

JERZY ROLA, JAN ŻMUDZIŃSKI

# Analiza restrykcyjna wariantów fenotypowych wirusa BHV 1

Zakład Wirusologii Instytutu Weterynarii, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

## Summary

### Analysis of restriction enzymes of phenotype variants of the BHV 1

Restriction enzyme analysis has been done for the DNA Agille and III/3 strains of the BHV 1 virus, and variants selected from these strains after neutralization with polyclonal antibodies. It has been shown that the electrophoretic pattern of DNA of the 8/-2 variant which was selected from the Agille strain and which has had higher resistance to neutralization to antibodies has been identical to the electrophoretic pattern of the Agille parent strain. This may suggest that the higher resistance to neutralization of the 8/-2 variant has been a result of phenotype variability. No difference between electrophoretic patterns of the III/3 strain and variants III/3D and III/3H has been discovered. Digestion with Hind III, Pst I, Bam HII, Eco RI enzymes differentiate the Agille and III/3 strain.

Celem tej części pracy było sprawdzenie przy pomocy analizy restrykcyjnej wirusowego DNA, czy zanotowana zwiększona oporność na neutralizację przeciwciałami swoistymi wyselekcjonowanych wariantów, wynika ze zmian fenotypowych czy też genotypowych. W tym celu otrzymane DNA wariantów, trawiono wybranymi enzymami restrykcyjnymi i

porównywano szablony elektroforetyczne ich DNA z szablonami elektroforetycznymi DNA szczepów macierzystych.

## Materiał i metody

Szczepy wirusowe: badaniom poddano szczepy Agille i III/3 wirusa BHV 1 wyizolowane z nasienia zakażonych buhajów oraz warianty 8/-2, III/3D, III/3M wyselekcjonowane poprzez namnażanie ww. szczepów w obecności swoistych przeciwciał poliklonalnych. Ekstrakcja i precipitacja wirusowego DNA: jednowarstwową hodowlę komórek linii ciągłej tchawicy bydła (TR) zakażano poszczególnymi szczepami terenowymi wirusa BHV 1 lub wyselekcjonowanymi wariantami przy współczynniku wielokrotności zakażenia 0,1-1. Zbiór wirusa dokonywano po 24 godz. przy 100% efekcie cytopatycznym. Uzyskany materiał wirusowy wirowano wstępnie przy 2400×g przez 30 min. Zebrany supernatant ultrawirowano przez 40% „poduszkę” sacharozową przy 100 000×g przez 120 min. w 4°C. Peletkę zawieszano w buforze TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) pH 8,0. Tak oczyszczony wirus traktowano proteinazą K (0,1 mg/ml) i 0,5% SDS (stężenie końcowe) przez 1 godz. w 37°C, a następnie dokonywano 2-krotnej ekstrakcji DNA mieszaniną fenol:chloroform (1:1). Resztki fenolu usuwano mieszaniną chloroform:alkohol izoamylowy (24:1). DNA precipitowano dodając do próbki 2 objętości etanolu i 1/10 objętości 3M octanu sodu (pH 5,2). Próbkę przetrzymywano w temp. -20°C przez noc. Wytrącone DNA osadzano przez wirowanie przy 15 000×g przez

Tab. 1. Porównanie szablonów elektroforetycznych szczepów macierzystych Agille, III/3 i wariantów wyprowadzonych z tych szczepów po trawieniu enzymami Hind III i Pst I

Fragmenty (kbp)	Hind III					Pst I				
	Agille	8/-2	III/3	III/3D	III/3M	Agille	8/-2	III/3	III/3D	III/3M
A	23	23	23	23	23	8,8	8,8	8,8	8,8	8,8
B	22	22	22	22	22	7,5	7,5	—	—	—
C	19	19	—	—	—	7,3	7,3	7,3	7,3	7,3
D	17,5	17,5	17,5	17,5	17,5	6,8	6,8	6,8	6,8	6,8
E	—	—	16	16	16	6,4	6,4	6,4	6,4	6,4
F	15	15	15	15	15	5,3	5,3	5,3	5,3	5,3
G	13	13	13	13	13	—	—	5,0	5,0	5,0
H	9,4	9,4	9,4	9,4	9,4	4,6	4,6	—	—	—
I	—	—	8,6	8,6	8,6	—	—	4,4	4,4	4,4
J	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	4,2	4,2	4,2	4,2	4,2
K	7,7	7,7	—	—	—	3,9	3,9	3,9	3,9	3,9
L	3,9	3,9	3,9	3,9	3,9	—	—	3,7	3,7	3,7
Ł	2,7	2,7	—	—	—	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
M	—	—	2,5	2,5	2,5	3,25	3,25	—	—	—
N						2,8	2,8	2,8	2,8	2,8
O						2,6	2,6	2,6	2,6	2,6
P						2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Q						2,45	2,45	—	—	—
R						2,35	2,35	2,35	2,35	2,35
Liczba fragment.	11	11	11	11	11	16	16	15	15	15

Tab. 2. Porównanie szablonów elektroforetycznych szczepów macierzystych *Agille*, III/3 i wariantów wyprowadzonych z tych szczepów po trawieniu enzymami Bam HI i Eco RI

Fragmenty (kbp)	Bam HI					Eco RI				
	<i>Agille</i>	8/-2	III/3	III/3D	III/3M	<i>Agille</i>	8/-2	III/3	III/3D	III/3M
A	–	–	27	27	27	–	–	28	28	28
B	25	25	–	–	–	27	27	–	–	–
C	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23
D	21	21	21	21	21	22	22	–	–	–
E	–	–	19,5	19,5	19,5	18,5	18,5	–	–	–
F	17,5	17,5	17,5	17,5	17,5	–	–	17,5	17,5	17,5
G	13,5	13,5	–	–	–	14	14	–	–	–
H	13	13	13	13	13	–	–	13,5	13,5	13,5
I	4,9	4,9	–	–	–	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5
J						–	–	2,9	2,9	2,9
Liczba fragment.	7	7	6	6	6	6	6	6	6	6

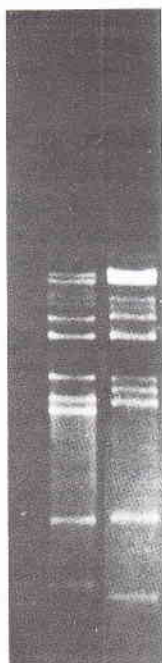
15 min. w temp. 4°C. DNA po dokładnym wysuszeniu rozpuszczano w buforze TE.

Enzymy restrykcyjne: do badań użyto następujących enzymów restrykcyjnych: Hind III, Pst I, Bam HI, Eco RI, wszystkie o koncentracji 8-12 U/ul. Do trawienia używano około 1 µg DNA badanych szczepów oraz 8-12 U odpowiedniego enzymu restrykcyjnego. Mieszaninę DNA i enzymu inkubowano 2 godz. w temp. 37°C. Następnie do mieszaniny tej dodawano roztworu obciążającego (0,25% błękit bromofenolowy, 60% sacharoza) i całość ogrzewano w 65°C przez 10 min.

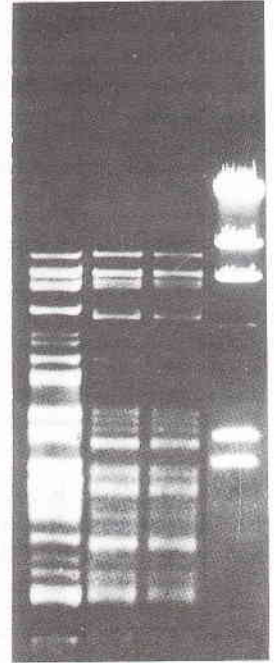
Elektroforeza DNA w żelu agarozowym: próbki DNA szczepów *Agille*, III/3 oraz wariantów wyprowadzonych z nich, uzyskane po trawieniu wybranymi enzymami restrykcyjnymi, nanoszono na 0,6% żel agarozowy. Elektroforezę prowadzono w buforze TAE (0,04 M Tris-acetate, 0,001M EDTA) pH 8,0 przy stałym napięciu 45V przez 4-5 godz. Po zakończeniu elektroforezy żel barwiono w bromku etydyny (1 µg/ml) przez 30 min., a następnie fotografowano w świetle UV przy długości fali 260 nm. Jako marker długości łańcucha nukleotydowego używano DNA faga lambda trawiony enzymem Hind III.

### Wyniki i omówienie

Wyniki ilustrujące porównanie szablonów elektroforetycznych DNA, po trawieniu wybranymi enzymami restrykcyjnymi, szczepów macierzystych *Agille* i III/3 z szablona DNA wariantów wyprowadzonych z tych szczepów przedstawiono w tabelach 1 i 2. Po trawieniu enzymem Hind III DNA szczepów macierzystych i wyselekcjonowanych wariantów cięte było na 11 fragmentów, a długości poszczególnych fragmentów DNA szczepów macierzystych i wariantów były identyczne (tab. 1, ryc. 1). Stwierdzono natomiast różnice w szablona elektroforetycznych DNA szczepów wyjściowych *Agille* i III/3. Szablon elektroforetyczny szczepu *Agille* posiadał fragmenty C-19 kbp, K-7,7 kbp i L-2,7 kbp. Z kolei DNA szczepu III/3 posiadał fragmenty E-16 kbp, I-8,6 kbp i M-2,5 kbp, nieobecne w DNA szczepu *Agille*.



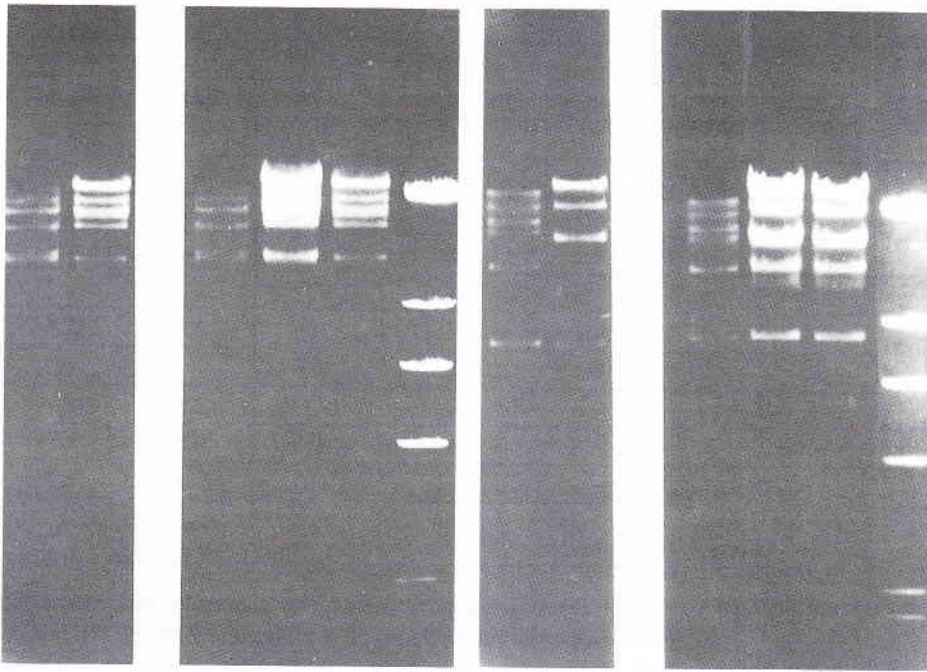
Ryc. 1. Szablon elektroforetyczny szczepów macierzystych *Agille*, III/3 i wariantów 8/-2, III/3D, III/3M po trawieniu enzymem Hind III



Ryc. 2. Szablon elektroforetyczny szczepów macierzystych *Agille*, III/3 i wariantów 8/-2, III/3D, III/3M po trawieniu enzymem Pst I

W przypadku enzymu Pst I DNA szczepów macierzystych i wariantów wyprowadzonych z nich cięte było na wiele małych fragmentów (tab. 1, ryc. 2). Analizę szablonów elektroforetycznych przeprowadzono dla zakresu migracji markerów 23 130 bp – 2027 bp. W uzyskanych szablona (ryc. 2) nie zaobserwowano pojawienia się nowych fragmentów, które by różnicowały szczepy macierzyste i warianty wyselekcjonowane po neutralizacji przeciwciałami. Wyniki zawarte w tabeli 1, uzyskane po trawieniu enzymem Pst I, potwierdzają możliwość różnicowania szczepu *Agille* od szczepu III/3. DNA szczepu *Agille* posiadał fragmenty B-7,5 kbp, H-4,6 kbp, M-3,25 kbp, Q-2,45 kbp, nieobecne w szablona szczepu III/3. Natomiast DNA szczepu III/3 posiadał fragmenty G-5,0 kbp, I-4,4 kbp i L-3,7 kbp.

Różnic w szablona elektroforetycznych DNA wyselekcjonowanych wariantów i szczepów macierzystych wirusa BHV 1 nie stwierdzono także po trawieniu enzymami Bam HI i Eco RI (tab. 2, ryc. 3. 4). W obu przypadkach liczba uzyskanych



Ryc. 3. Szablon elektroforetyczny szczepów macierzystych *Agille*, III/3 i wariantów 8/-2, III/3D, III/3M po trawieniu enzymem Bam HI

Ryc. 4. Szablon elektroforetyczny szczepów macierzystych *Agille*, III/3 i wariantów 8/-2, III/3D, III/3M po trawieniu enzymem Eco RI

Objaśnienia do rycin: ścieżki: 1 – szczep *Agille*; 2 – szczep III/3; 3 – wariant 8/-2; 4 – wariant III/3D; 5 – wariant III/3M; 6 – DNA faga lambda trawiony enzymem Hind III jako marker.

### Wnioski

1. Nie stwierdzono różnic między szablonami elektroforetycznymi szczepów *Agille* i III/3, a szablonami wariantów wyprowadzonych z tych szczepów po neutralizacji przeciwciałami.

2. Obserwowana podwyższona oporność na neutralizację wariantu 8/-2 wynikała ze zmian fenotypowych.

3. Analiza elektroforetyczna DNA szczepów macierzystych *Agille* i III/3 po trawieniu enzymami Hind III, Pst I, Bam HI, Eco RI umożliwiła różnicowanie obu szczepów.

Piśmiennictwo znajduje się w I części pracy: *Medycyna Wet.* 51, 343, 1995.

**MOHATO S. N., HARRISON L. J. S., HAMMOND J. A.:** Skuteczność tiabendazole w zarażeniach bawołów we Wschodnim Nepalu *Fasciola gigantica*. (Efficacy of thiabendazole against *Fasciola gigantica* in buffaloes in Eastern Nepal). *Vet. Rec.* 135, 579-580, 1994 (24)

Tiabendazol - pochodna benzimidazolu działa bardzo skutecznie na niedojrzałe i dojrzałe formy *Fasciola hepatica* u owiec, kóz i bydła. Zarażenia *F. gigantica* występują powszechnie u bawołów w Nepalu. Skuteczność tiabendazolu w zarażeniach tym pasożytem przebadano na bawołach w wieku 15-18 miesięcy u których inwazja nie była nasiloną. 10% zawiesinę tiabendazolu stosowano w dawce 12 mg/kg masy ciała. Ponieważ po 14 dniach liczba jaj pasożyta w kale nie uległa silnemu obniżeniu u 4 z 6 bawołów powtórzono leczenie podając dawkę 24 mg/kg masy ciała. Po drugim leczeniu liczba jaj w kale spadła do 0 po 6 dniach od momentu podania leku. Tiabendazol w dawce zalecanej przez producenta (12 mg/kg masy ciała) nie eliminuje więc *F. gigantica* z przewodów żółciowych bawołów.

G.

**BATOMUZI E. K., KRISTENSEN F., BASSE A., DAHL S.:** Idiopatyczna hematuria nerkowa u psa. (Idiopathic renal haematuria in a dog). *Vet. Rec.* 135, 603, 1994 (25)

U psa rasy labrador w wieku 2 lat wystąpiła hematuria trwająca przez okres 2 miesięcy. Badanie radiograficzne jamy brzusznej, bakteriologiczne moczu, laparotomia i cystotomia nie uniemożliwiły ustalenia przyczyny hematurii. Po 2 miesiącach badaniem ultrasonograficznym jamy brzusznej stwierdzono zmiany patologiczne w odcinku przednim lewej nerki. Badanie hematologiczne wykazało obniżenie wartości hematokrytu (90,35) i poziomu

hemoglobiny (6,70 mm/l) oraz wzrost aktywności A1AT (1,60  $\mu$ KAT/L). W moczu pojawiło się białko i barwnik krwi przy braku krwinek czerwonych. Powtórnie przeprowadzona laparotomia wykazała zmiany przypominające zawał w odcinku przednim lewej nerki i obrzęk moczowodu.

G.

**ESCUADERO E., CARCELES C. M., SERRANO J. M.:** Farmakokinetyka oksytetracykliny u kóz: modyfikacje związane z przedłużonym działaniem antybiotyku. (Pharmacokinetics of oxytetracycline in goats: modifications induced by a long-acting formulation). *Vet. Rec.* 135, 548-552, 1994 (23)

Oksytetracyklina jest antybiotykiem o szerokim spektrum działania i aktywności bakteriostatycznej. Formuła tego antybiotyku o przedłużonym działaniu jest lekiem z wyboru w leczeniu chorób zakaźnych o przebiegu ostrym. Porównano farmakokinetykę oksytetracykliny konwencjonalnej z postacią o działaniu przedłużonym po stosowaniu domięśniowym i dożylnym antybiotyku u kóz. Dystrybucja antybiotyku w organizmie przebiegała wg modelu dwukompartamentowego. Wartość  $V_z$  wynosiła 1,443 L/kg,  $V_c$  0,453 L/kg,  $T_{1/2}$  po podaniu dożylnym 69,28 min zaś po domięśniowym 10 godz. 38 min. Dla antybiotyku o przedłużonym działaniu wartości te wynosiły odpowiednio 6 godz. i 28 min. i 29 godzin. Celem uzyskania maksymalnego poziomu antybiotyku wynoszącego ponad 0,5 mg/L dawka konwencjonalnego antybiotyku winna wynosić 10 mg/kg a dawka podtrzymująca 8,5 mg/kg w odstępach dobowych. Natomiast w przypadku antybiotyku o przedłużonym działaniu zaleca się jako pierwszą dawkę 20 mg/kg a jako dawkę podtrzymującą 14 mg/kg w odstępach 48 godz.

G.