

ISSN 1016-3573



**VETERİNER KONTROL MERKEZ
ARAŞTIRMA ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ**
Etlik - ANKARA



ETLİK VETERİNER MİKROBİYOLOJİ DERGİSİ

JOURNAL OF ETLİK VETERINARY MICROBIOLOGY
ANKARA – TURKEY

Cilt/Volume 28 ♦ Sayı/Number 2 ♦ 2017

Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi
Cilt/Volume 28 ♦ Sayı/Number 2 ♦ 2017
Journal of Etlik Veterinary Microbiology
Yılda iki kez yayımlanır / Published two times per year
ISSN 1016-3573

Sahibi

Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Adına
Dr. Cevdet Yaralı
Enstitü Müdür V.

Yayın Kurulu / Publication Board

Sorumlu Yazı İşleri Müdürü / Managing Editor

Dr. A. Burak Güngör

Editör / Editor in Chief

Dr. Tahsin Onur Kevenk

Bilimsel Kurul / Editorial Board

Dr. Erhan Akçay

Dr. Asiye Dakman

Dr. Ali Erkurt

Dr. Elçin Günaydın

Dr. Filiz Şen

Adres / Address

Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü

Ahmet Şefik Kolaylı Cad. No 21/21-A

06020 Etlik - Ankara / TÜRKİYE

Tel. : +90 312 326 00 90 (8 hat)

Faks : +90 312 321 17 55

Web : <http://vetkontrol.tarim.gov.tr/merkez>

E-posta : etlikvetmikrobiyolderg@gmail.com

Hakem Listesi / Referee List*

Prof.Dr. İbrahim BALKAYA

Doç.Dr. Yunus Emre BEYHAN

Dr. Elvin ÇALIŞKAN

Doç.Dr. Yavuz ÇOKAL

Dr. Can ÇOKÇALIŞKAN

Doç.Dr. Alper ÇİFTÇİ

Doç.Dr. Gülay ÇİFTÇİ

Yrd.Doç.Dr. Gülşen GONCAGÜL

Prof.Dr. Timur GÜLHAN

Dr. A. Burak GÜNGÖR

Prof.Dr. Ergün KÖROĞLU

Yrd.Doc.Dr. Duygu Neval SAYIN İPEK

Prof.Dr. Kezban Can ŞAHNA

Yrd.Doç.Dr. Serap ÜNÜBOL AYPAK

Prof.Dr. Yakup YILDIRIM

Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı

Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı

GTHB Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü

Bandırma Onyediy Eylül Üniversitesi Bandırma Meslek Yüksekokulu

GTHB Şap Enstitüsü Müdürlüğü

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı

Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı

GTHB Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü

Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı

Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı

Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim dalı

ADÜ Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı

Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı

** İsimler soyada göre alfabetik dizilmiştir ve bu sayıda görev alanlar yazılmıştır.*

ULAKBİM Yaşam Bilimleri ve Türkiye Atıf Dizini veritabanları kapsamında bulunan “çift hakemli” bir dergidir.

Copyright © Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi 2017, Her hakkı saklıdır / All rights reserved

Basım Tarihi / Publishing Date: Aralık / December 2017, Baskı adedi / Circulation: 500

Tasarım ve Baskı / Printing



Medisan Yayınevi Ltd.Şti.

Çankırı Cad. 45 / 347 Ulus - Ankara, Türkiye

Tel : +90 312 311 24 26 – 311 00 57 medisan yayinevi@gmail.com

İçindekiler / Contents

Olgu Sunumu / Case Report

Dual Infection of Sheep Aborted Foetus with Peste des Petits Ruminants Virus and *Brucella melitensis*
 Abort Olmuş Koyun Fötusunun Peste des Petits Ruminants Virus ve *Brucella melitensis* ile İkili Enfeksiyonu
 Murat Şevik, Yasin Gülcü, Müge Doğan61

Co-infection with Border Disease Virus and *Brucella melitensis* in an Aborted Sheep Foetus
 Bir Koyun Abort Fötusunun Border Disease Virus ve *Brucella melitensis* ile Koenfeksiyonu
 Murat Şevik, Yasin Gülcü, Müge Doğan65

Detection of a Mixed Infection of Lumpy Skin Disease Virus and Foot and Mouth Disease Virus in a Calf
 Bir Buzağıda Lumpy Skin Disease Virus ve Şap Haslığı Virusunun Miks Enfeksiyonunun Tespiti
 Murat Şevik.....69

Araştırma Makalesi / Research Article

İki Leylek (*Ciconia ciconia*) ve Bir Şahin (*Buteo buteo*)’de *Lucilia sericata*’nın Neden Olduğu Yara Miyazı
 Wound Myiasis Caused by *Lucilia Sericata* in two White Storks (*Ciconia ciconia*) and in a Common Buzzard (*Buteo buteo*)
 Armağan Erdem Ütük, Cem Ecmel Şaki73

Comparision of Two Different Vaccination Shedule for Fight with Infectious Bursal Disease in Layer Hens
 Yumurtacı Tavuklarda Infectious Bursal Disease ile Mücadelede İki Farklı Aşılama Programının Karşılaştırılması
 Ahmet Bildir, Sibel Gür76

Yaygın *Salmonella* Serovarlarının Moleküler Tekniklerle Tiplendirilmesi

Molecular Typing of Common *Salmonella* Serovars
 Elçin Günaydın, Selahattin Şen, K. Serdar Diker, Derya Karataş Yeni, Özlem Kardoğan, H. Kaan Müştak, Özlem Şahan85

Molecular Characterization and Phylogenetic Analysis of Canine Parvovirus 2 in Dogs, Mersin Province, Turkey

Türkiye’de Mersin İlinde Köpeklerde Canine Parvovirus 2’nin Moleküler Karakterizasyonu ve Filogenetik Analizi
 Ender Dinçer96

Türkiye'nin Nevşehir İlindeki Atlarda Kistik Ekinokokkoz Seroprevalansı

Seroprevalance of Cystic Echinococcosis in Horses in Nevsehir Province of Turkey

Armağan Erdem Ütük, Selçuk Pekkaya, Fatih Kuzugüden, İbrahim Balkaya, Sami Şimşek101

Serological Evidences of West Nile Virus in Domestic Bird Species in the Samsun Province

Samsun İlindeki Evcil Kanatlı Türlerinde Batı Nil Virusunun Serolojik Bulguları

Sinan Pir, Harun Albayrak105

Derleme / Review Article

Ruminantlarda *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* Enfeksiyonunun İmmunolojik ÖzellikleriImmunological Characteristics of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* Infection in Ruminants

Ezgi Şababoğlu, Hülya Türütoğlu.....109

Viruslar ve Teratogenez

Teratogenesis and Viruses

Cüneyt Tamer, Semra Okur Gümüşova115

Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi Yayım Koşulları

1. Dergi, T.C. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Etlik Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'nün hakemli, bilimsel yayın organı olup, yılda iki defa yayımlanır. Derginin kısaltılmış adı "Etlik Vet Mikrobiyol Derg" dir.

2. Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi'nde veteriner hekimlik alanında yapılan, başka bir yerde yayımlanmamış olan orijinal bilimsel araştırmalar, güncel derleme, gözlem, kısa bilimsel çalışmalar ve enstitüden haberler yayımlanır. Derleme şeklindeki yazılar; orijinal olması, en son yenilikleri içermesi, klasik bilgilerin tekrarı olmaması durumunda kabul edilir. Derlemeyi hazırlayan yazarın, o konuda ulusal ya da uluslararası düzeyde orijinal yayın ve araştırmalar yapmış olması koşulu aranır.

3. Türkçe ve İngilizce olarak hazırlanacak metinler 12 punto Times New Roman yazı karakterinde, düz metin olarak, çift aralıklı ve kenarlarda 30 mm boşluk bırakılarak, A4 formundaki beyaz kağıda yazılmalıdır. Yazıların tamamı, şekil ve tablolar dahil olmak üzere orijinal bilimsel araştırmalarda 16, derlemelerde 10, gözlemlerde 6 ve kısa bilimsel çalışmalarda 4 sayfayı geçmemelidir.

4. Microsoft Word formatındaki metin ile en az 300 dpi çözünürlükteki JPEG formatındaki resim/lerin tamamı etikvetmikrobiyolderg@gmail.com e-posta adresine gönderilmelidir.

5. Türkçe orijinal çalışmalar konu başlığı, yazar/yazarların adları, adresleri, Türkçe özet ve anahtar sözcükler, İngilizce başlık, İngilizce özet ve anahtar sözcükler, giriş, materyal ve metot, bulgular, tartışma ve sonuç, teşekkür ve kaynaklar sırası ile hazırlanmalıdır. İngilizce orijinal çalışmalar konu başlığı, yazar/yazarların adları, adresleri, İngilizce özet ve anahtar sözcükler, Türkçe başlık, Türkçe özet ve anahtar sözcükler, giriş, materyal ve metot, bulgular, tartışma ve sonuç, teşekkür ve kaynaklar şeklinde hazırlanmalıdır. Kısa bilimsel çalışmaların ve derlemelerin başlık ve özet bölümleri orijinal çalışma formatında, bundan sonraki bölümleri ise, derlemelerde; giriş, metin ve kaynaklar şeklinde, kısa bilimsel çalışmalarda ise bölümlendirme yapılmadan hazırlanmalıdır.

6. Orijinal çalışmalar ve gözlemler aşağıdaki sıraya göre düzenlenerek yazılmalıdır.

Başlık, kısa, konu hakkında bilgi verici olmalı ve küçük harflerle yazılmalıdır.

Yazar(lar)ın, ad(lar)ı küçük, soyad(lar)ı büyük harflerle yazılmalı ve unvan belirtilmemelidir. **ORCID** numaraları yazılmalıdır.

Özet, Türkçe ve İngilizce olarak, tek paragraf halinde ve en fazla 500 sözcük olmalıdır.

Anahtar kelimeler, Türkiye Bilim Terimleri'nden seçilmeli, alfabetik sıraya göre yazılmalı ve 5 sözcüğü geçmemelidir.

Giriş, konu ile ilgili kısa literatür bilgisi içermeli, son paragrafında çalışmanın amacı vurgulanmalı ve iki sayfayı geçmemelidir.

Materyal ve Metot, ayrıntıya girmeden, anlaşılır biçimde yazılmalıdır. Başlıklar kalın, alt başlıklar italik yazı tipiyle belirtilmelidir.

Bulgular bölümünde veriler, tekrarlama yapmadan açık bir şekilde belirtilmelidir. Tablo başlıkları tablonun üstünde, şekil başlıkları ise şeklin altında belirtilmelidir.

Tartışma ve Sonuç bölümünde, araştırmanın sonucunda elde edilen bulgular, diğer araştırmacıların bulguları ile karşılaştırılmalı ve literatüre olan katkısı kısaca belirtilmelidir.

Teşekkür bölümü, gerekli görülüyorsa kaynaklardan hemen önce belirtilmelidir.

Kaynaklar bölümünde, kaynaklar listesi alfabetik ve kronolojik olarak sıralanmalı ve numaralanmalıdır. Metin içerisindeki kaynak, yazar soyadı yazılıp sıra numarası ile; cümle sonunda ise sadece sıra numarası ile **köşeli parantez** içerisinde yazılmalıdır. Cümle sonunda birden çok kaynak belirtilecek ise kaynak numaraları kü-

çükten büyüğe doğru sıralanmalıdır. Metin içerisinde ikiden çok yazarlı kaynak kullanımlarında ilk yazarın soyadı yazılmalı diğer yazarlar ise "ve ark." (İngilizce metinlerde "et al.") kısaltması ile belirtilmelidir. Dergi adlarının kısaltılmasında "Periodical Title Abbreviations: By Abbreviation" son baskısı esas alınmalıdır. Kaynaklar listesinde yazar(lar)ın aynı yıla ait birden fazla yayını varsa, yayın tarihinin yanına "a" ve "b" şeklinde belirtilmelidir.

Kaynak yazımı ve sıralaması aşağıdaki gibi yapılmalıdır;

Sürelili Yayın:

Dubey JP, Lindsay DS, Anderson ML, Davis SW, Shen SK, (1992). *Induced transplacental transmission of N. caninum in cattle*. J Am Vet Med Ass. 201, 709-713.

Yazarlı Kitap:

Fleiss JL, (1981). *Statistical methods for rates and proportions*. Second edition. New York: John Wiley and Sons, p.103.

Editörlü Kitap:

Balows A, Hausler WJ, Herrmann KI, eds., (1990). *Manual of Clinical Microbiology*. Fifth edition. Washington DC: IRL Press, p.37.

Editörlü Kitapta Bölüm:

Bahk J, Marth EH, (1990). *Listeriosis and Listeria monocytogenes*. Cliver DD. eds. Foodborne Disease. Academic press Inc, San Diego. p.248-256.

Kongre Bildirileri:

Çetindağ M, (1994). *Pronoprymna ventricosa, a new digenic trematode from the Alosa fallax in Turkey*. Eighth International Congress of Parasitology (ICOPA VIII), October, 10-14, İzmir-Turkey.

Tezler:

Aksoy E, (1997). *Sığır Vebası hastalığının histolojik ve immunoperoksidaz yöntemle tanısı üzerine çalışmalar*. Doktora Tezi, AÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Anonim:

Anonim, (2009). *Contagious equine metritis*. Erişim adresi: <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdf>, Erişim tarihi: 17.10.2009.

Peter AT (2009). *Abortions in dairy cows*. Erişim adresi: <http://www.wcds.afns.ualberta.ca.htm>, Erişim tarihi: 14.11.2009.

Yazışma adresi, çok yazarlı çalışmalarda yazışma adresi olarak yazarlardan sadece birinin adı/soyadı, adresi ve e-posta adresi çalışmanın sonunda belirtilmelidir.

7. Latince cins ve tür isimleri italik yazı tipi ile yazılmalıdır. Tüm ölçüler SI (Système Internationale)'ye göre verilmelidir.

8. Dergide yayımlanmak üzere gönderilen makaleler tüm yazarlar tarafından imzalanan "Yayın Hakkı Devri Sözleşmesi" ve başvuruya ilişkin bir dilekçe ile birlikte gönderilmelidir. Yayımlanması uygun görülen çalışmalar, istendiğinde Yayım Komitesi'nin basıma ilişkin kararı, yazar(lar)ına bildirilir.

9. Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi'nde yayımlanacak olan, hayvan deneylerine dayalı bilimsel çalışmalarda "Etik Kurul Onayı Alınmıştır" ifadesi aranır.

10. Gönderilen yazıların basım düzeltmeleri orijinal metne göre yapıldığından, yazıların her türlü sorumluluğu yazarlara aittir.

11. Ürünlerin ticari adları ile karşılaştırılmaları yönelik araştırmalar derginin ilgi kapsamı dışındadır.

12. Araştırmaya konu olan maddelerin ve ürünlerin ticari adları kullanılmamalıdır.

13. Şayet varsa araştırmanın desteklendiği kurum adı ve proje numarası belirtilmelidir.

14. Dergiye gönderilen yazılar geliş tarihine göre yayımlanır.

15. Yayımlanmayan yazılar, yazarına iade edilmez.

Journal of Etlik Veterinary Microbiology Publication Conditions

1. The Journal is a refereed, scientific publication of Republic of Turkey Ministry of Food, Agriculture and Livestock, Directorate of Etlik Veterinary Control Central Research Institute and is published two issues in a year. The abbreviation of the journal is "J Etlik Vet Microbiol".

2. In the Journal of Etlik Veterinary Microbiology, original research articles, actual reviews, case reports, short communications on the issue of veterinary medicine whose one part or whole have not been published in any other place before, and news from the institute are published. The review articles will be accepted only if they are original, actual and not repeating the classical knowledge. The author of the review is asked to possess original publications or researches on the subject at national or international levels.

3. Manuscripts that will be prepared in Turkish and English should be typed as a full text, on A4 paper with 12 pt, in Times New Roman typing character, double-spaced and with 30 mm space in both sides of the paper. Manuscripts including figures and tables should not exceed 16 pages for original research articles, 10 pages for reviews, 6 pages for case reports and 4 pages for short communications.

4. Manuscript written in Microsoft Word format and figures in JPEG format at minimum 300 dpi resolution should be submitted to etlikvetmikrobiyolderg@gmail.com

5. Original research articles and case reports should include in following rank: title, name(s) of the author(s), their addresses, abstract and key words in English, title, abstract and key words in Turkish, introduction, material and method, findings, discussion and conclusion, acknowledgements and references. In short communications and reviews, divisions except summaries should be omitted.

6. Original research articles and case reports should be arranged and composed as in the following.

Title should be brief, explanatory and written in small caps. Explanation(s) about the study should be written as footnotes.

Author(s) should be mentioned by their names and surnames; their surnames should be written in capital letters and author(s) title should not be mentioned. **ORCID** numbers should be written.

Summary should be in Turkish and English, single paragraph and composed of at most about 500 words.

Key words must be selected from Medical Subject Headings, should be written in alphabetical order and should not exceed 5 words.

Introduction not exceeding two pages should include a short review of the literature related with the subject and in the end paragraph; the aim of the study should be mentioned.

Material and Method should be written in an essential and comprehensible manner without getting into details. Subtopics should be mentioned first in bold and after in italic type.

Findings should be shortly explained and data should not be repeated within the text. Legends should be indicated at the top of each table, whereas should be indicated at the bottom of each figure and print. Vertical lines are not allowed in tables.

Discussion and Conclusion must include the evaluation and comparison of results with other researchers' findings. The study's contributions to the existing literature should also be explained briefly.

Acknowledgements must be indicated before references if necessary.

References should be listed alphabetically and chronologically by numbers. In the body of text, reference must be shown by author's surname and list number or only by list number within **square parenthesis**. If there is more than one reference that refers to the same issue, these should be arranged by smallest to biggest reference list

numbers at the end of sentence. If the reference is more than two authors, the surname of the first author should be written and other authors should be mentioned with the abbreviation of "et al.". For the abbreviation of journals, the latest edition of the "Periodical Title Abbreviations: By Abbreviation" should be taken as basis. If the author(s) have more than one publication within the same year, besides the publication date, it should be mentioned as "a" and "b" in the list of references.

The writing of the references and their alignment should be as in the following examples.

For articles:

Dubey JP, Lindsay DS, Anderson ML, Davis SW, Shen SK, (1992). *Induced transplacental transmission of N. caninum in cattle*. J Am Vet Med Ass. 201, 709-713.

For books:

Fleiss JL, (1981). *Statistical methods for rates and proportions*. Second edition. New York: John Willey and Sons, p.103.

For edited books:

Balows A, Hausler WJ, Herrmann KL, eds., (1990). *Manual of Clinical Microbiology*. Fifth edition. Washington DC: IRL Press, p.37.

For chapter in edited books:

Bahk J, Marth EH, (1990). *Listeriosis and Listeria monocytogenes*. Cliver DD. eds. Foodborne Disease. Academic press Inc, San Diego. p.248-256.

For congress papers:

Çetindağ M, (1994). *Pronoprymna ventricosa, a new digenic trematode from the Alosa fallax in Turkey*. Eighth International Congress of Parasitology (ICOPA VIII), October, 10-14, Izmir-Turkey.

For dissertations:

Aksoy E, (1997). *Sığır Vebası hastalığının histolojik ve İmmunoperoksidaz yöntemiyle tanısı üzerine çalışmalar*. PhD Thesis, Ankara University Institute of Health Sciences, Ankara.

Corresponding address, in multiple-author studies, as a correspondence address, only one of the authors' name/surname, address and e-mail should be mentioned at the end.

7. Genus and species names in Latin should be written in italic. All measures should be given according to the SI (Système Internationale) units.

8. The articles that are sent to be published in the journal should be sent with a covering letter and "Publication Rights Transfer Agreement" signed by all of the authors. The selected articles for the publication, and if asked for, the decision of the editorial committee concerning the publication, are declared to the article's author/authors.

9. The wording of "Ethical Commission Permission is obtained" should appear in scientific studies based on animal experiments, which will be published in the Journal of Etlik Veterinary Microbiology.

10. As the edition of the sent articles are done in accordance with the original text, all responsibility of the articles bear on the authors.

11. Researches that aim at comparisons of the products with their commercial names are out of the journal's theme scope.

12. The trademarks of materials and products that are subject of the research should not be mentioned.

13. If the research is supported by a foundation, name of the foundation and project number must be mentioned.

14. The articles that are sent to the journal are published in line with their coming date.

15. Unpublished papers are not returned to their author.

Yayın Hakkı Devri Sözleşmesi
Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi - Ankara

Aşağıda başlığı bulunan ve yazarları belirtilen makalenin tüm sorumluluğu Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi Yayın Komisyonu Başkanlığı'na ulaşıncaya kadar yazar/larına aittir.

Yayının adı:

Yazar/ların ad/ları:

Aşağıda isim ve imzaları bulunan yazarlar; yayınlamak üzere gönderdikleri makalenin orijinal olduğunu, daha önce başka bir dergiye yayınlanmak üzere gönderilmediğini ve kısmen ya da tamamen yayınlanmadığını, gerekli düzeltmelerle birlikte her türlü yayın hakkının, yazının yayımlanmasından sonra Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi'ne devrettiklerini kabul ederler. Yayımlanmak üzere gönderilen bu makalenin tüm sorumluluğunu da yazar/lar üstlenmektedir.

Yukarıdaki makalenin tüm hakları Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi'ne devredilmiştir.

Yazar ad/ları İmza Tarih

Yazışma Adresi:

Copyright Release

Journal of Etlik Veterinary Microbiology Ankara - TURKEY

The undersigned authors release Journal of Etlik Veterinary Microbiology from all responsibility concerning the manuscript entitled;

Title of paper:

Authors names:

Upon its submission to the publishing commission of the Journal of Etlik Veterinary Microbiology.

The undersigned author/s warrant that the article is original, is not under consideration by another journal, has not been previously published or that if has been published in whole or in part, any permission necessary to publish it in the above mentioned journal has been obtained and provided to the Journal of Etlik Veterinary Microbiology. We sign for and accept responsibility for releasing this material.

Copyright to the above article is hereby transferred to the Journal of Etlik Veterinary Microbiology, effective upon acceptance for publication.

To be signed by all author/s

Authors names Signature Date

Correspondence Address:

Dual Infection of Sheep Aborted Foetus with Peste des Petits Ruminants Virus and *Brucella melitensis*

Murat Şevik¹, Yasin Gülcü², Müge Doğan¹

¹ Department of Molecular Microbiology, Veterinary Control Institute, Konya, Turkey

² Department of Bacteriology, Veterinary Control Institute, Konya, Turkey

Geliş Tarihi / Received: 18.09.2017, Kabul Tarihi / Accepted: 01.11.2017

Abstract: In this study, we investigated the potential roles of *Brucella melitensis* and peste des petits ruminants virus (PPR) virus (PPRV) infections in a case of sheep abortion. Samples were collected from PPR-suspected ewe and its aborted foetus from a sheep flock in the Antalya Province in the Mediterranean region of Turkey in 2016. The presence of *Brucella* spp. directly assessed by bacterial isolation and detection of PPRV was carried by real time RT-PCR. Genetic characterization of the PPRV field isolates was conducted by sequencing the fusion (F) gene of PPRV. *Brucella* strain was isolated from the samples of aborted sheep foetus, and it was identified as *Brucella melitensis* by biochemical characteristics, agglutination with monospecific A and M sera. PPRV RNA was detected in samples of PPR-suspected ewe and its foetus. Phylogenetic analysis showed that the field isolate of PPRV obtained in this study was clustered within lineage IV. To the best of our knowledge, this is the first report on the dual infection of aborted sheep foetus with PPRV and *Brucella melitensis*.

Key words: Sheep foetus, Peste des petits ruminants virus, Genetic characterization, F gene, *Brucella melitensis*

Abort Olmuş Koyun Fötusunun Peste des Petits Ruminants Virus ve *Brucella melitensis* ile İkili Enfeksiyonu

Özet: Bu çalışmada bir koyun abort vakasında, koyun ve keçi vebası virusu (PPRV) ile *Brucella melitensis*'in potansiyel rolleri araştırılmıştır. Çalışmada kullanılan örnekler, 2016 yılında Türkiye'nin Akdeniz Bölgesinde yer alan Antalya İlindeki bir koyun işletmesindeki PPR şüpheli bir koyun ve bu koyunun fötusundan elde edilmiştir. *Brucella* spp. varlığı bakteriyel izolasyon, PPRV ise real time RT-PCR yöntemi ile araştırılmıştır. PPRV'unun genetik karakterizasyonu, PPRV'unun füzyon (F) geninin sekans analizi ile gerçekleştirilmiştir. Abort koyun fötusundan izole edilen *Brucella* suşu biyokimyasal karakteri ve monospesifik A ve M serumları ile aglütinasyonuna bağlı olarak *Brucella melitensis* olarak tanımlanmıştır. PPR şüpheli koyun ve fötusunda PPRV tespit edilmiştir. Filogenetik analiz sonucu, bu çalışmada izole edilen PPRV saha suşunun lineage IV'de yer aldığı belirlenmiştir. Bizim bildiğimiz kadarıyla, bu çalışma koyun fötusunun PPRV ve *Brucella melitensis* ile ikili enfeksiyonu hakkındaki ilk rapordur.

Anahtar Kelimeler: Koyun fötus, Koyun ve keçi vebası virusu, Genetik karakterizasyon, F gen, *Brucella melitensis*

Introduction

Peste des petits ruminants (PPR) is a highly contagious disease of small ruminants, which is characterised by high fever, pneumonia and enteritis. The causative agent, peste des petits ruminants virus (PPRV) belongs to the *Morbillivirus* genus of the *Paramyxoviridae* family [6]. Transmission of PPRV mainly occurs during close contact [3]. However, vertical transmission of PPRV has been reported [9,16].

B. melitensis, the main etiological agent of brucellosis in small ruminants, is the most important and pathogenic *Brucella* spp. with a worldwide distribution [14]. *B. melitensis* is usually transmitted both vertically and horizontally. It can cause

abortions and stillbirths [11]. Furthermore, border disease virus (BDV) can be one of the causes of abortion in small ruminants [12]. The current study was conducted to investigate the potential roles of *B. melitensis*, PPRV and BDV in a case of sheep abortion.

Material and Methods

Collection of samples

An aborted sheep foetus was submitted to the Konya Veterinary Control Institute from a sheep flock in the Antalya Province in the Mediterranean region of Turkey in 2016. According to farmer' report, fever, ocular and nasal discharge and nodular lesions around the mouth were observed in the ewe before

abortion, and abortions occurred at 2 months of gestation. The rate of abortion in this flock was 25% (20/80). Foetal stomach contents and liver of the aborted foetus were collected. Furthermore, nodular lesions of ewe that had aborted and internal organ specimens (spleen, lung and liver) of aborted foetus were collected for PPRV detection.

Bacteriological examinations

Samples from stomach contents and liver of the aborted foetus were inoculated onto Farrell's medium (5-10% v/v sterile inactivated horse serum) (Oxoid, SR0035) supplemented with *Brucella* selective supplement (Oxoid, SR083A). After incubation of the plate at 37°C and 5% CO₂ conditions for 7 days, the observed colonies were investigated and identified as *Brucella* spp. by morphological, cultural and characteristics. The strain was biotyped by agglutination with monospecific A and M antisera [11].

Samples were also inoculated onto Campylobacter agar base with selective supplement (Oxoid, SR069E) and 7% defibrinated sheep blood and MacConkey agar for isolation of other bacterial agents.

RNA extraction and real-time RT-PCR

Viral RNA extraction was carried out from the nodular lesions of ewe that had aborted and organ specimens of aborted foetus using a QIAamp Cadore Pathogen Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) in a QIAcube (Qiagen, Hilden, Germany). Real-time RT-PCR was performed using PPRV nucleocapsid protein (N) gene specific primers and probe designed by Batten et al. [1].

Furthermore, aborted foetus samples were also tested by real-time RT-PCR for detection of BDV. The protocol described by La Rocca and Sandvik [10] was used for detection of BDV RNA.

RT-PCR and sequencing of PCR products

One-step RT-PCR was performed with primers that amplified 448 bp of the fusion (F) protein gene of PPRV [5]. PCR products were purified from gels and sequenced. Sequence analysis was performed by using ChromasPro software (Version 1.7.5, Technolysium Ltd.). Phylogenetic tree was con-

structed for the F gene of PPRV with additional sequences from GenBank.

Results

Bacteriological isolation

Brucella was isolated from stomach contents and liver of the aborted foetus. *Brucella* strain was identified as *B. melitensis* by biochemical characteristics and agglutination with monospecific A and M antisera. Other bacterial agents were not detected in the investigated foetus.

Detection of PPRV

PPRV RNA was detected in spleen, lung and liver samples from foetus and nodular lesions of ewe that had aborted. However, BDV RNA was not detected in the investigated foetus samples.

Sequence analyses

Analysis of the PPRV F gene sequences revealed the homology between the two isolates in the present study was 100%, whereas the similarity among the field isolate in this study and previously characterized Turkish isolates ranged from 87.6% to 100%. The deduced amino acid homology among the field isolate and previously characterised PPRV isolates ranged between 96% and 100%.

Discussion

B. melitensis is the main aetiological agent of sheep and goat brucellosis in Turkey. Previous investigations of abortion cases in sheep in different regions of Turkey have shown that *B. melitensis* is responsible for about 20-31% of sheep abortions [2,8]. Stomach contents, spleen, liver, lung and foetal membranes are useful for diagnosis of *B. melitensis* in aborted foetuses [11]. In this study, *Brucella* was isolated from stomach contents and liver of the aborted foetus, and identified as *B. melitensis*. However, İlhan et al. [8] reported that using stomach contents for diagnosis is better than using other foetal materials. The rate of abortion in *B. melitensis* positive flock was 25% (20/80). This rate is consistent with the findings of previous studies in which it has been reported that rate of abortion in *B. melitensis* positive flocks ranged between 6% and 45% [4,7].

PPRV can cause abortion in pregnant animals [16]. In this study PPRV RNA was detected in spleen, lung and liver samples from foetus. This finding in agreement with previous report that suggest lung, liver, spleen and mesenteric lymph node samples can equally be used for PPR virus detection [15]. To the best of our knowledge, this is the first report on the dual infection of aborted sheep

foetus with PPRV and *B. melitensis*. The phylogenetic tree based on F gene sequences revealed that field isolate obtained from investigated foetus clustered within lineage IV (Figure 1). The circulation of PPRV lineage IV in Turkey was also reported in previous studies [13,16]. Results show that lineage IV is in circulation in Turkey since the disease was first reported.

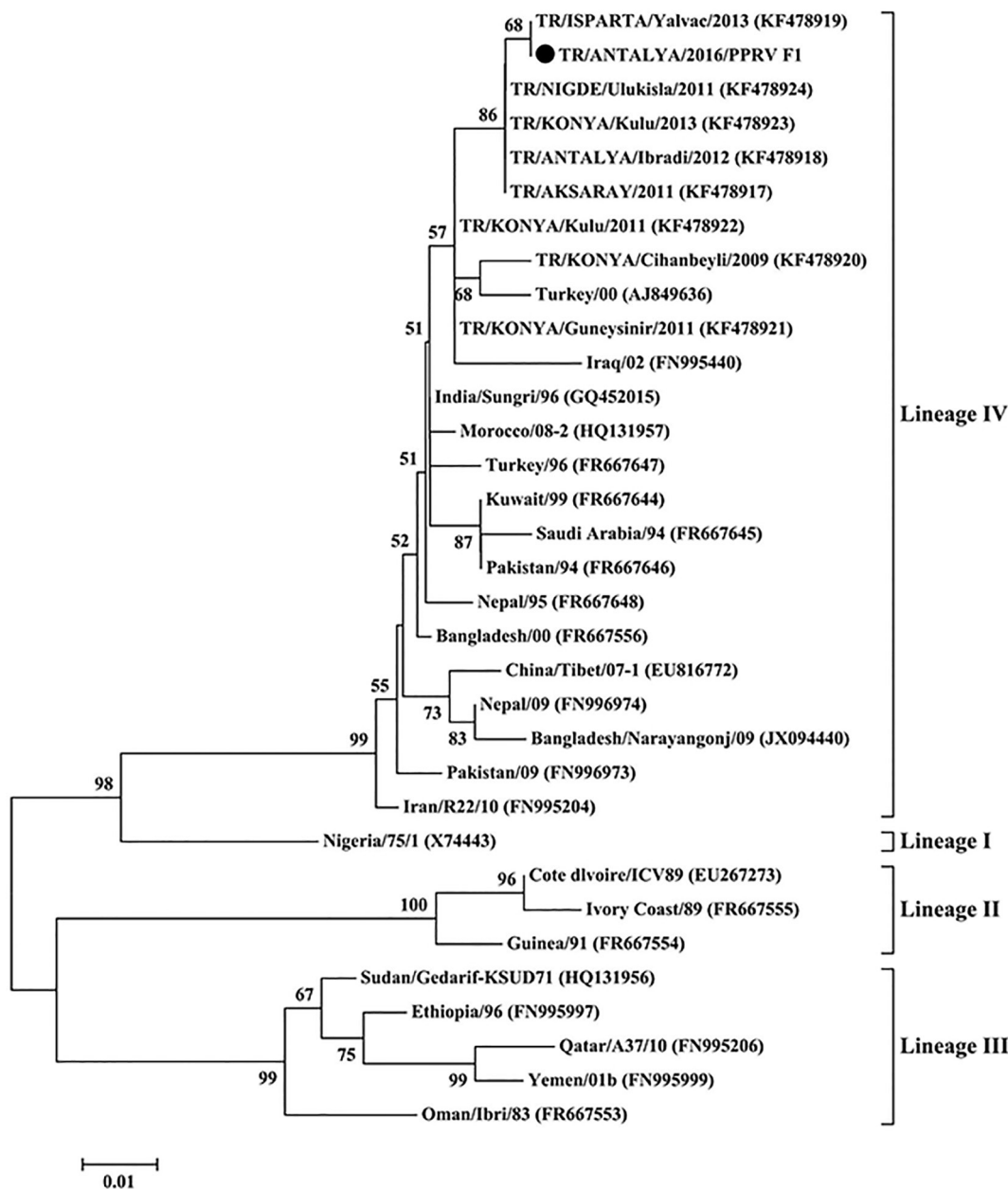


Figure 1. Phylogenetic tree constructed based on nucleotide sequences of the F gene (322 bp) showing the genetic relationships between PPRVs of Turkey and other virus isolates. The sequence obtained in this study is marked with round black spot (●).

The results of this study indicate that dual infection with PPRV and *B. melitensis* can occur in abortion cases. Therefore, PPRV should be taken into consideration in abortion cases in endemic areas.

References

- Batten CA, Banyard AC, King DP, Henstock MR, Edwards L, Sanders A, Buczkowski H, Oura CC, Barrett T, (2011). *A real time RT-PCR assay for the specific detection of Peste des petits ruminants virus*. J Virol Methods. 171, 401-404.
- Büyükçangaz E, Şen A, Kahya S, (2009). *Isolation and biotyping of Brucella melitensis from aborted sheep and goat fetuses*. Turk. J Vet Anim Sci. 33, 311-316.
- Couacy-Hymann E, Bodjo SC, Koffi MY, Kouakou C, Danho T, (2009). *The early detection of peste-des-petits-ruminants (PPR) virus antigens and nu-cleic acid from experimentally infected goats using RT-PCR and immunocapture ELISA techniques*. Res Vet Sci. 87, 332-335.
- European Commission, Health & Consumers Directorate-General (2012). *Eradication programme for Sheep and Goat Brucellosis (B. Melitensis)*. Erişim adresi: https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/cff_animal_vet-progs_2012_dec-2011-807-ec_ov-cap-brucellosis_grc.pdf, Erişim tarihi: 08.08.2017
- Forsyth MA, Barrett T, (1995). *Evaluation of polymerase chain reaction for the detection and characterisation of rinderpest and peste des petits ruminants viruses for epidemiological studies*. Virus Res. 39, 151-163.
- Gibbs PJE, Taylor WP, Lawman MP, Bryant J, (1979). *Classification of the peste des petits ruminants virus as the fourth member of the genus Morbillivirus*. Intervirology 11, 268-274.
- Hawari AD, (2012). *Epidemiological Studies, Seroprevalance and Some Risk Factors of Brucellosis in Sheep and Goats in the South Province of West Bank*. Asian J Anim Vet Adv. 7, 535-539.
- Ilhan Z, Solmaz H, Aksakal A, Gülhan T, Ekin IH, Boynukara B, (2007). *Comparison of PCR assay and bacteriological culture method for the detection of Brucella melitensis in stomach content samples of aborted sheep fetuses*. Dtsch Tierarztl Wochenschr. 114, 460-464.
- Kul O, Kabakci N, Ozkul A, Kalender H, Atmaca HT, (2008). *Concurrent peste des petits ruminants virus and pestivirus infection in stillborn twin lambs*. Vet Pathol. 45, 191-196.
- La Rocca SA, Sandvik T, (2009). *A short target real-time RT-PCR assay for detection of pestiviruses infecting cattle*. J Virol Methods. 161, 122-127.
- Office International des Epizooties (OIE) (2016). *Brucellosis (Brucella abortus, B. melitensis and B. suis)*. Erişim adresi: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.04_BRUCELLOSIS.pdf, Erişim tarihi: 24.10.2017
- Office International des Epizooties (OIE) (2017). *Border Disease*. Erişim adresi: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.07.01_BORDER_DIS.pdf, Erişim tarihi: 24.10.2017
- Ozkul A, Akca Y, Alkan F, Barrett T, Karaoglu T, Dagalp SB, Anderson J, Yesilbag K, Cokcaliskan C, Gencay A, Burgu I, (2002). *Prevalence, distribution, and host range of peste des petits ruminants virus, Turkey*. Emerg Infect Dis. 8, 708-712.
- Pappas G, Akritidis N, Bosilkovski M, Tsianos E, (2005). *Medical progress Brucellosis*. N Engl J Med. 352, 2325-2367.
- Şevik M, (2014). *Molecular Detection of Peste des Petits Ruminants Virus from Different Organs/Tissues of Naturally Infected Animals*. Kafkas Univ Vet Fak Derg. 20, 165-168.
- Şevik M, Sait A, (2015). *Genetic characterization of peste des petits ruminants virus, Turkey, 2009-2013*. Res Vet Sci. 101, 187-195.

Co-infection with Border Disease Virus and *Brucella melitensis* in an Aborted Sheep Foetus

Murat Şevik¹, Yasin Gülcü², Müge Doğan¹

¹ Department of Molecular Microbiology, Veterinary Control Institute, Konya, Turkey

² Department of Bacteriology, Veterinary Control Institute, Konya, Turkey

Geliş Tarihi / Received: 18.09.2017, Kabul Tarihi / Accepted: 10.11.2017

Abstract: In this study, we investigated the potential roles of border disease virus (BDV) and *Brucella melitensis* infections in a case of sheep abortion. Internal organ specimens from aborted sheep foetus and EDTA whole blood sample from mother of the foetus were collected from a sheep flock in the Konya Province in the Central Anatolia region of Turkey in 2017. The presence of *Brucella* spp. directly assessed by bacterial isolation and detection of BDV was carried by real time RT-PCR. Genetic characterization of the BDV field isolate was conducted by sequencing the 5'-end untranslated region (UTR) region of BDV. *Brucella* strain was isolated from the samples of aborted sheep foetus, and it was identified as *Brucella melitensis* by biochemical characteristics, agglutination with monospecific A and M sera. BDV RNA was detected in EDTA whole blood sample and aborted sheep foetus. Phylogenetic analysis in 5'-UTR region allocated the field isolate of BDV obtained in this study into BDV-7 genotype. To the best of our knowledge, this is the first report on the dual infection of aborted sheep foetus with BDV and *Brucella melitensis*.

Key words: Abortion, Border disease virus, Genetic characterization, *Brucella melitensis*, Sheep

Bir Koyun Abort Fötusunun Border Disease Virusu ve *Brucella melitensis* ile Koenfeksiyonu

Özet: Bu çalışmada, bir koyun abort vakasında border disease virusu (BDV) ve *Brucella melitensis* enfeksiyonlarının potansiyel rolleri araştırılmıştır. İki bin on yedi yılında Türkiye'nin İç Anadolu Bölgesinde yer alan Konya İlindeki bir koyun işletmesinden, bir abort koyun fötüsüne ait iç organ örnekleri ve fötüsün annesinden EDTA'lı tam kan örneği elde edilmiştir. *Brucella* spp. varlığı bakteriyel izolasyon, BDV ise real time RT-PCR yöntemi ile araştırılmıştır. BDV'un genetik karakterizasyonu, 5'- translate olmayan bölge sonunun (UTR) sekans analizi ile gerçekleştirilmiştir. Abort koyun fötüsünden izole edilen *Brucella* suşu biyokimyasal karakteri ve monospesifik A ve M serumları ile aglütinasyonuna bağlı olarak *Brucella melitensis* olarak tanımlanmıştır. Koyun abort fötüsünde ve EDTA'lı kan örneğinde BDV tespit edilmiştir. Filogenetik analiz sonucu, bu çalışmada izole edilen BDV saha suşunun BDV-7 genotipinde olduğu belirlenmiştir. Bizim bildiğimiz kadarıyla, bu çalışma koyun fötüsünün BDV ve *Brucella melitensis* ile birlikte enfeksiyonu hakkındaki ilk rapordur.

Anahtar Kelimeler: Yavru atma, Border disease virus, Genetik karakterizasyon, *Brucella melitensis*, Koyun

Introduction

Border disease (BD) is a reproductive disease of sheep, and occasionally seen in goats. The clinical manifestations of the disease are infertility, abortion, mummified fetuses, stillbirths, and the birth of 'hairy-shaker' lambs and persistent infections of the offspring [9]. The causative agent of disease, border disease virus (BDV), classified in the genus *Pestivirus* of the *Flaviviridae* family, and is closely related to bovine viral diarrhoea viruses (BVDV 1, 2) and classical swine fever virus (CSFV) [6]. BDV can also infect cattle, chamois and pigs [1,8]. Transmission of BDV mainly occurs by horizontal

and vertical routes, and weak lambs can be persistently infected (PI) [2].

Ovine brucellosis is another economically important disease of small ruminants that causes reproductive problems such as infertility and abortions. *B. melitensis* is the main etiological agent of brucellosis in small ruminants. The main clinical signs of *B. melitensis* infection in small ruminants are abortion and stillbirths, which usually occur during the last two months of gestation following infection [3]. The current study was conducted to investigate occurrence of BDV and *B. melitensis* in the case of small ruminant abortion.

Material and Methods

Collection of samples

An aborted sheep foetus was submitted to the Konya Veterinary Control Institute from a sheep flock in the Konya Province in the Central Anatolia region of Turkey in 2017. According to farmer' report, flock had a history of barren ewes, birth of small weak lambs with hairy fleeces, and abortions occurred at 2 to 3 months of gestation. The rate of abortion in this flock was 15% (24/160). Foetal stomach contents and liver of the aborted foetus were collected. Furthermore, whole blood sample from mother of the foetus and internal organ specimens of aborted foetus were collected for BDV detection.

Bacteriological examinations

Samples from stomach contents and liver of the aborted foetus were inoculated onto Farrell's medium (5-10% v/v sterile inactivated horse serum) (Oxoid, SR0035) supplemented with *Brucella* selective supplement (Oxoid, SR083A). After incubation of the plate at 37°C and 5% CO₂ conditions for 7 days, the observed colonies were investigated and identified as *Brucella* spp. by morphological, cultural and characteristics. The strain was biotyped by agglutination with monospecific A and M antisera. Samples were also inoculated onto Campylobacter agar base with selective supplement (Oxoid, SR069E) and 7% defibrinated sheep blood and MacConkey agar for isolation of other bacterial agents.

RNA extraction and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

Viral RNA extracted from the buffy coat cells from whole blood sample and organ specimens of aborted foetus using a QIAamp Cador Pathogen Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). A quantitative real-time RT-PCR described by La Rocca and Sandvik [7] was used to detect BDV RNA. Amplification of part of the 5'- end untranslated region (UTR) was carried out for samples in one step RT-PCR using primers 324 and 326 [11].

Sequence and phylogenetic analysis

PCR products were purified from gels with a High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Diagnostics, Indianapolis, USA), and sequenced on

an ABI 3130xl DNA Analyser (Applied Biosystems, USA). Phylogenetic tree was constructed with the programme MEGA software version 6, based on the evolutionary distances between different sequences calculated by Kimura two-parameter model. The confidence of the neighbour-joining tree was assessed by bootstrapping, using 1000 replicates, and only values above 50% are reported.

Results

Bacteriological isolation

In this study, *Brucella* was isolated from aborted sheep foetus. *Brucella* strain was identified as *B. melitensis* by biochemical characteristics and agglutination with monospecific A and M antisera. Other bacterial agents were not detected in the investigated foetus.

Detection of BDV

BDV RNA was detected in the investigated foetus and EDTA whole blood sample from mother of the foetus

Sequence analyses

A 100% level of identity was observed between the deduced amino acid sequences of the two isolates, from foetus and its mother, in the present study, whereas the similarity with sequences from different regions ranged from 67.8% to 96%, lowest with United States isolate (890) highest with Turkish isolate (Aydin-04).

Discussion

In this study, *Brucella* was isolated from aborted sheep foetus, and identified as *B. melitensis*. The rate of abortion in *B. melitensis* positive flock was 15% (24/160). This rate is consistent with the findings of previous studies in which it has been reported that rate of abortion in *B. melitensis* positive flocks ranged between 6% and 45% [4,5].

Border disease virus can cause abortion in pregnant small ruminants [9]. In this study BDV RNA was detected in the investigated foetus. To the best of our knowledge, this is the first report on the dual infection of aborted sheep foetus with BDV and *B. melitensis*. It has been reported that foetal death may occur at any stage of gestation, but is

more common during the first 2 months of gestation [12]. In this study abortion occurred at 2 to 3 months of gestation. This situation can be explained by the period of infection, immune status of the host and the virulence of virus.

Phylogenetic analysis has been used to determine the subgenotypes of field isolates from different areas of the world. The most frequent genetic

classification is based on a comparison of nucleotide sequences from the 5'UTR [1,10]. The phylogenetic analysis of 5'UTR sequences typed the field isolate in this study as BDV and clustered within the BDV-7 isolates together previously characterized Turkish isolates (Figure 1). The circulation of BDV-7 genotype in Turkey was also reported in previous study [10]. Results show that BDV-7 genotype is in circulation in Turkey.

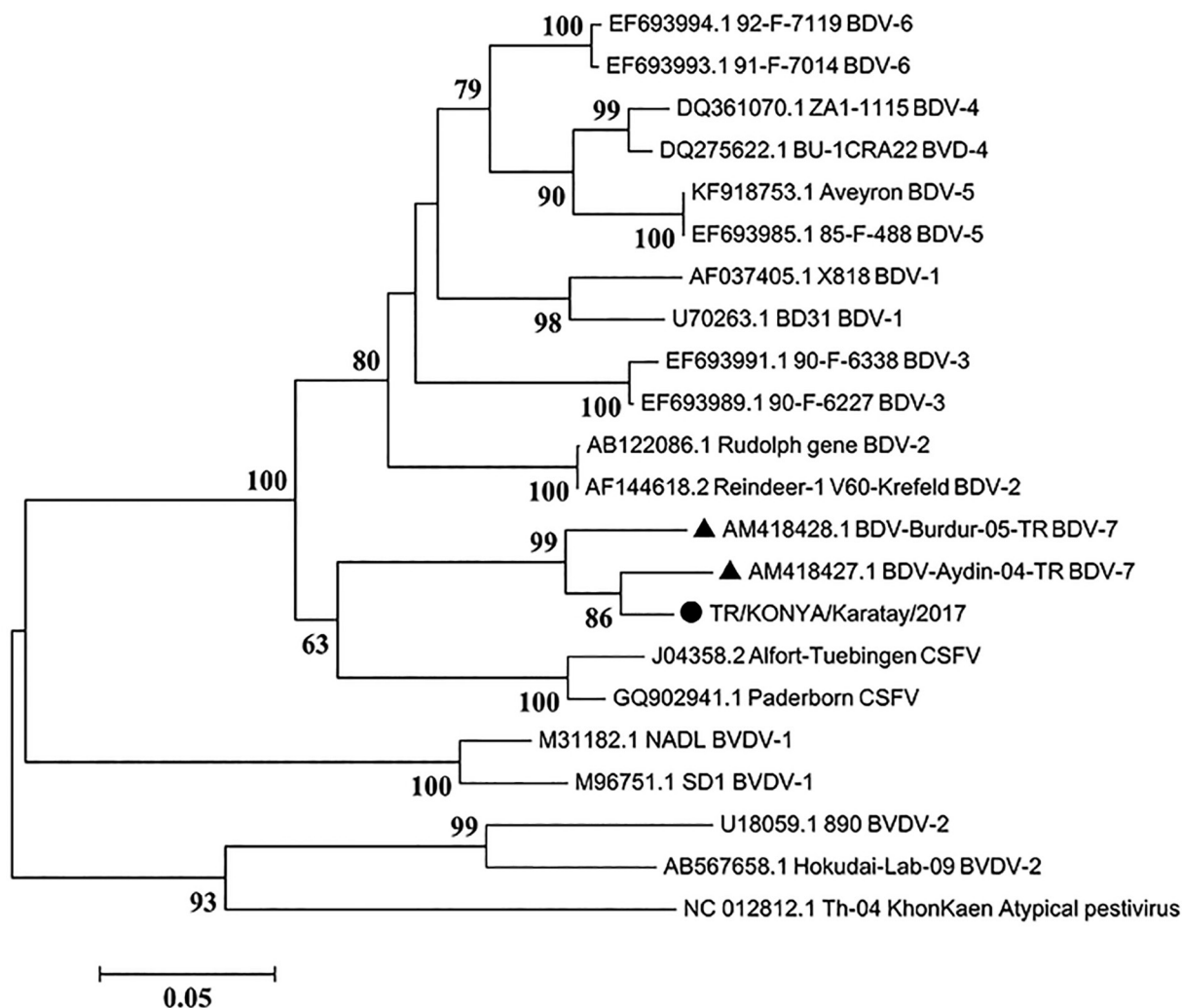


Figure 1. Phylogenetic tree constructed based on nucleotide sequences of the 5'UTR region (246 bp) showing the genetic relationships between BDVs of Turkey and other virus isolates. The sequence obtained in this study is marked with round black spot (●) and previous Turkish isolates are marked with black triangle (▲).

The results of this study indicate that dual infection with BDV and *B. melitensis* can occur in small ruminant abortion cases. BDV and *B. melitensis* infections cause important economic losses

due to reproductive failure in affected animals. Therefore, abortion cases should be examined for these two diseases.

References

1. Becher P, Orlich M, Shannon AD, Horner G, König M, Thiel HJ, (1997). *Phylogenetic analysis of pestiviruses from domestic and wild ruminants*. J Gen Virol. 78, 1357-1366.
2. Cabezón O, Rosell R, Velarde R, Mentaberre G, Casas-Díaz E, Lavín S, Marco I, (2010). *Border disease virus shedding and detection in naturally infected Pyrenean chamois (Rupicapra pyrenaica)*. J Vet Diagn Invest. 22, 744-747.
3. Díaz Aparicio E, (2013). *Epidemiology of brucellosis in domestic animals caused by Brucella melitensis, Brucella suis and Brucella abortus*. Rev Sci Tech. 32, 43-51, 53-60.
4. European Commission, Health & Consumers Directorate-General (2012). *Eradication programme for Sheep and Goat Brucellosis (B. Melitensis)*. Erişim adresi: https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/cff_animal_vet-progs_2012_dec-2011-807-ec_ov-cap-brucellosis_grc.pdf, Erişim tarihi: 08.08.2017
5. Hawari AD, (2012). *Epidemiological Studies, Seroprevalance and Some Risk Factors of Brucellosis in Sheep and Goats in the South Province of West Bank*. Asian J Anim Vet Adv. 7, 535-539.
6. Heinz FX, Collett MS, Purcell RH, Gould EA, Howard CR, Houghton M, Moonmann RJM, Rice CM, Tiehl HJ, (2000). *Family Flaviviridae, Virus Taxonomy*. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Academic Pres, p. 859-878.
7. La Rocca SA, Sandvik T, (2009). *A short target real-time RT-PCR assay for detection of pestiviruses infecting cattle*. J Virol Methods. 161, 122-127.
8. Marco I, Lopez-Olvera JR, Rosell R, Vidal E, Hurtado A, Juste R, Pumarola M, Lavín S, (2007). *Severe outbreak of disease in the southern chamois (Rupicapra pyrenaica) associated with border disease virus infection*. Vet Microbiol. 120, 33-41.
9. Nettleton PF, Gilray JA, Russo P, Dlissi E, (1998). *Border disease of sheep and goats*. Vet Res. 29, 327-340.
10. Oguzoglu TC, Tan MT, Toplu N, Demir AB, Bilge-Dagalp S, Karaoglu T, Ozkul A, Alkan F, Burgu I, Haas L, Greiser-Wilke I, (2009). *Border disease virus (BDV) infections of small ruminants in Turkey: a new BDV subgroup?* Vet Microbiol. 135, 374-379.
11. Vilcek S, Herring AJ, Herring JA, Nettleton PF, Lowings JP, Paton DJ, (1994). *Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis*. Arch Virol. 136, 309-323.
12. Office International des Epizooties (OIE), (2017). *Border Disease*. In *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. OIE, Paris, 1-13. Available at: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.07.01_BORDER_DIS.pdf (accessed on 25 August 2017).

Detection of a Mixed Infection of Lumpy Skin Disease Virus and Foot and Mouth Disease Virus in a Calf

Murat Şevik¹

¹ Department of Molecular Microbiology, Veterinary Control Institute, Konya, Turkey

Geliş Tarihi / Received: 18.09.2017, Kabul Tarihi / Accepted: 08.11.2017

Abstract: In this study, I investigated the possibility of dual infection with lumpy skin disease virus (LSDV) and foot and mouth disease virus (FMDV) in a 6-month-old Holstein calf which had fever, limping, nasal secretions, and lesions on the skin and vesicles on mucous membranes of the mouth. To assess presence of LSDV DNA in skin lesions, swab samples from skin were collected, and were analysed by real time PCR. Epithelium samples were collected from vesicular lesions, and were tested by the Sap Institute, Ankara for FMDV infection. Genetic characterization of the LSDV field isolate was conducted by sequencing the G-protein-coupled chemokine receptor gene segment. LSDV DNA was detected in swab samples and calf was diagnosed with FMD, serotype A. Phylogenetic analysis showed that the field isolate in this study was clustered together with other Africa, Europe and Middle East isolates. To the best of my knowledge, this is the first report on the dual infection of a calf with LSDV and FMDV.

Key words: Lumpy skin disease virus, Foot and mouth disease virus, Dual infection, calf

Bir Buzağda Lumpy Skin Disease Virusu ve Şap Haslığı Virusunun Miks Enfeksiyonunun Tespiti

Özet: Bu çalışmada ateş, burun salgıları, topallık, deride lezyonlar ve ağız mukoz membranlarında veziküller olan 6 aylık bir Holştayn buzağında lumpy skin disease virus (LSDV) ve şap haslığı virusu (FMDV)'nin dual enfeksiyon olasılığı araştırılmıştır. Deri lezyonlarında LSDV varlığını araştırmak için svap örnekleri toplanmış ve real time PCR yöntemi ile analiz edilmiştir. Veziküller lezyonlardan epitelyum örnekleri toplanmış ve Şap Enstitüsü (Ankara) tarafından şap hastalığı yönünden test edilmiştir. LSDV'unun genetik karakterizasyonu, G-proteine bağlı kemokin reseptörü gen segmentinin sekans analizi ile gerçekleştirilmiştir. LSDV DNA'sı svap örneklerinde tespit edilmiş olup, buzağıya şap hastalığı (serotip A) tanısı konmuştur. Filogenetik analiz sonucu, bu çalışmada izole edilen LSDV saha suşunun, Afrika, Avrupa ve Orta Doğu izolatları ile birlikte gruplandığı görülmüştür. Bildiğim kadarıyla, bu çalışma bir buzağının LSDV ve FMDV'leri ile dual enfeksiyonu hakkındaki ilk rapordur.

Anahtar Kelimeler: Lumpy skin disease virusu, Şap hastalığı virusu, Dual enfeksiyon, Buzağı

Introduction

Lumpy skin disease (LSD) is an emerging viral disease of cattle, which is characterised by fever, enlarged lymph nodes, and nodules on the skin, mucous membrane and internal organs [5,10]. LSD is caused by a double stranded DNA virus, classified in the genus *Capripoxvirus* of the family *Poxviridae*, and is antigenically closely related to sheep and goat poxviruses [10]. The most effective route of LSDV transmission is mechanical via biting flies [4].

Foot and mouth disease (FMD) is highly contagious disease of cloven-hoofed livestock including cattle, swine, sheep and goats, and wild animals [1]. Foot-and-mouth disease virus (FMDV), the

etiological agent, is a single-stranded RNA virus belonging to the genus *Aphthovirus* in the family *Picornaviridae*, and it has seven immunologically distinct serotypes, O, A, C, SAT 1, SAT 2, SAT 3 and Asia 1 with a large number of subtypes [6]. Infection with one serotype does not confer immunity against another [9]. Transmission of FMDV mainly occurs via respiratory aerosols and direct or indirect contact with infected animals and contaminated fomites [2]. Serotypes A, O, and Asia-1 have predominated in Turkey [11]. The current study was conducted to investigate the possibility of dual infection with LSDV and FMDV in a calf which had clinical symptoms of LSD and FMD.

Material and Methods

Collection of samples

A six month old Holstein calf was submitted to the Konya Veterinary Control Institute from a herd in the Antalya Province in the Mediterranean region of Turkey in 2016. The observed clinical signs were fever (40°C), nasal secretions, limping, and lesions on the skin and vesicles on mucous membranes of the mouth. According to farmer' report, calf was not vaccinated against LSD and FMD. Firstly, epithelium samples were collected from vesicular lesions of calf, and were sent to Sap Institute, Ankara for confirmatory diagnosis of FMD and serotype determination. Furthermore, swab samples from skin were collected for LSDV detection.

DNA extraction and real-time PCR

Viral DNA extraction was carried out from the swab samples using a QIAamp Cador Pathogen Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) in a QIAcube (Qiagen, Hilden, Germany). Real-time PCR was performed using P32 protein, encoded by open reading frame (ORF) 074, specific primers and probe designed by Bowden et al. [3].

PCR and sequencing of PCR products

PCR was performed with primers that amplified 1158 bp of the G-protein-coupled chemokine receptor (GPCR) gene of Capripoxviruses [7]. PCR product was purified from gels with a High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Diagnostics, Indianapolis, USA) and sequenced with the BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA) on an ABI 3130xl DNA Analyzer (Applied Biosystems, USA). Sequence analysis was performed by using ChromasPro software (Version 1.7.5, Technolysium Ltd.). Phylogenetic tree was constructed for the GPCR gene of LSDV with additional sequences from GenBank. The confidence of the neighbour-joining tree was assessed by bootstrapping, using 1000 replicates, and only values above 50% are reported.

Results

Confirmatory diagnosis of FMD

Clinical submission of the epithelium samples was identified as FMDV serotype A by Sap Institute.

Detection of LSDV

LSDV DNA was detected in swab samples.

Sequence analyses

Analysis of the GPCR gene sequences revealed that the homology between the field isolate in the present study and LSDV isolates from different regions ranged from 98.8% to 100%. The deduced amino acid homology among the field isolate and previously characterised LSDV isolates ranged between 98.5% and 100%.

Discussion

Lumpy skin disease was first reported in Turkey in 2013, and then the disease becomes endemic in Turkey [8]. LSDV is thought to be transmitted primarily by blood-feeding vectors [4]. Antalya Province is located in the Mediterranean region; this region has a subtropical Mediterranean climate characterised by mild and rainy winters and hot, dry summers that are suitable for the sustenance of blood-feeding insect activity and spread of arboviral infections. Therefore, the Antalya Province has a higher risk of LSDV infection.

In this study, LSDV was detected in a calf. According to farmer' report, infected calf was not vaccinated against LSD, whereas other animals in the herd were vaccinated against LSD and clinical symptoms were not observed in vaccinated animals. In Turkey, vaccination was carried out using the sheep and goat pox vaccine. Vaccination is the most effective way to control further spread of LSDV. Calves from vaccinated mothers should be vaccinated between 3 to 4 months of age [14]. The characteristic clinical signs of LSD are fever, nasal and pharyngeal secretions, loss of appetite, nodules in the skin and enlarged lymph nodes [5,10]. In this study, fever of 40°C, nasal secretions, and lesions on the skin were observed in infected calf. Clinical signs can change depend on age, breed of cattle and immune status at the time of infection [15].

The phylogenetic tree based on the GPCR gene sequences revealed that the field isolates in this study clustered together with other isolates from Africa, Europe and the Middle East (Fig. 1). This result is in agreement with previous report [12].

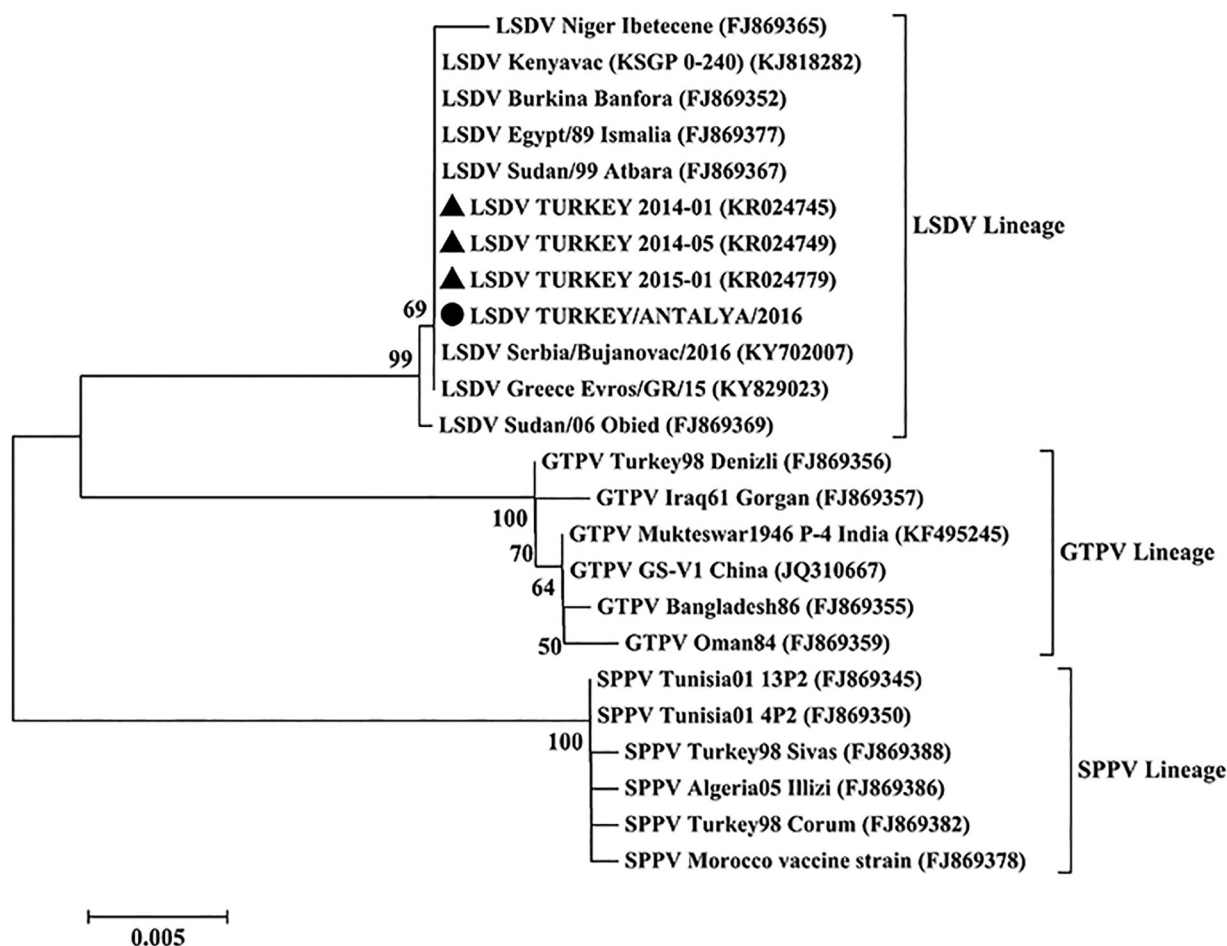


Figure 1. Phylogenetic tree constructed based on nucleotide sequences of the GPCR gene (1074 bp) showing the genetic relationships between LSDV isolate in this study and other virus isolates. The sequence obtained in this study is marked with round black spot (●) and previous Turkish isolates are marked with black triangle (▲).

Foot and mouth disease remains an important disease in Turkey, and its control is mainly based on vaccination. Routine FMD vaccination is performed using quadrivalent vaccine which incorporates serotypes O, A and Asia 1 (O Tur 07, A Tur 16, A NEP 84 and Asia-1 Tur 15 strains). In this study, infected calf had not been vaccinated against FMD, and calf was diagnosed with FMD, serotype A by Sap Institute. According to farmer's report, mother of the infected calf was vaccinated against FMD, and this infected calf received colostrum. Antibodies against FMDV transmitted through maternal colostrum protect calves until 2 months of age [13]. However, in this study infected calf was 6 months of age. Calves from vaccinated mothers should be vaccinated at 2 months of age, whereas calves from unvaccinated mothers should be vaccinated at 2 weeks of age [11].

The results of this study indicate that dual infection with LSDV and FMDV may have occurred. Young animals are more susceptible to these infections than adults, because their immune systems aren't fully functional. Vaccination is the most effective way to control the spread of LSDV and FMDV. Therefore, young animals should be vaccinated against LSDV and FMDV infections.

References

- Alexandersen S, Mowat N, (2005). *Foot-and-mouth disease: host range and pathogenesis*. *Curr Top Microbiol Immunol*. 288, 9-42.
- Bates TW, Thurmond MC, Carpenter TE, (2001). *Direct and indirect contact rates among beef, dairy, goat, sheep, and swine herds in three California counties, with reference to control of potential foot-and-mouth disease transmission*. *Am J Vet Res*. 62, 1121-1129.

3. Bowden TR, Babiuk SL, Parkyn GR, Copps JS, Boyle DB, (2008). *Capripoxvirus tissue tropism and shedding: A quantitative study in experimentally infected sheep and goats*. *Virology*. 371, 380-393.
4. Chihota CM, Rennie LF, Kitching RP, Mellor PS, (2003). *Attempted mechanical transmission of lumpy skin disease virus by biting insects*. *Med Vet Entomol*. 17, 294-300.
5. Davies FG, Krauss H, Lund J, Taylor M, (1971). *The laboratory diagnosis of lumpy skin disease*. *Res Vet Sci*. 12, 123-127.
6. Grubman MJ, Baxt B, (2004). *Foot-and-mouth disease*. *Clin Microbiol Rev*. 17, 465-493.
7. Le Goff C, Lamien CE, Fakhfakh E, Chadeyras A, Aba-Adulugba E, Libeau G, Tuppurainen E, Wallace DB, Adam T, Silber R, Gulyaz V, Madani H, Caufour P, Hammami S, Diallo A, Albina E, (2009). *Capripoxvirus G-protein-coupled chemokine receptor: a host-range gene suitable for virus animal origin discrimination*. *J Gen Virol*. 90, 1967-1977.
8. Office International des Epizooties (OIE), 2013: *OIE disease information*. Available at: http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Reviewreport/Review?reportid=14106 (accessed on 25 August 2017).
9. Office International des Epizooties (OIE), (2017). *Foot and Mouth Disease (Infection with Foot and Mouth Disease Virus)*. In *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. OIE, Paris, 1-32. Available at: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.08_FMD.pdf (accessed on 25 August 2017).
10. Office International des Epizooties (OIE), (2017). *Lumpy skin disease*. In *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. OIE, Paris, 1-13. Available at: www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.14_LSD.pdf (accessed on 25 August 2017).
11. Şap Enstitüsü, (2017). *Türkiye'de Şap Hastalığı*. Available at: <http://vetkontrol.tarim.gov.tr/sap/Menu/34/Turkiyede-Sap-Hastaligi> (accessed on 25 August 2017).
12. Şevik M, Doğan M, (2017). *Epidemiological and Molecular Studies on Lumpy Skin Disease Outbreaks in Turkey during 2014-2015*. *Transbound Emerg Dis*. 64, 1268-1279.
13. Şenel E, Ulutürk S, Boz C, (1989). *Buzağılarda şap aşısı ile aşılama zamanının tespiti*. 1. Uluslararası Şap Sempozyumu, Ankara. pp. 191-194.
14. Tuppurainen E, Galon N, (2016). *Lumpy Skin Disease: Current Situation in Europe and Neighbouring Regions and Necessary Control Measures to Halt the Spread in South-East Europe*. OIE Regional Commission. 1-12.
15. Tuppurainen E, Alexandrov T, Beltrán-Alcrudo D, (2017). *Lumpy skin disease field manual -A manual for veterinarians*. FAO Animal Production and Health Manual. 20, 1-60.

İki Leylek (*Ciconia ciconia*) ve Bir Şahin (*Buteo buteo*)’de *Lucilia sericata*’nın Neden Olduğu Yara Miyazı*

Armağan Erdem Ütük¹, Cem Ecmel Şaki²

¹Çukurova Üniversitesi, Ceyhan Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Adana, Türkiye

²Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Elazığ, Türkiye

Geliş Tarihi / Received: 28.10.2017, Kabul Tarihi / Accepted: 15.11.2017

Özet: Bu çalışmada, Orman ve Su İşleri Bakanlığı, Doğa Koruma ve Milli Parklar Osmaniye Şube Müdürlüğü’ne bağlı Rehabilitasyon Merkezine tedavi amacıyla getirilen yaralı iki Beyaz Leylek (*Ciconia ciconia*) ve bir Şahin (*Buteo buteo*)’de yara miyazı tespit edildi. Lezyonlu bölgeden toplanan canlı larvalar üzerine %70’lik sıcak etanol ilave edildikten sonra %30’luk Potasyum Hidroksit (KOH) ile şeffaflandırıldı. Tür tanısı için gerekli olan kısımları diseke edilerek CM medium ile lam üzerine monte edildi ve incelendi. Çalışma sonucunda larvaların *Lucilia sericata*’ya ait olduğu tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: Beyaz Leylek, *Lucilia sericata*, Miyaz, Şahin.

Wound Myiasis Caused by *Lucilia Sericata* in two White Storks (*Ciconia ciconia*) and in a Common Buzzard (*Buteo buteo*)

Abstract: In this study, traumatic myiasis was detected in two White Storks (*Ciconia ciconia*) and in a Common Buzzard (*Buteo buteo*) brought for treatment to the Rehabilitation Centre affiliated to the Nature Conservation and National Parks Osmaniye Branch Office of the Ministry of Forestry and Water Affairs. 70% hot ethanol was added on to the living larvae that were collected from wounded area and then larvae were cleared with 30% potassium hydroxide (KOH). For species identification, the relevant parts of larvae were dissected, mounted on slides with CM medium and examined. At the end of this study, the collected larvae were identified as *Lucilia sericata*.

Keywords: Common Buzzard, *Lucilia sericata*, Myiasis, White stork.

Giriş

Miyaz, konak hayvanların organ ve dokularının Diptera larvaları tarafından enfestasyonudur. Sinek larvaları direkt olarak konakların ölü ve canlı dokuları ile beslenir. Konaklar genellikle memeliler, ara sıra kuşlar nadiren de amfibi ve sürüngenlerdir. Hastalık larvaların konak hayvan üzerinde ya da içerisinde yerleştiği yere (dermal, subdermal, nazofarengal, oküler, intestinal, ürogenital), göç durumuna (kripping), beslenme özelliklerine (sanguinivoroz), oluşturdukları lezyonların şekline (travmatik, frunküler) ve konak parazit ilişkisine (obligator, fakültatif, aksidental) göre farklı şekillerde isimlendirilir [5,9,10].

Yabani kanatlılarda hastalık genellikle *Calliphoridae*, *Muscidae* ve *Neottiophilidae* ailesinde bulunan hematofaj türler tarafından oluşturulur ve yavrularda erişkinlerden daha yaygın olarak görülür. Ancak *Calliphoridae* ve *Sarcophagidae* ailelerde bulunan bazı türlerin oluşturduğu kutanöz ve subkutanöz vakalara da rastlanır [3,6].

Yabani kanatlılarda yara miyaz etkenleri kanama, anemi, büyük deri altı kistlerine, yaraların etrafında epidermal nekrozlara, bazen de karın, göğüs, nazal ve oküler boşluklara kadar ilerleyip toksemi ve sepsis sonucunda ölümlere neden olur [3,6].

Bu çalışma iki beyaz leylek (*Ciconia ciconia*) ve bir şahin (*Buteo buteo*)’de yara miyazına neden olan larvaların hangi diptera türüne ait olduğunu belirlemek amacıyla yapıldı.

Materyal ve Metod

Çalışmanın materyalini Orman ve Su İşleri Bakanlığı, Doğa Koruma ve Milli Parklar Osmaniye

*: Bu çalışma 18-21 Ekim 2017 tarihleri arasında Alanya’da düzenlenen II. International Academic Research Congress’de sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

Yazışma adresi / Correspondence: Armağan Erdem Ütük, Çukurova Üniv. Ceyhan Veteriner Fakültesi, Parazitoloji AD, Adana E-posta: autuk@cu.edu.tr

Şube Müdürlüğüne bağlı Rehabilitasyon Merkezine tedavi amacıyla getirilen iki beyaz leylek (*Ciconia ciconia*) ve bir şahin (*Buteo buteo*)'nin kanat ve sırtındaki lezyonlu bölgelerden elde edilen diptera larvaları oluşturdu [Figür 1, 2, 3].



Figür 1. Tedavi amacıyla getirilen şahin (*Buteo buteo*)'de lezyonlu bölgenin görünümü



Figür 2. Tedavi amacıyla getirilen 1 no'lu leylek (*Ciconia ciconia*)'te lezyonlu bölgenin görünümü

Çalışma için gerekli izinler Orman ve Su İşleri Bakanlığı, VII. Bölge Müdürlüğü'nden 177733 sayılı yazı ile alındı. Larvalar lezyonlu bölgeden bir pens vasıtası ile uzaklaştırılarak numune kaplarına konuldu. Canlı olarak laboratuvara ulaştırılan larvalar üzerlerine %70'lik sıcak etanol dökülerek tespit ve muhafaza edildi. Her bir yaralı hayvandan elde edilen larvalardan 20 adedi %30'luk sodyum hidroksit (NaOH) içerisinde şeffaflandırıldı. Tür tanısında kullanılacak kısımlar diseke edildikten sonra CM medium ile kalıcı preparat haline getirildi [2,7,8]. İlgili referanslar yardımı ile larvaların tür tanıları yapıldı [10]. Enfekte hayvanlara antiparaziter, antibiyotik ve destekleyici ilaç uygulamaları yapılarak iyileşinceye kadar rehabilitasyon merkezinde hospitalize edildi.



Figür 3. Tedavi amacıyla getirilen 2 no'lu leylek (*Ciconia ciconia*)'te lezyonlu bölgenin görünümü

Bulgular

Çalışma sonucunda lezyonlu bölgeden uzaklaştırılan larvaların *Lucilia sericata*'ya ait olduğu belirlendi (figür 4).



Figür 4. *Lucilia sericata*'nın üçüncü dönem larvasının anterior spiracle, cephalo-pharyngeal skeleton ve posterior spiracle (X10) görünümü

Tartışma ve Sonuç

Miyaz evcil ve yabani memelilerde oldukça yaygın görülen bir hastalıktır. Ülkemizde insanlar ile sığır,

koyun, keçi, kedi ve köpek gibi memelilerde miyaz vakalarına sıklıkla rastlanır [4]. Hastalık kanatlılarda memeliler kadar yaygın değildir [9]. Dünyada yapılan çalışmalarda kartal, doğan, şahin, kerkenez, baykuş, turna, beyaz leylek, kaz, bazı ördek türleri, ağaç kakan, bülbül ve makavlarda miyaz vakaları tespit edilmiştir [1,6]. Ülkemizde ise şahin, baykuş ve kargalarda hastalık bildirilmiştir [4,8].

Dünyaya genelinde yapılan çalışmalarda kanatlılarda tespit edilen miyaz etkenleri *Calliphora vicina*, *Lucilia sericata*, *Wohlfahrtia vigil*, *W.magnifica*, *W.opaca*, *Cuterebra buccata* ve *Dermatobia hominis*'tir [1,3,6]. Ülkemizde ise yabancı kanatlılarda tespit edilen tür *L.sericata*'dır [4,8].

Bu çalışmada iki beyaz leylek (*Ciconia ciconia*) ve bir şahin (*Buteo buteo*)'in kanat ve sırtındaki lezyonlu bölgelerden elde edilen larvaların *L.sericata* olduğu tespit edildi. Dünyada ve ülkemizde kanatlıların miyaz etkenleri ile ilgili fazla literatür bilgisine rastlanılmadığından mevcut vakaların konu ile ilgilenen araştırmacıların bilgisine sunulması uygun görüldü.

Miyaz vakaları sığır, koyun ve keçilerde et, süt, yapağı ve deri kayıplarına, kedi ve köpeklerde tedavi ve hospitalizasyon masraflarına bağlı olarak ciddi ekonomik kayıplara neden olur [4, 5,9]. Özellikle kesimhanelerin atıklarını usulüne uygun olarak imha etmemesi, belediyelerin topladıkları çöpleri açık alanlarda biriktirmesi, hala birçok belediyenin hayvan barınaklarının bulunmaması, olanların ise fiziksel koşullarının ve veteriner hizmetlerinin yetersiz oluşu, halkımızın, pet sahiplerinin, yetiştiricilerin bilinçsizliği ve ekolojik dengelerin bozulması gibi birçok faktör miyaz vakaları ile birlikte birçok enfeksiyöz hastalığa zemin hazırlayarak hayvan sağlığını, halk sağlığını ve yaban hayatını tehdit etmektedir [5,7,9,10].

Bu gibi olumsuzlukları en düşük seviyeye indirmek için toplumun her kesiminden insanın bilinçlendirilmesi, belediyelerin barınak ve kesimhanelerinin fiziksel koşullarını düzeltmesi, bu gibi

ortamlarda yeterli sayıda veteriner hekim ve yardımcı personel istihdam edilmesi gerekmektedir. Ayrıca çok geniş bir coğrafya, farklı iklim bölgeleri ve zengin bir biyoçeşitliliğe sahip olan ülkemizde yaban hayvanlarının paraziter hastalıkları ile ilgili daha fazla çalışma yapılması, bu hastalıkların epidemiyolojisinin daha iyi anlaşılmasına ve daha etkin mücadele yöntemleri geliştirilmesine katkı sağlayacaktır.

Teşekkür

Katkılarından dolayı Veteriner Hekim Bünyamin AKIN'a teşekkür ederiz.

Kaynaklar

1. Araghi MP, Eskandari F, Gilasian E, (2015). *Avian Wound Myiasis Caused by Calliphora vicina Robineau-Desvoidy (Diptera: Calliphoridae) in an Immature Migrating Eastern Imperial Eagle (Aquila Heliaca Savigny) (Aves: Accipitridae) in Southwestern Iran*. J Veterinar Sci Technolo. 6, 1-3.
2. Clark EW, Morishita F, (1950). *C-M Medium: A Mounting Medium Smal Insects, Mites and Other Whole Months*. Science, 112, 789.
3. Cooper JE, Cooper ME, Krone O, Newton I, Peakal DB, Zucca P, (2002). *Birds of Prey: Health and Diseases*. 3rd ed, Blackwell Science.
4. Dik B, Uslu U, Işık N, (2012). *Myiasis in Animals and Humanbeings in Turkey*. Kafkas Univ Vet Fak Derg. 18, 37-42.
5. Dinçer Ş, (1997). *İnsan ve Hayvanlarda Myiasis*. Özcel MA, Daldal N. eds. Parazitolojide Artropod Hastalıkları ve Vektörler. İzmir. Türkiye Parazitolojisi Dern, Yay No: 13, Ege Üniversitesi Basımevi, Türkiye.
6. Little SE, (2008). *Myiasis in Wild Birds*. Atkinson CT, Thomas NJ, Hunter DB .eds. Parasitic Diseases of Wild Birds. 1st ed, Wiley-Blackwell.
7. Ütük AE, (2006). *Bir köpekte travmatik miyazis olgusu*. Fırat Üniv Sağlık Bil Dergisi, 20, 97-99.
8. Ütük AE, Şaki CE, (2016). *Bir Baykuşta Travmatik Miyaz Olgusu*. İMSEC2016, Ekim, 16-28, Adana, Türkiye.
9. Wall R, Shearer D, (2001). *Veterinary Ectoparasites: Biology, Pathology, and Control*. 2nd ed, Blackwell Science, Oxford.
10. Zumpt, F, (1965). *Myiasis in Man and Animals in the Old World*. Butterwoths & Co. ltd., London.

Comparison of Two Different Vaccination Shedule for Fight with Infectious Bursal Disease in Layer Hens

Ahmet Bildir¹, Sibel Gür²

¹ Kartallar Limited Company, Afyonkarahisar, Turkey.

² Faculty of Veterinary Medicine, Department of Virology, Afyon Kocatepe University, Afyonkarahisar, Turkey.

Geliş Tarihi / Received: 29.09.2017, Kabul Tarihi / Accepted: 10.11.2017

Abstract: Infectious Bursal Disease Virus (IBDV) is one of the most important immunosuppressive diseases of poultry which classified in *Avibirnavirus* genus belonging to *Birnaviridae* family. In this study, two different vaccination schedules were compared in the aspect of protectivity. For this purpose, blood serum samples was collected from 6 flocks of layer chickens in the postnatal period on days 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63 and 70. Samples were randomly selected from 10 chicks in every sampling. Flock 1 was sampled two more times due to acute clinical infection. The total of 680 serum samples was tested for IBDV specific Antibody (Ab) presence and titers using ELISA. Maternal derived antibody (MDA) was found to be protective for 6-8 days. Standard vaccination schedule (one inactive and three live intermediate vaccines) was carried out at three flocks (2, 3 and 5). In other flocks, one live, one inactive and additional more live vaccine were administered to the chicks into water. Despite regular vaccination, IBD epidemic was seen in flocks 1 and 2. In flock 1, an outbreak was reported with 23% mortality in previous breeding period. This proportion was reduced to 4.5% in this enterprise by applying initially live vaccine, and then any sign of clinical infection has not been detected. Antibody titers were entered augmentation trend in flocks 1 and 2 until day 21. probably due to viral load, this turning point was detected on day 14 in other flocks. Statistical analysis clearly showed that MDA titers showed a sharp decrease in the initially live vaccine given flock. In conclusion, to stimulate cellular immune response using initial live dose as soon as possible is more influential. It means, changing standard vaccination schedule was found to be more effective on protection of animals in the critical period of infection, especially in the presence of viral load in the field.

Keywords: Infectious bursal disease, Maternal derived antibody, Virus, Vaccination.

Yumurtacı Tavuklarda Infectious Bursal Disease ile Mücadelede İki Farklı Aşılama Programının Karşılaştırılması

Özet: Infectious Bursal Disease Virus (IBDV) *Birnaviridae* familyasının *Avibirnavirus* genusunda sınıflandırılmış olan kanatlıların en önemli immunsupresif hastalıklarından biridir. Bu çalışmada, iki farklı aşılama programı koruyuculuğu açısından karşılaştırıldı. Bunun için, 6 yumurtacı sürüden portnatal 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63 ve 70. günlerde kan örnekleri alındı. Her örneklemede rastgele seçilmiş 10 civciv örneklendi. Akut klinik enfeksiyon gelişmesi üzerine sürü 1 iki kez daha örneklendi. Toplam olarak 680 serum örneği IBDV spesifik Ab varlığı ve titresini açısından ELISA ile test edildi. Maternal Antikorların (MA) 6-8. günlere kadar koruyucu olduğu belirlendi. Standart aşılama program (1 inaktif ve 3 canlı intermediate aşı) 3 sürüde uygulandı (2, 3 and 5). Diğer 3 sürüde, civcivlere bir canlı bir inaktif ve ek olarak bir canlı aşı içme suyuna karıştırılarak verildi. Düzenli aşılama yapılmasına rağmen sürü 1 ve 2'de IBD salgını görüldü.

Bir nolu sürüde bir önceki yetiştirme döneminde %23 mortaliteli bir salgın kayıt edilmişti. Bu oran aynı sürüde canlı aşı uygulamasıyla %4.5'a düşürüldü ve hiçbir klinik enfeksiyon tespit edilmedi. Antikor titreleri 1 ve 2 nolu sürüde muhtemelen viral yük nedeniyle 21. güne kadar artış eğiliminde iken diğer sürülerde bu dönüş noktasının 14. gün olduğu tespit edildi. İlk olarak canlı aşı uygulanan sürülerde maternal antikor titrelerinde ani bir düşüş gerçekleştiği istatistiksel analizlerle açıkça gösterilmiştir. Sonuç olarak, aşı takvimini değiştirmek anlamına gelen, hücrel immun yanıtı mümkün olduğunca erken bir şekilde uyarmak için ilk dozun canlı aşı olarak kullanılmasının, enfeksiyonun kritik dönemlerinde ve özellikle de sahada akut viral enfeksiyon söz konusu olduğunda etkili bir koruma sağlayabileceği belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Aşılama, Infectious bursal disease, Maternal Antikor, Virus

Introduction

Infectious Bursal Disease Virus (IBDV) was classified in *Avibirnavirus* genus belonging to

Birnaviridae family. There are two viruses in this group; IBDV in chicken and Infectious pancreatic necrosis virus in fish [24]. Birnaviruses have ico-

*Aynı isimli Yüksek Lisans Tezinden Özetlenmiştir

Yazışma adresi / Correspondance: Sibel Gür, Department of Virology, Faculty of Veterinary Medicine, Afyon Kocatepe University, ANS Campus, Afyonkarahisar, Turkey E-mail: sibelgur@aku.edu.tr

sahedral symmetry. Genome composes of linear double stranded RNA with two segments.

There are two distinct serotypes of IBDV, only type 1 is pathogenic. Both serotypes may infect fowl [3] and ducks [28], but clinical findings may only be seen in chicken. The primer replication site is B lymphocytes and target organ is Bursa Fabricius. Transient immunospression could be seen after acute infection or vaccination with live vaccines. Additionally, secondary infections and low level of Antibody (Ab) formation are potential problems in this period. Type 2 may be propagated the many different tissue type but none of the isolates are immune suppressive [35].

Immune suppression related problems are cause to economic loss via increase in sensitivity against other infectious agents [1,11,25] and low level Ab response to any kind of vaccines [42]. Chickens need to be protected especially during first 6 week of their life which is the most critical period in the aspect of the infection.

The agent was in circulation in many regions of America in 1960s [23], later on the infection was reached to continental Europe between 1962 and 1971 [10] and continued to spreading. Today, the presence of infection has been reported in many parts of the world [22]. According to an investigation conducted by Office of International des Epizooties in 1995 in 65 countries, 95% have the infection [9]. After emerging of very virulent strains of type 1 in America, Europe and Asia in 1990s, fighting with the IBDV has become an obligation [33,39].

The IBDV may be survived in farm material up to 122 day [5]. Resistant features of IBDV under environmental conditions and wide geographical distributions are creates an obligation to continuously fight with IBDV. Hygienic measures are quite advisable but generally not sufficient alone [5]. Vaccination has been accepted as only effective method [26]. Protective level of Ab may be achieved by with live or inactivated vaccines. The type of vaccine and the vaccination programme should be determined according to the potential risk of transmission status, virus strain, maternal antibody level (MDA) and heterogeneity of flocks. Inactivated vaccines have been using widely and successfully but not totally preventive against infection with high virulent strains. Classical live

vaccines creates lifelong protection but reactivation possibility and immunosuppression risk are limiting the usage of hot vaccines [15,29]. Intermediate type vaccines have been preferred due to providing efficient Ab level and relatively low side effects. As a common apply, hens has been vaccinating with an oil-emulsion vaccine before laying to create passive immunity at the offspring [42].

The IBDV was initially detected in a broiler flock in 1978 in Turkey [21]. Later on, the virus was isolated during an outbreak [8]. Serologic studies were revealed presence of up to 78% proportions from different parts of Turkey [2,4,34]. Türe ve Çöven [41] were determined antigenic similarities among field isolates. Mortality was nearly 2-5% in 1983-1992, after 1993, up to 50% and 80% mortality was observed in broiler and layer hens. IBDV is still among most important problem disease in fowl in Turkey.

Vaccination is a routine application for the prevention of IBDV infection by live or inactive vaccines. However, routine vaccinations schedule apply and hygienic precautions were not totally preventive. Therefore, aim of this study was to investigate the effect of different vaccination strategies in the prevention of IBDV infection in both healthy and outbreak detected flocks via monitoring MDA and vaccine related Ab titer alterations.

Materials and Methods

Study design and sampling

In this study, blood serum samples were collected from 6 different layer flocks in Afyonkarahisar province, Central Anatolia. Every flock were sampled 11 times on 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63 and 70 days. Blood samples have been drawn from randomly selected 10 chicks. Flock 1 was sampled two more times on 33. and 80. days. Total of 680 samples was obtained.

Vaccination schedule was started with inactive vaccine and continued with live intermediate on flocks 2, 3 and 5. In other three flocks, live vaccine was administered initially, and then one inactive and two live vaccinations have been applied (Table 1). Same vaccines have been used in whole studied flocks. Inactive vaccine was administered via injection as subcutan (0.5cc/per chicken). Live interme-

diate vaccines have been given via drinking water. Before the vaccinations, drinking water was withheld for two hours to allow animals to get thirsty. The dosages were counted according to the number of chickens and mixed into the de-chlorinated tap water in a consumable quantity within 2 hr.

Table 1. Vaccination programme of the flock (Day/Vaccine Type)

Flock no	First dose	Second dose	Third dose	Fourth dose
1	6. L*	7. I**	14. L	21. L
2	7. I	14. L	21. L	27. L
3	8. I	13. L	20. L	-
4	7. L	10. I	15. L	22. L
5	7. I	11. L	18. L	26. L
6	8. L	11. I	15. L	21. L

*L; Live vaccine, **I; Inactive vaccine

Typical IBDV clinical symptoms were observed in flocks 1 and 2 during sampling period. Clinical disorders and postmortem findings were determined in chicks such as watery white diarrhoea, depression, haemorrhage in legs and pectoral muscles, and proventriculus-ventriculus transition and enlargement in Bursa fabricius. Cross-section of Bursa fabricius was oedematous and petechial haemorrhages covered with yellowish transudate.

Serological Examination

To examine of the serum samples for IBDV specific antibodies and titer, ELISA was preferred due to

high sensitivity and specificity [7, 20, 27]. The obtained samples (n=680) were examined for IBDV specific antibodies using an indirect ELISA test kit (Synbiotics, USA). Test was performed according to the producer's instructions and plates were read in 405nm filter. Obtained Optic Density (OD) data were evaluated in accordance with manual.

Statistical Analysis

Analysis of Covariance (ANCOVA) was used to compare the different vaccination procedure. This test has been used to determine the variability of dependent variable, that explained by both categorical and continuous independent variables. Because of starting Ab titres are different on a flock basis, day 0 values were accepted as covariate.

Results

Serological test results

In flock 1, vaccination was started with live vaccine administration on day 6, inactive applied on day 7 and continued with live vaccine on days 14 and 21. IBDV epidemic was detected on day 33 and lasts for 6 days with 4.5% mortality. As can be seen in figure 1, a sharp decrease was observed on MDA level as a result of live vaccine but an uptrend shown after day 28.

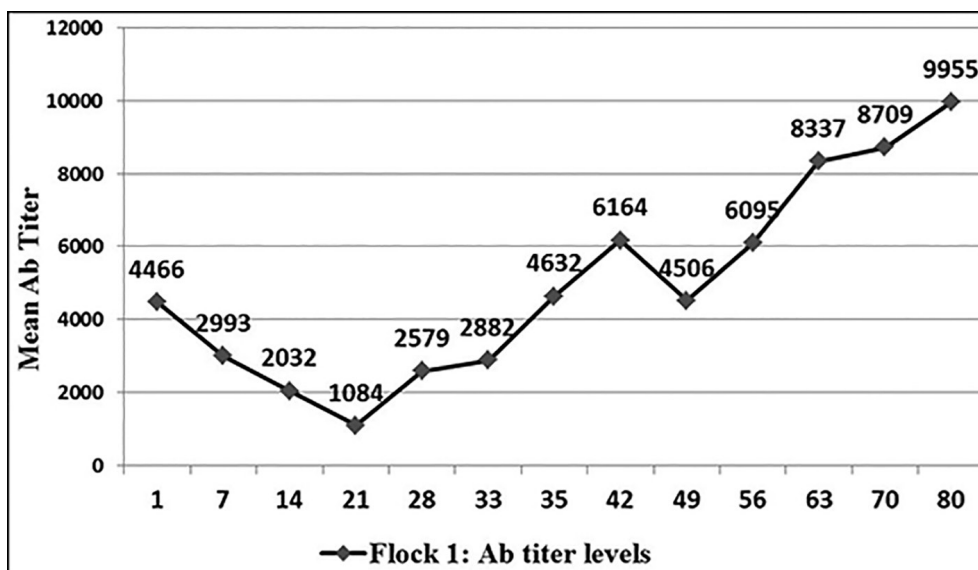


Figure 1. Mean Ab titer data according to the days of sampling of Flock 1

In flock 2, inactive vaccine was applied on day 7, whereas live vaccine was given on day 14. Then, live vaccine was administered on day 21 and 28. By

the way, clinical disorders have been observed between days 8 and 37. Mortality was 8.5% and the Abs turning point was detected on day 21.

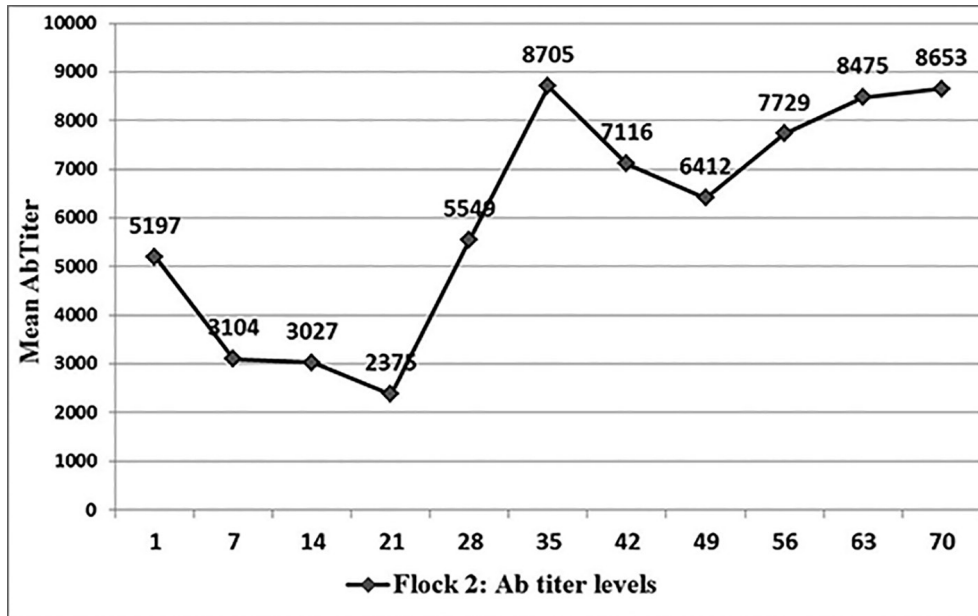


Figure 2. Mean Ab titer data according to the days of sampling of Flock 2

Schedule began with inactive vaccination on day 8 in flock 3 and two more live vaccine adminis-

trated on days 13 and 20. Ab titer was entered into the rising trend after day 35.

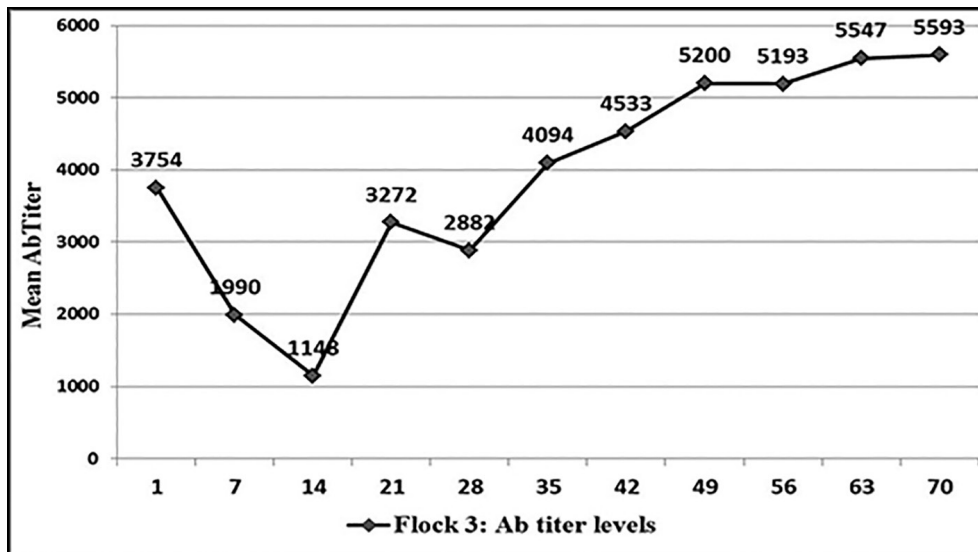


Figure 3. Mean Ab titer data according to the days of sampling of Flock 3

Flock 4 were vaccinated using live type on day 7. One inactive and two live vaccines were in subsequent days 10, 15 and 22, respectively. Ab level was entered regular increase trend after day 35 like

other flocks (1 and 6) that initially live vaccine applied. A small transient decrease was determined on 10. sampling in day 63.

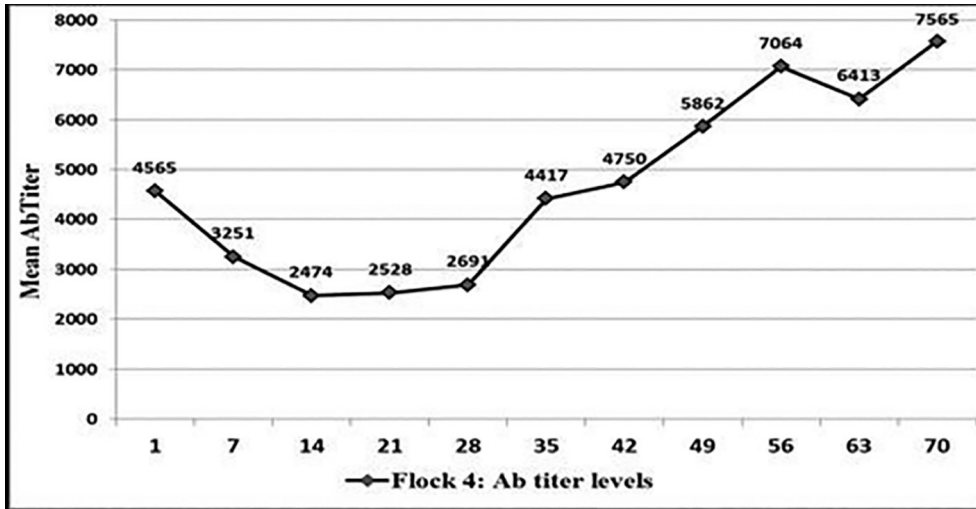


Figure 4. Mean Ab titer data according to the days of sampling of Flock 4

Inactive vaccine was administered in day 7 in flock 5, program was continued with three more live vaccine administration in days 11, 18, and 26.

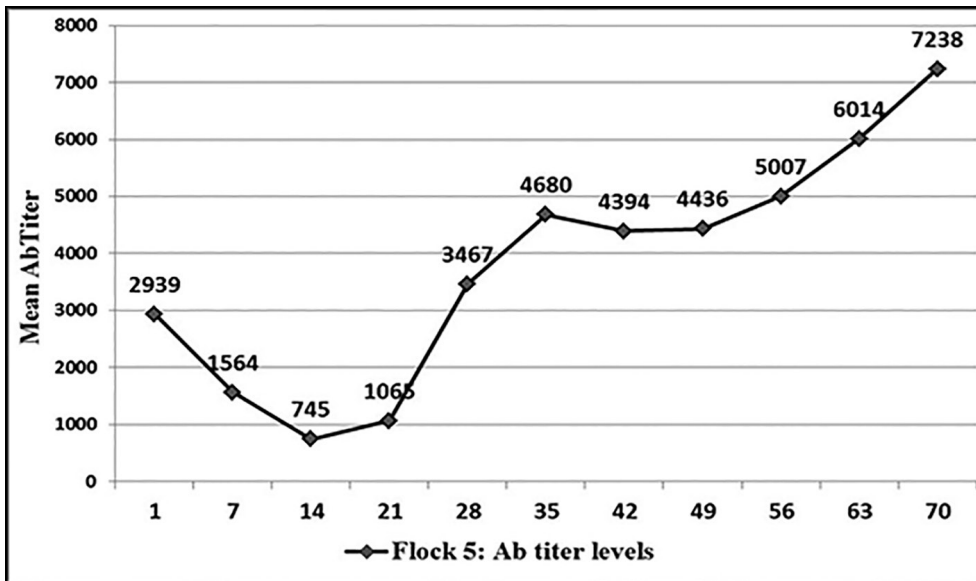


Figure 5. Mean Ab titer data according to the days of sampling of Flock 5

The most regular changes were detected in flock 6, live vaccine usage on 8. day caused to rapid decrease in titer level. Vaccination program was continued with inactive on day 11 and live vaccine administered on days 15 and 21. As can be seen in

figure 6, a rapid decrease was observed on day 63. Chickens were separated to two groups on day 56 for lessen the flock intensity. Ab levels showed increase again after day 70.

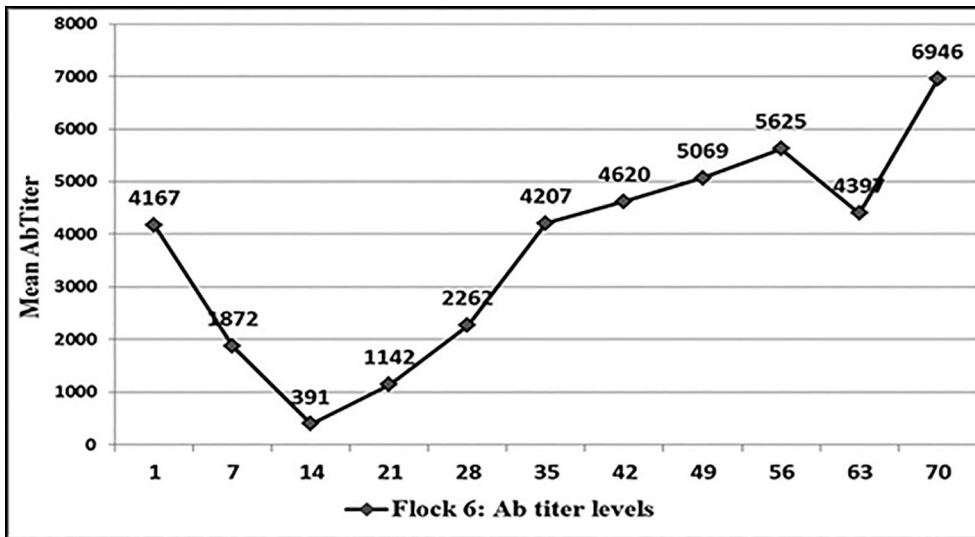


Figure 6. Mean Ab titer change according to the days of sampling of Flock 6

Statistical Analysis

As a result of ANCOVA analysis, differences was determined between two groups, Ab titer level was lower in three flock (1, 4, 6) with live vaccine used initially ($p < 0.05$).

Discussion

After first isolation in Gumboro district in Delaware in 1957 [6], IBDV infection was disseminated to many parts of the world but has been taken under control by regular vaccinations. However, the outbreaks are still being reported and causes to economic loss. To achieve enough level Ab titer via immunisation under field condition has been accepting as a main strategy [12].

In this study, Ab titer changes was monitored via regular sampling in different vaccination schedule applied 6 layer hens flock in this study.

IBDV infection was detected clinically with 23% mortality in previous breeding season in flock 1. Typical clinical disorders were observed again in the sampling performed breeding season on day 33. and lasts for 6 days but mortality reduced to 4.5%. Live intermediate vaccine was used as initially contrary to previous breeding season in 6. day, 1 day later inactive and live vaccine was applied again on 14. and 21. days. Ab was continued the decrease up to 21. day and a sharply turned to up continuously except in 49-56. days interval. The flock was vaccinated for *Salmonella gallinarum* via injection in 46.

days, later on a transient immunosuppression was observed probably due to handling stress. As can be seen in fig 1., a permanent increase and highest titer level was detected in this flock on 70. day. Both vaccination and natural infection seems stimulated the immune response strongly (Fig 1).

There has been no clinical IBDV history of flock 2 but an epidemic was arisen on 37. day. Clinical infection process was recorded as 8 days and mortality value was 8.5%. Despite quite high Ab titer (8.705) presence on day 35, two days before onset of the epidemic, happening mortality value was not low. Probable reason would be immune heterogeneity of the flock. Vaccination was started with inactive and continued with administration of live doses on days 14., 21. and 28. Titer level turn point was observed on day 21 like in flock 1, later on fluctuated in the course of clinical disorders observed period due to viral load (Fig 2).

IBDV infection was not observed in other studied flocks. One dose inactive and two live vaccines were applied in flock 3 (Fig 3). Turn point was detected in 3. sampling on day 14 and a sudden decrease observed sampling day 28. There would be two probable reason; flock would be exposed the virus and lost their antibodies or presence of undetected stress factor. However, there is no data to prove the both probability.

Vaccination was started with live intermediate in flock 4. Despite ordinary titer changes was observed in this flock, as can be seen in fig. 4, a

transient decrease was determined in day 63 of sampling just after injectable vaccination apply in day 58 for *Salmonella gallinarum*.

Ab level changes were detected as expected in flock 5 until day 35 (Fig 5). However, inadequate Ab increase observed from this point. On the controlling farm records, rise in temperature was detected in the middle of sampling period (end of the July). Heat stress would have been created immunosuppression.

Live vaccine was applied as first vaccination in flock 6, after a short rapid decrease, titer entered the augmentation trend from 14. days but a sharp transient downturn shown in 63. day sampling (Fig 6). This decrease was eventuated after dividing flock as two distinct groups to make rarefy. It is obvious that handling stress was effected the immune response.

Main factors of the epidemics in poultry farming are inappropriate disinfection, deficiency in management practises, wrong vaccine type and wrong timing applies are The infection may be seen more severe and earlier in next breeding period [5,36].

The most feasible method for prevention of IBDV infection in the field is vaccination. However a unique vaccination programme cannot be proposing due to variability of MDA, and other factors related to management and environmental conditions. Vaccination would be unnecessary in broiler flocks keeping in strictly controlled closed breeding management conditions. Additionally, have high level MDA seems sufficient in their short life span. However, active immunoprotection is quite necessary in layer hens. To determine the right vaccination schedule is the most critical decision and has vital importance. The most important parameter on the successful immunisation is to get obtain homogeneity in MDA titer at the beginning. In the field, controlling of Ab titer level is a routine work but, in most of the time, not gives enough information in the aspect of flock homology due to arbitrarily sampling style.

Main aim of the vaccination is to supply optimal Ab titer level in the critical period of IBDV infection (25-45 days). MDA is protective in the first 6-8 days of life, and end of first week of life was regarded as suitable time for initial vaccination.

Inactive vaccines have been preferred as first vaccination due to in case of no viral challenge risks. Live vaccines are stimulates the cellular immune system and stronger Ab level may be achieved. Commonly using schedule is 1 inactive and 2 or 3 doze live vaccine apply but this schedule may not be feasible in the presence of the virus in and around the farm. In the flock 1, 23% mortality was recorded in previous breeding period despite standard vaccination program. After changing schedule, this proportion was reduced to 4.5% in the sampling performed course and no infection was aroused in the subsequent breeding period. Considering presence of the virus in the farm and resistant character of the agent under field conditions, rearranging of vaccination style seems effective on prevention of economic losses. IBDV Ab titer decrease has been continued to day 14 of postnatal period on 4 flocks (3, 4, 5 and 6). After live vaccine apply in day 14, trend was entered the increase. Turn point was detected as 21. day on the flocks 1 and 2, probably due to environmental viral load. Two dose live vaccine has been administration in days 15 and 26. resulted with fast and ordinary titer increase in all of the flocks. In this period, statistical difference was not determined between different schedule used flocks.

Goddard et al. [13] was vaccinated the four group of chicks with different combinations of commercial inactivated and live vaccines. Only a dose of live vaccine administered group was detected as susceptible to the viral challenge up to seven week of life. Besides, bot vaccination schedule were found to be protective against experimental viral challenge.

However, initially live vaccine administered groups were found to be safer in this study. Decrease in mortality was observed in flocks 1 and 2 that clinical infection emerged accidentally.

The most of the experimental studies for determining optimal vaccination period were carried out in broiler. Half life of MDA has been evaluated differently according to breeding aim and management conditions. To determine the right schedule for vaccinations is not easy under field conditions. Interference of vaccine virus by MDA is the greatest risk and cause to retardation or prevention of immune response to the vaccine [40,43]. MDA level, half life of MDA, breeding aim, sampling days, the

Ab titer uniformity of the flock and vaccine type like factors have to be considered to determine the most suitable vaccination schedule using Deventer formula [7].

Correlation among stress factors and immune response is a well known phenomenon. Cortisone is one of the best known immune suppressor substances. Fear stimulates the amygdala and leads to cortisone secretion. This correlation was proved in more than 20 species. As can be obviously seen in this study, human manipulations have transient but strong negative effect on the immune response. Even though there was no clear description on this issue, stress related growth retardation [17,18], impairment in immune response [14,16,30], productivity problems were reported before [17,38]. To avoid from manipulative performances after the vaccinations is a necessity to obtain expected results.

Epidemics could be emerged despite routine vaccination programme and disinfection precautions. Any risk factors would not be detected in some cases. In this kind of situations, management conditions and other less important factors for transmission should be taken into consideration like birds, fly (*Aedes vexans*) [19], mealworm (*Alphitobius diaperinus*) [37], dogs and rodents [25,31,32].

In conclusion, IBDV Ab titer changes were monitored in two different vaccination programs applied groups of flocks. Prevention of epidemics and eliminate the economic losses could be more feasible via stimulating cellular immune response as soon as possible with initially live vaccine administration considering half-life of MDA.

Acknowledgement

The authors thanks to Dr. Nurhan Doğan for contribution to study with statistical evaluation.

References

- Allan WH, Faragher JT, Cullen GA, (1972). *Immunosuppression by the infectious bursal agent in chickens immunized against Newcastle disease*. Vet Rec. 90, 511-512.
- Babila A, Ası Y, Akçadağ B, Gürel A, (1988). *İstanbul ve Trakya Bölgesi kümes hayvanlarında IB, ILT, IBD, EDS, AE ve adenovirus enfeksiyonlarının epizootiyolojik araştırması ve izolasyon çalışmaları*. Pendik Hay Hast Arş Enst Derg. 19, 6-77.
- Barnes HJ, Wheeler J, Reed D, (1982). *Serological evidence of infectious bursal disease virus infection in Iowa turkeys*. Avian Dis. 26, 560-565.
- Baysal T, Bozkır M. (1989). *Konya Bölgesi kümes hayvanlarında IBD, ILT, EDS, IBD, AE, ve adenovirus enfeksiyonlarının epizootiyolojik araştırılması ve izolasyon çalışmaları*. Etlik Vet Mikrobiyol Derg. 6, 23-30.
- Benton WJ, Cover MS, Rosenberger JK, Lake RS, (1967). *Physicochemical properties of the infectious bursal disease agent (IBA)*. Avian Dis. 11, 430-438.
- Cosgrove AS, (1962). *An apparently new disease of chickens- Avian Nephrosis*. Avian Dis. 6, 385-389.
- De Wit JJ, (1999). *Gumboro disease: optimising vaccination*. Int Poult Prod. 7, 19-21.
- Ergün A, (1989). *Tavukların bazı viral hastalıklarının epizootiyolojik taramasında kullanılmak üzere antijen ve antiserum hazırlanması*. Etlik Vet Mikrobiyol Derg. 6, 35-54.
- Etteradossi N, (1995). *Progress in the diagnosis and prophylaxis of infectious bursal disease in poultry*. OIE, Paris, France, p.75-82.
- Faragher JT, (1972). *Infectious bursal disease of chicken*. Vet Bull. 42, 361-369.
- Faragher JT, Allan WH, Wyeth CJ, (1974). *Immunosuppressive effect of infectious bursal disease agent on vaccination against Newcastle disease*. Vet Rec. 95, 385-388.
- Fussel LW, (1998). *Poultry industry strategies for control of immunosuppressive diseases*. Poult Sci. 77, 1193-1196.
- Goddard RD, Wyeth PJ, Varney WC, (1994). *Vaccination of commercial layer chicks against infectious bursal disease with maternally derived antibodies*. Vet Rec. 135, 273-274.
- Grandin T, (1997). *Assessment of stress during handling and transport*. J Anim Sci. 75, 249-257.
- Guittet M, Le Coq H, Picault JP, Etteradossi N, Bennejean G, (1992). *Safety of infectious bursal disease vaccines: assessment of an acceptability threshold*. Dev Biol Stand. 79, 147-152.
- Hastings BE, Abbott DE, George LM, (1992). *Stress factors influencing plasma cortisol levels and adrenal weights in Chinese water deer (Hydropotes inermis)*. Res Vet Sci. 53, 375-80.
- Hemsworth PH, Barnett JL, (1989). *Relationships between fear of human productivity and cage position of laying hens*. Br Poult Sci. 30, 505-518.
- Hemsworth PH, Coleman GL, Barnett JL, Borg S, (2000). *Relationships between human-animal interactions and productivity of commercial dairy cows*. J Anim Sci. 78, 2821-2831, 2000.
- Howie RI, Thorsen J, (1981). *Identification of a strain of infectious bursal disease virus isolated from mosquitoes*. Can J Comp Med. 45, 315-320.
- Jackwood DJ, Sommer SE, (1999). *Restriction fragment length polymorphisms in the VP2 gene of infectious bursal disease viruses from outside the United States*. Avian Dis. 43, 310-314.
- Kandil M, (1978). *Hastalıklı piliçlerin bursa Fabricilerinde bir enfeksiyöz bursitis virusun izolasyonu ve bazı özel-*

- likleri üzerinde araştırmalar. Yüksek Lisans tezi, Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.
22. Lasher HN, Shane SM, (1994). *Infectious bursal disease*. World Poultry Sci. 50, 133-166.
 23. Lasher HN, Davis VS, (1997). *History of infectious bursal disease in the USA. The first two decades*. Avian Dis. 41, 11-19.
 24. Leong JC, Brown D, Dobos P, Kibenge FSB, Ludert JE, Muller H, Mundt E, Nicholson B, (2000). *Family Birnaviridae. Virustaxonomy: classification and nomenclature of viruses*. Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Carstens EB, Estes MK, Lemon SM, Maniloff J, Mayo MA, McGeoch DJ, Pringle CR, and Wickner RB. eds. Academic Press, San Diego, California, USA, p.481-490.
 25. Lukert PD, Saif YM, (2003). *Infectious bursaldisease*. Diseases of Poultry. Calnek BW, Barnes HJ, Beard CW, McDougald LR, Saif YM, eds. 11th ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA, p.161-180.
 26. Lütticken D, (1997). *Viral Diseases of the immune system and strategies to control infectious bursal disease by vaccination*. Acta Vet Hung. 45, 239-249.
 27. Marquardt WW, Johnson RB, Odenwald WF, Schlotthober BA, (1980). *An indirect enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA) for measuring antibodies in chickens infected with infectious bursal disease virus*. Avian Dis. 24, 375-385.
 28. McFerran JB, McNulty MS, McKillop ER, Connor TJ, McCracken RM, Collins PS, Allan GM, (1980). *Isolation and serological studies with infectious bursal disease viruses from fowl, turkeys and ducks, demonstration of a second serotype*. Avian Pathol. 9, 395-404.
 29. Moraes HLS, Salle CTP, Padilha AP, Nascimento VP, Souza GF, Pereira RA, Artencio JO, Salle FO, (2004). *Infectious bursal disease: evaluation of pathogenicity of commercial vaccines from Brazil in specific pathogen free chickens*. Brazil J Poult Sci. 6, 243-247.
 30. Morton DJ, Anderson E, Foggin CM, Kock MD, Tiran EP, (1995). *Plasma cortisol as an indicator of stress due to capture and translocation in wildlife species*. Vet Rec.136, 60-63.
 31. Okoye JOA, Uche UE, (1986). *Serological evidence of infectious bursal disease virus infection in wild rats*. Acta Vet Brno. 55, 207-209.
 32. Pages-Mante A, Torrents D, Maldonado J, Saubi N, (2004). *Dogs as potential carriers of infectious bursal disease virus*. Avian Pathol.33, 205-209.
 33. Rosenberger JK, Cloud SS, (1986). *Isolation and characterization of variant infectious bursal disease viruses*. J Am Vet Med Assoc.189, 357.
 34. Sayım Y, Akman A, Girgin H, (1988). *Ankara Bölgesi kümes hayvanlarında IB, ILT, EDS, IBD, AE, ve adenovirus enfeksiyonlarının epizootiyolojik araştırılması ve izolasyon çalışmaları*. Etlik Vet Mikrobiyol Derg. 6, 83-94.
 35. Sharma JM, Kim L, Rautenschlein S, Yeh H, (2000). *Infections bursal disease virus of chickens: pathogenesis and immunosuppression*. Dev Comp Immunol. 24, 223-235.
 36. Shirai L, Seki R, Kamimura R, Mitsubayashi S, (1994). *Effects of invert soap with 0.05% sodium hydroxide on infectious bursal disease virus*. Avian Dis. 38, 240-243.
 37. SnedekerC, Wills FK, Moulthrop IM, (1967). *Some studies on the infectious bursal disease agent*. Avian Dis. 11, 519-528.
 38. Stobel DP, Moberg GP, (1982). *Repeated Acute Stress During the Follicular Phase and Luteinizing Hormone Surge of Dairy Heifers*. J Dairy Sci. 65, 92-96.
 39. Tsukamoto K, Tanimura N, Hihara H, Shirai J, Imai K, Nakamura K, Maeda M, (1992). *Isolation of virulent infectious bursal disease virus from field outbreaks with high mortality in Japan*. J Vet Med Sci. 54, 153-155.
 40. Tsukamoto K, Tanimura N, Kakita S, Ota K, Mase M, Imai K, Hihara H, (1995). *Efficacy of three live vaccines against highly virulent infectious bursal disease virus in chickens with or without maternal antibodies*. Avian Dis. 39, 218-229.
 41. Türe O, Çöven F, (1999). *SDS-PAGE ve western immunoblotting teknikleri kullanarak Türkiye’de izole edilen çok virulent enfeksiyöz bursal hastalığı viruslarının karşılaştırma analizi*. Turkish J Vet Anim Sci. 23, 83-92.
 42. Van Den Berg TP, (2000). *Acute infectious bursal disease in poultry: a review*. Avian Pathol. 29, 175-194.
 43. Van Den Berg TP, Meulemans G, (1991). *Acute infectious bursal disease in poultry: protection afforded by maternally derived antibodies and interference with live vaccination*. Avian Pathol. 20, 409-421.

Yaygın *Salmonella* Serovarlarının Moleküler Tekniklerle Tiplendirilmesi

Elçin Günaydın¹, Selahattin Şen², K. Serdar Diker³, Derya Karataş Yeni⁴, Özlem Kardoğan⁵, H. Kaan Müştak³, Özlem Şahan⁶

¹ Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü, Yetiştirme Hastalıkları Teşhis Laboratuvarı, Ankara

² Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü, Bakteriyolojik Teşhis Laboratuvarı, Ankara

³ Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

⁴ Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü, Viral Aşı Üretim Laboratuvarı, Ankara

⁵ Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü, Kanatlı hayvan Hastalıkları Teşhis Laboratuvarı, Ankara

⁶ Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Burdur

Geliş Tarihi / Received: 10.09.2017, Kabul Tarihi / Accepted: 16.10.2017

Özet: Bu çalışmanın amacı, Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü (VKMAE), Bakteriyolojik Teşhis Laboratuvarı sorumluluğunda 2009-2011 yılları arasında *Salmonella* Prevalans çalışması kapsamında, Kauffmann-White serotiplendirme şeması ile tiplendirmesi yapılan toplam 907 *Salmonella* izolatının, serogrup *Salmonella* multiplex-PZR, Faz 1 *Salmonella* multiplex-PZR ve Faz 2 *Salmonella* multiplex-PZR kullanarak sahada yaygın olarak sirküle olan *Salmonella* serovarlara için dizayn edilen primerler ile maksimum 2-3 gün gibi kısa sürede, düşük maliyetle tiplendirmesini yapabilmektir. Bu çalışmayla, konvansiyonel yöntemle faz 1 ve faz 2 antijenlerinin eş zamanlı sergilenmemesi sonucunda ekstra laboratuvar iş yükü, olası çarpaz reaksiyonlar sebebiyle ekstra antiserum harcanması dolayısıyla yaşanan zaman kaybı ve yüksek maliyetin üstesinden gelineceği öngörüldü. Ayrıca, 2 testin (multiplex-PZR ve konvansiyel serotiplendirme) örtüşmediği durumlar bakterilerin 6.5 kb operonunu inceleyen ribotiplendirme desteğiyle çözülmesi yoluna gidilmiştir. Çalışmada kullanılacak primerler ile 907 izolatın % 29.32'sinin (266 izolat; 15 farklı serovar) üç antijenik yapısı da tam olarak tanımlanmış, isimlendirilebilmiştir. İncelenen izolatların somatik, flagellar 1 ve flagellar 2 antijenlerinin sırasıyla; %54.56 (490), %90.95 (825) ve %78.94 (716)'ü tespit edilebilmiştir. İzolatların en azından % 50'sinin tam olarak isimlendirilebileceği öngörülmüştür ancak *Salmonella* Infantis (*S. Infantis*) ve *S. Mbandaka* suşlarında somatik antijeni amplifiye eden primer olmasına rağmen somatik antijen tespit edilememiştir. Bu suşlar ribotiplendirmeye alınmıştır. Konvansiyonel seroloji, multiplex-PZR ve ribotiplendirme değerlendirildiğinde; ribotiplendirme ve multiplex-PZR'ların gold standart metoda destek metodlar olarak kullanılabileceği tespit edilmiştir. Özet olarak; çalışmada mevcut olan primerler sadece sahada yaygın olan serovarlara somatik, faz 1 ve faz 2 antijenlerine spesifik oldukları için PZR tüm serovarlara tanımlanmakta yetersiz kalmıştır. Sonuç olarak ucuz, hızlı ve duyarlı metod olan multiplex-PZR'ların belirli somatik, flagellar 1 ve 2 antijenlerinin tespitinde konvansiyonel serolojik yöntemle destek olarak kullanılabileceği kanısına varılmıştır.

Anahtar kelimeler: *Salmonella* serovarlara, Multiplex-PZR

Molecular Typing of Common *Salmonella* Serovars

Abstract: The purpose of this study was to identify total 907 *Salmonella* isolates had been formerly identified by using Kauffmann-White serotype scheme on the scope of *Salmonella* Prevalance Study between 2009-2011 under the responsibility of Veterinary Control Central Research Institute, Bacteriological Diagnosis Laboratory; by performing serogroup *Salmonella* multiplex-PCR, phase-1 *Salmonella* multiplex-PCR, phase-2 *Salmonella* multiplex-PCR with the specific primers designed for the common *Salmonella* serovars circulating around the field, in maximum 2-3 days, relatively short time, with a low cost. With this study, extra laboratory work load due to phase 1 and phase 2 flagellar antigens not being expressed synchronously, dilution of time and high cost due to probable cross-reactions requiring extra antiserum usage are envisaged to have been overcome. Moreover, the occasions where 2 tests (multiplex-PCRs and conventional serotyping) are not overlapped was resolved with the support of ribotyping which examine the 6.5 kb operone of bacteriae. Consequently, identification by both methods, and evaluating the results comparatively is thought to be beneficial. With the primers used in the study, three antigenic structures of 29.32% (266 isolates; 15 different serovars) of the 907 isolates were fully identified. Somatic, phase 1 and phase 2 antigens were determined with a percentage of 54.56 (490 isolates), 90.95 (825 isolates) and 78.94 (716 isolates), respectively. At least 50% of the isolates were presumed to be fully identified. However, the somatic antigen of *Salmonella* Infantis (*S. Infantis*) ve *S. Mbandaka* were not detected although the primers amplifying somatic antigen were present. These two serovars were ribotyped. When conventional serology, multiplex-PCRs and ribotyping were evaluated, multiplex-PCRs and ribotyping were found to be supportive to conventional serology. In a summary, due to present primers, specific to somatic, phase 1 and phase 2 of

the only common *Salmonella* serovars in the field, PCR has deficiencies for identifying whole serovars. Consequently, the multiplex-PCRs termed cheap, sensitive, and rapid were decided to be supportive to conventional serology for defining specific somatic, phase 1 and 2 antigens.

Key words: *Salmonella* serovars, Multiplex-PCR

Giriş

Salmonella, hayvanların ve insanların en önemli patojenlerinden biri olup, aynı zamanda zoonozdur. Günümüze kadar tiplendirilen toplam 2700' e yakın *Salmonella* serovarı mevcuttur. Bunlardan 2587 adedi *Salmonella enterica*, 23 adedi *Salmonella bongori* alt grubunda bulunmaktadır (8). *Salmonella enterica* altı alt türden oluşmaktadır; *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, *Salmonella enterica* subsp. *salamae*, *Salmonella enterica* subsp. *arizonae*, *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae*, *Salmonella enterica* subsp. *houtenae* ve *Salmonella enterica* subsp. *indica* veya sırasıyla *Salmonella enterica* subsp. I, II, IIIa, IIIb, IV ve VI (17). *Salmonella enterica* subsp. I genellikle insanlardan ve sıcak-kanlı hayvanlardan izole edilir. Klinik laboratuvarlarda izole edilen serotiplerin büyük çoğunluğu; 1547 adedi bu alt türe aittir (8, 17).

Salmonella serovarlarının isimlendirirken, Kauffmann-White serotiplendirme şeması, *Salmonella* izolatlarının tiplendirmesinde birçok laboratuvar tarafından kullanılmaktadır. Serotiplendirme, *Salmonella*'nın hücre duvarında bulunan somatik (O) ve flagellar (H) faktör antijenleri temel alınarak yapılır. H faktörü *Salmonella* suşunun serotip kimliğini belirlerken, O faktörü grubu tespit eder (8). O antijenleri, gram negatif bakterilerin önemli komponentlerinden olan lipopolisakariti (LPS) oluşturan spesifik polisakaritlerdir. O antijen sentezinden sorumlu genler, *rfb* diye isimlendirilen bir gen kümesinde, kromozom üzerinde grup halinde bulunurlar (2). *rfb* genleri nükleotid şeker biyosentez yolunu ve tekrarlayan ünitelerin bir arada bulunması için gerekli olan transferazları kodlamaktadır. Oniki potansiyel transmembran segmentini içeren proteini kodlayan ve daha önceleri *rfbX*, şimdi ise *wzx* olarak adlandırılan gen, tüm *Salmonella* O antijen gen kümelerinde bulunmaktadır. Farklı O antijen kümelerinden *wzx* proteinin yapısal homoloji gösterdiği fakat aminoasit sekans seviyesinde çok az bir benzerliğin olduğu öngörülmektedir (15). *Wzx*'in sitoplazmik membranın sitoplazmik kısmından periplazmik kısmına

O-ünitelerinin transferinden sorumlu olduğu bildirilmiştir (20).

Faz 1 ve faz 2 flagellar H antijenleri alternatif olarak, sırasıyla *fliC* ve *fliB* genleri sorumluluğunda faz varyasyon mekanizması tarafından eksprese edilirler. Bu genler kromozom üzerinde farklı iki lokalizasyonda bulunurlar. *fliBA* operonu, Hin rekombinazı kodlayan hin genini içerir; *fliB* geni fase 2 flagellinlerini, *fliA* geni de *fliC* için reprösörü kodlamaktadır. Hin rekombinaz geni, *fliBA* operonu için promotör içeren kromozomun 993 bp'lık segmentinin reversible inversiyonunu katalize eder. Bir oryantasyonda, promotör *fliC* geninin represyonuna yol açarak, *fliA* ve *fliB* genlerinin transkripsiyonunu sağlar. Hin'in diğer oryantasyonunda *fliA* ve *fliB* genleri eksprese edilmez, faz 2 flagellinin üstü kapanır, bu da faz 1 flagellinin eksprese edilmesini olanaklı hale getirir. (13, 25). Bu allelerden bazıları tek bir faktörle (i, d veya r), diğerleri ise birçok alt faktörle (l,v, g,m, e,n,x) tanımlanır. *Salmonella* flagellinlerinin aminoasit sekanslarının karşılaştırması ile 8 farklı bölge tanımlanmıştır. Amino ve karboksi terminal sekansları (sırasıyla bölge I ve II ve bölge VIII) oldukça korunmuştur. Polimerizasyon ve transport için çok önemli oldukları düşünülmektedir. Bölge IV, V ve VI'dan oluşan merkez bölge ise hem sekanslarda hem de flagellar antijenler arası uzunluklarda çok fazla çeşitlilik gösterir ve genelde H antijeninin epitopunu belirlediği düşünülmektedir (16, 23).

Yukarıda *Salmonella* somatik ve flagellar antijenlerinin ekspresyonu ile ilgili açıklamalar yapılmıştır. Flagellar 1 ve flagellar 2 antijenlerinin eş zamanlı sergilenmemesi dolayısıyla konvansiyonel yöntemde, flagellar antijenlerin ayrı ayrı açığa çıkarılmasıyla *Salmonella*ların karakterizasyonu yapılabilmektedir (17). Bu çerçevede, konvansiyonel yöntemle bu işlem, her şey yolunda giderse, minimum 5 iş günü gibi bir zaman dilimini, çapraz reaksiyonlar sebebiyle bazen tekrarları ve gerek besiyeri gerekse antiserum harcamaları dolayısıyla yüksek bir maliyeti gerektirmektedir.

Uzun yıllardır, Salmonellaların Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)-tabanlı yöntemlerle karakterizasyonu üzerine çalışmalar yapılmaktadır. *Salmonella* serotipleri arasında veya özel bir serotip içerisinde ayırım yapmak için tanımlanan moleküler PZR tabanlı metotlar mevcuttur (1, 7, 12). Çalışmamızda, serogruplandırma; O:B (O:4), O:C1(O:7), O:C2-C3 (O:8), O:D (O:9, O:9,46, O:9,46,27), O:E (O:3,10, O:3,19), O:D1(O:9) ve O:E1(3,10) somatik antijenlerini (10, 11), faz 1'in tiplendirilmesinde; H:i, H:z10, H:b, H:e,h, H:l,v, H:r, H:g kompleks flagellar antijenlerini çoğaltan spesifik primerler kullanılacaktır (9). *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Enteritidis* (*Salmonella* *Enteritidis*)'in 2. fazı sergilenmediği için bu serovarı spesifik çoğaltan sdf1 primerlerinden faydalanılacaktır (9). Faz 2'nin tiplendirilmesinde ise; H:1,5, H:1,6, H:1,7, H:1,2, H:l,w, H:e,n,z15 flagellar antijenleri spesifik primerler ile çoğaltılacaktır (5).

Çok uzun yıllardır, Kaufmann-White *Salmonella* serotip şemasının kullanımı ile elde edilen epidemiyolojik verilerin oldukça yararlı olduğu kanıtlanmıştır (8, 17). Bu nedenle hem PZR-tabanlı moleküler tiplendirme hem de Kaufmann-White *Salmonella* serotip şemasının kullanımı ile yapılan serolojik tiplendirme paralel götürülerek, PZR-tabanlı tiplendirmenin bilinen, kabul görmüş geleneksel yöntemle örtüşür sonuçlar vermesi arzu edilmektedir.

Bu çalışmada amaçlanan, *Salmonella* serovarylarının tanısına ek, destek, alternatif olabilecek, daha hızlı, ucuz ve duyarlı olan moleküler yöntemlerin geliştirilmesi ve optimizasyonudur.

Materyal ve Metot

A) Materyal

1. *Salmonella* suşları: Veteriner Kontrol Merkez araştırma Enstitüsü (VKMAE) Bakteriyolojik Teşhis Laboratuvarı'nda 2009-2011 yılları yürütülen *Salmonella* Survey'de izole ve identifiye edilen 907 adet *Salmonella* izolatu çalışıldı.

2. *Salmonella* Standart suşlar: Pozitif kontrol olarak, laboratuvarın katıldığı Uluslararası Karşılaştırma Yeterlilik Testleri'nde tiplendirme amacıyla gönderilen *Salmonella* serovaryları optimizasyon sırasında pozitif kontrol suş olarak kullanıldı.

3. Primerler: Multiplex-PZR'larda kullanılan primer çiftleri baz dizilimleri ayrıntılı olarak verilmiştir.

a) Multiplex-PZR serogruplandırma için (Herrera-Leo'n Silvia ve ark. 2007) (10)

Primer adı	Baz Dizilimi (5'-3')
F-tyvD	5'-GAGGAAGGGAAATGAAGCTTTT-3'
R-tyvD	5'-TAGCAAAGTGTCTCCACCATAC-3'
F-wzxB	5'-GGCATATATTTCTGTATTTCGCG-3'
R-wzxB	5'-GCCTTAATTAAGTAAGTTAGTGGAAGC-3'
F-wzxC1	5'-CAGTAGTCCGTAATAACAGGGTGG-3'
R-wzxC1	5'-GGGGCTATAAATACTGTGTAAATTCC-3'
F-wzxC2-C3	5'-ACTGAAGGTGGTATTTTCATGGG-3'
R-wzxC2-C3	5'-AAGACATCCCTAACTGCCCTGC-3'
F-wzxE	5'-TAAAGTATATGGTGTGATTAACC-3'
R-wzxE	5'-GTTAAAATGACAGATTGAGCAGAG-3'

b) D1 ve E1 serogruplarının ayırımı için Multiplex-PZR (Hong Y ve ark. 2008) (11)

Primer adı	Baz Dizilimi
F-D1	5'-ATGGGAGCGTTTGGGTTC-3'
R-D1	5'-CGCTCTCCACTACCAACTTC-3'
F-E1	5'-GATAGCAACGTTTCGGAAATTC-3'
R-E1	5'-CCCAATAGCAATAAACCAAGC-3'

c) Multiplex-PZR Faz-1 için (Herrera-Leon Silvia ve ark., 2004) (9)

Primer adı	Baz Dizilimi
Sense-60	5'-GCAGATCAACTCTCAGACCCTGGG-3'
Antisense-i	5'-ATAGCCATCTTTACCAGTTCC-3'
Antisense-z10	5'-CGTCGCAGCTTCTGCAACC-3'
Antisense-b	5'-CGCACCAGTCYWACCTAAGGCGG-3'
Antisense-eh	5'-AACGAAAGCGTAGCAGACAAG-3'
Antisense-lv	5'-CCTGTCACTTTCTGTGGTTAT-3'
Antisense-r	5'-AAGTGACTTTTCCATCGGCTG-3'
Forward-G	5'-GTGATCTGAAATCCAGCTTCAAG-3'
Reverse-G	5'-AAGTTTCGCACTCTCGTTTTTGG-3'
Forward-Sdf-1	5'-TGTGTTTTATCTGATGCAAGAGG-3'
Reverse-Sdf-1	5'-CGTTCTTCTGGTACTTACGATGAC-3'

d) Multiplex-PZR Faz-2 için (Echeita MA ve ark., 2002) (5)

Primer adı	Baz Dizilimi
Sense-F1	5'-CTATGCCRATAATGGTACTACTG-3'
Antisense-R5	5'-GGTTACAGVAGCCGTACCAG-3'
Antisense-R6	5'-CTCCTGTACTTCTGTTTTGGTTGTA-3'
Antisense-R7	5'-TAATCGCCATTTTGTGCGAG-3'
Antisense-R1	5'-TTGACCAAYKYMGCSCAT-3'
Sense-Fw 5	5'-GTGGGGCAACMCTCAATACTG-3'
Antisense-Rw 5	5'-CCTGCCACTTTCGTGGTTGC-3'
Sensen-Fe	5'-GGCAACCCGACAGTAACTGGCGATAC-3'
Antisense-Rx	5'-CCATCCTTAAAGGATACGGC-3'
Antisense-Rz15	5'-ATCAACGGTAACTTCATATTG-3'

3. Taq DNA Polymerase: Taq DNA Polymerase (Thermo Scientific Taq DNA Polymerase, Cat no: EP0402) kullanıldı.

4. DNA Ekstraksiyon Kiti: DNA ekstraksiyonları ticari DNA ekstraksiyon kiti ile (DNeasy Blood & Tissue Kits, Qiagen, Cat No 69504) yapıldı.

3. Serogrup Multiplex-PZR için Reaksiyon Hacmi ve Parametreler

Reagent	Miktar
10X PCR buffer (without MgCl ₂)	2.5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	3 µl
dNTP (10 mM)	0.5µl
F-tyvD (5 pmol/µl)	1 µl
R-tyvD (5 pmol/µl)	1 µl
F-wzxB (5 pmol/µl)	1 µl
R-wzxB (5 pmol/µl)	1 µl
F-wzxC1 (5 pmol/µl)	1 µl
R-wzxC1 (5 pmol/µl)	1 µl
F-wzxC2-C3 (5 pmol/µl)	1 µl
R-wzxC2-C3 (5 pmol/µl)	1 µl
F-wzxE1 (5 pmol/µl)	1 µl
R-wzxE1 (5 pmol/µl)	1 µl
Taq DNA Polymerase	0.5 µl
Deionize su	7.5 µl
Template	1 µl
Total hacim	25 µl

PARAMETRELER

Başlangıç denatürasyonu
Primerlerin bağlanması
(30 siklus)
Final uzama

5. Besiyerleri: Dokuzyedi izolatın canlandırılması ve stoklanması için sırasıyla XLT4 agar (Oxoid;CM106), XLT4 supplement (Oxoid; SR0237) ve Brain Heart Infusion Broth (Oxoid; CM1135) kullanıldı.

5. Ribotiplendirme kiti: PVU II (Dupont; Riboprinter System DNA Prep Reagents, PN:D10734575) enziminin kullanıldığı ribotiplendirme kitinin prosedürüne göre tiplendirme yapıldı.

B) Metot

1. İzolasyon ve canlandırma: Dokuzyedi izolat XLT4 Agarda (Oxoid;CM106) ile yeniden izole edildi. Reizolasyon sonrası şuşlar, Brain Heart Infusion Broth'ta (Oxoid; CM1135) stokları yapıldı -20°C'de saklandı.

2. DNA Ekstraksiyonu: Tekrar izolasyonu yapılan izolatların ekstraksiyonu, ticari DNA ekstraksiyon kitinin (DNeasy Blood & Tissue Kits, Qiagen, Cat No 69504) prosedürüne göre yapıldı.

4. D1 ve E1 için Serogrup Multiplex-PZR için Reaksiyon Hacmi ve Parametreler

Reagent	Miktar	
10X PCR buffer (without MgCl ₂)	2.5 µl	94°C 5 dk
MgCl ₂ (25 mM)	3 µl	94°C 30 sn
dNTP (10 mM)	0.5 µl	57°C 40 sn
F-D1 (5 pmol/µl)	1 µl	72°C 30 sn
R-D1 (5 pmol/µl)	1 µl	72°C 10 dk
F-E1 (5 pmol/µl)	1 µl	
R-E1 (5 pmol/µl)	1 µl	
Taq DNA Polymerase	0.5 µl	
Deionize su	13.5 µl	
Template	1 µl	
Total hacim	25 µl	

PARAMETRELER

Başlangıç denaturasyonu

Primerlerin bağlanması
(30 siklus)

Final uzama

5. Faz-1 Multiplex-PZR için Reaksiyon Hacmi ve Parametreler

Reagent	Miktar	
10X PCR buffer (without MgCl ₂)	4 µl	
MgCl ₂ (25 mM)	3 µl	
dNTP (10 mM)	0.5 µl	
Sense-60 (35 pmol/µl)	1 µl	
Antisense-i (5 pmol/µl)	1 µl	
Antisense-z10 (5 pmol/µl)	1 µl	
Antisense-b (7 pmol/µl)	1 µl	
Antisense-eh (7 pmol/µl)	1 µl	
Antisense-lv (5 pmol/µl)	1 µl	94°C 5 dk
Antisense-r (5 pmol/µl)	1 µl	94°C 30 sn
Forward-G (5 pmol/µl)	1 µl	58°C 40 sn
Reverse-G (5 pmol/µl)	1 µl	72°C 30 sn
Forward-Sdf-1 (5 pmol/µl)	1 µl	72°C 10 dk
Reverse-Sdf-1 (5 pmol/µl)	1 µl	
Taq DNA Polymerase	0.5 µl	
Deionize su	5	
Template	1 µl	
Total hacim	25 µl	

PARAMETRELER

Başlangıç denaturasyonu

Primerlerin bağlanması
(30 siklus)

Final uzama

6. Faz-2 Multiplex-PZR için Reaksiyon Hacmi ve Parametreler

Reagent	Miktar		
10X PCR buffer (without MgCl ₂)	2,5 µl		
MgCl ₂ (25 mM)	3 µl		
dNTP (10 mM)	0.5 µl		
Sense-F1mod (20 pmol/µl)	1 µl		PARAMETRELER
Antisense-R5mod (5 pmol/µl)	1 µl		
Antisense-R6 (5 pmol/µl)	1 µl	94°C 5 dk	Başlangıç denatürasyonu
Antisense-R7 (5 pmol/µl)	1 µl	94°C 30 sn	Primerlerin bağlanması
Antisense-R1mod5 (5 pmol/µl)	1 µl	61°C 40 sn	(30 siklus)
Sense-Fw 5 (5 pmol/µl)	1 µl	72°C 30 sn	
Antisense-Rw 5 (5 pmol/µl)	1 µl	72°C 10 dk	Final uzama
Sensen-Fe (5 pmol/µl)	1 µl		
Antisense-Rz15(5 pmol/µl)	1 µl		
Deionize su	9		
Template	1 µl		
Total hacim	25 µl		

7. Agaroz- Jel Elektroferez

Elde edilen PZR ürünlerinden; 5'er µl alınarak, 1 µl 6X loading dye solusyonu yüklenecek, 0.5 µl/ml ethidium bromide ile boyanan % 2'lik agaroz jelde 100 V elektrik akımında 120 dk yürütülerek elektroferez işlemi yapıldı. Agaroz jel, uv-transluminatöre transfer edilerek oluşan bantlar DNA marker ve pozitif kontroller yardımıyla UV ışığı altında değerlendirilip ve jel görüntüleme sistemi ile dökümantasyonu yapıldı. Serogrup Multiplex-PZR ile B, C1, C2-C3, D ve E grupları için beklenen DNA bantı büyüklükleri sırasıyla; 230 bp, 483 bp, 154 bp, 615 bp ve 345 bp olarak tespit edildi. D1-E1 Serogrup Multiplex-PZR için beklenen DNA bantı büyüklükleri sırasıyla; 624bp ve 281 bp'dır. Faz1 Multiplex- PZR ile H:G, H:z10, H:l,v, H:r, H:i, H:e,h, H:b antijenleri için dizayn edilen primerler ve *Salmonella* Enteritidis için spesifik olan Sdf1 primerleri ile beklenen DNA bantı büyüklükleri sırasıyla; 500 bp, 400 bp, 300 bp, 275, 250 bp, 200 bp, 150 bp ve 300 bp'dır. Faz 2 Multiplex-PZR ile H:1,2, H:1,5, H:1,6, H:1,7, H:l,w ve H:e,n,z15 antijenleri için dizayn edilen primerler ile beklenen DNA bantı büyüklükleri sırasıyla; 400 bp, 100 bp, 300 bp, 200 bp, 250bp, 150 bp'dır.

8. Ribotiplendirme: Ribotiplendirme, PVUII enzimi ile kit prosedürüne göre yapıldı.

Bulgular

Daha önce gold standart bir metot olan serotiplendirme ile isimlendirilen 36 farklı serovardan oluşan toplam 907 izolat, somatik, faz1 ve faz2 antijenlerinin multiplex-PZR ile tiplendirilmesi açısından tekrar değerlendirildi. Multiplex-PZR sonuçları aşağıda ayrıntısıyla anlatılmaktadır.

S. Heidelberg (1 adet), *S. Richmond* (15 adet), *S. Bsilla* (1 adet), *S. Abony* (3 adet), *S. Israel* (1 adet), *S. Otmarschen* (1 adet), *S. Potsdam* (1 adet), *S. Kapemba* (1 adet), *S. Typhimurium* (10 adet), *S. Braenderup* (27 adet), *S. Breedenev* (7 adet), *S. Anatum* (14 adet), *S. Enteritidis* (132 adet), *S. Virchow* (60 adet), *S. Sandiego* (2 adet) olmak üzere 15 farklı serovardan oluşan toplam 266 izolat tam olarak tanımlanmıştır.

Toplam 392 izolatın; *S. Mbandaka* (6,7,14:z10:enz15) (68 adet) ve *S. Infantis* (6,7,14:r:1,5) (324 adet) suşlarının tam olarak tanımlanması bekleniyordu. Ancak iki izolatında, somatik, faz1 ve faz 2 antijenlerini kodlayan pri-

merler mevcut olmasına rağmen, O:7 somatik antijeni kodlayan primer her iki izolatta da somatik antijeni amplifiye etmemiştir. Bu nedenle mevcut *S. Mbandaka* ve *S. Infantis* suşlarının sadece faz 1 ve faz 2 antijenleri tespit edilebildi. Tiplendirilemeyen *S. Mbandaka* ve *S. Infantis* suşları ribotiplendirmeye alındığında sonuçlar şu şekildedir: Altmışsekiz adet *S. Mbandaka* ve 324 adet *S. Infantis* suşlarından; 68 adet *S. Mbandaka* tam olarak tiplendirilebilirken, 392 adet *S. Infantis* suşunun 20 adedi *S. Bareilly* (6,7,14:y:1,5) olarak tiplendirilmiştir.

Toplam 159 izolatin somatik ve faz 1 antijenleri tespit edildi. *S. Kentucky* (8,20:i:z6) (150 adet), *S. Tumadi* (1,4,12:i:z6) (1 adet), *S. Hadar* (6,8:z10:e,n,x) (8 adet), suşlarının somatik antijen ve faz 1 antijenleri tespit edilirken, z6, enx faz 2 antijenlerini kodlayan primerler mevcut olmadığı için faz 2 antijenleri tespit edilememiştir.

S. Sao (5 adet) serovarının multiplex-PZR ile tiplendirilmesi değerlendirildiğinde, faz 1 ve faz 2 antijenlerini kodlayan primerler ile faz 1 ve faz 2 antijenleri identifiye edildi. *S. Sao* izolatomının somatik antijeni E4 grubunda yer almaktadır. Çalışmada sadece E grubu ve E1 grubunu kodlayan primerler mevcut olduğu için, *S. Sao* suşunun ancak E grubunda olduğu belirlenebildi, E4 grubunda olduğu tespit edilemedi.

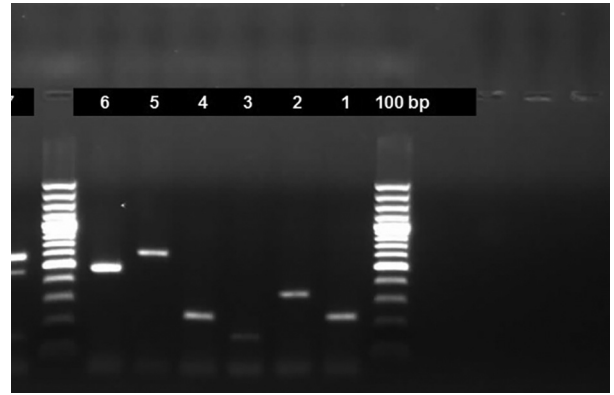
Yedi farklı serovar olmak üzere toplam 45 izolatin somatik ve faz 2 antijenleri tespit edildi. *S. Agona* (1,4,[5]: f,g,s: [1,2]) (15 adet), *S. Schwarzengrund* (1,4,12,27:d:1,7) (6 adet), *S. Coeln* (1,4,5,12:y:1,2) (5 adet), *S. Dabou* (8,20:z4,z23:l,w) (4 adet), *S. Orion* (3,10,[15], [15,34]:y: [1,5]) (9 adet), *S. Bareilly* (6,7,14:y: 1,5) (1 adet), *S. Livingstone* (6,7,14:d:l,w) (5 adet) suşlarının somatik ve faz 2 antijenleri tam olarak identifiye edilmiştir. Ancak faz 1 antijenini kodlayan primerler mevcut olmadığı için multiplex-PZR ile tespit edilememiştir.

Toplam 9 serovar olmak üzere 32 adet izolatta üç antijenden sadece biri tespit edildi. Tek bir antijenik yapısı tespit edilen serovarlar şunlardır: *S. Bispebjerg* (1,4:a:e,n,x) (3 adet), *S. Oranienburg* (6,7,14:m,t:z57) (1 adet), *S. Hvittingfoss* (16, b, e,n,x) (1 adet), *S. Amoutive* (28:d:1,5) (1 adet), *S. Derby* 1,4, [5],12:f,g: [1,2] (1 adet), *S. Liverpool* (1,3,19:d:enz15) (3 adet), *S. Oakey* (6,7:m,t:z64) (1 adet) *S. Duisburg* (1,4, 12,27:d: enz15) (4 adet), *S.*

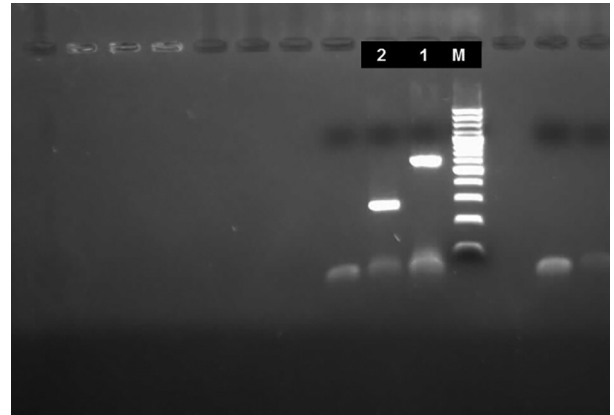
Montevideo (6,7,14:g,m,[p],s:[1,2,7]) (5 adet), *S. Molade* (8,20:z10:z6) (2 adet).

İncelenen örneklerde, herhangi bir antijenik yapının tespit edilemediği 2 serovar toplam 8 izolat; *S. Kingston* (1,4, [5],12,27:g,s,t:[1,2]) (1 adet) ve *S. Senftenberg* (1,3,19:g,[s],t:-) (7 adet)'dir.

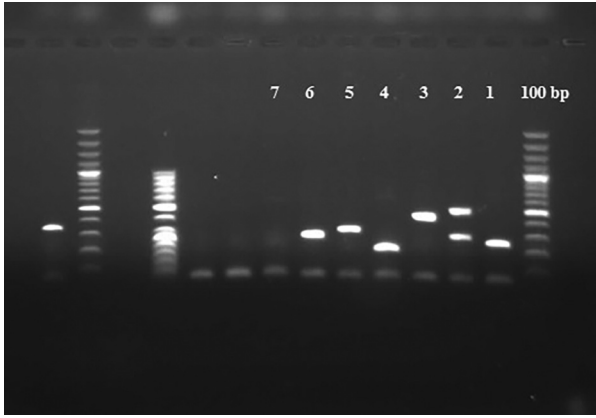
Projenin başında H:d flagellar 1 ve H:e,n,x flagellar 2 antijenlerini amplifiye eden primerler faz 1 ve faz 2 multiplex-PCR'larda öngörülmüştü. Ancak bu primerlerin ilgili antijenleri amplifiye etmediği tespit edilince reaksiyon dışı bırakıldılar.



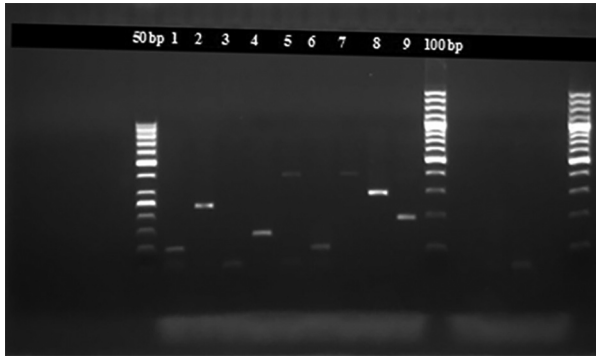
Resim 1. Serogrup mPZR jel görüntüsü : 100 bp marker (Fermentas; 100bp), **1 nolu kuyucuk:** *S. Typhimurium* [O:B (O:4)]= 230 bp, **2 nolu kuyucuk:** *S. Liverpool* [O:E (O:3,10, O:3,19)]=345 bp, **3 nolu kuyucuk:** *S. Hadar* [O:C2-C3(O:8)]=154 bp, **4 nolu kuyucuk:** *S. Typhimurium* [O:B (O:4)]= 230 bp, **5 nolu kuyucuk:** *S. Enteritidis* [O:D (O:9, O:9,46, O:9,46,27)]=615 bp, **6 nolu kuyucuk:** *S. Braenderup* [O:C1(O:7)]= 483bp



Resim 2. D1-E1 Serogrup mPZR jel görüntüsü: Marker (Fermentas; 100bp), **1 nolu kuyucuk:** *S. Enteritidis* [O:D (O:9)]=624 bp, **2 nolu kuyucuk:** *S. Anatum* O:E1(3,10)=281 bp



Resim 3. Faz 1 mPCR jel görüntüsü: Marker (Fermentas; 100 bp), **1 nolu kuyucuk:** *S. Typhimurium* (H:i)=250 bp, **2 nolu kuyucuk:** *S. Enteritidis* (g,m ve sdf)=500 bp ve 300 bp, **3 nolu kuyucuk:** *S. Hadar* (H:z10)= 400 bp, **4 nolu kuyucuk:** *S. Typhimurium* (H:i)=250 bp, **5 nolu kuyucuk:** (H:l,v)=300 bp, **6 nolu kuyucuk:** *S. Infantis* (H:r)=275 bp,



Resim 4. Faz 2 mPCR jel görüntüsü: Marker (Fermentas; 50bp), **1 nolu kuyucuk:** *S. Infantis* (H:1,5)=100bp, **2 nolu kuyucuk:** *S. Livingstone* (H:l,w)=250 bp, **3 nolu kutu:** deionized water (negative control), **4 nolu kutu:** *S. Liverpool* (H:e,n,z15): 150 bp, **5 ve 7 nolu kuyucuk:** *S. Typhimurium* (H:1,2)=400 bp, **6 nolu kuyucuk:** *S. Bariely* (H:1,5), **8 nolu kuyucuk:** *S. Schwarzengrund* (H:1,7)= 300bp

Tartışma

Son çeyrek yüzyıl içerisinde; *Salmonella*ların PZR-tabanlı yöntemlerle tiplendirmesi üzerine çalışmalar yapılmaktadır. *Salmonella* serotipleri arasında veya özel bir serotip içerisinde ayırım yapmak için tanımlanan PZR-tabanlı metotlar optimize edilmiştir. (1, 7, 12, 18, 19, 24). PCR-tabanlı metotlar ile direk somatik antijenlerin (10, 11, 14, 21), ve/veya flagellar antijenlerin (4, 5, 9) tespit edilmesine yönelik çalışmalar da mevcuttur.

Çalışmada, gold standart bir metot olan konvansiyonel serotiplendirmeye optimize edilen multiplex-PZR'larının doğru tiplendirme açısından geçerliliği sorgulandığında toplam 907 izolatin, 490'unda (%54.56) (28 farklı serovar) somatik antijen tam olarak tespit edilmiştir. Benzer bir şekilde, Herrera-Leon ve ark. (10), yaptıkları çalışmada, multiplex-PZR ile 500 *Salmonella* izolatinın 423'nü serogruplandırabildiklerini bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar, özellikle O-antijenini kaybedip rough suşa dönüşen veya flagellar antijenlerini eksprese etmeyen ve monofazik veya hareketsiz duruma geçen *Salmonella*ların konvansiyonel yöntemle tanısına gidemeyen, multiplex-PZR ile tespit edebildiklerini bildirmişlerdir. Konvansiyonel serotiplendirme ile karakterize edemedikleri 1 otoaglutinasyon veren, 4 tane de hareketsiz *Salmonella* *Enteritidis* suşunu tiplendirdiklerini ortaya koymuşlardır. Geleneksel tiplendirme metodu ve moleküler serotiplendirme arasında korelasyon % 99.2 olarak bildirmiştir (10). Bu çalışmada benzer örnekleri çalışma olanağımız olmasa da, mukoid bir *Salmonella* suşunun konvansiyonel yöntemlerle tiplendirmesinin yapılamadığı bir olguda multiplex-PZR ile tiplendirdiğimiz ve *S. Enteritidis* olarak isimlendirdiğimiz izolatla Leon ve ark. (2007)'nin (10) yaptıkları çalışmayı destekler sonuçlar elde edilmiştir (3).

Faz1 multiplex-PZR'nun tiplendirmede randımanı değerlendirildiğinde, 825 (%54.56) izolatin faz 1 antijenlerinin tam olarak belirlenebildiği saptandı. Çalışmamızla örtüşür şekilde; Herrera-Leon ve ark. (9), optimize ettikleri Faz 1 multiplex-PZR'nda İspanya'daki *Salmonella* izolatlarının % 80'ninin faz 1 antijenini doğru olarak tespit edebildiklerini ortaya koymuşlardır. Ancak, çalışmada faz-1 multiplex-PZR'nda reaksiyonda yer alan primer çiftlerinden H:d primer çiftinin amplifiye olmadığı tespit edildiğinden reaksiyon dışı bırakılmıştır. 82 izolatta flagellar 1 antijeninin tespit edilememesi, ya flagellar 1 antijeninin H:d olması veya H:G, H:z10, H:l,v, H:r, H:i, H:e,h, H:b antijenleri dışındaki flagellar 1 antijenine sahip olması kaynaklıdır. Çünkü mevcut primer çiftleri ancak 7 adet faz 1 antijenini tiplendirebilmektedir.

İncelenen izolatlardan 716'sının (%78.94) faz 2 antijenleri belirlenebilirken, faz2-multiplex-PZR'da H:e,n,x faz 2 antijenini kodlayan primer çifti amplifiye olmadığı için reaksiyon dışı bırakıldı.

dı. Çalışmamıza benzer şekilde, Echeita ve ark. (5), 10 primer çifti ile 49 farklı serotipe ait toplam 140 *Salmonella* izolatu ile yaptıkları çalışmada, multiplex-PZR ile % 100 sensitivite ve spesifite ile Faz 2 antijenlerini belirlediklerini bildirmişlerdir. Bu çalışmada tiplendirilemeyen 191 izolatın flagellar 2 antijenleri ise ya H:e,n,x ya da H:1,2, H:1,5, H:1,6, H:1,7, H:1,w ve H:e,n,z15 faz2 antijenleri dışındaki flagellar 2 antijenlerine sahip olması kaynaklıdır. Çünkü mevcut primer çiftleri ancak 6 faz 2 antijeni ni tiplendirebilmektedir.

S. Infantis ve *S. Mbandaka* suşlarında ise faz 1 ve faz 2 antijenleri tam olarak tespit edilebilmiştir. Ancak, O:7 somatik antijeni amplifiye eden primer mevcut olmasına rağmen, somatik antijenin bu iki izolatta tiplendirilememesi nedeniyle, bu iki serovarın tam ismi verilememiştir. Tiplendirilemeyen bu iki izolat, ribotiplendirmeye alındığında, 68 adet *S. Mbandaka* izolatu doğru olarak belirlenirken, 324 adet *S. Infantis* izolatının 12 adedi (% 4) *S. Bareilly* olarak isimlendirilmiştir. Bu çalışmadaki amaçlardan biri de multiplex-PZR ile tiplendirilemeyen suşları, serotiplendirme dışındaki başka bir metotla tiplendirmektir. Hem Multiplex-PZR'ların hem de ribotiplendirmenin doğruluğu gold standart metot olan Kauffman- White şemasına göre antiserumlarla yapılan serotiplendirme sonuçlarına göre değerlendirildi. Oniki izolatın *S. Bareilly* olarak bulunması konvansiyonel serotiplendirme metodu ile örtüşmemektedir. Benzer duruma Şahan ve ark. (22), 140 *Salmonella* izolatını klasik serotiplendirme ve pvuII enzimi kullanarak ribotiplendirme protokolü uyguladıkları çalışmalarında, *S. Infantis* suşlarını her iki metotla karşılaştırmıştır. Araştırmacılar, 119 izolatı konvansiyonel serotiplendirme metodu ile uyumlu bulduklarını, 16 suşun *S. Infantis*'e % 85'in altında benzerlik gösterdiğini ancak en yakın

tür olarak *S. Infantis*'e dahil ettiklerini, ilk denemede *S. Infantis* olarak belirlenemeyen 5 izolatın ikinci denemede 3'ünün *S. Infantis* olarak tespit edildiğini, geriye kalan 2 izolatın ise *S. Mbandaka* olarak tanımlanabildiğini bildirmişlerdir. 324 izolatın %96.3'ü seroloji ile uyumlu bulunurken, %3.70'lik farkın ise istatistiki olarak anlamlı bulunmadığını raporlamışlardır.

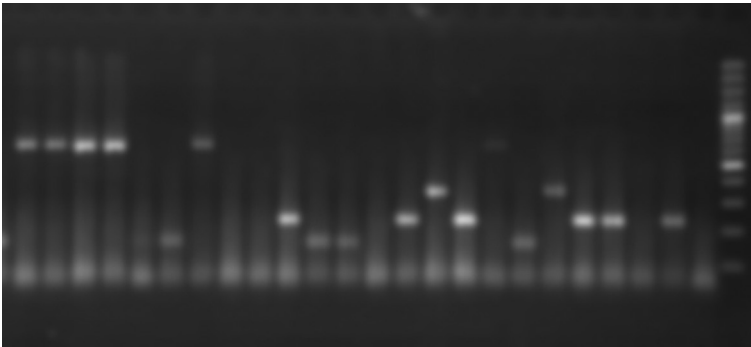
Tüm izolatların % 29.32'sinin (266 izolat; 15 farklı serovar) üç antijenik yapısı da tam olarak tanımlanabildiği, isimlendirilebilmiştir. İncelenen izolatların somatik, flagellar 1 ve flagellar 2 antijenlerinin sırasıyla; %54.56 (490), %90.95 (825) ve %78.94 (716)'ü tespit edilebilmiştir. Multiplex-PZR ve ribotiplendirme sonuçları değerlendirildiğinde, gold standart serolojik metoda alternatif değil, ancak destek bir metot olarak kullanılabilmesi sonucuna varılmıştır.

Sonuç

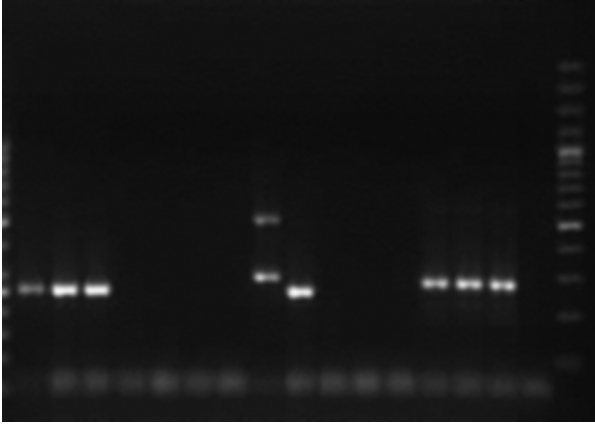
Bu çalışmayla daha düşük maliyetle, daha kısa sürede, duyarlılığı ve özgünlüğü yüksek destekleyici bir metotla *Salmonella*ların tiplendirilmesi yapılabilmektedir. Gönderilen izolatların birden fazla *Salmonella* serovarı taşıdığı durumlar ya da serovarlar arası çapraz reaksiyonlar gibi olumsuzlukların önüne geçilmesi sağlanmış olacağı görülmektedir. Özellikle O-antijenini kaybedip rough suşa dönüşen veya flagellar antijenlerini eksprese etmeyen ve monofazik veya hareketsiz duruma geçen *Salmonella*ların tiplendirmesinde seroloji ile yaşanan aksaklıkların ortadan kaldırılabilmesine olanak sağlanmaktadır.

Teşekkür

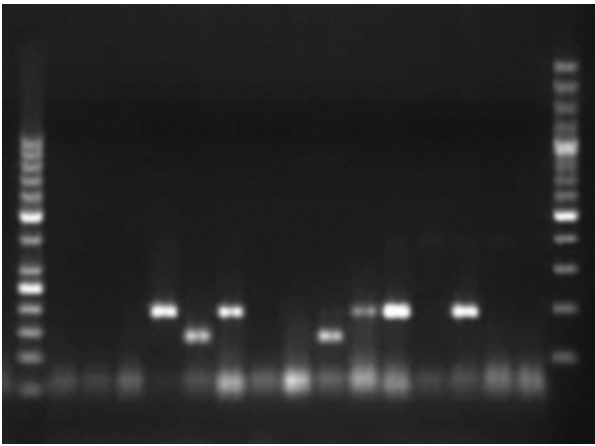
Bu çalışma, TAGEM/ HSGYAD/13/A07/P02/26 nolu proje ile desteklenmiştir.



Resim 5. Numunelerin Serogrup mPCR jel görüntüsü



Resim 6. Numunelerin Faz 1 mPCR jel görüntüsü



Resim 7. Numunelerin Faz 2 mPCR jel görüntüsü

Kaynaklar

- Aarts HJ, LA Van Lith, J. Keijer, (1998). *High resolution genotyping of Salmonella strains by AFLP-fingerprinting*. Lett Appl Microbiol, 26, 131-135.
- Bastin DA, Reeves PR, (1995). *Sequence and Analysis of the O antigen gene (rfb) cluster of Escherichia coli O111*. Gene, 16, 17-23.
- Bayindir Bilman F, Gunaydin E, Turhanoglu M, Akkoc A, (2014). *The Value of PCR Method in the Species-Level Identification of a Mucoïd Salmonella sp. Strain Isolated from the Urine Culture of a Case with Asymptomatic Nephrolithiasis*. Mikrobiol Bul, 48(1), 151-159.
- Echeita MA and Usera MA, (1998). *Rapid Identification of Salmonella spp. phase 2 antigens of the H1 antigenic complex using 'multiplex PCR'*. Res Microbiol, 149, 757-761.
- Echeita MA, Herrera S, Garazier J and Usera MA, (2002). *Multiplex PCR- based detection and identification of the most common Salmonella-second-phase flagellar antigens*. Research in Microbiol, 153, 107-113.
- Fitzgerald C, Sherwood R, Gheesling LL, Brenner FW, Fields PI, (2003). *Molecular analysis of the rfb O antigen gene cluster of Salmonella enterica serogroup O:6,14 and development of a serogroup-specific PCR assay*. Appl Environ Microbiol, 69(10), 6099-105.
- Grazier J, Lopez-Molina N, Laconcha I, Bagessen DL, Rementeria A, Vivanco A, Audicana I, Perales A, (2000). *Suitable of PCR fingerprinting, Infrequent-Restriction-Site PCR, and Pulsed-Field Gel Electrophoresis, combined with computerized gel analysis, in library typing of Salmonella enterica serovar Enteritidis*. Appl Environ Microbiol, 66, 5273-5281.
- Guibourdenche M, Roggentin, P Mikoleit M, Fields PI, Bockemühl J, Grimont PA.D, Weill François-Xavier, (2010). *Supplement 2003-2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme*. Res Microbiol, 161(1), 26-9.
- Herrera-Leon S, McQuiston JR, Usera MA, Fields PI, Garazier J and Echeita MA, (2004). *Multiplex PCR for Distinguishing the Most Common Phase-1 Flagellar Antigens of Salmonella spp.* J Clin Microbiol, 42(6), 2581-2586.
- Herrera-Leon S, Ramiro R, Arroyo M, Diez R, Usera MA, Echeita MA, (2007). *Blind comparison of traditional serotyping with three multiplex PCRs for the identification of Salmonella serotypes*. Research in Microbiology, 158, 122-127.
- Hong Y, Liu T, Lee MD, Hofacre CL, Maier M, White DG, Ayers S, Wang L, Berghaus R, Maurer JJ, (2008). *Rapid screening of Salmonella enterica serovars Enteritidis, Hadar, Heidelberg and Typhimurium using a serologically-correlative allelotyping PCR targeting the O and H antigen alleles*, BMC Microbiol, 8, 178.
- Lindstedt BA, Heir E, Vardund T, Kapperud G, (2000). *Fluorescent amplified-fragment length polymorphism genotyping of Salmonella enterica subsp. enterica serovars and comparison with pulsed-field gel electrophoresis typing*. J Clin Microbiol, 38, 1623-1627.
- Lino T, (1997). *Genetics of structure and function of bacterial flagella*. Anu Rev Genet, 11, 161-182.
- Luk JM, Kongmuang U, Reeves PR, Lindberg AA, (1993). *Selective amplification of abequose and paratose synthase genes (rfb) by polymerase chain reaction for identification of Salmonella major serogroups (A, B, C2, and D)*. J Clin Microbiol, 31, 2118-2123.
- Marolda CL, Vicarioli J, Valvano MA, (2004). *Wzx proteins involved in biosynthesis of O antigen function in association with the first sugar of O specific lipopolisaccharide subunit*. Microbiology, 150, 4095-4105.
- Newton S, MRD Wasley, A Wilson, LT Rosenberg, JF Miller, and BA Stocker, (1991). *Segment IV of a Salmonella flagellin gene specifies flagellar antigen epitopes*. Mol Microbiol, 5, 419-425.
- Patrick AD Grimont & François-Xavier Weill, (2007). *Kauffmann-White Scheme Antigenic formulae of the Salmonella serovars*, 9th edition, Institut Pasteur, 28 rue du Dr. Roux, 75724 Paris Cedex 15, France.

18. Ranjbar R, Mortazavi SM, Mehrabi Tavana A, Sarshar M, Najafi A, Soruri Zanjani R, (2017), Simultaneous Molecular Detec-tion of Salmonella enterica Serovars Typhi, Enteritidis, Infantis, and Typhimurium. Iran J Public Health, 46(1),103-111.
19. Reeves MW, Evins GM, Heiba AA, Plikaytis BD, Farmer JJ, (1989). *Clonal nature of Salmonella typhi and its genetic relatedness to other salmonellae as shown by multilocus enzyme electrophoresis, and proposal of S. bongori comb. J Clin Microbiol*, 35, 2786-2790.
20. Samuel G, Reeves PR, (2003). *Biosynthesis of O-antigens: genes and pathways involved in nucleotide sugar precursor synthesis and O-antigen assembly*, Carbohydr Res, 338, 2503-2519.
21. Shah DH, Park JH, Cho MR, Kim MC, Chae JS, (2005). *Allele-specific PCR method based on rfbS sequence for distinguishing Salmonella gallinarum from Salmonella pullorum: serotype-specific rfbS sequence polymorphism*. J Clin Microbiol, Methods, 60, 169-177.
22. Şahan Ö, Müştak K, Torun E, Akan M, Diker S. *Salmonella* Infantis tanısında ribtiplendirme ve serotiplendirme yöntemlerinin karşılaştırması. 10. Uluslararası Veteriner Hekimleri Mikrobiyoloji Kongresi, 24-27 Eylül 2012, Kuşadası, AYDIN
23. Wei LN, and TM Joys, (1995). *Covalent structure of three phase-1 flagellae filament proteins of Salmonella spp. J Mol Biol*, 186, 791-803.
24. Zappellini L, Martone-Rocha S, Dropa M, Matté MH, Tiba MR, Breternitz BS, Razzolini MT, (2017). *Effective characterization of Salmonella Enteritidis by most probable number (MPN) followed by multiplex polymerase chain reaction (PCR) methods*, Environ Sci Pollut Res Int, 24(5), 4828-4834.
25. Zieg J, Silverman M, Hilmen M and Simon M, (1977). *Recombinational switch for gene expression*. Science, 196, 170-172.

Molecular Characterization and Phylogenetic Analysis of Canine Parvovirus 2 in Dogs, Mersin Province, Turkey

Ender Dinçer

Mersin University, Advanced Technology Education, Research and Application Center, Mersin

Geliş Tarihi / Received: 10.10.2017, Kabul Tarihi / Accepted: 02.11.2017

Abstract: Canine parvovirus type 2 (CPV-2) is a highly contagious and lethal viral disease with acute gastroenteritis in young dogs. After it first appeared in USA in 1978, continuous evolution of virus genome has arisen new genetic and antigenic variants such as CPV-2a, CPV-2b, new CPV-2a, new CPV-2b and CPV-2c throughout the world. The aim of the present study was to detect CPV-2 genetic variants from blood samples of clinically ill dogs and to characterize CPV-2 genetic variants circulating in Mersin province (Turkey), by partial sequence analysis of VP2 gene. A total of 20 blood samples were collected from dogs with gastroenteritis from local veterinary clinics between April 2017 to September 2017. Out of 20, 7 samples were positive for CPV-2 genomic DNA using conventional PCR. Amino acid comparisons showed that Ile-324 mutation was detected in the VP2 of clinical CPV-2b samples, as differ previously studies Turkish genetic variants. A phylogenetic tree constructed based on VP2 gene sequences indicated that CPV-2b sequences from Mersin province were related to Indian genetic variants. Moreover, CPV-2b sequences from Mersin have clustered separately from other Turkish CPV-2b genetic variants previously reported. The results show that CPV-2b genetic variant is circulating among in dogs in Mersin province.

Key words: Canine parvovirus, dog, phylogenetic analysis, VP2 gene.

Türkiye’de Mersin İlinde Köpeklerde Canine Parvovirus 2’nin Moleküler Karakterizasyonu ve Filogenetik Analizi

Özet: Canine parvovirus 2 (CPV-2) genç köpeklerde akut kanlı gastroenteritis ile seyreden oldukça bulaşıcı ve ölümcül bir viral hastalıktır. 1978’de ABD’de ilk ortaya çıktıktan sonra, virus genomunun sürekli evrimi, tüm dünyada CPV-2a, CPV-2b, new CPV-2a, new CPV-2b ve CPV-2c gibi yeni genetik ve antijenik varyantların ortaya çıkmasına yol açmıştır. Bu çalışmanın amacı, Mersin (Türkiye) ilinde klinik olarak hasta köpeklerin kan örneklerinde CPV-2’yi tespit etmek ve dolaşımda olan CPV-2 genetik varyantlarının karakterizasyonunu sağlamaktır. Bunun için 2017 Nisan ve 2017 Eylül ayları arasında, yerel kliniklerden 20 adet kan örneği gastroenteritisli köpeklerden toplandı. 20 örneğin 7’si PZR ile CPV-2 yönünden pozitif olarak test edildi. Klinik CPV-2b örneklerinin VP2’indeki amino asit karşılaştırmaları sonucunda daha önce çalışılan Türk soylarından farklı olarak Ile-324 mutasyonu tespit edildi. VP2 geni dizinlerinden köken olarak yapılan filogenetik ağaç, Mersin ilinden gelen CPV-2b dizilerinin Hindistan genetik varyantlarıyla ilişkili olduğunu göstermiştir. Aynı zamanda Mersin ilinden elde edilen CPV-2b dizinleri daha önce tespit edilen Türk genetik varyantlarından farklı bir dal şekillendirmiştir. Bu sonuçlar Mersin ilinde CPV-2b genetik varyantının köpekler arasında dolaştığını göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Canine parvovirus, köpek, filogenetik analiz, VP2 gen.

Introduction

Canine parvovirus 2 (CPV-2) is small, non-enveloped, single-stranded DNA virus, belonging to genus *Parvovirus*, the family *Parvoviridae* with genome of 5, 2 Kb in length. CPV-2 has two open reading frames (ORFs). One of them encodes non-structural proteins (NS1, NS2) and the other encodes structural proteins (VP1, VP2). Amino acid changes in the VP2 protein, main viral protein of capsid, alter the antigenic properties of the virus in determining the viral host distribution and tissue tropism [6, 13].

After the emergence of the CPV-2 in 1978, two new genetic variants (CPV-2a and CPV-2b) were characterized in 1979 and 1984, respectively. Monoclonal antibodies can distinguish as CPV-2a (426Asn) and CPV-2b (426Asp) by amino acid substitution in the capsid protein gene. In 2000, CPV-2c (Asp-426 to Glu) is a new genetic variant was detected in Italy [6, 11]. These three genetic variants occur in dogs throughout the world; CPV-2a was found in Nigeria, South Africa, Turkey, Greece and other European countries [14]. CPV-2b was reported from USA, Turkey and China [6, 23]. Moreover,

CPV-2c has been reported in Italy, Spain, Germany, the United Kingdom, the United States, Australia, Portugal, Vietnam and some other European countries [1,5,7,10,12,13,19].

CPV-2 is a highly contagious disease that causes acute hemorrhagic enteritis and myocarditis in dogs with high fatality rate ranges from %24 to %43 [26, 27]. The virus is usually transmitted through direct contact from dog to dog or acquired indirectly environment contaminated with feces [27]. Although CPV-2 is common in all dogs, puppies between 6 weeks and 6 months are more susceptible to disease. The incubation period of disease is between 3 and 7 days and main characteristics of the disease are depression, loss of appetite, fever, vomiting, hemorrhagic diarrhea and dehydration. Vaccination is main method of protection from disease. Commercial vaccines are available for CPVs genetic variants worldwide and are able to protect against 4 genetic variants; CPV, CPV - 2a, CPV-2b and CPV- 2c respectively [13]. CPV vaccines (Vanguard, Pfizer; Nobivac, Intervet; Parvodog, Merial; Quantum, Schering) used for dogs include 2a and 2b genetic variants in Turkey. However, anti-

genetic changes occurring in the VP2 protein of CPV reduce efficacy of vaccine in dogs [23]. Mutations such as 87, 101 297, 300,305, 323, 324, 426, 440, 555 occurring of VP2 protein of CPV result in new genetic variant and pathogenic features [21, 25]. Carmichael et al.,[3] reported that CPV -2 variants were detected higher titres than original virus in faeces of naturally infected dogs.

The aim of the present study was to detect CPV from blood samples of dogs and to characterize CPV genetic variants circulating in Mersin province (Turkey), by partial sequence analysis of VP2 gene.

Materials and Methods

1. Sample collection

Blood samples (n=20) were obtained from local veterinary clinics in Mersin province between April and September 2017. Anticoagulated blood samples were centrifuged at 3000 rpm for 7 minutes and the buffy coat was collected and stored at -20°C until use. Individual information such as age, gender, breed, clinical symptoms and vaccination history about the animals involved the study is given in Table 1.

Table 1. Year, sample type, Age, gender, vaccination status, clinical sings of dogs infected and non - infected with CPV - 2b (F: Female, M: Male, NV: Non - vaccinated).

Year	Sample type	Age(month)	Sex	Vaccination status	Clinical symptoms	Type	Breed
2017	Blood 1	1,5ay	M	NV	Depression, vomiting	-	Mix
2017	Blood 2	2ay	F	NV	Diarrhea	CPV -2b	Mix
2017	Blood 3	2ay	F	NV	Anorexia, anemia depression	-	golden retriever
2017	Blood 4	3ay	M	NV	Anorexia, vomiting	-	german shepherd
2017	Blood 5	1,5	F	NV	diarrhea	CPV -2b	german shepherd
2017	Blood 6	5ay	M	NV	Anorexia, Diarrhea	-	Mix
2017	Blood 7	2ay	M	NV	Diarrhea	-	Mix
2017	Blood 8	3ay	M	NV	Diarrhea	-	rottweiler
2017	Blood 9	1,5	F	NV	Diarrhea	-	pointer
2017	Blood 10	3ay	F	NV	Anorexia, vomiting	-	pointer
2017	Blood 11	2ay	F	NV	Anorexia, vomiting	CPV -2b	Mix
2017	Blood 12	1,5	M	NV	Depression, vomiting	CPV -2b	Mix
2017	Blood 13	2ay	M	NV	Diarrhea	CPV -2b	golden retriever
2017	Blood 14	1,5	M	NV	Diarrhea	-	golden retriever
2017	Blood 15	2ay	F	NV	Vomiting, diarrhea	-	Mix
2017	Blood 16	2ay	M	NV	Anorexia, depression	CPV -2b	Mix
2017	Blood 17	3ay	M	NV	Diarrhea	-	Mix
2017	Blood 18	1,5ay	M	NV	Vomiting	CPV -2b	golden retriever
2017	Blood 19	2ay	F	NV	Vomiting	-	rottweiler
2017	Blood 20	5ay	M	NV	Anorexia, Diarrhea	-	rottweiler

2. Template DNA Preparation and PCR

Nucleic acids were extracted from 200µL blood samples using High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) following the manufacturer's recommendations. Purified DNAs were stored at -20°C until PCR. The PCR targeting partial VP2 gene (629bp) was performed as described elsewhere [2]. Amplified PCR products were visualized under ultraviolet light via ethidium bromide staining after electrophoresis using in %1 agarose gel in TAE (Figure 1). Consequently, 100µL amplicon from each sample was purified using a commercial kit (GeneJET, Thermo Scientific, Lithuania) according to manufacturer's instructions. Purified DNA was used for DNA sequencing and subsequent phylogenetic analysis.

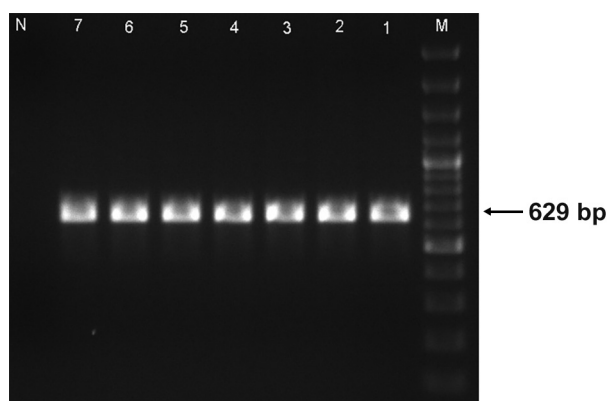


Figure 1. Agarose gel image of the PCR products (629 bp) of Canine parvovirus DNA using by Hfor and Hrev primers. Lane M: 100bp DNA ladder (Thermoscientific, USA); Lane: 1 - 7 positive samples; Lane 8: Negative control.

3. DNA sequencing and phylogenetic analysis

Sequencing was performed in ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystem, CA) using same primers that were used in the PCR. The

obtained DNA sequences were compared to other CPV sequences available from GenBank Database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Alignment and pairwise comparisons were carried out in CLC Main Workbench v7.7 (CLCBio, Aarhus, Denmark). Phylogenetic tree was drawn in MEGA software v.6.06 using neighbor-joining (NJ) method and bootstrap values were calculated with 1,000 replicates [19].

Results and Discussion

Twenty dogs with clinically defined gastroenteritis (especially vomiting and diarrhea) signs were tested with conventional PCR assay for the presence of CPV-2. Seven (35%) of the dogs were CPV-2 positive. Samples from negative dogs were not re-investigated for the other etiological causes of gastroenteritis. CPV- 2 positive dogs were between 1, 5 and 5 months old. Four of the positive dogs were male and three were female. According to the information received from the pet clinics, no vaccination was administrated to dogs. Breeds of dogs involved the study were recorded as Rottweiler, Golden Retriever, Pointer, German Shepherd and mix breed (Table 1).

Conventional PCR was carried out using Hfor and Hrev primers. Sequence analysis of PCR amplicons were performed with same primer sets. The obtained sequence results were compared to gene bank reference sequences (Figure 2). Phylogenetic (NJ) analysis revealed that all CPV-2 detected in the study were found to be CPV-2b. Other genetic variants (CPV-2a and CPV-2c) were not identified in the study. In order to investigate the variations occurring on VP2 gene, reference strain (GenBank Accession # M38245) was compared to amino acid residues obtained from clinical samples (Table 2).

Table 2. Amino acid changes in VP2 partial gene of CPV - 2b type

Aa no.	297	300	305	324	336	375	426	440
M38245	S	A	D	Y	A	N	N	T
P5	A	G	Y	I	G	D	D	A
P12	A	G	Y	I	G	D	D	A
P2	A	G	Y	I	G	D	D	A
P13	A	G	Y	I	G	D	D	A
P18	A	G	Y	I	G	D	D	A
P11	A	G	Y	I	G	D	D	A
P16	A	G	Y	I	G	D	D	A
Aa change	TCT→GCT S→A*	GCT→GGT A→G*	GAT→TAT D→Y*	TAT→ATT Y→I*	GTA→GTG V→V	AAT→GAT N→D*	ATT→GAT N→D*	ACA→GCA T→A*

Amino acid substitutions are indicated by asterisks (*).

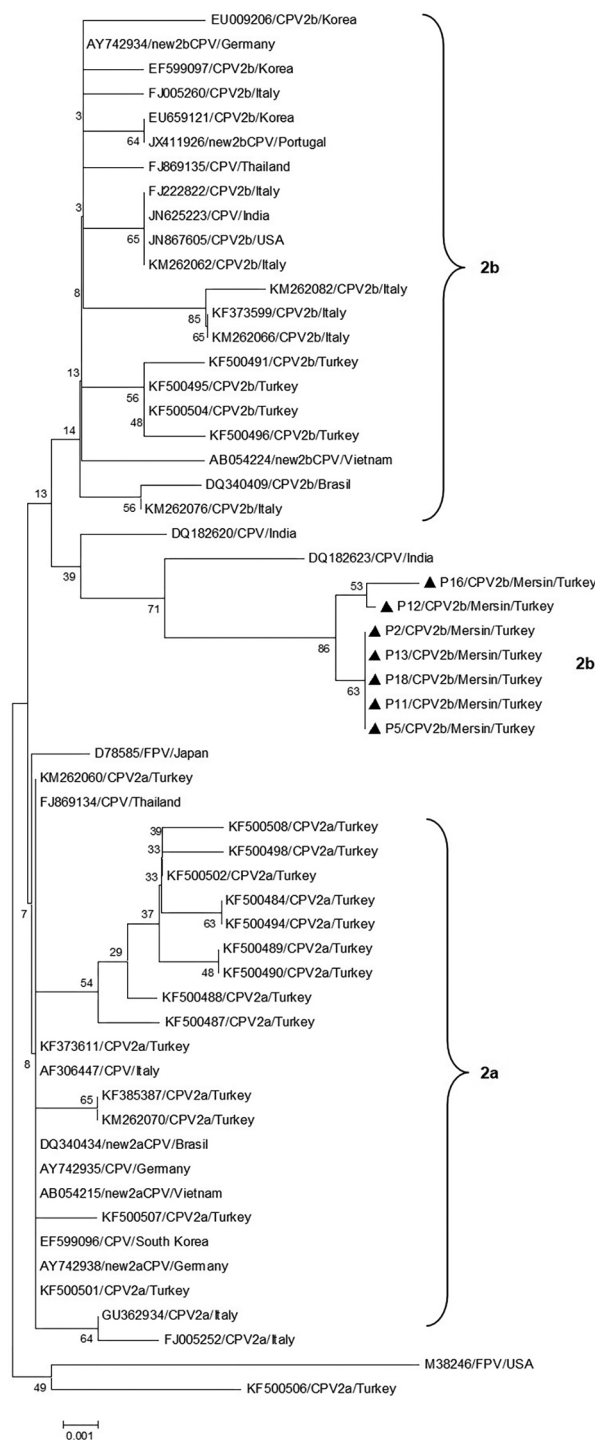


Figure 2. Neighbor joining tree (Mega 6) was constructed using canine parvovirus partial VP2 gene sequences under study (consensus sequences are indicated *filled triangle* in this study) and reference sequences.

Amino acid analysis revealed that all positive specimens were had a substitution N426D, which is characteristic of CPV-2b variant (A→G transver-

sion). Nucleotide variation at position 948 resulted in A→G (synonymous mutation) codon change from GTA→GTG, they both encode the same amino acid (V→V). In this study, substitutions were detected in S297A (nt3675), A300G (nt3685), D305Y (nt3699), Y324I (nt3757), N375D (nt3912) and T440A (nt4104) (Table 2). The residue T440A, which is known to be main antigenic site of the virus, locates at the three-fold spike on VP2 protein [6]. Synonymous and non-synonymous mutations have been described previous studies [6, 11, 17, 24, 26]. However, mutation in residue Y324I was the first reported in Turkey genetic variants (Table 2). The Y324I mutation has been reported in CPV genetic variants in China, India, Korea and Japan [10, 16, 18, 22]. It was reported that residue 324 shows strong positive selection all carnivore parvovirus. [8, 9]. It is adjacent to residue 323, which is responsible for host range like previously reported [6, 13, 23] and residue 93, which determines the host distribution with binding canine transferrin receptor (TrR) [16]. As a result, residue 324 mutation may have a role on CPV host range together with residue 323 and 93. Although the function of the residue 324 is not fully known, Lin et al., [9] reported that Ile324 mutation resulted in viral shedding up to 63 days in dogs. These mutations can lead to changes in the VP2 protein of CPV and cause new genetic variants. Moreover, the emergence of new genetic variants reduces the efficacy of vaccines used in the field [15].

Phylogenetic tree indicated that all CPV-2b genetic variants in Mersin province were close-related and allocated in a separate branch (Figure 2). Comparison of CPV-2b VP2 sequences obtained from clinical samples were 99% identical to each other and CPV-2b sequences detected in this study were associated with 98% identical to Indian sequences.

CPV-2 is highly infectious and deadly viral disease of dogs seen in many countries around the world. Study performed in Greece showed that all three CPV-2 genetic variants (CPV-2a, 2b and 2c) are circulating in dogs [11]. In one of the most recent investigation Dei Giudici et al., [6] performed in dogs and cats, all variants CPV- 2a/2b/2c have been shown to be in circulation by conventional PCR. Another study carried out in Lithuania re-

vealed CPV-2a and 2b genetic variants are present in dogs [26]. Moreover, CPV-2a has been reported in rectal swaps obtained from dogs in India [17]. In Turkey, there is limited number of studies on CPV genetic variants in dogs [21, 22, 23]. Timurkan et al., [20] carried out the first molecular characterization of CPV-2a and CPV-2b genetic variants in Ankara province. Results of the study showed presence of CPV-2b genetic variant in dogs in Mersin province. All of these investigations show that the CPV-2a and CPV-2b are predominant strains in dog population in Turkey and CPV-2c variant has not yet been identified in Turkey so far. Further molecular and epidemiological studies are needed to determine on CPV infections and to characterize circulating types in dogs.

In conclusion, the presence of amino acid mutations suggests that the virus has evolved continuously. Although parvovirus is a DNA virus, it has high genetic substitution rate, which causes emerging new genetic variants as well as RNA viruses [5]. Differences between field and vaccine strains are the most important reason for some immune failures [17]. Periodic epidemiological survey and molecular studies can be identified new CPV-2 genetic variants and mutations. In addition, comparison of strains obtained from different geographical areas can be provided the development of used vaccines and CPV 2 infections can be effectively controlled in the country.

References

1. Apaa TT, Daly JM, Tarlinton RE, (2016). *Canine parvovirus (CPV-2) variants circulating in Nigerian dogs*. Vet Rec Open. 3, 1 -4.
2. Buonavoglia C, Martella V, Pratelli A, Tempesta M, Cavalli A, Buonavoglia D, Bozzo G, Elia G, Decaro N, & Carmichael L, (2001). *Evidence for evolution of canine parvovirus type 2 in Italy*. J Gen Virol. 82, 3021 - 3025.
3. Charmichael LE, (1994). *Canine parvovirus type -2. An evolving pathogen of dogs*. Ann Vet Med. 135, 459- 464.
4. Decaro N, Martella V, Desario C, Bellacicco AL, Camero M, Manna L, D'Aloja D, Buonavoglia C, (2006). *First detection of canine parvovirus type C in pups with haemorrhagica enteritis in Spain*. J Vet Med. 53, 468-472.
5. Decaro N, Desario C, Addie DD, Martella V, Vieira JM, Elia G, Zicola A, Davis C, Thompson G, Thiry E, Truyen U, and Buonavoglia C, (2007). *Molecular Epidemiology of Canine Parvovirus, Europe*. Emerg Infect Dis. 13, 1222 - 124.
6. Dei Giudici S, Cubeddu T, Giagu A, Sanna G, Rocca S, Oggiano A, (2017). *First molecular characterization of canine parvovirus strains in Sardinia, Italy*. Arch Virol. 017, 3457-3.
7. Hong C, Decaro N, Desario C, Tanner P, Pardo CM, Sanchez S, Buonavoglia C, Saliki TJ, (2007). *Occurrence of canine parvovirus type 2c in the United States*. J Vet Diagn Invest. 19, 535-539.
8. Horiuchi M, Goto N, Ishiguro M, Shinagawa J, (1994). *Mapping of determinants of the host range for the canine cells in the genome of the canine parvovirus using canine parvovirus/mink enteritis virus chimeric viruses*. J Gen Virol. 75, 1319 - 1328.
9. Lin CN, Chien CH, Chio MT, Chueh LL, Hung MY, Hsu HS, (2014). *Genetic characterization of type 2a canine parvovirus from Twaiwan reveals the emergence of an ile324 mutation in VP2*. Virol J. 11, 39.
10. Jeoung S, Ahn S, Kim D, (2008). *Genetic analysis of VP2 gene canine parvovirus isolates in Korea*. J Vet Med Sci. 70, 719 - 722.
11. Ntafis V, Xylouri E, Kalli I, Desario C, Mari V, Decaro N, Buonavoglia C, (2010). *Characterization of Canine parvovirus 2 variants circulating in Greece* J Vet Diagn Invest. 22, 737-740.
12. Martella V, Decaro N, Elia G, Buonavoglia C, (2005). *Surveillance activity for canine parvovirus in Italy*. J Vet Med. 52, 312-315.
13. Meers J, Kyaw-Tanner M, Benzink Z, Zwijnenberg R, (2007). *Genetic analysis of canine parvovirus from dogs in Australia*. Aust Vet J. 85, 392-396.
14. Miranda C, and Thompson G, (2016). *Canine parvovirus: the worldwide occurrence of antigenic variants*. J Gen Virol, 97, 2043 - 2057.
15. Mittal M, Chakravarti S, Mohapatra KJ, Chug KP, Dubey R, Upmanuy V, Narwal PS, Kumar A, Churamani CP, Kanwar SN, (2014). *Molecular typing of canine parvovirus strains circulating from 2008 to 2012 in an organized kennel in India reveals the possibility of vaccination failure*. Infec Genet Evol. 23, 1- 6.
16. Mukhopadhyay HK, Matta SL, Amsaveni S, Antony PX, Thanislass J, Pillai RM, (2014). *Phylogenetic analysis of canine parvovirus partial VP2 gene in India*. Virus Genes. 48, 89 - 95.
17. Raj MJ, Mukhopadhyay KH, Thanislass J, Antony XP, Pillai MR, (2010). *Isolation, molecular characterization and phylogenetic analysis of canine parvovirus*. Infec Genet Evol. 10, 1237 - 1241.
18. Soma T, Taharaguchi S, Ohinata T, Ishii H, Hara M, (2013). *Analysis of the VP2 protein gene of canine parvovirus strains from affected dogs in Japan*. Res Vet Sci. 94, 368 - 371.
19. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, and Kumar S, (2013). *MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0*. Mol Biol Evol. 30, 2725 - 2729.
20. Timurkan M, Oguzoglu T, (2015). *Molecular characterization of canine parvovirus (CPV) infection in Turkey*. Vet Ital. 51, 39 - 44.
21. U. Truyen, (2006). *Evolution of canine parvovirus-a need for new vaccines?* Vet Microbiol. 117, 9-13
22. Yesilbag K, Yilmaz Z, Ozkul A, & Pratelli A, (2007). *Aetiological role of viruses in puppies with diarrhoea*. Vet Rec. 161, 169 - 170.
23. Yilmaz Z, Pratelli A, & Torun S, (2005). *Distribution of antigen types of canine parvovirus type 2 in dogs with hemorrhagic enteritis in Turkey*. Turk J. Vet Anim Sci. 29, 1073 - 1076.
24. Zhang R, Yang S, Zhang W, Zhang T, Xie Z, Feng H, Wang S, Xia X, (2010). *Phylogenetic analysis of the VP2 gene of canine parvoviruses circulating in China*. Virus Genes. 40, 397- 402.
25. Zhao Z, Liu H, Ding K, Peng C, Xue Q, Yu Z, Xue Y, (2016). *Occurance of canine parvovirus in dogs from Henan province of China*. Vet Res. 12, 138 - 145.
26. Zienuis D, Lelesius R, Kavaliauskis H, Stankevicius A, Salomskas A, (2016). *Pol J Vet Sci*. 19, 187-196.
27. Zourkas E, Ward MP, Kelman M, (2015). *Canine parvovirus in Australia: A comparative study of reported rural and urban cases*. Vet Microbiol. 121, 198 - 203.

Türkiye'nin Nevşehir İlindeki Atlarda Kistik Ekinokokkoz Seroprevalansı*

Armağan Erdem Ütük¹, Selçuk Pekkaya², Fatih Kuzugüden³, İbrahim Balkaya⁴, Sami Şimşek⁵

¹Çukurova Üniversitesi, Ceyhan Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Adana, Türkiye

²Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü, Ankara, Türkiye

³İl, Gıda Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü, Nevşehir, Türkiye

⁴Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Erzurum, Türkiye

⁵Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Elazığ, Türkiye

Geliş Tarihi / Received: 28.10.2017, Kabul Tarihi / Accepted: 11.11.2017

Özet: Kistik ekinokokkoz (KE) son derece önemli bir paraziter zoonoz olup insan ve hayvanlarda ciddi ekonomik kayıplara neden olur. Türkiye'de hastalığın sığır, koyun, keçi gibi çiftlik hayvanlarında oldukça yaygın olduğu tespit edilmiştir. Ancak atlarda KE konusunda çok az çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmanın amacı Nevşehir ilinde halk elinde yetiştirilen atlarda KE seroprevalansını belirlemektir. Bu amaçla yaşları 3-24 arasında değişen, farklı ırklardan, 105 dişi attan kan alınarak serumları çıkarıldı. Enfekte koyun kistlerinden Antijen-B bakımından zengin kısmı purüfye kist sıvısı antijeni hazırlanarak enzimle-linked immunosorbent assay testinde (ELISA) kullanıldı. Tarama sonucunda 7 yaş ve altı atlarda %4,54 (2/44), 7 yaş üstü atlarda %6,55 (4/61) oranında anti-*Echinococcus granulosus* antikorları tespit edildi. Ki-kare (X^2) testi ile yaş grupları ile seroprevalans arasında istatistiksel açıdan önemli bir fark bulunmadı ($p > 0,05$). Genel seroprevalans ise %5,71 (6/105) olarak belirlendi. Elde edilen veriler bu bölgede atların da son konak köpekçiller için enfeksiyon kaynağı olabileceğini ve hastalığın epidemiyolojisi açısından önemli olduğunu ortaya koymuştur. Bu çalışma ile Nevşehir ilindeki atlarda ilk defa KE seroprevalansı belirlenirken, ülkemizde konuyla ilgili çok sınırlı sayıda bulunan literatür bilgiye bir yenisi eklenmiştir.

Anahtar kelimeler: At, ELISA, Kistik Ekinokokkoz, Nevşehir.

Seroprevalance of Cystic Echinococcosis in Horses in Nevşehir Province of Turkey

Abstract: Cystic Echinococcosis (CE) is a highly significant parasitic zoonosis and can cause dramatic economic losses in humans and animals. In Turkey, the disease has been detected and highly prevalent in farm animals such as cattle, sheep and goat; however, there is very little research on CE in horses. The aim of this study is to detect the seroprevalance of CE in horses bred by the locals in Nevşehir province. For this purpose, blood samples were taken from 105 female horses of different races, aged from 3 to 24 and their sera were obtained. Partially purified cyst fluid antigen from sheep hydatid cysts was used as antigen in enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). At the end of the screening, anti-*Echinococcus granulosus* antibodies were detected in %4,54 (2/44) of horses aged 7 and under, and in %6,55 (4/61) of horses above 7 years of age. With the use of Chi-Square Test (X^2), no statistically significant difference was found between age groups and seroprevalance ($p > 0,05$). The overall seroprevalance rate was detected as %5,71 (6/105). The data obtained indicate that the horses in this region may be a source of infection for the final host, the canidae and are significant for the disease epidemiology. This study detects for the first time the seraprevalance of cystic echinococcus in horses in Nevşehir province and contributes to the limited amount of literature related to this topic in Turkey.

Key words: Cystic Echinococcosis, ELISA, Horse, Nevşehir.

Giriş

Echinococcus granulosus son konakları köpek, tilki, çakal kurt gibi kanideler ara konakları ise insan, sığır, koyun, keçi, deve, geyik, domuz, at ve eşek gibi memeliler olan taenid bir sestodtur. Ara konaklardaki metasestodlar hidatik kist, bu metasestodların oluşturduğu hastalık ise kistik ekinokokkoz

(KE) adını alır. Kistik ekinokokkoz kozmopolit bir yayılışa sahiptir. Hastalık çiftlik hayvanlarında ciddi ekonomik kayıplara neden olur. İnsanlarda ise anaflaktik reaksiyonlar, çeşitli organ ve dokularda yapısal ve fonksiyonel bozukluklar ve bazen ölümler görülür. Bu nedenle önemli bir helmintik zoonoz ve halk sağlığı problemidir [4,7].

*: Bu çalışma 18-21 Ekim 2017 tarihleri arasında Alanya'da düzenlenen II. International Academic Research Congress'de sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

Yazışma adresi / Correspondence: Armağan Erdem Ütük, Çukurova Üniversitesi, Ceyhan Veteriner Fakültesi, Parazitoloji AD, Adana, Türkiye E posta: autuk@cu.edu.tr

Hidatidozun ara konaklardaki yaygınlığı kesimhane kontrolleri ve serolojik testler ile belirlenmektedir. Türkiye'de hastalığın sığır, koyun ve keçilerdeki yaygınlığı üzerine çok sayıda çalışma olmasına rağmen, at hidatidozu ile ilgili sınırlı sayıda veri bulunmaktadır [2,6]. Ekinokokkozun belirli bir bölgede ara konaklardaki yaygınlığının belirlenmesi hastalığın epidemiyolojisi ve etkin kontrol yöntemlerinin geliştirilmesi açısından önem arz eder. Bu çalışmanın amacı Nevşehir ilindeki atlarda kistik ekinokokkozun prevalansını indirekt ELISA yöntemi ile belirlemektir.

Materyal ve Metod

Çalışmanın materyalini halk elinde bulunan ve turistik amaçlarla yetiştirilen, yaşları 3-24 arasında değişen, farklı ırklardan 105 dişi at oluşturdu. Atlar 7 yaş ve altı (≤ 7) ile 7 yaş üstü (>7) olarak iki gruba ayrıldı. Yaş grupları ile seropozitiflik arasında istatistiksel açıdan ilişki bulunup bulunmadığını belirlemek için Ki-kare testi (X^2) yapıldı.

Çalışma için Etlik Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Yerel Etik Kurulundan 21.11.2015 tarih ve 2015/07 sayılı yazı ile izin alındı. Kan örnekleri atların *Vena jugularis*'inden vakumlu serum tüplerine alındı ve oda ısısında 2-3 saat pıhtılaşması beklendi. Pıhtılaşan kan 5000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Serumlar mikrosantrifüj tüplerine ayrıldı ve kullanılıncaya kadar $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 'de muhafaza edildi [16].

Mezbahada kesimler takip edilerek ağır enfekte olduğu tespit edilen bir koyundan elde edilen karaciğer laboratuara getirildi ve hidatik kist sıvısından antijen B (AgB) bakımından zengin kist sıvısı antijeni hazırlandı. Bu amaçla kist sıvısı steril koşullarda aspire edildi ve mikroskopta protoskoleklerin varlığı yönünden incelendi. Fertil olduğu belirlenen kistlerin sıvısı 2000 g'de 15 dk santrifüj edilerek protoskolekler ve diğer katı materyal çöktürüldü. 100 ml süpernatant bir gece $+4\text{ }^\circ\text{C}$ 'de 0.005 M asetat buffer (pH 5) içerisinde diyaliz edildi. Diyaliz sonucunda elde edilen kist sıvısı $+4\text{ }^\circ\text{C}$ 'de 15,000 g'de 30 dk santrifüj edildi. Pelet toplanarak 10 ml 0.2 M fosfat tamponunda (pH 8) çözdürüldü ve 15 dk kaynatılarak $+4\text{ }^\circ\text{C}$ 'de 20,000 g'de 1 saat santrifüj edildi. AgB bakımından zengin süpernatant porsiyon-

lanarak kullanılıncaya kadar $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 'de muhafaza edildi. Protein konsantrasyonu spektrofotometre ile ölçülerek (NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer) $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ olarak belirlendi [6,10].

Test küçük modifikasyonlarla Şimsek ve ark. [14]'a göre yapıldı. ELISA plaklarının (Dynatech Laboratories, IA, USA) her bir kuyucuğuna 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ antijeni ihtiva eden 0.1 M karnonat/bikarbonat tamponundan (pH 9.6) 100 μl eklendi ve $+4\text{ }^\circ\text{C}$ 'de bir gece inkube edildi. İnkubasyondan sonra plaklar 2 kere içerisinde 0.01% Tween-20 bulunan 130 μl PBS (yıkama solüsyonu) ile yıkandı. Her kuyucuğa 5% oranında yağsız süt tozu ihtiva eden 0.01 M PBS (pH 7.4)'den 130 μl eklendi ve $37\text{ }^\circ\text{C}$ 'de 1.5 saat inkube edilerek bloklama işlemi yapıldı. Bloklamadan sonra 3 kere yıkama işlemi yapıldı. Serum örnekleri 0.05% Tween-20 ihtiva eden PBS ile 1:200 sulandırıldı ve her kuyucuğa 100 μl eklenerek $37\text{ }^\circ\text{C}$ 'de 1.5 saat inkube edildi. Plaklar 5 kere PBS/Tween ile yıkandıktan sonra her kuyucuğa 100 μl konjugat eklendi [1:5000'lik goat antihorse IgG HRP (Santa Cruz Biotechnology, sc2906, Lot: B212)] ve pleytler $37\text{ }^\circ\text{C}$ 'de 2 saat inkube edildi. İnkubasyon sonucunda pleytler 5 kez yıkandı ve her kuyucuğa 100 μl substrat eklendi (sitril/fosfat tamponu içerisinde O-fenilen diamin ve hidrojen peroksit) ve oda ısısında 15 dk inkube edildi. İnkubasyon sonucunda her kuyucuğa 50 μl durdurma solüsyonu (1 N sülfürik asit) eklendi. Plaklar ELISA okuyucuda (Bio-Tek instruments, USA) 450 nm dalga boyunda okutuldu. Her örnek çift olarak çalışıldı. Her örnek için sonuçlar örneklerin optik dansitelerinin ortalaması alınarak değerlendirildi. Aralarında %10'dan fazla optik dansite farkı olan örnekler tekrar çalışıldı. Negatif kontrollerin absorbans değerinin aritmetik ortalaması + 3 standart sapma ($X+3SD$) değerinin (cut-off) üstü pozitif olarak kabul edildi [6,14].

Bulgular

Çalışma sonucunda 7 yaş ve altı atlarda %4,54 (2/44), 7 yaş üstü atlarda %6,55 (4/61) oranında anti-*Echinococcus granulosus* antikorları tespit edildi. Ki-kare testi ile yaş grupları ile seropozitiflik arasında istatistiksel açıdan önemli bir fark bulunmadı ($p>0,05$). Genel seroprevalans ise %5,71 (6/105) olarak belirlendi.

Tartışma ve Sonuç

Postmortem incelemeye dayalı kontrollerde İtalya'nın Sicilya bölgesinde kesilen 360 atın %1,7'sinde [11] Şili'de 9391 atın %9'unda [1] Çin'in Xinjiang bölgesinde kesilen 352 atın %4,3'ünde [12] ve Fas'ta incelenen 455 tek tırnaklının %17,18'inde [5] hidatidoz tespit edilmiştir. Seroprevalans çalışmalarında ise Yunanistan'da 753 atın %0,1'inde ve İran'da 193 atın %3,11'inde anti-*E.granulosus* antikorları tespit edilmiştir [8,13].

Ülkemizde Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalında 1933-1961 yılları arasında nekropsisi yapılan 1352 atın %0,15'inde [3] ve Atatürk Orman çiftliğinde karnivorların beslenmesi amacıyla kesilen 80 tek tırnaklının %2,5'inde hidatidoz tespit edilmiştir [9]. Erzurum'da hidatidozun tek tırnaklılardaki seroprevalansını belirlemek amacıyla yapılan bir çalışmada 250 hayvanın %31,2'sinde, atların %20,4, eşeklerin ise %33,5'inde seropozitiflik belirlenmiştir [6].

Bu çalışmada incelenen 105 dişi atın %5,71'inde, 7 yaş ve altı atların %4,54'ünde, 7 yaş üstü atların ise %6,55 'inde anti-*E. granulosus* antikorları tespit edildi. Yaş grupları ve seropozitiflik arasında ise istatistiki açıdan bir ilişki bulunmadı ($p>0,05$).

Dünyadaki postmortem incelemeye dayalı çalışmalar ile karşılaştırıldığında ülkemizde tek tırnaklılarda hidatidoz prevalansı dünya ortalamasından daha yüksek değildir. Ancak serolojik çalışmalara bakıldığında ülkemizdeki atlardaki hidatidoz seroprevalansının Yunanistan ve İran'dan daha yüksek olduğu görülmektedir [6,8,13]. Hidatidoz seroprevalansını belirlemek amacıyla Yunanistan'da ELISA, İran'da ise Lateks Aglutinasyon Testi (LAT) kullanılmıştır [8,13]. Serolojik çalışmalarda kullanılan testlerin duyarlılıklarının farklı olması, aynı test kullanılsa dahi cut-off değerlerindeki farklılıkların sonuçları değiştirebileceği bilinmektedir [17]. Dolayısı ile Yunanistan, İran ve Türkiye'deki seroprevalans farklılıkları kullanılan test metodları ve cut-off değerlerindeki farklılıklardan kaynaklanabileceği gibi hastalığın Türkiye'de daha endemik olmasından ya da bu çalışma kullanılan hayvanların yetiştirme ve beslenme özelliklerinden de kaynaklanabilir. Ancak bu çalışmalarda kullanılan antijen, test ve cut-off değerlerinin Balkaya ve Şimşek [6]'in

çalışması ile aynı olduğu göz önüne alındığında hidatidozunun Erzurum yöresinde Nevşehir'den daha endemik olduğu söylenebilir. Bu seroprevalans farkı atların beslenme özelliklerine bağlı olabilir nitekim Balkaya ve Şimşek [6], atların en az bir dönem merada otladığını belirtmiştir. Bu çalışmada kullanılan atlar daha çok turistik amaçlarla kullanılmakta ve merada otlama imkânı bulamamaktadır. Bu da parazit konak temasının azalmasına bağlı olarak prevalansın düşmesine neden olmuş olabilir.

Atlarda hidatidozun genellikle asemptomatik seyretmesi, modern görüntüleme tekniklerinin hayvanlarda çok sık kullanılmaması ve kesimhane kontrollerine dayalı monitöring çalışmalarının yapılamaması atlarda hidatidozun yaygınlığı konusundaki verilerin yetersiz kalmasına neden olmaktadır. Bu gibi durumlarda serolojik testler hastalığın atlardaki yaygınlığını belirleme noktasında ön plana çıkmaktadır [15]. Bu çalışmadan elde edilen veriler Nevşehir yöresinde diğer çiftlik hayvanları gibi atların da son konak köpekgiller için enfeksiyon kaynağı olabileceğini ve hastalığın epidemiyolojisi açısından önemli olduğunu ortaya koymuştur. Bu çalışma ile Nevşehir ilindeki atlarda ilk defa kistik ekinokokkoz seroprevalansı belirlenirken, ülkemizde konuyla ilgili çok sınırlı sayıda bulunan literatür bilgiye bir yenisi daha eklenmiştir.

Kaynaklar

1. Acosta-Jamett G, Cleaveland S, Cunningham AA, Bronsvort BM, Craig PS, (2010). *Echinococcus granulosus* infection in humans and livestock in the Coquimbo region, north-central Chile. Vet Parasitol. 169, 102-110.
2. Akyol ÇV, (2004). *Echinococ Türlerinin Epidemiyolojisi*. Altuntaş N, Tınar R, Çoker A. Eds. Echinococcosis. Hidatidoz Derneği, Yayın No:1, Bornova, İzmir.
3. Alibasoglu A, Yalciner S, (1965). 1933-1961 yılları arasında Ankara ve yöresinde atlarda görülen hastalıklara toplu bir bakış. Ankara Univ Vet Fak Derg. 12, 98-111.
4. Amman RW, Eckert J, (1995). *Clinical diagnosis and treatment of echinococcosis in humans*. Thompson RCA, Lymbery AJ. Eds. Echinococcus and Hydatid Disease. Wallingford, Oxon: CAB International. p. 411-463.
5. Azlaf R, Dakkak A, (2006). *Epidemiological study of the cystic echinococcosis in Morocco*. Vet Parasitol. 137, 83-93.
6. Balkaya I, Simsek S, (2011). *A Serological Survey of Cystic Echinococcosis in Equids in East of Turkey*. Iranian J Parasitol. 6, 46-50.
7. Güralp N, 1981. *Helmintholoji*. İkinci baskı. Ank. Üniv. Vet. Fak. Yayın. No:368. Ankara

8. Kouam MK, Diakou A, Kanzoura V, Papadopoulos E, Gajadhar AA, Theodoropoulos G, (2010). *A seroepidemiological study of exposure to Toxoplasma, Leishmania, Echinococcus and Trichinella in equids in Greece and analysis of risk factors*. Vet Parasitol. 170, 170–175.
9. Oge S, Kircali F, Yildirim A, Oge H, (2004). *Hydatidosis (Hydatid cyst) in equines*. Ankara Univ Vet Fak Derg. 51, 75-76.
10. Oriol R, Williams JF, Perez-Esandi MV, Oriol C (1971). *Purification of lipoprotein antigens of Echinococcus granulosus from sheep hydatid fluid*. Am J Trop Med Hyg. 20, 569-574.
11. Pierotti P, (1954). *Echinococcosis in equine liver*. Ann Fac Med Vet Pisa. 7, 37-42.
12. Qingling M, Guanglei W Jun Q, Xinquan Z, Tianli L, Xuemei S, Jinsheng Z, Huisheng W, Kuojun C, Chuangfu C, (2014). *Prevalence of Hydatid Cysts in Livestock Animals in Xinjiang, China*. Korean J Parasitol. 52, 331-334.
13. Sakhaee E, Golchin M, Amir H, Fayed MR, Eydi J, (2016). *First serological study of equine hydatidosis in Iran*. J Parasit Dis. 40, 1567–1570.
14. Simsek S, Risvanli A, Utuk AE, Yuksel M, Saat N, Koroglu E (2007). *Evaluation of relationship between repeat breeding and Fasciola hepatica and hydatid cyst infections in cows in Elazig district of eastern Turkey*. Res Vet Sci. 83, 102-104.
15. Şimşek S, (2016). *Hidatidosis*. Özcel MA. Ed. Veteriner Hekimliğinde Parazit Hastalıkları, Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları, No: 24, Cilt:2, İzmir.
15. Şenlik B, (2011). *Teşhis yöntemleri*. Tınar R. Ed. Veteriner Helmintoloji. 1.Baskı. Dora Yayınları, Bursa.
16. Utuk AE, Eski F, (2017). *Detection of Anti-Neospora caninum Antibodies in a Goat Flock in Kilis Province of Turkey*. Inter J Vet Sci. 6, 114-117.

Serological Evidences of West Nile Virus in Domestic Bird Species in the Samsun Province

Sinan Pir¹, Harun Albayrak^{2*}

¹ Department of Poultry Disease, Veterinary Control Institute, 55400, Samsun, Turkey (Corresponding Author)

² Department of Virology, Faculty of Veterinary Medicine, Ondokuz Mayıs University, Atakum, Samsun, Turkey

Geliş Tarihi / Received: 13.10.2017, Kabul Tarihi / Accepted: 10.11.2017

Serological Evidences of West Nile Virus in Domestic Bird Species in the Samsun Province

Abstract: West Nile fever (WNV) is a zoonotic disease, occurring nearly globally. Birds are important host species of West Nile virus. West Nile virus (WNV) is a mosquito-borne viral disease. Although West Nile Virus causes an asymptomatic infection, especially it can cause neurologic disorders in humans, birds and horses. In this study, blood samples were randomly collected from domestic birds (chicken, duck, goose and turkey). The material consisted of 736 domestic birds, including 394 geese, 129 ducks, 117 turkeys and 96 chickens, from Samsun province in northern Turkey. The serum samples were analysed for the presence of antibodies to WNV using a competitive enzyme-linked immunosorbent assay (C-ELISA). Seropositivity rates in chickens, ducks, geese and turkeys were detected as 3.1%, 0.8%, 1.8% and 17.9% for WNV. Out of 736 serum samples examined, 32 (4.3%) were positive for WNV. The results, recorded for the first time for WNV in Turkey, supported the hypothesis that domestic bird act as a potential reservoir of WNV, and thus have a role in the epidemiology of these diseases.

Keywords: Domestic birds, ELISA, Turkey, West Nile virus.

Samsun İlindeki Evcil Kanatlı Türlerinde Batı Nil Virusunun Serolojik Bulguları

Özet: Batı Nil ateşi hemen hemen küresel düzeyde görülen zoonotik bir hastalıktır. Kuşlar batı nil virusunun önemli konakçılarıdır. Batı nil virüsü (BNV) sineklerle taşınan bir virüstür. Batı Nil virüsü asemptomatik bir enfeksiyona sebep olmasına rağmen, özellikle at, kuş ve insanlarda nörolojik bozukluklara neden olur. Bu çalışmada, evcil kanatlı türlerinden (tavuk, ördek, kaz ve hindi) rastgele örnekleme yoluyla kan örnekleri toplandı. Samsun ilinde 96 tavuk, 117 hindi, 129 ördek ve 394 kaz olmak üzere toplam 736 kanatlı kan serum örneği toplandı. Serum örnekleri c-ELISA metodu kullanılarak Batı nil virusu antikorları yönünden test edildi. Seropozitiflik oranı Batı Nil virüsü için tavuklarda %3,1, ördeklere %0,8, kazlarda %1,8 ve hindilerde %17,9 olarak tespit edildi. Toplamda 736 serum örneğinin 32'si (%4,3) Batı nil virusu antikorları yönünden pozitif bulundu. Sonuçlar, Türkiye'de evcil kanatlılarda Batı Nil virusu için ilk veriler olup, kuşların BNV yönünden potansiyel rezervuar olduğu ve hastalıkların epidemiyolojisinde önemli bir role sahip olduğu hipotezini desteklemektedir.

Anahtar kelimeler: Batı Nil virüsü, ELISA, Evcil kuşlar, Türkiye.

Introduction

Domestic birds are important to public health because they can be infected by a number of pathogenic microorganisms that are transmissible to humans. Among the most important of these diseases are emerging infectious diseases that are newly recognized or previously known diseases that appear in a new population or are rapidly increasing in incidence or geographical area.

West Nile virus has a wide geographical range that includes portions of Europe, Asia, Africa,

Australia (Kunjin virus) and North America [4,14]. West Nile virus (WNV), genus *Flavivirus*, family *Flaviviridae*, is an "old-world" arbovirus, transmitted mainly by infected mosquitoes. Wild birds are the primary amplifying hosts of the virus, but a number of species (amphibians, domestic poultry, and mammals, including humans and horses) can be infected through bites from WNV-infected mosquitoes, and disease will develop in some [11,14]. The diagnosis of WNV infection is commonly achieved using serological assays. While plaque reduction neutralization tests are still considered the gold stan-

* This study was summarized from the MSc thesis of first author.

Yazışma adresi / Correspondence: Sinan Pir, Department of Poultry Disease, Veterinary Control Institute, Samsun, Turkey
E-posta: sinanpir@gmail.com

standard for specific diagnosis, ELISA is now routinely used [5], as it is less laborious and more suited to high-throughput screening. WNV infection and antibodies have been detected in humans and animals in Turkey [10,19].

The objective of this study was to perform serological investigation of WNV in domestic birds (chicken, duck, goose and turkey) reared in rural areas of the northern Turkey.

Materials and Methods

Ethical Committee Approval

The study protocols and experimental procedures were approved by the Samsun Veterinary Control Institute Scientific Ethics Committee (No: 20).

Sample collection and processing

Blood samples were randomly collected from domestic birds, including 394 geese (*Anser anser*), 129 ducks (*Anas platyrhynchos domesticus*), 117 turkeys (*Melagris gallopavo*) and 96 chickens (*Gallus gallus domesticus*), without clinical signs of the diseases from Samsun province and their towns (Bafra, Kavak, Ladik, 19 Mayıs and Terme) in the northern part of Turkey between January and May 2013 (Figure 1.). The age of the animals varied from 11 months to 9 years. Blood samples were taken from the wing veins of the birds. Blood tubes were centrifuged at 3,000×g for 10 min, and sera were transferred to sterile tubes and stored at -20°C until investigation.

ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

The commercial ELISA kits were obtained from ID.VET, Montpellier, France, and the tests were performed according to the producer's description. This diagnostic kit is designed to detect avian IgG antibodies directed against the West Nile Virus envelope protein (pr-E) by competitive ELISA. Plates were read with an ELISA reader at 450 nm and results were calculated.

Statistical Method

The chi-square test was used to determine the significance of obtained results.

Results

A total of 736 serum samples (chicken, duck, goose and turkey) were examined for antibodies against WNV as detailed in Table 1. The overall seroprevalence was found to be 4.3% (32/736) for WNV.

No anti-WNV antibodies were detected in all domestic birds in Bafra, Kavak and Ladik towns. Seropositivity rates in chicken, duck, goose and turkey were detected as 3.1%, 0.8%, 1.8% and 17.9% for WNV. The provincial distribution of WNV seroprevalence in this study was as follows: 19 Mayıs 23.1% and Terme 4.1% . The highest rate of seropositivity (27.3%) was detected in 19 Mayıs town of Samsun province from turkey for WNV. The turkey was more susceptible for WNV infection than other domestic birds (chicken, duck and goose) ($p<0.01$).

Discussion and Conclusion

West Nile virus has a wide geographical range that includes portions of Europe, Asia, Africa, Australia and America [14]. Many serological test methods were used in the diagnosis of WNV such as plaque reduction neutralization test (PRNT) and ELISA. While PRNT is still considered the gold standard for specific diagnosis, ELISA is now routinely used [6]. The C-ELISA has a higher specificity (99.4%) and sensitivity (84.9%) for WNV infection [16].

West Nile virus has not affected commercial chickens (*Gallusgallus domesticus*) or turkeys (*Meleagridis gallopavo*), which are predominantly raised indoors with low potential for exposure to mosquito vectors [13]. However, natural WN virus infections were associated with severe neurologic signs and death in 8- to 10-week-old domestic geese from a flock in Israel [12]. The role of domestic geese as a WN virus reservoir in the Israel outbreak is unknown, but goose infection rates in the Sindbis District of the northern Nile Valley were 27%, suggesting that geese may have a role in local WN virus ecology [17]. West Nile virus antibodies have been detected in humans and animals in Turkey Albayrak and Ozan [2], Ergunay et al. [8], Ozkul et al. [15] and antibodies and viruses have been detected among mammals and vectors in the neighbouring countries of Balkan peninsula [11]. In addition, mosquito species known to transmit mos-

quito-borne diseases have been observed in Turkey [6]. Ozkul et al. [15] carried out a serological survey in mammalian species. Positivity rates for the animals varied and were as follows: ass-mules 2.5%; cattle 4%; dogs 37.7%; horses 13.5%; sheep 1% and

humans 20.4%. There is no study on the seroprevalence of WNV infection in domestic birds in Turkey. The determined positivity in domestic birds in this study (4.3%) was found to be very low comparing to the reported value in dogs, humans and horses.

Table 1. The number and ratio of WNV seropositive birds

City	Total number of animals					Positivity (%) (for WNV)				
	Chicken	Duck	Goose	Turkey	Total	Chicken	Duck	Goose	Turkey	Total
Bafra	24	26	-	-	50	0 (-)	0 (-)	-	-	0 (-)
Kavak	4	-	175	-	179	0(-)	-	0 (-)	-	0 (-)
Ladik	12	38	118	40	208	0 (-)	0 (-)	0 (-)	0 (-)	0 (-)
19 Mayıs	27	-	-	77	104	3 (11.1)	-	-	21 (27.3)	24(23.1)
Terme	29	65	101	-	195	0 (-)	1 (1.5)	7 (6.9)	-	8 (4.1)
Samsun (Total)	96	129	394	117	736	3 (3.1)	1 (0.8)	7 (1.8)	21 (17.9)	32 (4.3)



Figure 1. The map of the locations where samples were collected for serological assay

Albayrak and Ozan [2] carried out a serological survey in mammalian species.

Although they did not detect any WNV antibodies from cattle, horse, sheep and water buffalo samples, out of 70 goats, 2 (2.85%) were found to be seropositive for WNV. Yazici et al. [20] studied a molecular study about presence of WNV in horse blood samples in the Ardahan province of Southern Turkey, but they did not detect any WNV nucleic acid from these samples. Albayrak and Ozan [1] performed a molecular study about presence of WNV in wild bird samples in the same region, although they did not detect any WNV nucleic acid from these samples, in this study, seroprevalence of WNV in domestic birds (chicken and tur-

key) were most intense (23.1%) in 19 Mayıs town of Samsun. In this town there is a delta of a river called Kizilirmak, diverse avian hosts from Asia, Europe and Africa overlap in a region of intercontinental avifaunal mixing hypothesized to be an important zone of Europe-Asia-Africa virus transfer. Non-migratory birds become infected when WNV-infected mosquitoes feed on them. Evidence that the virus is transmitted between resident and migratory birds by infected mosquitoes can be obtained by detecting WNV-specific antibody, infectious virus or RNA in the non-migratory birds or in nearby animals.

It is commonplace knowledge that the result of the seroprevalence studies are influenced by many

factors such as the number of sampled animals, the age of the animals, the time of sampling, the conditions of care and feeding, individual differences.

It was concluded that, the results, recorded for the first time for WNV in domestic birds in Turkey, supported the hypothesis that domestic bird act as a potential reservoir of WNV, and thus have a role in the epidemiology of these diseases. To understand better acute infection rates of WNV in domestic birds, additional studies focusing on field observations are needed.

Acknowledgements

Funding for this research was provided by the Ondokuz Mayıs University Scientific Research Council (Project Number: PYO.VET. 1904. 13.002)

References

- Albayrak H., Ozan E., 2010. *Molecular detection of avian influenza virus but not West Nile virus in wild birds in northern Turkey*. Zoonoses Public Health, 57, e71-e75.
- Albayrak H., Ozan E., 2013. *Seroepidemiological study of West Nile virus and Rift Valley fever virus in some of mammalian species (Herbivores) in northern Turkey*. J Arthropod-Borne Dis, 7, 90-93.
- Bagheri M., Terenius O., Oshaghi MA., Motazakker M., Asgari S., Dabiri F., Vatandoost H., Mohammadi BM., Chavshin AR., 2015. *West Nile virus in mosquitoes of Iranian Wetlands*. Vector-Borne Zoonot Dis, 15, 750-754.
- Burke DS., Monath TP., 2001. *Flaviviruses*. In "Fields Virology", Eds., DM Knipe, PM Howley, 4th ed., 1043-1126, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Dauphin G., Zientara S., 2007. *West Nile virus: recent trends in diagnosis and vaccine development*. Vaccine, 25, 5563-5576.
- Dik B., Yagci S., Linton YM., 2006. *A review of species diversity and distribution of Culicoides Latreille, 1809 (Diptera: Ceratopogonidae) in Turkey*. J Nat Hist, 40, 1947-1967.
- Ergunay K., Saygan MB., Aydogan S., Menemenlioglu D., Turan HM., Ozkul A., Us D., 2007a. *West Nile virus seroprevalance in blood donors from central Anatolia, Turkey*. Vector Borne Zoonot Dis, 7, 157-161.
- Ergunay K., Ozer N., Us D., Ozkul A., Simsek F., Kaynas S., Ustacelebi S., 2007b. *Seroprevalance of West Nile virus and tick-borne encephalitis virus in southeastern Turkey: First evidence for tick-borne encephalitis virus infections*. Vector Borne Zoonot Dis, 10, 771-775.
- Ergunay K., Bakonyi T., Nowotny N., Ozkul A., 2015. *Close relationship between West Nile virus from Turkey and lineage 1 strain from Central African Republic*. Emerg Infect Dis, 21, 352-355.
- Gazi H., Özkütük N., Ecemis T., Atasoylu G., Köroglu G., Kurutepe S., Horasan GD., 2016. *Seroprevalance of west nile virus, crimean-congo hemorrhagic fever virus, Francisella tularensis and Borrelia burgdorferi in rural population of manisa, western Turkey*. J Vector Borne Dis, 53, 112-117.
- Hubalek Z., Halouzka J., 1999. *West Nile fever – a reemerging mosquito-borne viral disease in Europe*. Emerg Infect Dis, 5, 643-650.
- OIE, 1999. *Office International des Epizooties. West Nile fever in Israel in geese*. Disease Information, 12, 166
- OIE, 2000. *Office International des Epizooties. West Nile fever in the United States of America: in horses*. Disease Information, 13, 150-151
- OIE, 2015. *The World Organisation for Animal Health. West Nile fever. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2013*. Volume 1, Part 2
- Ozkul A., Yıldırım Y., Pinar D., Akcali A., Yılmaz V., Colak D., 2006. *Serological evidence of West Nile virus (WNV) in mammalian species in Turkey*. Epidemiol Infect, 134, 826-829.
- Padilla JA., Rubio EL., Romero EE., Cordoba L., Cuevas S., Mejia F., Calderon R., Milian F., Rosa ATD., Weaver SC., Franco JGE., Saiz JC., 2009. *The continous spread of west nile virus (WNV): seroprevalance in asymptomatic horses*. Epidemiol Infect, 137, 1163-1168.
- Swayne DE., Beck JR., Smith CS., Shieh WJ., Zaki SR., 2001. *Fatal encephalitis and myocarditis in young domestic geese (Anser anser domesticus) caused by West Nile virus*. Emerg Infect Dis, 7, 751-753.
- Thomas-Bachli AL., Pearl DL., Berke O., Parmley EJ., Barker IK., 2017. *A geographic study of West Nile virus in humans, dead corvids and mosquitoes in Ontario using spatial scan statistics with a survival time application*. Zoonoses Public Health, 00, 1-9.
- Toplu N., Oğuzoğlu TÇ., Ural K., Albayrak H., Ozan E., Ertürk A., Epikmen ET., 2015. *West Nile virus infection in horses: Detection by immunohistochemistry, in situ hybridization, and ELISA*. Vet Pathol, 52, 1073-1076.
- Yazici Z., Albayrak H., Ozan E., Gumusova S., 2012. *The first investigation of West Nile virus in horses using real time RT-PCR in Middle Black Sea Region in Turkey*. J Arthropod-Borne Dis, 6, 151-155.

Ruminantlarda *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* Enfeksiyonunun İmmunolojik Özellikleri

Ezgi Şababoğlu, Hülya Türütoğlu

Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Burdur

Geliş Tarihi / Received: 10.04.2017, Kabul Tarihi / Accepted: 23.10.2017

Özet: *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, hayvan sağlığını etkileyen ve ciddi ekonomik kayıplara sebep olan önemli bir patojendir. Etkenin mevcut immün sistemden kaçma stratejileri nedeniyle bugüne kadar paratüberküloza karşı etkili bir aşı geliştirilememiş ve uygun bir koruma ve kontrol stratejisi belirlenememiştir. *M. avium* subsp. *paratuberculosis*'e karşı doğru kontrol stratejilerinin geliştirilebilmesi için konakçı-patojen etkileşimini düzenleyen hücrel ve moleküler mekanizmalar ile hastalığın patolojik temelini detaylı olarak anlaşılması gerekmektedir. Bu derlemede; *M. avium* subsp. *paratuberculosis* ile konakçı ilişkisi ve konakçıda gelişen immünolojik reaksiyonlar üzerine kapsamlı bilgiler sunuldu.

Anahtar kelimeler: İmmünoloji, konakçı savunması, *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*

Immunological Characteristics of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* Infection in Ruminants

Abstract: *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* is an important pathogen that affects animal health and causes serious economic loss. Due to the current strategy of escape from the immunity system, so far, an effective vaccine against paratuberculosis has not been developed and no appropriate protection and control strategy has been determined. In order to develop correct control strategies against *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, cellular and molecular mechanisms regulating the host-pathogen interaction and the pathological basis of the disease must be understood in detail. In this review *M. avium* subsp. *paratuberculosis*-host interactions and the information on the immunological reactions developed in the host were presented.

Keywords: Host defense, immunology, *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*

Giriş

Paratüberküloz (Johne hastalığı), *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (*Map*) tarafından oluşturulan, kronik granümatöz enterokolitis, bölgesel lenfanjit ve lenfadenitis ile karakterize yavaş gelişen hatta ölümle sonuçlanabilen bir hastalıktır [36, 41]. Evcil ve yabani ruminantlarda (sığır, koyun, keçi, bizon, geyik, alpaka, lama, deve, manda) ve ruminant olmayan yabani türlerde (tavşan, tilki, maymun, porsuk, çakal, kuş, kedi, rakun) [3, 20, 23] hastalığa neden olmaktadır. Çok eskiden beri bilinen bir hastalık olmasına rağmen, patogenezi henüz tam olarak ortaya konulamamış ve dolayısıyla hastalığın kontrolü için etkili bir aşı veya uygun bir tedavi protokolü öngörülemediği. Hayvan sağlığını tehdit eden ve büyük ekonomik kayıplara yol açan bu hastalığın önemi günümüzde halen devam etmektedir [20]. Ekonomik zararının

yanı sıra ruminant paratüberkülozu ile insanların Crohn hastalığı arasında yakın bir ilişkinin tespit edilmesi, son zamanlarda paratüberküloz hastalığının daha çok ilgi çekmesine yol açmıştır [24]. Crohn hastalarının ince barsaklarındaki histopatolojik bulguların paratüberküloza büyük benzerlik gösterdiği ve vakaların çoğunda paratüberküloz hastalığının etkeni olan *Map*'in izole edildiği bildirilmesine rağmen, *Map*'in hastalığın oluşumundaki rolü kesin olarak ortaya konulamamıştır [4, 9]. Etkenin enfekte hayvanların dışkısının yanı sıra sütleriyle de atıldığı tespit edilmiş ve enfekte hayvanların süt ve süt ürünlerinin insanlar için potansiyel bir bulaşma kaynağı olabileceği ileri sürülmüştür [4, 13, 16].

Hastalığın Gelişim Evreleri ve Konakçı Yanıtı

Ruminantlarda paratüberküloz farklı evrelerden oluşmakta ve konakçının patolojik durumlara kar-

şı gösterdiği immun yanıtı bağı olarak bu evreler erken, subklinik ve klinik enfeksiyon evresi olarak sınıflandırılmaktadır [23].

Erken Evre

Hastalığın erken evresi, 2 yaştan küçük hayvanlarda ya da *Map*'in düşük konsantrasyonlarının (501.0x10³CFU) sindirim [20] veya vertikal [39] yol ile bulaştığı hayvanlarda görülmektedir. Konakçı tarafından sindirim yoluyla alınan *Map*'in, bağırsak ile ilişkili lenfoid dokuya (gut-associated lymphoid tissue, GALT) yerleştiği ve Payer plaklarında bulunan M hücreleri ile fibronektin köprüsü kurarak konakçıya girdiği bilinmektedir [20, 32]. Fibronektin köprüsünün yanısıra, *Map*'in epitel hücrelerine invaze olabileceği de bildirilmiştir [20, 30]. *Map*'in, vücuda girdikten sonra intestinal makrofajlara invaze olma yeteneğine sahip olduğu ve çeşitli stratejilerle konakçı savunmasını engelleyerek makrofajların içlerinde yaşayıp replike olabildiği açıklanmıştır [20, 32]. Bakterinin makrofajlar içinde hayatta kalma stratejisini farklı mekanizmalar oluşturmaktadır. Bakterinin kullandığı bu mekanizmalar arasında; stres koşullarında spor benzeri yapı oluşturarak ısı, lizozim ve proteinaz K'dan korunması [20], fagozom olgunlaşmasını inhibe etmesi, makrofaj apoptozisini ve fagozom asitleşmesini engellemesi [3, 10, 32], MHC molekülünün ekspresyonunu azaltması [32] ve sinyal iletim yollarını etkilemesi [1, 33] sayılabilir.

Map'e karşı konakçı tarafından oluşturulan doğal savunma mekanizması: Birçok mikroorganizmada bulunan ve oldukça korunmuş patojen ile ilişkili moleküler yapıları (pathogen associated molecular patterns, PAMP) tanıyan reseptörler (pattern-recognition receptors, PRRs), PAMP'ları bağlayarak hücrelerarası sinyal yollarını oluşturur ve böylece immun sistem hücrelerinin yangıyı uyaran molekülleri salgılamasına ve immun yanıtın uyarılmasına yol açarlar [29, 35]. *Map*'in endositozunda görevli fagositik hücrelerin üzerinde *Map*'i bağlayan önemli PRR'ler bulunmaktadır. Bu reseptörler (PRR) arasında komplement reseptörleri (complement receptor, CR1, CR3, CR4), mannoz reseptörü (MR), membran proteinini bağlayan bir fosfatidilinositol olan CD14 [32], CD11a, CD18 gibi β -integrin reseptörleri [23], sürfaktan protein-

ler, mannoz bağlayan lektinler (mannose-binding lectins, MBLs), C1q, IgG ile kaplı mikobakteriler için Fc γ reseptörü [32], transferrin reseptörleri, toll benzeri reseptör (toll-like receptors, TLR) 2, TLR 4 [23] ve TLR 9 [2] bulunmaktadır. En önemli PRR'lerden olan TLR'ler ile immun sistem uyarılarak sitokin yanıtı başlatılır [29]. Fagozomal olgunlaşma gibi mikobakterilerin patogenezesinde önemli hücresel işlemler TLR aracılığıyla şekillenmektedir [29]. TLR üretimindeki artışın *Map*'e karşı koruyucu olduğu gösterilmiştir [3]. TLR'lerin farklı etkiye sahip olmaları nedeniyle paratüberküloza karşı gelişen immun yanıtındaki rollerinin oldukça karışık olduğu bildirilmiştir [3], TLR'lerde meydana gelen mutasyonların mikobakterilere karşı duyarlılığı arttırdığı ileri sürülmüştür [23].

Mikobakterilerin öldürülmesinde etkili mekanizmalar: Mikobakterilerin öldürülmesinde en önemli mekanizmanın makrofaj aktivasyonu olduğu, makrofaj aktivasyonunda ise interferon gama (IFN- γ) ve tümör nekrozis faktör-beta (TNF- β) gibi proenflamatuar sitokinlerin rol oynadığı bildirilmiştir [32]. Lipopolisakkaritleri tanıyan TLR'ler tarafından aktive olan monosit ve makrofaj gibi mononükleer fagositler tarafından mikroorganizmaların sindirildiği, hücre içinde ise otofaji uyarılarak antimikrobiyal peptidler, reaktif oksijen/nitrojen ara ürünleri aracılığı ile mikroorganizmanın öldürüldüğü açıklanmıştır [31, 40]. D vitamininin aktif metaboliti olan 1, 25-dihidroksikolekalsiferol (kalsitriol, [1, 25 (OH)2D3])'ün ise CD14 ve mannoz reseptörü gibi yüzey reseptörlerinin üretimini artırarak makrofajların fagositoz yeteneğini güçlendirdiği, katelisin ve defensinlerin ekspresyonunu artırarak makrofajların antimikrobiyal etkisine katkıda bulunduğu ve ayrıca antijen sunumunun yanısıra bazı kemokin, sitokin ve makrofaj faktörlerinin sekresyonunu da düzenlediği açıklanmıştır [31]. Serbest yağ asitlerinin ve granülizinin de antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu ve *Mycobacterium tuberculosis (Mtb)*'in makrofajlar tarafından öldürülmesinde önemli rol oynadığı açıklanmıştır [32]. Bunun yanısıra apoptozisin de mikobakterinin yayılımını engelleyen diğer bir mekanizma olduğu belirtilmiştir [32].

Konakçı tarafından oluşturulan kazanılmış immun yanıt: Mikobakteri enfeksiyonlarının erken evresinde hücresel immun yanıtın çok önemli olduğu

bilinmektedir. Ancak *Map*, hayatta kalabilmek için erken gelişen bu hücrel immun yanıtı engelleyen stratejiler geliştirmektedir [23]. Örneğin, *Map* makrofajları enfekte ettiğinde fagozom lizozom füzyonunu engeller ve mitojen ile aktive edilmiş protein kinaz (mitogen activated protein kinase, MAPK) düzeyini artırır. MAPK, IL-10 sentezini arttırarak ve fagozom-lizozom füzyonunu engelleyerek bakterinin yaşamasına yardımcı olur [38]. Ayrıca TLR'lerde (TLR2 ve TLR4) de artış olur. Aktive edilen makrofajlar interleukin-1 (IL-1), tümör nekrozis faktör- α (TNF- α) ve IL-12 gibi pro-enflamatuvar sitokinleri üretir. IL-6, IL-8 ve IL-10'da artış gözlenir. IL-1'in artışı sonucunda IL-2 üreten T hücreleri aktive olur ve CD4⁺ yardımcı T hücrelerinin ve CD8⁺ sitozolik T hücrelerinin klonal çoğalmasına yol açar [32].

Paratüberkülozun erken aşamasında CD4⁺T hücreleri oldukça önemlidir. *Map* makrofajlar tarafından fagosite edildikten sonra makrofajlar tarafından antijen sunumu gerçekleşir ve sitokinler aracılığıyla CD4⁺T hücreleri aktive olarak hücrel immun yanıt şekillenir [6]. CD4⁺T hücrelerinin alt tipleri intrasellüler *Map*'e karşı hücrel immun yanıtı aktive etmede görevlidir. Aktive edilmiş makrofajlar enfeksiyon bölgesine CD4⁺T hücrelerini toplayan IL-12 ve kemokinleri salgılamaktadır. CD4⁺T hücreleri ya Th1 ya da Th2 hücrelerine farklılaşır. Th1 hücrelerinin aktivasyonu IFN- γ , IL-2 ve TNF- α sentezine neden olur [32]. Sentezlenen IFN- γ da makrofajlara IL-12 salgılanması ve yangısal değişiklikleri teşvik etmek üzere etki eder [23]. Ayrıca, B hücreleri de CD4⁺T hücrelerine antijen sunarak daha fazla IFN- γ sentezlenmesini sağlar [36]. IFN- γ , Th1 hücreleri aracılığıyla gelişen hücrel immun yanıtı da uyarır [23]. Diğer taraftan makrofajlar ve intestinal epitel hücreleri tarafından üretilen IL-18'in de IFN- γ üretimini arttırdığı belirtilmiştir [32].

Son yıllarda paratüberkülozun erken aşamasında gama-delta T ($\gamma\delta$ T) hücrelerinin rolü üzerinde çalışılmaktadır. $\gamma\delta$ T hücreleri 6 aylıktan küçük buzağılarda baskın olan T hücreleridir [32]. Buzağılarda sirkülasyondaki periferik kan mononükleer hücrelerinin yaklaşık %40'ını, yetişkin sığırlarda ise %10-15'ini oluşturmaktadır [23]. Deneysel yapılan bir çalışmada; canlı *Map* içeren inokulumların enjekte edildiği buzağılarda $\gamma\delta$ T hücrelerinin hastalığın er-

ken döneminde enfeksiyon bölgesine göç ettikleri gösterilmiştir [26]. $\gamma\delta$ T hücrelerinin antijenlerin CD4⁺T hücrelerine sunulmasında [23], canlı mikobakteri veya mikobakteriyel hücre duvarına karşı IFN- γ üretiminde [15], IFN- γ etkisi altında TNF- α salgılanmasında [32], intrasellüler ve ekstrasellüler *Mtb* etkenlerini granülizin salgılayarak öldürülmesinde, enfekte dendritik hücrelerden IL-17A salgılanmasında [21], IL-10 ve TGF- β üretiminde [5], Th1 immun yanıtının düzenlenmesi ve diğer dokulardaki hasarı engellemek için granülasyon oluşumunda [32] görevli olduğu rapor edilmiştir. IL-15'in ise IL-12 reseptörlerini etkilediği ve intraepitelyal $\gamma\delta$ T hücrelerini stimüle ettiği açıklanmıştır [32]. Diğer taraftan $\gamma\delta$ T hücrelerinin, sistemik sirkülasyonda strese oldukça duyarlı oldukları ve bu nedenle strese maruz kalan hayvanların paratüberküloza daha duyarlı olabilecekleri ileri sürülmüştür [32].

Bazı araştırmacılar [10, 17], dışkı, süt, doku gibi örneklerde az miktarda basil bulunduran paratüberkülozlu hayvanlarda Th1 (IFN- γ) yanıtının, çok miktarda basil içeren hayvanlarda ise Th2 tip yanıtının daha ağırlıkta olduğunu bildirmiştir. Fazla sayıda basil bulunan sığırlarda IL-2, IL-4 ve IL-10 düzeylerinde artış gözlemlendiği belirtilmiştir [22]. Son yıllarda yapılan bazı çalışmalarda [27, 37], ise deneysel olarak enfekte edilen hayvanlarda IFN- γ yanıtı gibi kısa bir sürede antikor yanıtının geliştiği saptanmıştır. Begg ve ark. [8] koyunlar üzerinde yürüttükleri deneysel çalışmalarında; enfekte koyunların %39'unda immun yanıtın güçlü IFN- γ yanıtından antikor yanıtına dönüştüğünü, %50'sinde enfeksiyonun erken aşamasında IFN- γ ve antikor yanıtının birlikte olduğunu, %16'sında ise antijene spesifik antikor yanıtının engellediğini saptamışlar ve bu bulgulara göre enfekte koyunlarda Th1 yanıtının Th2 yanıtına dönüşmesinin yaygın olmadığını ileri sürmüşlerdir.

Subklinik Evre

Subklinik evre, paratüberkülozun 2-5 yıla kadar sürebilen uzun bir latent fazıdır [23]. Bu fazda enfekte hayvan klinik bulgu göstermez, sağlıklı görünür. Fakat bu fazın geç aşamalarında hayvanlar aralıklı olarak dışkı ile etkeni çıkarır ve antikor düzeyi genellikle düşüktür [23, 36]. Bu evredeki hayvanla-

rın yaklaşık %10'unda IFN- γ ve antikor düzeyleri tespit edilebilir bir seviyeye yükselir [7, 11]. Tanı testlerinin yetersizliği veya *Map*'in aralıklı olarak çıkarılmasından dolayı subklinik enfekte hayvanların tespit edilmesi zordur ve bu durum Johne hastalığının kontrolünü zorlaştırmaktadır [23, 36]. IgG1 sınıfı antikorların subklinik enfeksiyonun özellikle orta ve ileri aşamalarında tespit edilebileceği bildirilmiştir [23].

Paratüberkülozun bilinen en önemli özelliği ince bağırsağın orta ve alt segmentlerinde granülom oluşturmasıdır. Subklinik evredeki hayvanlarda küçük granülomlar gözlenmektedir [34]. Bu granülatöz lezyonların, *Map*'in bağırsağın diğer bölümleri ile lenf düğümlerine yerleşmesini engellemek ve kontrol etmek için konakçı tarafından oluşturulan geç immün yanıtla ilişkili olabileceği düşünülmüştür [14]. Ancak bu granülomların mikobakteriler tarafından enfeksiyon yerine yeni makrofajları toplamak ve yer değiştirmek için kullanabileceği de ileri sürülmüştür [14]. Kısacası *Map*'in bağırsağın başka bölümleri ile meme bezleri ve mezenterik lenf düğümleri gibi diğer organları enfekte etmek için granülomlardan köprü olarak yararlanabileceği belirtilmiştir [20]. Granülomların içinde *Map* bulunduran makrofajlar ve dev hücreler bulunmaktadır. CD8⁺T hücreleri ve CD4⁺T hücreleri bu granülomların etrafını çevreler. Bu aşamada en önemli sitokin, $\gamma\delta$ T hücreleri ve CD4⁺T hücreleri tarafından salınan TNF- α 'dır. TNF- α , makrofajları toplayarak enfeksiyonun kontrol altına alınmasına yardımcı olur. Ancak doku hasarına da neden olabilir. Makrofajlar tarafından salınan IL-10, CD4⁺T hücrelerini baskılayarak IFN- γ üretimini azaltır. IFN- γ düzeyinin azalması nedeniyle yeni toplanan makrofajlar kalıcı enfekte olma eğilimindedir. Bu aşamada sitotoksik T hücre popülasyonu (CD8⁺ ve $\gamma\delta$ T hücreleri) farklı roller oynamaktadır. $\gamma\delta$ T hücreleri CD4⁺T hücre proliferasyonunu baskılayarak, CD8⁺T hücre proliferasyonunu korur. Ayrıca $\gamma\delta$ T hücreleri granülasyon oluşumuna neden olur ve yangısal yanıtı kısıtlar. Humoral immün yanıt sınırlıdır. $\gamma\delta$ T hücrelerinden ve CD4⁺T hücrelerinden salınan IFN γ , makrofajların hücre içi *Map*'i öldürmesi için yeterli değildir. IFN- γ yanıtı yeterli olmadığı için IgG1, IgG2'ye dönüşmez ve IgG1 tip immünglobulin yanıtı devam eder [32].

Erken subklinik aşamada olan hayvanların ileal dokularında IFN- γ , TNF- α , IL-1 α ve IL-6 gibi pro-enflamatuar sitokinlerin aşırı sentezine bağlı olarak CD4⁺T hücrelerinin oldukça fazla çoğaldığı Th1 tip hücresel immün yanıtının baskın olduğu gözlenmiştir [12, 19]. Fakat hastalıkta Th1 hücresel yanıtın, artan antikor yanıtı ile birlikte azaldığı bildirilmiş, ancak bu değişikliğin arkasındaki nedenin ve ne zaman olduğunun kesin olarak bilinmediği belirtilmiştir [23]. Subklinik aşamada düzenleyici T (regulatory T, Treg) hücrelerinin düşük düzeyde *Map* antijenleri ile uyarıldığı ve *Map*'e karşı gelişecek etkili bir T hücre yanıtını kısıtladığı açıklanmıştır [15]. Ayrıca bu dönemin hastalığın subklinik formdan klinik forma dönüştüğünün de göstergesi olduğu ifade edilmiştir [28]. Treg hücrelerinin immunomodülatör etkilerini IL-10 ve TGF- β üreterek gösterdikleri bilinmektedir [15]. Roussey ve ark. [28], sığır Treg hücrelerinin *Map*'e karşı spesifik olmadığını ve non-spesifik etkili bu Treg hücrelerinin in vitro koşulda Th1 sitokinlerinden IFN- γ ile sitotoksik T hücrelerinin sitotoksik fonksiyonunda görevli ve perforini kodlayan önemli bir protein olan profilin-1'in üretimini baskıladığını ortaya koymuşlardır.

Klinik Evre

Map ile enfekte hayvanlarda subklinik fazın geç dönemi ile erken klinik faz döneminde sürekli ishal, yem yemede azalma, halsizlik, kas erimesi ve süt üretiminde azalma gibi klinik belirtiler gözlenmekte ve hastalık en son aşamada ölüme neden olmaktadır [23]. Klinik bulguların ilerlediği dönemde, aşırı ishal, zayıflama ve kaşeksi görülmektedir [20]. Hayvanlar aşırı zayıftır ve bağırsakta fonksiyon kaybı nedeniyle özellikle albümin başta olmak üzere serum proteinlerinin konsantrasyonunun düşmesi sonucu submandibular ödem ortaya çıkmaktadır [10, 20]. Subklinik evrede olduğu gibi bu evrede de süt verimi azalır [23]. Ayrıca klinik aşamada *Map*, sürekli olarak dışkı, süt ve kolostrum ile etrafa saçılmaktadır. Bu durum ise *Map*'in sürü içinde yayılım riskini arttırmaktadır [23].

Klinik belirti gösteren hayvanlarda intestinal mukozada *Map* yükü yüksek konsantrasyona ulaştığı için dışkı kültürü ile polimeraz zincir reaksiyonu pozitif sonuç verir ve bu hayvanlarda antikorlar

ELİZA testi ile de tespit edilebilir [18]. Ayrıca bu dönemde süt ve kolostrumda da etkenin tespit edilebildiği [25] ve gebe hayvanların bakteriyi uterusu yavruya geçirebildiği [39] rapor edilmiştir. Lenfosit, epiteloid makrofaj ve dev hücre infiltrasyonu ile kalınlaşan intestinal mukozada villus ve mikrovillusların fonksiyonlarını kaybettiği saptanmıştır [20]. İntestinal mukozadaki kalınlaşma ile intestinal duvarda granümatöz yangı gibi patolojik lezyonların varlığı protein kaybına neden olan enteropatinin kanıtı olarak belirtilmiştir [23, 36]. Ayrıca *Map*'in, supramammar, karaciğer ve akciğer lenf düğümleri de dâhil olmak üzere bağırsak dışında diğer organlara da yayılabildiği bildirilmiştir [20].

Klinik bulguların görülmesiyle birlikte immün yanıtın Th1'den Th2 aracılığıyla gelişen immün yanıtı dönüştüğü gözlenmiştir [7]. Antikor üreten B hücrelerinin arttığı ve bununla orantılı bir şekilde serum antikor düzeylerinin de tespit edilebilir şekilde yükseldiği ortaya konulmuştur [23]. İmmün yanıtta bu değişiklikler belirlenmiş olmasına rağmen, bu değişime neden olan faktörler henüz aydınlatılamamıştır [23]. İmmün yanıtın değişimi ile periferik mononükleer kan hücrelerinde, ileum ve ilgili lenf nodüllerinde IL-10, TGF- β , IL-4 gibi anti-enflamatuar sitokinlerin baskın olduğu gözlenmiştir [12, 23]. Ayrıca Treg hücreleri (CD4+CD25+) tarafından IL-10 ve TGF- β sentezinin sağlandığı ve böylece CD4⁺T hücre popülasyonunun daha çok baskılandığı, Th2 hücre yanıtının baskılanması nedeniyle B hücre yanıtının azaldığı bildirilmiş, ancak B hücre yanıtının diğer deyişle IgG1 yanıtının bu aşamada hala ölçülebilir düzeyde kaldığı açıklanmıştır [36].

Sonuç olarak, bugüne kadar paratüberküloz için etkenin mevcut immün sistemden kaçma stratejileri nedeniyle uygun bir koruma ve kontrol stratejisi belirlenememiş, etkili bir aşı geliştirilememiştir. Spesifik bir aşı veya tedavinin bulunabilmesi için *Map*'in, immün sistemden kaçış mekanizmalarının ve patogenezinin anlaşılması gerekmektedir. Bu derlemede, *Map*'in enfeksiyon oluşturma mekanizmaları ile immün sistemi nasıl yanılttığı ve kalıcı enfeksiyonun nasıl oluştuğu açıklandı. Yapılan literatür taramalarında detaylı çalışmalarla karşılaştırılmasına rağmen, hastalığın patogenezinde hala açıklanamayan mekanizmaların bulunduğu ve hastalığın oluşum mekanizmasının henüz tam olarak

anlaşılamadığı görülmektedir. Bu nedenle, *Map*'in virülens faktörleri ile hastalığın patogenezi ve konakçının genetik duyarlılığı gibi konuların daha iyi anlaşılabilmesi için daha ayrıntılı çalışmalara gereksinim olduğu söylenebilir. Ancak bu detaylı çalışmalar sonucunda, etkili bir tedavi veya aşı bulunarak ya da yeni tanı testleri geliştirilerek hastalığın kontrolü yapılabilir ve böylece hayvan sağlığının yanı sıra insanlar için de gıda güvenliği sağlanabilir.

Kaynaklar

1. Arsenault RJ, Li Y, Bell K, Doig K, Potter A, Griebel PJ, Kusalik A, Napper S, (2012). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* inhibits interferon gamma induced signaling in bovine monocytes: insights into the cellular mechanisms of Johne's disease. *Infect Immun.* 80, 3039-3048.
2. Arsenault RJ, Li Y, Maattanen P, Scruten E, Doig K, Potter A, Griebel P, Kusalik A, Napper S, (2013). *Altered Toll-like receptor 9 signaling in Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*-infected bovine monocytes reveals potential therapeutic targets. *Infect Immun.* 1, 226-237.
3. Arsenault RJ, Maattanen P, Daigle J, Potter A, Griebel P, Napper S, (2014). *From mouth to macrophage: mechanisms of innate immune subversion by Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet Res.* 45, 54.
4. Ayele WY, Machackova M, Pavlik I, (2001). *The transmission and impact of paratuberculosis infection in domestic and wild ruminants.* *Vet Med-Czech.* 46, 205-224.
5. Baquero MM, Plattner BL, (2016). *Bovine WCI(+)* $\gamma\delta$ T lymphocytes modify monocyte-derived macrophage responses during early *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection. *Vet Immunol Immunopathol.* 170, 65-72.
6. Basler T, Geffers R, Weiss S, Valentin-Weigand P, Goethe R, (2008). *Mycobacterium avium* subspecies induce differential expression of proinflammatory mediators in a murine macrophage model: evidence for enhanced pathogenicity of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Immunobiology.* 213, 879-888.
7. Bassey EO, Collins MT, (1997). *Study of T-lymphocyte subsets of healthy and Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*-infected cattle. *Infect Immun.* 65, 4869-4872.
8. Begg DJ, de Silva K, Carter N, Plain KM, Purdie A, Whittington RJ, (2011). *Does a Th1 over Th2 dominance really exist in the early stages of Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infections? *Immunobiology.* 216, 840-846.
9. Behr MA, Kapur V (2008): *The evidence for Mycobacterium paratuberculosis in Crohn's disease.* *Curr Opin Gastroenterol.* 24, 17-21.
10. Clarke CJ (1997): *The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and other species.* *J Comp Pathol.* 116, 217-261.
11. Collins MT, Wells SJ, Petrini KR, Collins JE, Schultz RD, Whitlock RH, (2005). *Evaluation of five antibody detection tests for diagnosis of bovine paratuberculosis.* *Clin Diagn Lab Immunol.* 12, 685-692.

12. Coussens PM, Verman N, Coussens MA, Elftman MD, McNulty AM, (2004). *Cytokine gene expression in peripheral blood mononuclear cells and tissues of cattle infected with Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: evidence for an inherent proinflammatory gene expression pattern. *Infect Immun.* 72, 1409-1422.
13. Çetinkaya B, Muz A, Ertaş B, Öngör H, Sezen Y, Gülcü B, (2000). *Süt ineklerinde paratüberküloz prevalansının polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile saptanması*. *Türk J Vet Anim Sci.* 24, 371-379.
14. Davis JM, Ramakrishnan L, (2009). *The role of the granuloma in expansion and dissemination of early tuberculous infection*. *Cell.* 136, 37-49.
15. de Almeida DE, Colvin CJ, Coussens PM, (2008). *Antigen-specific regulatory T cells in bovine paratuberculosis*. *Vet Immunol Immunopathol.* 125, 234-245.
16. Ellingson JLE, Anderson JL, Koziczkowski JJ, Radcliff RP, Sloan, SJ, Allen SE, Sullivan NM, (2005). *Detection of viable Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in retail pasteurized whole milk by two culture methods and PCR. *J Food Prot.* 68, 966-972.
17. Gillan S, O'Brien R, Hughes AD, Griffin JF, (2010). *Identification of immune parameters to differentiate disease states among sheep infected with Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Clin Vaccine Immunol.* 17, 108-117.
18. Kalis CH, Barkema HW, Hesselink JW, van Maanen C, Collins MT, (2002). *Evaluation of two absorbed enzyme-linked immunosorbent assays and a complement fixation test as replacements for fecal culture in the detection of cows shedding Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *J Vet Diagn Invest.* 14, 219-224.
19. Khalifeh MS, Stabel JR, (2004). *Effects of gamma interferon, interleukin-10, and transforming growth factor beta on the survival of Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in monocyte-derived macrophages from naturally infected cattle. *Infect Immun.* 72, 1974-82.
20. Lamont EA, (2012). *Survival strategies of Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in a variety of microenvironments. PhD Thesis, The University of Minnesota, Minnesota, United States.
21. Lockhart E, Green AM, Flynn JL, (2006). *IL-17 production is dominated by T cells rather than CD4 T cells during Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol.* 177, 4662-4669.
22. Magombedze G, Eda S, Stabel J, (2015). *Predicting the role of IL-10 in the regulation of the adaptive immune responses in Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infections using mathematical models. *PLoS One.* 10, e0141539.
23. Mallikarjunappa S, (2013). *Cytokine gene expression in Holstein-Friesian and Jersey Calves infected with Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Master Thesis. The University of Guelph, Ontario, Canada.
24. Nielsen SS, (2008a). *Transitions in diagnostic tests used for detection of Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infections in cattle. *Vet Microbiol.* 132, 274-282.
25. Nielsen SS, Bjerre H, Toft N, (2008b). *Colostrum and milk as risk factors for infection with Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in dairy cattle. *J Dairy Sci.* 91, 4610-4615.
26. Plattner BL, Doyle RT, Hostetter JM, (2009). *Gamma-delta T cell subsets are differentially associated with granuloma development and organization in a bovine model of mycobacterial disease*. *Int J Exp Pathol.* 90, 587-597.
27. Robinson M, O'Brien R, Mackintosh C, Griffin F, (2008). *Differential immune responses of red deer (Cervus elaphus) following experimental challenge with Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Clin Vaccine Immunol.* 15, 963-969.
28. Roussey JA, Steibel JP, Coussens PM, (2014). *Regulatory T cell activity and signs of T cell unresponsiveness in bovine paratuberculosis*. *Front Vet Sci.* 1, 20.
29. Sanjuan MA, Milasta S, Green DR, (2009). *Toll-like receptor signaling in the lysosomal pathways*. *Immunol Rev.* 227, 203-220.
30. Secott TE, Lin TL, Wu CC, (2002). *Fibronectin attachment protein is necessary for efficient attachment and invasion of epithelial cells by Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Infect Immun.* 70, 2670-2675.
31. Selvaraj P, Afsal K, Harishankar M, (2015). *Vitamin D and macrophage functions in tuberculosis*. *Macrophage.* 2, e756.
32. Sohal JS, Singh SV, Tyagi P, Subhodh S, Singh PK, Singh AV, Narayanasamy K, Sheoran N, Komal Singh Sandhu, (2008). *Immunology of mycobacterial infections: with special reference to Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Immunobiology.* 213, 585-598.
33. Sommer S, Pudrith CB, Colvin CJ, Coussens PM, (2009). *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* suppresses expression of IL-12p40 and iNOS genes induced by signalling through CD40 in bovine monocyte-derived macrophages. *Vet Immunol Immunopathol.* 128, 44-52.
34. Tiwari A, VanLeeuwen JA, McKenna SL, Keefe GP, Barkema HW, (2006). *Johne's disease in Canada Part I: clinical symptoms, pathophysiology, diagnosis, and prevalence in dairy herds*. *Can Vet J.* 47, 874-882.
35. Tizard IR, (2009). *Veterinary Immunology*, 8th edition, Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, p: 11-16.
36. Wadhwa A, Kumar N, Velasco-Villa A, Eda S, (2013). *Overview of Johne's disease immunology*. *Veterinary World.* 6, 901-904.
37. Waters WR, Miller JM, Palmer MV, Stabel JR, Jones DE, Koistinen KA, Steadham EM, Hamilton J, Davis WC, Bannantine JP, (2003). *Early induction of humoral and cellular immune responses during experimental Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection of calves. *Infect Immun.* 71, 5130-5138.
38. Weiss DJ, Souza CD, (2008). *Modulation of mononuclear phagocyte function by Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet Pathol.* 45, 829-841.
39. Whittington RJ, Windsor PA, (2009). *In utero infection of cattle with Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: A critical review and meta-analysis. *Vet J.* 179, 60-69.
40. Woo SR, Czuprynski CJ, (2008). *Tactics of Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* for intracellular survival in mononuclear phagocytes. *J Vet Sci.* 9, 1-8.
41. Yardımcı H, (2006). *Mycobacterium* enfeksiyonları. Editörler: Aydın N, Paracıoğlu J. *Veteriner Mikrobiyoloji, İlke-Emek Yayınları, Ankara*, s: 87-107.

Viruslar ve Teratogenez

Cüneyt Tamer, Semra Okur Gümüsova

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji AD.

Geliş Tarihi / Received: 05.01.2017, **Kabul Tarihi** / Accepted: 17.10.2017

Özet: Hayvancılıkta reproduksiyon sorunları işletmelerin mücadele edeceği önemli sorunlardan birisi olarak kabul edilir ve erken teşhisi edilmesi önem taşır. Teratojen ajanlar ise, gebelik döneminde gelişimsel bozukluklara neden olarak reproduktif sorunlar oluşturan önemli etkenlerdendir. Enfeksiyöz teratojen ajanlar içerisinde sınıflandırılan viral etkenler de reproduktif sorunların önemli nedenlerinden birisi olarak kabul edilir. Teratojen virusların birçoğu gebelik döneminde asemptomatik seyrederek ve latentlik periyodu nedeniyle teşhisi zordur. Bu durum virusların saçılmasını kolaylaştırdığından sürü sağlığını tehdit etmektedir. Bu derleme ile önemli viral teratojenler hakkında yapılmış çalışmaların verileri toplanıp özetlenerek bu konudaki bilgilerin güncellenmesi amaçlanmıştır.

Anahtar kelimeler: Patogenez, teratogenez, virus,

Teratogenesis and Viruses

Abstract: Reproduction problems is one of the important problem for dairy farming and early diagnosis is important. Teratogen agents are creates reproductive problems as the cause of developmental disorders in the pregnancy period. Also, viruses classified as teratogen infectious agent are considered to be one of the major causes of reproductive problems. Many teratogen viruses are asymptomatic and is difficult to diagnose due to the latency period. This situation is threatens herd health. In this review, we aimed to update the datas of the studies about the important viral teratogens.

Key Words: Pathogenesis, teratogenesis, virus.

Giriş

Teratojenite, gebelik süresince yavruya meydana gelen gelişimsel bozuklukları (malformasyonları) ifade ederken, teratojen terimi ise bu bozuklukları meydana getiren etkenleri tanımlamaktadır. Hayvanlarda teratojenik olguların önlenmesi reproduksiyonun sorunsuz devam edebilmesi için gereklidir.

Malformasyonlar etiyolojilerine göre; kendiliğinden veya genetik olarak gelişen kromozomal bozukluklara bağlı şekillenen farklı protein kodlanmalarının neden oldukları gelişim bozuklukları ile transplasental olarak yavruya etkileyen enfeksiyonlar ve toksik kimyasallar gibi teratojenlerin oluşturduğu gelişim bozuklukları olarak ikiye ayrılır. Viral etkenler, teratojen enfeksiyöz ajanlar içerisinde sınıflandırılırlar ve daha çok sinir ve iskelet kas sistemini etkileyerek malformasyonlar meydana getirdikleri ortaya konmuştur [20].

Fötal Sinir Sistemi Gelişimi ve Viral Teratojenlerin Etki Mekanizmaları: Embriyogenezisin erken dönemlerinde ektodermin üst orta kısımları

kalınlaşıp içeri doğru çökerek mezodermden ayrılıp nöral tüpü şekillendirirken, nöral tüpü şekillendiren nöroektodermal hücreler ise dışa doğru göç ederek serebral ve serebellar dokuları şekillendirmektedir. Daha sonra, nöral tüpün rostral kısmından serebrum ve serebellum oluşurken, kaudal kısmı ise, omuriliği oluşturmak için farklılaşarak, ventrikuluslara ve kanalis spinalise dönüşmektedir [13]. Her hayvan türünde nöral tüpün gelişimi, myelinizasyonu ve sinir hücrelerinin göçü farklılık göstermektedir. Bu nedenle sinir sistemi gelişimini koyun, sığır, at ve domuzlarda prenatal dönemde tamamladığı, kedi ve köpekte ise postnatal dönemde de gelişimin devam ettiği bilinmektedir. Dolayısı ile teratojenlerin hedef aldığı hücrelerin, hayvan türlerine göre farklılık gösterdiği bildirilmiştir [20]. Enfeksiyöz etkenlerin gebelik sırasında fötusa bulaşmasından sonra, yavrunun nötralizan antikorları üretebilme ya da aneden alabilme durumuna bağlı olarak teratojenik defektin büyüklüğünün şekillenebildiği de bilinmektedir. Bazı hayvan virusları bovine viral diyare (BVD), border disease (BD) ve klasik domuz vebası (CSF), sinir sistemi dokularındaki teratojenik etki-

lerini genellikle selektif hücre ölümü ile gerçekleştirmektedir. Bu mekanizma, virusun hücreyi nekroza uğratarak nonspuratif yangı oluşturarak hücrelerin göçünü engellenmesi ve nekroza uğrayan dokuda boşluklar oluşması sonucu porensafali şekillenmesi ile açıklanmıştır. Hidranensefali gibi malformasyonların ise zamanla bu boşlukların beyin sıvısıyla dolması sonucu şekillendiği bildirilmiştir. Viral etkenler sinir sisteminde en çok hidranensefali, porensafali, hipomiyelinogenezis, demiyelinogenezis, serebellar hipoplazi, serebellar displazi ve hidrosefalusa, iskelet kas sisteminde ise nöral tüp defektine bağlı oluşan iskelet kası atrofisine ve artrogrippoiz sendromuna sebep olmaktadır. Teratojen viruslar hücre ölümü olmadan da hücrenin fonksiyonunu bozabilmektedirler. Örneğin BVD, BD ve CSF hücrelerde yetersiz miyelin sentezlemesine neden olarak hipomiyelinogenezis oluşturdukları bildirilmiştir [13].

Hayvanlar İçin Önemli Teratojen Virus Aileleri

1. Bunyaviridae ailesi: Bunyaviridae ailesi içinde sınıflandırılan iki genusta önemli teratojen viruslar yer alır. Bunlar; *phlebovirus* genusuna ait rift vadisi humması virusu (RVFV) ile *orthobunyavirus* genusuna ait *akabane virus* (AKAV), *cache vadisi virusu* (CVV), *aino virus* (AIV) ve *schmallenberg virus* (SMBV) olarak bildirilmiştir [7, 12] Bunlardan, akabane virus enfeksiyonlarının sıklıkla kuzu, buzağı ve oğlaklarda, aino virus enfeksiyonlarının daha çok buzağılarda, *cache vadisi virusu*'nun neden olduğu enfeksiyonların ise daha çok kuzularda meydana geldiği belirlenmiştir [12]. 2011 yılından itibaren bir çok avrupa ülkesinde enfeksiyonlara neden olan *schmallenberg virusun* ise sığır, koyun ve keçilerde non spesifik semptomlarla seyrederek abort ve anormal doğumlara sebep olmaktadır [7].

Akabane virusun sığırda gebeliğin ikinci yarısında (3 - 6. ay arasında), koyun ve keçilerin ise gebeliğin erken dönemlerinde (30 - 50. gün arasında) alınması durumunda, virusun subventriküler çizgilerde nekroza yol açtığı ve ölen nöronların gebeliğin ilerleyen döneminde beyinin gri madmesine doğru göç edememesi nedeniyle de beyin dokusunun tamamı ya da tamamına yakınının ortadan kalkarak sadece zarla çevrili içi sıvı dolu bir kese-

ye dönüşerek hidranensefaliye neden olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, gebeliğin daha geç döneminde şekillenen enfeksiyonlarda beyindeki lezyonların şiddetinin azaldığı ve porensafali şekillendiği, geç şekillenen enfeksiyonlar sırasında ise mikroensefali ve serebellar hipoplazinin meydana gelebileceği de bildirilmiştir [13].

Schmallenberg virus enfeksiyonlarında ise transplental enfeksiyona az rastlandığı, sığırda immun sistemi gebeliğin 40 - 170. günleri arasında geliştiğinden merkezi sinir sistemi lezyonlarının genellikle gebeliğin 60 - 180. günleri arasında oluştuğu belirlenmiştir [6]. Ayrıca, gebeliğin erken dönemindeki enfeksiyonlarda şiddetli merkezi sinir sistemi bulgularının, geç dönemindeki enfeksiyonlarda ise ensefalomiyelitisin meydana geldiği de bildirilmiştir [17]. *Akabane virus* ile birlikte *schmallenberg virusu*'nun oluşturduğu önemli başka bir sendrom ise virusun nöral tüpün kaudal kısmındaki bozukluklarının (Disrafizm) sebep olduğu artrogrippoizdir. Artrogrippoiz hayvanlarda omurgada kifozis, lordozis ya da tortikolliz şekillendiği ve ayak eklemlerinin ise fleksiyon durumunda kaldığı belirlenmiştir. Ayrıca medulla spinalisin ventral kollarındaki nöronların ölümünün sebep olduğu denerveyona bağlı iskelet kası atrofisinin meydana geldiği ve kas dokusunun yerini yağ ve fibröz dokunun doldurduğu da bildirilmiştir [3].

2. Flaviviridae ailesi: Flaviviridae ailesinin *pestivirus* cinsine ait ve birbiri ile genetik yakınlığa sahip 3 önemli virus olan BVDV, BDV ve CSFV'nin ve *flavivirus* cinsinde yer alan *wesselbron virus* (WBV)'un da teratojenik etkiye sahip viruslar olduğu bilinmektedir. Sığırda gebeliğin yaklaşık 100. gününe kadar şekillenen BVDV enfeksiyonlarında mumifikasyon veya abortlar şekillenir. 100 ile 125. günler arası şekillenen BVDV enfeksiyonlarında ise immun sistem gelişmesini henüz tamamlamadığı için, yavru doğsa bile zayıf ve immun tolere persiste enfeksiyon ile doğmaktadır. Malformasyonların ise gebeliğin yaklaşık olarak 6. ayından sonraki BVDV enfeksiyonunu takiben ortaya çıktığı belirlenmiştir. BDV ve CSFV enfeksiyonlarındaki malformasyonların ise, sırasıyla küçük ruminantların ve domuzların gebeliklerinin geç döneminde (özellikle 30-80. günde) oluşan enfeksiyonlar sonucu şekillendiği tespit edilmiştir [12]. Bu ailedeki viruslar diğer teratojenik viruslara benzer malformasyonlara da sebep

olmaktadırlar. Örneğın, BVDV sığırlarda, hastalık için karakteristik olan serebellar hipoplazinin yanı sıra hidranensefali, hidrosefalus, microensefali, perosomus elumbus, kistik septum pellisidum, hipomiyelinogenezis ve retinopatiye sebep olabildiğı belirlenmiştir [2, 10, 13]. Koyunlarda BDV enfeksiyonunda ise bunlara ek olarak vertebra defektleri tespit edilmiştir [12].

3. Reoviridae ailesi: Bluetongue virusu (BTV), ruminantlarda, özellikle koyun ve keçilerde vaskülitis, oral kavitede hiperemi, perikarditis, abort ve anomali doğumlara sebep olan *Orbivirus* genusuna ait bir virusdur. Virus, sığırlarda ve vahşi ruminantlarda genelde asemptomatik seyrederek [12]. Virusun dış kapsit proteini-2 (VP2)'nin yapısına bağılı olarak 27 farklı serotip tespit edilmiştir [9]. BTV saha suşlarının çok az bir kısmının transplental enfeksiyona yol açtığı bildirilse de laboratuvar koşullarında hazırlanan canlı attenüe aşuların ve virusun bazı suşlarının (özellikle serotip 8) fetal enfeksiyona neden olduğu bilinmektedir [12]. Sığırlarda gebeliğın ilk yarısında (70 - 130. günler arasında) oluşturulan deneysel enfeksiyonlar sonucunda buzağılarda malformasyonlar gözlemlenirken [11], yine koyunlarda 50 ile 55. günler arasında oluşturulan deneysel enfeksiyon sonucu, ensefalopati ve retinopati şekillendiğı saptanmıştır. Ayrıca virusun neden olduğu beyin lezyonlarının hemen hepsinde serebellar hipoplazi de bildirilmiştir [22]. BTV ile enfekte olan gebe hayvanlarda beyindeki öncü glia hücrelerinin ve nöronların enfeksiyonu sonucu hidranensefali ve poreensefali şekillenmektedir. Çalışmalar porenselinin hidranensefaliye göre daha az şekillendiğini de ortaya koymuştur [11]. Ayrıca virusun sebep olduğu vaskülitisin beyin lezyonlarını arttığı ve geç dönemdeki enfeksiyonların herhangi bir malformasyon yapmadan sadece ensefalitise neden olduğu saptanmıştır [21]. BTV ile enfekte gebe hayvanlarda bas-

kın semptom olarak ise hidranensefali görülmekle birlikte periventriküler doku kaybının olduğu bazı olgularda hidrosefalus da bildirilmiştir [18]. Şuana kadar saptanan BTV-8' in neden olduğu enfeksiyonlarda ise beyin sapı, medulla ve spinal kord boyunca bir bulgu saptanmamış ve bu enfeksiyonlar da artrogrippozis ve vertebral kanal malformasyonları gibi iskelet kas sistemini etkileyen lezyonlar belirlenmemiştir [1].

4. Parvoviridae ailesi: *Feline Panlökopeni virus* (FPV), Parvoviridae ailesinin Parvovirinae alt ailesinin *Parvovirus* cinsinde yer alır [8]. FPV, çok bulaşıcı ve tüm dünyada oldukça yaygın enfeksiyonlara sebep olmaktadır. Hastalık direk kontak yolla bulaşır. İnsan ve fomitlerin ise enfeksiyonun taşınmasında mekanik vektör rolü oynayabildikleri bildirilmiştir [12].

Parvoviruslar enfekte ettikleri hücreleri bölünmesini S fazında yakaladıklarından yüksek mitotik aktivite gösteren hücrelere tropizmleri oldukları düşünülmüştür [4]. Karnivorların sinir sistemi gelişimi doğumdan sonra da devam ettiği için, daha önce bu virusla perinatal dönemde enfekte olan kedilerde serebellar hipoplazi lezyonları ve beyindeki nöronlarda virusun varlığı immunohistokimyasal yöntemlerle tespit edilmiştir [5]. Gebelik süresince plentayı geçen virus, fötusun serebellumdaki extragranüler tabakada nekroz oluşturup serebellar hipoplaziye sebep olmaktadır Ayrıca, serebellumdaki purkinje hücrelerinde de virus tespit edilmiş ve enfekte fötsularda hafif derecede renal hipoplazi şekillendiğı de bildirilmiştir [16]. FPV ile enfekte kedi yavrularında kifozis de tespit edilmiştir ama bunun virus enfeksiyonu ile ilgili olup olmadığı tam olarak ortaya konulamamıştır [13]. Tablo 1' de hayvanlar için teratojen olan viruslar ve neden oldukları malformasyonlar gösterilmiştir

Tablo 1. Teratojen virusların fötusta meydana getirdiğı malformasyonlar.

	BVDV	BDV	AKAV	BTV	SMBV	FPV
Hidranensefali	+	+	+	+	+	+
Poreensefali	+	+	+	+	+	
Hidrosefali	+	+		+	+	
Microensefali	+	+	+	+	+	
Serebellar hipoplazi	+	+		+	+	+
Vertebra defektleri		+			+	+
Arthrogrippozis			+		+	

Bulaşma

Teratojen viruslar genel olarak vertikal bulaşmaya sahip olsalar da horizontal olarak bireyden bireye farklı şekilde bulaşabilmektedirler. Flaviviridae ve Bunyaviridae ailesine ait teratojenler birer arbovirustur. AKAV, SMB ve BTV sokucu sineklerle aktarıldığı bildirilmiştir. BTV için özellikle sulak bölgelerde, bahar aylarında sokucu sineklerin (*Culicoides* spp.) artmasıyla birlikte hayvanlar için risk artmaktadır. BTV özellikle ruminantların haricinde, son yıllarda köpek gibi diğer memelilerde de bildirilmiştir [12, 15]. Bu yüzden bu virusun rezervuar hayvan türünün arttığı göz önünde bulundurulmalıdır. BVDV, BDV, CSFV, FPV ve AEV ise direk kontak yolu ile bulaşmaktadır. Sığırlarla koyunlar arasında BVDV ve BDV enfeksiyonlarının türler arası nakli gözlemlenmiştir ama keçilerden diğer hayvan türlerine aktarım tespit edilememiştir [12].

Teşhis

BTV virusunun damar endotel duyarlılığından dolayı direk teşhisin de, kandan, yüksek oranda Polimaraz zincir reaksiyonu (PCR) ile virus tespit edilebilir. Ayrıca yine dalak, akciğer, lenf yumrularından antijen tespiti yapılabilir. BTV, indirek olarak ise antikor ELİSA kitleri ile de tespit edilebilir [12]. BVDV, BDV ve CSFV virusları hücre kültüründe sitopatojenik etki yapmadan da üreyebileceği için identifikasyonda immunperoksidaz ve immunfloresan testleri hala "gold" yöntem olarak kabul edilmektedir [19]. Bununla birlikte antijen ELİSA kitleri ile de virus tespiti yapılmaktadır. Antikor tespitinde ise en sık serum nötralizasyon ve antikor ELİSA testleri kullanılmaktadır [12].

SMBV ve AKAV enfeksiyonlarının yavru atıkları, amniyon sıvısı ve kandan tespitinde real-time ve konvansiyonel PCR teknikleri kullanılabilir. AKAV için ayrıca virus nötralizasyon ve ELİSA testleri sayesinde antikor tespiti de yapılabilir. SMBV için ise yine ELİSA, virus nötralizasyon ve immunfloresan antikor tekniği ile antikor varlığı saptanmaktadır [14].

Korunma ve Mücadele

Türkiye'de BVDV ve BDV hastalığı ile mücadele için üretilen aşı bulunmamakla birlikte iki hastalığa karşı da ithal inaktif aşılar kullanılmaktadır.

Sığırlarda BVD hastalığı için uygulanan aşı takvimi, gebelikten 2 ay önce, kuru dönemde bir doz ve antikor titresinin gebelikte koruyucu seviyeye gelebilmesi için ise birinci dozdan 4 hafta sonra rapel doz uygulanmasıdır. BDV aşısı ise Türkiye'de rutin olarak gebelikten önce uygulanmaktadır. Koyunlar yılda iki defa gebelik oluşturulabileceği için birinci gebelikte aşılama uygulandıysa, ikinci gebelikten önce serum antikor titresi ölçülerek aşı uygulamasına buna göre karar verilmelidir.

Türkiye'de görülen ve vektörler aracılığı ile aktarılan diğer teratojen viruslar için ise korunmada mevsimsel aşılama önemli yer tutmaktadır. SMBV ve AKAV'a karşı da ithal ya da yerli bir aşı bulunmazken, BTV ile mücadele için Türkiye'de üretilen serotip 4'e karşı canlı aşı bulunmaktadır. Koyunlarda BTV aşılmasının yılda bir kez ilkbahar aylarında koç katımından 1 ay önce uygulanması uygundur.

Ülkemizde kedilerde görülen FPV için korunma ise, uygulanmakta olan karma aşılarla sağlanabilmekte ve enfeksiyonla mücadelede başarı şansını arttırmak için aşılamanın sokakta ve barınakta yaşayan kedilerde uygulanması önerilmektedir.

Sonuç

Hayvancılıkta özellikle süt ve damızlık işletmelerde, anaçlardan düzenli yavru alımı önemli bir konudur. Bu nedenle reproduksiyon sorunları işletmelerin mücadele edeceği en önemli sorunlardan birisi olarak kabul edilir.

Teratojen virusların birçoğunun annelerde asemptomatik seyretmesi ve bu enfeksiyonlardaki latentlik periyodu nedeniyle hasta hayvanların yetişkin dönemlerinde teşhis edilememeleri bu virusların saçılmasını kolaylaştırıp sürü sağlığını tehdit etmelerine neden olmaktadır. Bu nedenle gebelikten önce viral teratojenlerin teşhisi ve bunlardan korunmanın sağlanması ve enfekte hayvanların tespit edilip sürüden çıkartılması bu viruslar ile mücadele için önem taşımaktadır. Bunun yanı sıra viral teratojenlerin neden olduğu enfeksiyonlar ortak semptomlarla seyrettiğinden malformasyonlu doğan yavrulara ve virusun neden olduğu makroskobik lezyonlara bakarak enfeksiyonun etiyolojisi hakkında tahmin yürütmek zordur. Bu nedenle sürülerde belirli aralıklarla viral teratojenlerin varlığının araş-

tırılması ve bu enfeksiyonlar için etkili yerli aşıların geliştirilmesi de teratojen viruslar ile mücadele ve ülke ekonomisi açısından önem taşımaktadır.

Kaynaklar

1. Agerholm JS, Hewicker-Trautwein M, Peperkamp K, Windsor PA, (2015) *Virus-induced congenital malformations in cattle*. Acta Vet Scand. 57: 54.
2. Bahr C, Kuiper H, Distl O, (2003) *Bilateral anophthalmia associated with further anomalies of the head in German Holstein calves*. Dtsch Tierarztl Wochenschr. 110 (11): 454-456.
3. Bayrou C, Garigliany MM, Sarlet M, Sartelet A, Cassart D, Desmecht D, (2014) *Natural intrauterine infection with Schmalleberg virus in malformed newborn calves*. Emerg Infect Dis. 20: 1327-1330.
4. Deleu L, Pujol A, Faisst S, Rommelaere J, (1999) *Activation of promoter P4 of the autonomous parvovirus minute virus of mice at early S phase is required for productive infection*. J Virol. 73:3877-3885.
5. Garigliany M, Gilliaux G, Jolly S, Casanova T, Bayrou C, Gommeren K, Fett T, Mauroy A, Lévy E, Cassart D, Peeters D, Poncelet L, Desmecht D, (2016) *Feline panleukopenia virus in cerebral neurons of young and adult cats*. BMC Vet Res. 12(1):28.
6. Herder V, Hansmann F, Wohlsein P, Peters M, Varela M, Palmarini M, Baumgartner W, (2013) *Immunophenotyping of inflammatory cells associated with Schmalleberg virus infection of the central nervous system of ruminants*. PLoS One. 8(5):1-11.
7. Hoffmann B, Scheuch M, Hoper D, Jungblut R, Holsteg M, Schirmer H, Eschbaumer M, Goller KV, Wernike K, Fischer M, Breithaupt A, Mettenleiter TC, Beer M, (2011) *Novel orthobunyavirus in Cattle, Europe*. Emerg Infect Dis. 18(3):469-479.
8. International Committee on Taxonomy of Viruses. (2012). http://www.ictvonline.org/taxonomyHistory.asp?taxnode_id=20142920&taxa_name=Parvoviridae Erişim tarihi: 03.04.2016.
9. Jenckel M, Bréard E, Schulz C, Sailleau C, Viarouge C, Hoffmann B, Höper D, Beer M, Zientara S, (2015) *Complete coding genome sequence of putative novel bluetongue virus serotype 27*. Genome Announc. 3(2):1-2.
10. Karakaya E, Alpay G, Yilmazbas-Mecitoglu G, Alasonyalilar-Demirer A, Akgül B, Inan-Ozturkoglu S, Ozyigit MO, Seyrek-Intas D, Seyrek-Intas K, Yesilbag K, Gumen A, Keskin A, (2013) *Perosomus elumbis in a Holstein calf infected with bovine viral diarrhoea virus*. Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere. 41(6):387-391.
11. MacLachlan NJ, Conley AJ, Kennedy PC, (2000) *Bluetongue and equine viral arteritis viruses as models of virus-induced fetal injury and abortion*. Anim Reprod Sci. 60-61: 643-651.
12. MacLachlan NJ, Dubovi EJ, (2011) *Fenner's Veterinary Virology*. 4. Baskı, Kaliforniya. Elsevier. 62-380
13. Maxie MG, (2015) *Kennedy & Palmer's Pathology of Domestic Animals*, 6. Baskı, Ontario, 3:283-432.
14. OIE, Bunyaviral Diseases of Animals. http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/2.09.01_bunyaviral_diseases.pdf Erişim Tarihi: 07.05.2016
15. Oura CA, E Harrak M, (2011) *Midge-transmitted bluetongue in domestic dogs*. Epidemiol Infect. 139 (9): 1396-1400.
16. Parrish CR, (1995) *Pathogenesis of feline panleukopenia virus and canine parvovirus*. Baillieres Clin Haematol. 8:57-71.
17. Peperkamp NH, Lutikholt SJ, Dijkman R, Vos JH, Junker K, Greijden S, Roumen MP, van Garderen E, Meertens N, van Maanen C, Lievaart K, van Wuyckhuise L, Wouda W, (2015) *Ovine and Bovine Congenital Abnormalities Associated With Intrauterine Infection With Schmalleberg Virus*. Vet Pathol. 52(6):1057-1066.
18. Peters M, Mösenfechtel S, Jacobsen B, Beineke A, Wohlsein P, (2008) *Bluetongue virus serotype 8 (BTV-8)-associated brain malformations in two calves*. Dtsch Tierarztl Wochenschr. 115(8):298-303.
19. Schelp C, Greiser-Wilke I, (2003) *BVD diagnosis: an overview*. Berl Munch Tierarztl Wochenschr. 116:227-233.
20. Vandevelde M, Higgins RJ, Oevermann A, (2012) *Veterinary Neuropathology*. 1. Baskı, Oxford. 92-94.
21. Williamson SM, Scholes SF, Welchman D. de B, Dennison M, Batten CA, Williams DL, Mertens PPC, Mellor PS, (2010) *Bluetongue virus serotype 8-associated hydranencephaly in two calves in south-eastern England*. Vet Rec. 167:216-218.
22. Wouda W, Peperkamp NH, Roumen MP, Muskens J, van Rijn A, Vellema P, (2010) *Epizootic congenital hydranencephaly and abortion in cattle due to bluetongue virus serotype 8 in the Netherlands*. Tijdschr Diergeneeskd. 134:422-427.

