

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
VETERİNERLİK VİROLOJİSİ ANABİLİM DALI



**HATAY İLİNDE HALK ELİNDE YETİŞTİRİLEN
MANDALARDA SIĞIR HERPESVİRUS TİP 4 (BoHV-4)
ENFEKSİYONUNUN SEROLOJİK VE VİROLOJİK
OLARAK ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kemal GÜREL

Danışman

Prof. Dr. Veysel Soydal ATASEVEN

HATAY-2022

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
VETERİNERLİK VİROLOJİSİ ANABİLİM DALI

**HATAY İLİNDE HALK ELİNDE YETİŞTİRİLEN
MANDALARDA SIĞIR HERPESVİRUS TİP 4 (BoHV-4)
ENFEKSİYONUNUN SEROLOJİK VE VİROLOJİK
OLARAK ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kemal GÜREL

Danışman

Prof. Dr. Veysel Soydal ATASEVEN

Bu tez, Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 21.YL.008 proje numarasıyla desteklenmiştir.

HATAY-2022

KABUL ONAY

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
VİROLOJİ (VET) ANABİLİM DALI

HATAY İLİNDE HALK ELİNDE YETİŞTİRİLEN MANDALARDA SIĞIR
HERPESVİRUS TİP 4 (BoHV-4) ENFEKSİYONUNUN SEROLOJİK VE VİROLOJİK
OLARAK ARAŞTIRILMASI

Yüksek Lisans Tezi
Kemal GÜREL

Bu tez aşağıda isimleri yazılı tez jürisi tarafından 04/07/2022 tarihinde yapılan tez savunma
sınavında oyçokluğu/oybirliği ile kabul edilmiştir.

Tez Jürisi : Jüri Başkanı : Prof.Dr.Seval BİLGE DAĞALP

Üye : Prof.Dr.Veyssel Soydal ATASEVEN

Üye : Doç.Dr.Fırat DOĞAN

Bu tez, Enstitümüz Viroloji (Veteriner) Anabilim Dalı'nda hazırlanmıştır.

,

...../...../2022

Prof.Dr.İbrahim Halil ÇERÇİ
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince, mesai saatlerinde ve mesai saatleri haricinde hatta tatil günlerinde dahi ilgisi ve desteğinin yanında, sorularımı yanıtlamak ve sorunlarımı çözmek için kıymetli bilgilerini ve önerilerini benden esirgemeyen, sabrını ve sevgisini her zaman hissettiğim danışman hocam Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Veysel Soydal ATASEVEN'e, eğitimim süresince yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Viroloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç.Dr. Fırat DOĞAN'a; Tezimin istatistiksel verilerini en yoğun olduğu zamanlarda dahi nezaketle ve büyük duyarlılıkla değerlendirerek kıymetli zamanını ayıran değerli hocam Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Dr. Pınar AMBARCIOĞLU'na; Lisansüstü eğitimime başlamam için verdiği destek ile arkadaşlığını ve dostluğunu her daim hissettiğim kıymetli meslektaşım Uzman Veteriner Hekim Tanay ÖZCAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her döneminde ve özellikle kritik süreçlerde aldığım kararları destekleyen, gerektiğinde yol gösteren, sabırlarını, sevgilerini ve bana olan güvenlerini her zaman hissettiğim aileme minnet, sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım.

Bu tez projesi, aynı başlıkla Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 21.YL.008 proje numarasıyla desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER	IV
ÇİZELGELER DİZİNİ	VI
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	VII
ÖZET	VIII
ABSTRACT.....	IX
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	2
2.1. Etiyoloji.....	2
3.2.Epidemiyoloji.....	3
2.3. Klinik ve Patogenez	6
2.4. Tanı	7
2.5. Kontrol ve Mücadele Stratejileri.....	8
3.GEREÇ VE YÖNTEM.....	10
3.1. Gereç	10
3.1.1. Hayvan Materyali.....	10
3.2. Yöntem.....	11
3.2.1. Materyallerin Hazırlanması.....	11
3.2.1.a. Kan Serumı Örnekleri.....	11
3.2.1.b.Genital Sıvı Örnekleri.....	12
3.2.2. İndirek ELISA	12
3.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	13
3.2.3.a. Viral Nükleik Asit İzolasyonu.....	13
3.2.3.b. Viral Nükleik Asit Amplifikasyonu	14
3.2.4. İstatistiksel Analizler.....	15
4.BULGULAR.....	16
4.1. Serolojik Bulgular ve İstatistiksel Değerlendirme	16
4.2. PCR Bulguları	17

5.TARTIŞMA	18
6.SONUÇ	21
7.KAYNAKLAR	22
EK-1	26
ETİK BEYAN.....	27
ÖZGEÇMİŞ	28



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Toplanan örneklerin işletmelere göre dağılımı.....	11
Çizelge 3.2. ELISA sonuçlarının değerlendirme formülü	13
Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan primerlerin dizin ve PCR protokolü.....	14
Çizelge 4.1. İşletme tipi, yaş ve cinsiyet gruplarının istatistiksel değerlendirmesi	16
Çizelge 4.2. Cinsiyete göre seropozitiflik düzeylerinin dağılımı.....	17
Çizelge 4.3. Yaş gruplarına göre seropozitiflik düzeylerinin dağılımı	17



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

bp	: Baz Çifti
BoHV-4	: Bovine Herpesvirus-4
BoHV-1	: Bovine Herpesvirus-1
BVDV	: Bovine Viral Diyare Virus
Cl	: Klor
COX-2	: Siklooksijenaz-2
ELISA	: Enzim-Linked Immunosorbent Assay
gB	: Glikoprotein B
gH	: Glikoprotein H
gL	: Glikoprotein L
gM	: Glikoprotein M
ICTV	: Uluslararası Virus Taksonomi Komitesi
kb	:Kilobaz
NK	: Negatif Kontrol
nm	: Nanometre
Mg	:Magnezyum
OD	: Optik Dansite
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PGE2	: Prostaglandin Estradiol 2
pH	: Asidite
PK	: Pozitif Kontrol
µL	: Mikrolitre

ÖZET

Hatay İlinde Halk Elinde Yetiştirilen Mandalarda Sığır Herpesvirus Tip 4 (BoHV-4) Enfeksiyonunun Serolojik ve Virolojik Olarak Araştırılması

Hatay ili Kırıkhan ilçesinde halk elinde yetiştirilen 18 adet aile tipi işletmelerdeki sağlıklı görünümlü 3 aylıktan büyük 150 adet mandadan tesadüfi örnekleme yoluyla serum ve 100 adet genital sıvı örnekleri alındı. Araştırmada örneklenen 150 mandadan 65 adedinde (%43,0) BoHV-4 spesifik antikor varlığı saptandı. Genel olarak işletme düzeyindeki seropozitiflik oranları %0-100 arasında belirlendi. Seropozitiflik oranları yetiştirme tiplerine göre karma yetiştiricilik yapan işletmelerde %10-100, sadece manda yetiştiriciliği yapılan işletmelerde ise %0-100 arasında tespit edilmiştir. Örneklenen hayvanlardan 36 dişi (%43,9) ve 29 erkek hayvanda (%42,0) virus spesifik antikor varlığı saptandı. Yaş gruplarına göre ise 3-6 aylık yaşlılarda 17 (%48,6) ve 6 aylıktan büyük mandaların 48 (%41,7) adedinde seropozitiflik tespit edildi. Örneklenen serumların % pozitifite değerlerinin frekansının +1 düzeyinde yüksek olduğu belirlendi. Bulgular neticesinde, ülkemizde farklı bir ruminant türü olan mandalarda da BoHV-4 enfeksiyonunun prevalansının yüksek olduğu saptanmış olup, BoHV-4 enfeksiyonunun ruminant popülasyonlarındaki epidemiyolojik dinamiklerinin daha iyi anlaşılmasını sağlayacak gelecekteki büyük ölçekli epidemiyolojik çalışmalara rehber olacaktır.

Anahtar Kelimeler: Antikor, Sığır Herpesvirus Tip 4 (BoHV-4), ELISA, Manda.

ABSTRACT

Serological and Virological Investigation of Bovine Herpesvirus Type 4 (BoHV-4) Infection in Privately Owned Water Buffaloes in Hatay Province

A total of 150 sera and 100 genital swabs were sampled from healthy-appeared water buffaloes aged older than 3 months in 18 private farms in Kırıkhan, Hatay province. BoHV-4 specific antibodies were detected in 65 (43.0%) of 150 water buffaloes here sampled. In general, the seropositivity rates at the enterprise level were determined between 0-100%. According to the breeding types, seropositivity rates varied between 10-100% in mixed-breeding enterprises, and between 0-100% in enterprises engaged in only water buffalo breeding. The presence of virus-specific antibodies was demonstrated in 36 female (43.9%) and 29 male animals (42.0%) from the sampled animals. According to age groups, seropositivity was detected in 17 (48.6%) buffaloes aged 3-6 months and 48 (41.7%) buffaloes older than 6 months. In general, it was determined that the frequency of % positivity values of the sampled sera was high at the level of +1. The findings showed that the prevalence of BoHV-4 infection was high in water buffaloes as a different ruminant species in Turkey, and this research will guide future large-scale epidemiological studies, which will provide a better understanding of the epidemiological dynamics of BoHV-4 infection in ruminant populations.

Keywords: Antibody, Bovine Herpesvirus Tip 4 (BoHV-4), ELISA, Water Buffalo.

1. GİRİŞ

Süt sığırcılığı sektörü buzağı kayıpları, abort, infertilite, servis süresinin uzaması ve mastitis gibi problemler nedeniyle büyük ekonomik kayıplara uğramaktadır. Kızgınlık belirtilerinin tam olarak açığa çıkmaması, folikül gelişim yetersizliği, oosit kalitesindeki düşüklük, sperma transferi sırasındaki olumsuzlukların yol açtığı fertilizasyon problemleri, üreme organlarında embriyonun gelişimi için yetersiz çevre şartları veya tüm bu faktörlerin bir arada bulunmasıyla ineklerde infertilite tablosu şekillenebilmektedir. Bu faktörlerle beraber, embriyo oluşumu öncesinde reproduktif organlarda meydana gelen yangısal olayların da fertilite bozukluklarına yol açtığı kabul edilmektedir. Fertilizasyonun başarısını doğrudan etkileyen kronik yangının sebebi; yönetimsel, metabolik, immünolojik, mikrobiyolojik ve virolojik nedenlere dayandırılabilir. Reprodüksiyonu olumsuz etkileyen en önemli nedenlerin başında doğum sonrası uterus lümeninde enfeksiyon tablosunun şekillenmesi gelmektedir (Gilbert ve ark. 2015). Süt sığırlarının yaklaşık %40'ını etkileyen postpartum metritisin oluşmasında başlıca bakteriler sorumlu tutulmasına karşın bir gammaherpesvirus olan BoHV-4'ün de rolü olduğu kanıtlanmıştır. BoHV-4 varlığı postpartum metritis dışında, endometritis, peritonitis, vulvovaginitis, dermatitis, mastitis, abort, ishal ve respiratorik problemler gibi çeşitli klinik semptomlar gösteren hayvanlarda da tespit edilmiştir (Czaplicki ve Thiry 1998, Donofrio ve ark. 2000, Frazier ve ark. 2001, Kalman ve ark. 2004, Monge ve ark. 2006, Egyed ve ark. 2011, Bellino ve ark. 2015, Delooz ve ark. 2017, Bilge Dağalp ve ark. 2020).

Bu araştırmada, Hatay ilinde halk elinde (aile tipi) yetiştiriciliği yapılan mandalarda serolojik ve moleküler yöntemlerle BoHV-4 enfeksiyonunun prevalansının araştırılması amaçlanmıştır. Ülkemizde BoHV-4 enfeksiyonuna yönelik araştırmaların sığırlarda gerçekleştirilmiş olması ve dünyada mandalarda yapılan sınırlı sayıda araştırma bulunması nedeniyle ulusal ve uluslararası düzeyde bilimsel literatüre katkı sağlayacağı da düşünülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Etiyoloji

Herpesviridae ailesi genom yapısı, replikasyon döngüsü, enfekte ettiği hücrelerde sergilediği sitopatoloji ve latentlik bölgesi gibi biyolojik özelliklerine göre *Alfaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* ve *Gammaherpesvirinae* olmak üzere üç alt aileye ayrılmaktadır (Davison ve ark. 2009). *Alfaherpesvirinae* ve *Betaherpesvirinae* alt ailelerindeki virusların litik replikasyonu birçok hücre tipi tarafından desteklenirken, bu viruslar sınırlı sayıda hücre tipinde latentlik sergilemektedir. Bu iki alt ailenin aksine, *Gammaherpesvirinae* alt ailesindeki viruslar genellikle geniş bir hücre spektrumunda latentlik ve sınırlı düzeyde litik replikasyona neden olmaktadır (Ackermann 2006). *Gammaherpesvirinae* alt ailesinde *Bosavirus*, *Rhadinovirus*, *Lenfokriptovirus*, *Makavirus*, *Mantikavirus*, *Patagivirus* ve *Percavirus* cinsleri yer almaktadır (ICTV 2021).

Sığır Herpesvirus Tip 4 (BoHV-4); *Herpesviridae* ailesinin *Gammaherpesvirinae* alt ailesinde *Rhadinovirus* cinsi içinde sınıflandırılan zarlı bir virion yapısına sahip DNA virusüdür. BoHV-4'ün, diğer sığır herpesvirusları ile antijenik ve biyolojik yakınlığı tespit edilememiştir (Roizman ve ark. 1992). İlk araştırmalarda izole edilen BoHV-4 suşları, Movar 33/63-like ve DN 599-like suşlar olmak üzere iki grup altında tanımlanmıştır. Movar benzeri suşları genel olarak Avrupa'da izole edilmesine karşın, DN-599 benzeri suşları ise tüm Amerikan suşlarını ve bufalodan izole edilmiş bir Afrika suşunu içermektedir (Thiry ve ark. 1990). BoHV-4 izolatları arasında genetik ilişki çok yüksek olmasına karşın (Shen ve ark. 1992; Van Santen 1993). BoHV-4 suşlarının, virus genomunun glikoprotein B (gB) ve timidin kinaz (TK) gen bölgelerinin dizin analizine göre 3 genotip altında gruplandığı bildirilmiştir. (González Altamiranda ve ark. 2015, Koç 2020, Bilge Dağalp ve ark. 2021). Virus, 146 kb'lik büyük bir DNA genomuna sahiptir. Genom; 162 kapsomer (12 pentamer ve 150 hekzamer) içeren bir ikosahedral kapsidle, her ikisinin oluşturduğu 100-110 nm çapındaki nükleokapsid ise zar ile çevrilidir (Roizman ve Baines 1991). BoHV-4 virionlarında; gB, gH, gL, gp180 ve gM olmak üzere beş zarf glikoproteini (peplomer) tanımlanmıştır (Lete ve ark. 2012). Zarf glikoproteinlerinden en az üçünün, virusun hücrede enfeksiyon başlatması için kesinlikle gerekli olduğu ve doku tropizminde etkisi olduğu düşünülen virion yüzey glikoproteinlerinin varyasyonlarında önemli rol oynadığı belirtilmektedir (Frazier ve ark. 2002). Tüm herpesvirusların girişi için gB, gH ve gL olarak

aslandırılan üç glikoprotein gerekliliği bildirilmektedir. gB glikoproteini viral enfektivitede esansiyel bir proteindir (Little ve ark. 1981, Lomonte ve ark. 1997).

Herpesvirusların genel karakteristiğinde olduğu gibi, BoHV-4 de primer enfeksiyondan sonra konakçıda latent kalmaktadır. BoHV-4'ün latentlik bölgeleri monosit/makrofaj mononükleer hücreleridir (Donofrio ve ark. 2005). Yapılan çalışmalarda, ganglionlarında BoHV-4'ün latentliği için olası bir yer olduğu belirtilmiştir (Homan and Easterday 1981, Naeem ve ark. 1991). Ayrıca, Egyed ve Bartha (1998) tarafından kemik iliği, lenf düğümleri ve sinir sisteminin farklı kısımlarında BoHV-4 izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

BoHV-4'ün, özellikle bazı insan kanser hücre hatlarında viral enfeksiyon sonucu apoptozisi indüklediği veya modüle ettiği belirtilmektedir. Bu olaya “Viro-onkoapoptozis” denilmektedir. BoHV-4 enfeksiyonunun bazı kanser hücre hatlarında doza ve zamana bağlı olarak viral replikasyon için gerekli olmayan erken dönem BoHV-4 genlerinin ekspresyonu ve kaspaz-10 aktivasyonuna bağlı olarak apoptozisi indüklediği tespit edilmiştir. BoHV-4'ün bazı insan karsinomalarının tedavisinde potansiyel bir viro-onkoapoptotik ajan olabileceği düşünülmektedir (Gillet ve ark. 2005, Aligholipour Farzani ve ark. 2021).

2.2. Epidemiyoloji, Dünyadaki ve Ülkemizdeki Durumu

BoHV-4, ilk kez 1963 yılında Macaristan'da solunum sistemi problemleri ve keratokonjunktivitis belirtileri bulunan sığırlardan izole edilmiştir (Bartha ve ark. 1966). Sığırlar dışında, zebu (*Bos indicus*) (Moreno-Lopez J ve ark. 1989), Amerikan Bizonu (Todd ve Storz. 1983), Afrika mandası (Rossiter ve ark. 1989), koyun ve keçi gibi ruminantlar da konakçı spektrumunda yer almaktadır. Aslanlar, kediler ve maymunlarda da sporadik olarak etken izolasyonu gerçekleştirilmiştir (Barahona ve ark. 1973, Kruger ve ark. 2000). Deneysel olarak , BoHV-4 ün kobayları ve tavşanları enfekte ettiği gösterilmiştir (Bublott ve ark. 1991, Kruger ve ark. 2000).

BoHV-4 nazal, konjunktival ve vajinal sekretlerle saçılmaktadır (Egyed ve ark. 1996, Bilge Dağalp ve ark. 2020). Enfeksiyon, solunum yolu sekretleriyle aerosol olarak veya buzağılarda enfekte annelerinden süt emme ile gerçekleşir (Donofrio ve ark. 2000, Kalman ve ark. 2004).

BoHV-4'ün reproduktif bozukluklar ve mastitis olgularında komplikasyon oluşturduğu bazı bakteriyel ve viral mikroorganizmalarla ilişkisi ortaya konulmuştur

(Barkema ve ark. 1998, Kalman ve ark. 2004, Barkema ve ark. 2009, Cvetojević ve ark. 2016, Szenci ve ark. 2016, Bilge Dağalp ve ark. 2020). Viral ajanlar arasında en yaygın olarak BVDV (Cvetojević ve ark. 2016, Bilge Dağalp ve ark. 2020), nadiren BoHV-1 ve parapox virus ile koenfeksiyon oluşturduğunu bildiren araştırmalar bulunmaktadır (Areda ve ark. 2018, Bilge Dağalp ve ark. 2020). Ayrıca *Escherichia coli*, *Streptococcus uberis*, *Trueperella pyogenes*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus agalactiae*, *Histophilus somni* ve *Staphylococcus aureus* gibi bakteriyel ajanların neden olduğu mastitis olgularında da latentlik bölgesi olan makrofajlardan reaktif olarak kofaktör olarak daha şiddetli ve daha uzun süreli mastitis olgularına katkıda bulunabilmektedir (Barkema ve ark. 1998, Kalman ve ark. 2004, Barkema ve ark. 2009, Szenci ve ark. 2016, Ataseven, 2022). BoHV-4, aynı endemik sürülerde yetiştirilen ineklerden izole edilmiş olmasına rağmen, buzağı veya düvelerden başarılı bir şekilde izole edilmemiştir. Doğum sonrası endometriyal doku tropizminin nedenleri belirsizdir ancak doğumdan hemen sonraki dönemde mevcut olan mikrobiyal faktörlerin endometriumun duyarlılığını artırması muhtemeldir. Bu yatkınlık faktörleri; doğumdan veya bakteriyel metritisten kaynaklanan endometriyal hasar, doğum sonrası mikroçevre (pH, tuzluluk, protein kalıntısı vd.), buzağılama veya hepatik lipidoz ile ilişkili immünosupresyon olabilir. Gebelik ve doğumla ilişkili glukokortikoid salınımının neden olduğu immünosupresyon endometriyal enfeksiyonlarda temel bir yatkınlık faktörüdür. Ayrıca, deksametazon tedavisini takiben boğalarda ve buzağılarda latent BoHV-4 enfeksiyonunun reaktivasyonu da gösterilmiştir (Frazier ve ark. 2001). Distosi, ölü doğum ve ikiz buzağılama gibi diğer problemlerin yanı sıra stresin de BoHV-4 ile enfeksiyon riskinin artması için önemli bir hazırlayıcı faktör olabileceğini belirtmişlerdir (Areda ve ark. 2018).

Enfeksiyonun prevalansı ile ilişkili risk faktörleri de tanımlanmıştır. Önceki araştırmalarda, BoHV-4 ile yaş, cinsiyet, laktasyon sayısı (multiparite), laktasyon evresi ve klinik metritis arasında anlamlı düzeyde bir ilişki olduğu gösterilmiştir (Wellenberg ve ark. 1999, Bilge Dağalp ve ark. 2007, El Hassan ve ark. 2011, Areda ve ark. 2018). Bununla birlikte, BoHV-4 ile ırk, coğrafi konum veya mevsim arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır. Laktasyon sayısına göre BoHV-4 enfeksiyonu olasılığı, ilk laktasyondaki ineklerle karşılaştırıldığında 4. (6.47 kat) ve 5. (6.79 kat) laktasyondaki inekler arasında daha yüksek olduğu belirtilmiştir. Laktasyon evresine göre; erken evresindeki inekler (0-120 gün), laktasyonun geç evresindeki (>240 gün) ineklere kıyasla BoHV-4 enfeksiyonu

için 8.27 kat daha yüksek oranlara sahiptir. Benzer şekilde, BoHV-4 ile metritis gelişimi arasında güçlü bir ilişki bulunduğu ve postpartum metritis oluşumuna göre BoHV-4 ile enfeksiyon olasılığının olmayanlara kıyasla 4,51 kat daha yüksek bulunduğu rapor edilmiştir (Areda ve ark. 2018). İki yaşımdan büyük hayvanların seropozitiflik oranlarının daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Wellenberg ve ark. 1999, Bilge Dağalp ve ark. 2007).

BoHV-4 enfeksiyonu, Türkiye'nin de içinde olduğu dünyanın birçok ülkesinde serolojik ve virolojik olarak tanımlanmıştır. Yapılan çalışmalarda enfeksiyonun seroprevalansı dünyadaki sığır populasyonlarında % 4,2-87,4 arasında tespit edilmiştir (Naeem ve ark. 1989, Wellenberg ve ark. 1999, Graham ve ark. 2005, Nikolin ve ark. 2007, Bilge Dağalp ve ark. 2007, Yavru ve ark. 2014). Frazier ve ark. (2002), doğum sonrası ülseratif endometritisli ineklerde BoHV-4'ün seroprevalansını %36 olarak bildirmiştir. Kalman ve ark. (2004), aynı sürüde bulunan yaklaşık 300 ineğin süt örneklerini PCR tekniği ile incelemiş ve sağlıklı ineklerin %5,9'unda ve mastitisli ineklerin %37,6'sında BoHV-4 nükleik asit varlığını belirlemişlerdir. Aynı araştırmada, mastitisli hayvanların süt örneklerinde *Escherichia coli*, *Streptococcus uberis* ve *S. aureus* bakterileri de belirlenmiştir. Aynı araştırmada tüm hayvanlar laktasyon dönemi boyunca takip edilerek, laktasyon sürecinde hem sağlıklı görünümlülerde hem de subklinik mastitis olgularında virus tespiti gerçekleştirilmiştir. Deim ve ark. (2007), aborte olmuş sığır fetüslerinin %29'unda BoHV-4 varlığı tespit etmişler ve enfeksiyonun ineklerdeki abort vakalarında risk faktörü olduğunu belirtmişlerdir. Nikolin ve ark. (2007), post-partum metritisli ineklerde %84,37 oranında seropozitivite tespit etmişlerdir. Sudan'ın farklı eyaletlerinde yer alan süt sığırcılığı işletmelerinde reproduktif problemler, abort ve neonatal buzağı ölümleri bildirilmiş ve söz konusu sürüler BoHV-1, BoHV-4 ve BVDV antikor varlığı yönünden kontrol edilmiştir. Seroprevelans oranları sırasıyla infertilite vakalarında %86,8, %26,3, %81,6; abort vakalarında %84,3, %48,6, %84,3 ve neonatal ölümlerde %75, %58,3, %91,67 olarak tespit edilmiştir (El Hassan ve ark. 2011).

Ülkemizde BoHV-4 üzerine sınırlı sayıda araştırma bulunmaktadır. Bilge Dağalp ve ark. (2007), fertilite problemleri bulunan işletmelerde serolojik olarak %54,3 oranında seropozitiflik tespit etmişlerdir. Başka bir çalışmada (Bilge Dağalp ve ark. 2008), hem Avrupa hem de Amerika izolatlarına yakınlık gösteren suşlar izole edilmiştir. Gür ve Doğan (2010), repeat breeder tespit edilen hayvanlarda BoHV-4 seropozitiflik oranlarını %69, sağlıklı görünümlü hayvanlarda %44 olarak tespit etmişlerdir. Bilge Dağalp ve ark. (2010),

metritis problemleri belirtilen bir işletmede BoHV-4 varlığını serolojik ve virolojik olarak ortaya koymuşlardır. Kale ve ark. (2011)'ı repeat breeder tespit edilen hayvanlarda BoHV-4 seroprevalansını %53,7 olarak belirlemişlerdir. Bilge Dağalp ve ark. (2011)'ı abort ve neonatal ölümlerin görüldüğü işletmedeki hayvanlardan alınan örneklerin %52,5 inde BoHV-4 nükleik asit varlığını tespit etmişlerdir.

2.3. Klinik ve Patogenez

BoHV-4 vulvovajinitis, orşitis, metritis, endometritis ve abort gibi çeşitli reproduktif bozukluklar, mastitis, püstüler meme dermatitisi, enteritis, bronkopnömoni gibi farklı klinik problemlerin yanı sıra, ölen buzağuların karaciğer, beyin, dalak, akciğer gibi farklı dokularında da saptanmıştır (Czaplicki ve Thiry 1998, Donofrio ve ark. 2000, Frazier ve ark. 2001, Kalman ve ark. 2004, Monge ve ark. 2006, Egyed ve ark. 2011, Bellino ve ark. 2015, Delooz ve ark. 2017, Bilge Dağalp ve ark. 2020). Ayrıca, sağlıklı ve asemptomatik hayvanlarda da virusun varlığı ortaya konulmuştur (Egyed ve Bartha 1998, Kalman ve ark. 2004, Graham ve ark. 2005, Monge ve ark. 2006).

BoHV-4 mukoza epitel hücrelerinde replike olmakta, sonrasında monosit/makrofajlar (mononükleer hücreler) aracılığıyla tüm organizmaya yayılabilmektedir. Virus endometrial ve endotel hücrelerine tropizm gösterir. Plasental bariyeri geçerek fötüsü enfekte olabildiği gibi plasental hücrelerde yıkımlanma ve buna bağlı fonksiyonel bozukluk sonucu aborta neden olabilmektedir (Fabian ve ark. 2008). Frazier ve ark. (2001), BoHV-4 enfeksiyonu ile ilişkili postpartum süperatif ve ülseratif endometritis tablosu gözlemlemiş, uterus epiteli ve endotelinde elektron mikroskobu ile herpesvirüs partikülü belirlemişlerdir.

BoHV-4, endometrial stromal hücreler için dikkate değer bir tropizme sahiptir (Donofrio ve ark. 2007). BoHV-4'ün, sığırlarda postpartum metritis gelişiminde bir kofaktör olarak oldukça karmaşık bir rolü olduğu varsayılabılır (Jacca ve ark. 2013). Doğum sonrası ineklerin uterusu; uterus bağışıklık sistemini uyaran, reproduktif performansın düşmesine ve sık uterus enfeksiyonlarına neden olabilecek çeşitli patojenik bakteri türleri ile kontamine olur ancak bu tür enfeksiyonlar 3 hafta içinde temizlenir (Frazier ve ark. 2002, Sheldom ve Dobson 2004, Lewis 2004). Doğumu takiben uterusun bakteriyel enfeksiyonunun, sürekli olarak BoHV-4 ile enfekte olmuş makrofajlarda BoHV-4 litik replikasyonunu aktive eden, inflamatuvar yanıtların önemli bir aracısı olan COX-2

proteini ekspresyonunu ve prostaglandin E (PGE2) salgılanmasını indüklediği rapor edilmiştir (Zhu ve ark. 2002, Donofrio ve ark. 2005). PGE2 ile indüklenen replikasyonun bir sonucu olarak yeni üretilen BoHV-4 partikülleri uterus zarlarını enfekte edebilir ve bu durum PGE2 sekresyonunu daha da artırır. Bu nedenle, PGE2 üretimi ile viral replikasyon arasındaki bu pozitif geri besleme mekanizması BoHV-4'ün metritise neden olmadaki rolünü açıklayabilir (Donofrio ve ark. 2005). Ayrıca, virusun reaktivasyonunu başlatıcı erken gen (IE2) ürünü ORF50/Rta'nın, IL-8 üretimini de indükleyerek enflamasyonu akut ve geçici bir durumdan (metritis) kronik bir duruma (endometrit) doğru kaydırıldığı vurgulanmıştır (Donofrio ve ark. 2010).

Reprodüktif döngünün luteal fazı sırasında progesteron düzeyinin diğer fazlara göre önemli ölçüde daha yüksek olması, progesteron hormonunun genital sistemdeki bağışıklık hücrelerinin sayısını azaltması ve sitokin sentezini inhibe etmesi nedeniyle reprodüktif sistemin BoHV-4 enfeksiyonuna luteal fazda foliküler faza göre daha duyarlı olabileceği ileri sürülmüştür. Ayrıca, uterustaki enfekte monositik hücre sayısı, vajina ve servikstekinden önemli ölçüde düşük olduğu için uterustaki BoHV-4 enfeksiyonunun vajina ve servikstekinden daha az etkili olabileceği, BoHV-4'ün genital sistemi kolayca enfekte ettiği ve genital sekresyonlarla bulaşabileceği de gösterilmiştir (Yang ve ark. 2017).

2.4. Tanı

Sığırların BoHV-4 enfeksiyonlarına karşı humoral bağışıklık tepkisi ve buna bağlı olarak nötralize edici antikor tepkisi çok düşüktür. Hatta bazı durumlarda nötralize edici antikorlar saptanamamaktadır. Bu nedenle antikorların belirlenmesi için nötralizasyon testi uygun bir yöntem değildir. Antikor tespiti için hassas bir test gereklidir (Thiry ve ark. 1990). BoHV-4'e özgül antikorlar; komplement fiksasyon (KF) testi, indirekt floresan antikor testi (IFA), immünoperoksidaz (IP) veya ELISA ile tespit edilebilmektedir (Sass ve ark. 1974, Guo ve ark. 1988, Wellenberg ve ark. 1999). Kan serumu örneklerinde BoHV-4'e karşı spesifik antikorların tespiti için ELISA en çok kullanılan yöntemdir. ELISA'nın sensitivitesi KF testinden daha yüksektir (Guo ve ark. 1988). Spesifik antikorların saptanmasında ticari indirekt ELISA tercih edilmektedir (Çabalar 2021).

BoHV-4 ile viral ve bakteriyel etkenler arasında ko-enfeksiyonların oluşması klinik tanıyı zorlaştırmaktadır. Kesin teşhis ancak virolojik ve serolojik yöntemlerle yapılabilir. Hastalıklı hayvanlardan alınacak nazal, konjunktival ve vajinal akıntı örnekleri, abort

olmuş ftus dokuları, plasenta, kan mononklear hücreleri ve lenfoid organlardan hazırlanan inokulumlar virus izolasyonu amacıyla MBBK, BHK-21 gibi hücre kültürlerine inoküle edilebilir. Ancak, virusun belirgin bir sitopatojenite göstermemesi izolasyonu olumsuz yönde etkileyen bir faktördür. (abalar 2021). Deneysel olarak enfekte olmuş tavşanlardan alınan organ örneklerinden BoHV-4 DNA'sını saptamak için polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) geliştirilmiştir (Egyed ve ark. 1996, Lin ve ark. 1999). Solunum ve genital sistem akıntıları, aborte ftus dokuları, plasenta, semen ve süt örneklerinde viral DNA tespiti için virusun gB ve TK bölgelerini hedef alan PCR yöntemi kullanılmaktadır. (Wellenberg ve ark. 2002, Nikolin ve ark. 2008, Egyed ve ark. 2011, Cvetojevi ve ark. 2016, Koç 2020, Bilge Dağalp ve ark. 2021).

2.5. Kontrol ve Mücadele Stratejileri

BoHV-4 n patogenezi üzerine yapılan çalışmaların ve elde edilen verilerin yeterli düzeyde olmaması, hastalık teşhisinde etiyolojik olarak rolünün spesifik belirlenememesi, latentlik üzerine yapılan çalışmaların verilerinin yeterli düzeyde olmaması ve en önemlisi düşük aviditeli antikor oluşumu şekillenmesi nedeniyle başarılı bir aşı geliştirilememiştir (Bilge Dağalp ve ark. 2010). BoHV-4 spesifik antikorları primer enfeksiyondan 15-20 gün sonra belirlenebilmektedir. Antiviral immunitede, humoral antikorların titresinin ve yarı-ömrünün düşük ve kısa süreli olmasından dolayı hücresel immunit daha önemli role sahiptir. (abalar 2021).

BoHV-4 viruslar, bakteriler ve protozoanlar dahil olmak üzere diğr patojenlerle birlikte sığırlarda endometrit olguları, abort ve solunum sistemi enfeksiyonlarında bir kofaktör olarak rol oynamaktadır (Reed ve ark. 1979, Frazier ve ark. 2002, Chastant Maillard 2015, Cvetojevi ve ark. 2016, Gagnon ve ark. 2017). Primer hastalık yapıcı etkinliğı kanıtlanan ve bazıları immunsupresyona neden olan bu mikrobiyal etkenler, latent enfekte hayvanlarda virus reaktivasyona yol açarak şiddetli klinik semptomlarla seyreden hastalık tabloları oluşturabilmektedir. nceki araştırmalar, mastitis ve reproduktif problemlerde BoHV-4'n ko-enfeksiyon oluşturduğı viral etkenler arasında BVDV prevalansının (Reed ve ark. 1979, Cvetojevi ve ark. 2016, Bilge Dağalp ve ark. 2020) BoHV-1 ve parapox prevalansına (Areda ve ark. 2018, Bilge Dağalp ve ark. 2020) göre daha yüksek olduğunu göstermektedir. Reprodüktif hastalıklarda ve özellikle klinik mastitisli hayvanların örneklerindeki bakteriyel etkenler ise *Escherichia coli*,

Streptococcus uberis, *Trueperella pyogenes*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus agalactiae*, *Histophilus somni* ve *Staphylococcus aureus* (Barkema ve ark. 1998, Kalman ve ark. 2004, Barkema ve ark. 2009, Szenci ve ark. 2016) olarak bildirilmiştir. Uterus, serviks gibi reproduktif dokulardaki lokal *Histophilus somni* çoğalması PGE2 gibi moleküllerin sentezi ve takiben BoHV-4'ün reaktivasyonunu etkinleştirirken, lokal makrofaj ve nötrofil işlevlerinin (opsonizasyon, antijen sunumu, öldürme etkinliği) etkinliğini ise azaltmaktadır. Bunun neticesinde, hem mikroorganizmalar birbirinin replikasyonunu teşvik eder hem de bağışıklık sisteminin müdahalesini sınırlandırır. Hedef dokular aynı anda farklı mikroorganizma türlerinin saldırısıyla karşı karşıya kalır (Donofrio ve ark. 2005, Perez ve ark. 2010, Szenci ve ark. 2016). Bu etkenlere yönelik planlanacak profilaktik ve metafilaktik uygulamalarla BoHV-4' le birlikte oluşan ko-enfeksiyonlar kontrol altına alınabilir. Özgünlük ve Yıldırım (2017), yetiştiricilerin eğitimi, hayvan hareketlerinin kontrolü, BVDV ile persiste enfekte hayvanların tespiti-eliminasyonu ve aşı uygulamasının BoHV-1 ve BVDV enfeksiyonlarının prevalansının düşürülmesinde önemli olduğunu belirtmişlerdir. BoHV-4 tarafından kofaktör olarak desteklenen bakteriyel ve viral etkenlere bağlı oluşan reproduktif problemlerin ve klinik mastitisin önlenmesi için aşılama birincil hedef olmalıdır (Ataseven 2022). Aşılama ile birlikte bulaşıcı (sütle bulaşan) etkenlerden kaynaklanan enfeksiyonları kontrol altına almak için; enfekte hayvanların izole edilmesi, sağım hijyeninin ve tekniğinin daha iyi hale getirilmesi, hayvanların direncinin yüksek tutulması, erken teşhis (ön sütün kontrolü/somatik hücre sayımı) ve etkili tedavi uygulamaları gibi unsurlar planlanmalıdır (Hulsen ve ark. 2016).

BoHV-4 enfeksiyonunun mücadelesinde; seropozitif hayvanlar sürüden çıkartılmalı, yeni doğanlar seronegatif annelerin kolostrum/sütü ile beslenmeli ve latent virusun reaktivasyonunu önlemek için stres doğurucu faktörlerden uzak durulmalıdır (Çabalar 2021). Son araştırmalar, farklı klinik olgulardan izole edilen virus suşlarının antijenik ve genetik karakterizasyonunun net bir şekilde ortaya konulmasıyla rekombinant aşı çalışmaları yapmanın mümkün olabileceğini vurgulamaktadır (Bilge Dağalp ve ark. 2010).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Hayvan Materyali

Araştırmada Kasım 2020-Mart 2021 tarihleri arasında Hatay İl Tarım ve Orman Müdürlüğü'nün kayıtlarına göre manda popülasyonunun en yoğun olduğu Kırıkhan ilçesinde halk elinde yetiştirilen ve (sahiplerinin gönüllü olduğu) 18 adet aile işletmesindeki sağlıklı görünümlü 3 aylıktan büyük farklı yaş gruplarında mandalardan tesadüfi örnekleme yoluyla jelli tüplere toplam 150 adet kan örneği toplandı. Yaş ortalamasının $12,91 \pm 7,45$ aylık olduğu belirlendi. Yaş gruplarına göre, 3-6 aylık gruptan 35 adet; 6 aylığın üzerindeki gruptan 115 adet mandadan kan örneği toplandı. Örneklemeler sırasında infertilite, abort veya ölü doğum gibi reproduktif sistem enfeksiyonu bulgularına yönelik anamnez verilmediği ve klinik bulgu tespit edilemediği için subklinik veya latent enfekte hayvanların belirlenebilmesi amacıyla klinik olarak sağlıklı görünümlü 3-36 ay yaş aralığındaki 100 adet mandadan da genital (81 vajinal ve 19 praeputial) sıvap örneği alındı. Örneklerin işletmelere göre dağılımları Çizelge 3.1'de gösterildi.

Bu tez çalışmasının yürütülmesi Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu (Tarih: 24.06.2020; Karar No. 2020-04-27) tarafından onaylanmıştır.

Çizelge 3.1. Toplanan örneklerin işletmelere göre dağılımları.

Sürü No.	Manda No.	İşletme Tipi	Cinsiyet Dağılımı		Seropozitif No. (%)
			Dişi	Erkek	
1	8	Karma	6	2	8 (100)
2	10	Karma	9	1	9 (90)
3	6	Manda	3	3	3 (50)
4	5	Manda	3	2	5 (100)
5	7	Karma	3	4	4 (57,1)
6	11	Karma	6	5	5 (45,4)
7	2	Manda	-	2	1 (50)
8	19	Manda	9	10	10 (52,6)
9	15	Karma	7	8	5 (33,3)
10	5	Karma	4	1	1 (20)
11	10	Karma	7	3	0 (0)
12	6	Karma	3	3	3 (50)
13	1	Manda	1	-	0 (0)
14	2	Manda	-	2	1 (50)
15	7	Manda	2	5	3 (42,8)
16	1	Karma	-	1	1 (100)
17	8	Manda	5	3	3 (37,5)
18	27	Karma	13	14	3 (11,1)
Toplam	150		81	69	65 (43,3)

3.2. Yöntem

3.2.1. Materyallerin Hazırlanması

3.2.1.a.Kan Serumı Örnekleri

Koagulan madde olarak jel içeren tüplere alınan kan örnekleri laboratuvarında 13000xg devirde 5 dakika santrifüj edildi. Üstte kalan serum 100-1000 µL hacimli mikropipet ucu yardımıyla ependorf tüplerine aktarılarak test edilinceye kadar -20°C derin dondurucularda saklandı.

3.2.1.b.Genital Sıvı Örnekleri

Kuru sıvı çubukları ile toplanan genital sıvı örneklerinin her biri kendilerine ait içinde 2 mL PBS bulunduran tüplerde laboratuvara getirildi. Laboratuvarda vortekslelendikten sonra steril ependorf tüplerine aktararak 8000xg devirde 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant yeni steril ependorf tüplerine aktarıldı. Örnekler, test edilinceye kadar -20°C derin dondurucularda saklandı.

3.2.2. İndirek ELISA

Manda serumlarında BoHV-4 spesifik antikor varlığı BoHV-4 antijeni kaplı ticari bir indirek ELISA kiti (Monoscreen Ab ELISA, double wells, Bio-X Diagnostics, Belçika) kullanılarak üretici firmanın kit kılavuzunda belirttiği şekilde test edildi. ELISA pleytlerinde tek rakamlı gözler (1,3,5,7,9,11) sensitize antijen kaplıyken, çift rakamlı gözler (2,4,6,8,10,12) kontrol olarak değerlendirildiği için her bir serum örneği tek ve çift rakamlı gözlerde test edildi. ELISA pleytinin A1 ve A2 gözleri pozitif, B1 ve B2 gözleri negatif kontroller için ayrıldı. Öncelikle kontroller ve tüm serum örneklerinin ayrı bir pleytte 1/10 ön sulandırması hazırlandı. Önceden 90 µL dilüsyon tamponu eklenen kit gözlerine bu sulandırmalardan 10µL alınarak 1/100 sulandırmaları hazırlandı. Tüm serum örnekleri ve kontroller 21°C’de 1 saat inkubasyona bırakıldı. Süre sonunda 3 kez yıkama solüsyonu ile yıkandı ve pleyt gözleri dikkatli bir şekilde kurutuldu. Tüm gözlere 1/50 oranında hazırlanan konjugat solüsyonundan 100µL eklenerek 21°C’de 1 saat inkubasyona bırakıldı. Süre sonunda 3 kez yıkama solüsyonu ile yıkandı ve pleyt gözleri dikkatli bir şekilde kurutuldu. Tüm gözlere 100µL substrat solüsyonu eklendi ve karanlık ortamda 21°C’de 10 dakika beklendikten sonra tüm gözlere 50µL “Reaksiyon durdurma (Stop)” solüsyonu eklenerek 450nm dalga boyunda ELISA okuyucuda optik dansite değerleri okutuldu. Sonuçlar kit kılavuzunda belirtilen matematiksel yöntem kullanılarak aşağıda belirtilen formülasyonla hesaplandı (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. ELISA sonuçlarının değerlendirme formülü.

Değerlendirme	
(+) kontrol A ₁ OD ₄₅₀ > 0,7 (-) kontrol: B ₁ OD ₄₅₀ < 0,3	
% Değer: $\frac{\text{SerumOD}_{450} \times 100}{\text{PK OD}_{450}}$	
Pozitivite Dereceleri	
<%30	Negatif
≥%30 - <%60	+
≥%60 - <%90	++
≥%90 - <%120	+++
≥%120 - <%150	++++
≥%150	+++++

3.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

3.2.3.a. Viral Nükleik Asit İzolasyonu

Genital sıvı örneklerinden viral nükleik asit izolasyonu ticari nükleik asit ekstraksiyon kiti (Roche HighPure Viral Nucleic Acid Extraction kit, Almanya) kullanılarak gerçekleştirildi. İzolasyon aşamaları;

- Şüpheli örnekten 200µL ependorf tüpüne alındı.
- Üzerine 200µL proteinaz K enzimi ve bağlanma solüsyonu içerisinde hazırlanan taşıyıcı (poly A) içeren çalışma solüsyonundan 200µL eklenerek vortekslendikten sonra su banyosunda 72°C’de 10 dakika inkube edildi.
- İnkubasyondan çıkarılan örneğin üzerine 100µL bağlanma solüsyonu eklenerek tekrar vortekslendi ve spin kolon bulunan bir tüpe aktarıldı.
- Spin kolon filtre içeren tüp 8000xg’de 1 dakika santrifüj edildi ve alttaki tüp atılarak spin kolon filtre yeni bir boş tüpe alındı.
- Spin kolon filtrenin üzerine 450µL inhibitör uzaklaştırıcı tampon eklendi ve 8000xg’de 1 dakika santrifüj edildi.
- Yeni bir boş tüpe alınan spin kolon filtrenin üzerine 500µL yıkama solüsyonu eklendikten sonra 8000xg’de 1 dakika santrifüj edildi.
- Spin kolon filtre yeni bir boş tüpe alındıktan sonra son bir kez 13000xg’de 10 saniye santrifüj edilerek kalıntılar uzaklaştırıldı. Son aşamada viral nükleik asitin aktarılacağı

ependorf tüplerine alınan spin kolon filtre üzerine 50µL elüsyon tamponu eklenerek 8000xg'de 1 dakika santrifüj edildi. Stok tüpüne alınan nükleik asit ekstraktı, PCR amplifikasyonunda kullanılmak üzere test edilinceye kadar -20°C derin dondurucularda saklandı.

3.2.3.b.Viral Nükleik Asit Amplifikasyonu

Wellenberg ve ark. (2001)'nin bildirdiği, virusun gB gen bölgesine yönelik primer çifti (sentetik oligonükleotit dizileri) ve ticari mastermiks solüsyonu (5xHot FIREPol PCR mastermiks with 15 mM MgCl₂, Solis BioDyne, Estonya) kullanılarak spesifik PCR amplifikasyonu gerçekleştirildi (Çizelge 3.3). Amplikonların görüntülenmesi amacıyla 0,5xTBE (Tris Boric Acid-Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid) solüsyonu içinde %1,5'luk olarak hazırlanan agaroz (Prona, EU) solüsyonuna 0,2µg/mL konsantrasyonunda nükleik asit boyası (Safe View Fire Red, ABM, Kanada) ilave edilerek polimerize olduktan sonra elektroforez tankına alındı. 615 bp büyüklüğündeki spesifik ürün bandı 100-3000 bp'lik DNA standardı (100bp DNA Ladder Plus, Hibrigen Biyoteknoloji, Türkiye) ile karşılaştırılarak ve jel görüntüleme sistemi (UVP EC3W Darkroom, Cambridge, Birleşik Krallık) kullanılarak görüntülendi. Negatif kontrol olarak DNase/RNase distile su kullanıldı.

Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan primerlerin dizin ve PCR protokolü (Wellenberg ve ark. 2001).

Primer	Dizin (5'-3')	Reaksiyon protokolü			
		Başlangıç denatürasyonu	95°C'de 13 dak.	1	siklus
BoHV-4/gB1 CCCTTCTTTACCACCACCTACA		Denatürasyon	95°C'de 15 sn	35	siklus
		Bağlanma	56°C'de 45 sn		
BoHV-4/gB2 TGCCATAGCAGAGAAACAATGA		Uzama	72°C'de 55 sn		
		Son uzama	72°C'de 10 dak.	1	siklus

3.2.4. İstatistiksel Analizler

BoHV-4 seroprevalansı üzerine işletme tipi (karma/manda), yaş ve cinsiyet etkisinin belirlenmesinde Pearson Ki-Kare analizi kullanıldı. Tanımlayıcı istatistikler frekans yüzde olarak gösterildi. İstatistik olarak anlamlı fark sınırı $p < 0,05$ olarak belirlendi. İstatistiksel analizlerde SPSS 23.0 paket programı kullanıldı.



4. BULGULAR

4.1. Serolojik Bulgular ve İstatistiksel Değerlendirme

Araştırmada örneklenen 150 mandadan 65 adedinde (%43,0) BoHV-4 spesifik antikor varlığı saptandı. Genel olarak işletme düzeyindeki seropozitiflik oranları %0-100 arasında belirlendi.

Yetiştirme tiplerine göre karma yetiştiricilik yapan işletmelerde seropozitiflik oranları %10-100 arasında, sadece manda yetiştiriciliği yapan işletmelerde ise %0-100 arasında olduğu saptandı. Örneklenen hayvanlardan 36 dişi (%43,9) ve 29 erkek hayvanda (%42,0) virus spesifik antikor varlığı tespit edildi. Yaş gruplarına göre ise 3-6 aylık yaşlı grupta 17 (%48,6) ve 6 aylıktan büyük mandaların 48 (%41,7) adedinde seropozitiflik tespit edildi. BoHV4 seroprevalansı üzerinde işletme tipi, yaş ve cinsiyetin etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1 İşletme tipi, yaş ve cinsiyet gruplarının istatistiksel değerlendirmesi.

Parametreler	Negatif n (%)	Pozitif n (%)	P değeri
İşletme Tipi			
Manda	24 (48,0)	26 (52,0)	0,130
Karma	61 (61,0)	39 (39,0)	
Yaş			
3-6 ay	18 (51,4)	17 (48,6)	0,475
>6 aydan büyük	67 (58,3)	48 (41,7)	
Cinsiyet			
Dişi	45 (55,6)	36 (44,4)	0,766
Erkek	40 (58,0)	29 (42,0)	
Toplam	85 (56,7)	65 (43,3)	

Serum antikor düzeylerini gösteren OD₄₅₀ üzerinden hesaplanan yüzde değerleri üretici firmanın bildirdiği şekilde +1'den +5'e göre sıralandığında (Tablo 2) yaş ve cinsiyet ayırtetmeksizin örneklenen serumların % pozitivite değerleri ortalamasının (Ortalama±standart sapma) 1,82±0,093 olduğu belirlendi. Örneklenen serumlar arasında en yüksek değer olan +4 pozitivite değeri 6 aylıktan büyük erkek bir mandada belirlendi (Çizelge 4.2 ve Çizelge 4.3).

Çizelge 4.2 Cinsiyete göre seropozitiflik düzeylerinin dağılımı.

Pozitiflik Düzeyi	Dişi n:85 (%)	Erkek n:65 (%)	Toplam n:150 (%)
+	20 (23,5)	14 (21,5)	34 (22,7)
++	6 (7,1)	4 (6,2)	10 (6,7)
+++	10 (11,8)	10 (15,4)	20 (13,3)
++++	-	1 (1,5)	1 (0,6)
+++++	-	-	-
Toplam	36 (42,4)	29 (44,6)	65 (43,3)

Çizelge 4.3. Yaş gruplarına göre seropozitiflik düzeylerinin dağılımı

	3-6 ay n	>6 ay n
+	12	22
++	2	8
+++	3	17
++++	-	1
+++++	-	-
Toplam	17 (%48,6)	48 (%41,7)

4.2. PCR Bulguları

Sağlıklı görünümlü mandalardan alınan genital sıvay örneklerinin hiçbirinde BoHV-4 nükleik asit varlığı belirlenemedi.

5. TARTIŞMA

Sağlıklı görünümlü sığırlardan olduğu gibi postpartum metrit, vulvovajinit ve abort gibi reproduktif bozukluklar başta olmak üzere deri lezyonları, ülseratif mamillit, enterit gibi farklı klinik bulgular sergileyen sığırlardan da izole edilen (Belak ve Palfi 1974, Kalman ve ark. 2004) bir gammaherpesvirus olan BoHV-4, tüm sığır popülasyonlarını etkilemektedir (Egyed ve ark. 1996, Egyed ve Bartha 1998).

Serolojik ve virolojik çalışmalar, Afrika mandasının da bu virus için doğal bir konakçı olduğunu göstermiştir (Dewals ve ark. 2006). BoHV-4'ün sığır ve mandalardan izole edilen farklı suşlarının Bo17 gen analizleri türlerarası bulaşma olayının yaklaşık 700 bin yıl kadar önce gerçekleşmiş olabileceğini ve virusun o zamandan beri sığırlarla birlikte evrimleşerek sığırlarda ve mandalarda enfeksiyon oluşturan iki ayrı dal oluşturduğunu ortaya koymuştur (Markine-Goriaynoff ve ark. 2003). Kenya'da vahşi Afrika manda (*Syncerus caffer*) popülasyonunda gerçekleştirilen bir araştırmada, sağlıklı görünümlü vahşi Afrika mandalarının %94'nün BoHV-4 spesifik antikorlara sahip olduğu ve kan örneklerinin %25'inden virusun izole edildiği bildirilmiştir (Rossiter ve ark. 1989). Bir başka araştırmada ise Doğu ve Güney Afrika'daki çeşitli alanlardaki vahşi Afrika mandalarından alınan 400 serum örneğinde %68'lik bir BoHV-4 seroprevalansı rapor edilmiştir (Dewals ve ark. 2005). Ülkemizde sığırlarda gerçekleştirilen sınırlı sayıdaki araştırmada enfeksiyonun seroprevalansı %29,3-69,6 arasında değişen oranlarda bildirilmiştir (Bilge Dağalp ve ark. 2007, Gür ve Doğan 2010, Yıldırım ve ark. 2011, Kale ve ark. 2011, Öztürk ve ark. 2012, Avcı ve Yavru 2013). Bu araştırmalardan bir kısmı abort veya repeat breeder gibi klinik bulguların görüldüğü sığırcılık işletmelerinde gerçekleştirilmiştir. Ülkemizde BoHV-4 varlığının ilk defa ortaya konulduğu çalışmada, Türkiye'nin üç farklı bölgesinde yer alan postpartum metrit, abort ve repeat breeder gibi reproduktif problemlere sahip süt sığırcılığı işletmelerinde enfeksiyonun seroprevalansının %54,3 olduğu bildirilmiştir (Bilge-Dağalp ve ark. 2007). Ülkemizde gerçekleştirilen diğer serolojik ve virolojik çalışmalarda, Konya ilindeki bir süt sığırcılığı işletmesinde %20,22 (Avcı ve Yavru 2013); Kars ilinde 10 süt sığırcılığı işletmesindeki gebeliğin 1. ve 2. trimesterlerinde abort yapan ineklerden örneklenen serum örneklerinin %11,4'ünde BoHV-4 spesifik antikor varlığı bildirilmiştir (Yıldırım ve ark. 2011). İşletme bazında %33,1-69,5 arasında seropozitiflik bildirilmekle birlikte reproduktif patolojiler ile BoHV-4

seropozitifliği arasında istatistiksel anlam olduğu da rapor edilmiştir (Yıldırım ve ark. 2011). Bu araştırmada, örneklenen 150 mandadan 65 adedinde (%43,3) BoHV-4 spesifik antikor varlığı saptanmıştır. Genel olarak işletme düzeyindeki seropozitiflik oranları %0-100 arasında belirlenmiştir. Yetiştirme tiplerine göre seropozitiflik oranları, karma yetiştiricilik yapılan işletmelerde %10-100 arasında, sadece manda yetiştiriciliği yapılan işletmelerde %0-100 arasında değiştiği tespit edilmiştir. Bu araştırmada örneklenen serumların pozitivite değerlerinin $1,82 \pm 0,093$ düzeyinde olduğu belirlenmiştir. BoHV-4 spesifik antikorların titresinin ve aviditesinin düşük, yarı-ömrünün kısa olması nedeniyle (Donofrio ve ark. 2000), bu çalışmada tek serum örneği ile çalışıldığından ve avidite testi yapılmadığından sadece seropozitivite düzeylerine bakarak enfeksiyonun statüsü (latent, akut veya reenfeksiyon) değerlendirilememiştir. Ancak, bu araştırmadaki seroprevalans sonuçları ile ülkemizde sığırlarda gerçekleştirilen önceki çalışmaların sonuçları benzerlik göstermektedir. Bununla birlikte, bazı çalışmalarda özellikle reproduktif problemleri olan sığırlarda %50' nin üzerinde prevalans bildirilmektedir. Bununla birlikte, sağlıklı görünümlü hayvanlarda da virus varlığı saptanmasına rağmen, bu araştırmada örneklenen genital sıvıların hiçbirinde viral nükleik asit tespit edilememiştir. İşletmelerde tesadüfi örnekleme yapılması nedeniyle sağlıklı görünümlü mandalarda örnekleme döneminde virus saçılımının olmamasına bağlı olarak virus tespiti yapılamadığı düşünülmektedir.

Bu çalışmada, yaş gruplarına göre 3-6 aylık yaş grubunun %48,6 (17/35)'sında, 6 aylıktan büyük yaş grubunda ise %41,7 (48/115)'sinde seropozitiflik tespit edildi. 6 aylıktan küçüklerdeki seropozitiflik oranı, 6 aylıktan büyük yaş grubuyla karşılaştırıldığında göreceli olarak daha yüksek bulunmuştur. Bilge-Dağalp ve ark. (2007) tarafından yapılan çalışmada BoHV-4 enfeksiyonunun seroprevalansının 2 yaşından büyük sığırlarda, 2 yaşından küçük sığırlara oranla daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. El-Hassan ve ark. (2011), 6-12 (%3,9) ve 12-24 aylık (%2,8) sığırlarda benzer prevalans oranları saptanmasına rağmen, özellikle 36 aylıktan büyük (%29,2) yaşlı hayvanlarda genç hayvanlara oranla daha yüksek seropozitiflik olduğunu ve bu farklılığın da istatistiksel olarak önemli olduğu göstermişlerdir. Bu araştırmada her iki yaş grubundaki seroprevalans dağılımları istatistiksel olarak anlamlı bulunmamasına karşın, özellikle 6 aylıktan küçük mandalardaki yüksek seropozitiflik oranlarının maternal antikor kaynaklı veya yaşamlarının ilk yılındaki bir enfeksiyona bağlı olabileceği düşünülmektedir. Önceki araştırma sonuçlarıyla (Bilge-Dağalp ve ark. 2007, El-Hassan ve ark. 2011, Areda ve ark.

2018) karşılaştırıldığında, enfeksiyona karşı farklı duyarlılıklardaki türlerle çalışılması (sığır ve manda), yetiştirme tiplerinin farklı olması (karma veya tek tür yetiştirme), küçük yaş gruplarının örneklenmesi, coğrafi alan ve örneklem büyüklükleri (n:150) gibi farklılıklar bulunmaktadır. Areda ve ark. (2018)'ı yaptıkları çalışmada laktasyon sayısı, laktasyon evresi ve postpartum metritisle BoHV-4 enfeksiyonu arasında anlamlı bir ilişki olduğu gösterilmesine karşın, ırk, coğrafi konum ve mevsimsel ilişki bulunamamıştır.

Bu araştırmada, dişilerin %43,9 (36/81) ve erkeklerin %42,6 (29/69)'sında BoHV-4 spesifik antikor varlığı gösterilmiştir. Önceki araştırmalarda, dişilerde erkeklere kıyasla daha yüksek bir seropozitiflik saptandığı rapor edilmiştir. Ayrıca, EHV-3 seroprevalans çalışmalarında, kullanım (yarış, damızlık, taşıma gibi) amacının prevalansı etkileyebileceği, özellikle yüksek prevalans oranlarının dişilerdeki çiftleşme ve genital organların inspeksiyonunun sıklığıyla ilişkili olduğu rapor edilmiştir. (Ataseven ve ark. 2014, Pagamjav ve ark. 2011). Bu araştırmada, örneklenen mandalarda doğal aşım yöntemi kullanılmaktadır. Dişi ve erkek mandalardaki seroprevalans oranlarında büyük farklılık saptanmamasına karşın dişi mandalarda göreceli olarak daha yüksek prevalans tespit edilmiş, ancak bu farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. Deneysel çalışmalar süt, salya ve spermada aralıklı saçılım olduğunu göstermiştir (Frazier ve ark. 2002). Her iki cinsiyetteki benzer seroprevalans oranlarının doğal aşım kaynaklı venereal bulaşmanın bir sonucu olarak sperma yoluyla olabileceğini düşündürmektedir.

6. SONUÇ

- ✓ Araştırmada çalışılan manda popülasyonunda BoHV-4 seroprevalansının yüksek olduğu saptandı. Bir ruminant türü olmasından dolayı sığırlardaki BoHV-4 enfeksiyonunun mücadelesinde uygulanacak stratejiler mandalarda da uygulanabilir. Bu amaçla;
- ✓ Düşük seroprevalans oranlarına sahip sürülerde seropozitif hayvanlar sürüden çıkartılmalı,
- ✓ Yeni doğan yavrular, seronegatif annelerin kolostrum ve sütü ile beslenmeli,
- ✓ Latent virusun reaktivasyonunu önlemek için stres doğurucu faktörlerden kaçınılmalı,
- ✓ Virusun etkileştiği diğer mikroorganizmalardan aşısı olanların kullanımı mandalarda da korunma/mücadele protokollerine eklenmeli ve
- ✓ Meme sağlığı için sağım hijyeni protokollerine uyulmalıdır.

7. KAYNAKLAR

1. **Ackermann M.** Pathogenesis of gammaherpesvirus infections. *Vet Microbiol*, **2006**, 113:211–222.
2. **Aligholipour Farzani T., Bilge Dağalp S., Özkul A., Gürdal H., Doğan F. ve ark.** Assessment of replication of bovine herpesvirus type 4 in human glioblastoma and breast cancer cells as a potential oncolytic virus. *Virus Genes*, **2021**, 57(1):31–39.
3. **Areda D, Chigerwe M, Crossley B.** Bovine herpes virus type-4 infection among postpartum dairy cows in California: risk factors and phylogenetic analysis. *Epidemiol Infect*, **2018**; 146(7): 904-912.
4. **Ataseven VS.** Sığır Yetiştiriciliğinde Reprodüktif Problemlerde BoHV-4' ün Rolü ve Türkiye'deki Epidemiyolojisi. Turkish Society of Veterinary Gynecology Congress of 9th National & 3rd International. 24-27 Mart **2022**, Antalya, Türkiye.
5. **Ataseven VS, Doğan F, Bilge Dağalp S, Tan MT, Altınbay K. ve ark.** Serological survey of equid herpesvirus 3 infection in Turkish horses. *Turk J Vet Anim Sci*, **2014**; 38: 295-298.
6. **Avcı O, Yavru S.** Investigation of Bovine Herpesvirus-1, Bovine Viral Diarrhea Virus and Bovine Herpesvirus-4 in a dairy herd with naturally infected in Konya. *Eur J Vet Sci*, **2013**, 29 (2):82-86
7. **Bartha A, Juhasz M, Liebermann H.** Isolation of a bovine herpesvirus from calves with respiratory disease and keratoconjunctivitis. *Acta Vet Acad Sci Hung*, **1966**, 16:357-358.
8. **Barahona HH, Melendez LV, King NW, Daniel MD, Fraser CEO ve ark.** Type 2: A New Viral Agent from Owl Monkeys (*Aotus triotragus*). *J Infec Dis*, **1973**, 127(2):171–178.
9. **Barkema HW, Schukken YH, Lam TJGM, Beiboer ML, Benedictus G ve ark.** Management Practices Associated with Low, Medium, and High Somatic Cell Counts in Bulk Milk. *J Dairy Sci*, **1998**, 81(7):1917–1927.
10. **Barkema HW, Green MJ, Bradley AJ, Zadoks RN.** Invited review: The role of contagious disease in udder health. *J Dairy Sci*, **2009**, 92(10):4717–4729.
11. **Belak S, Palfi V.** Characterization of a herpesvirus isolated from spontaneously degenerated bovine kidney cell culture. *Acta Vet Acad Sci Hung*, **1974**, 24(3):249-253.
12. **Bellino C, Iussich S, Biasato I, Peletto S, Caruso C ve ark.** Potential Pathogenetic Role of Bovine Herpesvirus 4 in Two Dairy Cows with Dermatitis-Pyrexia-Hemorrhagic Syndrome. *J Clin Microbiol*, **2015**, 53(8):2763–2767.
13. **Bilge Dağalp S, Demir AB, Güngör E, Alkan F.** The seroprevalence of Bovine Herpesvirus Type 4 (BHV4) infection in dairy herds in Turkey and possible interaction with reproductive disorders. *Rev Méd Vet*, **2007**; 158(4): 201-204.
14. **Bilge Dağalp S, Alkan F, Çalışkan E, Özkul A.** Molecular characterization of BHV4 field isolates from dairy cows with reproductive disorders in Turkey” XIV. International Congress of Virology, 10-15 August **2008**, İstanbul-Turkey.
15. **Bilge Dağalp S, Güngör E, Demir AB, Oğuzoğlu TÇ, Yılmaz V ve ark.** The investigation of the presence of bovine herpesvirus type 4 (BoHV-4) in cows with metritis in a dairy herd. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, **2010**, 57:2.
16. **Bilge Dağalp S, Oğuzoğlu TÇ, Faraji A, Timurkan MÖ.** The investigation of BVDV, BoHV-4 and BoHV-1 as a possible aetiological agents in abortion and neonatal death cases in cattle. 8. ESVV Pestivirus Sempozyumu, 25-28 Eylül **2011**, Hannover-Almanya.
17. **Bilge Dağalp S, Babaoğlu AR, Dogan F, Farzani TA, Alkan F.** An assessment of bovine herpes virus 4 as a causative agent in abortions and neonatal death. *Onderstepoort J Vet Res*, **2020**, 87(1):1761-1766.
18. **Bilge Dağalp S, Doğan F, Babaoğlu AR, Farzani TA, Alkan F.** Genetic variability of bovine herpesvirus type 4 (BoHV-4) field strains from Turkish cattle herds. *Vet Ital*, **2021**, 57 (1): 49-59.
19. **Bublot M, Dubuisson J, Van Bresse M, Danyi S, Pastoret P ve ark.** Antigenic and genomic identity between simian herpesvirus aotus type 2 and bovine herpesvirus type 4. *J Gen Virol*, **1991**. 72 (3):715-719.
20. **Chastant-Maillard S.** Impact of Bovine Herpesvirus 4 (BoHV-4) on Reproduction. *Transbound Emerg Dis*, **2015**, 62(3): 245–251.
21. **Cvetojevic D, Savic B, Milicevic V, Kureljusic B, Jezdimirovic N ve ark.** Prevalence of Bovine herpesvirus type 4 in aborting dairy cows. *Polish J Vet Sci*, **2016**, 19(4):731–736.
22. **Czaplicki G, Thiry E.** An association exists between bovine herpesvirus-4 seropositivity and abortion in cows. *Prev Vet Med*, **1998** , 33(1-4): 235-240.
23. **Çabalar M.** Bovine Herpesvirus 4. İç: Herpesviridae ailesi. Veteriner Viroloji, **2021**, Bölüm 3:63-64 , Medipress (Editör: Kadir Yeşilbağ).

24. **Davison AJ, Eberle R, Ehlers B, Hayward GS, McGeoch DJ ve ark.** The order Herpesvirales. *Arch Virol*, **2009**, 154:171–177.
25. **Deim Z, Szeredi L, Egyed L.** Detection of Bovine herpesvirus-4 DNA in aborted bovine fetuses. *Can J Vet Res*, **2007**, 71: 226–229.
26. **Delooz L, Czaplicki G, Houtain JY, Dal Pozzo F, Saegerman C.** Laboratory Findings Suggesting an Association Between BoHV-4 and Bovine Abortions in Southern Belgium. *Transbound Emerg Dis*, **2017**, 64(4):1100-1109.
27. **Dewals B, Gillet L, Gerdes T, Taracha ELN, Thiry E ve ark.** Antibodies against bovine herpesvirus 4 are highly prevalent in wild African buffaloes throughout eastern and southern Africa. *Vet Microbiol*, **2005**; 110:209–220.
28. **Dewals B, Thirion M, Markine-Goriaynoff N, Gillet L, de Fays K ve ark.** Evolution of Bovine herpesvirus 4: recombination and transmission between African buffalo and cattle. *J Gen Virol*, **2006**; 87: 1509-1519.
29. **Donofrio G, Flammini CF, Scatozza F, Cavirani S.** Detection of bovine herpesvirus 4 (BoHV-4) DNA in the cell fraction of milk of dairy cattle with history of BoHV-4 infection. *J Clin Microbiol*, **2000**, 38(12):4668-4671.
30. **Donofrio G, Cavirani S, van Santen V, Flammini CF.** Potential Secondary Pathogenic Role for Bovine Herpesvirus 4. *J Clin Microbiol*, **2005**, 43(7):3421–3426.
31. **Donofrio G, Martignani E, Sartori C, Vanderplasschen A, Cavirani S ve ark.** Generation of a transposon insertion mutant library for bovine herpesvirus 4 cloned as a bacterial artificial chromosome by in vitro MuA based DNA transposition system. *J Virol Methods*, **2007**, 141:63–70.
32. **Donofrio G, Capocefalo A, Franceschi V, Price S, Cavirani S ve ark.** The chemokine IL8 is up-regulated in bovine endometrial stromal cells by the BoHV-4 IE2 gene product, ORF50/Rta: a step ahead toward a mechanism for BoHV-4 induced endometritis. *Biol Reprod*, **2010**, 83:919–928.
33. **Egyed J, Ballagi-Pordany A, Bartha A, Belak S.** Studies of in vivo distribution of bovine herpesvirus type 4 in the natural host. *J Clin Microbiol*, **1996** , 34:1991-1095.
34. **Egyed L, Bartha A.** PCR studies on the potential sites for latency of BHV-4 in calves. *Vet Res Commun*, **1998**, 22(3):209-216.
35. **Egyed L, Sassi G, Tibold J, Mádl I, Szenci O.** Symptomless intrauterine transmission of bovine herpesvirus 4 to bovine fetuses. *Microb Pathog*, **2011**, 50(6):322-325.
36. **Elhassan AM, Fadol MA, El-Hussein AM.** Seroprevalence of bovine herpes virus-1, bovine herpes virus-4 and bovine viral diarrhea virus in dairy cattle in Sudan. *Pak Vet J*, **2011**, 31(4): 317-320.
37. **Fabian K, Makrai L, Sachse K, Szeredi L, Egyed L.** An investigation of the aetiological role of bovine herpesvirus 4 in bovine endometritis. *Vet J*, **2008**, 177(2):289-292.
38. **Frazier K, Pence M, Mauel MJ, Liggett A, Ii MEH ve ark.** Endometritis in postparturient cattle associated with bovine herpesvirus-4 infection: 15 cases. *J Vet Diag Invest*, **2001**,13:502–508.
39. **Frazier K, Baldwin CA, Pence M, West J, Bernard J ve ark.** Seroprevalence and comparison of isolates of endometriotropic bovine herpesvirus-4. *J Vet Diagn Invest*, **2002**; 14: 457-462.
40. **Gagnon CA, Traesel CK, Music N, Laroche J, Tison N ve ark.** Whole genome Sequencing of a Canadian Bovine Gammaherpesvirus 4 Strain and the Possible Link between the Viral Infection and Respiratory and Reproductive Clinical Manifestations in Dairy Cattle. *Front Vet Sci*, **2017**, 4:92.
41. **Gilbert I, Macaulay A, Robert C.** Oocyte developmental competence and embryo quality: distinction and new perspectives. *Anim Reprod* **2015**; 12(3): 397–407.
42. **Gillet L, Daix V, Donofrio G, Wagner M, Koszinowski UH ve ark.** Development of bovine herpesvirus 4 as an expression vector using bacterial artificial chromosome cloning. *J Gen Virol*, **2005**, 86:907–917.
43. **Goltz M, Broll H, Mankertz A, Weigelt W, Ludwig H ve ark.** Glycoprotein B of bovine herpesvirus type 4: Its phylogenetic relationship to gB equivalents of the herpesviruses. *Virus Genes*, **1994**; 9: 53-59.
44. **González Altamiranda E, Manrique JM, Pérez SE, Ríos GL, Odeón AC ve ark.** Molecular Characterization of the First Bovine Herpesvirus 4 (BoHV-4) Strains Isolated from In Vitro Bovine Embryos production in Argentina. *PloS One*, **2015**, 10(7):e0132212.
45. **Graham DA, McNeill GJ, Calvert V, Mawhinney K, Curran W ve ark.** Virological and serological evidence of bovine herpesvirus type 4 in cattle in Northern Ireland. *Vet Rec*, **2005**, 29:539-543.
46. **Guo WZ, Shen DT, Evermann JF, Gorham JR.** Comparison of an enzyme-linked immunosorbent assay and a complement - fixation test for the detection of IgG to Bovine Herpesvirus Type 4 (Bovine Cytomegalovirus). *Am J Vet Res*, **1988**, 49(5): 667-670.

47. **Gür S, Doğan N.** The possible role of bovine herpesvirus type-4 infection in cow infertility. *Anim Sci J*, **2010**; 81: 304-308.
48. **Homan EJ, Easterday BC.** Further studies of naturally occurring latent bovine herpesvirus infection. *Am J Vet Res*, **1981**, 42(10):1811-1813.
49. **Hulsen J, Lam T, Schukken YH.** Büyük Sütçü Sürüler için Meme Sağlığı, **2016**, 5: 63.
50. **ICTV.** dsDNA viruses, Herpesviridae: Subfamily: Gammaherpesvirinae, **2021**,
Erişim: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/dsdna-viruses/w/herpesviridae/1622/subfamily-gammaherpesvirinae.
51. **Jacca S, Franceschi V, Colagiorgi A, Sheldon M, Donofrio G.** Bovine endometrial stromal cells support tumor necrosis factor alpha-induced bovine herpesvirus type 4 enhanced replication. *Biol Reprod*, **2013**, 88:135
52. **Kale M, Ata A, Kocamüftüoğlu M, Hasırcıoğlu S.** Bovine Herpesvirus Type 4 (BHV-4) infection in relation to fertility in repeat breeder dairy cows. *Acta Vet (Beograd)*, **2011**; 61 (1):13-19.
53. **Kalman D, Janosi S, Egyed L.** Role of bovine herpesvirus 4 in bacterial bovine mastitis. *Microb Pathog*, **2004**. 37(3):125-129.
54. **Koç BT.** A Phylogenetic and Genotyping Study of Bovine Herpesvirus Type 4 (BHV-4) in Turkey. *J Res Vet Med*, **2020**, 39 (1): 61-66
55. **Kruger JM, Venta PJ, Swenson CL, Syring R, Gibbons-Burgener SN ve ark.** Prevalence of bovine herpesvirus-4 infection in cats in Central Michigan. *J Vet Intern Med*, **2000**, 14(6):593–597.
56. **Lete C, Palmira C, Leroy B, Mast J, Macihels B ve ark.** Proteomic characterization of bovine herpesvirus 4 extracellular virions. *J Virol*, **2012**. 86(21): 11567-80.
57. **Lewis G.** Steroidal regulation of uterine immune defenses. *Anim Reprod Sci*, **2004**, 82-83:281–294.
58. **Lin TM, Shi GY, Jiang SJ, Tsai CF, Hwang BJ ve ark.** Persistent infection of bovine herpesvirus type 4 in bovine endothelial cell cultures. *Vet Microbiol*, **1999**. 70(1-2):41-53.
59. **Little SP, Jofre JT, Courtney RJ, Schaffer PA.** A virion –associated glycoprotein essential for infectivity of herpes simplex virus type 1. *Virology*, **1981**, 115:149-160.
60. **Lomonte P, Filie P, Lyaku JR, Bublot M, Pastoret PP ve ark.** Glycoprotein B of Bovine Herpesvirus 4 is a major component of the virion, unlike that of two other gammaherpesviruses, Epstein-Barr virus and Murine Gammaherpesvirus 68. *J Virol*, **1997**, 4: 3332-3335.
61. **Markine-Goriaynoff N, Georgin J-P, Goltz M, Zimmermann W, Broll H ve ark.** The Core 2 β -1,6-N-Acetylglucosaminyltransferase-Mucin Encoded by Bovine Herpesvirus 4 Was Acquired from an Ancestor of the African Buffalo. *J Virol*, **2003**; 77(3):1784-1792.
62. **Monge A, Elvira L, Gonzalez Jv, Astiz S, Wellenberg G.J.** Bovine herpesvirus 4-associated postpartum metritis in a Spanish dairy herd. *Res Vet Sci*, **2006**; 80(1):120-125.
63. **Moreno-Lopez J, Goltz M, Rehbindler C, Valsala KV, Ludwig H.** A bovine herpesvirus (BHV-4) as passenger virus in ethmoidal tumours in Indian cattle. *Zentralbl Veterinarmed B*, **1989**. 36(7):481-486.
64. **Naeem K, Goyal SM, Werdin RE.** Prevalence of bovid herpesvirus-4 and its antibody in cattle in Minnesota. *Am J Vet Res*, **1989**, 50(11):1931-1935.
65. **Naeem K, Murtaugh MP, Goyal SM.** Tissue distribution of bovid herpesvirus-4 in inoculated rabbits and its detection by DNA hybridization and polymerase chain reaction. *Arch Virol*, **1991**. 119(3-4): 239-255.
66. **Nikolin VM, Donofrio G, Milošević B, Taddei S, Radosavljevic V ve ark.** First Serbian isolates of bovine herpesvirus 4 (BoHV-4) from a herd with a history of postpartum metritis. *New Microbiol*, **2007**; 30(1):53–57.
67. **Nikolin V, Milicevic V, Radosavljevic V.** Presence of Bovine herpesvirus type 4 (BHV-4) infection in bulls for artificial insemination in Serbia. *Acta Vet*, **2008**, 58(2-3):267–273.
68. **Özgünlük İ, Yıldırım Y.** Güneydoğu Anadolu Bölgesindeki Sığırlarda Bovine Herpes Virus 1 (BHV 1) ve Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) Enfeksiyonlarının Serolojik Olarak Araştırılması. *Harran Univ Vet Fak Derg*, **2017**; 6 (2):152-157.
69. **Öztürk D, Kale M, Pehlivanoglu F, Hasırcıoğlu S, Türütoğlu H.** Evaluation for some bacterial and viral abortions of dairy cattle farms in Burdur district of Turkey. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, **2012**; 18:255-258.
70. **Pagamjav O, Kobayashi K, Murakami H, Tabata Y, Miura Y ve ark.** Serological survey on equine viral diseases in Mongolia. *Microbiol Immunol*, **2011**; 55:289–292.
71. **Perez DS, Perez FA, Bretschneider G.** Histophilus somni: Pathogenicity in cattle. An update. *Anales de Veterinaria de Murcia* **2010**; 26:5-21.

72. **Reed D, Langpap TJ, Bergeland ME.** Bovine abortion associated with mixed Movar 33/63 type herpesvirus and bovine viral diarrhea virus infection. *Cornell Vet*, **1979**; 69(1):54–66.
73. **Roizman B, Baines J.** The diversity and unity of Herpesviridae. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, **1991**. 14(2):63-79.
74. **Roizman B, Desroisiers RC, Fleckenstein B, Lopez C, Minson ve ark.** The family herpesviridae: an update. *Arch Virol*, **1992**, 123:425-449.
75. **Rossiter PB, Gumm ID, Stagg DA, Conrad PA, Mukolwe S ve ark.** Isolation of bovine herpesvirus-3 from African buffaloes (*Syncerus caffer*). *Res Vet Sci*, **1989**; 46:337–343.
76. **Sass B, Mohanty SB, Hetrick FM.** Fluorescent antibody study of a new bovine herpesvirus (strain DN-599). *Am J Vet Res*, **1974**. 35(10):1343-1346.
77. **Sheldon IM, Dobson H.** Postpartum uterine health in cattle. *Anim Reprod Sci*, **2004**, 82-83:295–306.
78. **Shen DT, Burger D, Tong GZ, Gorham JR.** Molecular Cloning and physical mapping of bovine herpesvirus 4 strain DN 599 and comparison with two American field isolates. *Arch Virol*, **1992**, 127:75-87.
79. **Szenci O, Sassi G, Fodor L, Molnar L, Szelenyi Z ve ark.** Co-infection with bovine herpesvirus 4 and *Histophilus somni* significantly extends the service period in dairy cattle with purulent vaginal discharge. *Reprod Domest Anim*, **2016**, 51:143-149.
80. **Thiry E, Dubuisson J, Bublot M, Van Bresse MF, Pastoret PP.** The biology of bovine herpesvirus-4 infection of cattle. *Dtsch Tierarztl Wochenschr*, **1990**. 97(2):72-77.
81. **Todd WJ, Storz J.** Morphogenesis of a cytomegalovirus from an American bison affected with malignant catarrhal fever. *J Gen Virol*, **1983**; 64(5): 1025-1030.
82. **Van Santen VL.** Characterization of a bovine herpesvirus 4 immediate-early RNA encoding a homolog of the Epstein-Barr virus R transactivator. *J Virol*, **1993**; 67(2):773-784.
83. **Wellenberg GJ, van Rooij EM, Maissan J, Van Oirschot JT.** Evaluation of newly developed immunoperoxidase monolayer assays for detection of antibodies against bovine herpesvirus 4. *Clin Diagn Lab Immunol*, **1999**; 6(4):447-451.
84. **Wellenberg GJ, Verstraten ER, Belák S, Verschuren SB, Rijsewijk FA ve ark.** Detection of bovine herpesvirus 4 glycoprotein B and thymidine kinase DNA by PCR assays in bovine milk. *J Virol Methods*, **2001**; 97(1-2):101-112.
85. **Wellenberg GJ, Van Der Poel WHM, Van Oirschot JT.** Viral infections and bovine mastitis: a review. *Vet Microbiol*, **2002**; 88(1):27–45.
86. **Yang B, Li Y, Pascottini OB, Xie J, Wei R ve ark.** Primary replication and invasion of the bovine gammaherpesvirus BoHV-4 in the genital mucosae. *Vet Res, BioMed Central*, **2017**; 48 (1):83.
87. **Yavru S, Avcı O, Kale M.** Serologic and virologic investigation of BHV-1, BVDV and BHV-4 in cattle with metritis. *Anim Vet Sci*, **2014**; 2(5):142-145.
88. **Yıldırım Y, Yılmaz V, Kalaycıoğlu AT, Dağalp SB, Faraji Majarashin AR ve ark.** An investigation of a possible involvement of BVDV, BHV-1 and BHV-4 infections in abortion of dairy cattle in Kars district of Turkey. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, **2011**; 17:879-883.
89. **Zhu H, Cong JP, Yu D, Bresnahan WA, Shenk TE.** Inhibition of cyclooxygenase 2 blocks human cytomegalovirus replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **2002**; 99(6):3932–3937.

EK-1

Evrak Tarih ve Sayısı: 18/08/2020-E.36850

BE84LS69P

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu



Sayı: 40595970-050.99-
Konu: Prof. Dr. Veysel Soydal ATASEVEN

SAYIN PROF.DR. VEYSEL SOYDAL ATASEVEN

ÖĞRETİM ÜYESİ

Kurulumuzun 24/06/2020 tarihli toplantısında almış olduğu 2020/04-27 numaralı karar aşağıda sunulmuştur.
Bilgilerinize rica ederim.

Prof.Dr. İlker YAVAŞ
Kurul Başkanı

KARAR 2020/04-27 Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi Öğretim Üyesi Prof. Dr. Veysel Soydal ATASEVEN'in (Viroloji AD) yürütücüsü olduğu ve Veteriner Hekim Kemal GÜREL'in (Sağlık Bilimleri Enst.) ortak çalışmaları " *Hatay İlinde Halk Elinde Yetiştirilen Mandalarda Sığır Herpesvirus Tip 4 (BoHV-4) Enfeksiyonunun Serolojik ve Virolojik Olarak Araştırılması*" adlı proje Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesine uygun bulunarak onaylanmasına oybirliğiyle karar verilmiştir.

Mevcut Elektronik İmzalar

İLKER YAVAŞ (Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu - Kurul Başkanı) 18/08/2020 14:21

T: F:

E-Posta : Web:

İletişim: Hükümet Ardili (Dahili: 3262455845)



ETİK BEYAN



ÖZGEÇMİŞ

Kemal GÜREL ilk, orta ve lise öğrenimini Aydın’ da tamamladı. 2009 yılında girdiği Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi’nden 2014 yılında mezun oldu. 2019 yılında Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı’ nda yüksek lisans eğitimine başladı.

2014 yılından beri Veteriner Hekim olarak özel sektörde çalışmaktadır.

