

Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR) Virus Antijenlerinin Lokalizasyonunun İmmunoperoksidaz Boyama ile Gösterimi

Hakan BULUT, Yusuf BOLAT, Aykut ÖZDARENDELİ

Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı, Elazığ-TÜRKİYE

Mehmet Z. DOYMAZ

Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Elazığ-TÜRKİYE

S. İsmet GÜRHAN

Şap Enstitüsü, Ankara-TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 25.10.1996

Özet: Bu çalışmada, enfeksiyonun değişik zamanlarında IBR-IPV (Infectious Bovine Rhinotracheitis-Infectious Pustular Vulvovaginitis) virus antijenlerinin hücrel lokalizasyonuna çalışıldı. Bunun için öncelikle MDBK hücreleri IBR-Colorado suşuyla enfekte edilip, enfeksiyonun erken ve geç saatlerinde antijenik dağılımına bakıldı. Viral antijenlerin immunohistokimyasal boyanmaları, IBR-Colorado suşuyla immun fare serumu ve peroksidazla işaretli keçi anti-fare immunoglobulin konjugatının primer ve sekonder serum olarak kullanılmasıyla gerçekleştirildi. Ancak, daha geç saatlerde viral antijenler, hem nükleusta hem de sitoplazmada gözlemlendi. Enfeksiyonun 3. saatine kadar, viral antijenler hücrenin nükleusunda tespit edildi. Enfeksiyon saatleri ilerledikçe, viral antijenlerin miktarlarının arttığı ve sitoplazmik boyanma bölgelerinin yoğunlaştığı kaydedildi. Bu saatlerde mikroskopik olarak, IBR-IPV'ye özgü sitoplazmik değişimler belirlendi.

Anahtar Sözcükler: IBR, ELISA, İmmunoperoksidaz

Demonstration of Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR) Virus Antigens by Immunoperoxidase Staining

Abstract: In this study, cellular localization of IBR-IPV (Infectious Bovine Rhinotracheitis-Infectious Pustular Vulvovaginitis) virus antigens at various times of infection was studied. For this purpose, MDBK cells were infected with IBR-Colorado strain and cellular distribution of viral antigens were followed at early and late periods of infection. Immunohistochemical staining of virus antigens were performed by using IBR-Colorado immune Balb/C mouse serum and horse radish peroxidase-conjugated goat anti-mouse immunoglobulins as primary and secondary antibodies, respectively. Until the third hour of infection, viral antigens were confined to the nucleus of infected cells, however, at later times, viral antigens were distributed to both nucleus and cytoplasm. As the time period of infection increased, the amount of viral antigens detected became abundant. At those period, typical cytopathic changes of IBR-IPV infection such as swelling of the cells and distention of cytoplasm were noticed in infected cells.

Key Words: IBR, ELISA, Immunoperoxidase

Giriş

Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR) virusu herpesviridae ailesinin bir üyesi olup, yapısında; çift iplikli linear formda DNA, 160-162 kapsomerden oluşmuş ikosaedral yapıda kapsit, kapsidi çevreleyen tegument ve en dışta ise üzerinde glikoproteinleri ihtiva eden viral zarf bulundurmaktadır. Sığırlarda; respiratorik enfeksiyon, konjunktivitis, vulvovaginitis, abort ve nadiren ensefalitise seyirli hastalık tablosu oluşturmaktadır. Ayrıca, yaşamboyu asemptomatik olarak seyredabilen latent virus

enfeksiyonların en önemli etkenlerindedir (1, 2).

Virus biyolojilerinin aydınlatılmasında ve virus etkisiyle enfekte hücrelerde gözlenen cytopathological effect (CPE)'in anlaşılmasında IBR virusuyla yapılmış olan çalışmaların büyük katkısı olmuştur (3, 4, 5, 6, 7). Yapılmış olan bu çalışmalarda; sitoplazmik değişimlerin farklı peryotlar gösterdiği kaydedilmiştir. Virus enfeksiyonunun erken aşamalarında viral çoğalma saptanamadığı bu dönem latent faz olarak zikredilmektedir. Bu dönemde hücrenin nükleusunda saptanmış olan viral antijenlerin

büyük kısmının viral polimerazlar olduğu kaydedilmiştir. Enfeksiyonun logaritmik fazında ise sitoplazmik antijenlerin miktarındaki artışın fazlalığı dikkati çekmiştir (3, 4). Ayrıca, enfekte hücrelerde yapılmış olan daha sonraki çalışmalarda, virion genomunun 70'den fazla proteini açıklamasına rağmen bunların ancak 30 tanesi yeni virionun yapısında gösterilebilmiştir. Toplam proteinin 11 tanesinin glikoprotein olduğu saptanmıştır (5, 6, 7, 9). Bu glikoproteinlerin virionun yüzeyinde bulunduğu, hücre yüzeyine tutunmada ve penetrasyonda etkili oldukları belirlenmiştir (6, 8, 9).

Herpes virus tarafından kodlanan proteinlerin sentez zamanlarına göre; alfa (en erken: immediate early), beta (erken: early), gamma (geç: late) proteinler olarak sınıflandırmaları yapılabilmektedir. Alfa proteinler genellikle yapısal olmayan ve transkripsiyonda görev alan proteinlerdir. Glikoproteinlerden hiçbiri bu gruba dahil değildir. Beta proteinler ise DNA-RNA metabolizmasında görev alan enzimleri kapsar. En son sentezlenen gamma proteinlerin çoğunluğu virusun yapısal proteinleridir (5). Çok güçlü antijen spesifik aktiviteye sahip monoklonal antikorlar kullanılarak yapılmış olan deneysel çalışmalarda ise bu glikoproteinlerin önce Rough Endoplasmic Reticulum (RER)'da daha sonra Golgi Apparatusunda buldukları saptanmıştır (5, 6, 7, 8).

Viral antijenik yapıların gerek deneysel olarak enfekte edilmiş hücre kültüründe, gerekse enfekte dokularda gösterilmesi suretiyle, etkenin indentifikasyonu yanında viral antijenlerin lokalizasyonlarının saptanmasına imkan sağlaması bakımından, immunohistokimyasal metodlar virolojinin vazgeçilmez testlerinden birisidir. Bu çalışmalarda, genel olarak peroksidaz veya alkalin fosfat enzimlerinden birisiyle işaretli anti-primer antikorlar kullanılarak antijen-antikor ilişkisi belirlenmektedir (3, 4, 10, 11). Bu çalışmada ise aynı temel prensiplerle invitro ortamda IBR-Colorado virus suşunun varlığı gösterilmiştir.

Materyal ve Metot

Hücre ve Virus: Madin-Darby Bovine Kidney (MDBK) hücreleri (American Type) Culture Collection, Rockville, MD, USA) %10 Fötal Calf Serumu (Serva Feinbiochemica GmbH, Heidelberg, Germany) içeren Eagl.'s Minimal Essential Media (EMEM) vasatında büyütüldü. Vasat SIGMA Hücre Kültür Kataloğu 1992 (SIGMA Co. St. Louis MO, USA) tarifine göre hazırlandı. Çalışmada IBR virusunun Colorado suşu (Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi) kullanıldı.

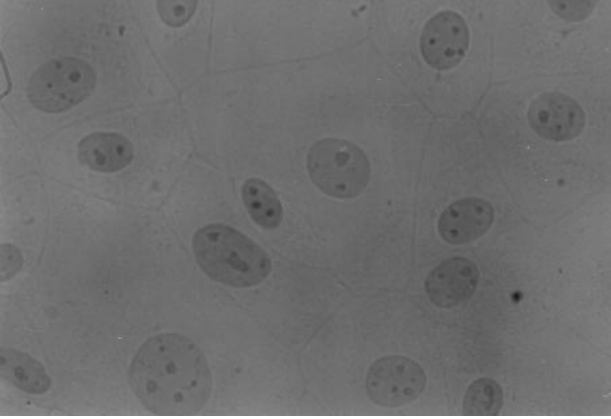
Stok virusun Üretilmesi: IBR-Coloroda suşu, tek

tabaka (monolayer) olmuş MDBK hücrelerine, 1000 hücreye 1 virus gelecek sıklıkta adsorpsiyona bağlı metotla ekildi. 37°C'de 48 saatlik inkubasyondan sonra hücrelerin %80'inde CPE gözlemlendi. Hücre kültür süpernatantı toplandı ve 4°C'de 5000 rpm'de 30 dak. santrifüj edildi. Bu haliyle 1 ml'lik miktarlarda ampüllere taksim edilerek, -196°C (sıvı azot)'de saklandı (12). Daha sonra virusun Doku Kültür Enfeksiyöz Doz 50'i tespit edildi (10).

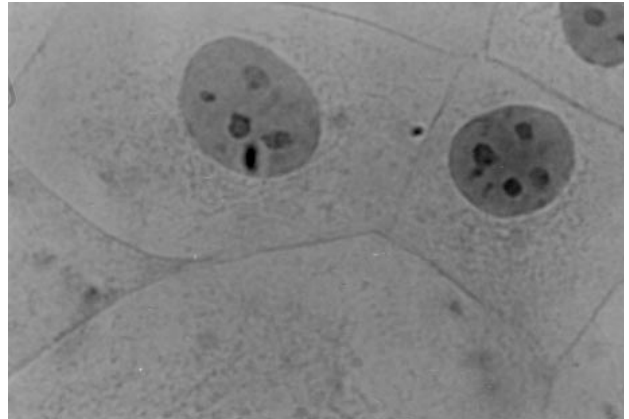
Primer Serumun Hazırlanması: Dişi Balb/C fareleri (Şap Enstitüsü, Ankara) 100 mikrolitre (µl) kısmi saflaştırılmış virus ve eşit miktarda Complete Freud's Adjuvant ile intraperitoneal olarak immunize edildi. Daha sonraki immunizasyon aynı virus miktarıyla bu kez incomplete adjuvant ile 15 gün sonra tekrarlandı. Son immunizasyonda adjuvant kullanılmadı ve intravenöz olarak gerçekleştirildi. Son enjeksiyonu takip eden 4. günde immunize fareden retroorbital yolla alınan kandan serum elde edildi (13). Elde edilen serumda IBR-Colorado virusuna karşı antikorun bulunup bulunmadığı Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA testiyle)'le saptandı (14).

Immunoperoksidaz Metodu: Öncelikle 6 kuyucuklu pleytlerde üretilen MDBK hücresi monolayer oluşturduktan sonra 20 hücreye 1 virus düşecek şekilde enfekte edildi. Enfeksiyondan sonra 2., 3., 4., ...14. saatlerde hücreler +4°C'ye taşınarak enfeksiyon durduruldu. Kontrol hücre olarak kullanılacak enfekte edilmiş hücre de aynı işleme maruz bırakıldı.

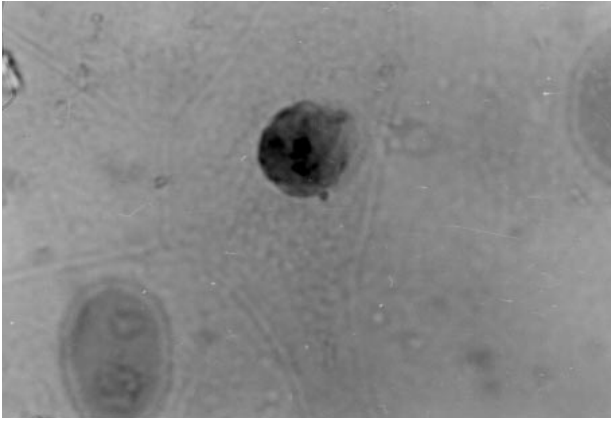
Enfekte hücrelerin immunoperoksidaz ile görüntülenmesi önceden tarif edildiği şekilde yapıldı (15). Kısaca, enfekte ve enfekte olmayan kontrol hücreleri +4°C'ye konularak kısa süreli bekletildi. Hücreler 1 ml %2 paraformaldehit ve %0.1 Triton x -100 içeren fosfatla tamponlanmış fizyolojik tuzlu su (PBS) ile fikse edildi. Endojen peroksidaz ihtimaline karşı hücreler 1 ml %0.3'lük hidrojen peroksit içeren PBS ile muamele edildi. Fikse edilmiş hücreler 4 ml PBS-Tween-20 ile 3 kez yıkandı. Arkasından, özgül olmayan bağlanmayı ortadan kaldırmak amacıyla kuyucuklar 1 ml %3 tavşan serumu içeren PBS ile +4°C'de 30 dak. inkube edildi. Hücreler yıkandı ve kuyucuklara 1 ml 1/200 oranında IBR-Colorado virus suşu ile bağışık fare serumu (Primer serum) ve immun olmayan serum bırakıldı. 1 saat +4°C'de inkubasyon tekrarlandı. Yıkama işlemi yapıldıktan sonra 1/100 oranında peroksidazla işaretli keçi anti - fare IgG (SIGMA Co. St. Louis, MD, USA) konjugatı ilave edilip, inkubasyon gerçekleştirildi. Bu süre sonunda hücreler yıkanarak, kuyucuklara 1'er ml. pH 6'daki 0.1 M sifrat-fosfat tamponunda hazırlanan 5 mg/ml konsantrasyonun-



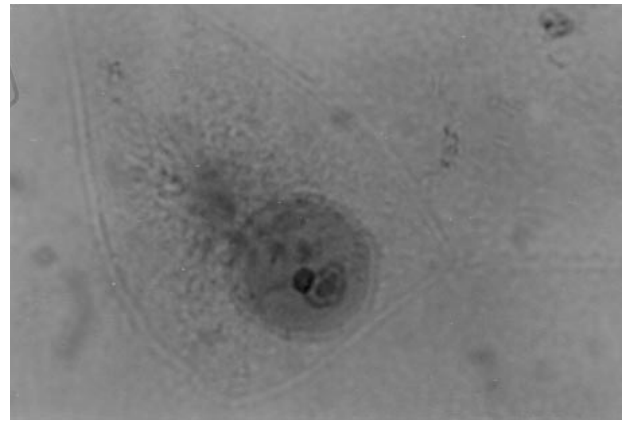
Şekil 1. Enfekte edilmemiş MDBK hücrelerin IBR-immun fare serumla muamelesinden sonra Immunoperoksidaz metoduyla elde edilen mikroskopik görüntüsü (400x).



Şekil 2. IBR virusuyla enfekte edilmiş (8. saat) MDBK hücrelerinin non-immun fare serumuyla maruz bırakılmasından sonra gerçekleştirilen immunoperoksidaz boyamanın mikroskopik görüntüsü (100x).



Şekil 3. IBR virusuyla enfekte edilmiş (3. saatlik enfeksiyon) MDBK hücrelerinin IBR-immun fare serumuyla tekrarlanan immunoperoksidaz metodundan sonraki mikroskopik görüntüsü (100x).



Şekil 4. IBR virusuyla enfekte edilmiş (5. saat) MDBK hücreleri ile IBR-immun fare serumu kullanılarak yapılan immunoperoksidazın mikroskopik görüntüsü (100x).

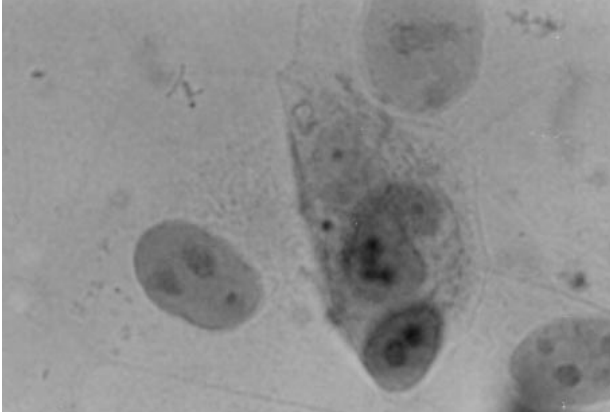
da O-Phenylendiamine (SIGMA. Co. St. Louis, MO, USA) substratı eklendi. Oda ısısında 15 dak. reaksiyonun gelişmesi beklenildikten sonra yıkama tekrarlandı. Arka plan boyamayı sağlamak için 1 ml Mayer Hemotoksileni içinde 15 saniye tutuldu. Boya uzaklaştırıldıktan sonra hücreler 2 ml %90'lık absolüt etanol ile ksilolde 5'er saniye tutuldu. Kanada balzamu konularak lamel kapatılıp mikroskopta incelendi ve mikrografları alındı.

Bulgular

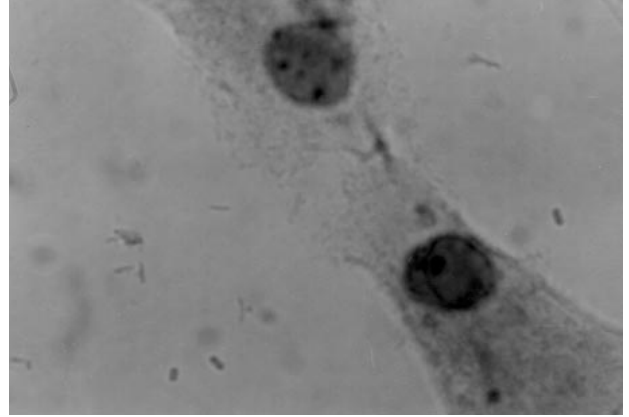
IBR-Colorado virus suşuyla deneysel olarak enfekte edilmiş MDBK hücrelerinde immunoperoksidaz metoduyla yapılmış olan bu çalışmada, virusun antijenik yapılarının farklı enfeksiyon saatlerinde lokalizasyonları kaydedildi. Negatif kontrol olarak kullanılan enfekte edilmemiş hücrelerin IBR-immun fare serumlarıyla muamelesinde

herhangi bir immunohistokimyasal boyama tespit edilemedi (Şekil 1). Diğer bir negatif kontrol olarak kullanılan enfekte hücrelerin bağışık olmayan fare serumuyla muamelesinde sonraki görüntüleme de aynı bulgu saptandı (Şekil 2).

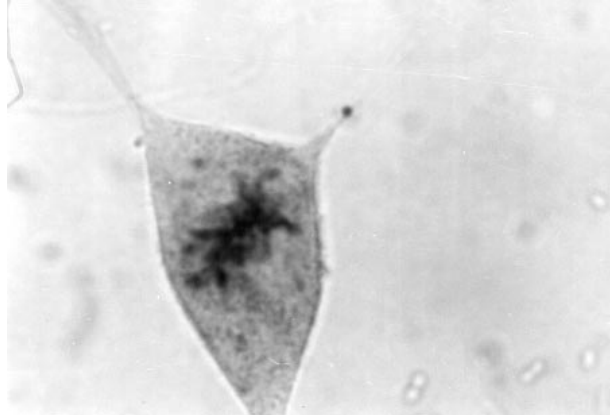
Enfekte hücrelerde ise IBR immun fare serumlarıyla reaksiyonlarda immunoperoksidaz boyamaya özgü boyu kahverengi renk değişimleri görüldü. Enfeksiyon saatlerine göre, gerek renk değişimlerinin hücre içi lokalizasyonları, gerekse buldukları bölgelerde yoğunlukları birbirlerinden farklı bulundu. Enfeksiyonun ilk 3'üncü saatine kadarki renk değişimleri nükleer bölgede görülürken (Şekil 3), bu alanların 4.-8. saatler arasında sitoplazmik bölgede belirginleştiği saptandı (Şekil 4, 5). Bu saatlerde nükleusta da koyu kahverengi alanlar bulunmaktadır ancak, enfeksiyon ilerledikçe sitoplazmik bölgeledeki alanlar daha çok artmıştır. Ayrıca, enfeksiyonun 10. saatinde



Şekil 5. IBR virusuyla enfekte edilmiş (8. saat) MDBK hücrelerinin IBR-immun fare serumuyla muamelesinden sonraki immunoperoksidazda saptanan değişimlerin mikroskobdaki görüntüsü (100x).



Şekil 6. IBR virusuyla enfekte edilmiş (10. saat) MDBK hücreleriyle IBR-immun fare serumu kullanılarak gerçekleştirilen immunoperoksidaz çalışmasının mikroskopik görüntüsü (1000x).



Şekil 7. IBR virusuyla enfekte edilmiş (12. saat) MDBK hücreleriyle IBR-immun fareserumu kullanılarak gerçekleştirilen immunoperoksidaz metodunun mikroskobdaki görüntüsü (1000x).

hücrelerin normal çokgen formlarını kaybederek uzamış bir şekil aldıkları kaydedildi (Şekil 6). Hücre nükleer membranın parçalanarak hücre kromozomların sitoplazmaya dağıldıkları 12. saatde saptandı (Şekil 7). Daha sonraki saatlerde yapılan testlerde enfekte hücrelerin kültür doku kültürü kabında kolayca ayrılması nedeniyle fiksasyon işlemi başarısızlıkla sonuçlandı ve immunohistokimyasal boyama gerçekleştirilemedi.

Tartışma

Virus biyolojisinin aydınlatılmasına yönelik olarak yapılmış olan çalışmalar son yıllarda ağırlık kazanmıştır. Hiç şüphesiz bunun en önemli nedeni virusların en ince ayrıntısına kadar aydınlatılmasına duyulan ihtiyaçtır. Bu çalışmaların başarısıyla birlikte, virus komponentlerinin daha net olarak anlaşılması sağlanacak ve virus identi-

fikasyonu ve tedavide daha iyi başarılar elde edilecektir.

Virus biyolojisi çalışmalarında kullanılan önemli testlerin başlıcaları immunofloresan ve immunohistokimyasal deneylerdir ve bu deneylerin de farklı amaçlara yönelik çeşitleri bulunmaktadır (18, 19). Herpes virüsüne karşı hem dokularda hemde enfekte hücre kültürlerinde hazırlanan preparatlar için yapılmış olan çalışmalarda, herpes virüsüne oluşan enfeksiyonların erken dönemlerinde oluşan antijenik yapıların çoğunluğunun transkripsiyon ile replikasyondan sorumlu oldukları ve nükleusta lokalize oldukları kaydedilmiştir (8, 11, 16, 17). Enfeksiyon saatleri ilerledikçe nükleer antijenler yanında sitoplazmik antijenlerinde görülmeye başladığı ve ilerleyen saatlerde ise miktarın çok arttığı belirtilmiştir. Glikoproteinler haricindeki diğer antijenik yapıların hem nükleusta hem de sitoplazmada bulunabilecekleri saptanmıştır (5, 6, 17).

Bu çalışmanın bulgularına bakıldığında, daha önceki çalışmaların verileriyle uyum içinde olduğu görülmektedir. Enfeksiyonun ilk 3 saatindeki verilerde viral antijenleri nükleusta lokalize oldukları belirlenmiştir. Bunu takibeden 4. saatde lokalizasyon alanları hem nükleus hemde sitoplazmik bölgedir. Ancak, 6. saatten sonraki görüntülerde sitoplazmadaki renk değişim alanlarının daha yaygın ve daha kesif olduğu kaydedilmiştir. Hücrelerin normal formlarını kaybetmeye başlaması 10. saatte, enfekte hücrelerin nükleer membranları parçalanarak hücre kromozomların sitoplazmaya dağılması ise 12. saatte gözlenmiştir. Daha sonraki saatlerde tam anlamıyla bir fiksasyonun sağlanamaması nedeniyle, bu saatlerde görüntüleme yapılamamıştır.

Günümüzde, pekçok virüsün biyolojileri bilinmektedir. Yine, bu virüsler hakkındaki bilgiler gen düzeyine kadar

indirgenebilmiştir. Herbir genin hangi proteini şifrelediği ve bu proteinlerin fonksiyonlarının neler olduğu daha ileri düzeylerde çalışılmaktadır. Ayrıca, viral proteinlerin herhangi bir amino asidindeki değişimin nelerle sonuçlanacağı üzerine çalışmaları da yapılmaktadır. Ancak, ülkemizdeki çalışmaların pekçoğu antijen ve antikor ilişkilerine dayalı teşhis metodları noktasındadır. Şüphesiz bunlar da çok elzemdir, fakat laboratuvarımız için viral biyoloji

çalışmalarının geliştirilmesi açısından ve ileride yeni metodların da bu çalışmalara kanalize edilmesi bakımından yapılan çalışmanın yararlı olduğu kanaatindeyiz.

Bu çalışmada eldeki imkanlar kullanılarak viral biyolojinin çalışılmasına yönelik bir adım atılmıştır. Proteinlere özgül monoklonal antikorların sağlanmasından sonra çalışmaların daha detaylı olarak sürdürülmesi planlanmaktadır.

Kaynaklar

1. Fenner, F.J., Gibbs, E.P., Murphy, F.A.: Herpesviridae; Diseases Caused by Alphaherpes Viruses, Veterinary Virology, 2nd Ed. Academic Press New York, 1993; 338-368.
2. Roizman, B., and Sears, A.E.: Hepresviridae; A Brief Introduction, Fundamental Virology 2nd Ed. Raven Press New York, 841-848, 1991.
3. Jasty, V., Chang, P.W.: Infectious bovine rhinotracheitis virus in bovine kidney cells; sequence of viral production, cellular changes and localization of viral nucleic acid and protein. Am. J. Vet. Res., 1969; 30: 1325-1332.
4. Stevens, J. G., and Groman, N.B.: Infectious bovine rhinotracheitis viral replication, cytophogy, and plaque formation in the presence and absence of nucleic acid. J. Bact., 1964; 87: 446-453.
5. Misra, V., Blumental, R.M., and Baiuk L.A.: Proteins specified by bovine herpesvirus 1 (Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus). J. Virol. 1981; 40: 367-378.
6. Koga, J., Charterjee, S., and Whitley, R.J.: Studies on herpes simplex virus type 1 glycoproteins using monoklonal antibodies. Virology. 1986; 151: 385-389.
7. Holden, V.R., Caugman, G.B., Zhao, Y., Harty, R.N., and O'callaghan D.J.: Identification and characterization of the ICP22 protein of equine herpesvirus 1. J. Virol. 1992; 68: 4329-4340.
8. Van Den Hurk, J.V., Gilchrist, J.E., Misra, V., and Baiuk, L.A.: Interactions of monoclonal antibodies and bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) glycoproteins: characterization of their biochemical and immunological properties. Virology. 1984; 135: 466-479.
9. Navarro, D., Paz, P., and Pereira, L.: Domains of herpes simplex virus glycoprotein B that function in virus penetration cell-to-cell spread and cell fusion. Virology. 1992; 186: 99-112.
10. Burleson, F.G., Chambers, T.M., and Wiedrouk, D.L.: Virology: A Laboratory Manual. Academic Press. Inc. San Diego. CA. A.B.D. 1992.
11. Rodriguez, M., Saurez-Helein, A., Ruiz, M., Metzler, A.E., and Schydel, A.A.: Detection of bovine herpesvirus type 1 via an immunoperoxidase method, using monoklonal antibodies. Am. J. Vet. Res. 1989; 50: 5, 619-621.
12. Rouse, B.T., and Baiuk, L.A.: Host defense mechanism against infectious bovine rhinotracheitis virus in vitro stimulation of sensitized lymphocytes by virus. Infect. Immun. 1974; 10: 681-687.
13. Harlow, E., Lane, D.: Monoclonal Antibodies. Antibodies; A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory. 1988; 209-215.
14. Bolat, Y., Bulut, H., Özdarndeli, A., Doymaz, M.Z.: Development and utilization of an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of anti-infectious bovine rhinotracheitis (IBR) virus antibodies in cattle. F. Ü. Sağlık Bil. Dergisi. 1996. 10: 2, 283-191.
15. Doymaz, M. Z.: Influenza A Virus enfeksiyonun hücre kültüründe Immunohistokimyasal metotla incelenmesi. F.Ü. Sağlık Bil. Dergisi. 1996; 10: 1, 1-7.
16. Smith, G.H., Colling, J.K., and Catman, J.: Use of an immunoperoxidase test for the detection of bovine herpesvirus-1 aborted fetal tissue. J. Vet. Diag. Inv. 1989; 1:1. 39-44.
17. Okazaki, K., Honda, E., Minetoma, T.: Mechanism of neutralization by monoklonal antibodies to different antigenic sites on the bovine herpesvirus type 1 glycoproteins. Virology. 1986; 150: 260-264.
18. Bayer, E., Skutelsy, E., Wilchek, M.: The avidin-iotin complex in affinity cytochemistry. Methods in Enzymology. 62: 308-315.
19. Mishell, B. B., Shiigi, S. M.: Preparation of immunoglobulins for cellular studies. Selected methods in cellular immunology. W.H. Freeman and Company. 1980: 247-269.