

Contagious Ecthyma (ORF) enfeksiyonu görülen koyun ve kuzularda pestivirus varlığının araştırılması

Veli Gülyaz, Aysel Baca, Fahriye Saraç, Ahmet Sait

Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü 34890, İstanbul

Geliş Tarihi / Received: 09.02.2016, **Kabul Tarihi / Accepted:** 30.05.2016

Özet: Contagious ecthyma (CE), özellikle kuzu ve oğlaklarda yaygın şekilde görülen ve Orf virusu tarafından oluşturulan viral bir enfeksiyondur. Bu çalışma, Sakarya’da bir koyun işletmesinde CE enfeksiyonuna yakalanan koyun ve kuzularda şiddetli dudak ve diş eti lezyonlarının oluşmasında immunosuppressive etki yapan persiste pestivirus varlığının araştırılması amacıyla gerçekleştirildi. Bu amaçla, CE enfeksiyonuna özgü semptomlar gösteren sakız ırkı 18 koyun ve 26 kuzudan kan ve dudak lezyonlarından doku örnekleri alındı. Alınan doku örneklerinde orf virusu ve kanlardan elde edilen lökosit örneklerinde polymerase chain reaction (PCR) ile pestivirus antijen varlığı araştırıldı. Doku numuneleri yapılan semi-nested PCR testi ile orf virusu yönünden pozitif bulunurken aynı hayvanlara ait lökosit örneklerinin nested RT-PCR metodu ile pestivirus nükleik asit varlığı yönünden negatif olduğu saptandı. Sonuç olarak, bu vakada kuzular ve koyunlarda görülen şiddetli CE enfeksiyonunun temelinde pestivirusların etkisinin olmadığı, dudaklarda yoğun olarak görülen lezyonların izole edilen virusların patojenitesinden ve koyunların ırkından kaynaklanabileceği kanaatine varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Contagious ecthyma, koyun, kuzu, orf, pestivirus,

The Determination of Presence of Pestivirus in Sheep and Lambs Infected with Contagious Ecthyma (Orf)

Abstract: Contagious ecthyma (CE), caused by Orf virus is widespread viral infection in young sheep and goats especially in newborn lambs and kids. In a sheep flock, severe lesions of the lips and gums caused by CE virus were detected at 18 of 115 sheep between the 2 and 4 ages and at 26 of 72 lambs during the clinical examination of animals in Sakarya. The aim of this study was to determine the presence of persistent pestiviruses that causes immunosuppressive effect on formation of severe CE lesions in the sheep and lambs. For this purpose, the blood and lip samples were taken from 18 sheep and 26 lambs showing the CE-specific symptoms. For the identification of orf virus, tissue samples leukocyte samples obtained from bloods were tested by PCR to determinate the presence of orf and pestivirus antigens. Orf viruses were determined from all tissue samples obtained lip samples with semi-nested PCR and leukocyte samples were found as negative for the presence of pestivirus nucleic acid by nested RT-PCR test. As a result, in this case, the existence of pestivirus was not found on severe CE infection in lambs and sheep. It was concluded that intensive lesions seen on lips can be connected to pathogenicity of the isolated viruses and caused by the race of sheep.

Key words: Contagious ecthyma, lamb, orf virus, pestivirus, sheep,

Giriş

Contagious ecthyma (CE), Parapoxvirus generi içinde yer alan orf virusu tarafından oluşturulan viral bir enfeksiyondur. CE, özellikle yeni doğan kuzu ve oğlaklar ile genç koyun ve keçilerde yaygın şekilde görülür. CE’ya bağlı lezyonlar özellikle genç kuzu ve oğlaklarda ağız çevresi, dudak, diş etlerinde görülürken, tipik lezyonlar doğum yapmış koyun ve keçilerin memelerinde ve nadiren dudak-diş etlerinde ortaya çıkmaktadır [6].

Koyunlarda pestivirus enfeksiyonları, bovine viral diarrhoea (BVDV) ve border disease virusu

(BDV) tarafından oluşturulan, koyunlarda immunosupresyon gebelik dönemine bağlı olarak yavru atma ve yeni doğan kuzularda; merkezi sinir sistemi bozuklukları, tüylerde dikleşme, normalin altında doğum ağırlığı ve kafatasında değişikliklerle karakterize bulaşıcı viral bir hastalıktır [11,20]

Bu çalışmanın amacı, CE enfeksiyonuna yakalanan koyun ve kuzularda şiddetli dudak ve diş eti lezyonlarının oluşmasında, immunosupresif etkisi yapan persiste pestivirus varlığının araştırılmasıdır.

Materyal ve Metot

Materyal

Çalışmada, orf ve pestivirus tespiti amacıyla, doku ve kan örnekleri Sakarya'da CE enfeksiyonuna yakalanan 2-4 yaş arası sakız ırkı 18 koyun ve 1-2 aylık 26 kuzudan sağlandı.

Metot

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 [10].

Doku örneklerinde Orf virusunun tespiti: Toplanan klinik örnekler ve pozitif kontrolden viral DNA'nın ekstraksiyonu için, DNAeasy Blood and Tissue Kit (QIAGEN) üretici talimatlarına göre kullanıldı. DNA pelletleri 50 µl distile su içinde toplandı ve kullanılmaya kadar -20 °C'de saklandı. Orf virusunun identifikasyonu amacıyla Inoshima ve ark. (2000) tarafından bildirilen semi-nested PCR metodu kullanıldı. [15]

PCR reaksiyonu: PCR reaksiyonu için Inoshima ve ark. (2000) tarafından bildirilen yöntem uygulandı. PCR ürününün çoğaltılmasında, elde edilen viral DNA'dan 1 mikrogram olacak şekilde, 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 dak 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 [15]. PCR ürünlerinin görüntülenmesi, 0,5 µgr/ml etidyum bromid içeren %1'lik agaroz jelin elektroforezi ile gerçekleştirildi. [15]

Lökosit örneklerinde pestivirus varlığının saptanması: Lökosit örneklerinden viral RNA'nın ekstraksiyonu için High Pure Viral Nucleic Acid kit (Roche) kullanıldı. Örneklerle birlikte RNA ekstraksiyonu yapılmış pozitif ve negatif örnekler kullanıldı. Bunun için, RNA ekstraksiyon kontrolü

olarak, BVDV pozitif bir RNA ve su RT-PCR kontrolü olarak kullanıldı.

PCR'da; V324 (5'-ATG CCC WTA GTA GGA CTA GCA - 3') ve V326 (5'-TCA ACT CCA TGT GCC ATG TAC -3') dış primerler, A11 (5'-AGT ACA GGG TAG TCG TCA GTG GTT CG- 3') ve A14 (5'-CAA CTC CAT GTG CCA TGT ACA GCA -3') primerleri iç primerler olarak kullanıldı. Bu primerler, yaklaşık 300 bp ve 200 bp büyüklüğünde fragmentler amplifiye etmektedir.

PCR ürünlerinin elde edilmesi için, McGoldrick ve ark. (1999) tarafından belirtilen yöntemle göre reaksiyon, RT ve PCR basamaklarının tek tüpte birleştirilmesi ve takiben nPCR'ın ayrı bir tüpte yapılması olarak iki basamakta gerçekleştirildi [16]

Birinci basamakta, viral RNA'dan cDNA sentezi ve PCR için Qiagen One step RT-PCR kiti kullanıldı ve RT-PCR reaksiyonu 20 µl olarak hazırlandı. Reaksiyon karışımı, 6 µl RNase free su, 4 µl 5x RT-PCR buffer, 0,8 µl dNTP's, 4 µl Q solution, 1'er µl V324 (20pmoles/ul) ve V326 (20pmoles/ µl) primerleri, 0,8 µl enzim mix olacak şekilde hazırlandı ve bu karışıma 2,4 µl daha önce ekstrakte edilmiş RNA eklendi.

Thermalcycler, cDNA sentezi için; 50°C'de 30 dk 1 siklus, PCR aktivasyonu için; 95°C'de 15 dk 1 siklus ve amplifikasyon için; 35 siklus olacak şekilde, 95°C'de 1'dk, 56°C'de 1 dk 72°C'de 1 dk ve son olarak 72°C'de 10 dk 1 siklus şeklinde programlandı.

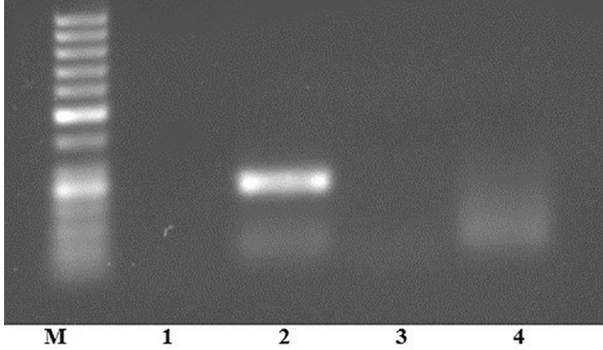
Nested PCR için, PCR Master Mix (2X) kiti (Fermentas) kullanıldı ve reaksiyon karışımı 10 µl 2xMaster Mix, 2'er µl A11(20 Pmoles/ul) ve A14 primerleri, 6 µl RNase free su şeklinde hazırlandı. Bu karışıma 1/10 oranında sulandırılmış birinci basamak reaksiyondan elde edilen 2 µl PCR ürünü eklendi.

Thermalcycler cihazı, 94°C'de 2 dk, 30 siklus olacak şekilde, 94°C'de 1 dk, 56°C'de 1 dk, 72°C'de 1 dk ve son olarak, 72°C'de 5 dk olacak şekilde programlandı.

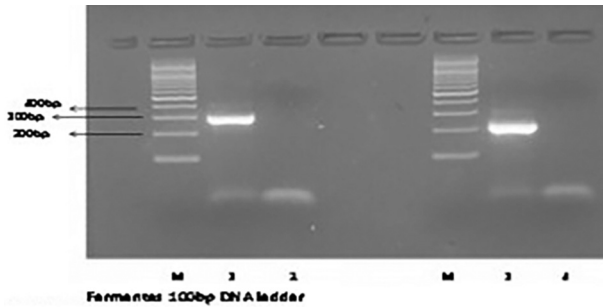
PCR ürünleri, 0,2 µg/ml ethidium bromide içeren %2'lik agar jele, 5 µl yüklendikten sonra elektroforezi yapılarak, UV transimülatörde görüntüledi.

Bulgular

CE enfeksiyonuna yakalanan 18 koyun ve 26 kuzudan sağlanan doku homojenatlarında semi-nested PCR testi 235 bp büyüklüğünde ampikonlar elde edilerek doku örnekleri orf virusu yönünden pozitif olarak bulunurken (Şekil 1), aynı hayvanlara ait lökosit örneklerinin nested RT-ŞPCR metodu ile pestivirus nükleik asit varlığı yönünden yaklaşık 300 bp ve 200 bp büyüklüğünde fragmentler amplifiye edilemedi (Şekil 2).



Şekil 1. Şekilde 1;1: basamak pozitif kontrol, 2;2: basamak pozitif kontrol, 3; 1. basamak negatif kontrol,4; 2 basamak negatif kontrol



Şekil 2. 1. basamak PCR, 1: Pozitif kontrol, 2: Negatif Kontrol; 2. Basamak PCR, 3: pozitif Kontrol, 4: negatif kontrol

Tartışma ve Sonuç

CE enfeksiyonu genç kuzu ve oğlakların dışında ergin koyun ve keçilerde özellikle atipik ve persiste, multifokal, proliferatif lezyonlarla karakterize enfeksiyonlar şeklinde sık sık görülmekte olduğu ve sebep olarak immun yetmezlik ve orf virusun virulensinin etkili olabileceği bildirilmiştir [1,2,14].

Persiste koyun ve keçilerden izole edilen virusların koyun ve keçilerde yapılan patojenite çalışmaları

rında, Orf virus izolatlarının persiste enfeksiyonlar oluşturmasının sebebi olarak en yaygın görüş immun yetmezlik olarak bildirilmektedir [9,17]. Koyun ve keçilerde immun yetmezlik nedenlerinden biri de persiste enfeksiyonlara sebep olan pestiviruslardır.

Koyun ve keçilerde özellikle atipik ve persiste CE enfeksiyonlarının görülmesinde immun sistemi olumsuz etkileyen sebepler arasında, hayvanların bir yerden başka bir yere nakledilmesi [23], mineral madde eksikliği, hayvanların kuru ve sert otlaklarda otlatılması [12], hayvan rasyonlarında bulunan bakır ve demir arasında mineral madde dengesizliği [5] yapılan çalışmalarda bildirilmiştir.

Bu çalışma, CE enfeksiyonuna yakalanan ergin koyun ve bu koyunlara ait kuzularda şiddetli dudak ve diş eti lezyonlarının oluşmasında immunosupresif etki yapan persiste pestivirus varlığının araştırılması amacıyla gerçekleştirilmiş, ancak kuzularla birlikte 3-4 yaş ergin koyunlarda özellikle dudak, diş eti ve meme lezyonlarıyla karakterize CE enfeksiyonu görülen hayvanların lökosit örneklerinde pestivirus varlığı saptanamamıştır.

Sonuç olarak hastalık olgularının vitamin-mineral eksiklikleri, parazit enfestasyonları ve kronik zehirlenmeler yönünden incelenmesinin atipik ve persiste CE enfeksiyonlarının sebeplerinin ortaya konulmasında uygun olacağı kanaatine varılmıştır.

Kaynaklar

1. Abu Elzein EME and 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. (1984a). Heterogeneity orf contagious ecthyma virus isolates. *Am J Vet Res*, 45(1), 75-79.
3. Buddle BM, Dellers RW, Schuring GG. (1984b.) 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 kültüründe pasajı ve antijenik özelliklerinin incelenmesi. *Pendik Vet Mikrobiyol*, 6 (2), 12-20.
9. Gallina L, Scagliarina L, McInnes CJ, Guercio A, Purpari G, Prosperi S, Scagliarini A. 2008. Parapoxvirus in goats: experimental infection and genomic analysis. *Vet Res Common*, 32, 203-205.
10. 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.
11. Hasırcıoğlu S., Kale M., Acar A. (2009). Investigation of pestivirus infections in aborted sheep and goats in Burdur region. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 15(2), 163-167.
12. Hawkins CD., Ellis TM., Davis MK., Peet RL., Parkinson J. (1991). An unusual outbreak of contagious ovine ecthyma. *Aust Vet*, 68, 210-211.
13. Hooser SB., Scherbo G., Morin DE., Whiteley HE. (1989). Atypical contagious ecthyma in a sheep after extensive cutaneous thermal injury. *Jaoumo*, 195(9), 1255-1256.
14. Housawi FMT, Abu Elzein EME, Amin MM, Al Afaleg AI. (1991). Contagious pustular dermatitis (orf) infection in sheep and goats in Saudi Arabia. *Vet Record*, 128, 550-551.
15. Inoshima Y, Morooka A, Sentsui H, (2000). Detection and diagnosis of parapoxvirus by polimerase chain reaction. *Journal of Virological Methods*, 84, 201-208.
16. Mc Goldrick A, Bensaude E, Ibata G, Sharp G, Paton DJ. (1999). Closed one-tube reverse transcription nested polymerase chain reaction for the detection of pestiviral RNA with fluorescent probes. *J Virol Methods*, 79, 85-95.
17. McKeever D. 1984. Persistent orf. *Vet Record*, 29, 334-335.
18. Mondal B, Bera AK, Hosamani M, Tembhumne PA, Bandyopadhyay SK. (2006). Detection of virus from an outbreak in goats and its genetic reletion with other Parapoxviruses. *Vet Res Commun*, 30, 531-539.
19. 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.
20. Peterhans E, Bachofen C, Stalder H, Schweizer M. (2010). Cytopathic bovine viral diarrhea viruses (BVDV): emerging pestiviruses doomed to extinction. *Vet Res*, 41-44.
21. Pye D. (1989). Cell lines for growth of sheep viruses. *Aust Vet J*, 66(7), 231-232.
22. 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.
23. Zhang K, Lu Z, Shang Y, Zhergld , Jin Y, He J. And Liu X. (2010). Diagnosis and phylogenetic analysis of orf virus from goats in china. *Virology Journal*, 7, 78.