

Badania nad określeniem genotypu szczepów terenowych herpeswirusa bydła typ 1 izolowanych od bydła w Polsce

JERZY ROLA, WOJCIECH SOCHA, JAN F. ŻMUDZIŃSKI

Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Rola J., Socha W., Żmudziński J. F.

Determining the genotype of bovine herpesvirus 1 strains isolated from cattle in Poland

Summary

The aim of this study was to determine the subtype of bovine herpesvirus 1 (BHV1) strains currently circulating in the cattle population in Poland. Altogether 224 nasal swabs, 36 lung tissue samples and 14 samples of fluid after embryo washing in cows were tested by virus isolation test. Five field strains of BHV1 were isolated. These isolates as well as 4 archival and 2 reference strains of BHV1 were subjected to restriction enzyme analysis. Viral DNA was cleaved with Hind III, Hpa I and Pst I enzymes. After digestion with Hind III typical patterns for BHV1.1 subtype were observed in all field strains. Among archival strains 2 belonged to BHV1.1 and 2 others to B-HV1.2a subtype. These findings were confirmed by digestion with other enzymes. The presented study showed that strains of BHV1.1 subtype are dominant in cattle in Poland

Keywords: cattle, bovine herpesvirus type 1 (BHV1), restriction enzyme analysis

Herpeswirus bydła typ 1 (BHV1), określany wcześniej jako wirus IBR/IPV należy do najważniejszych czynników chorobotwórczych bydła. Wirus ten może powodować zakaźne zapalenie nosa i tchawicy (IBR), pęcherzykowe zapalenie błony śluzowej sromu i pochwy u krów (IPV) lub napletka i prącia u buhajów (IBP), zwane popularnie otrętem bydła, zapalenie spojówek oraz poronienia (13, 20, 22, 23). W wyniku zakażenia BHV1 u krów może dochodzić także do znacznego obniżenia produkcji mleka oraz zaburzeń w rozrodzie w postaci zapalenia macicy i jajników, zaburzeń w tworzeniu ciała żółtego oraz powtarzania rui (7, 11, 12). U zakażonych buhajów obserwuje się okresowe pogorszenie jakości nasienia objawiające się zmniejszoną ruchliwością plemników oraz zwiększonym odsetkiem plemników o nieprawidłowej budowie morfologicznej. Różnorodność form klinicznych wywoływanych przez BHV1 jest przyczyną dużych strat finansowych w hodowli bydła. Straty bezpośrednie wynikają z: upadków zwierząt, poronień, obniżonej produktywności, mniejszych przyrostów masy ciała oraz kosztów leczenia zwierząt. Straty dodatkowe powodują restrykcje nakładane na gospodarstwo, w którym stwierdzono chorobę, ograniczające możliwości obrotu bydlęciem, nasieniem buhajów, zarodkami (8, 9, 16, 21).

Głównym źródłem zakażenia BHV1 w stadzie bydła są zwierzęta chore lub latentnie zakażone. Zakażenie latentne powodowane przez BHV1 lokalizuje się w komórkach zwojów nerwowych (2, 3, 15). Zakażenie to utrzymuje się do końca życia zwierzęcia, a okresowo pod wpływem działania czynników stresowych może dochodzić do jego reaktywacji. Osobniki, u których doszło do reaktywacji zakażenia latentnego mogą nie wykazywać objawów klinicznych i dlatego zwierzęta te są szczególnie niebezpieczne, gdyż wyglądają jak zwierzęta zdrowe, a są siewcami wirusa i źródłem zakażenia dla zwierząt wrażliwych. Występowanie zwierząt latentnie zakażonych w stadach bydła utrudnia realizację programów zwalczania BHV1.

BHV1 należy do rodziny *Herpesviridae*, podrodziny *Alphaherpesvirinae*. Na podstawie analizy restrykcyjnej wirusowego DNA wyodrębniono 3 podtypy wirusa. Podtyp BHV1.1 obejmuje klasyczne szczepy oddechowe izolowane z przypadków IBR, podtyp 1.2a szczepy wywołujące IBR i poronienia, a BHV1.2b – otręt u krów i buhajów. Stwierdzane w ostatnim czasie w Polsce zachorowania u bydła powodowane przez BHV1 miały postać ostrą i przebiegały z objawami ze strony układu oddechowego, którym towarzyszyły poronienia u ciężarnych krów (17). Może to świadczyć o tym, że w populacji bydła krążą obecnie szcze-

py podtypu BHV1.1, które są bardziej zjadliwe niż szczepy podtypu BHV1.2, odpowiedzialne za epizootię otrętu u buhajów w SHiUZ w latach 1970.

Zasadniczym celem badań było określenie wzoru restrykcyjnego szczepów BHV1 krążących aktualnie w populacji bydła w Polsce oraz porównanie uzyskanych wzorów z wzorem restrykcyjnym wybranych szczepów archiwalnych przechowywanych w zbiorach Zakładu Wirusologii Państwowego Instytutu Weterynaryjnego w Puławach.

Materiał i metody

Próbki. Materiał do badań stanowiły próbki wymazów z nosa pochodzące od bydła podejrzanego o zakażenie BHV1, wycinki narządów wewnętrznych z poronionych płodów i zwierząt padłych z objawami ze strony układu oddechowego oraz płyn po płukaniu zarodków u krów. Ogółem w latach 2005-2009 badaniu poddano 224 próbki wymazów, 36 próbek wycinków z płuc i 14 próbek płynu po płukaniu zarodków u krów. Do badań użyto także 4 szczepów archiwalnych oraz szczepów referencyjnych Los Angeles i K-22 wirusa BHV1.

Izolacja wirusa. Izolację BHV1 prowadzono w hodowli komórek MDBK w 24-dółkowych płytkach z płaskim dnem. Próbki narządów wewnętrznych poddawano homogenizacji sporządzając 10% zawiesinę w płynie Eagle'a MEM, wymazy zaś zalewano płynem z dodatkiem antybiotyków i wirowano przy $1000 \times g$ przez 10 min. w 4°C. Uzyskanym supernatantem zakażano wyrośniętą hodowlę MDBK. Płytki inkubowano 1 godz. w 37°C, następnie odciągano inokulum, a hodowlę zalewano płynem utrzymującym i ponownie inkubowano w 37°C. Zakażoną hodowlę komórek oglądano pod mikroskopem codziennie przez okres 5-7 dni. W przypadku pojawienia się charakterystycznego dla herpeswirusów efektu cytopatycznego materiał wirusowy zbierano i przechowywano do dalszych badań.

Namnażanie i oczyszczanie szczepów wirusowych. Szczepy referencyjne Los Angeles i K-22, szczepy archiwalne oraz izolaty terenowe BHV1 namnażano w hodowli MDBK. Każdym szczepem zakażano 4 butelki pokryte jednowarstwową hodowlą komórek o powierzchni dna 165 cm^2 . Zbiór wirusa dokonywano przy 100% efekcie cytopatycznym. Uzyskany materiał wirusowy wirowano wstępnie przy $2000 \times g$ przez 30 min. Zebrany supernatant ultrawirovano (L7-65 Beckman) przy $100\,000 \times g$ przez 2 godz. w 4°C, a uzyskaną peletkę zawieszano w buforze TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0).

Ekstrakcja genomowego DNA. Do ekstrakcji używano całości materiału wirusowego uzyskanego po oczyszczeniu szczepów wirusowych, dodawano 2 μl proteinazy K (25 mg/ml) oraz 25 μl 10% SDS. Zawartość próbek dokładnie mieszano i inkubowano w łaźni wodnej z wytrząsaniem w temp. 37°C przez 2-3 godz. Następnie dodawano taką samą objętość mieszaniny fenol:chloroform:alkohol izoamylowy (25 : 24 : 1, pH 8,0, Sigma), mieszano i wirowano przy $12\,000 \times g$ przez 5 min. Do nowej próbki przenoszono fazę wodną, dodawano taką samą objętość mieszaniny chloroform:alkohol izoamylowy (24 : 1), mieszano i ponownie wirowano przy $12\,000 \times g$ przez 5 min. Supernatant zbierano do nowej próbki, dodawano 1/10 objętości 3 M octanu sodu, pH 5,2 (Sigma) oraz 2,5 obję-

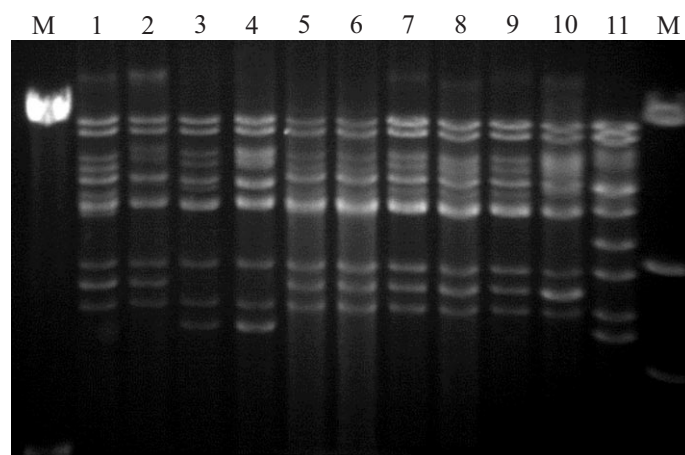
tości 96% etanolu w celu precypitacji DNA. Po wymieszaniu zawartość próbki przechowywano w -20°C przez noc lub w -70°C przez 1 godz. DNA zbierano przez wirowanie przy $12\,000 \times g$ przez 15 min. w 4°C. Osadzoną peletkę DNA przemywano 70% etanolem, suszono, rozpuszczano w 50 μl redestylowanej wody.

Analiza polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP). Do trawienia DNA szczepów referencyjnych BHV1 oraz izolatów terenowych używano następujących enzymów restrykcyjnych: Hind III, Hpa I i Pst I (MBI Fermentas). Do próbki DNA wirusowego (około 1 μg) dodawano 10 j. enzymu restrykcyjnego oraz 1/10 objętości końcowej odpowiedniego buforu. Całość uzupełniano wodą do żądanej objętości, delikatnie mieszano i inkubowano w temperaturze 37°C przez 2 godz. Po tym czasie do mieszaniny dodawano bufor próbkowy, a następnie poszczególne próbki nanoszono na 0,7% żel agarozowy z dodatkiem bromku etydyyny o stężeniu 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Elektroforezę prowadzono w buforze TAE przy napięciu 30 V przez 18-20 godz. Jako wzorca używano DNA faga lambda trawionego enzymem Hind III lub Eco RI/Hind III (Gibco BRL). Po zakończeniu elektroforezy żel oglądano w świetle UV i fotografowano.

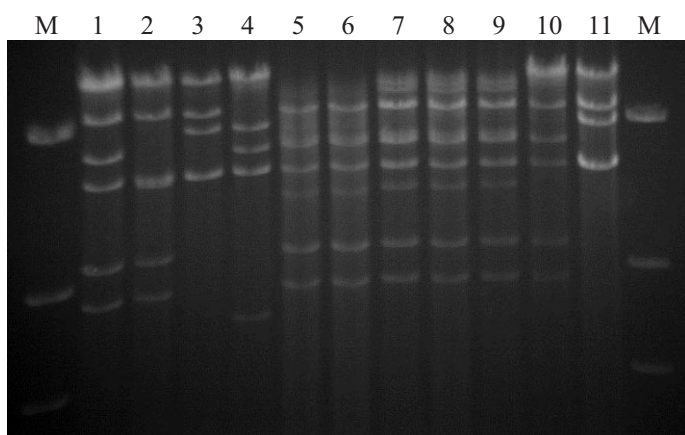
Wyniki i omówienie

W ciągu kilku ostatnich lat w Zakładzie Wirusologii PIWet. w Puławach wyizolowano 5 szczepów terenowych BHV1. Cztery szczepy wyizolowano z wymazów z nosa od dorosłego bydła, a jeden z płuc od 2-tygodniowego cielęcia padłego z powodu zakażenia górnych dróg oddechowych. Efekt cytopatyczny charakterystyczny dla herpeswirusów stwierdzano z reguły już w pierwszym pasażu, po zakażeniu hodowli komórkowej MDBK.

Wyizolowane szczepy poddano następnie badaniu z użyciem metody RFLP. Do badań użyto także 4 szczepów archiwalnych oraz 2 szczepów referencyjnych wirusa BHV1. Po trawieniu enzymem Hind III stwierdzono, że wzory restrykcyjne szczepów terenowych BHV1 (ryc. 1, ścieżki 5-9) nie różniły się między sobą



Ryc. 1. Wzór restrykcyjny szczepów BHV1 po trawieniu enzymem Hind III. Ścieżki: M – marker, DNA λ trawiony Eco RI/Hind III, 1-4 – archiwalne szczepy BHV1, 5-9 – terenowe szczepy BHV1, 10 – szczep referencyjny BHV1 Los Angeles, 11 – szczep referencyjny BHV1 K-22, M – marker, DNA λ trawiony Hind III



Ryc. 2. Wzór restrykcyjny szczepów BHV1 po trawieniu enzymem Hpa I. Ścieżki: M – marker, DNA λ trawiony Hind III, 1-4 – archiwalne szczepy BHV1, 5-9 – terenowe szczepy BHV1, 10 – szczep referencyjny BHV1 Los Angeles, 11 – szczep referencyjny BHV1 K-22

i były podobne do wzoru restrykcyjnego szczepu referencyjnego Los Angeles, reprezentującego podtyp BHV1.1 (ryc. 1, ścieżka 10). Różnice między wzorami restrykcyjnymi stwierdzono wśród szczepów archiwalnych. Szczepy oznaczone jako 2/13 i Gorzów miały wzór restrykcyjny charakterystyczny dla podtypu BHV1.1 (ryc. 1, ścieżki 1, 2), zaś dwa pozostałe szczepy opisane jako Frezer i Muskat posiadały wzór podobny do wzoru szczepów podtypu BHV1.2a (ryc. 1, ścieżki 3, 4).

Wyniki trawienia DNA badanych szczepów endonukleazą Hpa I przedstawia ryc. 2. Również w przypadku tego enzymu wzory restrykcyjne szczepów terenowych BHV1 wyizolowanych w ostatnich latach były podobne do siebie (ryc. 2, ścieżki 5-9). Z kolei wśród szczepów archiwalnych stwierdzono dalsze różnice. Wzory restrykcyjne szczepów 2/13 i Gorzów różniły się fragmentem C. W szablonie szczepu 2/13 fragment ten migruje w żelu samodzielnie (ryc. 2, ścieżka 1), natomiast w szablonie szczepu Gorzów jest on podobnej wielkości, jak fragment D i oba fragmenty migrują razem (ryc. 2, ścieżka 2).

Różnice stwierdzono także w szablonach szczepów Frezer i Muskat. We wzorze restrykcyjnym szczepu Frezer widoczne są 4 fragmenty (ryc. 2, ścieżka 3), a wzór szczepu Muskat zawiera 5 fragmentów DNA (ryc. 2, ścieżka 4).

Otręt, czyli płciowa forma zakażenia wirusem BHV1, opisywany był w Europie już w połowie XIX wieku jako zakaźna, łagodnie przebiegająca choroba układu rozrodczego bydła. Z kolei forma oddechowa przebiegająca klinicznie w postaci zakaźnego zapalenia nosa i tchawicy zaobserwowana została po raz pierwszy w USA na początku lat pięćdziesiątych XX wieku. Pierwsze próby klasyfikacji herpeswirusów bydła z użyciem analizy restrykcyjnej wirusowego DNA przeprowadzone zostały na początku lat osiemdziesiątych ubiegłego stulecia. Engels i wsp. (6) oraz Metzler i wsp. (10) stosując tę metodę, stwierdzili wyraźne róż-

nice między wzorami restrykcyjnymi szczepów izolowanych z układu oddechowego i układu płciowego bydła. W kolejnych latach badacze szwajcarscy wybrali zestaw składający się z 4 różnych endonukleaz i w oparciu o wzory restrykcyjne DNA uzyskane po trawieniu tymi enzymami opracowali system identyfikacji szczepów BHV1 (1). Porównanie wzoru restrykcyjnego nowo izolowanego szczepu BHV1 z wzorami restrykcyjnymi szczepów archiwalnych przechowywanymi w bazie danych pozwalało szybko określić podtyp wirusa oraz zidentyfikować szczep, do którego jest on podobny.

Pojawienie się nowego genotypu wirusa BHV1 na Wyspach Brytyjskich zaobserwowano najwcześniej w Szkocji. Według Nettletona (14), wystąpienie pierwszych przypadków zakaźnego zapalenia nosa i tchawicy spowodowane było przedostaniem się do populacji bydła bardziej zjadliwego podtypu BHV1.1. Edwards i wsp. (4, 5), wykonując analizę restrykcyjną ponad 80 izolatów BHV1 wyizolowanych w Anglii i Walii w latach 1960-1987, stwierdzili, że podtyp BHV1.1 wyparł niemal całkowicie z populacji bydła podtyp BHV1.2. Autorzy wykazali, że izolaty pochodzące z lat 1960. i wczesnych 1970. należały do podtypu BHV1.2b i powodowały zachorowania o łagodnym przebiegu. Od 1977 r. zaczęto izolować głównie szczepy należące do podtypu BHV1.1. Według autorów, podtyp ten został sprowadzony do Wielkiej Brytanii z latentnie zakażonym bydlęm importowanym z USA.

Badania tego typu przeprowadzone w Polsce w latach dziewięćdziesiątych ubiegłego wieku wykazały, że w okresie po stwierdzeniu pierwszych przypadków zakażeń BHV1 na obszarze naszego kraju występowały oba główne podtypy wirusa BHV1. Rola i wsp. (18), analizując szczepy BHV1 wyizolowane z nasienia zakażonych buhajów, stwierdzili, że należały one do podtypów BHV1.1 i BHV1.2. Z kolei Salwa (19) wykazał, że szczepy wyizolowane od krów i buhajów z objawami otrętu należały do podtypu BHV1.2a. Analiza szablonów restrykcyjnych szczepów BHV1 wyizolowanych w ciągu ostatnich kilku lat wykazała, że szczepy te należały do podtypu BHV1.1. Wśród szczepów archiwalnych 2 należały do podtypu BHV1.1, a 2 inne do podtypu BHV1.2a. Reasumując, na podstawie przeprowadzonych badań można przyjąć, że aktualnie szczepy należące do podtypu BHV1.1 dominują w populacji bydła w Polsce.

Piśmiennictwo

1. Ackermann M., Engels M.: Pro and contra IBR-eradication. *Vet. Microbiol.* 2006, 113, 293-302.
2. Ackermann M., Peterhans E., Wylser R.: DNA of bovine herpes virus type 1 in the trigeminal ganglia of latently infected calves. *Am. J. Vet. Res.* 1982, 43, 36-40.
3. Ackermann M., Wylser R.: The DNA of an IPV strain of bovine herpesvirus 1 in sacral ganglia during latency after intravaginal infection. *Vet. Microbiol.* 1984, 9, 53-63.
4. Edwards S., Newman R. H., White H.: The virulence of british isolates of bovine herpesvirus 1 in relationship to viral genotype. *Br. vet. J.* 1991, 147, 216-230.

5. Edwards S., White H., Nixon P.: A study of the predominant genotypes of bovid herpesvirus 1 found in the U.K. *Vet. Microbiol.* 1990, 22, 213-223.
6. Engels M., Steck F., Wylter R.: Comparison of the genomes of infectious bovine rhinotracheitis and infectious pustular vulvovaginitis virus strains by restriction endonuclease analysis. *Arch. Virol.* 1981, 67, 169-174.
7. Hage J. J., Schukken Y. H., Dijkstra T., Barkema H. W., van Valkengoed P. H. R., Wentink G. H.: Milk production and reproduction during a subclinical bovine herpesvirus 1 infection on a dairy farm. *Prev. Vet. Med.* 1998, 34, 97-106.
8. Kendrick J. W., McEntree K.: The effect of artificial insemination with semen contaminated with IBR/IPV virus. *Cornell Vet.* 1987, 57, 3-11.
9. Kupferschmied H. U., Kihm U., Bachmann P., Muller K., Ackermann M.: Transmission of IBR/IPV virus in bovine semen: a case report. *Theriogenology* 1986, 25, 439-443.
10. Metzler A. E., Matile H., Gassmann U., Engels M., Wylter R.: European isolates of bovine herpesvirus 1: a comparison of restriction endonuclease sites, polypeptides, and reactivity with monoclonal antibodies. *Arch. Virol.* 1985, 85, 57-69.
11. Miller J. M.: The effects of IBR virus infection on reproductive function of cattle. *Vet. Med.* 1991, 86, 95-98.
12. Miller J. M., Whetstone C. A., Van der Maaten M. J.: Abortifacient property of bovine herpesvirus type 1 isolates that represent three subtypes determined by restriction endonuclease analysis of viral DNA. *Am. J. Vet. Res.* 1991, 52, 458-461.
13. Muylkens B., Thiry J., Kirten P., Schynts F., Thiry E.: Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. *Vet. Res.* 2007, 38, 181-209.
14. Nettleton P. F.: The diagnosis of infectious bovine rhinotracheitis. *Vet. Ann.* 1986, 26, 90-99.
15. Pastoret P. P., Thiry E., Brochier B., Derboven G.: Bovine herpesvirus 1 infection of cattle: pathogenesis, latency, consequences of latency. *Ann. Rech. Vet.* 1982, 13, 221-235.
16. Philpott M.: The dangers of disease transmission by artificial insemination and embryo transfer. *Br. Vet. J.* 1993, 149, 339-370.
17. Rola J., Larska M., Polak M. P.: Detection of bovine herpesvirus 1 from an outbreak of infectious bovine rhinotracheitis. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 2005, 49, 267-271.
18. Rola J., Żmudziński J. F.: Analiza restrykcyjna DNA szczepów wirusa BHV1 izolowanych z nasienia buhajów. *Medycyna Wet.* 1996, 53, 42-45.
19. Salwa A.: Charakterystyka zakażeń herpeswirusem bydłowym typu 1 (BHV1) w stadach krów mlecznych z uwzględnieniem aspektów epizootologii molekularnej. Praca hab. SGGW, Warszawa 1997.
20. Straub O. C.: BHV1 infections: relevance and spread in Europe. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 1991, 14, 175-186.
21. Van Oirschot J. T., Straver P. J., van Lieshout J. A., Quak J., Westenbrink F., van Exsel A. C.: A subclinical infection of bulls with bovine herpesvirus type 1 at an artificial insemination centre. *Vet. Rec.* 1993, 132, 32-35.
22. Van Wuijckhuise L., Bosch J., Franken P., Frankena K., Elbers A. R.: Epidemiological characteristics of bovine herpesvirus 1 infections determined by bulk milk testing of all Dutch dairy herds. *Vet. Rec.* 1998, 142, 181-184.
23. Wentink G. H., Van Oirschot J. T., Verhoeff J.: Risk of infection with bovine herpes virus 1 (BHV1): a review. *Vet. Q.* 1993, 15, 30-33.

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