

Kars ve Ardahan Yöresindeki Atlarda Equine Viral Arteritis Enfeksiyonunun Seroprevalansının Belirlenmesi^a

Ali Haydar KIRMIZIGÜL

Yakup YILDIRIM*

Gürbüz GÖKÇE*

* Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Kars - TÜRKİYE

**Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı, Kars - TÜRKİYE

^a Bu çalışma TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir. Proje No: TOVAG 106 O 262

Yayın Kodu: 2007/35-A

Özet

Bu çalışmada Kars ve Ardahan illerindeki atlarda Equine Viral Arteritis (EVA) enfeksiyonunun seroprevalansı araştırıldı. Bu amaçla adı geçen illerde bulunan atlardan toplam 400 adet kan serumu örneği alındı. Kan serumları equine viral arteritis virüsüne spesifik antikorlar yönünden Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) yönetimi kullanılarak test edildi. Örneklenen popülasyonda EVA virüs enfeksiyonunun seroprevalansı %8.75 (35/400) olarak saptandı. Bu değer Kars'ta %9.5 (19/200) ve Ardahan'da ise %8 (16/200) olarak bulundu. Cinsiyetlere göre seropozitiflik oranları, erkeklerde %11.55 (26/225), dişilerde ise %5.14 (9/175) olarak tespit edildi.

Sonuç olarak Kars ve Ardahan illerinde yaşayan insanların hayatında ekonomik ve fiziksel koşullar açısından önemli yeri olan atlarda, EVA enfeksiyonunun varlığı/yaygınlığı ilk kez ortaya konuldu ve projeden elde edilen sonuçlara göre bu enfeksiyonun kontrolü amacıyla önlemlerin alınması gerektiği kanaatine varıldı.

Anahtar sözcükler: *At, Equine viral arteritis, ELISA*

Seroprevalence of Equine Viral Arteritis in Horses of the Kars and Ardahan Provinces^a

Summary

This study investigated sero-prevalence of Equine Viral Arteritis (EVA) in Kars and Ardahan districts. For this purpose, 400 horses from these districts were blood sampled and specific antibodies to equine viral arteritis were investigated in serum by means of Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Of the population sampled, seroprevalence of EVA was 8.75% (35/400). Seroprevalence was 9.5% (19/200) in Kars and 8% (16/200) in Ardahan. Seropositivity according to gender revealed that the proportion of seropositivity was 11.55% (26/225) in male and 5.14% (9/175) in females.

In conclusion, this was the first study to report the presence and prevalence of EVA in horses in Kars and Ardahan where horse has important contribution to economic and day to day life of human and preventive measures should be taken to control the infection.

Key words: *Horse, Equine viral arteritis, ELISA*

İletişim (Correspondence)

Phone: +90 474 2426800/1251

e-mail: ahkirmigul@hotmail.com

GİRİŞ

Equine viral arteritis (EVA) enfeksiyonu, Arteriviridae familyası içinde yer alan pozitif polariteli RNA içeren equine arteritis virüsü tarafından oluşturulan at, katır ve eşeklerin reprodüktif ve solunum sistemi bozukluklarıyla karakterize bir hastalıktır ^{1,2}.

Etken, çoğunlukla yeni abort yapmış veya akut enfekte hayvanların burun akıntısı, göz akıntısı, gaita ve idrarları ile saçılır. Ayrıca enfekte aygırların semenleri de bulaşmada önemli rol oynamaktadır. EVA virüsünün doğal rezervuarı durumundaki taşıyıcı aygırlarda persiste enfeksiyon oluşabilir ^{1,3-5}. Virüs sağlıklı hayvanlara direkt temas, inhalasyon veya sperma yolu ile bulaşabileceği gibi bakıcılar ve kullanılan malzemeler aracılığıyla da virüsün yayılması mümkündür ^{6,7}.

Enfeksiyon Dünya'nın birçok yerinde endemik seyretmekte olup, vakalar çoğunlukla subklinik olarak görülmektedir. Hastalığın akut fazında ateş, veneral ödem, bacaklarda ödem, peteşiyel kanamalar, diyare, hemorajik enteritis, depresyon, rinitis ve konjunktivitis görülür ⁸⁻¹². Virüs kısıraklarda abortlara, yeni doğanlarda ölüme, aygırlarda scrotal ödem ve hipertermi sonucu sperm bozukluklarına yol açabilir ^{1,13-15}.

EVA enfeksiyonunu geçiren hayvanlarda uzun süreli bir immünite gelişir. Kısıraklar ve kastre edilmiş aygırlar 60 gün içinde virüsü elimine etmelerine karşın, akut enfekte aygırların %30-60'ı kalıcı enfekte olup, aralıklı veya sürekli olarak semen ile virüsü saçarak ^{1,3,14}. Veneral yolla enfekte olan kısıraklarda enfeksiyon gelişebilir ve bu hayvanlar herhangi bir klinik semptom göstermeden idrarları ve nazofaringeal sekresyonları ile çok miktarda virüs saçarak, popülasyon içinde enfeksiyon kaynağı görevi yaparlar ¹⁶.

Gebe kısıraklarda abort, EVA enfeksiyonunun en büyük risklerinden biridir. Doğal enfeksiyonlarda, gebeliğin 3-10. ayları arasında görülen abort vakalarının oranı %10-60 arasında değişir ¹⁷⁻¹⁹.

EVA enfeksiyonunun teşhisinde Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ²⁰ ve Serum Nötralizasyon (SN) ²¹ gibi yöntemlerden yararlanılmaktadır. Kan serumunda EVA spesifik antikorların tespiti amacı

ile, ELISA ve SN testlerinin karşılaştırmalı çalışıldığı araştırmalarda, Hyun ve ark.²² iki test arasında %99.4 sensitivite, Paweska ve ark.²³ ise %99.2 sensitivite ve %80.3 oranında spesifite olduğunu saptamışlardır. Ayrıca ELISA testi SN testine göre daha hızlı sonuç vermesi ve ucuz olması bakımından daha avantajlı görülmektedir ²².

Değişik ülkelerde yapılan çalışmalarda EVA yönünden seropozitiflik oranı, %1.9 ile %10.3 arasında 24-28 belirlenirken, ülkemizde yapılan bir çalışmada 100 attan 5'inin seropozitif olduğu belirlenmiştir ²⁹.

Bu çalışmada, Kars ve Ardahan yöresindeki atlarda EVA enfeksiyonunun varlığının serolojik olarak saptanması ve yöredeki yaygınlığı hakkında bilgi edinilmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Örneklenen hayvanlar

Araştırmada, 1 yaşından büyük ve EVA virüsüne karşı aşılınmamış, Kars yöresinden 200 adet (120 adet erkek, 80 adet dişi) ve Ardahan yöresinden de 200 adet (105 adet erkek ile 95 adet dişi at) olmak üzere toplam 400 adet at örneklenildi.

Serum örnekleri

Koagulantlı tüplere alınan kan örnekleri, 3000 devirde 15 dakika santrifüj edildikten sonra, elde edilen serumlar stok tüplere alındı. Elde edilen bu serum örnekleri daha sonra 56 °C'de 30 dakika süreyle inaktivasyona tabi tutuldu ve test aşamasına kadar -20°C'de saklandı.

Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Test, üretici firmanın (Ingenasa-İspanya) bildirdiği prosedüre göre uygulandı. Bu amaçla kit içeriğinde bulunan kullanıma hazır pozitif ve negatif referans serumlardan mikropleytlerin iki çukuruna 0.1 ml pozitif referans serumu, diğer iki çukuruna ise 0.1 ml miktarında negatif referans serumu, diğer her bir çukura da test edilecek 1/25 oranında sulandırılmış serum örneklerinden 0.1'er ml konularak ELISA shaker'da çalkalandıktan sonra, pleytin üzeri alüminyum folyo ile örtüldü ve 37°C'de 24 saat süreyle inkübe edildi.

İnkübasyon süresi bitimini takiben 6 kez yıkanan tabletin her bir kuyucuğuna titresi oranında (1/100) sulandırılan konjugattan (anti-EVA konjugatı) 0.1 ml konuldu ve 37°C'de 30 dakika süreyle tekrar inkübe edildi. Tekrar edilen yıkama işleminden sonra, substrat tamponu içinde hazırlanan tetramethylbenzidine (TMB) kromojeninden her bir kuyucuğa 0.1 ml ilave edildi. Oda ısısı ve karanlık ortamda 5 dakika bekletildikten sonra ortaya çıkan reaksiyon 2M H₂SO₄ ilavesi ile durduruldu. Test sonucu, spektrofotometrik olarak 450 nm filtre absorbanlarında okunmak suretiyle değerlendirildi. Bu aşamada pozitif kontrol OD (Optical Densities) 0.5'e eşit veya daha yüksek, negatif kontrol OD 0.2'den daha düşük ve cut-off değer de negatif kontrol OD+0.2 olarak alındı. Cut-off değerinden büyük OD değerinde okunan serum örnekleri pozitif olarak kabul edildi.

İstatistik Değerlendirme

EVA enfeksiyonu için belirlenen seropozitiflik oranlarının karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesi amacıyla Ki-Kare (χ^2) testi uygulandı³⁰.

BULGULAR

Proje kapsamında toplanan 400 adet ata ait kan serumu örneklerinin serolojik olarak ELISA testi ile incelenmesi sonucunda, EVA virüsüne karşı %8.75 (35/400) oranında seropozitiflik tespit edildi. Örnekleme yapıldığı illere göre seropozitiflik oranları, Ardahan ili ve çevresinde %8 (16/200), Kars ili ve çevresinde ise %9.5 (19/200) olarak saptandı. Örnekleme yapılırken hayvan sahiplerinden alınan bilgiler doğrultusunda, seropozitif tespit edilen kısırların (Kars'ta 2 adet, Ardahan da ise 3 adet) gebeliğin 5-9. aylarında abort yaptıkları belirlendi. Çalışmada cinsiyetlere göre seropozitiflik oranları, erkeklerde %11.55 (26/225) ve dişilerde %5.14 (9/175) olarak tespit edildi. Seropozitif bulunan erkek ve dişilerin illere göre dağılımlarında, Kars ilinde erkeklerin %11.66'sı (14/120), dişilerin %6.25'i (5/80) ve Ardahan ilinde erkeklerin %11.42'si (12/105) ile dişilerin %4.21'i (4/95) antikör pozitif olarak belirlendi.

Her iki ildeki erkeklerin ve dişilerin seropozitiflik değerleri istatistiksel olarak Ki-Kare (χ^2) metoduyla pozitiflik açısından karşılaştırıldığında, iller

arasında fark önemli bulunmazken ($\chi^2=0.13$ p=0.7), erkeklerle dişiler arasında farkın önemli olduğu belirlendi ($\chi^2=4.3$ p=0.038).

TARTIŞMA ve SONUÇ

Kars ve Ardahan yöresinde yaşayan insanlar, ağır kış şartları ve engebeli arazi koşulları nedeniyle ulaşım, taşımacılık ve tarım alanlarında sıklıkla atlardan yararlanmaktadır. Bu nedenle atlar, insanların hayatında ekonomik ve fiziksel koşullar açısından önemli bir yer tutmaktadır. EVA virüsü atlarda konjesyon, vücudun değişik bölgelerinde ödem, dispne, konjunktivitis, diyare, hemorajik enteritis, larengitis, farengitis ve öksürük ile karakterize akut enfeksiyon tablosu oluşturabildiği gibi, çoğunlukla her hangi bir klinik semptomaya yol açmadan da subklinik olarak seyredebilmektedir. EVA enfeksiyonu, abort ve neonatal ölümlere yol açtığından at yetiştiriciliğinde önemli ekonomik kayıplara neden olur. Dünyada birçok ülkede yapılan çalışmalarla²⁴⁻²⁷ varlığı ortaya konulan enfeksiyonun, Türkiye'de durumu ile ilgili ise bir çalışmaya rastlanmıştır²⁹.

Szeredi ve ark.²⁷ Hollanda'da yaptıkları çalışmada, 57 çiftlikten topladıkları 96 adet abort olmuş tay örneğinde, EVA enfeksiyonunun seroprevalansını %8.3 olarak belirlemişler ve aynı zamanda bu örnekleme yapıldığı çiftliklerde bulunan kısırlarda da enfeksiyonun %65 oranında bulunduğunu ortaya koymuşlardır. Hullinger ve ark.²⁶ ABD'de ithal edilen ve California Eyaleti'nde bulunan atları kapsayan araştırmalarında, ithal edilen atlarda %18.6, California'da 44 çiftlikten topladıkları 364 adet at serumunda %1.9 oranında pozitiflik tespit etmişlerdir. Tunus'ta Ghram ve ark.²⁴ 400 adet at kan serumu örneğinde yaptıkları çalışmada, EVA enfeksiyonunun seroprevalansını %8.75 olarak saptamışlardır. Kölbl ve ark.²⁸ Avustralya'da topladıkları 944 adet at kan serumu örneğine uyguladıkları nötralizasyon testi sonucunda EVA enfeksiyonunun prevalansını, %10.9 olarak tespit etmişlerdir. Benzer olarak Avrupa'da birçok ülkede yapılan serolojik çalışmalarla^{25,31,32} enfeksiyonun varlığı değişik oranlarda ortaya konmuştur. Ülkemizde ise yapılan bir çalışmada, 100 attan 5'i EVA yönünden pozitif olarak belirlenmiştir²⁹.

Bu çalışmada Türkiye'nin Doğu Anadolu Bölgesinde bulunan Kars ve Ardahan illerinde, 1

yaşından büyük ve EVA virüsüne karşı aşılammış 400 adet at kan serumu örneği alınmış ve bu hayvanlarda enfeksiyonun seroprevalansı %8.75 olarak tespit edilmiştir. Belirlenen bu oran, dünyada bildirilen diğer çalışma bulgularıyla benzerlik göstermektedir. Fakat daha önceden bölgede bu enfeksiyonla ilgili herhangi bir çalışma yapılmaması nedeniyle, bu projede elde edilen bölgesel enfeksiyon prevalansındaki değişimler karşılaştırılmamıştır. Projede cinsiyetlere göre seropozitiflik oranları ise, erkeklerde %11.55 (26/225) ve dişilerde %5.14 (9/175) olarak tespit edildi.

Bu noktada tespit edilen EVA seropozitiflik oranları, iller arasında ve cinsiyetler arasında istatistiksel olarak karşılaştırmalı değerlendirilmiş olup, iller arasında fark önemli bulunmazken ($\chi^2=0.13$ p=0.7), erkelerle dişiler arasındaki farkın önemli olduğu belirlendi ($\chi^2=4.3$ p=0.038). Cinsiyete göre ortaya çıkan bu farklılığın en önemli nedenini aygırlarda EVA virüsünün persiste enfeksiyonlara neden olmasından kaynaklanabileceği düşünüldü.

Bu çalışmada örnekleme yapılan hayvanlarda, EVA enfeksiyonun atlardaki en büyük risklerinden biri olan abort vakalarının oranı %1.25 olarak belirlendi.

Enfeksiyonda subklinik enfekte hayvanların virüs saçılımında aktif rol oynadığı göz önüne alındığında, atların sağlıklı görünse bile enfeksiyonun devam ettiği ve zaman içinde problemler yaratacağı kuşkusuzdur.

Sonuç olarak, bu çalışmadan elde edilen verilerle bölgede enfeksiyonun varlığı ilk kez ortaya konuldu. Bölgenin hem Gürcistan hem de Ermenistan ile komşu olduğu düşünüldüğünde, kontrolsüz hayvan hareketlerinin engellenmesi önem kazanmaktadır. Bunun yanı sıra abortlara neden olan diğer etkenlerinde araştırılmasının gerekliliği ortaya çıkmaktadır. Özellikle enfeksiyonun sperma ile bulaştığı dikkate alındığında, aygırların EVA virüsü yönünden rutin kontrollerinin yapılması ve sperma ithalatında bu konunun göz önünde tutulması faydalı olacaktır. Ayrıca enfeksiyonla mücadelede, profilaktik aşı uygulamalarının da yapılmasının yararlı olabileceği kanısına varıldı.

KAYNAKLAR

1. **Timoney PJ, McCollum WH:** Equine viral arteritis. *Vet Clin North Am: Equine Pract*, 9, 295-309, 1993.
2. **Cavanagh D:** Nidovirales: A new order comprising Coronaviridae and Arteriviridae. *Arch Virol*, 142, 629-633, 1997.
3. **Timoney PJ, McCollum WH, Roberts AW, Murphy TW:** Demonstration of the carrier state in naturally acquired equine arteritis virus infection in the stallion. *Res Vet Sci*, 41, 279-280, 1986.
4. **Timoney PJ, McCollum WH, Roberts AW, Murphy TW, Willard JG, Carswell GD:** The carrier state in equine arteritis virus infection in the stallion with specific emphasis on the venereal mode of virus transmission. *J Reprod Fertil Suppl*, 35, 95-102, 1987.
5. **Timoney PJ, McCollum WH:** Equine viral arteritis: further characterization of the carrier state in stallions. *J Reprod Fertility*, 56, 3-11, 2000.
6. **Collins JK, Kari S, Ralston SL, Bennet DG, Traub-Dargatz JL, McKinnon AO:** Equine viral arteritis in a veterinary teaching hospital. *Prevent Vet Med*, 4, 389-397, 1987.
7. **Guthrie AJ, Howell PG, Hedges JF, Bosman AM, Balasuriya UB, McCollum WH, Timoney PJ, MacLachlan NJ:** Lateral transmission of equine arteritis virus among Lipizzaner stallions in South Africa. *Equine Vet J*, 35, 596-600, 2003.
8. **Glaser AL, De Vries AA, Rottier PJ, Horzinek MC, Colenbrander B:** Equine arteritis virus: clinical symptoms and prevention. *Tijdschr Diergeneesk*, 122, 2-7, 1997.
9. **Chirnside ED:** Equine viral arteritis- A free market threat. *Eq Vet Educ*, 5, 137-139, 1993.
10. **Del Piero F:** Equine viral arteritis. *Vet Pathol*, 37, 287-296, 2000.
11. **Timoney PJ, McCollum WH:** Equine viral arteritis. *Eq Vet Educ*, 8, 97-100, 1996.
12. **Moore B, Balasuriya U, Watson J, Bosio C, MacKay R, MacLachlan N:** Virulent and avirulent strains of equine arteritis virus induce different quantities of TNF-alpha and other proinflammatory cytokines in alveolar and blood-derived equine macrophages. *Virology*, 314, 662-670, 2003.
13. **Cole JR, Hall RF, Hendricks JB, Pursell AR, Sene DA, Pearson JE, Gipson CA:** Transmissibility and abortigenic effect of equine viral arteritis in mares. *J Am Vet Med Assoc*, 189, 769-771, 1986.
14. **Neu SM, Timoney PJ, McCollum WH:** Persistent infection of the reproductive tract in stallions experimentally infected with equine arteritis virus. **In**, Powell DG (Ed): Proceedings of the Fifth International Conference on Equine Infectious Diseases, Vol. 5, pp: 149-154, University Pres of Kentucky, 1988.
15. **Vaala WE, Hamir AN, Dubovi EJ, Ruiz B:** Fatal, congenitally acquired infection with equine arteritis virus in a neonatal Thoroughbred. *Equine Vet J*, 24, 155-158, 1992.
16. **Samper JC, Tibary A:** Disease transmission in horses. *Theriogenol*, 66, 551-559, 2006.
17. **Clayton H:** 1986 outbreak of EVA in Alberta, Canada. *J Eq Vet Sci*, 7, 101, 1987.
18. **Balasuriya UBR, Hedges JF, Timoney PJ,**

- McCollum WH, MacLachlan NJ:** Genetic stability of equine arteritis virus during horizontal and vertical transmission in an outbreak of equine viral arteritis. *J Gen Virol*, 80, 1949-1958, 1999.
19. **Golnik W:** The results of serological examinations of stallions for equine arteritis virus antibodies. *Med Weter*, 56, 573-575, 2000.
 20. **Ramina A, Dalla Vale L, De Mas S, Tisato E, Zuin A, Renier M, Cuteri V, Valente C, Cancellotti FE:** Detection of equine arteritis virus in semen by reverse transcriptase polymerase chain reaction-ELISA. *Comp Immun Microbiol Infect Dis*, 22, 187-197, 1999.
 21. **Senne DA, Pearson JE, Carbrey EA:** Equine viral arteritis: A Standard procedure for the virus neutralization test and comparison of results of a proficiency test performed at five laboratories. **In**, Proceedings of 89th Annual Meeting of the United States Animal Health Association, Milwaukee, pp. 29-34, 1985.
 22. **Cho HJ, Entz SC, Deregt D, Jordan LT, Timoney PJ, McCollum WH:** Detection of antibodies to equine arteritis virus by a monoclonal antibody based blocking ELISA. *The Canadian Journal of Veterinary Research*, 64, 38-43, 2000.
 23. **Paweska JT, Binns MM, Woods PS, Chirnside ED:** A survey for antibodies to equine arteritis virus in donkeys, mules and zebra using virus neutralisation (VN) and enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). *Equine Vet J*, 29, 40-43, 1997.
 24. **Ghram A, Chabchoub A, Turki I, Boussetta M, Ibn Amor H, Ghorbel A:** Rhinopneumonia and equine viral arteritis: Seroepidemiological study in the northeast of Tunisia. *Arch Inst Pasteur Tunis*, 71, 5-12, 1994.
 25. **Glaser AL, Chirnside ED, Horzinek MC, Vries AAF:** Equine arteritis virus. *Theriogenol*, 47, 1275-1295, 1997.
 26. **Hullinger PJ, Gardner IA, Hietala SK, Ferraro GL, MacLachlan NJ:** Seroprevalence of antibodies against equine arteritis virus in horses residing in the United States and imported horses. *J Am Vet Med Assoc*, 219, 946-949, 2001.
 27. **Szeredi L, Hornyak A, Palfi V, Molnar T, Glavits R, Denes B:** Study on the epidemiology of equine arteritis virus infection with different diagnostic techniques by investigating 96 cases of equine abortion in Hungary. *Vet Microbiol*, 108, 235-242, 2005.
 28. **Kölbl S, Schuller W, Pabsl J:** Serological studies of the recent infections of Austrian horses with the equine arteritis virus. *Dtsch Tierarztl Wochenschr*, 98, 43-45, 1991.
 29. **Yılmaz H, Özgür NY, Ilgaz A:** Equine viral arteritis üzerine serolojik araştırma. I. Uluslararası Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi, İstanbul, 1996, s. 200.
 30. **SPSS for Windows**, SPSS Copyright Inc. Version 10.0, 1999.
 31. **Monreal L, Villatoro AJ, Hooghuis H, Ros I, Timoney PJ:** Clinical features of the 1992 outbreak of equine viral arteritis in Spain. *Equine Vet J*, 27, 301-304, 1995.
 32. **Newton JR, Wood JL, Castillo-Olivares FJ, Mumford JA:** Serological surveillance of equine viral arteritis in the United Kingdom since the outbreak in 1993. *Vet Rec*, 145, 511-516, 1999.