

## SİĞİR VEBASI ŞÜPHELİ BUZAĞILARDAN VİRUS İZOLASYONU

Feridun Öztürk<sup>1</sup>

Sibel Yavru<sup>2</sup>

Atilla Şimşek<sup>3</sup>

Hüdaverdi Erer<sup>4</sup>

### A Virus Isolation From Rinderpest Suspected Calves

**Summary :** A highly lethal disease, suspected of, resembling Rinderpest, was diagnosed as a result of clinical and pathological examinations, in calves, in October 1991. in Konya.

Total of 9 specimens, including 2 mesenterial lymph nodes, 2 spleens, 2 buffy coat samples and 3 nasal swaps was obtained for virology testing from Rinderpest suspected calves.

The inoculation of specimens to Foetal Calf Kidney (FCK) cell cultures, showed that, 4 of the specimens of the 2 mesenterial lymph nodes and 2 nasal swaps was positive for cytopathologic effect (CPE).

The histopathologic examination of specimens with CPE in cell cultures, revealed intrastoplasmic and intranuclear inclusion bodies.

**Özet :** Konya Bölgesinde 1991 yılının Ekim ayında buzağılar arasında yüksek düzeyde ölümle seyreden, klinik ve patolojik olarak sığır vebasından şüpheli bir hastalık görülmeye başlandı.

Virolojik muayene amacıyla hasta buzağılardan 2 adet mezenteriyal lenf yumrusu, 2 adet dalak, 2 lökosit örneği ve 3 adet de nasal swap olmak üzere toplam 9 materyalin, fetal dana böbrek (FDB) hücre kültürlerine yapılan inokulasyonlarında numunelerin 4 adedinde (iki adet nasal swap ve iki adet mezenteriyal lenf yumrusu) sitopatolojik efekt (CPE) gözlemlendi. CPE oluşturan numunelerin hücre kültürlerindeki histopatolojik incelemelerinde intrastoplazmik ve intranükleer inklüzyon cisimcikleri oluşturduğu saptandı.

#### Giriş

Sığır vebası ruminantlara özgü, kontagiyöz, ateşli, akut yada subakut seyirli, sindirim ve solunum sistemindeki mukozaların nekrozu, erozyonu ve kanlı ishale karakterize, mortalite oranı yüksek, sistemik bir hastalıktır. Ölüm, genellikle dehidrasyon sonucu şekillenen genel kondüsyon kaybından

oluşur. Yüksek mortaliteye bağlı olarak çok büyük ekonomik kayıplara neden olur (4, 11).

Sığır vebası etkeninin bir virus olduğu ilk olarak Nicolle ve Adil Bey tarafından tespit edilmiştir (17).

Antijenik olarak stabil olan etken Paramyxoviridae familyasının morbillivirus cinsi içinde yer alır ve tek tiptir. Sığır vebası virusunun, kızamık (Measles) ve köpeklerin gençlik hastalığı (Canine Distemper) virusları ile immunolojik olarak yakınlığı vardır (3, 8, 32).

Sığır vebası virusu dayanıksız bir virus olup, konakçı dışında yüksek-düşük pH ve ısı değerlerinde, güneş ışığında ve % 50-60 nemli ortamlarda hızla inaktive olur (4, 11, 24).

Virion pleomorfik, yuvarlak ve zarlıdır. Genellikle 100-150 nm çapında veya uzun flemantöz formdadır. Tek sarmallı RNA içeren virionda nükleokapsid 18 nm çapında ve helikal simetrik yapıya sahiptir. Virus yüzeyi, lipoprotein tabiatında, ışınal çıkıntıları bulunan bir zar ile çevrilmiştir (4, 11, 21).

Sığır vebası virusu sığır, koyun, keçi, tavuk embriyosu, domuz, hamster, köpek ve insan hücre kültürlerinde syncytial hücre oluşumu, intrastoplazmik ve intranükleer asidofilik inklüzyon cisimciği ile karakterize CPE yaparak çoğalır (1, 14, 26, 28, 29, 30, 31).

Fötal dana böbrek hücre kültürleri etkene en duyarlı hücre kültürleridir (16). Devamlı hücre kültürlerinden en yaygın olarak kullanılanı ise Vero (African Green Monkey), MDBK (Madine Darby Bovine Kidney) ve Hela hücre kültürleridir (7, 9, 16, 19, 21, 26).

Sığır vebası virusunun (Kabeta "O" suşu ile) doku kültürlerinde meydana getirdiği sitopatolojik

1. Prof. Dr., S.Ü. Veteriner Fakültesi Viroloji Bilim Dalı.

2. Yrd. Doç. Dr. S.Ü. Veteriner Fakültesi Viroloji Bilim Dalı.

3. Araş.Gör. S.Ü. Veteriner Fakültesi Viroloji Bilim Dalı.

4. Prof. Dr., S.Ü. Veteriner Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı.

bozukluklar ilk defa 1957 yılında Plowright ve Ferris (20) tarafından incelenmiştir. Bu araştırmacılar, virusun yedinci pasajından dana böbrek hücre kültürlerine yapmış oldukları ekimlerden 3-4 gün sonra, hücrelerde bozuklukların meydana geldiğini, onikinci günde virusun etkisiyle hücrelerin hepsinin dö-küldüğünü saptamışlardır. Ayrıca hücre kültürlerinde sığır vebası virusunun, kızamık ve kabakulak vi-rusları gibi intranükleer ve intrastoplazmik inklüzyon cisimcikleri oluşturduğunu belirtmişlerdir.

Liess (12, 13) sığır vebası virusunun Kabeta "O" suşunu Hela hücresinde üretmiş ve aynen dana böbreğinden hazırlanmış hücre kültürlerinde olduğu gibi CPE (sitopatolojik efekt) ve intrastoplazmik ve intranükleer inklüzyon cisimcikleri şekillendirdiğini gözlemiştir.

Sığır vebası enfeksiyonunun varlığı ve yaygınlığı daha çok serolojik yöntemlerle saptanmaktadır (22, 23, 25, 26).

Darbyshire (2) sığır vebasını mukozal has-talıklardan ayırt etmek için agar jel diffüzyon metodunun uygun bir test olduğunu bildirmiştir.

Liess ve Plowright (15) deneysel olarak oluş-turdukları sığır vebası enfeksiyonlarında kuluçka süresinin 3-5 gün, kontakt enfeksiyonlarında 8-11 gün olduğunu; derece yükselmesinin 2. günü ile 9. günleri arasında burun akıntısından, hastalığın 1-8. günleri arasında idrardan ve 3. günden itibaren de gaitadan virusun izole edilebildiğini sap-tamışlardır.

Gürtürk ve ark. (5) Türkiye'nin çeşitli böl-gelerinden sağlanan 1012 adet sığır kan serumunu sığır vebasına karşı mikronötralizasyon testi ile kontrol etmişler ve 464 adet serumun pozitif ol-duğunu bildirmişlerdir.

Gürtürk ve ark. (6) IBR virusuna karşı nötralizan antikor yönünden pozitif olan sığırlarda sığır vebası aşısının daha yüksek titrede antikor oluşturduğunu yaptıkları nötralizasyon testiyle belirlemişlerdir.

Bu çalışma, buzağılarda görülen, klinik ve patolojik olarak sığır vebasından şüpheli hastalığın teşhisini, etken izolasyonu ile desteklemek amacıyla yapılmıştır.

## Materyal ve Metot

Konya bölgesinde 1991 yılı Ekim ayında sı-ğırlarda klinik olarak sığır vebasından şüpheli bir salgın hastalık görülmeye başlaması ve S.Ü. Veteriner Fakültesine 10 Ekim 1991 tarihinde Konya'nın Saraçoğlu Mahallesinde bir besicilik ünitesinde buzağılarda yüksek düzeyde ölümlerle seyreden bir hastalık başvurusu üzerine ilgili Bilim Dalı uzmanları tarafından hastalık sahada göz-lemelendi. Klinik ve patolojik olarak hastalığın sığır vebasına çok benzediği görüldü. Etken izolasyonu amacıyla gerekli numuneler alınarak laboratuvar incelemelerine başlandı.

1. Klinik numuneler : Virolojik muayene amacıyla hastalıktan şüpheli 40 başlık bir sürünün içinden 4 buzağı seçilerek 2'sinden antikoagulanlı tüp içine kan örneği, burun akıntısı bulunan 3'ünden steril şartlarda nasal swap alındı. Ölen hayvanlardan 2'sinden otopsi yapılarak 2 adet dalak ve 2 adet mezenteriyal lenf yumruları toplandı. Böylece araştırma materyalini hastalıklı ve ölen hayvanlardan alınan toplam 9 numune oluşturdu.

### 1.1. Klinik numunelerin hazırlanması :

1.1.1. Nasal swap : Steril şartlarda alınan swap, antibiyotikli PBS içinde laboratuvara getirildi. Üçbin devirde 30 dakika santrifüjden sonra antibiyotik ilave edilerek sterilite kontrolü yapıldı ve kul-lanılincaya kadar -80 C° de dondurularak sak-landı.

1.1.2. Kan : Antikoagulanlı (EDTA) tüpe\* alınan kan (2000) devirde 10 dakika santrifüj edildi. Lökosit tabakası pastör pipeti ile alınarak, üç kez PBS ile yıkandı. PBS ile sulandırıldıktan sonra sterilite kontrolü yapıldı. DMSO (Dimetilsülfoksit), fetal dana serumu ve antibiyotik ilave edilerek, kullanılincaya kadar -80 C°de saklandı.

1.1.3. Mezenteriyal lenf yumrusu : Steril şartlarda alınan lenf yumrusu, homojenizatörde\*\*, homojenize edildikten sonra, santrifüj edildi. Üstteki sıvıya konsantre antibiyotik ilave edilerek sterilite kontrolü yapıldı. Hazırlanan numuneler hücre kültürlerine inokule edilinceye kadar -80 C°de saklandı.

1.1.4. Dalak : Mezenteriyal lenf yumrusunda olduğu gibi hazırlandı. Sterilite kontrolü yapıldıktan sonra kullanılincaya kadar -80 C°de saklandı.

### 2. Hücre kültürü : Konya Et ve Balık Kurumu

Mezbahasında kesilen sığırlardan alınan fötuslar, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Bilim Dalı laboratuvarına getirildi. Steril şartlarda fötusların böbrekleri alınarak tripsinleme metodu ile FDB (föetal dana böbrek) hücre kültürü hazırlandı. Hücre üretme vasatı olarak Eagle MEM (Minimum Essential Medium) kullanıldı.

3. Virus izolasyonu için klinik numunelerin doku kültürlerine inokulasyonu :

Virus izolasyonu amacıyla hazırlanan bütün numuneler, FDB hücre kültürlerinde 5 kez pasajlandı.

Bu amaçla her bir materyal için iki adet doku kültürü tüpüne 2 ml. FDB hücre süspansiyonu (300.000 hücre/ml) konularak 37 C°'de 2 gün inkube edildi. Hücre yüzeyleri 37 C°'de ısıtılmış PBS ile yıkandıktan sonra izolasyon materyallerinden 0.2 ml miktarında inokule edilerek, 37 C°'de 1 saat adsorbsiyona bırakıldı. Adsorbsiyondan sonra hücre yüzeyleri PBS ile yıkanarak üzerlerine 2 ml virus üretme vasatı (Eagle MEM) kondu. Hücre kültürleri 7 gün süreyle 37 C°'de inkubasyona bırakıldı ve her gün CPE yönünden kontrol edildi. CPE'nin görülmediği durumlarda numuneler taze hücre kültürlerinde tekrar pasajlandı.

4. Inklüzyon cisimciğinin aranması : FDB hücre kültürleri çapı 30 mm. olan ufak petri kutularına konulan 20x20 mm büyüklüğündeki lamellerde hazırlandı. Lamellerde istenilen hücre kültürü üremesi sağlandıktan sonra, numunelerden izole edilen viruslar inokule edildi. İnokulasyondan sonra sıra ile 2., 3., 4. ve 5. günlerde alınan lameller Bouin's solusyonu ile tespit edilerek Hemotoksilen-Eozin ile boyandı. Hazırlanan preparatlar Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji laboratuvarında inklüzyon cisimciği yönünden araştırıldı.

### Bulgular

Klinik olarak sığır vebası semptomu gösteren buzağılardan alınan 2 adet mezenteriyal lenf yumrusu, 2 adet dalak, 2 lökosit örneği ve 3 adet de nasal swap olmak üzere toplam 9 materyalin, FDB hücre kültürlerine yapılan ekimlerinde, numunelerin 4 tanesinde CPE gözlemlendi (Resim 1 - A,B,C,D,E).

CPE gözlenen materyallerin ikisi mezenteriyal

lenf yumrusuna, diğer ikisi ise nasal swap numunelerine aitti.

Virus izole edilen mezenteriyal lenf yumrularının birinde 3. pasaj ikinci günde, diğerinde ise 3. pasaj dördüncü günde ve 2 adet nasal swap'ın birinde 2. pasaj beşinci günde, diğerinde ise 2. pasaj dördüncü günde ilk kez CPE tespit edildi (Tablo 1).

Patoloji laboratuvarında, virus inokule edilen hücre kültürlerinden 2., 3., 4., ve 5. günlerde hazırlanan ve Hemotoksilen Eozin ile boyanan hücre kültürü preparatlarında, sığır vebası virusunun tipik özelliklerinden olan intrastoplazmik ve intranükleer inklüzyon cisimcikleri 3. günden itibaren gözlemlendi (Resim 1-F).

Tablo 1. Doku kültürlerinde gözlenen CPE.

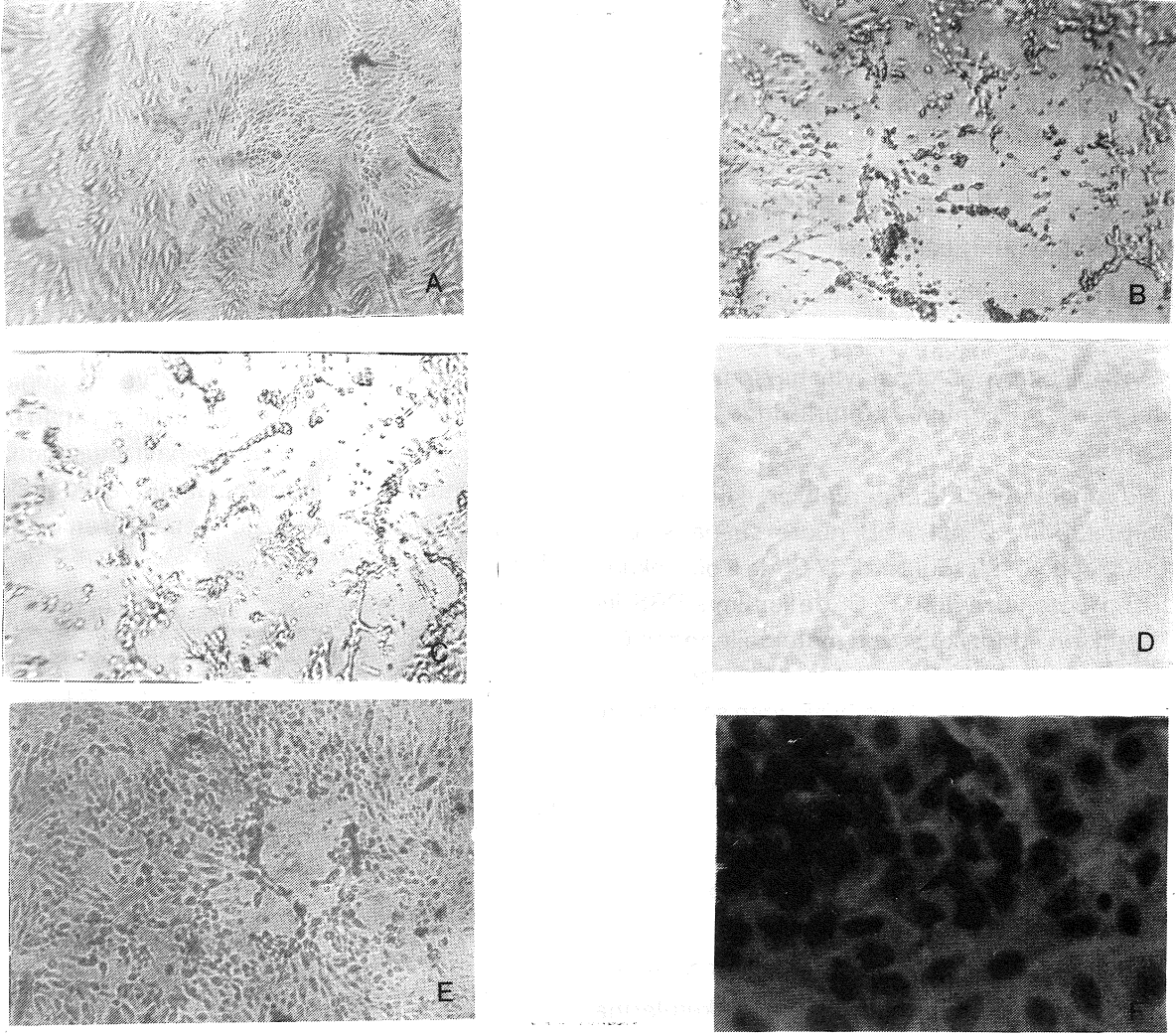
	FDB hücre kültürlerinde gözlenen CPE				
	1. p*	2. p	3. p	4. p	5. p
Nasal swap (1)	-	-	-	-	-
Nasal swap (2)	±	+	+	+	+
		5.gün	4.gün	3.gün	3.gün
Nasal swap (3)	-	+	+	+	+
		4.gün	4.gün	4.gün	3.gün
Lökosit (1)	-	-	-	-	-
Lökosit (2)	-	-	-	-	-
Mezenteriyal lenf yumrusu (1)	-	-	+	+	+
			2.gün	2.gün	2.gün
Mezenteriyal lenf yumrusu (2)	-	-	+	+	+
			4.gün	4.gün	3.gün
Dalak (1)	-	-	-	-	-
Dalak (2)	-	-	-	-	-

\* p : Pasaj

### Tartışma ve Sonuç

Sığır vebası özellikle sığır ve mandaların akut bulaşıcı bir hastalığıdır. Başlangıçta yüksek ateş, kanlı ishal, sindirim kanalında dejeneratif değişikliklerle karakterizedir. Paramyxovirus grubundan olan etken *in vivo* ve *in vitro* olarak syncytial hücreler ve inklüzyon cisimcikleri meydana getirir (10,14,15,19).

Doku kültürleri üzerinde yapılan çalışmalarda birçok fötal, primer ve devamlı hücre kültürlerinin sığır vebası virusuna karşı hassas olduğu bildirilmiştir (7, 9, 16, 19, 21, 26). Ancak bunlar arasında FDB hücre kültürünün daha duyarlı olduğu bildirilmiştir (15). FDB hücre kültürlerinde, numunelerin inokulasyonundan sonra gözlenen CPE, bu hücre kültürünün hassasiyetini tespit eden araştırmacıları (16, 19, 21) doğrular niteliktedir.



Şekil1-A. FDB hücre kültürü.

- B. FDB hücre kültürüne inokule edilen 1 nolu mezenteriyel lenf yumrusunun oluşturduğu CPE'nin görünüşü.  
C. FDB hücre kültürüne inokule edilen 2 nolu mezenteriyel lenf yumrusunun oluşturduğu CPE'nin görünüşü.  
D. FDB hücre kültürüne inokule edilen 1 nolu nasal swap'ın oluşturduğu CPE'nin görünüşü.  
E. FDB hücre kültürüne inokule edilen 2 nolu nasal swap'ın oluşturduğu CPE'nin görünüşü (x200).  
F. İzolatların FDB hücre kültüründe oluşturduğu intrastoplazmik ve intranükleer inklüzyon cisimcikleri (x400)

FDB hücre kültüründe sığır vebası virusunun meydana getirdiği değişiklikleri inceleyen araştırmacılar, CPE'nin inokulasyondan sonra 2. günde başladığını ve tüm hücrelerin nekrozuna kadar devam ettiğini bildirmektedirler (18, 27, 29). Bu çalışmada ise klinik olarak hastalığın tipik semptomlarını gösteren hayvanlardan kan ve burun akıntısı, ölen hayvanlardan ise mezenteriyel lenf yumrusu ve dalak olmak üzere 9 adet numune alınmıştır. FDB hücre kültürlerine inokule edilen bu numunelerden 4 adet virus izole edilmiştir. İnokulasyondan sonra hücre kültürlerinde CPE'nin oluşum günleri yukarıda belirtilen araştırmacılar ile paralellik göstermektedir.

Yapılan çalışmalar, tüm paramyxovirusların asidofilik intrastoplazmik inklüzyon cisimciği oluşturduğunu, bunun yanında sığır vebası, köpeklerin gençlik hastalığı, kızamık viruslarının ayrıca intranükleer inklüzyon cisimciği de meydana getirdiğini belirtmektedir (18, 28, 30, 31).

Plowright-(18) ve Ushijima ve ark. (29) doku kültürlerinde yaptıkları çalışmalarda sığır vebası virusunun inokulasyonundan 2 gün sonra CPE ve intrastoplazmik inklüzyon, 3 gün sonra ise intranükleer inklüzyon cisimciği oluşturduğunu gözlemlemişlerdir. Bu çalışmada FDB hücre kültürlerinde gözlenen asidofilik intrastoplazmik ve intranükleer inklüzyon cisimciklerinin oluşum günleri

yukarıdaki araştırmacıların (18, 29) bulgularıyla paralellik göstermektedir.

Sığır vebası hastalığının hızlı seyri, tipik klinik semptomları ve çabucak gelişen ölüm olayları nedeniyle hücre kültürlerinde virus izolasyonu çalışmalarına çok fazla önem verilmemiştir. Sığır vebası enfeksiyonunun varlığı ve yaygınlığı çoğunlukla nötralizasyon ve agar gel presipitasyon testleri ile indirekt olarak tespit edilmiştir (22, 23, 25). Bagdady ve ark. (1), klinik ve patolojik bulguların hastalığın teşhisi için yeterli olmadığını, ancak serolojik ve virolojik muayenelerden sonra "Sığır Vebası" teşhisi konulabileceğini ifade etmektedirler. Sunulan bu çalışma, buzağılarda görülen, klinik ve patolojik olarak sığır vebasına çok benzeyen bu hastalığın, etken izolasyonu ile, sığır vebası virusu tarafından meydana getirildiği ihtimalini ortaya koymuştur.

#### Kaynaklar

- 1-Bagdady, M., Ilchmann, M.M. und Liebisch, A. (1971). Die Rinderpest im Nahen Osten 1970. Mhefte, fur Vet. Med., 26, 269-272.
- 2-Darbyshire, J.H. (1961) A serological differentiation of rinderpest and bovine mucosal disease by agar gel diffusion. Vet. Rec., 73, 255-256.
- 3-Delay, P.D., Stone, S.S., Karzon, D.T., Katz, S. and Enders, J. (1965). Clinical and immun response of alien hosts to inoculation with measles, rinderpest and canine distemper viruses. Am. J. Vet. Res., 26, 1359-1373.
- 4-Fenner, F., Bachman, P.A., Gibbs, E.P.J., Murphy, F.A., Studdert, M.J. and White, D.O. (1987). Veterinary Virology. Academic Press. Inc. (London) LTD.
- 5-Gürtürk, S., Finci, E. ve Burgu, İ. (1974). Yurdumuz sığırlarında sığır vebası üzerinde araştırmalar. A.Ü. Vet. Fak. Derg., XXI, 1-2, 101-113.
- 6-Gürtürk, S., Finci, E. ve Burgu, İ. (1975). Yurdumuz sığırlarında sığır vebası üzerine araştırmalar. Fırat Üniv. Vet. Fak. Derg., 2, 261-267.
- 7-Imagawa, D.T. (1965). Preparation of rinderpest virus in suckling mice and its comparison to murine adapted strains of measles and distemper. Arch. ges. Virusforsch., 17, 203-215.
- 8-Imagawa, D.T., Goret, P. and Adams, J.M. (1960). Immunological relationship of measles, distemper and rinderpest viruses. Proc. Nat. Acad. Sci., 46, 1118-1123.
- 9-Isogai, S. (1960). Pathogenicity of rinderpest virus, original and attenuated, in various tissue cultures. J. Jap. Ass. Infect. Dis., 35, 417-432.
- 10-Jubb, K.V.F. and Kennedy, P.C. (1970). Pathology of domestic animals. II. ed., vol. 2, Academic Press, New York.
- 11-Kahrs, R.F. (1986). Viral Disease of Cattle. The Iowa State University Press/Ames, Iowa.
- 12-Liess, B. (1965 a). Untersuchungen über das Virus der Rinderpest unter Verwendung von Zellkulturen. Arch. Exp. Vet. Med., 20, 157-202.
- 13-Liess, B. (1965 b). Untersuchungen über das virus der rinderpest unter Verwendung von Zellkulturen. Arch. Exp. Vet. Med., 20, 203-257.
- 14-Liess, B. und Bogel, K. (1969). Rinderpest, Virusdiarrhoe Mucosal Disease, Bosartiges Katarrhalfieber-Differential diagnostische Molichkeiten. Dtsch. Tierarztl. Wschr., 76, 138-141.
- 15-Liess, B. and Plowright, W. (1964 a). Studies on the pathogenesis of rinderpest in experimental cattle. J. Hyg. Camb., 62, 81-100.
- 16-Liess, B. and Plowright, W. (1964 b). The propagation and growth characteristics of rinderpest virus in HeLa cells. Arch. ges. Virusforsch., 14, 27-38.
- 17-Nicolle, M. et Adil Bey (1902). Etudes sur la peste bovine. Experiences sur la filtration. Ann. Inst. Pasteur., 16, 56-64.
- 18-Plowright, W. (1964 a). Rinderpest virus. Ann. N.Y. Acad. Sci., 101, 548-563.
- 19-Plowright, W. (1964 b). Studies on the pathogenesis of rinderpest in experimental cattle. J. Hyg. Camb., 62, 257-281.
- 20-Plowright, W and Ferris, R.D. (1957). Cytopathogenicity of rinderpest virus in tissue culture. Nature., 179, 316-336.
- 21-Plowright, W. and Ferris, R.D. (1959). Studies with rinderpest virus in tissue culture. I. Growth and Cytopathogenicity. J. Comp. Path., 69, 152-172.
- 22-Rossiter, P.B. and Jessett, D.M. (1982 a). Neutralising antibodies to rinderpest virus in sheep and goats in Western Kenya. Vet. Rec., 111, 504-505.
- 23-Rossiter, P.B. and Jessett, D.M. (1982 b). Microtitre techniques for the assay of rinderpest virus and neutralising antibody. Res. Vet. Sci., 32, 253-256.
- 24-Serter, F. ve Serter, D. (1986). Klinik Viroloji. Ege Üniversitesi Basım Evi, Bornova, İzmir.
- 25-Shanthikumar, S.R. and Atilola, M.A.LO. (1990). Outbreaks of rinderpest in wild and domestic animals in Nigeria. Vet. Rec., 126, 306-307.
- 26-Singh, K.V. and ElCicy, I.F. (1966). Comparative cytopathology of rinderpest and bovine parainfluenza 3 viruses in cell cultures. Nature, 211, 314-315.
- 27-Tajima, M., Motahashi, T., Kishi S. and Nakamura, J. (1971). A comparative electron microscopic study on the morphogenesis of canine distemper and rinderpest viruses. Jap. J. Vet. Sci., 33, 1-10.
- 28-Thiery, G. (1956). Hemalogie, Histopathologie et histochemie de la peste bovine. Rev. Elev., 9, 117-139.
- 29-Ushijima, T., Tajima, M. and Kishi S. (1969). Observations on cultured cell infected with rinderpest virus by means of fluorescen antibody technic. Jap. J. Vet. Sci., 31, 43-49.
- 30-Warren, J. (1960). The relationship of the viruses of measles, canine distemper and rinderpest. Advances Virus Res., 7, 27-60.
- 31-Watson, A.P. (1965). Measles virus. Arch. ges. Virusforschung., 16, 57-80.
- 32-Watson, A.P., Rott, R. and Enders, R.G. (1963). The components of measles virus and their relation to rinderpest and distemper. Naturforsch., 18, 377-384.