

TÜRKİYE'DE SIĞIRLARDA İBARAKİ ENFEKSİYONUNUN SEROLOJİK OLARAK ARAŞTIRILMASI

FERAY ALKAN*

SEVAL BİLGE DAĞALP**

Investigation of Ibaraki disease in cattle in Turkey

Summary : *In this study, it is investigated to the presence of Ibaraki virus infection in cattle in Turkey serologically. 1342 serum samples were collected from 9 herds and were tested for Ibaraki virus spesific antibodies by the microtiter serum neutralisation technique. Of 1342 serum samples, 3 (0.22 %) were found to be positive for antibodies against Ibaraki virus. These sera were detected as negative for EHD-1, EHD-2 and Bluetongue spesific antibodies by microneutralisation technique.*

Key words: *Ibaraki, antibody, cattle.*

Özet: *Bu çalışmada Türkiye'de sığırlarda İbaraki virus enfeksiyonunun varlığı araştırıldı. 9 sürüye ait 1342 sığırdan alınan kan serumları mikronötralizasyon testi ile İbaraki virusuna spesifik antikolar yönünden kontrol edildi ve 3 (% 0.22) adedinde İbaraki antikolarının varlığı saptandı. Bu kan serumları mavidil, EHD-1 ve EHD-2 virusları ile yapılan mikronötralizasyon testinde negatif bulundu.*

Anahtar kelimeler: *Ibaraki, antikor, sığır.*

Giriş

İbaraki hastalığı beden ısısı artışı, burun akıntısı, köpüklü salivasyon, oral ve nazal mukozalarda erozyonlar, yutak felci, eklemlerde ağrılı şişkinlikler ve bazı vakalarda tırnağın corona bölgesinde, vulva ve memede erozyon ve ülserler ile karakterizedir (5,6).

Etken, hastalığın ilk saptandığı yer nedeniyle " İbaraki virus" olarak adlandırılmıştır. Inaba (5) bazı yazarların ise etkeni " Kaeshi virus " ya da hastalığın klinik ve patolojik tabloları ile mavidil enfeksiyonuna benzerliği ve etkenlerin antijenik yakınlıklarının bulunması nedeniyle "

Mavi dil benzeri virus " olarak da adlandırdıklarını bildirmiştir.

Etken Reoviridae familyasının Orbivirus alt grubunda bulunan epizootic hemorrhagic disease (EHD) serogrubunda yer alır ve mavi dil virusu ile antijenik ilişkiye sahiptir (4). Champbell ve George (2), İbaraki virusunun EHD2 olduğunu ve bu adın EHD 2 Alberta ile sinonim olarak değerlendirilmesini önermişlerdir. Gorman(4) ise; İbaraki virusunun EHD-2 Albertadan farklı, ancak ilişkili olduğunu bildirmiş ve tüm EHD serogrup viruslarını şu şekilde sınıflandırmıştır.

* Doç. Dr. A.Ü. Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı, Ankara.

** Dr., A.Ü. Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı, Ankara.

İzolasyon

Serotip	Prototip	Yıl	Ülke
EHD-1	New Jersey	1955	ABD
EHD-2	Alberta	1962	Kanada
	İbaraki virus	1959	Japonya
	CSIRO 439 Avustralya	1980	Avustralya
EHD-3	XBM/ 67	1967	Güney Afrika
EHD-4	Ib Ar 22619	1967	Nijerya
EHD-5	Ib Ar 33853	1968	Nijerya
EHD-6	Ib Ar 4963	1970	Nijerya
EHD-7	CSIRO 157	1977	Avustralya
EHD-8	CSIRO 753	1981	Avustralya
EHD-9	CSIRO 775	1981	Avustralya
EHD-10	DPD 59	1982	Avustralya

Gorman(4)'dan alınmıştır.

İbaraki virusu çift iplikçikli RNA içeren kübik simetrik yapıdadır. Fötal dana primer hücre kültürleri, koyun ve hamster böbrek , BHK-21, W12, Vero hücre kültürlerinde sitopatolojik değişiklik oluşturarak çoğalır. Embriyolu tavuk yumurtasının sarısında 33.5°C'de ve farelerde intracerebral inokulasyonlar ile deneysel olarak üretilmiştir(5,6).

İbaraki enfeksiyonu 1959 yılı Ağustos - Aralık aylarında Japonya'nın orta ve batı kısımlarında ilk kez tespit edilmiştir. 1960 yılının Eylül- Aralık aylarında da Japonya' nın orta bölgelerinde sınırlı bir salgının hüküm sürdüğü bildirilmiştir (5). Omori ve ark (9) ise bu yaygın salgın öncesinde 1950 yılında da benzer bir epideminin görüldüğünü belirtmişlerdir. Hastalığın mevsimsel olarak görülmesi ve coğrafik durumu, iklim koşulları ile bir ilişkisinin varlığını ve bu yönden artropod vektörlerin enfeksiyonun naklinde rol oynadığını düşündürmektedir. Bununla beraber birçok EHD virus serotiplerinin sokucu sineklerden izolasyonu yapılabildiği halde, İbaraki virusunun vektörlerden

izolasyonu ile ilgili veri bulunmamaktadır (3,7)

İbaraki virus enfeksiyonunda klinik bulgular 40° C'ye varan 2-3 gün süreli, bazen 7-10 gün süren ateş, anorexia, gözyaşı akıntısı, salya akıntısı ve ruminasyon durması ile başlar. Bu bulguları konjektivada konjesyon ve konjuktival ödem, oral, nasal mukozalar ve mermede ödem ve konjuktal takip eder. Hafif seyirli vakalarda enfeksiyon 2-3 günde seyrini tamamlar ve iyileşme görülür. Daha ağır hastalık tablolarında ise dilde ve mermede siyanoz ve küçük nekrotik odaklar gelişir. Bu lezyonlar daha sonra kabuklaşır, erozyon ve ülserler gelişir. Ayak eklemlerinde ağrılı şişkinlikler, tırnağın coronasında erozyon ve ülserler ile laminitis görülür. Bazen meme ve/ veya vulvada da benzer lezyonların oluştuğu bildirilmiştir (5).

Hastalığın Japonya dışında coğrafik dağılımı ile ilgili bilgiler sınırlıdır. Taiwan ve Endonezya'nın Bali adasında İbaraki spesifik antikorların saptandığı bildirilmiştir (5).

Avustralya'da enfeksiyonun varlığı mavi dil virus enfeksiyonunun 20 serotipi için test edildikten sonra test edilemeyen diğer serotipler için de kontrollerinin yapılması amacıyla Pirbright Araştırma Enstitüsü'ne gönderilen kan serumlarının çoğunda İbaraki virus antikorlarının saptanması ile enfeksiyonun varlığı ilk kez serolojik olarak ortaya konmuştur (11). Sonraki yıllarda mavi dil benzeri semptomlarla seyreden hayvanlardan sağlanan materyallerden elde edilen 35 izolattan 30 adedi mavi dil izolatu olarak identifiye edilmiş ve diğer 5 adedinde ise (CSIRO 157,439,753,775 ve Dpp 59) İbaraki virus ile yakın grup ilişkisinin olduğu belirlenmiştir. Plak inhibisyon nötralizasyon testi ile CSIRO 439' un ibaraki serotipi olduğu saptanmış, diğer izolatlar ise İbaraki'den farklı EHD serotipleri olarak değerlendirilmiştir. CSIRO 439 serotipi referenz laboratuvar tarafından da " ibaraki virus " olarak tanımlanmıştır (11).

Türkiye'de EHD serogrup enfeksiyonları ile ilgili olarak, Burgu ve ark. (1) tarafından bildirilen tek bir çalışma bulunmaktadır. Burgu ve ark.(1), Türkiye'nin güney bölgelerinden sağlanan sığır ve koyun kan serumlarının Agar Gel İmmunodiffuzyon (AGID) testi ile EHD-1 ve EHD-2 antikorları yönünden yapılan kontrolü sonucunda,EHD-1 için koyunlarda % 0.4 (1/230), sığırlarda % 0.9 (5/ 568); EHD-2 için koyunlarda % 6.5 (15/230) ve sığırlarda % 4.5 (26/568) oranında seropozitiflik saptamışlar ve EHD-1,

EHD-2 ve mavidil antikorları arasında çapraz bağışıklık tespit edilmediğini de belirtmişlerdir. Bununla birlikte araştırmacılar (1) AGID testinde İbaraki virus ve EHD grup viruslar arasında kros reaksiyonlar gelişebileceğini de gözönünde bulundurarak, saptanan EHD-1 ve EHD-2 antikorlarının Türkiye'de diğer bazı EHD serotiplerinin varlığı ile de ilgili olabileceğini belirtmişlerdir.

Bu çalışmada, İbaraki virus enfeksiyonunun - EHD serotipleri ile oluşan enfeksiyonların tanısında serotip spesifik olarak tanımlanan mikronötralizasyon testi kullanılarak - Türkiye'de varlığının serolojik olarak araştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Hücre Kültürü : İbaraki, EHD-1 ve EHD-2 viruslarının üretilmesi, titrelerinin belirlenmesi ve sözkonusu viruslara spesifik antikorların tespiti amacıyla uygulanan serum nötralizasyon testinde Vero hücre kültürü, mavidil virusunun üretilmesi, titresinin belirlenmesi ile bu virusa spesifik antikorların saptanması amacıyla kullanılan serum nötralizasyon testinde ise MDBK hücre kültürü kullanıldı.

Virus : Araştırmada mavidil virusu ile Pirbright Araştırma Enstitüsü , İngiltere den temin edilen EHD-1, EHD-2 ve İbaraki virusları kullanıldı. Mikronötralizasyon testinde kullanılan virusların enfektif titreleri Tablo 1'de gösterildi.

Tablo 1: Mikronötralizasyon testinde kullanılan virusların enfektif güçleri

Tablo 1: Infective doses of viruses used in the microneutralisation test

Virus	DKID50
	(log10)
Ibaraki	6.3 / 0.1 ml
EHD-1	4.0 / 0.1 ml
EHD-2	4.0 / 0.1 ml
Mavi Dil	4.25 / 0.1 ml

Serum Örnekleri: Serolojik kontrol amacıyla 9 kamu işletmesinde bulunan toplam 1342 sığıra ait kan serumu kullanıldı. Materyal örneklenen işletmelerin bulunduğu iller ve materyallerin dağılımı Tablo-2 'de gösterildi .

Steril şartlarda kaolinli tüplere alınan kan örnekleri santrifüj edilerek, serumları ayrıldıktan sonra 56 °C'de su banyosunda 30 dakika inaktive edildi ve kullanılıncaya kadar -20 C'de saklandı.

Tablo 2 : İbaraki antikorunu yönünden kontrol edilen serumların dağılımı.

Table 2 : Distribution of the serum samples tested for antibodies against Ibaraki virus.

No	İL/ BÖLGE	MATERYAL SAYISI
1	Ankara / İç Anadolu	100
2	Ankara / İç Anadolu	100
3	Muğla / Ege	812
4	Samsun / Karadeniz	100
5	Konya / İç Anadolu	100
6	Ş.Urfa / Güneydoğu Anadolu	61
7	Adana / Akdeniz	21
8	Denizli /Ege	26
9	Kırşehir/ iç Anadolu	22
Toplam		1342

Serum Nötralizasyon Testi: Test Pearson ve ark. (10) tarafından bildirilen yöntemine göre yapıldı. İbaraki antikorlarının saptanması amacıyla kullanılan serum örneklerinin mikronötralizasyon tabletlerinde hazırlanan 1/10 oranındaki sulandırılmaları üzerine 100 DKID₅₀ / 0.05 oranında sulandırılan İbaraki virusu eşit hacimde ilave edildikten sonra, tabletler 37 °C 'de 1 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda tabletin gözlerine Vero hücre süspansiyonu (300 000 hücre / ml) ilave edilerek, tabletler 37°C'de 3 gün süre ile inkübasyona bırakıldı. Doku kültürü mikroskopunda sitopatolojik değişikliklerin oluşumu dikkate alınarak sonuçlar değerlendirildi. İbaraki virusu ile nötralizasyon veren kan serumlarının serum nötralizasyon değeri (SN₅₀) log₂ tabanına göre hazırlanan sulandırılmaları kullanılarak uygulanan mikronötralizasyon testi ile belirlendi.

İbaraki antikorunu saptanan kan serumlarına kros reaksiyonun araştırılması amacı ile mavidil, EHD-1 ve EHD-2 virusları ile de nötralizasyon testi uygulandı.

Bulgular

Araştırmanın yürütüldüğü 9 işletmeden 1 adedinde İbaraki virus enfeksiyonunun varlığı serolojik olarak saptandı. Bu işletmeye ait toplam 812 sığırdan sağlanan kan serumlarının 3 adedi seropozitif olarak tespit edildi. Pozitif serumların SN₅₀ değerleri 1/5, 1/ 160 ve 1/ 320 olarak belirlendi. Sürüdeki seropozitiflik oranı ise % 0.36 (3/812) olarak saptandı (Tablo 3). Kontrol edilen 9 işletmeden sağlanan toplam 1342 kan serumunun ise % 0.22'sinde (3/1342) mikronötralizasyon testi ile İbaraki virusuna spesifik antikorlar tespit edildi (Tablo 3).

Tablo 3: Mikronötralizasyon testi sonuçları.

Table 3: The results of the microneutralisation test.

No	İli / Bölge	MATERYAL SAYISI		
		Kontrol edilen	Pozitif	%
1	Ankara / İç Anadolu	100	-	-
2	Ankara / İç Anadolu	100	-	-
3	Muğla / Ege	812	3	0.36
4	Samsun/ Karadeniz	100	-	-
5	Konya/ İç Anadolu	100	-	-
6	Ş.Urfa/Güneydoğu Anadolu	61	-	-
7	Adana / Akdeniz	21	-	-
8	Denizli / Ege	26	-	-
9	Kırşehir / İç Anadolu	22	-	-
Toplam		1342	3	0.22

Tartışma ve Sonuç

İbaraki virusu EHD serogrubu içinde yer almakta olup, çeşitli araştırmacılar tarafından EHD-2 ile identik yada ilişkili olarak bildirilmiştir (2,4,5,10).Bu araştırmada kontrol edilen 9 işletmeden 1 adedi ve kontrol edilen hayvanların %0.22'si seropozitif olarak saptanmıştır. Türkiye'de İbaraki enfeksiyonun seroepidemiolojisine ilgili başka bir veri bulunmadığı için, belirlenen seroprevalans değeri ile ilgili bir karşılaştırma yapabilmek mümkün değildir. Burgu ve ark.(1)'nin araştırmada Türkiye'nin güney bölgelerine ait 11 farklı yerleşimde bulunan sığırlardan sağlanan kan serumu örnekleri kullanılmış, ancak işletme isimleri bildirilmemiştir. Bu nedenle bu çalışmada örneklenen Türkiye'nin güney bölgelerine ait işletmelerin, Burgu ve ark (1)'nin çalışmasında örneklenen işletmeler olup olmadığı bilinmediğinden, işletmeler bazında veriler arasında bir karşılaştırma yapmak da mümkün olamamıştır. Ancak bu

araştırmada elde edilen İbaraki enfeksiyonunun toplam hayvan sayısına göre oranı (%0.22) , Burgu ve ark.'nın (1) EHD-1 için sığırlarda saptadıkları orana(%0.9) benzerlik göstermektedir. Aynı araştırmacıların (1) EHD-2 için sığırlarda saptadıkları seropozitiflik oranının (% 4.5) ise bu araştırmada elde edilen orandan daha yüksek olduğu görülmüştür.

EHD serogrubunda yer alan farklı serotiplerin saptanması amacıyla komplement fikzasyon, AGID ve virus nötralizasyon testleri kullanılmış, komplement fikzasyon ve AGID testinin EHD grup spesifik antikorların saptanması için uygun ,nötralizasyon testinin ise serotip spesifik olduğu birçok araştırmacı (8,10) tarafından bildirilmiştir.

Bu çalışmada nötralizasyon testi kullanılmış olup, seropozitif olarak saptanan kan serumları mavidil, EHD-1,EHD-2 virusları ile de nötralizasyon testine tabi tutulmuşlar ve çapraz reaksiyon tespit

edilmemiştir. Bu nedenle örneklenen toplam hayvan sayısına göre belirlenen seropozitifliğin (% 0.22) İbaraki enfeksiyonuna ilgili olduğu sonucuna varılmıştır.

Kaynaklar

1. Burgu, İ., Akça, Y., Hamblin, C and Kitching, P (1991). *Epizootic haemorrhagic disease virus antibodies in Turkey*. Trop Anim Hlth Prod **23**, 261-262.
2. Campbell, C.H and St. George, T.D. (1986). *A preliminary report of a comparison of epizootic aemorrhagic disease viruses from Australia with others from North America, Japan and Nigeria*. Aust Vet J **63**: 7, 233
3. Foster, N.M., Metcalf, H.E., Barber, T.L., Jones, R.H., and Luedke, A.J. (1980) *Bluetongue and Epizootic Haemorrhagic Disease Virus isolations from Vertebrate and Intervertebrate Hosts at a common geographic site*. JAVMA 176 : 2, 126-129
4. Gorman, B.M: *An overview of the orbiviruses* . In: Proc. of the second International symposium. Bluetongue, African Horse Sickness, and Related Orbiviruses. Walton, T.E and Osburn, B.I. Ed: CRS Press, Inc. Boca Raton FL, 1992. 335-347.
5. Inaba, Y. (1975) *Ibaraki disease and its relationship to Bluetongue*. Aust Vet J **51**, 178-184
6. Knudson, D.L. and Monath, T.P. "Orbiviruses", In : *Virology*, Fields, K.N., Knipe, D.M. et al. Ed: Raven Press Ltd., New York, 1990. chap.50
7. Lee, V.H., Causey, O.R., Moore, D.L. (1974). *Bluetongue and related viruses in Ibadan, Nigeria. Isolation and preliminary identification of viruses*. Am J Vet Res **35**: 8. 1105-1108.
8. Moore, D.L. (1974): *Bluetongue and related viruses in Ibadan, Nigeria. Serological comparison of Bluetongue, Epizootic Hemorrhagic Disease of deer, and Abadina (Palyam) viral isolates*. Am J Vet Res **35**: 8, 1109-1113
9. Omori, T., Inaba, Y., Morimoto, T., Tanaka, Y., Ishitana, R., Kurogi, H., Minakata, K., Matsuda, K and Matumoto, M. (1969): *Ibaraki virus an agent of Epizootic disease of cattle resembling Bluetongue*. Jap J Micro **13** (2) : 139-157.
10. Pearson, J.E., Gustafson, G.A., Shafer, A.L., and Alstad, A.D. (1992) *Diagnosis of bluetongue and Epizootic hemorrhagic disease*. In: Proc. of the second International symposium. Bluetongue, African Horse Sickness, and related Orbiviruses. Walton, T.E and Osburn, B.I. Ed. CRS press, Inc. Boca Raton FL, 1992.
11. St George, T.D., Cybinski, D.H., Standfast, H.A., Gard, G.P. (1983) *The isolation of five different viruses of the epizootic haemorrhagic disease of deer serogroup*. Aust Vet J **60**: 7, 216-217

Yazışma Adresi:

Doç.Dr. Feray ALKAN

A.Ü.Veteriner Fakültesi

Viroloji Anabilim Dalı

6110 Dışkapı-ANKARA

TURKEY