



ARAŞTIRMA

F.Ü.Sağ.Bil.Vet.Derg.
2014; 28 (3): 107 - 110
<http://www.fusabil.org>

Sivas Kangal ve Alman Kurt Köpeklerinde Canine Herpesvirus-1 Seroprevalansı

Kezban CAN ŞAHNA¹
Öznur ASLAN²

¹Fırat Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
Viroloji Anabilim Dalı,
Elazığ, TÜRKİYE

²Erciyes Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
İç Hastalıkları Anabilim Dalı,
Kayseri, TÜRKİYE

Bu çalışmada; 40 adet Alman Kurt ve 55 adet Sivas Kangal olmak üzere toplam 95 adet köpek kan serum örneğinde canine herpesvirus-1 (CHV-1) antikorlarının ırk, cinsiyet ve yaş ile ilişkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Köpeklerden elde edilen serum örneklerinde CHV-1 antikor varlığı komplement ilaveli virus nötralizasyon testi (VNT) ve ELISA tekniği ile araştırılmıştır. VNT ile 24 hayvanda (%25.2) CHV-1 antikor tespit edilmiştir. VNT ile seropozitif bulunan serum örnekleri ELISA ile de pozitif bulunmuştur. Antikor pozitifliğinin cinsiyetle ilişkisi arasında anlamlı bir fark bulunamazken ($P>0.05$), Sivas Kangal köpeklerindeki seropozitiflik oranının Alman Kurt köpeklerindeki daha fazla olduğu, seropozitifliğin yaşla birlikte arttığı ve en yüksek oranda (%64.7) 5 yaş köpeklerde olduğu saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: CHV-1, köpek, seroprevalans.

Seroprevalence of Canine Herpesvirus-1 in Anatolian Shepherd Dogs and German Shepherd Dogs

This study was conducted to determine relationship among the antibody of canine herpesvirus-1 (CHV-1), breed, gender and age in a total of 95 dogs (55 Anatolian Shepherd Dogs and 40 German Shepherd dogs). CHV-1 antibody was detected by using virus neutralization test with added complement (VNT), and ELISA technique. CHV-1 antibody was detected in 24 dogs (25.2%) by VNT. Serum samples which were positive by VNT were also found positive by ELISA. There was no significant relationship between being antibody positive and gender ($P>0.05$), but Anatolian Shepherd dogs had higher seropositive ratio than German Shepherd dogs. The rate of the seropositivity increased by age and the highest was at age 5 (64.7%).

Key Words: CHV-1, dog, seroprevalence.

Giriş

Canine herpesvirus-1 (CHV-1) ilk olarak 1965 yılında tanımlanan, erişkin köpeklerde solunum ve genital kanal enfeksiyonu, yenidoğanlarda ise öldürücü hemorajik hastalık oluşturan bir virustur (1). Virus ayrıca vajina ve vestibulumda veziküler lezyonlara, düşük doğum ağırlığına ve abortlara neden olur (2, 3). Virus başlıca oro-nasal yolla bulaşır, bunun yanında transplasental ve venereal bulaşma da meydana gelebilir (2, 4). Enfekte köpeklerde virus latent kalabilir (5) ve lumbosakral ganglion, tonsil, paratiroid bez ve karaciğerden virus identifiye edilebilir (6).

CHV-1 *Alphaherpesvirinae* alt ailesinin *Varicellovirus* genusu içinde sınıflandırılmış ve bu gruptaki feline herpesvirus-1 (FHV-1) ile antijenik yakınlığı olduğu tespit edilmiştir (7). Yaş, cinsiyet, ırk, gebelik, immunsupresif tedavi gibi faktörler virusun patogenezinde önemli rol oynar (8, 9). Virusun patojenitesi 5 haftalıktan küçük köpeklerde oldukça yüksektir (8).

Hastalığın teşhisinde yaygın olarak serolojik yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemlerin başlıcaları immunfloresan, hemaglutinasyon, nötralizasyon testi ve ELISA'dır (10, 11). Bu testler arasında en çok kullanılanlar komplement ilave edilmiş nötralizasyon testi ve ELISA'dır. Bunun yanında farklı dokulardan PCR ile de etken teşhisi yapılabilmektedir (6).

Hastalığın seroprevalansı Finlandiya ve İngiltere'de çok yüksek iken Fransa, Hollanda ve Belçika'da orta düzeyde, İsviçre ve Almanya'da düşük düzeyde bildirilmiştir. Türkiye'de ise hastalığın seroprevalansı Fransa ve Hollanda'daki düzeyde belirlenmiştir (12).

Bu çalışmada; 40 adet Alman Kurt ve 55 adet Sivas Kangal olmak üzere toplam 95 adet serum örneğinde CHV-1 antikorlarının ırk, cinsiyet ve yaş ile ilişkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Geliş Tarihi : 22.05.2014
Kabul Tarihi : 27.08.2014

Yazışma Adresi
Correspondence

Kezban CAN ŞAHNA
Fırat Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
Viroloji Anabilim Dalı,
Elazığ - TÜRKİYE

kezbanacs@hotmail.com

Gereç ve Yöntem

Kan Serumu Örnekleri: Bu çalışmada Kayseri ve Sivas illerinde bulunan ve daha önce CHV-1 aşısı yapılmayan toplam 95 adet köpeğe ait kan serumu örnekleri kullanıldı. Serumların 40 tanesi Alman Kurt, 55 tanesi Sivas Kangal köpeklerinden toplandı. Örneklerin 62 tanesi dişi, 33 tanesi erkek köpeklere ait serumlardı.

Virus ve Hücre Kültürü: CHV-1 DK-13 suşu Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı'ndan temin edildi. Virus MDCK hücre kültüründe üretildikten sonra virus nötralizasyon testi ve ELISA yönteminde kullanıldı. MDCK hücreleri %10 fetal dana serumu içeren DMEM (Dulbecco's Minimal Essential Medium) vasatında üretildi.

Virus Nötralizasyon Testi (VNT): Yeşilbaş ve ark. (12)'nin belirlediği VNT protokolü kullanıldı. Bu amaçla serum örnekleri 1:2 oranında 50 µL DMEM ile sulandırıldı ve 96-kuyucuklu mikronötralizasyon tabletinde iki kuyucuğa bırakıldı. Üzerine eşit miktarda (50 µL) %10 kobay komplemanı içeren virus süspansiyonundan (400DKID₅₀) ilave edildi. Tabletler 37 °C de 2 saat inkubasyona bırakıldıktan sonra tüm kuyucuklara MDCK hücre süspansiyonu (2x10⁴ hücre/kuyucuk) eklendi. Tabletler 37 °C de %5 CO₂'li etüvlere kaldırıldı. 5 günlük inkubasyondan sonra sitopatik etkinin varlığı doku kültürü mikroskopu kullanılarak değerlendirildi. Seropozitif oldukları tespit edilen serum örnekleri serum nötralizasyon titrelerini belirlemek için 1:2 oranındaki sulandırmadan başlayarak iki katlı olarak 1:512 oranına kadar sulandırıldı. Viral üremenin nötralize olduğu en yüksek sulandırma nötralizasyon titresini olarak değerlendirildi.

ELISA: Yeşilbaş ve ark. (12)'nin uyguladığı ELISA tekniği kullanıldı. Bu amaçla, ELISA tabletinin tüm kuyucuklarına 100 µL CHV-1 antijeni ilave edilerek 4 °C de bir gece inkubasyona bırakıldı. Tabletler %0.05 Tween 20 içeren PBS (PBS-T) ile 3 kez yıkandıktan sonra tüm kuyucuklara 100 µL %1 sığır serum albumini ilave edilerek 37 °C de 1 saat inkube edildi. Tabletler PBS-T ile beş kez yıkandıktan sonra, PBS ile 1:50 oranında sulandırılmış köpek serumlarından kuyucuklara 100 µL aktararak 37 °C de 1 saat bekletildi. Tabletler yıkandıktan sonra konjugat ilave edilerek 37 °C de 1 saat inkube edildi ve kuyucuklara 100 µL OPD substratı eklendi. Oda ısısında 30 dakika inkubasyon sonrası reaksiyon 0.18 M H₂SO₄ ile durdurulup sonuçlar ELISA okuyucuda 450 nm'de (OD₄₅₀) değerlendirildi.

İstatistik Analiz: Veriler 'SPSS for Windows 21.5' paket programı kullanılarak analiz edildi. Her bir parametre yüzde olarak ifade edildi. Parametreler arasında ilişkinin anlamlılığını belirlemek için ki-kare analizi Yates düzeltmesi sonucu kullanıldı (13). P<0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bulgular

Nötralizasyon testi sonucunda 95 adet köpek kan serumu örneğinin 24 adedinde (%25.2) CHV-1 antikor tespit edildi.

Alman Kurt köpeklerinde CHV-1 seropozitiflik oranı %2.5 (1/40) iken Sivas Kangal köpeklerindeki seropozitiflik oranı %41.8 (23/55) olarak belirlendi. Sivas Kangal köpeklerindeki seropozitiflik oranının Alman Kurt köpeklerindeki seropozitiflik oranından daha yüksek olması istatistiksel olarak anlamlı (P<0.01) bulundu.

Örnekleme yapılan dişi köpeklerdeki seropozitiflik oranı %25.8 (16/62) iken, erkek köpeklerdeki seropozitiflik oranı % 24.2 (8/33) olarak belirlendi (Tablo 1). Dişi ve erkek köpeklerin seropozitiflik oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (P>0.05).

VNT ile pozitif bulunan köpeklerin yaşları incelendiğinde; pozitif hayvan sayısının yaşla birlikte arttığı ve en yüksek oranda (%64.7) 5 yaş köpeklerde olduğu tespit edildi (Tablo 2).

Nötralizasyon ile pozitif bulunan örneklerin antikor titrelerinin daha çok 1:4-1:8 olduğu belirlendi. Sadece 1 adet köpeğin serumunda antikor titre değerinin 1:256 olduğu saptandı (Tablo 3).

ELISA yöntemi sadece nötralizasyon ile pozitif bulunan serum örneklerine uygulandı ve bu serumların hepsinin ELISA ile de pozitif olduğu tespit edildi.

Tablo 1. VNT ile pozitif bulunan köpeklerin ırk ve cinsiyet sayıları

	Köpek Sayısı	Erkek/Dişi Sayısı	Pozitif Sayısı (Erkek/Dişi) (%)
Alman Kurt	40	18/22	1/0 (%5.5 / 0)
Sivas Kangal	55	15/40	7/16 (%46.6 / %40.0)
Toplam	95	33/62	8/16 (%24.2 / %25.8)

Tablo 2. VNT ile pozitif bulunan köpeklerin yaş dağılımı

Yaş	Köpek Sayısı (n)	Pozitif Sayısı (n) (%)
≤6 ay	25	1 (4.0)
1	14	1 (7.1)
2	16	2 (12.5)
3	10	3 (30.0)
4	5	2 (40.0)
5	17	11 (64.7)
>5	8	4 (50.0)
Toplam	95	24 (25.2)

Tablo 3. Pozitif örneklerin antikor titreleri

	Antikor Titreleti						
	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
Pozitif Sayısı	8	6	3	5	1	–	1

Tartışma

CHV-1 enfeksiyonu tüm dünyada köpekler arasında yaygın bir enfeksiyondur. Hastalık Avrupa'da birçok ülkede köpek popülasyonlarında enzootik olarak seyretmektedir. Yapılan çalışmalarda hastalığın seroprevalansı Finlandiya'da % 81.5 (14), Hollanda'da % 42.1 (11), Belçika'da % 45.7 (15) olarak saptanmıştır. Nöthling ve ark. (16) ise Güney Afrika'da seropozitiflik oranını %22 olarak tespit etmişlerdir. Yeşilbağ ve ark. (12) ise, Türkiye'de seropozitiflik oranını nötralizasyon testi ile %29.4 olarak belirlemişlerdir. Bu çalışmada ise seropozitiflik oranı %25.2 olarak bulunmuştur.

Bu araştırmada Alman Kurt köpeklerinde CHV-1 seropozitiflik oranı %2.5 olarak belirlenirken Yeşilbağ ve ark. (12) bu ırktaki pozitiflik oranını %43.7 olarak bildirmiştir. Sivas Kangal köpeklerindeki seropozitiflik oranı ise %41.8 olarak saptanmıştır. Alman Kurt ve Sivas Kangal köpeklerindeki seropozitiflik oranları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş ($P<0.01$) ve bu sonuç enfeksiyonda ırk duyarlılığının önemli olduğunu ortaya koymuştur.

Yeşilbağ ve ark. (12) test ettikleri örneklerin %56.6'sında antikor titresinin 1:32'den daha düşük seviyelerde olduğunu bildirmiştir. Bu çalışmada ise nötralizasyon ile pozitif bulunan 24 kan serumu örneğinin 22 (%91.6) adedindeki antikor titreleri 1:32 ve daha düşük oranda bulunmuştur. Bunun nedeni olarak titresinin enfeksiyondan çok kısa bir süre sonra hızlı olarak düşmesi ancak tespit edilebilir düzeyde 15 ay kadar kalabilmesi olarak gösterilmektedir (17).

Hastalığın teşhisinde daha çok serolojik yöntemler tercih edilmektedir. Bu yöntemler içinde en çok kullanılanlar nötralizasyon testi ve ELISA'dır. ELISA yönteminin nötralizasyon testinden daha hassas olduğunu bildiren çalışmalar (12, 14, 18) olmasına

Kaynaklar

1. Kraft S, Evermann JF, McKeirnan AJ, Riggs M. The role of neonatal canine herpesvirus infection in mixed infections in older dogs. *Compend Continuing Edu Practising Veterinarian* 1986; 8: 688-694.
2. Hashimoto A, Hirai K, Suzuki Y, Fujimoto Y. Experimental transplacental transmission of canine herpesvirus in pregnant bitches during the second trimester of gestation. *Am J Vet Res* 1983; 44: 610-614.
3. Parzefall B, Ficher A, Blutke A, Schmahl W, Matiasek K. Naturally-occurring canine herpesvirus-1 infection of vestibular labyrinth and ganglion of dogs. *Vet J* 2011; 189:100-102.
4. Ronsse V, Verstegen J, Onclin K, et al. Risk factors and reproductive disorders associated with canine herpesvirus-1 (CHV-1). *Theriogenology* 2004; 61: 619-636.
5. Okuda Y, Ishida K, Hashimoto A, et al. Virus reactivation in bitches with a medical history of herpesvirus infection. *Am J Vet Res* 1993; 54: 551-554.

rağmen, Reading ve Field (10) ve Nöthling ve ark. (16) nötralizasyon testinin ELISA'ya benzer hassasiyette olduğunu rapor etmişlerdir. Bu çalışmada, komplement ilave edilmiş nötralizasyon testi kullanılmış, ELISA yöntemi ise sadece nötralizasyonda pozitif bulunan örneklerle uygulanmıştır. Bu yüzden iki testin karşılaştırması yapılamamıştır.

CHV-1 enfeksiyonunda seropozitifliğin yaşla birlikte artış gösterdiğini belirleyen birçok çalışma vardır. Yeşilbağ ve ark. (12) en yüksek seropozitiflik oranının 4 yaş köpeklerde olduğunu bildirmiştir. Bu çalışmada ise, seropozitiflik oranının yaşla birlikte arttığı ve en yüksek oranda (%64.7) 5 yaş köpeklerde olduğu tespit edilmiştir.

Ronsse ve ark. (4) seropozitiflik oranının erkeklerde dişilerden daha yüksek olduğunu ve bu farkın istatistiki olarak anlamlı olduğunu tespit etmiştir. Nöthling ve ark. (16) seropozitiflik oranını dişilerde %23.8 erkeklerde %17.4; Yeşilbağ ve ark. (12) ise bu oranları dişilerde %46.8 erkeklerde ise %44.7 olarak bildirmiştir. Bu çalışmada ise seropozitiflik dişilerde %25.8 erkeklerde ise %24.2 olarak bulunmuş ve bu çalışmalara benzer olarak dişi ve erkeklerdeki pozitiflik oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır.

CHV-1 enfeksiyonunun epidemiyolojisinde köpeklerin yaşı, ırkı, cinsiyeti, barınma koşulları ve hijyenik ortamların önemli rol oynadığı bildirilmektedir (4, 12, 16). Bu çalışma ile CHV-1 seroprevalansının yaş, ırk ve cinsiyetle ilişkisi olduğu belirlenmiştir.

Teşekkür

Bu araştırmaya katkılarından dolayı Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Kadir YEŞİLBAĞ'a teşekkür ederiz.

6. Burr PD, Campbell MEM, Nicolson L, Onions DE. Detection of canine herpesvirus 1 in a wide range of tissues using the polymerase chain reaction. *Vet Microbiol* 1996; 53: 227-237.
7. Lebach M, Harder TC, Frey HR, et al. Comparative immunological characterization of type-specific and conserved B-cell epitopes of pinniped, felid and canid herpesviruses. *Arch Virol* 1994; 136: 335-347.
8. Bujko M, Sulovic V, Zivanovic V, Lako B, Dotlic R. Effect of progesterone and pregnancy on the replication of herpes simplex virus tip 2 in vivo. *Clin Exp Obstet Gynecol* 1998; 15: 34-7.
9. Ronsse V, Verstegen J, Onclin K, et al. Canine herpesvirus-1 (CHV-1): Clinical, serological and virological patterns in breeding colonies. *Theriogenology* 2005; 64: 61-74.
10. Reading MJ, Field HJ. Detection of high levels of canine herpesvirus-1 neutralising antibody in kennel dogs using a novel serum neutralisation test. *Res Vet Sci* 1999; 66: 273-275.

11. Rijsewijk FAM, Luiten EJ, Daus FJ, Heijden RW, Oirschot JT. Prevalence of antibodies against canine herpesvirus 1 in dogs in The Netherlands in 1997-1998. *Vet Microbiol* 1999; 65: 1-7.
12. Yeşilbağ K, Yalçın E, Tuncer P, Yılmaz Z. Seroprevalance of canine herpesvirus-1 in Turkish dog population. *Res Vet Sci* 2012; 92: 36-39.
13. Özdamar K. SPSS ile Biyoistatistik. Yenilenmiş 9. Baskı, Ankara: Sözkesen Matbaacılık Tic Ltd Sti, 2013.
14. Dahlbom M, Johnson M, Myllys V, Taponen J, Andersson M. Seroprevalance of canine herpesvirus-1 and *Brucella canis* in Finnish breeding kennels with and without reproductive problems. *Rep Dom Ani* 2009; 44: 128-131.
15. Ronsse V, Verstegen J, Onclin K, et al. Seroprevalance of canine herpesvirus-1 in the Belgian dog population. *Rep Dom Ani* 2002; 37: 299-304.
16. Nöthling JO, Hüsey D, Steckler D, Ackermann M. Seroprevalance of canine herpesvirus in breeding kennels in the Gauteng Province of South Africa. *Theriogenology* 2008; 69: 276-282.
17. König M, Neiseke J, Thiel HJ. Prevalance of canine herpesvirus 1 (CHV-1) in German kennels. *Tierärztliche Umschau* 2004; 59: 559-565.
18. Takumi A, Kusanagi K, Tuchiya K, et al. Serodiagnosis of canine herpesvirus infection- development of an enzyme-linked immunosorbent assay and its comparison with two improved methods of serum neutralization test. *J Vet Sci* 1990; 52: 241-250.