



**SIĞIR PNÖMONİLERİNDE BOVİNE HERPESVİRUS
TİP 1'İN VARLIĞININ İMMUNOHİSTOKİMYA,
İMMUNOFLORESANS VE ELISA (ENZYME-LINKED
IMMUNOSORBENT ASSAY) YÖNTEMLERİ İLE
ARAŞTIRILMASI VE PATOLOJİK BULGULAR**

Selim ÇOMAKLI

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Yavuz Selim SAĞLAM

Doktora Tezi-2017

**T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SIĞIR PNÖMONİLERİNDE BOVİNE HERPESVİRUS
TİP-1'İN VARLIĞININ İMMUNOHİSTOKİMYA,
İMMUNOFLORESANS VE ELISA (ENZYME-LINKED
IMMUNOSORBENT ASSAY) YÖNTEMLERİ İLE
ARAŞTIRILMASI VE PATOLOJİK BULGULAR**

Selim ÇOMAKLI

Veteriner Patoloji Anabilim Dalı

Doktora Tezi

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Yavuz Selim SAĞLAM

ERZURUM

2017

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER PATOLOJİ ANABİLİM DALI

**SİĞİR PNÖMONİLERİNDE BOVINE HERPESVİRUS TİP-1'İN
VARLIĞININ İMMUNOHİSTOKİMYA, İMMUNOFLORESANS VE
ELISA (ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY)
YÖNTEMLERİ İLE ARAŞTIRILMASI VE PATOLOJİK
BULGULAR**

Selim ÇOMAKLI

Tez Savunma Tarihi : 05.07.2017

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Yavuz Selim SAĞLAM (Atatürk Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Hasan ÖZEN (Kafkas Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Musa KARAMAN (Balıkesir Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Kübra Asena TERİM KAPAKİN (Atatürk Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. Mehmet Özkan TİMURKAN (Atatürk Üniversitesi)

Onay

Bu çalışma yukarıdaki jüri tarafından **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Mehtap TAN
Enstitü Müdürü

Doktora Tezi
ERZURUM - 2017

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	IV
ÖZET.....	V
ABSTRACT.....	VI
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VIII
TABLolar DİZİNİ.....	XI
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Pnömoniler.....	3
2.1.1. Bronkpnömoni.....	4
2.1.2. İntersitisyel Pnömoni.....	6
2.1.3. Embolik Pnömoni.....	7
2.1.4. Granülomatöz Pnömoni.....	7
2.2. Bovine Herpesvirus 1.....	9
2.2.1. Etiyoloji.....	9
2.2.2. Tarihçe.....	10
2.2.3. Epidemiyoloji.....	11
2.2.4. Patogenez.....	12
2.2.5. Latentlik.....	13
2.2.6. Reaktivasyon.....	15
2.2.7. Klinik Bulgular.....	15
2.2.8. Makroskobik Bulgular.....	16
2.2.9. Mikroskobik Bulgular.....	17
2.2.10. Teşhis.....	18
2.2.11. Koruma ve Kontrol.....	18
3. MATERYAL VE METOT.....	20
3.1. Çalışma Materyali.....	20
3.2. Yöntem.....	20
3.2.1. Makroskobik İnceleme.....	20

3.2.2. Mikroskopik İnceleme.....	20
3.2.2.1. Dokuların İşlenmesi.....	20
3.2.2.2. Hematoksilen Eozin Boyama.....	21
3.2.2.3. İmmunohistokimyasal Boyama.....	21
3.2.2.4. İmmunofloresan Boyama.....	22
3.2.3. Antijen ELISA (Enzym-Linked ImmunoSorbent Assay) Testi.....	23
3.2.4. İstatistiksel Analiz.....	24
4. BULGULAR.....	25
4.1. Makroskopik Bulgular.....	25
4.1.1. Bronkopnömoni.....	26
4.1.1.1. Kataral- İrinli Bronkopnömoniler.....	26
4.1.1.2. Fibrinli Bronkopnömoniler.....	27
4.1.2. İntersitisyel Pnömoni.....	28
4.1.3. Embolik Pnömoni.....	29
4.1.4. Granülomatöz Pnömoni.....	29
4.2. Mikroskopik Bulgular.....	29
4.2.1. Bronkopnömoniler.....	30
4.2.1.1. İrinli Bronkopnömoniler.....	30
4.2.1.2. Fibrinli Bronkopnömoniler.....	33
4.2.2. İntersitisyel Pnömoniler.....	36
4.2.3 Embolik Pnömoniler.....	39
4.2.4. Granulomatöz Pnömoniler.....	39
4.3. İmmunohistokimyasal Bulgular.....	41
4.4. İmmunofloresan Boyama Bulguları.....	46
4.5. Antijen ELISA Testi Bulguları.....	51
4.6. İstatistiksel Bulgular.....	54
5. TARTIŞMA.....	64
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	74
KAYNAKLAR.....	75
EKLER.....	83

EK.1. ÖZGEÇMİŞ.....	83
EK.2. ETİK KURUL ONAY FORMU.....	84



TEŞEKKÜR

Bu çalışmada emeği geçen başta danışmanım Prof. Dr. Yavuz Selim SAĞLAM’a teşekkür ederim.

Anabilim dalı öğretim üyeleri Doç. Dr. Kübra Asena TERİM KAPAKİN, Yrd. Doç. Dr. Mustafa ÖZKARACA, Yrd. Doç. Dr. Serkan YILDIRIM ve Yrd. Doç. Dr. Serdar ALTUN’a teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmamda destek ve yardımları bulunan Yrd. Doç. Dr. Mehmet Özkan TİMURKAN ve Prof. Dr. Armağın HAYIRLI’ya şükranlarımı sunarım. Ayrıca, çalışmamda yardımcı olan ve materyal sağlayan Et ve Süt Kurumu ile Özel Oral- Et Kombinası İşletme yöneticilerine teşekkürü bir borç bilirim.

ÖZET

Sığır Pnömonilerinde Bovine Herpesvirus Tip-1 ' in varlığının İmmunohistokimya, İmmunofloresans ve ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) Yöntemleri ile Araştırılması ve Patolojik Bulgular

Amaç: Bu çalışmada Erzurum ilinde faaliyet gösteren mezbahalarda kesimi yapılan sığırlara ait akciğer örneklerinde Bovine Herpesvirus I etkeninin immunohistokimyasal, immunfloresan boyama yöntemleri ve Antijen ELISA testi ile varlığı ve yaygınlığının saptanması amaçlanmıştır. Ayrıca kullanılan bu 3 metodun istatistiksel olarak karşılaştırılması yapılarak laboratuvar ve saha şartlarında kullanılabilirlikleri değerlendirilmiştir.

Materyal ve Metot: Yapılan çalışmada toplam 1023 sığır kesimi izlendi. Makroskobik olarak pnömoni gözlenen 120 adet (%11.73) akciğer toplandı. Toplanan dokuların rutin histopatolojik, immunohistokimyasal ve immunofloresan boyamaları Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim dalı laboratuvarında, Antijen ELISA testi ise Viroloji Anabilim dalı laboratuvarında gerçekleştirildi.

Bulgular: Makroskobik ve mikroskobik incelemeler sonucunda akciğerde gözlenen pnömoniler; bronkopnömoni (Kataral-İrinli, Fibrinli) , intersitisyel pnömoni, embolik pnömoni, granulatöz pnömoniler olarak sınıflandırıldı. Sunulan çalışmada % 6.7 kataral-irinli bronkopnömoniye, % 5 fibrinli bronkopnömoniye, % 84.1 intersitisyel pnömoniye, %4.2 granulatöz pnömoniye rastlanmış, embolik pnömoni ise gözlenmemiştir. Yapılan IHC, IF ve antijen ELISA yöntemlerine göre BoHV-1 pozitifliğine sırasıyla %48.33, %50.83 ve %29.9 oranlarında rastlandı. IHC ve IF yöntemlerinde pozitifliklere çoğunlukla alveolar makrofajlarda, bronş, bronşiyol ve alveol epitel hücrelerinin sitoplazmasında, bronş ve bronşiyol çevresinde, intersitisyel alanda, eksudattaki yangı hücrelerinde rastlanmıştır.

İstatistiksel olarak IHC ve antijen ELISA'nın diagnostik açıdan IF'den farklı olduğu, ancak IHC'nin antijen ELISA'ya kıyasla laboratuvar ve saha şartlarında daha güvenilir bir yöntem olduğu belirlenmiştir.

Sonuç: Elde edilen bulgular değerlendirildiğinde sığır pnömonilerinde BoHV-1'in yaygın bir şekilde gözleendiği, solunum sistemi hastalık kompleksi içinde önemli bir yere sahip olduğu çeşitli teşhis metodları ile ortaya konulmuştur.

Anahtar Kelimeler: Antijen ELISA, BoHV-1, immunohistokimya, immunofloresan, pnömoni,

ABSTRACT

Investigation of Presence of Bovine Herpesvirus Type-1 in Bovine Pneumonia with Immunohistochemistry, Immunofluorescence and ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) Methods and Pathological Findings

Aim: In this study was aimed to determine of the presence and the prevalence of Bovine Herpesvirus I with immunohistochemical, immunofluorescent staining methods and Antigen ELISA test in lung samples of cattle cut in slaughter in Erzurum province. In addition, these three methods were compared statistically and their usability was evaluated in laboratory and on field conditions.

Material and Method: A total of 1023 cattle cuts were observed in this study. Macroscopically, 120 lungs (%11.73) observed pneumonia were collected. Routine histopathological staining, immunohistochemical and immunofluorescent staining of the collected tissues were carried out in Atatürk University Veterinary Faculty Pathology Department. Antigen ELISA test was carried out in Virology laboratory too.

Findings: As a result of macroscopic and microscopic examinations, pneumonia observed in lungs were classified as bronchopneumonia (Catarrhal-Suppurative, Fibrinous), interstitial pneumonia, embolic pneumonia, granulomatous pneumonia. In the present study, 6.7% catarrhal-suppurative bronchopneumonia, 5% fibrinous bronchopneumonia, 84.1% interstitial pneumonia, 4.2% granulomatous pneumonia were encountered, embolic pneumonia was not observed. According to IHC, IF and antigen ELISA methods, BoHV-1 positivity was found in 48.33%, 50.83% and 29.9%, respectively. Pozitivities were mostly encountered in the alveolar macrophages, in the cytoplasm of bronchial, bronchiol and alveolar epithelial cells, around bronchial and bronchiolal, in interstitial area, exudative inflammatory cells in IHC and IF methods.

Statistically, IHC and antigen ELISA were different from IF in terms of diagnosis, but as compared to antigen ELISA , IHC is more reliable method in laboratory and field conditions.

Result: When the findings are evaluated, various diagnostic methods have been shown that BoHV-1 is commonly observed in bovine pneumonia and has an important place in respiratory system disease complex.

Key words: Antigen ELISA, BoHV-1, Immunohistochemistry, Immunofluorescence, Pneumonia

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

- ORF-E:** Açık Okuma Çerçevesi-E
- BALT :** Bronşıyo Alveolar Lenfoid Doku
- BoHV-1:** Bovine Herpesvirus-1
- ELISA:** Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
- HRP:** Horseradish peroxidase
- IBR:** İnfeksiyöz bovine rhinotracheitis
- IHC:** İmmunohistokimya
- IF:** İmmunofloresan
- IPV:** Sığırlarda enfeksiyöz püstüler vulvovaginitis
- IPB:**Enfeksiyöz püstüler balanopostitis
- LR:** Latentlikle ilgili genler
- PBS:** Phosphate buffer saline
- PCR:** Polimeraz zincir reaksiyonu
- ROC:** Receiver Operating Characteristic
- OD:** Optik Dansite

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. Herpesvirusun Yapısı.....	9
Şekil2.2. BoHV-1 enfeksiyonunun epidemiyolojisi. Virusun ana giriş ve bulaşma yolları.....	11
Şekil4.1. Kataral-irinli bronkopnömoni. Kranial lobda apse odağı ve sert kıvamlı odaklar.....	26
Şekil 4.2. Kataral-irinli bronkopnömoni. Kesit yüzeyinde irin içeren odak ve akciğer yüzeyinde milier irin odakları	27
Şekil 4.3. Fibrinli bronkopnömoni. Kırmızı ve gri hepatizasyon alanları, plöra üzerinde fibrin birikimi.....	28
Şekil 4.4. İntersitisyel pnömoni. Kollabe olmamış akciğer görüntüsü	29
Şekil 4.5. İrinli bronkopnömoni. Bronşiyol ve alveol lümenlerinde deskuame epitel hücreleri, yoğun nötrofil lökosit ve makrofajlardan oluşan irinli eksudat ile amfizemli alanlar	29
Şekil 4.6. İrinli nekrotik bronkopnömoni. Bronşiyol lümeninde nekrotik kitle ve alveollerde nötrofil lökositler	31
Şekil 4.7. Nekrotik irinli bronkopnömoni. Nekroz, nötrofil lökositler ve makrofajlardan oluşan yangısal hücre infiltrasyonu.....	32
Şekil 4.8. Apseli bronkopnömoni. Nekroz alanı bu alanın çevresinde nötrofil lökositler ile makrofajlar ve en dışta ise fibröz kapsül	32
Şekil 4.9. Fibrinli bronkopnömoni. Yangısal hiperemi ve kırmızı hepatizasyon alanı.....	34
Şekil 4.10. Fibrinli bronkopnömoni. İnteralveolar septumda fibrin birikimine bağlı meydana gelen kalınlaşma, akciğer parankiminde gri hepatizasyon alanları.....	34
Şekil 4.11. Fibrinli bronkopnömoni. Alveollerin lümenlerinde iğ şeklinde bazofilik lökositler (Oat cell).....	35
Şekil 4.12. Fibrinli bronkopnömoni. Plörada kalınlaşma	35
Şekil 4.13. İntersitisyel pnömoni. İnteralveolar ve interlobuler bölgede kalınlaşma	36
Şekil 4.14. İntersitisyel pnömoni. Peribronşiyal lenfoid hiperplazi ve fibromusküler hipertrofi	37
Şekil4.15. İntersitisyel pnömoni. Peribronşiyal lenfoid hiperplazi. İnteralveoler duvarda kalınlaşma ve amfizem.....	37

Şekil 4.16. İntersitisyel pnömoni. Sinsityal tip dev hücreleri, lenfosit, makrofaj ve plazma hücrelerinden oluşan yangısal hücre infiltrasyonu.	38
Şekil 4.17. İntersitisyel pnömoni. Sinsityal tip dev hücresi	38
Şekil 4.18. Granülomatöz pnömoni. Kazeifikasyon nekrozu, Langhans tipi dev hücreleri, makrofaj ve az sayıda lenfosit infiltrasyonu.	40
Şekil 4.19. Granülomatöz pnömoni. Kazeifikasyon nekrozu ve kalsifikasyon odağı ile birlikte çevrede mononükleer hücre infiltrasyonları.....	40
Şekil 4.20. Bronş epitel ve BAL dokusunda BoHV-1 immunpozitifliği	42
Şekil 4.21. Bronşiyol epitel ve peribronşiyal lenfoid dokuda BoHV-1 immunpozitifliği	43
Şekil 4.22. İnteralveolar bölgede yangı hücrelerinin sitoplazmasındaki immunpozitiflik.....	43
Şekil 4.23. İnteralveolar septumdaki intrasitoplazmik yerleşimli BoHV-1 immunpozitifliği ...	44
Şekil 4.24. Bronşiyol epitel ve lümende deskuame epitel ve makrofajlarda BoHV-1 immunpozitifliği.....	44
Şekil 4.25. Bronş epitel ve lümendeki eksudatta bulunan hücrelerde immunpozitiflik.....	45
Şekil 4.26. İntersitisyel alandaki immunpozitiflik	45
Şekil 4.27. Peribronşiyal bölgede ve plörada yangı hücrelerinde immunpozitiflik.....	46
Şekil 4.28. Alveolar makrofajlarda immunpozitiflikler	47
Şekil 4.29. Bronş epitelindeki immunpozitiflikler	48
Şekil 4.30. Bronşiyol çevresindeki yangı hücrelerinde immunpozitiflikler	48
Şekil 4.31. Bronş çevresinde bulunan makrofajlarda immunpozitiflikler	49
Şekil 4.32. İntersitisyel alanda immunpozitiflikler	49
Şekil 4.33. Damar çevresinde immunpozitiflikler	50
Şekil 4.34. Bronşiyol lümenindeki eksudatta ve çevresinde immunpozitiflik	50
Şekil 4.35. İmmunpozitifliklerin 2.5 D boyutlu görüntüsü. Eksudat ve çevresindeki pozitifliği.....	51
Şekil 4.36. 1. ELISA platedeki negatif ve pozitif sonuçlar.....	52
Şekil 4.37. 2. Plate'deki örneklerin pozitifliğini gösteren renk değişikliği.....	54
Şekil 4.38. İmmunofloresan testine göre hasta ve sağlıklı hayvanların dağılımı.....	55
Şekil 4.39. İmmunohistokimyasal boyama yöntemine göre hasta ve sağlıklı hayvanların dağılımı.....	55
Şekil 4.40. ELISA testine göre hasta hayvanlar ve sağlıklı hayvanlar arasındaki dağılım.....	56
Şekil 4.41. IHC'nin IF testine göre sensitivitesi ve spesifitesi.....	58
Şekil 4.42. ELISA'nın sensitivitesi ve spesifitesi.....	59
Şekil 4.43. IHC ve ELISA testinin IF'ye göre sensitivitesi ve spesifikliği.....	60

Şekil 4.44. IHC'nin sağlıklı ve hasta hayvanları belirlemedeki hata payı	61
Şekil 4.45. ELISA'nın sağlıklı ve hasta hayvanları belirlemedeki hata payı.....	62
Şekil 4.46. ELISA yönteminin IHC yöntemine göre sağlıklı ve hasta hayvanları belirlemedeki hata payı.....	63



TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No</u>	<u>Sayfa No</u>
Tablo 4.1. Yıllara göre incelenen akciğer sayısı ve pnömoni gözlenen akciğer sayısı.....	25
Tablo 4.2. Makroskopik olarak pnömoni çeşitleri ve yüzde oranları.....	25
Tablo 4.3. Mikroskopik olarak pnömoni çeşitleri ve yüzde oranları.....	30
Tablo 4.4. Pnömoni çeşitleri içerisinde BoHV-1 immunpozitiflikleri.....	41
Tablo 4.5. Pnömoni çeşitleri içerisinde BoHV-1 immunofloresan pozitiflikleri.....	46
Tablo 4.6. 1. ELISA testi uygulanan akciğer örnekleri.....	51
Tablo 4.7. 1. ELISA sonuçları.....	52
Tablo 4.8. 2. ELISA testi uygulanan akciğer örnekleri.....	53
Tablo 4.9. 2. Plate'deki Akciğer Örneklerinin ELISA sonuçları.....	53
Tablo 4.10. IHC testinin IF testine göre spesifik ve sensitivitesi.....	56
Tablo 4.11. ELISA'nın sensitivitesi ve spesifitesi.....	58
Tablo 4.12. Diğer testlerin IF'ye göre duyarlılık ve öznelliklerinin karşılaştırılması.....	59
Tablo 4.13. Ki-kare Testi ile testlerin altın standarttan farklılığının önemi.....	60
Tablo 4.14. Ki-kare Testi ile ELISA testinin altın standarttan farklılığının önemi.....	61
Tablo 4.15. Ki-kare Testi ile ELISA ve IHC testlerinin farklılığının önemi.....	63

1. GİRİŞ

Sığırlarda solunum sistemi hastalık kompleksi, dünyadaki tüm sığır popülasyonunu etkileyen önemli sağlık problemlerinden biridir.¹⁻⁵ Bu hastalık kompleksi sığırlarda önemli oranda et ve süt üretiminde kayıplara neden olmaktadır. Tedavi ve önlemeye yönelik yapılan masraflara ek olarak çoğu zaman sürüde ölümlerin görülmesi de diğer ekonomik kayıpları oluşturmaktadır.^{3, 4, 6-9} Sığırlarda solunum sistemi hastalık kompleksi stres, konakçının savunma sistemi, beslenme ile hastalığı yapıcı etkenin patojenitesi ve patojene maruz kalma olasılığını artıran çevresel faktörlere bağlı olarak ortaya çıkmaktadır.¹⁰⁻¹³ Bu kompleksin oluşmasında primer olarak solunum sisteminde yıkıma yol açan viral etkenler, sekonder olarak ise bakteriyel etkenler ile mikoplazmal enfeksiyonlar rol oynamaktadır.^{1, 3, 4, 13-15} Özellikle solunum sistemi hastalıkları buzağılar üzerinde etkili olmaktadır. Yapılan araştırmalarda solunum sistemi hastalıklarının süt emen buzağılarda % 24.5, sütten kesilmiş buzağılarda ise % 44.8 oranında ölüme neden olduğu bildirilmektedir.¹¹

Sığırlarda solunum sisteminde hastalık oluşturan viral etkenler *Bovine Herpesvirus-1 (BoHV-1)*, *Bovine Coronavirus (BoCV)*, *Bovine Respiratory Syncytial Virus (BRSV)*, *Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV)*, *Parainfluenza-3 Virus (PI3V)*, *Bovine Adenovirus*, *Bovine Enterovirus-1, -2, -3*, *Bovine Rhinovirus -1 ve -2* dir.^{14, 16, 17} Sığırların solunum sistemi hastalıklarında, akciğerlerinden birçok bakteri türü de izole edilmektedir. Besi sığırları ve erişkin sığırlarda *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* en önemli bakteriyel patojen etken olarak bilinmektedir. *Pasteurella multocida* ve *Hemophilus somnus* 'un ise bu etkenin veya viral etkenlerin oluşturduğu enfeksiyonlara eşlik ettiği kaydedilmektedir. Genç hayvanlarda bu etkenlerin hepsi pnömoniye neden olsa da özellikle *Mycoplasma* spp.'nin daha ciddi enfeksiyon oluşturduğu bildirilmektedir.^{3, 11, 15, 17, 18} Pnömoni akciğerlerden *Streptococcus* spp., *Staphylococcus*

spp., *Pseudomonas aeruginosa* ve *Chlamydia* spp. gibi diğer bakteri türlerinin de daha az izole edildiği kaydedilmektedir.^{11, 17-20}

Bovine herpesvirus-1 etkeni sığırlarda enfeksiyöz sığır rinotrakeitis gibi solunum sistemi enfeksiyonu, Pustuler vulvovajinitis - balanopostitis gibi genital hastalıkların yanı sıra konjunktivitis, ensefalitis, abort, fötusta multisistemik enfeksiyonlara da neden olmaktadır.^{3, 4, 16, 21-24} Etkenin morbidite oranı yüksek, mortalite oranı ise düşüktür. Genç hayvanlarda generalize enfeksiyon oluşturan BoHV-1 etkeni, yetişkinlerde çoğunlukla subklinik enfeksiyon şeklinde seyretmektedir. BoHV-1, Dünya’da ve Türkiye’de oldukça yaygın bir enfeksiyon oluşturma potansiyeline sahiptir. Dünya’da seroprevalans üzerine yapılan çalışmalarda Afrika’da % 14-86^{24, 25}, Çin’de % 36²⁶, İngiltere’de % 43²⁷ oranında pozitifliğe rastlanmıştır. Türkiye’de BoHV-1’in yaygınlığı üzerine yapılan çalışmalarda %20 - %74 arasında değişen seropozitiflik gözlenmiştir.²⁸⁻³³

Bu çalışmada, Erzurum ilinde sığır pnömonilerinin insidansı’nın belirlenmesi ve BoHV-1’ in varlığının immunohistokimya (IHC), immunofloresan (IF) ve Antijen Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) yöntemleriyle tespiti amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Pnömoniler

Pnömoni, akciğerlerin yangısıdır.^{4, 34, 35} Bu yangı tablosuna neden olan virüs, bakteri, parazit gibi enfeksiyöz etkenler ile yakıcı-irritan gazlar gibi non-enfeksiyöz etkenler akciğerlere aerojen veya hematogen yolla ulaşırlar.^{3, 4, 35} Burun boşluğunun anatomik yapısı, mukus tabakası, fagositik savunma mekanizmaları gibi solunum sisteminin savunma sistemi tarafından bu etkenlerin elimine edilerek akciğere ulaşması ya da akciğerde kalması engellenerek pnömoni oluşumu önlenir.^{3, 4, 35} Zararlı ajan alveollere ulaşmış ise farklı bir savunma mekanizması faaliyete geçer. Alveoller silyumlu ve mukus üreten hücrelerden yoksun olduğu için akciğere ulaşan etkenlere karşı yanıt kandan gelen monositler ve intersitisyumdaki alveolar makrofajlar tarafından sağlanır.^{4, 35} Akciğerde makrofajlara dönüşen monositler ve alveolar makrofajlar tarafından bakteriler, parazitler ve diğer yabancı maddeler lizozomlardaki enzimler ile fagosit edilmeye çalışılır. Ancak bazı hücre içi yerleşen bakterilere (*Mycobacterium tuberculosis*, *Listeria monocytogenes*, *Brucella abortus*, bazı *Salmonella* türleri) karşı bu sistem etkili değildir.^{3, 4, 35}

Pnömonilerin sınıflandırılması veteriner patolojide tartışılan konulardan biridir. Bu yaklaşımlara bakıldığında bazı araştırmacılar yangının süresine göre (akut, subakut, kronik), bazıları yangının tipine göre eksudatif (kataral, fibrinli, suppuratif, hemorajik) ve proliferatif pnömoniler olarak, bazıları ise yangının yayılış yerine (bronkopnömoni, lobar pnömoni ve intersitisyel pnömoni) göre sınıflandırma yapmışlardır.^{4, 35, 36} Yine diğer bir yaklaşımda ise evcil hayvanlarda pnömoniler eksudat, dağılım, görünüm ve yapısına göre morfolojik olarak 4'e ayrılmıştır. Bunlar bronkopnömoni, intersitisyel pnömoni, embolik pnömoni ve granülatöz pnömoni olarak sınıflandırılmıştır.⁴

2.1.1. Bronkopnömoni

Bronkopnömoniyeye neden olan etiyoloji kompleks olup bazı olgularda viral bir hastalığın primer nedeni olurken bazı olgularda doğrudan bakteriyel veya mantar etkenleri de hastalık oluşturabilmektedir.^{3, 37} Evcil hayvanlarda bronkopnömoniler çoğunlukla akciğerlerin kraniyoventral/medial loblarında şekillenir.^{3, 4, 38} Bu tip pnömonilerin akciğerin kraniyoventral bölgelerini tercih etmesine neden olarak yer çekiminin etkisine bağlı eksudatın ventral bölgede birikmesi ile bu bölgede etkenlerin daha fazla birikimi, azalan perfüzyon, hava kanallarının kısılılığı veya azlığı neden olarak gösterilmektedir.^{3, 4, 35}

Bronkopnömonide eksudatta nötrofil yaygınsa irinli, fibrinden zenginse fibrinöz bronkopnömoni olarak isimlendirme yapılmaktadır.⁴ İrinli bronkopnömoniler akciğerin kraniyoventral bölgesinde konsolidasyonla seyreden, piyojenik mikroorganizmalar tarafından meydana getirilen ve akciğer parankiminde yoğun irinleşme ile karakterize olan pnömonilerdir.^{3, 4, 35, 37} Makroskopik olarak sağlıklı ve enfeksiyondan etkilenen bölgeler birbiriyle karıştığından satranç tahtası görünümü oluşur.⁴ Eksudat grimsi-sarı renkte olup yağlı bir görünüme sahiptir.³⁵ Mikroskopik olarak bronş, bronşiyol ve alveol lümenleri yoğun nötrofil lökosit, epitel döküntüsü ve alveolar makrofajlardan oluşan bir eksudat ile doludur.^{3, 4, 35}

Fibrinöz bronkopnömoniler, eksudat içinde bolca fibrin bulunması ile irinli bronkopnömonilerden ayrılır.⁴ Bu tip pnömoniler genellikle kraniyoventral yerleşimli olup akciğer lobunun tamamını veya büyük bir kısmı ile birlikte plörayı da etkilemiştir.^{4, 38} Bundan dolayı plöropnömoni adı da verilmektedir.⁴ Bazı hastalıklarda örn: *Pasteurella* spp. gibi gram negatif bakterilerin neden olduğu bronkopnömoni olgularında etkenin toksinine bağlı olarak akciğerde nekrozda şekillenebilmektedir.³ Fibrinli bronkopnömoniler 4 döneme ayrılır. Bunlar yangısal hiperemi, kırmızı ve gri

hepatizasyon ve lizis dönemleridir. Sığırlarda lizis dönemi şekillenmediğinden hastalık organizasyon ile sonuçlanır.³⁷ İlk dönem şiddetli konjesyon ve hemoraji ile karakterize yangısal hiperemi dönemi olup akciğerin etkilenen bölümleri volümünöz, koyu kırmızı ve nispeten sert bir yapıya sahip olup kesit yüzünden gri kırmızı renkte sıvı sızar.^{4, 37} Birkaç saat sonra fibrinin plörada toplanması sonucu buzlu cam görünümünde kırmızı koyu yapılar ile birlikte göğüs boşluğunda sarı renkli sıvı birikir.⁴ Kesit yüzeyi düzdür ve konsolide alanlardan gri kırmızı renkli sıvı sızar.^{3, 37} Mikroskopik olarak akciğer oldukça dilate ve kanla doludur. Alveollerde tek tük eritrosit ve dökülmüş epitel hücreleri gözlenir.³⁷ Kırmızı hepatizasyon döneminde akciğer lobu volümünöz, koyu kırmızı ve sert yapıda, kesit yüzeyi kuru, gri-kahve renkte, ince granüllü yapıdadır.^{3, 35, 37} Gri hepatizasyon döneminde akciğer yine hacimli, sert kıvamlı ve kesit yüzü kurudur. Etkilenen bölgede lökositlerin artmasına ve eksudatın alveol kapıllarına yaptığı basınç sonucu akciğerler gri renkte görülür. Mikroskopik olarak alveoller lökosit ve dökülmüş alveol epitelleri ile doludur.⁴ Peribronşiyal ve interlobular konnektif doku yangısal ödemden dolayı genişlemiş ve yoğun fibrin içermektedir.^{37, 38} Lizis dönemi evcil hayvanlarda seyrek görülmektedir. Mikroskopik olarak lizis döneminde lökositlerin proteolitik enzim aktivitesi ile fibrin parçalanır ve lenf damarları ile uzaklaştırılır.⁴ Sığırlarda bu dönemin yerine daha çok organizasyon şekillenir.^{4, 35} Organizasyon döneminde akciğer et kıvamı halinde gözlenir. Fibrinli içerik proteolitik enzimlerle erilemez ve lenf damarlarındaki meydana gelen trombozlardan dolayı rezorbe edilemez. Bundan dolayı alveollerde bu eksudat hiyalinleşir ve fibrozis ile organizasyon meydana gelir.^{4, 35}

2.1.2. İntersitisyel Pnömoni

Bu tip pnömonilerin genel makroskopik incelemede teşhisi zordur. En önemli mikroskopik bulgusu interalveolar septumlarda kalınlaşma ve alveol lümenlerinin boş olmasıdır. Ayrıca hiyalin membran oluşumu, tip II pnömosit proliferasyonu ve intersitisyel fibrozis şekillenebilir.^{3, 4} İntersitisyel pnömonilerin patogenezi karışık olup alveolar epitelin direk aerojen yolla zarar görmesi ya da alveolar kapillar endotelin veya alveolar bazal membranın hematojen yolla etkilenmesi hastalık oluşturabilmektedir. Toksik gazların (amonyak) solunum yolu ile alınması ve pnömotropik viruslar (influenza, enfeksiyöz sığır rinotrakeitis (IBR), köpek gençlik hastalığı) hastalığın oluşmasında etkili olan en önemli birkaç faktörden biridir. Ayrıca septisemiler sırasında vasküler endotelin zedelenmesi, mikroembolizmdeki yaygın damariçi pıhtılaşmalar, paraziter larva göçleri (ascaris suum), 3 metilindol gibi toksik metabolitlerin sindirim sisteminden absorbe edilmesi, alveolar kapillardan serbest radikallerin salınımı ve endoteliotropik viral enfeksiyonlar (köpek gençlik hastalığı, klasik domuz ateşli hastalığı) hastalığın patogenezinde rol oynamaktadır.⁴

Akut veya kronik intersitisyel pnömonide makroskopik olarak akciğerin tamamında veya bazen dorsokaudal bölgesinde şekillenmektedir.^{3, 4, 35, 39} Göğüs boşluğu açıldığında akciğerler sönmemiş, şişkin, solgun renkte, ödemli, lastik ya da süngerimsi kıvamdadır.^{3, 38, 39} Çoğu olguda akciğerin plörası üzerinde kaburga izlerine rastlanır ve sekonder etkenlerle kontamine olmadıkça hava yollarında eksudat bulunmaz.³

Mikroskopik incelemede; akut eksudatif aşamada alveollerde proteinden zengin ödem sıvısı, fibrin eksudasyonu, amfizem, alveolar duvarda konjesyon, intersitisyumda mononükleer hücre infiltrasyonu ve tip II pnömositlerde hiperplazi gözlenir.^{3, 4, 38, 39} Fakat en karakteristik bulgu hiyalin membran varlığıdır.^{3, 39} Bronşların çevresi ise mononükleer hücrelerin yoğun olduğu hücrelerle bir manşet gibi çevrilidir. Bu yapı peribronşiyolar

lenfoid hiperplazi olarak adlandırılır.^{3, 4, 35} Bazı viral ve mikoplazma enfeksiyonlarında yangı intersitisyel bölgeden bronş, bronşiyol ve alveollere yayılabilmektedir. Bu tip pnömoniler hem bronkopnömoni hem de intersitisyel pnömoninin makroskopik ve mikroskopik bulgularını taşıdıkları için bronkointersitisyel pnömoni olarak da adlandırılmaktadır.^{4, 38}

2.1.3. Embolik Pnömoni

Embolik pnömoni, pnömonilerin özel bir tipi olup çoğunlukla dolaşımdaki bakteri ya da parazitler tarafından meydana getirilir.^{3, 4, 35} Embolik pnömoni bütün akciğer loplarna ya da akciğerin herhangi bir lobunun tamamına gelişigüzel dağılan tekli ya da çoklu lezyonlarla karakterizedir.^{4, 39} Bu lezyonlar 1-10 mm boyutunda etrafı kırmızı hemorajik bir kuşakla çevrili beyaz odaklar şeklindedir. Emboli çok büyük sayılara ve alana ulaşmadıkça fibrinolizis ile çözünür ve uzaklaştırılır.⁴ Eğer büyük bir alana etki ederse solunum yetmezliğine bağlı ölümlere yol açabilir.³⁹ Embolik pnömoni ile karşılaşıldığında septik embolinin kaynağının belirlenmesi için dikkatli postmortem değerlendirmeye ihtiyaç duyulmaktadır.⁴ Sığırlarda en yaygın nedeni hepatik apselerin rupturu sonucu şekillenen vena kava kaudalisn septik trombozudur.^{3, 4, 35} Yine hayvanlardaki omfaloflebitler, kronik bakteriyel deri ve ayak hastalıkları, enfekte juguler kateter uygulamaları embolik pnömoniye neden olabilir.⁴

2.1.4. Granülomatöz Pnömoni

Granülomatöz pnömoni makrofajlar tarafından fagositoz ile elimine edilemeyen patojenler, patojenlerin ürünleri ve yabancı partiküllere karşı oluşan pnömonilerin özel bir şeklidir.^{4, 40} *Histoplasmosis* (*Histoplasma capsulatum*), *Blastomycosis* (*Blastomyces dermatitidis*), *Coccidioidomycosis* (*Coccidioides immitis*), *Cryptococcosis* (*Cryptococcus neoformans*) gibi mantar enfeksiyonları ile *Mycobacterium* spp., *Actinobacillus*, *Actinomyces* spp. ve *Nocardia* spp. bakterileri bu tip pnömonilere neden

olmaktadır.^{3, 4, 35, 40} Yangıda makrofajla birlikte, lenfosit, az sayıda nötrofil ve bazen dev hücrelerine rastlanır.⁴ Granülamatöz pnömonilerde akciğer parankimindeki travma ya da yabancı cisim lokal bir yıkım şekillendirerek sistemik immun yetersizliğe sebep olabilir.^{3,}

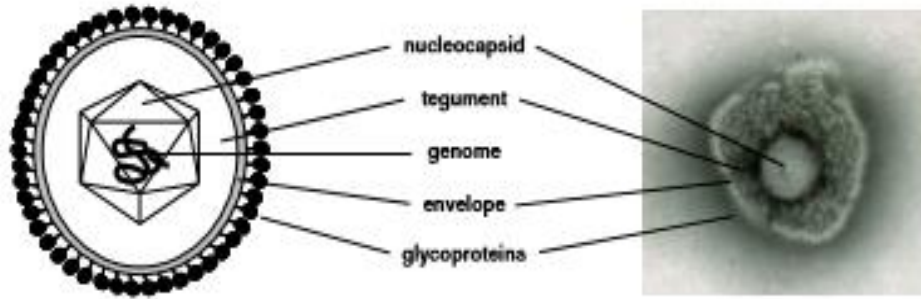
35

Granülamatöz pnömoniler kazeöz ya da kazeöz olmayan lezyonların akciğere yayılmasıyla karakterizedir. Palpasyonda iyi sınırlandırılmış, sert kıvamlı, değişik büyüklükte kalsifikasyon odakları bulunabilir. Postpartum incelemede neoplazmalar ile karıştırılabilir. Mikroskopik incelemede akciğerdeki granulomlarda ortada nekrotik alan ve bu alanın çevresinin makrofajlar, dev hücreleri, en dışta ise lenfositler, plazma hücreleri, bağ doku ile kuşatıldığı görülür.⁴

2.2. Bovine Herpesvirus I

2.2.1. Etiyoloji

Bovine Herpesvirus-1, *Herpesviridae* familyası, *Alphaherpesvirinae* alt familyasındaki Varicellovirus genusuna ait bir virüstür.⁴¹⁻⁴³ Etken yaklaşık 70 protein tarafından kodlanan çift zincirli DNA'dan oluşan viral bir genoma sahiptir.²² BoHV-1 genomu bir kapsid, bir tegument ve bir zarla çevrilidir. Tegument en kompleks yapıdır ve yapısı hala anlaşılamamıştır. Tegumentteki proteinler enfeksiyon sırasında hücre içi ile ilk temasa giren ve ilk salınan proteinlerdir. Viral glikoproteinler virionun üzerindeki zarla yerleşiktir. Bu proteinler patogeneze ve bağışıklıkta önemli rol oynamaktadır.⁴⁴



Şekil.1. Herpesvirusun Yapısı ⁴⁵

Genomik analizler ve viral peptid yapıları baz alındığı zaman BoHV-1 birkaç alt tipe ayrılmaktadır.²⁴ Bunlar; BoHV-1.1, BoHV-1.2 ve BoHV-1.3'dür. BoHV-1.1 solunum sistemindeki enfeksiyonlardan, BoHV-1.2 genital enfeksiyonlardan sorumludur.^{22, 24, 46} BoHV-1.3 ise günümüzde BoHV-5 olarak bilinir ve genellikle 8 aylık sığırlarda nonpurulent meningoensefalitise seyreden bir hastalık tablosu oluşturur.^{46, 47} BoHV-1.2, BoHV-1.2a ve BoHV-1.2b alt tiplerine ayrılır. BoHV-1.1 ve BoHV-1.2a en patojenik türler olarak kabul edilip sırasıyla solunum enfeksiyonlarına ve abortlara yol

açmaktadırlar. BoHV-1.2b ise diğer türlere göre daha hafif bir patogeneze sahip olup dişi sığırlarda enfeksiyöz püstüler vulvovaginitis (IPV), erkek sığırlarda ise enfeksiyöz püstüler balanopostitise (IPB) neden olur.^{48, 49}

BoHV-1 çevresel şartlara oldukça dirençlidir. Virusun inaktivasyonu sıcaklık, pH, ışık, nem gibi çeşitli faktörlere bağlıdır. Etken 4 °C’de 1 ay boyunca aktif kalabilir. BoHV-1 56 °C’de 21 dakika, 37 °C’de 10 gün, 22 °C’de 50 gün içerisinde inaktive olmaktadır.⁵⁰ Yemlerde 30 günden daha fazla hayatta kalabilmektedir. Virus zarflı bir yapıya sahip olduğu için kloroform, aseton ve eter gibi organik çözücülere duyarlıdır. Virüs %5 lik formalin solüsyonunda 1 dakikada inaktive olmaktadır.⁵¹

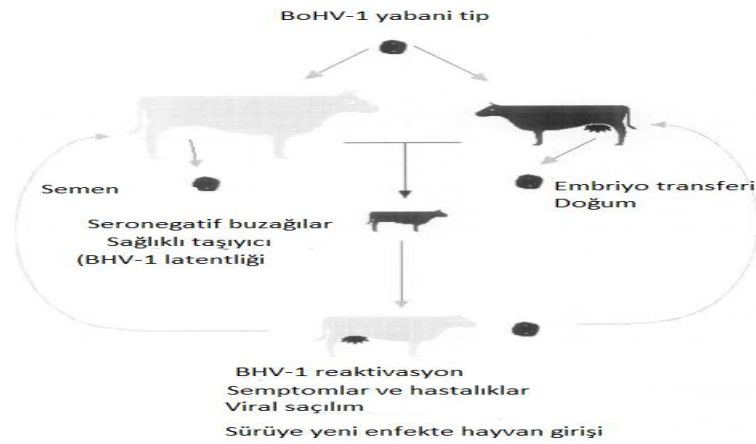
2.2.2. Tarihçe

BoHV-1 tarafından oluşturulan hastalıklar ilk olarak 1841 yılında Almanya’da Büchner ve Trommsdorf tarafından ‘Bläschenausschlag’ (koital veziküler ekzantem) olarak tanımlanmıştır. Reisinger ve Reimann 1928 yılında hastalığın viral bir etiyojisi olduğunu bildirmişlerdir.^{22, 24, 52} Hastalık 1950’ye kadar dişi sığır ve düvelerde enfeksiyöz püstüler vulvovajinitis, boğalarda ise enfeksiyöz püstüler balanopostitis olarak tanımlanmıştır. Ancak 1954 yılında ABD’nin California bölgesinde süt sığırlarında yüksek ateşle seyreden (38.9-42.2 °C), 24-48 saat içerisinde süte azalma, burundan önce muköz daha sonra mukopurulent bir akıntının geldiği yeni bir klinik durum gözlenmiştir. Etkilenen hayvanlarda %3’lük bir mortalite ve %7.6’lık bir morbidite oranı saptanmış, ölen hayvanların postmortem incelenmesinde şiddetli hemorajik trakeitis ve bronşitis gözlenmiştir. Bu durumun viral bir etiyojisi olduğu düşünülerek rapor yazılmıştır. Bu rapor günümüzde de IBR olarak adlandırılan hastalığın ilk bildirisi olarak kabul edilmektedir.⁵²

2.2.3. Epidemiyoloji

Bovine Herpesvirus-1 tüm dünyadaki sığır popülasyonunu etkilemektedir. Hastalık Avustralya, Yeni Zelanda, Kanada, ABD, Zaire, İtalya, Belçika, Hindistan ve Türkiye’de yüksek prevalans oranlarında seyretmektedir.^{29, 53-57} Buna karşın bazı Avrupa ülkelerinde hastalıkla mücadele için yapılan eradikasyon programlarının başarıya ulaşması sonucu Avusturya, Danimarka, Finlandiya, İsveç ve İsviçre gibi ülkeler hastalıktan arı ülkeler olarak adlandırılmaktadır.^{44, 53}

BoHV-1 ya primer enfeksiyonun akut aşamasındaki hayvanların ya da latent enfekte hayvanların sürüye katılması ile sağlıklı hayvanlara bulaşır.⁵⁸ Enfeksiyon enfekte boğaların semeni veya taşıyıcı hayvanların enfekte embriyolarından bulaşabilir. Virüs sürüye girdikten kısa bir süre sonra enfekte hayvanların solunum, göz, burun akıntıları ve genital akıntılar ile hayvanlar arasında bulaşmaya neden olmaktadır. Enfeksiyonun yayılmasında kontamine materyal ile yetiştirme bölgesine giren insanlar indirekt bulaşma kaynağı olarak rol oynamaktadır.^{21, 53, 58, 59}



Şekil.2.BoHV-1’in ana giriş ve bulaşma yolları⁵⁸

Hayvanlarda yaşın artması BoHV-1 seropozitifliği için önemli bir risk faktörüdür.⁶⁰⁻⁶⁴ Enfeksiyonun buzağılarda düşük bir prevalansı olduğu söylenmesine rağmen, 24 aylıktan küçük hayvanlar arasında enfeksiyonun prevalansının daha yüksek olduğu da bildirilmektedir.^{27, 65, 66} Erkek sığırlarda dişi sığırlara göre daha fazla seropozitiflik gözlendiği kaydedilmektedir. Bu sonuç da cinsiyetin önemli bir risk faktörü olduğunu ortaya koymaktadır.⁶²

Koyun ve keçiler enfeksiyonun yayılmasında önemli bir faktördür. Keilerdeki Caprine Herpesvirus-1 (CapHV-1) sığırlardaki BoHV-1 ile antijenik olarak yakın bir ilişiye sahip olup her iki virüs sığır ve keçilerde enfeksiyon oluşturabilme yeteneğine sahiptir.^{21, 67}

2.2.4. Patogenez

Enfeksiyonun ana kaynağını nasal eksudat, öksürük damlacıkları, göz yaşi akıntıları, genital sekresyonlar, semen, yemler, ftal sıvı ve dokular oluşturmaktadır.⁴⁴ BoHV-1.1 ile enfekte hayvanlar BHV-1.2b ile enfekte hayvanlardan daha yüksek titrelerde (10-100 kat) nasal sıvı oluşturup enfeksiyonun bulaşmasına aracılık etmektedir.⁴⁴ Etken vücuda burun boşluğu, orofarinks, göz ve genital mukozadan girmektedir.⁵⁸

Virusun hücreye girişi hücresel reseptörler ve viral zarfdaki yapısal proteinler arasındaki ilişi ile gerçekleşir. İlk olarak hücre yüzeyindeki heparin benzeri yapılara virüs glikoprotein B ve C ile düşük bir affinitede bağlanır, daha sonra virusun gD bölgesi ile hücresel reseptör nectin-1 ile yüksek/kararlı olarak bağlanır. En sonunda viral zarfdaki gB, gD, gH ve gI bölgeleri hücre ile tam bir füzyon sağlar.⁶⁸ Hedef epitel hücreye penetre olduktan sonra litik replikasyon aşaması başlar. Bu durum viral genlerin karşılıklı olarak sıralanması, yeni bir virüs projeni üretimine ve hücre ölümüne yol açmaktadır. BoHV-1' in sitopatik etkisi hücrede balonumsu dejenerasyon ve intranükleer inkluzyon

cisimciklerinin artması ile oluşur.²² Doğrudan sitopatik etki sonucu, BoHV-1 yıkımlanan bölgelere yeni epitel hücrelerinin göçünü önleyerek solunum yolu epitelinin yenilenmesini azaltmaktadır.⁶⁹ Yeni oluşan projen virüs yüksek titrelerde burun akıntısı ile saçılır ve sürüdeki diğer hayvanların kısa sürede enfeksiyona yakalanmasına neden olur.²² Virüsün yayılımı 3 şekilde olmaktadır;⁷⁰

- 1) Lokal Yayılma
- 2) Viremi ile sistemik yayılma
- 3) Nöroinvazyon yolu ile yayılma (Latentlik)

Lokal yayılda yeni BoHV-1 generasyonunun enfekte mukozadan yayılımı 2 şekilde olmaktadır. İlkinde hücre dışı ortamda bulunan virusun zarf yapısı ve duyarlı hücrenin reseptörlerinin bağlantısı ile yayılma olurken, diğer yayılda ise virüs partikülleri doğrudan enfekte hücrelerden enfekte olmayan komşu hücrelere geçerek olur.²²

Viremi ile yayılda ise etken çoğu doku ve organlarda enfeksiyon oluşturabilmektedir.⁵⁸ Ancak bu yol ender gözlenmektedir. BoHV-1'in *in vitro* uygulamalarında etkenin monositleri enfekte edebildiği ancak virüs replikasyonunun ve salınımının sınırlı olduğu gözlenmiştir.⁴⁴

Herpesvirüsler ilk girdiği bölgedeki replikasyonun ardından lokal sinir hücrelerindeki aksonlara yerleşebilmektedir. Daha sonra intra-aksonal yol ile virüs bölgesel ganglionlardaki nöronlara ulaşarak bu bölgelerde latentlik oluşturabilir.⁷⁰

2.2.5. Latentlik

BoHV-1 virusun bir saha izolatu ya da zayıflatılmış virüs aşısı ile üst solunum sistemi ve göz mukozasında replikasyonu sonucu oluşan ilk enfeksiyon sonrasında sinir sistemine ait bazı ganglionlarda latent olarak kalabilmektedir.^{22, 24, 44, 71} BoHV-1

tarafından oluşan solunum enfeksiyonunda trigeminal ganglionlar dahil birinci derecede nöronlar etkilenir.⁷² Viral genomik DNA'ya IBR enfeksiyonu sonrası 1-6 gün içerisinde trigeminal sinirlerin sensory ganglionlarında, IPV/IPB gibi genital enfeksiyonlardan sonra ise sakral spinal ganglionlarda rastlanmaktadır.^{24, 44} Latentliğin ana merkezi bu ganglionik nöronlar olmasına rağmen faringeal tonsillerin germinal hücrelerinde de rastlanmaktadır.^{22, 71} Latentliğe ayrıca periferik kanda ve lenf düğümlerinde de rastlanılmaktadır.²⁴

Zayıflatılmış aşı zincirleri vücutta latent olarak kalabilir ve latent enfeksiyon oluşumuna karşı bir koruyuculuk sağlamaz.⁷³ Canlı aşı da hayvanlarda latent enfeksiyonlara neden olmaktadır. Genç sığırlar, maternal antikorların varlığında latent enfeksiyona yakalanmakta ve enfeksiyona bağlı antikor yanıtı göstermektedirler.⁷⁴ Kolostrumdaki BoHV-1 antikorları buzağılarda başlangıçta virüs replikasyonunu önleyemez ve latentlik kolostral bağışıklığın bitmesini takiben oluşur. Bu durumdaki buzağılar seronegatifdir.²⁴

Akut enfeksiyon sonrası trigeminal ganglionlardaki hücre aracılıklı bağışıklık, nöronal faktör, latentlikle ilgili genler (LR) ve Açık Okuma Çerçevesi-E (ORF-E) gibi bazı faktörler latentliğin başlamasına yardımcı olmaktadır.⁷⁵ LR, virüsle enfekte hücrelerde apoptozisi inhibe ederek latentliği uyarmaktadır. ORF-E enfeksiyon sonrası nöronal fonksiyonların tekrar eski durumunu almasında önemli rol oynamaktadır.⁷⁶ Nöronal faktörler ise enfeksiyon oluşumunu ve trigeminal ganglionlardaki hücre aracılı immun yanıtı önler.⁷⁷

Hayvanlarda latent enfeksiyon enfekte virusun izole edilememesi ve viral antijenlerin teşhis yöntemleri ile belirlenememesi ile karakterizedir.⁷⁰ Latent olan hayvanlarda çeşitli faktörlere bağlı olarak gelişen reaktivasyon ile etkenin tekrar saçılma

uğraması hastalığın yayılmasında potansiyel bir tehlike oluşturmakla birlikte hastalığın kontrol ve eradikasyonunda önemli derecede güçlükler neden olmaktadır.⁷⁸

2.2.6. Reaktivasyon

Reaktivasyon gebelik, laktasyon gibi doğal stres faktörleri ile taşıma, kortikosteroid uygulanması gibi faktörlere bağlı olarak oluşur.⁷⁸ Reaktivasyon latentlikten tamamen farklı bir süreç olup trigeminal ganglionlarda virüs reaktivasyon oluşur oluşmaz yeni bir litik devreye girer.⁵⁸ Oluşan projen virüs primer enfeksiyon bölgesine aksonal yolla ulaşmaktadır. Virusun yeniden saçılımını iki faktör etkilemektedir. Bunlar primer immun yanıt ve projeni virüsün fenotipidir. Primer immun yanıt ya etkene direk maruz kalma ile ya da latent taşıyıcı hayvanlardan tekrar hastalık oluşumunu önlemek için yapılan aşılama sonrası oluşur. Ard arda reaktivasyonun uyarılması ile artan sekonder immun yanıt virüsün tekrar saçılımını inhibe etmesinde etkilidir. Bu nedenle primer enfeksiyonu takip eden ilk 2 ayda oluşan reaktivasyon uyarımı ile virüsün tekrar saçılımı beklenmemelidir.²²

2.2.7. Klinik Bulgular

BoHV-1 enfeksiyon periyodu normal koşullar altında 10 günden 20 güne kadar değişebilmektedir. Klinik bulgular çok farklı şekillerde gözlenebilmektedir. Bunlar; solunum formu, genital form, oküler form ve ensefalitis formlarıdır.⁴⁴

Solunum formunda yüksek ateş (41.5°C), anoreksi, öksürük, aşırı salivasyon, burun akıntısı, göz yaşı akıntısı ve solunum güçlüğü genel bulgulardır.^{58, 79, 80} Göz ve burun akıntısı başlangıçta seröz karakterde olup⁷⁹, birkaç gün içerisinde mukopurulent bir karakter alır.^{22, 44} Burun mukozası hiperemik ve bu bölgedeki lezyonlar püstüler nekrozdan hemorajik ve krem renkli difteroid membranla kaplı ülserli alanlara kadar değişmektedir. Bu tabakalar eğer kaldırılırsa alt kısımlardaki dokular hiperemiktir. Bu yüzden 'Kırmızı Burun' adı verilmektedir.⁴⁴

Oküler formda tek veya çift taraflı bir göz yaşı akıntısı gözlenir. Etkilenen hayvanlarda fotofobi gözlenirken, epiphora en karakteristik bulgulardan biridir. Kornea genellikle etkilenmezken sekonder bakteriyel enfeksiyonlarda keratitis ve korneal ülserasyon şekillenebilmektedir.^{44, 80}

Genital formda dişi hayvanlarda IPV , erkek hayvanlarda ise IPB şekillenir.^{22, 45,}
⁵³ Seronegatif hayvanlarda BoHV-1 solunum enfeksiyonu sonucu abort meydana gelebilir. Doğal olarak oluşan BoHV-1 abortları genellikle gebeliğin 4 ile 8. ayları arasında gözlenir, fakat gebe düvelerde deneysel çalışmalarda parenteral olarak verilen virüsün 3 aydan önce de embriyonik ölümlere yol açtığı gözlenmiştir.²² Abort olgularında plasentada değişiklik oluşmazken, fötüse ait dokularda patolojik bulgular olduğu bildirilmiştir. Plasentadan fötüse yayılma umbilikal ven aracılığı ile hematojen olarak gerçekleşmektedir. Bu olgularda fötüs karaciğerinde multifokal nekroz odakları şekillenmektedir.⁸¹

Ensefalitis formu buzağılarda yaygın olmasına rağmen erişkin sığırlarda ender olarak rastlanılır.³

2.2.8. Makroskopik Bulgular

BoHV-1'in neden olduğu enfeksiyonlarda akciğer lezyonlarına daha az rastlanmakla birlikte,^{3, 12} genç sığırlarda üst solunum yollarında herhangi bir lezyona neden olmadan bronkointersitisyel bir pnömoni geliştiği gözlenmiştir.³ Etkenin yapılan deneysel çalışmalarda ya da doğal olarak oluşan enfeksiyonlarda akciğerde kırmızı hepatizasyon alanlarına, yaygın irinli bir bronkopnömoniye, atelektaziye, konsolidasyon alanlarına rastlanmış ancak bu bulguların hastalığın üst solunum yollarında oluşturduğu eksudatın aspirasyonu sonucu mu yoksa bu bölgede önceden varolan bir enfeksiyondan mı kaynaklandığı belirlenememiştir.¹²

Hastalığın solunum formunda üst solunum yollarında (burun ve konha) mukoza hiperemik, ödematöz ve seröz rinitis ile karakterizedir.⁴⁴ Bakteriyel komplikasyon oluşmuş ise bu lezyonlar trakea ve sinüslara kadar yayılır. Larinks ve trakeada irinli bir eksudasyon şekillenebilir. Primer hastalığa bağlantılı olmaksızın veya hastalığın bir komplikasyonu olarak pnömoni gelişebilir.⁴⁴ Neonatal buzağılarda solunum yollarında, dalak, karaciğer, böbrek, lenf düğümleri, özefagus ve ön midelerde fokal nekroz odaklarına rastlanır.⁸²

Genital formda vulva, penis, preputium mukozasında 0.1-0.5 mm çapında vezikül ve püstüllere rastlanır. Bu lezyonlar yaklaşık iki hafta içerisinde iyileşir.⁸²

Okuler formda epiphora, konjunktivitis ve mukopurulent göz yaşı akıntısı dikkati çeker.²²

Ensefalit formunda belirgin bir makroskobik bulgu şekillenmez.⁴⁴

2.2.9. Mikroskobik Bulgular

Mikroskobik olarak solunum sisteminde üst solunum yollarında mukozada nötrofil lökosit içeren bir ödem, submukozada lenfosit, makrofaj ve plazma hücre infiltrasyonu görülür. Enfeksiyonun ilk günlerinde intranükleer inklüzyon cisimcikleri epitel hücrelerinde görülebilir.^{50, 80} Hastalığın ilerlemesi ile birlikte üst solunum yollarında ödemin şiddeti artarak yangısal bulgular alt solunum yolları, larinks ve sinüslara kadar yayılır. Bu dönemde bronş-bronşiyol epitellerinde nekroz, tip II pnömositlerde proliferasyon ve alveol lümenlerinde hiyalin membran oluşumu şekillenir.⁴⁴ Bakteriyel komplikasyona bağlı olarak bronkopnömoni lezyonları şekillenebilir.⁸³

Genital formda vulva ve vajina'da mikroskobik değişikliklere epitel, lamina propriya ve lenf nodüllerinde rastlanır. Püstül ve vezikül aşamalarında mukoza epitelinde balonumsu dejenerasyon, nekroz ve deskuamasyon, nötrofil lökosit infiltrasyonları,

eozinofilik intranükleer inklüzyonlara rastlanır. Lamina propriada hiperemik, ödematöz, çoğunlukla lenfosit ve plazma hücrelerini içeren yangısal bir tablo gözlenir.³

Ensefalitis formunda serebellumun subkortikal alanlarında nöron ve astrositlerde nekroz, intranükleer inklüzyon cisimleri, perivasküler hücre infiltrasyonu ile karakterize nonpurulent ensefalomyelitis gözlenir.³

2.2.10. Teşhis

BoHV-1 enfeksiyonlarının belirlenmesinde çeşitli klinik ve laboratuvar teşhis yöntemleri kullanılmaktadır. Klinik teşhis yöntemleri özellikle akut herpesvirus enfeksiyonlarında kullanılırken, latent enfeksiyonların belirlenmesi için laboratuvar testlerinin yapılması zorunludur.^{58, 84} BoHV-1 enfeksiyonlarının laboratuvar teşhisinde hücre kültürü, virüs, virüsün komponentleri ve virusa karşı oluşan antikorun belirlemek için serolojik testler, ayrıca polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), histopatoloji, IHC ve IF boyama yöntemleri, Western blot, ELISA, elektron mikroskop gibi birçok yöntem kullanılmaktadır.^{24, 44, 58, 79, 84-87}

2.2.11. Koruma ve Kontrol

BoHV-1 enfeksiyonlarına karşı aşı kullanılmasındaki amaç hastalığın oluşmasını engellemek ve hastalığın ekonomik etkisini azaltmaktır.⁵⁸ Sığırlardaki BoHV-1 enfeksiyonlarına karşı korumada günümüzde 4 çeşit aşı kullanılmaktadır.⁴⁴ Bunlar; modifiye canlı virüs aşılı, inaktif aşılı, subunit aşılı ve marker aşılıdır.^{22, 24, 44, 58} Mevcut aşılı latent enfekte hayvanlara karşı koruyuculuk sağlamaz.⁵⁸ Hatta aşının immunsupresif etkisinden dolayı genç hayvanlarda da aşılama sonrası enfeksiyon şekillenebilmektedir.⁷⁵ Aşının bu etkilerinden dolayı kullanılması veya nasıl geliştirileceği tartışma konusudur.^{75, 88} Modifiye canlı aşılı 3 grupta incelenir. Parenteral aşılı fotal sığır böbrek doku kültüründen elde edilir. Bunun yanısıra 2 adet intranasal aşı

mevcuttur. Bunlar BoHV-1'in mutant formunu içeren tavşan doku kültürü ya da sığır doku kültürlerinden elde edilmektedir. Modifiye canlı aşılar hızlı bir yanıt oluşturur ve uzun süreli lokal mukozal bağışıklık sağlar.^{24, 44} Fakat bu aşılar güçlü bir abort nedenidir. Bu yüzden aşılanmamış gebe hayvanlarda kullanılmaz. Yine bu aşılar latentlik geliştirip aşı virusunun saçılımına yol açabilir.⁴⁴ İnaktif aşılar modifiye canlı aşıların abort, latentlik ve immunsupresif etkilerinden dolayı geliştirilmiştir. Bundan dolayı gebe hayvanlarda kullanılabilir. Bu aşıların dezavantajı ise virusa maruz kalan hayvanlarda latentliğin oluşumunu engelleyememesidir.^{24, 44} Subunit aşılar gB, gC ve gD gibi glikoproteinleri içerir. gD temelli aşılar etkili adjuvanlar ile birleştirildiği zaman klinik olarak hastalığın oluşmasına engel olmada en etkili olan aşıdır.²² Marker aşılar ise doğal enfekte hayvanlar ile aşıları hayvanlar arasındaki ayrımı sağlayan bir veya daha fazla viral proteinin silinmesi esasına dayanır. Bu aşıların farklı tipleri mevcuttur. Bunlar gE-canlı, , gG-cansız, gC-canlı, gD-subunit, gB-subunit ve gD-replication-incompetent gibi aşılardır.⁴⁴

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Çalışma Materyali

Çalışma materyalini mezbahada kesilen ve makroskopik muayenede pnömoni olduğu saptanan 120 adet sığır akciğeri oluşturdu.

3.2. Yöntem

3.2.1. Makroskopik İnceleme

Erzurum iline bağlı Et ve Süt Kurumu ile özel mezbahalarda 2014-2016 yılları arasında kesime alınan sığırların akciğerleri rutin olarak incelendi ve örnekler alındı. Çalışma için gerekli numune sayısının elde edilebilmesi için toplam 1023 sığır akciğeri incelendi ve makroskopik olarak pnömoni gözlenen 120 adet akciğer toplandı. Alınan her bir akciğer örneğinin bir kısmı % 10' luk formaldehit solüsyonunda tespit edildi bir kısmı ise Antijen ELISA yöntemi için -20 °C'de muhafaza edildi.

3.2.2. Mikroskopik İnceleme

3.2.2.1. Dokuların İşlenmesi

Makroskopik olarak pnömoni gözlenen akciğerlerden alınan doku örnekleri %10'luk tamponlu formalin solüsyonunda tespit edildi. Tespiti gerçekleşen dokuların küçültme işlemi yapılarak kasetlere yerleştirildi. Kasetteki dokular 1 gece boyunca akan çeşme suyunda yıkanarak tespit solüsyonu uzaklaştırıldı. Sonrasında ototeknikon cihazı ile dokuların sırasıyla %60, %70, %80, %96, %100'lük alkol serisinde 2 saatlik aralıklarla dehidrasyon, Ksilol 1 ve Ksilol 2 solüsyonlarında 1 saat süreyle şeffalaştırılma işlemleri gerçekleştirildi. Bloklanmış dokulardan 5 µm kalınlığında alınan kesitlerin bir kısmı histopatolojik inceleme için normal lamlara, bir kısmı ise immunohistokimyasal ve immunfloresan inceleme için polilisinli lamlara alındı.

3.2.2.2. Hematoksilen-Eozin Boyama

Dokudaki parafinin erimesi için lamalar 57 °C’lik etüvde 1 saat bekletildi. Bu süre sonunda etüvden çıkarılan lamalar ksilol-alkol serisinden geçirildi ve 5 dakika süreyle distile suda bekletilerek Hematoksilen solüsyonunda bekletildi. Çeşme suyunda yıkanan dokulardan asit alkol ile fazla hematoksilen uzaklaştırıldı. Daha sonra dokular Eozin solüsyonunda 1 dakika bekletildikten sonra alkol-ksilol serisinden geçirildi. Lamlara entellan damlatılarak lamelle kapatıldı. Hematoksilen-Eozin ile boyanan preparatlar ışık mikroskobunda (Olympus BX-51) incelendi.

İncelenen preparatlardaki pnömoniler, bronkopnömoni, intersitisyel pnömoni, embolik pnömoni ve granülamatöz pnömoni olarak sınıflandırıldı.⁴

3.2.2.3. İmmunohistokimyasal Boyama

Polilislinli lamlara alınan 5 µm’ lik kesitlerin üzerindeki parafin 1 saat etüvde bekletilerek giderildikten sonra preparatlar ksilol ve alkol serilerinden geçirildi. Kesitler 5 dakika distile suda bekletildikten sonra %3’lük H₂O₂’ de 10 dakika tutularak endojen peroksidaz inaktivasyonu sağlandı ve daha sonra 2 kez phosphate buffer saline (PBS) ile yıkandı. Dokulardaki antijeni açığa çıkarmak için antijen retrieval solüsyonu (10 mM Sodyum sitrat, 0.05% Tween 20, pH 6.0) ile 2x5 dakika 500 watt’ da muamele edildi ve PBS ile 3 kez yıkandı. Non-spesifik bağlanmaları önlemek amacıyla dokuların etrafı PAP pen ile çizilerek üzerlerine protein block (1% Monobasic dihydrogen potassium phosphate, 0.014% Dibasic monohydrogen sodium phosphate, 1% Triton-X-100, 1% Gelatin, 0.002% Potassium chloride, 1% Sodium chloride, 1% BSA) damlatılarak 10 dakika bekletildi ve PBS ile 1 kez yıkandı. Daha sonra PBS ile yıkanan dokular Bovine Herpesvirus Type 1 (BHV-1/IBR) MAb gC-gIII IgG2b Isotype monoclonal antibody (VMRD, CATALOG NO. F2) ile 37° C de 1/100 oranında dilüsyon solüsyonu (Antibody Diluent, Abcam, ab64211) ile dilue edildi ve 30 dakika süreyle inkubasyona bırakıldı.

İnkubasyon sonunda PBS ile 3 kez yıkanan dokulara sırasıyla biyotinlenmiş sekonder ve Horseradish peroxidase (HRP) konjugat damlatılarak 15' er dakika bekletildi. HRP konjugat sonrası 4 kez PBS ile yıkanan dokulara kromojen olarak 3,3 diaminobenzidine (DAB) 1 ml'e DAB Substrata 30 µl olacak şekilde damlatıldı . Yaklaşık 30 saniye kromojende bekletilen kesitler distile su ile yıkandıktan sonra 1-2 dakika Mayer's hematoksilin ile zıt boyama yapıldı. Tekrar alkol-ksilol serisinden geçirilen kesitlerin üzerine entellan damlatılarak ışık mikroskobunda incelendi.

3.2.2.4. İmmunofloresan Boyama

Parafini etüvde bekletilerek uzaklaştırılan kesitler ksilol alkol serisinden geçirilerek 5 dakika süreyle distile suda bekletildi. Dokulardaki antijeni açığa çıkarmak için antijen retrieval solüsyonu ile 2x5 dakika 500 watt' da muamele edildi, takibinde PBS ile 3 kez yıkandı. Non-spesifik bağlanmaları önlemek amacıyla dokuların etrafı PAP pen ile çizilerek üzerlerine protein block damlatılarak 10 dakika bekletildi ve PBS ile 1 kez yıkandı. PBS ile yıkanan dokular Bovine Herpesvirus Type 1 (BHV-1/IBR) MAb gC-gIII IgG2b Isotype monoclonal antibody (VMRD, CATALOG NO. F2) ile 37° C de 1/100 dilüsyon oranında 30 dakika süreyle inkubasyona bırakıldı. Daha sonra PBS ile 3 kez yıkanan kesitler üzerine immunofloresan antikor (Goat Anti-Mouse IgG H&L (FITC) Catalog no: ab6785) 1/100 oranında damlatıldı ve 45 dakika süreyle karanlık ortamda bekletildi ve distile su ile yıkandı. 9 kısım gliserol ve 1 kısım distile su karıştırılarak lamaların üzerine damlatıldı ve lamel ile kapatılarak floresan mikroskopta incelendi.

3.2.3. Antijen ELISA (Enzym-Linked Immunosorbent Assay) Testi

Tez çalışmasında elde edilen akciğerlerden BoHV-1'in ELISA ile belirlenmesi için Biox firmasından Pulmotest BoHV1 (Cat. No.BIO K 335) kiti temin edildi.

-20 °C'de muhafaza edilen akciğer örneklerinden yaklaşık olarak 1 gr alındı. Petri kutusuna alınan her bir akciğer örneğinin üzerine 2 ml kullanıma hazır lizis buffer solüsyonu eklenerek makas yardımı ile küçük parçalar haline getirildi. Homojenize olan dokular solüsyonla birlikte başka bir tüpe aktarıldı ve bu tüpler oda ısısında 500xg'de 10 dakika boyunca santrifüj edilerek çözünmeyen akciğer dokusunun fragmantlarının tüpün dibine çökmesi sağlandı. Böylece üstte kalan sıvı kısım ile ELISA için gerekli süpernatant elde edilmiş oldu.

Bütün içerik kullanılmadan 30 dakika öncesine kadar oda sıcaklığına getirildi. ELISA plate'in her bir gözüne bir örnek gelecek şekilde 100 µl oranında süpernatant eklendi. Plate'in kapağı kapatılarak 21 °C'de 1 saat inkübe edildi. Daha sonra kitin kompozisyonuna göre hazırlanan yıkama solüsyonu plate'in herbir gözüne döküldü ve lavobada aniden çevirilerek mikropate'in boşalması sağlandı. Bu işlem 3 kez tekrarlandıktan sonra diğer aşamaya geçildi.

Yıkama işlemi yapıldıktan sonra yine plate'in her bir gözüne 100 µl oranında konjugat solüsyonu eklendi. Konjugat solüsyonunda plate 21 °C'de inkübe edildi. 5 kez yıkama işlemi gerçekleştirildi. Plate'nin herbir gözüne 100 µl kromojen solüsyonu eklendi ve 21 °C'de 10 dakika karanlık ortamda inkübe edildi. Daha sonra her bir göze stop solüsyonu 50 µl oranında eklendi.

Stop solüsyonu eklenen plaktaki örneklerin 450 nm filtreli bir mikropate spektrofotometresinde optik dansiteleri okundu. Sonuçların hesaplanması için aşağıdaki formül kullanıldı.

Delta OD spl * 100

Val= _____

Delta OD pos

3.2.4. İstatistiksel Analiz

Yöntemler arası kıyaslama için ROC Alıcı İşletim Karakteristiği (Receiver Operating Characteristic, ROC) ve Ki-Kare (X^2) testi kullanıldı (MedCalc Statistical Software version 13.1.2, Ostend, Belgium).

4. BULGULAR

İncelenen akciğer örnek sayısı ve makroskobik olarak pnömoni bulgusu gözlenen örnek sayısının yıllara göre dağılımı ve oranları Tablo 4.1’ de verilmiştir. Makroskobik olarak 2014 -2016 yılları arasında incelenen 1023 örneğin 120 (%11.73)’ sinde pnömoni bulgusu tespit edilmiştir.

Tablo 4.1. Yıllara göre incelenen akciğer sayısı ve pnömoni sayısı

	2014	2015	2016	Toplam
İncelenen Akciğer sayısı	432	404	187	1023
Pnömoni Gözlenen Akciğer sayısı	41(%9.49)	57(%14.10)	22 (%11,76)	120 (%11.73)

4.1. Makroskobik Bulgular

Makroskobik incelemede pnömoniler bronkopnömoni (irinli ve fibrinli bronkopnömoniler), intersitisyel pnömoni, embolik pnömoni ve granülatöz pnömoni olarak sınıflandırılmış olup örnek sayıları ve %’ leri tablo 4.2’ de verilmiştir. Lezyonlara daha çok akciğerin kraniyal loblarında rastlansada, kaudal, lateral ve medial loblarda da lezyonlar gözlemlendi.

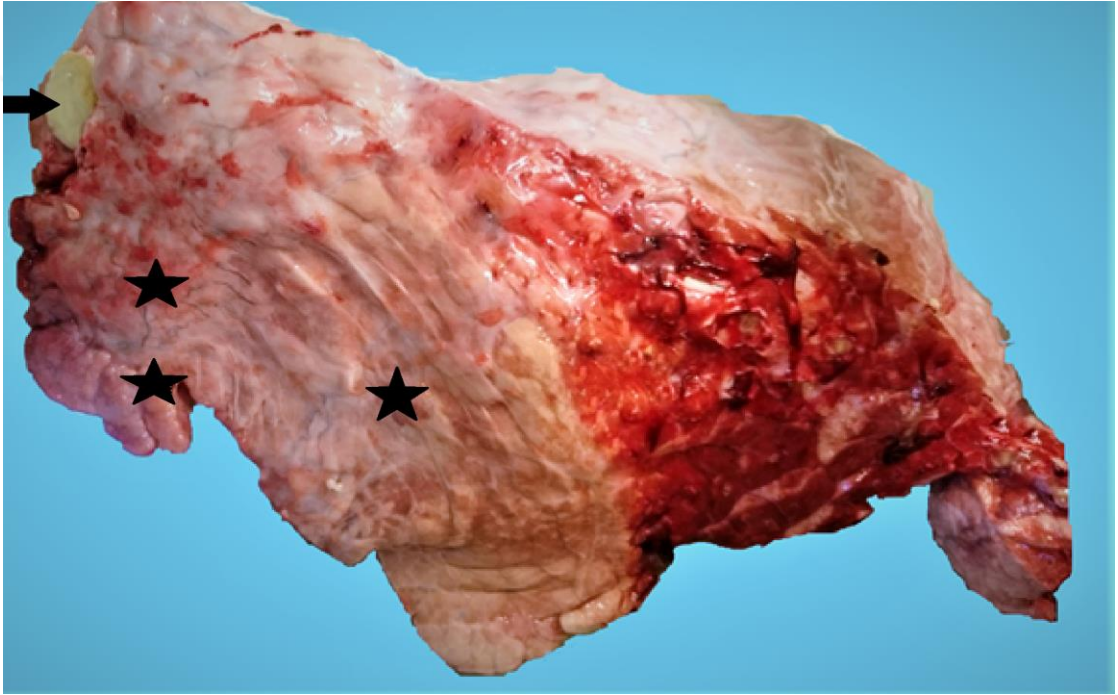
Tablo 4.2. Makroskobik olarak pnömoni çeşitleri ve yüzde oranları

	2014	2015	2016	Toplam	Yüzde (%)
İrinli Bronkopnömoni	41/3	57/3	22/2	120/8	6,7
Fibrinli Bronkopnömoni	41/3	57/2	22/1	120/6	5
İntersitisyel Pnömoni	41/33	57/50	22/18	120/101	84,1
Granülatöz Pnömoni	41/2	57/2	22/1	120/5	4,2
Embolik Pnömoni	41/0	57/0	22/0	120/0	0

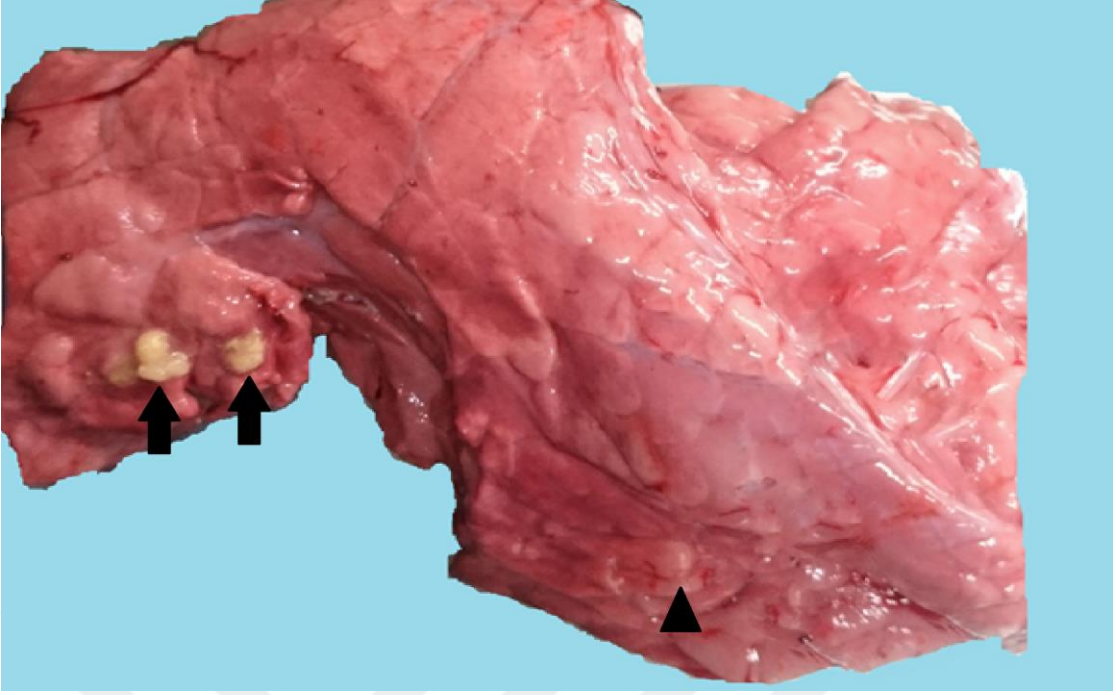
4.1.1. Bronkopnömoni

4.1.1.1. Kataral-İrinli Bronkopnömoniler

İrinli bronkopnömoni gözlenen akciğerlerde, lezyonlar daha çok kraniyal yerleşimli olup koyu kırmızı-gri renkte sert bir kıvama sahipti (Şekil 4.1). Lezyonlara yapılan kesit sonucunda organın kesit yüzeyinden irinli bir eksudatın sızdığı gözlemlendi (Şekil 4.2). Bazı olgularda ise irinle birlikte nekrotik alanlara rastlandı.



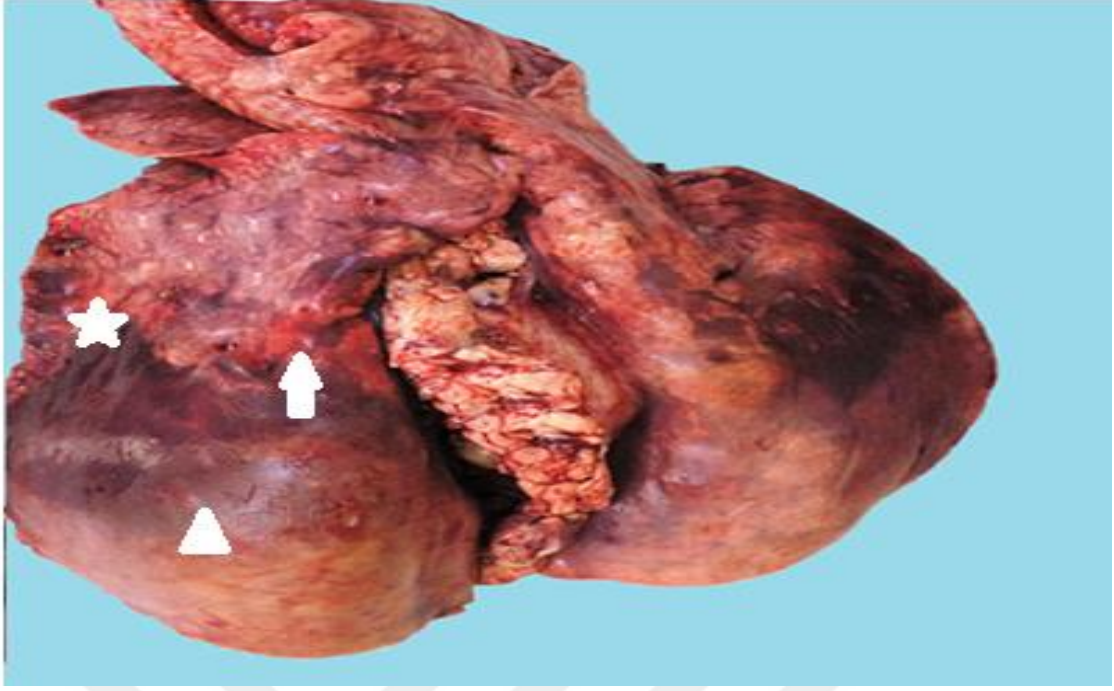
Şekil 4.1. Kataral-irinli bronkopnömoni. Kranial lobda apse odağı (ok) ve sert kıvamlı odaklar (*).



Şekil 4.2. Kataral-irinli bronkopnömoni. Kesit yüzeyinde irin içeren odak (oklar) ve akciğer yüzeyinde milier irin odakları (ok başı).

Fibrinli Bronkopnömoniler

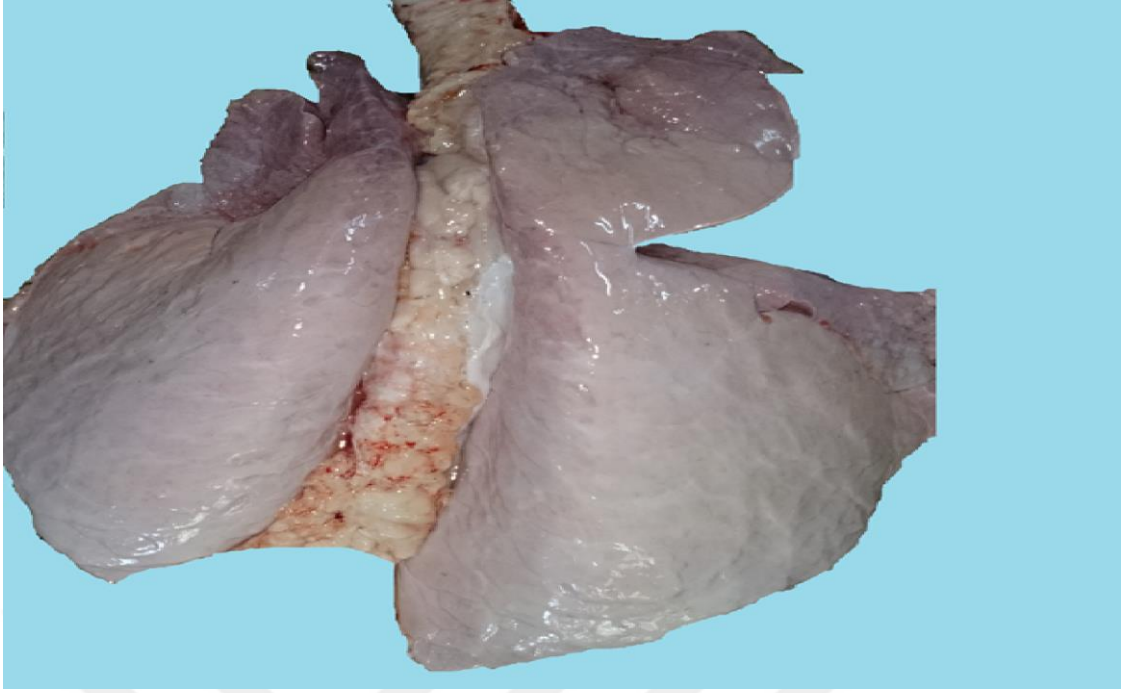
Fibrinli bronkopnömoni olarak değerlendirilen olgularda lezyonlar lobar karakterde olup çoğunlukla kraniyal loblarda gözlendi. Koyu kırmızı ve gri bölgelerden dolayı alacalı mermer görünümü izlendi. Kraniyal lobların çoğunlukla tamamına yakın kısmında koyu veya açık kırmızı alanlar ile gri renkli ve sert kıvamlı hepatize alanların kapladığı gözlendi (Şekil 4.3). Bu hepatize bölgelerin kimi olgularda kesit yüzeyleri kuru görünümde olup, interlobüler septumlarda genişlemeler saptandı. Lezyonlu bölgelerdeki plöra ise seröfibrinöz bir eksudat nedeniyle kalınlaşmış durumdaydı.



Şekil 4.3. Fibrinli bronkopnömoni. Kırmızı (ok) ve gri hepatizasyon (ok başı) alanları, plöra üzerinde fibrin birikimi (*).

4.1.2. İntersitisyel pnömoni

İntersitisyel pnömoni olarak değerlendirilen akciğerler kıvamlı, çoğunluğu kollob olmamış şişkin ve renkleri solgun görünümlüydü (Şekil 4.4). Akciğerin kesit yüzeyi kuru ve süngerimsi bir yapıya sahipti. Plöra etkilenmemiş ve subplöral lenf düğümlerinin şişkin olduğu gözlemlendi.



Şekil 4.4. İntersitisyel pnömoni. Kollabe olmamış akciğer görüntüsü.

4.1.3. Embolik Pnömoni

Çalışmamızda embolik pnömoni olgusuna rastlanmamıştır.

4.1.4. Granülomatöz Pnömoni

Granülomatöz pnömoni olarak değerlendirilen akciğerlerde makroskopik olarak sert yapılı nodüller gözlemlendi. Bunlara yapılan kesitlerde kalsifiye nekrotik alanlar mevcuttu.

4.2. Mikroskopik Bulgular

Makroskopik olarak incelenen akciğerlerin rutin histopatolojik takibi sonucu elde edilen örnekler hematoxilen eozin boyama metodu ile boyanarak mikroskopik olarak incelendi. Mikroskopik bulgulara göre pnömoni çeşitleri, sayı ve oranları tablo 4.3' de verildi.

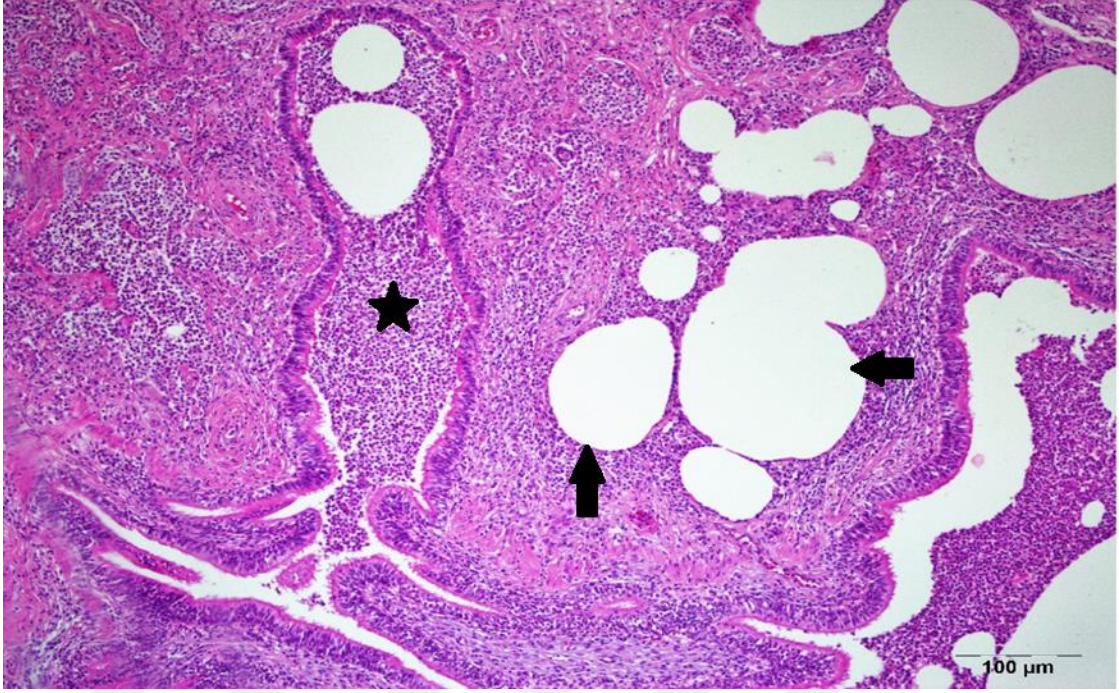
Tablo 4.3. Mikroskopik olarak pnömoni çeşitleri ve yüzde oranları

	2014	2015	2016	Toplam	Yüzde (%)
İrinli Bronkopnömoni	3	3	2	8	6,7
Fibrinli Bronkopnömoni	3	2	1	6	5
İntersitisyel Pnömoni	33	50	18	101	84,1
Granülomatöz Pnömoni	2	2	1	5	4,2
Toplam	41	57	22	120	100

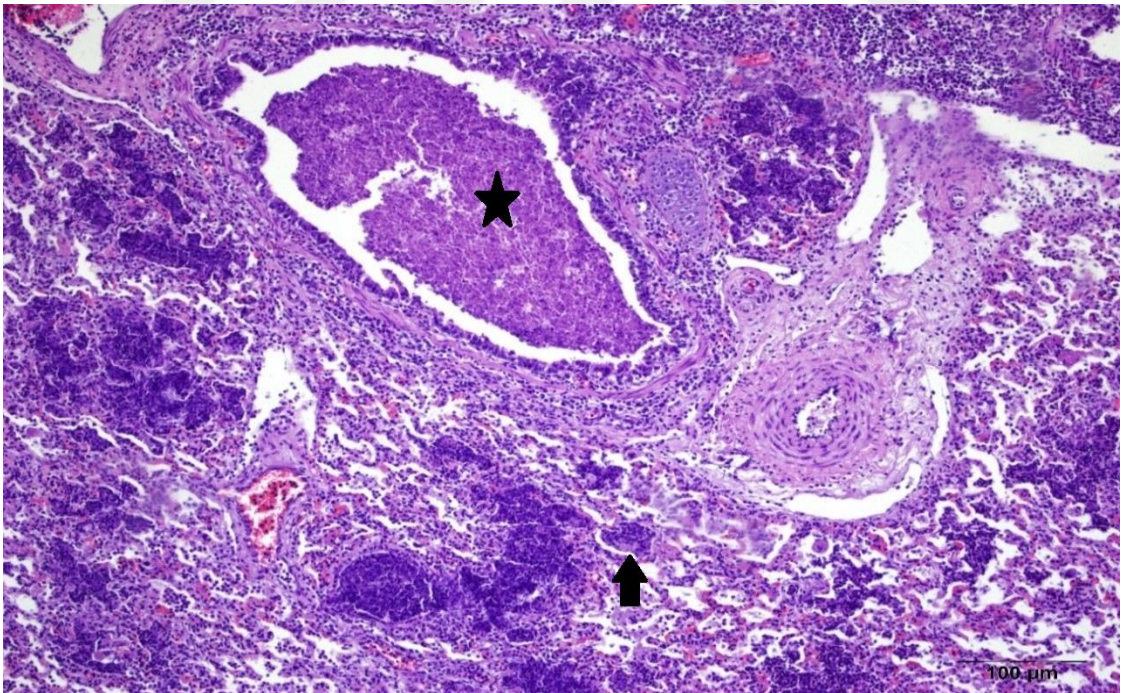
4.2.1. Bronkopnömoniler

4.2.1.1. İrinli Bronkopnömoniler

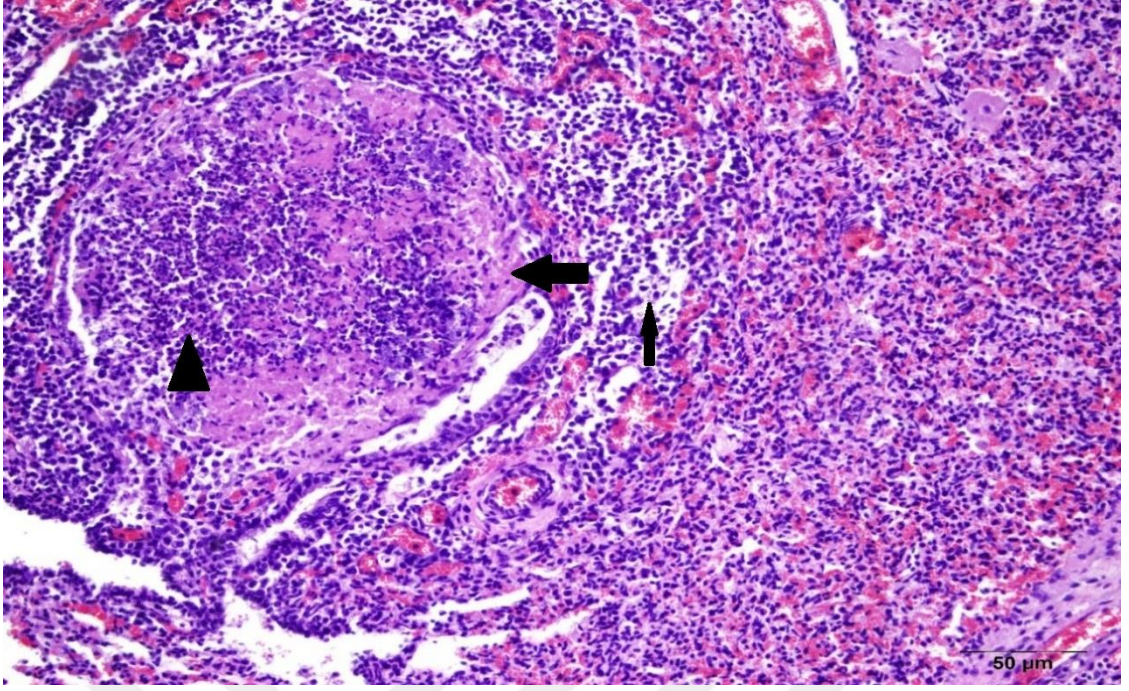
Doku örneklerinin mikroskopik incelenmesi sonucunda 8 (%6,7) adet irinli bronkopnömoni olgusuna rastlanmıştır. Bu bronkopnömoni olgularının mikroskopik incelenmesinde bronş, bronşiol, alveoler boşluklarda ödem, dökülmüş epitel hücreleri ile birlikte bol miktarda nötrofil lökosit ve yer yer nekroz alanlarına rastlandı (Şekil 4.5), (Şekil 4.6), (Şekil 4.7). Bu olguların bazılarında ise, ortada nekroz alanı bu alanın çevresinde nötrofil lökositler ile makrofajlar ve en dışta ise fibröz dokudan oluşan apse odakları belirlendi (Şekil 4.8).



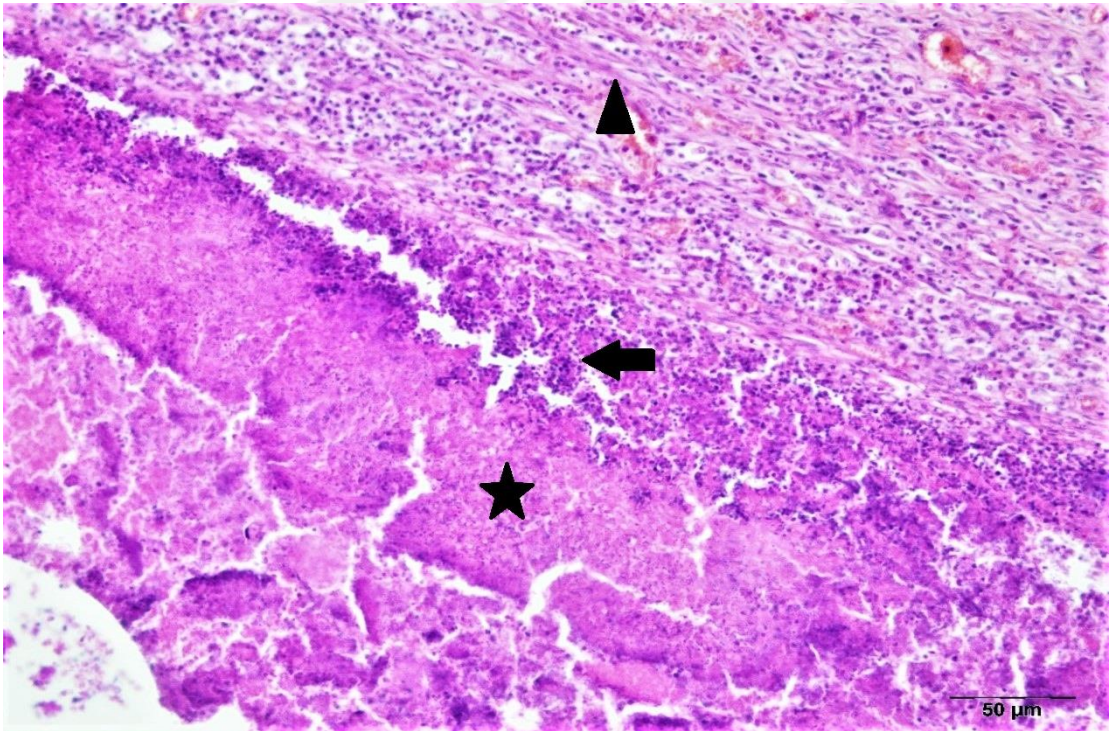
Şekil 4.5. İrinli bronkopnömoni. Bronşiyol ve alveol lümenlerinde deskuame epitel hücreleri, yoğun nötrofil lökosit ve makrofajlardan oluşan irinli eksudat (*) ile amfizemli alanlar (oklar). H&E. 100µm.



Şekil 4.6. İrinli nekrotik bronkopnömoni. Bronşiyol lümeninde nekrotik kitle (*) ve alveollerde nötrofil lökositler (ok). H&E. 100µm.



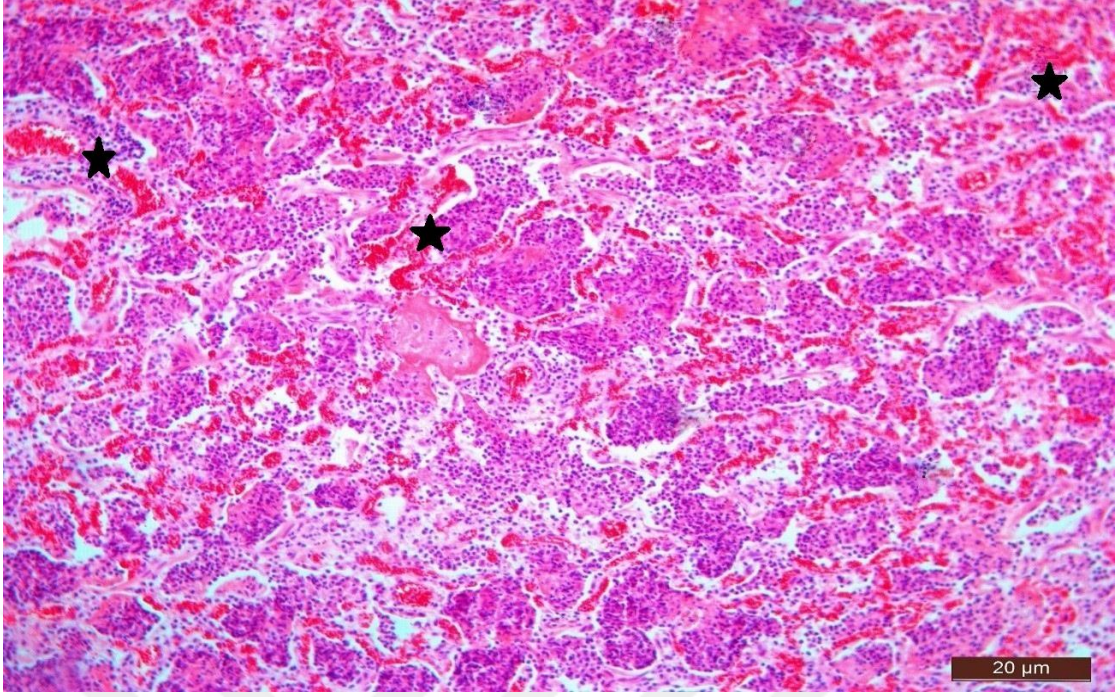
Şekil 4.7. Nekrotik irinli bronkopnömoni. Nekroz (ok), nötrofil lökositler (ok başı) ve makrofajlardan (ince ok) oluşan yangısal hücre infiltrasyonu. H&E. 50µm.



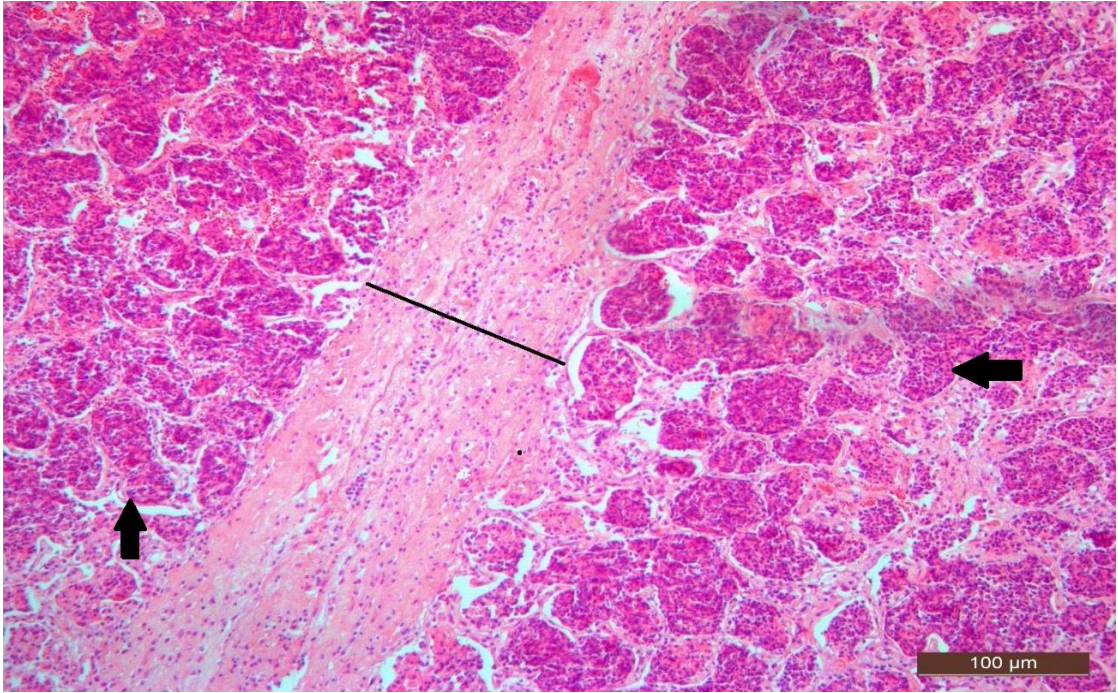
Şekil 4. 8. Apseli bronkopnömoni. Nekroz alanı (*) bu alanın çevresinde nötrofil lökositler ile makrofajlar (ok) ve en dışta ise fibröz kapsül (ok başı). H&E. 50µm.

4.2.1.2. Fibrinli Bronkopnömoniler

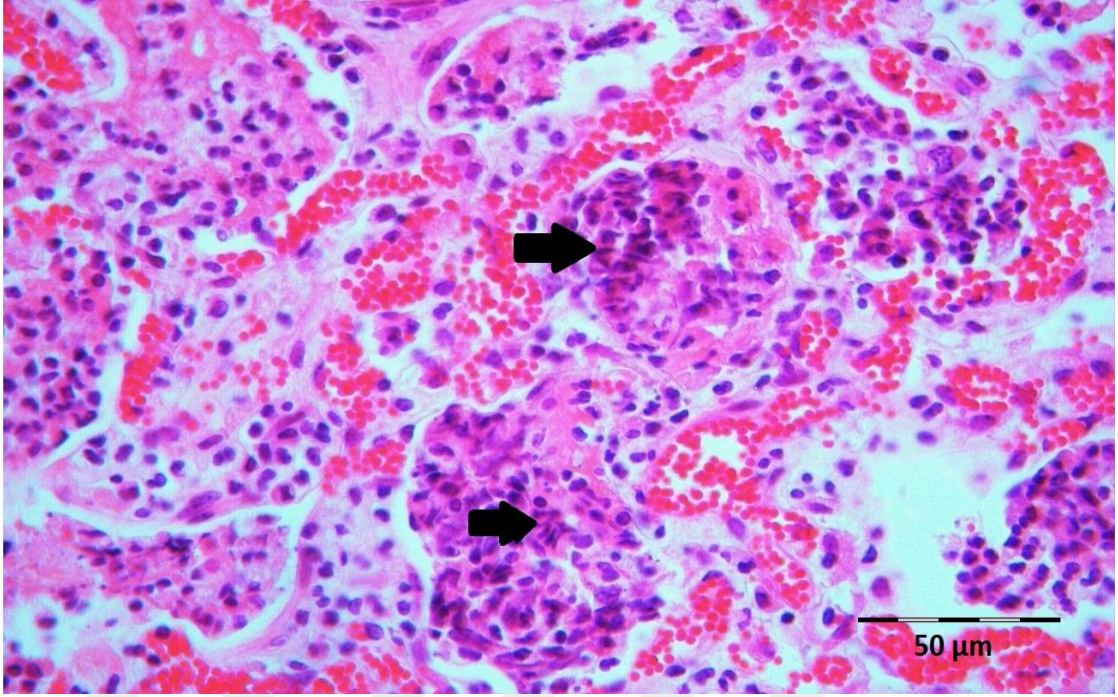
Mikroskopik incelemeler ışığında 6 (%5) adet fibrinli bronkopnömoni olgusuna rastlandı. Alveol, bronş-bronşiyol lümeninde fibrin birikimi ile dökülmüş epitel hücreleri gözlemlendi. Yine fibrinli bronkopnömoni olgularının bazılarında yangısal hiperemi, kırmızı hepatizasyon ve gri hepatizasyon alanları gözlemlendi. Yangısal hiperemi döneminde; interalveoler kapillalar hiperemik, alveol lümenlerinde çok hafif kırmızı renkte homojen sıvı birikimi ile tek tük nötrofil lökosit ile birlikte eritrositlere rastlandı (Şekil 4.9). Kırmızı hepatizasyon döneminde; interalveolar kapillalar hiperemik, alveol lümenlerinde nötrofil dökülmüş alveol epitelleri, az sayıda eritrosit görüldü (Şekil 4.9). Alveollerin içerisinde yoğun fibrin ağları ile birlikte ödem sıvısı mevcuttu. İnterlobüler septumda ödem ve yangısal hücre infiltrasyonu nedeni ile genişleme belirgindi (Şekil 4.10). Genişlemiş olan lenf damarlarında yer yer tromboz vardı. Gri hepatizasyon döneminde; alveol lümenlerinde bol miktarda nötrofil lökosit ile alveol lümenlerinde az sayıda dökülmüş epitel hücresi belirlendi. İnterlobüler septumda yangısal hücre infiltrasyonundan dolayı genişleme ve bazı lenf damarlarında tromboz gözlemlendi. Bazı alveollerin lümeninde oat cell yapılarına rastlandı (Şekil 4.11). Fibrinli bronkopnömoni olgularında 2 örnekte alveoler parankimde nekroz alanlarının olduğu gözlemlendi. Plöranın etkilendiği durumlarda ödem, nötrofil lökosit ve fibröz doku artışına bağlı olarak kalınlaştığı gözlemlendi (Şekil 4.12).



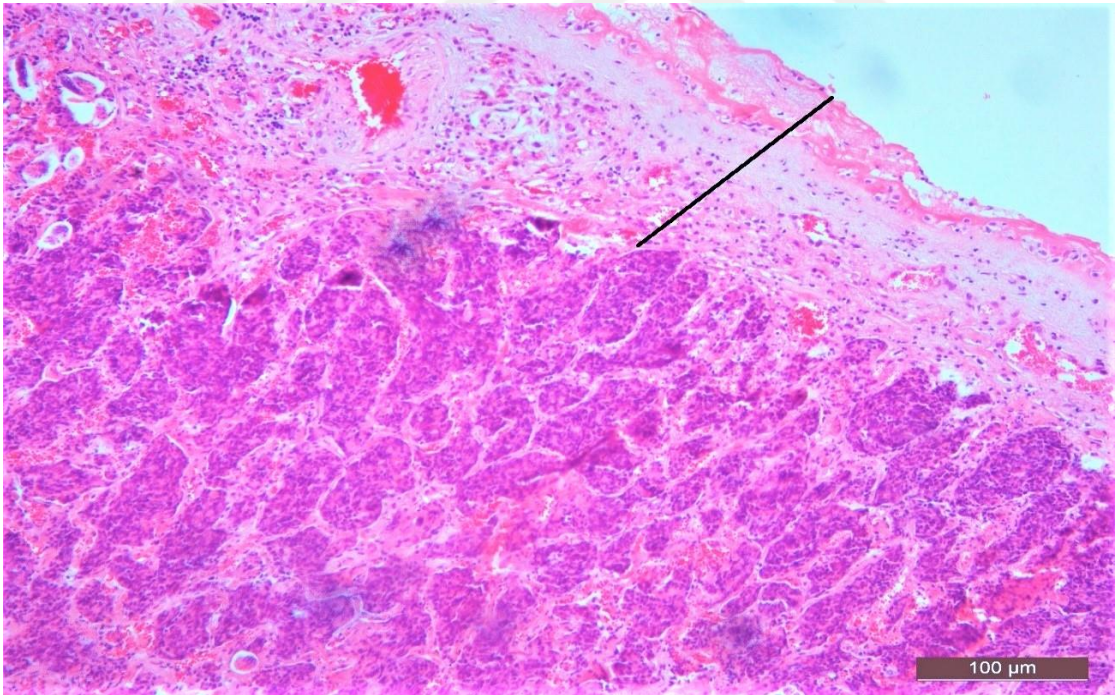
Şekil 4.9. Fibrinli bronkopnömoni. Yangısal hiperemi (*) ve kırmızı hepatizasyon alanı. H&E. 20µm.



Şekil 4.10. Fibrinli bronkopnömoni. İnteralveolar septumda fibrin birikimine bağlı meydana gelen kalınlaşma (çizgi), akciğer parankiminde gri hepatizasyon alanları (oklar). H&E. 100µm.



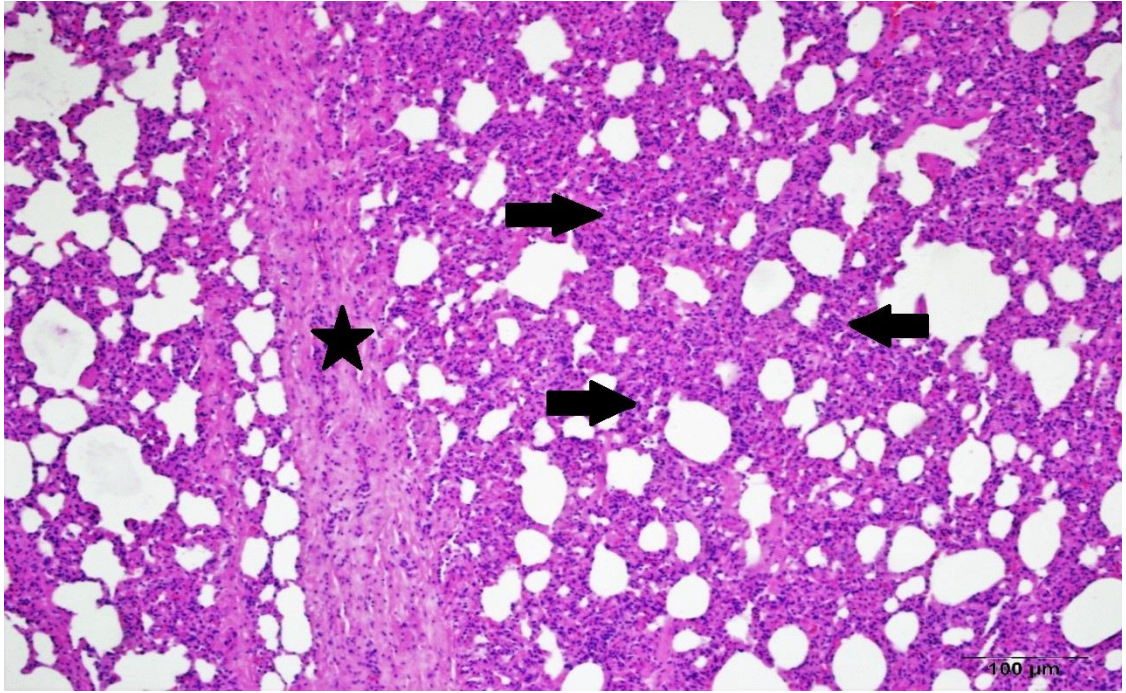
Şekil 4.11. Fibrinli bronkopnömoni. Alveollerin lümenlerinde iğ şeklinde bazofilik lökositler (Oat cell) (oklar). H&E. 50 µm.



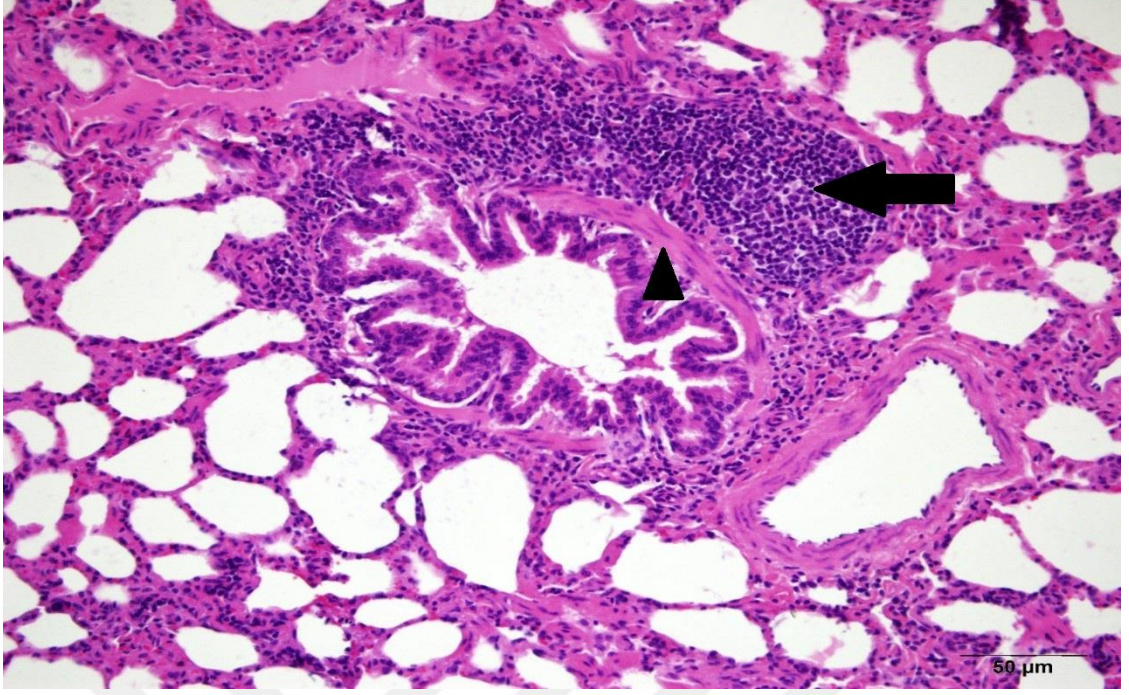
Şekil 4.12. Fibrinli bronkopnömoni. Plörada kalınlaşma (Çizgi). H&E. 100 µm.

4.2.2. İntersitisyel Pnömoniler

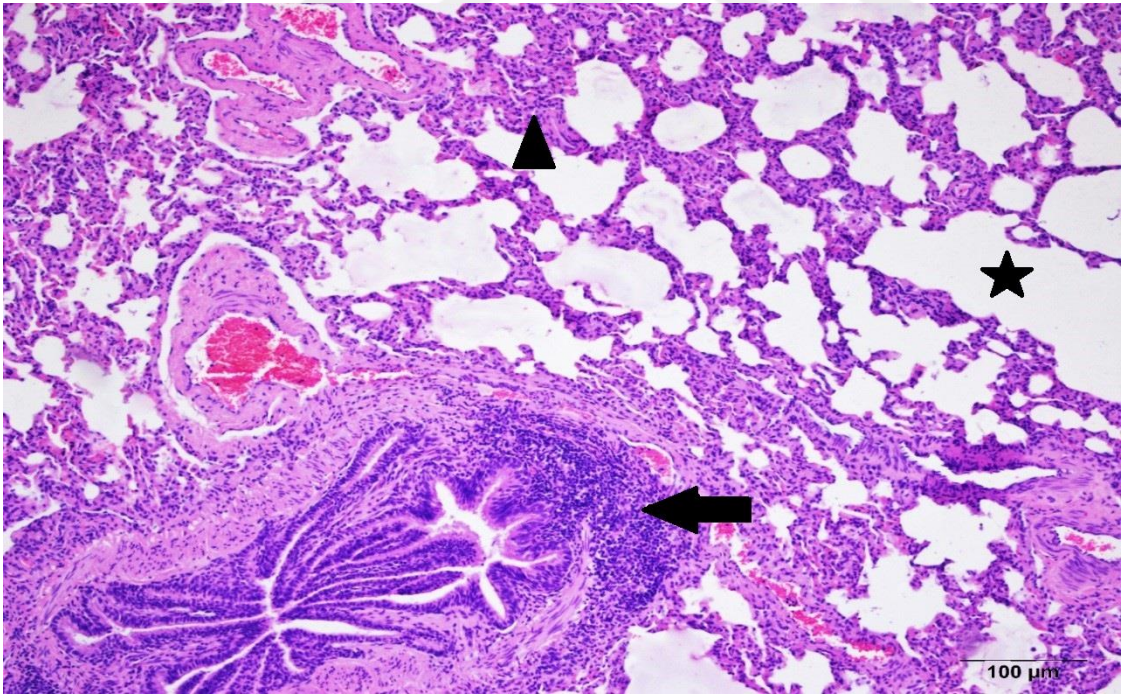
Akciğer örneklerinin mikroskopik değerlendirmesi sonucu 101 (%84,1) örnekte intersitisyel pnömoni belirlendi. İntersitisyel pnömonilerde alveollerin lümeninin boş olduğu, interalveolar septumda yoğun mononükleer hücre infiltrasyonları ile birlikte bağ doku artışına bağlı olarak kalınlaşma tespit edildi (Şekil 4.13). Bronş ve bronşiyol çevresinde lenfoid dokuda (BALT) hiperplazi ve fibromusküler hipertrofi gözlemlendi (Şekil 4.14), (Şekil 4.15). Bronş ve alveol lümenleri çoğunlukla boş olmakla birlikte bazı vakalarda alveol lümenlerinde hiyalin membran ile az sayıda sinsityal hücre ve mononükleer hücreler tespit edildi (Şekil 4.16), (Şekil 4.17).



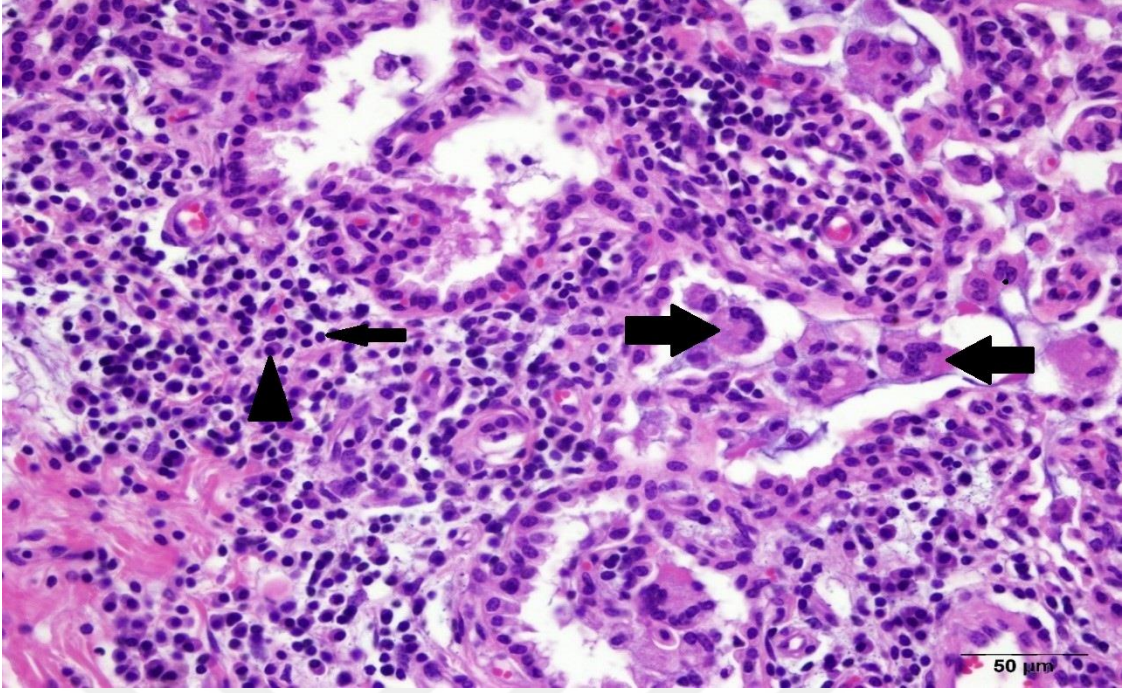
Şekil 4.13. İntersitisyel pnömoni. İnteralveolar (ok) ve interlobuler bölgede kalınlaşma (*). H&E. 100µm.



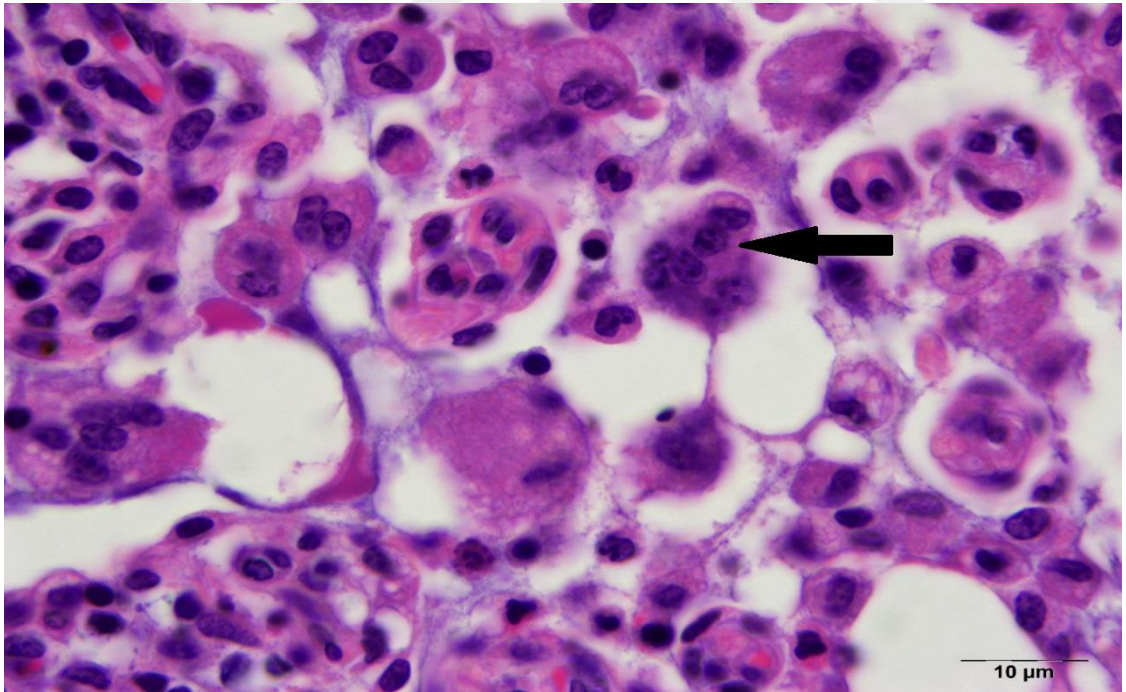
Şekil 4.14. İntersitisyel pnömoni. Peribronşiyal lenfoid hiperplazi (ok) ve fibromusküler hipertrofi (ok başı). H&E. 50µm.



Şekil 4.15. İntersitisyel pnömoni. Peribronşiyal lenfoid hiperplazi (ok). İnteralveoler duvarda kalınlaşma (ok başı) ve amfizem (*). H&E. 100µm.



Şekil 4.16. İntersitisyel pnömoni. Sinsityal tip dev hücreleri (oklar), lenfosit (ince ok), makrofaj ve plazma hücrelerinden (ok başı) oluşan yangısal hücre infiltrasyonu. H&E. 50µm.



Şekil 4.17. İntersitisyel pnömoni. Sinsityal tip dev hücresi (ok). H&E. 10µm.

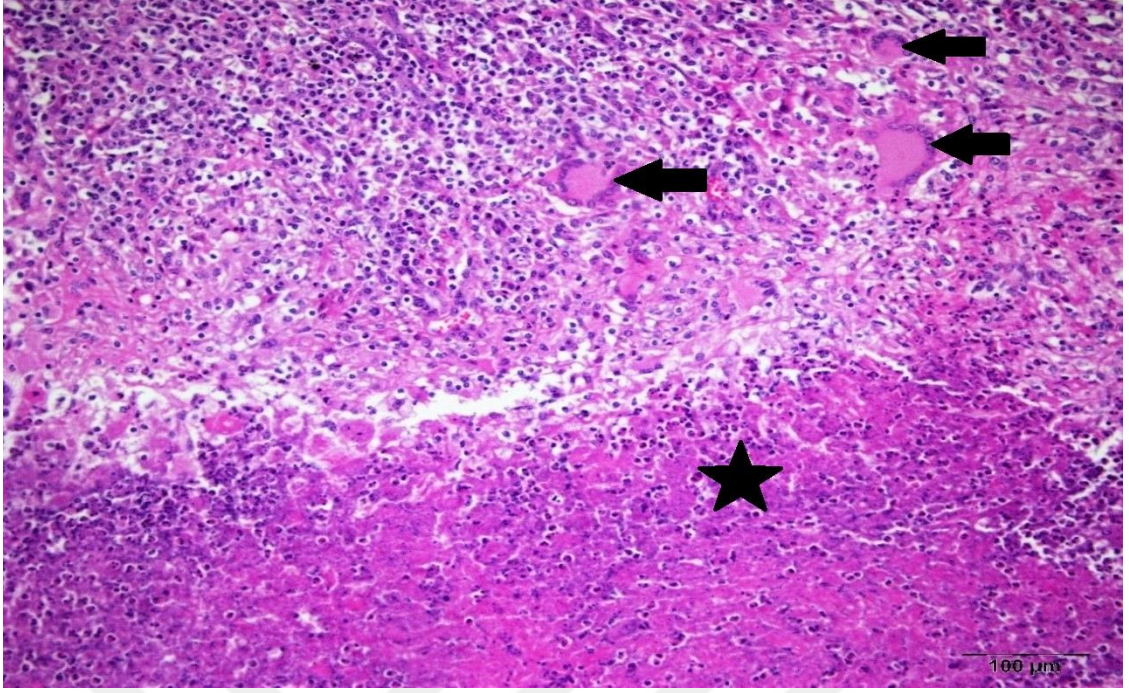
4.2.3. Embolik Pnömoni

Histopatolojik incelemelerde embolik pnömoniye rastlanmadı.

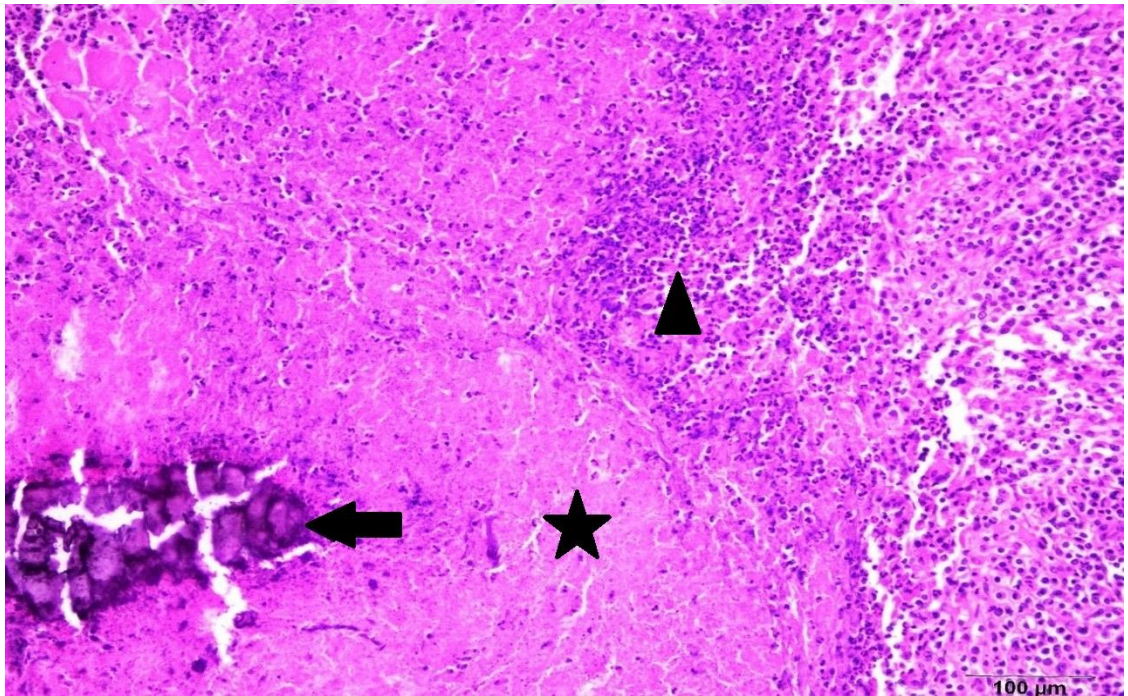
4.2.4. Granülamatöz Pnömoni

Histopatolojik incelemeler ışığında 5 (%4,2) adet granülamatöz pnömoni olgusu tespit edildi. Bunlardan 4'ünde multifokal tarzda ve etrafı bağ doku ile sınırlandırılmış kazeifikasyon nekroz alanları gözlendi. Nekroz alanının çevresinde Langhans tipi dev hücreleri, epiteloid hücreler, histiyosit, lenfosit ve plazma hücrelerinden oluşan yangısal hücre infiltrasyonu ile en dışta fibroz bağ dokudan oluşan bir kapsül belirlendi (Şekil 4.18) Bazı kazeifiye olmuş alanların merkezinde kalsifikasyon alanlarına da rastlandı (Şekil 4.19).

Diğer 1 adet örnekte ise parazite ait kistik yapılar, kist duvarının çevresinde lenfosit, histiyosit, plazma hücrelerini içeren mononükleer hücre infiltrasyonu ve eozinofil granülosit infiltrasyonu, yabancı cisim dev hücreleri ve bu yangısal alanın etrafında fibrosit ve fibroblastlardan oluşan bir bağ doku alanı tespit edildi.



Şekil 4.18. Granülomatöz pnömoni. Kazeifikasyon nekrozu (*), Langhans tipi dev hücreleri (oklar), makrofaj ve az sayıda lenfosit infiltrasyonu. H&E. 100µm.



Şekil 4.19. Granülomatöz pnömoni. Kazeifikasyon nekrozu (*) ve kalsifikasyon odağı (ok) ile birlikte çevrede mononükleer hücre infiltrasyonları (ok başı). H&E. 100µm.

4.3. İmmunohistokimyasal Bulgular

Makroskopik olarak pnömoni tespit edilen ve histopatolojik olarak sınıflandırılan 120 vakanın immunohistokimyasal incelenmesi sonucunda 58 (%48.33) vakada BoHV-1 immunpozitifliği tespit edildi. Pnömoni çeşitleri içerisinde BoHV-1 immunpozitiflikleri tablo 4.4’ de verilmiştir.

Tablo 4.4. Pnömoni çeşitleri içerisinde BoHV-1 immunpozitiflikleri.

<u>Pnömoni Çeşitleri</u>	<u>BoHV-1 immunpozitifliği</u>
İrinli Bronkopnömoni	8/1
Fibrinli Bronkopnömoni	6/4
İntersitisyel Pnömoni	101/50
<u>Granülomatöz Pnömoni</u>	<u>5/3</u>
Toplam	120/58 (%48.33)

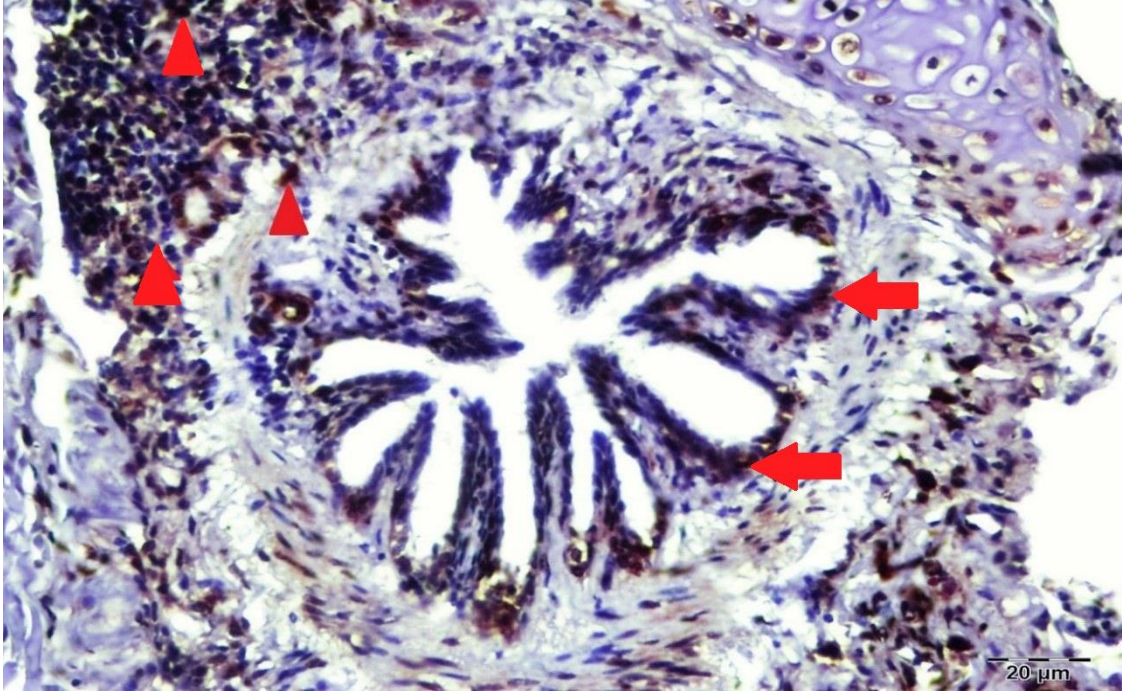
Sekiz irinli pnömoninin birinde, altı fibrinli pnömoninin dördünde, 101 intersitisyel pnömoninin 50’sinde, beş granülomatöz pnömoninin üçünde immunohistokimyasal olarak pozitifliklere rastlandı.

İmmunpozitifliklere intersitisyel pnömonilerde 28 akciğer örneğinde bronş-bronşiyol epitellerinde (Şekil 4.20), 30 akciğer örneğinde BALT dokusundaki makrofajların sitoplazmalarında (Şekil 4.21), 49 akciğer örneğinde interalveolar septumlarda (Şekil 4.22), (Şekil 4.23), bronkointersitisyel pnömoni tablosu şekillenen olgularda 12 akciğer örneğinde eksudatta bulunan makrofajlarda (Şekil 4.24), (Şekil 4.25) 11 akciğer örneğinde peribronşiyal ve peribronşiyoler bölgedeki mononükleer hücrelerde, 12 akciğer örneğinde bronş ve bronşiyol epitellerinin sitoplazmasında immunpozitifliğe rastlandı.

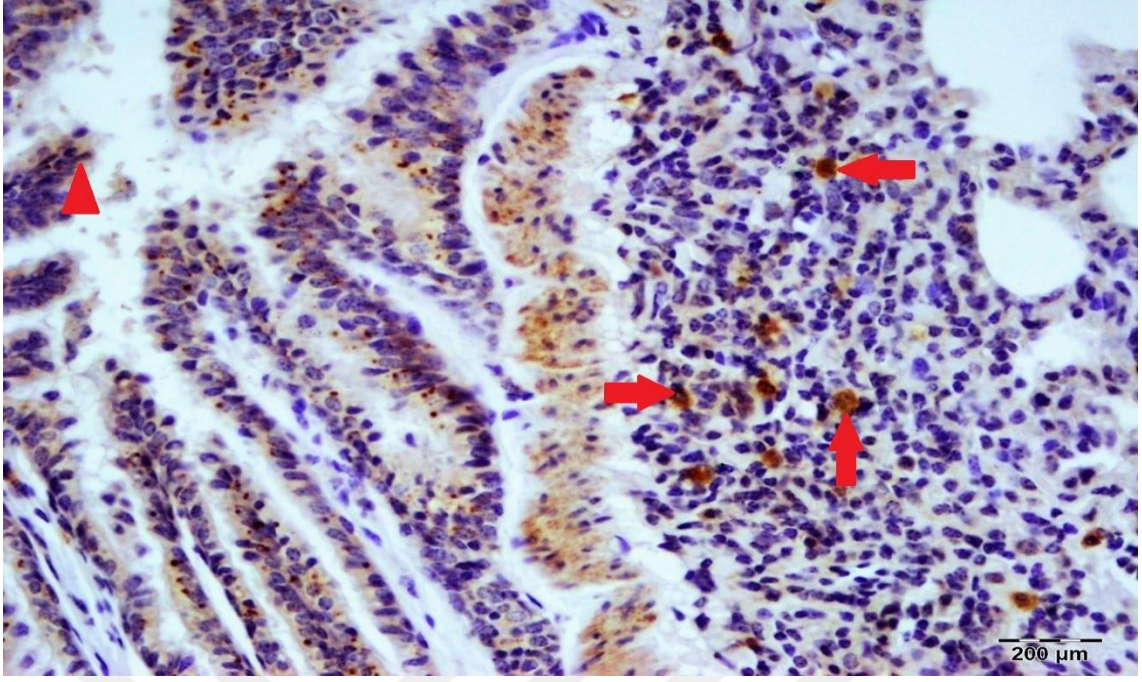
Fibrinli pnömonilerde 4 akciğer örneğinde intersitisyel alanda (Şekil 4.26), 2 akciğer örneğinde plörada, 2 akciğer örneğinde bronş-bronşiyol epitelinde

immunpozitiflikler gözlemlendi. İrinli pnömonide 1 akciğer örneğinde bronş epitelinde ve peribronşiyoler bölgedeki makrofajlarda (Şekil 4.27) immunpozitifliğe rastlandı.

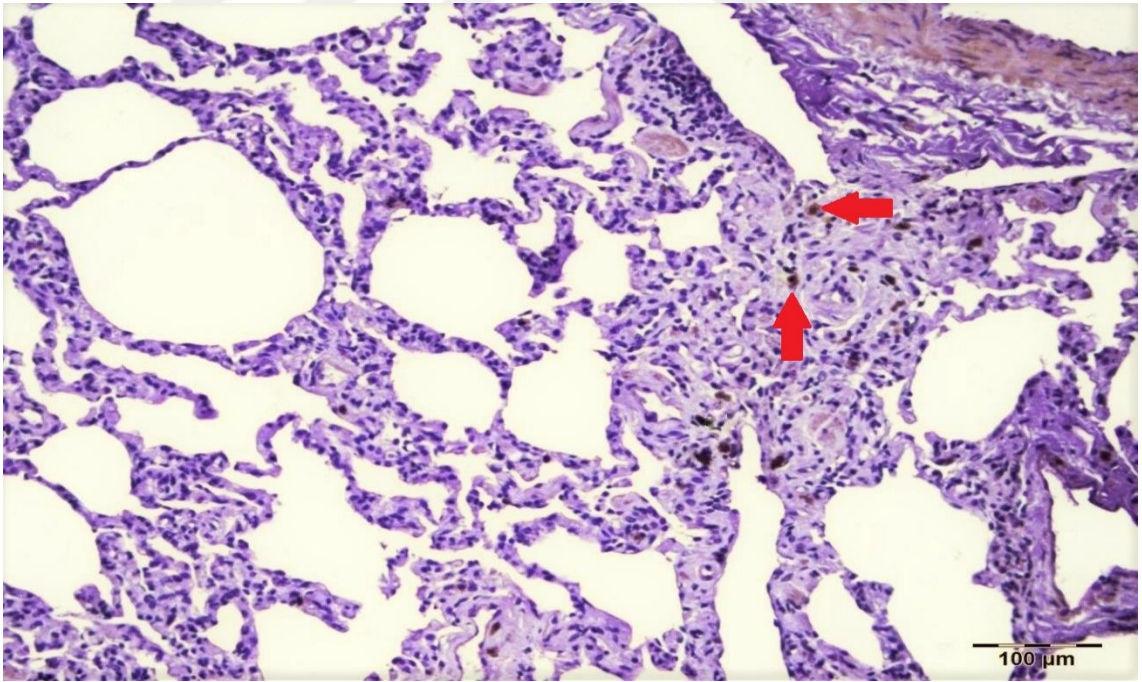
Granülamatöz pnömonilerde 3 akciğer örneğinde intersitisyel bölgedeki makrofajlarda ve peribronşiyal ve peribronşiyoler bölgedeki makrofajlarda immunpozitiflik belirlendi.



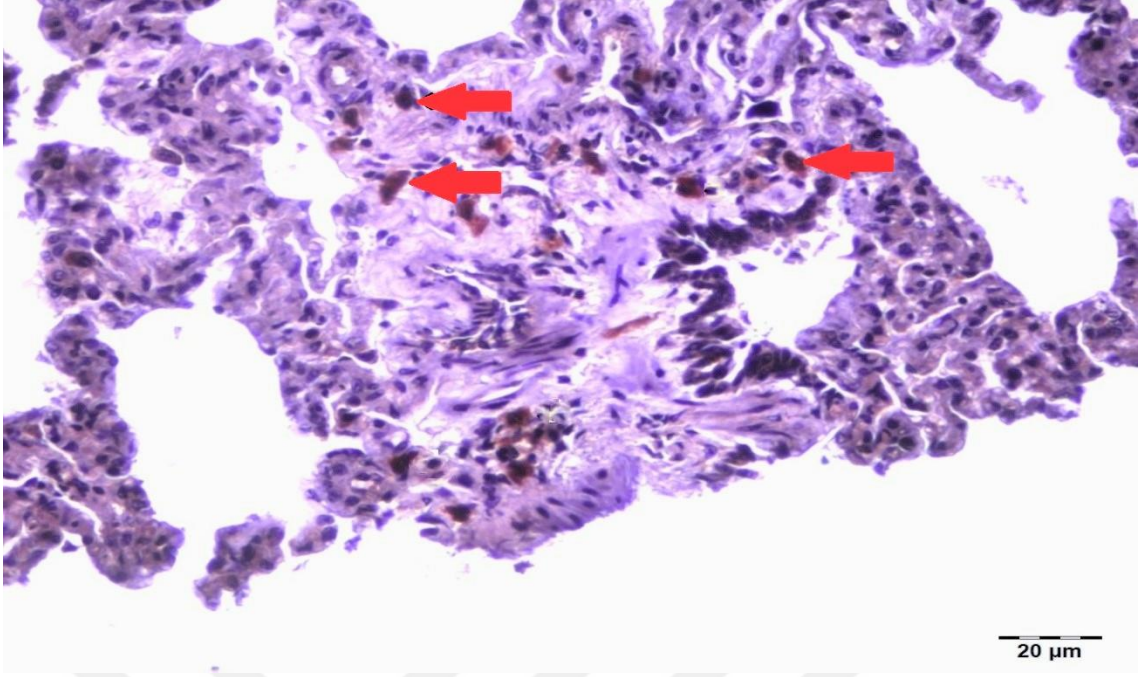
Şekil 4.20. Bronş epiteli (oklar) ve BALT dokusunda BoHV-1 immunpozitifliği (ok başları). IHC. 20 µm.



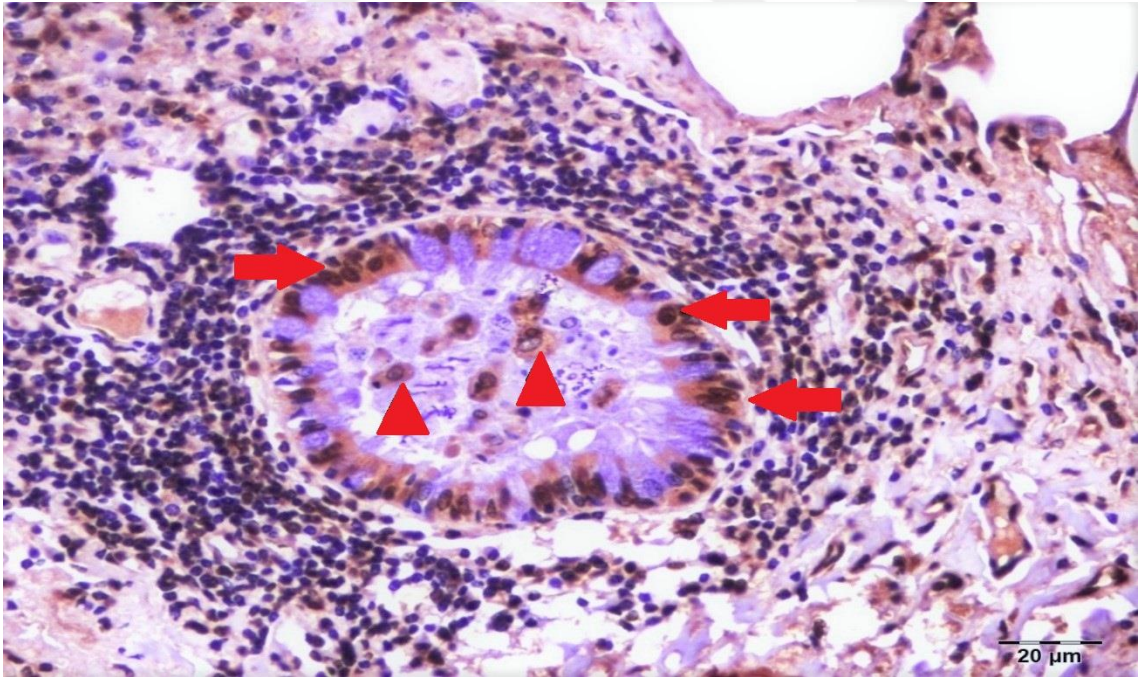
Şekil 4.21. Bronşiyol epiteli (ok başı) ve peribronşiyal lenfoid dokuda BoHV-1 immunpozitifliği (oklar). IHC. 20 µm.



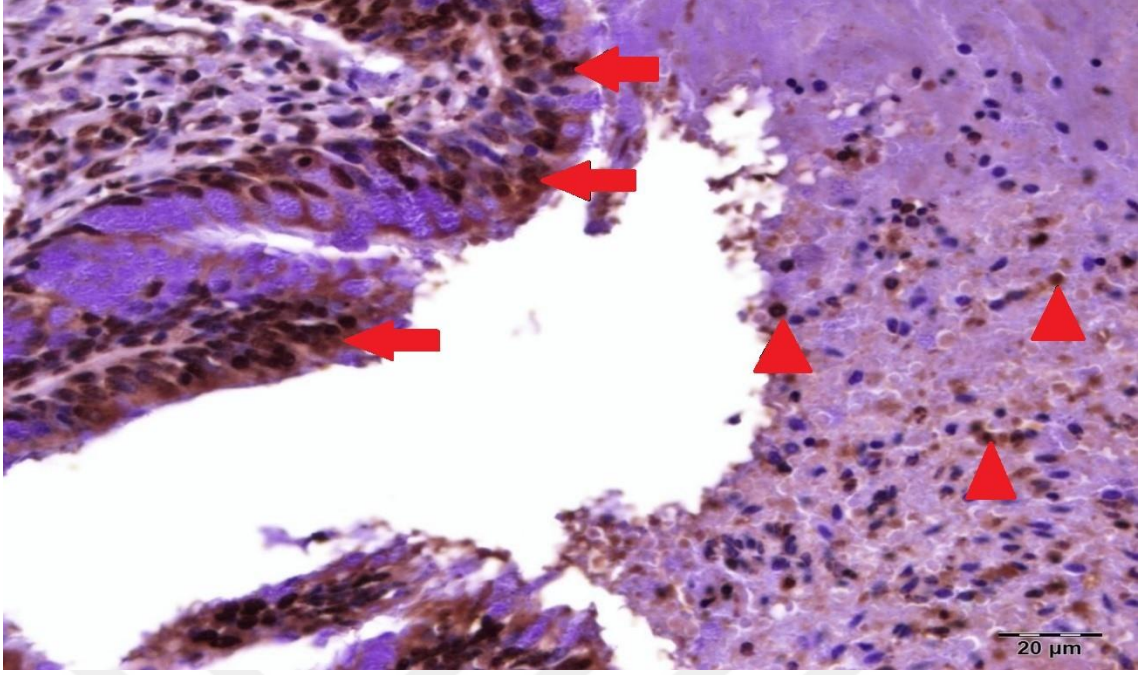
Şekil 4.22. İnteralveolar bölgede yangı hücrelerinin sitoplazmasındaki immunpozitiflik (oklar). IHC. 100 µm.



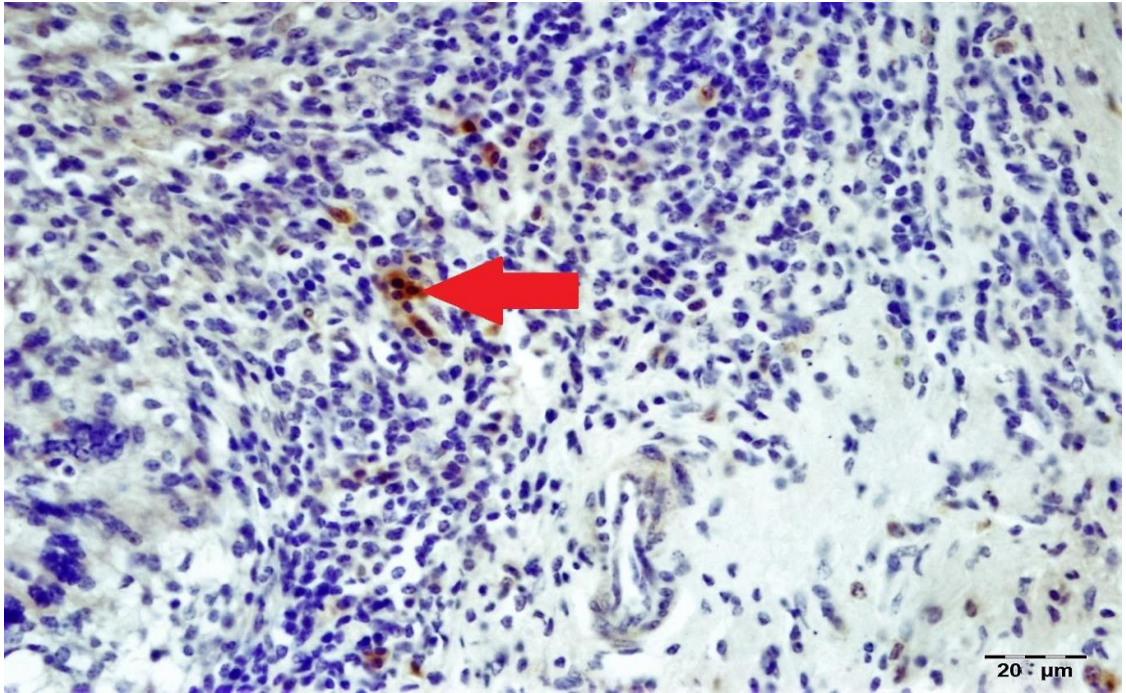
Şekil4.23. İnteralveolar septumdaki intrasitoplazmik yerleşimli BoHV-1 immunpozitifliği (oklar). IHC. 20 µm.



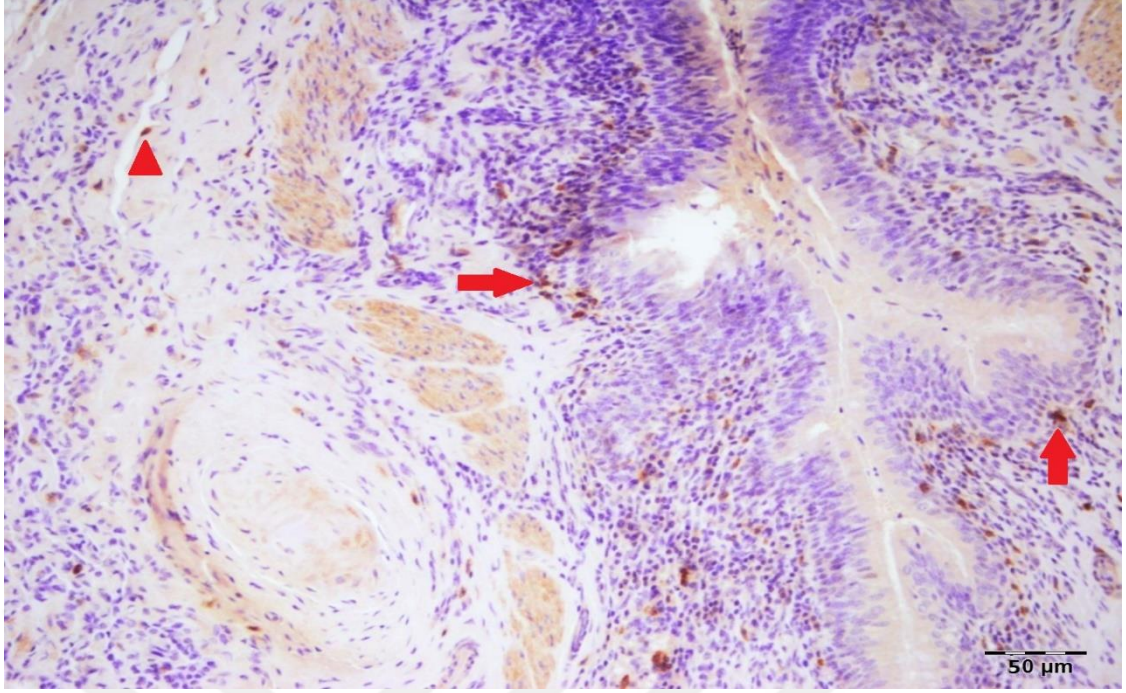
Şekil 4.24. Bronşiyol epiteli ve lümende (oklar) deskuame epitel ve makrofajlarda BoHV-1 immunpozitifliği (ok başları). IHC. 20 µm.



Şekil 4.25. Bronş epiteli (oklar) ve lümendeki eksudatta bulunan hücrelerde immunpozitiflik (ok başları). IHC. 20 µm.



Şekil 4.26. İntersitisyel alandaki immunpozitiflik (ok). IHC. 20 µm.



Şekil 4.27. Peribronşiyal bölgede (ok) ve plörada (ok başı) yangı hücrelerinde immunpozitiflik, IHC. 20 µm.

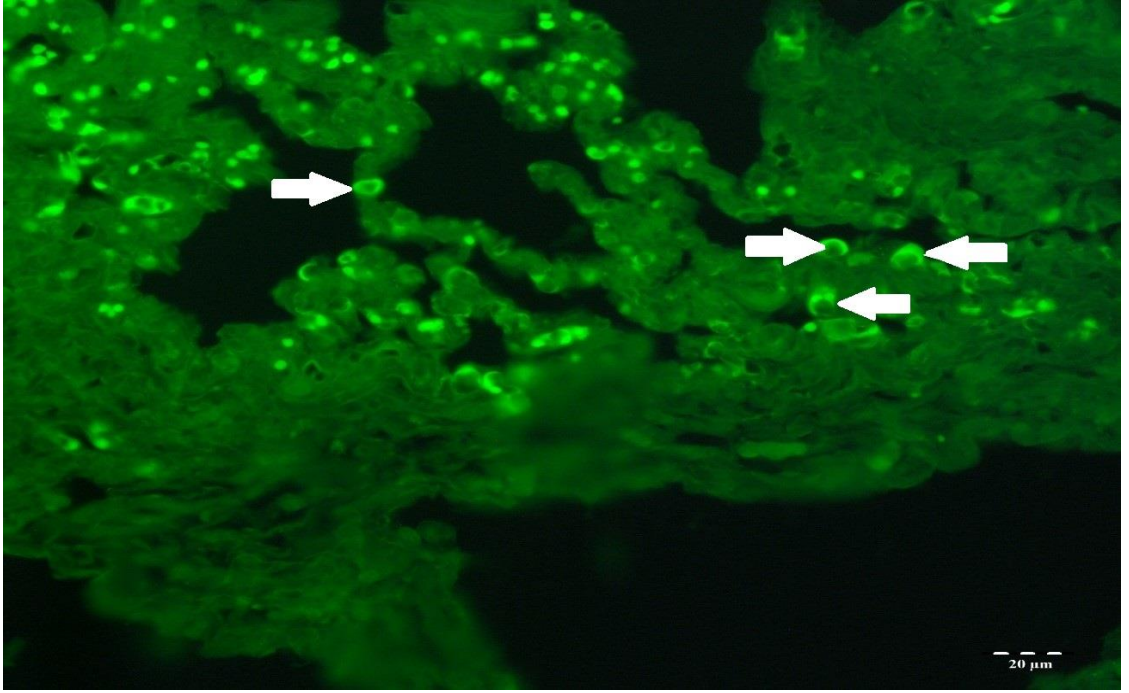
4.4. İmmunofloresan boyama bulguları

Makroskopik olarak pnömoni tespit edilen ve histopatolojik olarak sınıflandırılan 120 vakanın immunofloresan incelenmesi sonucunda 61 (%50.83) vakada BoHV-1 immunpozitifliği tespit edildi. Pnömoni çeşitleri içerisinde BoHV-1 immunofloresan pozitiflikleri tablo 4.5’de verilmiştir.

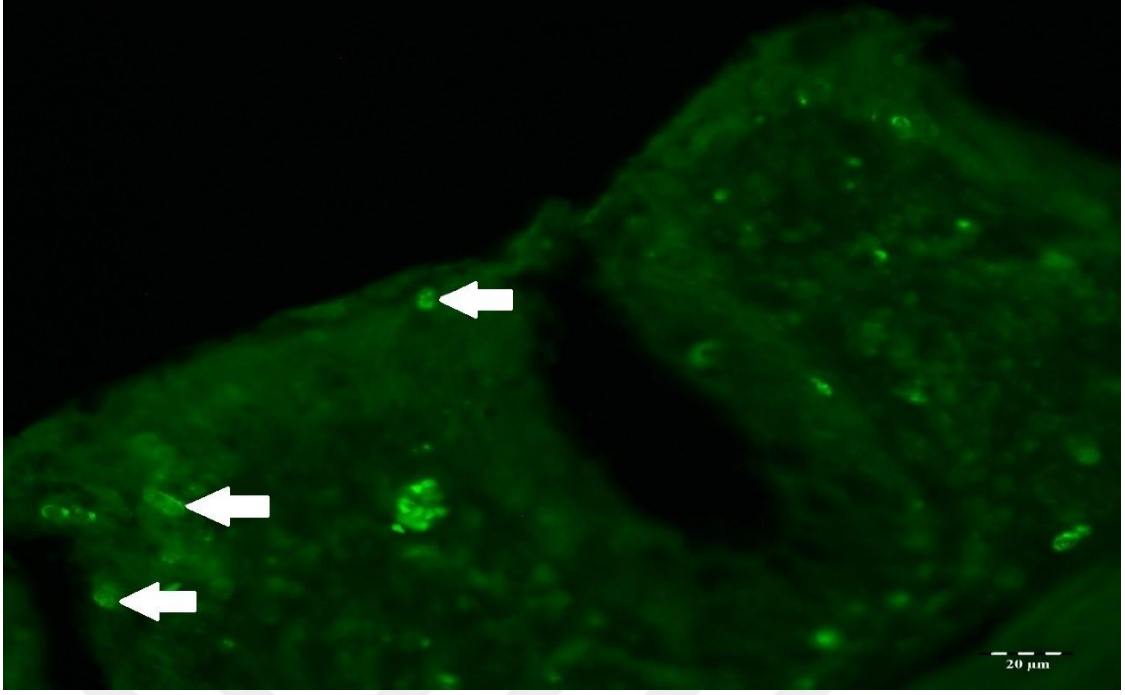
Tablo 4.5. Pnömoni çeşitleri içerisinde BoHV-1 immunofloresan pozitiflikleri.

<u>Pnömoni Çeşitleri</u>	<u>BoHV-1 İmmunofloresan pozitifliği</u>
İrinli Bronkopnömoni	8/2
Fibrinli Bronkopnömoni	6/4
İntersitisyel Pnömoni	101/52
Granülomatöz Pnömoni	5/3
Toplam	120/61 (%50,83)

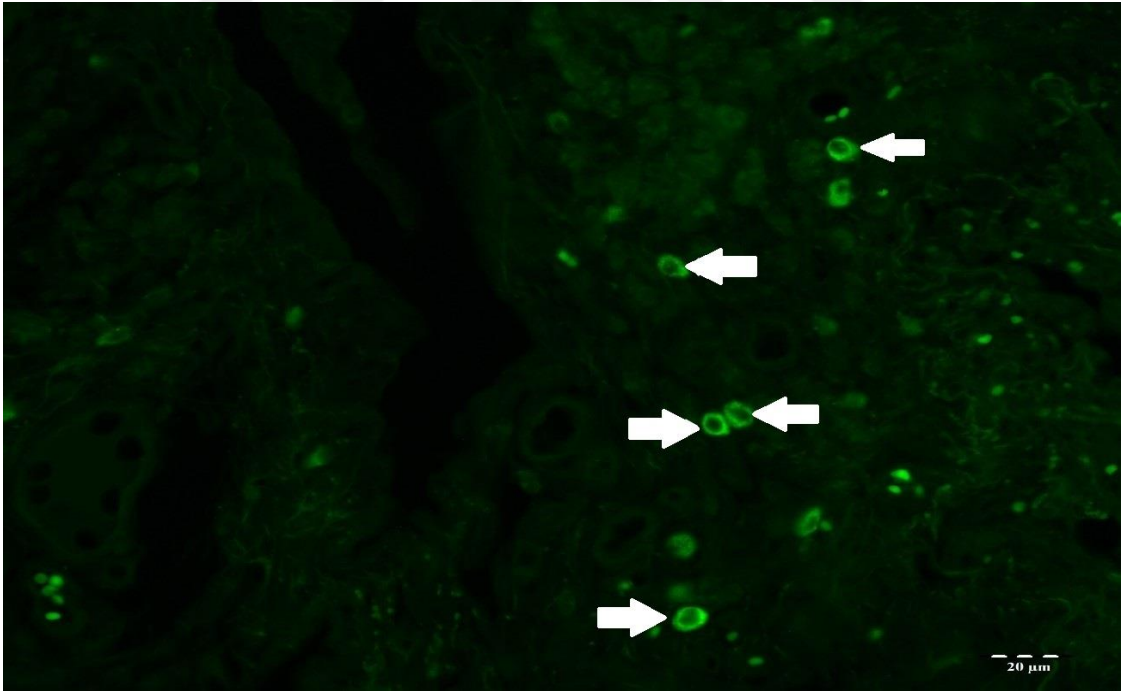
İmmunofloresan pozitifliklere immunohistokimyasal boyamada pozitifliğin gözleendiği alveolar makrofajlarda (Şekil 4.28), bronş, bronşiyol ve alveol epitel hücrelerinin sitoplazmasında (Şekil 4.29), bronş ve bronşiyol çevresinde bulunan makrofajlarda (Şekil 4.30), (Şekil 4.31), intersitisyel alanda yine makrofajlarda (Şekil 4.32), damar çevresinde (Şekil 4.33.), eksudattaki yangı hücrelerinde (Şekil 4.34.) rastlandı.



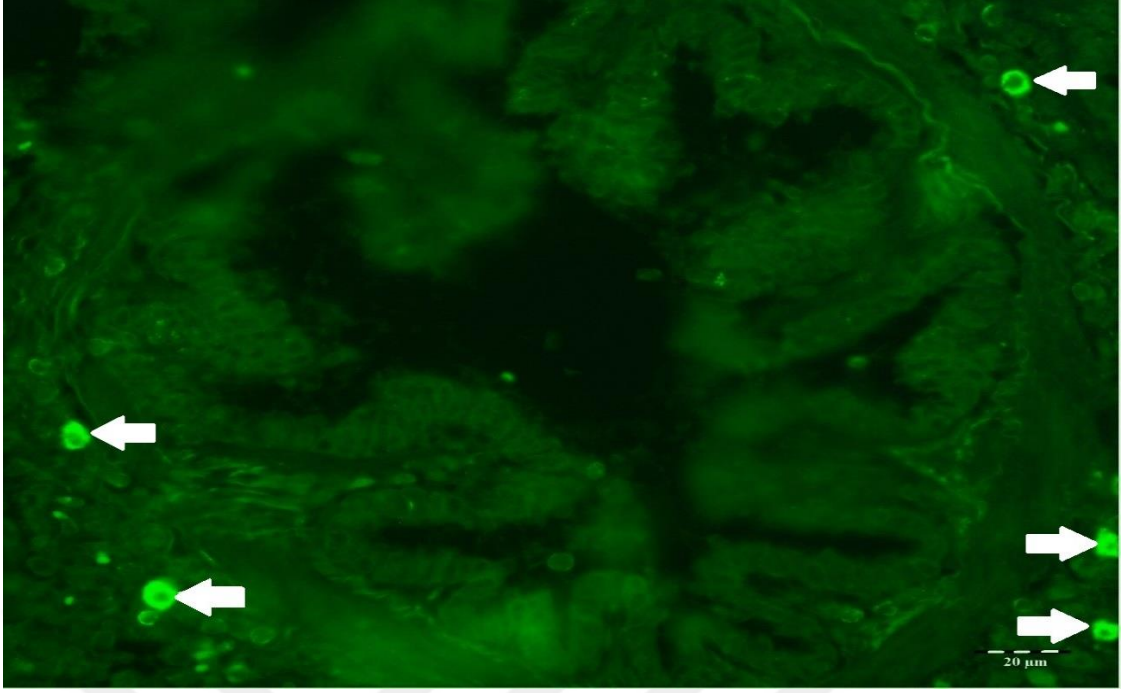
Şekil 4.28. Alveolar makrofajlarda immunpozitiflikler (oklar). FITC. 20 µm.



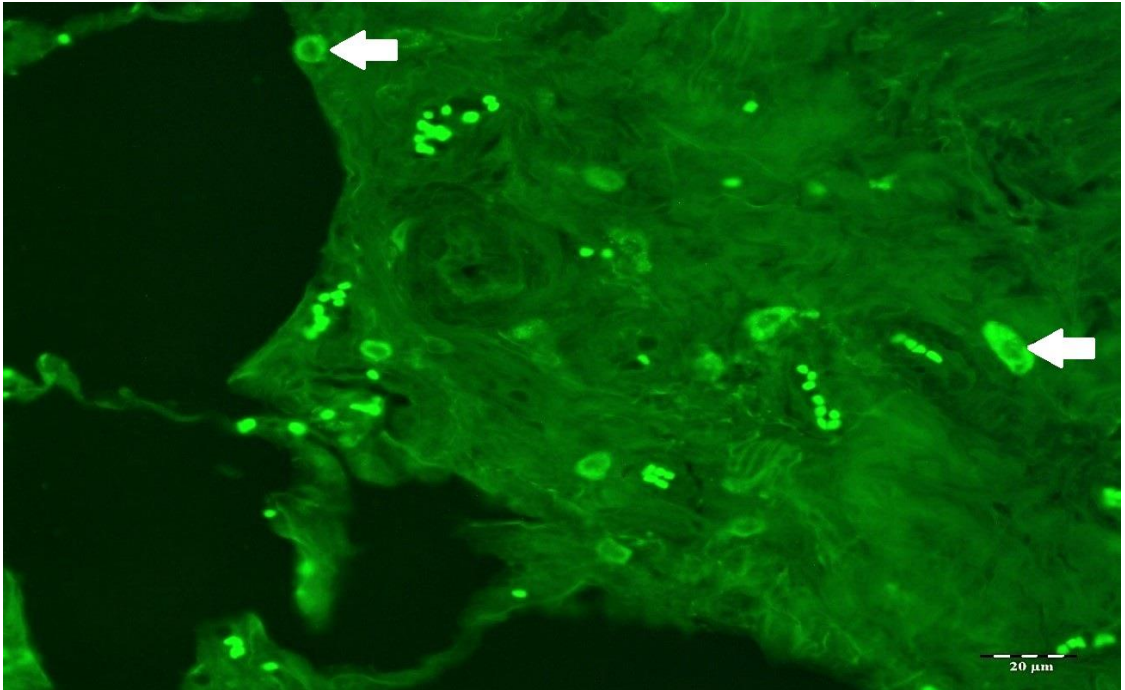
Şekil 4.29. Bronş epitelindeki immunpozitiflikler (oklar). FITC. 20 μm.



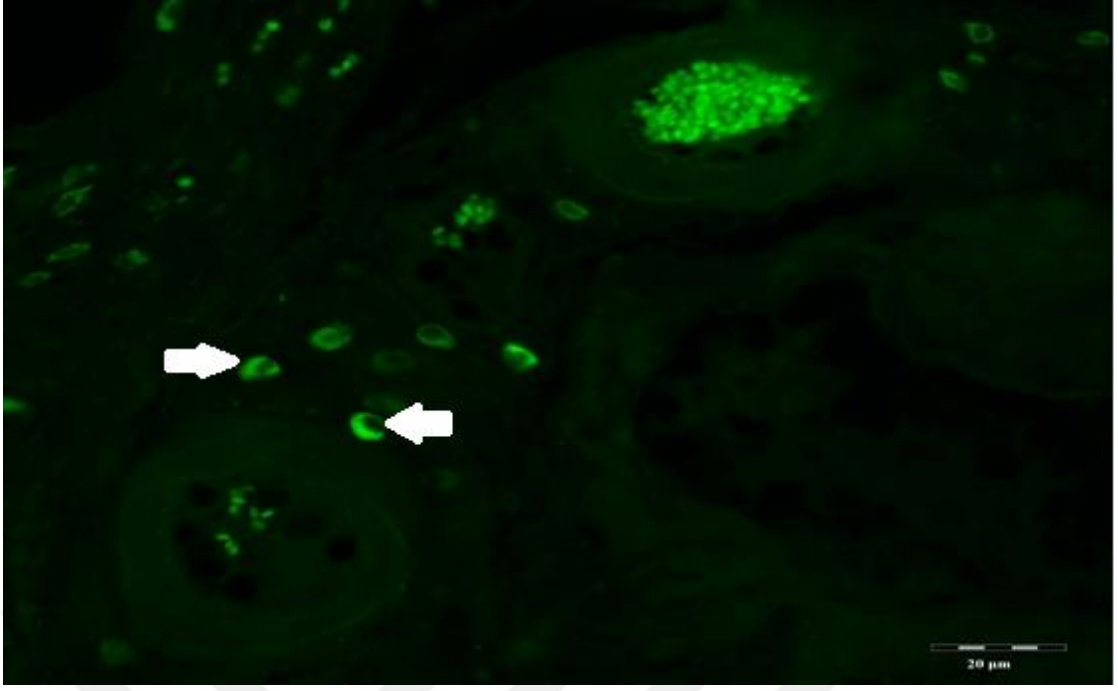
Şekil 4.30. Bronşiyol çevresindeki yangı hücrelerinde immunpozitiflikler (oklar). FITC. 20 μm.



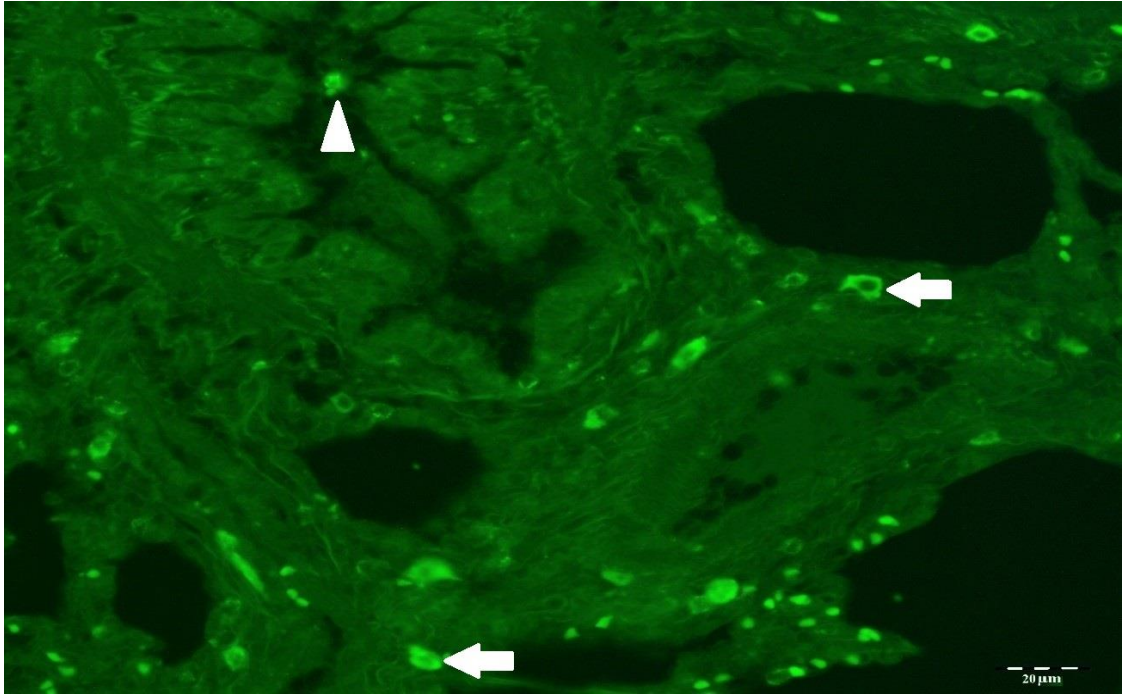
Şekil 4.31. Bronş çevresinde bulunan makrofajlarda immunpozitiflikler (oklar). FITC. 20 μm.



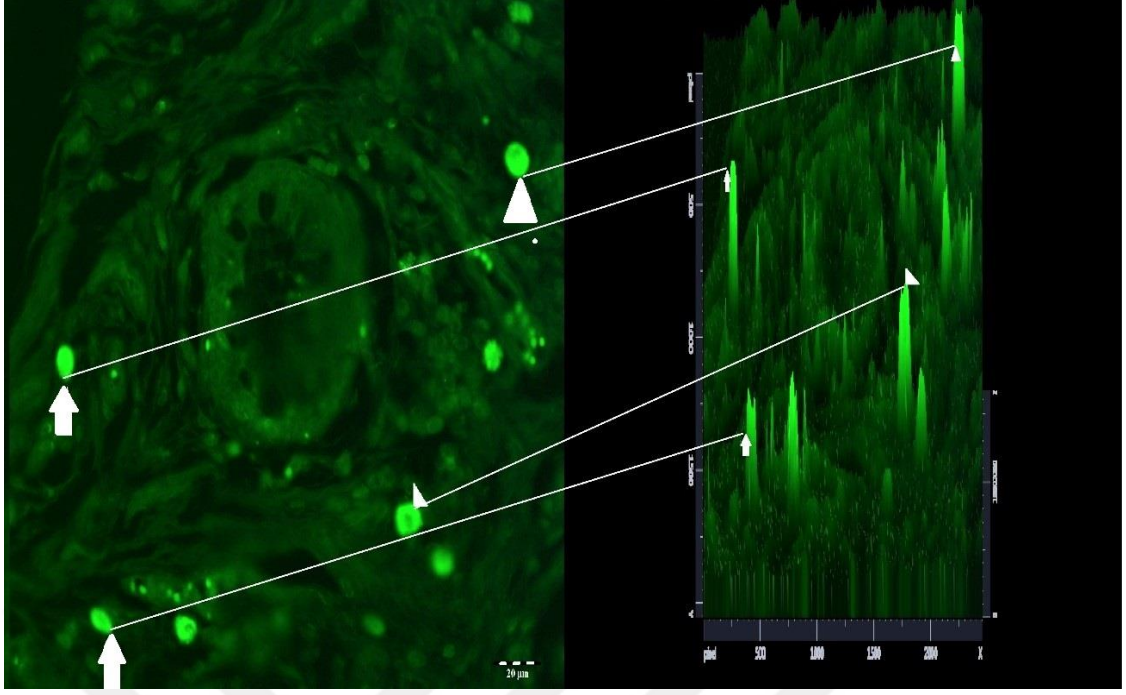
Şekil 4.32. İntersitisyel alanda immunpozitiflikler (oklar). FITC. 20 μm.



Şekil 4.33. Damar çevresinde immunpozitiflikler (oklar). FITC. 20 μm.



Şekil 4.34. Bronşiyol lümenindeki eksudatta ve çevresinde immunpozitiflik (oklar). FITC. 20 μm.



Şekil 4.35. İmmunpozitifliklerin 2.5 D boyutlu görüntüsü. FITC. 20 μ m.

4.5. Antijen ELISA (Enzym-Linked ImmunoSorbent Assay) Testi

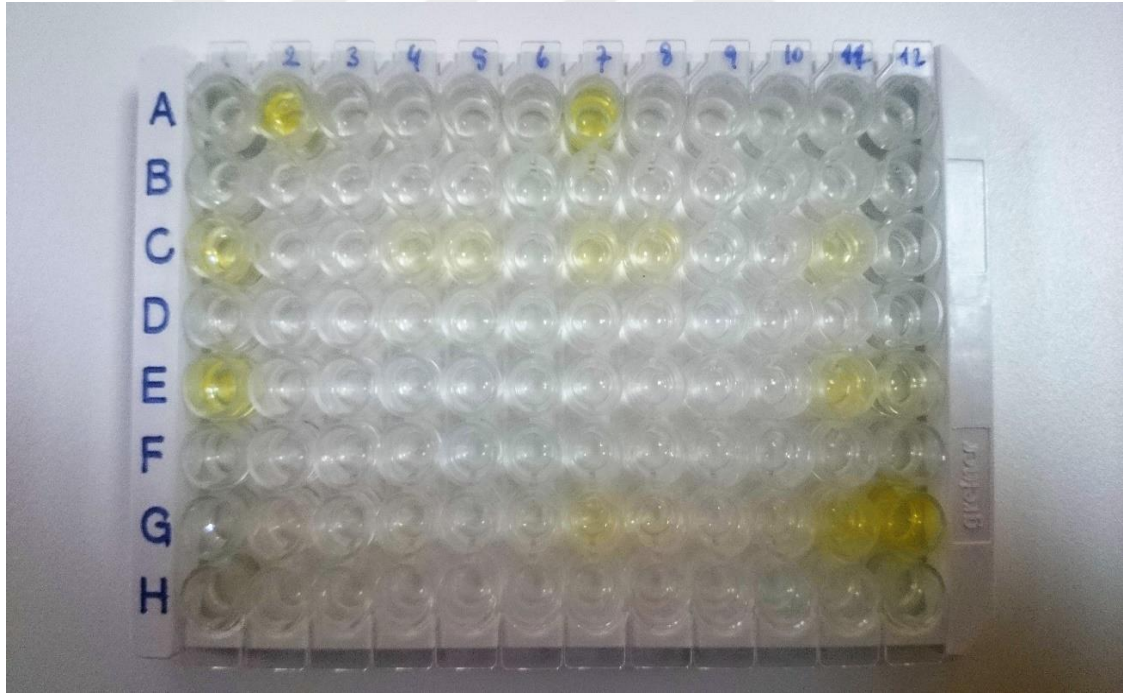
Ticari antijen ELISA kitiyle yapılan değerlendirmede makroskopik olarak pnömoni tespit edilen 120 akciğerin 117 adetine test uygulanarak, 35 örnekte pozitiflik saptandı. İmmunohistokimyasal olarak negatif sonuç veren 2 örneğin ELISA’da pozitif olarak değerlendirildi.

Tablo 4.6. 1. ELISA testi uygulanan akciğer örnekleri

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	76	120	48	91	101	73	118	99	53	39	1	2
B	76	120	48	91	101	73	118	99	53	39	1	2
C	116	93	66	87	3	69	24	106	26	109	93	7
D	116	93	66	87	3	69	24	106	26	109	93	7
E	96	77	71	12	18	50	36	8	67	117	86	14
F	96	77	71	12	18	50	36	8	67	117	86	14
G	78	84	72	54	52	105	115	95	98	76	88	PK
H	78	84	72	54	52	105	115	95	98	76	88	NK

Tablo 4.7. 1. ELISA sonuçları

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.045	0.309	0.049	0.102	0.046	0.046	0.291	0.048	0.052	0.096	0.062	0.047
B	0.029	0.053	0.049	0.049	0.058	0.045	0.049	0.051	0.047	0.037	0.083	0.053
C	0.197	0.095	0.051	0.140	0.148	0.052	0.172	0.143	0.049	0.059	0.213	0.048
D	0.049	0.047	0.047	0.049	0.051	0.05	0.056	0.062	0.052	0.041	0.072	0.049
E	0.278	0.044	0.054	0.051	0.052	0.063	0.046	0.05	0.050	0.051	0.226	0.103
F	0.059	0.037	0.049	0.057	0.055	0.054	0.068	0.048	0.048	0.060	0.068	0.050
G	0.077	0.064	0.055	0.074	0.051	0.065	0.129	0.077	0.060	0.078	0.151	1.931
H	0.056	0.039	0.047	0.050	0.05	0.05	0.050	0.053	0.088	0.051	0.048	0.066



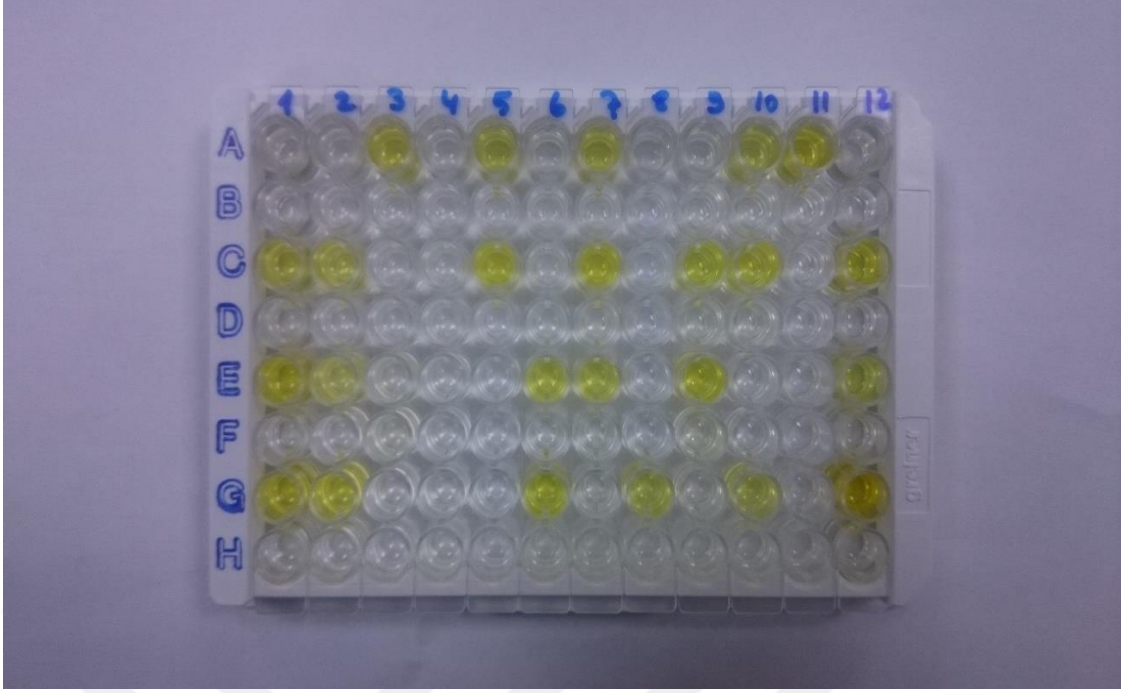
Şekil 4.36. 1. ELISA platedeki negatif ve pozitif sonuçlar

Tablo 4.8. 2. ELISA testi uygulanan akciğer örnekleri

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	79	75	83	6	34	65	107	60	43	40	112	41
B	79	75	83	6	34	65	107	60	43	40	112	41
C	84	33	103	49	55	38	119	114	100	80	74	113
D	84	33	103	49	55	38	119	114	100	80	74	113
E	57	45	10	92	56	5	104	63	89	19	42	82
F	57	45	10	92	56	5	104	63	89	19	42	82
G	109	90	68	59	2	94	45	99	70	62	23	PK
H	109	90	68	59	2	94	45	99	70	62	23	NK

Tablo 4.9. 2. Plate'deki Akciğer Örneklerinin ELISA sonuçları

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,095	0,1	0,747	0,064	0,626	0,064	0,639	0,047	0,073	0,493	1,009	0,063
B	0,058	0,08	0,065	0,055	0,049	0,058	0,061	0,049	0,071	0,073	0,071	0,054
C	0,75	0,53	0,06	0,074	0,878	0,074	0,83	0,05	0,654	0,725	0,056	1,027
D	0,065	0,06	0,062	0,07	0,052	0,064	0,074	0,047	0,083	0,077	0,054	0,059
E	1,114	0,42	0,092	0,083	0,055	0,601	0,512	0,056	0,79	0,071	0,049	0,594
F	0,068	0,06	0,103	0,065	0,051	0,066	0,071	0,049	0,111	0,055	0,047	0,085
G	0,952	0,74	0,068	0,072	0,051	0,732	0,074	0,432	0,077	0,437	0,047	2,464
H	0,064	0,06	0,056	0,07	0,048	0,069	0,068	0,052	0,063	0,056	0,046	0,069



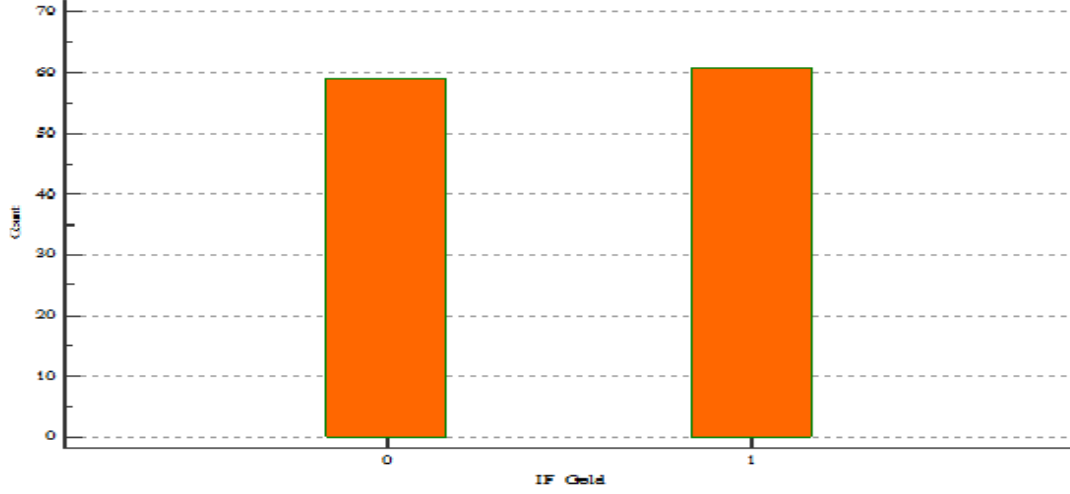
Şekil 4.37. 2. Plate'deki örneklerin pozitifliğini gösteren renk değişikliği.

4.6. İstatistiksel bulgular

a) Testlere göre negatif (0) / pozitif (1) dağılımı

a.1) İmmunofloresan Testi (IF)

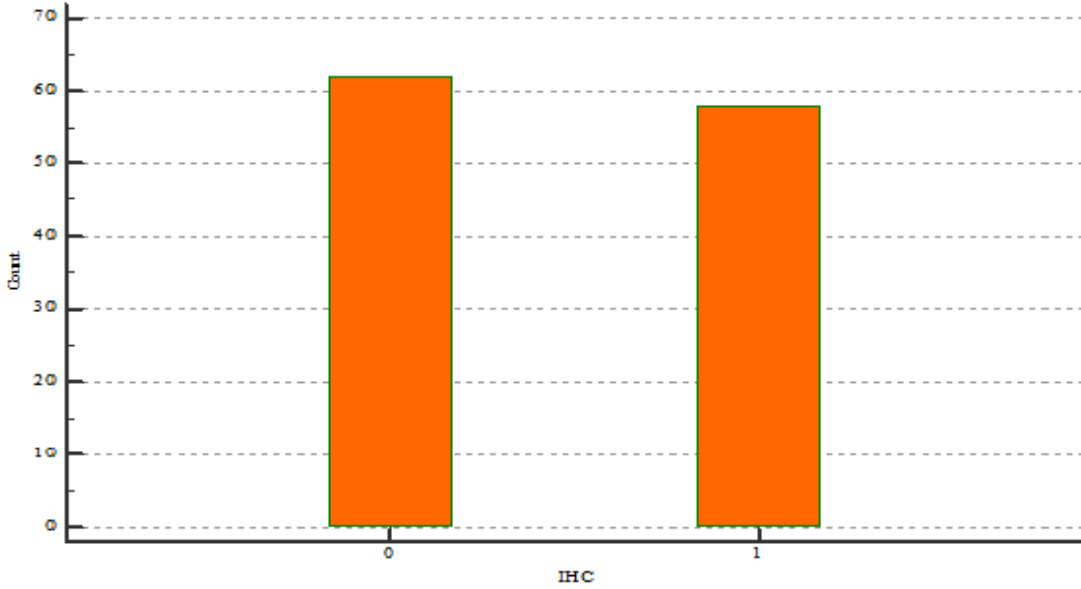
İmmunofloresan test (IF) “altın standart” olarak kabul edildiğinde, ki-kare testiyle yapılan değerlendirmeye göre % 49,2 negatif, %50,8 pozitifliğe rastlanmıştır ($X^2=0,033$ $P=0,8551$). İmmunofloresan teste göre hasta ve sağlıklı hayvanlar homojen bir dağılım göstermiştir (Şekil 4.38).



Şekil 4.38. İmmunofloresan testine göre hasta ve sağlıklı hayvanların dağılımı.

a.2. İmmunohistokimyasal (IHC) test

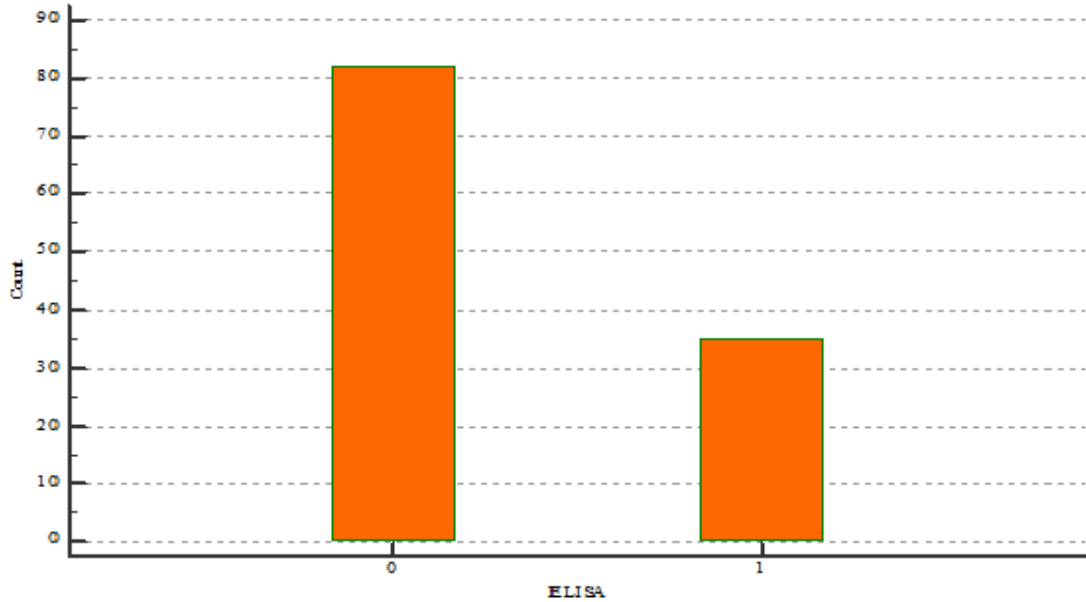
IHC boyama metodu ile 120 örnekte %51,7 negatifliğe , %48,3 pozitifliğe rastlanmıştır ($X^2=0,133$ $P=0,7150$). İmmunohistokimyasal boyama sonucu hasta ve sağlıklı hayvanlarda homojen bir dağılım gözlemlendi (Şekil 4.39).



Şekil 4.39. İmmunohistokimyasal boyama yöntemine göre hasta ve sağlıklı hayvanların dağılımı.

a.3. ELISA Sonuçları

ELISA ile yapılan değerlendirmeye göre %70,1 negatifliğe , %29,9 pozitifliğe rastlanmıştır($X^2=18,880$ $P<0,0001$). ELISA testi ile hasta hayvanlar ve sağlıklı hayvanlar arasında heterojen bir dağılım olduğu gözlemlendi (Şekil 4.40).



Şekil 4.40. ELISA testine göre hasta hayvanlar ve sağlıklı hayvanlar arasındaki dağılım.

b. Özgüllük ve Duyarlılık

Çalışmada IF testi “Gold Standart” olarak kabul edilip diğer testlerin özgüllük ve duyarlılıkları saptanmıştır. Buna göre;

b.1. İmmunohistokimyasal test

Tablo 4.10. IHC testinin IF testine göre spesifik ve sensitivitesi

ROC curve

Variable	IHC
Classification variable	IF_Gold

Sample size	120
Positive group ^a	61 (50,83%)
Negative group ^b	59 (49,17%)

^a IF_Gold = 1

^b IF_Gold = 0

Disease prevalence (%)	Bilinmiyor
------------------------	------------

Area under the ROC curve (AUC)

Area under the ROC curve (AUC)	0,875
Standard Error ^a	0,0303
95% Confidence interval ^b	0,803 to 0,929
z statistic	12,391
Significance level P (Area=0.5)	<0,0001

^a DeLong ve ark. ⁸⁹

^b Binomial exact

Youden index

Youden index J	0,7508
Associated criterion	>0
Sensitivity	85,25
Specificity	89,83

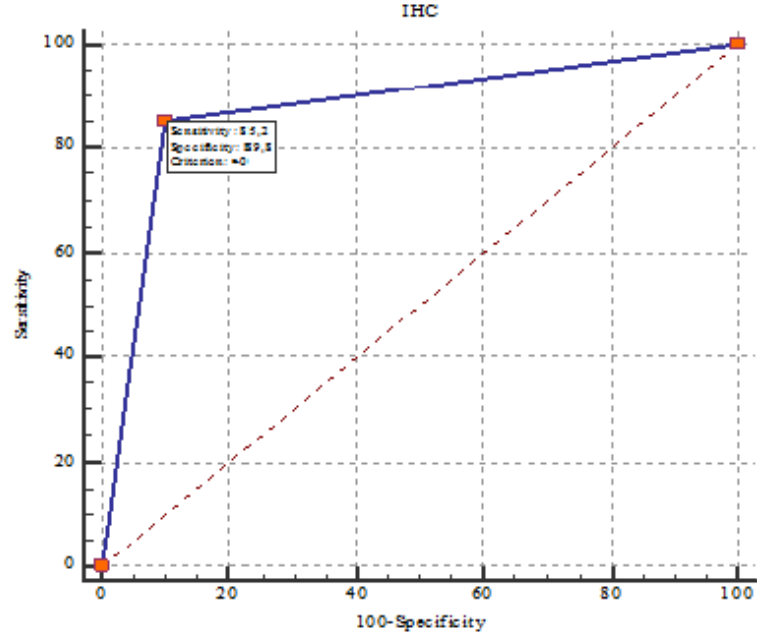
Criterion values and coordinates of the ROC curve

Criterion	Sensitivity	95% CI	Specificity	95% CI	+LR	-LR
≥0	100,00	94,1 - 100,0	0,00	0,0 - 6,1	1,00	
>0	85,25	73,8 - 93,0	89,83	79,2 - 96,2	8,38	0,16
>1	0,00	0,0 - 5,9	100,00	93,9 - 100,0		1,00

+LR= Sağlıklı olup pozitif olarak gözlenen örnek yüzdesi

-LR= Hastalıklı olup negatif olarak gözlenen örnek yüzdesi

Çalışmada IHC testinin sensitivitesi %85.2, spesifitesi ise %89.3 olarak saptandı (Şekil 4.41).



Şekil 4.41. IHC'nin IF testine göre sensitivitesi ve spesifitesi.

b.2. ELISA Testi

ELISA'nın IF testine göre sensitivitesi %55.74, spesifikliğı %98.21 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.42).

Tablo 4.11. ELISA'nın sensitivitesi ve spesifitesi

ROC curve

Variable	ELISA
Classification variable	IF_Gold

Sample size	117
Positive group ^a	61 (52,14%)
Negative group ^b	56 (47,86%)

^a IF_Gold = 1

^b IF_Gold = 0

Disease prevalence (%)	unknown
------------------------	---------

Area under the ROC curve (AUC)

Area under the ROC curve (AUC)	0,770
Standard Error ^a	0,0333
95% Confidence interval ^b	0,683 to 0,843
z statistic	8,105
Significance level P (Area=0.5)	<0,0001

^a DeLong ve ark.⁸⁹

^b Binomial exact

Youden index

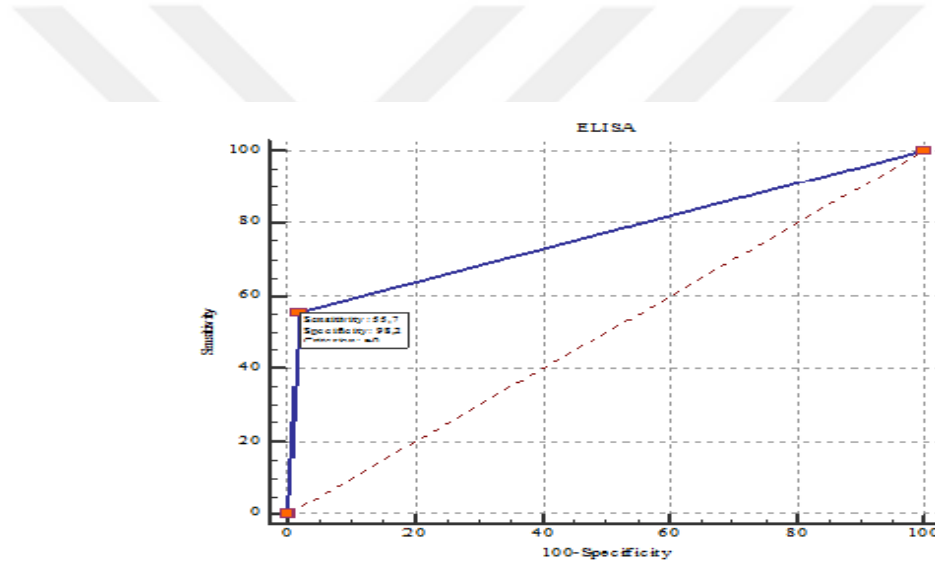
Youden index J	0,5395
Associated criterion	>0
Sensitivity	55,74
Specificity	98,21

Criterion values and coordinates of the ROC curve [\[Hide\]](#)

Criterion	Sensitivity	95% CI	Specificity	95% CI	+LR	-LR
≥0	100,00	94,1 - 100,0	0,00	0,0 - 6,4	1,00	
>0	55,74	42,4 - 68,5	98,21	90,4 - 100,0	31,21	0,45
>1	0,00	0,0 - 5,9	100,00	93,6 - 100,0		1,00

+LR= Sağlıklı olup pozitif olarak gözlenen örnek yüzdesi

-LR= Hastalıklı olup negatif olarak gözlenen örnek yüzdesi



Şekil 4.42. ELISA'nın sensitivitesi ve spesifitesi.

Tablo 4.12. Diğer testlerin IF'ye göre duyarlılık ve öznelliklerinin karşılaştırılması

Comparison of ROC curves

Variable 1	IHC
Variable 2	ELISA
Classification variable	IF_Gold

Sample size	117
Positive group ^a	61 (52,14%)
Negative group ^b	56 (47,86%)

^a IF_Gold = 1

^b IF_Gold = 0

Variable	AUC	SE ^a	95% CI ^b
----------	-----	-----------------	---------------------

IHC	0,873	0,0310	0,798 to 0,927
ELISA	0,770	0,0333	0,683 to 0,843

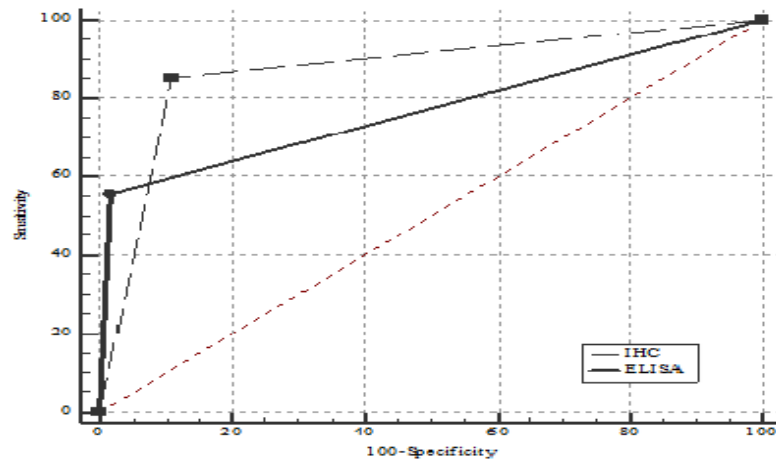
^a DeLong ve ark.⁸⁹

^b Binomial exact

Pairwise comparison of ROC curves

IHC ~ ELISA	
Difference between areas	0,103
Standard Error ^a	0,0392
95% Confidence Interval	0,0261 to 0,180
z statistic	2,626
Significance level	P = 0,0086

^a DeLong ve ark.⁸⁹



Şekil 4.43. IHC ve ELISA testinin IF'ye göre sensitivitesi ve spesifikliğı.

Bu iki test IF dikkate alındığı zaman eğri altında kalan alan bakımından IHC, ELISA'ya göre daha büyük bir alana sahip olduğu için bu iki testin IF'ye göre sensitivitesi ve spesifikliğı farklıdır.

Tablo 4.13. Ki-kare Testi ile testlerin altın standarttan farklılığının önemi

Chi-squared test

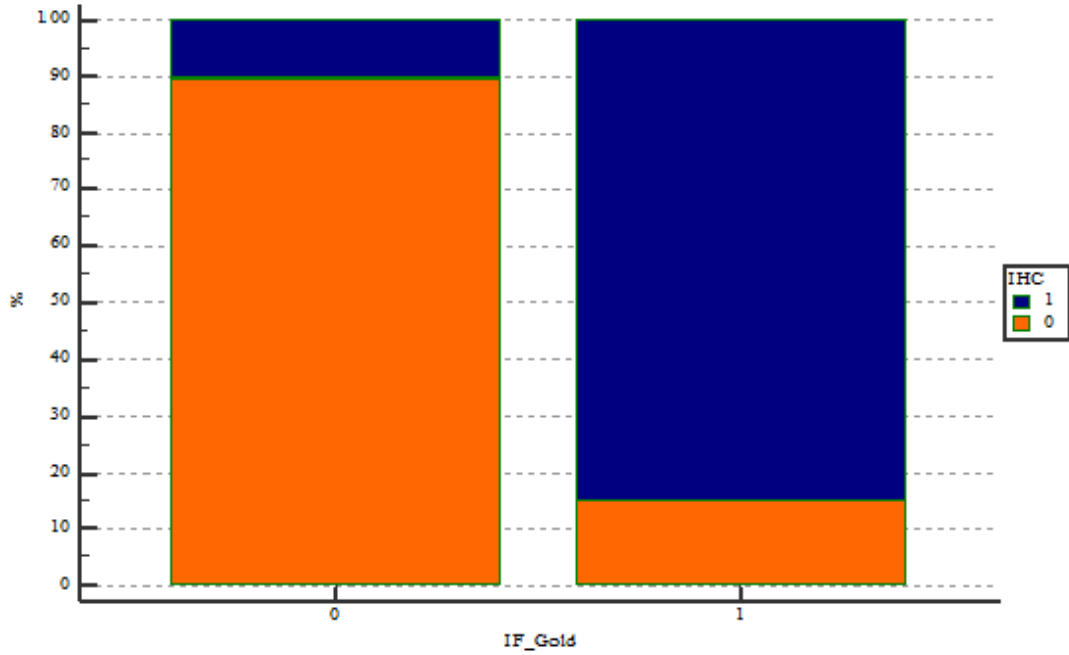
Codes X	IF_Gold
Codes Y	IHC

Codes Y	Codes X		
	0	1	
0	53	9	62 (51,7%)
1	6	52	58 (48,3%)

	59 (49,2%)	61 (50,8%)	120
--	---------------	---------------	-----

Chi-squared test

Chi-squared	67,130
DF	1
Significance level	$P < 0,0001$
Contingency coefficient	0,599



Şekil 4.44. IHC'nin sağlıklı ve hasta hayvanları belirlemedeki hata payı.

Grafikten görüldüğü üzere IF altın standard olarak kabul edildiği zaman IHC'nin sağlıklı hayvanları belirlemedeki hata payı hasta hayvanları belirlemedeki hata payından daha büyüktür. IF'nin populasyonun % 100'ünü sağlıklı olarak belirlediği durumda IHC % 90'ını sağlıklı gösterirken, IF'nin populasyonun % 100'ünü hasta olarak gösterdiği durumun IHC %85 'ini hasta olarak göstermektedir.

Tablo 4.14. Ki-kare Testi ile ELISA testinin altın standarttan farklılığının önemi

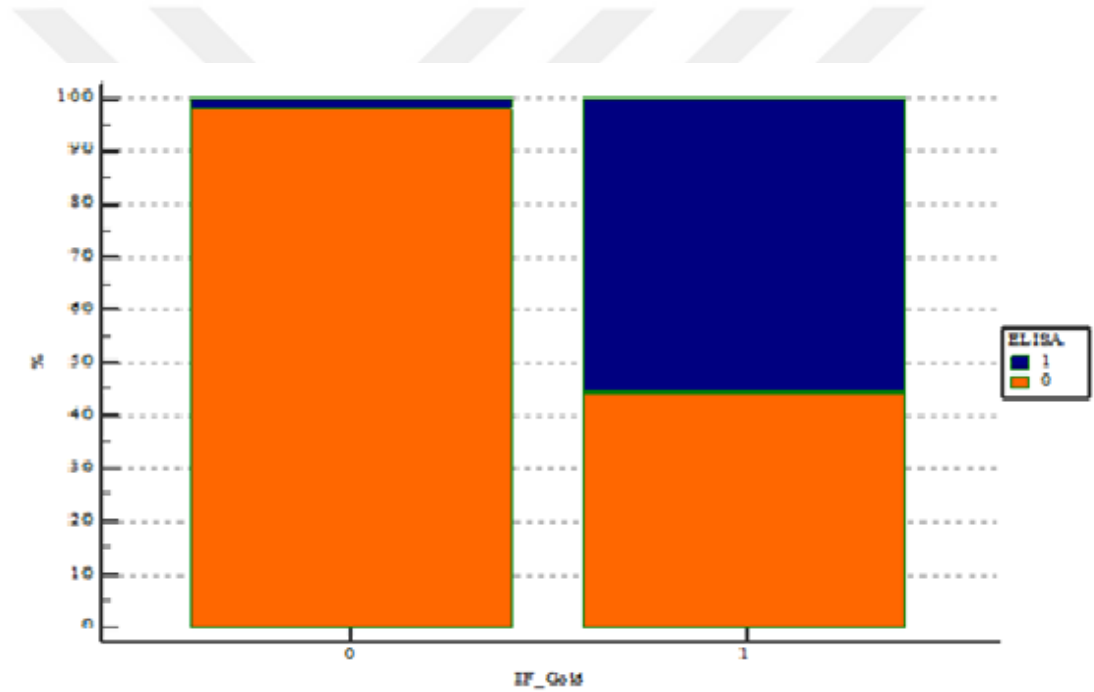
Chi-squared test

Codes X	IF_Gold
Codes Y	ELISA

Codes Y	Codes X		
	0	1	
0	55	27	82 (70,1%)
1	1	34	35 (29,9%)
	56 (47,9%)	61 (52,1%)	117

Chi-squared test

Chi-squared	40,189
DF	1
Significance level	P < 0,0001
Contingency coefficient	0,506



Şekil 4.45. ELISA'nın sağlıklı ve hasta hayvanları belirlemedeki hata payı.

Grafik incelendiğinde ELISA yönteminin sağlıklı hayvanları belirlemedeki hata payı IHC yöntemine göre daha az, hasta hayvanları belirlemedeki hata payı IHC ile yakındır. Yani IF'nin % 100 sağlıklı olarak belirlediği popülasyonun, ELISA %98'ini sağlıklı olarak göstermektedir. IF'nin popülasyonun %100'ünü hasta olarak belirlediği durumda, ELISA %55 'ini hasta olarak göstermektedir.

Tablo 4.15. Ki-kare Testi ile ELISA ve IHC testlerinin farklılığının önemi

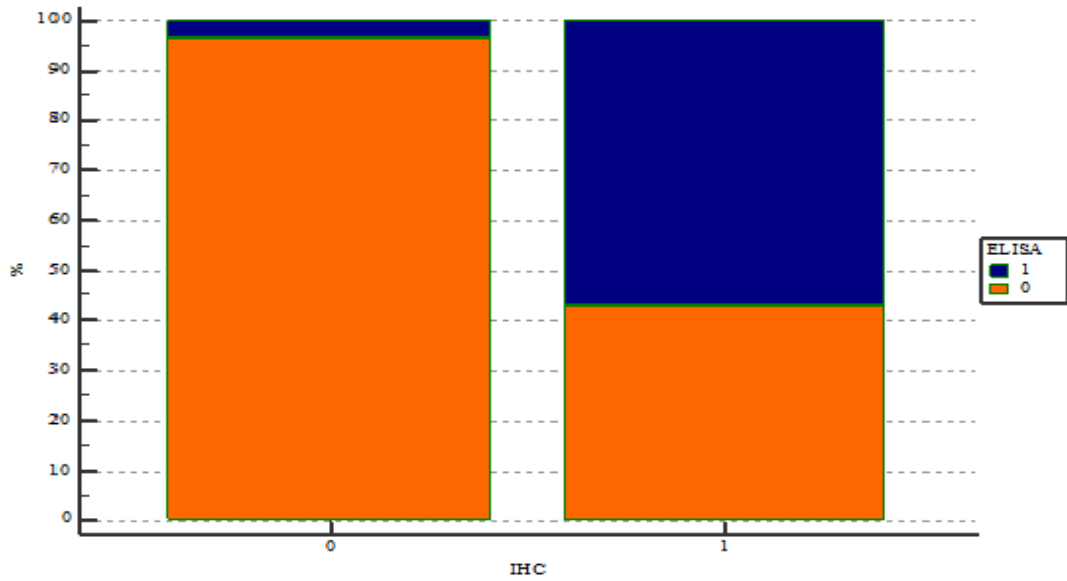
Chi-squared test

Codes X	IHC
Codes Y	ELISA

Codes Y	Codes X		
	0	1	
0	57	25	82 (70,1%)
1	2	33	35 (29,9%)
	59 (50,4%)	58 (49,6%)	117

Chi-squared test

Chi-squared	39,598
DF	1
Significance level	P < 0,0001
Contingency coefficient	0,503



Şekil 4.46. ELISA yönteminin IHC yöntemine göre sağlıklı ve hasta hayvanları belirlemedeki hata payı.

Şekil 4.44 ve Şekil 4.45'in her ikisini yorumlayacak olursak IHC'nin hastalığı belirleme yüzdesi %85 iken, ELISA'nın %55 orandadır Bundan dolayı, **her iki testin diagnostik açıdan IF'den farklı olduğu, ancak IHC'nin ELISA'ya kıyasla daha güvenilir olduğu görülmektedir.**

5. TARTIŞMA

Sığırlarda Solunum Sistemi Hastalık Kompleksi, yoğun araştırma ve önleme çalışmalarına rağmen sığır yetiştiriciliği endüstrisi için ölümcül bir sorun olmaya devam etmektedir.^{90, 91} Enfeksiyonun oluşumunda virus ve bakteriler gibi canlı hastalık etkenlerinin yanısıra çevresel veya konakçıya bağlı çeşitli stres faktörlerinin de rol oynaması hastalığı kompleks bir hale getirmektedir.⁹²

Sığır pnömonilerinin epidemiyolojik olarak prevalansının belirlenmesine yönelik yapılan çalışmalarda pnömoni oranının %3.6 ile %65.83 arasında olduğu bildirilmektedir.⁹³⁻⁹⁷ Sunulan çalışma ile Erzurum ilinde kesimi yapılan sığırlarda, kesim sonrası makroskopik olarak pnömoni tespit edilen akciğerlerde BoHV-1 etkeninin varlığı belirlenmiş ve bu akciğer örneklerinde gözlenen patolojik değişiklikler tanımlanmıştır. Doğu Anadolu Bölgesinde yapılan çalışmalarda pnömoniler %9.59⁹⁸ ile %11.96⁹⁹ oranlarında bulunmuştur. Sunulan bu çalışmada ise sığır akciğerlerinde 120/1023 (%11,73) oranında pnömoniye rastlanmıştır. Araştırmanın yürütüldüğü Doğu Anadolu Bölgesinde işletme şartlarının yetersiz, yerli ve kültür ırkı hayvanların çeşitliliğinin olduğu, hayvan hareketlerinin kontrol edilemediği, beslenmenin çoğunlukla meraya dayalı olduğu ve olumsuz iklim koşullarının hüküm sürdüğü bu illerde pnömonilerin yüksek insidenste görülmesinin nedeni olarak düşünülmektedir.

Akciğerlerin enfeksiyöz etkenlere inhalasyon yoluyla maruz kaldığı olaylarda hastalığın çoğunlukla kraniyovertral loblarda şekillendiği bildirilmektedir.³⁶ Buna karşın viral etkenlerden kaynaklanan pnömoniler genellikle dorsokaudal loblara yerleşim gösterme eğilimindedir.³⁵ Sunulan çalışmada irinli bronkopnömoniler ve fibrinli bronkopnömonilerin çoğunlukla kraniyal loblarda şekillendiği buna karşın intersitisyel pnömonilerin kaudal loblarda yerleşim gösterdiği tespit edilmiştir. Pnömoniler çoğunlukla makroskopik görünümüne göre sınıflandırılır. Ancak çoğu zaman

pnömonileri sadece makroskopik görünümüne göre sınıflandırmak görünümünün birbirine yakın olması nedeniyle zorluklara neden olmaktadır.^{3, 94, 100} Bu nedenle pnömonileri sınıflandırırken mikroskopik özelliklerine de dikkat edilmesi gerekmektedir. Bu çalışmada pnömoniler Mc Gavin ve ark.'nın⁴ yapmış olduğu sınıflandırmaya uygun olarak makroskopik ve mikroskopik özelliklerine göre değerlendirildi. Makroskopik ve mikroskopik bulgular ışığında yaptığımız değerlendirme sonucu çalışmada pnömoniler irinli bronkopnömoni 8 (%6.7), fibrinli bronkopnömoni 6 (%5), intersitisyel pnömoni 101 (%84.1) ve granülomatöz pnömoni 5 (%4,2) adet olarak tespit edildi.

Belkhiri ve ark.¹⁰¹ yaptıkları çalışmada inceledikleri 870 akciğerde %0.39 oranında irinli bronkopnömoniye rastlamış olup makroskopik olarak parazitik ve nekrotik pnömoni gözlemlemişlerdir. İrinli bronkopnömoniler incelendiğinde çalışmalarda insidensin ülkeden ülkeye, bölgeden bölgeye farklılık göstermiş olduğu dikkat çekmektedir. Yurt dışında yapılan bu çalışmalarda irinli bronkopnömoninin prevalansı %15 ile % 30.7 arasında değişirken,^{101, 102,103} ülkemizde bu oran %5.29 ile %32.32 arasında tespit edilmiştir.^{38, 98, 99} Çalışmamızda ise irinli bronkopnömoni'nin prevelansı %6.7 olarak belirlenmiştir. Çalışmalardaki bu oranların farklılığı hayvancılığın tipi, hayvan ırkı, yaşı ve örneklerin toplanma şekli ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca çalışma materyalini mezbahada kesilen besi sığırlarının oluşturması sebebi ile bölgedeki akut hastalıklı hayvanlar yerine çoğunlukla kronik nitelikli pnömonili hayvanların yer alması çalışmalarda tespit edilen düşük oranların bir nedeni olmuş olabilir. İrinli pnömonilerde mikroskopik olarak bronş, bronşiyol, alveol epitellerinde dejenerasyon ve deskuamasyon, lümenlerinde nötrofil ve bu yapılar ait dökülmüş epitel hücrelerinden meydana gelen eksudat, kronik olgularda ise yer yer lenfosit hücre infiltrasyonuna rastlandığı bildirilmektedir.^{38, 99, 101, 104, 105} Sunulan çalışmada da yukarıdaki literatürlere benzer şekilde alveol ve bronş-bronşiyol lümenlerinde bol sayıda nötrofil lökositlerin ve dökülmüş

alveol ve bronş-bronşiyol epitellerin olması, mikroskopik bulguların literatür bulgularıyla uyumlu olduğunu göstermektedir.

Sığır akciğerlerinde yapılan çalışmalarda fibrinli pnömoniye % 4.52¹⁰¹ oranında ve % 9.6¹⁰³, ülkemizde ise yapılan çalışmalarda %8 ile %16.35 oranında fibrinli pnömoni gözlemlendiği bildirilmiştir. ^{38,98,99} Bu çalışmalardan %8 olarak bildirilen oran Altun ve Sağlam⁹⁹ tarafından ilimizde yapılan bir çalışmada tespit edilmiştir. Sunulan bu çalışmada da ise % 5 oranında fibrinli pnömoni tespit edilmiştir. Her iki çalışmada da benzer insidensin çıkması ilimizde fibrinli pnömonilerin insidensi azalsada önemini hala koruduğunu hala göstermektedir. Bu nedenle fibrinli pnömoniye neden olan yapıcı faktörler ile hazırlayıcı faktörlerin iyi irdelenmesi gerekmektedir. Fibrinli pnömoniler, çoğunlukla akciğerin kraniyovertral loblarında, lobar pnömoni şeklinde ve plöranın eşlik ettiği alacalı mermer görünümündeki plöropnömoniye sahiptir.³⁶ Sunulan çalışmada olguların lobar karakterde olması, çoğunlukla kraniyal loblarda gözlenmesi, alacalı mermer görünümü ve plöranın genelde akciğere yapışık olması literatür^{37, 38, 99} verilerine uygun olarak görülmüştür. Yapılan çalışmalarda fibrinli pnömonilerde mikroskopik olarak kapillar damarlarda yoğun hiperemi, bronş, bronşiyol ve alveol lümenlerinde fibrinden zengin bir eksudat, dökülmüş epitel hücreleri bulunurken, plöra ve interlobuler septal dokuda kalınlaşma gözlenmiş olup sunulan çalışma ile benzer olduğu belirlenmiştir. ^{38, 99, 101, 104} Sunulan çalışmada tespit edilen 6 fibrinli bronkopnömoninin 4'ünde BoHV-1 pozitifliğinin gözlenmesi fibrinli bronkopnömonilerin altında BoHV-1 enfeksiyonunun olabileceğini göstermektedir. İlimizdeki fibrinli bronkopnömonilerin oluşmasında başka virusların etkisinin de olduğunu ortaya koyacak çalışmalara ihtiyaç vardır.

İncelenen literatür kaynaklarında intersitisyel pnömoninin diğer pnömonilere göre daha yüksek oranda olduğu bildirilmektedir.^{36, 38, 98, 99} İntersitisyel pnömoniye, yurt

dışında % 7.2 ile % 50 arasında rastlandığı,^{102, 103} Türkiye’de ise %20.93 ile %45.25 oranında rastlandığı bildirilmiştir. ^{38,98} Benzer şekilde Erzurum ilinde yapılan bir çalışmada ise % 42 oranında intersitisyel pnömoni olduğu bildirilmektedir.⁹⁹ Sunulan bu çalışmada ise % 84.1 oranında intersitisyel pnömoniye rastlanmıştır. Sunulan çalışmada intersitisyel pnömonilerde gözlenen akciğerlerin kolloba olmaması, kıvamlı, kesit yüzeyinin kuru, plöranın etkilenmemiş ve subplöral lenf düğümlerinin şişkin olması gibi makroskobik bulguların diğer çalışmalarla^{36, 99, 101} uyumlu olduğu görülmüştür. Yapılan çalışmalarda mikroskobik incelemelerde, interalveolar septumlarda kalınlaşma, peribronşiyal-peribronşiyoler lenfoid doku ve epitelde hiperplazi, bronkointersitisyel pnömoni olgularında lümende yer yer eksudata rastlandığı, bazı literatürlerde sinsityal dev hücrelerin bulunduğu bildirilmiştir.^{4, 38, 99, 104} Sunulan çalışmada elde edilen interalveolar septumda kalınlaşma, bronş ve bronşiyol lümenlerinin boş, peribronşiyal lenfoid dokuda hiperplazi’nin şekillenmesi gibi mikroskobik bulgular literatür bilgisini desteklemektedir. Sunulan çalışmada BoHV-1 etkeni hem IHC hemde IF yöntem ile tespit edilen 101 intersitisyel pnömoni örneğinin yaklaşık yarısında bulunmuştur. Bu durum viral etkenlerin intersitisyel pnömonilerde önemli oranda bulunduğunu belirten diğer literatür bilgileri ile desteklenmektedir.^{4, 38}

Granülomatöz pnömoniler kronik seyirli, genellikle akciğerlerde lokal ya da diffuz olarak yerleşen, farklı büyüklükte granulomlara neden olan pnömonilerdir.¹⁰⁶ Granülomatöz pnömonilere, özel boyalarla belirlenen *Mycobacterium* spp., *Actinobasillosis* spp., gibi bakteriyel etkenler, mantar etkenleri veya silikoz gibi yabancı cisimler neden olmaktadır.^{106, 107} Sunulan çalışmada 5 (% 4.2) adet granülomatöz pnömoniye rastlanmış olup etken identifikasyonu yapılmamıştır. Tespit edilen bu 5 örneğin 3’ünde aynı zamanda BoHV-1 etkenine rastlanmış olması, granülomatöz pnömonilerde viral etkenlerinde bulunabileceğini göstermiştir.

Sığırlarda primer olarak solunum sisteminde hastalık oluşturan viral etkenler BRSV, PI-3 ve ayrıca BoHV-1'dir.¹⁰⁸ BoHV-1 etkeni hastalık oluşturduktan sonra solunum veya genital mukozayı innerve eden sinir gangliyonlarında latent olarak kalır ve immunsupresyon durumlarında böyle hayvanlar virüsü belli aralıklarla saçabilirler. BoHV-1 ile enfekte hayvanlarda *Mycoplasma haemolytica*, *Pasteurella multocida* ve *Histophilus somnis* gibi sekonder etkenler kolaylıkla gelişerek ölümlere neden olabilirler.¹⁰⁹

BoHV-1 enfeksiyonları akciğerlerde bronş ve bronşiyol epitel hücrelerinde, sinsityal dev hücrelerde eozinofilik intranükleer inklüzyon cisimleri ile karakterizedir.¹¹⁰ Sunulan çalışmada BoHV-1'in tespit edildiği olgularda bronş ve bronşiyollerde nekroz tablosuna rastlanırken, sinsityal dev hücrelerde eozinofilik intranükleer inklüzyon cisimleri gözlenmemiştir. Sunulan çalışmada inklüzyon cisimciklerinin gözlenmemesi, mezbahada kesilen hayvanlar arasından seçilmesi, bu hayvanlarda hastalığın kronik yada latent olduğunu akla getirmektedir. Bu durumda da inklüzyon cisimciklerinin görülmemesi literatür bilgi ile uyumluluk göstermektedir.^{3, 98, 110}

Günümüzde BoHV-1'in teşhisinde virüs izolasyonu, PCR, Western Blot, dokudan floresan antikor tekniği, ELISA ile antijen belirleme ve immunperoksidaz boyama yöntemleri kullanılmaktadır.^{44, 111, 112} Sunulan çalışmada 120 pnömonili akciğer örneğinden Antijen ELISA testi, IHC boyama yöntemi ve indirek floresan antikor tekniğiyle BoHV-1 pozitiflikleri belirlenmiştir.

ELISA yöntemi kullanılarak BoHV-1 etkenin belirlenmesine yönelik çalışmalar dünyada ve ülkemizde çoğunlukla seroprevalans çalışması şeklinde olup, dokudan direk antijen ELISA yöntemi ile etken belirlenmesine yönelik çalışmalar oldukça sınırlıdır. Dünya'da yapılan çalışmalarda antikor ELISA testi ile serum örneklerinde % 17.4 - %70 oranında pozitiflik bulunmuştur.^{113, 114,115} Kampa ve ark.⁶¹ Tayland'da yaptıkları

çalışmada 2002 ile 2004 yılları arasındaki topladıkları tank süt örneklerinde sırasıyla %61 ve %48 oranında BoHV-1 pozitifliğine rastlamışlardır. Singh ve ark.¹¹⁶ yine antijen ELISA yöntemi ile Hindistan'da yapmış oldukları çalışmada 333 adet nasal swap örneğinden %11.1 pozitifliğe rastlamışlardır. Genel bir değerlendirme yapılırsa dünyada BoHV-1'in seroprevalansı Afrika'da %14-86^{24,25}, Amerika'da %36-48⁵¹, Çin'de %36²⁶, İngiltere'de %43²⁷ olarak bildirilmiştir.

Türkiye'de yapılan çalışmalar daha çok serolojik tanı yöntemi üzerine olup, birçok bölgede et ve süt sığırları arasında etken yaygın olarak tespit edilmiştir.^{24, 31, 33, 117, 118} Türkiye'de virusun ilk tespiti Erhan ve ark.³³ tarafından 1971 yılında İnanlı Çiftliği ve Karacabey Harası'nda 100 sığıra ait kan örneğinden serum nötralizasyon testi kullanılarak yapılmış ve bu çalışmada % 28 oranında spesifik antikor pozitifliği belirlenmiştir. Bu çalışmadan sonra çok sayıda virolojik ve serolojik çalışma yapılmıştır. Alkan ve ark.²⁸ kamu işletmelerinde yaptıkları çalışmada IBR enfeksiyonunun seroprevalansını % 59,70 olarak belirlemişlerdir. Gürtürk ve ark.³¹ 'nın yaptıkları çalışmada, 928 adet sığır kan serumunda BoHV-1 virusuna karşı % 56,1 oranında spesifik antikor varlığı saptandığı bildirilmiştir. Güler ve ark.¹¹⁹ mezbahada kesimi yapılan sığırlardan aldıkları kan serumları ile %35 oranında seropozitiflik elde etmişlerdir. Türkiye'de yapılan başka bir çalışmada IBR-IPV antikorları yönünden kontrol edilen 486 adet kan ve süt örneklerinden kan serumlarının 359 tanesinde (%74), süt serumu örneklerinin 209 adedi (%43) pozitif olarak gözlenmiştir.²⁹ Karadeniz Bölgesinde yapılan çalışmada Samsun'da 302 sığır kan serumundan 133 adedi (%44.03), Sinop'ta 62 kan serumundan 23 adedi (%37.09), Amasya'da 62 kan serumundan 42 adedi (67.74), Tokat'ta 75 kan serumundan 26 adedi (%34.66) seropozitif olarak bildirilmiştir.¹¹⁸ Kuzeydoğu Anadolu Bölgesinde halk elindeki sığırlarda Yıldırım ve Burgu'nun⁵ yaptıkları çalışmada BoHV-1 seropozitifliği % 59,48 olarak bildirilmiş olup, aynı

çalışmada Erzurum ilinde 82 kan örneğinden 31 adetinde (% 37.8) pozitiflik görülmüştür. Serolojik olarak yapılan ELISA testlerinde antikorların pozitif olarak belirlenmesi çoğu kez anlamlı olmamaktadır. Antikor yönünden serum pozitifliği çoğu kez geçirilmiş yada latent bir enfeksiyonu gösterebildiği gibi solunum sistemi dışından kaynaklanan bir enfeksiyonu da işaret edebilmektedir. Bu nedenle dokuda antijenin gösterilmesi hastalık etkeni için en doğru yol olmaktadır.

Antijen ELISA ile dokudan BoHV-1'in belirlenmesine yönelik çalışmalar dünyada ve ülkemizde yok denecek kadar azdır. Elhassan ve ark.¹²⁰ vajinal svap, uterus sıvısı, plasenta ve kan örneklerinde antijen ELISA ile yaptıkları çalışmada %0 ile %33.3 arasında BoHV-1 pozitifliği tespit etmişlerdir. Saeed ve ark.^{121, 122} ise deve akciğerlerinde BoHV-1'in antijen ELISA ile belirlenmesine yönelik yaptıkları iki farklı çalışmada %2 ve %1.6 oranında pozitifliğe rastladıklarını bildirmektedirler. Ülkemizde dokudan antijen ELISA ile BoHV-1 in belirlenmesine yönelik bir çalışmada 24 sığır akciğerinde pozitifliğe rastlamamıştır.¹⁰⁸ Sunulan çalışmada antijen ELISA ile 117 pnömonili sığır akciğerinde 35 adet (%29,9) pozitifliğe rastlanmıştır. Sunulan çalışmada kullanılan Antijen ELISA kitinde plate'nin tabanı virusun tüm yüzey glikoproteinleri ile kaplıdır. ELISA tabanlı çalışmalarda glikoprotein yapılarının antikorla temas etmesi gerekir. Çalışmada Antijen ELISA ile pozitiflik oranının yapılan IHC ve IF yöntemlerinde elde edilen pozitiflik oranından düşük çıkmasında dokuların dondurma-çözdürme ve homojenizasyon aşamasında virusun bu glikoprotein yapılarını kaybetmesi ve antikorla bağlanmanın tam anlamıyla oluşmamasıyla açıklanabilir.

Dokularda BoHV-1 antijenlerinin IHC yöntemi ile belirlenmesine yönelik çok sayıda çalışma bulunmaktadır.^{98, 110, 123-126} Narita ve ark.¹¹⁰ endobronşiyol uygulama ile buzağılarda topladıkları örneklerde Pasteurella haemolytica ve BoHV-1 etkenlerini incelemişler ve BoHV-1 immunpozitifliğinin solunum yollarının tamamında

gözlendiğini bildirmişlerdir. Araştırmada enfekte olan bu hücrelerde dejenerasyon, deskuamasyon ve rejenerasyona da rastladıklarını bildirmişlerdir. Crook ve ark.¹²⁶ 400 abort fötustan otolize olmayanların organlarını (beyin, fötal sıvı, kalp, karaciğer, akciğer, plasenta) inceledikleri çalışmada 9 akciğerden 5'inde (% 55.6) BoHV-1 pozitifliğine rastlamışlardır. Smith ve ark.¹²³ 87 abort fötusun organlarından (akciğer, karaciğer, böbrek, dalak, timus) immunperoksidaz yöntemiyle BoHV-1 antijenini belirlemek için yaptıkları çalışmada 17 (%19.5) akciğerde immunpozitifliğe rastlamışlardır. Szeredi ve ark.¹²⁴ 48 buzağı akciğerinde 47 adet pnömoni olgusuna rastlamış ve bu 47 akciğerin enfeksiyöz ajan tespit edilen 40 tanesinden 1'inde (%2.5) immunohistokimyasal boyama yöntemiyle BoHV-1 pozitifliğine rastlamışlardır. Aynı çalışmada BoHV-1 antijenleri bronş, bronşiyol ve alveol epitel hücrelerinin çekirdek ve sitoplazmasında, bronş, bronşiyol ve alveolar yangısal eksudatta, en yaygın ise akut doku nekrozu olan bölgelerde gözlenmişlerdir. Moeller JR. ve ark.¹²⁵ 2980 buzağı akciğeri incelemiş ve bunlardan 62'sinde BoHV-1 immunpozitifliğine rastlamışlardır. İmmunpozitif boyanmaya bronş, bronşiyol epiteli, stromal konnektif doku ve bazı damar duvarlarında rastlanmıştır. Çeribaşı ve ark.⁹⁸ 247 adet pnömonili sığır akciğerinden PI3, BRSV, BAV3 ve BoHV1 antijenlerini belirlemeye yönelik yaptıkları çalışmada 6 adet (2.43%) BoHV-1 immunpozitifliği gözlediklerini bildirmektedirler. İmmunpozitif boyanmanın bronşiyal, bronşiyol ve alveolar epitel hücrelerinde intrasitoplazmik olarak şekillendiği kaydedilmektedir. Ayrıca bronşiyollerin lümenindeki eksudatta, alveolar makrofajlarda da immunpozitiflikler görüldüğü bildirilmektedir. Sunulan çalışmada 120 pnömonili akciğerin 58 (%48.3)'inde BoHV-1 IHC immunpozitifliği belirlenmiştir. BoHV-1 immunpozitifliği pnömoni tiplerine göre incelendiğinde, 50 intersitisyel pnömonide, 1 irinli pnömonide, 4 fibrinli pnömonide, 3 granülomatöz pnömonide rastlanmıştır. Lokalizasyon olarak immunpozitiflikler bronş, bronşiyol epitelinde, BALT'ta

lenfositlerde, eksudatta, interalveolar septumda lenfosit ve makrofajlarda, damar duvarında, plörada gözlendi. Elde edilen bu bulgular ile yapılan çalışmaların uyumlu olduğu dikkati çekti.

İmmunofloresan boyama tekniği, viral antijenleri hücre kültürü ve doku örneklerinde tespit etmekte kullanılan bir yöntemdir.¹²⁷ Bu teknik virüs izolasyonu ile kıyaslandığında daha kısa zamanda ve kolaylıkla uygulanabildiği için tercih edilmektedir. Özellikle ölümden 48 saate kadar canlı kalabilen virüslerin belirlenmesinde daha sensitif olduğu vurgulanmaktadır.¹²⁸ Yapılan çalışmalarda sığırlarda BoHV-1 etkeninin solunum sisteminde oluşturduğu enfeksiyonların teşhisinde immunofloresan yönteminin hızlı teşhis için başarılı bir şekilde kullanıldığı görülmektedir.^{52, 98, 112, 129} Her ne kadar bu teknik virüsün hızlı ve kolay tespiti için yaygın olarak kullanılsada dokunun morfolojik yapısını belirlemede yeterli olmamaktadır.⁹⁸ Nettleton ve ark.¹²⁹ 107 IBR salgınından şüphelendikleri olgudan 200 adet swap almış ve bu swaplardan indirek floresan yöntemiyle %14.5 oranında immunpozitifliğe rastlamışlardır. Graham ve ark.⁵² 87 akut ve iyileşmiş durumdaki hayvandan aldıkları serumlardan indirek immunofloresan yöntemiyle 58 (%66.6) adet BohV-1 spesifik IgM belirlemişlerdir. Intisar ve ark.¹²² 186 pnömonili deve akciğerinden antijen ELISA testiyle %1.6 BoHV-1 pozitifliğine rastlamış ve immunofloresan yöntemiyle de % 1.6 pozitiflik bularak bütün ELISA pozitiflerin doğruluğunu onaylamıştır. Çeribaşı ve ark.⁹⁸ 247 adet pnömonili sığır akciğerinde direk floresan antikor yöntemiyle 11 adet (%4.45) immunpozitifliğe rastlamıştır. İmmunpozitifliklere alveol ve bronş, bronşiyol epitelinde intrasitoplazmik olarak rastlamışlardır. Sunulan çalışmada 120 pnömonili sığır akciğerinden immunofloresan boyama yöntemiyle 61 adet (%50.8) immunpozitifliğe rastlanmıştır. İmmunpozitiflikler bronş, bronşiyol ve alveol epitellerinde, interalveolar bölgelerde ve eksudatta

intrasitoplazmik olarak rastlanmıştır. Bu bulgular literatür verileriyle uygunluk göstermektedir.

Literatürde altın standart^{130, 131} olarak kabul edilen IF testi bu çalışmada da altın standart olarak kabul edildi. IHC'nin IF testine göre spesifikliğı %89.3 sensitivitesi %85.2, ELISA'nın IF testine göre sensitivitesi %55.74, spesifikliğı %98.21 olarak elde edilmiştir. Collins ve ark.¹²⁰ BoHV-1 in varlığını belirlemeye yönelik yaptıkları çalışmada antijen capture ELISA yönteminin sensitivitesini % 64, spesifitesini ise % 100 bulmuşlardır. Yaptığımız çalışmada da ELISA'nın sensitivitesi düşük, spesifitesi yüksek yüzdeli olarak görünmektedir. Çalışmamızda kullandığımız IHC ve Antijen ELISA testi IF dikkate alındığında farklı AUC'ye sahiptir. Yani bu iki testin IF'ye göre sensitivite ve spesifiteleri farklıdır. Bu iki testten IHC'nin sensitivitesi ve spesifitesinin ELISA yöntemine göre yüksek olması saha şartlarında IHC ve ELISA ile yapılacak testlerde IHC'nin daha güvenilir olduğunu göstermektedir.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada sığır yetiştiriciliğinde önemli verim kayıplarına neden olan solunum sistemi hastalık kompleksinin oluşmasında önemli bir yer tutan BoHV-1'in pnömonilerindeki yaygınlığının farklı teşhis metodları ile ortaya konulması amacıyla yapılmıştır. Sunulan çalışmada pnömonili sığır akciğerlerinde BoHV-1'in belirlenmesine yönelik yapılan immunohistokimyasal boyamada %48.3 ve immunofloresan boyamada % 50.8 immunpozitifliğe, antijen ELISA testinde ise %29.9 pozitifliğe rastlanmıştır. Bu bulgular dikkate alındığında ilimizdeki sığır pnömonilerinde BoHV-1 etkeninin yaygın olarak bulunduğu gözlenmektedir.

Teşhis amacı ile kullanılan bu yöntemlerin kendi aralarında istatistiksel olarak karşılaştırılması sonucunda IF boyama yönteminin teşhiste IHC ve ELISA testinden farklı olduğu saha şartlarında pozitiflikleri belirlemede ise IHC'nin ELISA testine göre daha güvenilir olduğu sonucuna varılmıştır. Bundan dolayı ELISA testinin her ne kadar laboratuvar şartlarında hızlı ve kolay uygulanabilirlik avantajı olsa da enfeksiyonun varlığının daha doğru tespiti açısından immunohistokimyasal ve immunofloresan testlerinin yapılması gerektiği tespit edilmiştir.

KAYNAKLAR

1. Hartel H, Nikunen S, Neuvonen E, Tanskanen R, Kivela SL, Aho R, Soveri T, Saloniemi H. Viral and bacterial pathogens in bovine respiratory disease in Finland. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 2004, 45: 193-200.
2. EL-Bayoumy MK AK, Elgayed SS, Allam AM, Taha SS. Antiviral competence of broad-spectrum antiinfective drug artesunate against *Bovine Herpesvirus-1*. *International Journal of Basic and Applied Virology*, 2013, 2: 06-13.
3. Maxie M, Jubb K. *Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals*. 5th ed. Philadelphia, 2007: 523-629.
4. Zachary JF, Donald M, Gavin M. *Pathologic basis of veterinary disease*. 4th ed. Elsevier Health Sciences, 2006:462-532
5. Yıldırım Y. Kuzeydoğu Anadolu bölgesindeki sığırlarda mavidil (BT), IBR, PI-3, EBL ve BVD enfeksiyonlarının seroprevalansı. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Viroloji Anabilim Dalı. Doktora, Ankara: Ankara Üniversitesi, 2003.
6. Van der Fels-Klerx H, Sørensen JT, Jalvingh A, Huirne R. An economic model to calculate farm-specific losses due to bovine respiratory disease in dairy heifers. *Preventive veterinary medicine*, 2001, 51: 75-94.
7. Griffin D. Economic impact associated with respiratory disease in beef cattle. *Veterinary Clinics of North America-Food Animal Practice*, 1997, 13: 367-378.
8. Irsik M, Langemeier M, Schroeder T, Spire M, Roder JD. Estimating the effects of animal health on the performance of feedlot cattle. *Bovine Practitioner*, 2006, 40: 65-74.
9. Smith RA. Effects of feedlot disease on economics, production and carcass value. *American Association of Bovine Practitioners Proceedings*, 2000, 33: 125-128.
10. Loneragan GH, Dargatz DA, Morley PS, Smith MA. Trends in mortality ratios among cattle in US feedlots. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 2001, 219: 1122-1127.
11. Callan RJ, Garry FB. Biosecurity and bovine respiratory disease. *Veterinary Clinics of North America-Food Animal Practice*, 2002, 18: 55-77.
12. Yates W. A review of infectious bovine rhinotracheitis, shipping fever pneumonia and viral-bacterial synergism in respiratory disease of cattle. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 1982, 46: 225-263.
13. Griffin D, Chengappa M, Kuszak J, McVey DS. Bacterial pathogens of the bovine respiratory disease complex. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 2010, 26: 381-394.
14. O'Neill R, Mooney J, Connaghan E, Furphy C, Graham D. Patterns of detection of respiratory viruses in nasal swabs from calves in Ireland: a retrospective study. *Veterinary Record*, 2014, 175: 351-351.
15. Horwood PF, Mahony TJ. Multiplex real-time RT-PCR detection of three viruses associated with the bovine respiratory disease complex. *Journal of Virological Methods*, 2011, 171: 360-363.
16. Fulton RW. Bovine respiratory disease research (1983-2009). *Animal Health Research Reviews*, 2009, 10: 131-139.
17. Mosier D. Review of BRD pathogenesis: the old and the new. *Animal Health Research Reviews*, 2014, 15: 166-168.
18. Ames T, Baker J, Wikse S. The bronchopneumonias (respiratory disease complex of cattle, sheep, and goats). *Large Animal Internal Medicine*. 3rd ed. St. Louis: Mosby, 2002: 551-570.

19. De Rosa D, Mechor G, Staats J, Chengappa M, Shryock T. Comparison of *Pasteurella* spp. simultaneously isolated from nasal and transtracheal swabs from cattle with clinical signs of bovine respiratory disease. *Journal of Clinical Microbiology*, 2000, 38: 327-332.
20. Tegtmeier C, Uttenthal A, Friis N, Jensen N, Jensen H. Pathological and microbiological studies on pneumonic lungs from Danish calves. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 1999, 46: 693-700.
21. Patel J, Didlick S. Epidemiology, disease and control of infections in ruminants by herpesviruses-an overview: review article. *Journal of the South African Veterinary Association*, 2008, 79: 8-14.
22. Muylkens B, Thiry J, Kirten P, Schynts F, Thiry E. Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. *Veterinary research*, 2007, 38: 181-209.
23. Campos F, Franco A, Hübner S, Oliveira M, Silva A, Esteves P, Roehe P, Rijsewijk F. High prevalence of co-infections with bovine herpesvirus 1 and 5 found in cattle in southern Brazil. *Veterinary microbiology*, 2009, 139: 67-73.
24. Biswas S, Bandyopadhyay S, Dimri U, H. Patra P. Bovine herpesvirus-1 (BHV-1) are emerging concern in livestock: a revisit to its biology, epidemiology, diagnosis, and prophylaxis. *Veterinary Quarterly*, 2013, 33: 68-81.
25. Mahmoud M, Mahmoud NA, Allam A. Investigations on infectious bovine rhinotracheitis in Egyptian cattle and buffaloes. *Global veterinaria*, 2009, 3: 335-340.
26. Yan B, Chao Y, Chen Z, Tian K, Wang C, Lin X, Chen H, Guo A. Serological survey of bovine herpesvirus type 1 infection in China. *Veterinary microbiology*, 2008, 127: 136-141.
27. Woodbine KA, Medley GF, Moore SJ, Ramirez-Villaescusa AM, Mason S, Green LE. A four year longitudinal sero-epidemiological study of bovine herpesvirus type-1 (BHV-1) in adult cattle in 107 unvaccinated herds in south west England. *BMC veterinary research*, 2009, 5: 5.
28. Alkan F, Akça Y, Özkul A, Burgu İ, Karaoğlu MT, Bilge S, Yeşilbağ K, Oğuzoğlu TÇ. Sığırlarda viral nedenli solunum sistemi enfeksiyonlarının seroepidemiolojisi. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 1997, 44: 1-8.
29. Bilge S. Kan ve süt serumlarında IBR/IPV antikorlarının nötralizasyon testi ile saptanması ve süt örneklerinden virus izolasyonu. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 1998, 45: 313-321.
30. Çabalar M, Akça Y. Fertilité problemli ineklerde enfeksiyöz bovine rhinotracheitis - enfeksiyöz pustuler vulvovaginitis (IBR-IPV) virus izolasyonu ve seroepidemiolojisi. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 1994, 41: 337-349.
31. Gürtürk S, Finci E, Burgu İ. Yurdumuz sığırlarında enfeksiyöz bovine rhinotracheitis (IBR) üzerinde araştırmalar. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 1974, 21: 34-46.
32. Yılmaz F. Elazığ ve çevresindeki sığırlarda enfeksiyöz bovine rhinotracheitis-infeksiyöz pustuler vulvovaginitis'in (IBR/IPV) serolojik olarak araştırılması. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 1994, 8: 70-75.
33. Erhan M, Onar B, Csontas L, Hopkins I. Serological survey on some virus and bedsonia diseases of cattle. *Pendik Vet Kont Ars Derg*, 1971, 4: 55-58.
34. Dunn L. Pneumonia: classification, diagnosis and nursing management. *Nursing standard*, 2005, 19: 50.
35. Hazıroğlu R, Milli ÜH. *Veteriner Patoloji*. II. Baskı. Ankara, Medipress, 2001: 50-77.

36. Ortatatlı M. Konya bölgesi mezbahalarında kesilen besi danalarında pnömonilerin insidensi ve patolojisi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, (Vet) Patoloji Anabilim Dalı. Doktora, Konya: Selçuk Üniversitesi, 1997.
37. Cohrs P. *Textbook of special pathological anatomy of domestic animals*. Çeviri: R. C. I. ed. London, Pergamon Press, 2013: 158-160.
38. Ortatatlı M, Çiftçi MK. Konya bölgesi mezbahalarında kesilen besi danalarında pnömonilerin insidensi ve patoloji. *Veterinarium*, 2005, 16: 24-35.
39. Thomson RG, Carlton W, McGavin MD. *Special veterinary pathology*. I. Baskı. B.C. Decker, Inc, Toronto, Philadelphia., 1995: 69-122.
40. Uma S, Nair MG, Varshney KC. Occurrence of Granulomas in Bovines: An Abattoir-Based Study. *ISRN veterinary science*, 2012, 2011: 1-5.
41. Robinson KE, Meers J, Gravel JL, McCarthy FM, Mahony TJ. The essential and non-essential genes of Bovine herpesvirus 1. *Journal of General Virology*, 2008, 89: 2851-2863.
42. Thiry J, Widén F, Grégoire F, Linden A, Belák S, Thiry E. Isolation and characterisation of a ruminant alphaherpesvirus closely related to Bovine herpesvirus 1 in a free-ranging red deer. *BMC veterinary research*, 2007, 3: 1-11.
43. Surendra K, Rana S, Subramanian B, Reddy R, Sharma G, Srinivasan V. Phylogenetic analysis of bovine herpesvirus isolate of India. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, 2015, 3: 451-460.
44. Nandi S, Kumar M, Manohar M, Chauhan R. Bovine herpes virus infections in cattle. *Animal Health Research Reviews*, 2009, 10: 85-98.
45. Thiry J, Keuser V, Muylkens B, Meurens F, Gogev S, Vanderplasschen A, Thiry E. Ruminant alphaherpesviruses related to Bovine herpesvirus 1. *Veterinary research*, 2006, 37: 169-190.
46. Rola J, Żmudziński J. Genetic profiles of bovine herpesvirus 1 strains isolated from cattle in Poland. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 2010, 54: 457-460.
47. D'arce R, Almeida R, Silva T, Franco A, Spilki F, Roehe P, Arns C. Restriction endonuclease and monoclonal antibody analysis of Brazilian isolates of bovine herpesviruses types 1 and 5. *Veterinary microbiology*, 2002, 88: 315-324.
48. Varela A, Holz C, Cibulski S, Teixeira T, Antunes D, Franco A, Roehe L, Oliveira M, Campos F, Dezen D. Neutralizing antibodies to bovine herpesvirus types 1 (BoHV-1) and 5 (BoHV-5) and its subtypes. *Veterinary microbiology*, 2010, 142: 254-260.
49. Spilki FR, Esteves PA, Lima Md, Franco AC, Chiminazzo C, Flores EF, Weiblen R, Driemeier D, Roehe PM. Comparative pathogenicity of Bovine herpesvirus 1 (BoHV-1) subtypes 1 (BoHV-1.1) and 2a (BoHV-1.2 a). *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 2004, 24: 43-49.
50. Gibbs E, Rweyemamu M. Bovine herpesviruses. I. Bovine herpesvirus 1. *Veterinary Bulletin*, 1977.
51. Straub O. Infectious bovine rhinotracheitis virus. *Virus infections of ruminants*, 1990, 3: 71-108.
52. Graham D. Bovine herpes virus-1 (BoHV-1) in cattle-a review with emphasis on reproductive impacts and the emergence of infection in Ireland and the United Kingdom. *Irish Veterinary Journal*, 2012, 66: 15-15.
53. Ackermann M, Engels M. Pro and contra IBR-eradication. *Veterinary microbiology*, 2006, 113: 293-302.
54. Castrucci G, Martin W, Frigeri F, Ferrari M, Salvatori D, Tagliati S, Cuteri V. A serological survey of Bovine herpesvirus-1 infection in selected dairy herds in northern and central Italy. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 1997, 20: 315-317.

55. Boelaert F, Biront P, Soumare B, Dispas M, Vanopdenbosch E, Vermeersch J, Raskin A, Dufey J, Berkvens D, Kerkhofs P. Prevalence of Bovine herpesvirus-1 in the Belgian cattle population. *Preventive veterinary medicine*, 2000, 45: 285-295.
56. Rajkhowa S, Rajkhowa C, Rahman H, Bujarbaruah K. Seroprevalence of infectious bovine rhinotracheitis in mithun (*Bos frontalis*) in India. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 2004, 23: 821-829.
57. Yesilbag K, Bilge-Dagalp S, Okur-Gumusova S, Gungor B. Studies on herpesvirus infections of goats in Turkey: Prevalence of antibodies to bovine herpesvirus 1. *Revue de médecine vétérinaire*, 2003, 154: 772-774.
58. Turin L, Russo S, Poli G. BoHV-1: new molecular approaches to control a common and widespread infection. *Molecular Medicine*, 1999, 5: 261-284.
59. Hopper M. *Bovine Reproduction*. I Baski. 2015: 541-544.
60. Solis-Calderon J, Segura-Correa V, Segura-Correa J, Alvarado-Islas A. Seroprevalence of and risk factors for infectious bovine rhinotracheitis in beef cattle herds of Yucatan, Mexico. *Preventive veterinary medicine*, 2003, 57: 199-208.
61. Kampa J, Alenius S, Emanuelson U, Chanlun A, Aiumlamai S. Bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) and bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections in dairy herds: self clearance and the detection of seroconversions against a new atypical pestivirus. *The Veterinary Journal*, 2009, 182: 223-230.
62. Boelaert F, Speybroeck N, de Kruif A, Aerts M, Burzykowski T, Molenberghs G, Berkvens D. Risk factors for bovine herpesvirus-1 seropositivity. *Preventive veterinary medicine*, 2005, 69: 285-295.
63. Guarino H, Núñez A, Repiso M, Gil A, Dargatz D. Prevalence of serum antibodies to bovine herpesvirus-1 and bovine viral diarrhoea virus in beef cattle in Uruguay. *Preventive veterinary medicine*, 2008, 85: 34-40.
64. Raaperi K, Alekseev A, Orro T, Viltrop A. Dynamics of bovine herpesvirus type 1 infection in Estonian dairy herds with and without a control programme. *The Veterinary record*, 2012, 171: 99-99.
65. Mars M, De Jong M, Franken P, Van Oirschot J. Efficacy of a live glycoprotein E-negative bovine herpesvirus 1 vaccine in cattle in the field. *Vaccine*, 2001, 19: 1924-1930.
66. Segura-Correa JC, Solorio-Rivera JL, Sánchez-Gil LG. Seroconversion to bovine viral diarrhoea virus and infectious bovine rhinotracheitis virus in dairy herds of Michoacan, Mexico. *Tropical Animal Health and Production*, 2010, 42: 233-238.
67. Six A, Banks M, Engels M, Bascuñana CR, Ackermann M. Latency and reactivation of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) in goats and of caprine herpesvirus 1 (CapHV-1) in calves. *Archives of virology*, 2001, 146: 1325-1335.
68. Ellis JA. Update on viral pathogenesis in BRD. *Animal Health Research Reviews*, 2009, 10: 149-153.
69. Spurzem JR, Raz M, Ito H, Kelling CL, Stine LC, Romberger DJ, Rennard SI. Bovine herpesvirus-1 infection reduces bronchial epithelial cell migration to extracellular matrix proteins. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 1995, 268: L214-L220.
70. Engels M, Ackermann M. Pathogenesis of ruminant herpesvirus infections. *Veterinary microbiology*, 1996, 53: 3-15.
71. Winkler M, Doster A, Jones C. Persistence and reactivation of bovine herpesvirus 1 in the tonsils of latently infected calves. *Journal of virology*, 2000, 74: 5337-5346.
72. Levings RL, Roth JA. Immunity to Bovine herpesvirus 1: I. viral lifecycle and innate immunity. *Animal Health Research Reviews*, 2013, 14: 88-102.

73. Jones C, Newby T, Holt T, Doster A, Stone M, Ciacchi-Zanella J, Webster C, Jackwood M. Analysis of latency in cattle after inoculation with a temperature sensitive mutant of bovine herpesvirus 1 (RLB106). *Vaccine*, 2000, 18: 3185-3195.
74. Banks M, Beer M, Schuller W, Thiry E, Van Oirschot J, Vanopdenbosch E. Report on Bovine Herpesvirus 1 (BHV-1) marker vaccines and the accompanying diagnostic tests. *Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare*, 2000, 25: 1-23.
75. Jones C, Chowdhury S. A review of the biology of bovine herpesvirus type 1 (BHV-1), its role as a cofactor in the bovine respiratory disease complex and development of improved vaccines. *Animal Health Research Reviews*, 2007, 8: 187-205.
76. Perez S, Meyer F, Henderson G, Jiang Y, Sherman S, Doster A, Inman M, Jones C. A protein encoded by the bovine herpesvirus 1 open reading frame E gene induces neurite-like morphological changes in mouse neuroblastoma cells and is expressed in trigeminal ganglionic neurons. *Journal of neurovirology*, 2007, 13: 139-149.
77. Feldman LT, Ellison AR, Voytek CC, Yang L, Krause P, Margolis TP. Spontaneous molecular reactivation of herpes simplex virus type 1 latency in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2002, 99: 978-983.
78. Yıldırım Y, Yılmaz V, Majarashın A. Kuzeydoğu Anadolu Bölgesi sınır illerinde bulunan sığırlarda viral solunum sistemi enfeksiyonlarının seroprevalansı. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2009, 15: 601-606.
79. Rola J, Larska M, Polak MP. Detection of bovine herpesvirus 1 from an outbreak of infectious bovine rhinotracheitis. *Bulletin-Veterinary Institute In Pulawy*, 2005, 49: 267.
80. Murphy FA, Gibbs EPJ, Horzinek MC, Studdert MJ. *Veterinary virology*. III. Baskı. Academic press, 1999: 309-311.
81. Crook T, Benavides J, Russell G, Gilray J, Maley M, Willoughby K. Bovine herpesvirus 1 abortion current prevalence in the United Kingdom and evidence of hematogenous spread within the fetus in natural cases. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2012, 24: 662-670.
82. Vegad J, Katiyar AK. *Textbook of veterinary special pathology*. III. Baskı. International Book Distributing Company, 2012: 158-160.
83. Gu X, Kirkland P. Infectious bovine rhinotracheitis. In: Australian and New Zealand standard diagnostic procedures for animal diseases. Sub-Committee on animal health laboratory standards for animal health committee, Australia, Canberra,. 2008: 1-18.
84. Kaashoek M, Rijsewijk F, Van Oirschot J. Persistence of antibodies against bovine herpesvirus 1 and virus reactivation two to three years after infection. *Veterinary microbiology*, 1996, 53: 103-110.
85. Moore S, Gunn M, Walls D. A rapid and sensitive PCR-based diagnostic assay to detect bovine herpesvirus 1 in routine diagnostic submissions. *Veterinary microbiology*, 2000, 75: 145-153.
86. Wentink G, Van Oirschot J, Verhoeff J. Risk of infection with Bovine herpes virus 1 (BoHV1): a review. *Veterinary Quarterly*, 1993, 15: 30-33.
87. De-Giuli L, Magnino S, Vigo PG, Labalestra I, Fabbi M. Development of a polymerase chain reaction and restriction typing assay for the diagnosis of bovine herpesvirus 1, bovine herpesvirus 2, and bovine herpesvirus 4 infections. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2002, 14: 353-356.
88. Jones C, Chowdhury S. Bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) is an important cofactor in the bovine respiratory disease complex. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 2010, 26: 303-321.

89. DeLong ER, DeLong DM, Clarke-Pearson DL. Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach. *Biometrics*, 1988; 837-845.
90. Woolums A, Loneragan G, Hawkins L, Williams S. Baseline management practices and animal health data reported by US feedlots responding to a survey regarding acute interstitial pneumonia. *Bovine Practitioner*, 2005, 39: 116.
91. Taylor JD, Fulton RW, Lehenbauer TW, Step DL, Confer AW. The epidemiology of bovine respiratory disease: what is the evidence for preventive measures? *The Canadian Veterinary Journal*, 2010, 51: 1351.
92. Panciera RJ, Confer AW. Pathogenesis and Pathology of Bovine Pneumonia. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 2010, 26: 191-214.
93. Thomas L, Swann R. Influence of colostrum on the incidence of calf pneumonia. *Veterinary Record*, 1973, 92: 454-455.
94. Özer H. Besi danalarında eksudative pnömonilerin yayılışı. *Elazığ Bölgesi Veteriner Hekimler Odası Dergisi*, 1985, 1: 63-70.
95. Özer H. Besi sığırlarında atipik interstitial pneumonie'lerin yayılışı. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi* 1987, 1: 27-34.
96. Caldow G, Edwards S, Nixon P, Peters A. Associations between viral infection and respiratory disease in young beef bulls. *Veterinary Record*, 1988, 122: 529-531.
97. Alexander B, MacVean D, Salman M. Risk factors for lower respiratory tract disease in a cohort of feedlot cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 1989, 195: 207-211.
98. Çeribaşı AO, Özkaraca M, Çeribaşı S, Özer H. Histopathologic, immunoperoxidase and immunofluorescent examinations on natural cattle pneumonia originated from Parainfluenza type 3, Respiratory Syncytial virus, Adenovirus type 3 and Herpesvirus type. *Revue de médecine vétérinaire*, 2014, 165: 201-2012.
99. Altun S. Pnömonili Sığır Akciğerlerinde Mycoplasma bovis Enfeksiyonunun patolojik ve moleküler yöntemlerle araştırılması. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Veteriner Patoloji Anabilim Dalı. Doktora, Erzurum: Atatürk Üniversitesi, 2015.
100. Yener Z, Gürtürk K, Gülbahar Y, Solmaz H. Pathological and bacteriological studies on pneumonia in goats slaughtered at Bitlis slaughterhouse. *Veteriner Bilimleri Dergisi*, 2001, 17: 13-20.
101. Belkhiri M, Tlidi M, Benhathat Y, Meziane T. Histopathological study and pulmonary classification of bovine lesions. *African Journal of Agricultural Research*, 2009, 4: 584-591.
102. Omar A. The aetiology and pathology of pneumonia in calves. *The Veterinary bulletin*, 1966, 36: 73.
103. Habacha F, darradj AA-, Al-zoubaidi E. Study of pathological changes in cattle lungs in Iraq. Department of medicine ,Pathology College of Veterinary Medicine. Iraq: University of Baghdad., 1993.
104. Yaman İ, Gülcü HB. Besi danalarında pnömonilerin patolojik ve bakteriyolojik incelenmesi. *Veteriner Bilimleri Dergisi*, 2002, 28: 99-108.
105. Scott PR. Clinical presentation, auscultation recordings, ultrasonographic findings and treatment response of 12 adult cattle with chronic suppurative pneumonia: case study. *Irish Veterinary Journal*, 2013, 66: 1.
106. Ortatatlı M, Çiftçi MK, Tuzcu M. Sığırlarda tüberküloz ve diğer granümatöz pnömoniler üzerinde patolojik incelemeler. *Veteriner Bilimleri Dergisi*, 1998, 14: 139-150.
107. Akıllı H, Yoldas A, Özmen M, Topçuoğlu H, Turut N, Tuzcu N. Çukurova Yöresinde Sığırlarda Görülen Granümatöz Pnömoniler Etiyolojisinin Histopatolojik ve

Moleküler Yöntemlerle Belirlenmesi. *Adana Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü Dergisi*, 2012, 2: 1-6.

108. Avci O, Yavru S, Ekik M. Detection of respiratory viral antigens in cattle lung tissues by direct ELISA. *Animal and Veterinary Sciences*, 2014, 2: 146-149.

109. Ezzi A, Hatami A, Bakhshesh M, Shoukri M, Gharaghozloyan M. Serological study of bovine herpesvirus type 1 and parainfluenza type 3 in cow farms of qazvin province based on different ages and seasons. *Archives of Razi Institute*, 2013, 68: 53-57.

110. Narita M, Kimura K, Tanimura N, Arai S, Tsuboi T, Katsuda K. Immunohistochemical characterization of calf pneumonia produced by the combined endobronchial administration of bovine herpesvirus 1 and *Pasteurella haemolytica*. *Journal of comparative pathology*, 2000, 123: 126-134.

111. Majumder S, Ramakrishnan M, Nandi S. Infectious Bovine Rhinotracheitis: An Indian Perspective. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 2015, 4: 844-858.

112. Keuser V, Schynts F, Detry B, Collard A, Robert B, Vanderplasschen A, Pastoret P-P, Thiry E. Improved antigenic methods for differential diagnosis of bovine, caprine, and cervine alphaherpesviruses related to bovine herpesvirus 1. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004, 42: 1228-1235.

113. Mahmoud M, Allam A. Seroprevalence of Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV), Bovine Herpes Virus Type 1 (BHV-1), Parainfluenza Type 3 Virus (PI-3V) and Bovine Respiratory Syncytial Virus (BRSV) among non Vaccinated Cattle. 2013.

114. Naseri Z, Rad M, Hashemi Tabar G, Azizzadeh M. Detection of antibody against infectious bovine rhinotracheitis glycoprotein gE in aborted cattle in Mashhad, Iran. *Archives of Razi Institute*, 2016, 64: 91-95.

115. Sharma M, Katoch R, Charanjeet, Dhar P. Seroprevalence of IBR among cattle in hiwialchal pradesh. *Indian veterinary journal*, 2006, 83: 1-3.

116. Singh R, Verma AK, Sharma B, Yadav SK. Detection of Bovine Herpesvirus-1 (BHV-1) Infection in Cattle by Antigen Detection ELISA and Multiplex PCR. 2013.

117. Akça Y, Özkul A, Burgu İ. Sigirlarda viral nedenli solunum sistemi enfeksiyonlarının seroepidemiolojisi. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 1997, 44: 1-8.

118. Yazıcı Z, Albayrak H, Ozan E, Gümüşova S. Serological Status of Bovine Herpes Virus Type 1 in Cattle in Small Scale Private Farms in the Central Black Sea Region, Turkey. *Pakistan Veterinary Journal*, 2014, 35: 101-102.

119. Güler L, Yavru S, Ekik M, Ok Ü, Şimşek A, Gündüz K, Gülcü Y. Boğalarda bazı önemli patojen etkenlerin araştırılması. *Veteriner Bilimleri Dergisi*, 2004, 20: 71-78.

120. Elhassan AM, Fadol MA, Salih MAM, El Hussein ARM. Bovine herpes virus-1 (BoHV-1) detection in dairy cattle with reproductive problems in Sudan. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*, 2015, 2: 185-189.

121. Saeed IK, Ali YH, AbdulRahman MB, Mohammed ZA, Osman HM, Taha KM, Musa MZ, Khalafalla AI. Mixed infection of peste des petits ruminants virus (PPRV) and other respiratory viruses in dromedary camels in Sudan, an abattoir study. *Tropical Animal Health and Production*, 2015, 47: 995-998.

122. Intisar K, Ali Y, Khalafalla A, Mahasin ER, Amin A. Natural exposure of Dromedary camels in Sudan to infectious bovine rhinotracheitis virus (bovine herpes virus-1). *Acta tropica*, 2009, 111: 243-246.

123. Smith GH, Collins JK, Carman J. Use of an immunoperoxidase test for the detection of bovine herpesvirus-1 in aborted fetal tissue. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 1989, 1: 39-44.

124. Szeredi L, Jánosi S, Pálfi V. Microbiological and pathological examination of fatal calf pneumonia cases induced by bacterial and viral respiratory pathogens. *Acta Veterinaria Hungarica*, 2010, 58: 341-356.
125. Moeller Jr RB, Adaska J, Reynolds J, Blanchard PC. Systemic Bovine herpesvirus 1 infections in neonatal dairy calves. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2013, 25: 136-141.
126. Crook T, Benavides J, Russell G, Gilray J, Maley M, Willoughby K. Bovine herpesvirus 1 abortion: current prevalence in the United Kingdom and evidence of hematogenous spread within the fetus in natural cases. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2012, 24: 662-670.
127. Silim A, Elazhary M. Detection of infectious bovine rhinotracheitis and bovine viral diarrhea viruses in the nasal epithelial cells by the direct immunofluorescence technique. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 1983, 47: 18.
128. Flores EF, Weiblen R, Medeiros M, Botton SA, Irigoyen LF, Driemeier D, Schuch LF, Moraes M. A retrospective search for bovine respiratory syncytial virus (BRSV) antigens in histological specimens by immunofluorescence and immunohistochemistry. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 2000, 20: 139-143.
129. Nettleton P, Herring J, Herring A. Evaluation of an immunofluorescent test for the rapid diagnosis of field infections of infectious bovine rhinotracheitis. *Veterinary Record*, 1983, 112: 298-300.
130. Wągrowska-Danilewicz M, Danilewicz M. Immunofluorescence on paraffin-embedded sections in evaluation of immune complex deposits in renal biopsy specimens. *Polish Journal of Pathology*, 2009, 60: 3-9.
131. Kajimura J, Ito R, Manley NR, Hale LP. Optimization of single-and dual-color immunofluorescence protocols for formalin-fixed, paraffin-embedded archival tissues. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 2016, 64: 112-124.

EKLER

EK-1. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler
Adı Soyadı: Selim ÇOMAKLI Doğum tarihi: 20.09.1988 Doğum yeri: Aşkale Medeni hali: Bekar Uyruğu: T.C. Adres: Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Veterinerlik Patoloji Anabilim Dalı, 25240 ERZURUM Tel: 0442 231 70 84 Faks: - E-mail: selim.comakli@atauni.edu.tr
Eğitim
Lise: Mehmet Akif ERSOY Lisesi (2006) Lisans: Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi (2008-2013) Yüksek lisans: -- -- Doktora: Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Veteriner Patoloji Anabilim Dalı (2013-2017)
Yabancı Dil Bilgisi
İngilizce: Orta derecede (YDS 65.00) _____ Almanca: -- _____ Rusça: --
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar
-- --
İlgi Alanları ve Hobiler
Futbol, Sinema --

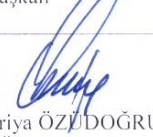
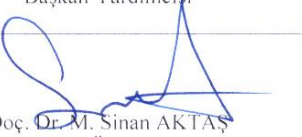
EK-2. ETİK KURUL ONAY FORMU



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ VETERİNER FAKÜLTESİ
ETİK ALT KURUL BAŞKANLIĞI
(AÜVFEAK)



ETİK KURUL KARARI

Karar Sayısı: 2015/3	Karar Tarihi: 03/04/2015
Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Yavuz Selim SAĞLAM ve Araş. Gör. Selim ÇOMAKLI tarafından sunulan "Sığır Pnömonilerinde Bovine Herpesvirus 1 (BHV-1)'in Varlığının İmmunohistokimyasal, İmmunofloresans ve Enzyme-Linked İmmunosorbent Assay (ELISA) Yöntemler ile Araştırılması ve Patolojik Bulgular" adlı bilimsel teze ait başvuru formu etik kurulumuz tarafından değerlendirilmiştir. Çalışmada Erzurum ilinde faaliyet gösteren kesimhanelerden ve Patoloji Anabilim Dalına getirilen toplam 120 adet sığıra ait akciğer numunelerinde immunohistokimyasal, immunofloresans ve ELISA yöntemler ile BHV-1'in prevalansı hakkında incelemeler yapılacaktır. Sunulan bilimsel tez çalışmasının Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesi ilkelerine uygun olduğuna karar verilmiştir.	
 Prof. Dr. Yunus Emre ÖZKANLAR Başkan	 Prof. Dr. Ömer UÇAR Başkan Yardımcısı
 Prof. Dr. Zekeriya ÖZÜDOĞRU Üye	 Doç. Dr. M. Sinan AKTAŞ Üye
 Doç. Dr. Emre KARAKUŞ Üye	