



Buzağlarda Schmallenberg Virüs Özgül Maternal Antikor Varlığının İzlenmesi

Emel BIYIKLI¹
Ahmet Kürşat AZKUR¹
Şükrü TONBAK²
Hasan Ceyhan MACUN³

¹ Kırıkkale Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
Viroloji Anabilim Dalı,
Kırıkkale, TÜRKİYE

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

³ Kırıkkale Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
Doğum ve Jinekoloji
Anabilim Dalı,
Kırıkkale, TÜRKİYE

Schmallenberg virüsü (SBV) sığır ve koyunlarda abort, ishal ve süt veriminin azalmasına neden olan bir etken olarak 2011 yılında keşfedilmiştir. Bu çalışmada, SBV ile doğal enfekte ineklerin ve kolostromu alan buzağların serum örneklerinde SBV özgül antikorlarının ELISA ile tespit edilebildiği sürenin belirlenmesi amaçlandı. Bir sığır çiftliğinde bulunan 148 baş inek ve buzağıdan alınan serumlarda SBV özgül antikor varlığı ELISA ile araştırıldı. İneklerde ve bu ineklere ait buzağlarda SBV özgül antikor yanıtı 8 ay boyunca aralıklarla izlendi. Toplamda 148 örnek içinde 6 tanesi yeni doğan buzağı olmak üzere 26 serum örneğinde SBV özgül antikor yanıtı pozitif olarak belirlendi (%17.56). Kolostrom almış buzağılardan 8. aya kadar serum örnekleri toplanıp SBV özgül antikor yönünden tarama yapıldı. Buzağlarda SBV seropozitifliğinin belirlenmesinin kolostromdan kaynaklandığı görüldü. SBV seropozitif buzağların tamamı SBV açısından 8. ayda seronegatif olarak tespit edildi ve ineklerdeki SBV seropozitiflik oranı %13.51 (20/148) olarak belirlendi. Sonuç olarak bu çalışma ile buzağılardaki SBV özgül maternal antikorların 8 aylık yaşa kadar varlığı teyit edildi. Bu neden ile SBV özgül antikor varlığı tespiti için buzağılarda yapılacak serolojik taramaların 8. aydan sonra başlaması önerildi. Aşı etkinliğinin belirlenmesi için SBV'nin koruyucu ve interferen antikor seviyesini incelediği detaylı bir çalışma gerekli olduğu ortaya konuldu.

Anahtar Kelimeler: Schmallenberg virüs, maternal antikor, inek, buzağı

Monitoring Schmallenberg Virus Specific Maternal Antibodies in Calves

Schmallenberg virus (SBV), emerged in 2011, cause abortion, diarrhea and reduced milk yield in cattle and sheep. The aim of this study was to determine the duration of SBV specific maternal antibodies in calves. For this purpose, 148 sera collected from cattle and calves were tested for SBV specific antibodies with ELISA. SBV specific antibody response was monitored during 8 months in cattle and their calves. SBV seropositivity was detected in 26 out of (six of them from newborn calves) 148 samples (17.56%). Calves were tested for SBV specific antibody for 8 months after colostrum intake. Seropositivity in calves born from SBV seropositive cattle is thought to be due to colostrum maternal antibodies. All SBV seropositive calves became seronegative after 8 months and SBV seropositivity of cattle was determined as 13.51% (20/148). In conclusion SBV maternal antibodies persistence for 8 months in calves is confirmed and therefore it is suggested that serological monitoring for SBV antibodies in calves should be initiated after 8 months of age. Furthermore it is necessary to investigate SBV specific protecting and interfering antibody levels for evaluation of vaccination efficiency.

Key words: Schmallenberg virus, maternal antibody, cow, calf

Giriş

Schmallenberg virüsü (SBV) 2011 yılında ineklerde ortaya çıkan ve teşhisi yapılamayan bir hastalık tablosunun incelenmesiyle keşif edilmiştir. Etken *Bunyaviridae* ailesi *Orthobunyavirus* cinsine ait zarflı, segmentli, negatif veya ambisense polariteli tek iplikli bir RNA virüsüdür (1-3). Schmallenberg virüsü ile enfekte sığırlarda; hipertermi, süt veriminde düşüş ve sulu ishal ile karakterize klinik belirtiler gözlenmektedir. Yeni doğan hayvanlarda ise brahignathia, artrogripozis, ankilozis, tortikollis, skolyoz, hidranensefali ve poreensefali gibi konjenital malformasyonların gözleendiği olgularda SBV varlığı tespit edilmiştir (1, 4-6).

Schmallenberg virüsünün varlığı, Danimarka, Almanya, İsviçre, Hollanda, Belçika, İngiltere, Fransa, Lüksemburg, İtalya, İspanya, Yunanistan, Avusturya ve Norveç gibi pek çok Avrupa ülkesinde (7-10) ve Afrika'da bildirilmiştir (11). Türkiye'de SBV'nin varlığı ELISA ile gösterilmiş ve seroprevalans oranları sığırlarda %39.8, koyunlarda %1.6, keçilerde % 2.8 ve mandalarda ise %1.5 olarak bildirilmiştir (12). Kırıkkale ilinde koyunlarda yapılan serolojik çalışma sonucunda seropozitivite %0.38 olarak belirlenmiştir (13). Ayrıca ülkemizde SBV genom varlığı real-time RT-PCR ile teyit edilmiştir (14, 15). Ülkemizde farklı çiftliklerdeki döl tutmayan farklı ırk ineklere ait kan serumları SBV yönünden ELISA ile incelendiğinde seropozitiflik oranı %43.52 olarak belirlenmiştir (16).

Sığır yetiştiriciliğinde maternal antikorları içeren kolostrom ile sağlanan pasif bağışıklık, buzağların hastalıklara karşı korunmasında önem arz eder. Steril bir ortam olan anne karnından, birçok mikroorganizmanın var olduğu bir çevre ile tanışan, yeni doğan buzağların korunmasında kolostrom çok önemli rol oynar. Kolostrom içerisinde

Geliş Tarihi : 24.05.2017
Kabul Tarihi : 08.10.2017

Yazışma Adresi
Correspondence

Ahmet Kürşat AZKUR
Kırıkkale Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
Viroloji Anabilim Dalı,
Kırıkkale - TÜRKİYE

azkurkursat@hotmail.com

bulunan maternal antikorların buzağuların serumunda çeşitli testler ile tespit edilebilme ve koruyucu titrede bulunma süreleri enfeksiyon etkenlerine göre farklılık göstermektedir. Akabane virüs enfeksiyonlarına karşı oluşmuş maternal antikorlar buzağılarda 4-5 ay, sığır herpesvirüs-1 enfeksiyonunda ise 4-6 ay süreyle kalmaktadır (17, 18). Sığırlarda doğal SBV enfeksiyonunda kolostrum aracılığıyla buzağulara aktarılan maternal antikorların ise ortalama 6 ay boyunca kaldıkları belirlenmiştir (19).

Bu çalışmada, SBV doğal enfekte ineklerden elde edilen kolostrum ile beslenen buzağılarda, ELISA testi ile serumda bulunan SBV özgül maternal antikorların varlığı ve kinetiğinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

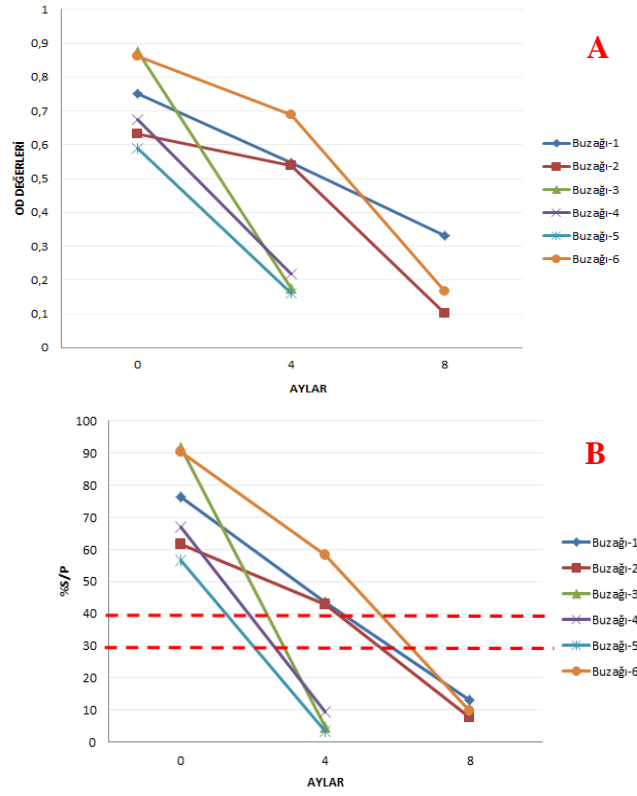
Gereç ve Yöntem

Serum Örnekleri: Çalışma için Kırıkkale Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan onay alındı (Karar no: 17/15). Afyonkarahisar ilindeki bir sığır çiftliğinde bulunan ve herhangi bir klinik bulgu göstermeyen toplam 148 baş inek ve buzağıdan kan örnekleri toplandı. İnekler ve kolostrum almış olan buzağularından ilk örneklemeyi takiben 4. ve 8. aylarda da kan alındı. Serumların elde edilmesi için örnekler +4 °C'de 3,000 rpm devirde 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen serumlar kullanılıncaya kadar -20 °C derin dondurucuda saklandı.

ELISA: Toplanan serum örnekleri Schmallenberg virüs indirekt ELISA (Schmallenberg virus antibody test kit, IDEXX, İsviçre) kiti ile incelendi. Analizler üreticinin önerdiği şekilde gerçekleştirildi ve sonuçlar ELISA okuyucuda (Seac, Sirio S, İtalya) 450 nm dalga boyunda okutulmuş değerlendirildi. İndirekt ELISA sonuçları %S/P = 100 x (örnek OD - negatif kontrol OD)/(pozitif kontrol OD - negatif kontrol OD) formülüne göre hesaplandı. Hesaplanan sonuçlara göre örnekler %S/P <%30 ise negatif, ≥%30 ile <%40 arasında ise şüpheli, ≥%40 ise pozitif olarak değerlendirildi.

Bulgular

İlk örneklemede alınan toplam 148 baş sığırın, 20 başı inek ve 6 başı buzağı olmak üzere toplam 26 serum örneğinde (%17.56) SBV özgül antikor yanıtı ELISA ile pozitif olarak belirlendi. Buzağı serumlarında belirlenen SBV özgül seropozitivitenin kaynağının kolostrum kaynaklı maternal antikor olduğu düşünüldü. Bu neden ile SBV seropozitif buzağılardan doğum sonrası 4. ve 8. ayda tekrar serum örnekleri toplandı. Dördüncü ayda yapılan örneklemede 6 buzağı serumunun 3 tanesi SBV seropozitif, kalan 3 buzağı serumu ise SBV seronegatif olarak tespit edildi. SBV seropozitifliği devam eden buzağuların serolojik olarak izlenmesi açısından 4 ay sonra (8. ayda) aynı hayvanlardan tekrar örnekleme yapıldı. Sekizinci ayda ise seropozitif kalan 3 buzağı serumu da SBV seronegatif olarak saptandı (Şekil 1). Son analiz sonuçlarına göre SBV seropozitifliğinin %17.56 oranından %13.51 oranına değiştiği gözlemlendi.



Şekil 1. Seropozitif buzağulara ait indirekt ELISA sonuçları. A) İzlenen altı buzağıya ait ELISA OD sonuç grafiği, B) İzlenen altı buzağıya ait ELISA %S/P sonuç grafiği. %S/P <%30 ise negatif, ≥%30 ile <%40 arasında ise şüpheli, ≥%40 ise pozitif olarak değerlendirildi

Tartışma

İneklerdeki sindezmokoriyal plasenta nedeni ile anneden fütüsa antikor geçişi gebelik süresince olmamakta ve buzağular maternal antikorları kolostrum aracılığıyla almaktadır. Bu maternal antikorların alınması ile sağlanan pasif koruma sığır yetiştiriciliğinde buzağıyı bovine viral diyare virüsü (BVDV), sığır herpesvirüs-1 (BHV-1), sığır respiratorik sinsityal virüsü (BRV), Akabane ve mavidil gibi pek çok viral enfeksiyona karşı korumaktadır (17, 18, 20, 21). SBV enfeksiyonunda da kolostrum ile buzağıya maternal antikor geçişi olmaktadır ve bu maternal antikorlar 4-8 ay arasında değişkenlik gösteren bir süre zarfında buzağılarda tespit edilebilmektedir (19). Çalışmada incelenen SBV seropozitif ineklerden doğan buzağılarda belirlenen seropozitivitenin kolostrum kaynaklı olduğu saptandı. İlk örneklemedeki serum örneklerinde ELISA ile belirlenen SBV seropozitivitesinin sonraki örneklemede seronegatifliğe dönmüş olduğu belirlendi. Elbers ve ark. (19)'nın yaptığı çalışma ile uyumlu olarak buzağılardaki maternal antikor seviyesinin 4-8 ay kadar sonra düşüşe geçtiği bu çalışmada doğrulandı. Elbers ve ark. (19)'nın yaptığı çalışmada buzağılardaki maternal antikor seviyeleri virüs nötralizasyon testi ile belirlenir iken, mevcut çalışmada maternal antikor seviyeleri indirekt ELISA ile araştırıldı. Elde edilen sonuçların uyumlu

olması ile rutin tanıda kullanım kolaylığı ve zaman tasarrufu yönünden ELISA testinin SBV taramalarında kullanılmasının uygun olabileceği görüldü.

Kolostrum alan buzağılardaki maternal antikorlar ile pasif immüitenin süresi her enfeksiyon için aynı değildir. Akabane virüs enfeksiyonunda maternal antikorlar buzağılarda 4-5 aylık iken %90 oranında düşüş göstermektedir (18). Buzağılardaki maternal antikorların düşüş süreleri BVDV için 5-6 ay, BHV-1 için 4-6 ay, BRSV için ortalama 6 aydır (17, 22). SBV enfeksiyonunda ise maternal antikor seviyesinin azalması 4-8 ay arasında değişmektedir (19). Maternal antikor seviyesinin düşüş süresi ayrıca ineğin verim yönü, annedeki antikor titresi, buzağının aldığı kolostrum miktarı ve kolostrumun bağırsaklardan emilimi gibi pek çok faktör nedeniyle farklılık gösterebilmektedir. Etçi ineklerde kolostrumdaki immunoglobulin seviyesi süt ineklerine kıyasla daha yüksektir (23). Bu çalışma ile Elbers ve ark. (19)'nın yapmış oldukları çalışmada, sütçü inekler üzerine inceleme yapılmış ve sütçü ineklerin buzağılarında SBV özgül maternal antikorların 4-8 ay kadar kaldığı belirlenmiştir. Ancak SBV maternal antikorlarının buzağılardaki seviyesinin ineğin verim türüne göre ne kadar süre devam ettiğine dair karşılaştırmalı bir çalışma henüz bulunmamaktadır.

Hayvanlardaki enfeksiyonun şiddeti ve antikor seviyeleri de kolostrumdaki antikor miktarını etkileyebilmektedir. Ülkemiz genelinde SBV seroprevalansı sığırlarda %39.8 olarak bildirilmiştir (12). Ancak Afyonkarahisar'da SBV'nin süt ineği popülasyonundaki seroprevalansına dair bir veri henüz mevcut değildir. Bu çalışmada ilk örneklemede inek ve buzağılarda %17.56 SBV seropozitiflik saptandı. Fakat kolostral antikorlardan kaynaklanan buzağı seropozitivitesinin ortadan kalkmasıyla birlikte, seropozitiflik ineklerde %13.51 olarak belirlendi. Afyonkarahisar ilinde SBV'nin antikor varlığının sığırlarda belirlendiği ilk çalışmadır.

Yenidoğan buzağılar pek çok enfeksiyona karşı duyarlı durumdadır. Doğum sonrasında kolostrum ile sağlanan pasif immünite ve aşılamalarla sağlanan aktif immünite sayesinde buzağılar pek çok viral, bakteriyel ve paraziter hastalıklara karşı korunmaktadır. Buzağılarının aşılama esnasında mevcut olan maternal antikorlar aşılamaların etkinliğini azaltmaktadır (21, 24). SBV enfeksiyonunda buzağılardaki maternal antikorların ortalama 6 ay kadar kalması nedeniyle buzağı aşılamalarının 6 aylıktan sonra uygulanması

önerilmektedir (19). Ülkemizde SBV enfeksiyonuna karşı bir aşılama programı bulunmamaktadır. Ancak Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı'nın yayınlamış olduğu ek beyan ile ülkemize ithal edilen hayvanlarda SBV ile mavi dil enfeksiyonları yönünden tarama yapılması gerekliliği bildirilmiştir (25). Bu beyana göre ülkemiz ithal edilen sığır, koyun, keçi türlerinin gebe dişi damızlıklarının SBV yönünden "Türkiye Cumhuriyeti'ne Gebe Hayvan İhracatı İçin Ek Deklarasyon" aranması koşulu konulmuştur. Ülkemize ithal edilen gebe hayvanların SBV pozitif olarak sonuç vermesi durumunda doğan buzağının kolostrum alması sonrasında maternal antikorlar nedeniyle seropozitif olabileceği testi yapan uzmanlar tarafından göz önünde bulundurulmalıdır. Kolostrum öncesi serumun alınmadığı durumlarda ise buzağı 8 aylıktan sonra tekrar SBV antikorları yönünden incelenmelidir. Gebelikte oluşan SBV enfeksiyonu sonrasında buzağılar malformasyon bulgularına sahip olabileceği gibi sağlıklı görünümde de doğabilirler. Sağlıklı buzağılarının fetal SBV enfeksiyonu geçirip geçirmediğinin belirlenmesi için kolostrum öncesi serum örneğinin alınmasının önemli olduğu gösterilmiştir (26, 27).

Sığırlarda yapılan SBV aşı çalışmaları sonucunda inaktif ve attenüe (delesyon mutan) aşılar geliştirilmiştir (28, 29). Bu aşıların henüz gebe hayvanlardaki denemeleri yapılmadığı için güvenli kullanımları, fetal enfeksiyon riski, kolostrumdaki maternal antikor seviyesi gibi noktalar netlik kazanmamıştır. Gebe ineklerin aşılama ile ilgili çalışmaların yapılması ile bu konudaki açıklık giderilmelidir. Ayrıca doğal SBV enfeksiyonu sonucunda oluşan ve buzağıya aktarılan maternal antikorların buzağıda 8 ay kadar süreyle kaldığı bilinmesine rağmen maternal antikorların buzağıları olası SBV enfeksiyonuna karşı koruyup korumadığı veya ne kadar süre ile koruma sağladığı da henüz bilinmemektedir. Buna rağmen yeni doğan buzağılarının SBV enfeksiyonuna karşı pasif bağışıklığının sağlanması amacıyla yetiştiricilerin kolostrum vermesi önem arz etmektedir. Aşılama ve maternal antikor aracılı pasif koruma ile ilgili bu bilimsel boşlukların doldurulması için daha kapsamlı çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Sonuç olarak; bu çalışma ile SBV özgül antikorların 8 aya kadar buzağılarda kalabileceği teyit edilmiş, aşılama ve tanıda bu verinin kullanılması önerilmiştir. İlaveten Afyonkarahisar ilinde ilk kez ineklerde SBV seropozitiflik oranı %13.51 olarak belirlenmiştir.

Kaynaklar

- Hoffmann B, Scheuch M, Höper D, et al. Novel orthobunyavirus in cattle, Europe, 2011. *Emerg Infect Dis* 2012; 18: 469-472.
- Varela M, Schnettler E, Caporale M, et al. Schmallenberg virus pathogenesis, tropism and interaction with the innate immune system of the host. *PLoS Pathog* 2013; 9: e1003133.
- Azkur AK, Tonbak S. Schmallenberg virüsü. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi* 2015; 29: 129-135.
- Ducomble T, Wilking H, Stark K, et al. Lack of evidence for Schmallenberg virus infection in highly exposed persons, Germany, 2012. *Emerg Infect Dis* 2012; 18: 1333-1335.
- Herder V, Wohlsein P, Peters M, Hansmann F, Baumgartner W. Salient lesions in domestic ruminants infected with the emerging so-called Schmallenberg virus in Germany. *Vet Pathol* 2012; 49: 588-591.
- van den Brom R, Luttikholt SJ, Lievaart-Peterson K, et al. Epizootic of ovine congenital malformations associated

- with Schmallenberg virus infection. *Tijdschr Diergeneeskd* 2012; 137: 106-111.
7. Beer M, Conraths FJ, van der Poel WH. 'Schmallenberg virus'--a novel orthobunyavirus emerging in Europe. *Epidemiol Infect* 2013; 141: 1-8.
 8. Chaintoutis SC, Kiossis E, Giadinis ND, et al. Evidence of Schmallenberg virus circulation in ruminants in Greece. *Trop Anim Health Prod* 2014; 46: 251-255.
 9. Wisloff H, Nordvik BS, Sviland S, Tonnessen R. The first documented clinical case of Schmallenberg virus in Norway: Fetal malformations in a calf. *Vet Rec* 2014; 174: 120.
 10. Steinrigl A, Schiefer P, Schleicher C, et al. Rapid spread and association of Schmallenberg virus with ruminant abortions and foetal death in Austria in 2012/2013. *Prev Vet Med* 2014; 116: 350-9.
 11. Blomstrom AL, Stenberg H, Scharin I, et al. Serological screening suggests presence of Schmallenberg virus in cattle, sheep and goat in the Zambezia province, Mozambique. *Transbound Emerg Dis* 2014; 61: 289-292.
 12. Azkur AK, Albayrak H, Risvanli A, et al. Antibodies to Schmallenberg virus in domestic livestock in Turkey. *Trop Anim Health Prod* 2013, 45: 1825-1828.
 13. Macun HC, Azkur AK, Kalender H, Erat S. Kırıkkale'de yetiştirilen koyunlarda Schmallenberg virüs seroprevalansı ve bazı coğrafi özelliklerle ilişkisi. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2017; 64: 93-97.
 14. Yılmaz H, Hoffmann B, Turan N, et al. Detection and partial sequencing of Schmallenberg virus in cattle and sheep in Turkey. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2014; 14: 223-225.
 15. Tonbak S, Azkur AK, Pestil Z, et al. Circulation of Schmallenberg virus in Turkey, 2013. *Turk J Vet Anim Sci* 2016; 40: 175-180.
 16. Risvanli A, Pestil Z, Azkur AK, et al. Seroprevalence of Schmallenberg virus in repeat breeder cows. *Online J Vet Res* 2013; 17: 432-435.
 17. Fulton RW, Briggs RE, Payton ME, et al. Maternally derived humoral immunity to bovine viral diarrhea virus (BVDV) 1a, BVDV1b, BVDV2, bovine herpesvirus-1, parainfluenza-3 virus bovine respiratory syncytial virus, Mannheimia haemolytica and Pasteurella multocida in beef calves, antibody decline by half-life studies and effect on response to vaccination. *Vaccine* 2004; 22: 643-649.
 18. Tsutsui T, Yamamoto T, Hayama Y, et al. Duration of maternally derived antibodies against Akabane virus in calves: Survival analysis. *J Vet Med Sci* 2009; 71: 913-918.
 19. Elbers AR, Stockhofe-Zurwieden N, van der Poel WH. Schmallenberg virus antibody persistence in adult cattle after natural infection and decay of maternal antibodies in calves. *BMC Vet Res* 2014, 10: 103.
 20. Mechor GD, Rousseaux CG, Radostits OM, Babiuk LA, Petrie L. Protection of newborn calves against fatal multisystemic infectious bovine rhinotracheitis by feeding colostrum from vaccinated cows. *Can J Vet Res* 1987; 51: 452-459.
 21. Vitour D, Guillotin J, Sailleau C, et al. Colostral antibody induced interference of inactivated bluetongue serotype-8 vaccines in calves. *Vet Res* 2011; 42: 18.
 22. Menanteau-Horta AM, Ames TR, Johnson DW, Meiske JC. Effect of maternal antibody upon vaccination with infectious bovine rhinotracheitis and bovine virus diarrhea vaccines. *Can J Comp Med* 1985; 49: 10-14.
 23. Guy MA, McFadden TB, Cockrell DC, Besser TE. Regulation of colostrum formation in beef and dairy cows. *J Dairy Sci* 1994; 77: 3002-3007.
 24. Endsley JJ, Roth JA, Ridpath J, Neill J. Maternal antibody blocks humoral but not T cell responses to BVDV. *Biologicals* 2003; 31: 123-125.
 25. T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı. "Hayvan İthalatında Talep Edilen Ek Deklarasyon Formatları". <http://www.tarim.gov.tr/Konular/Veteriner-Hizmetleri/Ihracat-Ithalat/Ithalat/15.05.2017>.
 26. van Maanen C, van der Heijden H, Wellenberg GJ, et al. Schmallenberg virus antibodies in bovine and ovine fetuses. *Vet Rec* 2012; 171: 299.
 27. Wernike K, Holsteg M, Schirrmeyer H, Hoffmann B, Beer M. Natural infection of pregnant cows with Schmallenberg virus--a follow-up study. *PLoS One* 2014; 9: e98223.
 28. Wernike K, Nikolin VM, Hechinger S, Hoffmann B, Beer M. Inactivated Schmallenberg virus prototype vaccines. *Vaccine* 2013; 31: 3558-3563.
 29. Kraatz F, Wernike K, Hechinger S, et al. Deletion mutants of Schmallenberg virus are avirulent and protect from virus challenge. *J Virol* 2015; 89: 1825-1837.