

KLİNİĞİMİZDE GÖZLEMLENEN REVERSE TRANSKRİPTAZ – POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (RT-PCR) İLE DOĞRULANAN MUKOZA HASTALIĞI OLGULARI

Mustafa İSSİ¹ İrem GÜLAÇTI² Ömer KIZIL¹ Tolga KARAPINAR¹
Hakan BULUT² Yusuf GÜL¹

¹Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Elazığ – TÜRKİYE

²Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı, Elazığ – TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 20.10.05 Kabul Tarihi: 20.02.2006

ÖZET

Bu olguda, Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Kliniği'ne muayene ve tedavi için getirilen iki sığırdaki Reverse Transkriptaz-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) metodu kullanılarak teşhis edilen Bovine Viral Diarrhea Virusu (BVDV)'nin sebep olduğu Mukosal Disease (MD) hastalığının bildirilmesi amaçlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Bovine Viral Diarrhea Virusu, BVDV, Mukosal Disease, RT-PCR.

ABSTRACT

The Mucosal Disease Cases Observed in Our Clinic and Confirmed with Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

The aim of case this report was to report the mucosal disease caused by Bovine Viral Diarrhea Virusu (BVDV) and diagnosed with reverse transcription – polymerase chain reaction (RT-PCR) technology in two cattle presented to the Internal Medicine Clinic of Veterinary Faculty of Fırat University for examination and treatment.

Key Words: Bovine Viral Diarrhea, BVDV, Mukosal Disease, RT-PCR.

GİRİŞ

Bovine Viral Diarrhea/Mucosal Disease (BVD/MD) sığırlara mahsus, identik bir virus (Bovine Viral Diarrhea Virusu; BVDV) tarafından meydana getirilen, klinikman birbirinden farklı iki formu bulunan hastalıktır (1, 2, 3). Hastalığın her iki formu da hayvanların yaş ve duyarlılığı ile çevresel faktörlerin etkisine bağlı olarak çoğunlukla sporadik ve zaman zaman enzootik olarak ortaya çıkabilir (4). Dünyada yaygın görülen hastalığın büyük ekonomik kayıplara neden olduğu bildirilmektedir (2, 5, 6, 7).

Flaviviridae familyasından pestivirus grubundan bir virus olan BVDV'nin primer konakçıları sığırlardır (1, 2, 5). Virusun, hücre kültürlerindeki cytopathic etkiye dayandırılarak yapılan BVDV izolasyonunda cytopathogenic (CP) ve noncytopathogenic (NCP) olarak iki biyotipe ayrıldığı, antijenik-genotipik olarak ise tip I (BVDV1) ve tip II (BVDV2) şeklinde sınıflandırıldığı bildirilmiştir (2, 5, 6, 7, 8). BVDV1 tipi yaygın olarak aşı üretimi, laboratuvar teşhis ve araştırmalar için kullanılmaktadır (9). BVDV2 tipe ait olan viruslar ilk kez 1980'lerin sonlarında Kuzey Amerika'daki bir salgında izole edilmiştir ve daha sonra yapılan çalışmalarla bu

tipin hastalığın şiddetli formundan sorumlu olduğu ortaya konmuştur (10).

BVDV'nin; BVD, akut ve kronik MD, sürekli virus saçan buzağular, kongenital anomaliler ve abortlar gibi birçok klinik görünümde hastalığa neden olduğu belirtilmiştir (8). BVDV'nin oluşturduğu morbiditesi yüksek ve mortalitesi düşük olan, en yaygın görülen BVD formunun saf ırk sığırlarda subklinik hafif bir enfeksiyon şeklinde seyrettiği, bu hayvanların genellikle serum nötralizing antikorlar ürettikleri ve birkaç günde iyileştikleri kaynaklarda belirtilmektedir (2, 5, 6, 8). Persiste infekte (PI) bir hayvanın farklı tipteki bir BVDV enfeksiyona karşı herhangi bir savunma mekanizması kurmadığı, sonradan BVDV'ye maruz kalırsa MD'nin şekillendiği bildirilmektedir. Sadece PI hayvanlarda görülen MD formunun morbidite oranı düşük (% 2-50) olmasına rağmen mortalite oranı yüksektir (% 90) (4, 6, 8).

Ülkemizde daha önce yapılan çalışmalarla (11, 12, 13, 14, 15, 16) BVDV'nin varlığı ortaya konmuştur. Bu amaçla gerçekleştirilen çalışmaların pek çoğu serolojik veya virus izolasyonu temellidir. Serolojik testlerin duyarlılığı

düşük ve elde edilen sonuçlar yoruma açıktır. Virus izolasyonu temelli testlerin ise en büyük dezavantajı çok uzun sürede sonuçların elde edilmesidir. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR); kısa sürede sonuç elde edilmesi, duyarlılığı ve özgüllüğünün yüksek olması nedeniyle pek çok viral hastalığın tanısında sıklıkla kullanılmaktadır. Ülkemizde BVDV'nin tanısında PCR'ın kullanıldığı sınırlı sayıda çalışmaya rastlanmıştır (15).

Bu gözlem, bölgemizde klinik olarak ilk defa rapor edilen ve sekans çalışmaları devam eden, reverse transkriptaz-PCR (RT-PCR) ile doğrulanan MD olgularının ön rapor olarak bildirilmesi amacıyla yazılmıştır. Ayrıca, çalışmada MD ile klinik olarak benzerliklerinden dolayı, örnekler, infeksiyöz bovine rhinotracheitis (IBR), sığır vebası (RPV) ve şap (FMDV) varlığı yönünden de araştırılmıştır.

OLGU SUNUMU

Çalışmanın materyalini iştahsızlık ve ishal şikayetiyle 15.04.2005 tarihinde F.Ü. Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Kliniği'ne muayene, teşhis ve tedavi için getirilen 6 aylık Simental melezi bir dana (Protokol no 255, Olgu 1) ile onbeş gün önce satın alınan, kliniğimize getirilmeden üç gün önce theileriosis tedavisi (Butalex ve Primamycin/LA) yapılan, iştahsızlık, öksürük ve ishal şikayetiyle 13.06.2005 tarihinde kliniğimize getirilen 1 yaşındaki Simental melezi bir tosun (Protokol No 406, Olgu 2) oluşturmuştur.

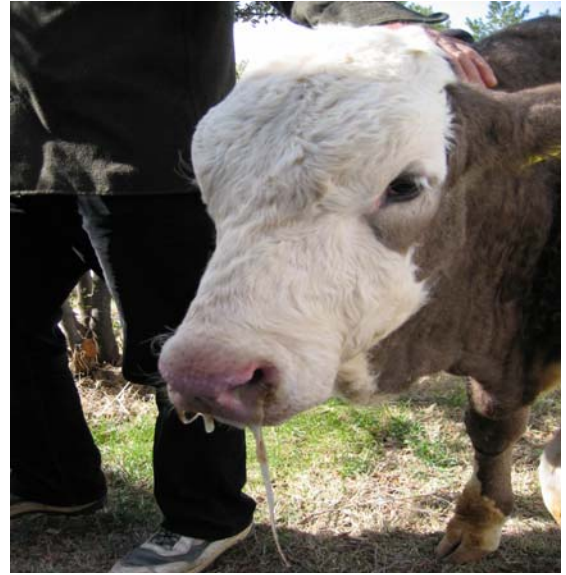
Anemnezde olgu 2'nin bulunduğu ahırda daha hafif şiddette ve farklı görünümde başka hastaların olduğu ifade edildiği için ahıra gidilerek sürünün yapılan klinik muayenesi sonucunda diğer hastaların şap olduğu belirlenmiş ve Elazığ İl Tarım Müdürlüğü'ne ihbarı yapılmıştır. Ayrıca hasta sahibinin de ifade ettiği gibi olgu 2'deki klinik semptomlar ile sürüdeki klinik görünümün farklı olduğu tespit edilmiştir.

Her iki hastanın yapılan klinik muayenelerinde durgun oldukları gözlenmiş, diş gıcırdatması, konjunktiva ve ağız mukozasında hiperemi ve skleral damarlarda dolgunluk belirlenmiştir. Diş etleri, üst damak, dil ve yanak mukozasında erozyon ve ülserin bulunduğu (Şekil 1a ve 2a), salya akıntısı, purulent tabiatla burun akıntısı (Şekil 1b), perianal bölgede kabartılardan olduğu ve ishal (sulu, gri yeşilimsi renkte gaita) (Şekil 2b) ile dehidrasyon bulguları

saptanmıştır. Akciğerlerin oskültasyonunda sert veziküler sesler alınmıştır. Ayaklarda herhangi bir lezyon gözlenmemekle birlikte hafif derecede sıcaklık artışı tespit edilmiştir.



Şekil 1a. Olgu 1'de ağız lezyonları



Şekil 1b. Olgu 1'de burun akıntısı

Hastaların klinik muayeneleri yapıldıktan sonra V. jugularis'lerinden alınan kan örneklerinde Forcyte marka kan sayım cihazı ile hematolojik parametreler saptanmıştır (Tablo 1).

Klinik ve hematolojik muayeneler sonrasında hayvanların MD olabileceğinden şüphelenilerek virolojik muayeneler için salya, burun akıntısı ve faregeal swap örnekleri laboratuvara gönderilmiştir.

Bu hayvanları sekonder enfeksiyonlardan korumak için günde 10 mg/kg oksitetrasiklin (Primamycin/LA; Pfizer: her ml'de 200 mg oksitetrasiklin içeren 50 ml'lik flakon), vücut

direncini artırmak amacıyla 25 ml C vitamini (VitCe; Sanovel; her ml'de 200 mg askorbik içeren 50 ml'lik flakon) ve rehidrasyon ve enerji ihtiyacını karşılamak amacıyla kg canlı ağırlığa 10 ml dozunda damar içi olarak serum fizyolojik (% 0.9) ve dekstroz (% 5) uygulamaları yapılmıştır. Ayrıca ağızdaki lezyonlara gliserin iode sürülmüştür.



Şekil 2a. Olgu 2'de ağız lezyonları



Şekil 2b. Olgu 2'de ishal

Tablo 1. Olguların klinik ve hematolojik muayene bulguları

Klinik ve Hematolojik Parametreler	Olgu 1	Olgu 2
Vücut sıcaklığı ($^{\circ}$ C)	40.2	40.0
Kalp frekansı (adet/dk)	82	90
Solunum Frekansı (adet/dk)	38	32
Rumen Hareketi (adet/5 dk)	0	2
Total Lökosit Sayısı (bin/mm ³)	2.4	2.6
Eritrosit Sayısı (milyon/mm ³)	7.2	5.4
Hemoglobin miktarı (g/dl)	10.2	9.4
Hematokrit değeri (%)	32.02	28
Trombosit sayısı (bin/mm ³)	153	140

DNA ve RNA ekstraksiyonu

Klinik ve kontrol örneklerinden (negatif kontrol; RNases ve DNases free steril su, pozitif kontroller; BVDV NADL suşu, IBR Colorado suşu, sığır vebası ve şap aşı suşları) DNA ve RNA ekstraksiyonu üretici firmanın tavsiyesine göre ticari hem doku hemde doku sıvılarında kullanıma uygun ekstraksiyon kiti kullanılarak elde edildi (Biological Industries Co., Israel). DNA ve RNA peletleri 50 μ l distile su içinde çözdürüldü ve kullanılmaya kadar -20 $^{\circ}$ C'de saklandı.

Genom amplifikasyon metodları

Klinik ve kontrol örneklerinden IBR (17), şap (18) ve sığır vebasının (19) genomlarının çoğaltılması daha önceden belirtildiği gibi yapıldı. Bu çalışmada, 5' UTR fwd (5'-CTA GCC ATG CCC TTA GTA GGA CTA-3') ve STAR-Trev (5'-CAA CTC CAT GTG CCA TGT ACA GCA-3') primerleri RT-PCR'da BVD'nin 5'-UTR bölgesinin çoğaltılması için kullanıldı. BVD için RT-PCR prosedürü daha önceden belirtildiği gibi bazı modifikasyonlar yapılarak gerçekleştirildi (20). Kısaca; RT aşamasında klinik örneklerden elde edilen RNA'nın 10 μ l'si, 5 μ l 5x M-MLV Buffer (250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM potassiumchloride, 15 mM Magnesium chloride, 50 mM DTT), her birinden 2 mM deoksiniükleotitler, 20U M-MLV reverse transcriptase (Promega), 20 pmol primer (5'-CAA CTC CAT GTG CCA TGT ACA GCA-3') kullanılarak, 37 $^{\circ}$ C'de 1 saatte cDNA'ya dönüştürüldü. PCR reaksiyonu, 5 μ l c DNA, 10xPCR Bufferden (100 mM Tris-HCl, pH: 8.0, 500 mM potassiumchloride, 15 mM Magnesium chloride) 5 μ l, 4 deoksiniükleotidin her birinden 2 mM, 1U Taq DNA polymerase (Bioron), 20 pM primerler olmak üzere toplam 50 μ l PCR karışımında gerçekleştirildi. Amplifikasyonlar, 94 $^{\circ}$ C'de 2 dak. başlangıç aşamasından sonra, 94 $^{\circ}$ C'de 30 sn, 52 $^{\circ}$ C'de 1 dak, 72 $^{\circ}$ C'de 1 dak, toplam 35 döngüde sonra, 72 $^{\circ}$ C'de 7 dak. son uzatma ile gerçekleştirildi. PCR ürününün 10 μ l'si % 2'lik agaroz jelde yürütüldü ve UV ışığı altında etidium bromide boyamayla görüntüldü.

TARTIŞMA

Klinik örneklerden izole edilen RNA'nın BVD primerleriyle yapılan RT-PCR sonucunda, iki şüpheli hayvanda 292 bp'lik spesifik bant gözlenmiştir. Aynı örneklerin şap, sığır vebası, IBR primerleriyle gerçekleştirilen PCR sonucunda, olgu 2'de şap primerleri ile spesifik bant oluşumu haricinde, agaroz jelde bant oluşumu belirlenmemiştir (Şekil 3).



Şekil 3. RT-PCR bulgularının %2'lik agaroz jelde görüntüsü. Hat 1; pozitif kontrol (BVDV'nin NADL standart suşu), hat 2; olgu 1 RNA'sının BVDV primerleriyle amplifikasyonu, hat 3; olgu 2 RNA'sının BVDV primerleriyle amplifikasyonu, hat 4; olgu 2 RNA'sının şap primerleriyle amplifikasyonu, hat 5; olgu 2 RNA'sının sığır vebası primerleriyle amplifikasyonu, hat 6; olgu 2 DNA'sının IBR primerleriyle amplifikasyonu, hat 7; distile su-BVDV primerleriyle amplifikasyon.

BVDV enfeksiyonları dünyada besi ve süt hayvanları için yaygın bir problemdir (2, 6). Sindirim kanalının eroziv lezyonları ve ishal salgınlarıyla karakterize sığırların akut sindirim kanalı hastalığı olarak ilk kez 50 yıl kadar önce Kuzey Amerika'da tarif edilmiştir (6, 9). Ülkemizde hastalığın varlığı ve prevalansı çeşitli araştırmacılar (11, 13, 14, 16) tarafından saptanmaya çalışılmış ve değişik oranlarda BVDV'nin varlığı ortaya konulmuştur. Ancak bu çalışmalarda BVDV'nin neden olduğu MD formunun klinik görünümü ile ilgili bir bilgiye rastlanmamıştır.

BVDV'nin şiddetli bir formu olarak bildirilen akut ve kronik MD'nin sadece PI immunotolerant sığırların süperenfeksiyona maruz kalması sonucu sporadik ve enzootik olarak meydana geldiği vurgulanmıştır (4, 6, 8, 21). Laboratuvar muayeneleri sonrasında BVDV taşıdığı tespit edilen hayvanlardan olgu 1'in PI immunotolerant bir sığır olduğu ve süperenfeksiyon sonrasında MD'nin meydana geldiği düşünülmektedir. PCR'da şap virusunun da bulunduğu tespit edilen ve yeni satın alınarak theileriosis tedavisi yapılmış olan PI olduğu düşünülen olgu 2'nin ise alışık olmadığı yeni ortama adaptasyonu esnasında oluşabilecek problemler ile şapın MD hastalığının görülmesinde tetikleyici bir etmen olduğu düşünülmektedir. Ahırdaki diğer

hastalarda şapın tipik bulguları olan ağız ve ayaktaki lezyonlar gözlenmiştir. Ancak olgu 2'de gözlenen ağız lezyonları şapa benzemesine rağmen, özellikle olguda ishalin mevcudiyeti ve genel durumun kötüleşmesi nedeniyle zorunlu olarak kesilmesi hastanın MD olduğunu destekler niteliktedir.

MD formunda; ateş, depresyon, anoreksi, ishal, nasal akıntı, ağız ve dil mukozasını içine alan üst sindirim kanalında erozyon ve ülserler, dehidrasyon, aşırı zayıflama ve olayların bazılarında interdigital ve coroner sahada epitel nekroz, kabuk oluşumu ve erozyonlara bağlı olarak ağırlı yürüyüş görüldüğü ve genellikle iki hafta içinde ölümlerin olabileceğini belirten literatür bildirimleriyle (2, 4, 5, 6, 7, 8, 22) olgularda gözlenen klinik bulguların uyum içerisinde olduğu gözlenmiştir.

Literatürlerde (1, 4, 5, 7, 8, 22), hastalığa bütün yaşlardaki sığırların duyarlı olmasına rağmen genellikle 6 – 24 aylık hayvanlarda enfeksiyonun meydana geldiği bildirilmektedir. Her iki olgunun da duyarlı olarak bildirilen yaş grubu arasında oluşu bu görüşü destekler niteliktedir. Çalışmadaki her iki olguda da saptanan total lökosit ve trombosit sayısındaki düşüşlerin Baker (6)'in MD'li hayvanlarda lökosit sayısının normalden % 50 aşağı düştüğü ve trombosit sayısının azaldığı bildirimleriyle uyumlu bulunmuştur.

Sekunder enfeksiyonlara karşı tedaviye alınan hayvanların sahipleri ile yapılan görüşmede, her iki hayvanın da daha sonra kötüleştiği ve bu nedenle zorunlu olarak kestikleri öğrenilmiştir. Öldüğünde haber vermeleri istenmesine rağmen bilgi vermeden kestiklerinden otopsileri yapılamamıştır. Ancak her iki hastanın kötüleşmesi ve zorunlu kesilmeleri PI sığırlarda BVDV tarafından meydana getirilen MD'nin mortalitesinin çok yüksek olduğu bildirimini (4, 6) destekler niteliktedir.

Bu çalışmada, PCR metodu kullanılarak MD şüpheli vakalar kısa sürede belirlenmiştir. Ayrıca, çalışmada klinik benzerlikleri nedeniyle, örnekler mukozal hastalıklara sebep olan diğer önemli virusların varlığı yönünden de test edilmiştir. Test edilen viruslardan, erken tanısı bakımından, sığır vebası hastalığı özellikle önem arz etmektedir. Ülkemiz bu hastalıktan arı olmasına rağmen, coğrafik konumu nedeniyle, Doğu-Güney Doğu Anadolu Bölgesi sığır vebası yönünden en riskli bölgelerden biridir. Bu nedenle bölgemiz için MD hastalığıyla sığır vebası hastalığının ayırımının hızlı

ve doğru bir şekilde gerçekleştirilmesi daha da önem arz etmektedir. Bu çalışma bu nedenle de önemli görülmektedir.

Sonuç olarak; sığırların ishal ve stomatitits semptomlarıyla seyreden hastalık olaylarında bölgemizde klinik olarak ilk kez gözlemlenen ve RT-PCR metodu kullanılarak teyit edilen MD hastalığının da dikkate alınması gerektiği, ayrıca ülkemizde hastalığın insidansını ortaya koyacak

çalışmaların yapılmasının faydalı olacağı kanısına varılmıştır.

Teşekkür

BVDV'un NADL suşunun teminini sağlayan Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sibel YAVRU'ya teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

- Gül Y. Geviş Getiren Hayvanların İç Hastalıkları (Sığır, Koyun-Keçi). Ankara: Özkan Matbaacılık Ltd. Şti, 2002.
- Smith BP. Large Animal Internal Medicine. Diseases of Horses, Cattle, Sheep, and Goats. St. Louis, Baltimore, Philadelphia, Toronto: The C.V. Mosby Company, 1990.
- Urano K, Shibata I, Nakane T. Detection of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) using reverse transcription polymerase chain reaction assay. J Vet Med Sci 1998; 60 (7): 867-870.
- Rosenberger G. Krankheiten des Rindes. 3. unveränderte Auflage, Berlin: Blackwell Wissenschafts-Verlag, 1990.
- Aiello SE, Mays A. The Merck Veterinary Manual. 8th Edition, Philadelphia: National Publishing, 1998.
- Baker JC. BVDV infection: Clinical Manifestation. Michigan Dairy Review 1996; 1 (3): 17.
- Blood DCH, Radostits OM. Veterinary Medicine. 7th Edition, London, Philadelphia, Sydney, Tokyo, Toronto: Bailliere Tindall, 1990.
- Veterinary Professional Services, Merial Limited. "Bovine Virus Diarrhoea (BVD)/Mucosal Disease (MD). The merial bovine infectious disease series". http://us.merial.com/veterinary_professionals/veterinarians/cow_calf/disease_pdf/BVD_MD.pdf/ 11.10.2005.
- Ridpath J, Bolin S, Dubovi E. Segregation of bovine viral diarrhoea virus in genotypes. Virology 1994; 205: 66-74.
- Carman S, Van Dreumel T, Ridpath J, et al. Severe acute bovine viral diarrhoea (BVD) in Ontario, 1993-1995. J Vet Diagn Invest 1998; 10 (1): 27-35.
- Ak S, Fırat İ, Bozkurt HH, Gülyüz V, Ak K. Trakya bölgesindeki sığırlarda bovine viral diarrhoea virus (BVDV) enfeksiyonlarının prevalansı ve persiste infekte (PI) hayvanların saptanması üzerine çalışmalar. Turk J Vet Anim Sci 2002; 26: 245-248.
- Alkan F, Burgu İ. Investigation on the incidence of Bovine Viral Diarrhoea Virus in calves in Turkey. Dtsch Tierarztl Wochenschr 1993; 100: 107-109.
- Burgu İ, Özkul A. Detection by cultural isolation of bovine virus diarrhoea (BVD) virus following field infections in cattle and their fetuses in Turkey. Dtsch Tierarztl Wochenschr 1993; 100: 361-363.
- Özkul A, Çabalar M, Bilge S, Akça Y, Burgu İ. Süt sığırcılığı işletmelerinde rastlanan IBR/IPV ve BVD virus enfeksiyonlarının infertilite olgularındaki rolü. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 1995; 42: 381-387.
- Özkul A, Yeşilbağ K, Burgu İ. Comparison of four diagnostic techniques for detecting Bovine Virus Diarrhoea Virus (BVDV) in buffy coat samples after long-term storage. Turk J Vet Anim Sci 2002; 26 (5): 1043-1048.
- Şimşek A, Öztürk F. Klinik olarak sağlıklı sığır sürülerinde persiste bovine viral diarrhoe virus enfeksiyonlarının araştırılması ve epizootiyolojik önemi. Veteriner Bilimleri Dergisi 1997; 13: 113-119.
- Santurde G, Da Silva N, Villares R, et al. Rapid and high sensitivity test for direct detection of bovine herpesvirus-1 genome in clinical samples. Vet Microbiol 1996; 49 (1-2): 81-92.
- Shin JH, Sohn HJ, Choi KS, et al. Identification and isolation of foot-and-mouth disease virus from primary suspect cases in Korea in 2000. J Vet Med Sci 2003; 65 (1): 1-7.
- Doymaz M, Kılıç AO, Bulut H, Özdarendeli A, Bolat Y. Cloning and prokaryotic expression of hemagglutinin gene of rinderpest virus. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi 2000; 14 (1): 189-195.
- Mahony TJ, McCarthy FM, Gravel JL, Corney B, Young PL, Vilcek S. Genetic analysis of bovine viral diarrhoea viruses from Australia. Vet Microbiol 2005; 106: 1-6.

21. Loehr BI, Frey HR, Moening V, Greiser-Wilke I. Experimental induction of mucosal disease: Consequences of superinfection of persistently infected cattle with different strains of cytopathogenic bovine viral diarrhoea virus. Arch Virol 1998; 143: 667-679.
22. Hoar BR. "Bovine Viral Diarrhoea (BVD)". http://repositories.cdlib.org/anrrec/sfrec/2004_bovine_virus_diarrhoea/ 26.05.2005.

Yazışma Adresi: Mustafa İSSİ, Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, 23119 Elazığ-TÜRKİYE
Tel: 0 424 237 00 00-3874 e-posta: missi@firat.edu.tr
