

**1969 - 1970 DE DOMUZ BÖBREĞİ EPİTEL HÜCRE KÜLTÜRÜNDE
İZOLE VE İDANTİFİYE EDİLEN «RHİNOPNEUMONİTİS
VİRUSU»**

Dr. Salih YILMAZ (*)

Kısırak abort virusunun doku kültüründe üretilebileceğinden ilk defa Randall, C.C ve mesai arkadaşları (9) bahsetmişlerdir. Kawakami ve arkadaşları (6) virusun; domuz, keçi, ada tavşanı ve embryonal sığır böbreği hücre kültürlerinde, Mc Collum ve mesai arkadaşları (7) adı geçen virusun en iyi olarak domuz, at ve koyun böbreği epitel hücre kültürlerinde, Girar ve arkadaşları (4) yukarıdaki araştırmacıları teyid eder mahiyette bu virusun üretilmesinde domuz, sığır koyun ve ada tavşanı böbrekləri hücre kültürlerinden çok iyi sonuç aldıklarını bildirmişlerdir.

Müteakip yıllarda Rhinopneumonitis virusu birçok memlekette yukarıda adı geçen hücre kültürlerinde izole ve idantifiye edilmiştir.

Kısırakların viral abortüsünden yurdumuzda ilk defa İyigören, B ve Yılmaz, S. (5); Karacabey harasında sıkıt yapan kısırakların fötal organlardaki bulgulara ve yavru atan kısırakların Macaristana virüsü kısırak abortüsü yönünden muayene edilmek üzere gönderilen kan serumlarından aldıkları müsbet sonuçlardan Tarım Bakanlığına sundukları müşterek raporda bahsetmişlerdir. Bunu müteakip Doğuer, M., S. Yılmaz ve N. Yalım (3) Karacabey harasından gönderilen fötal organlardan yaptıkları suspensiyonları deney hayvanlarına inoküle etmek suretiyle endirekt yolla virusun varlığının isbatlandığını, Yurdumuzda virusun doku kültüründe

(*) Etlik Vet. Kont. ve Araşt. Enst. Viral Abortuslar Lâb. Şefi

izolasyonundan ilk defa Başkaya, H. ve mesai arkadaşları (1) söz etmişlerdir.

M A T E R Y A L V E M E T O D

1 — 1969-1970 doğum sezonu içinde Karacabey harasında yavru atan kısırakların fütal organları,

2 — Sıkıt yapan kısıraklardan gönderilen kan serumları,

3 — Virolojik çalışmalarda bilhassa domuz ve mukayese içinde kuzu, koyun böbreği epitel hücre kültürleri, kullanılmıştır.

4 — Serolojik test olarak Komplement - fixasyon ve Neutralizasyon metodlarından istifade edilmiştir.

5 — Gerek domuz ve gerekse koyun böbreği epitel hücre kültürlerinin hazırlanmasında Younger (10) tarafından pratiğe aktarılan ve daha sonra Bodian (2) adındaki araştırmacının modifiye ederek geliştirdiği metoddan yararlanılmıştır.

Hücrelerin üretiminde dengeli % 10 dana sorumlu Hank's solusyonu ile E.Y.L. vasatı, virus izolasyonunda ise serumsuz olanları kullanılmıştır.

Doku kültürlerindeki hücre suspansiyonu yoğunluğu «Fuchs Rosenthal» lamında hücrelerin boyanması suretiyle ayarlanmış olup;

a) Domuz böbreği hücre kültürlerinde beher ml. vasata 400.000 adet,

b) Kuzu ve koyun böbreği hücre kültürlerine ise 800.000 adet hücre beher ml. vasata isabet edecek şekilde hücre sedimenti sulandırılmıştır.

Karacabey harasında 1969-1970 doğum sezonunda sıkıt yapan kısırakların fütal organlarından Enstitümüz Patoloji laboratuvarında yaptırılan histopatolojik muayenelerde (Karaciğer ve dalaklar) 9.1.1970 tarih, 43/27; 2.2.1970 gün, 43/63; 17.3.1970 gün, 98/79 ve 7.4.1970 tarih 121/103 sayılı raporları ile viral bir etkenin mevcut olduğu bildirilmiştir. Bunun üzerine mevcut marazi maddelerden virus izolasyonu için domuz böbreği epitel hücre kültürlerinde virolojik araştırmaya girişilmiştir.

Marazi maddelerden suspensiyon hazırlama tekniği :

1 — Fötal organlardan (karaciğer, dalak) tartmak suretiyle belli bir miktar alındı ve Ultraturax'da homojen bir madde haline getirildi,

2 — Elde edilen homojen madde 1 : 10 oranında PBS eriyiği ile sulandırılarak bir suspensiyon hazırlandı,

3 — Marazi madde suspensiyonu 20 dakika 3000 devirde soğutucu santrifüjde çevrildi,

4 — Üstte toplanan berrak kısımdan belli bir miktar alınarak beher ml. için 2000 ünite penicillin ve 2 mgr. streptomycin katıldı ve 30 dakika oda derecesinde bırakıldı.

Antibiotiklenen Marazi madde suspensiyonundan Domuz böbreği Epitel hücre kültürüne ekim tekniği :

1 — Kültür kaplarındaki hücre üretme veya idame besin vasatları steril şartlarda boşaltılarak uzaklaştırıldı ve hücre kültürleri PBS ile yıkandılar,

2 — Antibiotikli marazi madde suspensiyonundan % 1 oranda kültür kaplarına ekim yapılarak, hücreler üzerinde iyice yaydırıldı ve 2-3 dakika oda derecesinde tutuldular,

3 — Bu müddetin bitiminde % 2 dana serumlu pH; 7,4-7,5 olan dengeli Earle vasatı katılarak 2 saat 37°C lik etüvde adsorpsiyona terkedildi,

4-2 saatlik adsorpsiyon süresi bitiminde kültür kaplarının içindeki vasatların tamamı boşaltılarak yeniden virus üretme vasat konarak kültür kapları 37°C lik etüve kaldırıldı.

Ekim yapılan kültür kapları hergün kontrol edilmiş olup virus izolasyonuna muvaffak olunan vak'aların hemen hepsinde ekimden en geç 38 saat sonra hücrelerde belirli CPE tesbit edilmiştir.

1969-1970 doğum sezonunda laboratuvarımıza gönderilen kısırak fötal organlarından (57-64, 12/61, 13-65 ve 20-60 numaralı kısıraklar) domuz böbreği epitel hücre kültürlerinde virus izolasyonuna muvaffak olunmuştur.

İzole edilen virus suşları yukarıda adı geçen hücre kültüründe pasajları yapılmıştır. İlk izolasyonda viruslar $KID_{50} = 10^{-5,5}$ lik

bir titre göstermişler pasaj sayısı arttıkça titreleri yükselmiş olup 9. pasajlarında $KID_{50} = 10^{-7,5}$ ğa çıkmıştır. (Karber metoduna göre hesaplanmıştır.)

İzole edilen 4 virus üzerinde yapılan tip tayini çalışmaları :

Laboratuvarımızda mevcut ve Hannover Yüksek Veteriner Okulu Mikrobiyoloji Kürsüsünden getirilmiş olan Tip spesifik anti «Rhinopneumonitis» Subtyp 2 serum ile domuz böbreği hücre kültürlerinde üretilen 4 virus suşu Neutralisasyon testine tabi tutulmuş olup yerli viruslarımız bu serum tarafından neutralize edilmişlerdir. Kontrol olarak normal menfi beygir serumu ile işleme tabi tutulan bu virusların ekildiği hücre kültürlerinde aşıkâr CPE tesbit ve müşahede edilmiştir.

Serolojik Yoklamalar :

Fötal organlarından doku kültüründe virus izole edilmiş olan kısıraklardan; sıkıt tarihinden 21 gün sonra getirilen kan serumları laboratuvarımızda **Army 183, P.4** Rhinopneumonitis virusu ile enfekte edilen yavru Hamster karaciğerlerinden hazırlanan süspansiyonun antijen olarak kullanıldığı komplement-fixasyon test'ine (Petzoldt, (8) tabi tutulmuştur.

Virus izole edilen hayvanların kan serumları müsbet reaksiyon vermişlerdir. 1 : 4 ve daha yukarı dilüsyonlarda hemmung gösteren serum numuneleri müsbet olarak kabul edilmektedir. (Petzoldt, (8).

Muayene edilen serumlar 1 : 8 ile 1 : 32 arasında değişen dilüsyonlarda hemmung göstermişlerdir. Her test'te müsbet ve menfi kontroller birlikte işlenmiştir.

İzole edilen virus suşlarının koyun ve domuz böbreği hücre kültürlerinde yapılan mukayese sonuçları :

Domuz böbreği epitel hücre kültürlerinde ilk izolasyonu yapılan 4 virus suşu bilâhare mukayese gayesiyle laboratuvarımızda koyun böbreği epitel hücre kültürlerine de ekilmişlerdir. Neticede bütün virus suşlarının adı geçen kültürdede gayet iyi üredikleri fakat bu virus için karakteristik olan dev hücrelerin pek fazla olmadığı ve primaer CPE nin ancak 40 ıncı saatte başladığı görülmüştür.

S O N U Ç

Bu çalışma ile yurdumuzda daha önce Başkaya, H. ve mesai arkadaşları tarafından koyun böbreği epitel hücre kültüründe izolesine muvaffak olunan kısırak abort virusunun; domuz böbreği epitel primer hücre kültürlerinde yurdumuzda da üretilmesine ve idantifikasyonuna çalışılmıştır.

1969-1970 doğum sezonunda Karacabey harasında salgın şekilde gebe kısıraklar arasında meydana gelen yavru atmalarda laboratuvarımıza gönderilen fetal organlardan yapılan suspansiyonlardan domuz böbreği primer epitel hücre kültürlerine yapılan ekimlerde dört virus suşu izole edilmiştir.

Üretilmesine muvaffak olunan bu virus suşları laboratuvarımız mevcut spesifik anti serumlarla neutralisasyon testine tabi tutulmak suretiyle idantifiye edilmişlerdir. Test sonuçları bu suşlarında «Rhinopneumonitis virusu» Subtyp 2 olduklarını göstermiştir.

Bu araştırma ile Başkaya, H. ve mesai arkadaşlarınca (1) yapılan çalışmalarda varılan sonuçların aynısı elde edilmiş bulunmaktadır.

T A R T I Ş M A

1 — 1969-1970 normal doğum sezonunda Karacabey harası kısırakları arasında başgösteren salgın karakterdeki sıkıtlar üzerine laboratuvarımıza gönderilmiş bulunan fetal organlardan (Karaciğer, dalak, akciğer) Enstitümüz Patoloji laboratuvarında yaptırılan histopatolojik yoklamalarda viral bir etkenin mevcut olduğunun bildirilmesi üzerine domuz böbreği primer epitel hücre kültüründe virus izolasyon çalışmalarına girişilmiştir.

2 — Özellikle bu virolojik çalışmada genç domuz böbreği epitel hücre kültürü, gerek ilk izolasyonda ve gerekse titrasyonla müteakip virus pasajlarında kullanılmış olup zaman zaman koyun böbreği epitel hücre kültürü ile mukayeseli çalışmalar yapılmıştır.

3 — Domuz böbreğinin kullanıldığı doku kültürlerinde; Karacabey harasından 1969-1970 döneminde yavru atan 10 kısırak cenininden gönderilen fetal organların dördünden virus izolasyonuna muvaffak olunmuştur.

4 — İzole edilen bu 4 virus suşu adı geçen doku kültüründe 9. pasaja kadar devam ettirilmiştir.

5 — 4 virus suşu laboratuvarımızda mevcut spesifik anti «Rhinopneumonitis» (Hannover, 1835) immun serumu ile Neutralisasyon teste tabi tutulmuşlar ve hepsinin «Rhinopneumonitis Subtyp 2» virusu oldukları saptanmıştır.

6 — Sıkıt yapan ve fotal organlarından virus izole edilen ana kısıraklardan temin edilen kan serumları laboratuvarımızda komplement - fixasyon test'i ile işlenmiştir.

a) Test'te antijen olarak Army, 183. P. 4 Rhinopneumonitis virusu ile intraperitoneal olarak enfekte edilen yavru Hamsterin karaciğer suspensiyonu kullanılmıştır.

b) C.F. test'inde; virus izolasyonu yapılan ana kısırakların kan serumlarında 1 : 4 ilâ 1 : 16 arasında değişen bir antikor titresi tesbit edilmiştir, (1 : 4 ve daha yukarı serum dilüsyonlarında tesbit edilen hemmung Rhinopneumonitis enfeksiyonu için spesifik kabul edilmektedir (Petzoldt,))

c) Sıkıt yapan kısırakların kan serumlarında Rhinopneumonitis virusuna karşı spesifik antikorların komplement - fixasyon test'ile tesbit edilmesi indirekt yolla virus izolasyonunu ve adı geçen enfeksiyonun mevcudiyetini isbatlamaktadır.

7 — Yapılan bu araştırma ile Rhinopneumonitis virusunun yurdumuzda rahatlıkla koyun böbreği hücre kültüründe olduğu gibi yavru domuz ve domuz böbrekleri epitel hücre kültürlerinde gerek ilk izolasyonunda ve gerekse müteakip pasajlarında kullanılabilceğini, ayrıca domuz böbreğinin fazla hücre sedimenti vermesi bakımından çok sayıda kültürün elde edilmesine dolayısıyla virus üretiminde kısa zamanda büyük bir rekoltun temin edilmesi bakımından koyun böbreği kültürüne tercih olunabileceği tesbit edilmiş bulunmaktadır.

8 — Bu çalışma ile ikinci kez Karacabey harasında peryodik olarak her dört yılda bir kısıraklar arasında vukubulan salgın karakterdeki sıkıtların ajanının Rhinopneumonitis virusu olduğu tesbit edilmiştir.

Ö Z E T

1 — Karacabey harası kısırakları arasında 1969-1970 doğum devresinde çıkan yavru atma vak'alarında laboratuvarımıza gönderilen fötal organlarda Enstitümüz patoloji laboratuvarınca viral bir etkenin mevcut olduğunun tesbiti üzerine domuz böbreği epitel hücre kültürlerinde virus izolasyon çalışmalarına girişilmiştir.

2 — Çalışmalar sonunda gönderilen 10 marazi maddenin 4 ünden virus izole edilmiştir.

3 — İzole edilen 4 virus suşu laboratuvarımızda spesifik anti Rhinopneumonitis subtyp 2 (Hannover, 1835) immun serumu ile neutralize edilmişlerdir.

4 — Sıkıt yapan ve atık ceninlerine ait fötal organlarından virus izole edilen ana kısırakların kan serumlarında adı geçen enfeksiyona karşı komplementi fixe edici spesifik antikorların mevcudiyeti isbatlanmıştır.

5 — Böylece yurdumuzda ilk kez domuz böbreği primer epitel hücre kültüründe de kısırak fötal organlarından «Rhinopneumonitis virusu» izole ve idantifye edilmiştir.

Z U S A M M E N F A S S U N G

In den Jahren 1969-1970 trat auf Gestütt Karacabey bei den trachtigen Stuten ein seuchenhaftes Verfohlen auf. In den Organen der abortierten Foeten wurden keine bakteriellen Erreger festgestellt.

In den gleichen Organen wurden in unserem Institut Labor für Pathologie für das Rhinopneumonitis-virus typische Einschlusskörperchen gefunden.

Aus den 10 Untersuchungsmaterial wurden auf primare Schweinezellkulturen 4 Virusstämme isoliert. Die isolierten Virusstämmen wurden mit typenspezifischen Antiserum (Hannover, 1835) im Neutralisationstest neutralisiert und als Rhinopneumonitis Subtyp 2 diagnostiziert.

Darüberhinaus wurden bei den Stuten, aus deren Foeten das Virus isoliert worden war, Kompletmetbindungstiter 1 : 4 bis 1 : 32

gefunden. Damit wurden bei den Stutenser on spezifische Antikörper gegen Rhinopneumonitis - virus festgestellt.

Bei der Erstisolierung von Rhinopneumonitis - virus wurden primäre Schweinenierenzellkulturen in der Türkei zum Ersten Mal in unserem Labor angewendet und 4 Virusstämme isoliert und typisiert.

L I T E R A T Ü R

- 1 -- **Başkaya, H. Keskin-tepe, H., Doğuer, M. İyigören, B., Yılmaz, S. ve Demir E. (1968)** : An outbreak of Equine virus abortin in Turkey. I. Isolation and identification of Rhinopneumonitis virus in cell cultures, Vet. Fakültesi Dergisi; XV, 3-4, 309-317
- 2 — **Bodian, D. (1956)** : Simplified method of dispersion of monkey Kidney cells with trypsin, Virology 4, 525-577
- 3 — **Doğuer, M., Yılmaz, S. ve N. Yalım (1963)** : Karacabey harasındaki kısarak sıklıklarının etkenini tesbit etmek maksadı ile yapılan araştırmalar Etlik Vet. Bakt. Enst. Dergisi I. 367-390
- 4 — **Girar ve mesai arkadaşları (1963)** : Equine virus abortion in Canada II. Isolation of viruses and detection of antibodies in tissue culture.
- 5 — **İyigören, B. ve S. Yılmaz (1962)** : Karacabey harası kısarakları arasında seyreden sıklıklar hakkında Tarım Bakanlığına sunulan rapor.
- 6 — **Kawakami, G. ve mesai arkadaşları (1962)** : Etiological study on an outbreak of acute respiratory disease among colts due to equine rhinopneumonitis virus Jap. exp. med. 32,211-229.
- 7 — **Mc Collum, M.H. ve mesai arkadaşları (1962)** : Isolation and propagation of equine rhinopneumonitis virus in primary monolayer kidney cell cultures of domestic animals. Corn. Vet. 164-172.
- 8 — **Petzoldt, K. (1966)** : Die Technik der Komplementbindungsreaktion Zur Diagnose des virusabortes der Stuten (Rhinopneumonitis). DTW, 15. Mai 1966, 252-255.
- 9 — **Randall, C. C., F.W. Ryden, E.R. dol nad F.S. Schell (1953)** : Cultivation of equine abortion virus in fetal horse Tissue in vitro. Amer J, Path 29, 139-153.
- 10 — **Younger, J.S. (1954)** : Monolayer tissue Culture proc soc. exp. biol. Med. 85, 202-205