

# Diyarbakır İlinde Yetiştirilen Ruminantlarda Solunum Sistemi Viruslarının Seroprevalansı ve Pestivirus Varlığının Araştırılması

<sup>ORCID</sup> Berfin KADİROĞLU<sup>1</sup>, <sup>ORCID</sup> Gizem AYTOĞU<sup>1</sup>, <sup>ORCID</sup> Kadir YEŞİLBAĞ<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji AD, Bursa-Türkiye

Received 2019-05-02 Accepted 2020-04-17

## Özet

Sığır solunum sistemi hastalıkları kompleksi (BRDC) başta sığırlar olmak üzere birçok çift turnaklı hayvan türünü etkileyen ve ülkemiz dahil olmak üzere tüm dünyada yaygın olarak görülen bir problemdir. Bu çalışmada Diyarbakır ilini temsil edecek şekilde 8 farklı ilçeden 229 sığır, 192 koyun ve 12 keçi olmak üzere toplam 433 serum örneğinde Bovine viral diarrhoea virus (BVDV), Bovine herpesvirus-1 (BoHV-1), Bovine respiratory syncytial virus (BRSV), Bovine coronavirus (BCoV) ve Bovine parainfluenza-3 (BPIV-3) viruslarına karşı gelişmiş antikorların varlığı incelenmiştir. Virus nötralizasyon yöntemiyle belirlenen seroprevalans değerleri BVDV, BHV-1, BRSV, BCoV ve BPIV-3 virusları yönünden sırasıyla sığırlarda %57,6, %37,6, %71,2, %75,5, %40,2; koyunlarda %39,6, %1,6, %79,7, %86,5, %16,7; ve keçilerde %66,7, %50, %100, %100, %8,3 olarak bulunmuştur. Aynı örneklem grubundan 39 sığır, 11 keçi ve 33 koyuna ait örnekler RT-PCR yöntemiyle incelenmiş ve pestivirus yönünden negatif bulunmuştur. Test edilen virusların seroprevalans değerleri arasında istatistiki olarak yüksek oranda farklılık tespit edilmiştir ( $p < 0.001$ ). Diyarbakır ilinde örneklenen tüm hayvanlarda BCoV ve BRSV seroprevalansının yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu sebeple BCoV ve BRSV enfeksiyonlarının bu bölgede sadece sığırlarda değil aynı zamanda koyun ve keçilerde de BRDC enfeksiyonlarına yakınlık oluşturabileceği değerlendirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Viral enfeksiyonlar, Ruminant, Seroprevalans, Virus nötralizasyon, RT-PCR, Diyarbakır

## Abstract

The bovine respiratory system complex (BRDC) is a viral disease that affects many ungulates, especially cattle, and is common worldwide. Total of 433 sera (229 cattle, 192 sheep and 12 goats serum) were collected from eight district of Diyarbakır province, South Eastern Turkey. Serological analysis by serum neutralisation assay were performed against Bovine viral diarrhoea virus (BVDV), Bovine herpesvirus-1 (BoHV-1), Bovine respiratory syncytial virus (BRSV), Bovine coronavirus (BCoV), and Bovine parainfluenza-3 (BPIV-3) viruses. Detected seroprevalence rates against BVDV, BHV-1, BRSV, BCoV and BPIV-3 were 57.6%, 37.6%, 71.2%, 75.5%, 40.2% in cattle; 39.6%, 1.6%, 79.7%, 86.5%, 16.7% in sheep and 66.7%, 50%, 100%, 100%, 8.3% in goats, respectively. Selected samples from 39 cattle, 11 goats and 33 sheep were negative for pestivirus by RT-PCR. A statistically significant difference was detected among seroprevalence values of tested viruses ( $p < 0.001$ ). Due to the high seroprevalence of BCoV and BRSV in all tested animals species, those viruses may be concluded as possible reason for tendency to BRDC infections not only in cattle but also in sheep and goats in the region.

Key Words: Viral infections, Ruminants, Seroprevalance, Virus neutralization, RT-PCR, Diyarbakır

## Giriş

Solunum sistemi enfeksiyonları çiftlik hayvanları yetiştiriciliğinde mortalite, gelişme geriliği, verim kaybı,

karkas kalitesi ve karkas ağırlığında azalma gibi önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır.<sup>1</sup> Sığırların solunum sistemi hastalık kompleksi (BRDC) birçok enfeksiyöz ajanın rol aldığı multi-etiyolojik bir hastalık tablosu olarak

\* Corresponding author: Kadir YEŞİLBAĞ: Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji AD, Bursa-Türkiye.

Tel: (+90 224) 294 12 95, e-mail: kyesilbag@uludag.edu.tr



nitelendirilir. BRDC gelişimine katkı sağlayan *Pasteurella multocida*, *Histophilus somni*, *Mannheimia haemolytica* ve *Mycoplasma bovis* gibi bakteriyel etkenlerin yanında, başta Bovine viral diarrhoea virus (BVDV), Bovine herpesvirus-1 (BoHV-1), Bovine respiratory syncytial virus (BRSV), Bovine parainfluenzavirus-3 (BPIV-3) ve Bovine coronavirus (BCoV) olmak üzere birçok viral etken ile söz konusu virus ve bakteriler BRDC klinik olgularında değişen kombinasyonlarda çoklu enfeksiyon şeklinde ortaya çıkar.<sup>2-4</sup> Bu etkenler aynı zamanda koyun ve keçilerde de benzer enfeksiyon tablosuna neden olmaktadır.<sup>5</sup>

BVDV, yakın antijenik özellik gösteren koyun ve keçilerin Sınır hastalığı virusu (Border disease virus -BDV) ve Klasik domuz vebası virusu (CSFV) ile birlikte Flaviviridae ailesinde Pestivirus cinsinde yer almaktadır. Pestivirus enfeksiyonlarının klinik ve patolojik bulguları virus türüne, biyotipine, konakçının gebelik periyoduna, immünolojik durumuna ve çevresel faktörlere göre değişmektedir. Non-sitopatojen BVDV suşuyla transplasental enfeksiyonlarda fetüsün immunokompedans gelişmeden önce virusla karşılaşması halinde immunotolere persiste enfeksiyon meydana gelmektedir.<sup>6</sup> Hastalığın çoklu klinik form, patogenezi ve bulguları arasında ölümcül karakterdeki mukoza hastalığı (MD), konjenital anomali, reproduktif kayıplar, değişen derecelerde ateş, ishal, lökopeni, eroziv stomatit, nazal ve oküler akıntı sayılabilir. Aynı zamanda virusun immun supresif etkisi sonucunda sekonder enfeksiyonlara duyarlılığın arttığı, bu sebeple virusun solunum sistemi enfeksiyonlarının oluşumunda önemli rolü olduğu da bildirilmiştir.<sup>7</sup>

BoHV-1 Herpesviridae ailesinde, Alfaherpesvirinae alt ailesindeki Varicellovirus cinsinde yer almaktadır. BoHV-1 enfeksiyonlarında üst solunum yolu ve genital sistem etkilenerek mukopurulent nazal akıntı, konjunktivit, püstüller vulvovajinit ve balanopostit meydana gelebilir. Akut enfeksiyonu takiben trigeminal ve sakral ganglionlarda latent kalan virusun immunosupresyon ve stres faktörleriyle reaktif olduğu tespit edilmiştir.<sup>8</sup> En önemli konakçısı sığırlar olmakla beraber koyun ve keçilerde de BoHV-1 enfeksiyonları tespit edilmiştir. Bu sebeple sığırlarda enfeksiyon gelişmesinde türler arası virus saçılımının etkili olabileceği ve küçük ruminantların muhtemel virus kaynağı oldukları öne sürülmüştür.<sup>9</sup>

Pneumoviridae ailesi Orthopneumovirus cinsinde yer alan BRSV sığırlarla birlikte koyun ve keçileri de enfekte edebilmektedir.<sup>10</sup> Hastalık görünümü ölümcül formdan subklinik seyre kadar değişkenlik göstermektedir. Sığırlarda subklinik seyreden hastalık 5 aylıktan küçük buzağılarda

şiddetli alt solunum yolu enfeksiyonuna neden olmaktadır.<sup>11</sup> BRSV'nin, oluşturduğu hastalık bulguları dışında immun sistemi baskılayarak konakçıyı sekonder enfeksiyonlara duyarlı hale getirmesi sebebiyle solunum sistemi enfeksiyonlarında önemli rolü olduğu bilinmektedir.

BPIV-3, Paramyxoviridae ailesinde Respirovirus cinsinde yer almaktadır.<sup>12</sup> Tek başına hafif seyirli enfeksiyon oluşturan virus, alveolar epitel ve makrofajların yanı sıra üst ve alt solunum yollarındaki siliyer solunum epitel hücrelerini de enfekte etmektedir. Etken sığırlarda görülmekle birlikte, tüm dünyada koyun ve keçilerin solunum yollarında sık rastlanan viral etkenlerden biridir. Koyun ve keçilerde pnömoni gelişimine sebep olabildiği gibi, klinik bulgu göstermeyen küçük ruminantlarda değişen oranlarda sero-prevalans değerleri de saptanmıştır.<sup>5,13</sup>

BCoV, Coronaviridae ailesinde Coronavirinae alt ailesinde Betacoronavirus genusunda yer almaktadır. Bovine-like CoV'ler vahşi ruminantların yanı sıra ishali koyun dışkısında da tespit edilmiştir. BCoV sığırlarda neonatal ishal, kış dizanterisi ve solunum yolu enfeksiyonlarından sorumludur.<sup>14-15</sup> Erken yaşta enteritis, depresyon, zayıflık ve gelişen neonatal ishale bağlı olarak sürüde ekonomik kayıplara yol açan coronavirus, neonatal ishali oğlaklarda da tespit edilmiştir.<sup>16</sup> Serolojik çalışmalar bovine coronavirusun sığır dışında koyun ve keçilerde de sirküle olduğunu göstermektedir.<sup>17-19</sup>

Ülkemizde BRDC etiolojisinde rol alan virusların varlığı çeşitli çalışmalarla ortaya konulmuştur. Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde ve özellikle Diyarbakır ilinde söz konusu virusların tamamına yönelik sınırlı sayıda veri bulunmaktadır. Bu çalışmada ruminant yetiştiriciliği yönünden öneme sahip olan bölgede BRDC etiolojisindeki viral etkenlerin serolojik durumunun belirlenmesi hedeflenmiştir. Ayrıca Güneydoğu Anadolu bölgesinde pestiviruslara yönelik çalışmaların ağırlıklı olarak serolojik yönde olması ve ilgili çalışmalarda yüksek seroprevalans değerlerinin belirlenmiş olması sebebiyle seçilen örneklerde pestivirus taraması yapılarak saptanması olası saha suşlarının moleküler tiplendirmesi de hedeflenmiştir.

## Materyal ve Metot

### Örneklenen hayvanlar

Örnekleme çalışmaları Diyarbakır ilinde yer alan Hani, Silvan, Eğil, Dicle, Sur, Yenişehir, Kayapınar ve Bağlar olmak üzere toplam 8 ilçede yapıldı. Saha koşullarını yansıtmaya amacıyla halk elinde bulunan küçük işletmelerde barındırılan ve tamamı 6 ay-5 yaş aralığında olan sığır, koyun ve keçilerden rastgele yapılan örnekleme değerlendirildi.

Örnekleme yapılan işletmelerde tek tür hayvan bulunduğu fakat ortak mera kullanıldığı yetiştiriciler tarafından beyan edildi. Örnekleme yapılan sürülerin aile işletmesi yapısında olduğu ve hayvan sayısının 5-25 baş arasında değiştiği kaydedildi. Örnekleme sürecinde (UÜ-HADYEK 2017-11-3) klinik bulgu, ırk ve cinsiyet farkı gözetilmedi. Değerlendirilen sığırların önemli bir bölümünde örnekleme anında klinik bulgu tespit edilmezken, 17 sığırdan ve koyunların tamamında hafif solunum ve/veya sindirim sistemi bulguları görülmüş olduğu bildirildi. Araştırma kapsamında incelenen virüslere karşı aşılama yapılmamış olan 18 sürüden 229 sığır, 192 koyun ve 12 keçi olmak üzere toplam 433 hayvandan kan örneği kullanıldı. Sığır ve koyun örnek sayılarına kıyasla keçi sayısının oldukça az olması, barınaklardan sadece 2 tanesinde keçi yetiştiriciliği yapılırken diğerlerinde bulunmamasından kaynaklanmaktadır. Antikoagülsüz tüplere alınan kan örnekleri soğuk zincir altında laboratuvara nakledildi. Santrifüjleme işlemiyle (3000 x rpm'de 10 dk) çıkarılan serum ayrılarak 56°C'de 30 dk süreyle inaktive edildi ve test aşamasına kadar  $\leq -20$  °C'de saklandı. Yeterli miktara sahip olan örnekler arasından 39 sığır, 33 koyun ve 11 keçi serumundan 0.5 ml ayrılarak RT-PCR'la pestivirus taramasında kullanılmak üzere inaktive edilmeden saklandı.

### Hücre Kültürü ve Viruslar

Araştırmada kullanılan virusların üretilmesi, titrasyonu ve test aşamalarında Madin Darby Bovine Kidney (MDBK) hücre hattı kullanıldı. Hücre kültürünün intrinsik pesti-virus enfeksiyonu yönünden ari olduğunun teyidi immunoperoksidaz testi ve RT-PCR yöntemiyle yapıldı.<sup>20</sup> Virus nötralizasyon testlerinde test virüsü olarak tamamı sito-patolojik etki (CPE) oluşturarak üreyen BVDV NADL, BoHV-1 Cooper, BRSV Atue, BPIV-3 SF-4 ve BCoV Me-bus referans suşları kullanıldı. Virusların titreleri 10 katlı sulandırılmalar yapılarak standart mikrotitrasyon yöntemiyle belirlendi. Hücre hatlarının üretilmesi için pestivirus kontaminasyonu bakımından negatif olduğu önceden belirlenen fetal dana serumu (%10) eklenmiş DMEM vasatı (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) kullanıldı.

### Virus nötralizasyon testi

Araştırma kapsamında antikor tespiti amacıyla mikronötralizasyon yöntemi kullanıldı.<sup>21</sup> Her serum örneği için 2 göz olacak şekilde 50 µl dağıtıldı. Titresi belirlenen virus süspansiyonundan her göze 50 µl dağıtılıp BVDV, BRSV, BCoV ve PI-3 için 1 saat, BoHV-1 için ise 2 saat süreyle 37°C, %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda inkübasyona bırakıldı.

Ardından tüm gözlerle 300.000 hücre/ml olacak şekilde hazırlanmış MDBK hücre süspansiyonundan 50 µl ilave edildi. Tekrar aynı koşullarda inkübasyona bırakılan pleyt gözlerindeki hücreler 5-7 gün süreyle invert mikroskop altında incelenerek CPE oluşumları yönünden değerlendirildi. CPE oluşumunun görülmediği örnekler antikor pozitif olarak değerlendirildi.

### RNA izolasyonu ve RT-PCR Analizi

Seçilen örneklerde BVDV taraması amacıyla pan-pesti-virus spesifik primerler kullanılarak RT-PCR uygulandı. Bu amaçla inaktive edilmemiş serum örneklerinden vi-ral RNA ekstraksiyon kiti (NucleoSpin® Virus, Macherey-Nagel, Germany) kullanılarak nükleik asit izolasyonu gerçekleştirildi ve ticari kit (iScript™ cDNA Synthesis Kit, Bio-rad, USA) kullanılarak cDNA sentezi yapıldı. Pan-pesti-virus varlığını araştırmak amacıyla p324 (5'-ATG CCC WTA GTA GGA CTA GCA-3') ve p326 (5'-TCA ACT CCA TGT GCC ATG TAC-3') primerlerinin kullanıldığı RT-PCR protokolü uygulandı.<sup>22</sup> Buna göre; 94°C'de 2 dk ön ısıtmayı takiben 35 siklus olacak şekilde 94°C'de 1 dk denatürasyon, 56°C'de 1 dk bağlanma, 72°C 1 dk uzama ve son aşamada 72°C'de 7 dk son uzama işlemleri uygulandı. 288 bp uzunluğundaki PCR ürünleri SafeView™ (Applied Biological Materials, Canada) ilave edilen %2'lik agaroz jelde elektroforez uygulanarak görüntülendi.

### İstatistiksel analizler

Araştırma kapsamında incelenen 5 virusa karşı elde edilen seroprevalans değerleri, hayvan türlerine göre dağılımı ve çoklu enfeksiyon verileri SPSS (IBM SPSS Statistics, Version 23) programında Ki kare testiyle analiz edildi.

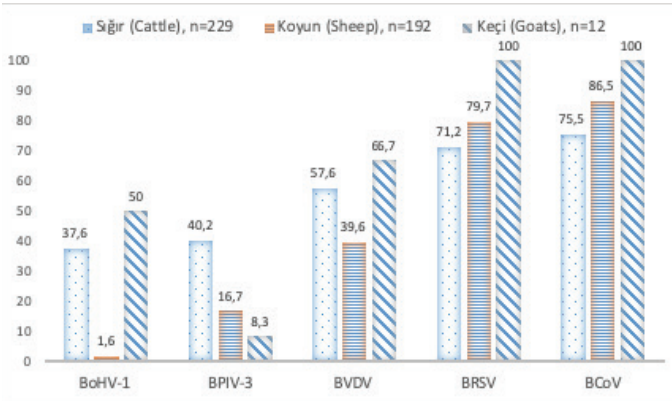
### Bulgular

Test edilen 433 hayvanda BVDV, BoHV-1, BRSV, BPIV-3 ve BCoV etkenlerine karşı seroprevalans değerlerine hayvan türüne göre bakıldığında sığır, koyun ve keçiler arasında istatistiki olarak önemli düzeyde fark olduğu bulundu ( $p < 0,001$ ). Tüm hayvan türlerinde en yüksek seropozitiflik oranı BCoV'e karşı saptandı (Tablo 1). Buna göre sığır, koyun ve keçilerde BCoV' a karşı seropozitiflik oranları sırasıyla %75,5, %86,5 ve %100 olarak tespit edildi (Şekil 1). BRSV'a karşı seropozitiflik değerlerinin de yüksek oranlarda seyrettiği tespit edildi (Tablo 1). Hayvan türlerine göre BRSV ve BCoV seroprevalans değerleri arasında istatistiki farklılık olmadığı görüldü ( $p \leq 0,058$ ). En düşük seroprevalans değerleri BoHV-1'e karşı saptanırken, hayvan türleri açısından en düşük seropozitiflik oranı koyunlarda (%1,6) tespit edildi (Şekil 1). Keçilerin tamamında BRSV ve BCoV' a karşı seropozitiflik görülürken (%100,0), BPIV-3 virusuna karşı antikor varlığı sadece bir keçide tespit edildi.

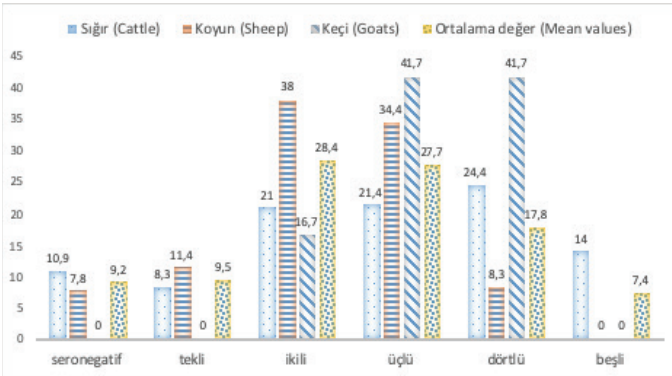
Tablo 1: Araştırılan virusların lokasyonlara göre seroprevalans değerleri

Lokasyon	Hayvan Sayısı (n)			Seropozitiflik Oranı (n, %)														
	S	Ky	Kç	BoHV-1			BPIV-3			BVDV			BRSV			BCoV		
				S	Ky	Kç	S	Ky	Kç	S	Ky	Kç	S	Ky	Kç	S	Ky	Kç
Bağlar	29	69	1	8 (%27,5)	3 (%4,3)	-	9 (%31,0)	5 (%7,2)	-	10 (%34,4)	42 (%60,8)	-	20 (%68,9)	64 (%92,7)	1 (%100)	18 (%62,0)	67 (%97,1)	1 (%100)
Yenişehir	26	-	-	11 (%42,3)	-	-	7 (%26,9)	-	-	13 (%50,0)	-	-	17 (%65,3)	-	-	15 (%57,6)	-	-
Kayapınar	30	-	-	17 (%56,6)	-	-	15 (%50,0)	-	-	14 (%46,6)	-	-	21 (%70,0)	-	-	15 (%50)	-	-
Sur	48	123	-	25 (%52,0)	-	-	26 (%54,1)	26 (%21,1)	-	35 (%72,9)	34 (%27,6)	-	38 (%79,1)	89 (%72,3)	-	41 (%85,4)	99 (%80,4)	-
Silvan	4	-	-	3 (%75)	-	-	2 (%50)	-	-	2 (%50)	-	-	4 (%100)	-	-	4 (%100)	-	-
Eğil	4	-	-	1 (%25)	-	-	2 (%50)	-	-	0	-	-	3 (%75)	-	-	4 (%100)	-	-
Dicle	18	-	-	3 (%16,6)	-	-	7 (%38,8)	-	-	14 (%77,7)	-	-	13 (%72,2)	-	-	16 (%88,9)	-	-
Hani	70	-	11	21 (%30)	-	6 (%54,5)	26 (%37,1)	-	1 (%9,0)	47 (%67,1)	-	8 (%72,7)	50 (%71,4)	-	11 (%100)	64 (%91,4)	-	11 (%100)
Toplam hayvan sayısı	229	192	12	86 (%37,5)	3 (%1,6)	6 (%50)	93 (%40,6)	31 (%16,1)	1 (%8,3)	132 (%57,6)	76 (%39,6)	8 (%66,7)	163 (%71,2)	153 (%79,7)	12 (%100)	173 (%75,5)	166 (%86,4)	12 (%100)
Genel toplam hayvan sayısı	433			95 (%21,9)			125 (%28,9)			216 (%49,9)			328 (%75,8)			351 (%81,1)		

(-): Belirtilen hayvan türü ve lokasyondan örnekleme yapılmamıştır; S: Sığır; Ky: Koyun; Kç: Keçi



Şekil 1: Test viruslarına göre belirlenen seroprevalans değerleri (%)



Şekil 2: Hayvan türlerine göre çoklu enfeksiyonların dağılımı (n: 433, %)

Tekli ve çoklu seropozitifliklerin değerlendirilmesiyle istatistiki olarak önemli farklılıklar tespit edildi ( $p < 0,001$ ). Çoklu seropozitiflik değerlerinde en yüksek olarak ikili ve

üçlü pozitiflik kombinasyonu (sırasıyla %28,4 ve %27,7) belirlendi. Tüm hayvanlarda ikili seropozitiflik kombinasyonu ele alındığında en yüksek seropozitiflik oranı BCoV-BRSV kombinasyonunda bulundu (%66,6). Benzer olarak üçlü kombinasyonlarda BCoV-BRSV-BVDV kombinasyonlarının en yüksek orana sahip olduğu belirlendi (%63,3). Koyun ve keçilerde beşli seropozitiflik kombinasyonu görülmezken, sığırlarda bu oran %13,9 düzeyinde bulundu. Araştırma sonunda toplam 40 (%9,2) hayvanda araştırma kapsamında değerlendirilen 5 virustan hiçbirine karşı antikor tespit edilemedi. Sığır, koyun ve keçilerde seronegatif oranlar sırasıyla %10,9, %7,8 ve %0 olarak bulundu. İnaktive edilmemiş olan 83 örneğin panpestivirus primerleriyle yapılan RT-PCR uygulamasında ise tüm örnekler pestivirus yönünden negatif sonuç vermiştir.

## Tartışma ve Sonuç

Sığır solunum sistemi hastalıkları kompleksi (BRDC) sığırlarda önemli ölçüde ekonomik kayıplara neden olabilen bir hastalıktır. BRDC gelişimine katkı sağlayan virusların koyun ve keçilerdeki solunum sistemi hastalıklarında da rol aldığı bilinmektedir. Ülkemizde BRDC enfeksiyonları yaygın olup hayvan sağlığı ve ekonomik açıdan önemi birçok çalışmada vurgulanmıştır.<sup>23-26</sup>

Sığırlarda BVDV enfeksiyonu dünya genelinde yaygın olup, ülkemizde ruminantlardaki seropozitiflik oranları %1,8-%96,6 arasında saptanmıştır.<sup>3,27-31</sup> Güneydoğu Anadolu bölgesindeki illerde yapılan çalışmalarda Şan-

lurfa'daki sığırlarlarda BVDV seroprevalansı %96,6 olarak belirlenmiştir.<sup>3</sup> Çabalar ve ark.<sup>29</sup> tarafından BVDV seroprevalansı Şanlıurfa'da %71,0, Gaziantep'te %40-66,0, Diyarbakır'da %92,8-100 düzeyinde bildirilmiştir. Bölgenin büyük bölümünü temsilen değerlendirilen sığır örneklerinde ise BVDV seroprevalansı %48,05 olarak belirlenmiştir.<sup>31</sup> Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgesindeki keçilerde aborta neden olan etkenlerin serolojik olarak incelendiği bir çalışmada BVDV için seroprevalans değeri %30,2 olarak gösterilmiştir.<sup>28</sup> Araştırmamızda Diyarbakır ilinde BVD virusuna karşı sığır, koyun ve keçilerdeki seroprevalans değerleri sırasıyla %57,6 , %39,6 ve %66,7 (ortalama %49,9) olarak bulunmuş olup daha önce elde edilen değerlerle benzerlik göstermektedir. Ancak Pestivirus cinsindeki virusların antijenik yakınlığı ve tespit edilebilen çapraz reaksiyonlar göz önüne alındığında koyun ve keçilerde elde edilen seropozitiflik değerlerinin sadece BVD virusunun türler arası geçişinden kaynaklanmayabileceği, diğer pestivirusların (özellikle BDV) varlığından da ileri gelebileceği dikkate alınmalıdır. Diğer taraftan yüksek seroprevalans değerleri elde edilmiş olmasına karşın sığır, koyun ve keçi örneklerinde RT-PCR ile yapılan virolojik analizlerde pozitif sonuç bulunamamıştır. Bu durum örneklenen hayvanlar arasında persiste enfekte birey bulunmadığı ve örnekleme sırasında viremi safhasında akut enfeksiyon olmadığına işaret etmektedir. Bölgede yapılacak geniş kapsamlı saha çalışmalarıyla elde edilecek izolatların moleküler karakterizasyonunun yapılmasıyla ülkemizde BVDV'nin moleküler epidemiyolojisiyle ilgili bölgesel verilerin tamamlanabileceği değerlendirilmektedir.

BoHV-1 sığır, koyun ve keçilerde solunum ve genital enfeksiyonlara neden olup, immun sistemi baskılayarak hayvanları diğer enfeksiyonlara predispoze hale getirir. Ülkemizde yapılan çalışmalarda ruminantlar için seropozitiflik oranları %2,27 – 61,50<sup>13,32-36</sup> olarak bildirilmiştir. Diyarbakır bölgesinin incelendiği çalışmalarda sığırlar için antikör değerleri %47,7-79,0 arasında değişmektedir.<sup>31,37</sup> Bu çalışmada sığır, koyun ve keçiler için seroprevalans değerleri sırasıyla %37,6 , %1,6 ve %50,0 olarak tespit edilmiştir. Elde edilen bu değerler Diyarbakır ilinde daha önce belirlenen seroprevalans değerlerinden daha düşüktür. Dünyada ve ülkemizde yapılan çalışmalarda keçilerin koyunlara oranla daha yüksek seropozitiflik göstermesi<sup>9,13,27</sup> tür direnci ihtimalini akla getirmektedir. Deneysel çalışmalarda BoHV-1 ve CapHV-1'in doğal konakçıları arasında çapraz enfeksiyon oluşturabildiğinin gösterilmesi yanında, ardından tüm gözlemlere 300.000 hücre/ml olacak şekilde hazırlanmış MDBK hücre süspansiyonundan 50 µl ilave edildi.<sup>38</sup> Koyun ve keçilerde doğal BoHV-1 enfeksiyonu da tespit edilmiştir.<sup>9</sup> Bu bilgiler ışığında ülkemizdeki bazı işletmelerde koyun ve keçi gibi potansiyel rezervuar hayvanların sığırlarla

beraber barındırılmasının oluşturabileceği riskler göz ardı edilmemelidir.

BRDC'nin bir diğer önemli etkeni olan BRSV enfeksiyonu da dünyada yaygın olup, seroprevalansının %100'e ulaşabildiği gösterilmiştir.<sup>39</sup> Ülkemizde sığırlarda saptanan seropozitiflik değerleri %44,6–97,1 arasında değişmektedir.<sup>23,40-41</sup> Türkiye'nin batı bölgelerindeki koyun ve keçilerde BRSV seroprevalansı %50,9-%74,7 arasında saptanırken,<sup>13,27</sup> Güneydoğu Anadolu bölgesinde BRSV ile ilgili çalışmalar sınırlı olup, Çabalar ve ark.<sup>42</sup> tarafından sığırlardaki seropozitiflik oranı %67,3 olarak bulunmuştur. Bu çalışmada sığır, koyun ve keçilerden elde edilen sırasıyla %71,2 , %79,7 ve %100 seroprevalans değerleri, bölgede daha önce tespit edilen değerlerden daha yüksektir. Hayvanlar arasında BRSV bulaşmasının aerosoller yoluyla olması ve böylece hızlı yayılması yüksek seroprevalans değerlerinin sebebi olarak değerlendirilebilir.

BPIV-3 özellikle makrofajları enfekte ederek, immunsupresyona bağlı sekonder enfeksiyonları tetikleyebilmektedir. Ülkemizde yapılan çalışmalarda sığırlarda BPIV-3 seropozitiflik oranlarının % 11,0-91,1 arasında değiştiği gösterilmiştir.<sup>17,23,27,35,40-43</sup> Koyun ve keçilerde ise % 3,3- %16,2 arasında değişen değerler bildirilmiştir.<sup>13,27,44-45</sup> Van ve Bitlis illerinde yapılan patolojik incelemelerde pnömoni keçilerin %66,6'sının akciğerlerinden BPIV-3 antijeni tespit edilmiştir.<sup>46</sup> Bu çalışmada Diyarbakır bölgesinden elde edilen serolojik bulgular önceki veriler ile uyumluluk göstermektedir. En yüksek seroprevalans değeri sığırlarda (%40,2) tespit edilirken, koyun ve keçilerde daha düşük değerler (%16,7, %8,3) saptanmıştır

BCoV sığırlarda solunum ve sindirim sisteminde enfeksiyona neden olarak hayvanlar arasında fekal-oral ve solunum yoluyla bulaştırılabilir.<sup>47</sup> BCoV'un sığır popülasyonlarında yüksek seropozitiflik düzeyleriyle (% 82-90) seyrettiği bilinmektedir.<sup>10,48</sup> BCoV'un sığırlar dışında, diyareli kuzu ve oğlakta tespit edilebildiği bildirilse de<sup>4,16</sup> özellikle küçük ruminantlarda solunum hastalıkları kompleksine katıldığını gösteren çalışmalar oldukça sınırlıdır. Ülkemizde sığırlarda BCoV enfeksiyonlarının varlığı değişik yöntemlerle gösterilmiştir.<sup>15,17,49-52</sup> Sığırlarda BCoV seroprevalansı %4,4-100 arasında saptanırken,<sup>15,17,49,51-52</sup> Güneydoğu Anadolu bölgesini temsilen Şanlıurfa ilinden alınan örneklerde bu oran %13,3 olarak bulunmuştur.<sup>49</sup> Bu çalışmada Diyarbakır ilinde saptanan değerler oldukça yüksek olup sığır, koyun ve keçilerde sırasıyla %75,5 , %86,5 ve %100 düzeyindedir. Dünyada koyun ve keçilerde coronavirus tespiti ya da seroprevalansına yönelik sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır.<sup>18-19</sup>

Yang ve ark.19 Güney Kore'de 804 keçideki seropozitiflik oranını %1 olarak saptamıştır. Trávén ve ark.18 ise İsveç'te 218 koyundaki seropozitiflik oranını %19 olarak saptamıştır. Bu çalışmada koyunlarda seropozitiflik düzeyinin yüksek olduğu (%86,5) görülürken, test edilen keçilerin tamamında antikor saptanmıştır. Ancak örneklenen keçi sayısının oldukça düşük olması nedeniyle elde edilen verilerin bölgedeki durumu tam olarak yansıtmaya yeterli olmadığı ve daha geniş örnek popülasyonunun incelenmesi gerektiği değerlendirilmektedir. Diğer taraftan küçük ruminantlarda yüksek seroprevalans değerlerinin saptanmış olması bu hayvan türlerinde Coronavirus patogenezinin araştırılmasının gerekliliği konusunu gündeme getirmektedir.

Test edilen hayvanlardan 40 tanesi (%9,2) (25 sığır, 15 koyun) araştırmada ele alınan etkenler yönünden seronegatif olarak belirlenirken, 393 (%90,8) tanesinde antikor tespiti yapılmıştır. Bu durum Diyarbakır bölgesinde solunum sistemi viral enfeksiyonlarının yaygınlığına işaret etmektedir. Seropozitif olan hayvanlardan sadece 41 tanesinde (%9,5) tekli enfeksiyon saptanması ise bölgedeki çoklu viral enfeksiyonların yaygınlığını (%81,3) gösteren önemli bir veridir. Çoklu enfeksiyon olarak belirlenen olgular ko-enfeksiyon şeklinde gerçekleşmiş olabileceği gibi, farklı zamanlarda oluşan tekli enfeksiyonlarla oluşan antikor yanıtlarına da bağlı olabilir. Klinik vakalardan alınacak örneklerde yapılacak virolojik çalışmalar bölgede görülen eş zamanlı çoklu enfeksiyonlar hakkında etiyolojik veriler sunacaktır. Bu çalışmada elde edilen serolojik verilere göre en yüksek olarak ikili (%28,4) ve üçlü (%27,7) kombinasyonlar saptanmıştır. Bu kombinasyonlar arasında en sık karşılaşılanlar sırasıyla BRSV-BCoV ve BRSV-BCoV-BVDV seropozitifliği olarak belirlenmiştir. Araştırmada test edilen viruslara karşı aşılammış hayvanlar kullanılmıştır. Bu hayvanlar arasında yüksek seroprevalans değerlerinin saptanması söz konusu virusların bölgede geniş ölçekte sirküle olduğunu göstermektedir. Her üç hayvan türünde saptanan seroprevalans değerlerindeki farklılıkların, sürüde persiste enfekte hayvan varlığı, barındırılma koşulları, beslenme şekli, stres faktörleri ve hayvan giriş-çıkışı gibi faktörlere bağlı olduğu bilinmektedir. Örneklenen hayvanların tür bazında ayrı barındırılmasına karşın ortak mera kullanıyor olması türler arasının enfeksiyon bulaştırılması açısından önem taşıdığı göz ardı edilemez. Bu araştırmada elde edilen temel veriler ışığında vakaların klinik gözlem ve virolojik çalışmalarla desteklenmesini içeren kapsamlı çalışmalar yapılması, bölgedeki solunum sistemi enfeksiyonlarının etiyolojisine ilişkin detaylı verileri ortaya çıkaracaktır.

## Teşekkür

Bu araştırmaya ilişkin çalışmaların bir bölümü Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje no: KUAP(V)-2018/6. Örnekleme çalışmalarındaki katkısı nedeniyle Vet.Hek. Nahit Saylak ve Vet.Hek. Günsel Kirman'a teşekkür ederiz.

## Kaynaklar

1. Griffin D. Economic impact associated with respiratory disease in beef cattle. *Vet Clin Food Anim*, 13(3), 367-377, 1997.
2. Alkan F, Özkul A, Bilge-Dağalp S, Yeşilbağ K, Oğuzoğlu TÇ, Akça Y, Burgu İ. Virological And Serological Studies On The Role Of PI-3 Virus, BRSV, BVDV And BHV-1 On Respiratory İnfections Of Cattle The Detection Of Etiological Agents By Direct Immunofluorescence Technique. *Dtsch Tierarztl Wschr*, 107: 193-195, 2000.
3. Özkul A, Çabalar M, Bilge S, Akça Y, Burgu İ. Süt sığırcılığı işletmelerinde rastlanan IBR/IPV ve BVD virus enfeksiyonlarının. infertilite olgularındaki rolü. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 42(3), 381-387, 1995.
4. Storz J, Purdy CW, Lin X, Burrell M, Truax RE, Briggs RE, Frank GH, Loan RW. Isolation of respiratory bovine coronavirus, other cytocidal viruses, and Pasteurella spp from cattle involved in two natural outbreaks of shipping fever. *J Am Vet Med A*, 216(10), 1599-1604, 2000.
5. Elazhary MA, Silim A, Dea S. Prevalence of antibodies to bovine respiratory syncytial virus, bovine viral diarrhoea virus, bovine herpesvirus-1, and bovine parainfluenza-3 virus in sheep and goats in Quebec. *Am J Vet Res*, 45(8), 1660-1662, 1984.
6. Brock KV. The persistence of bovine viral diarrhoea virus. *Biologicals*, 31(2), 133-135, 2003.
7. Moerman A, Straver PJ, De Jong MCM, Quak J, Baanvinger T, Van Oirschot JT. Clinical consequences of a bovine virus diarrhoea virus infection in a dairy herd: a longitudinal study. *Vet Q*, 16(2), 115-119, 1994.
8. Jones C, Chowdhury S. A review of the biology of bovine herpesvirus type 1 (BHV-1), its role as a cofactor in the bovine respiratory disease complex and development of improved vaccines. *Anim Health Res Rev*, 8(2), 187-205, 2007.
9. Mahmoud MA, Ahmed SA. Prevalence of bovine herpesvirus-1 in sheep and goats in Egypt. *Glob Vet*, 3(6), 472-479, 2009.
10. Bidokhti MRM, Trávén M, Fall N, Emanuelson U, Aalenius S. Reduced likelihood of bovine coronavirus and bovine respiratory syncytial virus infection on organic compared to conventional dairy farms. *Vet J*. 182(3):

- 436-440, 2009.
11. Baker JC, Velicer LF. Bovine respiratory syncytial virus vaccination: current status and future vaccine development. *Compend Contin Educ Vet*, 1991.
  12. Tiwari K, Cornish C, Gamble B, Thomas D, Sharma RN. Seroprevalence of bovine parainfluenza virus Type 3 (BPI-3V) in ruminants from Grenada. *Open J Vet Med*, 6(02), 23, 2016.
  13. Yeşilbağ K, Güngör B. Antibody prevalence against respiratory viruses in sheep and goats in North-Western Turkey. *Trop Anim Health Pro*, 41(4), 421-425, 2009.
  14. Alekseev KP, Vlasova AN, Jung K, Hasöksüz M, Zhang X, Halpin R, Wang S, Ghedin E, Spiro D, Saif LJ. Bovine-like coronaviruses isolated from four species of captive wild ruminants are homologous to bovine coronaviruses, based on complete genomic sequences. *J Virol*, 82(24), 12422-12431, 2008.
  15. Hasöksüz M, Kayar A, Dodurka T, Ilgaz A. Detection of respiratory and enteric shedding of bovine coronavirus in cattle in Northwestern Turkey. *Acta Vet Hung*, 53(1), 137-146, 2005.
  16. Özmen Ö, Yukarı A, Haligür M, Şahinduran Ş. Observations and immunohistochemical detection of Coronavirus, *Cryptosporidium parvum* and *Giardia intestinalis* in neonatal diarrhoea in lambs and kids. *Schweiz Arch Tierh*, 148(7), 357-364, 2006.
  17. Gümüsova Okur S, Yazıcı Z, Albayrak H, Meral Y. Rotavirus and coronavirus prevalence in healthy calves and calves with diarrhoea. *Medycyna Wet*, 63, 62-64, 2007.
  18. Tråvén M, Carlsson U, Lunden A, Larsson B. (1999). Serum antibodies to bovine coronavirus in Swedish sheep. *Acta Vet Scand*, 40(1), 69-74, 1999.
  19. Yang DK, Hwang IJ, Kim BH, Kweon CH, Lee KW, Kang MI, Lee CS, Cho KO. Serosurveillance of viral diseases in Korean native goats (*Capra hircus*). *J Vet Med Sci*, 70(9), 977-979, 2008.
  20. Yeşilbağ K, Förster C, Ozyiğit MO, Alpay G, Tuncer P, Thiel HJ, König M. Characterisation of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates from an outbreak with haemorrhagic enteritis and severe pneumonia. *Veterinary microbiology*, 169(1-2), 42-49, 2014.
  21. Frey HR, Liess B. Vermehrungskinetik und Verwendbarkeit eines stark zytopathogenen VD-MD-Virusstammes für diagnostische Untersuchungen mit der Mikrotiter-Methode. *Zbl Vet Med*, 18(1), 61-71, 1971.
  22. Vilček Š, Herring AJ, Herring JA, Nettleton PF, Lowings JP, Paton DJ. Pestivirus isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. *Arch Virol*, 136(3-4), 309-323, 1994.
  23. Avcı O, Yavru S, Sevik M. Antibody prevalence against respiratory viruses in naturally infected cattle in Central Anatolia. *Eurasian J Vet Sci*, 30(2), 80-84, 2014.
  24. Çomaklı S, Sağlam YS, Timurkan MO. Comparative detection of bovine herpesvirus-1 using antigen ELISA, immunohistochemistry and immunofluorescence methods in cattle with pneumonia. *Turk J Vet Anim Sci*, 43, 306-313, 2019.
  25. Gümüsova S, Yazıcı Z, Albayrak H. Seroprevalence of bovine viral respiratory diseases, *Acta Vet*, 57:11-16, 2007.
  26. Timurkan MO, Aydın H, Sait A. Identification and molecular characterisation of bovine parainfluenza virus-3 and bovine respiratory syncytial virus: first report from Turkey. *J Vet Res*, 63 (2) 167-173; 2019.
  27. Alpay G, Tuncer P, Yeşilbağ K. Bir ada ekosistemindeki sığır, koyun ve keçilerde bazı viral enfeksiyonların serolojik olarak araştırılması. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 61, 43-48, 2014.
  28. Ataseven VS, Ataseven L, Tan T, Babur C, Oğuzoğlu TC. Seropositivity of agents causing abortion in local goat breeds in Eastern and South-eastern Anatolia, Turkey. *Rev Med Vet-Toulouse*, 157(11), 545, 2006.
  29. Çabalar M, Karaoğlu T. Sığırlarda bovine viral diarrhoea (BVD) Virus enfeksiyonuna karşı antikor varlığının araştırılmasında nötralizasyon immunoperoxidaz (NPLA) ve serum nötralizasyon (SN) testlerinin karşılaştırılması. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 46, 249-255, 1999.
  30. Ozan E, Turan HM, Albayrak H, Çavunt A. Serological determination of pestivirus, bluetongue virus and peste des petits ruminants virus in small ruminants in Samsun province of Turkey. *Atatürk Üniversitesi Vet Bil Derg*, 7(1), 27-33, 2012.
  31. Özgünlük İ, Yıldırım Y. Güneydoğu Anadolu bölgesindeki sığırlarda bovine herpesvirus-1 (BHV-1) ve bovine viral diarrhoea virus (BVDV) enfeksiyonlarının serolojik olarak araştırılması. *Harran Üniv Vet Fak Derg*, 6(2), 152-157, 2017.
  32. Albayrak H, Yazıcı Z, Okur-Gümüsova S. Seroprevalence to bovine herpesvirus type 1 in sheep in Turkey. *Veterinarski arhiv*, 77(3), 257, 2007.
  33. Aslan ME, Azkur AK, Gazyağcı S. Epidemiology and genetic characterization of BVDV, BHV-1, BHV-4, BHV-5 and *Brucella* spp. infections in cattle in Turkey. *J Vet Med Sci*, 77(11), 1371-1377, 2015.
  34. Tamer C, Palancı HS, Yazıcı Z, Bayram E, Çakmak M, Ozan E, Kadı H, Önkol Ş, Gümüsova S, Albayrak H. Serological data of bovine herpesvirus type-1 and

- bovine viral diarrhoea virus infections in various ruminants in small-scale farms in the Central and Eastern Black Sea Region, Turkey. *Indian J Anim Res*, 52(6), 903-906, 2018.
35. Yıldırım Y, Yılmaz V, Majarashin FRA. Kuzeydoğu Anadolu Bölgesi sınır illerinde bulunan sığırlarda viral solunum sistemi enfeksiyonlarının Seroprevalansı. *Kafkas Uni Vet Fak Derg*, 15(4), 601-606, 2009.
  36. Yılmaz V, Coşkun N. Investigation of bovine herpesvirus type-1 infection in sheep in the Kars Province of Turkey. *Harran Üniv Vet Fak Derg*, 5 (1) 40-43; 2016.
  37. Şimşek A, Gürcay M, Parmaksız A, Sekin S, Koçhan A, Çelik ÖY, Çakmak F. Diyarbakır Yöresindeki Sığırların Sindirim ve Solunum Sistemi Problemlerinde Enzootik Bovine Leukosis (EBL), Bovine Viral Diare (BVD), Infeksiyöz Bovine Rhinotracheitis (IBR) ve Mavi Dil (BT) Enfeksiyonlarının Rollerinin Araştırılması. *Dicle Üniv Vet Fak Derg*, 10(1), 13-18, 2017.
  38. Six A, Banks M., Engels M., Ros Bascunana C. and Ackerman M. Latency and reactivation of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) in goats and of caprine herpesvirus-1 (CapHV-1) in calves. *Arch Virol*, 146, 1325-1335, 2001.
  39. Sakhaee E, Khalili M. Serological study of bovine viral respiratory diseases in dairy herds in Kerman province, Iran. *Iran J Vet Res*, 10(1), 49-53, 2009.
  40. Alkan F, Özkul A, Karaoğlu MT, Bilge S, Akça Y, Burgu D, Yeşilbağ K, Oğuzoğlu TC. Sığırlarda Viral Nedenli Solunum Sistemi Enfeksiyonlarının Seroepidemiolojisi. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 44, 73-80, 1997.
  41. Öner EB, Yeşilbağ K. Besi sığırlarında solunum sistemi viruslarının seroprevalansı ve persiste BVD virus enfeksiyonu tespiti. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 65, 1-7, 2018
  42. Çabalar M, Can-Şahna K. Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgesinde süt sığırlarında parainfluenza virus-3, bovine herpesvirus-1 ve respiratory syncytial virus enfeksiyonlarının seroepidemiolojisi. *YYÜ Vet Fak Derg*, 11(2), 101- 105, 2000.
  43. Yeşilbağ K, Güngör B. Seroprevalence of bovine respiratory virus in North-Western Turkey. *Trop Anim Health Pro*, 40(1), 55-60, 2008.
  44. Ataseven VS, Başaran Z, Yılmaz V, Dağalp SB. Van bölgesi keçilerinde parainfluenza virus-3 (PIV-3) ve bovine herpesvirus-1 (BHV-1) enfeksiyonlarının seroprevalansı. *YYÜ Vet Fak Derg*, 21(1), 7-9, 2010.
  45. Yavru S, Öztürk F, Gürhan İ, Şimşek A, Ünver G, Duman R, Yapıkçı O. Koyunlarda solunum yolu viruslarının serolojik olarak araştırılması. *Hayvancılık Araş Derg*, 53-60, 1999.
  46. Yener Z, Sağlam YS, Timurkaan N, İlhan F. Immunohistochemical detection of parainfluenza type 3 virus antigens in paraffin sections of pneumonic caprine lungs. *J Vet Med A*, 52(6), 268-271, 2005.
  47. Cho KO, Hoet AE, Loerch SC, Wittum TE, Saif LJ. Evaluation of concurrent shedding of bovine coronavirus via the respiratory tract and enteric route in feedlot cattle. *Am J Vet Res*, 62(9), 1436-1441, 2001.
  48. O'Connor A, Martin SW, Nagy E, Menzies P, Harland R. The relationship between the occurrence of undifferentiated bovine respiratory disease and titer changes to bovine coronavirus and bovine viral diarrhoea virus in 3 Ontario feedlots. *Can J Vet Res*. 65(3): 137-142, 2001.
  49. Alkan F, Bilge-Dağalp S, Can ŞK, Özgünlük İ. Sığırlarda coronavirus enfeksiyonunun epidemiyolojisi. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 50(1), 59-64, 2003.
  50. Timurkan MO, Aydın H, Belen S. Erzurum Bölgesinde Sığırlarda Respiratory Coronavirus Enfeksiyonunun RT-PCR ile tespiti ve Moleküler Karakterizasyonu. *Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg*. 10(3), 186-192; 2015.
  51. Yavru S, Yapıcı O, Kale M, Sahinduran S, Pehlivanoglu, F, Albay, MK, Avcı O. Bovine coronavirus (BoCV) infection in calves with diarrhoea and their dams. *Acta Sci Vet*, 44, 1-7, 2016.
  52. Yıldırım Y, Dağalp SB, Tan M, Kalaycıoğlu AT. Sero-prevalence of the rotavirus and corona virus infections in cattle. *J Anim Vet Adv*, 7, 1320-1323, 2008.