

# Zmienność genetyczna polskich izolatów wirusa RHD

ANDRZEJ FITZNER, ANDRZEJ KĘSY

Zakład Pryszczycy Państwowego Instytutu Weterynaryjnego, ul. Wodna 7, 98-220 Zduńska Wola

Fitzner A., Kęsy A.:

## Variability of Polish isolates of the RHD virus

### Summary

The aim of the study was to evaluate the genetic changes of Polish RHDV strains collected between 1988-2000. Analyses were carried out by nucleotide sequencing of two PCR fragments of the genome encoding N-terminal portion of both capsid and non-structural proteins. Nucleotide and amino-acid sequence comparisons of the RHDV genome regions analyzed revealed a high genetic identity of the isolates. The maximum divergence of nucleotide was from 5.4 to 8% for three isolates characterized by different restriction profiles in a non-structural region.

The phylogenetic analysis enabled the identification of two genogroups assembled with German and Italian reference isolates.

**Keywords:** RHDV – sequence analysis

Krwotoczna choroba królików (RHD) jest pandemią. W ciągu niewielu lat od jej stwierdzenia w Azji (15), rozprzestrzeniła się w Europie, Afryce, Australii i Ameryce (17). Choroba ma przebieg gwałtowny. Charakteryzuje ją wysoka zaraźliwość i śmiertelność, która wśród zwierząt w zarażonym stadzie często osiąga 100%. Czynnikiem etiologicznym RHD jest kaliciwirus, występujący w postaci jednego serotypu, o dobrze poznanych właściwościach morfologicznych i fizyko-chemicznych. Głównym strukturalnym komponentem kapsydu jest polipeptyd o masie 60 kD. Genom wirusa RHD tworzy kwas rybonukleinowy, jednoniciowy, o wielkości 7,5 kb. Pojedyncza, obszerna ramka odczytu (ORF1) koduje w końcu aminowym białko niestrukturalne, a w części C-końcowej – białko strukturalne VP60. Mniejsza ORF2 koduje białko VP10 (10, 11, 16, 21, 20).

Sekwencję genomu wirusa jako pierwsi przedstawili Meyers i wsp. (16). W niedługim czasie opublikowano także kolejne, pełne oraz częściowe sekwencje genomu innych szczepów wirusa (1, 2, 11-13, 18, 19, 22). Wieloletnie obserwacje dotyczące przebiegu choroby – kliniczne i epizootyczne, a przede wszystkim wyniki badań wirusa metodami biologii molekularnej uzasadniają tezę o jego wysokiej stabilności genetycznej. Do silnej konserwatywności materiału genetycznego przyczyniają się: krótki okres inkubacji choroby i bardzo wysoka śmiertelność wśród zwierząt. Natomiast brak wrażliwości na zakażenie wirusem młodych osobników oraz znaczny, sezonowy wzrost liczebności nie szczepionych królików w hodowlach przyzgodowych są czynnikami, które nie sprzyjają

utrwalaniu się zmian genetycznych wirusa. W tym kontekście istotne wydaje się występowanie szczepów: niepatogennego RCV (2, 3) oraz izolatów RHDV charakteryzujących się brakiem aktywności hemaglutynacyjnej (1, 6, 14).

Ocena sytuacji epizootycznej RHD w Polsce wskazuje na występowanie stałego zagrożenia chorobą hodowli królików. Każdego roku, w okresie od wiosny do jesieni, wraz z pojawieniem się nowej populacji wrażliwych zwierząt (powyżej 6-8 tygodni życia) wirus znajduje doskonałe warunki do namnożenia się i rozprzestrzeniania.

Celem badań była ocena zmienności genetycznej polskich szczepów wirusa RHD na podstawie analizy wyników sekwencji nukleotydowych dwóch fragmentów genomu, pochodzących z części niestrukturalnej i z regionu białka strukturalnego, otrzymanych w wyniku reakcji enzymatycznej amplifikacji (PCR). W poprzedniej pracy, stosując metodę analizy restrykcyjnej, wskazywano na stabilność genetyczną izolatów w analizowanym fragmencie białka strukturalnego oraz na występowanie szczepów o odmiennym profilu restrykcyjnym w regionie genomu odpowiedzialnym za kodowanie białek niestrukturalnych (9).

### Materiał i metody

**Wirus RHD.** Izolaty wirusa z obszaru Polski z lat 1988-2000 (9) oraz szczep francuski (PLF) z 1992 roku otrzymany z laboratorium w Ploufragan. Szczepy krajowe: SGM (1988), KGM (1988), PD (1989), MAL (1994), BLA (1994), GSK (1998), ŻD (2000) – wirus z próbki terenowej oraz z pierwszego pasaży (ŻD1) pochodzą z własnej

kolekcji, natomiast szczep LUB (1988) – ze zbioru prof. J. Buczka (AR Lublin).

**Izolacja RNA.** Wirus do badań otrzymywano z wątrób zakażonych królików, które homogenizowano w PBS w proporcji 1 : 5. Wirus oczyszczono przez chloroformowanie i wirowanie. Całkowite RNA uzyskano za pomocą zestawu do szybkiej izolacji (Rneasy Mini Kit) (8).

**Reakcja RT-PCR.** Reakcję odwrotnej transkrypcji przeprowadzono używając enzymu odwrotnej transkryptazy AMV i startera oligonukleotydowego z końca 3' genomu RHDV. W reakcji PCR zastosowano dwie pary starterów zaprojektowane na podstawie sekwencji nukleotydowej niemieckiego, referencyjnego szczepu RHDV-FRG 89 (16). Startery P1, P2 wykorzystane przez Guittre i wsp. (13) kodują fragment 510 pz (5182-5692) obejmujący N-koniec strukturalnego białka kapsydu VP60. Druga para starterów powiela odcinek 490 pz (2302-2793) stanowiący fragment białka p30, z części niestrukturalnej genomu wirusa, pomiędzy genami helikazy a VPg. Fragment ten jest identyczny z regionem C analizowanym przez Le Gall i wsp. (11). Produkty reakcji PCR rozdzielano w 1,5% żelu agarozowym i dokumentowano przy pomocy systemu Image Store 5000 (UVP).

**Sekwencjonowanie.** Sekwencje nukleotydowe produktów reakcji PCR analizowano na sekwenatorze ABI Prism 310 z wykorzystaniem zestawu ABI Prism Rhodamine Terminator Cycle Sequencing kit. Sekwencję aminokwasów wprowadzono na podstawie sekwencji nukleotydów.

**Analiza komputerowa.** Drzewo filogenetyczne skonstruowano przy użyciu programu Megalign z pakietu Lasergene (Dnastar, USA). Do analizy włączono pobrane z bazy danych sekwencje szczepów: wzorcowego – niemieckiego FRG 89 (M67473) oznaczonego jako RHDV, czeskiego V351 z 1987 roku (U 54983), włoskiego BS z 1989 r. (X 87607), amerykańskiego Iowa z roku 2000 (AF258618) oraz sekwencjonowane fragmenty o wielkości 420 p.z. Porównywano również sekwencje nukleotydowe szczepów: hiszpańskiego AST 89 (Z 49271), a także badane przez Guittre egipskiego E1 oraz francuskiego 3237 (13).

## Wyniki i omówienie

Metodą PCR uzyskano amplifikację fragmentów genomu o wielkości 510 i 490 pz badanych szczepów, które następnie sekwencjonowano. W regionie białek niestrukturalnych, kodowanych przez parę starterów C1, C2, zmienność sekwencji nukleotydów szczepów SGM, KGM, PD, LUB i PLF wyniosła od 1% do 2,8%. Większe różnice stwierdzono wśród izolatów BLA – 7,3%, GSK – 5,4% i ŻD (wirus z próbki terenowej i pierwszego pasażu) – 8%. Zmiany aminokwasów dotyczyły od 1 do 5 pozycji. We fragmencie genomu P1, P2 kodującym strukturalne białko kapsydu VP60 stwierdzono zmienność nukleotydów od 0,2% do 1,2% w przypadku pięciu izolatów. Największa heterogenność sekwencji nukleotydów występowała w izolatach BLA i ŻD (3,8-4,0%). Zmiany aminokwasów wyniosły od 1 do 5 pozycji. Dominowały tzw. ciche mutacje (silent), w których zmiana kodonu nie prowadziła do

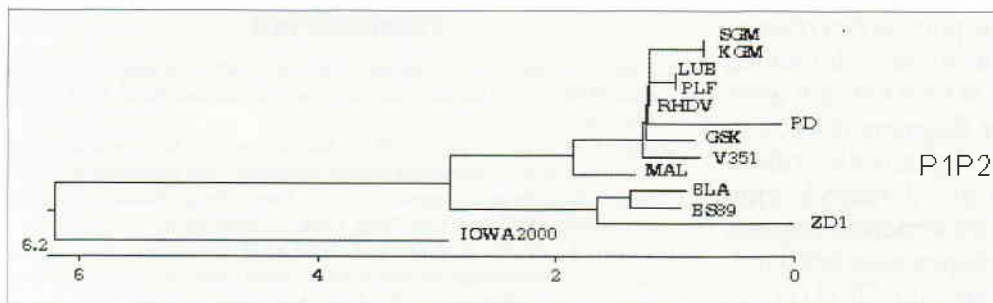
zmiany aminokwasu. Nie stwierdzono delecji ani insercji, a zdecydowaną większość stanowiły tranzycje (85-100%). Nieznacznie wyższą zmienność sekwencji nukleotydów i aminokwasów stwierdzono w regionie genomu kodującym niestrukturalne białko p30 niż w regionie P1, P2 kodującym N-końcowy fragment białka VP60.

W obu sekwencjonowanych odcinkach odnotowano od kilkunastu do kilkudziesięciu punktowych mutacji, wspólnych dla izolatów polskich i szczepów zagranicznych: BS, AST, SD, IOWA, E1 i 3237. We fragmencie niestrukturalnym tranzycje w sekwencji zasad genomu, obecne w co najmniej 7 porównywanych izolatach polskich i zagranicznych, stwierdzono w pozycjach 2358 (t/c), 2412 (t/c), 2430 (c/t), 2442 (c/t), 2451 (a/g), 2478 (a/g), 2637 (a/g), 2688 (t/c), 2691 (t/c). W regionie tym zlokalizowano 3 transwersje prowadzące do zmiany aminokwasu w pozycjach 2659 (a/t), 2703 (c/a) oraz 2746 (c/a). W odcinku genomu kodującym fragment VP60 najczęściej powtarzające się tranzycje były obecne w pozycjach: 5292 (a/g), 5323 (g/a ze zmianą aminokwasu), 5346 (g/a), 5370 (t/c), 5373 (c/t), 5415 (t/c), 5425 (a/g ze zmianą aminokwasu), 5436 (a/g), 5556 (c/t). Ponadto stwierdzono transwersje ze zmianą aminokwasu w pozycji 5382 (a/t). Kolejność nukleotydów zgodna z sekwencją szczepu wzorcowego FRG 89.

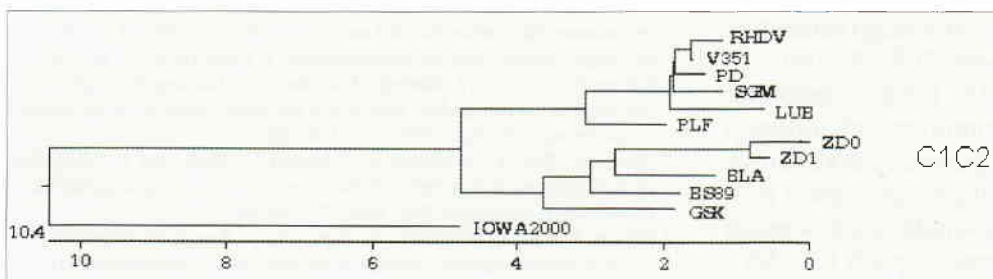
Na podstawie drzewa filogenetycznego, w analizowanych fragmentach można wyróżnić dwie grupy genetyczne. Pierwsza grupa – skupiona wokół wzorcowej sekwencji niemieckiej (oznaczonej jako RHDV), a grupa druga – wokół włoskiego izolatu BS 89 (ryc. 1, 2).

Współczynnik zmienności sekwencji nukleotydów genomu polskich szczepów wirusa RHD jest porównywalny z odsetkiem zmienności częściowych sekwencji kilkudziesięciu szczepów europejskich, u których sięga 10% (1, 11, 13, 19, 22). Podobieństwo pełnych sekwencji nukleotydów w genomach szczepów FRG, SD i V351 wynosi około 96-99% (12, 22). Zmienność sekwencji nukleotydów w omawianych regionach (P1, P2 / C1, C2) włoskiego szczepu BS i hiszpańskiego AST mieści się przedziale od 3,5% do 5,5%, a izolatu Iowa od 8,0% do 12,0%. Dwa najbardziej zmienne izolaty badane przez Guittre (13) wykazują homologię nukleotydów od 96,6% (szczep francuski 3237) do 98,7% (szczep egipski E1) w stosunku do wzorcowego szczepu niemieckiego.

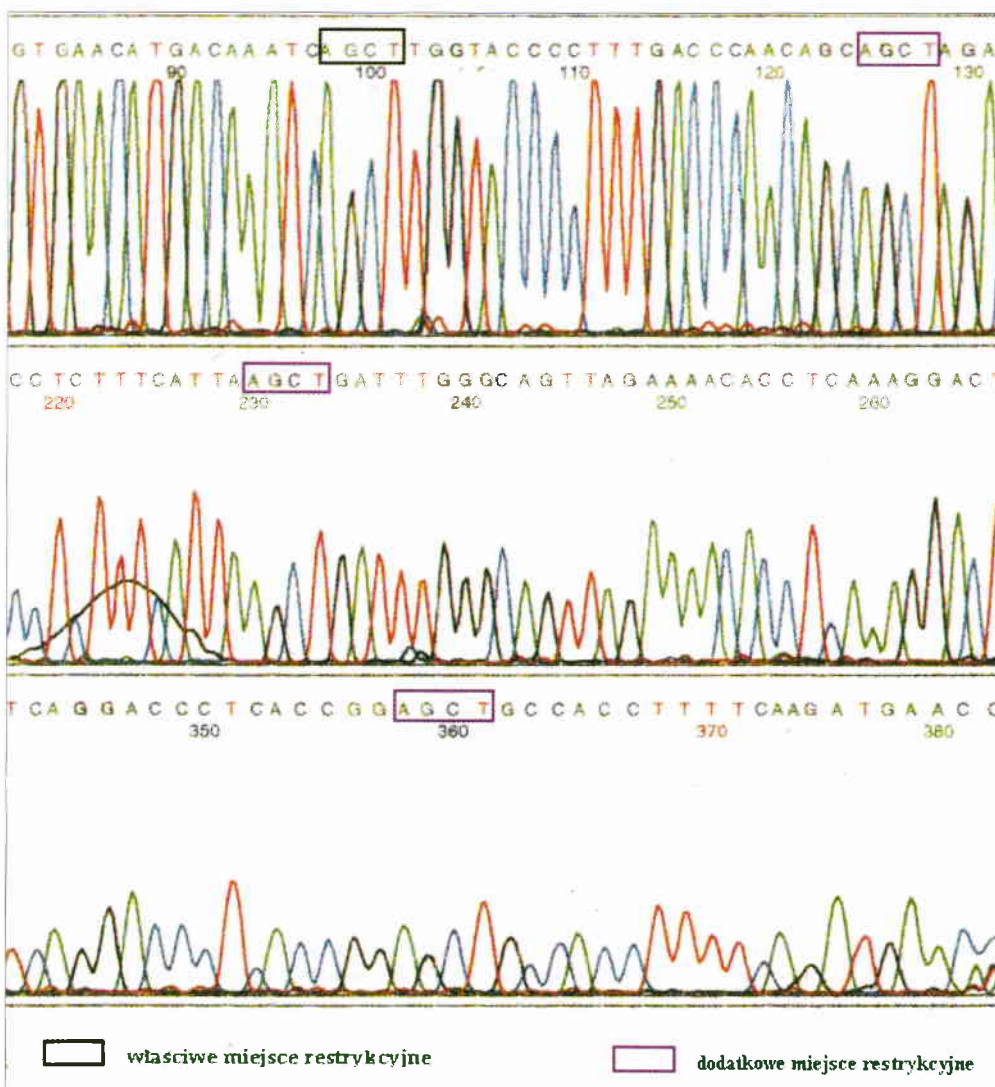
Opublikowane dotąd sekwencje genomu europejskich szczepów wirusa RHD (w tym pełne sekwencje FRG, SD, BS, AST) wykazują bardzo wysoki stopień podobieństwa, bliski 96,0-98,0% (10, 16, 19, 22). Różnice w sekwencjach nukleotydów i aminokwasów 22 próbek wirusa RHD zebranych w Australii w okresie 2 lat od momentu jego wprowadzenia do środowiska, wynoszą maksymalnie 1,8% w porównaniu z macierzystą sekwencją szczepu V351. Wyniki analizy sekwencyjnej genomu wirusa RHD ugruntowują więc



Ryc. 1. Drzewo filogenetyczne wirusa RHD – na podstawie sekwencji nukleotydów kodującej fragment strukturalnego polipeptydu VP60



Ryc. 2. Drzewo filogenetyczne szczepów wirusa RHD, na podstawie sekwencji nukleotydów kodującej fragment niestrukturalnego białka p30



Ryc. 3. Lokalizacja miejsc restrykcyjnych agct we fragmencie sekwencji nukleotydów szczepu BLA wirusa RHD – region niestrukturalnego białka p30

poгляд o wysokiej konserwatywności jego materiału genetycznego, który znajduje równocześnie potwierdzenie w klinicznym obrazie choroby.

Poprzednie badania własne wskazywały na jednorodność wyosobnionych szczepów krajowych zarówno w odniesieniu do struktury antygenowej (obecność dominującego polipeptydu VP60), jak i przebiegu choroby manifestującej się krótkim okresem inkubacji i wysoką śmiertelnością (7). Istotną różnicę stwierdzono natomiast wobec izolatu BLA, u którego nie udało się wykazać zdolności do aglutynowania erytrocytów człowieka w odczynie HA (14). Występowanie takich szczepów zostało także opisane przez innych badaczy (1, 3, 6). Drzewo powinowactwa genetycznego wskazuje, że szczepy BLA (1994) i ŻD (2000), wyizolowane w południowej i północnej części województwa łódzkiego, występują wspólnie w obu badanych fragmentach razem z włoskim szczepem BS. Pozostałe izolaty krajowe, jak też badany przez nas francuski szczep PLF skupiają się wokół niemieckiego szczepu FRG 89. W tej grupie genetycznej mieści się także czeski szczep V351, co znajduje swoje logiczne uzasadnienie w analizie epizootycznej choroby w naszym regionie Europy w latach 1987-1988. Jedynym szczepem występującym w obu grupach jest GSK 98, wyosobniony w fermie królików miniaturowych w województwie pomorskim. Fragment genomu szczepu GSK, który koduje białko strukturalne wykazuje niewielką heterogenność nukleotydów (poniżej 1%) w stosunku do szczepu FRG, podczas gdy w regionie niestrukturalnym zmienność ta przekracza 5%.

Analiza sekwencji nukleotydów potwierdza równocześnie wyniki naszych badań, wykonanych metodą analizy restrykcyjnej. Wykazano w nich ten sam wzór restrykcyjny szczepów wirusa we fragmencie kodującym białko kapsydu, natomiast w regionie niestrukturalnym stwierdzono odmienny profil restrykcyjny trzech szczepów RHDV (9). W sekwencjach regionu P1, P2 potwierdzono obecność występowanie tylko jednego miejsca restrykcyjnego dla enzymu Cfo I (pozycje nukleotydów 5326-5529). W regionie białek niestrukturalnych zidentyfikowano natomiast dodatkowe miejsca trawienia, których położenie tłumaczy występowanie odmiennego profilu restrykcyjnego szczepów (BLA – pozycje: 2450-53, 2555-58, 2682-85 (ryc. 3); ŻD – pozycje: 2450-53, 2555-58; GSK – pozycje: 2450-53, 2555-58). Położenie punktowych mutacji nukleotydów, w których wyniku powstały dodatkowe miejsca trawienia dla enzymu AluI w szczepach polskich, nie jest przypadkowe i odpowiada zmutowanym pozycjom stwierdzanym także w szczepach BS, AST i IOWA za wyjątkiem miejsca restrykcyjnego 2555-58 występującego tylko w omawianych izolatach krajowych.

Na podstawie obrazu drzewa filogenetycznego – do którego skonstruowania wykorzystano znane sekwencje wirusa z banku genów – można zauważyć, że szczepy europejskie i polskie, pomimo uchwytnych różnic, są ze sobą bardzo blisko spokrewnione. Wyraźnie większy dystans genetyczny w odniesieniu do sekwencji referencyjnej RHDV wykazuje szczep Iowa wyosobniony w Stanach Zjednoczonych (pierwsze ognisko RHD) w 2000 r., którego pochodzenie nie zostało ustalone. Szczepy SGM, KGM, PD, LUB, podobnie jak referencyjny szczep niemiecki FRG, czeski V351, włoski BS, a także hiszpański AST czy francuski SD, wyizolowano w pierwszych dwóch latach występowania RHD w Europie. Odsetek zmienności sekwencji nukleotydów krajowych szczepów wirusa z lat 1994-2000 wynosi od 1,0% do blisko 8,0% i jest podobny do rezultatów izolatów francuskich oraz kilkudziesięciu innych szczepów europejskich (1, 11, 13, 19).

Pomimo tak znacznego podobieństwa genetycznego szczepów wirusa, Novotny i wsp. (19) wskazują na możliwość szerzenia się pomoru królików z Chin do Europy dwiema drogami. Pierwsza z nich – kontynentalna – wiodła przez kraje Dalekiego Wschodu, a dalej przez Rosję i Ukrainę. Druga zaś – przypuszczalnie przez Hiszpanię, Francję i kraje Europy Środkowej w wyniku bezpośredniego importu żywych zwierząt lub mrożonego mięsa.

Obecność dwu grup genowych wśród badanych izolatów krajowych sugeruje występowanie genetycznych śladów obu ścieżek rozprzestrzeniania się wirusa krwotocznej choroby także w Polsce. W odpowiedzi na pytanie, na ile źródła pochodzenia wirusa w Polsce są podobne do tych, które przedstawił Novotny, pomogą dalsze badania z włączeniem większej liczby izolatów i porównanie analogicznego regionu genomu.

## Piśmiennictwo

1. *Asgari S., Hardy J. R. E.*: Sequence analysis of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) in Australia: alterations after its release. *Arch. Virol.* 1999, 144, 135-145.
2. *Boga J. A., Casais R., Marin M. S., Martin-Alonso J. M., Carmenes R. S., Prieto M., Parra F.*: Molecular cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli* of the protein gene from rabbit haemorrhagic disease virus (Spanish isolate AST/89). *J. Gen. Virol.* 1994, 75, 2409-2413.
3. *Capucci L., Chasey D., Lavazza A., Westcott D.*: Preliminary characterization of a non-haemagglutinating strain of rabbit haemorrhagic disease virus from the United Kingdom. 1996. *J. Vet. Med. B* 43, 245-250.
4. *Capucci L., Fallacara F., Grazioli S., Lavazza A., Pacciarini M. L., Brocchi E.*: A further step in the evolution of rabbit hemorrhagic disease virus: the appearance of the first consistent antigenic variant. *Virus Res.* 1998, 58, 115-126.
5. *Capucci L., Fussi P., Lavazza L., Pacciarini M. L., Rossi C.*: Detection and preliminary characterization of a new rabbit calicivirus related to rabbit hemorrhagic disease virus but nonpathogenic. *J. Virol.* 1996, 70, 8614-8623.
6. *Chasey D., Lucas M. H., Westcott D. G., Sharp G., Kitching A., Hughes S. K.*: Development of a diagnostic approach to the identification of rabbit haemorrhagic disease. *Vet. Rec.* 1995, 137, 158-160.
7. *Fitzner A., Kęsy A., Niedbalski W., Paprocka G., Walkowiak B.*: Identyfikacja dominującego polipeptydu VP60 krajowych izolatów wirusa pomoru królików (VHD). *Medycyna Wet.* 1996, 52, 302-305.
8. *Fitzner A., Kęsy A., Niedbalski W., Paprocka G.*: Zastosowanie reakcji PCR do identyfikacji szczepów wirusa krwotocznej choroby królików (RHD) wyosobnionych w Polsce. *Medycyna Wet.*, 1999, 55, 120-122.
9. *Fitzner A., Kęsy A., Niedbalski W., Paprocka G.*: Charakterystyka szczepów RHDV na podstawie analizy restrykcyjnej RNA. *Medycyna Wet.*, 2001, 57, 890-893.
10. *Gall G. le, Billetot E., Morisse J-P.*: Viral haemorrhagic disease of rabbit: purification and characterization of a strain isolated in France. *Ann. Rech. Vet.* 1992, 23, 381-387.
11. *Gall G. le, Arnauld C., Boilletot E., Morisse J. P., Rasschaert D.*: Molecular epidemiology of rabbit haemorrhagic disease virus outbreaks in France during 1988 to 1995. *J. Gen. Virol.* 1998, 79, 11-16.
12. *Gould A. R., Kattenbelt J. A., Lenghaus C., Morrissy C., Chamberlain T., Collins B. J., Westbury H. A.*: The complete nucleotide sequence of rabbit haemorrhagic disease virus (Czech strain V351): use of the polymerase chain reaction to detect replication in Australian vertebrates and analysis of viral population sequence variation. *Virus Res.* 1997, 47, 7-17.
13. *Guittré C., Baginski L., Gall G. le, Prave M., Trépo C., Cova L.*: Detection of rabbit haemorrhagic disease virus isolates and sequence comparison of the N-terminus of the capsid protein gene by the polymerase chain reaction. *Res. Vet. Sci.* 1995, 58, 128-132.
14. *Kęsy A., Fitzner A., Niedbalski B., Paprocka G., Walkowiak B.*: A new variant of the viral haemorrhagic disease of rabbits virus. *Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz.* 1996, 15, 1029-1035.
15. *Liu S. J., Xue H. P., Pu B. Q., Quian N. H.*: A new viral disease in rabbits. *Anim. Husb. Vet. Med.* 1984, 16, 253-255.
16. *Meyers G. C., Wirblich H., Thiel H-J.*: Rabbit hemorrhagic disease virus molecular-cloning and nucleotide sequencing of a calicivirus genome. *Virology* 1991, 184, 664-676.
17. *Morisse J-P., Gall G. le, Boilletot E.*: Hepatitis d'origine virale des Leporides: introduction et hypotheses etiologiques. *Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz.* 1991, 10, 269-282.
18. *Nagesha H. S., Wang L. F., Hyatt A. D., Morrissy C. J., Lenghaus C., Westbury H. A.*: Self-assembly, antigenicity, and immunogenicity of the rabbit haemorrhagic disease virus (Czechoslovakian strain V351) capsid protein expressed in baculovirus. *Arch. Virol.* 1995, 140, 1095-1108.
19. *Novotny N., Ros Bascumana C., Ballagi-Pordany A., Gavier-Widen D., Uhlen M., Belak S.*: Phylogenetic analysis of rabbit haemorrhagic disease and European brown hare syndrome viruses by comparison of sequences from the capsid protein gene. *Arch. Virol.* 1997, 142, 657-673.
20. *Ohlinger V. F., Haas B., Meyers G., Weiland F., Thiel H-J.*: Identification of the virus causing rabbit haemorrhagic disease. *J. Virol.* 1990, 64, 3331-3336.
21. *Parra F., Prieto M.*: Purification and characterization of a calicivirus as the causative agent of the lethal hemorrhagic disease in rabbits. *J. Virol.*, 1990, 64, 4013-4015.
22. *Rasschaert D., Huguet S., Madelaine M-F., Vautherot J-F.*: Sequence and genomic organization of a rabbit hemorrhagic disease virus isolated from a wild rabbit. *Virus Genes.* 1994, 9:2, 121-132.