

ELAZIĞ, DİYARBAKIR VE ŞANLIURFA İLLERİNDE
KOYUNLARIN MAVİ DİL HASTALIĞI'NIN YAYILMASI
ÜZERİNDE SEROLOJİK ARAŞTIRMALAR¹

*Serologic studies on incidence of Bluetongue disease of sheep
in Elazığ, Diyarbakır and Şanlıurfa*

Yusuf BOLAT²

Summary : Pericipitating antibody with the aid of immunodiffusion test and neutralizing antibody against bluetongue virus type 4 were determined in 275 of 1290 sera samples from sheep which in some cities of the east south - east Anatolia such as Elazığ, Diyarbakır, Şanlıurfa, Gaziantep, Kayseri, Muş, Van and Tunceli. The incidence of the disease in these cities was determined as 21.32 per cent.

Özet : Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgesinde bulunan Diyarbakır, Elazığ, Şanlıurfa, Gaziantep, Kayseri, Muş, Van ve Tunceli illerinde yetiştirilen koyunlardan alınan 1290 serum numunesinden 275 adedinde mavi dil virusu tip 4'e karşı nötraliz edici antikor ve immunodiffuzyon testi yardımıyla presipite edici antikor saptandı. Bu illerde, hastalığın raslantı oranı %21.32 olarak tesbit edildi.

Giriş

Mavi dil hastalığı ilk defa Güney Afrika'da saptanarak 1881'de Hutcheon tarafından tanımlanmış ve hastalığa «Epizootic catarrh» adı verilmiştir (11). 1905'de Spreull, etkenin bir virus olduğunu belirterek hastalığa «Mavi Dil» ismini vermiştir (2). Bu tarihten itibaren yapılan araştırmalarla hastalığın Afrika ülkeleri dışında bir çok ülkelerde de yaygın olduğu anlaşılmıştır (1, 4, 7, 9, 10, 11, 15).

Ülkemizde 1944 yılında koyunlarda başgösteren bir hastalığın klinik belirtilere göre mavi dil olduğu ileri sürülmüş, fakat bu iddia laboratuvar çalışmalarıyla doğrulanmamıştır (8). Ancak 1977'de Aydın ili çevre-

(1) Bu çalışma, aynı başlıklı doktora tezinden özetlenmiştir.

(2) Araş. Gör. Dr., F. Ü. Veteriner Fakültesi, Viroloji Bilim Dalı, Elazığ.

sinde koyunlarda görülen hastalığın etken izolasyonu ve serolojik yöntemlerle mavi dil olduğu kesinlik kazanmıştır (17). Yapılan araştırmalarla hastalığın 1979 yılına kadar tüm Ege bölgesine yayıldığı saptanmıştır (18).

Hastalığın koyunlarda ve sığırlarda büyük ekonomik kayıplara sebep olduğu vurgulanmıştır. Özellikle koyunlarda yüksek oranda ölüm, kondisyon ve yapağı kaybı, genel direncin azalması sonucu bu gibi hayvanların sekonder enfeksiyonlara yakalanması, gebe koyunların yavru atmaları veya anormal yapıda kuzu doğurmaları ekonomik kayıplara neden olarak gösterilmiştir (5).

Bu çalışma yukarıda belirtildiği üzere ekonomik yönden büyük bir önem taşıyan mavi dil hastalığının, koyunculunun yoğun olduğu Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgesinde bulunup bulunmadığını araştırmayı amaçlamaktadır.

Materyal ve Metot

Virus : Araştırmada test virusu olarak Etlik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsünden temin edilen mavi dil virusunun serotip 4'ü kullanıldı.

Yumurta : Virusun üretilmesi ve bundan immunodiffuzyon testi için antijen hazırlanması amacıyla kullanılan yumurtalar Elazığ Mikrobiyoloji Enstitüsünden sağlandı.

Hücre Kültürü : Araştırmada Etlik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsünden temin edilen VERO (green monkey kidney) hücreleri kullanıldı.

Koyun serumları : Diyarbakır, Şanlıurfa, Gaziantep, Kayseri, Muş, Van ve Tunceli illerinden getirilerek Şanlıurfa Et ve Balık Kurumunda kesilen hayvanlardan 827 ve Elazığ Et ve Balık Kurumunda kesilen hayvanlardan da 463 olmak üzere toplam 1290 serum numunesi hazırlandı. Bu serumlar — 20°C de muhafaza edildi. Nötralizasyon testinde kullanılacak serumlar teste tabi tutulmadan önce 56°C de 30 dakika bekletilerek inaktive edildi.

Pozitif kontrol serumu Etlik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsünden temin edildi.

Hücre Kültürü vasatları ve diğer çözeltiler : Gerek hücre kültürü hazırlanmasında ve gerekse virus sulandırmasında Hank's, Earle, fosfatlı tamponlanmış tuzlu su (PBS); Sodyumbikarbonat, Laktalbumin hidroliz-

zat, Fenol kırmızısı ve Tripsin-versen çözeltisi Cunningham'a (3) göre hazırlandı ve 4° de muhafaza edildi.

Fötal dana serumu : Difco laboratuvarınca üretilen fötal dana serumu kullanıldı (Detroit Michigan USA).

Dana serumu : Hücre kültürü ve virus üretme vasatlarında kullanmak amacıyla dana serumu hazırlamak için Elazığ Et ve Balık Kurumunda kesilen yaklaşık bir yaşındaki danalardan kan alındı. Serumu çıkartıldı ve Seitz filtresinden süzöldükten sonra 56°C de 30 dakika inaktive edildi. Bunların sterilite kontrolleri de yapıldıktan sonra 10 ml. miktarlarda — 20°C de muhafaza edildi.

Virusun embiriyolu tavuk yumurtasında üretilmesi : Virus bir çok araştırmacı tarafından önerildiği gibi 6 gün kuluçka edilmiş embiriyolu tavuk yumurtasında üretildi. Bu amaçla 5. kültür pasajı olarak sağlanan virus 0.2 ml. miktarında embiriyolu tavuk yumurtasının sarı kesesine inokule edildi. İnokulasyondan sonra yumurtalar 33.5°C ye ayarlanmış ve %80-90 rutubetli etüve bırakıldılar. Günlük kontroller yapılarak inokulasyonu izleyen 3. günden itibaren ölen embiriyolar alınarak patolojik değişimler yönünden incelendi. Kimi araştırmacılar, tarafından da belirtildiği gibi virus etkisine bağlı olarak ölen embiriyolarda kiraz kırmızısı bir renk ve gelişim önlenmesi gibi bozukluklar gözlemlendi. Söz konusu patolojik değişimleri gösteren embiriyolar alınarak bunların baş, ayak ve kanatları uzaklaştırıldı. Arta kalan embiryo kısmı PBS içinde bir parçalayıcı yardımcıyla %10'luk bir suspansiyon haline getirildi. Bu suspansiyon 3 defa tekrarlanan dondurma ve çözündürmeden sonra soğutucu santrifüjde 3000/dk. devirde 30 dakika santrifüje edildi. Üst kısımlar (Supernatant) alınarak sterilite kontrolleri yapıldı. Steril olan viruslu sıvılar toplandıktan sonra virus stoku olarak 1 ml. miktarlarda — 20°C de muhafaza edildi. Bu şekilde hazırlanan virus immunodiffuzyon testinde antijen olarak kullanıldı.

Embiriyolu tavuk yumurtasında virus aktivitesinin saptanması : ilke olarak embiriyolu tavuk yumurtasındaki virus aktivitesi saptanmış olan yöntemle göre yapıldı (6). Önce embiriyolu tavuk yumurtasında 3 defa pasajı yapılan virusun ELD₅₀/0.2 ml. aktivitesini tesbit etmek için 3. embiryo pasajı virus 10⁻¹ den 10⁻¹⁰ a kadar log. 10 tabanına göre penicillin ve streptomycin içeren PBS ile sulandırıldı. Her sulandırma basamağında 5 embiriyolu tavuk yumurtasının (6 gün kuluçka edilmiş) sarı kesesine 0.2 ml. miktarlarda inokulasyon yapıldı. Sonra bu yumurtalar 33.5°C ye ayarlanmış ve yeteri rutubete sahip etüvde 8 gün tutuldu. İlk 24 saat içinde ölenler değerlendirilmede dikkate alınmadılar. Virusun ELD₅₀/0.2 ml. aktivitesini hesaplamada Kaerber yönteminden yararlandı (12).

Hücre kültüründe virus aktivitesinin saptanması : Tüplerde hücre tabakası oluşuktan sonra hücre üretme vasatı uzaklaştırıldı. Virus, virus üretme vasatında log. 10 tabanına göre 10^{-1} den 10^{-10} a kadar sulandırıldı. Her sulandırma basamağından 5 adet hücre kültür tüpüne 2'şer ml. bırakıldı. Sonra bu tüpler 33.5°C ye ayarlanmış etüve konuldu. Bunu 8 gün devam eden günlük kontroller izledi. Bu süre içinde sulandırma basamaklarından hangilerinde CPE oluştuğu kaydedildi. Virus aktivitesi Kaerber (12) yöntemine göre hesaplandı.

İmmunodiffuzyon testi : Test, bilinen yöntemine göre yapıldı (14). Bunun için 1.25 gr. agar (Difco) 98.75 ml. Ca ve Mg iyonları içermeyen PBS çözeltisi içerisinde çözülünceye kadar kaynatıldı (yaklaşık iki saat). Sonra bu karışım çözülmemiş agar kısımlarının uzaklaştırılması için 3000/dk. devirde 3 dakika santrifüje edildi. Santrifüj tüplerindeki berrak agar kısmı alınarak 120°C de 20 dakika otoklavda sterilize edildi. Sonra agara %0.01 oranında merthiolet ve trypan mavisi katıldı ve agarın pH sı 7.2 ye ayarlandı. Sıvı haldeki bu agardan 10 cm. çaplı Petri kutularına 18 ml. miktarlarda bırakıldı. Agar katılaştıktan sonra biri merkezde ve diğerleri bunun çevresinde olmak üzere 6 delik açıldı. Deliklerin çapı 6 mm. ve çevredeki deliklerin merkezdekine uzaklığı ise 3 mm. idi.

Denemede merkezde olan deliğe antijen olarak 10^{-6} ELD₅₀/0.2 ml. aktiviteye sahip virus bırakıldı. Çevrede bulunan deliklerden birine bilinen pozitif serum diğerlerine ise kontrol serumlardan bırakıldı. Antijen ve serumlar bulunan Petri kutuları 20° - 22°C de ve rutubetli ortamda 112 - 120 saat tutuldular. Presipitasyon bandının varlığı yönünden 72 saat sonra kontroller yapıldı.

Nötralizasyon testi : İmmunodiffuzyon testinde band oluşumu yönünden kuvvetli, zayıf ve negatif reaksiyon gösteren toplam 20 serum alınarak nötralizasyon testinde kontrol edildi. Nötralizasyon testi kimi araştırmacılar tarafından belirtilen yöntemlere göre yürütüldü (13). Denemede sabit virus ve serum sulandırma yöntemi uygulandı. Bu amaçla kontrol edilen bir serumdan 4^{-1} den 4^{-5} e kadar devam eden bir seri sulandırma hazırlandı. Her serum sulandırma basamağından alınan miktara 10^{-7} DKID₅₀/1 ml. olan virusdan 100 DKID₅₀/1 ml. hazırlanarak bundan aynı miktar ilave edildi. Serum - virus karışımları 37°C de 1 saat tutuldu. Serum - virus karışımından 5 hücre kültür tüpüne 0.2 ml. miktarlarda ekim yapıldı. Bu tüpler virus adsorbsiyonu için 37°C de 1 saat bekletildikten sonra tüplere virus üretme vasatı kondu. Müteakiben bu tüpler 33.5°C ye bırakılarak 6 gün süreyle CPE oluşumu yönünden kontrol edildi. Denemede kontrol olarak serum yerine PBS ile hazırlanmış virus karışımları kullanıldı. Serumların nötralizasyon edici etkilerinin ölçütü ola-

rak CPE oluşumunun önlenmesi alındı. Değerlendirmede Kaerber (12) yönteminden faydalanıldı.

Bulgular

Araştırmada kullanılan mavi dil tip 4 aşısı suşunun, kuluçkadaki 6 günlük yumurtaların sarı kesesine yapılan ekimleri sonunda, virusun inokulasyonunu izleyen 3 ve 4. günlerde embriyonun cüceleşmesi, ölümü ve kanamalar gibi patolojik bozukluklar oluşturduğu saptandı. Virusun embriyolu tavuk yumurtasındaki titresi, $ELD_{50}=10^{-6.9}/0.2$ ml. olarak bulundu.

Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgesinde yer alan ve yukarıda belirtilen illerde üretilen koyunlardan alınan 1290 serum numunesinden 275 adedinde presipite edici antikor saptandı. Pozitif reaksiyon veren serumlardan bazısı kuvvetli bazıları ise zayıf presipitasyon bandı oluşturdular. İmmunodiffüzyon testinde kontrol edilen numunelerin illere göre dağılımı ve test sonuçları çizelge 1'de görülmektedir.

Çizelge 1 : İllere göre immunodiffüzyon test sonuçları

İller	Teste tabi tutulan serum adedi	Pozitif serum sayısı	Pozitif serumların yüzdesi (%)
Elazığ	415	148	33.25
Diyarbakır	360	51	14.17
Şanlıurfa	265	43	16.23
Gaziantep	96	7	7.29
Van	58	9	15.52
Muş	46	4	8.69
Kayseri	41	3	7.32
Tunceli	9	0	0.00
Toplam	1290	275	21.32

VERO hücre kültürlerinde üretilen virus, resim (1-2) de görüldüğü gibi ekimden 84 saat sonra CPE oluşmaktadır. Virusun hücre kültüründeki titresi $DKID_{50}=10^{-7}/1$ ml. olarak hesaplandı.

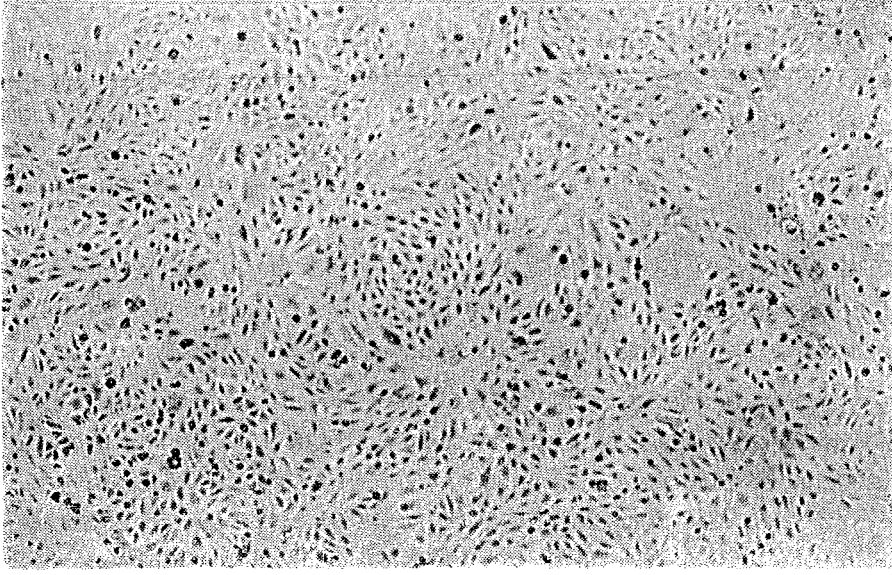
İmmunodiffüzyon testinde pozitif reaksiyon veren serumlardan bazıları tip tayini amacıyla nötralizasyon testinde kontrol edildi.

Presipitasyon bandı oluşturma gücü bakımından 10 kuvvetli, 5 zayıf ve 5 negatif olarak seçilen 20 serum numunesi ile yapılan nötralizasyon testi sonuçları çizelge 2'de verilmiştir.

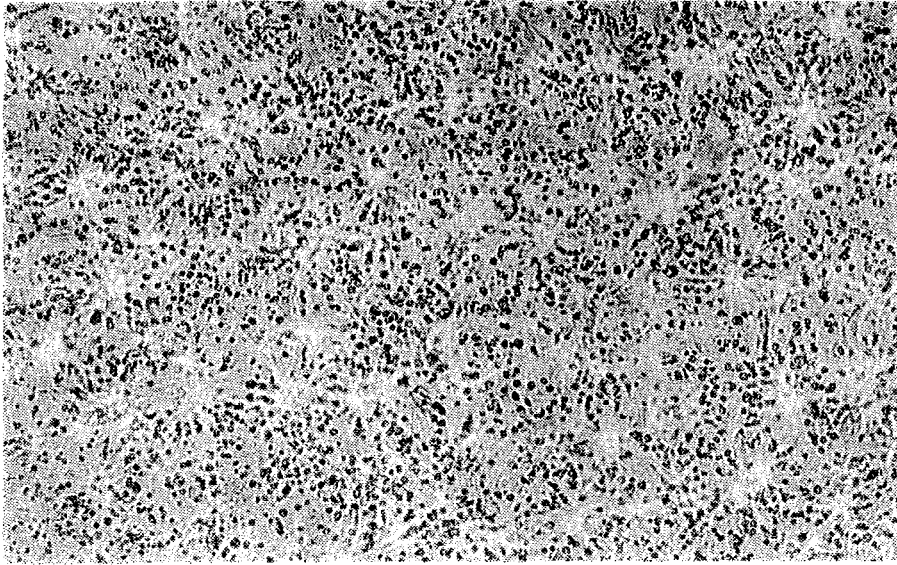
Çizelge 2 : İmmunodiffuzyon testi ve nötralizasyon testi sonuçlarının karşılaştırılması

Serum No	İmmunodiffuzyon test sonuçları	Serum titreleri (SN ₅₀)
1	+++	10 ^{-2'47}
2	+++	10 ^{-2'35}
3	+++	10 ^{-2'23}
4	+++	10 ^{-2'27}
5	+++	10 ^{-2'71}
6	++	10 ^{-0'18}
7	++	10 ^{-2'35}
8	++	10 ^{-1'99}
9	++	10 ⁰
10	++	10 ^{-2'25}
11	+	10 ^{-0'42}
12	+	10 ^{-0'66}
13	+	10 ⁰
14	+	10 ^{-2'11}
15	+	10 ^{-2'23}
16	—	10 ⁰
17	—	10 ⁰
18	—	10 ⁰
19	—	10 ⁰
20	—	10 ⁰

Çizelge de görüleceği gibi immunodiffuzyon testi sonuçlarıyla nötralizasyon sonuçları arasındaki bir paralellik dikkati çekmektedir. Kontrolu yapılan serum numunelerinde en yüksek serum titresi olarak 1/515.64 saptanmıştır.



Resim 1 : 6 günlük VERO hücre kültürü X 100 (Kontrol)
The sixday VERO cell culture (Controle)



Resim 2 : VERO hücre kültüründe 6. günde mavi dil virusunun meydana getirdiği CPE X 125
The CPE induced by bluetongue virus in VERO cell culture the 6th day

Tartışma ve Sonuç

Mavi dil koyun, sığır, keçi ve yabani geviş getirenlerin akut veya subakut seyirli, mevsime bağlı ve artropodlarla taşınan bir viral hastalığı olarak tanımlanmıştır. Özellikle koyunlarda ölüm, ağırlık ve yapağı kaybı, anormal kuzu doğumu ve yavru atma gibi nedenlerle ekonomik yönden önem taşıyan mavi dil hastalığının Afrika dışında birçok ülkelere yayılmış olduğu bildirilmektedir (2, 7, 11).

Bilhassa İran %8.6, Irak %28.3, Mısır %36.8, İsrail, Suriye ve Kıbrıs gibi komşu ülkelerde hastalığın değişik oranlarda bulunması, tehlikenin sınırlarımıza kadar yaklaştığını göstermektedir (1, 9, 10, 16).

Hastalık ülkemizde ancak 1977 yılında saptanabilmiştir (17). İlk defa Aydın ili ve çevresinde baş gösteren hastalığın 2 yıl gibi kısa bir süre içinde tüm Ege bölgesine yayılmış olması, diğer bölgelerde de bir epidemiyolojik çalışmayı zorunlu hale getirmektedir. Araştırmada klinik vaka görülmemesine rağmen hastalığın %21.32 oranında bulunması, komşu ülkelerde alınan sonuçları doğrulamaktadır.

Mavi dil virusunun 20 serolojik tipinin varlığı koruyucu hekimlik yönünden daha geniş kapsamlı bir taramayı ve tip tayinini gerektirmektedir. Ortadoğu ülkelerinde Mısır'da tip 1, 4, 10, 14, İsrail'de tip 4, 10, 12, 16, Kıbrıs'ta tip 3 ve 4, Suriye'de ise tip 4 saptanmıştır (16).

Gerek Ege bölgesinde ve gerekse Suriye'de hastalığa sero tip 4'ün sebep olduğu bildirilmektedir. Ege bölgesine virusun Kıbrıs'tan yayıldığı ileri sürülmektedir (17). Mısır ve İsrail'de virusun aynı tiplerinin bulunması ülkemizde diğer tiplerinde bulunabileceği ihtimalini düşündürmektedir. Bu nedenle geniş kapsamlı taramalar yapılmalı ve virus tipleri tesbit edilmelidir. Presipite edici antikorun hastalığı atlatan hayvanların kan serumunda 2 yıla kadar saptanabilmesi ve presipite edici antijeninde grup spesifik reaksiyon vermesi, immunodiffuzyon testinin bu amaca uygun olduğunu göstermektedir.

Ülkemizde ve Ortadoğu ülkelerinde yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar, doğal şartlarda mavi dil hastalığının epizootiyolojisinde, müteakip araştırmaların yapılmasını ve hastalığa koyunlar dışında sığır ve keçilerde duyarlı olduklarından Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgesinde bu türlerde de hastalığın bulunup bulunmadığının araştırılmasının önemini göstermektedir.

Kaynaklar

- 1 — Afshar, A. and Kayvanfar, H. (1974). Occurrence of precipitating antibodies to bluetongue virus in sera of farm animals in Iran. *Vet. Rec.*, 94: 233 - 235.
- 2 — Bowne, J. G. (1971). Bluetongue disease. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.*, 15: 1 - 46.
- 3 — Cunningham, H. C. (1966). «Laboratory Guide in Virology», 6th ed., Burg. Publ. Comp, Minneapolis, Minn.
- 4 — Eisa, M., Osman, O. M., Karrar, A. E. and Abdel, Rahim, A. A. (1980). An outbreak of bluetongue in sheep in the Sudan. *Vet. Rec.*, 106: 481 - 482.
- 5 — Erasmus, B. J. (1975). Bluetongue in sheep and goats. *Austr. Vet. J.*, 51: 165 - 170.
- 6 — Foster, N. M., Luedke, A. J. and Metcelf, E. H. (1972). Bluetongue in sheep and cattle: Efficacy of embryonating chicken eggs in viral isolations. *Am. J. Vet. Res.*, 33: 77 - 81.
- 7 — Guindo, O. (1975). Enquete serologique chez les ruminants domestiques et sauvages en Afrique Intertropicale. Thèse École Nationale Veterinaire de Lyon.
- 8 — Güleç, Ş. (1972). Bluetongue in Turkey. Cento Seminar on Viral Disease held in İstanbul, Turkey, 101.
- 9 — Hafez, S. M. (1978). Serological survey of bluetongue in Iraq. *Bull. off. Int. Epiz.*, 89: 13 - 22.
- 10 — Hafez, S. M. and Ozowa, Y. (1973). Serological survey of bluetongue in Egypt. *Bull. Epizoot. Dis. Afr.*, 21: 297 - 304.
- 11 — Howell, P. G. (1963). Bluetongue in emerging diseases of the United Nations, Rome., 110 - 153.
- 12 — Kaerber, G. (1964). In diagnostic procedures for viral and rickettsial disease. *Public Health. Assoc. New York*, 3: 48 - 50.
- 13 — Kemeny, L. and Drehle, L. E. (1961). The use of tissue culture propagated bluetongue virus for vaccine preparation. *Am. J. Vet. Res.*, 22: 921 - 925.
- 14 — Klontz, G. W., Svehag, S. E. and Gorham, J. R. (1962). A study by the agar diffusion technique of precipitating antibody directed against bluetongue virus and its relation to homotypic neutralizing antibodies. *Arch. ges. Virusforsch.*, 12: 259 - 268.

- 15 — *Moore, D. L. and Kemp, G. E. (1974). Bluetongue and related viruses in Ibadan, Nigeria: Serologic studies of domesticated and wild animals. Am. J. Vet. Res., 35: 1115 - 1120.*
- 16 — *Sellers, R. F. (1975). Bluetongue in Cyprus. Austr. Vet. J., 51: 198 - 203.*
- 17 — *Yongu, A. D. (1981). Ege blgesinde seyreden mavi dil salgınında hasta bir koyundan mavi dil tip - 4 virusunun izolasyonu. Vet. Hek. Derg., 51: 12 - 19.*
- 18 — *Yongu, A. D. (1982). Bluetongue in western Turkey. Vet. Rec., 111: 144 - 146.*