

Kars Yöresindeki Kültür Irkı Sığırlarda Bovine Leukemia Virus (BLV) Enfeksiyonunun Seroprevalansı ^[1]

Yakup YILDIRIM* Volkan YILMAZ* Salih OTLU** Mitat ŞAHİN**

[1] KAÜ Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Birimi tarafından desteklenmiştir
(Proje No: 2006-VF-014).

* Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anbilim Dalı, Kars – TÜRKİYE

** Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anbilim Dalı, Kars - TÜRKİYE

Yayın Kodu (Article Code): 2008/15-A

Özet

Bu çalışmada, Kars yöresinde halk elindeki kültür ırkı sığırlarda Bovine Leukemia Virus (BLV) enfeksiyonunun seroprevalansı araştırıldı. Bu amaçla, Kars yöresinde halk elinde yetiştirilen, rastlantısal olarak seçilmiş bir yaşımdan büyük kültür ırkı sığırlardan sağlanan kan serumları kullanıldı. Kan serumları BLV'a spesifik antikorlar yönünden Agar Gel Immunodiffüzyon (AGID) ve Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) yöntemleri kullanılarak test edildi. Örneklenen populasyon BLV enfeksiyonu açısından her iki metoda göre seronegatif olarak bulundu.

Anahtar sözcükler: AGID, Bovine Leukemia Virus, ELISA, Seroprevalans

The Seroprevalance of Bovine Leukemia Virus (BLV) Infection in Imported-breed Cattle in Kars District in Turkey

Summary

This study was carried out to determine seroprevalance of Bovine Leukemia Virus (BLV) infections in imported-breed cattle housed in private farms in Kars and environs. For this purpose, serum samples collected from randomly selected cattle older than a year were used. Sera were tested for antibodies against BLV by using commercial Agar Gel Immunodiffusion (AGID) and Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) technique. The analysed population was found to be seronegative for BLV in both assays.

Key words: AGID, Bovine Leukemia Virus, ELISA, Seroprevalence

İletişim (Correspondence)

Phone: +90 474 2426800/1170

E-mail: yayildirim@hotmail.com

GİRİŞ

Enzootik sığır löykozu (EBL) dünyanın çeşitli bölgelerinde oldukça sık rastlanılan, 2 yaşından büyük sığırlarda lenf düğümlerinde tümör oluşumları, kan tablosu değişiklikleri ve lenfosit sayısı artışı ile karakterize bir enfeksiyondur ^{1,2}. Hastalık kondisyon kaybı, süt veriminde azalma, ağırlık kaybı gibi nedenlerden dolayı ekonomik kayıplara yol açar ³.

Bovine Leukemia Virus (BLV) *Retroviridae* familyasında *Deltaretrovirus* genusu içinde yer alır. Etken tek iplikçikli, pozitif polariteli, tek segmentli, linear yapıda RNA genomu taşıır ⁴.

Bovine leukemia virusunun bulaşmasında en önemli yol, etkenin B lenfositlerde persiste kalmasından dolayı, bu enfekte B lenfositlerin horizontal olarak sağlıklı hayvanlara aktarılmasıdır. Bu noktada çeşitli amaçlarla yapılan uygulamalar (boynuz kesme, kulak numaralama, kan alma, enfekte cerrahi aletler, vb) sırasında gelişen iatrojenik bulaşma doğal enfeksiyonun bulaşmasında önem taşımaktadır. Ayrıca enfeksiyon etkeni artropodlar vasıtası ile de sağlıklı bireylere taşınabilir. Yavrulara ise BLV'u enfekte anne sütünün alınması ve uterus enfeksiyonları şeklinde aktarılabilir. BLV ile enfekte hayvanlar büyük çoğunlukla klinik semptom göstermeden persiste enfekte olarak kalırlar. Bu durum enfeksiyonun sürü içinde yayılmasında büyük önem taşıır ^{2,4-6}.

BLV enfeksiyonunun teşhisinde Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), Radioimmunoassay (RIA) ve Agar Gel Immunodiffüzyon (AGID) gibi serolojik yöntemlerden yararlanılmaktadır. ELISA testi AGID testine göre enfekte sığırların enfeksiyonunu erken döneminde teşhis edebilmesi bakımından daha avantajlı görülmesine rağmen, her iki test de EBL enfeksiyonunun teşhisinde yaygın olarak kullanılmaktadır ². Bu bağlamda kan serumunda BLV spesifik antikorların tespiti amacıyla ELISA ve AGID testlerinin karşılaştırmalı çalışıldığı araştırmalarda, Wincers ve Wyler ⁷ iki test arasında %98.1, Wang ⁸ ise %89.4 oranında korelasyon olduğunu saptamışlardır.

Hastalığın prevalansı ülkeden ülkeye değişiklik gösterir, aynı şekilde ülke içinde veya aynı bölgede bulunan çiftliklerde de prevalansı farklı olabilmektedir ². Yapılan çalışmalarda bir çok ülkede

değişik oranlarda varlığı bildirilen ⁹⁻¹¹ EBL enfeksiyonu, ülkemizde ilk kez 1962 ¹² yılında patolojik ve hematolojik bulgulara dayanılarak bildirilmiştir. Daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda ¹³⁻¹⁶ gerek halk elinde bulunan ve gerekse kamuya ait işletmelerde yetiştirilen sığırlarda enfeksiyonun değişen oranlarda varlığı saptanmıştır.

Bu çalışmada, yerli sığır ırklarının ıslah çalışmalarının ön plana çıktığı günümüzde Kars yöresinde halk elinde yetiştirilen kültür ırkı sığırlarda BLV enfeksiyonunun varlığı/seroprevalansının araştırılması ve kan serumunda BLV spesifik antikorların tespiti amacıyla kullanılan AGID ve ELISA testlerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Serum örnekleri

Araştırma planına uygun olarak Kars yöresindeki küçük aile işletmelerinde yetiştirilen 200 adet bir yaş üzeri kültür ırkı (Holstein, Simental ve Esmer) sığırlardan kan örnekleri toplandı.

Kaolinli tüplere alınan kan örnekleri 3000 devirde 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası ayrılan serum kısmı stok tüplerine alındı. Daha sonra bu serum örnekleri 56°C'de 30 dakika süreyle inaktivasyona tabi tutuldu ve test aşamasına kadar -20°C'lik dondurucularda saklandı.

Agar Gel Immunodiffüzyon (AGID) test kiti

BLV spesifik antikorların tespiti için Seromed firmasının ticari test kiti kullanıldı. Test kiti; BLV gp51 antijeni (Seromed D-7503) ve buna spesifik anti-gp51 kontrol serumu (Seromed D-7504) içermektedir.

Agar Gel Immunodiffüzyon Testi (AGID)

Serum örneklerinde BLV spesifik antikorların tespitinde Frenzel ve Kaaden'in ¹⁷ bildirdikleri agar jel-immunodiffüzyon testi kullanıldı. İçerisinde 0.1 M Tris/HCL ve %8.5 NaCl bulunan %0.8 Bacto Agar 45°C'lik su banyosunda eritilerek 10 cm çapındaki petri kutularına 12 ml miktarında dökülerek donduruldu. Özel delici ile merkezde 1 ve bunun periferinde birbirine eşit uzaklıkta 6 adet delik açıldı. Merkezdeki deliğe BLV antijeni, periferdeki karşılıklı iki deliğe referenz pozitif serum

ve diğer deliklere de test edilecek serum örneklerinden eşit miktarda konuldu. Test, petri kutularının nemli ortamda, oda ısısında 72 saat inkubasyonunu takiben presipitasyon hatlarının oluşmasına göre değerlendirildi.

Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Test üretici firmanın (Institut Pourquier, Fransa) bildirdiği yöntemle göre uygulandı. Bu amaçla kit içeriğinde bulunan pozitif ve negatif referans serumlar 0.5 ml distile su ile sulandırılarak hazırlanmıştır. Çift sayılı sütunları BLV antijeni ile kaplı, tek sayılı sütunları BLV antijeni ile kaplanmamış tabletlerin her çukuruna 0.19 ml buffer solüsyonu konuldu. Daha sonra pleytin B1 ve B2 çukuruna 0.01 ml pozitif referans serum, A1 ve A2 çukuruna ise 0.01 ml miktarında negatif referans serum, diğer her bir çift çukura (C1 ve C2, D1 ve D2, ...) test edilecek serum örneklerinden 0.01'er ml miktarında konularak (1/20), 37°C'de bir saat süreyle inkubasyona bırakıldı. Süre sonunda 3 kez yıkanan tabletin gözlerine titresi oranında (1/100) sulandırılan konjugatdan (anti-BLV konjugatı) 0.1 ml konularak 37°C'de 30 dakika inkube edildi. Tekrar edilen yıkama işleminden sonra tetramethylbenzidine (TMB) kromojeni, substrat tamponu içinde hazırlanarak tablet gözlerine (0.1 ml) ilave edildi. Yirmi dakika sonra reaksiyon 2M H₂SO₄ ilavesi ile durduruldu. Test spektrofotometrik olarak 450 nm filtre absorbanları okunmak suretiyle değerlendirildi.

Her örnek için gerçek optik dansite (OD) değeri; antijen kaplı çukurun OD değerinden antijen kaplanmamış çukurun OD değerinin çıkarılması ile elde edilmiştir.

Sonuçların doğru kabul edilmesinde; pozitif referans serumun doğrulanmamış OD'sinin en az 0.350 ve pozitif referans serumun OD'si ile negatif referans serumun OD'si arasında 3.5 kat ve daha fazla oran olması temel kriter olarak kabul edilmiştir. Test edilen serum örneğinin gerçek OD'si pozitif referans serumun gerçek OD'sinden düşük ise BLV enfeksiyonu yönünden negatif, yüksek ise pozitif olarak değerlendirilmiştir.

BULGULAR

Araştırma kapsamında toplanan 200 adet kültür ırkı sığira ait kan serumu örneğinin serolojik olarak

ELISA ve AGID testi ile incelenmesi sonucunda, kontrol edilen örnekler BLV'a karşı spesifik antikor yönünden negatif olarak değerlendirildi.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Enzootik Sığır Löykozisi (EBL) daha çok yetişkin sığırlarda görülmekte ve seropozitif olarak tespit edilen bu hayvanlarda enfeksiyon subklinik olarak seyretmektedir. Verim özelliklerinde azalma, sağaltım için medikal girdiler, mortalite vb nedenlerle önemli ekonomik kayıplara neden olan BLV enfeksiyonunun prevalansı, birçok ülkede yapılan çalışmalarda ⁹⁻¹¹ %0 ile %72.7 arasında değişen oranlarda bildirilmiştir.

Türkiye'de EBL enfeksiyonu ile ilgili olarak, Hakioglu ¹² tarafından bildirilen çalışmanın verilerine göre, örneklenen 576 adet sığira ait kan serumlarının kontrolü sonucunda %3.7 (21/576) pozitiflik saptanmıştır. Burgu ve ark.¹⁸ Türkiye'nin değişik bölgelerinde bulunan 3 tarım işletmesinde EBL varlığını tespit etmek için yaptıkları AGID testi sonucunda %0-33.08 arasında seropozitiflik tespit etmişlerdir. Akça ve ark.¹³ da 9 değişik tarım işletmesinden topladıkları 409 adet kan serumuna yaptıkları AGID testi sonucunda %0-28.9 oranları arasında BLV spesifik antikor varlığını belirtmişlerdir. İyisan ve ark.¹⁹ İstanbul ilinde süt sığırcılığı yapılan işletmelerde AGID testi sonucunda %2.9 oranında prevalans saptamışlardır. Uysal ve ark.²⁰ da Trakya bölgesinde halk elinde bulunan 1.5 yaş üstü 480 sığira ait kan serumu örneğini ELISA tekniği kullanarak BLV antikorları varlığı yönünden kontrol etmişler ve %10.63 oranında pozitiflik bulmuşlardır. Yılmaz ve ark.²¹ ile Otlı ve ark.¹⁴ sırası ile Elazığ ve Kars illerinde küçük aile işletmelerinde yetiştirilen sığırlar üzerinde yapılan çalışmalarda, seropozitiflik saptayamadıklarını bildirmişlerdir. Bursa ilinde yapılan iki çalışmada ise ^{22,23} EBL seroprevalansı %3.06 ve %9.15 bulunmuştur. Güneydoğu Anadolu Projesi Bölgesinde küçük aile işletmelerinde yetiştirilen sığırlarda yapılan benzer çalışmalarda da, Çabalar ve ark.²⁴ test ettikleri sığır kan serumlarının tümünün BLV'a spesifik antikorlar yönünden negatif bulunduğunu belirtmişler, Özgünlük ve ark.¹⁵ ise EBL seroprevalansını aynı bölgede %0.27 olarak tespit etmişlerdir. Yıldırım ¹⁶, 2003 yılında Kuzeydoğu Anadolu Bölgesindeki yerleşim birimlerinde bulunan sığırlarda %1.58 (8/506) oranında seropozitiflik

saptamış ve aynı çalışmada Kars ilinden topladığı kan serumlarında ise BLV'a spesifik antikor tespit edilmediğini bildirmiştir.

Bu çalışmaların ^{13,14,16,18,24} verileri değerlendirildiğinde, hayvancılığın büyük sürüler halinde yapıldığı özel ya da kamuya ait işletmelerde belirlenen seropozitiflik oranlarının, küçük aile işletmelerinde yetiştirilen hayvanlardaki seropozitiflik oranlarından çok daha yüksek olduğu görülmektedir. Nitekim bu çalışmada da bir yaşımdan büyük kültür ırkı sığırlardan sağlanan 200 adet kan örneğinde seropozitiflik tespit edilememiştir. Bu veri halk elindeki hayvanların örneklediği çalışmalarla ^{14,16,21,24} paralellik göstermektedir.

Bir sürüden EBL enfeksiyonunun eradikasyonu, belirli aralıklarla yapılacak kontroller sonucu seropozitif bulunan hayvanların sürüden çıkarılmasını takiben, 6 ay yaştan üzerindeki tüm hayvanların en az 4 ay ara ile 3 kez seronegatif bulundukları takdirde tamamlanır. Eradikasyon programında çalışılacak test yönteminin seçiminde; testin pratik olması, enfeksiyonun teşhisini erken dönemde yapabilmesi ve daha çabuk sonuç vermesi gibi konulara dikkat edilmesi gerekir.

Bölgenin iklim ve coğrafi şartlarına bağlı olarak yörede hayvancılık oldukça gelişmiştir. Kars'ta yapılan sığır yetiştiriciliği genellikle küçük aile işletmeciliği şeklinde ve aile ihtiyaçlarını karşılamak amacıyla yapılmaktadır. 2006 yılı verilerine göre Kars yöresinde kültür ırkı yetişkin sığır sayısı 9960 adet olarak bildirilmiştir ²⁵. Örnekleme sınırlı sayıda yapılmış olmasına rağmen, elde edilen veriler enfeksiyonun yöredeki durumu hakkında bilgi vermesi açısından önemlidir.

Araştırmada BLV spesifik antikorların tespitinde kullanılan ELISA ve AGID testlerinin duyarlılıklarının tespiti amaçlansa da, çalışmada her iki test metoduyla da örneklenen hayvanlar BLV antikorları yönünden negatif bulunduğu için böyle bir karşılaştırma yapılamadı.

Son yıllarda sığır yetiştiriciliğindeki ıslah çalışmalarından dolayı, kültür ırklarının EBL gibi viral enfeksiyonları daha da önem kazanmıştır. BLV enfeksiyonunun persiste karakteri nedeniyle seropozitif hayvanlar sürekli virus taşıyıcısı ve saçıcısıdır. Bu durum, sürü içinde enfeksiyonun yayılması bakımından büyük önem taşır ². Her ne kadar bu

çalışmada halk elinden örneklenen kültür ırkı sığırlarda seropozitiflik tespit edilmemiş olsa da, birçok entansif sığır yetiştiriciliği için EBL'un yüksek oranlarda saptandığı dikkate alınarak, henüz halk elinde yüksek oranlara ulaşmamış olan bu enfeksiyonun kontrolü çalışmalarının yapılması gerektiğinin vurgulanmasında yarar görülmüştür.

KAYNAKLAR

1. **Camargos MF, Stancek D, Rocha MA, Lessa LM, Reis JKP, Leite RC:** Partial sequencing of env gene of bovine leukaemia virus from Brazilian samples and phylogenetic analysis. *J Vet Med B*, 49, 325-331, 2002.
2. **Van Der Maaten MJ, Miller JM:** Bovine leukosis virus. Chapter 39, 419-429. In, Dinter Z, Morein B (Eds): *Virus Infections of Ruminants*. Elsevier Science Publisher, 1990.
3. **Murtaugh MP, Lin GF, Haggard DL, Weber AF, Meiske JC:** Detection of bovine leukemia virus in cattle by the polymerase chain reaction. *J Virol Med*, 33, 73-85, 1991.
4. **Willems L, Kettmann R:** Deltaretrovirus. 1014-1019. In, Tidone CA, Darai G (Eds): *The Springer Index of Viruses*. Springer, Berlin, 2002.
5. **Bielanski A, Maxwell P, Simard C:** Effect of bovine leukaemia virus on embryonic development and association with in vitro fertilised embryos. *Vet Rec*, 26, 255-256, 2000.
6. **Kelly EJ:** 55 early detection of bovine leukemia virus in cattle by use of the PCR. In, Becker Y, Darai G. (Eds): *PCR Protocols for Diagnosis of Human and Animal Virus Diseases*. 499-506. Springer Lab Manual, 1995.
7. **Wincenz E, Wyler UR:** Seroepidemiologische untersuchung über das vorkommen von enzootischer boviner leukose in der schweiz mittels agar gel-immunodiffusion und ELISA in blut und milchserum. *Arch Tierheilk*, 127, 185-203, 1985.
8. **Wang CT:** Bovine leukemia virus infection in Taiwan: Evaluation of the enzyme-linked immunosorbent assay and agar gel immunodiffusion test. *Jpn J Vet Res*, 39, 107-115, 1991.
9. **Meas S, Seto J, Sugimoto C, Bakhsh M, Riaz M, Sato T, Naeem K, Ohashi K, Onuma M:** Infection of bovine immunodeficiency virus and bovine leukemia virus in water buffalo and cattle population in Pakistan. *J Vet Med Sci*, 62, 329-331, 2000.
10. **Usui T, Meas S, Konnai S, Ohashi K, Onuma M:** Sero-prevalance of bovine immunodeficiency virus and bovine leukemia virus in dairy and beef cattle in Hokkaido. *J Vet Med Sci*, 65, 287-289, 2003.
11. **Zaghawa A, Beier D, El-Rahim IHA, El-Ballal S, Karim I, Conraths FJ, Marquardt O:** An outbreak of enzootic bovine leukosis in Upper Egypt: Clinical, laboratory and molecular-epidemiological studies. *J Vet Med B*, 49, 123-129, 2002.
12. **Hakioğlu F:** Karacabey harası sığırlarında lökosis bakımından yapılan hematolojik araştırmalara ait ilk tebliğ. *Türk Vet Hek Dern Derg*, 167-175, 1962.
13. **Akça Y, Alkan F, Bilge S, Karaoğlu T, Özkul A, Burgu İ, Kaaden OR:** Süt sığırlarının süt ve kan serumlarında enzootik sığır lökkozuna (EBL) karşı antikor varlığının enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) ve agar jel

- immunodiffuzyon(AGID) testi ile araştırılması. Ankara Üniv Vet Fak Derg, 43, 53-59, 1996.
14. **Otlı S, Aydın F, Genç O, Güler MA, Gökçe G:** Kars yöresi sığırlarında bovine leukemia virus (BLV) enfeksiyonu üzerinde serolojik ve hematolojik araştırmalar. *Turk J Vet Anim Sci*, 25, 105-110, 2001.
 15. **Özgünlük İ, Yıldırım Y, Alkan F:** Güneydoğu Anadolu Projesi (GAP) kapsamındaki bölgede halk elinde yetiştirilen sığırlarda Bovine Leukemia Virus (BLV) enfeksiyonunun seroprevalansı. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 52, 109-112, 2005.
 16. **Yıldırım Y:** Kuzeydoğu Anadolu Bölgesindeki Sığırlarda Mavdil (BT), IBR, PI-3, EBL ve BVD Enfeksiyonlarının Seroprevalansı. Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, *Doktora Tezi*, 2003.
 17. **Frenzel B, Kaaden OR:** Zur standard zierung der serologischen diagnose der rinderleukose fortschritte der veterinarmedizin. Herd 30: 13 Kongressbericht. 188-189. Verl Paul Parey, Berlin und Hamburg, 1980.
 18. **Burgu İ, Urman HK, Kaaden OR, Akça Y, Alçıgır G, Berkin Ş, Alkan F, Atasever A:** Türkiye'de enzootik sığır löykozu'nun seroepidemiolojisi ve patolojisi. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 37, 32-45, 1990.
 19. **İyisan AS, Bitgel A, Özyörük F:** İstanbul ilindeki süt sığırlarında enzootik bovine leukosisin seroepidemiolojisi. *Türkiye Uluslararası Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi*, 25-27 Eylül 1996, İstanbul-Türkiye, 1996.
 20. **Uysal A, Bilal T, Yılmaz H, Tan H, Bakirel U, Zerin M, Arslan M:** Trakya yöresinde halk elindeki sığırlarda enzootik sığır löykozunun teşhisinde hematolojik ve serolojik bulgular üzerine karşılaştırmalı araştırmalar. *Türkiye Uluslararası Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi*, 25-27 Eylül 1996, İstanbul-Türkiye, 1996.
 21. **Yılmaz K, Gül Y, Bolat Y, Özdemir H:** Elazığ ve çevresindeki sığırlarda enzootik sığır lökozunun araştırılması. *I. Veteriner İç Hastalıkları Kongresi*, 28-30 Eylül 1995, Elazığ, 1995.
 22. **Batmaz H, Çarlı KT, Kahraman M, Çetin C, Kennerman E:** Serological and haematological diagnosis of enzootic bovine leukosis in cattle in Turkey. *Vet Rec*, 136, 42-44, 1995.
 23. **Şen A, Ülgen M, Çarlı KT, Batmaz H:** Seroprevalance of bovine leukemia virus infection in cattle slaughtered at Bursa abattoir. *Turk J Vet Anim Sci*, 19, 325-327, 1995.
 24. **Çabalar M, Voyvoda H, Sekin S:** Doğu ve Güneydoğu Anadolu Bölgesinde süt sığırlarında enzootik bovine leukosis (EBL)'in seroprevalansı. *IV. Uluslararası İç Hastalıkları Kongresi*, 04-06 Temmuz 2001, Konya-Türkiye, 2001.
 25. **Türkiye İstatistik Kurumu:** Kars yöresinde yetişkin kültür ırkı sığır sayısı. Erişim: [<http://www.tuik.gov.tr>]. *Erişim Tarihi:* 13.11.2007.