

Türkiye’de mandalarda bovine enterovirus tip-1’in serolojik olarak araştırılması

Sibel GÜR¹, Yılmaz AKÇA², İbrahim BURGU²

¹Afyon Kocatepe Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı, Afyon; ²Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı, Ankara.

Özet: Bovine Enteroviruslar, erişkin hayvanlarda genellikle subklinik enfeksiyona neden olabilmesinin yanı sıra abort, infertilite ve neonatal ölümlere; genç hayvanlarda ve yenidoğanlarda ise gelişme geriliği, enteritis ve solunum sistemi enfeksiyonuna yol açmaktadır. Bu çalışmada, Türkiye’de 8 ilden toplam 355 yetişkin mandadan kan serum örneği alınarak, BEV Tip-1 spesifik antikolar yönünden mikroneutralizasyon testi ile kontrol edilmiştir. Dört ilde %21.4, %8.3, %2.8, %2.4 oranlarında seropozitiflik saptanmış, örneklenen popülasyonun seropozitiflik oranı %3.9 (14/355) olarak bulunmuştur.

Anahtar sözcükler: Enterovirus, manda, seroprevalans.

Serological investigation of bovine enterovirus type-1 in buffaloes in Turkey

Summary: Bovine Enteroviruses are generally leads to subclinical infection in adult animals beside abortion, infertility and neonatal death; growth retardation, enteritis and respiratory system disorders in young and newborn animals. In this study, blood sera samples were collected from 355 adult water buffaloes in 8 provinces, in Turkey and tested for BEV-1 specific antibody with microneutralization test. Seropositivity was detected as 21.4%, 8.3%, 2.4% and 2.4% in four different provinces, where as seropositivity rate of sampled population was detected as 3.9 % (14/355).

Keywords: Enterovirus, seroprevalance, water buffalo.

Giriş

Sığırların Enterovirusları (Bovine Enterovirus, BEV) ishal (17), solunum sistemi hastalıkları (16) ve abort (4) gibi farklı klinik tablolarla ortaya çıkabilen, dünyada yaygın olarak görülen bir enfeksiyondur.

Etken pozitif polariteli, tek iplikçikli bir RNA virusu olup, Picornaviridae ailesinin Enterovirus genusunda yer alır. Zarsızdır ve ikozahedral simetriye sahiptir. Bugüne kadar izole edilen 89 adet enterovirus serotipinin 62’si insan, 22’si maymun, 2’si sığır ve 3 tanesi de domuzlarda tespit edilmiştir (14). Sığırlarda tespit edilen antijenik varyantlar 2 serotip altında gruplandırılmıştır (5, 8, 11, 13).

Enteroviruslar diğer RNA viruslarında olduğu gibi yüksek genetik çeşitliliğe sahiptir. Saha izolatlarının klasifikasyonu ile alt tip ve/veya serotiplerin sayısının arttığı kabul edilmektedir (3, 14).

BEV-1 evcil sığır, manda (18, 25), koyun, keçi (9), Afrika mandası ve impala (7) gibi türlerden izole edilmiştir. Nötralizan antikolar insan, maymun, lama, köpek, koyun, keçi, sığır, tavşan ve kanatlılarda tespit edilmiş (17, 21, 22, 27) olmasına rağmen, Tip 2 sadece evcil sığırlardan izole edilmiştir (4, 21, 25, 29).

Virusun bulaşması enfekte hayvan ve hayvansal ürünlerle direkt temas ile olmaktadır. Özellikle dışkı yüksek titrede virus içermesi nedeniyle, oral-fekal bulaşma enfeksiyonunun yayılımında en önemli role sahiptir (14, 24). Genellikle ağız yoluyla sindirim sistemine alınan virus dayanıklı tabiatı nedeniyle etkilenmeden çoğalmaya devam eder. Lokal lenf bezlerine giderek düşük titrede antikor üretimine neden olur ve klinik tablo daha fazla ilerlemez. Hedef organlarda daha yaygın çoğalma meydana geldiği durumda ise ishal, gelişme geriliği, neonatal ölüm, infertilite, abort ve sindirim sistemi bozuklukları (19, 20, 23, 26) ortaya çıkar. Enteroviruslar sağlıklı ve hasta sığırların faringeal yıkantı ve dışkılarından izole edilmiştir.

Bovine enterovirus enfeksiyonu dünyanın birçok yerinde endemiktir (2, 12, 15, 22, 28). Türkiye’de BEV-1 ve BEV-2 enfeksiyonunun varlığı serolojik olarak ilk kez 1997’de Alkan ve ark. (1) tarafından bildirilmiştir.

Bu çalışmada Türkiye’de mandacılığın yoğun olarak yapıldığı 8 ilde yetiştirilen 355 erişkin mandada BEV-1 enfeksiyonunun seroprevalansının araştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Hücre kültürü

BEV-1'in üretilmesi, enfeksiyözite gücü tayini ve mikronötralizasyon testinde Madine Darby Bovine Kidney (MDBK) hücre kültürü kullanıldı.

Hücrelerin üretilmesinde %10 Fötal Dana Serum (FDS) ilave edilmiş Dulbecco's Minimal Essential Medium (DMEM) (Biochrom-Almanya) kullanıldı.

Virüs

Bovine Enterovirus Tip-1 (DKID₅₀= 10⁻⁵/0,1ml) kullanıldı. Virusun doku kültürü enfektif dozu (DKID₅₀) Kaerber metoduna göre hesaplandı.

Örneklenen hayvanlar ve serum örnekleri

Araştırmada, 8 ilde bulunan BEV-1 aşısı yapılmamış 355 adet mandadan sağlanan kan serum örnekleri kullanıldı (Tablo 1). Serum tüplerine alınan kan örnekleri 3000 rpm'de 10 dk santrifüj edildikten sonra serumlar stok tüplerine aktarıldı ve 56°C'de 30dk tutularak inaktive edildikten sonra, testte kullanılmaya kadar -20°C'de saklandılar.

Örnekleme yapıldığı tek organize sürü Afyon Mandacılık Araştırma Enstitüsü (AMAE) çiftliğidir. Bunun dışındaki örneklerin tamamı Türkiye'deki mandacılığın şekli gereği aile tipi küçük işletmelerde yetiştirilen erişkin hayvanlar ile bu işletmelerde yetiştirilen ve mezbalalarda kesimi yapılan hayvanlardan alınmıştır.

Mikronötralizasyon testi

Kan serum örneklerinde BEV-1 spesifik antikorlarının tespiti amacıyla Frey ve Liess'in (6) bildirdiği yöntemden yararlanıldı. Bu amaçla, 1/5 oranında sulandırılan serum örnekleri mikrotitrasyon tabletinin iki gözüne 50µl konuldu. Üzerlerine eşit hacimde titresi oranında sulandırılmış test virusu da ilave edilerek 37°C'deki %5 CO₂'li etüvde 1 saat inkubasyona bırakıldı. Süre sonunda tüm gözlemlere 50µl MDBK hücre süspansiyonu (300.000hücre/ml) konuldu ve etüvde aynı ortamda 48-72 saat inkubasyona bırakıldı, süre sonunda test doku kültürü mikroskopunda değerlendirildi.

Nötralizasyon testi sonucunda antikor varlığı tespit edilen örneklerde antikor düzeylerini belirlemek (Serum Nötralizasyon₅₀=SN₅₀) amacıyla serum örneklerinin Log 2 tabanına göre hazırlanan sulandırmalarına (1/5, 1/10, 1/20,.....,1/160) mikronötralizasyon testi uygulandı.

Bulgular

Mikro nötralizasyon testi

Toplam 355 kan serum örneği BEV-1 spesifik nötralizan antikor varlığı yönünden test edildi ve seropozitiflik oranı %3.9 (14/355) olarak belirlendi.

Elazığ, Sivas, Samsun ve Konya illerinden elde edilen serum örneklerinde BEV-1'e karşı pozitiflik tespit edilemedi. Örneklenen iller arasında en yüksek seropozitiflik oranı Tokat'ta (%21.4) tespit edildi, diğer

illerde ise seropozitiflik oranlarının %2.4 ile 8.3 arasında değiştiği gözlemlendi (Tablo 1).

Tablo 1. Mikronötralizasyon testi sonuçları.

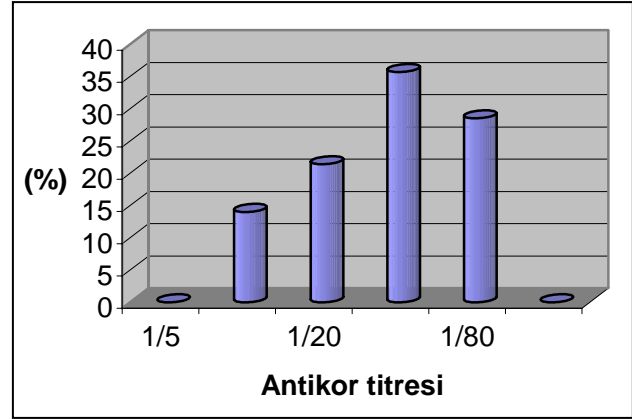
Table 1. The results of microneutralization test.

| İller | Örnek sayısı | BEV Ab(+) | % |
|--------|--------------|-----------|------|
| Afyon | 105 | 3 | 2,8 |
| Elazığ | 6 | - | - |
| Ankara | 36 | 3 | 8,3 |
| Sivas | 16 | - | - |
| Samsun | 74 | - | - |
| Amasya | 82 | 2 | 2,4 |
| Tokat | 28 | 6 | 21,4 |
| Konya | 8 | - | - |
| Toplam | 355 | 14 | 3,9 |

BEV-1 yönünden pozitif olarak belirlenen örneklerin ise, değerlerinin 1/10 ile 1/80 aralığında olduğu ortaya konuldu (Grafik 1).

Grafik 1. BEV-1 için pozitif olan serumların SN₅₀ değerlerinin dağılımı.

Graphic 1. The distribution of SN₅₀ values of positive sera samples for BEV-1.



Tartışma ve Sonuç

Tüm dünyada yaygın olan bovine enteroviruslar birçok organ sisteminde meydana getirdiği semptomlar sonucunda ergin hayvanlarda abort, infertilite ve neonatal ölümler; genç hayvanlarda ise gelişme geriliğine yol açtığından dolayı sığırlarda önemli ekonomik kayıplara neden olabilmektedir.

Bovine enteroviruslar erişkinlerde genellikle subklinik seyretmekte olup, sağlıklı görünümlü hayvanlardan da izole edilebilmektedir (29). Ancak bu hayvanlar yüksek titrede virus saçtıklarından, daha duyarlı olan yeni doğanlarda klinik enfeksiyonun ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Maternal antikorların postnatal dönemin ilk haftasından itibaren sütteki varlıklarının sona ermesiyle yavruların korunması da ortadan kalkmakta ve sürüde akut enfekte bireylerin varlığı söz konusu olduğunda, sürüde ve işletme çevresinde enfeksiyonun

insidensinde ani artışlar meydana gelmektedir. Virusun çevresel şartlara son derece dirençli olması nedeniyle, enfeksiyonun yayılması ve organize sürülerde insidensin yükselmesi çok kolay şekillenmektedir (14).

Türkiye’de Alkan ve ark. (1) tarafından yapılan bir çalışmada, 480 sığırdan BEV-1 için %53 oranında seropozitiflik tespit edilmiştir. Türkiye’de, mandalarda bu konu üzerine herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

BEV-1 enfeksiyonu tüm dünyada yaygın bir enfeksiyondur, Jimenez-Clavero ve ark. (10) İspanya’da 100 sığır gaitasında %78 oranında antijen pozitiflik tespit etmişlerdir. Hamblin ve ark. (7) vahşi hayvanlarda da virüsü izole etmişlerdir. Japonya’da (12) ishal ve pireksi bulguları gösteren danaların dışkılarından enterovirus izole edilmiştir. Mehrota 1973’te (18) mandalarda enterovirusun izolasyon ve karakterizasyonunu yapmıştır. Enfeksiyonun varlığı serolojik olarak da birçok ülkede bildirilmiştir (4, 22, 23).

Bu çalışmada Türkiye’de mandanın en çok yetiştirildiği iller başta olmak üzere 8 ilden toplam 355 manda örneklenmiştir. Numunelerin tamamına yakını ergin dişilerden alınmıştır. Mikronötralizasyon test sonucunda örnekleme yapılan sekiz ilin dördünde tüm hayvanların seronegatif olduğu tespit edilmiştir. BEV-1 spesifik anti-kor varlığı tespit edilen illerden Tokat’ta %21.4 ile en yüksek oran saptanmıştır. Bunu %8.3 ile Ankara, %2.8 ile Afyon ve %2.4 ile Amasya izlemektedir. Örneklenen hayvanların %3.9’unun (14/355) BEV-1 yönünden pozitif olduğu saptanmıştır. Elde edilen bu verinin, Alkan ve ark.’nın (1) çalışmasında bildirilen orandan (%53) çok daha düşük olması; örneklenen populasyonların farklılığı ve yetiştiricilik şekli ile açıklanabilir. Örnek sağlanan illerde belirlenen seropozitiflik oranlarının farklılığı ise; örnek populasyon (her ilde materyal sağlanan işletme sayısının farklılığı) ve işletmelerde bulunan hayvan sayısı farklılıkları, barınma koşulları farklılıkları, enfeksiyonun zamanı, hayvanların yaş dağılımları, vb gibi faktörlerden kaynaklanmaktadır. Bu faktörlerin belirlenen seropozitiflik oranları üzerindeki etkileri ise bu çalışmada araştırılmamıştır.

Sonuç olarak, bu çalışmada mandalarda Türkiye’de ilk kez BEV-1 enfeksiyonunun varlığı ve oranı ortaya konularak, örneklenen populasyon için elde edilen değerlerin sığırlardaki değerlerden genel olarak daha düşük olduğu belirlenmiştir.

Kaynaklar

1. **Alkan F, Özkul A, Karaoğlu MT, Bilge S, Akça Y, Burgu İ, Yeşilbağ K, Oğuzoğlu TÇ** (1997): *Sığırlarda viral nedenli solunum sistemi enfeksiyonlarının seroepidemiolojisi*. Ankara Üniv Vet Fak Derg, **44**, 73-80.
2. **Anderson AA** (1978): *Cross reaction between bovine enterovirus and south African territories 15 foot-and-mouth disease virus*. Am J Vet Res, **39**, 59-63.
3. **Domingo E, Biebrichter C, Holland JJ, Eigen M** (2001): *Quasispecies and RNA virus evolution: principles and consequences*. Landes Bioscience, Austin, Texas
4. **Dunne HW, Huang CM, Lin WJ** (1974): *Bovine enteroviruses in the calf: an attempt at serologic, biologic and pathologic classification*. JAVMA, **164**, 290-294.
5. **Egbertson SH, Mayo DR** (1986): *A microneutralisation test for the identification of Enterovirus isolates*. J Virol Methods, **14**, 305-307.
6. **Frey HR, Liess B** (1971): *Vermehrungskinetik und verwendbarkeit einer stark zytopathogene VD-MD virus stammes für diagnostische untersuchungen mit der mikrotiter-methode*. Zbl Vet Med, **18**, 61-71.
7. **Hamblin C, Knowles NJ, Hedger RS** (1985): *The isolation and identification of bovid enteroviruses from free-living wild animals in Botswana*. Vet Rec, **116**, 238-239.
8. **Hofner MC, Carpenter WC, Lyons SA, Hamblin C** (1993): *An indirect sandwich ELISA for the identification of bovine enteroviruses*. J Virol Methods, **41**, 239-43.
9. **Jain NC, Batra SK** (1985): *Isolation and characterisation of ovine enteroviruses*. Ind J Virol, **1**, 17-25.
10. **Jimenez-Clavero MA, Escibano-Romero E, Mansilla C, Gomez N, Cordoba L, Roblas N, Ponz F, Ley V, Saiz JC** (2005): *Survey of bovine enterovirus in biological and environmental samples by a highly sensitive real-time transcription-PCR*. App Environ Microbiol, **71**, 3536-3543.
11. **Knowles NJ, Barret ITR** (1985): *A serological classification of bovine enteroviruses*. Arch Virol, **83**, 201-208.
12. **Kurogi H, Inaba Y, Takahashi E, Sato E, Omori T** (1976): *Separation and properties of enterovirus and reovirus recovered from a fecal samples with diarrhea*. Natl Inst Anim Health Q (Tokyo), **16**, 49-58.
13. **La Placa M, Portolani M, Lamieri C** (1965): *The basis for a classification of bovine enteroviruses. Antigenic characters studied with chicken immune sera and rhesus monkey erythrocytes agglutinating activity*. Arch Ges Virusforsch, **17**, 98-115.
14. **Ley V, Higging J, Fayer R** (2002): *Bovine enteroviruses as indicators of fecal contamination*. Appl Env Microbiol, **68**, 3455-3461.
15. **McCarthy FM, Smith GA, Mattick JS** (1999): *Molecular characterisation of Australian bovine enteroviruses*. Vet Microbiol, **68**, 71-81.
16. **McClurkin AW** (1976). *Symposium: Calftlood diseases and immunisation programs. Probable role of viruses in calftlood diseases*. J Dairy Sci, **60**, 278-282.
17. **McFerran JB** (1962): *Bovine enteroviruses*. N Y Acad Sci, **101**, 436-443.
18. **Mehrota ML** (1973): *Isolation and characterisation of cytopathogenic viral agents resembling enteroviruses of buffalo*. Indian J Anim Sci, **43**, 624-628.
19. **Moll T, Finlayson AV** (1957): *Isolation of cytopathogenic viral agent from the feces of cattle*. Science, **126**, 401-402.
20. **Moll T, Ulrich MI** (1963): *Biologic characteristics of certain bovine enteric viruses*. Am J Vet Res, **24**, 545-550.
21. **Moscovici C, La Placa M, Maisel J, Kepme CH** (1961): *Studies of bovine enteroviruses*. Am J Vet Res, **22**, 852-863.

22. **Puntel M, Fondevila NA, Blanco Viera J, O'Donnell VK, Marcovecchio JF, Carrillo BJ, Schudel AA** (1999): *Serological survey of viral antibodies in llamas (Lama glama) in Argentina*. Zentralbl Veterinarmed B, **46**, 157-161.
23. **Stott EJ, Thomas LH, Collins AP, Crouch S, Jebbet J, Smith GS, Luther PD, Caswell R** (1980): *A survey of virus infections of the cattle and their association with disease*. J Hyg Camb, **85**, 257-270.
24. **Taylor MW, Su R, Cordell-Stewart B, Morgan S, Crisp M, Hodes ME** (1974): *Bovine Enterovirus-1: characterisation, replication and cytopathogenic effect*. J Gen Virol, **23**, 173-178.
25. **Urakawa T, Shingu M** (1987): *Studies on the classifications of bovine enteroviruses*. Microbiol Immunol, **31**, 771-778.
26. **Wilner BI** (1969): *Classification of the major groups of human and other animal viruses*. Burgess Publishing company, Mineapolis, MN, pp.3239.
27. **Yamada S** (1965): *Studies on bovine enteroviruses. IV. Neutralizing antibodies in the Kyushu district*. Jpn J Vet Sci, **27**, 317-323.
28. **Zhang AQ, Smith JR, Burgess GW** (1990): *Blocking anzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies against bovine enterovirus*. Vet Microbiol, **21**, 275-281.
29. **Zeichhardt H** (1986): *Enteroviruses* In: S.Specter, G.J.Lancz (Ed.), *Clinical Virology Manual*, ch. 21, pp.283-299. Elsevier Science Publishing Company Inc.

Geliş tarihi: 19.12.2005 / Kabul tarihi: 24.02.2006

Yazışma adresi

Afyon Kocatepe Üniversitesi
Veteriner Fakültesi Viroloji AD.
03100 Afyon
e-mail: sibelgr@yahoo.com