

## KONYA BÖLGESİ SIĞIRLARINDA SIĞIR ADENOVİRUS TİP 2 ENFEKSİYONLARININ SERUM NÖTRALİZASYON TESTİ İLE ARAŞTIRILMASI

Feridun Öztürk<sup>1</sup> Sibel Yavru<sup>2</sup> Rüstem Duman<sup>3</sup> Atilla Şimşek<sup>4</sup>

The Serological Survey On Bovine Adenovirus Type 2 Infection In Bovine In Konya.

**Summary :** This study was carried out to determine serologically the bovine adenovirus (BAV) type 2 infections on 950 cattle blood sera in Konya.

The cattle blood sera collected from 950 cattle in Meat and Fish Association's Slaughterhouse in Konya, were subjected to microneutralization test, initially by diluting 1/10, then by diluting them two times and by comparing BAV type 2 viruses with the ratio of 100 DKID<sub>50</sub> 1.05 ml.

MDBK (Madine Darby Bovine Kidney) cell culture were used in virus production, in titration and in microneutralization test. As a cell medium, Eagle 's MEM with % 10 inactivated calf sera and as virus medium Eagle 's MEM medium without sera were used.

Based on the results the neutralization antibodies were found in 247 sera of the 950 sera against BAV type 2.

This study pointed out that the adenovirus infections were prevalent in cattle in Konya.

**Özet :** Bu çalışma, Konya Bölgesindeki siğir adenovirus (BAV) tip 2 enfeksiyonlarının varlığını araştırmak amacı ile serolojik olarak 950 siğir kan serumu üzerinde gerçekleştirilmiştir.

Konya Et ve Balık Kurumu Mezbahasından toplanan 950 adet siğir kan serumu, 1/10 sulandırmadan başlamak üzere 2'şer misli sulandırılarak, BAV-2'nin 100 DKID<sub>50</sub> 0.05 ml oranları ile ayrı ayrı karşılaştırılarak mikronötralizasyon testine tabi tutulmuşlardır.

BAV-2'nin çoğaltılmasında, titrasyonunda ve mikronötralizasyon testinde MDBK hücre kültürü kullanılmıştır. Hücre üretme vasatı olarak % 10 serumlu Eagle 's MEM ve virus üretme vasatı olarak serumsuz Eagle 's MEM kullanılmıştır.

Elde edilen sonuçlara göre, 950 siğir kan serumundan 247'sinde (% 26) BAV-2'ye karşı nötralizan antikolar saptanmıştır.

Bu araştırma, Konya bölgesindeki siğirlerde, yetiştirme hastalıklarından biri olan adenovirus enfeksiyonlarının yaygın olarak bulunduğunu ortaya koymuştur.

### Giriş

Dünyanın birçok yerinde ve memleketimizde yaygın olarak bulunan Adenovirus enfeksiyonları büyük hayvancılık işletmelerinde ekonomik kayıplara neden olan oldukça bulaşıcı viral bir hastalıktır.

Birçok türde etkili ve genellikle türe spesifik olan adenoviruslar, insanlarda ve hayvanlarda latent olarak bulunabildikleri gibi klinik enfeksiyonların nedeni de olabilirler (25).

Adenoviridae familyası izole edildikleri konakçılarının türüne göre Mastadenoviruslar ve Aviadenoviruslar olmak üzere iki alt gruba ayrılırlar (13, 14, 22).

Mastadenovirus alt grubunda yer alan siğir adenoviruslarının serum nötralizasyon testi ile 10 ayrı serotipi belirlenmiştir (17).

Klein ve ark. (15), tarafından 1959 yılında sağlıklı bir dananın gaitasından, siğir suşu 19 olarak isimlendirilen siğir adenovirus tip 2 ilk kez izole edilmiştir.

Adenoviruslar morfolojik, fiziksel ve kimyasal özellikleri ile kesin olarak tanımlanan bir virus grubunu oluştururlar (3). Basit yapıda, ortalama 70-90 nm büyüklüğünde çift zincirli DNA içeren adenovirusların elektron mikroskopta 20 yüzlü ikozahedral simetri gösterdiği ve bu ikozahedral yapıların 12 köşesinden iplikçiklerle karakterize 252 kapsomerden oluşan zarsız bir kapside sahip olduğu gözlenmiştir (14, 18, 22, 25).

Hücre çekirdeğinde çoğalan adenoviruslar hücrelerde yuvarlaklaşma ve intranükleer inklüzyon cisimciği oluştururlar (20, 22). Şekli değişen hücreler erimezler ve yapıştıkları yüzeyden ayrılırlar (25).

Adenovirusların siğirlerde ekonomik yönden önem taşıyan solunum ve sindirim sistemi enfeksiyonlarının oluşumunda rol oynadığı bildirilmekte ve genel olarak pnömoenteritis enfeksiyonlarından sorumlu tutulmaktadır (14).

\* Bu araştırma, S. Ü. Araştırma Fonunun desteği ile yürütülmüştür. Proje No: 89/111.

1. Prof. Dr., S. Ü. Veteriner Fakültesi Viroloji Bilim Dalı, Konya.  
2. Yrd. Doç. Dr., S. Ü. Veteriner Fakültesi Viroloji Bilim Dalı, Konya.  
3. Uzm., S. Ü. Veteriner Fakültesi Viroloji Bilim Dalı, Konya.  
4. Araş. Gör., S. Ü. Veteriner Fakültesi Viroloji Bilim Dalı, Konya.

Adenovirusların teşhisi direkt ve indirekt yöntemler kullanılarak yapılabilir (26). Ancak klinik olarak sağlıklı hayvanlardan da adenovirusların tespit edilebilmesi teşhiste dikkat edilmesi gereken bir husustur (2, 21).

Yapılan araştırmalar adenovirus enfeksiyonlarının teşhisinde serum nötralizasyon testinin yanında; agar jel presipitasyon, floresan antikor, komplement fikzasyon, hemaglutinasyon-inhibisyon ve Elisa testlerinin de kolayca uygulanabileceğini göstermektedir (12, 23, 26, 30).

Canselotti ve ark. (6), Sığır adenovirus-1, 2 ve 3 ile yaptıkları nötralizasyon testinde İtalya'da değişik yaş gruplarına ait 405 adet sığır kan serumunun, % 68.9'unda BAV-1'e, % 77.8'inde BAV-2'ye ve % 84.4'ünde BAV-3'e karşı antikor tespit etmişlerdir.

Türkiye'de sığır adenovirusları üzerine ilk çalışma Toker (26) tarafından yapılmış olup, bu çalışmada BAV-1, 2 ve 3'ün tip ayırımında mikronötralizasyon testi, komplement fikzasyon ve single radial hemoliz testlerini uygulamıştır. Araştırmacı (26) yaptığı deneylerde mikronötralizasyon testi ile tip 1'in, tip 2 ve tip 3'den ayırt edilebileceğini, ancak tip 2 ve tip 3'ün aynı test ile ayırt edilemediğini ifade etmiştir.

Sığırlarda BAV enfeksiyonlarının Türkiye'deki varlığının seroepizootolojik olarak araştırılmasında ilk kez Burgu ve Toker (5) çalışmışlardır. Araştırmacılar (5), Türkiye'nin çeşitli illerinden (Ankara, Kars, Yozgat ve Eskişehir) ve Haymana ilçesinden topladıkları 288 adet sığır kan serumundan 235'inde (% 81.6) BAV-1'e, 278'inde (% 99.5) BAV-2'ye ve 276'sında (% 95.8) BAV-3'e karşı 1/10 serum sulandırmalarında nötralizan antikorlar tespit etmişlerdir.

Burgu ve Akça (4), Gelemen Devlet Üretim Çiftliği sığırlarından alınan kan serumlarını BAV-1, 2 ve 3'e karşı nötralizasyon testi ile taramışlar ve 1/4 serum sulandırmasında 60 adet serumun 23'ünde (% 38.33) BAV-1'e, 42 serumun 28'inde (% 66.66) BAV-2'ye ve 52 adet serumun 37'sinde BAV-3'e karşı antikor tespit etmişlerdir.

Öztürk ve Toker (19), Konya Tarım İşletmesinden aldıkları 214 adet sığır kan serumlarının 1/10 sulandırmalarını, BAV-1, 2 ve 3 ile ayrı ayrı karşılaştırarak mikronötralizasyon testine tabi tutmuşlardır. 214 adet sığır kan serumundan 153'ünde (% 71) BAV-1'e, 179'unda (% 84) BAV-2'ye ve 191'inde (% 89) BAV-3'e karşı nötralizan antikor saptamışlardır.

#### Materyal ve Metot

Virus : Araştırmada BAV-2 (Sığır adenovirus tip 2)'nin 12/66 suşu kullanıldı. Bu virus suşu Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Bilim Dalından sağlandı. Virus, MDBK hücre kültürlerinde 37 °C da

üretildi. Virus üretme vasatı olarak serumsuz Eagle's MEM vasatı kullanıldı. % 80-85 CPE meydana geldiği zaman hücreler toplandı. Dondurma-çözdürme işleminden sonra viruslu hücre sıvısı, 3000 devirde 30 dakika santrifuj edildi. Virus süspansiyonu 1 ml miktarında tüplere taksim edildi ve kullanılıncaya kadar - 80°C da muhafaza edildi. BAV-2'nin enfeksiyözite titresi mikrotitrasyon metodu ile tespit edildi (10).

Serumlar : Araştırmada 950 adet sığır kan serumu Konya Et ve Balık Kurumu Mezbahasında kesilen sığırlardan temin edildi. Kan serumları serolojik teste tabi tutulmadan önce su banyosunda 56 °C'da 30 dakika ısıtılarak inaktive edildi. 2 x 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 kullanılıncaya kadar -20°C'da saklandı.

Hücre kültürü : Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Bilim Dalından temin edilen MDBK (Madin Darby Bovine Kidney: Sığır böbrek epitel hücresi) devamlı hücre kültürü kullanıldı. MDBK hücre kültürünün üretilmesinde % 10 inaktif dana serumu içeren Eagle's MEM (Minimum Essential Medium) vasatı kullanıldı.

Serum Nötralizasyon Testi: Sığırlardan toplanan kan serumlarında BAV-2'ye karşı nötralizan antikorların varlığını ortaya çıkarmak amacıyla mikronötralizasyon testi uygulandı.

Bu amaçla kontrolleri yapılacak olan kan serumları PBS (Phosphate Buffer Solusyonu) ile 1/10 oranında sulandırıldıktan sonra mikronötralizasyon tablasındaki her bir sırada bulunan dört göze 0.05 ml konuldu. Daha sonra bütün gözlere titresi bilinen virustan (100 DKID<sub>50</sub>: 10<sup>-5.20</sup>/0.05 ml) özel pipet yardımıyla 0.05 ml miktarında damlatıldı ve mikronötralizasyon tablasının üzeri toksik etkiye sahip olmayan şeffaf, yapıştırıcı bant ile örtülerek 1 saat 37°C'da etüvde bekletildi. Inkubasyondan sonra tablaların üzerindeki bant kaldırılarak her göze yine özel pipet yardımıyla MDBK hücre süspansiyonundan (250.000 hücre/ml) 0.05 ml miktarında damlatıldı. Tablaların üzeri yeniden bant ile kapatılarak 37°C'da inkube edildi. Doku kültürü mikroskopunda yapılan kontrollarda, sonuçlar 5. günde meydana gelen CPE'lere göre değerlendirildi. Ayrıca sonuçlar, boyanarak (29) makroskopik olarak da saptandı. Böylece serumların 1/10 sulandırmada BAV-2'ye karşı nötralizan antikorlar içerip içermedikleri belirlendi.

#### Bulgular

Virusun Enfeksiyözite Gücünün Saptanması: BAV-2'nin MDBK hücre kültürlerine yapılan ekimleri sonucunda, virusun 5. günden itibaren bu kültürlerde

CPE meydana getirdiği saptanmıştır (Tablo-1).

Araştırmada kullanılan BAV 2'nin, MDBK hücre kültürlerinde mikrotitrasyon testi sonunda, titresi  $DKID_{50}$ :  $10^{-5.20}/0.05$  ml olarak tespit edilmiştir (Tablo-1).

Tablo-1. BAV-2'nin MDBK hücre kültüründe üretilmesi sonucu ve mikrotitrasyon metodu ile saptanan titre değeri.

Hücre kültürü	CPE	Üreme Süresi (Gün olarak)	Enfeksiyözite Değeri ( $DKID_{50}/0.05$ ml)
MDBK	+	5	$10^{-5.20}$

Mikronötralizasyon Testi Sonuçları: Araştırmada, 950 adet sığırdan alınan kan serumu numuneleri üzerinde, BAV-2'ye karşı mikronötralizasyon testi ile yapılan nötralizasyon testi sonunda, 247 adet serumda pozitif sonuç alınmıştır (Tablo-2).

Tablo-Mikronötralizasyon testi ile BAV-2'ye karşı kontrol edilen sığır kan serumlarının toplu sonuçları.

Serumların alındığı yer	Teste tabi tutulan serum adedi	1/10 serum sulandırmasında pozitif çıkan serumlar	Pozitif serumların yüzdesi (%)
Konya Et ve Balık Kurumu Mezbahası	950	247	26

### Tartışma ve Sonuç

BAV'lar sığırlarda solunum ve sindirim sistemi hastalıklarının önemli etkenleri arasında yer almaktadır. Bütün dünyada ve Türkiye'de yapılan çalışmalar sığır popülasyonları arasında bu virüslere karşı antikorların yaygın olduğunu göstermektedir.

BAV enfeksiyonlarının varlığı ve yaygınlığı nötralizasyon, hemagglütinasyon, agar jel presipitasyon, komplement fikzasyon ve Elisa testleri ile indirekt olarak tespit edilmiştir (1, 12, 16, 24, 27, 28). Nötralizasyon testi, agar jel presipitasyon testi ve Elisa testi BAV'lara karşı oluşan antikorları ortaya çıkarmada aynı derecede hassas olarak bulunmuştur (7, 8, 9, 11). Ancak nötralizasyon testi, hassaslığının yanısıra ekonomik olması nedeni ile viroloji laboratuvarlarında sık olarak kullanılmaktadır.

Türkiye'de BAV'lar üzerinde ilk çalışma Toker (26) tarafından yapılmış olup, bu çalışmada (26) BAV'ların tip ayırımı için mikronötralizasyon, komplement fikzasyon ve single radial hemoliz testleri kullanılmıştır. Araştırmacı (26) mikronötralizasyon testi ile tip 1'in, tip 2 ve tip 3'den ayırt edilebildiğini ancak tip 2 ve tip 3'ün aynı test ile ayırt edilemediğini bildirmiştir.

Burgu ve Toker (5), Türkiye'nin çeşitli illerinden topladıkları 288 adet sığır kan serumunda BAV-2'ye

karşı 278'ini (% 96.5) pozitif olarak tespit etmişlerdir.

Burgu ve Akça (4), Gelemen Devlet Üretim Çiftliği sığırlarından aldıkları 42 adet kan serumunun 28'inde (% 66.66) BAV-2'ye karşı antikorlar tespit etmişlerdir.

Öztürk ve Toker (19), Konya Tarım İşletmesinden aldıkları 214 adet sığır kan serumunun 179'unda (% 84) BAV-2'ye karşı antikorlar saptamışlardır.

Bu çalışmada ise Konya Et ve Balık Kurumu Mezbahasından alınan 950 adet sığır kan serumundan 247'sinde (% 26) BAV-2'ye karşı antikor tespit edilmiştir.

Bu oran, Burgu ve Akça (4), Öztürk ve Toker'in (19) buldukları değerlerden daha düşük olarak görülmektedir.

Sonuç olarak ülkemizde şimdiye kadar yapılmış olan çalışmalar, BAV enfeksiyonlarının devlete ait hayvancılık işletmelerinde daha yaygın olarak bulunduğunu ortaya koymuştur. Bu çalışma ile sahada da bu enfeksiyonların, devlete ait işletmelerdeki kadar yaygın olmamakla beraber, bulunduğu tespit edilmiştir. Gerek besi gerekse süt sığırcılığı yapılan hayvancılık ünitelerinde, hayvanların birbirlerine yakın ve birarada barındırıldığı intansif yetiştiricilik yapılan devlete ait hayvancılık işletmelerinde bu enfeksiyonların eradike edilmesi amacıyla hayvanların belirli aralıklarla serolojik kontrollara tabi tutulması, devamlı pozitif çıkan hayvanların sürüden elimine edilmesi, ayrıca bu enfeksiyonların sahada yayılmasını önleyebilmek için aşı uygulamasına geçilmesi yararlı olacaktır.

### Kaynaklar

- 1-Aair, B. M., McFerran, J. B., McKillop, E. R. and McCullough, S. J. (1984). Survey for antibodies to respiratory viruses in two groups of sheep in Northern Ireland, Vet. Rec., 115, 403-406.
- 2-Bibrack, B. (1965). Isolierung und charakterisierung eines adenovirus aus nieren vom schwein, Inaugural-Dessertation zur Erlangung der Veterinärmedizinischen Doktorwürde der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.
- 3-Bibrack, B. and Mc Kercher, D. G. (1971). Serologic evidence for adenovirus infection in California cattle, Am. J. Vet. Res., 32, 805-807.
- 4-Burgu, I. ve Akça, Y. (1982). Gelemen Devlet Üretim Çiftliği sığırlarında bazı viral enfeksiyonlara karşı serolojik araştırmalar, A. Ü. Vet. Fak. Derg., 29, 3-4, 506-512.
- 5-Burgu, I. ve Toker A. (1985). Türkiye'de sığır adenoviruslarının (Tip 1, 2, 3) serolojik olarak tespiti, A. Ü. Vet. Fak. Derg., 32, 1, 223-230.
- 6-Cancellotti, F., Turilli, C. and Gagliardi, G. (1976). Serological studies with bovine adenovirus type 1, 2 and 3 in Venetia Province Italy, Atti Della Societa Italiana di Buiatria, 8, 189-194.
- 7-Darbyshire, J. H., Dawson, P. S., Lamont, P. H., Ostler, D. C. and Pereira, H. G. (1965). A new adenovirus serotype of bovine origin, J. Comp. Path., 75, 327-330.
- 8-Estela, L. A. (1967). Application of the agar gel technique in the

diagnosis of infectious bovine rhinotracheitis, Am. J. Vet. Res., 28, 127, 1903-1904.

9-Florent, G. and Mameffe, C. (1986). Enzyme Linked immunosorbent assay used to monitor serum antibodies in cows and calves vaccinated against adenovirus infection, Veterinariya Moskov, USSR, 5, 38-42.

10-Frey, H. R. und Liess, B. (1971). Vermehrungskinetik und verwendbarkeit einer stark zytopathogenen VD-MD-virusstammes für diagnostische untersuchungen mit der mikrotiter-methode, Zbl. Vet. Med., 18, 61-71.

11-Gough, R. E. (1984). Application of agar gel precipitation tests to the serological study of goose parvovirus, Avian Pathology, 13, 501-509.

12-Inaba, Y., Tanaka, Y., Sato, K., Ito, H., Omori, T. and Matumoto, M. (1968). Bovine adenovirus. II. A serotype, Fukuroi, Recovered from Japanese cattle, Japan J. Microbiol., 12, 219-229.

13-Jones, T. C. and Hunt, R. D. (1983). Veterinary Pathology, Lea and Febiger, Philadelphia.

14-Kahrs, R. F. (1986). Viral Diseases of Cattle, The Iowa State University Press/Ames, Iowa, 61-70.

15-Klein, M., Zellat, J. and Michaelson, C. (1960). A new bovine adenovirus related to human adenovirus, Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 105, 340-342.

16-Majewska, H., Kryszkowska, D. S. and Baczynski, Z. (1975). Differential diagnostics of mixed infectious with pneumotropic and entrotropic bovine viruses. III Detection of mixed infections by immunofluorescence test using different fluorochromes. Bull. Vet. Inst. Pulawy, 19, 14-21.

17-Merchant, I. A. and Packer, R. A. (1967). The adenoviruses, Veteriner Bacteriology and Virology, seventh edition. The Iowa State University Press, 640-643.

18-Norrby, E., Bartha, A., Boulanger, P., Dreizin, R. S., Gindsberg, H. S., Kalter, S. S., Kawamura, H., Rowe, W. P., Russell, W. C., Schlesinger, W. and Wigand, R. (1976). Adenoviridae, Intervirology,

7, 117-125.

19-Öztürk, F. ve Toker, A. (1988). Konya Tarım İşletmesi sığırlarında sığır adenovirus tip 1, tip 2 ve tip 3'ün serolojik olarak saptanması, S. Ü. Vet. Fak. Derg., 4, 1, 213-218.

20-Pelczar, M. J., Chan, E. C. S. and Krieg, N. R. (1986). Microbiology Mc Graw-Hill Book Company, Singapore.

21-Phillip, J. I. H. and Sands, J. J. (1972). The isolation of bovine adenovirus serotype 4 and 7 in Britain, Res. Vet. Sci., 13, 386-387.

22-Rolle, M. and Mayr, A. (1978). Microbiologie, Infektions und Seuchenlehre, Ferdinand Enke Verlag Stuttgart, 247-259.

23-Sabiravic, M., Bajrovic, T., Bajalo, N. and Sola, J. (1987). Use of indirect immunofluorescence in adenovirus diagnosis Primjena, Veterinarski Glasnik, 41, 11/12, 1006-1008.

24-Schwarzmaier, J. (1983). Detecting antibodies against reoviruses and adeno-associated viruses in the fowl by Elisa. Inaugural Dissertation, Fachbereich Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin, 80.

25-Serter, F. ve Serter, D. (1986). Klinik Viroloji, Ege Üniversitesi, Bornova-Izmir.

26-Toker, A. (1983). Sığır adenoviruslarında (Tip 1, Tip 2, Tip 3) serolojik reaksiyonlarla tip ayırımı üzerinde araştırmalar, A. Ü. Vet. Fak. Derg., 30, 2, 247-258.

27-Whetstone, C. A., Draayer, H. and Collins, J. E. (1988). Characterization of canine adenovirus type 1 isolated from American black bears, Am. J. Vet. Res., 49, 6, 778-780.

28-Wilcox, G. E. (1970). The aetiology of infectious bovine keratoconjunctivitis in Queensland, Aust. Vet. J., 46, 415-420.

29-Witte, K. H. (1971). Microcolor test for assay of transmissible gastroenteritis virus-neutralizing antibodies, Arch. Ges. Virusforsch., 33, 171-176.

30-Yavru S. ve Öztürk, F. (1990). Konya Bölgesi sığırlarında sığır adenovirus tip-1 üzerinde nötralizasyon ve agar jel presipitasyon testi ile karşılaştırmalı araştırmalar, Veterinarium, 1, 2, 28-32.