

TÜRKİYE'DE KOYUNLARDA ADENOVİRUS ENFEKSİYONU ÜZERİNDE ARAŞTIRMALAR

Feridun ÖZTÜRK*

ÖZET

Türkiye'de izole edilmiş bulunan koyun adenovirus tip 5 (OA₅), primer ve sekonder dana testis ile primer dana böbrek epitel hücre kültürleri ve MDBK (Madin Darby Bovine Kidney) hücre kültürüne adapte edilmiş ve bu hücrelerde üretilmiştir.

Türkiye'de çeşitli yörelerden 700 koyundan toplanan kan serumları üzerinde yapılan nötralizasyon testiyle, koyunlarda bu virusa karşı % 22.29 oranında nötralizan antikor bulunduğu ve pozitif nötralizasyon veren serumların 1/3.98 - 1/431.6 değerleri arasında değişen nötralizan antikor kapsadığı saptanmıştır. Bu sonuçlar koyunlarda bu virus ile oluşan enfeksiyonun Türkiye'de yaygın olduğunu göstermektedir.

SUMMARY

Researches on Adenovirus Infection in Sheep in Turkey

Previously isolated ovine adenovirus type 5 (OA₅) was adapted and propagated in the primary and secondary tissue cultures of calf testicular epithelium, to primary cultures of calf renal epithelium, and MDBK cell cultures.

Neutralizing antibodies against this virus were found in 22.29 % of blood sera obtained from 700 sheep coming from different parts of Turkey. The concentration of neutralizing antibodies was ranging from 1/3.98 to 1/431.6 when the positive sera was titrated. These results suggested that the adenovirus infections by OA₅ in sheep in Turkey are remarkably frequently detectable and this requires some measurements and special care before it is too late.

Key words: Adenovirus infection, sheep.

GİRİŞ

Koyun adenovirusları ilk olarak McFerran ve ark.¹ tarafından izole edilmiştir. Bu araştırmacılar, koyunların gaitalarından hazırladıkları süspansiyonlardan primer kuzu böbrek doku kültürlerine yaptıkları ekimler sonunda adenovirusları izole etmeyi başarmışlardır. Sonraki yıllarda, aynı araştırmacılar² izole ettikleri bu adenovirusları

* Doç. Dr.; Selçuk Üniv. Veteriner Fakültesi, Konya.

çapraz nötralizasyon testi kullanmak suretiyle 3 grup altında toplamışlar ve bunları koyun adenovirus tip 1 (OA₁), koyun adenovirus tip 2 (OA₂) ve koyun adenovirus tip 3 (OA₃) olarak isimlendirmişlerdir.

Sharp ve ark.³, kuzuların rektal numunelerinden koyun tiroid doku kültürlerine ekimler yapmışlar ve izole ettikleri ajanı adenovirus olarak idantifiye etmişlerdir. Bu izole edilen adenovirus suşu, bilinen 3 koyun adenovirus serotipinden antijenik özellikleri yönünden ayrıcalık gösterdiğinden, koyunların yeni bir adenovirus tipi olarak kabul edilmiş ve koyun adenovirus tip 4 (OA₄) olarak adlandırılmıştır.

Bauer ve ark.⁴, klinik olarak sağlıklı koyunların gaita numunelerinden primer kuzu böbrek doku kültürlerine ekimler yaparak sitopatolojik değişiklikler yapan bir ajan izole etmişlerdir. Yapılan serolojik çalışmalarla izole edilen bu ajanın, diğer koyun adenovirus tiplerinden farklı olduğu saptanmıştır. Sonradan bu suş, koyun adenovirus tip 5 (OA₅) olarak isimlendirilmiştir⁵. Belak ve Palfi⁶, hastalıklı koyunların burun akıntılarında Het/3 olarak isimlendirdikleri viral bir ajan izole etmişler ve bunu adenovirus olarak idantifiye etmişlerdir. Het/3'ün yapılan serolojik çalışmalar sonunda, sığır adenovirus tip 2 ile yakın bir ilişkisi olduğu tespit edilmiştir⁶.

Belak ve ark.⁷, pneumoenteritis belirtileri gösteren kuzu ve koyunlardan, iki ayrı virus suşu (ORT/111 ve GY/14) izole etmişler, GY/14 suşunun koyun adenovirus tip 1 (OA₁) ile antijenik yakınlık gösterdiğini bildirmişlerdir.

Adair ve McFerran⁸, koyunlardan izole edilen 5 tip adenovirusun sığır ve domuz adenoviruslarından farklı olduğunu göstermişlerdir. Daha sonraki yıllarda Thurley ve ark.⁹, kuzulardan birbirinden farklı 2 adenovirus suşu (WV419/75 ve WV757/75) izole etmişlerdir. Sonradan Adair ve ark.¹⁰ tarafından yapılan çalışmada, WV419/75 adenovirus suşunun yeni bir adenovirus tipi olduğu belirlenmiş ve koyun adenovirus tip 6 (OA₆) olarak isimlendirilmiştir.

Bu araştırma, ülkemiz koyunlarında adenovirus enfeksiyon durumu ve özellikle ilk defa Türkiye'de⁴ izole edilmiş olan koyun adenovirus tip 5'in (OA₅) yaygınlığını saptamak amacıyla yapılmıştır.

MATERYAL VE METOD

Virus ve hücre kültürleri: Araştırmada Türkiye'de izole edilmiş ve yeni bir tip olduğu saptanmış olan koyun adenovirus tip 5 (OA₅) kullanıldı. Virusun üretilmesi için primer kuzu böbrek doku kültürlerinde üretilmiş olan OA₅, devamlı doku kültürlerinden MDBK (Madin Darby Bovine Kidney) hücrelerine adapte edildi. Bu hücrelerde 10-12 pasaj sonra karakteristik CPE'ler (sitopatolojik etkiler) meydana geldiği görüldü. MDBK hücrelerine adapte edilen OA₅, doku kültürlerinde üretme denemeleri amacıyla, primer dana böbrek ve testis, civciv fibroblast doku kültürleri ile sekonder dana testis doku kültürüne ve devamlı doku kültürlerinden MS₂₁ (Monkey Stable) hücrelerine ekildi. Hücre üretme vasatı olarak primer ve sekonder doku kültürleri için % 10 inaktif dana serumlu Hank's vasatı, MDBK hücreleri için % 10 inaktif dana serumu, % 1 vitamin ve % 1 aminoasit karışımı içeren Hank's vasatı ve MS₂₁ hücreleri için % 10 inaktif dana serumlu Earle vasatı kullanıldı. Virus üretmek amacıyla serumsuz Earle vasatı kullanıldı. Virus titresi Frey ve Liess'in¹¹ bildirdikleri mikrotitrasyon yöntemi ile yapıldı ve sonuçlar Kaerber'e¹² göre

hesaplandı. Serolojik araştırmada kullanılan virus, MDBK hücrelerinde 10-12 kez pasaj yapılan ve enfeksiyözite gücü $DKID_{50} = 10^{5.0}/0.1$ ml (Doku Kültürü İnektif Doz) olan OA_5 virusudur.

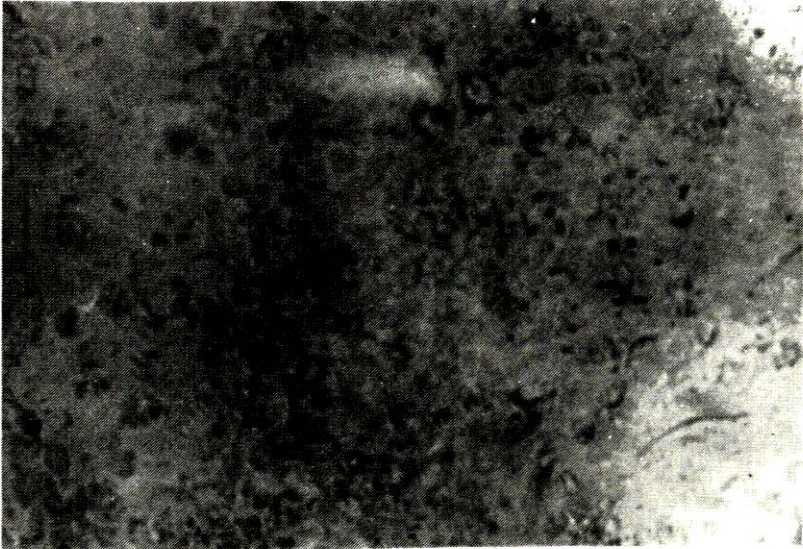
Serumlar: Araştırmada kullanılan 700 adet koyun kan serumu numunelerinden 90 adedi Konya Harası, 50 adedi Eskiřehir Çifteler Harası, 114 adedi Bursa Karacabey Harası, 342 adedi Ankara Et-Bahk Kurumu Mezbahası ve 104 adedi de Ankara'ya bağlı Çubuk ilçesi köylerinden temin edildi. Alınan kan serumları $56^{\circ}C$ de 30 dakika inaktive edildikten sonra sterilite kontrolleri yapılarak $-20^{\circ}C$ de saklandı.

Mikronötralizasyon testi: Araştırmada kullanılan virusa karşı koyun kan serumlarındaki nötralizan antikor varlıkları, mikronötralizasyon testi kullanmak suretiyle araştırıldı. Kullanılan virus $100 DKID_{50}/0.1$ ml. de, serum numuneleri ise 1/4 sulandırmada test'e alındı. Ayrıca 1/4 sulandırmada, kullanılan virusa karşı pozitif sonuç veren serumların SN_{50} (serum nötralizasyon) değer dağılımları için de mikronötralizasyon testi uygulandı. Bu amaçla ikişer katı sulandırmalar yapılarak serum numuneleri 1/4 den 1/512'ye kadar sulandırıldı.

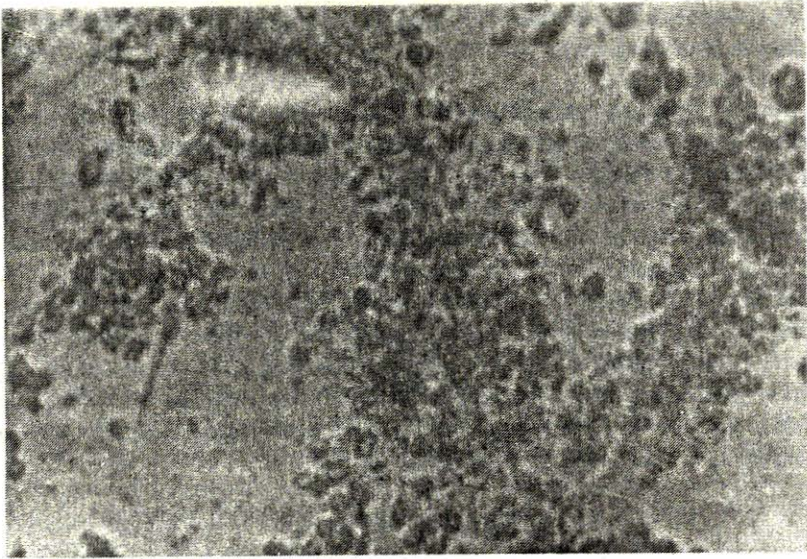
BULGULAR

Primer kuzu böbrek doku kültürlerinde üretilmiş olan OA_5 'in MDBK doku kültürlerine yapılan ekimleri sonunda, virusun 10-12 kör pasajdan sonra bu kültürlerde 6 gün içinde karakteristik CPE meydana getirdiği saptanmıştır (Resim: 1-2).

MDBK doku kültüründe üretilen virusu, primer dana testis ve böbrek, sekonder dana testis, civciv fibroblast ve MS_{21} doku kültürlerinde üretme denemeleri sonunda, virusun civciv fibroblast ve MS_{21} doku kültürleri dışında diğerlerinde 6 gün içinde CPE ile karakterize üremeler gösterdiği tesbit edilmiştir.



Resim: 1
MDBK Doku Kültürü, Kontrol (X400)
(Figure 1. Uninfected MDBK Tissue Culture, Control)



Resim : 2

MDBK Doku Kültüründe 4. Günde Virusun (OA₅) Meydana Getirdiği CPE Görünümü (X330)

(Figure 2. The CPE Appearance of MDBK Tissue Culture Infected With OA₅ Virus on the Fourth Day)

Araştırmada kullanılan OA₅ virusunun, MDBK doku kültürlerinde mikrotitrasyon yöntemi ile yapılan titrasyonu sonunda, titresi DKID₅₀ = 10^{5.0}/0.1 ml. olarak belirlenmiştir.

Şüpheli koyun kan serumları ile yapılan mikronötralizasyon test sonuçlarına göre; toplam 700 adet koyun kan serumu üzerinde yapılan nötralizasyon reaksiyonunda, 156 adet serumda (% 22.29) OA₅ 'e karşı nötralizan antikörler saptanmıştır (Tablo: I).

Tablo: I

Mikro-Nötralizasyon Testi İle OA₅ 'e Karşı Kontrolü Yapılan Serumların Toplu Sonuçları

Serum Numunesi Alınan Yerler	Test'e Tabi Tutulan Serum Adedi	SN ₅₀ = 1/4 Pozitif Serumlar	Pozitif Serumların Yüzdesi (%)
Ankara Et-Balık Kurumu Mezbahası	342	82	23.98
Konya Harası	90	41	45.55
Karacabey Harası	114	20	17.54
Çifteler Harası	50	0	0
Ankara'nın Çubuk İlçesi Köyleri	104	13	12.50
T O P L A M	700	156	22.29

1/4 sulandırma pozitif sonuç veren 156 adet koyun kan serumundaki mevcut antikor miktarını saptamak amacıyla daha ileri sulandırmalarda yapılan nötralizasyon testi sonunda, serumların 1/3.98 - 1/431.6 değerleri arasında antikor taşıdıkları tesbit edilmiştir. En yüksek antikor düzeyine Konya harasından alınan kan serumlarında, en düşük antikor düzeyine ise Ankara Et-Balık Kurumu Mezbahasında kesilen koyunlardan alınan kan serumlarında rastlanmıştır (Tablo: II).

Tablo: II
Pozitif Serumların Serum Nötralizasyon (SN₅₀) Değerleri

Serum Titreleeri	Ankara Et-Balık Kurumu Mezbahası	Konya Harası	Karacabey Harası	Ankara'nın Çubuk İlçesi Köyleri
1/3.98	1	—	—	—
1/4.68	1	—	—	—
1/5.62	2	—	—	—
1/6.61	2	2	—	—
1/7.94	5	—	—	—
1/9.33	8	—	—	—
1/11.2	5	—	—	2
1/13.2	3	—	1	1
1/15.8	8	1	1	—
1/18.6	1	—	1	—
1/22.4	5	1	7	1
1/26.3	8	1	2	2
1/31.6	6	1	2	3
1/37.2	5	4	3	1
1/44.7	3	3	2	—
1/52.5	6	2	—	—
1/63.1	5	4	1	1
1/74.1	—	4	—	—
1/89.1	3	2	—	1
1/106.0	2	6	—	—
1/126.0	2	—	—	—
1/148.0	—	1	—	—
1/180.8	—	2	—	—
1/209.0	—	3	—	—
1/251.0	—	—	—	1
1/295.0	1	2	—	—
1/355.0	—	1	—	—
1/431.6	—	1	—	—
TOPLAM	82	41	20	13

TARTIŞMA VE SONUÇ

Çeşitli araştırmacılar^{1.2.3.4.7.13} koyun adenoviruslarının yalnızca koyun orijinli doku kültürlerinde izole edildikleri ve üretildiklerini bildirmişlerdir.

Bauer ve ark.⁴ ve Müller¹⁴ tarafından ilk izolasyonu primer kuzu böbrek doku kültürlerinde yapılan OA₅'in BHK₂₁ (Baby Hamster Kidney), MDCK₆₅ (Madin Darby Canine Kidney), PK₁₅ (Pig Kidney), primer dana böbrek ve testis, sekonder dana böbrek ve testis ve civciv fibroblast doku kültürlerine yapılan ekimlerinden başarılı sonuçlar alınamamıştır.

Bu araştırmada, aynı virus suşu (OA₅), primer ve sekonder dana testis ile primer dana böbrek doku kültürlerine ve devamlı doku kültürlerinden MDBK hücrelerine adapte edilmiş ve bu hücrelerde üretilebilmiştir. Böylece virusun (OA₅) koyun orijinli hücreler dışında, sığır orijinli hücrelerde de üreyebileceği bu çalışma ile ortaya konulmuştur.

Türkiye'de koyunlardan izole edilen ve yeni bir tip olarak saptanan koyun adenovirus tip 5'e (OA₅) karşı, Türkiye'nin çeşitli yörelerinden toplanan 700 koyun kan serumu üzerinde yapılan nötralizasyon testi sonunda, koyunlarda bu virusa karşı % 0 ile % 45.55 arasında değişen ve ortalama olarak da % 22.29 oranda 1/4 serum sulandırmasında antikor bulunduğu saptanmıştır. 1/4 sulandırmada pozitif sonuç veren koyun kan serumlarının yapılan titrasyonunda, bu serumların 1/3.98 - 1/431.6 değerleri arasında nötralizan antikor kapsadığı tesbit edilmiştir.

Bu sonuçlar, Türkiye'de koyunların viral enfeksiyonları arasında adenovirusların önemli bir yeri olduğunu göstermektedir.

KAYNAKLAR

1. McFERRAN, J.B., NELSON, R., McCracken, J.M. and ROSS, J.G.: Viruses isolated from sheep. *Nature (Lond.)*, 221, 194-195 (1969).
2. McFERRAN, J.B., NELSON, R. and KNOX, E.R.: Isolation and characterization of sheep adenoviruses. *Arch. Ges. Virusforsch.*, 35, 232-241 (1971).
3. SHARP, J.M., McFERRAN, J.B. and RAE, A.: A new adenovirus from sheep. *Res. Vet. Sci.*, 17, 268-269 (1974).
4. BAUER, K., MÜLLER, H. and GÜRTÜRK, S.: Isolierung eines virus von schafen und seine Einordnung als neuer serotyp oviner adenoviren. *Zbl. Vet. Med.*, 22, 656-665 (1975).
5. BAUER, K.: Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere, Tübingen, Waldhauser Höhe Paul-Ehrlich-Str. 28 (Personel Communication), 1977.
6. BELAK, S. and PALFI, V.: An adenovirus isolated from sheep and its relationship to type 2 bovine adenovirus. *Arch. Ges. Virusforsch.*, 46, 366-369 (1974 b).
7. BELAK, S., PALFI, V. and PALYA, V.: Adenovirus infection in lambs. I. Epizootiology of disease. *Zbl. Vet. Med.*, 23, 320-330 (1976).
8. ADAIR, B.M. and McFERRAN, J.B.: Comparative serological studies with mammalian adenoviruses. *Arch. Virol.*, 51, 319-325 (1976).
9. THURLEY, D.C., BOYES, B.W., DAVIES, D.H., WILKINS, M.F., O'CONNELL, E. and HUMPHREYS, S.: Subclinical pneumonia in lambs. *N. Z. Vet. J.*, 25, 173-176 (1977).
10. ADAIR, B.M., McFERRAN, J.B. and McKILLOP, E.R.: A sixth species of ovine adenovirus isolated from lambs in New Zealand. *Arch. Virol.*, 74, 269-275 (1982).
11. FREY, H.R. and LIESS, B.: Vermehrungskinetik und verwendbarkeit einer stark zytopathogenen VD-MD-Virus-Stammes für diagnostische untersuchungen mit der mikrotiter-methode. *Zbl. Vet. Med.*, 18, 61-71 (1971).
12. KAERBER, G.: In diagnostic procedures for virus and rickettsial disease. *Public Health Assn. (New York)*, 3, 48-50 (1964).
13. BELAK, S. and PALFI, V.: Pneumoenteritis of lambs caused by adenoviruses. *Acta. Vet. Hung.*, 24, 327-328 (1974 a).
14. MÜLLER, H.: Charakterisierung und typisierung eines aus Schafen isolierten Adenovirus. *Dissertation, Giessen* (1974).