



ARAŞTIRMA MAKALESİ

Koyun fötüslerinde Border Disease Virus varlığının immunperoksidaz ile saptanması

Sibel Yavru, Oğuzhan Avcı*, Kamil Atlı

Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı, 42003, Konya, Türkiye

Geliş: 15.08.2014, Kabul: 17.09.2014

*oavci@selcuk.edu.tr

Özet

Yavru S, Avcı O, Atlı K. Koyun fötüslerinde Border Disease Virus varlığının immunperoksidaz ile saptanması.

Abstract

Yavru S, Avcı O, Atlı K. Detection of Border Disease Virus in sheep fetuses by immunoperoxidase.

Eurasian J Vet Sci, 2014, 30, 4, 222-226

DOI:10.15312/EurasianJvetSci.201447380

Amaç: Bu çalışma Konya'da koyun fötüslerinde pestiviral antijenlerin araştırılması amacı ile yapıldı.

Aim: The purpose of the present study was to investigate pestiviral antigen in sheep fetuses in Konya.

Gereç ve Yöntem: Araştırmada 34 adet koyun fötüsünden elde edilen toplam 170 doku örneği (karaciğer, akciğer, lenf, dalak ve beyin) Border Disease Virus (BDV) antijen varlığı yönünden Madin-Darby Bovine Kidney devamlı hücre kültürlerinde immunperoksidaz (IP) testi ile incelendi.

Materials and Methods: Totally 170 samples (liver, lung, lymph, spleen, and brain) from 34 sheep fetuses were investigated to determine the presence of Border Disease Virus (BDV) with immunoperoxidase (IP) in Madin-Darby Bovine Kidney permanent cell culture.

Bulgular: Fötüslerin %8.82'sinde pestiviral antijen varlığı belirlendi. 3 adet fötüsa ait 8 doku örneği (3 karaciğer, 3 akciğer ve 2 beyin) pozitif tespit edildi. Aynı fötüslara ait lenf ve dalak örneklerinin hiçbirisinde pozitiflik belirlenmedi.

Results: Presence of pestiviral antigen was detected by IP in 8.82% of fetuses. 8 tissue (3 livers, 3 lungs, and 2 brains) samples of 3 fetuses were detected as positive. Lymph and spleen samples of the same fetus were not determined in any positivity.

Öneri: Konya'da BDV ile mücadele edilmesi gerekliliği ifade edilebilir.

Conclusion: It can be expressed that control programme of BDV is needed in Konya.

Anahtar kelimeler: Border disease virus, fötüs, immunperoksidaz, koyun

Key words: Border disease virus, fetus, immunoperoxidase, sheep





Giriş

Sığır, koyun, keçi, domuz gibi evcil hayvanların yanı sıra vahşi ruminantlarda da enfeksiyon meydana getirebilen pestiviruslar (Krametter-Froetscher ve ark 2007, Abdel-Latif ve ark 2013), zarlı, tek zincirli, pozitif RNA viruslarıdır (Hurdato ve ark 2003, Evermann 2006, Rasmussen ve ark 2008). Border Disease Virus (BDV)'u, Flaviviridae familyasının Pestivirus genusunda yer almakta olup aynı genusta bulunan Classical Swine Fever Virus (CSFV)'u ve Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV)'u ile yakın antijenik ilişki içerisinde (Rasmussen ve ark 2008, Fernandez-Sirera ve ark 2012). BDV antijenik özellikleri ve konakçı spesifitesine göre 4 alt gruba ayrılmıştır (Berriatua ve ark 2006). Fransa'da izole edilen pestivirus izolatlarından sonra ise BDV5 ve BDV6 alt grupları belirlenmiştir (Dubois ve ark 2008).

Border Disease Virus'unun çoğaltılması için kullanılan sığır hücre kültürü sistemleri arasında fetal dana testis (Gray ve Nettleton 1987), embriyonik trakea (Kreeft ve ark 1990), turbinata (Laamanen ve ark 1997), fetal dana böbrek (Kirkland ve ark 1991), fetal dana dalak (Anderson ve ark 1987) ve Madin Darby Bovine Kidney (MDBK) (Yeşilbağ ve ark 2008) hücre kültürü sistemleri yer almaktadır. Pestivirus'ların hücre kültürlerindeki çoğalma durumlarına göre sitopatojenik (cp) ve nonsitopatojenik (ncp) olmak üzere iki biyotipi bulunmaktadır (Fulton ve ark 2005).

Etken, enfekte hayvanlardan burun akıntısı, idrar, salya, gaita, semen, gözyaşı, süt, vaginal akıntı gibi sekret ve ekskretlerin (Nodelijk ve ark 2001) yanı sıra abort olan fetus, fetal membran ve kan (Marco ve ark 2007) ile de saçılmaktadır. Persiste enfekte koyunların sekret ve ekskretleri ile sadece ncp BDV'nin saçıldığı bildirilmiştir (Bielefeldt-Ohmann ve ark 2008). Fetal immun yanıt şekillenmeden önce intrauterin enfeksiyona maruz kalan koyunlardan persiste viremik olarak doğan kuzular yaşamları boyunca sekret ve ekskretleri ile virus saçarak enfeksiyonun bulaştırılmasında büyük rol oynamaktadırlar (Nettleton ve Willoughby 2007).

Koyunlarda plasenta syndesmo-chorial, adeciduata ve villosa cotyledonota yapısındadır (Sammin ve ark 2009). Koyun blastositleri preimplantasyon sürecinde Pestivirus geçişine izin vermemektedir (Sawyer ve ark 1991). Bu süreç içerisinde embriyonun uterusu tutunması tamamlanmamıştır. Embriyonun uterus duvarına tutunması 17. günden itibaren başlamaktadır. BDV'nin zona pellucidayı geçemediği bildirilmiştir (French ve ark 1974). Karşılaşılabilecek transplasental enfeksiyonlar; erken embriyo ölümleri (Pratelli ve ark 1999), intrauterin gelişme azlığı, MSS deformasyonları, iskelet sistemi bozuklukları, persiste viremik kuzuların doğumu, 'Hairy Shaker' görünümüne sahip kuzuların doğumu, deri ve yünde değişikliklere neden olabilmektedir (Monies ve ark 2004, Nettleton ve Willoughby 2007, Avcı 2010).

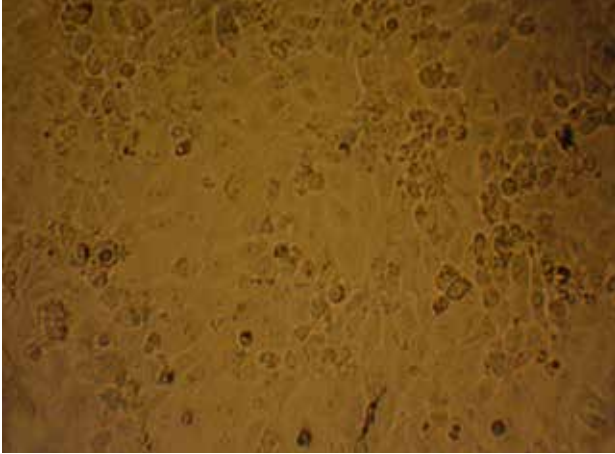
BDV enfeksiyonunun teşhisi ile ilgili olarak Office International des Epizooties (OIE, Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü) tarafından belirlenmiş herhangi bir referans laboratuvar bulunmamaktadır. BDV'nin teşhisinde en güvenli yol virus izolasyonunun yapılmasıdır (OIE 2008). Direkt immunfloresan (IF) (Anderson ve ark 1987), immunperoksidaz (IP) (Ward ve Kaeberle 1984, Çokçalışkan 2000, Marco ve ark 2009, Avcı 2010), donmuş doku parçalarında gerçekleştirilen immunohistokimyasal yöntemler antijen tespiti için kullanılan ELISA (Fenton ve ark 1990) ve RT-PCR (Hasırçioğlu ve ark 2009) BDV ile enfekte hayvanların tespitinde kullanılacak diğer testler arasında yer almaktadırlar.

Bu çalışma koyun fetuslarında pestiviral antijenlerin tespit edilmesi amacı ile yapıldı.

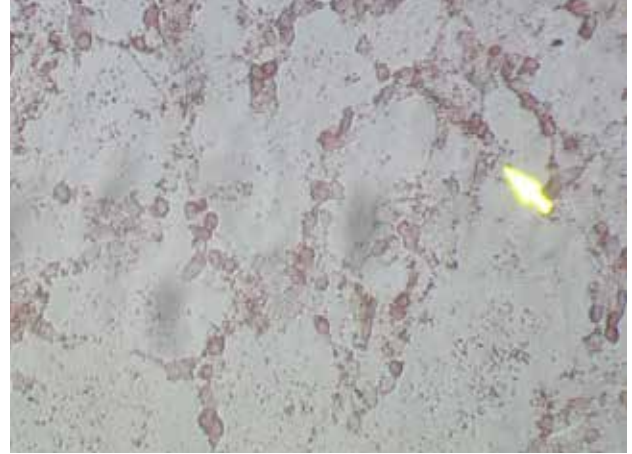
Gereç ve Yöntem

Araştırma süresince elde edilen fetuslar (34 adet) uygun şartlarda, en kısa sürede ve soğuk zincir şartlarında Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Viroloji ABD'ye getirildi. Çalışmada kullanılacak olan fütusa ait doku örnekleri (karaciğer, akciğer, lenf, dalak ve beyin) steril şartlar altında çıkarıldı. Konsantre antibiyotik (Biological Industries, İsrail)'li PBS (Phosphate Buffer Saline, 1/10 oranında) içerisine alınarak homojenizasyon işlemine tabii tutuldu. Homojenizatör (IKA T-25 Ultra-Turrax, Almanya) yardımı ile 6000 devir/dk 10 dk homojenize edilen homojenizatlar 3000 rpm (Hettich, Almanya) +4°C'de 20 dk santrifüj edildi. Antibiyotik ilave edildikten sonra enjektör filtrelerden geçirilerek sterilite kontrollerinin yapılması için kanlı ağara (Sigma, Almanya) ekimleri yapıldı. Herhangi bir bakteriyel kontaminasyon görülmeyen örnekler %10 DMSO ilave edilerek IP ile test edilmeye kadar -80°C'lik derin dondurucuda (Sanyo, Japonya) muhafaza edildi.

Bu çalışmada kullanılan MDBK hücre kültürü, BVDV cp referans suşu olan NADL (virus kontrol) ve ncp BVDV (virus kontrol) Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Viroloji ABD'den temin edildi. MDBK hücre kültürü kullanılmadan önce pestivirus varlığı yönünden negatif olduğu belirlendi. Hücre kültürü çalışmalarında gerekli olan fetal calf sera (FCS, fetal dana serumu) ticari olarak (Biological Industries, İsrail) temin edildi. Steril FCS'ler kullanılmaya kadar -20°C'lik derin dondurucuda muhafaza edildi ve kullanılmadan önce 56°C'de 30 dk süre ile inaktive edildi. Direkt IP testi Hyera ve ark (1987)'nin bildirdiği prosedüre uygun olarak gerçekleştirildi. Bu çalışma protokolü Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Etik Kurul onayı (Rapor No:2012/016) aldı.



Şekil 1. Hücre kontrol (x 200).



Şekil 2. Virus kontrol (cp NADL suşu, x200).



Şekil 3. Virus kontrol (ncp BVDV, x200).



Şekil 4. Border Disease Virus antijen pozitif örnek (Karaciğer, x200).

Bulgular

Hücre kontrol (Şekil 1), cp NADL suşu kontrol (Şekil 2), ncp BVDV kontrol (Şekil 3) ve karaciğer dokusundan (Şekil 4) elde edilen mikroskopik görüntüler sırası ile aşağıda verildi. Üç fötusa ait karaciğer, akciğer ve beyin dokularında IP ile BDV antijen varlığı tespit edilirken lenf ve dalak numunelerinin hiçbirisinde herhangi bir pozitiflik belirlenmedi. BDV antijen yönünden pozitif tespit edilen örneklerin hepsinin ncp karakterde olduğu tespit edildi.

Tartışma

Fötal dokularda pestivirus varlığının gösterilmesi için kullanılan farklı metotlar bulunmaktadır. Abort olan koyun fötuslarından Pestivirus antijeninin tespit edildiği bildirilmiştir (Thür ve ark 1997), ancak izolasyon çalışmalarının zaman alıcı, pahalı ve otoliz olan dokularda sağlıklı sonuç vermesi gibi dezavantajları bulunmaktadır (Garcia-Perez ve ark 2009). Pestivirus antijenlerinin tespiti için IF (Reimann ve ark 2004), IP (Marco ve ark 2009) ve Flow Sitometri (Burrells ve ark 1989) testleri de kullanılabilir. Son

yıllarda BDV'nin hızlı teşhis edilmesi amacı ile RT-PCR testi kullanılmaktadır (Rosamilia ve ark 2014). Dalak, tiroid, timus, böbrek, beyin ve lenf nodüllerinin Pestivirus izolasyonu için en uygun organ ve dokular olduğu ifade edilmiştir (OIE 2008).

Bu çalışmada 3 adet fötusa ait karaciğer, akciğer ve beyin dokularında IP ile BDV antijen varlığı belirlenirken (Şekil 4) lenf ve dalakta ise herhangi bir pozitiflik tespit edilemedi. Çokçalışkan (2000) bir fötusa ait lökosit örneğinden pestivirus izole ettiğini bildirmiştir. İzole ettiği virusun ncp karakterde olduğunu kaydeden araştırmacı (Çokçalışkan 2000), Pestivirus antijen varlığı yönünden pozitif olduğunu tespit ettiği fötusun diğer organlarından da (karaciğer, akciğer, bağırsak, böbrek, beyin) virus izolasyonu gerçekleştirdiğini ifade etmiştir. 170 adet doku örneği kullanılan bu çalışmada 3 adet fötusa ait toplam 8 adet dokuda (karaciğer 3 adet, akciğer 3 adet, beyin 2 adet) BDV antijen varlığı belirlendi. Çokçalışkan (2000) yapmış olduğu çalışmada bağırsakta BDV'yi tespit ettiğini bildirmiştir. Bu çalışmada ince bağırsak numuneleri toplanmadığı için karşılaştırma yapılamamıştır. BDV'nin dokular arası yerleşim yerlerine göre her-





hangi bir değerlendirme yapılamamıştır. Daha fazla örneğin kullanılarak fütüsler ile birlikte annelerin de örnekleneceği çalışmalar planlanmalıdır.

Öneri

Sonuç olarak Konya'da daha önce varlığı bildirilmiş olan BDV enfeksiyonunun devam ettiği ve bu nedenle enfeksiyon ile mücadele edilmesi gerekliliği ifade edilebilir.

Teşekkür

Bu çalışma 13401040 proje numarası ile Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir.

Kaynaklar

- Abdel-Latif AO, Goyal SM, Chander Y, Abdel-Moneim AS, Tamam SM, Madbouly HM, 2013. Isolation and molecular characterisation of a pestivirus from goats in Egypt. *Acta Vet Hung*, 61, 270-280.
- Anderson CA, Higgins RJ, Smith ME, Osburn BI, 1987. Border disease virus-induced decrease in thyroid hormone levels with associated hypomyelination. *Lab Invest*, 57, 168-175.
- Avcı O, 2010. Konya ve çevresinde abort problemlili koyun sürülerinde border disease virus enfeksiyonunun araştırılması, Doktora tezi, Selçuk Üniv Sağlık Bil Ens, Konya.
- Berriatua E, Barandika JF, Aduriz G, Hurtado A, Estevez L, Atxaerandio R, Garcia-Perez AL, 2006. Flock-prevalence of border disease virus infection in Basque dairy-sheep estimated by bulk-tank milk analysis. *Vet Microbiol*, 118, 37-46.
- Bielefeldt-Ohmann H, Tolnay AE, Reisenhauer CE, et al., 2008. Transplacental infection with non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus types 1b and 2: Viral spread and molecular neuropathology. *J Comp Pathol*, 138, 72-85.
- Burrells C, Nettleton PF, Reid HW, Miller HRP, Hopkins J, McConnell I, 1989. Lymphocyte subpopulations in the blood of sheep persistently infected with border disease virus. *Clin Exp Immunol*, 76, 446-451.
- Çokçalışkan C, 2000. Pestivirus infections of pregnant sheep and their fetuses, Ankara University graduate school of health sciences, Ankara, Turkey, PhD. Thesis.
- Dubois E, Russo P, Prigent M, Thiery R, 2008. Genetic characterization of ovine pestiviruses isolated in France, between 1985 and 2006. *Vet Microbiol*, 130, 69-79.
- Evermann JF, 2006. Pestiviral infection of llamas and alpacas. *Small Rumin Res*, 61, 201-206.
- Fenton A, Entrican G, Herring JA, Nettleton PF, 1990. An ELISA for detecting pestivirus antigen in blood of sheep persistently infected with Border disease virus. *J Virol Methods*, 27, 253.

- Fernandez-Sirera L, Riba L, Cabezón O, Rosell R, Serrano E, Lavin S, Marco I, 2012. Surveillance of border disease in wild ungulates and an outbreak in Pyrenean chamois (*Rupicapra pyrenaica pyrenaica*) in Andorra. *J Wildl Dis*, 48, 1021-1029.
- French EL, Hore DE, Snowdon WA, Parsonson IM, Uren J, 1974. Infection of pregnant ewes with mucosal disease virus of ovine origin. *Aust Vet J*, 50, 45-54.
- Fulton RW, Briggs RE, Ridpath JF, Saliki JT, Confer AW, Payton ME, Duff GC, Step DL, Walker DA, 2005. Transmission of bovine viral diarrhoea virus 1b to susceptible and vaccinated calves by exposure to persistently infected calves. *Can J Vet Res*, 69, 161-169.
- Garcia-Perez AL, Minguñon E, Jesus FB, Aduriz G, Povedano I, Juste RA, Hurtado A, 2009. Detection of Border disease virus in fetuses, stillbirths, and newborn lambs from natural and experimental infections. *J Vet Diagn Invest*, 21, 331-337.
- Gray EW, Nettleton PF, 1987. The ultrastructure of cell cultures infected with border disease and bovine virus diarrhoea viruses. *J Gen Virol*, 68, 2339-2346.
- Hasircioglu S, Kale M, Acar A, 2009. Investigation of pestivirus infections in aborted sheep and goats in Burdur region. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 15, 163-167.
- Hurdato A, Garcia-Perez AL, Aduriz G, Juste RA, 2003. Genetic diversity of ruminant pestiviruses from Spain. *Virus Res*, 92, 67-73.
- Hyera JMK, Liess B, Frey HR, 1987. A direct neutralizing peroxidase-linked antibody assay for detection and titration of antibodies to bovine viral diarrhoea virus. *J Vet Med B*, 34, 227-239.
- Kirkland PD, Richards SG, Rothwell JT, Standley DF, 1991. Replication of bovine viral diarrhoea virus in the bovine reproductive tract and excretion of virus in semen during acute and chronic infections. *Vet Rec*, 128, 587-590.
- Krametter-Froetscher R, Kohler H, Benetka V, Moestl K, Golja F, Vilcek S, Baumgartner W, 2007. Influence of communal Alpine pasturing on the spread of pestiviruses among sheep and goats in Austria: First identification of border disease virus in Austria. *Zoonoses Public Hlth*, 54, 209-213.
- Kreeft HAJG, Greiser-Wilke I, Moennig V, Horzinek MC, 1990. Attempts to characterize bovine viral diarrhoea virus isolated from cattle after immunization with a contaminated vaccine. *Dtsch Tierärztl Wochenschr*, 97, 63-65.
- Laamanen UI, Neuvonen EP, Yliviuhkola EM and Veijalainen PML, 1997. Comparison of RT-PCR assay and virus isolation in cell cultures for the detection of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in field samples. *Res Vet Sci*, 63, 199-203.
- Marco I, Lopez-Olvera JR, Rosell R, Vidal E, Hurtado A, Juste R, Pumarola M, Lavin S, 2007. Severe outbreak of disease in the southern chamois (*Rupicapra pyrenaica*) associated with border disease virus infection. *Vet Microbiol*, 120, 33-41.



- Marco I, Rosell R, Cabezon O, Beneria M, Mentaberre G, Casas E, Hurtado A, Lopez-Olvera JR, Lavin S, 2009. Serologic and virologic investigations into pestivirus infection in wild and domestic ruminants in the Pyrenees (NE Spain). *Res Vet Sci*, 87, 149-153.
- Monies RJ, Paton DJ, Vilcek S, 2004. Mucosal disease-like lesions in sheep infected with Border disease virus. *Vet Rec*, 155, 765-769.
- Nettleton PF, Willoughby K, 2007. Border disease In: *Diseases of sheep*, ed. Martin WB, Aitken ID, Blackwell Publishing, Oxford, UK, pp. 119-126.
- Nodelijk G, de Jong MC, van Leengoed LA, Wensvoort G, Pol JM, Steverink PJ, Verheijden JH, 2001. A quantitative assessment of the effectiveness of PRRSV vaccination in pigs under experimental conditions. *Vaccine*, 19, 3636-3644.
- OIE, 2008. Border Disease. Chapter 2.7.1. In *Ovidae and Capridae Section 2.7*, pp: 963-973.
- Pratelli A, Bollo E, Martella V, Guarda F, Chiocco D, Buonavoglia C, 1999. Pestivirus infection in small ruminants: Virological and histopathological findings. *New Microbiol*, 22, 351-356.
- Rasmussen TB, Reimann I, Hoffmann B, Depner K, Uttenthal A, Beer M, 2008. Direct recovery of infectious pestivirus from a full-length RT-PCR amplicon. *J Virol Methods*, 149, 330-333.
- Reimann I, Depner K, Trapp S, Beer M, 2004. An avirulent chimeric pestivirus with altered cell tropism protects pigs against lethal infection with classical swine fever virus. *Virology*, 322, 143-157.
- Rosamilia A, Grattarola C, Caruso C, et al., 2014. Detection of border disease virus (BDV) genotype 3 in Italian goat herds. *Vet J*, 199, 446-450.
- Sammin D, Markey B, Bassett H, Buxton D, 2009. The ovine placenta and placentitis. *Vet Microbiol*, 135, 90-97.
- Sawyer MM, Schore CE, Osburn BI, 1991. Border disease of sheep-aspects for diagnostic and epidemiologic consideration. *Arch Virol*, 3, 97-100.
- Thür B, Hilbe M, Strasser M, Ehrensperger F, 1997. Immunohistochemical diagnosis of pestivirus infection associated with bovine and ovine abortion and perinatal death. *Am J Vet Res*, 58, 1371-1375.
- Ward ACS, Kaeberle ML, 1984. Use of an immunoperoxidase stain for the demonstration of bovine viral diarrhoea virus by light and electron microscopes. *Am J Vet Res*, 45, 165-170.
- Yeşilbaş K, Förster C, Bank-Wolf B, et al., 2008. Genetic heterogeneity of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates from Turkey: Identification of a new subgroup in BVDV-1. *Vet Microbiol*, 130, 258-267.

