

HÜCRE KÜLTÜRLERİ VE SIĞIR SERUMLARINDA PESTİVİRUS KONTAMİNASYONU

İbrahim Burgu¹

Feray Alkan²

Aykut Özkul²

Pestivirus contamination of cell cultures and bovine serum.

Summary: *In this research, 23 fetal calf kidney cell cultures, 20 normal calf sera and 5 fetal calf sera were tested for pestivirus contamination by IF and IP technique.*

Of 23 fetal calf kidney culture initiated, 7 (30 %) were found positive for pestivirus. All of 5 fetal sera and 20 normal calf sera tested were negative for pestivirus.

Data obtained from this research indicated that cell cultures could be highly contaminated with pestivirus. Hence, it is suggested that cell cultures and serum batches which used in research, diagnostic and vaccine production laboratories absolutely should be controlled for pestivirus contamination before used.

Özet: *Bu araştırmada 1990-1992 yılları arasında A.Ü. Veteriner Fakültesi Viroloji Bilim Dalında yürütülmekte olan çalışmalarda kullanılmak üzere hazırlanan 23 adet fetal dana böbrek hücre kültürü ile 5 adet fetal dana serumu ve 20 adet normal dana serumu pestiviruslar bakımından IF ve IP testleri ile kontrol edildi.*

Hücre kültürlerinden 7 (% 30) adetinde pestivirus kontaminasyonu saptandı. FDS ve normal dana serumları ise pestiviruslar bakımından negatif sonuç verdi.

Araştırmadan elde edilen veriler, özellikle hücre kültürlerinin pestiviruslar ile yüksek oranda kontamine olabileceğini ortaya koydu. Bu sebeple, araştırma, rutin teşhis yada aşı hazırlama amacına yönelik olarak çalışan laboratuvarlarda hazırlanan hücre kültürlerinin ve serumların kullanılmadan önce pestivirus kontaminasyonu bakımından mutlaka kontrol edilmesi önerildi.

Giriş

Günümüzde hücre kültürleri, virus çalışmaları için vazgeçilmez sistemler olmuşlardır. Ancak, hücre kültürlerinin kullanımı beraberin-

1 Prof. Dr., A.Ü. Veteriner Fakültesi Viroloji Bilim Dalı, Ankara.

2 Dr., A.Ü. Veteriner Fakültesi Viroloji Bilim Dalı, Ankara.

de bazı risk faktörlerini de getirmiştir. Bunların içinde hücrelerin endojen viruslar ile kontaminasyonu büyük önem taşımaktadır(14). Özellikle siğir orijinli hücre kültürü çalışmalarında pestivirus kontaminasyonları araştırmacıları bu konuda önlemler almaya sevk etmiştir.

Pestiviruslar togaviridac familyasının alt grubudurlar (6,8,11). Bu grupta siğirlerin viral diarrhea virusu (BVDV) (11), koyunların border disease virusu (BDV) (6, 8) ve domuzların Avrupa domuz vebası virusları (8) yer almaktadır. Bu virusların herbiri enfeksiyona sebep oldukları hayvan türünün yanısıra siğir, koyun, keçi ve domuzlarda doğal ve deneysel enfeksiyonlara sebep olmaktadır (6,7,27).

Pestiviruslar transplasental olarak fütusa geçebilirler ve enfeksiyon zamanında fötusun yaşına bağlı olarak abort, fötal rezorpsiyon ve fötusun mumifikasyonu, kongenital bozukluğa sahip yavru doğumları ile persiste enfekte yavru doğumlarına neden olabilirler (1, 2,3,4,15,17,22,25). Virus ile enfekte olarak doğan yavrular, yaşamları boyunca organlarında, endotel ve epitel hücreleri ile retikuloendotelial sistemlerinde virusu taşırlar (7, 23, 25). Bu nedenle fötal yada postnatal dönemdeki bu hayvanlardan sağlanan serumlar ile doku ya da organlarından hazırlanan hücre kültürlerinin pestivirus ile kontamine olmaları kaçınılmaz bir sonuçtur.

Hücre kültürlerinin pestiviruslar ile kontaminasyonu bir çok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (10,20,24). Hassan ve Scott (10), mezbahada kesilen 26 siğirin fötuslarına ait böbreklerden hazırlanan hücre kültürlerinin 11'inin BVDV ile kontamine olduğunu belirtmişlerdir. Nuttall ve ark.(20), ise 63 dana böbrek hücre kültüründen 10'unda sitopatojen olmayan ve pestivirus varlığını saptamışlardır. Rossi ve ark. (24)'da 37 farklı seri fötal dana akciğer hücresinden bir (% 3) tanesinin BVDV içerdiğini, iki hücre kültürünün ise 2. ve 3. pasajlarda BVDV bakımından immunfloresan testi ile pozitif sonuç vermiş olmakla birlikte, enfeksiyon kaynağının şüpheli kaldığını belirtmişlerdir.

Hücre kültürlerinin üretilmesinde genellikle ticari olarak hazırlanan fötal serumlardan yararlanılmaktadır. Bundan başka yeni doğanlardan yada mezbahada kesilen hayvanlardan sağlanan serumlar da kullanılmaktadır. Serumlar kullanılmadan önce her ne kadar ısı ile inaktivasyon yada gamma irradiasyon işleminden geçiriliyorlar ve teorik olarak bu işlemler ile pestivirusların inaktive olduğu bilini-

yorsa da, yapılan bazı araştırmaların sonuçları, serumların kullanılmadan önce pestivirus kontaminasyonu yönünden kontrol edilmelerinin gerekliliğini ortaya koymaktadır (13, 24). King ve ark. (13), 6 ticari dana serumundan birini BVDV yönünden pozitif bulduklarını ve bu serumun 56°C'de 30 dakika süreyle yapılan inaktivasyonundan sonra BVDV'un inaktive olduğunu belirtmelerine karşın, Rossi ve ark.(24), 6000 DKID₅₀ oranında BVDV'un NADL suşu ilave edilen 6 şişe fetal serumdan 4 adedinde ısı ile inaktivasyon sonrasında, BVDV kontaminasyonunun devam ettiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar (24), irradiye edilmiş 9 serumdan birinin, irradiye edilmemiş 21 serumdan 13'ünün (% 62) BVDV ile kontamine olduğunu da bildirmişlerdir.

Bu çalışma ile, fetal orijinli hücre kültürleri ile fetal serum ve normal dana serumlarının pestiviruslar yönünden kontrol edilmesi ve rutin teşhis, araştırma yada aşı hazırlama ünitelerinde çalışan araştırmacıların konuya ilgilerinin çekilmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Hücre Kültürü : Araştırmada 1990-1992 yılları arasında hazırlanan 23 farklı seri fetal dana böbrek (FDB) hücre kültürü kullanıldı.

Hücre kültürleri, Ankara Çubuk Belediyesi Mezbahasında kesilen gebe hayvanların 3-5 aylık fütuslarına ait böbreklerden standart teknikle hazırlandı.

Serumlar : 5 adet fetal dana serumu (FDS) ve 20 adet normal dana serumu pestiviruslar bakımından kontrol edildi. Fetal dana serumları ticari olarak sağlandı.

Normal dana serumlarının hazırlanmasında ise, mezbahada kesilen hayvanlardan sağlanan kan kullanıldı. Alınan kan pıhtılaştıktan sonra, 3000 devirde santrüfuj edildi. Elde edilen serumlar 56°C de 30 dakika su banyosunda tutularak, inaktive edildi ve milipor selüloz asetat filtreden geçirilerek steril edildi.

Konjugat : BVDV'a karşı domuzlardan sağlanan antikolların immünfloresan (IF) testi için flourescein iso-thiocyanate (FITC), immünperoksidaz (IP) testi için peroksidaz ile işaretlenmesi ile hazırlanan konjugatlar kullanıldı.

IF testinde kullanılan konjugat 1/20, IP testinde kullanılan konjugat ise 1/200 titreye sahipti.

Konjugatlar Almanya Hannover Veteriner Yüksek Okulu, Viroloji Enstitüsü'nden sağlandı.

İmmunfloresan Tekniği: Test, Orban ve ark.(21)'nin bildirdiği yöntemle yapıldı.

Cell culture staining chamber (CCSC) tüplerine 1 ml FDB hücre süspansiyonu (80000 hücre/ml) konuldu. 72 saat sonra hücre yüzeyleri 0.01 M PBS ile yıkanarak, gözlere titresi oranında sulandırılmış konjugattan 0.075 ml miktarında konuldu. Tabletler 37°C'de 1 saat inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon süresinin sonunda 0.01 M PBS ile 3 kez yıkanan lameller, bir damla % 20 gliserin içeren PBS yardımıyla, lamlar üzerine kapatıldı. Sonuçlar floresan mikroskopta değerlendirildi.

İmmunperoksidaz Tekniği: Test, Hyera ve ark.(12)'nin bildirdiği yöntemle yapıldı.

Hücre üretme şişelerinde monalayer tabakalanmış hücreler, tripsin enzimi yardımıyla üredikleri şişelerden ayrılarak, 100.000 hücre/ml olacak şekilde hücre üretme vasatı içinde sulandırıldı. Hazırlanan hücre süspansiyonların herbirinden, tabletteki 2 göze birer ml konuldu ve tabletler 48 saat 37°C'de inkubasyona bırakıldı. 80°C'de 1 saat tutularak, hücrelerin fikze edilmesinden sonra, gözlere titresi oranında sulandırılmış konjugattan 0.2 ml ilave edilerek, 37°C'de 1 saat inkubasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda tabletlere substrat (3-amino-9-ethylcarbazole) konuldu. Sonuçlar 15 dakika sonra doku kültürü mikroskobunda değerlendirildi.

Bulgular

1990-1992 yılları arasında hazırlanan ve pestiviruslar bakımından IF ve IP testleri kullanılarak kontrol edilen 23 ayrı seri hücre kültüründen 7 (% 30)'sinde pestivirus varlığı saptandı (Tablo 1).

Tablo 1. 1990-1992 yıllarında hazırlanan ve pestivirus varlığı tesbit edilen hücre kültürleri

Yıllar	Örneklenen hücre kültürü	Pozitif hücre kültürü
1990	7	3
1991	7	2
1992	9	2
Toplam	23	7

Araştırmada, IF ve IP testleri ile kontrol edilen 5 adet fetal dana serumu ve 20 adet normal dana serumu pestiviruslar yönünden negatif sonuç verdi.

Tartışma

Virus izolasyon çalışmalarında homolog hayvan türünden sağlanan hücre kültürlerinin en duyarlı sistemler olduğu uzun zamandır bilinmektedir (18). Bu sebeple sığır viruslarına ilgili çalışmalarda da genellikle sığır orijinli hücre kültürleri kullanılmaktadır. Ancak, sığır orijinli hücre kültürlerinin pestiviruslar ile kontaminasyon riskinin bulunduğu da bir başka gerçektir. Hassan ve Scott (10), mezbahada kesilen 26 gebe sığırın fötuslarına ait böbreklerden hazırlanan hücre kültürlerinden 11'inde (% 42), Nuttall ve ark. (20), 63 FDB hücrelerinin 10'unda ve Rossi ve ark.(24), 37 fetal dana akciğer hücre kültürünün birinde (% 3) pestivirus varlığını tesbit etmişlerdir.

Bilindiği gibi hücre kültürlerinin pestiviruslar ile kontaminasyonu transplental pestivirus enfeksiyonlarının sonucudur (2,7,23,25). Yapılan serolojik ve virolojik çalışmalar ile pestivirusların Türkiye'de de yaygın olduğu ortaya konulmuştur (1,5,22). Burgu ve ark. (5) ile Alkan (1) ve Özkul (22)'un transplental pestivirus enfeksiyonları ve bu enfeksiyonların sonuçlarına ilgili çalışmalarında ise değişen oranlarda intrauterin pestivirus enfeksiyonu saptanmıştır. Başka bir ifade ile, Türkiye'de pestivirus enfeksiyonları yaygın olarak bulunduğu ve pestiviruslar fötusa nakledilebiliyor olduklarına göre, Türkiye'de hazırlanan hücre kültürlerinin pestiviruslar ile kontaminasyon olasılığı oldukça yüksektir. Nitekim bu araştırmada 1990-1992 yılları arasında hazırlanan 23 farklı seri FDB hücre kültüründen 7 (% 30) adedinde pestivirus varlığı saptanmıştır. Bu oran oldukça yüksek olup, çeşitli laboratuvarlarda enfekte hücrelerin pestiviruslar yönünden kontrol edilmeden kullanılmasının doğuracağı sonuçlar bakımından düşündürücüdür.

Bu araştırmada, kontrol edilen ticari serumlar ile normal dana serumlarında pestivirus tesbit edilmemiştir. Ancak bu konuda yapılan çalışmalar ısı ile inaktive edilmiş yada gamma irradiyasyona tabi tutulmuş bile olsalar, serumların pestivirus ile kontamine olabileceğini ortaya koymuştur (13,24).

Pestiviruslar ile kontamine hücre kültürleri yada hücrelerin üretilmesinde kullanılan serumlar,

- 1) Viral izolasyon prosedürünü interfere eder,

2) İzolasyon çalışmalarında yanlış değerlendirmelere neden olabilir,

3) İnaktive edilmemiş aşuların hazırlanmasında kullanılırlarsa, aşı kontaminasyonuna ve aşılama yolu ile virusun nakledilmesine neden olurlar. Nitekim, Tamoglia (26) İngiltere'de tüm lisanslı üreticilerin canlı IBR virüsü aşularının % 8'inde BVDV varlığını saptamıştır. Menasse ve ark.(19) ile Wenswoort ve Terpstra(28) ise anneleri gebeliği esnasında pestivirus ile kontamine aşularla aşılanan kuzularda BD, domuz yavrularında da kongenital domuz vebası benzeri hastalık salgınlarını bildirmişlerdir. Lohen ve ark. (16) ise pestivirus ile kontamine orf aşısı ile aşılanan, gebeliğinin erken dönemindeki dişi keçilerden % 82'sinde gebe kalmama, abortlar, ölü doğumlar ve zayıf yavru doğumları gibi reproduktif problemlerin oluştuğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar (16) ayrıca, sözkonusu keçiler ile aynı çiftlikte bulunan sığırlarda abort, koyunlarda BD'e karakteristik beyin lezyonları ve merkezi sinir sistemi lezyonlarına sahip kuzu doğumlarının görüldüğünü de belirtmişlerdir.

Türkiye'de sığır vebası, koyun ve keçi çiçek aşuları, mavidil ve ecthyma contagiosum (orf) aşularının üretiminde fetal yada post natal yaşamdaki dana yada kuzulardan hazırlanan böbrek hücre kültürleri kullanılmaktadır (Tablo 2). Hücre kültürlerinin üretilme-

Tablo 2. Türkiye'de hazırlanan bazı aşular ve aşı hazırlanmasında kullanılan hücre kültürleri

Aşı	Hücre kültürü
Sığır Vebası	Fötal dana böbrek
Mavidil	Koyun böbrek
Koyun çiçek	Kuzu böbrek
Keçi çiçek	Kuzu böbrek
Orf	Dana böbrek

sinde ise genellikle mezbahadan sağlanan serumlardan yararlanılmaktadır. Bu çalışmadan elde edilen veriler ve pestivirus enfeksiyonlarının patogenezinin ilgili bilgiler gözönünde tutulduğunda, açıkça görülmektedir ki, hücre kültürleri ile serumların pestiviruslar bakımından kontrol edilmeden kullanılması halinde söz konusu aşuların bazı serilerinin pestiviruslar ile kontamine olması mümkündür. Nitekim, Gelfert (9)'de pestivirus enfeksiyonlarına ilgili araştırmasında, sığır vebası aşısı ile aşılanmış 6 işletmede pestivirus enfeksiyonu prevalansının % 100 olduğunu saptamış ve bu verilerin Türkiye'de kullanılan sığır vebası aşularının pestiviruslar ile kontamine olabileceğinin gös-

tergesi olduğunu belirtmiştir. Canlı aşı hazırlayan ünitelerde kullanılan serum ve hücre kültürleri pestiviruslar yönünden kontrol edilmediği takdirde, kontamine aşular ile özellikle gebe hayvanların aşılanmalarını takiben gelişecek abortlar, fötusun mumifikasyonu ve anomalili doğan yavrular nedeniyle hem önemli ekonomik kayıpların meydana geleceği hem de persiste enfekte doğacak yavrular nedeniyle Türkiye'de pestivirus enfeksiyonlarının yaygınlığının daha da çok artacağı açık bir gerçektir.

Bu çalışmada, mezbahada kesilen sığırların fötuslarına ait böbreklerden hazırlanan hücre kültürlerinde pestivirus varlığı saptanmış ve rutin teşhis amacına yönelik yada aşı hazırlama laboratuvarlarında kullanılacak serum ve hücre kültürlerinin pestiviruslar bakımından kontrol edilmesinin önemi ve gerekliliği vurgulanmıştır. Ayrıca serum kontaminasyonu riskinin aza indirilmesi amacıyla serumun kullanılmadan önce inaktive edilmesi yada pestivirus enfeksiyonlarının görülmediği hayvan türlerinden örneğin tektürnaklılardan sağlanan serumların kullanılması da önerilmektedir.

Kaynaklar

1. **Alkan, F.** (1989). *Arthrogrippythphosa ve hidranencephaly'li buzağı doğumlarında bovine viral diarrhea-mucosal disease (BVD-MD)'in insidensi üzerinde araştırmalar*. Doktora Tezi, A.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
2. **Binkhorst, G.J., Journee, D.H.L., Wouda, W., Straver, P.J. and Vos, J.H.** (1983). *Neurological disorders, virus persistence and hyponyelination in calves due to intrauterine infections with bovine virus diarrhoea virus*. Vet. Q., 5 (4); 145-155.
3. **Bistner, S.I., Rubin, L.F. and Saunders, L.Z.** (1970). *The ocular lesions of bovine viral diarrhoea-mucosal disease*. Path. Vet., 7: 275-286.
4. **Brown, T.T., Schultz, R.D., Duncan, J.R. and Bistner, S.I.** (1979). *Serological response of the bovine fetus to bovine viral diarrhoea virus*. Infection and Immunity, 25 (1): 93-97.
5. **Brownlie, J., Clarke, M.C. and Howard, C.J.** (1989). *Experimental infection of cattle in early pregnancy with a cytopathic strain of bovine virus diarrhoea virus*. Res. Vet. Sci., 46: 307-311.
6. **Burgu, İ., Öztürk, F., Toker, A., Frey, H. -R and Liess, B.** (1987). *Investigation on the occurrence and impact of bovine viral diarrhoea (BVD) virus infections in sheep in Turkey*. Dtsch. tierarztl. Wschr., 94: 292-294.
7. **Carlsson, U.** (1991). *Border Disease in sheep caused by transmission of virus from cattle persistently infected with bovine virus diarrhoea virus*. Vet. Rec., 128: 141-147.
8. **Coria, M. F. and Mc Clurkin, A.W.** (1978). *Duration active and colostrum-derived passive antibodies to bovine viral diarrhoea virus in calves*. Can. J. comp. Med., 42: 239-243.

9. **Dahle, J., Liess, B. and Frey, H.R.** (1987). *Neutralizing antibody development following sequential inoculation of pigs with strains of bovine viral diarrhoea virus and hog cholera virus.* J. Vet. Med. B., 39:729-739.
10. **Hassan, A.K.M. and Scott, G.R.** (1986). *A technique to obviate the risk of inadvertent infection of cell cultures with bovine viral diarrhoea virus.* J. Comp. Path., 96: 241-246.
11. **Horzinek, M.C.** (1990). *Bovine Virus Diarrhoea Virus: An Introduction.* Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz., 9 (1): 13-23.
12. **Hyera, J.M.K., Dahle, J., Liess, B., Mocnig, V. and Frey, H.-R.** (1985). *Production of potent antisera raised in pigs by anamnestic response and use for direct immunofluorescent and immunoperoxidase techniques.* Pestivirus Infections of Ruminants, Commission of the European Communities, EUR, 10238, pp 87-101.
13. **King, A.A. and Harkness, J.W.** (1975). *Viral contamination of bovine serum.* Vet. Rec., 97 (1) : 16.
14. **Kniazeff, A.J.** (1973). *Endogenous Virus Contaminants in fetal bovine serum and their role in tissue culture contamination.* In: Contamination in Tissue Culture (Ed. Fogh. J.) 233-242. Academic Press, New York, London, 1973.
15. **Liess, B., Orban, S., Frey, H.-R., Trautwein, G., Wiefel, W and Blindow, H.** (1984). *Studies on transplacental transmissibility of a bovine virus diarrhoea (BVD) vaccine virus in cattle. II. Inoculation of pregnant cows without detectable neutralising antibodies to BVD virus 90-229 days before parturition (51 st to 190th day of gestation)* Zbl. Vet. Med. B., 31: 669-681.
16. **Lohen, T., Krogsrud, J. and Bjerkas, I.** (1991). *Outbreaks of border disease in goats induced by a pestivirus contaminated orf vaccine, with virus transmission to sheep and cattle.* J. Comp. Path., 104: 195-209.
17. **Mc Clurkin, A.W., Littlelike, E.T., Cutlip, R.C., Frank, G.H., Coria, M.F. and Bolin, S.R.**, (1984). *Production of cattle immunotolerant to bovine viral diarrhoea virus.* Can. J. Comp. Med., 48: 156-161.
18. **Mc Ferran, J.B., Clarke, J.K., Knox, E.R. and Connor, T.J.** (1972). *A study of the cell lines required to detect a variety of veterinary viruses in routine diagnostic conditions.* Br. vet. J., 128: 627-634.
19. **Menasse, A., Seimenis, A., Skyrianos, G., Stoforos, E. and Saratsiotis, A.** (1978). *Sheep pox in Greece. Serious incidents after largascale vaccination.* In: Proceedings of the 5 th International Symposium of World Association of Veterinary Microbiological and Immunological Specialists in Infectious Diseases. Tunis 1978, 42.
20. **Nuttall, P.A., Luther, P.D. and Stott, E.J.** (1977). *Viral contamination of bovine foetal serum and cell cultures.* Nature, 266:835-837.
21. **Orban, S. Liess, B., Hafez, S. M., Frey, H.-R., Blindow, H and Sasse-patzer, B.** (1983). *Studies on transplacental transmissibility of a Bovine Virus Diarrhoea (BVD) vaccine virus.* Zbl. Vet. Med. B., 30: 619-634.
22. **Özkul, A.** (1992). *Gebe ineklerde ve fütüslerinde bovine virus diarrhoea -mucosal disease.* Doktora Tezi, A.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü.

23. **Radostits, O.M and Littlejohns, I.R.** (1988). *New concepts in the pathogenesis, diagnosis and control of disease caused by BVDV.* Can. Vet. J., 29: 513-528.
24. **Rossi, C.R., Bridgman, C.R. and Kiesel, G.K.** (1980). *Viral contamination of bovine fetal lung cultures and bovine fetal serum.* Am. J. Vet. Res., 41: 1680-1681.
25. **Straver, P.J., Journee, D.H.L. and Binkhorst, G.J.** (1983). *Neurological disorders, virus persistence and hypomyelination in calves due to intrauterine infections with bovine virus diarrhoea virus. II. Virology and epizootology.* Vet. Q., 5 (4): 156-164.
26. **Tamoglia, T.W.** (1968). *Laboratory evaluation of bovine respiratory disease vaccines for safety.* J.A.V.M.A., 152: 847-850.
27. **Van Oirschot, J.T.** (1983). *Congenital infections with nonarbo togaviruses.* Vet. Microbiol., 8: 321-361.
28. **Wensvoort, G and Terpstra, C.** (1988). *Bovine viral diarrhoea virus infections in piglets born to sows vaccinated against swine fever with contaminated vaccine.* Res. Vet. Sci., 45: 143-145.