

Kars Yöresinde Küçük Aile İletmelerindeki Koyunlarda Küçük Ruminant Lentivirus Varlı ının Ara tırılması

Yakup YILDIRIM¹, Volkan YILMAZ¹, Dilek MUZ², Tuba Çi dem O UZO LU³

¹ Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı, 36300, Kars-TÜRK YE

² Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı, 31040, Hatay-TÜRK YE

³ Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı, 06110, Ankara-TÜRK YE

Özet: Bu çalı mada, Kars yöresindeki küçük aile i letmelerinde lentivirus enfeksiyonu klinik semptomları gösteren koyunlardan alınan 24 adet kan örne inde küçük ruminant lentivirus (KRL) varlı ı ara tırıldı. Alınan kan serumu örneklerinin 5 adedinde enzyme linked immunosorbent assay tekni i (ELISA) ile KRL'na kar ı spesifik antikor varlı ı tespit edildi. Virolojik kontrol amacıyla alınan kan örnekleri ise polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile KRL yönünden kontrol edildi ve negatif oldukları saptandı. Elde edilen veriler, Kars yöresinde halk elinde yeti tirilen koyunlarda KRL'nin varlı ını ortaya koymaktadır.

Anahtar Kelimeler: ELISA, koyun, küçük ruminant lentivirus, polimeraz zincir reaksiyonu

The Investigation of Presence of Small Ruminant Lentivirus in Sheep Belongs to Public in Kars Region

Summary: In this study, 24 sera obtained from sheep belonging to public in Kars region were investigated for small ruminant lentivirus (SRL). Of sampled 24 local sheeps, 5 were seropositive for antibodies against to SRL by using ELISA. For the virological study blood samples were tested for SRL using polymerase chain reaction (PCR). The blood samples were found negative for SRL RNA by PCR. The data suggest that SRL infections are present in sheep belonging to public in Kars region.

Key Words: ELISA, polimerase chain reaction, sheep, small ruminant lentivirus

Giri

Küçük ruminant lentivirusları olarak adlandırılan Maedi-Visna Virus (MVV) ve Caprine Arthritis Encephalitis Virus (CAEV), *Retroviridae* familyasının *Lentivirus* generusu içinde yer almaktadır. Maedi-Visna Virus ve CAE virusları lentivirusların prototipidirler (20). Maedi-Visna Virus ve CAEV 'nin çe itli izolatlarının nükleotid sekansı kar ıla tırıldı. İnda bu virusların yakın akraba oldukları, ayrıca di er hayvan ve insan lentivirusları ile daha az yakınlık gösterdikleri tespit edilmi tir. Bu iki virus'un hedef olarak seçtikleri organ farklı olmasına ra men, hücre tropizmuslarının aynı oldu u belirlenmi tir (15,21,25).

Lentiviruslar konakçı savunma sisteminden etkilenmeyen tek virus grubudur. Konakçı spesifik olan bu gruptaki viruslar immun sistem hücrelerini enfekte ederek vücut sıvıları ile bireyden bireye horizontal olarak bula abilmektedirler (8). Hastalık süresince virus, humoral ve selüler immun yanıtı ra men akci erlerde, memelerde, merkezi sinir sisteminde ve hemopoetik organlarda persiste olarak kalmakta; enfekte hayvanlar virus'u di er

hayvanlara ve çevreye sürekli olarak saçmaktadırlar. Enfeksiyonun ülkeler arasında yayılmasında sa lıklı görünömlü enfekte hayvan ticaretinin öne mi oldu u bilinmektedir (11,23).

Küçük ruminat lentivirusları içinde yer alan MVV'ü eri kin koyunlarda enfeksiyona neden olur. Maedi'de progressive intersititiel pneumonia, visna'da ise meningoencephalitis sonucu geli en klinik bulgular saptanmaktadır. Klinik bulgular uzun süreli prodromal dönemden sonra ba lamaktadır. Bu dönem maedi için genellikle 3-4 yıl, visna için yakla ık 2 yıl oldu u bildirilmi tir (12,28,30).

Keçilerin kronik bir hastalı ı olan CAEV enfeksiyonu ise eri kin hayvanlarda ilerleyici arthriti s, 2-6 aylık ya tan daha genç o laklarda demiyelinize encephaliti s ile karakterizedir. Di er klinik belirtiler; Hard Udder Sendromu (katı meme sendromu) veya mastiti s, ilerleyici parezi s, nörolojik disfonksiyon, hipogalactia, kronik intersitisyel pneumoni ve a ırı kilo kaybı olarak bilinmektedir (2,9,15).

Lentivirus enfeksiyonlarının serolojik te hisinde nötralizasyon, agar jel immundiffüzyon (AGID), enzim linked immunosorbent assay (ELISA) ve immunperoksidad (IP) testlerinden yararlanılmaktadır. Bu testler ile grup spesifik antijenlere (p25 ve

gp135) ait antikorlar ba arıyla tespit edilmektedir (4,10,12,19). Bu te his yöntemlerine ek olarak radioimmunoassay (RIA) ve western blot (WB) teknikleri de kullanılmaktadır (5).

Direkt te his; tam kan, süt ve organ materyalinden polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) teknikleri kullanılarak, virionun gag, pol, env ve LTR gen bölgelerine spesifik primerler yardımıyla proviral DNA'nın amplifiye edilmesi esasına dayanmaktadır (26). Ayrıca Southern Blotting ve In Situ Hibridizasyon teknikleri de kullanılmaktadır. Sirkülasyonda bulunan virus miktarının azlığı, enfeksiyonu meydana getiren su lar arasındaki sekans farklılıkları ve persiste enfeksiyonun dönemi PZR tekniklerinin duyarlılıklarında da i kenli e neden olabilmektedir (5).

Enfeksiyondan sonra, seropozitifli in geç olu ması durumunda enfekte hayvanlardan alınan serum örnekleri serolojik testlerde negatif sonuç verebilmektedir. Bu nedenle proviral DNA özelli inde olan virus'un tespitinde PZR gibi moleküler teknikler, eradikasyon programları için çok önemli olmakta ve hayvanlardaki enfeksiyonun durumunu kesin olarak ortaya koymaktadır (33).

Türkiye'de endemik olarak seyreden KRL enfeksiyonunun (29,31,32) Avustralya ve Yeni Zelanda hariç olmak üzere dünyanın ço u bölgesinde de yaygın olarak varlığı ortaya konmu tur (1,16,18,22,24).

Bu çalı mada, Kars yöresindeki küçük aile i letmelerinde klinik olarak lentivirus enfeksiyonu semptomları gösteren koyunlarda, KRL enfeksiyon varlığının ara tırılması ve sözü geçen enfeksiyonların kontrolüne yönelik önerilerin tartılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Örneklenen Hayvanlar: Çalı mada Kars ilindeki küçük aile i letmelerinde kuru öksürük, solunum güçlü ü, paraliz ve kilo kaybı klinik semptomları gösteren, Akkaraman ve Morkaraman ırkına ait 6 aylıktan büyük hayvanların bulunduğu 8 sürüden 24 adet koyun kan örne i sa landı. Kan örnekleri serolojik çalı ma için koagülanlı, virolojik çalı ma için ise anti-koagülanlı tüplere (Greiner) alındı.

Serum örneklerinin hazırlanması: Koagülanlı tüplere alınan kan örneklerinden 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj i lemını takiben ayırt edilen serumlar steril tüplere alındı ve ELISA testi ile serolojik kontrolleri yapılmak üzere test uygulamasına kadar -20°C'de saklandı.

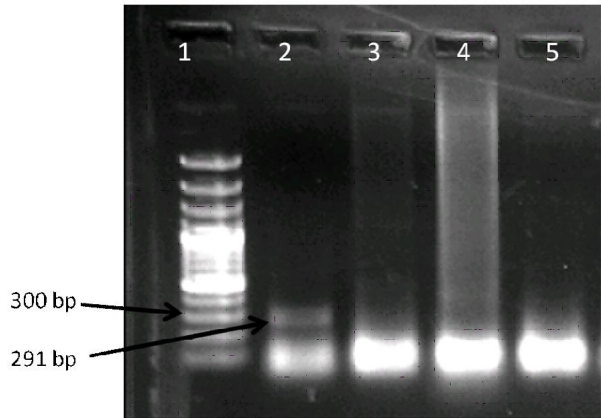
Lökosit örneklerinin hazırlanması: Anti-koagülanlı tüplere alınan kan örnekleri 1500 rpm'de santrifüj edilerek, lökosit tabakası pastör pipeti ile alındı. 1 ml fosfatlı buffer solüsyonu içinde sulandırıldı ve üzerine % 10 dimetilsülfoksit (DMSO) ilave edilerek test a amasına kadar -80 °C'de saklandı.

ELISA : Kan serum örnekleri lentivirüslerle karşı olan antikorların tespiti amacıyla ticari ELISA kiti (Insitute Porquier, Kat.No:P00303, Fransa) ile test edildi. Test, üretici firmanın bildirdi i prosedüre göre yapıldı.

PZR : RNA ekstraksiyonu, Chomczynski ve Sacchi (7) tarafından bildirilen yöntem kullanılarak yapıldı. Ekstraksiyon sonrasında elde edilen cDNA'lar, PZR reaksiyonunda 291 baz çiftlik (bp) ampliconların olu umunu sa layan, Extramania ve ark. (14) tarafından bildirilen viral genomun long terminal repeat (LTR) bölgesine spesifik primerler yardımıyla test edildi. PZR ürünlerinin jelde görüntülenmesi amacıyla, %1'lik agaroz solüsyonu hazırlandı ve 0.5 µg/ml oranında ethidium bromide (EtBr) ilave edilerek, yürütülen jel ultraviyole (UV) ışığı altında görüntüldü.

Bulgular

Ara tırmada küçük aile i letmelerinde bulunan klinik olarak hasta koyunlardan örneklenen 24 adet serum örne ine uygulanan ELISA testi sonucunda 5 adedinde KRL'na karşı spesifik antikor varlığı saptandı. Direkt te his amacıyla uygulanan PZR testi sonucunda ise örneklerin hiçbirinde istenilen büyüklükte sahip amplicon tespit edilmedi.



ekil 1 : PZR sonuçları. Hat 1 : 100 bp DNA Merdiveni (Fermentas,Litvanya); Hat 2 : Pozitif virus kontrol (291 bp); Hat 3-5 : Ara tırmada kullanılan bazı örnekler.

Tartı ma ve Sonuç

Koyun yeti tiricili i yapılan birçok ülkede varlı ı bilinen MVV enfeksiyonunun Türkiye'de varlı ı ilk kez Aliba o lu ve Arda (3) tarafından mezbahada kesilen koyunların %0.02'sinde patolojik bulgulara dayanılarak tanımlanmı tir. Daha sonraki yıllarda yapılan çalı malarda (6,27,32) ise gerek halk elinde ve gerekse kamuya ait bazı i letmelerde enfeksiyonun varlı ı ve önemi serolojik verilere dayanılarak bildirilmi tir. Kamuya ait i letmelerde enfeksiyonun seropozitiflik oranlarının %1.5-56.2 arasında de i ti i belirlenmi tir (4,6,29).

Küçük aile i letmelerinde yeti tirilen koyunlarda enfeksiyonun ara tırılmasına yönelik olarak Yavru ve ark. (31)'nin çalı masında örneklenen populasyon için %2.29 seropozitiflik bildirilmi tir. Yavru ve ark. (31), 10 adedi Konya ilinde yerle ik olmak üzere Konya, Mersin ve zmir illerinde bulunan 12 küçük aile i letmesinden 8 adedinde, de i en oranlarda (%0.85-13.3) seropozitiflik tespit etmi lerdir. Yılmaz ve ark. (32) ise stanbul'da mezbahaya kesim için getirilen koyunların %1'inde (3/320) ayrıca Trakya bölgesinde bulunan koyun çiftliklerinden sa lanan atık yapmı koyun ve sa - lıklı koçlardan alınan kan örneklerinin %8'inde (13/156) MVV spesifik antikor saptamı lardır. Benzer olarak, Schreuder ve ark. (27) da Erzurum ilinde küçük aile i letmelerinde yeti tirilen koyunlarda enfeksiyonun varlı ını tespit etmi ler ve buna bölgede tohumlama amaçlı kullanılan ithal koçların kaynak olu turmu olabilece ini bildirmi lerdir.

Bu ara tırmada ise Kars ilinde küçük aile i letmelerinde KRL enfeksiyonunun varlı ı belirlenmi tir. Bu veri küçük aile i letmelerine ilgili olarak Türkiye'de daha önceki bildirimlerin verileri ile benzerlik göstermektedir. Bu noktada üzerinde durulması gereken önemli konulardan birisi halk elinde yeti - tirilen koyunlarda enfeksiyonun Türkiye'nin tüm bölgelerinde varlı ı ve artan oranlarla belirlenen yaygınlı ıdır.

Lentivirus enfeksiyonlarının kontrolünde temel olarak enfeksiyon kayna ının belirlenmesi ve ortadan kaldırılması ile özellikle enfekte annelerden do an kuzulara enfeksiyonun bula ma riskinin azaltılmasına dayalı programlar uygulanmaktadır. Bundan ba ka, hastalı a genetik rezistans gösteren hayvanların seçilerek ya da üretilerek yeti tirilmesi yönünde görü lerde bulunmaktadır (13,16-18).

Sonuç olarak, KRL enfeksiyonunun Kars ilinde varlı ının ortaya konuldu u bu çalı mada elde edilen serolojik veriler, kontrol ve eradikasyon programları uygulanmadı ı sürece enfeksiyonun

varlı ının devam edece i anlaşı lmaktadır. Enfekte oldu u saptanan koyunların kesimi ile hastalı ın eradikasyonu en uygun ve radikal yöntem olarak görülmektedir. Ancak, Türkiye'de bu konuya ilgili yasal düzenlemeler söz konusu olmadı ndan, konu yeti tiricinin inisiyatifindedir. Hastalı ın daha geni populasyonlara yayılmasını engellemek için hayvan hareketleri (kaçak yolla ya da yasal ithalat ile ba ka ülkelerden veya i letmeler arası nakil) özenle takip edilmelidir ve halk elindeki koyunlarda lentivirus antikor taraması yapılmalıdır. Ayrıca, bu hastalı ın Türkiye'deki yaygınlı ı, bu nedenle olabilecek ekonomik kayıpların boyutu ve hastalı ın kontrolü için uygulanacak programların belirlenmesi önemli yarar sa layacaktır.

Kaynaklar

1. Adair BM, 1986. Serological surveillance for maedi visna virus and caprine arthritis encephalitis virus in Northern Ireland. *Vet Rec*, 118: 422-423.
2. Adams DS, Klevjer-Anderson P, Carlson JL, McGuire TC, Gorham JR, 1983. Transmission and control of caprine arthritis encephalitis virus. *Am J Vet Res*, 44: 1670-1675.
3. Aliba o lu M, Arda M, 1975. Koyun pulmoner adenomatosisi'nin Türkiye'de durumu ile patolojisi ve etiyolojisinin ara tırılması. *TÜB TAK VHAG Yayınları*, 274.
4. Alkan F, Tan T, 1998. A comparative study on the diagnosis of maedi-visna infection in serum and colostrum samples using agar gel immunodiffusion (AGID) technique. *Dtsch Tierarztl Wochenschr*, 105: 276-278.
5. Andres D, Klein D, Watt NJ, Berriatua E, Torsteinsdottir S, Blacklaws BA, Heakiss GD, 2005. Diagnostic tests for small ruminant lentivirus. *Vet Microbiol*, 107: 49-62.
6. Burgu I, Toker A, Akçay Y, Alkan F, Yazıcı Z, Özkul A, 1990. Türkiye'de visna maedi enfeksiyonunun serolojik olarak ara tırılması. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 37: 538-553.
7. Chomczynski P, Sacchi N, 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 162(1):156-159.
8. Clements JE, Gdovin SL, Montelaro RC, Narayan O, 1988. Antigenic variation in lentiviral diseases. *Ann Rev Immunol*, 6: 139-159.

9. Crawford TB, Adams DS, Cheevers WP, 1980. Chronic arthritis in goats caused by a retrovirus. *Science*, 207: 997-999.
10. Cutlip RC, Jackson TA, Laird GA, 1977. Immunodiffusion test for ovine progressive pneumonia. *Am J Vet Res*, 38: 1081-1084.
11. Dawson M, 1980. Maedi-visna: a review. *Vet Rec*, 106: 212-216.
12. Dawson M, Biront P, Houwers DJ, 1982. Comparison of serological tests used in three state veterinary laboratories to identify maedi visna virus infection. *Vet Rec*, 111: 432-434.
13. Dohoo IR, Heaney DP, Stevenson RG, Samagh BS, Rhodes CS, 1987. The effects of maedi-visna virus infection on productivity in ewes. *Prev Vet Med*, 4: 417-484.
14. Extramania AB, Gonzalez L, Cortabarría N, Garcia M, Juste RA, 2002. Evaluation of a PCR technique for the detection of maedi-visna proviral DNA in blood, milk and tissue samples of naturally infected sheep. *Small Rum Res*, 44: 109-118.
15. Granoff A, Webster RG, eds., 1999. *Encyclopedia of Virology*. Second Edition. London: Academic Press, pp. 223-229.
16. Houwers DJ, König CDW, De Boer GF, Schake J, 1983. Maedi visna control in sheep I: Artificial rearing of colostrum deprived lambs. *Vet Microbiol*, 8: 179-185.
17. Houwers DJ, Schaake J, De Boer GF, 1984. Maedi-visna control in sheep. II. Half-yearly serological testing with culling positive ewes and progeny. *Vet Microbiol*, 9: 445-451.
18. Houwers DJ, König CDW, Bakker J, De Boer MJ, Pekelder JJ, Sol J, Vellema P, De Viries G, 1987. Maedi visna control in sheep III: Results and evaluation of a voluntary control program in the Netherlands over a period of four years. *Vet Quart*, 9: 29-36.
19. Lujan L, Badiola JJ, Garcia Martin JF, Moreno B, Margas MA, Fernandez de Luco D, Perez V, 1993. Seroprevalence of maedi visna infection in sheep in the north east of Spain. *Prev Vet Med*, 15: 181-190.
20. Narayan O, Clements I, Kennedy-Stoskopf S, Shetfer, D, Royal W, 1987. Mechanisms of escape of visna-lenti viruses from immunological control. *Contr Microbiol Immunol*, 8: 60-76.
21. Oliver R, Cathcart A, McNiven R, Poole W, Robati G, 1984. Transmission of caprine arthritis encephalitis virus to sheep. *New Zealand Vet J*, 32 (11):199-200.
22. Palsson PA, 1976. Maedi and visna in sheep. RH Kimberlin ed. *Slow Virus Infections of Animals and Man*. Amsterdam: North-Holland Publishing Company, pp.17-114.
23. Pritchard GC, Spence JB, Arthur MJ, Dawson M, 1984. Maedi visna virus infection in commercial flocks of indigenous sheep in Britain. *Vet Rec*, 115: 427-429.
24. Pritchard GC, Done SH, Dawson M, 1995. Multiple cases of maedi and visna in a flock in East Anglia. *Vet Rec*, 21: 443.
25. Reina R, Mora MI, Glaria I, Garcia I, Solano C, Lujan L, Badiola JJ, Contreras A, Berriatua E, Juste R, Mamoun, RZ, Rolland M, Amorena B, Andres D, 2006. Molecular characterisation and phylogenetic study of maedi visna and caprine arthritis encephalitis viral sequences in sheep and goats from Spain. *Virus Res*, 121: 189-198.
26. Rowe JD, East NE, Thurmond MC, Franti CE, Pedersen NC, Theilen GH, 1992. Risk factors associated with the incidence of seroconversion to caprine arthritis encephalitis virus infection in goats on a California dairy. *Am J Vet Res*, 53: 2386-2395.
27. Shcreuder BEC, Yonguc AD, Girgin H, Akçora A, 1988. Antibodies to maedi-visna in indigenous sheep in Eastern Turkey. *Etilik Vet Mikrobiyol Derg*, 6: 47-53.
28. Sigurdsson B, Palsson PA, Tryggvadottir A, 1952. Transmission experiments with maedi. *J Infect Dis*, 90: 233-241.
29. Tan MT, Alkan F, 2002. Türkiye'de maedi-visna enfeksiyonunun seroepidemiolojisi ve virus izolasyonu. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 49: 45-50.
30. Watt NJ, King TJ, Collie D, Melntyre N, Sargan D, McConnel I, 1992. Clinicopathological investigation of primary, uncomplicated maedi-visna virus infection. *Vet Rec*, 131: 455-461.
31. Yavru S, im ek A, Levent O, Kale M, 2001. Serological survey of maedi - visna virus

- (MVV) infection for sheep in Turkey. *In: Proceeding of X. International Symposium of Veterinary Laboratory Diagnosticians and OIE Seminar on Biotechnology.* Salsomaggiore-Palma, Italy.
32. Yılmaz H, Gürel A, Özgür Y, Turan N, Bilal T, Kuçu B, Ilgaz A, Dawson MM, Morgan KL, 1998. Koyun serumlarında maedi-visna virusu antikorlarının saptanması ve bu koyunların beyin ve akciğerini histopatolojik ve bakteriyolojik yönden incelenmesi. *III. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi*, 23-25 Eylül, Bursa-Türkiye.
33. Zink MC, Narayan O, Kennedy PG, Clements JE, 1987. Pathogenesis of visna maedi and caprine arthritis encephalitis: new leads on the mechanism of restricted virus replication and persistent inflammation. *Vet Immunol Immunopathol*, 15: 167-180.

Yazı ma Adresi:

Doç. Dr. Yakup YILDIRIM
Kafkas Üniversitesi
Veteriner Fakültesi, Viroloji ABD,
36300, Paçayırı/KARS
Tel: 0 474 242 68 07 / 1170
e-mail: yayildirim@hotmail.com