

KOYUNLARDA MAVİ DİL ENFEKSİYONU ÜZERİNDE SEROEPİZOOTOLOJİK ARAŞTIRMALAR*

The Serological Survey On Bluetongue Virus Infection In Sheep

Feridun ÖZTÜRK¹, Sibel YAVRU², Saffet ERÖZ

Summary : A sum of 86 blood sera of sheep were collected from Konya Livestock Research Centre. The blood sera were examined to determine the presence of neutralizing antibodies to BTV (Bluetongue Virus), type SA₄ by microneutralization test. BHK (Baby Hamster Kidney) permanent cell line was used for production and titration of BTV and neutralization test. Glasgow Eagle's MEM (Minimum Essential Medium) with 10 % calf sera for cell medium and Glasgow Eagle's MEM without sera for virus medium were used in this research. The blood sera were tested at the rate of 1/10 dilution. At the end of the microneutralization test, the 31 (36.04 %) sheep blood were found seropositive to BTV, type SA₄.

Özet : Tarım Orman ve Köyişleri Bakanlığına bağlı Konya Merkez Hayvancılık Araştırma Enstitüsünde bulunan toplam 86 adet koyundan kan serumu numuneleri toplanmıştır. Alınan kan serumları koyun Mavi Dil virusunun SA₄ tipine karşı, nötralizan antikör varlığını saptamak amacıyla mikronötralizasyon metoduyla test edilmiştir. Mavi Dil virusunun üretilmesi, titrasyonu ve nötralizasyon testlerinde, BHK (Baby Hamster Kidney : Yavru Hamster Böbrek Epitel Hücre) devamlı hücre kültürü kullanılmıştır. Hücre üretime vasatı olarak % 10 inaktif dana serumlu Glasgow Eagle's MEM, virus üretime vasatı olarak serumuz Glasgow Eagle's MEM vasatı kullanılmıştır. Koyun kan serumları, 1/10 sulandırma oranında teste alınmıştır. Mikronötralizasyon testi sonunda, 86 adet serumun 31 adedinde (% 36.04) Mavi Dil virusuna karşı, pozitif nötralizan antikör varlığı tespit edilmiştir.

Giriş

Mavi Dil hastalığı ilk kez 1800 yılında Güney Afrika'daki koyunlarda görülmüştür (18, 19). Sığırlarda ise ilk kez 1889 ve 1904 yılları arasında "Mycotic Stomatitis" adı ile rapor edilmiştir (24). Mavi Dil virusu ilk olarak 1952 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde Kaliforniya'daki enfekte koyunlardan izole ve identifiye edilmiştir (23).

Mavi Dil hastalığı akut seyreden, mevsime bağlı, öncelikle koyunlarda görülen ve sokucu sineklerle nakledilebilen viral bir enfeksiyondur (16, 21). Hastalık ateş, dolaşım bozuklukları, oral ve nazal mukozada hiperemi, dudakta ödem, daha sonra gangranöz bir rhinitis ve mukoza ülserasyonları ile karakterizedir (21).

Mavi Dil hastalığı sığırlarda ise; benzer semptomlarla birlikte hidraensefaliye, ekstremitelerde deformasyona, gebe ineklerde aborta, yeni doğanlarda ölümlere neden olduğu bildirilmektedir (21).

Koyun ve sığırlar dışında keçiler ve yabani ruminantlar da enfeksiyon spektrumu içinde yer almaktadır (1, 2).

Mavi Dil hastalığının etkeni Reoviridae familyasının Orbivirus cinsi içinde yer alır (4, 21). Virus hepsi enfeksiyöz olan, molekül ağırlığı 2.7 x 10⁶ ile 0.28 x 10⁶ Dalton arasında sınırlanmış 10 segmentten oluşan çift zincirli RNA molekülü içerir (10, 21). Virion 60-80 nm çapındadır (20). Mavi Dil virusunun şimdiye kadar 22 serotipinin tespit edildiği bildirilmiştir (17, 30). Virus hücre membranlarına yüksek bir affinite göstermektedir (10).

Hücre kültürlerinde CPE (Cytopathologic effect) yaparak üreyen virusun üreme sırasında hücrelerde intranükleer ve intrastoplazmik inklüzyon cisimcikleri oluşturduğu rapor edilmektedir (16, 21).

İmmunolojik olarak pluralite özelliği gösteren etkenin bütün serotipleri komplemanı tutan ortak antijene sahiptirler (16, 21). Etken dış etkilere karşı oldukça dayanıklıdır (4).

Mavi Dil virusu sığır, kobay, fare, insan, tavuk ve kaz eritrositlerini hemaglutine etmektedir (9, 11).

Virusun üretilmesinde ilk inokulasyon embriyolu tavuk yumurtasına yapılmakta, daha sonra doku kültürlerine adapte edilmektedir (13, 21).

Virusun temas yoluyla bulaştığı şimdiye kadar rapor edilmemiştir (25). Koyundan koyuna, koyundan sığıra veya sığırdan sığıra virus bulaşması için insekt ısırmasına veya eksperimental inokulasyona ihtiyaç vardır (13, 21).

Culicoides'lerin Mavi Dil virusunun biyolojik vektörü olduğu ve virusun Culicoides'lerin hemolenf ve tükrük bezlerinden izole edildiği bildirilmiştir (27, 28).

Hafez ve Taylor (17), Suudi Arabistan'da 560 koyun, 61 keçi, 112 sığır ve 3 deveden alınan kan serumlarında Mavi Dil virusunun bilinen 22 serotipine karşı AGPT'ni kullanılarak presipitan antikörleri tespit etmişler ve 560 koyundan 336'sını (% 60), 61 keçiden 26'sını (% 43), 112 sığırdan 20'sini (% 18) ve 3 deveden 2'sini (% 67) pozitif bulmuşlardır. Aynı araştırmacılar (17) daha sonra Mavi Dil virusunun bilinen 22 serotipini kullanarak tam presipitasyon veren 31 koyun ve 1 keçi kan serumunu nötralizasyon testi ile kontrol etmişlerdir, sadece 12 serumun 1 veya daha fazla Mavi Dil virus serotipini nötralize ettiğini bildirmişlerdir.

Leféuer ve Calvez (22), 1982 ve 1984 yılları arasında 6 Afrika ülkesinde 238 keçi ve 1021 koyundan topladıkları kan serumlarını Mavi Dil virusuna karşı AGPT ile kontrol etmişler, pozitif koyun ve keçilerin oranını sırasıyla Çad'da % 18- % 54, Kuzey Kamerun'da % 16.6 - % 35, E-topya'da % 8- % 44, Zaire'de % 36.5 - % 46 olarak bulmuşlardır.

Sendow ve ark. (26), Endonezya'da inek, manda, koyun ve keçilerden toplanan kan serum örneklerini Mavi Dil virusuna karşı AGPT ve nötralizasyon testine tabi tutarak

* Bu araştırma, S.Ü. Araştırma Fonunun desteği ile yürütülmüştür. Proje No. : 87-067.

1 Prof. Dr. , S.Ü. Veteriner Fakültesi Viroloji Bilim Dalı, Konya.

2 Yrd. Doç. Dr., S.Ü. Veteriner Fakültesi Viroloji Bilim Dalı, Konya.

3 Vet. Hek., Konya Merkez Hayvancılık Araştırma Enstitüsü, Konya.

presipitan ve nötralizan antikorları taramışlardır. Sonuçta 1742 inekte % 53, 247 mandada % 75, 287 keçide % 32 ve 224 koyunda % 19 oranında Mavi Dil virus antikorları tespit etmişlerdir.

Türkiye'de Mavi Dil hastalığının ilk defa 1944 yılında Hatay Bölgesinde görüldüğü ve bulaşmanın Suriye'den kaynaklandığı tahmin edilmektedir (5). Dağlıç koyunlarında 1977 yılının sonbahar aylarında Türkiye'nin Batı Bölgesinde Aydın ilinde Mavi Dil hastalığının tekrar ortaya çıktığı bildirilmiştir (3). Koyunları bu hastalığa karşı koruma için çok sıkı sağlık zabıtası önlemleri alınmış ve buna paralel olarak sistemli bir aşılama kampanyası başlatılmıştır. Yonuç ve ark. (31), 1978 yılında Türkiye'de koyunlarda Mavi Dil virusunu izole etmişlerdir. 1982 yılında Türkiye'de izole edilen Orbiviruslardan şüpheli bir serotipin (6), Mavi Dil viruslarıyla ilişkisini araştırmak amacıyla; bilinen 20 ayrı Mavi Dil serotipine karşı hazırlanmış refarens hiperimmün serumlarla yapılan çalışma sonunda, bu virusun Mavi Dil viruslarıyla aynı olmadığı ve antijenik ilişki içinde bulunmadığı saptanmıştır (7). Gürtürk ve ark. (16), 1980 yılında Aydın bölgesinden topladıkları 21 adet sığır kan serumundan 19 tanesinde Türkiye'de ilk defa sığırlarda, Mavi Dil virusunun SA₄ suşuna karşı nötralizan antikorlar saptanmışlardır. Aynı araştırmacılar (16), buzağların cerebros spinal sıvısından BHK₂₁ hücre kültürlerinde Mavi Dil pozitif serumundan nötralizasyon veren bir virus izole etmişlerdir. Yonuç ve ark. (31), Batı Türkiye'de gözlenen Mavi Dil hastalığının Aydın, İzmir, Manisa, Çanakkale, Balıkesir, Denizli, Antalya, Kocaeli ve İstanbul'un bazı bölgelerinde görüldüğünü bildirmişlerdir.

Girgin ve Yonuç (15), Türkiye'de Aydın, İzmir, Balıkesir ve Çanakkale illerinde koyun, sığır ve keçilerden alınan toplam 691 adet kan serumunda Mavi Dil virusuna karşı koyunlarda % 46, sığırlarda 16, keçilerde ise % 44 oranında nötralizan antikorlar tespit etmişlerdir.

Burgu ve ark. (8), Tahirova Devlet Üretim Çiftliği koyunlarından aldıkları 52 adet kan serumunda mikronötralizasyon testiyle, Mavi Dil virusunun SA₄ suşuna karşı nötralizan antikor tespit edememişlerdir.

Bazı araştırmacılar (5, 9), serumdaki spesifik antikorların Mavi Dil virusunu etkilemediğini çeşitli serolojik testlerle belirlemişlerdir. Bunlar arasında nötralizasyon testi (NT), Plak nötralizasyon testi (PNT), agar gel presipitasyon testi (AGPT), komplement fitzasyon testi (CF), direkt ve indirekt flouresans antikor testi (FAT), Elisa testi, single radial hemoliz testi (SRH), hemaglutinasyon-inhibisyon testi (HAI) sayılabilir.

Bazı araştırmacılar (5, 8) ise Mavi Dil viruslarının tip tayininde ve seroepizootolojik çalışmalarda nötralizasyon testini kullanmışlardır.

Bu çalışmada, Konya Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsüne ait koyunlarda Mavi Dil virusuna karşı nötralizasyon testiyle nötralizan antikorların taraması yapılarak hastalığın devlete ait işletmelerdeki durumu ve elde edilen sonuçların sonraki çalışmalara ışık tutması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Serumlar : Konya Merkez Hayvancılık Araştırma Enstitüsünde bulunan 86 koyundan alınan kan serumları serolojik teste tabi tutulmadan önce su banyosunda 56 °C'da 30 dakika ısıtılarak inaktive edildi. 2x antibiyotik (100 I.Ü. penisilin / ml, 100 gama streptomisin/ml, 0.05 mg kanamisin/ml) ilave edilip oda ısısında 2 saat bekletildikten sonra sterilite kontrolleri yapılarak kullanılmaya kadar - 20 °C'da saklandı.

Hücre kültürü : Araştırmada, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Bilim Dalından temin edilen BHK (Baby Hamster Kidney : Yavru Hamster Böbrek Epitel Hücresi) devamlı hücre kültürü kullanıldı. Bu hücre kültürü % 10 inaktif dana serumu kapsayan Glasgow Eagle MEM (Minimum Essential Medium) vasatında üretili.

Virus : Araştırmada kullanılan Mavi Dil virusunun SA₄ suşu Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Bilim Dalından temin edildi. Virus, BHK hücre kültürlerinde 37°C'da üretili. Virus üretme vasatı olarak serumsuz Glasgow Eagle MEM vasatı kullanıldı. Takriben % 85'inde CPE görüldüğü zaman hücreler toplandı. Dondurma çözündürme işleminden sonra virüslü hücre sıvısı, 3000 devirde 30 dakika kadar santrifuj edildi. Virus süspansiyonu 1 ml miktarında tüplere taksim edildi ve kullanılmaya kadar -80°C'da muhafaza edildi. Mavi Dil virusunun enfeksiyözite titresi mikrotitrasyon metodu ile tespit edildi (14).

Serum nötralizasyon testi : Koyunlardan alınan kan serumlarında Mavi Dil virusuna karşı nötralizan antikorları belirlemek amacıyla çeşitli araştırmacılar (8, 12) tarafından uygulanmış olan mikronötralizasyon testi kullanıldı. Kontrolleri yapılacak olan kan serumları PBS (Phosphate Buffer Solusyon) ile 1/10 oranında sulandırıldıktan sonra mikronötralizasyon tablasında her bir sırada bulunan dört göze 0.05 ml konuldu. Daha sonra bütün gözlere titresi belli virüstan (100 DKID₅₀ : Doku Kültürü Enfektif Doz 50) 0.05 ml ilave edildi. Mikronötralizasyon tablasının üzeri steril nontoksik şeffaf bir bant ile kapatılarak 1 saat 37°C'de bekletildi. süre sonunda tablaların üzerindeki bant kaldırılarak her göze BHK hücrelerinden (3 x 10⁵ hücre /ml) 0.05 ml damlatıldı. Mikronötralizasyon tablalarının üzeri steril bant ile kapatılıp 37°C'de etüvde inkube edildi. Sonuçlar 3. günde doku kültürü mikroskopunda okundu. Ayrıca mikronötralizasyon plate'leri boyanarak (29) sonuçlar makroskopik olarak da tespit edildi.

Bulgular

Araştırmada kullanılan Mavi Dil virusunun SA₄ suşunun BHK hücre kültürlerinde üretilmesi, üretim süresi ve mikrotitrasyon yöntemi ile saptanan enfeksiyözite titresi tablo 1'de gösterilmiştir.

Konya Hayvancılık Araştırma Enstitüsünde bulunan 86 adet koyundan alınan kan serumu numuneleri üzerinde, Mavi Dil virusu SA₄ suşuna karşı mikronötralizasyon yöntemi ile yapılan mikronötralizasyon testi-ne ait değerler tablo 2'de verilmiştir.

Tartışma ve Sonuç

Bu araştırmada koyunlarda Mavi Dil enfeksiyonunun indirekt teşhisinde nötralizasyon testi kullanılmış ve ortaya çıkan % 36.04 seropozitiflik oranının, bazı araştırmacıların (22, 26) AGPT ile tespit ettikleri seropozitiflik oranının çok üzerinde olduğu saptanmıştır. Mavi Dil enfeksiyonlarının indirekt teşhisinde nötralizasyon testinin kullanılmasının AGPT kadar hassas ve uygulamasının kolay olduğu bu araştırma ile gösterilmiş ve bu durum Girgin ve Yonuç'un (15) yaptıkları çalışma ile teyit edilmiştir.

Bu araştırmada Konya Merkez Hayvancılık Araştırma Enstitüsüne ait 86 koyundan alınan kan serumlarının 31 adedinde (% 36.04) 1/10 serum sulandırmasında Mavi Dil virusuna karşı nötralizan antikorlar saptanmıştır. Bu araştırmada bulunan seropozitiflik oranı Girgin ve Yonuç'un (15) koyunlarda buldukları orana yakın bir değerdir.

Hastalıkla mücadelede ağıl hijyeni, culicoides'lerle savaş ve sağlamların aşılınması önem taşımaktadır. Koyunların aşılınmasına karşı sığır ve keçilere aşı tatbik

edilmemektedir. Bu hayvanlarda da Mavi Dil antikoruna bulunabilir, bu doğrudan doğruya doğal enfeksiyona bağlıdır. Bu durumda belirgin klinik bulgular görülmesi bile bölgedeki sığır ve keçiler de Mavi Dil enfeksiyonuna yakalanabilirler. Yurdumuzun Ege Bölgesi'nde hastalık saptandıktan sonra Mavi Dil aşısı ile Ege Bölgesi'nde koyunlara aşılama yapılmış ve aşı uygulamalarından sonra hastalığın bölgede görülmediği bildirilmiştir (15). Aşı uygulama-

larının daha da yaygınlaştırılması ve özellikle devlet işletmelerindeki koyunlara uygulanması hastalığın önlenmesi yönünden yararlı olacaktır.

Sonuç olarak, bu araştırmada hem devlete ait bir hayvancılık işletmesindeki koyunlarda Mavi Dil enfeksiyonunun varlığı ortaya çıkarılmış ve hem de yurdumuzun Orta Anadolu Bölgesinde enfeksiyonun olabileceğine dikkat çekilmiştir.

Tablo 1 : Araştırmada kullanılan Mavi Dil virusunun BHK hücre kültüründe üretilmesi ve enfeksiyözite değeri.

Hücre kültürü	CPE	Üremesüresi	Enfeksiyözite değeri (DKID ₅₀ /0.05 ml)
BHK	+	2 gün	10 ^{5.95}

Tablo 2 : Mikronötralizasyon testi sonuçları.

Serumların alındığı yer	Teste tabi tutulan serum sayısı	1/10 serum sulandırmasında pozitif serum sayısı	Pozitif serumların yüzdesi (%)
Konya Merkez Hayvancılık Araştırma Enstitüsü	86	31	36.04

Kaynaklar

1. Abu Elzein E.M.E. (1984). Rapid detection of Bluetongue virus antigen in the sera and plasma of camels, sheep and cattle in Sudan, using the gel immunodiffusion test. Arch. Virol., 79, 131-134.
2. Abu Elzein E.M.E. (1985). Bluetongue in the Sudan. Revue Scientifique et Technique, Office International des Epizooties, 4, 4, 795-801.
3. Anonim (1971). Koyun Hastalıkları. Pendik Vet. Kont. Araş. Enst. Yayınları No : 3, Hilal Matbaacılık Koll. Şti., İstanbul.
4. Border E.C., Shope R.E. and Murphy F.A. (1971). Physicochemical and morphological relationships of some Arthropod-Borne viruses to Bluetongue virus. A new taxonomic group. Physicochemical and serologic studies. J. Gen. Virol., 13, 261-271.
5. Boulanger, P. and Frank, J.T. (1975). Serological methods in the diagnosis of bluetongue. Aust. Vet. J., 51, 185-194.
6. Burgu, İ. (1980). Koyunlarda abort yapan orbivirüsler dahil bir serotipin özellikleri ile Türkiye'deki durumu üzerinde araştırmalar. A. Ü. Vet. Fak. Derg., 3-4, 135-150.
7. Burgu İ. and Öztürk F. (1982). Serologischer Vergleich eines in der Türkei aus schafblutungen isolierten virus (stam "Ankara") mit blautzunge (Bluetongue) virus typen. A.Ü. Vet. Derg., 29, 3-4, 502-505.
8. Burgu, İ. Öztürk F. ve Akça Y. (1985). Tahirova Devlet Üretim Çiftliği koyunlarında viral enfeksiyonlar üzerinde serolojik araştırmalar. A.Ü. Vet. Fak. Derg., 32, 2, 167-179.
9. Coackley W., Smith V.W. and Maker D. (1980). A serological survey for bluetongue virus antibody in Western Australia. Aust. Vet. J., 56, 487-491.
10. Collisson, E.W. and Barber T.L. (1984). Blood cells associated with bluetongue virus infection in cattle. Proceeding of Annual Meeting of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, 26, 287-300.
11. Cowley J.A. and Gorman B.M. (1987). Genetic reassortants for identification of the genome segment coding for the bluetongue virus hemagglutinin. Journal of Virology, 61, 7, 2304-2306.
12. Flanagan, M., Wilson A.J., Trueman K.F. and Shepherd M.A. (1982). Bluetongue virus serotype 20 infection in pregnant Merino sheep. Aust. Vet. J., 59, 18-20.
13. Foster N.M., Jones R.H. and Luedke A.J. (1986). Transmission of attenuated and virulent bluetongue virus with culicoides variipennis infected orally via sheep. Am. J. Vet. Res., 29, 275-279.
14. Frey H.R. und Liess, B. (1971). Vermehrungskinetik und Verwendbarkeit seiner stark zytopathogenen VDM Virusstammes für diagnostische Untersuchungen mit der Microtiter-Methode. Zbl. Vet. Med., 18, 61-71.
15. Girgin H. ve Yonguç A.D. (1988). Türkiye'deki koyunlarda Mavi Dil hastalığının serolojik, etiyolojik ve patolojik durumu üzerinde araştırmalar. Etik. Vet. Mikrobiol. derg., 6, 3, 13-24.
16. Gürtürk S., Burgu İ. ve Toker A. (1980). Türkiye'de sığırlarda Mavi Dil (Bluetongue) enfeksiyonu üzerinde araştırmalar. A. Ü. Vet. Fak. Der., XXVII, 1-2, 322-330.
17. Hafez S.M. and Taylor W.P. (1985). Serotypes of Bluetongue virus present in Saudi Arabia. Bluetongue

- and Related Orbiviruses, 531-537. Alan R. Liss, Inc.
18. **Howell P.G.** (1963). Bluetongue in Emerging disease of animal. FAO Agric. Study no. 61, FAO of U.N., Rome, 111-153.
 19. **Howell P.G. and Vermorel D.W.** (1971). Bluetongue. Virology Monographs., 9, 37-74.
 20. **Wawetz-Melnick, E.L. and Adelberg, E.A.** (1980). Bluetongue. Review of Medical Microbiology, 14 th ed., 329.
 21. **Kahrs, R.F.** (1986). Viral Disease Of Cattle. The Iowa State University Press/Ames, Iowa.
 22. **Lefèvre, P.C. and Calvez D.** (1986). Bluetongue in terropical Africa : Influence of ecological factors on the prevalence of infection. Rev. Elev. Méd. Vét. Pays Trop., 39, 3/4, 263-268..
 23. **McGowan B.** (1953). An epidemic resew bling sore muzzle of bluetongue in California Sheep. Cornell Vet., 43, 213-216.
 24. **Metcalf, H.E. and Luedke, A.J.** (1980). Bluetongue and related disease. The Bovine Practitioner, 15, 188-193.
 25. **Neitz, W.O.** (1948). Immunological studies of bluetongue in sheep. J. Vet. Sci. Anim. Ind., 23, 93-136.
 26. **Sendow, I., Young, P. and Ronohardjo, P.** (1986). Serological studies of buletongue virus in Indonesia: Melbourne, Australia, CSIRO, 271-273.
 27. **Soulsby, E.J. L.** (1974). Helminths, arthropod and protozoa of domesticated animals. 6th ed., Balliere Tindall, England, 392-394.
 28. **Statt, J.L., Osburn, B.I., Bushnell, R., Loomis, E.C. and Squire, K.R. E.** (1985). Epizootiological study of bluetongue virus infection in California Livestock : An overview. Alan R. Liss. Inc., 571-582.
 29. **Witte, K.H.** (1971). Micro-clor test for assay of transmissible gastroenteritis virus neutralizing antibodies. Arch. ges. Verusforsch., 33, 171-176.
 30. **Yang, C., Ho, E. and Hubschle, O.J.B.** (1984). Haemagglutination of bluetongue virus (BTV), a simple preparation high titre antigen. Zbl. Vet. Med., 13, 31, 505-507.
 31. **Yonguç, A.D., Taylor, W.P., Csontos, L. and Worrall, E.** (1982). Bluetongue in Western Turkey. Vet. Rec., III, 144,146.