

stanowiły koty w wieku powyżej 12 miesięcy. W grupie wiekowej 6-12 miesięcy jedynie 12,6% posiadało dodatnie miana przeciwciał podczas gdy w grupie zwierząt starszych (powyżej 1 roku) odsetek seroreagentów dodatnich wynosił 34,9%. Najniższy odsetek kotów posiadających przeciwciała dla wirusa FHV-1 zanotowano w grupie wiekowej do 3 miesięcy. W przeprowadzonych badaniach nie stwierdzono występowania zależności rasowej w stosunku do częstości zakażeń herpeswirusowych u kotów.

Przy analizie przedstawionych wyników należy uwzględnić, istotny z epizootycznego punktu widzenia fakt, że wszystkie badane koty nie były uprzednio szczepione przeciwko zakażnemu zapaleniu nosa i tchawicy. Stwierdzenie więc, tak dużej liczby seroreagentów dodatnich wśród nie szczepionych zwierząt świadczy o znacznym rozprzestrzenieniu zakażeń herpeswirusowych kotów w Polsce. Ponadto, wysokie miana przeciwciał u większości dodatnio reagujących kotów przemawiają za istnieniem dużej grupy zwierząt mogących stanowić potencjalne źródło wirusa (4, 5). Wykazano bowiem, że częstość izolacji wirusa FHV-1 była największa wśród kotów posiadających wysokie miana przeciwciał (2, 3, 4, 5, 6, 7). Zdaniem większości autorów, wysoki poziom przeciwciał FHV-1 u kotów nie szczepionych, często również nie wykazujących klinicznych objawów URTD, świadczy o przetrwałej infekcji lub o ustaleniu się nosicielstwa wirusa (4, 5). Stwierdzony wysoki odsetek seroreagentów dodatnich wśród kotów pochodzących z dużych ośrodków miejskich wskazuje, że częstość występowania zakażeń herpeswirusowych związana jest z warunkami bytowania zwierząt. Z danych piśmiennictwa wynika, że najwięcej przypadków URTD notowanych jest w dużych, zagęszczonych populacjach kotów (7, 11). Potwierdzeniem tego są wyniki badań przeprowadzonych wśród

kotów pochodzących ze schroniska dla zwierząt, w którym nie prowadzono szczepień ochronnych. Odsetek seroreagentów dodatnich w tej grupie wynosił 82% przy czym 61,4% zwierząt posiadało bardzo wysokie (>64) miana przeciwciał FHV-1. Powyższy wynik świadczy również o aktywnie przebiegającej i stale utrzymującej się infekcji herpeswirusowej w omawianej populacji kotów. Można przypuszczać, że podobna sytuacja panuje w większości polskich schronisk dla zwierząt.

Przedstawione wyniki wskazujące na częste występowanie zakażeń herpeswirusowych u kotów w Polsce przemawiają za celowością podjęcia swoistej profilaktyki. Należy jednak zaznaczyć, że jak wynika z obserwacji poczynionych w krajach, w których immunoprofilaktyka zakażeń FHV-1 prowadzona jest od ponad 10 lat, szczepienia kotów nie eliminują w 100% problemu infekcji herpeswirusowych. Stosowanie szczepień ochronnych łagodzi jednak kliniczny przebieg choroby.

Piśmiennictwo

1. Bittle J. L., Peckham J. C.: J. Am. Vet. Med. Ass. 158, 927, 1971.
2. Ellis T. M.: Aust. Vet. J. 57, 115, 1981.
3. Ellis T. M.: Res. Vet. Sci. 33, 270, 1982.
4. Gaskell R. M., Povey R. C.: Vet. Rec. 93, 204, 1973.
5. Gaskell R. M., Povey R. C.: Vet. Rec. 100, 128, 1977.
6. Gaskell R. M., Povey R. C.: Res. Vet. Sci. 27, 167, 1979.
7. Gaskell R. M., Povey R. C.: Vet. Rec. 111, 359, 1982.
8. Górski J., Wójcik J.: Życie wet. 68, 226, 1993.
9. Jensen M. H.: Acta vet. scand. 22, 85, 1981.
10. Larski Z.: Diagnostyka wirusologiczna chorób zwierząt. PWRiL, Warszawa 1992.
11. Pedersen N. C.: Feline Herpesvirus Type 1 w: Virus Infection of Carnivores, Elsevier Sci. Publ. B. V., Amsterdam 1987.
12. Wójcik J.: Bull. vet. inst. Puławy 38, 77, 1994.

Adres autora: dr Jacek Wójcik, ul. Kościuszki 12/23, 24-100 Puławy

JERZY ROLA, JAN ŻMUDZIŃSKI

Analiza restrykcyjna DNA szczepów wirusa BHV 1 izolowanych z nasienia buhajów

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

Summary

Restriction enzyme analysis of BHV1 strains isolated from bovine semen

Field strains of BHV1 isolated from bovine semen at different periods in Poland have been studied by the restriction enzyme analysis of DNA. It has been shown that the *Aguille* strain isolated in 1976 belongs to the subtype BHV 1.2 which comprises IPV strains. But strains III/2, III/3 and 6/42 isolated in 1981 belong to the subtype BHV 1.1 which comprises IBR strains.

Zakażenie wirusem BHV 1 może przybierać różne formy kliniczne, spośród których zakażne zapalenie nosa i tchawicy (IBR) oraz otręt bydła (IPV) są najbardziej znanymi i najważniejszymi z ekonomicznego i epizootologicznego punktu widzenia (1, 2, 3, 8, 9). Próby różnicowania szczepów wirusa BHV 1 metodami serologicznymi, na podstawie markerów biologicznych, namnażania się w hodowlach komórkowych, wielkości łysinek okazały się nieskuteczne (6, 10, 11, 12, 15, 16). Jedyną metodą pozwalającą pewnie różnicować szczepy IBR od szczepów IPV jest analiza restrykcyjna ich DNA.

Celem pracy było określenie, przy pomocy analizy restrykcyjnej DNA, czy szczepy wirusa BHV 1 wyizolowane z na-

sienia buhajów w Polsce, w odstępie kilku lat, należą do tego samego podtypu, czy też do różnych podtypów.

Materiał i metody

Hodowla komórek: wirusy namnażano w hodowli komórek linii ciągłej tchawicy bydła (TR).

Szczepy wirusa: w badaniach użyto szczep referencyjny IPV 468 uzyskany od prof. Barthy z Centralnego Instytutu Weterynarii w Budapeszcie. Szczep ten wyizolowany został na Węgrzech od buhaja z klinicznymi objawami otętu w 1968 r. Terenowe szczepy *Agille*, III/2, III/3, 6/42 wirusa BHV 1 wyizolowano z nasienia buhajów w Polsce. Szczep *Agille* wyizolowano w 1976 r., zaś szczepy III/2, III/3, 6/42 wyizolowano w 1981 r.

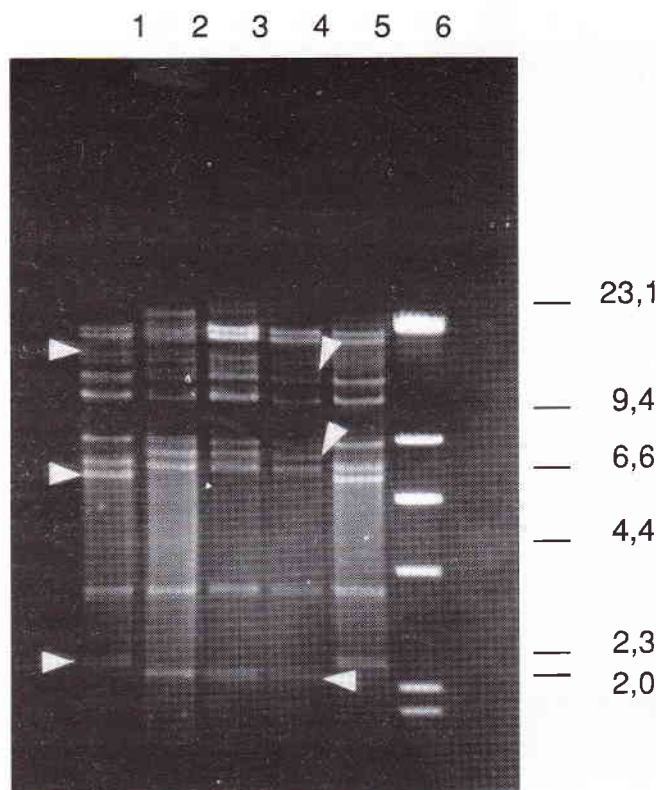
Izolacja wirusowego DNA: jednowarstwową hodowlę komórek TR zakażano poszczególnymi szczepami terenowymi wirusa BHV 1 przy współczynniku wielokrotności zakażenia 0,1-1. Zbiór wirusa dokonywano przy 100% efekcie cytopatycznym. Uzyskany materiał wirusowy wirowano wstępnie, a następnie supernatant ultrawirowano przez 40% „poduszkę” sacharozową przy 100 000xg. Peletkę zawieszano w buforze TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,6). Tak oczyszczony wirus traktowano proteinazą K (0,1 mg/ml) i SDS (0,5%) przez 1 godz. w 37°C. Następnie dokonywano ekstrakcji DNA 2 razy mieszaniną fenol:chloroform:alkohol izoamylowy (25:24:1) i 1 raz mieszaniną chloroform:alkohol izoamylowy (24:1). DNA precipitowano dodając 2 objętości etanolu i 1/10 objętości 3M octanu sodu (pH 5,2).

Analiza restrykcyjna: do badań używano endonukleaz Hind III, Pst I, Bam HI, Eco RI wszystkie o koncentracji 8-12 U/μl. Trawiono około 1 μg DNA badanych szczepów. Mieszaninę DNA i enzymu inkubowano 2 godz. w 37°C, a następnie dodawano roztworu obciążającego (0,25% błękit bromofenolowy, 60% sacharoza). Produkty trawienia nanoszono na 0,6% żel agarozowy. Elektroforezę prowadzono w buforze TAE (0,04 M Tris-acetate, 0,001 M EDTA, pH 8,0) przy stałym napięciu 45V. Żel barwiono w bromku etydyny (1 μg/ml) przez 30 min. i fotografowano w świetle UV. Jako marker długości łańcucha nukleotydowego używano DNA faga lambda trawiony enzymem Hind III.

Wyniki i omówienie

Użyte w badaniach enzymy restrykcyjne Hind III, Pst I, Bam HI, Eco RI pozwoliły wykazać znamienne różnice w szablonych elektroforetycznych DNA badanych szczepów. Stwierdzono, że szablony elektroforetyczne DNA szczepu *Agille* były identyczne jak szablony DNA szczepu referencyjnego IPV 468. Z kolei szablony elektroforetyczne DNA szczepów III/2, III/3, 6/42 były bardzo podobne i znamienne różniły się od szablonów elektroforetycznych szczepów *Agille* i IPV 468. Przy trawieniu enzymem Hind III DNA każdego szczepu macierzystego cięte było na 11 fragmentów. Fragmenty C o długości 19 tysięcy par zasad (kbp) oraz K i Ł o długościach 7,7 kbp i 2,7 kbp występowały tylko w genomie szczepów *Agille* i referencyjnego IPV 468. Z kolei fragmenty E o długości 16 kbp, I – 8,6 kbp i M – 2,5 kbp były obecne wyłącznie w genomie szczepów III/2, III/3, 6/42 (tab. 1, ryc. 1).

W przypadku enzymu Pst I DNA badanych szczepów trawione było na wiele małych fragmentów. Analizę uzyskanych szablonów przeprowadzono dla zakresu migracji markerów 23130 bp – 2027 bp. Fragmenty B (7,5 kbp), I (4,6 kbp), N (3,25 kbp), R (2,45 kbp) występowały w genomie szczepów *Agille* i IPV 468. Natomiast fragmenty H (5,0 kbp), J (4,4 kbp) i Ł (3,7 kbp) występowały w genomie szczepów III/2, III/3, 6/42. DNA szczepu III/2 jako jedyny wykazywał do-



Ryc. 1. Szablon elektroforetyczny DNA szczepów BHV 1 po trawieniu enzymem Hind III

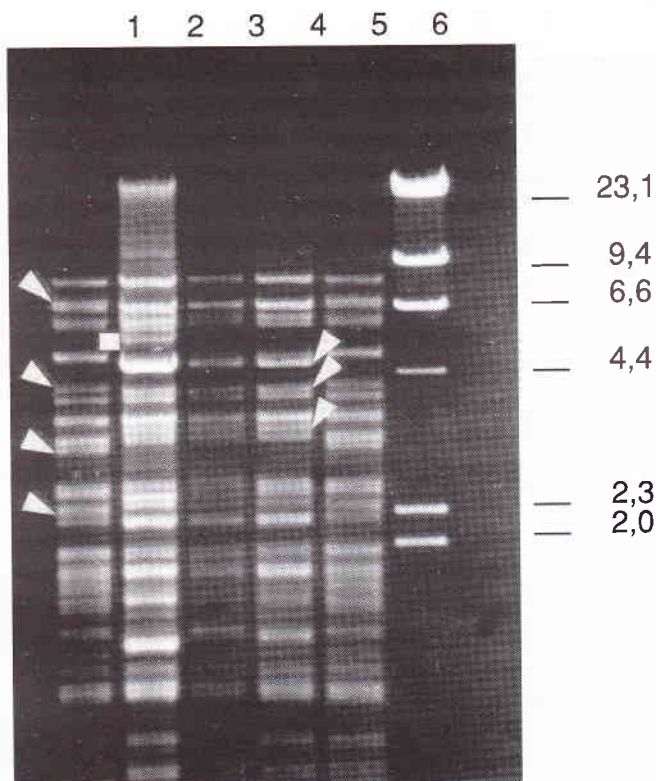
Objaśnienia do rycin 1-4

ścieżki: 1 – szczep *Agille*, 2 – szczep III/2, 3 – szczep III/3, 4 – szczep 6/42, 5 – szczep IPV 468, 6 – DNA faga lambda trawiony enzymem Hind III jako marker.

Tab. 1. Wielkość fragmentów DNA szczepów BHV 1 po trawieniu enzymem Hind III

Fragmenty (kbp)	Hind III				
	<i>Agille</i>	III/2	III/3	6/42	IPV 468
A	23	23	23	23	23
B	22	22	22	22	22
* C	19	–	–	–	19
D	17,5	17,5	17,5	17,5	17,5
* E	–	16	16	16	–
F	15	15	15	15	15
G	13	13	13	13	13
H	9,4	9,4	9,4	9,4	9,4
* I	–	8,6	8,6	8,6	–
J	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0
* K	7,7	–	–	–	7,7
L	3,9	3,9	3,9	3,9	3,9
* Ł	2,7	–	–	–	2,7
* M	–	2,5	2,5	2,5	–
Liczba fragment.	11	11	11	11	11

Objaśnienie: * – fragmenty różniące szablony restrykcyjne szczepów BHV 1.

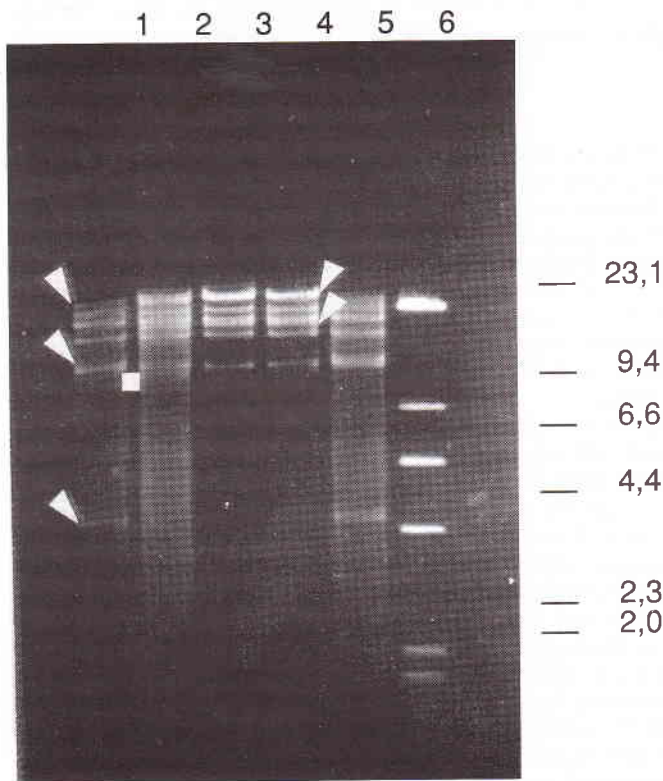


Ryc. 2. Szablon elektroforetyczny DNA szczepów BHV 1 po trawieniu enzymem Pst I

Tab. 2. Wielkość fragmentów DNA szczepów BHV 1 po trawieniu enzymem Pst I

Fragmenty (kbp)	Pst I				
	<i>Agille</i>	III/2	III/3	6/42	IPV 468
A	8,8	8,8	8,8	8,8	8,8
* B	7,5	—	—	—	7,5
C	7,3	7,3	7,3	7,3	7,3
D	6,8	6,8	6,8	6,8	6,8
E	6,4	6,4	6,4	6,4	6,4
→ F	—	6,2	—	—	—
G	5,3	5,3	5,3	5,3	5,3
* H	—	5,0	5,0	5,0	—
* I	4,6	—	—	—	4,6
* J	—	4,4	4,4	4,4	—
K	4,2	4,2	4,2	4,2	4,2
L	3,9	3,9	3,9	3,9	3,9
* Ł	—	3,7	3,7	3,7	—
M	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
* N	3,25	—	—	—	3,25
O	2,8	2,8	2,8	2,8	2,8
P	2,6	2,55	2,6	2,6	2,6
Q	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
* R	2,45	—	—	—	2,45
S	2,35	2,35	2,35	2,35	2,35
Liczba fragment.	16	16	15	15	16

Objaśnienia: * – fragmenty różniące szablony restrykcyjne szczepów BHV 1, → – fragment różniący szablon restrykcyjny szczepu III/2 od szczepu III/3 i 6/42.



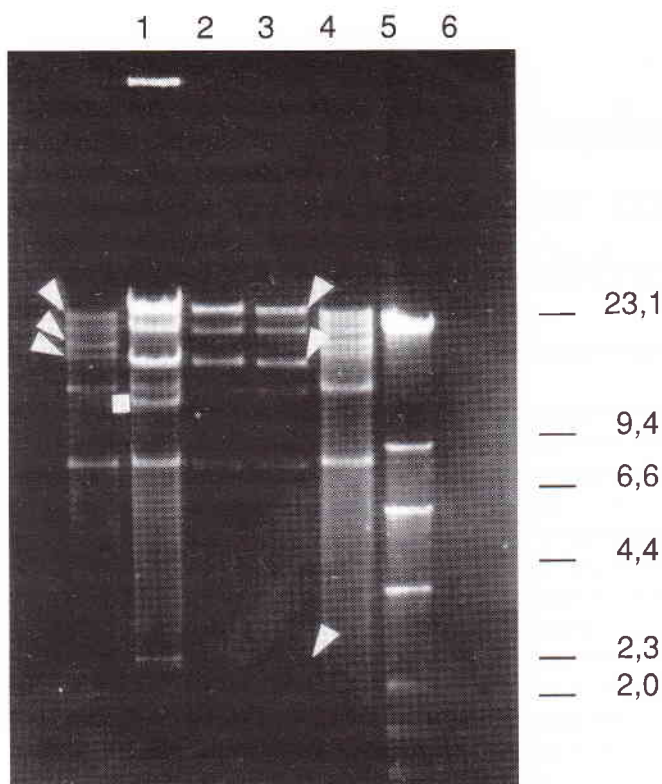
Ryc. 3. Szablon elektroforetyczny DNA szczepów BHV 1 po trawieniu enzymem Bam HI

datkowe miejsce restrykcyjne charakteryzujące się obecnością fragmentu F o długości 6,2 kbp (tab. 2, ryc. 2).

Wynik trawienia enzymem Bam HI przedstawia tab. 3. Po trawieniu tym enzymem uzyskano 7 fragmentów w przypadku szczepów *Agille*, III/2, 6/42 i IPV 468. DNA szczepu III/3 trawiony był na 6 fragmentów. W szablonie elektroforetycznym DNA tego szczepu brak było fragmentu I. Fragment I różnicował również szczepy III/2 i 6/42, bowiem w szczepie III/2 wykazywał długość 11,5 kbp, a w szczepie 6/42 – 12,2 kbp. Fragmenty B (25 kbp), G (13,5 kbp), J (4,9 kbp) były obecne w genomie szczepów *Agille* i IPV 468, zaś fragmenty A (27 kbp) i E (19,5 kbp) były obecne w genomach szczepów III/2, III/3, 6/42 (tab. 3, ryc. 3).

Również trawienie enzymem Eco RI potwierdzało występowanie różnic w szablonach elektroforetycznych badanych szczepów. Fragmenty B (27 kbp), D (22 kbp) i E (18,5 kbp) występowały w genomie szczepów *Agille* i referencyjnego IPV 468. Natomiast fragmenty A (28 kbp), F (17,5 kbp), J (2,9 kbp) były obecne w genomie szczepów III/2, III/3, 6/42. Ponadto DNA szczepu III/2 posiadał dodatkowe miejsce restrykcyjne, które umożliwiało wyodrębnienie fragmentu H o długości 12,7 kbp różniącego szczep III/2 od szczepów III/3 i 6/42 (tab. 4, ryc. 4).

Porównując uzyskane wyniki z danymi piśmiennictwa (4, 13, 14) stwierdzono, że szczep *Agille* należy do podtypu BHV 1.2 określanego jako „IPV podobny” (ścieżki 1 ryc. 1-4). Natomiast szczepy III/2, III/3, 6/42, pomimo że zostały wyizolowane z nasienia buhajów, należą do podtypu BHV 1.1 określanego jako „IBR podobny” (ścieżki 2, 3, 4, ryc. 1-4). Należy tu podkreślić, że szczep *Agille* wyizolowany został w 1976 r. z ogniska otrętu, które wystąpiło w Polsce po raz pierwszy. Pozostałe szczepy wyizolowano w 1981 r., w którym zanotowano znaczne zwiększenie się liczby przypadków oraz ognisk otrętu w Polsce. Opierając się na uzyskanych wynikach



Ryc. 4. Szablon elektroforetyczny DNA szczepów BHV 1 po trawieniu enzymem Eco RI

należy stwierdzić, że przypadki otrętu notowane w 1981 r. powodowane były przez podtyp BHV 1.1 (IBR), który jest podtypem bardziej zjadliwym niż podtyp BHV 1.2 (IPV) i najczęściej był izolowany z przypadków zakażeń układu oddechowego.

Możliwość różnicowania szczepów IBR i IPV wirusa BHV 1 za pomocą analizy restrykcyjnej została opisana przez innych autorów (4, 7, 13, 14, 17). Wyniki otrzymane przez tych badaczy stanowiły podstawę do opracowania aktualnie obowiązującego podziału szczepów wirusa BHV 1 na podtypy BHV 1.1 i BHV 1.2.

Tab. 3. Wielkość fragmentów DNA szczepów BHV 1 po trawieniu enzymem Bam HI

Fragmenty (kbp)	Bam HI				
	Agille	III/2	III/3	6/42	IPV 468
* A	—	27	27	27	—
* B	25	—	—	—	25
C	23	23	23	23	23
D	21	21	21	21	21
* E	—	19,5	19,5	19,5	—
F	17,5	17,5	17,5	17,5	17,5
* G	13,5	—	—	—	13,5
H	13	13	13	13	13
→ I	—	11,5	—	12,2	—
* J	4,9	—	—	—	4,9
Liczba fragment.	7	7	6	7	7

Objaśnienia: jak w tab. 2.

Tab. 4. Wielkość fragmentów DNA szczepów BHV 1 po trawieniu enzymem Eco RI

Fragmenty (kbp)	Eco RI				
	Agille	III/2	III/3	6/42	IPV 468
* A	—	28	28	28	—
* B	27	—	—	—	27
C	23	23	23	23	23
* D	22	—	—	—	22
* E	18,5	—	—	—	18,5
* F	—	17,5	17,5	17,5	—
G	14	14	13,5	13,5	14
→ H	—	12,7	—	—	—
I	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5
* J	—	2,9	2,9	2,9	—
Liczba fragment.	6	7	6	6	6

Objaśnienia: jak w tab. 2.

Zgodnie z danymi piśmiennictwa podtyp BHV 1.1 (IBR) uważany jest za typowy patogen układu oddechowego bydła natomiast BHV 1.2 (IPV) uważany jest za typowy patogen układu rozrodczego. Przedstawione wyniki badań wskazują jednak, że podtyp BHV 1.1 może występować również w układzie rozrodczym bydła powodując zachorowania, które klinicznie rozpoznawane są jako otręt bydła. Zatem analiza restrykcyjna DNA poszczególnych szczepów (izolatów) wirusa BHV 1 (IBR/IPV) umożliwia ich różnicowanie nie daje jednak podstawy do stwierdzenia, że szczepy o określonym profilu w analizie restrykcyjnej powodują określone syndromy chorobowe.

Piśmiennictwo

1. Bagust T. J., Clark L.: J. Comp. Path. 82, 375, 1972.
2. Buczek J., Deptuła W., Deptuła D.: Medycyna Wet. 37, 426, 1981.
3. Buczek J., Rokosz B., Wrzosek-Lobocka G.: Medycyna Wet. 37, 169, 1981.
4. Engels M., Steck F., Wyler R.: Arch. Virol. 67, 169, 1981.
5. Gibbs E. P. J., Rweyemamu M. M.: Vet. Bull. 47, 317, 1977.
6. Gillespie J. H., McEntee K., Kendrick J. W., Wagner W. C.: Cornell Vet. 49, 288, 1959.
7. Gregersen J. P., Pauli G., Ludwig H.: Arch. Virol. 84, 91, 1985.
8. Kahrs R. F.: J. Am. vet. med. Ass. 171, 1055, 1977.
9. Kendrick J. W., Gillespie J. H., McEntee K.: Cornell Vet. 48, 458, 1958.
10. House J. A.: Cornell Vet. 62, 431, 1972.
11. Jetteur P., Pastoret P. P., Aguilar-Setien A., Leroy P., Godart M., Schoenaers F.: Ann. Med. Vet. 123, 115, 1979.
12. McKercher P. D.: Canad. Comp. Med. Vet. Sci. 28, 77, 1964.
13. Metzler A. E., Matile H., Gassmann U., Engels M., Wyler R.: Arch. Virol. 85, 57, 1985.
14. Misra V., Babiuk L. A., Darcel C. L. Q.: Arch. Virol. 76, 341, 1983.
15. Pastoret P. P., Jetteur P., Aguilar-Setien A., Leroy P., Godart H., Schoenaers F.: Ann. Med. Vet. 123, 203, 1979.
16. Rola J.: Występowanie mutantów opornych na neutralizację przeciwciałami poliklonalnymi w populacji wirusa BHV 1 (IBR/IPV). Praca dokt. Inst. Wet. Puławy 1994.
17. Seal B. S., Jeor S. C., St., Taylor R. E.: J. gen. Virol. 66, 2787, 1985.

Adres autora: dr Jerzy Rola, ul. Kościuszki 19/16, 24-100 Puławy