

**Doğal Enfekte Bir Sürüde ELISA ve Nested-PCR ile Sığırların Lösemi Virüs Enfeksiyonunun Belirlenmesi****Hakan BULUT¹**
İrem GÜLAÇTI²
İbrahim SÖZDUTMAZ³¹Firat Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi
Viroloji Anabilim Dalı,
Elazığ, TÜRKİYE²Pendik Veteriner Araştırma
Enstitüsü, Aşı Ünitesi,
İstanbul, TÜRKİYE³Veteriner Araştırma
Enstitüsü, Viroloji Bölümü,
Erzurum, TÜRKİYE

Bu çalışmada, doğal enfekte bir sürüde sığırların lösemi virüs (Bovine leukemia virus; BLV) enfeksiyonunun varlığı nested-polimeraz zincir reaksiyonu ve iki farklı ELISA kitiyle araştırılmıştır. Bu sürüde bulunan 65 hayvandan alınan serum örnekleri 2 farklı ELISA, kan örnekleri ise nested-PCR ile test edildi. Her iki ELISA sonucunda, 65 hayvanın 14 (% 21,5) tanesinde BLV seropozitifliği belirlendi. Nested-PCR neticesinde ise; toplam 16 (% 24,6) örnekte BLV proviral DNA varlığı tespit edildi. Çalışmanın bulguları, ELISA'nın avantajlarına rağmen, BLV'nin eradikasyonu programında tek başlarına serolojik testlerin yetersiz kalabileceği verilerini destekler niteliktedir.

Anahtar Kelimeler: BLV, sığır, ELISA, nested-PCR.

Determination of Bovine Leukemia Virus Infection by ELISA and Nested-PCR in A Naturally Infected Cattle Herd

In this study, the presence of bovine leukemia virus (BLV) infection in a naturally infected cattle herd was determined using nested-polymerase chain reaction (Nested-PCR) and enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Serum and blood samples from 65 animals in this herd were tested for BLV with nested-PCR and two different ELISA kits. According to ELISA examinations, 14 (21,5 %) of 65 animals were found as BLV seropositive. In the result of nested-PCR, 16 (24,6 %) of 65 samples were found positive for BLV proviral DNA. The findings of the present study suggest that despite several advantages of ELISA, serological tests when they were used alone might not be adequate in BLV eradication programmes.

Key Words: BLV, cattle, ELISA, nested-PCR.

Giriş

Enzootik sığır lökozu (enzootik bovine leucosis) etkeni olan sığırların lösemi virüsü (bovine leukemia virus; BLV) pozitif anlamı, diploid karakterde bir RNA'ya sahiptir. Bu virüs insan T hücre lenfotropik virüs tip I ve II ile simian T hücre lenfotropik virüsleri ile birlikte *Retroviridae* ailesinin Deltaretrovirus alt grubunda yer almaktadır (1).

Sığırların lösemi virüsünün enfekte lökosit hücrelerinde çoğalması aşamasında viral tersine transkripsiyon enzim aktivitesi sonucunda oluşan proviral DNA'lar, enfekte hücrelerin kromozal DNA'sına entegre olmakta ve bu proviral DNA'lar klinik olarak sağlıklı görünen hayvanlarda uzun yıllar bulunmaktadır. Proviral DNA bulunan bu hücrelerde üretimli dönemle birlikte fazla sayıda yeni yavru virüsler kana salıverilmektedir. Bu nedenle, klinik olarak sağlıklı enfekte hayvanlar taşıyıcı olarak uzun yıllar enfeksiyonu horizontal ve konjenital yolla saçmaktadırlar (2). Bundan dolayı, enfekte hayvanların belirlenmesi ve bunların sürüde uzaklaştırılması hastalıkla savaşımında oldukça önemlidir.

Sığırların lösemi virüsü ile enfekte hayvanın teşhis edilmesinde, virüse karşı antikor varlığını belirlemeye yönelik, enzime bağlı immunosorbent deneyi (enzyme linked immunosorbent assay; ELISA), agar gel immunodifüzyon testi (AGID) ve radioimmunoassay (RIA) gibi serolojik testler sıklıkla kullanılmaktadır (3, 4). Bu testler içerisinde, ELISA, enfeksiyonun teşhis edilmesinde kolay uygulanabilirliği, duyarlı ve özgül olmasından dolayı, diğer serolojik testlere tercih edilmektedir (4). Ancak, son yıllarda provirusun pozitif olduğu ama serolojik olarak negatif olan sığırların varlığı bildirilmiştir (2, 5, 6). Bu nedenle, şüpheli vakalarda virüse karşı oluşan antikorun tespitiyle birlikte virüs veya virüs yapı unsurlarının belirlenmesine yönelik doğrulayıcı testler önerilmektedir. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), BLV ile enfekte tüm hayvanlarda proviral DNA'nın belirlenmesinde oldukça etkin bir test olarak kabul edilmektedir (7, 8).

Bu çalışmada, daha önceki yıllarda BLV enfeksiyonunun yaygın olduğu belirlenen doğal enfekte bir sürüde (9) iki farklı ELISA ve nested-PCR ile BLV enfeksiyonunun varlığının tespiti ve BLV'ye karşı her hangi bir savaşım programı uygulanmayan bu sürüde 10 yıllık bir süreç sonunda enfeksiyon insidansının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Geliş Tarihi : 30.10.2008
Kabul Tarihi : 25.12.2008**Yazışma Adresi**
Correspondence**Hakan BULUT**
Firat Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
Viroloji Anabilim Dalı,
23119
Elazığ - TÜRKİYE**hbulut1@firat.edu.tr**

Gereç ve Yöntem

Hayvanlar: Çalışmanın gerçekleştirileceği sürüde, Şubat 2004 yılında 6 Holştayn, 26 esmer ve 33 Simental ırkıdan 65 hayvanda EDTA'lı ve EDTA'sız tüplere kan örnekleri alındı. Yirmi tanesi erkek, 45 tanesi dişi olan ve yaşları 2-5 arasında değişen bu hayvanların hiç birinde lösemi için karakteristik bir klinik semptom tespit edilmedi.

ELISA: EDTA'sız tüplere alınan kan örneklerinden elde edilen serumlar ticari iki farklı ELISA kiti kullanılarak BLV antikorları yönünden test edildi. Bu testlerde bir tanesinde yüzeyi inaktif BLV ile kaplı (The CHEKIT-Leucotest) diğer ELISA kitinde ise BLV'nin p-24 proteini ile kaplı mikroplyetler kullanılmıştır (EBLV Ab ELISA, Test-Line Ltd., 61200, Brno, Czech Republic). Hayvanlardaki seronegatiflik, seropozitiflik ve şüphelilik durumu kitlerde belirtilen kriterler dikkate alınarak tespit edildi.

DNA ekstraksiyonu ve nested-PCR: Tüm hayvanların lökositinden DNA ekstraksiyonu NucleoSpin@Tissue ticari kiti kullanılarak üretici firmanın belirttiği prosedüre göre gerçekleştirildi (Macherey-Nagel Inc USA). Ekstraksiyonlar esnasında lökosit örneklerinin bir kısmı kullanıldı ve diğer kısmı ihtiyaç duyulduğunda kullanılmak üzere -80 °C'de saklandı.

Nested-PCR prosedürü daha önceden tanımlandığı gibi gerçekleştirildi (10). İlk adım PCR reaksiyonu, 3 µl lökosit DNA, 5µl 10xPCR Buffer (100 mMTris-HCl, pH 8.0, 500 mM potassiumchloride, 15 mM Magnesium chloride), her birinden 1.25 µM deoksinükleotitler, 1U Taq DNA polymerase (Bioron), 10 pM primerler (env5032; 5'-TCTGTGCCAAGTCTCCCAGATA-3' ve env5608; 5'-AACAAACAACCTCTGGGAAGGGT-3') olmak üzere toplam 50µl PCR karışımı ile gerçekleştirildi. İkinci adım PCR reaksiyonunda ise, ilk adımdan farklı olarak, templeyt DNA olarak 1 µl birinci PCR ürünü ile primer olarak da env5099; 5'-CCAACAAGGGCGGCGGTTT-3' ve env5521; 5'-GCGAGGCCGGTCCAGAGCTGG-3' primerleri kullanıldı. Her iki aşama amplifikasyonlar 94 °C'de 10 dak. başlangıç inkübasyonundan sonra, 94 °C'de 1 dak. 55 °C'de 1 dak. ve 72 °C'de 2 dak.'lık toplam 32 siklus döngüyü takiben, 72 °C'de 10 dak. son uzatma ile gerçekleştirildi. Elde edilen PCR ürünleri etidyum bromid ile boyandı ve % 2'lik agaroz jelde UV altında görüntüldü.

Bulgular

Doğal enfekte sürüde gerçekleştirilen iki farklı ELISA neticesinde, her test kitiyle 65 hayvanın, 13 tanesi aynı (% 20) ve birer tanesi farklı, 14 örnekte (% 21,5) BLV seropozitifliği belirlendi (Tablo 1). The CHEKIT-Leucotest kitiyle şüpheli olarak tespit edilen bir serum örneği EBLV Ab ELISA kitiyle seropozitif olarak tespit edildi. EBLV Ab ELISA kitiyle seronegatif olarak tespit edilen bir örnek ise The CHEKIT-Leucotest kitiyle pozitif bulundu. İki ELISA kitinde farklı bulunan bu örnekler, sonuçlarının teyidi amacıyla bir kez daha test edildi ve aynı sonuçlar elde

edildi. Bu nedenle, her iki testin pozitifliği dikkate alındığında toplam 15 örnekte en az bir ELISA kiti ile pozitiflik kaydedildi.

Altmış beş hayvanın lökositlerinden elde edilen DNA'ların kalıp olarak kullanıldığı nested-PCR neticesinde ise her iki ELISA'da seropozitif 13 ve her bir ELISA'da birer farklı örneğe ilave olarak iki ELISA'da da seronegatif bir örnekte BLV proviral DNA varlığı tespit edildi. Dolayısıyla, nested-PCR'da toplam 16 örnekte (% 24,6) yaklaşık 444 baz çifti uzunluğunda amplikasyon ürünü agaroz jelde görüntüldü (Şekil 1).

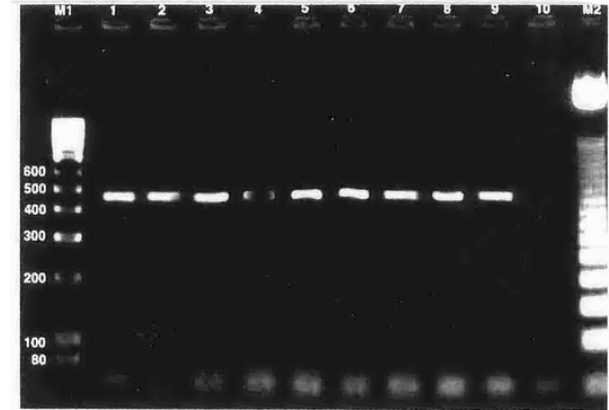
Nested-PCR'a göre ELISA sonuçları kıyaslandığı zaman, ELISA'ların her birinin duyarlılıkları % 93,3 ve özgüllükleri ise % 100 olarak kaydedildi.

Tablo 1. Doğal enfekte bir sürüde (n:65) sığırların lösemi virüs enfeksiyonunun varlığının tespiti amacıyla gerçekleştirilen nested-polimeraz zincir reaksiyonu ve iki farklı ticari ELISA kiti sonuçları.

	The CHEKIT-Leucotest kiti	EBLV Ab ELISA kiti	Nested-PCR
Pozitif	14 ^a (%21,5)	14 ^a (%21,5)	16 ^b (% 24,6)
Negatif	51 (% 78,5)	51 (% 78,5)	49 (% 75,4)

a) Her iki grupta birer tanesi farklı örnek.

b) 13 tanesi her iki ELISA'da aynı, iki tanesi bir ELISA'da pozitif ve bir tanesi de her iki ELISA'da negatif örnek.



Şekil 1. Sığırların lökosit hücrelerinde elde edilen DNA ile sığır lösemi virüs (BLV)'e karşı gerçekleştirilen nested-PCR ürünlerinin agaroz jelde görüntüsü. M1: marker (100 bp DNA Ladder), M2: marker (50 bp DNA Ladder), 1-9; BLV pozitif örnekler, 10; BLV negatif örnek.

Tartışma

Bu çalışmada, daha önceki yıllarda (1993-1994) yapılan bir çalışmada (9) yüksek oranda (%7,1) BLV prevalansı belirlenen doğal enfekte bir sürüde BLV enfeksiyonunun varlığı nested-PCR ve iki farklı ticari ELISA kitiyle araştırılmıştır. Ülkemizde BLV enfeksiyonuna karşı, ithal hayvanlardan EBLV seronegatiflik sertifikası istenmesi haricinde, ulusal bir program mevcut değildir. Bu nedenle, 1993-1994 yılında gerçekleştirilen test sonuçlarına göre seropozitif hayvanlar kesime gönderilmemiş ve bu hayvanlar sürüde tutulmuşlardır. Bu süre zarfında ise sürüde mevcut olan ineklerin tohumlanması ve doğumları gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, sürüde horizontal bulaşmayı engelleyecek herhangi bir tedbirin alınmadığı kaydedilmiştir. Bu nedenle, yüksek insidansla bir BLV enfeksiyon varlığının olacağı öngörüsü ile çalışma amacıyla bu sürü seçilmiştir.

Mevcut çalışma sonunda 65 hayvanın iki farklı ELISA ile araştırılması sonucu, birer örnek farklı olmakla birlikte, 14 (% 21,5) tanesinde BLV'a karşı antikor yanıtı tespit edilmiştir. En az bir ELISA'da pozitif olan toplam 15 hayvanın hepsinde PCR ile BLV DNA'ları belirlenmiştir. Ayrıca, PCR'da, her iki ELISA'da da seronegatif olan bir sığırdaki BLV proviral DNA'sı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, öncelikle testler arası duyarlılığı akla getirmektedir. Bu nedenle, sonuç farklılığının PCR'da yalancı pozitiflikten kaynaklanabilmesi ihtimali düşünülerek, özellikle tartışmalı üç örnek (tek bir ELISA ile pozitif çıkan iki ve ELISA negatif olup PCR pozitif olan bir örnek) ekstraksiyon aşamasından başlayarak nested-PCR'da yeniden çalışılmıştır ve aynı sonuçlar elde edilmiştir. Daha önceki bazı çalışmalarda da BLV provirusun pozitif olduğu ama serolojik olarak negatif olan sığırlar bildirilmiştir (2,5,11). Enfeksiyonun varlığına rağmen seronegatiflik durumu genellikle enfeksiyonun ilk safhalarıyla ilişkili olabilir. Ayrıca, immun sistemi baskılayan sığırların mukozal hastalığı gibi enfeksiyonlar

Kaynaklar

1. Zhao X, Buehring GC. Natural genetic variations in bovine leukemia virus envelope gene: possible effects of selection and escape. *Virology* 2007; 366: 150-165.
2. Coulston J, Daniel RC, Lavin MF. Integration of bovine leukaemia virus at all stages of enzootic bovine leucosis. *Arch Virol* 1991; 119: 13-23.
3. Gutierrez SE, Dolcini GL, Arroyo GH, et al. Development and evaluation of a highly sensitive and specific blocking enzyme-linked immunosorbent assay and polymerase chain reaction assay for diagnosis of bovine leukemia virus infection in cattle. *Am J Vet Res* 2001; 62: 1571-1577.
4. Martin D, Arjona A, Soto I, et al. Comparative study of PCR as a direct assay and ELISA and AGID as indirect assays for the detection of bovine leukaemia virus. *Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2001; 48: 97-106.
5. Eaves FW, Molloy JB, Dimmock CK, Eaves LE. A field evaluation of the polymerase chain reaction procedure for

veya gebelik gibi fizyolojik faktörler de bu duruma neden olabilmektedir (12,13). Bunun yanısıra BLV'nin farklı provirus varyantlarıyla enfekte olan hayvanlarda da seronegatiflik bildirilmektedir (11,14). Bu nedenle, bu çalışmada da benzer durumlardan bir veya birkaçının söz konusu olduğu düşünülebilir. Elde edilen sonuçlar bu konuda devam eden tartışmalara katkı sağlamakla birlikte, bu konuda ileride daha detaylı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Son yıllarda ülkemizde, özellikle Ege ve Marmara Bölgelerinde, sığır yetiştiriciliğinde bireysel hayvan sağlığından ziyade sürü sağlığını gözeten yaklaşımların yaygınlaştığını görmekteyiz. Bu nedenle de enfeksiyöz hastalıklara verilen önemin arttığını ve birçok enfeksiyona karşı sürülerin taranması ile ilgili taleplerin geldiğini kaydetmekteyiz. Sürü taraması ile talepler, genel olarak, sığırların mukozal hastalığı, sığırların enfeksiyöz rinotrahitisi-enfeksiyöz balonopostitisi (IBR/IPV) ve sığırların lökozuna karşı olmaktadır. Bu bakımdan ülkemiz açısından mevcut çalışmanın verileri ileriki yıllarda daha da önem arz edecektir.

Sonuç olarak, bu çalışmanın verilerine göre, BLV'e karşı sürü bazında bir tarama programı uygulanması durumunda, serolojik testler içinde en duyarlı olan ve birçok avantajları bulunan ELISA'nın tek başına yetersiz kalabileceği görülmüştür. Bu nedenle de, ELISA ile bir tarama yapılması durumunda, özellikle prevalansı yüksek çıkan sürülerde, bu sürülerin uzun süre klinik ile hematolojik takibi ve ELISA'nın belirli bir süre sonra tekrarı faydalı olacaktır. Ayrıca, bu çalışmada elde edilen diğer bir önemli sonuç, enfekte bir sürüde eradikasyon programı uygulanmadığı takdirde 10 yıl gibi bir sürede enfeksiyonunun insidansının %7,1 oranından % 24,6 gibi oldukça yüksek bir orana yükseldiği kaydedilmiştir. Bu sonuçlar anneden yavruya plesanta yoluyla konjenital olarak geçen ve rektal palpasyonla dahi saçılabilirdiği gösterilen (15) BLV gibi etkenlerle savaşımında sürü takibinin önemini göstermektedir.

- the detection of bovine leukaemia virus proviral DNA in cattle. *Vet Microbiol* 1994; 39: 313-321.
6. Fechner H, Kurg A, Geue L, et al. Evaluation of polymerase chain reaction (PCR) application in diagnosis of bovine leukaemia virus (BLV) infection in naturally infected cattle. *Zentralbl Veterinarmed B* 1996; 43: 621-30.
7. Murtaugh MP, Lin GF, Haggard DL, Weber AF, Meiske JC. Detection of bovine leukemia virus in cattle by the polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 1991; 33: 73-85.
8. Dusty WN, Tyler JW, Kleiboeker SB, Stoker A. Use of a polymerase chain reaction assay to detect bovine leukemia virus in dairy cattle. *JAVMA* 2003; 222: 983-985.
9. Yılmaz K, Gül Y, Özdemir H, Bolat Y. Elaziğ ve çevresindeki sığırlarda enzootik sığır lökozunun araştırılması *Turk J Vet Anim Sci* 1997; 21: 115-123.

10. Licursi M, Inoshima Y, Wu D, et al. Genetic heterogeneity among bovine leukemia virus genotypes and its relation to humoral responses in hosts. *Virus Res* 2002; 86: 101-110.
11. Fechner H, Blankenstein P, Looman AC, et al. Provirus variants of the bovine leukemia virus and their relation to the serological status of naturally infected cattle. *Virology* 1997; 237: 261-269.
12. Kelly EJ, Jackson K, Marsolais G, Morrey J.D, Callan R.J. Early detection of bovine leukemia virus in cattle by use of the polymerase chain reaction. *Am J Vet Res* 1993; 54: 205-209.
13. Roberts DH, Lucas MH, Wibberley G, Westcott D. Response of cattle persistently infected with bovine virus diarrhoea virus to bovine leukosis virus. *Vet Rec* 1988; 122: 293-296.
14. Licursi M, Inoshima Y, Wu D, et al. Provirus variants of bovine leukemia virus in naturally infected cattle from Argentina and Japan. *Vet. Microbiol* 2003; 96,17-23.
15. Kohara J, Konnai S, Onuma M. Experimental transmission of Bovine leukemia virus in cattle via rectal palpation. *Jpn J Vet Res* 2006; 54: 25-30.