



## ARAŞTIRMA

F.Ü.Sağ.Bil.Vet.Derg.  
2013; 27 (1): 35 - 37  
<http://www.fusabil.org>

### Türkiye'nin Bazı Bölgelerinde 2008 Yılında Görülen Bovine Ephemeral Fever Virüs Enfeksiyonlarının Polimeraz Zincir Reaksiyonuyla Belirlenmesi \*

Şükrü TONBAK<sup>1</sup>  
Engin BERBER<sup>1</sup>  
Mehmet ÇABALAR<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Fırat Üniversitesi,  
Veteriner Fakültesi,  
Viroloji Anabilim Dalı,  
Elazığ, TÜRKİYE

<sup>2</sup>Harran Üniversitesi,  
Veteriner Fakültesi,  
Viroloji Anabilim Dalı,  
Şanlıurfa, TÜRKİYE

Bovine ephemeral fever (BEF), biyokimyasal ve hematolojik değişikliklerle karakterize sığırların viral bir hastalığıdır. Süt veriminde azalmaya ve besi sığırcılığında verim kaybına neden olmasından dolayı ekonomik olarak önemli bir hastalıktır. Bu çalışmada Doğu Anadolu, Güneydoğu Anadolu ve Akdeniz bölgelerinde yer alan on vilayetten 2008 yılında 110 adet kan ve 120 adet serum örneği toplanmıştır. Toplanan örneklerden izole edilen RNA'lara tersine transkripsiyon ve polimeraz zincir reaksiyon (RT-PZR) deneyleri yapıldı. Glikoprotein genine spesifik primerlerin kullanıldığı polimeraz zincir reaksiyonunda 2008 yılında 20 örnek pozitif olarak bulundu.

**Anahtar Kelimeler:** Bovine ephemeral fever virüs, RT-PZR, sığır.

#### Detection of Bovine Ephemeral Fever Virus Infections by Polymerase Chain Reaction in Some Regions of Turkey in 2008

Bovine ephemeral fever (BEF) is a viral disease of cattle which is characterized by hematological and biochemical changes. It can cause significant economic impact due to reduced milk production in dairy herds, and loss of condition in beef cattle. In the present study, a total of 110 whole blood and 120 sera were collected from cattle in 10 provinces located in Southeastern Anatolia, Eastern Anatolia, and Mediterranean region in 2008. After total RNA extraction of the samples, reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to recover partial sequences of the BEFV glycoprotein gene. Glycoprotein gene was found in 20 samples by polymerase chain reaction by using specific primers in 2008.

**Key Words:** Bovine ephemeral fever virus, RT-PCR, cattle.

#### Giriş

Bovine ephemeral fever virüsü (BEFV) ilk kez Batı Afrika'da tanımlanmış olup daha sonraları geniş bir tropikal kuşakta bildirilmiştir (1). Virüs sadece sığır (*Bos taurus*, *Bos indicus* ve *Bos javanicus*) ve su buffalolarında klinik semptom göstermektedir (1, 2). Etkilenen hayvanlarda klinik belirtiler birkaç gün görülmesinden dolayı hastalığın diğer bir ismi de üç gün hastalığı olarak bilinmektedir (1).

Bovine ephemeral fever virüsü *Rhabdoviridae* ailesinin *Ephemerovirus* sınıfında yer almaktadır. Virüs tek zincirli, segmentsiz ve 14.900 nükleotid uzunluğunda negatif polariteli bir RNA genomuna sahip olup diğer rhabdo virüslerden genom uzunluğu bakımından daha büyüktür. BEF virüsünün nükleoprotein (N), fosfoprotein (P), matriks (M), glikoprotein (G) ve large (L) olmak üzere beş tane yapısal proteini bulunmaktadır. Virüsün sadece bir serotipi bulunmasına rağmen farklı izolatlar, antijenik değişiklikler göstermektedir (3-9).

Hastalık Afrika, Asya, Avustralya ve Orta Doğu'nun tropikal ve subtropikal bölgelerinde görülmekle birlikte süt ve besicilik endüstrisinde önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır (1, 4, 6). İlk hastalık vakaları genelde sporadik olarak meydana gelmesine rağmen 7-10 gün sonra morbiditenin yüksek olmasından dolayı epidemiler meydana gelmektedir (10). Hastalığın morbidite oranı %80, mortalite oranı ise %1-3 arasında değişmektedir (1, 11).

Virüs, duyarlı hayvanlara direk temasla, semenle, damlacık enfeksiyonuyla, vücut ekstremleri, vücut eksudatının transferi veya enjeksiyonu yolu ile taşınmamaktadır. Enfeksiyon deneysel olarak intravenöz yolla oluşturulabilmesine rağmen subkutan veya intramüsküler yolla genellikle enfeksiyon oluşmamaktadır. Enfeksiyon sıklıkla iklim şartlarına bağlıdır ve yayılması enfekte insektler (*Culicoides*, *Culex* ve *Anopheles*) ile olmaktadır. Bovine ephemeral fever virüsü enfekte insektlerde replike olabilmektedir. Hastalığın ortaya çıkışı uygun iklim koşullarına, vektörün artışına ve insektlerin yayılmasına bağlıdır (2, 4, 11, 12).

\* Bu çalışma, TÜBİTAK tarafından desteklenen 105O436 nolu projenin bir kısmından özetlenmiştir.

Geliş Tarihi : 06.01.2013  
Kabul Tarihi : 05.02.2013

#### Yazışma Adresi Correspondence

Şükrü TONBAK  
Fırat Üniversitesi,  
Veteriner Fakültesi,  
Viroloji Anabilim Dalı  
Elazığ - TÜRKİYE

stonbak@firat.edu.tr

Bu çalışmada; Doğu Anadolu, Güneydoğu Anadolu ve Akdeniz bölgelerinde üç gün hastalığının tersine transkripsiyon ve polimeraz zincir reaksiyonuyla (RT-PZR) belirlenmesi amaçlanmıştır.

### Gereç ve Yöntem

**Numunelerin Toplanması:** Hastalığın görülme zamanı olan Eylül-Kasım ayları arasında Adana, Adıyaman, Diyarbakır, Elazığ, Gaziantep, Hatay, Kahramanmaraş, Malatya, Mardin ve Şanlıurfa illeri ile bu vilayetlere bağlı ilçe ve köylerde yüksek ateş belirtisi gösteren hayvanlardan hem kan hemde serum numuneleri alındı (Tablo 1). Sahadan toplanan kan örnekleri soğuk zincirde serum numuneleri ise sıvı azot tankı içerisinde laboratuvara getirildi. Araştırmancının yürüttüğü odaklarda 2008 yılında farklı yaş ve türdeki hayvanlardan 110 adet kan ve 120 adet serum örneği toplandı.

**Numunelerden RNA İzolasyonu:** Sahadan toplanan numunelerden RNA izolasyonu QIAamp Viral RNA izolasyon kiti (Qiagen, Almanya) ile üretici firmanın belirttiği yönetime göre yapıldı.

**Tersine Transkripsiyon ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu:** Bu deneyde bovine ephemeral fever virüsü glikoprotein genine spesifik BEF19F ve BEF523R primerleri kullanıldı (13).

**BEF19F:** 5' ATT TAC AAT GTT CCG GTG AA 3'

**BEF523R:** 5' GGT ATC CAT GTT CCG GTT AT 3'

Elde edilen RNA'lardan reverz transkriptaz enzimi kullanılarak gen spesifik primerlerle cDNA'lar elde edildi. Bu cDNA'ların kalıp olarak kullanıldığı 20 pmol primer, 1.25 mM dNTP (Promega, Almanya), 25 mM MgCl<sub>2</sub> (Promega, Almanya), 10X PCR bufer (Promega, Almanya), 2 U Taq DNA Polimeraz (Promega, Almanya), 50 µL'lik PZR karışımı hazırlandı. 94 °C'de 5 dakika ön ısıtmadan sonra, 94 °C'de 45 saniye denatürasyon, 56 °C'de 45 saniye bağlanma, 72 °C'de 1 dakika uzatma ile 32 döngüden oluşan ve 72 °C'de 10 dakika son uzatma ile sonlanan amplifikasyon işlemi yapıldı. PZR ürünleri %1.5'lik agaroz jelde etidyum bromid kullanılarak görüntülendi.

### Bulgular

Araştırma kapsamındaki on vilayetten toplanan 230 örnekten RNA izolasyonu ve RT-PZR deneyleri yapıldı. BEF virüsü glikoprotein genine spesifik primerlerin kullanıldığı PZR sonucunda yaklaşık 520 baz çifti uzunluğundaki ürünler Şekil 1'de gösterilmiştir.

Sahadan toplanan 230 örnekten; Adana (3), Adıyaman (2), Kahramanmaraş (2), Şanlıurfa (10) ve Hatay (3) olmak üzere toplam 20 adet örnek pozitif olarak belirlenmiştir.

**Tablo 1:** 2008 yılı Eylül-Kasım tarihleri arasında toplanan numunelerin sayısı ve odakları

| Odaklar       | Kan        | Serum      | Toplam     |
|---------------|------------|------------|------------|
| Adana         | 10         | 10         | 20         |
| Adıyaman      | 10         | 10         | 20         |
| Diyarbakır    | 10         | 15         | 25         |
| Elazığ        | 10         | 10         | 20         |
| Gaziantep     | 10         | 10         | 20         |
| Hatay         | 10         | 15         | 25         |
| Kahramanmaraş | 10         | 10         | 20         |
| Malatya       | 10         | 10         | 20         |
| Mardin        | 10         | 10         | 20         |
| Şanlıurfa     | 20         | 20         | 40         |
| <b>TOPLAM</b> | <b>110</b> | <b>120</b> | <b>230</b> |



**Şekil 1:** Hat M: DNA marker, hat 1, 2, 3, 4: Şanlıurfa; hat 5, 6, 7: Hatay; hat 8: Adıyaman; hat 9: Adana, hat 10: Kahramanmaraş hat 11: Negatif Kontrol

### Tartışma

Bovine ephemeral fever virüsü; vektörlerin yaşamasına uygun iklim koşullarına sahip olan Batı Afrika, Ortadoğu, Asya ve Avustralya'yı içerisine alan geniş bir tropikal alanda görülmektedir (1). Ülkemizde Tarım İşletmeleri Genel Müdürlüğü'ne bağlı işletmelerde ve bu işletmelerin çevresindeki il ve ilçelerde 1987 yılından itibaren her iki yılda bir görülen üç gün hastalığı virüsü hakkında bilgiler oldukça yetersizdir. Etkilenen hayvanlarda klinik belirtiler birkaç gün görülmesinden dolayı hastalık üç gün olarak isimlendirilmiştir (1, 5). Virüs duyarlı hayvanlara direk temas, vücut sıvıları, semen, vücut eksudatının transferi veya enjeksiyonu yolu ile taşınmamaktadır. Enfeksiyon genelde iklim şartlarına bağlıdır ve yayılma enfekte insektler (Culicoides, Culex ve Anopholes) ile olmaktadır (2, 4, 11, 12).

Bovine ephemeral fever hastalığı genelde iki yılda bir görülmesine rağmen bu tür tropikal hastalıklar mevsime bağlı enfeksiyonlar olup hastalığın ortaya çıkma trendi

değişiklik gösterebilmektedir (1). Böyle tropikal hastalıklar belirli bir süre görülebilmekte (5-10 yıl) ve daha sonra belirli bir zaman diliminde ise görülmeyebilmektedir. Bu çalışmada Doğu Anadolu, Akdeniz ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde toplam on vilayette üç gün hastalığı enfeksiyonunun varlığı araştırılmıştır. Araştırma 2008 yılında hastalığın görülme zamanı olan Eylül-Kasım ayları içerisinde yapılmıştır. Belirtilen illerden 2006 ve 2007 yıllarında üç gün hastalığını belirlemek için kan ve serum örnekleri toplanmasına rağmen bu numunelerde pozitiflik belirlenememiştir. Bu bağlamda düşünüldüğünde 2006 ve 2007 yıllarında pozitif vaka belirlenememesi bu nedenden kaynaklanmış olabileceğini düşündürmektedir. Bu ihtimallerden dolayı 2008 yılı Eylül ve Kasım ayları arasında tekrar belirtilen on vilayetten 230 adet kan ve serum örneği toplanmıştır. Numunelerin toplandığı odalarda klinik semptom gösteren akut vakalar bu dönem içerisinde görülmüştür. Toplanan numunelerden RNA izolasyonu yapılarak RT-PZR deneyleri yapıldı. Polimeraz zincir reaksiyonunda sahadan toplanan numunelerden %16.6'lık bir pozitiflik belirlenmiştir. Mevcut çalışmada enfeksiyon Doğu Anadolu'da

görülmezken Akdeniz bölgesinde %22.8'lik ve Güneydoğu Anadolu bölgesinde ise %18.4'lük bir pozitiflik belirlenmiştir. Üç gün hastalığı daha çok Akdeniz ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde ve komşu ülke sınırlarına yakın vilayetlerde görülmüştür. Bu bölgedeki iklim şartları dikkate alındığında BEF virüsünün taşınmasında rol oynayan insektler için uygun bir ortam olarak görünmektedir.

Bovine ephemeral fever enfeksiyonları; süt üretiminde belirgin düşüslere, dişi sığırlarda ve boğalarda infertiliteye, gebe sığırlarda yavru atmaya ve sürü içerisinde hızla yayılmasından dolayı da ekonomik kayıplara neden olan bir hastalık olup ülkeler arası hayvan ticaretini etkileyen önemli bir enfeksiyondur (1, 2, 4, 5, 10-12, 14). BEF virüsünün sadece bir serotipi olmasına rağmen farklı izolatlar arasında antijenik değişimler bulunabilmektedir (3-7, 9).

Sonuç olarak; bu çalışmada ülkemizde bovine ephemeral fever enfeksiyonunun varlığı moleküler yöntemlerden biri olan polimeraz zincir reaksiyonu ile belirlenmiştir.

## Kaynaklar

1. Nandi S, Negi BS. Bovine ephemeral fever: a review. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 1999; 22: 81-91.
2. Venter GJ, Hamblin C, Paweska JT. Determination of the oral susceptibility of South African livestock-associated biting midges, *Culicoides* species, to bovine ephemeral fever virus. *Med Vet Entomol* 2003; 17: 133-137.
3. Dhillon J, Cowley JA, Wang Y, Walker PJ. RNA polymerase (L) gene and genome terminal sequences of ephemero viruses bovine ephemeral fever virus and adelaide river virus indicate a close relationship to vesiculoviruses. *Virus Res* 2000; 70: 87-95.
4. Kongsuwan K, Cybinski DH, Cooper J, Walker PJ. Location of neutralizing epitopes on the G protein of bovine ephemeral fever rhabdovirus. *J Gen Virol* 1998; 79: 2573-2581.
5. Liao YK, Inaba Y, Li NJ, et al. Epidemiology of bovine ephemeral fever virus infection in Taiwan. *Microbiol Res* 1998; 153: 289-295.
6. McWilliam SM, Kongsuwan K, Cowley JA, Byrne KA, Walker PJ. Genome organization and transcription strategy in the complex G<sub>NS</sub>-L intergenic region of bovine ephemeral fever rhabdovirus. *J Gen Virol* 1997; 78: 1309-1317.
7. Walker PJ, Byrne KA, Riding GA, et al. The genome of bovine ephemeral fever rhabdovirus contains two related glycoprotein genes. *Virology* 1992; 191: 49-61.
8. Walker PJ, Cybinski DH. Proteins of bovine ephemeral fever virus. *J Gen Virol* 1991; 72: 67-74.
9. Holmes IH, Doherty RL. Morphology and Development of bovine ephemeral fever virus. *J Virol* 1970; 5: 91-96.
10. Yeruham I, Braverman Y, Yadin H, et al. Epidemiological investigations of outbreaks of bovine ephemeral fever in Israel. *Vet Rec* 2002; 151: 117-121.
11. Yeruham I, Ham MV, Bar D, Yadin H, Tiomkin D. Economic aspects of the 1999 outbreak of bovine ephemeral fever in dairy cattle herds in the Jordan Valley in Israel. *Vet Rec* 2003; 153: 180-182.
12. Yeruham I, Yadin H, Abramovitch I, Shama Z. Bovine ephemeral fever in a dairy cattle herd in the Jordan Valley. *Vet Rec* 2005; 156: 284-286.
13. Stram Y, Kuznetsova L, Levin A, Yadin H, Rubinstein-Giuni M. A real-time RT-quantitative(q) PCR for the detection of bovine ephemeral fever virus. *J Virol Methods* 2005; 130: 1-6.
14. Yeruham I, Sharir B, Yadin H, Tiomkin D, Chai D. Bovine ephemeral fever in beef cattle herds in the Jordan Valley, Israel. *Vet Rec* 2003; 152: 86-88.