

Genetyczna zmienność szczepów EHV-2 wyizolowanych od koni w Polsce^{*})

ALEKSANDRA RUSZCZYK

Zakład Wirusologii, Mykologii i Immunologii Katedry Nauk Przedklinicznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa

Ruszczyk A.

Genomic heterogeneity of EHV-2 strains isolated from horses in Poland

Summary

EHV-2 infections are very common in horse populations. By co-cultivation of peripheral blood, equine leucocytes with equine dermal cells (ED), 34 EHV-2 strains were isolated and identified by PCR using primers for the sequence located upstream from gene homologous to the human IL-10-like gene. The fragment length polymorphism of 6 EHV-2 strains was established using BamHI and HindIII restriction. Genomic heterogeneity of EHV-2 isolates was demonstrated, as well as diverse fragment patterns between standard and investigated strains.

Keywords: horses, EHV-2, genomic heterogeneity

Herpeswirus koni typu 2 (EHV-2), do niedawna zaliczany do podrodziny β -*Herpesvirinae*, został ostatnio sklasyfikowany jako γ -herpeswirus (15). Jego udział w patogenezie zakażeń koni do tej pory nie został w pełni wyjaśniony. Uważa się, że EHV-2 może predysponować do wtórnych zakażeń układu oddechowego zrebriat np.: *Rhodococcus equi*, a także powodować zapalenie dolnych i górnych dróg oddechowych, zapalenie rogówki, spojówek, gardła, immunosupresję oraz pogorszenie kondycji koni wyścigowych (2, 4, 7, 10, 13, 14). Prawdopodobny wydaje się również udział EHV-2 w reaktywacji ze stanu latencji α -herpeswirusów: EHV-1 i EHV-4 (19).

Genom EHV-2 zaliczany jest do klasy A i składa się z unikalnej długiej sekwencji (UL, unique long) o długości 149 321 par zasad, ograniczonej przez dwie leżące po obu końcach nici sekwencje powtarzające się, zorientowane w tym samym kierunku (DR, direct repeat), o długości 17 553 par zasad każda (16). W obrębie fragmentu UL znajduje się niezależna od siebie para krótkich sekwencji powtarzających się, o przeciwniejszej orientacji (6, 15).

EHV-2 wykazuje zmienność antygenową w odczynie seroneutralizacji, a także dużą zmienność genetyczną stwierdzoną przy użyciu analizy restrykcyjnej (17, 18). Możliwa jest izolacja kilku szczepów EHV-2, różniących się między sobą pod tym względem w obrębie jednej grupy koni, a nawet od jednego osobnika (5). Nie ustalono, czy są to różne, czy też jeden szczep wirusa, który podlega zmianom w obrębie pewnych sekwencji genomu, zależnie od miejsca replikacji w organizmie gospodarza (4). Dotychczasowe badania

wskazują, że sugerowany przez niektórych badaczy wpływ zmienności budowy genomu EHV-2 na jego patogenność nie znajduje potwierdzenia (3).

Celem badań była analiza restrykcyjna kilku wyizolowanych szczepów EHV-2.

Materiał i metody

W trakcie badań prowadzonych nad występowaniem EHV-2 w populacji koni w Polsce, metodą wspólnej hodowli leukocytów krwi obwodowej koni z hodowlą komórek skóry konia (ED, equine dermal, ATCC CCL 57), wyizolowano 34 szczepy EHV-2, które zidentyfikowano przy użyciu starterów dla fragmentu znajdującego się powyżej genu homologicznego z genem IL-10 (12). Materiał do badań stanowiło 6 losowo wybranych spośród nich szczepów EHV-2. Szczepy wirusa namnażano w hodowli komórek ED, inkubując zakażone komórki do momentu wystąpienia efektu cytopatycznego (CPE, cytopathic effect) obejmującego całość hodowli. Płyn w objętości 200 ml odwirowywano przy 2000 \times g przez 20 min. w 4°C, zaś pozostały osad komórkowy mrożono w -20°C, dla uwolnienia z niego wirusa związanego z błonami komórkowymi. Płyn znad uzyskanego kruszywa komórkowego odwirowywano i całość ultrawirowano przy 100 000 \times g przez 2 godz. w 4°C na warstwie z 25% sacharozy (Sigma). Ekstrakcję DNA przeprowadzano wg metody opracowanej przez Rolę (11). DNA szczepu standardowego EHV-2 (szczep 86/67 uzyskany dzięki uprzejmości prof. M. J. Studderta, School of Veterinary Science, The University of Melbourne, Australia) izolowano przy użyciu metody opisanej przez Crabba i wsp. (8). Zawiesinę wirusa wirowano wstępnie przy 2500 \times g przez 20 min. Wirus osadzano przez ultrawirowanie przy 50 000 \times g przez 90 min. i zawieszano w buforze TEN (0,01 M Tris HCl, pH 7,4; 0,1 M NaCl, 0,001 M EDTA). W kolejnym etapie zawiesinę wirusa ultrawirowano przy gradiencie 5-15% Ficollu-400 (Sigma) w bufo-

^{*}) Badania finansowane częściowo w ramach grantu Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej nr 10/2000.

rze TEN przy $20\ 000 \times g$ przez 2 godz. w $4^{\circ}C$, zbierano znajdujące się na granicy faz oczyszczone wiriony i ponownie osadzano przez ultrawirowanie. DNA ekstrahowano według metody opisanej przez Rolę (11).

Rozpuszczony DNA 6 wyizolowanych szczepów EHV-2 oraz szczepu standardowego (86/67) trawiono enzymami restrykcyjnymi BamHI oraz HindIII (Sigma). Do próbek DNA wirusowego w ilości około 1 μg dodawano 10 j. enzymu restrykcyjnego, 1/10 objętości odpowiedniego buforu i uzupełniano wodą do objętości 20 μl . Mieszaninę inkubowano przez 2 godz. w $37^{\circ}C$, nanoszono na 0,6% żel agarozowy z dodatkiem bromku etydyny (Sigma) i przeprowadzano elektroforezę w buforze TBE przy napięciu 30 V przez noc. Jako wzorca używano DNA faga lambda trawionego enzymem restrykcyjnym HindIII (Sigma). Żel oglądano i fotografowano w świetle lampy UV.

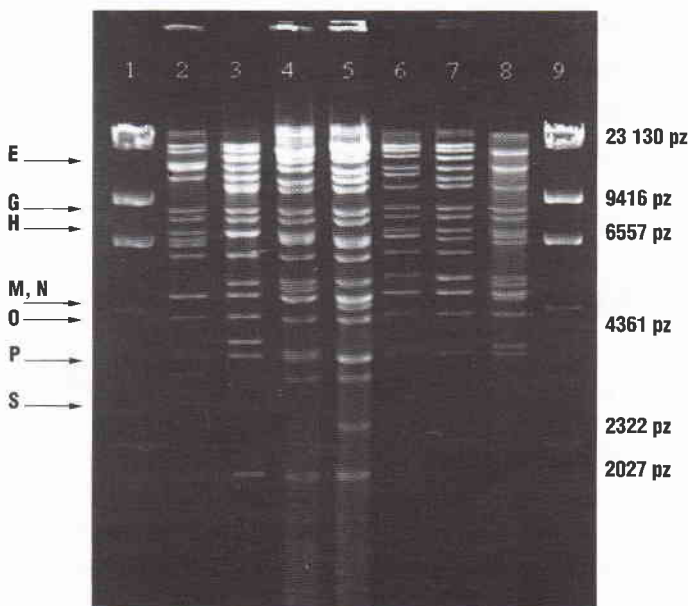
Wyniki i omówienie

Analiza polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych 6 badanych szczepów EHV-2 ciętych enzymami restrykcyjnymi BamHI i HindIII przedstawiona jest na ryc. 1 oraz 2. Wykazała ona występowanie różnic we wzorcach restrykcyjnych poszczególnych szczepów EHV-2. Po cięciu enzymem BamHI jedynie fragmenty E, G, H, M, N i O występowały u wszystkich badanych izolatów i znajdowały się na jednakowej wysokości. Ponadto fragment P znajdował się niemalże na tej samej wysokości u badanych szczepów. Pozostałe fragmenty restrykcyjne szczepów terenowych w porównaniu z fragmentami restrykcyjnymi szczepu standardowego wykazywały różnice migrując szybciej lub wolniej. Obserwowano również brak lub występowanie dodatkowych prążków np. obecność dodatkowych fragmentów pomiędzy 6,2, a 4,8 tys. p.z. u szczepu LR43, LR59, LR60, LR191 i AR46 czy brak frag-

mentu S u wszystkich badanych szczepów. Również po analizie restrykcyjnej wykonanej przy pomocy enzymu HindIII wykazano podobne wyniki: na jednakowej wysokości znajdowały się fragmenty H, N, O i P zaś pozostałe fragmenty restrykcyjne szczepów badanych migrowały odmiennie, zaś w szablonach restrykcyjnych brakowało prążków i/lub pojawiały się dodatkowe.

Występowanie zmienności genetycznej pomiędzy poszczególnymi szczepami EHV-2 stanowi istotny element biologii tego wirusa. Analiza polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych 6 szczepów EHV-2 wykazała, że żaden z nich nie ma takiego samego profilu restrykcyjnego. Profile te różniły się również od profilu restrykcyjnego szczepu standardowego EHV-2 (86/67). Jednocześnie wykazano hybrydyzację DNA szczepu standardowego do DNA badanych izolatów. Podobne wyniki uzyskali inni autorzy (3). Zmienność EHV-2 kontrastuje z jednolitością drugiego końskiego γ -herpeswirusa – EHV-5: porównanie szczepów z Polski i Australii wykazało, że mają one niemal jednakowe szablony restrykcyjne.

RFLP jest niezwykle pomocnym narzędziem w dochodzeniu epizootologicznym w przypadku badań prowadzonych nad wieloma wirusami np. analiza szczepów EHV-1 prowadzona przez Allena i wsp. (1) umożliwia wykrycie szczepionkowych szczepów, które powodowały ronienia ciężarnych klaczy. Prowadzone przez tych autorów badania wykazały również, że szczepy o pewnym profilu restrykcyjnym odpowiedzialne były za masowe ronienia, zaś szczepy o odmiennym, jedynie za pojedyncze przypadki ronień. Analiza szczepów EHV-1 wykazała niewielką zmienność budowie ich genomu: spośród 148 badanych szczepów wyodrębniono jedynie 16 różnych wzorów



Ryc. 1. Analiza restrykcyjna badanych szczepów EHV-2 wykonana przy pomocy enzymu BamHI. 1. i 9. Wzorzec masowy DNA, prążki wielkości: 23 130 pz, 9416 pz, 6557 pz, 4361 pz, 2322 pz, 2027 pz; 2. DNA szczepu standardowego EHV-2 (86/67); 3-8. DNA badanych szczepów, odpowiednio LR43, LR59, LR60, LR191, AR46, LR275.



Ryc. 2. Analiza restrykcyjna badanych szczepów EHV-2 wykonana przy pomocy enzymu HindIII. 1. i 9. Wzorzec masowy DNA, prążki wielkości: 23130 pz, 9416 pz, 6557 pz, 4361 pz, 2322 pz, 2027 pz; 2. DNA szczepu standardowego EHV-2 (86/67); 3-8. DNA badanych szczepów, odpowiednio LR43, LR59, LR60, LR191, AR46, LR275.

restrykcyjnych (1), gdy wszystkie 47 szczepów EHV-2 wykazywało różnice w obrębie ich profili restrykcyjnych (5). W prowadzonych przez Ruszczyk i wsp. badaniach nad EHV-2 stwierdzono nie tylko jego zmienność genetyczną, ale również zmienność w zachowaniu się wirusa w hodowli komórkowej (różna dynamika wzrostu przejawiająca się różnicami w czasie koniecznym do osiągnięcia pełnego CPE, różnicami w wysokości miana wirusowego oraz wielkości powstających łysek). Interesującym zagadnieniem wydaje się być znalezienie zależności pomiędzy wielkością łysek, profilem restrykcyjnym a miejscem izolacji EHV-2 oraz odmienną patogennością poszczególnych jego szczepów. Przeprowadzone do tej pory badania wydają się jednakże nie wykazywać żadnych tego typu współzależności (3, 5, 9).

Piśmiennictwo

- Allen G. P., Yergan M. R., Turtinen L. W., Bryans J. T., McCollum W. H.: Molecular epizootiologic studies of equine herpesvirus-1 infections by restriction endonuclease fingerprinting of viral DNA. *Am. J. Vet. Res.* 1983, 44, 263-271.
- Blakeslee J. R., Olsen R. G., McAllister E. S., Fassbender J., Dennis R.: Evidence of respiratory tract infection induced by equine herpesvirus, type 2, in the horse. *Canad. J. of Microbiol.* 1975, 21, 1940-1946.
- Borchers K., Wolfinger U., Goltz M., Broll H., Ludwig H.: Distribution and relevance of equine herpesvirus type 2 (EHV-2) infection. *Arch. Virol.* 1997, 142, 917-928.
- Borchers K., Wolfinger U., Ludwig H., Thein P., Baxi S., Field H. J., Slater J. D.: Virological and molecular biological investigation into equine herpes virus type 2 (EHV-2) experimental infections. *Virus Res.* 1998, 55, 101-106.
- Browning G. F., Studdert M. J.: Genomic heterogeneity of equine betaherpesviruses. *J. Gen. Virol.* 1987, 68, 1441-1447.
- Browning G. F., Studdert M. J.: Physical mapping of a genome of equine herpesvirus 2 (equine cytomegalovirus). *Arch. Virol.* 1989, 104, 77-86.
- Collinson P. N., O'Rielly J. L., Ficatorilli N., Studdert M. J.: Isolation of equine herpesvirus type 2 (equine gammaherpesvirus 2) from foals with ceratoconjunctivitis. *JAVMA* 1994, 205, 329-331.
- Crabb B. S., Studdert M. J.: Comparative studies of the proteins of equine herpesviruses 4 and 1 and asinine herpesvirus 3: antibody response of the natural hosts. *J. Gen. Virol.* 1990, 71, 2033-2041.
- Holloway S. A., Lindquester G. J., Studdert M. J., Drummer H. E.: Analysis of equine 2 strains variation using monoclonal antibodies to glycoprotein B. *Arch. Virol.* 2000, 145, 1699-1713.
- Pálfi V., Belák S., Molnár T.: Isolation of herpesvirus type 2 from foals, showing respiratory symptoms. *Zntbl. Vet-Med. B* 1978, 25, 165-167.
- Rola J.: Profile restrykcyjne polskich izolatów herpeswirusa koni typ 1. *Med. Wet.* 2000, 56, 813-815.
- Ruszczyk A., Chmielewska A., Tucholska A., Bańbura M. W.: Izolacja i identyfikacja herpeswirusa koni typu A (EHV-2). *Med. Wet.* 2001, 57, 603-606.
- Schlocker N., Gerber-Bretscher R., Von Fellenberg R.: Equine herpesvirus 2 in pulmonary macrophages of horses. *Am. J. Vet. Res.* 1995, 56, 749-754.
- Studdert M. J.: Equine herpesvirus 2 and disease. *Equine Vet. J.* 1996, 28, 426-428.
- Telford E. A. R., Studdert M. J., Agins C. T., Watson M. S., Aird H. C., Davidson A. J.: Equine herpesviruses 2 and 5 are γ -herpesviruses. *Virology* 1993, 195, 492-499.
- Teleford E. A. R., Watson C. T., Aird H. C., Perry J., Davidson A. J.: The DNA sequence of equine herpesvirus 2. *J. Molec. Biol.* 1995, 249, 520-528.
- Turner A. J., Studdert M. J., Peterson J. E.: Equine herpesviruses. 2. Persistence of equine herpesviruses in experimentally infected horses and the experimental induction of abortion. *Australian Vet. J.* 1970, 46, 90-98.
- Turner A. J., Studdert M. J.: Equine herpesviruses. 3. Isolation and identification of slowly cytopathic viruses and the serological incidence of equine rhinopneumonitis. *Australian Vet. J.* 1970, 46, 581-586.
- Welch H. M., Bridges C. G., Lyon A. M., Gryffiths L., Edington N.: Latent equid herpesvirus 1 and 4: detection and distinction using polymerase chain reaction and co-cultivation from lymphoid tissues. *J. Gen. Virol.* 1970, 73, 261-268.

Adres autora: dr Aleksandra Ruszczyk, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa; e-mail: ruszczyk@amaltea.sggw.waw.pl

**Sekcja Immunologii Weterynaryjnej
Polskiego Towarzystwa Immunologii Doświadczalnej i Klinicznej,
Sekcja Immunologii PTNW
oraz Katedra Mikrobiologii i Immunologii Klinicznej
Wydziału Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie**

organizują w dniach 11-12 września 2003 r.

IV Kongres Immunologów Weterynaryjnych nt. Immunologia w diagnostyce, profilaktyce i terapii

Kongres odbędzie się na terenie Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UW-M w Olsztynie. Opłata kongresowa, obejmująca materiały konferencyjne, wynosi 200 zł dla samodzielnego pracownika naukowego, 150 zł dla adiunkta i asystenta oraz 100 zł dla osoby towarzyszącej. Przedpłaty należy dokonać na adres: Bank PKO BP Oddział Centrum w Olsztynie, nr konta 21 10203541 1011428886 tytułem „uznać subkonto 0512-1102” do dnia 1 września 2003 r. Zgłoszenia: Katedra Mikrobiologii i Immunologii Klinicznej, Wydział Medycyny Weterynaryjnej UW-M w Olsztynie, ul. Oczapowskiego 13, 10-718 Olsztyn; tel./fax. (0 prefix 89) 523 33 28, E-mail: zbigniew.procajlo@uwm.edu.pl