

Contagious Ecthyma Virus (ORF) İzolasyonunda FLK-BLV-044 Hücre Kültürünün Kullanılması

Veli Gülyaz¹, Fahriye Saraç¹, Mustafa Hasöksüz², Hüseyin Çakıroğlu¹, Zeynel Arslan¹

¹Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü 34890, İstanbul

²İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji ABD, Avcılar, İstanbul

Geliş Tarihi / Received: 19.02.2016, Kabul Tarihi / Accepted: 29.05.2016

Özet: Bu çalışma, FLK-BLV-044 hücre kültürünün Contagious Ecthyma (CE) enfeksiyonuna yakalanmış kuzu ve oğlaklardan orf virusunun izolasyonunda ilk kez kullanılması amacıyla gerçekleştirilmiştir. Klinik olarak CE lezyonlarına sahip 4 oğlak ve 2 kuzuya ait dudak dokusundan hazırlanan inokulumlar PCR testi ile orf virusuna ait nükleik asitlerin varlığı yönünden test edildi. Örneklerden monolayer FLK-BLV-044 hücre kültürlerine ekimler gerçekleştirildi. Yapılan hücre kültürü ekimlerinin 2. pasajında hücre yuvarlaklaşması ile karakterize sitopatik efekt (CPE) odaklarının oluştuğu saptandı. PCR testi ile izole edilen virusların orf virusu olduğu, üreyen virusların titrelerinin 3 oğlak ve 1 kuzu izolatında DKID₅₀ 10^{5.5} ve 1 kuzu ve 1 oğlak izolatında 10^{5.0}/ml olduğu, yapılan histopatolojik boyamalarda üreyen virusların intrasitoplazmik inklüzyon cisimleri oluşturduğu saptandı. Sonuç olarak, sürekli üretilebilir karakterde olan FLK-BLV-044 hücre kültürünün CE enfeksiyonuna yakalanmış hayvanlardan orf virusunun izolasyonunda kullanılabileceği ortaya konulmuştur.

Anahtar kelimeler: Contagious ecthyma, hücre kültürü, izolasyon, orf virus

The Use of FLK-BLV-044 Cell Culture for Isolation of Contagious Ecthyma Virus (Orf)

Abstract: The aim of this study was to use of FLK-BLV-044 cell culture for isolation of orf viruses from lambs and kids infected with contagious ecthyma virus. For this purpose, the existence of nucleic acid of orf virus was analyzed by PCR test from inoculum prepared from lips clinically infected 4 kids and 2 lambs. Each of the samples were inoculated into FLK-BLV-044 monolayer cell cultures. Cytopathogenic effect (CPE) characterized by rounding of the cells were seen in the second passage of the cell cultures. Isolated viruses were identified as orf virus by PCR test. The titer of viruses were found as 10^{5.5}/ml TCID₅₀ for 3 kids and 1 lamb strains, 10^{5.0}/ml for 1 goat and 1 lamb strains. Intracytoplasmic inclusion bodies were detected in infected cells with H&E staining. In conclusion, it was represented that the FLK-BLV-044 cell cultures, propagated permanently, can be used for isolation of orf virus from infected materials obtained from kids and lambs.

Key words: Cell culture, Contagious Ecthyma, isolation, orf virus

Giriş

Contagious ecthyma (CE) veya contagious pustular dermatitis olarak bilinen orf hastalığı koyun ve keçilerde özellikle kuzu ve oğlaklarda dudak, burun çevresi, ağız mukozası, meme ve meme uçlarında yaygın olarak görülen nonsistemik eruptif deri hastalığıdır [10,14]. Hastalık etkeni Poxviridae familyasının Parapoxvirus genusunda yer alan orf virusudur [14]. CE enfeksiyonunun teşhisinde Elektron mikroskopi, virus izolasyonu, Serum Nötralizasyon Testi, Komplemet Fiksasyon Testi, Agar Jel Immüno Diffüzyon, İmmünperoksidaz, Floresan Antikor

Tekniği, ELISA ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Testleri kullanılmaktadır [5,11,15,18]. Orf virusunun izolasyonu amacıyla primer kuzu ve oğlak hücre kültürleri ile birlikte vero, fetal lamb lung (CSL-503), BHK, MDBK, MDCK gibi devamlı üretilebilen hücre kültürleri kullanılmaktadır [1,4,8,16,17].

Bu çalışma, CE enfeksiyonuna yakalanmış kuzu ve oğlaklardan orf virusunun izolasyonunda sürekli pasajlanabilir cell line FLK-BLV-044 hücre kültürünün kullanılması amacıyla gerçekleştirilmiştir.

Materyal ve Metod

Enfekte doku örnekleri

Çalışmada kullanılan enfekte dudak derisi örnekleri klinik olarak CE lezyonlarına sahip 1-3 aylık 4 oğlak ve 2 kuzudan elde edildi.

Hücre kültürü

CE şüpheli doku örneklerinden orf virusu izolasyonu amacıyla kullanılan FLK-BLV-044 (ovine embryonal kidney cells) (DSMZ No: ACC 153) Almanya DSMZ hücre kültürü koleksiyonundan temin edildi.

İnokulum hazırlanması

Kuzu ve oğlaklardan elde edilen lezyonlu dudak deri örnekleri havan içinde ezilerek virus üretme vasatı içinde homojenatlar hazırlandı. Örnekler 3000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi ve 0,45 µm filtrelerden geçirildi [9].

Doku örneklerinde orf virusunun tespiti

Doku homojenatlarından DNA ekstraksiyonu amacıyla ticari genomik DNA purifikasyon kiti (Promega) kullanıldı. DNA peletleri 50 ml distile su içinde toplandı ve kullanılıncaya kadar -20 °C'de saklandı. Orf virusunun identifikasyonu amacıyla Inoshima ve ark. (2000) tarafından bildirilen semi-nested PCR metodu kullanıldı.[13]

Virus izolasyonu

Flasklarda %10 FCS içeren Dulbecco's MEM/Ham's F-12 (Biochrom) vasatı ile monolayer hücre kültürü hazırlandı (Şekil 2). Hazırlanan örnekler FLK-BLV-044 hücre kültürüne inokule edildi. Hücre kültürleri 37°C'de, %5 CO₂'li etüvde inkubasyona bırakıldı. Her gün inverted mikroskopta sitopatik efekt (CPE) oluşumu yönünden kontrolleri gerçekleştirildi. Hücre kültürlerinde CPE oluşumları gözlenene kadar 5 günde bir kör pasajlar yapıldı ve %75 CPE görülen hücre kültürleri 3 kez dondurulup çözdürüldü. Santrifüj ile temizlenen süpernatantlar kullanılıncaya kadar -80°C'de muhafaza edildi [8, 9].

Virus titrasyonu

Hücre kültüründe CPE oluşturarak üreyen orf viruslarının titrasyonu FLK-BLV-044 hücre kültüründe

Buddle ve ark. [2,3] tarafından bildirilen metotla gerçekleştirildi. Santrifüj işlemi 3000 rpm'de 20 dakika yapılarak hücre kalıntılarında temizlenen virus süspansiyonunun DMEM/Ham's-F12 vasatı içinde 10 katlı dilüsyonu yapıldı. Her dilüsyondan 96 gözlü pleytlerin 4 gözüne 100'er µl kondu ve üzerine 1x10⁴/ml hücre süspansiyonundan 100'er µl eklendi. Pleytler 37°C'de, %5 CO₂'li etüvde inkubasyona bırakıldı ve pleytler CPE oluşumları yönünden 5-7 gün süreyle gözlendi. TCID₅₀ değerleri Karber Metodu ile saptandı.

Hücre kültürlerinde virus üremesinin tespiti

Hücre kültürlerinin histolojik muayenesi

İzole edilen orf viruslarının hücre kültüründe üremesi esnasında oluşturduğu inklüzyon cisimciğinin saptanması amacıyla orf virusu inokulasyonu yapılan FLK-BLV-044 lamel hücre kültüründe Hematoksilen-Eozin (H&E) boyama gerçekleştirildi [7].

Orf virusu varlığının saptanması

Toplanan klinik örnekler ve pozitif kontrolden, viral DNA'nın ekstraksiyonu için, DNAeasy Blood and Tissue Kit (QIAGEN) üretici talimatlarına göre kullanıldı.

PCR reaksiyonu

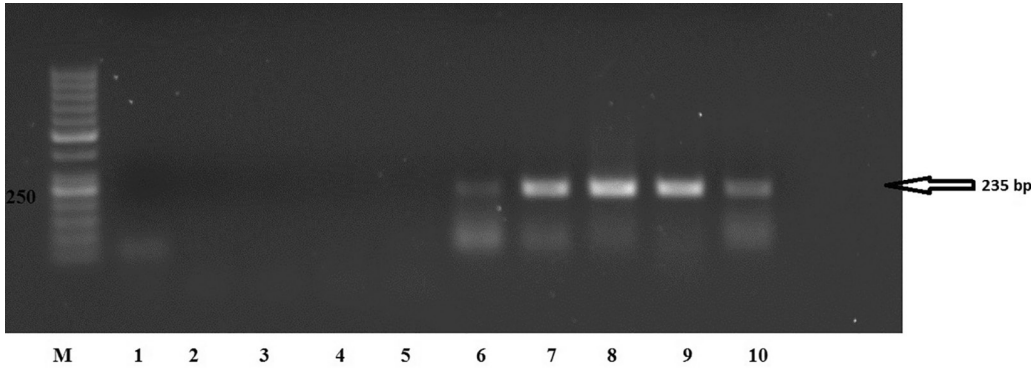
PCR reaksiyonu için Inoshima ve ark. (2000) tarafından bildirilen yöntem uygulandı. PCR ürününün çoğaltılmasında, elde edilen viral DNA'dan 1 mikrogram, toplam 50 µl reaksiyon miktarı için, 0,2 mM her bir primerden (PPP-1 ve PPP-4), 200 mM dNTP, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂ ve 1U Taq DNA polimeraz (Fermentas) kullanıldı.

PCR reaksiyonu için ısı döngü cihazı (Techne TC-412 Thermal Cycler), 95°C'de 9 dk'yı takiben, 94°C'de 1 dk, 55°C'de 1 dk ve 72°C'de 1 dk olacak şekilde 30 siklus şeklinde ayarlandı. Semi nested PCR, ilk reaksiyon sonucu elde edilen 5 µl PCR ürünü ile aynı reaksiyon şartlarında PPP-3 ve PPP-4 primerleri kullanılarak tekrarlandı [13]. PCR ürünlerinin görüntülenmesi, 0,5 µg/ml etidyum bromid içeren %1'lik agaroz jelin elektroforezi ile gerçekleştirildi.

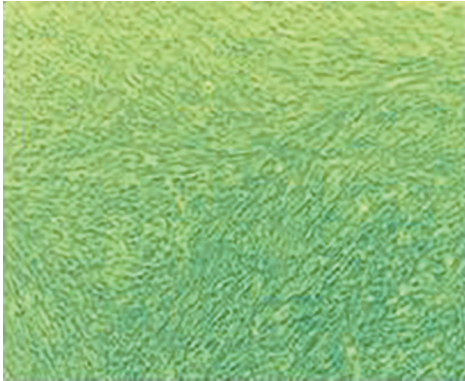
Bulgular

Klinik olarak CE enfeksiyonu belirtileri gösteren 4 oğlak ve 2 kuzu numunesinden hazırlanan homojenatların semi-nested PCR testi ile 235 bp büyüklüğünde ampliconlar elde edildi (Şekil 1). Virus izolasyonu amacıyla hücre kültürüne yapılan inokulasyonlar sonucu hücre kültürlerinin 2. pasajlarında virus üremesine bağlı CPE odaklarının, inkübasyonun 3. gününden itibaren ortaya çıktığı ve 5. günde

%90'a ulaştığı gözlemlendi (Şekil 3). Üreyen virusların titreleri 3 oğlak ve 1 kuzu izolatında $DKID_{50} 10^{5.5}/ml$ ve 1 kuzu ve 1 oğlak izolatında $10^{5.0}/ml$ olarak belirlendi. FLK-BLV-044 hücre kültürlerinde izole edilen 6 izolatın yapılan semi-nested PCR ile orf virusu olduğu (Şekil 3), lamel hücre kültürlerinin histopatolojik boyamalarında üreyen virusların intrasitoplazmik inklüzyon cisimcikleri oluşturduğu tespit edildi (Şekil 4).



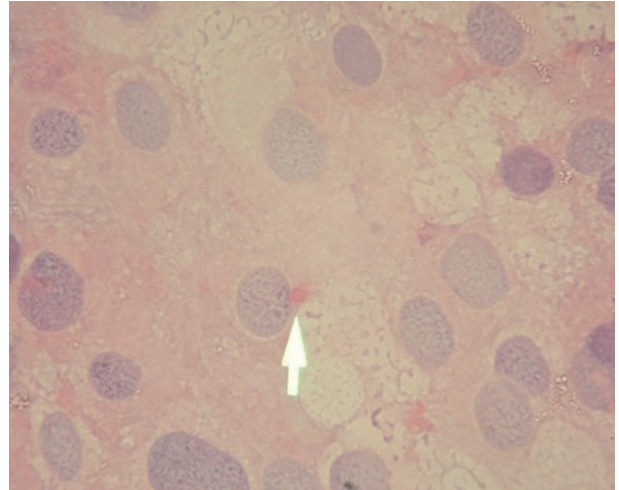
Şekil 1. M: Marker (50 bp), 1-5: 1. PCR (PPP1-PPP4), 6-10: Semi-nested PCR (PPP3-PPP4)



Şekil 2. FLK-BLV-044 hücre kültürü



Şekil 3. Orf virusunun CPE oluşumları



Şekil 4. FLK-BLV-044 hücre kültüründe orf virusuna ait intrasitoplazmik inklüzyon cisimciği

Tartışma

Koyun ve keçilerde CE enfeksiyonunun teşhisi amacıyla son yıllarda PCR kullanılırken, virus izolasyonu metodunun zaman alması ve zahmetli olması nedeniyle yaygın olarak kullanılmamaktadır. Ancak, orf virusunun gerek moleküler gerekse aşı-patojenite çalışmaları amacıyla izolasyon ça-

lışmalarına ihtiyaç duyulmaktadır. Koyun ve keçilerde orf virusunun izolasyonu amacıyla primer ve sürekli hücre kültürleri yaygın olarak kullanılmaktadır [2,3,6,8,12]. Primer hücre kültürleri virus izolasyonları için her ne kadar uygun ise de birçok dezavantaja sahiptirler. Primer hücre kültürlerinin düzenli aralıklarla hayvan dokularından hazırlanması, karakterize edilmesi ve viral kontaminantlar yönünden test edilmeleri de gerekmektedir. Sürekli üretilen hücreler bu dezavantajlara sahip oldukları gibi likit nitrojende kullanılıncaya kadar yıllarca saklanabilirler [16].

Orf virusunun izolasyonu amacıyla yapılan diğer çalışmalarda primer ve sürekli hücre kültürlerinde elde edilen virus titreleri $DKID_{50} 10^{4.5}-10^{7.5}/ml$ olduğu ve virusun 2-3 kör pasajı takiben hücre kültürlerinde yuvarlaklaşma ile karakterize CPE oluşturduğu bildirilmiştir [3,6,8,12] Bu çalışmada, orf virusunun FLK-BLV-044 hücre kültüründe 2. kör pasajda $DKID_{50} 10^{5.5}-10^{5.0}/ml$ titrelerde hücre yuvarlaklaşması ile karakterize üremesinin diğer çalışmalarda elde edilen sonuçlarla benzer olduğu görülmüştür.

Sonuç olarak, bu çalışma ile devamlı üretilen (permanent cell line) hücre hattı olan FLK-BLV-044 hücre kültürünün orf virusu izolasyonu amacıyla kullanılabileceği ortaya konulmuştur.

Kaynaklar

1. Abu Elzein EME, Housavi FMT, (2009). Drastic cutaneous multi-focal orf infection in goats, causing severe dysfunctioning. *Rev Sci Tech Off Int Epiz*, 28(3),1025-1029.
2. Buddle BM, Dellers RW, Schuring GG, (1984 a). Heterogeneity of contagious ecthyma virus isolates. *Am J Vet Res*, 45(1), 75-79.
3. Buddle BM, Dellers RW, Schuring G. G, (1984 b). Contagious ecthyma virus-vaccination failures. *Am. J. Vet. Res*, 45(2), 263-266.
4. Coates JW, Haff S, (1990). Contagious ecthyma: An unusual distribution of lesions in goats. *Can Vet J*, 31, 209-210.
5. Çabalar M, Voyvada H, Sekin S, (1996). Van yöresinde bir sürüde ecthyma contagious (Orf) olgusu. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 43,45-51.
6. De la Concha-Bermejillo A, Guo J, Zhang Z, Waldron D, (2003). Severe persistent orf in young goats. *J Vet Diagn Invest*, 15, 423-431.
7. Ekicioğlu G, Özkan N, Şalvaazar E, (2005). Hematoksilen-Eozin (hematoxylin-eosin) (H&E). *Aegean Pathology Journal*, 2, 58-61.
8. Ergin H, Köklü A, (1974). Ektima virusunun doku kültürlerinde pasajı ve antijenik özelliklerinin incelenmesi. *Pendik Vet Mikrobiyol Derg*, 6(2),12-20.
9. Guo J, Rasmussen J, Wünschmann A, De la Concha-Bermejillo A, (2004). Genetic characterization of orf viruses isolated from various ruminant species of a zoo. *Vet Microbiol*, 99, 81-92.
10. Hawkins CD, Ellis TM, Davis MK, Peet RL, Parkinson J, (1991). An unusual outbreak of contagious ovine ecthyma. *Aust Vet J*, 68, 210-211.
11. Hooser SB, Scherbo G, Morin DE, Whiteley HE, (1989). A typical contagious ecthyma in a sheep after extensive cutaneous thermal injury. *Jaoumo*, 195(9), 1255-1256.
12. Housawi FMT, Abu Elzein EME, Amin MM, Al Afaleg AI, (1991). Contagious pustular dermatitis (orf) infection in sheep and goats in Saudi Arabia. *Vet Rec*, 128, 550-551.
13. Inoshima Y, Morooka A, Sentsui H, (2000). Detection and diagnosis of parapoxvirus by polimerase chain reaction. *Journal of Virological Methods*, 84, 201-208.
14. Mondal B, Bera AK, Hosamani M, Tembhurne PA, Bandyopadhyay SK, (2006). Detection of virus from an outbreak in goats and its genetic relation with other Parapoxviruses. *Vet Res Commun*, 30, 531-539.
15. Nettleton PF, Gilray JA, Yirrell DL, Scott GR, Reid HW, (1996). Natural transmission of orf virus from clinically normal ewes to orf-naive sheep. *Vet Record*, 139, 364-366.
16. Pye D, (1989). Cell lines for growth of sheep viruses. *Aust Vet J*, 66(7), 231-232.
17. Sanchez RL, Hebert A, Lucia H, Swedo J, (1985). A case report with histologic, electron microscopic and immunoperoxidase studies. *Arch Pathol La Med*, 109, 166-170.
18. Zhang K, Lu Z, Shang Y, Zhergld, Jin Y, He J, Liu , (2010). Diagnosis and phylogenetic analysis of orf virus from goats in China. *Virology Journal*,7, 78.