

A.Ü. Veteriner Fakültesi Viroloji Kürsüsü
Prof. Dr. Selahattin Gürtürk

**ANKARA'DA BİR AT BİRLİĞİNDE ATLARIN
RHİNOVİRUSUNA (NM₁₁ SUŞU) KARŞI ANTİKOR
DAĞILIMI ÜZERİNDE SEROLOJİK ÇALIŞMALAR**

İbrahim Burgu*

**Serologische Untersuchungen auf das Vorkommen von
Antikörper gegen den equinen Rhinovirus (Stamm NM₁₁)
bei einer Pferdebeständ in Ankara**

Zusammenfassung: Um die neutralisierende Antikörper gegen den equinen Rhinovirus bei Pferden in einer Pferdebeständ in Ankara festzustellen wurden 100 Serum proben entnommen und mit der Mikroneutralisationmethode auf neutralisierende Antikörper untersucht. Aus 100 Seren waren 15 (15 %) Serum proben positiv und der Neutralisationstiter bei der Positiven waren zwischen den 1/3.98-1/37.2.

Özet: Ankara'da bir at birliğinde bulunan atlarda Rhinovirus equi'ye karşı nötralizan antikörlerin varlığını saptamak amacı ile 100 adet serum numunesinde mikronötralizasyon testi ile nötralizan antikörler arandı. 100 serumdan 15 i (% 15) pozitif bulundu. Bu pozitif serumlar 1/3. 98-1/37.2 arasında nötralizasyon titresi verdiler.

Giriş

Soğuk algınlıklarının etkenleri üzerinde uzun yıllar araştırmalar yapılmıştır. İlk defa 1960 yılında yapılan bir çalışmada bu tür hastalıkların etkeni olarak bir virus izole edildiği bildirilmiştir (21). Daha sonraları bu çalışma sonuçları bazı araştırmacılar tarafından da onaylanmıştır (8). Solunum yollarında enfeksiyonlar meydana getiren virüslerden biri de rhinovirüsler olup bu virüsler üzerinde çe-

*Doç. Dr. A.Ü. Veteriner Fakültesi Viroloji Kürsüsü Ankara/Türkiye

şitli araştırmalar yapılmıştır (4, 6). Atların rhinovirusları ilk defa 1962 yılında Plummer (15) tarafından İngiltere'de izole edilmiştir. Çeşitli araştırmalarda değişik ülkelerde atlardan rhinovirusları izole etmeyi başarmışlardır (3, 7, 17, 22). Plummer (15) İngiltere'de Wellcome araştırma enstitüsü laboratuvarlarında yaptığı bir çalışmada 13' at gaitasından maymun böbrek hücre kültürlerinde bir virus izole etmiş ve yaptığı denemeler sonunda bu virusu "equine respiratory virus" olarak tanımlamıştır.

Ditchfield ve MacPherson'da (7) 1965 yılında Kanada'da solunum sistemi hastalığı gösteren atlardan iki ayrı rhinovirus izole etmişlerdir. Araştırmacılar bu serotipler arasında uyguladıkları çapraz nötralizasyon testleri sonunda bu tipleri serotip 1 ve serotip 2 olarak isimlendirmişlerdir. Serotip 2 bugüne kadar başka bir yerde izole edilmemiştir. 1963 yılında Wilson, Bryan, Doll ve Tudor (22) Amerika Birleşik Devletleri'nde Kentucky'de atlardan izole ettikleri rhinovirus suşunu serotip 1 olarak saptamışlardır. Burrows (5) İngiltere'de 1967 yılında hafif solunum yolu enfeksiyonu gösteren üç genç atın NM₁₁ rhinovirus suşunu izole etmiş ve bu suşu özellikleri nedeni ile serotip 1 olarak saptamıştır. Becker, Keller ve Teufel (3) Batı Almanya'da Berlin'de yaptıkları bir çalışmada atlardan rhinovirus izole etmişler ve HEROS adını verdikleri bu suşu özellikleri nedeni ile serotip 1 olarak saptamışlardır.

Rhinovirus equi Picorna viruslar grubuna dahildir (15). Virus ribonükleik asit kapsar. Ultrasantrifüj ve phosphotungstat ile yapılan negatif kontrastlı elektronmikroskop çalışmalarında virusun büyüklüğü 25-30 milimikron olarak ölçülmüştür (15, 18). Rhinovirus equi morfolojik olarak Polio virusuna benzer ve basit bir kübik simetri gösterir (7, 15). Virion'un yoğunluğu Cesiumchlorid (CsCl₂) ile yapılan ölçümlerde 1.40 g/ml. (15) ile 1.45 g/ml. (18) olarak saptanmıştır. Enteroviruslarda ise bu yoğunluk 1.34 g/ml. dir. Virusun sakkarozdaki sedimentasyon gücü 160 S dir (21).

Rhinovirus equi etere, kloroforma ve fluorokarbona (C₂Cl₂F₂) dayanıklıdır (15, 18, 19). Isıdan kolayca etkilenmez. 50°C'da çok az bir enfeksiyözite kaybı gösterir (2, 15, 18). Bütün rhinoviruslarda olduğu gibi rhinovirus equi'de asite dayanıksızdır. Enterovirusların aksine pH 2-5 değerlerinde kolayca inaktive olur (21).

Rhinovirus equi'nin hemagglütinasyon ve hemadsorbsiyon özelliği yoktur. Bugüne kadar çeşitli eritrositlerle (insan, maymun, ke-

di, köpek, at, öküz, rat, gelincik, kobay ve civciv) yapılan testler olumsuz sonuç vermiştir (15, 18).

Rhinovirus equi'nin invitro üretilmesinde çeşitli kültürler kullanılmıştır. Araştırcıların gözlemlerine göre virus diğer rhinovirusların aksine 37°C da gayet iyi üremektedir (zellikle insan rhinovirusları 33°C'da üremektedir) (3). Yapılan çalışmalarda virusun at, maymun, tavşan, köpek, hamster böbrek kültürlerinde ve devamlı kültürlerden de MS-21, LLC-MK₂ (13), Hep-2 ve Hela kültürlerinde ürediği bildirilmiştir (1, 3, 10, 15). Deneme hayvanlarında yapılan deneysel enfeksiyon çalışmalarından başarılı sonuçlar alınamamıştır (15, 22.) Ancak deneme hayvanlarından imnun serum elde edilmesinde yararlanılmıştır (2, 15).

Atlar üzerinde çeşitli araştırcılar deneysel enfeksiyon çalışmaları yapmışlardır (15, 16). Bu araştırmalar sonunda, intranasal inokulasyonda inkubasyon sresinin 2-3 gün olduğu saptanmıştır.

Enfeksiyon st solunum yollarında kataral bir yangı ile başlar. Hayvanlarda sulu tabiattan mukopurulent karektere kadar değişen bir burun akıntısı vardır. Aynı zamanda lenf yumrularında şişmeler görülür. Kısa süreli kuru olmayan bir öksürük bulunur. İlk hastalık haftasının sonunda viremi meydana gelir ki bu viremi devri 40°C'ın üstüne kadar çıkan bir ateşle kendini belli eder. Ateşli dönem yaklaşık 4-5 gün kadar sürer ve nötralizan antikorların oluşması ile son bulur (7, 16, 19).

Rhinovirus equi'nin serolojisi üzerinde çeşitli araştırcılar çalışmışlardır (7, 10, 17, 19, 20). Teufel ve Keller (19) 71 at serumu ile yaptıkları nötralizasyon testi sonucunda 63 serumda (% 88) yüksek titrede antikor varlığı saptamışlardır. Ditchfield ve MacPherson (7) nötralizasyon testi ile rhinovirus equi'ye karşı 1/4-1/1024 değerleri arasında antikor bulmuşlardır. Studdert ve Gleeson (17) Avustralya'da 355 serum ile yaptıkları bir çalışmada rhinovirus equi serotip 1'e karşı % 47.9 oranında pozitif seruma rastlamışlardır. Finci (10) pasif hemoliz testi yardımı ile spesifik antikorların varlığını saptamıştır.

Rhinovirus equi'nin plak karakterleri üzerinde de araştırcılar durmuşlardır (1, 18). Araştırcılar alışmaları sonunda plakların 6-7 ci günlerde oluştuğunu, küçük yapıda, düzensiz karakterde plakların meydana geldiğini tesbit etmişlerdir (1, 18). Diğer taraftan Studdert ve Gleeson (18) rhinovirus equi ile floresans seroloği çalışmaları da yapmışlardır.

Yurdumuzda atların rhinovirusları ile ilgili tek çalışma Ateş (1) tarafından yapılmıştır. Araştırmacı bu çalışmasında Rhinovirus equi NM₁₁ (serotip 1) suşunun MS-21 hücre kültürlerinde plak formasyonları üzerinde çalışmıştır.

Bu araştırmada Rhinovirus equi'nin ülkemizde ilk kez serolojik olarak epidemiyolojisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu nedenle de bir ahır enzootisi şeklinde seyreden bu hastalığın serolojik çalışması toplu bir at birliği olan Cumhurbaşkanlığı Muhafız alayına bağlı süvari birliğindeki konkur ve süvari atlarında yapılmıştır.

Materyal ve Metot

Virus: Araştırmamızda Rhinovirus equi'nin NM₁₁ (serotip 1) suşu kullanıldı. Suş Serbest Berlin Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Enstitüsünden sağlandı.

Serumlar: Araştırmada serum nötralizasyon testi ile serolojik değerlendirmeye konulan serumlar Cumhurbaşkanlığı Muhafız alayına bağlı süvari birliğindeki süvari ve konkur atlarından alındı. Bu amaçla 100 adet serum numunesi kullanıldı. Alınan serum numuneleri serolojik uygulamadan önce 56°C'da su banyosunda 30 dakika inaktive edildi ve 5 × antibiyotik (100 IE penisilin/ml., 100 gamma streptomisin/ml. ve 0.005 mg. kanamisin/ml.) katılıp oda derecesinde iki saat bekletildi, daha sonra sterilite kontrolleri yapıp kullanılabilecek kadar -20°C'da saklandı.

MS-21 devamlı hücre kültürü: Gerek virus üretmek amacı ile ve gerekse nötralizasyon testinde MS-21 hücre kültürleri kullanıldı. Hücre üretme vasatı olarak % 10 inaktif dana serumu ve antibiyotik kapsayan Hanks vasatı (12) kullanıldı.

Virus üretilmesi: Rhinovirus equi NM₁₁ (serotip 1) suşunu çoğaltmak amacı ile MS-21 hücre kültürlerine ekimler yapıldı. Virus üretilmesinde vasat olarak serumsuz, antibiyotikli Earle vasatı (9) kullanıldı ve üretme işlemi 37°C'da uygulandı. Ekimi izleyen 48 inci saatte mikroskop altında yapılan kontrollarda MS-21 hücre kültürlerinde % 80-90 oranında sitopatolojik efektin (CPE) görülmesi üzerine virüslü hücre kültürü şişeleri etüvden alınarak derin dondurucuda donduruldu. Daha sonra çözdürülen virüslü materyal 3000 devirde 30 dakika santrifüje edildi ve küçük porsiyonlar halinde -60°C'da saklandı.

Virusun mikrotitrasyon yöntemi ile titresinin tesbiti: Nötralizasyon testinde kullanılacak olan virusun enfeksiyözite gücü Frey ve Liess' in (11) bildirdikleri mikrotitrasyon yöntemi ile saptandı. Virus phosphat Puffer solüsyonu (PBS) içinde log. 10 tabanına göre sulandırıldı. Her sulandırma basamağı için mikrotitrasyon tablasından altı göz kullandı. Gözlere her bir sulandırma basamağından 0.1 ml. konuldu. Gözlerdeki virus sulandırmaları üzerine özel pipet* yardımı ile 0.05 ml. hücre (3.0×10^5 hücre/ml.) damlatıldı. Mikrotitrasyon tablasının üzeri toksik etkisi olmayan özel yapıştırıcı bant** ile örtülerek 37°C 'da inkubasyona kondu. Hergün doku kültürü mikroskobu ile, hücrede meydana gelen sitopatolojik değişiklikler kontrol edilerek 3 üncü gün sonunda sonuçlar Kaerber'e (14) göre hesaplanarak virusun titresi saptandı.

Mikronötralizasyon testi: Toplanan kan serumlarında Rhinovirus equi'ye karşı antikor olup olmadığını araştırmak için bu test uygulandı. Kontrolü yapılacak olan kan serumları deney tüplerinde PBS ile 1/2 oranında sulandırıldı. Bu sulandırmalar üzerine eşit miktarda titresini bilinen virustan ($100 \text{ DKID}_{50} = 10^{2.0} / 1.0 \text{ ml.}$) konuldu. Böylece 1/4 lük bir sulandırma elde edildi. Bu serum + virus karışımı 2 saat oda derecesinde tutulduktan sonra mikronötralizasyon tablasındaki gözlere 0.1 ml. konuldu. Her serum numunesi için 4 göz kullanıldı. Daha sonra bütün gözlere özel pipet yardımı ile MS-21 hücre süspansiyonundan (3.0×10^5 hücre/ml.) damlatıldı. Tablanın üzeri özel şeffaf bant ile örtülerek 37°C lik etüve kaldırıldı. Doku kültürü mikroskobu ile yapılan muayenelerle sonuçlar 3 üncü günde meydana gelen sitopatolojik efektte göre değerlendirildi.

Pozitif serumların serum nötralizasyon değerlerinin (SN_{50}) tesbiti: Mikronötralizasyon testi uygulaması sonunda 1/4 lük sulandırma da pozitif çıkan 15 serum numuncesindeki antikor titreleri yine mikronötralizasyon yöntemi ile saptandı. Pozitif serumlar PBS içinde 1/2 sulandırıldı. Bu sulandırılan serumlardan sıra ile mikronötralizasyon tablasında ilk sıradaki 4 adet göze 0.1 ml. konuldu. İlk sıradaki gözleri izleyen sıradaki gözler özel pipet ile serumsuz Earle vasatından 0.05 ml. damlatıldı. Daha sonra özel mikrosulandırıcılar yardımı ile en üst sıralarda bulunan serum sulandırmalarından başlamak ve alttaki gözlere 0.05 ml. taşımak surtiyle serumlar 1/512 ye kadar sulandırıldı. Sulandırma işleminden sonra bütün gözlere

*Firma Greiner und Söhne, Nürtingen/württ.

**Cooke Engineering Company, Alexandria, U.S.A.

titresi bilinen virustan ($100 \text{ DKİD}_{50} = 10^{2.0}/1.0 \text{ ml.}$) özel pipet yardımı ile 0.05 ml. damlatıldı ve mikronötralizasyon tablasının üzeri şeffaf yapıştırıcı bant ile örtülerek 2 saat oda derecesinde bırakıldı. Bu sürenin sonunda tablanın üzerindeki bant kaldırılarak her göze yine özel pipet yardımı ile MS-21 hücre süspansiyonundan (3.0×10^5 hücre/ml.) 0.05 ml. damlatıldı. Tablanın üzeri yeniden örtülerek 37°C 'lik etüve kaldırıldı ve daha sonra mikroskop altında yapılan kontrollerle 3 üncü günde pozitif serumlardaki antikor titreleri saptandı.

Sonuçlar

Virusun mikrotitrasyon yöntemi ile elde edilen titresi: Rhinovirus equi NM_{11} (serotip 1) suşunun MS-21 hücre kültürlerindeki enfeksiyözite gücü $\text{DKİD}_{50} = 10^{4.0}/1.0 \text{ ml.}$ olarak saptandı.

Şüpheli serumlarla yapılan antikor taraması sonuçları: Cumhurbaşkanlığı muhafız alayına bağlı süvari birliğindeki konkur ve süvari atlarından alınan 100 adet kan serumunda Rhinovirus equi NM_{11} (serotip 1) suşuna karşı yapılan antikor taraması sonunda 15 adet serumda (% 15) bu virusa karşı nötralizan antikorların varlığı tesbit edildi. Aynı zamanda pozitif sonuç veren bu hayvanların yaşlarının iki yaşından yukarı olduğu saptandı. Ayrıca bu hayvanların 5 adedinin Gemlik Askeri Harasından, 6 adedinin özel at yetiştirme çiftliklerinden veya şahıslardan, 1 adedinin Karacabey harasından ve 1 adedinde Fransa'dan alındığı anlaşıldı (Tablo 1).

Tablo 1. 1/4 sulandırmada pozitif sonuç veren serumlar.

Hayvanın adı	Doğum tarihi	Geldiği yer
Polat	1975	Gemlik Askeri Hara
Yavuz	1974	Şahıs
Tayfun	1974	Şahıs
Çapkın	1975	Gemlik Askeri Hara
Hakan	1967	Gemlik Askeri Hara
Sema	1975	Gemlik Askeri Hara
Laçın	1971	Şahıs
Lerzan	1969	Gemlik Askeri Hara
Ejder	1970	Fransa
Kosova	1972	Şahıs
Çilli	—	—
Pamir	1968	Şahıs
Sabire	1974	Şahıs
Gül I	1968	Karacabey Harası
Zeynep	1974	Şahıs

Pozitif serumların SN_{50} değerleri: Pozitif sonuç veren 15 serumdaki antikor titreleri (SN_{50}) 1/3.98-1/37.2 değerleri arasında bulundu (Tablo 2).

Tablo 2. Pozitif serumların antikor titreleri (SN_{50}).

Hayvanın adı	Serum sulandırma						
	1/3.98	1/4.68	1/5.62	1/9.33	1/11.2	1/22.4	1/37.2
Polat		+					
Yavuz		+					
Tayfun			+				
Çapkın		+					
Hakan							+
Sema						+	
Laçın	+						
Lerzan		+					
Ejder				+			
Kosova					+		
Çilli		+					
Pamir		+					
Sabire						+	
Gül I	+						
Zeynep					+		
Toplam	2	6	1	1	2	2	1

Tartışma

Cumhurbaşkanlığı Muhafız alayına bağlı süvari birliğindeki konkur ve süvari atlarında Rhinovirus equi NM_{11} (serotip 1) suşuna karşı nötralizan antikor varlığını saptamak amacı ile yapılan bu çalışmada 100 attan 15 inde (% 15) pozitif sonuç alınmıştır. Diğer ülkelerde bu konu ile ilgili yapılan çalışmalarda elde edilen pozitif serumlardaki nötralizan antikor düzeyleri bizim bulgularımızın üzerindedir (7, 10, 17, 19, 20). Diğer taraftan pozitif sonuç veren hayvanların yaşlarının iki yaşından yukarı olması Plummer (15), Ditchfield ve MacPherson (7) ve Teufel ve Keller'in (19) bulguları ile uyum göstermiştir.

Türkiye'de bu konuda serolojik bir çalışma yapılmamış olması bu çalışmada alınan sonuçların Türkiye'deki yarış atı ve konkur atları popülasyonu bakımından bir değerlendirmesine olanak vermemektedir. Ancak pozitif sonuç alınan hayvanların birliğe geliş yerlerinin farklı olması, bu tür devlet kurumları ve sportif amaçlarla at yetiştirilen özel çiftliklerde bu hastalık yönünden araştırmaların yapılmasını ve bu hastalığa karşı korunma önlemlerinin alınmasını kanımızca zorunlu kılmaktadır. Hastalığın ahır personeline de bulaşabilmesi kuşkusuz üzerinde durulması gereken diğer önemli bir konudur.

Literatür

- 1- **Ateş, M.** (1979): *Atların rhinovirusunun plak formasyonları üzerinde araştırmalar.* Doktora tezi. F.Ü. Vet. Fak. pp 31.
- 2- **Becker, W.** (1972): *Die Komplementbindungsreaktion mit dem Equinen Rhinovirusstamm NM₁₁ und ihre Eignung zur serologischen Diagnostik der Erkrankung.* Inaugural Diss. Berlin pp 45.
- 3- **Becker, W., Keller, Ü. und Teufel, B.** (1974): *Die Rhinovirusinfektion des Pferdes.* Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 87, 305-308.
- 4- **Bögel, K. and Böhm, U.** (1962): *Ein Rhinovirus des Rindes.* Zentbl. Bakt. I Orig. 187, 2-14.
- 5- **Burrows, R.** (1968): *Equine Rhinoviruses.* Proc. 2nd Int. Conf. on Equine Infectious Diseases. Paris Verlag S. Karger Basel 1970.
- 6- **Bürki, B.** (1965): *Picornaviruses of cats.* Arch. ges. Virusforsch. 15, 692-696.
- 7- **Ditchfieldt, J. and MacPherson, L. W.** (1965): *The properties and classification of two new rhinoviruses recovered from horses in Toronto, Canada.* Cornell Vet. 55, 181-189.
- 8- **Ditchfieldt, W. J. B.** (1969): *Rhinoviruses and parainfluenza viruses of horses.* J. Am. med. Ass. 155, 384-387.
- 9- **Earle, W. R.** (1943): *Production of malignancy in vitro. IV. The mouse fibroblast cultures and changes in the living cells.* J. natn. Cancer Inst. 4, 165-212.
- 10- **Finci, E.** (1978): *A passive haemalysis test for the detection of antibodies of rhinovirus equi.* Vet. Fak. Derg. Ankara Üniv. XXV, 720-730.
- 11- **Frey, H. R. und Liess, B.** (1971): *Vermehrungskinetik und Verwendbarkeit einer stark zytopathogenen VD-MD Virusstammes für diagnostische Untersuchungen mit der Mikrotiter-Methode.* Zentbl. Vet. Med. B 18, 61-71.
- 12- **Hanks, J. H. and Wallece, R. E.** (1949): *Relation of oxygen and temperature in the preservation of tissue by refrigeration.* Proc. Soc. exp. Biol. Med. 112, 1040-1050.

- 13- **Hull, R. N., Cherry, W. R. and Tritch, O. J.** (1962): *Growth characteristics of monkey kidney cell strains LLC-MK₁ and their utility in virus research.* J. Exp. Med. 115, 903-912.
- 14- **Kärber, G.** (1964): *In diagnostic procedures for virus and rickettsial disease.* Publ. Hlth. Ass. (New-York) 3, 48-50.
- 15- **Plummer, G.** (1962): *A equine respiratory virus with enterovirus properties.* Nature, s. 195, 519-520.
- 16- **Plummer, G. and Kerry, J. B.** (1962): *Studies on the equine respiratory virus.* Vet. Rec. 74, 967-970.
- 17- **Studdert, M. j. and Gleeson, L. J.** (1977): *Isolation of equine rhinovirus type 1.* Aust. vet. J. 53, 452.
- 18- **Studdert, M. j. and Gleeson, L. J.** (1978): *Isolation and characterisation of an equine rhinovirus.* Zentbl. Vet. Med. V 25, 225-237.
- 19- **Teufel, P. und Keller, H.** (1970): *Das Vorkommen neutralisierender Antikörper gegen den equinen Rhinovirusstamm NM₁₁ in Berliner Pferdebeständen.* Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 23, 466-467.
- 20- **Teufel, P.** (1977): *Untersuchungen zur Rhinovirusinfektion des Pferdes.* Prakt. Tierarzt (Sondernummer) 30-32.
- 21- **Tyrell, D. A.J. and Parsons, R.** (1960): *Some virus isolation from common colds. III. Cytopathogenic effects in tissue cultures.* Lancet, 1, 239-246.
- 22- **Wilson, J. C., Bryans, J. T., Doll, E. R. and Tudor, L.** (1965): *Isolation of a newly identified equine respiratory virus.* Cornell vet. 55, 425-431.