

DONDURUP ÇÖZDÜRMEİNİN SERUMDAKİ IBR VİRUS ANTİKOR TİTRELERİNE ETKİSİNİN SNT VE ELISA İLE TESBİTİ

THE DETERMINATION OF THE EFFECT OF FREEZING- THAWING ON THE SERUM ANTIBODY TITERS FOR IBR VIRUS BY SNT AND ELISA *

Özden KABAĞLI** Ayhan AKÇORA**

ÖZET

Bu araştırmada Türkiye'nin değişik bölgelerinden IBR/IPV şüpheli sığırlardan alınan 250 adet serum hem mikro nötralizasyon testi hemde ELISA ile test edildi. Testler arasındaki farklılık karşılaştırıldı. Ayrıca test edilen bu 250 serum içinde 44 adedi 10 kez dondurulup - çözündürülerek, dondurup çözündürmenin serumlardaki antikor seviyeleri üzerine etkisi SNT ve ELISA ile araştırıldı.

ELISA ile 250 adet kan serumununun 173 adedi pozitif, 77 adedi negatif sonuç verdi. SNT ile 170 adedi pozitif, 80 adedi negatif sonuç verdi. SNT ile negatif sonuç veren 80 serumdan 3 adedi ELISA ile pozitif reaksiyon verdi. Chi square (X^2) metodu kullanılarak her iki testte serumlardaki pozitiflik oranı karşılaştırıldığında $X^2=236(p<0.001)$ bulundu. SNT standart kabul edilerek ELISA karşılaştırıldığında spesifitesi %96.25, sensitivitesi %100 olarak bulundu.

Bu araştırmada, 10 kez dondurulup-çözündürülen 44 adet serumun başlangıçta her iki test ile pozitif oldukları tesbit edilen 40 adedinin serum nötralizasyon değerleri (SN_{50}) 1:1.41 -1:316, ELISA'daki optikal dansite (OD) değerleri %50 - %95 arasında dağılım gösterdiği bulundu. Her iki test arasında iyi bir pozitif korelasyon ($r=0.90$) bulunduğu tesbit edildi. Elde edilen sonuçlar, 10 kez dondurup - çözündürmenin bile serumdaki antikorlar üzerinde önemli bir değişikliğe sebep olmadığını gösterdi.

Anahtar Kelimeler: Dondurup - çözdürme, serum, SNT, ELISA

SUMMARY

In this study, 250 serum samples were obtained from cattle which infected with IBR/IPV virus, in various regions of Turkey. They were tested for IBR/

* Aynı başlık altındaki uzmanlık tezinden özetlenmiştir.

** Etlik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Ankara/Türkiye

Kabul Tarihi, Ağustos 1996

IPV virus antibodies by microneutralization test and ELISA. Two tests were compared for the detection of the proportion of positive sera. In addition to, 44 serum samples selected in 250 serum which tested before. They were frozen/thawed 10 times and tested for effects of freezing thawing on antibody titers in sera by SNT and ELISA. In ELISA 173 of 250 sera were estimated as positive and 77 were negative. For SNT test 170 were positive, 80 were negative. Three of 80 samples were negative for SNT and positive in the ELISA. Using the Chi square method the proportion of positive sera in both tests were $X^2=236$ ($p<0.001$). The relative sensitivity and specificity of ELISA in comparison with the SNT were 100% and 96.25%, respectively. In this study, 40 positive sera of 44 which 10 times frozen/thawed and tested before by ELISA and MN test were found to have 1:1.41 - 1:316 neutralising dose 50 and in ELISA 50%-95% OD values of antibodies. There was a good correlation ($r=0.90$) between ELISA and SNT. The results showed no significant change on antibody levels in sera, even after 10 cycles of freezing and thawing.

Key Words: Freezing - thawing, serum, SNT, ELISA

GİRİŞ

Çoğu zaman serolojik yönden test edilecek serumlar hemen değerlendirmeye alınamayıp, bir süre saklamak zorunda kalınabilir. Özellikle bir serum bankası kurulması durumunda, serumların bir kaç kez dondurulup-çözdürülmesi gerekebilir. Serum bankalarından yalnızca serolojik çalışmalar için değil, diğer iz elementler, mineraller, toksinler, pestisit ve genetik marker'lar yönünden de yararlanılmaktadır (11). Bu amaçla son yıllarda, değişik ısı ve saklama şartlarının serumlar üzerindeki etkisi üzerine çeşitli araştırmalar yapılmıştır (11,12) Yapılan çalışmalar sonunda serolojik yönden test edilecek serumların -20°C 'de saklanması ve -20°C - 25°C 'de su banyosu içinde çözdürmenin en uygun yöntem olduğu ve bu yöntemle tekrarlanan dondurup-çözdürmenin antikor titreleri üzerine olumsuz etkisinin olmadığı bildirilmiştir (3,14).

Bazı araştırmacılar (2,3,12,14) serumları defalarca dondurup-çözdürmenin antikor titreleri üzerine etkisini değerlendirmek amacıyla araştırmalar yapmışlardır. Bu araştırmalarda, dondurup-çözdürmenin antikor titrelerinde istatistiki yönden önemli bir artışa neden olduğunun bildirilmesinin (3,14) yanı sıra, bazı viral etkenlere karşı oluşan antikorların titrelerinde düşüşe neden olduğunu bildiren araştırmalar da mevcuttur (2).

Serumlardaki virusa spesifik antikorların özellikle bu çalışmamızda temel aldığımız Bovine Herpes Virus -1 (BHV-1) virusuna spesifik antikorların

tesbitinde kullanılan en yaygın metodların başında serum nötralizasyon test (SNT) ve enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) gelmektedir (13,15). Bu iki test arasında yapılan karşılaştırmalı çalışmalar ELISA'nın SNT'e göre daha duyarlı olduğunu göstermektedir (4,7).

Bu çalışmada, Infeksiyöz Bovine Rhinotracheitis - Infeksiyöz Pustular Vulvovaginitis (IBR/IPV) etkeni olan BHV-1 virusuna karşı oluşan antikorları içeren serumlarda tekrarlanan dondurup-çözdürmenin antikor titresi üzerine etkisinin SNT ve ELISA ile belirlenmesi hem de IBR yönünden SNT ve ELISA testlerini laboratuvarımız şartlarında karşılaştırılması amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

3.1. Şüpheli serumlar:

Türkiye'nin çeşitli bölgelerinde Etlik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsüne gönderilen çeşitli yaş ve cins grubundan sığır kan serumları kullanıldı. Serumlar serolojik testlere tabi tutulmadan önce 56°C'lik su banyosunda 30 dakika inaktive edildi ve sterilite kontrolünden sonra kullanılmaya kadar -20°C de saklandı. Çözdürme işlemleri her seferinde oda sıcaklığında su banyosunda yapıldı. Test serumlarından birer örnek kontrol için çalışmanın sonuna kadar -20°C'de saklandı.

3.2 Virus:

Mikronötralizasyon testi için BHV-1 -403108 katalog numaralı ED1 suşu kullanıldı. Referens suş Weybridge, İngiltere'den temin edildi.

3.3 Fötal Dana Serumu:

Hücre kültürü vasatında Fetal Calf Serum kullanıldı.

3.4 Hücre kültürü:

Mikronötralizasyon testlerinde kullanmak amacıyla primer dana böbrek (PDB) hücre kültürü hazırlandı (5).

3.5. Vasatlar ve Kimyasal Maddeler:

Hank's vasatı: Kimyasal maddeler karıştırıldıktan sonra filtreden süzüldü ve hücrelerde test edilen bu vasat, mikronötralizasyon testlerinde kullanıldı.

PBS (Phosphate buffer solution): Eritilen ve filtrasyonla sterilize edilen kimyasal maddeler kullanım süresince +4°C'de saklandı.

Tripsin: Maddeler karıştırıldıktan sonra filtrasyonla sterilize edildi ve -20°C'de

muhafaza edildi.

ETDA (Ethylen diamine tetra acatic acid): Maddeler eritildikten sonra 120°C’de 30 dakika otoklavda sterilize edildi ve +4°C’de saklandı.

ELISA Test kitleri: IBR için TRACHITEST enzyme immunoassay (EIA) ticari kiti kullanıldı.

3.6. Virusun üretilmesi:

IBR/IPV virusunun ED1 suşunun üretilmesi için primer dana böbrek hücre kültüründen yararlanıldı.

200 ml’lik hücre kültürü şişesinde üretilen PDB hücre kültürüne, 0.5ml liyofilize stok virusun 0.5 ml steril distile su ile sulandırılarak hazırlanmış şekliyle inokule edildi. 37°C’de 1 saat adsorbsiyon için bekletildi. Bu süre sonunda virus üretme vasatı olarak Hank’s ilave edildi. Inkübasyondan 48-72 saat sonra %80 oranında sitopatolojik değişikliklerin görülmesi üzerine, kültür -80°C’de dondurulup, 37°C’de çözülerek viruslu hücre sıvısı 3000 devirde 30 dakika santrifuj edildi. Üstte kalan viruslu sıvının (süpernatantın) sterilite kontrolu yapılarak 1ml’lik porsiyonlar halinde -80°C’de saklandı.

3.7. Virusun Titrasyonu:

SN testlerinde kullanılacak olan IBR/IPV ‘nin ED1 referens suşunun titresi Frey ve Liess’in (6) bildirdikleri yöntemle göre yapıldı. Elde edilen sonuçların titresi Kaerber (9) metodu ile saptandı.

3.8 Mikronötralizasyon test:

Test Frey ve Liess (6)’nin bildirdiği yöntemle göre yapıldı. Üçüncü gün sonunda CPE’lere göre değerlendirme yapılarak pozitif serumlar tesbit edildi.

3.9. BHV-1 antikorunu içerdigi saptanan serumların nötralizasyon değerlerinin (SN50) saptanması:

Test Frey ve Liess (6)’nin bildirdiği yöntemle göre yapıldı. Serumlardaki antikor titreleri Kaerber yöntemine (9) göre hesaplandı. Bu işlemler 10 kez dondurulup-çözdürme yapılarak tekrarlanırdı.

3.10. IBR ELISA Test:

Ticari bir kit olan bu ELISA kitinde sandwich ELISA tekniği kullanıldı. Test serumlarında pozitif kontrol serumun OD değerinin < %50 değerleri negatif, > %50 değerleri pozitif olarak değerlendirildi.

3.11. İstatistik Değerlendirme:

On kez dondurulup-çözdürülen serumlardaki antikor titre farklılıklarının önemlilik testleri t test ile (1), EPI INFO programı ile bilgisayarda yapıldı. Laboratuvarımız şartlarında SNT ve ELISA arasındaki duyarlılığın karşılaştırılması korelasyon, X² test ile EPI INFO programı ile yapıldı.(1).

BULGULAR

4.1. Virusun üretilmesi:

IBR/IPV virusunun ED1 referens suşu hücre kültüründe yapılan inokulasyondan 48-72 saat sonra karakteristik sitopatik efektler oluşturuldu.

4.2. Virusun Titresi:

Araştırmada kullanılan referens suş PDB hücre kültüründe, mikrotitrasyon yöntemi ile yapılan titrasyonunda, enfektivitesi 3.günün sonunda DKID50=10^{-7.242} / ml olarak belirlendi.

4.3 Mikronötralizasyon Testi ve ELISA ile IBR/IPV antikorlu içeren serumların tesbiti:

Türkiye'nin çeşitli bölgelerinden gelen IBR/IPV yönünden şüpheli 250 adet serum hem Trachitest ELISA hem de mikro nötralizasyon yöntemi ile test edildi ve her iki test ile elde edilen sonuçlar karşılaştırıldı (Tablo 1).

Test edilen 250 adet serumun 173 adedi ELISA'da pozitif sonuç verirken, SNT ile 170 adedi pozitif sonuç verdi (Tablo I). SNT ile negatif sonuç veren 80 serumdan 3 adedi ELISA ile pozitif reaksiyon verdi. Bu çalışmada ELISA ile SNT'de elde edilen değerler arasında iyi bir pozitif korelasyon (r=0.90) bulundu (Tablo II, III). Chi square (x²) metodu kullanılarak her iki testte serumlardaki pozitiflik oranı karşılaştırıldığında (Tablo I) X²=236 (p<0.001) bulunarak iki test arasındaki farkın önemli olmadığı tesbit edildi. SNT standart kabul edilerek laboratuvar şartlarımızda Trachitest ELISA'yı karşılaştırdığımızda relative spesifitesi %96.25, relative sensitivitesi %100 olarak bulundu (Tablo I).

Tablo I. SNT ile ELISA'nın karşılaştırılması.

	SNT pozitif	SNT negatif	Toplam
SNT pozitif	170	3	173
ELISA negatif	0	77	77
Toplam	170	80	250
ELISA'nın relative spesifitesi	77/80=96.25%, relative sensitivitesi		

170/170=100%.

4.4. 10 kez dondurulup- çözdürülen serumların SNT ve ELISA ile

tesbit edilen serum nötralizasyon (SN_{50}), optikal dansite (OD) değerleri:

Daha önce test edilen 250 adet serumdan dondurulup-çözdürmeye devam edilen 44 serumun Tablo II ve Tablo III de görüldüğü gibi, taze iken hem SNT hemde ELISA ile negatif olduğu tesbit edilen 4 adedi, 10 kez dondurup-çözdürme sonunda da negatif sonuç verdi. Başlangıçta pozitif olduğu belirlenen diğer 40 adet serumun SNT ile belirlenen SN_{50} değerleri en düşük 1:1.41, en yüksek 1:316 olarak tesbit edildi. Bu serumların 10 kez yapılan dondurup-çözdürme işlemleri sonunda SN_{50} değerlerinde istatistiki açıdan önemli bir farklılık görülmedi. ELISA ile aynı serumların tesbit edilen OD değerleri Tablo III de görüldüğü gibi pozitif serumlarda en düşük %50, en yüksek %95 olarak tesbit edildi. Tablo III'de görüldüğü gibi 9. ve 10. dondurup çözdürme periyodlarında (*) işaretli 7 adet serumdaki farklılığın istatistiki açıdan önemli olmadığı tesbit edildi. Sonuçta 10 kez dondurup-çözdürmede OD değerlerinde istatistiki açıdan önemli bir farklılık görülmedi.

SONUÇ

Son yıllarda çeşitli ELISA yöntemlerinin getirilmesi araştırmacıları, referens test olarak kabul edilen SNT ile ELISA'yı kendi şartlarında karşılaştırmayı amaçlayan araştırmalara yönlendirmiştir (7,13,15). Yapılan araştırmalar sonunda ELISA'nın SNT'ye göre daha hassas olduğu bildirilmiştir. Bu araştırmada da aynı amaçla Türkiye'nin değişik bölgelerinden IBR/IPV şüpheli sığırlardan toplanan 250 adet kan serumu laboratuvar şartlarında Serum Nötralizasyon Test ve Enzyme Linked Immunosorbent Assay ile karşılaştırmalı olarak test edildi. Her iki test arasında iyi bir pozitif ($r=0.90$) korelasyon olduğu ve SNT referens kabul edilerek ELISA'nın %100 sensitiv, %96.25 spesifik olduğu bulundu. Elde edilen bu sonuçlar diğer araştırmacıların sonuçları ile paralellik göstermektedir. Lyaku ve ark. (10) sığır serumlarında BHV-1 virusuna karşı spesifik antikorları tesbit eden ve miktarlarını belirleyen bir kantitatif ELISA yöntemi geliştirmişler ve bu testi 370 sığır serumunda SNT testi ile karşılaştırmışlardır. IgG ve IgM ELISA yöntemi kullanıldığında sonuçlar %98.3 sensitif ve %94.4 spesifik bulunduğu ve SNT ile arasında ($r=0.86$) iyi bir pozitif korelasyon olduğu bildirilmiştir. Durham ve Sillars (4) IBR spesifik antikorlarını tesbit etmek için 2028 serum test ettiklerini ve sonuçta ELISA'nın absorbans miktarları ile SNT titrelerinin son derece iyi bir korelasyon ($r=0.909$) gösterdiğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada da yukarıda bildirilen araştırma sonuçlarıyla uyum sağlayan sonuçlar elde edildi. 250 adet serumun 173 adedi ELISA'da pozitif sonuç verirken SNT ile 170 adedi pozitif sonuç verdi. SNT ile negatif sonuç veren 80 serumdan 3 adedi ELISA'da pozitif reaksiyon verdi.

Serolojik testlerin duyarlılığının önemi olduğu kadar, bu testlerde kullanılacak olan serumların hangi şartlarda saklandığı, test edilmeden önce gördüğü işlemler ve bunların serumlardaki antikorlar üzerine yaptığı etkilerde önemlidir. Bu çalışmanın diğer amacında dondurup-çözdürmenin serumlardaki antikor seviyeleri üzerine etkisini araştırmaktır. Çalışma sonunda 10 kez uygulanan dondurup çözdürmenin sığır serumlarındaki IBR/IPV spesifik antikorlarının titresi üzerinde SNT ve ELISA istatistiki açıdan önemli bir değişikliğe sebep olmadığı SNT ve ELISA ile belirlenmiştir. Bu çalışmada elde ettiğimiz sonuç bir kısım araştırmacının bulunduğu sonuçlarla paralellik gösterirken diğer bazı araştırmacıların bulduklarından farklıdır. Haines ve ark. (8) kolostrumdaki immunglobulinler üzerine dondurup çözdürmenin etkisini araştırmışlar ve bu amaçla süt örnekleri 8 defa dondurulup çözdürülmüş ve IgG, IgM, IgA seviyelerini single radial immunodiffüzyon tekniği ile ölçmüşlerdir. Test sonuçlarının dondurup çözdürmenin immunglobulinlerin miktarları üzerinde önemli bir değişikliğe neden olmadığını gösterdiğini bildirmişlerdir. Blazevic ve ark. (2) Bovine Leukemia virus spesifik antikorları

üzerine serumda ve inek sütünde dondurup-çözdürmenin ve değişik ısı derecelerinin etkisini araştırmışlardır. Sonuçta tekrarlanan dondurup çözdürme ve yüksek ısı uygulamanın serumdaki antikor seviyesinde önemli bir düşüşe neden olduğu bildirilmiştir. Cecchini ve ark. (3) tekrarlanan dondurup çözdürmenin serumdaki antikorların aktivitesi üzerine olan etkisini IBR/IPV ve Brucella spesifik antikorları üzerinde araştırmışlardır. Antikor içeren serumlar 22 defa dondurulup çözdürülmek suretiyle ELISA ile test etmişler ve 3 serumda IBR yönünden titrede artış tesbit ettiklerini, Brucella yönünden ise önemli bir farklılık olmadığını bildirmişlerdir. Roche ve Edwards (14) Pestivirus spesifik antikorlarını içeren serumlarda dondurup çözdürmenin etkisini SNT ve ELISA test ile araştırmışlardır. Test edilen serumların %9'unda dondurup çözdürmenin nötralizan antikor titresinde 4 katı bir artışa neden olduğu ve seronegatif serumlardan birinde de seropozitiflik tesbit ettiklerini bildirmişlerdir. Araştırmacılar artan bu nötralizasyon kapasitesinin nednini, dondurup çözdürmenin etkisiyle immunkompleks sistemin parçalanmasına bağlamışlardır. Araştırmamızda da 9. ve 10. dondurup çözdürme periyodunda ELISA ile 7 serumda istatistiki açıdan önemli olmayan bir artış tesbit edilmiştir. Bu önemli olmayan farklı sonuçlar testin uygulamasında kabul edilen %5'lik hata payına bağlanabilir.

Sonuç olarak -20°C'de uygun şartlarda saklanıp, oda sıcaklığında su banyosu içinde çözdürülmek suretiyle, 10 kez dondurup çözdürmenin serumlardaki antikor titreleri üzerine olumsuz bir etkisinin olmadığı araştırmamız sonucunda da ortaya konulmuştur. Bir serum bankası kurulması durumunda, viral etkenlerin serolojik çalışmaları yönünden bu serum bankaları güvenle kullanılabilir. Çalışmamızın diğer bölümünde %100 sensitiv ve %96.25 spesifik olarak tesbit ettiğimiz ELISA testinin özellikle survey çalışmaları ve çok sayıdaki serum örneklerinde SNT'ye alternatif olarak kullanılması hem ekonomik açıdan hemde zaman kazanmak açısından yararlı olacaktır.

KAYNAKLAR

1. **BAILEY, N.T.J.** (1981): Statistical methods in biology. Second Edition Nourthumberland Press Ltd. London.
2. **BLAZEVIC, A.; CAJAVEC, S.; LOJKIC, M.; ERGOTIC, N.; SLODIC, D.**(1994): The stability of antibodies to bovine leukemia virus in milk and blood sera. Veterinarski Archiv. 64:1-3, 19-26.
3. **CECCHINI, G.; BEKELE, T.; KASALI, O.B.**(1992): The effect of repeated freezing and thawing of serum on the activity of antibodies. Vet. Res. Com. 16(6): 425-428.
4. **DURHAM, P.J.K. ; SILLARS, H.M.** (1986) : Evaluation of an enzyme - linked immunosorbent assay (ELISA) for sero diagnosis of infectious bovine rhinotracheitis infection, with results of a preliminary survey. New-Zeland. Vet.Jour., 34(3):27-30.
5. **FREY, H.R.; LIESS, B.** (1971): Vermehrungskinetik und verwendbarkeit einer stark zytopatogenen VD -MD virusstammes für diagnostische untersuchungen mit der mikrotiter methode. Zbl. Vet.Med., 18:61-71.
6. **FRESHNEY, I.R.**(1983): Cultures of Animal Cells. 2. Edition. Alan, R.Liss.Inc., NewYork.
7. **GÜRHAN, B.; ŞENEL, E.; DAKILIR, G.; ÖZTÜRMEH, H.**(1994): Şap aşılı sığırlarda mikro nötralizasyon ve ELISA ile antikör düzeylerinin saptanması. Etlik Vet.Mikr. Derg., 7(5): 99-109.
8. **HAINES, D.M.; CHELACK, B.J.; RADOSTITS, O.** (1992): Freezing -thawing does not adversely effect immunoglobulin levels in colostrum. Can. Vet. Jour., 33(6): 355-356.
9. **KAERBER, G.**(1964) : In diagnostic procedures for virus and rickettsial disease. Public Health Ass. (New York), 3:48-50.
10. **LYAKU, J.R.S.; NETTLETON, P.F.; SCOTT, G.R.** (1990): A quantitative enzyme- linked immunosorbent assay for bovine herpes virus type-1(BHV-1) antibody. Biologicals, 18(3): 199-205.
11. **MOORHOUSE, P.D.; HUGH - JONES, M.E.** (1982): The results of retesting bovine sera stored at -18°C for twenty years with lessons for future serum banks. Vet. Bull. 4:260-265.

12. **PASCUAL, D.W.; CLEM, L.W.** (1992): An effective procedure for mouse Ig M (F(ab)2 fragment production. *Jour. of Immun. Meth.*, 146:249-255.

13. **RATTAN, B.; SHARMA, B.; SHANKAR, H.**(1992): Comparative evaluation of enhanced serum neutralization test and ELISA for detection of bovine herpesvirus -1 antibody in cattle. *Indian J. of Vir.*, 8(1): 4-7.

14. **ROCHE, P.M.; EDWARDS, S.** (1992): Effect of multiple freezing/thawing on sera from the offspring of pestivirus - infected sows. Second symposium on pestiviruses 1-3 october 1992, France.

15. **TRYBALA, E. ; WISKIEWSKI, J.; KALICKI, M.** (1992); Evaluation of three serological tests and skin test to diagnose IBR-IPV virus infections in cattle. *Medycyna Weterynaryjna.* 48 (8): 345-347.