

ECTHYMA CONTAGIOSUM VIRUSUNUN (ELMADAĞ) SUŞU) FİZİKSEL VE
KİMYASAL ÖZELLİKLERİ İLE ELEKTRONMİKROSKOPİSİ ÜZERİNDE ARAŞ-
TIRMALAR

İbrahim Burgu*

Asuman Toker**

Studies on the physicochemical characteristics and electronmicroscopic investi-
gation of Elmadağ strain of Ecthyma contagiosum virus

Summary: *Physicochemical characteristics and electronmicroscopic examination of Elmadağ strain of Ecthyma contagiosum virus that was isolated from fetal lamb kidney cell culture were investigated. The virus was also grown in fetal calf kidney cell culture as well as fetal lamb kidney cell culture. But it was not grown on MDBK, BHK-21, HeLa, Vero and MA-104 cell cultures. The infectivity titer of the virus did not show any change at 50 °C but disappeared completely at 60 °C.*

The infectivity titer of the virus decreased at pH 3.0-4.0, but was stabil at pH 6.0-7.0 and 8.0.

The virus did not show and infectivity after treating with aether and chloroform. After treatment with trypsin, the infectivity of virus was decreased about $10^{0.25}/0.1$ ml.

The type of virus was detected as type 1/a by electronmicroscopical examination.

Özet: *Klinik olarak Ecthyma contagiosum semptomları gösteren bir kuzunun gingivasından fotal kuzu böbrek hücre kültüründe izole edilen Ecthyma contagiosum virusunun (Elmadağ suşu) fiziksel ve kimyasal özellikleri ile elektronmikroskopisi incelendi. İzole edilen virus homolog hücre kültürü yanında fotal dana böbrek hücre kültüründe de ürediği halde MDBK, BHK-21, HeLa, Vero ve MA-104 hücre kültürlerinde üremedi. Isı duyarlılık testi sonunda virus, 50 °C de enfeksiyözitesini korumasına karşılık, 60 °C de enfeksiyözitesini tamamen kaybetti.*

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

** Yrd. Doç. Dr., A.Ü. Veteriner Fakültesi, Viroloji Bilim Dalı, Ankara.

Virus pH 3.0 ve 4.0 değerlerinde enfeksiyözitesini kaybetmesine karşın, pH 6.0 - 7.0 ve 8.0 değerlerinde enfeksiyözite gücünü korudu.

Eter ve kloroformdan etkilendi. Tripsinle muamelede ise $10^{0.25}$ /0.1 ml değerinde enfeksiyözite güç kaybına uğradı.

Elektronmikroskopik kontrolde virusun tip 1 a görünümünde olduğu saptandı.

Giriş

Plowright ve ark. (14), ecthyma contagiosum (orf) virusunun koyun ve sığırların böbrek ve testis primer hücre kültürlerinde üreyebildiğini bildirmişlerdir. Liess (9), insan ve koyun orijinli ecthyma contagiosum viruslarını dana testis hücre kültürlerinde izole ettiğini ve bu kültürlerde seri pasajlarının yapılabildiğini belirtmiştir. Precausta ve Stellman (15), kuzu böbrek primer hücre kültürlerinde ecthyma contagiosum virusunu izole ve idantifiye ettiklerini bildirmişlerdir. Nagington ve Whittle (12), ecthyma contagiosum virusunun insan amnion primer hücre kültürlerinde ve maymun böbrek hücre kültüründe üreyebildiğini, buna karşılık insan orijinli HeLa hücre kültüründe üremediğini belirtmişlerdir. Nagington (11) ise koyundan izole edilen ecthyma contagiosum virusunun başlangıçta yalnızca koyun orijinli hücre kültürlerinde üreyebildiğini bildirmiştir.

Türkiye'de ecthyma contagiosum virusunun ilk izolasyonu Ergin ve Köklü (5) tarafından koyun troid hücre kültürlerinde gerçekleştirilmiştir. Aynı araştırmacılar (5), izole ettikleri virusu kuzu ve dana böbrek hücre kültürlerine de adapte etmişlerdir.

Burgu ve Toker (4), kuzu orijinli ecthyma contagiosum virusunu fetal kuzu böbrek (FKB) hücre kültürlerinde izole ettiklerini bildirmişlerdir.

Berkin ve ark. (2) ise doku kültürlerinde virus izolasyonu yapılmaksızın, klinik olarak ecthyma contagiosum tanı koyunlardan elde ettikleri materyallerden yaptıkları deneysel transmisyon çalışmalarında başarılı sonuç aldıklarını bildirmişlerdir.

Ecthyma contagiosum virusu ısıya karşı oldukça dayanıklıdır (16). Precausta ve Stellman (15), izole ve idantifiye ettikleri ecthyma contagiosum virusunun 50 °C'de 30 dakika süreyle stabil olduğunu bildirmişlerdir. Robinson ve Balassu (16), Sawhney, Buxton ve Fra-

ser'in bulgularına dayanarak virusun 60 °C de 30 dakikada enfeksiyözitesini tamamen kaybettiğini, 55 °C de 30 dakika sonra enfeksiyözite gücünde kayıplar olduğunu belirtmişlerdir.

Ecthyma contagiosum virusunun pH duyarlılığı üzerinde sınırlı sayıda araştırmacı çalışmıştır. Bu araştırmacılar Precausta ve Stellman (15), virusun pH 3 değerinde çok duyarlı olduğunu ve enfeksiyözite yönünden oldukça fazla etkilendiğini bildirmişlerdir.

Precausta ve Stellman (15), ecthyma contagiosum virus suşlarının oda derecesinde 30 dakika süre ile yağ eriticilerinden eterle karşılaştırıldıklarında enfeksiyözite güçlerinde $10^{1.5}$ - $10^{2.5}$ azalma meydana geldiğini, aynı virus suşlarının aynı süre ve ısı derecesinde klorofomla karşılaştırıldıklarında ise enfeksiyözite güçlerinin 10^4 oranında azalabildiğini belirtmişlerdir.

Rolle ve Mayer (17), ecthyma contagiosum virusunun tripsin enzimi ile karşılaştırıldığında yapısının bozulduğunu bildirmişlerdir.

Ecthyma contagiosum virusunun elektron mikroskopisi üzerinde çeşitli araştırmacı çalışmışlardır (7, 13). Nagington ve Horne (13), elektron mikroskopta ecthyma contagiosum virusunun iki ayrı form da görülebildiğini, bu formlardan tip 1 a olarak isimlendirdikleri formun en çok rastlanan form olduğunu diğer tip 1 b, tip 2 a ve tip 2b'nin ise daha az görüldüğünü ve gerek iç strüktür, gerekse dış görünüm olarak tip 1 a'dan büyük farklar gösterdiklerini belirtmişlerdir. Aynı araştırmacılar (13), virusun elektron mikroskopta görünümü ile konakçı arasında ilişki olmadığını, iki insan ve koyun orijinli ecthyma contagiosum viruslarının elektron mikroskopta aynı partikül yapısını gösterdiklerini bildirmişlerdir.

Bu araştırma, Burgu ve Toker (4) tarafından klinik olarak ecthyma contagiosum semptomları gösteren bir kuzunun gingivasındaki lezyonlardan izole ve idantifiye edilen ecthyma contagiosum (Elmadag) virus suşunun fiziko-kimyasal özellikleri ile elektron mikroskopik yapısını araştırmak amacıyla yapılmıştır.

Materyal ve Metot

Virus: Araştırmada kullanılan virus, FKB hücre kültürü 17. pasajdan elde edilmiştir (DKID₅₀: $10^6/0.1$ ml).

Hücre kültürü: Virus suşunun fiziko-kimyasal özelliklerinin araştırılması ve elektron mikroskopik kontrol amacıyla virusun üretilmesi

için % 20 inaktif dana serumlu Hanks vasatında üretilen FKB hücre kültürleri kullanılmıştır. Virus suşunun farklı hücre kültürlerinde üretilme denemelerinde ise fetal dana böbrek (FDB), Vero, HeLa, BHK-21, ve MA-104 hücre kültürlerinden yararlanılmıştır. Hücre üretme vasatı olarak FDB hücre kültürü için % 20 inaktif dana serumlu Hanks vasatı, diğer hücre kültürleri için ise % 10 inaktif dana serumlu Eagle MEM vasatı kullanılmıştır.

Virus inokulasyonu: İzole edilen ecthyma contagiosum virusunun farklı hücre kültürlerinde üretilme denemeleri adsorbsiyona bağlı yöntemle gerçekleştirilmiştir. Her hücre sisteminde 8 pasaj yapılmıştır. Virus üretme vasatı olarak yarı yarıya karıştırılmış % 5 fetal dana serumlu Earle + Eagle MEM vasatı kullanılmıştır.

Fiziko-kimyasal reaksiyonlar: İzole edilen virusun ısı duyarlılık ile eter ve kloroform duyarlılık testleri Akashi ve ark. (1)'nin; pH ve tripsin duyarlılık testleri de Burgu (3) nun bildirdiği yöntemlerle yapılmıştır. Isı, pH, eter, kloroform ve tripsin duyarlılık testlerinin saptanmasına esas teşkil eden enfeksiyözite güç kontrolleri için mikrotitrasyon (6), enfeksiyözite güç değerlendirmesi için ise Kaerber (8) yönteminden yararlanılmıştır.

İzole edilen virusun elektron mikroskopik kontrolü amacıyla virus FKB hücre kültüründe üretildikten sonra, hücreler 2000 devirde 10 dakika santrifüj edilerek çöktürülmüştür. Dipte oluşan hücre sedimenti elektron mikroskopik kontrol amacıyla bir damla distile su ile sulandırılarak Poly-L-Lysine ile kaplanmış karbonlu gridler üzerine damlatılmıştır. Gridler daha sonra fosfotungustik asit ile boyanarak E.M. 9 Zeiss elektronik mikroskopta kontrol edilmiştir (10).

Bulgular

Ecthyma contagiosum (Elmadağ) virus suşunun çeşitli hücre kültürlerinde yapılan inokulasyon denemeleri sonunda yalnızca FKB ve FDB hücre kültürlerinde sitopatolojik efekt oluşturduğu tesbit edilmiştir.

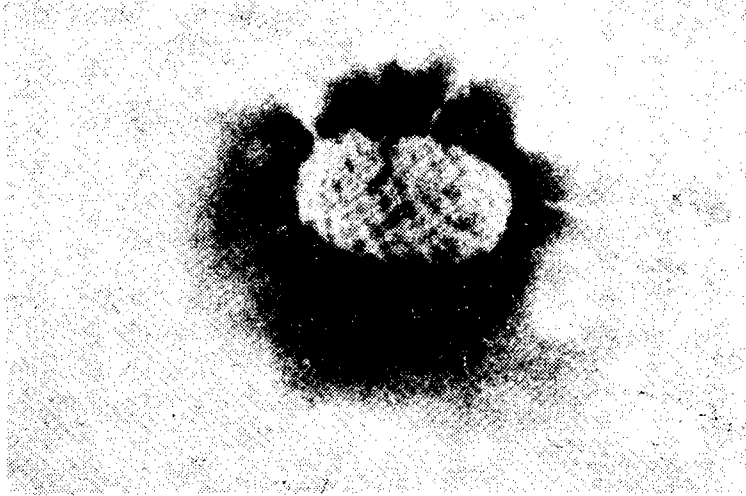
Isı duyarlılık testinde virus 50 °C de 1 saat bekletildiğinde kontrol virusa oranla (DKID₅₀: 10⁶/0.1 ml) herhangi bir enfeksiyözite kaybı saptanamamış (DKID₅₀: 10⁶/0.1 ml), buna karşılık 60 °C'de ise bir saatlik süre sonunda enfeksiyözite gücünün tamamen kaybolduğu tesbit edilmiştir.

pH duyarlılık testinde virusun pH 3.0 ve pH 4.0 de enfeksiyözite gücünün bulunmadığı; pH 6.0, pH 7.0, pH 8.0'de ise enfeksiyözite gücünde kontrol virusa oranla herhangi bir azalma olmadığı saptanmıştır.

Eter ve kloroform duyarlılık testi sonucunda virusun klorofomla karşılaştırıldığında enfeksiyözite gücünü tamamen kaybettiği, eterle karşılaştırıldığında ise enfeksiyözite gücünde kontrol virusa oranla (DKID₅₀: 10⁶/0.1 ml) büyük ölçüde azalma olduğu (DKID₅₀: 10²/0.1 ml) gözlenmiştir.

Tripsin duyarlılık testi sonunda ise virusun enfeksiyözite gücünde kontrol virusa oranla 10^{0.25} değerinde bir azalmanın olduğu tesbit edilmiştir.

Elektron mikroskopik kontrolde virusun tip 1 a görünümünde olduğu saptanmış ve iç yapısı belirgin şekilde gözlenmiştir (Şekil 1).



Şekil 1. Ecthyma contagiosum virusu (Elmadağ suşu). Elektronmikroskopik görünüm.
x 84 000.

Figure 1. Ecthyma contagiosum virus (Elmadağ strain). Electronmicroscopical appearance. x 84 000.

Tartışma ve Sonuç

Ecthyma contagiosum virusu üreme yönünden geniş bir hücre spektrumuna sahip olup, koyun (5, 14), sığır (9, 14), maymun (12), insan amnion primer hücre kültürü (12) gibi hücre kültürlerinde üretilmiştir. Bu çalışma da izole edilen virus FKB ve FDB hücre kültürlerinde üretilmiş buna karşılık MDBK, BHK-21, HeLa ve maymun hücre kültürlerinden Vero ve MA-104'de üretilmemiştir.

Nagington (11), koyunlardan izole edilen ecthyma contagiosum virusunun başlangıçta sadece koyun hücre kültürlerinde ürettiğini, devamlı pasajlar ile heterolog hücre kültürlerinde de üreyebildiğini belirtmiştir. Ergin ve Köklü (5) ise koyun troid hücre kültürlerinde izole ettikleri ecthyma contagiosum virusunu, daha sonra troid kültürlerinde pasajlamak suretiyle dana böbrek hücre kültürlerinde adapte ettiklerini bildirmişlerdir.

Bu çalışmada da bir kuzunun gingivasından FKB hücre kültürlerinde izole edilen virus, devamlı pasajlara gereksinim göstermeksizin FDB hücre kültüründe ilk inokulasyonda, FKB hücre kültüründeki titreyle üreme göstermiştir.

Precausta ve Stelman (15), izole ettikleri ecthyma contagiosum virusunun 5 farklı suşunun 50 °C'de 30 dakika süreyle ısı duyarlılık testi uygulanması sonunda enfeksiyözite güçlerinin değişmediğini bildirmişlerdir. Robinson ve Balassu (16), Sawhney, Puxton ve Fraser'e atfen ecthyma contagiosum virusunun 60 °C'de 30 dakika da enfeksiyözite gücünü tamamen kaybettiğini, 55 °C'de ise 30 dakika sonra enfeksiyözite gücünde kayıplar olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmada ise izole edilen ecthyma contagiosum (Elmadağ) virus suşunun ısı duyarlılık testi sonucunda Precausta ve Stelman (15)'in bildirdikleri, 50 °C'lik ısıda 1 saat tutulduğunda dahi inaktive olmadığı, buna karşılık Robinson ve Balassu (16)'nın Sawhney, Buxton ve Fraser'e atfen bildirdikleri gibi 60 °C'de ise enfeksiyözite gücünü tamamen kaybettiği saptanmıştır.

pH duyarlılık testi sonuçlarına göre izole edilen ecthyma contagiosum (Elmadağ) virus suşunun Precausta ve Stelman (15)'in bildirdiği pH 3 değerinde enfeksiyözite gücünü kaybetmesi yanında, pH 4'de de enfeksiyözitesinin tamamen kaybolduğu, pH 6, pH 7 ve pH 8 değerlerinde ise enfeksiyözite gücünde kontrol virusa oranla herhangi bir değişme olmadığı tesbit edilmiştir.

Yağ eriticilerinden eter ve kloroforma karşı duyarlılık araştırması sonucunda virusun Precausta ve Stellman (15)'in bildirdiği gibi etere, kloroforma oranla daha az duyarlı olduğu görülmüştür.

Rolle ve Mayer (17), tripsin enzimi ile ecthyma contagiosum virusunun karşılaştırıldığında parçalandığını ve enfeksiyözite gücünü kaybettiğini bildirmişlerdir. Yapılan bu çalışmada ise Rolle ve Mayer (17)'in bildirdiklerinin aksine virusun enfeksiyözite gücünün devam ettiği, meydana gelen enfeksiyözite güç kaybının kontrol virusa oranla $10^{0.25}/0.1$ ml değeri gibi önemsiz bir güç kaybı olduğu tesbit edilmiştir.

Elektron mikroskoptaki kontrol sonunda kuzudan izole edilen bu virusun tip 1/a yapısında olduğu, Güneş ve ark. (7)'nin insandan izole ederek elektron mikroskopik olarak tipini tesbit ettikleri ecthyma contagiosum virusu ile aynı morfolojik yapıyı gösterdiği saptanmıştır. Bu durum Nagington ve Horne (13)'nun da iki insan ve bir koyun orijinli ecthyma contagiosum virus suşları arasında saptadıkları morfolojik ayrılığın bulunmadığı görüşü ile de uyum göstermektedir.

Sonuç olarak ecthyma contagiosum klinik semptomları gösteren bir kuzunun dış etinden izole edilen ecthyma contagiosum (Elmadağ) virus suşunun bazı araştırmacıların (11), bildirdiğinin aksine heterolog hücre kültürlerinde üretilmesinde seri pasajlara gereksinim göstermediği fiziko-kimyasal özellikleri daha önce çeşitli araştırmacılar (15) tarafından araştırılan ecthyma contagiosum virusları ile karşılaştırıldığında ısı duyarlılık yönünden virusun daha stabil olduğu, ayrıca tripsine duyarlı olduğu bildirilen ecthyma contagiosum virusunun bu çalışmada duyarlılık göstermediği saptanmıştır.

Diğer taraftan ise bu çalışma, Türkiye'de hücre kültürlerinde üretilen virusların elektron mikroskopik kontrolleri yönünden yeni bir metot uygulanmasına imkan sağlamış ve Güneş ve ark. (7)'nden sonra hayvansal kökenli ecthyma contagiosum virusunun Türkiye'de ilk elektronmikroskopik çalışmasını ortaya koymuştur.

Literatür

1. Akashi, H., Inaba, Y., Miura, Y., Tokuhisa, S., Sato, K. and Satoda, K. (1980). *Properties of a coronavirus isolated from a cow with epizootic diarrhoea*. Vet. Microbiol. 5: 265-276.

2. **Berkin, Ş., Kahraman, M., Hazıroğlu, R., İzgür, M. ve Yonuş, A.D.** (1985). *Enzootik Ecthyma Contagiosum ovis-Necrobacillosis*. A.Ü. Vet. Fak. Derg. 32 (1): 157-171.
3. **Burgu, İ.** (1979). *Koyunlarda abort yapan orbivirüsler dahil bir serotipin özellikleri ile Türkiye'deki durumu üzerinde araştırmalar*. A.Ü. Vet. Fak. Derg. 26 (3-4): 135-150.
4. **Burgu, İ. ve Toker, A.** (1984). *Bir kuzunun dış etinden Ecthyma Contagiosum (orf) virüsü izolasyonu*. A.Ü. Vet. Fak. Derg. 31 (2): 230-239.
5. **Ergin, H. ve Köklü, A.** (1973). *Ektima virüsünün doku kültürlerinde pasajı ve antijenik özelliklerinin incelenmesi*. Pendik Vet. Bakt. Serol. Enst. Derg. 5 (2): 12-20.
6. **Frey, H.R. und Liess, B.** (1971). *Vermehrungs kinetik und verwendbarkeit einer stark zytopathogenen VD-MD virusstammes für diagnostische Untersuchungen mit der Mikrotiter-Methode*. Zbl. Vet. Med. 18: 61-71.
7. **Güneş, A.T., Gezen, C., Kapdağlı, H. und Marschall, H.J.** (1982). *Ecthyma Contagiosum Epidemien in der Türkei*. Der Hautarzt 33: 384-387.
8. **Kaerber, G.** (1964). *In diagnostic procedures for virus and rickettsial disease*. Public Health Assn. (New York), 3: 48-50.
9. **Liess, B.** (1962). *Beobachtungen und Untersuchungen über den Lippengrind (Ecthyma contagiosum) der Schafe als Zoonothroponose*. Zentbl. Bakt. 185: 289-304.
10. **Menzies, J.** (Personal communication) Moredun Research Institute Dep. Electron Microscopy.
11. **Nagington, J.** (1968). *The growth of paravaccinia viruses in tissue culture*. Vet. Rec. 82: 437-482.
12. **Nagington, J. and Whittle, C.H.** (1961). *Human orf: Isolation of the virus by tissue culture*. Br. Med. J. 2: 1324-1326.
13. **Nagington, J. and Horne, R.W.** (1962). *Morphological studies of orf and Vaccinia viruses*. Virology 16: 248-260.
14. **Plowright, W., Whitcomb, M.A. and Ferris, R.D.** (1959). *Studies with a strain of contagious pustular dermatitis virus in tissue culture*. Arch. ges. Virusforsch. 9: 214-231.
15. **Precausta, P. and Stellman, C.H.** (1973). *Isolation and comparative study "in vitro" of five strains of contagious ecthyma of sheep*. Zbl. Vet. Med. 20: 340-355.
16. **Robinson, A.J. and Balassu, T.C.** (1981). *Contagious pustular dermatitis (orf)*. Vet. Bull. 51 (10): 771-782.
17. **Rolle, M. und Mayr, A.** (1966). *Microbiologie und Allgemeine seuchenlehre*. Ferdinand Enke Verlag Stuttgart.