

Pasteurella haemolytica 'ya KARŞI AŞILAMALARDAN SONRA GÖRÜLEN SİĞİRLARIN ENFEKSİYÖZ RİNOTRAHİTİS OLGULARI

İrem Gülaçtı¹

Hakan Bulut^{1*}

Occurrence of Infectious Bovine Rhinotracheitis After *Pasteurella haemolytica* Vaccinations

Özet: *Pasteurella (Mannheimia) haemolytica* sığırlarda şiddetli pnömoninin en önemli nedenlerinden biridir ve yüksek oranda ölümlere sebep olur. Pnömonik pastörellozize karşı pek çok ülkede aşılar kullanılmaktadır. Bu çalışmada, pastörella aşısı yapıldıktan sonra ortaya çıkan sığırların enfeksiyöz rinotracheitis (IBR) olguları rapor edilmiştir. Çalışma amacıyla, aşılamadan sonra IBR şüphesi görülen 10 hayvanda burun swap örnekleri alınmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) neticesinde, IBR şüpheli 10 sığıra ait örneklerin 6 tanesinde IBR pozitifliği belirlendi. Ülkemizde IBR enfeksiyonunun prevalansının yüksek olduğu dikkate alındığında, bu çalışmanın sonuçları oldukça önemli görülmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Pasteurella haemolytica*, IBR, aşılama, PCR.

Summary: *Pasteurella (Mannheimia) haemolytica* is one of the major causative agents of severe pneumonia causing high mortality rate in cattle. Vaccines for pneumonic pasteurellosis have been used in many countries. In this study, infectious bovine rhinotracheitis (IBR) cases occurring after *Pasteurella haemolytica* vaccination were reported. For this aim, nasal swap samples were taken from 10 IBR-suspected animals that were previously vaccinated against *Pasteurella haemolytica*. In result of polymerase chain reaction (PCR), 6 of 10 IBR-suspected animals were detected as positive. Considering high prevalence of IBR infection in our country, results of this study is very important.

Key Words: *Pasteurella haemolytica*, IBR, vaccination, PCR.

Giriş

(Moore ve ark., 2000; Smits ve ark., 2000).

Pasteurella (Mannheimia) haemolytica sığırlarda görülen pnömoninin en önemli nedenlerinden biridir. Bu hastalıktan korunmak için, pek çok ülkede, hayvanlara canlı veya inaktif aşılar yapılmaktadır (Brogden ve ark., 1998).

Bu çalışmada, 2005 yılında, Elazığ ve çevresinde koruyucu amaçla pastörella aşısı yapıldıktan sonra ortaya çıkan IBR şüpheli klinik bulguların görüldüğü sığırlarda IBR enfeksiyonunun PCR'la belirlenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Hayvanlar: Elazığ ve çevresinde 2005 yılında, farklı çiftliklerde bulunan 1 yaşını doldurmuş 75 hayvana koruyucu amaçlı Pastörella aşısı (One Shot, Pfizer) yapılmıştır. Aşıdan yaklaşık bir hafta sonra hayvanların 10 tanesinde yüksek ateş, kon-

Bovine herpesvirus-1(BHV-1) *Herpesviridae* ailesinin alphaherpesvirinae alt ailesi içinde yer almaktadır. Bu virüs sığırların solunum sisteminde enfeksiyöz rinotracheitis (IBR) hastalığına, genital sistemde dişilerde püstüler vulvovaginitis (IPV) ve boğalarda enfeksiyöz balanopostitis (IBP) neden olmaktadır (Studdert 1994).

Bovine herpesvirus-1 hastalıklarının teşhis edilmesinde genellikle virüs izolasyonu, virüs nötralizasyon, immunofloresans yada enzime bağlı immünosorbent deneyi (ELISA) gibi testler kullanılmaktadır (Edwards ve ark.,1983; Xia ve ark., 1995). Virüs izolasyonuna dayalı metotlar zaman alıcı ve zahmetlidir. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), kısa sürede sonuç elde edilmesi, duyarlılığı ve özgüllüğünün yüksek olması nedeniyle, BHV-1 vakalarının tanısında sıklıkla kullanılmaktadır

juktivitis, burun akması, solunum sayısında artış ve genel durum bozukluğu gibi klinikler bulgular gözlenmiştir. Bu klinik bulguları gösteren hayvanlardan akut dönemde nazal svap örnekleri alınmıştır.

DNA ekstraksiyonu ve PCR: Klinik ve kontrol örneklerinden (distile su ve IBR Colorado suşu; TCID50: log107.25/ml) DNA ekstraksiyonu ticari bir kit kullanılarak gerçekleştirildi (Wizard Genomic DNA Purification System, Promega Corp., Madison, WI).

PCR reaksiyonu, 10 µl DNA örneği, 10x PCR Buffer (100mM Tris-HCl, pH:8.0, 500mM Potasyum klorit, 15mM Magnezyum klorit)' dan 5µl, 4 dNTP'nin her birinden 2 mM, 1U Taq DNA polimeraz (Bioron), 20 pM primerler (P1; 5'-AAGCGCAAAAACGTGTG-3' ve P2; 5'-TGCAGGTACAGCTTGGC-3') ve 30 µl dH2O olmak üzere toplam 50µl PCR karışımı ile gerçekleştirildi (Santurde ve ark., 1996). Çoğaltma işlemi, 94 °C'de 1 dak.'lık ön ısıtmayı ve 94 °C'de 1 dak., 55 °C'de 1 dak., 72 °C'de 1 dak.'lık toplam 34 döngüyü takiben, 72 °C'de 5 dak. son uzatma ile sağlandı. PCR ürünlerinin 10 µl'si % 1,5'lik agaroz jelde yürütüldü ve UV ışığı altında etidyum bromit boyamayla görüntülendi.

Çalışmada PCR'in deteksiyon limitini belirlemek için; titresi bilinen IBR Colorado suşunun 2 kat sulandırılmalarıyla DNA ekstraksiyonu ve PCR aşaması gerçekleştirildi.

Bulgular

PCR deneyi sonucunda, pozitif kontrol olarak kullanılan, IBR Colorado suşu DNA örneğinin çoğalmasında 323 baz çifti (bç) bir bant gözlemlendi. Titresi bilinen IBR Colorado suşunun 2 kat sulandırılmalarıyla gerçekleştirilen çalışmada; PCR'in deteksiyon limiti yaklaşık 10 virüs partikülü/ml olarak belirlendi. Etken spesifik bantlar (323 bç) IBR şüpheli 10 sığira ait örneklerin 6 tanesinde de görüntülendi (Şekil). Negatif kontrol olarak kullanılan distile su örneği ile IBR şüpheli 10 hayvanın 4 tanesinin DNA örneğinden de herhangi bir amplifikasyon ürünü tespit edilmedi. Negatif olarak belirlenen IBR-şüpheli klinik örneklerde DNA ekstraksiyonu ve PCR aşamaları tekrar edildi. Bu tekrarlarda da örnekler PCR negatif olarak tespit edildi.

Tartışma ve Sonuç

Pasteurella haemolytica tarafından oluşturulan

pnömoni besi sığırlarında çok yaygındır ve bu hastalık besi hayvanlarında büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Brogden ve ark., 1998). *P. haemolytica* genellikle yetişkin hayvanlarda bulunur ve doğumdan kısa bir süre sonra yavruya bulaşarak, üst solunum yolu florasının doğal bir parçası haline gelmektedir. Daha sonra stres ve enfeksiyonlara bağlı olarak *P. haemolytica* A2 tipinden A1 tipine dönüşür ve alt solunum yoluna inerek orada çoğalmaktadır. Bu hastalıktan korunmak için hayvanlara uzun yıllardan beri canlı veya inaktif aşılar uygulanmaktadır (Ackermann ve Brogden, 2000; Lo, 2001).

Mevcut çalışmada konu edilen hayvanlarda, yaz aylarında koruyucu amaçla yapılan pastörella (One Shot, Pfizer) aşılama sonrasında, ateş, konjuktivitis, salivasyon, solunum sayısında artış, burun akıntısı gibi klinik bulgular gözlenmiştir. Bu olgularda, aşılamalardan önce hayvanlarda uzun bir süredir her hangi bir solunum sistemi hastalığı belirlenmemesi, klinik bulguların aşılama sonrası görülmesi ve olguların klinik görüntüsü nedeniyle, IBR enfeksiyonundan şüphe edilmiştir. Yapılan PCR çalışması sonucunda 10 olgunun 6 tanesinde (%60) IBR genomunun varlığı tespit edilmiştir. Kalan şüpheli 4 olguda ise özgül amplifikasyon gözlenmemiştir. Kalan 4 şüpheli olguda IBR'nin görülmemesi, zayıf bir ihtimalle, numune alımı ve işlenmesi ile metotun duyarlılığından kaynaklanabileceği gibi, bu hayvanlarda IBR'ye karışan diğer bir solunum sistemi enfeksiyonunun da var olabileceğini akla getirmektedir. Ancak, IBR-şüpheli 10 olgudan negatif 4 olguya rağmen, aşılanan 75 hayvanın 6 tanesinde virüsün reaktif olması oldukça önemlidir. Özellikle aşı yapılan hayvanlarında latent enfeksiyonun varlığının bilinmesi aşılamanın tüm aşılı gruplarda latent enfeksiyonun tetikleme oranının tespiti bakımından faydalı olacaktır. Ancak, çalışmamızda konu edilen hayvanlarda immun parametrelere bakılamamıştır. Bu nedenle, bu hayvanların latent enfekte olup, olmadıklarına dair bir fikre sahip değiliz.

IBR tüm dünyada yaygın olan bir hastalıktır (FAO, 2000). Bu hastalıktan korunmak için birçok ülkede farklı tedbirler alınmaktadır. Bu hastalıktan korunmak için seronegatif hayvanlara inaktif, canlı veya gp E çıkarılmış marker aşılar uygulanmaktadır (Van Oirschot ve ark., 1996; Kaashoek ve ark., 1994). Bölgemizde IBR'ye karşı herhangi bir aşılama yapılmamaktadır. Daha önce yapılan bir çalışmada, ülkemizde IBR enfeksiyonunun görülme sıklığı yüksek bulunmuştur (Burgu ve Akça, 1986). Bizim bölgemizde yapılan bir çalışmada ise bu has-

taliğin görülme sıklığı % 56 oranında belirlenmiştir (Bolat ve ark., 1996). Bu nedenle, IBR prevelansının yüksek olduğu bu bölgede, *P. haemolytica* aşılmasına bağlı bugün için tespit edemediğimiz faktörlerin latent enfeksiyonu tetiklemiş olabileceği düşünülmektedir.

Pasteurella haemolytica aşıları Avrupa Ülkelerinde sıklıkla kullanılan bir aşıdır. Ancak, Avrupa ülkelerinde BHV-1 latent enfeksiyonları ülkemizdeki kadar yaygın değildir. Bu nedenle, *P. haemolytica* aşılmasından sonra ortaya çıkan olgular ülkemiz açısından önemlidir. Bu konuda daha sağlıklı sonuçların elde edilmesi için, ilave saha çalışmaları yapılması ve deneysel çalışmalara gidilmesi düşünülmektedir.

Teşekkür: Klinik örneklerin temininde yardımları için Pfizer Limitet Şirketi, Hayvan Sağlığı Bölümünden Veteriner Hekim Ahmet Yavaş'a teşekkür ederiz.

Kaynaklar

- Ackermann, M.R. and Brogden K.A. (2000). Response of the ruminant respiratory tract to Mannheimia (*Pasteurella*) haemolytica. *Microbes Infect.*, 2, 1079-1088.
- Bolat, Y., Bulut, H., Özdamendeli, A. ve Doymaz, M. Z. (1996). Sığırlarda infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis virüs antikorlarının saptanması amacıyla geliştirilen enzime bağlı immunosorbent deneyi. *F. Ü. Sağlık Bil. Derg.*, 10, 282-288.
- Brogden, K.A., Lehmkuhl, H.D. and Cutlip, R.C. (1998). *Pasteurella haemolytica* complicated respiratory infections in sheep and goats. *Vet. Res.*, 29, 233-254.
- Burgu, İ. ve Akça, Y. (1986). Türkiyede suni tohumlamada kullanılan bazı damızlık boğalarda IBR/IPV enfeksiyonu. *A. Ü. Vet. Fak. Derg.*, 33, 113-121.
- Edwards, S., Chasey D. and White H. (1983). Experimental infectious bovine rhinotracheitis: comparison of four antigen detection methods. *Res. Vet. Sci.*, 34, 42-45.
- Food and Agriculture Organization. Handistatus II Annual Animal Disease Status, World / 2000 / infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis.
- Kaashoek, M.J., Moerman, A., Madic, J., Rijsewijk, F.A.M., Quak, J., Gielkens, A. L.J. and Van Oirschot J.T. (1994). A conventionally attenuated glycoprotein E-

negative strain of bovine herpesvirus type 1 is an efficacious and safe vaccine. *Vaccine*, 12, 439-444.

Lo R.Y. (2001) Genetic analysis of virulence factors of Mannheimia (*Pasteurella*) haemolytica A1. *Vet. Microbiol.*, 22, 23-25.

Moore, S., Gunn, M. and Walls, D. (2000) A rapid and sensitive PCR-based diagnostic assay to detect bovine herpesvirus 1 in routine diagnostic submissions. *Vet. Microbiol.*, 75, 145-153.

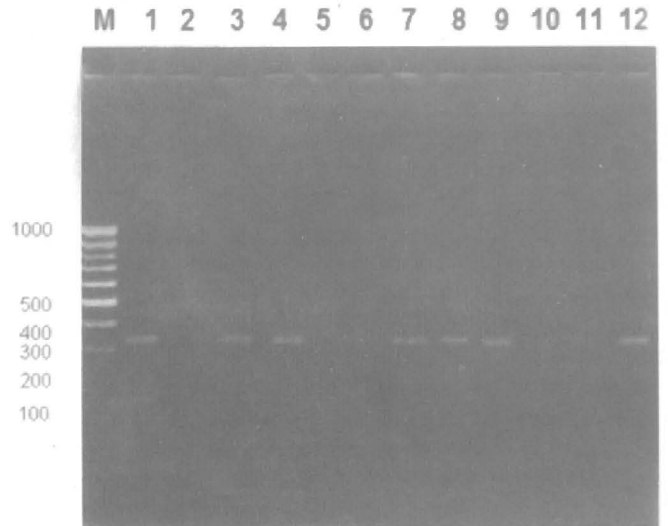
Santurde, G., Da Silva, N., Villares, R., Tabares, E., Solana, A., Bautista, J.M. and Castro, J.M. (1996). Rapid and high sensitivity test for direct detection of bovine herpesvirus-1 genome in clinical samples. *Vet. Microbiol.*, 49, 81-92.

Smits, C.B., Van Manen, C., Glas, R.D., De Gee, A.L., Dijkstrab, T., Van Oirschot, J.T. and Rijsewijk, F.A. (2000). Comparison of three polymerase chain reaction methods for routine detection of bovine herpesvirus 1 DNA in fresh bull semen. *J. Virol. Methods.*, 85, 65-73.

Studdert, M. J. (1994). Bovine herpesvirus. In: *Encyclopedia of Virology*, Webster R.G. and Granoff A., eds. Academic Press, London, UK, 155-158.

Van Oirschot, J.T., Kaashoek, M.J. and Rijsewijk, F.A.M. (1996). Advances in the development and evaluation of bovine herpesvirus 1 vaccines. *Vet. Microbiol.*, 53, 43-54.

Xia, J.C., Yason, C.V. and Kibenge F.S.B. (1995). Comparison of dot blot hybridisation, polymerase chain reaction, and virus isolation for detection of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) in artificially infected semen. *Can. J. Vet. Res.* 59, 102-109.



Şekil 1: PCR amplifikasyon ürünlerinin % 1,5'lik agaroz jeldeki görüntüsü. M; DNA ağırlık markeri, hat 1; pozitif kontrol (IBR Colorado suşu), hat 2; negatif kontrol (distile su), hat 3-12; IBR şüpheli olgular.