

Badania nad lokalizacją zakażenia latentnego powodowanego przez wirus BHV1

JERZY ROLA, JAN F. ŻMUDZIŃSKI

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

Rola J., Żmudziński J. F.

Investigations on localizing latent infections caused by bovine herpesvirus 1

Summary

The aim of the study was to compare the distribution of BHV1.1 and BHV1.2 strains in various tissues of rabbits during latent infection. When using PCR with external primers, the presence of the Cooper strain (subtype BHV1.1) was only detected in samples of the trigeminal ganglion. When using nested PCR, positive reactions were obtained in samples of the trigeminal ganglion, cerebellum, spinal cord, ophthalmic nerve, tonsils and lungs. The K-22 strain (subtype BHV1.2) was found in the minority of samples. The DNA of the K-22 strain was detected in the trigeminal ganglion in 2 out of 6 infected rabbits during the first PCR reaction. When PCR with internal primers was applied, however, samples of the trigeminal ganglion, cerebral cortex, cerebellum and ophthalmic nerve reacted positively.

Keywords: BHV1, latent infection, PCR

Herpeswirus bydłowy typ 1 (BHV1), zwany także wirusem IBR/IPV, jest jednym z ważniejszych patogenów bydła. Wirus ten jest czynnikiem etiologicznym zakaźnego zapalenia nosa i tchawicy (IBR), pęcherzykowego zapalenia błony śluzowej sromu i pochwy u krów (IPV) oraz napletka i prącia u buhajów (IPB), zapalenia spojówek, zapalenia mózgu i rdzenia kręgowego, poronień oraz zaburzeń w rozrodcie (3, 4, 12). Różnorodność form klinicznych towarzysząca zakażeniu BHV1 jest przyczyną poważnych strat ekonomicznych w hodowli bydła na całym świecie.

BHV1 należy do rodziny *Herpesviridae*, podrodziny *Alphaherpesvirinae*. Genom wirusa zbudowany z liniowego, dwuniciowego DNA wielkości około 136 tys. par zasad ma budowę typową dla grupy D herpeswirusów (11). Składa się z długiej, unikalnej sekwencji U_L oraz krótkiej, unikalnej sekwencji U_S , która otoczona jest odwróconymi, powtarzającymi się sekwencjami – wewnętrzną IR_S i końcową TR_S . Wyróżnia się dwa główne podtypy wirusa BHV1. Szczepy podtypu BHV1.1 określanego również jako „IBR like” wykazują tropizm głównie do układu oddechowego, natomiast podtypu BHV1.2 określanego jako „IPV like” – do układu rozrodczego. Szczepy obu podtypów BHV1 posiadają zdolność powodowania zakażenia latentnego. W następstwie zakażenia pierwotnego BHV1 intensywnie namnaża się w miejscu wnikięcia do organizmu. Następnie wirus transportowany jest wzdłuż aksonów do jąder komórek nerwowych, gdzie może nastąpić dalsza replikacja wirusa prowadząca do śmierci komórki, lub też może dojść do ustanowienia zakażenia latentnego. W trakcie latencji, w zakażonych komórkach wykrywana jest jedynie obecność wiruso-

wego materiału genetycznego. Ponieważ zagadnienie latencji BHV1 nie jest ostatecznie wyjaśnione, celem pracy było porównanie zdolności szczepów BHV1 reprezentujących oba podtypy wirusa do wywoływania zakażenia latentnego oraz ustalenie jego lokalizacji.

Materiał i metody

Do doświadczenia użyto królików o masie 2-3 kg każdy. Króliki podzielono na dwie grupy. Każda grupa składała się z 8 królików, spośród których 6 zakażono wirusem, a 2 pozostałe służyły jako kontrola. Pierwszą grupę królików zakażono szczepem Cooper (podtyp BHV1.1) o mianie $10^{6.5}$ TCID₅₀, drugą zaś szczepem K-22 (podtyp BHV1.2), którego miano zakaźne wynosiło $10^{5.7}$ TCID₅₀. Króliki zakażano dospojówkowo poprzez podanie 0,2 ml zawiesiny odpowiedniego wirusa do prawego i lewego worka spojówkowego. Królikom kontrolnym podawano płyn fizjologiczny w takiej samej objętości.

Próbki do badań. Króliki wykrwawiono po 4 miesiącach od zakażenia. Do badań pobierano następujące próbki: zwój trójdzielny, korę mózgową, mózdzek, rdzeń przedłużony, nerw oczny, migdałki, węzły chłonne podżuchwowe, płuca, serce, śledzionę, nerkę i wątrobę. Próbki narządów wewnętrznych przechowywano w -70°C do czasu dalszych badań.

Ekstrakcja DNA z tkanek królików. Z poszczególnych próbek narządów sporządzano 10% zawiesiny w płynie Eagle'a MEM według ogólnie przyjętych zasad (5). Do ekstrakcji DNA używano 500 μl 10% zawiesiny narządów, dodawano 2 μl proteiny K (25 mg/ml) oraz 25 μl 10% SDS. Całość dokładnie mieszano i inkubowano w łaźni wodnej z wytrząsaniem w temp. 50°C przez 3 godz. Następnie dodawano taką samą objętość mieszaniny fenol : chloroform : alkohol izoamylowy (25 : 24 : 1, pH 8,0), mie-

szano i wirowano przy $12\,000 \times g$ przez 5 min. Do nowej probówki przenoszono fazę wodną, dodawano taką samą objętość mieszaniny chloroform : alkohol izoamyłowy (24 : 1), mieszano i ponownie wirowano przy $12\,000 \times g$ przez 5 min. Supernatant zbierano do nowej probówki, dodawano 1/10 objętości 3 M octanu sodu, pH 5,2 oraz 2,5 objętości 96% etanolu w celu precypitacji DNA. Po wymieszaniu zawartość probówki przechowywano w -20°C przez noc lub w -70°C przez 1 godz. DNA zbierano przez wirowanie przy $12\,000 \times g$ przez 15 min. w 4°C . Osadzoną peletkę DNA przemywano 70% etanolem, suszono, rozpuszczano w 50 μl redestylowanej wody i przechowywano w -20°C do czasu dalszych badań.

Amplifikacja DNA. W badaniach zastosowano zestawy starterów dla genu kodującego glikoproteinę gD wirusa BHV1. Sekwencje starterów i ich lokalizacja w genomie były następujące: startery gD zewnętrzne – D₁ 351-5'GCTGTGGGAAGCGGTACG-368, D₂ 817-5'GTC-GACTATGGCCTTGTGTGC-796, startery gD wewnętrzne – D₃ 394-5'ACGGTCATATGGTACAAGATCGA-GAGCG-422, D₄ 716-CCAAAGGTGTACCCGCGAGCC-696 (13, 15). Pierwsza para starterów amplifikowała fragment długości 466 pz, druga zaś – długości 325 pz. Mieszanina reakcyjna składała się z 5 μl 10 \times buforu dla termostabilnej polimerazy DNA Prime Zyme™, 8 μl 1,25 mM mieszaniny dNTPs, po 1 μl 5 mM roztworu każdego ze starterów i 0,5 μl (2,5 j.) polimerazy DNA Prime Zyme™. Mieszaninę uzupełniano jałową wodą do objętości 50 μl . W reakcji ze starterami zewnętrznymi D₁ i D₂ do mieszaniny reakcyjnej dodawano 5 μl DNA. W nested PCR pobierano 1,5 μl produktu z pierwszej reakcji i wykonywano reamplifikację z użyciem starterów wewnętrznych D₃ i D₄. Warunki amplifikacji dla obu par starterów były identyczne. Najpierw próbki ogrzewano w temp. 95°C przez 5 min., a następnie wykonywano właściwą amplifikację. Każdy cykl obejmował: denaturację 1 min. 95°C , hybrydyzację

1 min. 60°C , elongację 1 min. 72°C . Łącznie wykonywano 35 cykli.

Analiza produktów amplifikacji. Produkty PCR analizowano po przeprowadzeniu rozdzielania elektroforetycznego 10 μl mieszaniny poreakcyjnej w 2% żelu agarozowym. Elektroforezę prowadzono przez 1,5 godz. przy 70 V w buforze TAE (0,04 M Tris-acetate, 0,001 M EDTA, pH 7,8). Jako markera masy molekularnej używano DNA ϕX174 trawionego enzymem Hae III. Wynik PCR uznawano za dodatni, jeżeli w żelu widoczny był prążek DNA o spodziewanej dla danej pary starterów długości.

Wyniki i omówienie

Wyniki badań dotyczące lokalizacji zakażenia latentnego powodowanego przez szczep Cooper przedstawiono w tab. 1. W reakcji PCR ze starterami zewnętrznymi obecność wirusa stwierdzono wyłącznie w próbkach zwoju trójdzielnego. Dodatkowo reagowały próbki pobrane od wszystkich królików zakażonych tym szczepem. Próbki zwoju trójdzielnego wypadły pozytywnie również w nested PCR. Dodatnią reakcją reamplifikacji odnotowano także w przypadku próbek mózdzku, nerwu ocznego i płuc od królika nr 1 (ryc. 1), mózdzku i rdzenia kręgowego od królika nr 2, rdzenia kręgowego od królika nr 3 oraz w próbkach migdałków i płuc od królika nr 5. Próbki narządów pobrane od królików kontrolnych wypadły negatywnie w obu testach PCR.

Wyniki otrzymane dla szczepu K-22 przedstawiono w tab. 2. W reakcji PCR ze starterami D₁ i D₂ obecność DNA szczepu K-22 stwierdzono jedynie w próbkach zwoju trójdzielnego u królików nr 2 i 5. W nested PCR większość pozytywnych wyników uzyskano również dla próbek zwoju trójdzielnego. Dodatkowo reagowały produkty pierwszej reakcji PCR reprezen-

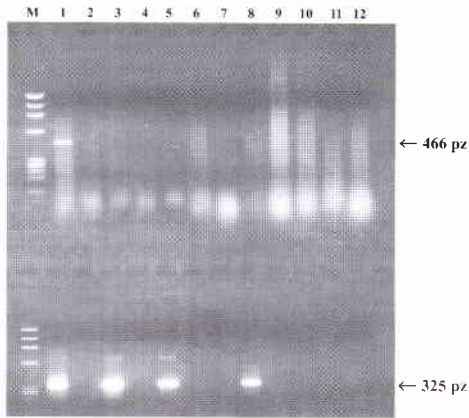
Tab. 1. Rozmieszczenie szczepu Cooper w tkankach królików w trakcie zakażenia latentnego*

Narząd	Królik nr											
	1		2		3		4		5		K	
	z	w	z	w	z	w	z	w	z	w	z	w
Zwój trójdz.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Kora mózg.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mózdzek	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Rdzeń kręg.	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
Nerw oczny	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Migdałki	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
W. chł. płuch.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Płuca	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Serce	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Śledziona	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nerka	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Wątroba	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

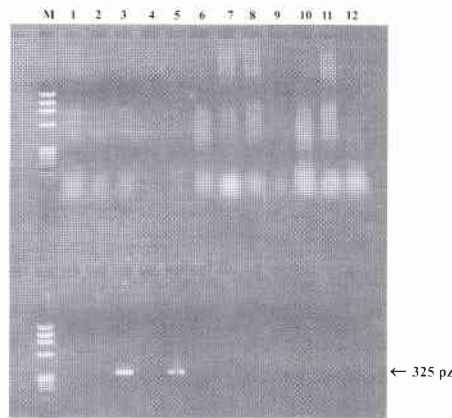
Tab. 2. Rozmieszczenie szczepu K-22 w tkankach królików w trakcie zakażenia latentnego

Narząd	Królik nr													
	1		2		3		4		5		6		K	
	z	w	z	w	z	w	z	w	z	w	z	w	z	w
Zwój trójdz.	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-
Kora mózg.	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Mózdzek	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Rdzeń kręg.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nerw oczny	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Migdałki	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
W. chł. płuch.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Płuca	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Serce	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Śledziona	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nerka	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Wątroba	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Objaśnienia: z – PCR z użyciem starterów D₁ i D₂, w – nested PCR z użyciem starterów D₃ i D₄, K – kontrola, * szósty królik padł w trakcie doświadczenia



Ryc. 1. Elektroforetyczny rozdziel produktów PCR uzyskanych w reakcji starterów zewnętrznych D₁ i D₂ (szereg górny) oraz wewnętrznych D₃ i D₄ (szereg dolny) z DNA izolowanym z tkanek królika nr 1 zakażonego szczepem Cooper, zakażenie latentne. Ścieżki: M – marker, DNA ϕ 174/Hae III, 1 – zwój trójdzielny, 2 – kora mózgowa, 3 – mózdzek, 4 – rdzeń kręgowy, 5 – nerw oczny, 6 – migdałki, 7 – węzeł chłonny podżuchwowy, 8 – płuca, 9 – serce, 10 – śledziona, 11 – nerka, 12 – wątroba



Ryc. 2. Elektroforetyczny rozdziel produktów PCR uzyskanych w reakcji starterów zewnętrznych D₁ i D₂ (szereg górny) oraz wewnętrznych D₃ i D₄ (szereg dolny) z DNA izolowanym z tkanek królika nr 1 zakażonego szczepem K-22, zakażenie latentne. Oznaczenie ścieżek jak na ryc. 1.

tujące próbki zwoju trójdzielnego królików od nr 2

do nr 6. Pozytywną reamplifikację stwierdzono też w przypadku próbek mózdzku i nerwu ocznego od królika nr 1 (ryc. 2), kory mózgowej od królika nr 3 oraz mózdzku od królika nr 4.

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że oba podtypy wirusa BHV1 posiadają zdolność powodowania zakażenia latentnego. Badania te wykazały również, że głównym miejscem lokalizacji zakażenia latentnego jest zwój trójdzielny. Jednakże obecność szczepu Cooper w mózgowiu, migdałkach oraz płucach sugeruje, że zakażenie latentne powodowane przez BHV1 może lokalizować się także w innych tkankach. Dane te są zgodne z wynikami badań innych autorów. Rock i wsp. (8, 9) wykonując badania z użyciem szczepu Cooper wirusa BHV1 stwierdzili również, że zakażenie latentne lokalizowało się w zwoju trójdzielnym. Mweene i wsp. (6) wykazali, że zakażenie latentne może dotyczyć także tkanki limfatycznej i leukocytów. Van Engelenburg i wsp. (14) wykrywali obecność DNA wirusów użytych do zakażenia w próbkach błony śluzowej nosa, węzłów chłonnych podżuchwowych i pozagardłowych oraz zwojów trójdzielnych. Stosując metodę ilościowego PCR autorzy ci wykazali, że w zwojach trójdzielnych zwierząt zakażonych dzikim szczepem BHV1, obecna była zdecydowanie większa ilość DNA wirusowego niż w zwojach zwierząt zakażonych mutantem BHV1 gE⁻. Według niektórych badaczy lokalizacja zakażenia latentnego zależy od drogi zakażenia. Ackermann i wsp. (1) stosując hybrydyzację *in situ* wykazali, że u cieląt zakażonych szczepem Los Angeles (podtyp BHV1.1) drogą donosową zakażenie latentne lokalizowało się w zwojach trójdzielnych. Gdy zaś zwierzęta zakażo-

no drogą dopochwową szczepem należącym do podtypu BHV1.2, zakażenie latentne umiejscawiało się w zwojach krzyżowych (2). W obu przypadkach DNA wirusowe wykrywano w jądrach komórek zwojów nerwowych. Narita i wsp. (7) stwierdzili obecność genomu BHV1 w zwojach trójdzielnych oraz we włóknach nerwów obwodowych cieląt zakażanych drogą donosową i dospojówkową. Rodriguez i wsp. (10) po zbadaniu około 100 próbek zwojów trójdzielnych pobranych od klinicznie zdrowego bydła wyizolowali BHV1 w 10 przypadkach. W późniejszych badaniach autorzy ci stwierdzili, że wyizolowane szczepy różniły się między sobą wielkością wytwarzanych lysinek oraz pato-

gennością dla młodych królików. Podsumowując uzyskane wyniki można stwierdzić, że głównym miejscem lokalizacji zakażenia latentnego, po dospojówkowym podaniu wirusa BHV1, jest zwój trójdzielny. Jednakże zakażenie latentne wywoływane przez ten wirus może również lokalizować się w innych tkankach/narządach, np.: w mózgowiu, migdałkach, płucach.

Piśmiennictwo

- Ackermann M., Peterhans E., Wylter R.: DNA of bovine herpes virus type 1 in the trigeminal ganglia of latently infected calves. *Am. J. Vet. Res.* 1982, 43, 36-40.
- Ackermann M., Wylter R.: The DNA of an IPV strain of bovid herpesvirus 1 in sacral ganglia during latency after intravaginal infection. *Vet. Microbiol.* 1984, 9, 53-63.
- Gibbs E. P. J., Rweyemamu M. M.: Bovine herpesviruses. Part I. Bovine herpesvirus 1. *Vet. Bull.* 1977, 47, 317-343.
- Kahrs R. F.: Infectious bovine rhinotracheitis: a review and update. *J. Am. Vet. Ass.* 1977, 171, 1055-1064.
- Larski Z.: Diagnostyka wirusologiczna chorób zwierząt. PWRiL, Warszawa 1992.
- Mweene A. S., Okazaki K., Kida H.: Detection of viral genome in non-neural tissues of cattle experimentally infected with bovine herpesvirus 1. *Jpn. J. Vet. Res.* 1996, 44, 165-174.
- Narita M., Inui S., Namba K., Shimizu Y.: Neural changes in calves after intra-conjunctival inoculation with infectious bovine rhinotracheitis virus in calves treated with dexamethasone. *Am. J. Vet. Res.* 1978, 39, 1399-1403.
- Rock D. L., Reed D. E.: Persistent infection with bovine herpesvirus type 1: rabbit model. *Infect. Immun.* 1982, 35, 371-373.
- Rock D., Lokensgard J., Lewis T., Kutish G.: Characterization of dexamethasone-induced reactivation of latent bovine herpesvirus 1. *J. Virol.* 1992, 66, 2484-2490.
- Rodriguez L. L., Homan E. J., Easterday B. C.: Characterization of bovine herpesvirus 1 isolated from trigeminal ganglia of clinically healthy cattle. *Am. J. Vet. Res.* 1984, 45, 1069-1072.
- Roizman B.: The family Herpesviridae: an update. *Arch. Virol.* 1992, 123, 425-449.
- Straub O. C.: BHV1 infections: relevance and spread in Europe. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 1991, 14, 175-186.
- Tikoo S. K., Fitzpatrick D. R., Bahiuk L. A., Zamb T. J.: Molecular cloning, sequencing, and expression of functional bovine herpesvirus 1 glycoprotein gIV in transfected bovine cells. *J. Virol.* 1990, 64, 5132-5142.
- Van Engelenburg F. A., Kaashoek M. J., van Oirschot J. T., Rijsewijk F. A.: A glycoprotein E deletion mutant of bovine herpesvirus 1 infects the same limited number of tissues in calves as wild-type virus, but for a shorter period. *J. Gen. Virol.* 1995, 76, 2387-2392.
- Wiedmann M., Brandon R., Wagner P., Dubovi E. J., Batt C. A.: Detection of bovine herpesvirus-1 in bovine semen by a nested PCR assay. *J. Virol. Methods* 1993, 44, 129-139.

Adres autora: doc. dr hab. Jerzy Rola, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy; e-mail: jrola@piwet.pulawy.pl