başta gelen problemlerden birisi olarak değerlendirilmektedir (1). Döl tutmama sorununun ortaya çıkmasında temel olarak iki neden sorumlu tutulmaktadır. Bunlar, fertilizasyonun şekillenmemesi ve erken embriyonik ölümlerdir. Embriyonik ölümlere ve fertilizasyonun şekillenmemesine birçok faktör neden olabilmektedir. Bu faktörlerden birisi genital kanalı etkileyen infeksiyonlardır (4,7,8,17).

Daha önce yapılan çalışmalarda BHV-1 genital kanaldan izole edilmiş ve virus foleküler sıvı ile oositlerde belirlenmiştir (10,11). Ayrıca, deneysel infekte edilen hayvanlarda döl veriminde düşmeler kaydedilmiştir (2,12). Genital formun ineklerde neden olduğu en önemli bozukluklar nekrotik özellikteki endometritis ve ooforitistir. Bu bozukluklar ise infekte inekte döl tutmama veya infertiliteye neden olabilmektedir (8,10,12).

Klinik veya subklinik infeksiyonu geçiren BHV-1 ile infekte seropozitif sığırlar daimi virus taşıyıcısı olarak kalmaktadırlar. Seropozitif sığırlardaki latent virus infeksiyonları bazı faktörlerin etkisiyle reaktif olabilmekte ve bu nedenle de seropozitif sığırlar bu süreçte virüsü çevreye saçılabilirler (5,18).

Son yıllarda, hayvan sağlığı ve çiftlik ekonomisine önemli etkilerinden dolayı, pek çok ülke BHV-1 enfeksiyonunun eradikasyonuna veya en azından kontrolüne ilişkin programlar hazırlamışlardır.

Bu infeksiyonla mücadelede tartışmasız olarak kabul gören tek yaklaşım, suni tohumlama istasyonlarında kullanılan boğaların seronegatif olması şartıdır. Ancak, diğer hayvanların seropozitifliği durumlarında, verilecek kararlar, Danimarka gibi infeksiyon insidansının %1 civarları veya daha altında seyrettiği ülkeler hariç, diğer bazı ülkelerde tartışılmaktadır (6,14,17).

Bu çalışmada, ekonomik sığır yetiştiriciliğinde oldukça önemli olan döl tutmama olguları ile BHV-1 seropozitifliği arasında ilişki bulunup bulunmadığının saha şartlarında incelenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Serum Örnekleri: Bu çalışmada BHV-1 antikorları yönünden test edilen serum örnekleri Elazığ ili ve çevre ilçelerindeki yaşları 2-10 arasında değişen 200 inekten toplandı. Bu ineklerin 120 tanesi daha önce en az bir defa doğum yapmış, seksüel siklusları düzenli olan ve fertil bir boğa veya suni tohumlama ile en az 3 defa tohumlanmasına karşı gebe kalmayan hayvanlardı. Geri kalanlar 80 inek ise gebelik problemi olmayanlardan seçildi. Kan alınan tüm ineklerde ultrasonografik, rektal ve vaginal muayene yapıldı ve anamnezleri alındı.

Enzyme Linked Immunosorbent Assay: ELISA'da katı faz antijeni olarak, IBR-Colorado suşu ile infekte Madin Darby Bovine Kidney (MDBK) hücre üst sıvılarından polietilen glikol (PEG) presipitasyon yöntemiyle elde edilen kısmi pürifiye virus kullanıldı (9). PEG pürifiye virus peletindeki protein miktarı Bradford ayracı (Sigma Product Information, Bradford reagent for protein detection) kullanılarak belirlendi ve virus peleti karbonat buferda (pH 9.6) 1 mg/ml oranında sulandırıldı. Bu solüsyondan 96 kuyucuklu ELISA plakalarının her kuyucuğuna 100 µl konuldu. Antijen bağlanmaları için +4°C'de bir gece beklendi. Bu çalışmada, hem kuyucuklarda boş kalan bölgelerin kapatılması hem de sığırlarda MDBK proteinlerine karşı olabilecek bağlanmaların engellemesi amacıyla, bloklama solüsyonu olarak PBS ile %10 oranında sulandırılan MDBK hücre proteini ile immunize edilen fare serumu kullanıldı. Deneyin sonraki aşamaları ve ELISA sonuçlarının değerlendirilmesi Bolat ve ark. tarafından bildirilen yöntemle göre gerçekleştirildi (3). Kısaca, bloklama aşamasını takiben, PBS ile %100 oranında sulandırılan her bir test serum örneğinden iki ayrı kuyucuğa 100'er µl bırakıldı. İnkubasyon (37°C'de 1 saat) ve yıkamalardan (PBS/Tween-20 ile 5 kez) sonra, kuyucuklara PBS ile 1/5000 oranında sulandırılan peroksidaz enzimiyle işaretli tavşan anti-bovine IgG'leri (Sigma Co. St. Louis, MO, USA) ilave edildi. İnkubasyon ve yıkamaları takiben

kuyucuklara 100 µl substrat-kromojen solüsyonu (% 0.03 H₂O₂ ve 0.5 mg/ml O-phenylenediamine içeren 0.1 M sitrat-fosfat tamponu) eklendi. Oda ısısında 15 dk. beklemeden sonra, kuyucuklara 1 N H₂SO₄ eklenerek renk reaksiyonu durduruldu. Kuyucuklardaki absorbans değerleri ELISA okuyucusunda (Medispec, ESR 200, Awareness Technology Inc., Palm City, FL) 450 nm'de okutuldu. Bu deneyde negatif serum kontrol olarak dört kuyucukta fetal calf serumu (FCS, Sigma Co. St. Louis, MO, USA) çalışıldı. Negatif serum kontrolde okunan ortalama absorbans değeri ile 5 x negatif serumun absorbans değerlerinin standart sapması toplamı pozitif-negatif sonuçlar arasında cut-off nokta olarak değerlendirildi (3).

Döl tutmama ile BHV-1 seropozitifliği arasında ilişki bulunup, bulunmadığı x² (ki kare) testi ile belirlendi (13).

Bulgular

Çalışmada kullanılan ELISA sonuçları Tablo 1'de özetlenmiştir. Bu çalışmada ELISA ile test edilen toplam 200 serum örneğinin 144 tanesinde (%72) BHV-1 antikorları saptanmıştır.

Döl tutmayan ineklere ait 120 serum örneğinden 85 tanesinde (%70.8) BHV-1 antikorları saptanırken, bu problemin görülmediği 80 ineğe ait serum örneklerinin ise 59 tanesi (%73.75) bu antikorlar yönünden pozitif bulunmuştur.

Bu verilere göre iki farklı grupta belirlenen seropozitiflik açısından istatistiki olarak önemli bir farklılık saptanmamıştır (P>0.05).

Tablo 1. Çalışmada incelenen hayvanların ELISA bulguları

	Döl tutmayan	Döl tutan	Toplam
Seropozitif	85	59	144
Seronegatif	35	21	56
Toplam	120	80	200

Tartışma

Virusun sığır yetiştiriciliğinde sebep olduğu önemli ekonomik kayıplardan dolayı, bugün, başta Avrupa Birliği ülkeleri olmak üzere pek çok ülke BHV-1 ile mücadele kararı almıştır. BHV-1 ile mücadelede ülkelere göre farklı stratejiler belirlenmiş olmakla birlikte, gerek bu stratejilerin bazıları gerekse ilave bazı kararların alınması halen tartışılmaktadır (6,14,15).

Bu çalışmada test edilen tüm serum örneklerinde yüksek oranda bir seropozitiflik belirlenmiştir. Bölgede IBR/IPV aşılması yapılmadığı için bulunan bu seropozitiflik latent bir infeksiyonun göstergesi

olarak değerlendirilebilir. Daha önce aynı bölgede yapılan bir çalışmada da yüksek oranda (%56.1) BHV-1 seropozitifliği bildirilmiştir (3). Mevcut çalışmada seropozitif hayvanlarda, serumların alındığı dönemlerde, hastalığın klinik formlarına ait semptomlara rastlanmamıştır. Bu durum, ilk olarak latent virusun bu süreçte aktif olmadığı ihtimalini akla getirmekle birlikte, seropozitif hayvanlarda tekrar infeksiyonların çoğunlukla subklinik seyirli olabilmesiyle de ilişkili olabilir.

Antijenik farklılıklarına ve restriksiyon enzim analizi profillerine göre, BHV-1'in 3 subtipi bulunduğu bildirilmektedir (2,7,16). Bu subtiplerden BHV-1.1'in solunum sisteminde, BHV-1.2'nin ise hem solunum hem de genital sistemde infeksiyonlara yol açtığı ifade edilmektedir. Bu nedenle, BHV-1 her zaman genital sistem bozukluğuna yol açmamaktadır. Bundan dolayı, mevcut çalışmada seropozitif hayvanların büyük bir bölümünde genital sistemin etkilenmemesi durumu da söz konusudur.

Kaynaklar

1. Alaçam E. İneklerde infertilite sorunu. In: Alaçam E, Editor. Evcil Hayvanlarda Doğum ve İnfertilite. Medisan, Ankara 1999; 267-290.
2. Biuk-Rudan N, Cvetnic S, Madic J, Rudan D. Prevalence of antibodies to IBR and BVD viruses in dairy cows with reproductive disorders. *Theriogenology* 1999; 51: 875-881.
3. Bolat Y, Bulut H, Özdarendeli A, Doymaz MZ. Sığırlarda infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis virus antikorlarının saptanması amacıyla geliştirilen enzime bağlı immunosorbent deneyi. *F Ü Sağlık Bil Derg* 1996; 10: 282-288.
4. Chiang BC, Smith PC, Nusbaum KE, Stringfellow DA. The effect of infectious bovine rhinotracheitis vaccine on reproductive efficiency in cattle vaccinated during oestrus. *Theriogenology* 1990; 33:1113-1120.
5. Fenner FJ, Gibbs EP, Murphy FA, Rott R, Studdert MJ, White DO. Immune response to viral infections. In: Fenner FJ, Gibbs EP, Murphy FA, Rott R, Studdert MJ, White DO. Editors. *Veterinary Virology*. Academic Press, San Diego 1993; 137-157.
6. Food and Agriculture Organization. *Handistatus II Annual Animal Disease Status, World /2000/ infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis*.
7. Hage JJ, Schukken YH, Dijkstra Th, Barkema HW, Van Valkengoed PHR, Wentink GH. Milk production and reproduction during a subclinical bovine herpesvirus 1 infection on a dairy farm. *Prev Vet Med* 1998; 34: 97-106.
8. Kendrick JW, McEntree K. The effect of artificial insemination with semen contaminated with IBR/IPV virus. *Cornell Vet* 1987; 57: 3-11.
9. Killington RA, Stokes A, Hierholzer JC. PEG precipitation. In: Mahy BWJ, Kangro HO, Editors. *Virology Methods Manual*. Academic Press, New York 1996; 71-88.
10. Miller MJ, Van Der Maaten JM. Experimentally induced infectious bovine rhinotracheitis virus infection during early pregnancy: Effect on the bovine corpus luteum and conceptus. *Am J Vet Res* 1986; 47: 223-228.
11. Miller MJ, Van Der Maaten JM. Reproductive tract lesion in heifers after intrauterine inoculation with infectious bovine rhinotracheitis virus. *Am J Vet Res* 1984; 45: 790-794.
12. Parsonson IM, Snowdon WA. The effect of natural and artificial breeding using bulls infected with, or semen contaminated with, infectious bovine rhinotracheitis virus. *Aust Vet J* 1975; 51: 365-369.
13. Snedecor GW, Cochran WG. *Statistical Methods*. Iowa State University Press. Iowa. 1991.
14. Straub OC, Mawhinney IC. Vaccination to protect calves against infectious bovine rhinotracheitis. *Vet Rec* 1988; 122: 407-411.
15. Van Oirschot JT, Kaashoek MJ, Rijsewijk FAM. Advances in the development and evaluation of bovine herpesvirus 1 vaccines. *Vet Microbiol* 1996; 53: 43-54.

16. Van Oirschot JT, Straver PJ, Van Lieshout JAH, Quak J, Westenbrink F, Van Exsel ACA. A subclinical infection of bulls with bovine herpesvirus type 1 at an artificial insemination centre. *Vet Rec* 1993; 132: 32-35.
17. Wentink GH, Frankena K, Bosch JC, Vandehoek JED, van den Berg T. Prevention of disease transmission by semen in cattle. *Liv Prod Sci* 2000; 62: 207-220.
18. Wyler R, Engels M, Schwyzer M. Infectious bovine rhinotracheitis/vulvovaginitis (BHV1). In: Wittmann G, Editor. *Herpesvirus Diseases of Cattle, Horses and Pigs*. Kluwer Academic Publishers, Boston 1989; 1-72.