

## ÇEŞİTLİ SERUMLARDA (KOYUN-KEÇİ-SIĞIR) MAVİ DİL ANTİKORLARININ AGAR-JEL PRESİPİTASYON TESTİ İLE ARAŞTIRILMASI

Arife ERTÜRK (\*)

### 1. GİRİŞ

Ruminantlarda, reoviridae familyasının orbivirus grubu tarafından meydana getirilen mavi dil hastalığının varlığı, dünyada ve ülkemizde yapılan serolojik çalışmalar (11,12,19,20,25,33,38,40,45) ve virus izolasyonları ile saptanmıştır (8,29,45).

Mavi dil koyun, keçi, sığır ve yabani geviş getirenlerin akut, subakut seyirli, mevsime bağlı, arthropodlarla taşınan viral bir hastalığı olarak tanımlanmaktadır (8).

Hastalığın koyunlarda ve sığırlarda büyük ekonomik kayıplara neden olduğu bilinmektedir (1,14). Özellikle koyunlarda yüksek oranda ölüm, kondüsyon düşüklüğü ve yapağı gelişmesinin durması sonucu yapağı kaybına neden olur. Ayrıca hayvanlarda tortikollis şekillenir ve hayvanlar beslenemez. Genel direncin azalması, hayvanları bakteri veya chlamydia enfeksiyonları için uygun bir konakçı haline getirir. Gebe koyunların yavru atmaları veya anormal oluşumlu kuzu doğurmaları ekonomik kayıplara bir neden olarak da gösterilmektedir (8).

Yapılan çalışmalar, yerli koyunların ithal edilen koyunlardan ve merinoslardan daha az enfeksiyona duyarlı olduğunu ortaya koymuştur (23). Ülkeler ve kıtalar arasında koyunların mavi dil hastalığına bağlı mortalite oranları değişiktir. Mortalite oranları G. Afrika'da % 2-30 arasında değişmesine karşın Amerika Birleşik Devletleri'nde mortalite oranı % 5 olarak bildirilmiştir (26,43).

Mavi dil virusunun serotipleri arasında virulans farklılıkları tesbit edilmiştir (39).

(\*) Etlik Hayvan Hastalıkları Araştırma Enst., Uzm. Vet. Hekim

Sığırlardaki ekonomik kayıplar, süt veriminde azalma, kondüsyon kaybı, anormal buzağı doğumları olarak bildirilmektedir (19,27).

Türkiye'de mavi dil enfeksiyonunun varlığını saptamak amacı ile çeşitli araştırmacılar tarafından gerek virus izolasyonları (27,45) ve gerekse, hastalığa sebep olan virusun serolojik tiplerinin saptanmasında ve antikor varlığının tesbitinde, serum nötralizasyon testi (Makro ve mikro serum nötralizasyon test) ve agar jel presipitasyon testleri (5,10,20,24,38) yardımı ile seroepidemiolojik çalışmalar yapılmıştır. Tip tayininde ise serum nötralizasyon testi (SNT) ve plak redüksiyon testleri uygulanmıştır (15,30 31).

Saha kontrollerinde, grup spesifik antijene sahip olması nedeniyle agar jel presipitasyon testi tercih edilmektedir. AGPT ile tüm tiplere karşı oluşmuş antikorları saptamak mümkündür (7).

Bu çalışmada, Türkiye'de değişik bölgelerden toplanan koyun, keçi ve sığır kan serumlarında mavi dil virusuna karşı AGPT ile antikor taraması yapılarak hastalığın bölgesel durumu, yaygınlığı ve elde edilen sonuçların sonraki çalışmalara ışık tutması amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Hastalığın Coğrafi Yayılışı

Mavi dil hastalığı ilk kez 1800 yılında Güney Afrika'daki koyunlarda görülmüştür (28,29).

Hastalığın vatanı Afrika'dır. İlk tanımı 1881'de Hutcheon tarafından yapılmış ve hastalığa "Epizootic Catarrh" ismi verilmiştir (8,24).

Sığırlarda ilk kez 1889 ve 1904 yılları arasında "Mycotic Stomatitis" adı ile rapor edilmiştir (36).

1905 yılında Spreull hastalık etkeninin bir virus olduğunu belirterek hastalığa "Mavi dil" ismini vermiştir (29).

1906 yılında Theiler tarafından infeksiif sıvılar, Berkefeld filtresinden geçirilerek ajanın filtrabl bir ajan olduğu saptanmıştır (8).

1940'lı yıllara kadar yalnızca Afrika'da tanınan mavi dilin daha sonraları batı Akdeniz ülkelerinde de varlığı doğrulanmıştır (8,16).

1949 yılında Gambles tarafından (29) Kıbrıs adasında şiddetli bir epizooti bildirilmiştir. Epizooti bölgelerin bazılarında % 60-70 mortaliteye sebep olmuştur. Hastalık, Suriye'de ve İsrail'de de görülmüştür.

Mavi dil virusu, 1952 yılında California'da koyunlardan, 1959 yılında ise Oregon'da sığırlardan izole edilmiştir (1,8,16).

1956-1957 yıllarında Portekiz ve İspanya'da büyük bir epizooti daha bildirilmiştir.

1959 yılında şiddetli bir epizooti Japonya'da sığırlarda komplemant fikzasyon testi (CFT) ile mavi dil olarak doğrulanmıştır (8).

Hastalığın 1959 yılında Pakistan'da, Kuzey Avustralya Papua ve Yeni Gine'de, 1963 yılında da Hindistan'da varlığı bildirilmiştir (21).

Türkiye'de mavi dil hastalığının ilk defa 1944 yılında Hatay bölgesinde görüldüğü ve bulaşmanın Suriye'den kaynaklandığı tahmin edilmektedir (11,20). Klinik olarak teşhisi konmuş fakat herhangi bir laboratuvar çalışması yapılmamıştır.

1977 yılının sonbahar aylarında Türkiye'nin batı bölgesinde, Aydın ilinde mavi dil hastalığının tekrar ortaya çıktığı bildirilmiştir (11,45).

Yonguç ve ark. (45) ilk defa 1978 yılında Türkiye'de koyunlarda mavi dil virusunu izole etmişlerdir.

Eylül 1980 yılında AG/HE'li yeni doğmuş bir buzağıdan BTV serotip 4 izole edilmiştir (27).

Gürtürk ve ark. (24). 1980 yılında Aydın bölgesinde topladıkları 21 adet sığır kan serumundan 19 tanesinde sığırlarda, mavi dil virusunun BT4 suşuna karşı nötralizan antikörlerini saptamışlardır.

Hızıroğlu, (27) 1985 yılında AG/HE'li 18 buzağıdan 8'inde ELISA testi kullanarak mavi dil için pozitif sonuçlar elde etmiş bunun yanısıra hydrancephalili iki buzağının kanından "Etlik Araştırma Enstitüsü"nde mavi dil virusunun izolasyonunu bildirmiştir.

Yonguç ve ark. (45) da, mavi dil hastalığının Aydın, İzmir, Manisa, Çanakkale, Balıkesir, Denizli, Antalya, Kocaeli ve İstanbul'un bazı bölgelerinde görüldüğünü bildirmişlerdir.

Bolat (5), Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgesinde klinik vak'a görülmemesine rağmen hastalığın % 7.32 - 33,25 arasında değişen bir oranda yayılmış olduğunu bildirmiştir.

Dünyanın çeşitli bölgelerinde mavi dil virusunun serotipleri Tablo 1'de gösterilmiştir (16).

**Tablo 1**

BÖLGE	SEROTİPLER
Güney ve Batı Afrika	1 - 15 - 18 - 19 - 22 - 24
Ortadoğu	1 - 3 - 4 - 10 - 12 - 16
İber Yarımadası	10
Amerika B. Devletleri	2 - 10 - 11 - 13 - 17
Avustralya	1 - 20 - 21 - 23
Güney Amerika (Brezilya)	4
Türkiye	4

## 2.2. Virusun Özellikleri

Mavi dil hastalığının etkeni Reoviridae familyasının Orbivirus cinsi içinde yer alır (3,6,10,15,21,32). Virus hepsi enfeksiyöz olan, molekül ağırlığı  $2,7 \times 10^6$  ile  $0,28 \times 10^6$  Dalton arasında sınırlanmış 10 segmentden oluşan çift iplikçikli RNA molekülü içerir (11,29). Virion 60.80 nm çapındadır. Virus eter ve kloroforma karşı dayanıklıdır. 6'dan aşağı ve 8'den yukarı pH değerlerine hassastır.

Mavi dil virusunun şimdiye kadar 24 serotipinin tesbit edildiği bildirilmiştir (16,25,44). Virus hücre membranlarına yüksek bir affinite göstermektedir (13).

Immunolojik olarak pluralite özelliği gösteren etkenin bütün serotipleri komplemanı tutan ortak antijene sahiptirler (23,24,32). Etken dış etkilere karşı oldukça dayanıklıdır (6).

Zarsız olmalarına rağmen hemaglutinasyon özelliğine sahiptirler. Mavi dil virusu sığır, kobay, fare, insan, tavuk ve kaz eritrositlerini hemoglobuline etmektedir (12,14).

Virusun üretilmesinde ilk inokulasyon embriyolu tavuk yumurtasına yapılmakta, daha sonra doku kültürlerine adapte edilmektedir (17,32).

Virus üretmek için BHK-21, Hela, VERO ve insan amnion hücreleri gibi çeşitli hücre kültürleri kullanılır (3,15,16). Ayrıca virus embriyonal dana böbreği ve kuzu böbreğinden hazırlanan primer hücre kültürlerinde de üretilmiştir. Hücre kültürlerinde CPE yaparak üreyen virus, üreme sırasında hücrelerde intranükleer ve intrastoplazmik inklüzyon cisimcikleri oluşturur (24,32).

### 2.3. Epidemiyoloji

Mavi dil virusunun temas yoluyla bulaştığı şimdiye kadar bildirilmemiş olmasına rağmen (32) ender olarak boğalar, viremik dönemlerinde virusu spermaları ile nakledebilirler (15,16).

Virus bulaşması için insekt ısırmasına veya eksperimental inokulasyona ihtiyaç vardır (20,32). Kan emici sinekler özellikle culicoides türü sinekler hastalığı nakledebilirler (22). Culicoideslerin mavi dil virusunun biyolojik vektörü olduğu ve virusun culicoideslerin hemolenf ve tükürük bezlerinden izole edildiği bildirilmiştir (41,42).

Başta koyunlar olmak üzere sığır ve keçiler de hastalığa yakalanırlar. Merinos ve kıvrıcıklar diğer türlere göre hastalığa karşı daha duyarlıdırlar (3,14).

Hastalık genellikle yaz ortaları ve sonbahar başlarında görülür (8). Hastalığın mevsimsel durumu culicoideslerin uçuş zamanlarına bağlıdır. Salgının en yüksek düzeye ulaştığı zaman, rutubetli havaların ve sokucu sinek popülasyonunun en yoğun olduğu zamandır (16).

### 2.4. Patogenez

Mavi dil tipik sikluslu genel bir hastalıktır. Viremi döneminden önce virus hematopoetik hücrelerde ve kan damarlarının endotel hücrelerinde çoğalır. Endotel hücrelerinde enfeksiyonu takiben celular hipertrofi, piknoz ve karyoreksis meydana gelir. Bu değişiklikler damar daralmalarına ve ek-sudasyona neden olur ve bunun sonucunda oluşan dolaşım bozukluklarına bağlı olarak da ödemler görülür.

Etken kolaylıkla placentayı geçer, fötüs de intrauterin enfeksiyonlar oluşur (9,15,16).

## 2.5. Patolojik Bulgular

Histolojik olarak, mukozada peteşiyel kanamalarla birlikte, barsak kanalında kataral bir yangı vardır. Diğer dokularda ise yaygın hiperemi, ödem ve kanamalar bulunur. Pulmoner arterin tunica mediasındaki kanamalar hastalık için patognomiktir (16). Lenf düğümleri ve dalak orta derecede büyümüş ve hemorajiktir. İskelet kasları boyunca peteşiler ve soluk renkteki nekroz alanları düzensiz şekilde dağılmıştır. Üst solunum sisteminde kataral bir yangı, akciğerlerde ödem vardır (15,21).

## 2.6. Klinik Belirtiler

Mavi dil enfeksiyonlarında klinik belirtiler, ateş, dolaşım bozuklukları, oral ve nasal mukozada hiperemi, dudakta ödem, daha sonra gangrenöz bir rhinitis ve mukoza ülserasyonları ile karakterizedir (2,15,16,29).

Bağışık analardan doğan kuzular hariç koyunlar hayatın her devresinde hastalığa yakalanabilir. Tabii bulaşmada kuluçka süresi 4-7 gündür (21). Deneysel inokülasyonlar bu sürenin 3-10 gün arasında değiştiğini göstermiştir.

Dikkati çeken ilk belirti beden ısısının yükselmesidir, 48 saat içinde 41°C'ye ulaşır. Bir hafta süreyle dalgalanma gösterir. Ateşin yükselmesinden 24-36 saat sonra ağız ve burun mukozalarında hiperemi görülür. Hafif bir salivasyon başlar, ağız kenarları köpüklenir, papillalar kızarır. Dil ve dudaklar şişer, ödem baş ve kulaklara kadar yayılır, boynun alt kısmına ve göğüse de yayılabilir (8).

Göz ve burundan başlangıçta seröz zamanla koyu kıvamlı bir akıntı gelir. Mukozalardaki hiperemik görünüş zamanla derinleşir mavimsi-mor bir renk alır ki bu görünüş hastalığa mavi dil denmesine neden olur (18,29). Ateşin yükselmesinden 5-8 gün sonra mukozalarda nekrotik sahalar ve 2-4 mm çapında ülserler oluşur (21). Dilin epitel tabakası soyulur. Burun akıntısı mukopurulent bir hal alır, kuruyarak hayvanın soluk almasını güçleştirir. Ayaklarda, deri ile tırnağın birleştiği yerde morumsu bir halka oluşur. Kas dejenerasyonu omuz tutukluğuna neden olur. Bazı koyunlarda tortikollis görülür. Zamanla ishal başlar. Gebe koyunlar yavru atarlar. Sekunder enfeksiyonların devreye girmesiyle durum daha da ağırlaşır ve ölüm oranı hassas sürülerde % 90'a ulaşır (15,19).

Sığırlar açık klinik belirti göstermemelerine rağmen salivasyon, burun akıntısı ve dudaklarda ödem dikkat çekicidir (8). Gebe ineklerde aborta, yeni doğanlarda ölümlere ve buzağı anomalilerine neden olduğu bildirilmiştir (32). Yenidoğan buzağuların bacaklarında ve kafatası kemiğinde çarpıklıklar vardır. Alt çene oluşmaz, dil dışarıdadır. Çoğu zaman beyin dumura uğramıştır, beyin yerinde berrak bir sıvı vardır (19).

Buzağılarda intrakraniyal malformasyonlar özellikle hydranencephali pek çok değişik aileden virusların oluşturdukları gebelik dönemi enfeksiyonlarına bağlıdır. Bu viruslar Reoviridae (Bluetongue virus, Chuzan virus), Bunyaviridae (Akabane virus, Aino virus), Togaviridae (bovin viral diyare virus) dir (34,35,37).

## 2.7. Immunité

Mavi dil enfeksiyonu geçiren hayvanların devamlı bir spesifik bağışıklık oluşturdukları, buna karşın diğer tiplerin bulunması halinde aynı hayvanlarda yeni hastalık oluşabileceği vurgulanmıştır. Fakat bu reenfeksiyonlar daha hafif seyirlidir (16). Çünkü serotipler arasında partial bir bağışıklık oluşmaktadır. Bağışıklığın süresi tam belirgin değildir. Virusun çok sayıda serolojik tipinin bulunması ve koyun popülasyonlarının farklı duyarlılığa sahip olmaları bağışıklık süresinin saptanmasını güçleştirir (8).

Bağışıklık sistemi yeterli olan hayvanlarda, mavi dil virusu ile enfeksiyon, grup spesifik ve tip spesifik antikorların oluşumu ile 7-10 gün içinde izlenir. Tip spesifik nötralizan antikorlar genellikle 3 yıl, grup spesifik antikorlar ise 6-18 aylık bir koruma verirler (15,19,29).

Koruyucu immunité genellikle nötralizan antikorlarla ilişkilidir (15).

Maternal antikorların yeni doğmuş kuzulara kolostrumlu taşındığı ve bunların yavruyu 2-6 ay arasında değişen bir süre koruduğu saptanmıştır (15,16).

## 2.8. Tanı

Hastalığın tanısı direkt ve indirekt olarak yapılmaktadır.

### 2.8.1. Direkt Tanı

Mavi dil hastalığının tanısı genellikle klinik ve patolojik belirtilere dayanarak yapılabilmesine rağmen laboratuvar teyidi gereklidir (15). Has-

talığın direkt teşhisi virusun izolasyonu ve identifikasyonu ile yapılır. Virus izolasyonu için bütün lezyonlardan materyal sağlanabilirse de en önemli izolasyon materyali kandır. Kan, heparin, EDTA ya da sitrat gibi antikoagulanlar içerisine ateşli hayvanlardan alınmalıdır. Öldürücü olaylarda dalak ve lenf düğümleri parçaları ölümden sonra kısa süre içerisinde alınmalı ve teşhis laboratuvarına en seri şekilde gönderilmelidir (15,20).

Virusun üretilmesinde ilk inokulasyon embriyolu tavuk yumurtasına yapılmakta, daha sonra doku kültürlerine adapte edilmektedir (17,32). Virusun üretilmesinde 10-12 günlük embriyolu yumurtalar kullanılır. Bazen izolasyonlar yenidoğan farelere intracerebral inokulasyonla ya da hücre kültürüne (BHK-21, VERO) inokulasyonla da yapılabilir (15).

Virus izolatlarının ilk identifikasyonu için IF, CF gibi grup spesifik testler, serotip tayini içinde plak redüksiyon ve SN testleri kullanılır (30,31).

### 2.8.2. İndirekt Tanı

Mavi dil hastalığının indirekt tanısı çeşitli serolojik testlerle yapılmaktadır. Bunlar, SNT, IF, AGPT, Plak redüksiyon, HIG, ELISA, testlerdir (4,11,15,18,31,38).

### 2.9. Koruma ve Kontrol

Bir ülkede mavi dil hastalığı tesbit edilmişse, onu eradike etmek imkansız ve hatta kontrol altına almak güç olabilir. Çok geniş konakçı oranı ve latent olarak enfekte, taşıyıcı hayvanların varlığından dolayı virus kaynağının eliminasyonu mümkün olmayabilir. Mevcut bilgilerin ışığında eradikasyonu ve hatta insekt vektörlerin etkili şekilde azaltılması imkansız ya da kullanışlı değildir. Insekt kontrollerinin önemi vurgulanmasına rağmen yine de insektler çiftliklerden, yerleşim merkezlerinden rüzgarla sürüklenebilir. Hayvanların ahırda tutulması ve insekt ilaçlarının uygun kullanımı enfeksiyonun yayılışını engelleyecektir; fakat bu daima mümkün olmayabilir. Bu yüzden koyunların koruyucu aşılamaları en pratik ve etkili kontrol tedbiridir (15).

Mavi dil aşıları ülkede salgın yapan tiplere göre monovalan veya polivalan olarak hazırlanır (8,19). Canlı attenuue BTV aşısı 40 yıldan beri kullanılmaktadır. Çok etkili ve uzun süren bir bağışıklık oluşturduğu bilinir. Ancak bilinen 24 serotipten 21'nin bulunduğu Güney Afrika gibi bir ülkede polivalan aşılarda yapımında güçlüklerle karşılaşmaktadır. Çünkü bir aşı suşu diğer suşlara karşı yeterli bağışıklık oluşturmaz. Bundan dolayı polivalan aşılarda suş seçimi önemlidir (15,21).



Günümüzde en az 3 hafta aralıklarla verilen 3 pentavalari aşilar Güney Afrika'da kullanılmaktadır (15).

Aşilamadan 14 gün sonra antikor teşekkül etmeye başlar ve tam bağışıklık 30 gün sonra oluşur. Aşı en az bir yıl bağışıklık verir. Aşilar ilkbaharda ve kirkimdan 3-6 hafta önce uygulandığında immunite şansı yüksektir. Gebe hayvanlara ve 6 aydan küçüklere aşı uygulamaz. Aşı uygulamalarından sonra bazen embriyopathiler ve koçlarda geçici sterilite olayları gözlenmiştir.

Gebe koyunlar doğum sonrası, koçlar da koç katımından sonra aşılanmalıdır (29).

Antikorlar kolostrum ile yenidoğanlara nakledilir (15). Pasif immun korunma, yaklaşık 2-6 ay devam eder. Aşilamadan sonra meydana gelen aktif immunite ile interfere olur. O nedenle kolostral immunite süresi içinde aşı yapılmaması önerilir (15,16).

### 3. MATERYAL VE METOD

#### 3.1. Hücre Kültürü

Test virusunun üretimi ve titrasyonu için BHK-21 devamlı hücre kültürlerinden yararlanıldı. Hücre üretmek için % 10 inaktif dana serumlu Glasgow, Eagle MEM kullanıldı.

#### 3.2. Virus Suşu

Çalışmada kullanılan mavi dil virusu BT-4 suşu BHK-21 devamlı hücre kültüründe serumsuz Glasgow Eagle MEM vasatında üretildi. Virusun titre değeri saptandıktan sonra kullanilana kadar +4 °C'de saklandı.

#### 3.3. Hücre Kültürlerinde Kullanılan Serum

Hücre kültürlerinde kullanılmak üzere kan serumları Çubuk Belediye-si mezbahasında kesilen danalardan sağlandı.

Serumlar seitz EKS filtrelerinden süzölüp 56 °C'de 30 dakika inaktive edildikten sonra küçük porsiyonlar halinde -20 °C'de kullanilincaya kadar muhafaza edildi.

### 3.4. Çalışmada Kullanılan Vasat ve Kimyasal Maddeler

#### 3.4.1. Glasgow Minimum, Essential Medium (BHK-21, G - MEM)

Glasgow MEM*	12.52 gr.
Na HCO <sub>3</sub>	2.75 gr.
Tryptose Phosphate Broth	2.75 gr.
Penicillin	100.000 I.U
Streptomycin	0.1 gr.
Distile su	1000 ml.

Kimyasal maddeler distile suda eritildikten sonra seitz filtresinden geçirilerek sterilize edilip +4 °C'de kullanılıncaya kadar muhafaza edildi.

#### 3.4.2. Noble agar.\* (%1)

Noble agar	1gr.
Borik Asit	0.9 gr.
NaOH	0.2 gr.
Distile su	100 ml.

Kimyasal maddeler kaynayan bu banyosunda eritilip pH 9 ayarlandı, kullanılmak üzere +4 °C'de muhafaza edildi.

#### 3.4.3. PBS (Phosphate bufer solution)

NaCl	8.00 gr.
KCL	0.20 gr.
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12 H <sub>2</sub> O	2.37 gr.
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.20 gr.
Glucose	1.00 gr.
Penicillin	100.000 I.U
Streptomycine	0.1 g.
Phenolred	0.01 gr.
Distile su	1000 ml.

\* Gibco limited, P.O. Box. 35, Paisley, Scotland

\* Difco Laboratories, Detroit USA.

Kimyasal maddeler distile suda eritildikten sonra seitz EKS'den süzülerek, +4°C'de muhafaza edildi.

#### 3.4.4. Tripsin (% 02.5)

Tripsin\* 2.50 gr.

PBS 1000 ml

Kimyasal maddeler karıştırılıp seitz EKS'den süzülerek kullanılmaya kadar -20°C'de muhafaza edildi.

#### 3.4.5. Fizyolojik Tuzlu Su (FTS)

NaCl 8.50 gr.

Distile su 1000 ml.

#### 3.5. Hyperimmun Serum

Mavi dil hastalığına karşı hassas 2 adet koyun biri kontrol bırakılmak suretiyle Mavi dil aşısı ile aşılanarak bağışık kılındı. 21 gün sonra mavi dil virusu ile eprüve edildi. Hastalığı geçirmiş olan kontrol koyundan kan alındı. Serum ayrıldıktan sonra inaktivasyona tabi tutularak AGPT ile titre edildi ve testlerde, pozitif kontrol serum olarak kullanılmak üzere -20°C'de saklandı.

#### 3.6. Antijen

##### 3.6.1. AGPT'inde Kullanılacak Antijenin Hazırlanması

BHK-21 hücre kültürleri ml'de 300.000 hücre olacak şekilde %10 dana serumlu Glasgow MEM'de üretildi. Hücreler monolayer olduktan sonra BT4 suşu ile enfekte edildi. [200 TCID<sub>50</sub>/ml]. Hergün CPE kontrolleri yapılarak %80 CPE oluştuktan sonra, virus toplandı 4000 devirde 10 dakika santrifüj edildi. Dipteki çöküntü kadar üstteki sıvıdan karıştırılarak 1 dakika buz içinde sonike edildi. 4000 devirde 10 dakika tekrar santrifüj edilerek üstteki sıvı önceki alınan virus ile karıştırıldı. Bütün virus eşit hacimde, doymuş amonyum sülfat'la karıştırıldı. 1 saat buzdolabında bekletildi. Yarım saat 2000 devirde santrifüj edildi. Supernatant atıldı ve dipteki çöküntü eşit hacimde fizyolojik tuzlu su ile karıştırıldı. Taksimi yapıldı ve antijen olarak kullanılmak üzere -20°C'de saklandı.

\* 1.250 Difco Laboratories, Detroit, U.S.A.

### 3.7. Çalışmada Kullanılan Serumlar

Çalışmada toplam koyunlardan 351, keçilerden 114, sığırlardan 100 serum toplandı (Tablo 2). Toplanan bu kan serumu örnekleri 56°C'de 30 dakika inaktive edildikten sonra, sterilite kontrolleri yapıp küçük serum tüplerine konularak -20°C'da muhafaza edildi.

Tablo 2 Çalışmada kullanılan kan serumlarının toplandığı iller

İller	Koyun	Keçi	Sığır	Toplam
Adana*	21	8	4	33
Adıyaman*	31	-	14	45
Ankara	-	-	29	29
Antalya*	3	-	7	10
Aydın*	18	-	-	18
Çorum	-	-	11	11
Diyarbakır*	43	46	31	120
Gaziantep*	45	-	-	45
Giresun	3	25	-	28
İstanbul	68	-	-	68
İzmir*	12	-	-	12
Kars	-	35	-	35
Kocaeli	7	-	-	7
Kahramanmaraş*	9	-	-	9
Mardin*	40	-	-	40
Sakarya	9	-	-	9
Muğla*	8	-	-	8
Niğde	4	-	-	4
Ş.Urfa	6	-	-	6
Van	24	-	-	24
Karaman	4	-	-	4
<b>Genel Toplam</b>	<b>351</b>	<b>114</b>	<b>100</b>	<b>565</b>

\* Koyunlara mavi dil aşısı tatbik edilen iller

### 3.8. Agar Jel Presipitasyon Testinin Yapılışı

Test, petri içerisinde antikor ile antijenin birbirine doğru hareket ederek optimal miktarlarının karşılaştığı noktada bir çöküntü meydana getirmesi esasına dayanır. Bu reaksiyonda antijene presipitinojen antikora perisipitin meydana gelen çöküntüye de presipitat adı verilir.

Test iki şekilde yapılır.

1. Serum sulandırma metodu : (Şüpheli serum, bilinen virus)
2. Virus sulandırma metodu : (Şüpheli virus, bilinen serum)

Hazırlanan %1'lik Noble agar su banyosunda eritildi 9 cm. çapındaki petriler için 10 ml agar döküldü ve katılaşıncaya kadar oda derecesinde, katılaştıktan sonra da bir gece buzdolabında bekletildi.

Test için, agar da, biri merkezde ve diğerleri bunun çevresinde 7 çukur açıldı. Çukurların çapı 6 mm. ve çevredeki çukurların mekezdekine uzaklığı ise 3 mm idi (9).

Merkezde olan çukura mavi dil antijeninden 0.05 ml miktarında konuldu. Bir pozitif (+) bir negatif (-) kontrol serum ve test serumları olmak üzere çevredeki 6 çukura sıra ile serumlar 0.05 ml miktarında konuldu.

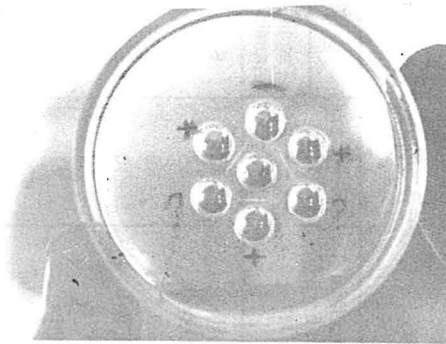
Test petri kutuları karanlık ve nemli bir ortamda oda sıcaklığında 24-72 saat tutuldu.

Antijen ile şüpheli serum arasında presipitasyon çizgisi oluşturan serumlar pozitif (+), presipitasyon çizgisi oluşturmayan serumlar negatif (-) olarak değerlendirildi (4,5,6,33).

### 4. BULGULAR

Agar jel presipitasyon testi sonucunda testte kullanılacak hiperimmün serumların titresi 1/16 olarak tesbit edildi ve pozitif serum olarak testde kullanıldı.

Teste tabi tutulan 351 adet koyun kan serumunun 121 adeti (% 34,4), 114 adet keçi kan serumunun 17 adeti (% 15) ve 100 adet sığır kan serumunun 1 adetinde (%1) mavi dil virusuna karşı pozitif presipitan antikorlar saptanmıştır (Tablo 3) (Resim 1).



Resim 1 : AGPT yapımından bir örnek

Tablo 3 : AGPT ile mavi dil antikorları yönünden, kontrol edilen koyun, keçi ve sığır kan serumlarının sonuçları

Serumların Temin Edildiği İller	AGPT'ne tabi tutulan serumların adedi	KOYUN		KEÇİ		SIĞIR		ANTİKOR YÜZDESİ		
		Pozitif Serumlar	Negatif Serumlar	Pozitif Serumlar	Negatif Serumlar	Pozitif Serumlar	Negatif Serumlar	Koyun	Keçi	Sığır
ADANA*	33	6	15	4	4	-	4	%29	%50	-
ADİYAMAN*	45	5	26	-	-	-	14	%16	-	-
ANKARA	29	-	-	-	-	-	29	-	-	-
ANTALYA*	10	3	-	-	-	1	6	%100	-	%14
AYDIN*	18	18	-	-	-	-	-	%100	-	-
ÇORUM	11	-	-	-	-	-	11	-	-	-
DIYARBAKIR*	120	18	25	12	34	-	31	%42	%26	-
GAZİANTEP*	45	9	36	-	-	-	-	%20	-	-
GİRESUN	28	-	3	-	25	-	-	-	-	-
İSTANBUL	68	8	60	-	-	-	-	%12	-	-
İZMİR	12	10	2	-	-	-	-	%83	-	-
KARS	35	-	-	1	34	-	-	-	%0.28	-
KOCAELİ	7	7	-	-	-	-	-	%100	-	-
K.MARAŞ*	9	9	-	-	-	-	-	%100	-	-
MARDİN*	40	5	35	-	-	-	-	%12.5	-	-
SAKARYA	9	9	-	-	-	-	-	%100	-	-
MUĞLA*	8	4	4	-	-	-	-	%50	-	-
NİĞDE	4	-	-	-	-	-	4	-	-	-
Ş.URFA	6	-	6	-	-	-	-	-	-	-
VAN	24	10	14	-	-	-	-	%42	-	-
KARAMAN	4	-	4	-	-	-	-	-	-	-
<b>GENEL TOPLAM</b>	<b>565</b>	<b>121</b>	<b>230</b>	<b>17</b>	<b>97</b>	<b>1</b>	<b>99</b>	<b>%34.4</b>	<b>%15</b>	<b>%1</b>

\* 1991 yılında koyunlara mavi dil aşısı tatbik edilen iller.

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada koyun, keçi ve sığırlarda mavi dil enfeksiyonunun indirekt teşhisinde AGPT kullanılmış ve seropozitiflik oranı koyunlarda % 34.4, keçilerde % 15, sığırlarda %1 olarak saptanmıştır.

Koyun, keçi ve sığırlarda mavi dil enfeksiyonunun makronötralizasyon testi ile indirekt teşhisinde Girgin ve Yonguç (20) Aydın, İzmir, Balıkesir, Çanakkale illerindeki koyun, keçi ve sığırlardan alınan kan serumlarında koyunlarda % 46, keçilerde % 44, sığırlarda ise % 16, Öztürk ve Ark. (38)'da mikronötralizasyon testi ile Konya Merkez Hayvancılık Araştırma Enstitüsü'nde bulunan koyunlara ait kan serumlarında % 36.04 oranında nötralizan antikorlar saptanmıştır.

Mavi dil enfeksiyonunun indirekt teşhisinde AGPT'nin kullanılmasının SN testi kadar hassas ve uygulanışının kolay olduğu bu çalışma ile görülmüş ve bu durum araştırmacıların (20,38) yaptıkları çalışmalar ile paralellik göstermiştir.

Afrika, Asya ve Amerika kıtalarındaki birçok ülkelerde mavi dil enfeksiyonlarının varlığı ve yaygınlığı AGPT ile araştırılmıştır.

Hafez ve Taylor (25), Suudi Arabistan'da 560 koyun, 61 keçi, 112 sığır ve 3 deveden alınan kan serumlarında mavi dil virusuna karşı AGPT'ni kullanarak presipitan antikorları 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.

Lefe'ure ve Calvez (33) 1982-1984 yılları arasında G. Afrika ülkesinde 238 keçi ve 1021 koyundan topladıkları kan serumlarını mavi dil virusuna karşı AGPT ile kontrol etmişler pozitif koyun ve keçilerin oranı sırasıyla Çad'da % 18 - % 54, Kuzey Kamerun'da % 16.6 - % 35, Etiyopya'da % 8 - % 44, Zaire'de % 36 - % 46 olarak bulmuşlardır.

Sendow ve Ark. (40), Endonezya'da sığır, manda, koyun ve keçilerden toplanan kan serum örneklerini mavi dil virusuna karşı AGPT ve nötralizasyon testine tabi tutarak presipitan ve nötralizan antikorları taramışlardır. Sonuçta 1742 sığırdan % 53, 247 mandadan %75, 287 keçi'de % 32 ve 204 koyun'da % 19 oranında mavi dil virus antikorları tesbit etmişlerdir. Bu çalışmada bulunan seropozitiflik oranının Öztürk ve Ark. (38)'nin koyunlarda buldukları değere yakın bir değer olmasına karşın bazı araştırmacıların (33,40) AGPT ile tesbit ettikleri seropozitiflik oranlarının altında olduğu görülmüştür.

Çalışmamızın sonucunda mavi dile karşı koyun, keçi ve sığırlarda antikor yüzdelerinde az da olsa düşüklük olmasına rağmen enfeksiyonun devam ettiği görülmektedir.

Hastalıkla mücadelede, ahır hijyeni, culicoideslerle savaş ve sağlamların aşılması büyük önem taşımaktadır. Koyunların aşılmasına karşı sığır ve keçilere aşı tatbik edilmemektedir. Sığır ve keçilerde mavi dil antikorlarının bulunması doğrudan doğruya doğal enfeksiyona bağlıdır. Bu durumda belirgin klinik bulgular görülmesi bile bölgedeki sığır ve keçilerde mavi dil enfeksiyonuna yakalanabilirler. Yurdumuzun Ege bölgesinde hastalık saptandıktan sonra mavi dil aşısı ile Ege bölgesinde koyunlara aşılamalar yapılmış ve aşı uygulamalarından sonra hastalığın bölgede görülmediği bildirilmiştir (20). Ayrıca, 1991 yılından beri Adana, Antalya, Hatay, İçel, Kahramanmaraş illerinde koyunlar mavi dil hastalığına karşı koruyucu olarak aşılanmaktadır.

Sonuç olarak yapılan bu çalışmada hastalığın görüldüğü bölgelerin dışında, değişik bölgelerde, klinik olarak hasta hayvanların görülmemesine rağmen, koyun keçi, ve sığırlarda mavi dil antikor varlığı ortaya konmuştur. Bu da bize mavi dil hastalığı ile ilgili çalışmaların daha geniş kapsamlı yapılmasının gerekliliğini vurgulamaktadır.

## 6. ÖZET

Türkiye'nin değişik bölgelerinden toplanan 565 adet koyun, keçi ve sığır kan serumlarında, mavi dil virusuna karşı antikorlar, AGPT'i ile tesbit edildi.

Bu çalışmada antijen hazırlanmasında BHK-21 hücre kültürlerinden yararlanıldı ve kan serum örneklerinde uygulanan AGPT'inde ise % 1'lik Noble agar kullanıldı.

Test sonucunda toplam 351 koyun kan serumunun 121'inde (% 34,4), 114 keçi kan serumunun 17'sinde (% 15), 100 sığır kan serumunun 1'inde (% 1) presipitan antikorlar tesbit edildi.

## 7. SUMMARY

The detection of the antibodies against Bluetongue disease agar gel precipitation test performed in several blood sera. (sheep, goats cattle)

The antibodies to bluetongue virus were determined by the AGPT in the 565 sero of sheep, goats and cattle collected from the various region of Turkey.



In the study, BHK-21, cell cultures were used in the preparation of antigen and 1% Noble agar was used in AGPT applied on the blood serum samples.

As a result of the test, the precipitating antibodies were determined in 121 of the 351 sheep sera (34,4%), 17 of the goats sera (15%) and 1 of the 100 cattle sera (1%).

## 8. KAYNAKÇALAR

- 1- ANONİM : Foreign Animal Disease, U.S. Livestock Sanitary Association New Jersey, pp 93-101, 1954.
- 2- ANONİM : Koyun Hastalıkları Pendik Vet. Kont. Araş. Enst. Yayınları No: 3, Hilal Matbaacılık Koll. Şti. İstanbul, 1971.
- 3- ANONİM : Bluetongue. OIE Manuel III : 1-14, 1990.
- 4- AFSHAR, A., THOMAS F.C., WRIGHT, P.F., SHARIPO, J.L., ANDERSON, J.L. : Comparison of competitive ELISA, Indirect ELISA and standart AGID test for detection bluetongue virus antibodies in cattle an sheep. Vet. Rec. 124: 136-141, 1989.
- 5- BOLAT, Y. : Elazığ, Diyarbakır ve Şanlıurfa illerinde koyunların mavi dil hastalığının yayılması üzerinde serolojik araştırmalar. S.Ü. Vet. Fak. Derg. No: 1, 103-112, 1986.
- 6- BORDER, E.C., SHOPE, R.E. and MURPHY, F.A. : Physicochemical and morphological relationship of some Arthropod - Borne viruses to Bluetongue virus. A new taxonomic group. Physicochemical and serologic studies. j. Gen. Virol., 13: 261-272, 1971.
- 7- BOULANGER, P. and FRANK J.T. : Serological methods in the diagnosis of bluetongue. Aust. Vet. J., 51 : 185-194, 1975.
- 8- BOWNE, J. G. : Bluetongue Disease. advances in Veterinary Science and comparative Medicine. United States Department of Agriculture, Denver Colorado, 1971.
- 9- BRECKON, R.D., LUEDKE, A.J. WALTON, T.A. : Bluetongue Virus in Bovine Semen: Viral isolation. Am. J. Vet. Res. 3: 439-442, 1980.
- 10- BURGU, I. ÖZTÜRK, F. AKÇA, Y. : Tahirova Devlet Üretme Çiftliği koyunlarında viral enfeksiyonlar üzerinde serolojik araştırmalar. A.Ü.Vet. Fak. Derg. 32, 2, 167-196, 1985.
- 11- BURGU, I., URMAN, H.K., AKÇA, Y., YONGUÇ, A., MELLOR, P.S. and HAMBLIN, C. : Serologic Survey and Vector surveillance for Bluetongue in Southern Turkey In : WALTON, T.E., OUSBURN, B.I., Bluetongue, African Horse Sickness and Related Orbivirus, Press Inc. Florida, 1992.
- 12- COAKLEY, W. SMITH, V.M., MAKER, D., : A serological survey for bluetongue virus antibody in Western Australia. Aust. Vet. J., 56, 487-491, 1980.
- 13- COLLISSON, E.W. and BARBER, T.L. : Blood cells associated with Bluetongue virus infection in cattle. Proceeding of Annual Meeting of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, 26, 287-300, 1984.

- 14- COWLEY, J.A.: GORMAN, B.M. : Genetic reassortants for identification of the genome segment coding for the bluetongue virus hemagglutinin. *Journal of Virology*, 61, 7, 2304-2306, 1987.
- 15- ERASMUS, B.J. : Bluetongue Virus. In: DINTER, Z., MOREIN, B. : *Virus infections of Ruminants*, Elsevier Science Publishing Company, Inc. Amsterdam Netherlands, 1990.
- 16- FENNER, F., BACHMANN, P.A., GIBBS, E.D.J., MURPHY, F.A., STUDDERT, M.J., WHITE, D.O. : *Veterinary Virology*. Academic Press. Inc. Orlando, Florida, pp. 582-587, 1987.
- 17- FOSTER, N.M., JONES, R.H. and LUEDKE, A.J. : Transmission of attenuated and virulent bluetongue virus with *Culicoides variipennis* infected orally via sheep. *Am. J. Vet. Res.*, 29, 275-279.
- 18- FULTON, R.W., POTTER, M.T., PEARSON, N.J., HAGSTAD, H.V. : Prevalence of Bluetongue Viral antibodies in Louisiana Goats. *Am. J. Vet. Res.* 11 : 1985 - 1986, 1981.
- 19- GILLESPIE E.J.H., TIMONEY, J.F. : Bluetongue. Hagan and Bruners infectious disease of domestic animal. 7, pp. 653-659, 1981.
- 20- GIRGIN, H., YONGUÇ, A.D. : Türkiye'deki koyunların mavi dil hastalığının serolojik, etiyolojik ve patolojik durumu üzerinde araştırmalar. *Etilik Vet. Mik. Der.* 3 : 13-24, 1988.
- 21- GLEERING, W.A. : The disease and their diagnosis. *Emergency Disease of Livestock*, 1: 22-27, 1990.
- 22- GREINER, E.C., ALEXANDER, F.C.M., ROACH, J. MOE, V., BORDE, G., TAYLOR, W.P., DICKINSON, J., GIBBS, E.D.J. : Bluetongue epidemiology in the Caribbean region: Serological and entomological findings from a pilot sentinel system in Trinidad and Tobago. *Medical and Veterinary entomology*, 3: 101-105, 1989.
- 23- GROOCOCK, C.M., PARSONSON, I.M., CAMPBELL, C.H. : Bluetongue virus serotypes 20 and 17 infections in sheep: Comparison of clinical and serological responses. *Vet. Mic.* 7: 189-196, 1982.
- 24- GÜRTÜRK, S., BURGU, I., TOKER, A. : Türkiye'de sığırlarda mavi dil (Bluetongue) enfeksiyonu üzerinde araştırmalar. *A.Ü. Vet. Fak. Derg.* XXVIII, 1-2, 332-330, 1980.
- 25- HAFEZ, S.M., TAYLER, W.P. : Serotypes of Bluetongue virus present in Saudi Arabia. *Bluetongue and Related Orbiviruses*. Alan R. Liss, Inc, 531-537, 1985.
- 26- HARD, W.T.T and PRICE, D.A. : Seromuzzle of sheep. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 120, 23, 1952.
- 27- HIZIROĞLU, R. : Buzağılarda Hydranencephali olgularında patolojik ve anatomik bulgular. *Doktora Tezi*. A.Ü. Vet. Fak. 1987.
- 28- HOWELL, P.G. : Bluetongue in Emerging disease of animal *FAO Agric. Study. no. 61*, *FAO of U.N.*, Rome, 111-153, 1963.
- 29- HOWELL, P.G., VERWOERD, D.W. : Bluetongue Virus. *Virology Monographs* 9 : 37-74, 1971.
- 30- JOCHIM, M.M. : Improvement of the AGP test for bluetongue, *Proc. Am. Assoc. Vet. Lab. Diagn.*, 19, 361., 1976.
- 31- JOCHIM, M.M., JONES, S.C. : Evaluation of a hemolysis - in - Gel Test for Detection and Quantitation of antibodies to Bluetongue Virus. *Am. J. Vet. Res.* 4 : 595-599, 1980.

- 32- KAHRS, R.F. : Viral, Disease of cattle, The Iowa State University Press/Ames, Towa, 1986.
- 33- LEFE'URE, P.C., CALVEZ, D.H. : Bluetongue in intertropical Africa: influence of ecological factors on the prevalence of infection. Rev. Elev. Med. Vet. Pays trop., 39, 3/4, 263-268, 1986.
- 34- MACLACHLAN, N.J., OSBURN, B.I. : Bluetongue virus-induced hydranencephaly in cattle. Vet. Pathol. 20 : 563-573, 1983.
- 35- MCKERCHER, D.G., SAITO, J.K., SINGH, K.V. : Serologic evidence of an etiologic role for bluetongue virus in hydranencephaly of calves. J. Am. Vet. Med. Assoc. 156 : 1044-1047, 1970.
- 36- METCALF, H.E. and LUEDKE, A.J. : Bluetongue and related disease. The Bovine Practitioner, 15, 188-193, 1980.
- 37- MORIWAKI, M. MIURA, Y., HAYASHI, S., ISHITANI, R. : Histopathological findings of calves infected experimentally with Aino virus. Natl. Inst. Anim. Health 17: 95-106, 1977.
- 38- ÖZTÜRK, F., YAVRU, S., ERÖZ, S : Koyunlarda mavi dil enfeksiyonu üzerinde seroepizootolojik araştırmalar. S.Ü. Vet. Fak. Derg. 6, 1, 37-40, 1990.
- 39- PARSONSON, I.M. and LUEDKE, A.J. : Unpublished data, 1978.
- 40- SENDOW, I., YOUNG, P. RONOHAROJO, P. : Serological studies of bluetongue virus in Indonesia. Melbourne, Australia, CSIRO, 171-273, 1986.
- 41- SOULSBY, E.J.L. : Helminths, arthropod and protozoa of domesticated animals, 6 th ed., Bailliera Tindall, England, 392-294, 1974.
- 42- STATT, J.L., OSBURN, B.I, BUSHNELL, R., LOMMIS, EC, and SGUIRE, K.R.E. : Epizootiological study of bluetongue virus infection in California Livestock : An overview. Alan R. Liss. Inc., 571-582, 1985.
- 43- UREN, M.F. and STGEORGE, T.D. : The clinical susceptibility of sheep to four australian serotypes of bluetongue virus. Aust. Vet. J., 62, 175, 1985
- 44- YANG, C., HO, E. and HUBSCHLE, O.J.B. : Haemagglutination of bluetongue virus (BTV), A simple preparation high titre antigen. Zbl. Vet. Med., 13, 31, 505-507, 1984.
- 45- YONGUÇ, A.D., TAYLOR, W.P. CSONTOS, L., WORRALL, E. : Bluetongue in Western Turkey. Vet. Rec. III : 144-146, 1982.