

SAHADAN İZOLE EDİLEN BOVİNE VİRAL DİARRHEA VİRUS (BVDV) İZOLATLARININ İMMUNPLAK TEST İLE BİYOTİPİK TAYİNİ*

Taner KARAOĞLU**

Biotypic Characterisation of Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) Isolates Recovered from Field Using Immunoplaque Assay in Turkey.

Summary: In this research, cattles showing respiratory and digestive symptom infection symptoms from four different farms and a sloughterhouse and cattles with no symptoms of digestive and respiratory system infections were sampled. Faeces, leucocyte and sera samples of 230 cattles had been examined for BVDV antigen with PLA test and sera samples were examined for BVDV spesific antibodies with NPLA test.

3 of the 230 leucocyte samples showed BVDV antigen. This three isolates had been determined as noncytopathogenic BVDV biotype according to immunoplaque test while they had shown noncytopathogenic immunoplaques. In 166 (72.1 %) 230 cattles which were sampled, different titres of BVDV antibodies were found while 64 samples (27.8 %) were detected as seronegative.

Key words: BVD, biotype, Immunoplak test

Özet: Araştırmada, dört farklı işletmede ve bir mezbahada sindirim veya solunum sistemi enfeksiyonu semptomları gösteren sığırlar ile sindirim ve solunum sistemi enfeksiyonu semptomlarının görülmediği kapalı bir işletmeden örneklemeler yapıldı. Toplam 230 adet sığırın gaita, lökosit ve serum numunelerinde direkt PLA testi ile BVDV antijeni, serum numunelerinde ise NPLA testi ile BVDV spesifik antikorları araştırıldı.

Araştırmada örneklenen toplam 230 adet sığırın 3 adedinin lökosit numunesinde BVDV antijeni tesbit edildi. Elde edilen 3 izolat, yapılan İmmunplak test sonucunda nonsitopatojen immunplak oluşturdu ve nonsitopatojen BVDV biyotipi olarak değerlendirildi. Örneklenen 230 adet sığırın 166 (% 72.1) adedinde farklı titrelerde BVDV spesifik antikor tesbit edilirken 64 adet (% 27.8) numune seronegatif olarak değerlendirildi.

Key words: BVD, biyotip, İmmunplak test

GİRİŞ

Bovine viral diarrhea virus (BVDV) ilk kez 1946 yılında İngiltere'de sindirim sisteminde erosiv lezyonlar ve diyare ile seyreden ve öldürücü olan akut epizootik enfeksiyonlarla ilişkili olarak tanımlanmış (25), 1967 yılında ise Gillespie ve ark. (9)

tarafından abort olmuş bir fötustan izole edilmiştir. BVD özellikle sığırlar arasında oldukça geniş bir yayılım göstermekte, sığırların büyük bir çoğunluğu yaşamlarının ilk yılında virus ile enfekte olmaktadır.

Hastalığın akut şekli diyare, öksürük, süt veriminde geçici düşme ve ender olarak

* Bu çalışma A.Ü. Araştırma Fonu tarafından desteklenen ve Prof.Dr.İbrahim Burgu'nun yöneticiliğinde sürdürülen 93.30.00.08 no'lu Doktora tez projesinin özetidir.

** Araş.Gör.Dr.. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı, Ankara.

görülen abortlar ile karakterizedir (7,25). Hastalığa bağlı abort ve malformasyonların sebebi olarak fetal enfeksiyonlar gösterilmekte (9), immün olmayan gebe hayvanların enfeksiyonu sonucu virus plasental bariyeri geçerek fötüsü enfekte etmekte (8,17,27) ve bu durum fötüsün konjenital enfeksiyona yakalanma yaşına bağlı olarak çeşitli anomalilere, fötüsün ölümüne, klinik semptom oluşturmaksızın yaşam boyu sürebilen viral persistense veya virüsü elimine edecek immün cevabın oluşumuna neden olmaktadır (7,17,19).

BVD virusunun sitopatojen (cp) ve sitopatojen olmayan (ncp) biyotipleri bulunmakta (1,2,3,15,21,22), sitopatojen biyotipler hücre kültürlerinde meydana getirdikleri sitopatolojik etki (CPE) ile kolayca izlenebilmelerine karşın, sitopatojen olmayan biyotipler ancak interferenz (1,3,6,21,26), İmmunfloresan (1,3,21,26), İmmunperoksidaz (16) ve İmmunplak test (15,20,28) gibi teknikler ile saptanabilmektedirler.

BVD virusunun ncp biyotipi 1957'de ilk kez Lee ve Gillespie. (18) tarafından hücre kültürü sistemlerinde izole edilmiş, aynı yıllarda Underdahl ve ark. (30), bir sığırdan hücre kültürlerinde vakuolasyon ve lizis'e sebep olan sözkonusu virüsün cp bir biyotipini izole etmeyi başarmışlardır. Daha sonra yapılan araştırmalar (18,30) bu iki ajanın aynı virüsün biyotipleri olduklarını göstermiştir. Günümüzde ise bu iki izolatin aynı virüsün farklı biyotipleri oldukları ve Mucosal Disease (MD)'in patogeneğinde ortak rol oynadıkları kesin olarak ortaya konulmuştur (4,5,24).

BVDV'nin ncp biyotipi ile persiste enfekte sığırların, aynı virüsün cp biyotipi ile süperenfeksiyonu sonucu öldürücü MD gelişmekte (4,5,12,26), bu durumda hastalığın başlamasından iki hafta sonra ölümler meydana gelmekte, virüsün cp ve ncp her iki biyotipi de hayvanın dokularından izole edilebilmektedir (21). MD genellikle 6-24 aylık sığırlarda oluşmakta (1,22,26), hastalığın klasik formunda şiddetli ishal, burun akıntısı, aşırı salivasyon gibi ağır klinik bulgular görülmekte, hastalık düşük morbidite ve

yüksek mortalite ile seyretmektedir. Bazı akut MD olaylarında hayvan beklenen süre içinde ölmekte ve hastalık kronikleşebilmekte, kronik MD'li hayvanlar ise 18 aya kadar yaşayabilmekte ve bitkinlik içinde ölmektedir (1,26).

Hastalığın teşhisi karakteristik olan klinik ve patolojik bulguların varlığına dayanılarak yapılabilirse de kesin teşhis laboratuvarında mümkün olmakta, direkt ve indirekt olarak enfeksiyon belirlenebilmekte, ilk kez Howard ve ark. (15) tarafından kullanılan immünplak test ile virüsün biyotipi tesbit edilebilmektedir.

Bu araştırmada başlıca iki amaç öngörülmüştür, a) Kapalı yetiştirmeler veya küçük çaplı özel işletmelerde bulunan sindirim veya solunum sistemi enfeksiyonu semptomları gösteren sığırların gaita, lökosit ve serum numunelerinden BVDV izolasyonuna gidilmesi ve serum örneklerinin BVDV spesifik antikorları yönünden serolojik kontrolü ile BVDV enfeksiyonunun insidensinin belirlenmesi, b) Elde edilen BVDV izolatlarının Türkiye'de ilk kez immünplak test ile biyotipik karakterizasyonunun yapılmasıdır.

MATERYAL ve METOT

Materyal

Hücre Kültürü: Araştırmada kullanılan fetal dana böbrek (FDB) hücre kültürü Çubuk/Ankara mezbahasında kesilen sığırların fötüslerinin böbreklerinden klasik yöntem ile hazırlandı ve BVD virus yönünden kontrol edilmek üzere direkt immünperoksidaz testine (PLA) tabi tutuldu. BVDV yönünden negatif olarak tesbit edilen hücre serileri araştırmada kullanılmak üzere -80°C'de saklandı.

Dana serumu: Araştırmada kullanılan dana serumu, Et ve Balık Kurumu, Ankara mezbahasında kesilen danalardan sağlandı. Bu danalardan elde edilen kanın serumu ayrıldıktan sonra 56°C'de 30 dakika tutulmak suretiyle inaktivasyona tabi tutuldu

ve membran filtrasyon yöntemi ile steril edilerek küçük miktarlara porsiyonlandı. Elde edilen serumlar BVD virus yönünden kontrol edilmek üzere PLA testine tabi tutuldu ve BVDV yönünden negatif olduğu tesbit edilen dana serumları, FDB hücrelerinin üretilmesinde ve devamlılığının sağlanmasında kullanıldı.

Fötal dana serumu: Virus izolasyon çalışmaları ile elde edilen izolatların biyotipik tayinlerinin yapılması amacıyla uygulanan Native plak ve İmmunplak testlerde BVD antijen ve antikoru içermeyen fötal dana serumları (FDS) kullanıldı.

Virus: BVDV spesifik antikorların varlığını tesbit etmek amacıyla yapılan Nötralizasyon immünperoksidaz (NPLA) testinde BVD virusunun sitopatojen referens suşu NADL kullanıldı.

Konjugat: Direkt immünperoksidaz (PLA), İmmunplak test ve Nötralizasyon immünperoksidaz (NPLA) testlerde heterotipik poliklonal BVD antikorusunun horse-radish peroksidaz (HRPO) ile işaretli konjugatı kullanıldı.

Substrat: 0.1 M asetat tamponu (pH:5) içinde 3 amino-9 etil karbazol ve dimetil formamid'in hazırlanmasıyla elde edildi ve 1/1000 oranında kromojen (H₂O₂) ilavesiyle kullanıldı.

Araştırmada Örneklenen Hayvanlar: Araştırmada, bazı kapalı yetiştirmeler (1) ile küçük çaplı özel bir işletmede (2) ve bir mezbahada (3) sindirim veya solunum sistemi enfeksiyonu semptomları gösteren sığırlar ile sindirim ve solunum sistemi enfeksiyonu semptomlarının görülmediği kapalı bir işletmeden (4) rastgele örneklemeler yapıldı. Örneklenen işletmeler ve örneklenen hayvan sayıları Tablo 1.'de gösterildi.

Tablo 1.: Araştırmada örneklenen hayvanlar ve sayıları
Table 1.: Origin and number of sampled animals

İşletme / BÖLGE	İşletme Kodu	Örneklenen Hayvan Sayısı
Ceyhan / ADANA	1	14
Karacabey / BURSA	1	50
Çubuk / ANKARA	3	27
Acıpayam / DENİZLİ	1	44
Akyurt / ANKARA	2	48
Çifteler / ESKİŞEHİR	4	47
TOPLAM		230

Virus İzolasyon Materyalleri: Bu amaçla, örneklenen hayvanların; gaita, lökosit ve serum numuneleri kullanıldı.

Gaita örnekleri: Gaita örnekleri her hayvanın direkt olarak rektumundan alındı ve PBS ile 1/10 oranında sulandırıldıktan sonra vorteksenerek homojen hale getirildi. Homojenat 3000 devirde +4°C'de 30 dakika süre ile santrifüje tabi tutulduktan sonra süpernatant steril başka bir tüpe aktarıldı ve sterilite kontrolü yapıldıktan sonra virus izolasyonu yapıncaya kadar -20°C'lik dondurucularda saklandı.

Lökosit örnekleri: Antikoagulan madde içeren tüplere⁽¹⁾ alınan kan örneği 2000 devirde +4°C'de 10 dakika süre ile santrifüje tabi tutuldu. Süre sonunda lökosit tabakası 2 ml antibiyotikli PBS içinde 3 kez yıkandı ve son olarak 2 ml PBS içinde sulandırıldıktan sonra kullanılıncaya kadar -20°C'lik donduruculara kaldırıldı.

Serum örnekleri: Kaolin'li tüplere⁽¹⁾ alınan kanın serumu ayrıldıktan sonra serum örnekleri ikiye bölündü. Bir kısmı virus izolasyonu amacıyla derin donduruculara kaldırılırken diğer miktarları BVDV spesifik

⁽¹⁾ Greiner, Nuertingen, Germany.

antikor varlığını tesbit etmek amacıyla serolojik kontrole tabi tutulmak üzere ayrıldı ve bu numuneler serolojik teste tabi tutulmadan önce 56°C'de 30 dakika bekletilmek suretiyle inaktive edildi.

Virus İzolasyonu: BVDV yönünden negatif olduğu tespit edilen FDB hücresi, ELA⁽²⁾+EMEM⁽²⁾+%5 FDS⁽³⁾ ile 1×10^5 hücre/ml olacak şekilde sulandırıldıktan sonra hücre kültürü tüplerine⁽⁴⁾ 1'er ml konuldu. Bir gece inkubasyondan sonra her numuneden bir tüpe 0.1 ml inokulasyon yapıldı ve inokulasyon yapılan tüpler 37°C'lik etüvlere kaldırıldı. Beş gün süreyle inkubasyonda kalan tüpler her gün doku kültürü mikroskobu⁽⁵⁾ ile kontrole tabi tutuldu ve hücrelerde meydana gelen morfolojik değişiklikler kaydedildi.

Metot

Direkt İmmunperoksidaz (PLA)

Testi: Araştırmada örneklenen sığırların gaita, lökosit ve serum numunelerinde BVDV antijeninin varlığını araştırmak amacıyla bu numunelerin FDB hücre kültüründeki 1. pasaj sıvıları PLA testine tabi tutuldu. Holm Jensen'in (14) bildirdiği yöntemle göre yapılan testte, FDB hücre kültürü ELA+EMEM+%5 FDS vasatı ile 1×10^5 hücre/ml olacak şekilde sulandırılarak 24 gözlü makropleytlere⁽⁶⁾ her gözüne 1'er ml konuldu. Yirmidört saat 37°C, %5 CO₂'li etüvde inkubasyonu takiben her hayvana ait gaita, lökosit ve serum numunelerinin 1. pasaj sıvılarından her numune için ayrı göz olacak şekilde 0.1'er ml inokule edildi ve pleytler tekrar 37°C, %5 CO₂'li etüvlere kaldırıldı. Kırksekiz saat süren inkubasyon sonunda makropleytlere içerikleri dökülerek hücre yüzeyleri 1/3'lük PBS ile yıkandı ve pleytler gözleri aşağıya gelecek şekilde 80°C'de 1 saat süreyle tutularak hücrelerin pleyt yüzeyine fikze olması sağlandı. Süre sonunda tüm gözlere 0.2 ml konjugat konuldu ve pleytler oda sıcaklığında 1 saat bekletildikten sonra konjugat ortamdan

uzaklaştırılarak hücre yüzeyleri 3'er kez 1/3'lük PBS ile yıkandı. PBS'in ortamdan uzaklaştırılmasını takiben tüm gözlere 0.2 ml substrat konuldu ve oda sıcaklığında 30 dakika inkubasyonu takiben reaksiyon distile su ile durdurularak her göz doku kültürü mikroskobunda değerlendirildi.

BVDV izolatlarının FDB hücre kültüründe pasajlanması: Direkt PLA testine tabi tutularak BVDV antijeni tespit edilen numunelerin, FDB hücre kültüründe sitopatojeniteleri izlenmek amacıyla 3 seri pasaja tabi tutuldu.

Native ve İmmunplak Test: Araştırmada direkt PLA testine tabi tutularak BVDV antijeni tespit edilen numuneler biyotipik tayinleri yapılmak üzere native plak ve İmmunplak teste tabi tutuldu.

Native Plak Test: Sanders (28)'in bildirdiği yöntemle göre yapılan native plak testte, FDB hücre kültürü ELA+EMEM+%5 FDS'lu vasatı ile 2×10^5 hücre/ml olacak şekilde sulandırıldıktan sonra 6 cm çaplı hücre kültürü petrilere 6'şar ml konuldu ve 37°C, %5 CO₂'li etüve kaldırıldı. Ertesi gün petri içindeki vasat uzaklaştırıldı ve hücre yüzeyleri birer kez PBS ile yıkandı. PBS'in ortamdan uzaklaştırılmasından sonra her izolatin 1. pasaj sıvılarının 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴ ve 10⁻⁵'lik sulandırmalarından 0.5'er ml inokule edilerek 37°C, %5 CO₂'li etüvde 2 saat süreyle inkubasyonu sağlandı. Süre sonunda pasaj sıvıları ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra hücre yüzeyleri 3'er kez PBS ile yıkandı. Yıkama işlemini takiben eşit miktarda 2xDMEM⁽⁷⁾+%2'lik Noble agar⁽⁸⁾+ %10 FDS'lu vasattan her petri kutusuna 6'şar ml konuldu ve yarı katı vasatın donması sağlandıktan sonra petri kutuları 37°C'lik %5 CO₂'li etüve kaldırıldı. Dört günlük inkubasyondan sonra native plakların görülebilmesi amacıyla hücreler vital boyamaya tabi tutuldu. Bu amaçla petri kutuları içindeki yarı katı vasatın üzerine 5'er ml 2xDMEM+ %2'lik Noble agar+ %1'lik Nötral Red karışımından konularak 37°C, %5

(2) Biochrom, Kg., Berlin, Germany.

(3) Paesel GmbH and Co., Frankfurt, Germany.

(4) Greiner, Nuertingen, Germany.

(5) Olympus, Tokyo, Japan.

(6) Costar, Cambridge, MA, USA.

(7) Biochrom, Kg., Berlin, Germany.

(8) Difco, Detroit, Michigan, USA.

CO₂'li etüve kaldırıldı ve 5-6 saat sonra izolatların plak oluşturup oluşturmadığı değerlendirildi.

İmmunplak Test: İmmunplak test Liess ve ark. (20)'nin bildirdiği yöntemle yapıldı. Bu amaçla native plak testte, her izolatin 1. pasaj sıvılarının petri kutularına inokulasyonu ve 4 günlük inkubasyonu sonuna kadar uygulanan her basamak İmmunplak testte de aynen uygulandı. Dört günlük inkubasyon sonunda petri kutuları içindeki yarı katı vasat uzaklaştırılarak hücre yüzeyleri 3'er kez PBS ile yıkandı. Petri kutularının ağızları aşağıya gelecek şekilde 80°C'de 1 saat tutulmak suretiyle hücrelerin fizyasyonu sağlandı. Her petri kutusuna 1.5 ml konjugat konularak oda sıcaklığında 1 saat bekletildi. Süre sonunda konjugatın uzaklaştırılmasını takiben hücre yüzeyleri 3'er kez 1/3'lük PBS ile yıkandı ve tüm petri kutularına 1.5 ml substrat konularak oda sıcaklığında inkube edildi. Reaksiyon 20-30 dakika sonra distile su ile durduruldu ve oluşan immunplaklar doku kültürü mikroskobu ile değerlendirildi.

Nötralizasyon İmmunperoksidaz (NPLA) testi: Araştırmada örneklenen sığırlarda BVDV spesifik antikor varlığının tesbiti amacıyla uygulanan NPLA testi Holm Jensen (14)'in bildirdiği yöntemle yapıldı. Buna göre serum numuneleri 96 gözlü mikroyetler üzerinde 1/5, 1/10, 1/20, 1/40 olacak şekilde sulandırıldıktan sonra, 0.05 ml serum sulandırmalarının üzerine 0.05 ml BVDV'nin cp referens suşu NADL ilave edildi ve 1 saat 37°C, % 5 CO₂'li etüve nötralizasyona bırakıldı. Süre sonunda ELA+EMEM+% 5FDS'lu vasat ile 3x10⁵ hücre/ml olacak şekilde hazırlanan FDB hücre süspansiyonundan her göze 0.05 ml ilave edildi ve mikroyetler CO₂'li etüve kaldırıldı. Kırksekiz saat süren inkubasyondan sonra mikroyetlerin içeriği dökülerek hücre yüzeyleri 3'er kez 1/3'lük PBS ile yıkandı ve yetler gözleri aşağı gelecek şekilde 80°C'de 1 saat tutularak hücrelerin yet yüzeyine fizyasyonu sağlandı. Tüm gözlerle 0.05 ml konjugat konularak oda sıcaklığında 1 saat inkubasyona bırakıldı. Süre sonunda konjugat uzaklaştırılarak hücre yüzeyleri 3'er kez

1/3'lük PBS ile yıkandı ve yine her göze 0.05 ml substrat ilave edildi. Oda sıcaklığında 20-30 dakika inkubasyonu takiben reaksiyon distile su ile durduruldu ve serum numunelerindeki antikor düzeyi tesbit edildi.

BULGULAR

Virus İzolasyonu sonuçları:

Araştırmada örneklenen 230 adet sığırın gaita, lökosit ve serum numunelerinin hiçbiri, FDB hücre kültürüne yapılan ilk inokulasyonlarında hücre kültüründe sitopatolojik etki oluşturmadı.

PLA testi sonuçları:

Toplam 230 adet sığıra ait gaita, lökosit ve serum numunelerinin 1. pasaj sıvılarına yapılan direkt PLA testi sonucunda, ağır sindirim ve solunum sistemi enfeksiyonu görülen küçük kapasiteli özel bir işletmeden örneklenen (Tablo 1, no:2) 3 adet sığırın lökosit numunesinde BVDV antijeni tespit edildi.

BVDV izolatlarının FDB hücre

kültüründe Sitopatojeniteleri: Araştırmada elde edilen 3 adet BVDV izolatının FDB hücre kültüründe yapılan 3 seri pasajında hiçbir izolat sitopatolojik etki meydana getirmede.

Native ve İmmunplak test

sonuçları: Direkt PLA testi ile tespit edilen 3 adet BVDV izolatına uygulanan native plak test sonucunda hiçbir izolat plak oluşturmazken, immunplak test sonucunda her üç izolat da non-sitopatojen immunplak oluşturdu ve BVDV'nin ncp biyotipi olarak değerlendirildi.

NPLA testi sonuçları:

Araştırmada örneklenen 230 adet sığırın 166 adedinde (%72.1) BVDV spesifik antikor tespit edildi. Bir ve 4 numaralı kapalı işletmelerde örneklenen sığırların tamamında (% 100) seropozitiflik saptanırken, 2 sıra no'lu kapalı işletmede seropozitiflik % 20, virus izolasyonunun yapıldığı 5 no'lu küçük kapasiteli işletmede ise seropozitiflik % 89.5 olarak belirlendi. Mezbahada örneklenen (no: 3) ve Türkiye'nin farklı bölgelerinden kesim için getirilen sığırlarda seropozitiflik % 92.5 olarak tespit edilirken, sindirim veya solunum

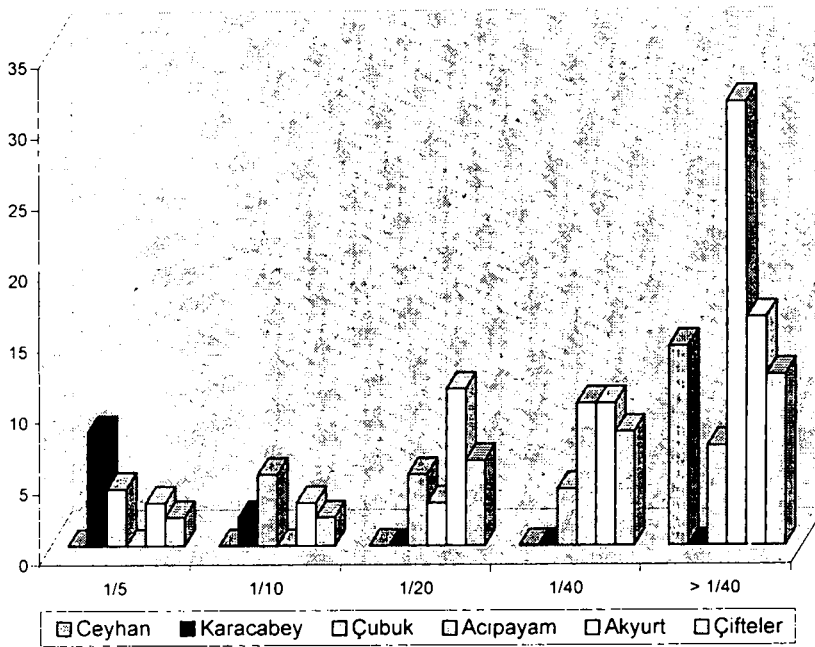
sistemi enfeksiyonu semptomlarının görülmediği 6 no'lu kapalı işletmede ise bu oran % 63.8 olarak saptandı. Seropozitif olarak tespit edilen 166 adet sığırın antikor titreleri

Tablo 2' de ve Grafik 1'de gösterilmiştir. Beş numaralı kapalı işletmede örneklenen ve direkt PLA testi ile BVDV antijeni tespit edilen 3 adet sığır ise seronegatif olarak tespit edildi.

Tablo 2.: Seropozitif hayvanların SN₅₀ değerleri

Table 2.: Distribution of ND₅₀ values of seropositive animals within the herds.

Kod İşletme / BÖLGE	Hayvan Sayısı			SN ₅₀				
	Örneklenen	Seropozitif	%	1/5	1/10	1/20	1/40	>1/40
1 Ceyhan/ADANA	14	14	100	-	-	-	-	14
2 Karacabey/BURSA	50	10	20.0	8	2	-	-	-
3 Çubuk/ANKARA	27	25	92.5	4	5	5	4	7
4 Acıpayam/DENİZLİ	44	44	100	-	-	3	10	31
5 Akyurt/ANKARA	48	43	89.5	3	3	11	10	16
6 Çifteler/ESKİŞEHİR	47	30	63.8	2	2	6	8	12
TOTAL	230	166	72.1	17	12	25	32	80



Grafik 1.: Araştırmada örneklenen sığırların antikor titreleri

Graphic 1.: Antibody titers of sampled animals

TARTIŞMA ve SONUÇ

Araştırmada direkt PLA testi ile tespit edilen 3 adet BVDV izolatının hücre kültüründe meydana getirdiği sitopatolojik etkinin gözlenmesi ve hücre kültürlerinde meydana gelen morfolojik hücre değişikliği ile İmmunlak test sonuçlarının karşılaştırılması

amacıyla her 3 izolat da her biri 5'er gün süren 3'er pasajlama işlemine tabi tutulmuş ve bu süre içinde hiçbir numune sitopatolojik etki oluşturmamıştır. Radostits ve Littlejohns. (26) herhangi bir numunedeki olası virusun inokule edildiği hücre kültürü sistemlerinde sitopatolojik etki ile tanınabilmesi için hücre kültüründe birkaç pasaja ihtiyaç duyulduğunu,

eğer numunede BVDV'nin cp bir biyotipi varsa en az birkaç pasaj sonucunda CPE'nin meydana gelebileceğini belirtmektedir.

Bunun yanında bir seri pasajlama işlemine tabi tutulan izolatların hücre kültürlerinde sitopatolojik etkisinin tesbiti amacıyla yapılan mikroskopik kontrollerinde değerlendirme hatalarının olabileceği de bir gerçektir. Hücrelerde meydana gelen morfolojik değişiklikler her zaman yalnızca virusun varlığına bağlı olarak şekillenmemektedir. Scheppers (29) çalışmasında elde ettiği BVDV izolatlarını hücre kültürlerinde bir seri pasajlama işlemine tabi tutmuş, hücre kültürlerinde morfolojik olarak meydana gelen değişikliklerin mikroskopik olarak değerlendirilmesi ile elde ettiği sonuçların, daha sonra aynı izolatlara uyguladığı plak ve immunplak test sonuçlarından farklılıklar gösterdiğini tespit etmiş, bu farklı sonucun mikroskop değerlendirmesindeki "teknik hatadan veya yorum hatasından kaynaklanabileceğini bildirmiştir. Çeşitli araştırmacılar (11,23) hücrelerin yaşlılığından kaynaklanan hücre dejenerasyonu ile tipik, spesifik virus CPE'sinin birbirinden ayrılmasının güçlüğünü de belirtmektedirler.

Hücre kültüründe meydana gelen morfolojik değişikliklere bakılarak virusun sitopatojenitesi hakkında sağlıklı bir değerlendirme yapılamamasının bir diğer nedeni ise cp ve ncp BVDV biyotiplerinin birlikte bulunduğu miks enfeksiyon durumlarının değerlendirilmesidir. Gillespie ve ark. (10) aynı izolatta BVDV'nin cp biyotipi ile ncp biyotipinin birlikte bulunabileceğini ve cp BVDV biyotipinin ncp BVDV biyotipine karşı interfere olma özelliğinden dolayı izolatın biyotipine ait gerçek sonucun immunplak testten elde edilmesi gerektiğini belirtmiştir.

Tüm bu bilgiler, elde edilen BVDV izolatlarının biyotipik tayinlerinin yapılabilmesi için o izolatın hücre kültürü pasajlarının yapılarak hücrelerdeki morfolojik değişikliklere bakılması suretiyle değerlendirilmesinin gerçekçi bir sonuca

götürmeyebileceğini göstermektedir. BVDV antijeni tespit edilen izolatların biyotipik tayinlerinin yapılmasında esas yöntem İmmunplak test olmakta, İmmunplak test sonucunda virusun cp ve ncp biyotipleri ayrı ayrı tesbit edilebileceği gibi her iki biyotipin birarada bulunduğu miks enfeksiyon durumları da kolayca değerlendirilebilmektedir.

Araştırmada izole edilen 3 adet BVDV izolatının hücre kültürlerinde yapılan 3 seri pasajında hiçbir numune sitopatolojik etki oluşturmamıştır. Bu 3 adet izolata uygulanan native plak testte hiçbir izolat plak meydana getirmezken, immunplak test sonucunda ise her 3 izolat da nonsitopatojen immunplak oluşturmuş, elde edilen izolatların hepsi ncp BVDV biyotipi olarak tespit edilmiştir. Söz konusu 3 adet sığırın yapılan serolojik kontrollerinde ise BVDV spesifik antikoruna rastlanmamıştır. Bu hayvanların besi danası olmaları ve birinci örneklemeden kısa bir süre sonra kesilmeleri 2. örneklemenin yapılabilmesini engellemiş, ikinci örnekleminin yapılamaması bu 3 sığırın örnekleme anındaki viremik durumları hakkında kesin bir bilgiye ulaşılmasını olanaksız kılmıştır. Ancak bu 3 adet sığırın örnekleme anında akut enfekte olabileceği gibi persiste enfekte olma olasılığı da gözönünde bulundurulmalıdır. Meyling ve ark. (22) yaptıkları çalışmada persiste enfekte hayvanların bulunduğu sürülerde BVDV antikor prevalansını % 87, persiste enfekte hayvanların bulunmadığı sürülerde ise antikor prevalansını % 43 olarak saptamışlardır. Harkness (13) ise yaptığı serolojik taramalarda 1 yaşın üzerindeki sığırların % 60-80'inin nötralizan antikor taşıdığını göstermiş, bu kadar yüksek seropozitifliğin sürüdeki persiste enfekte hayvanların varlığına bağlı olduğunu bildirmiştir.

Araştırmada örneklenen 230 adet sığırın kan serumuna yapılan NPLA testi sonucunda 166 adedinde (% 72.1) farklı titrelerde BVDV antikoruna rastlanmış, 64 adet sığırın (% 27.8) kan serumunda ise seronegatiflik saptanmıştır. Seropozitif olarak tesbit edilen 166 adet sığırın 80 adedinin (% 48.1) 1:40 ve daha yüksek titrede BVDV

antikoru içerdiği tesbit edilmiştir. Sürülerin durumu ayrı ayrı incelendiğinde; Karacabey'deki kapalı işletmede seropozitiflik % 20 olarak tespit edilmiştir. Bu hayvanların yaşlarının 3-23 gün arasında değişmesi seropozitifliğin immunkompotensin gelişmesinden sonraki fütal enfeksiyon sonucu olabileceği gibi kolostral antikorlarca da meydana gelebileceği olasılığını akla getirmektedir. Ancak seropozitif olarak tespit edilen bu yenidoğanların annelerinin serolojik kontrollerinin yapılamaması yenidoğanlardaki bu seropozitifliğin açıklanamamasına neden olmuştur. Ceyhan ve Acıpayam'daki kapalı işletmelerde örneklenen sığırların tamamı (% 100), Akyurt'taki özel işletmede örneklenen sığırların % 89.5'u seropozitif olarak tespit edilirken, Türkiye'nin çeşitli bölgelerinden kesim için getirilen sığırların örneklediği Çubuk mezbahasında, % 92.5 oranında seropozitiflik bulunmuş, sindirim ve solunum sistemi enfeksiyonu semptomlarının görülmediği Çifteler'deki kapalı işletmede bu oran % 63.8 olarak tespit edilmiştir.

Bu araştırma ile ülkemizde BVDV enfeksiyonunun yaygın olarak görüldüğü bir kez daha ortaya konulmuş ve en önemlisi elde edilen BVDV izolatlarına İmmunplak test uygulamak suretiyle Türkiye'de ilk kez BVDV'nin biyotipik sınıflandırmanın yapılması sağlanmıştır. İmmunplak test, BVDV izolatlarının sitopatojenite tayinlerinin tesbiti ile sığırlarda BVDV enfeksiyonlarının tüm formlarına ilgili patogenezin açıklanmasında da önemli bir yer tutmaktadır. Böylece BVDV'nin sitopatojenite özelliğinin tesbiti sayesinde örneklenen bireylere ve bunların oluşturdukları sürülere ilişkin sağlıklı değerlendirmelerin yapılabilmesi olanağı elde edilmiş, plak ve immunplak testlerin rutine indirgenmiş olmasıyla ülkemizde gelecekte yapılması planlanan moleküler düzeydeki çalışmalara temel oluşturacak önemli bir adım atılmıştır.

Kaynaklar

1. **Baker, J.C.** (1987) : *Bovine virus diarrhoea virus. : a review.* J. Am. Vet. Med. Assoc., 190(11):1449-1458.
2. **Barber, D.L.M., Nettleton, P.F. and Herring, J.A.** (1985) : *Disease in a dairy herd associated with the introduction and spread of bovine virus diarrhoea virus.* Vet. Rec., 117:459-464.
3. **Bolin, S.R., Mc Clurkin, A.W. and Coria, M.F.** (1985) : *Frequency of persistent bovine viral diarrhoea virus infection in selected cattle herds.* Am. J. Vet. Res., 46:2385-2387.
4. **Bolin, S.R., Mc Clurkin, A.W., Cutlip, R.C. and Corina, M.F.** (1985): *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., 46:573-576.
5. **Brownlie, J., Clarke, M.C. and Howard, C.J.** (1984) : *Experimental production of fatal mucosal disease in cattle.* Vet. Rec., 114:535-536.
6. **Burgu, İ.** (1972) : *Prüfung vier verschiedener Stamme des Virusdiarrhoea-Mucosal disease (VD-MD) virus auf Interferon-induzierende Eigenschaften in Bovinen Zellkulturen.* Inaugural Dissertation, Tierarzth. Hoch. Hannover.
7. **Dannacher, G. and Moussa, A.** (1986) : *Pathogenie et formes cliniques de L'infection par le virus de la diarrhee virale des bovins (BVD).* Revue Med. Vet., 137(5):359-365.
8. **Done, J.T., Terlecki, S., Richardson, C., Harkness, J.W., Sands, J.J., Patterson, D.S.P., Sweasy, D., Shaw, I.G., Winkler, C.E. and Duffel, S.J.** (1980) : *Bovine virus diarrhoea-mucosal disease virus : Pathogenicity for the fetal calf following maternal infection.* Vet. Rec., 106:473-479.

9. **Gillespie, J.H., Bartholomew, P., Thomson, R. and Mc Entee, K.** (1967) : *The isolation of noncytopathic virus diarrhoea virus from two aborted fetuses.* Cornell Vet., 57:564-571.
10. **Gillespie, J.H., Madin, S.H. and Darby, N.B.** (1962) : *Cellular resistance in tissue culture induced by noncytopathogenic strains, to a cytopathogenic strain of virus diarrhoea virus of cattle.* Proc.Soc.exp.Biol.Med., 110:248-250.
11. **Hafez, S.M.** (1967) : *Charakterisierung und Darstellung des Virus der 'Virusdiarrhoea-Mucosal Disease' des Rindes (VD-virus).* Inaugural Dissertation, Tierarzth. Hoch. Hannover.
12. **Harkness, J.W., Roeder, P.L. and Wood, L.** (1984) : *Mucosal disease in cattle.* Vet.Rec., 115(8):186.
13. **Harkness, J.W., Sands, J.J. and Richards, M.S.** (1978) : *Serological studies of mucosal disease virus in England and Wales.* Res.Vet.Sci., 24:98-103.
14. **Holm Jensen, M.** (1981). *Detection of antibodies against hog cholera virus and bovine viral diarrhoea virus in porcine serum. A comparative examination using CF, PLA and NPLA assays.* Acta Vet. Scand. 22: 85-98.
15. **Howard, C.J., Brownlie, J. and Clarke, M.C.** (1987) : *Immunoenzyme techniques for bovine viral diarrhoea virus.* Pestivirus infections of ruminants. A seminar in the CEC programme, Brussels.
16. **Hyera, J.M.K., Liess, B., and Frey, H.-R.** (1987) : *A direkt neutralizing Peroxidase-Linked Antibody Assay for detection and titration of antibodies to bovine viral diarrhoea virus.* J.Vet.Med., 34:227-239.
17. **Kendrick, J.W.** (1971) : *Bovine viral diarrhoea-mucosal disease virus infection in pregnant cows.* Am.J.Vet.Res., 32:533-544.
18. **Lee, K.M., and Gillespie, J.H.** (1957) : *Propagation of virus diarrhoea virus of cattle in tissue culture.* Am.J.Vet.Res., 18:952-953.
19. **Liess, B., Frey, H.-R., Kittsteiner, H., Baumann, F. and Neumann, W.** (1974): *Beobachtungen und Untersuchungen über die 'Mucosal disease' des Rindes-einer immunbiologische erklärbaren Spatform des BVD-MD virusinfection mit Kriterion einer 'slow virus infection'.* Dtsch.tierarztl.Wschr., 81:477-500.
20. **Liess, B., S.Reinecke, G., Sanders, I., Greiser-Wilke and Moennig, V.** (1993) : *An immunoplaque assay distinguishing between cytopathogenic and noncytopathogenic biotypes of bovine viral diarrhoea virus.* Zbl. Vet. Med. 40, 89-96.
21. **Mc Clurkin, 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.Am.Vet.Med.Assoc., 186:568-569.
22. **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.
23. **Mills, H. and Luginbuhl, R.E.** (1965) : *Third passage bovine kidney cell cultures. An excellent system for preparing the Oregon C24V*

- Mucosal disease agent.* Cornell Vet., 55:344-354.
24. **Moennig,V.** (1990) : *Pestiviruses : A review.* Vet.Microbiol., 23:35-54.
25. **Olafson,P., Mc Callum,A.D. and Fox,F.H.** (1946) : *An apparently new transmissible disease of cattle.* Cornell.Vet., 36:205-213.
26. **Radostits,O.M. and Littlejohns,I.R.** (1988) : *New concepts in the pathogenesis, diagnosis and control of disease caused by bovine viral diarrhea virus.* Can.vet.J., 29:513-528.
27. **Roeder,P.L., Jeffrey,M. and Cranwell,M.P.** (1986) : *Pestivirus fetopathogenicity in cattle: changing sequelae with fetal maturation.* Vet.Rec., 118:44-48.
28. **Sanders,G.** (1991) : *Charakterisierung zytopathogener und nichzytopathogener biotypen unter Stammenisolaten des BVD-virus in einem Immunoplaque test.* Inaugural Dissertation, Tierarzth. Hoch. Hannover.
29. **Schepers,J.** (1990) : *Bovine Virus diarrhoe : Suche nach 'Matching Pairs' zytopathogener und nichzytopathogener Virusisolate bei individuellen Rindern und ihre Analyse mittels monoklonaler Antikörper.* Inaugural Dissertation, Tierarzth. Hoch. Hannover.
30. **Underdahl,N.R., Grace,O.D. and Hoerlein,A.B.** (1957) : *Cultivation in tissue culture of cytopathogenic agent from bovine mucosal disease.* Proc.Sos.exp.Biol.Med., 94:795-797.