Turk J Vet Anim Sci
27 (2003) 999-1002
© TÜBİTAK

Araştırma Makalesi

Kısmi ve Pürifiye Sığır Vebası Virüs Antijenleri Kullanılarak ELISA'nın Geliştirilmesi

Aykut ÖZDARENDELİ
Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Elazığ - TÜRKİYE
Hakan BULUT
Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı, Elazığ - TÜRKİYE
Mehmet Ziya DOYMAZ
Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Elazığ - TÜRKİYE
Yusuf BOLAT
Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı, Elazığ - TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 20.06.2002

Özet: Bu çalışmada, Malatya ve Elazığ bölgesinde sığır vebasına (SV) karşı yapılan aşılamalar sonucu oluşan sığır anti-SV antikorlarını test etmek amacıyla enzime bağlı immunosorbent deneyi (ELISA) geliştirildi. Araştırmada kullanılan sığır serumlarından 180 adedi 1995 bahar döneminde Malatya bölgesinden, 157 adet sığır serumu da 1996 bahar döneminde Elazığ bölgesinden alındı. Toplam 337 serum ELISA testi ile araştırıldı. ELISA'yı dizayn etmek için referans olarak İngiltere Pirbright Hayvan Sağlığı Enstitüsünden getirilen pürifiye SV virüs antijenleri kullanıldı. Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, Ankara'dan temin edilen SV virüsü aşı suşu Afrika yeşil maymun böbrek hücresinde (Vero) üretildi ve kısmen pürifiye edildi. Kısmi pürifiye SV virüs antijeni ELISA'da test antijeni olarak çalışıldı. Test serumları, kısmi pürifiye SV antijeni ve referans SV antijenleriyle hazırlanan ELISA ile kontrol edildi. Referans antijen kullanıldığında, 337 serumun 286'sında (% 84,86) SV antikorları belirlendi. Aynı serumlarla kısmi pürifiye SV antijenleri kullanılarak yapılan ELISA'da ise 337 serumun 223'ü (% 66,17) pozitif belirlendi. Kısmi olarak saflaştırılan SV virüs antijenlerinin duyarlılığı % 75,87 ve özgüllüğü % 88,24 olarak bulundu. Kısmi olarak saflaştırılan SV virüs antijenleriyle geliştirilen ELISA duyarlılığı ve özgüllüğünün kabul edilebilir olduğu görüldü.

Anahtar Sözcükler: Sığır vebası virüsü, ELISA, antikor

Developing ELISA for Antibodies to Rinderpest Virus (RPV) by Using Reference and Partially Purified RPV Antigens

Abstract: The aim of this study was to develop ELISA to examine antibodies against rinderpest virus (RPV) for vaccination programmes in the Malatya and Elazığ regions. Serum samples from 180 clinically healthy cattle in Malatya were obtained in the spring of 1995 and 157 serum samples from cattle were taken in the spring of 1996 in Elazığ. The 337 serum samples were investigated with ELISA. To design the ELISA, reference purified RPV antigen obtained from Pirbright Animal Health Institute was used. RPV RBOK vaccine strain was provided by Central Veterinary Control and Research Institute, Ankara. It was used to infect the Vero cell line and was purified partially. The partially purified RPV antigen was used as a test antigen in ELISA. To compare the reference RPV antigen with the partially purified RPV antigen, 337 serum samples were subjected to ELISA. Antibodies to RPV were detected in 286 out of 337 (84.86%) cattle sera when the reference RPV antigen was used. However, when the same serum samples were examined in ELISA by using the partially purified RPV antigen, 223 out of 337 (66.17%) sera were positive. The sensitivity and specificity of partially purified RPV antigen were 75.87% and 88.24%, respectively. The developed ELISA with partially purified RPV antigen seems to be acceptable according to our results.

Key Words: Rinderpest virus, ELISA, antibody.

Giriş

Sığır vebası (SV) morbiditesi % 95'den daha yüksek, mortalitesi ise % 90 oranında seyreden gevişgetirenlerde önemli ekonomik kayıplara sebep olan viral bir hastalıktır. Sığır vebası virüsü, paramyxoviridae ailesi içerisinde morbilli virüs genusunda yer almaktadır. Etken negatif anlamlı yaklaşık 16 kb uzunluğunda linear RNA genomuna sahiptir (1). Bu virüsün farklı bir çok izolatı olmasına rağmen yalnız bir serotipi bulunmaktadır (2). Hastalıkta belirtiler hayvanın bağışıklık durumuna göre

değişiklik göstermektedir. Fakat genel olarak, yüksek ateş, sindirim sistemi mukozasında erozyonlar ve şiddetli ishal ile karakterize belirtiler görülmektedir (1,3-5). Viral antijen ve antikorların belirlenmesinde nötralizasyon, immunodifuzyon, komplement fikzasyon ve ELISA testleri sıklıkla kullanılmaktadır (6,7). ELISA'nın bu testlere karşı birçok avantajı vardır.

Bu çalışmada 1995-1996 yılı bahar dönemlerinde Malatya ve Elazığ bölgelerindeki SV'na karşı aşılanmış sığırlardan elde edilen serumlarda, anti-SV virüs antikorlarına ELISA ile bakıldı. Yapılan ELISA'da kısmi ve tam pürifiye SV antijenlerinin duyarlılığı ve özgüllüğü değerlendirildi.

Materyal ve Metot

Hücre ve Virüs

Afrika yeşil maymun böbrek epitel hücresi (Vero, Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, Ankara) % 10 fötal dana serum (FCS Serva, Feinbiochemical GmbH, Germany) içeren Dulbecco's Minimal Essential Media'da (DMEM) üretildi. Sığır vebası virüsü RBOK aşı suşu aynı enstitüden temin edildi.

Serumlar

Araştırma amacıyla 1995 yılı Malatya bölgesinden 180 adet, 1996 yılı Elazığ bölgesinden 157 adet olmak üzere toplam 337 adet kan toplandı. Serumlar elde edildikten sonra, -20 ºC'de saklandı.

Antijen hazırlanması

Sığır vebası virüsü RBOK aşı suşu Vero hücrelerinde üretildi. Hücreler kültür kabının % 70-80'ini tek tabakalı olarak kapladığı zaman, hücrelere DKID50 $\log10^{3.25}$/0.1 ml titredeki virüsden 1000 hücreye 1 virüs düşecek şekilde ekim yapıldı. Hücrelerin yaklaşık % 80'inde sitopatik etki infeksiyondan sonraki 5. günde görüldü. Üst sıvı toplanarak 4 ºC'de 3500 rpm'de 30 dk santrifüj edildi. Daha sonra 4 ºC'de 20.000 rpm'de 5 saat santrifüjle kısmi virüs peleti elde edildi. Pelet virüs 0,001 M PBS ile sulandırılarak -20 ºC'de saklandı (4,8).

Negatif kontrol grubu olarak Vero hücreleri 25 cm^2'lik hücre kaplarında üretildi. Hücreler tek tabaka olduktan sonra -20 ºC'de iki kere dondurulup çözdürüldü ve 4 ºC'de 3500 rpm'de 30 dk santrifüj edildi. Elde edilen hücre peleti 0,001 M PBS ile sulandırılarak -20 ºC'de saklandı.

Protein konsantrasyonlarının belirlenmesi

Lowry ve ark. (9) göre protein konsantrasyonları belirlendi. Kısmi pürifiye ve kontrol grubu antijenlerin protein konsantrasyonları Lowry ve arkadaşlarının metoduna göre belirlendi (9).

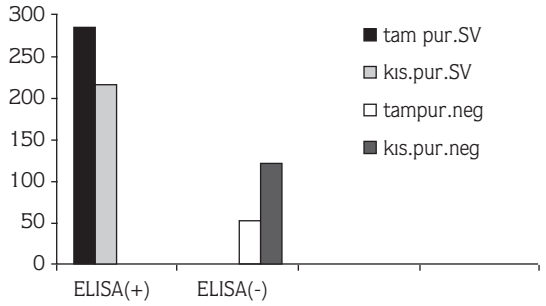
ELISA

Doksanaltı kuyucuklu ELISA kaplarına karbonat-bikorbanat (pH 9,6) tamponu içerisinde 30 µg/ml oranında sulandırılan tam ve kısmi pürifiye antijenden 100 µl konuldu. Negatif kontrol kuyucuklarına ise Vero hücrelerinden elde edilen hücre peleti karbonat-bikorbanat tamponunda 1/40 oranında sulandırılarak 100 µl konuldu. Kaplar 4 ºC'de 1 gece bekletildi. Bağlanmayan antijenleri uzaklaştırmak için, kuyucuklar % 0,05 Tween 20 içeren PBS solüsyonu ile 3 kere yıkandı. Kuyucuklara % 3 tavuk serumu içeren PBS'den 100 µl ilave edilerek, 37 ºC'de 2 saat bekletildi. İki kere % 0,05 Tween 20 PBS ile yıkama işlemi yapıldı. Kuyucuklara % 0,02 Tween 20 PBS ile 1/100 oranında dilue edilen serumlar üç farklı antijen bağlanmış kuyucuklara 100 µl konuldu. Serumlar 37 ºC'de 2 saat inkübe edildi. Beş kere yıkama işleminden sonra, kuyucuklara 100 µl % 0,02 Tween 20 PBS ile 1/25,000 oranında sulandırılan peroksidazla işaretli keçi anti-sığır serumu ilave edildi. Bekleme ve yıkama işlemleri tekrarlandı. Kuyucuklara % 3'lük H_2O_2 içeren 0,1 M sitrat-fosfat tamponunda hazırlanan 5 mg/ml oranında O-phenylandiamine (OPD, SIGMA Co. St. Louıs., MO, USA) 50 µl eklendi. Oda sıcaklığında 15-20 dk bekletilerek enzimatik reaksiyonun gelişmesi sağlandı. Reaksiyon 1 N H_2SO_4'den 50 µl kuyucuklara konularak durduruldu. Kuyucuklardaki absorbans değerleri (OD) otomatik ELISA okuyucusunda 450 nm dalga boyunda belirlendi (8,10).

Bulgular

Sığır vebası virüsü ile infekte edilen Vero hücrelerindeki protein konsantrasyonu Lowry metoduna göre 500 µg/ml olarak, kontrol grubu olarak kullanılan Vero hücrelerindeki protein konsantrasyonu ise 200 µg/ml olarak belirlendi.

Referans antijen olarak kullanılan tam pürifiye SV virüs antijeniyle yapılan ELISA'da toplam 337 serumdan 286'sı (% 84,86) pozitif, 51'i ise (% 15,14) negatif olarak bulundu.



Şekil. Kısmi ve pürifiye sığır vebası virüsü antijenleri kullanılarak yapılan ELISA sonuçlarının karşılaştırılması. Dikey sütun serum sayısı. Yatay sütun kısmi ve pürifiye antijen.

Aynı serumların kısmi olarak saflaştırılmış SV virüsü ile yapılan ELISA'de ise 337 serumdan 223'ü (% 66,17) pozitif, 114'ü de (% 33,82) negatif olarak belirlendi (Şekil).

Her iki antijenle yapılan ELISA sonuçları karşılaştırıldığında tam pürifiye antijenin 450 nm dalga boyunda belirlenen OD değerleri kısmi pürifiye antijene göre daha yüksek bulundu.

Referans antijenle karşılaştırıldığında kısmi olarak saflaştırılan SV virüs antijeninin duyarlılığı % 75,87, özgüllüğü ise % 88,24 olarak saptandı.

Elde edilen bu sonuçlar, kısmi olarak saflaştırılan SV virüs antijeniyle dizayn edilen ELISA'nın duyarlılığı ve özgüllüğünün kabul edilebilir sınırlar içinde olduğunu göstermektedir.

Tartışma

Sığır vebası hastalığı dünyanın birçok yerinde eradike edilmesine karşın ülkemizde halen sığır varlığını tehdit etmektedir. Bu çalışmada SV virüsüne karşı oluşan antikorları belirlemek için ELISA kiti geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Antiviral antikorların bulunması amacıyla kullanılan metotların başında ELISA gelmektedir. ELISA SV tanısında kullanılan diğer birçok metoda göre daha duyarlı ve pratik olması nedeniyle tercih edilmektedir (11-14).

Laboratuarımızda kısmi pürifiye SV virüs antijenleri ile hazırlanan ELISA kiti ile Malatya ve Elazığ bölgelerinde SV virüsüne karşı aşılanmış hayvanlardan toplanan serumlarda anti-SV antikorlarının varlığı araştırıldı. Sığır vebası virüs antikorlarının belirlenmesinde 55 ng kısmi pürifiye antijen ya da doku kültüründe $10^{2,2}$ $DKID_{50}$/ml titresindeki virüs yeterli bulunmaktadır (15). Lowry metoduyla elde ettiğimiz kısmi pürifiye SV virüs antijenleri ile yapılan ELISA sonuçlarına göre testin duyarlılığının % 75,87, özgüllüğünün ise % 88,24 olduğu belirlendi. Bu sonuçları referans antijenle karşılaştırdığımızda % 18'lik bir yalancı negatiflik vermesine rağmen elde edilen değerlerin birbirine uyumlu oldukları görüldü. Oluşan % 18'lik yalancı negatiflik antijenin tam pürifiye olmamasına bağlanmaktadır.

Elde edilen sonuçların ışığı altında, bu metot anti-SV antikorlarının belirlenmesinde kullanılabilir olarak kabul edilebilir. Daha sonraki çalışmalarda polietilen glikol (PEG) veya sükroz gradient saflaştırma yöntemleri kullanılarak elde edilen virüs antijenleri bu metotla karşılaştırılabilir.

Kaynaklar

1. Fenner, F.J., Gibbs, E.P.J., Murphy, F.A., Rott. R., Studdert, M.J., White, D.O.: Paramyxoviridae. Veterinary Virology, Academic Press. California. 1993; 471-487.
2. Kingsbury, D.W.: Paramyxoviridae and their replication. Fields Virology. Raven Press, New York. 1990; 945-955.
3. Barrett, T., Rossiter, P.B.: Rinderpest: the diseases and its impact on humans and animals. Adv. Vir. Res. 1999; 53: 89-110.
4. Bolat, Y., Doymaz, M.Z.: Veteriner viroloji ders notları. 1998; 302-304.
5. Crowther, J.R.: Rinderpest: at war with the disease of war. Sci. Prog. 1997; 80: 21-43.
6. Rweyemamu, M.M., Cheneaue, Y.: Strategy for the global rinderpest eradication programme. Vet. Microbiol. 1995; 44: 369-376.
7. Taylor, W.P., Durojaiye, O.A., Lefevre, P.C.: Manual of standards for diagnostic test and vaccines. 3rd ed., 1996. OIE.
8. Özdarendeli, A., Bolat, Y., Bulut, H., Doymaz, M.Z.: Sığırlarda anti-parainfluenza 3 virüs antikorlarının belirlenmesinde enzime bağlı immunosorbent testinin (ELISA) geliştirilmesi ve kullanımı. F.Ü. Sağ. Bil. Dergisi. 1997; 11: 277-282.
9. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr A.L., Randall, R.J.: Protein measurement with the folin-phenol reagents. J. Biol. Chem. 1951; 193: 265-275.
10. Bolat, Y., Bulut, H., Özdarendeli, H., Doymaz, M.Z.: Sığırlarda infeksiyöz bovine rhinotracheitis/infeksiyöz pustular vulvo vaginitis virus antikorlarının saptanması amacıyla geliştirilen enzime bağlı immunosorbent deneyi. F.Ü. Sağ. Bil. Dergisi. 1996; 10: 283-288.

11. Anderson, J., Rowe, L.W., Taylor. W.P.: Use of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of IgG antibodies to rinderpest virus in epidemiological surveys. Res. Vet. Sci. 1983; 34: 77-81.

12. Diallo, A., Libeau, G., Couacy-Hymann, E., Barbron, M.: Recent developments in the diagnosis of rinderpest and peste des petits ruminants. Vet. Microbiol. 1995; 44: 307-317.

13. Harlow, E.L., Lane, D.: Antibodies: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. 1988; 533-613.

14. Roitt, I., Brostoff, J.M.: Immunological techniques in immunology. 3rd ed. Mosby Year Book Europa Ltd. 1993.

15. Libeau, G., Diallo, A., Colas, F., Guerre, L.: Rapid differential diagnosis of rinderpest and peste des petits ruminants using an immunocapture ELISA. Vet Rec. 1994; 134: 300-304.