

ВЕТЕРИНАРНА МЕДИЦИНАПРИЛОЖЕНИЕ НА ПОЛИМЕРАЗНО-ВЕРИЖНА РЕАКЦИЯ
ЗА ДИАГНОСТИКА НА ЗАРАЗНИЯ РИНОТРАХЕИТ

РАЙКО ПЕШЕВ, ЛИЛИЯ ХРИСТОВА*

Национален диагностичен научноизследователски
ветеринарномедицински институт - София

*Институт по биофизика - БАН, София

Говеждият херпес вирус 1 (ГХВ 1) е представител на подсемейство алфахерпес вирине в семейство херпесвириде (**Roizman et al.**, 1995). ДНК на ГХВ 1 е с големина около 136 kb (**Mayfield et al.**, 1983) и сега е известно почти пълното секвениране на генома. Геномът е съставен от два уникални региона - дълъг, с големина около 103 kb и къс около 10 kb. Късият участък е обграден от вътрешни и външни повтарящи се последователности, всяка с големина около 11 kb. Те са причина късият сегмент да бъде подлаган на чести обръщания. Дългият сегмент остава напълно фиксиран в една посока. Досега са идентифицирани около 70 различни протеин кодиращи участъци, които кодират регулаторни протеини, вирусни ензими и структурни протеини, между които 9 трансмембранны гликопротеини. Вирусните гликопротеини осъществяват свързването на вируса с клетките, проникването, преминаването на вирусите от клетка в клетка и напускането им (**Spear**, 1993), както и контактуването с имунната система, свързване със системата на комплемента или имуноглобулините (**Dubin et al.**, 1991, **Hung et al.**, 1994). Допуска се, че гликопротеините gB, gD и вероятно gH, gK и gL са необходими за репликацията на вируса, докато gC, gG, gI и gE не са, но участват при взаимодействието между вирус и гостоприемник (**Spear**, 1993). Ето защо за доказване на ГХВ 1 чрез полимеразна верижна реакция (PCR) са приложени различни подходи. За тази цел от генома на вируса за амплифициране са използвани различни участъци - тимидин киназния (ТК) ген (**Kibenge et al.**, 1994), гените на гликопротеин gB (**Vilcek**, 1993, **Masri et al.**, 1996), gD (**Wiedmann et al.**, 1993), gC (**Van Engelenburg et al.**, 1993), gE (**Fuchs et al.**, 1999) или късият регион на вируса (**Al Candido et al.**, 2000). За диференциране на вирулентните от генно делетираните ваксинални херпес-вируси е разработена и специфична PCR (**Schynts et al.**, 1999).

Целта на настоящата работа бе прилагане на PCR за доказване на gB, gC и gE гените на щамове ГХВ 1, изолирани в България.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

В проучванията бяха включени херпесвирусни щамове, изолирани от говеда с респираторни и генитални заболявания от различни региони на България, идентифицирани като ГХВ 1 чрез директна електронна микроскопия (ДЕМ), вирус неутрализационен тест (ВНТ) и директен имунофлуоресцентен тест (ДИФТ). В табл. 1 са посочени данни за историята и произхода на изследваните вирусни щамове.

Използвани бяха свински херпесвирус (СХВ 1) щам А2, кози херпесвирус 1 (КХВ 1) щам Е/СН, говежди херпесвирус 4 (ГХВ 4) щам Мовар 33/66, говежди аденовирус щам Казичене като хетероложни, а като референтен ГХВ 1 - щам Оксфорд при PCR.

Таблица 1. Използвани хомоложни и хетероложни вирусни щамове при разработване и верифициране на метода PCR

| Херпес вирусен щам | Година на изолация или получаване | Клинични признаци | Изолиран от |
|----------------------|-----------------------------------|----------------------|--------------|
| ГХВ 1 - Озет | 1969 | респираторни | носен тампон |
| ГХВ 1 – Червена вода | 1974 | аборти, респираторни | носен тампон |
| ГХВ 1 - Оксфорд | референтен щам | репродуктивни | |
| КХВ 1- Е/СН | референтен щам | репродуктивни | |
| СХВ 1- А2 | референтен щам | | |
| ГХВ-4 Мовар 33/66 | референтен щам | конюнктивит | носен тампон |
| Аденовирус Казичене | референтен щам | респираторни | носен тампон |

За изолация и поддържане на ГХВ 1 използвахме първични клетъчни култури и постоянни клетъчни линии от говежди произход: телешки бъбреци (ТБ), телешки тестиси (ТТ), ембрионална телешка трахея (ЕБТР), телешка трахея (ТТр), телешки бъбрек (МДБК) и заешки бъбрек (ЗБ).

Получаване на вирусна ДНК с геномен ДНК кит GFX

Вирусна ДНК получавахме с помощта на GFX ДНК геномен, пречистващ кит на фирмата Амершам. Културални клетки МДБК в количество 3 до 4×10^6 , кл/ml, заразени с различните херпесвирусни щамове, обработвахме съгласно указанията на фирмата производител. За елюция на пречистената ДНК от колонката използвахме ТЕ буфер (10mM Tris HCl, 1mM EDTA, pH 8.0), алтернативно 10mM Tris HCl буфер с pH 8.0 или автоклавирана, двойно дестилирана вода.

Получаване на вирусна ДНК с мини ДНК кит QIAamp

За екстракция на ДНК от клетъчни култури, носни, вагинални тампон проби и семенни проби използвахме QIAamp ДНК мини кит на фирмата Qiagen Pvt Ltd, съгласно инструкциите, дадени от фирмата производител, като използвахме буфери AL, AW 1 и AW 2. Елюирането на ДНК от колонките извършвахме в 100 μ l АЕ буфер или стерилна дейонизирана вода и я съхранявахме на -20°C .

Получаване на ДНК с кит за изолация на ДНК "Fermentas"

Заразените с вирусни клетъчни култури обработвахме чрез промиване на клетъчния монослой с ФБР или физиологичен разтвор, след което обработвахме с трипсинов разтвор за сваляне на клетките от стената на съда. Центрофугирахме клетките на 300 xg за 5 min и ресуспендирахме в 200 μ l ТЕ буфер. В реакцията използвахме $0.4-0.6 \times 10^6$ клетки. С клетките, съдържащи вирус, процедирахме съгласно указанията на фирмата производител и разтваряхме ДНК в 100 μ l стерилна дейонизирана вода или ТЕ буфер чрез внимателно вортексиране.

Получаване на ДНК с кит за изолация на ДНК "Puutra"

Необходимите реагенти от кита приготвихме съгласно указанията на фирмата производител. За екстракция на вирусната ДНК заразените с вирус клетки лизирахме с хаотропен агент в лизисния разтвор в присъствие на протеиназа К. След инкубация и центрофугиране обработвахме с лизисен разтвор, промивахме с миещ буфер и елюирахме с 200 μ l елюиращ буфер, предварително загрят на 70°C , като ДНК съхранявахме на 4° или -20°C до момента на изследване.

Получаване на вирусна ДНК с хелатна смола "Chelex"100.

Получаването на вирусна ДНК с хелатна смола "Chelex" 100 осъществявахме като към проба от клетъчно културална течност прибавяхме 10% или 20% w/v Chelex 100 sodium (Sigma) в дестилирана деминерализирана вода, Proteinase K (10mg/ml, Sigma), 11.5 μ l, DL-Dithiothreitol (1M,

Sigma) -7.5 µl, свободна от нуклеази вода - 90 µl. След смесване поставяхме разтвора на 56°C за 30 min, вортексирахме за 10 s, след което инкубирахме във вряща водна баня за 8 min, отново вортексирахме за 10 s и центрофугирахме на 10 000 xg за 3 min. Супернатантите прехвърляхме в нови микроепруветки и използвахме директно за PCR, или ги съхранявахме на -20°C за по късни изследвания.

Получаване на вирусна ДНК чрез обработка с хлороформ изоамилов алкохол

За получаване на ДНК от органи и клетъчно културален вирус използвахме метода, препоръчан от фирма "Ингеназа" съгласно инструкциите, дадени от фирмата производител. Пробите обработвахме с екстракционен буфер, добавяхме хлороформ, хомогенизирахме и центрофугирахме. Вирусната ДНК обработвахме с изопропанол, промивахме със 70% охладен етанол, центрофугирахме и пелета, в който се намираше ДНК разтваряхме в 50 µl свободна от ДНК-аза вода, която съхранявахме на -20°C.

Количеството на ДНК определяхме чрез електрофореза и спектрофотометрично чрез апарат Jenway на фирмата Genova.

Полимеразно верижна реакция и анализ на получените продукти

За извършване на PCR използвахме праймери според публикуваните ДНК секвенции в геномната банка за доказване на гените gB (M₂1474) gE (NU06934) и gC (M₂7491), кодиращи гликопротеини от ГХВ 1. Тези праймери продуцират ДНК продукти с големина 478 bp за gB, 265 bp за gE и 527 bp за gC гена. За доказване на ДНК на вируса на заразния ринотрахеит използвахме и два комерсиални кита от фирми Genekam Biotechnology Germany и InGene IBR 12.IBR.K5 Ингеназа Испания, съгласно указанията на фирмите производителки.

Използваните специфични праймери в кита InGene IBR продуцират ДНК продукти с големина за gC гена 390 bp, а за gE гена 281 bp. Използваният кит Genekam от Германия амплифицира участък от gC гена с големина 173 bp. Към реакциите залагахме и съответните положителни и отрицателни контроли.

В табл. 2 са отразени данните за олигонуклеотидните праймери, амплифициращи гликопротеиновите гени gB, gC и gE на ГХВ 1.

За извършване на реакциите използвахме реагенти от кит Illustra™ puRe Tag Ready -To-Go PCR beads. Съдържанието на перлите рехидрирахме в 0.5 ml микроепруветки със стерилна свободна от ДНК-за-РНК-за дестилирана вода, като всяка реакция в обем от 25 µl съдържаше 2.5 U от Pure Tag DNA Polymerase, 10 mM Tris-HCl (pH 9.0), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) и разтворител, съдържащ BSA. Всеки праймер беше в коли-

Таблица 2. Характеристики на олигонуклеотидните праймери, приложени в PCR (разположение, големина и последователност в генома), съответстващи на референтния щам Соорег на ГХВ 1

| Вид олигонуклеотиди | ДНК последователности | Разположение на праймерите в нуклеотидни позиции | Големина на продукта от PCR (bp) |
|---------------------|---------------------------------|--|----------------------------------|
| gB-1 | 5'-TACGACTCGTTCGCGCTCTC-3' | 883-902 | 478 bp |
| gB-2 | 5'-GGTACGTCTCCAAGCTGCCC-3' | 1341-1360 | 478 bp |
| gE-1 | 5'-GCTTCGGTCGACACGGTCTT-3' | 501-520 | 265 bp |
| gE-2 | 5'-CTTTGTGCGCCCGTTGAGTCG-3' | 746-765 | 265 bp |
| gC-1 | 5'-AGGAGCGCAAGTGGATGCTCTG-3' | 563-581 | 527 bp |
| gC-2 | 5'-GTAGCCGTTGCGGAACCAGTGC-3' | 1068-1087 | 527 bp |
| gC-1 InGene | 5''-TG TGACTTGGTGCCCATGTCGC-3'' | 913-935 | 390 bp |
| gC-2 InGene | 5''-GAGCAAAGCCCCGCCAAGGAG-3'' | 546-548 | 390 bp |
| gC-1/2 Genekam | | | 173 bp |

чество 50 pM, а ДНК в количества между 100 и 300 ng.

Използвахме и Hot Start -IT™ Fideli Tag™ PCR Master Mix (2X). Сместа съдържаше Hot Start -IT™ Fideli Tag ДНК полимераза, USB ултра чисти нуклеотиди и реакционен буфер. Мастер миксът участваше в обем 25 µl, 10 µM от напредващия праймер в количество 0.5 до 5 µl, 10 µM от връщащия се праймер в количество 0.5 до 5 µl, ≥ 10 µl от ДНК пробата в количества между 100 и 300 ng. Микроепруветката допълвахме със дестилирана вода, свободна от ДНК-за и РНК-за до 50 µl. За провеждане на PCR използвахме термоциклер QB-96 (LKB).

При използване на реагентите от puRe Tag Ready -To-Go PCR beads и Hot Start -IT™ Fideli Tag™ PCR Master Mix за извършване на реакциите след предварително загряване на пробите на 96°C за 5 min извършвахме 35 цикъла, от които 10 цикъла от 60 s на 96°C, 45 s на 65°C и 45 s на 72°C, последвани от 15 цикъла от 60 s на 96°C, 45 s на 54°C, 45 s на 72°C и 10 цикъла от 60 s на 96°C, 45 s на 60°C и 45 s на 72°C. След последния цикъл за финална екстензия на продукта беше използвано време от 10 min на 72°C.

При използване на реагентите от фирми Genekam Германия и Ингеназа Испания работихме съгласно указанията, придружаващи китовете.

За кита от Ингеназа Испания програмирахме термоциклера на следните условия: пре-денатурация 1 цикъл от 7 min на 94°C, амплификация от 35 цикъла на 94 °C за 30 s, прилепване 1 min на 60°C, удължаване 1 min на 72°C. Финалното удължаване осъществявахме в 1 цикъл от 5 min на 72°C. Съхранявахме пробите на 4°C до изваждането им от термоциклера.

Преди обработката за интерпретация на резултатите, получени от амплификацията верифицирахме протичането чрез проверка на съответните вътрешни контроли. След получаване на продуктите от реакцията накапвахме контролите и изследваните проби върху 1.5% агарозен гел, съгласно указанията за валидиране на теста. Пробите съхранявахме през цялото време до анализа им на - 20 °C.

Контрол на получените ДНК образци чрез различните методи извършвахме чрез електрофореза в 1.5% (w/v) агарозен гел в TBE буфер за (1 h на 85 mV) и оцветяване с етидиев бромид (10mg/ml в дестилирана вода). Към всяка реакция залагахме и маркер на молекулните тегла (DNA с големина от 100 до 1000 bp), чрез която определяхме големината на получените ДНК фрагменти. Резултатите от изследванията отчитаме на ултравиолетов трансилюминатор при дължина на вълната 302 nm и фотографирахме чрез фотодокументационна система (**Wilber Lourmat, France**).

Проучвания върху специфичността и чувствителността на PCR

Специфичността на PCR установявахме чрез изследване на родствени представители на семейство херпесвируси и хетероложни ДНК вируси. За целта изследвахме кози херпесвирус щам E/CH, говежди херпесвирус 4 щам Мовар 33/66, свински херпесвирус щам А2 и аденовирус по говедата щам Казичене. Херпес вирусите и аденовирусът бяха намножавани върху клетки МДБК, като ДНК от тези вируси добивахме чрез същата методика както ДНК от говеждите херпесвируси тип 1, а за амплификация на вирусните ДНК използвахме праймерите за амплифициране на говеждите херпесвируси тип 1. Като отрицателна контрола използвахме ДНК проба, получена от контролна, незаразена с ГХВ1 клетъчна култура МДБК, а като положителна контрола референтния щам Оксфорд на ГХВ 1.

Аналитичната чувствителност на реакцията беше изследвана с щам Озет с титър $10^{-7.66}$ ТКИД₅₀/ml. За целта приготвихме серийни 10 - кратни разреждания на щам Озет в културалната среда. Разрежданията съдържаха съответно 7.66×10^{-3} ; 7.66×10^{-2} ; 7.66×10^{-1} ; 7.66; 0.776; 0.0766 ТКИД₅₀/ml и бяха обработени поотделно за получаване на вирусна ДНК чрез използване на лизисен буфер, хлороформ, изоамилов алкохол. Получените продукти амплифицирахме чрез същите праймери и при същите условия, както изходния щам. Чрез инокулиране на клетъчни

култури, сравнихме чувствителността на PCR с реакция вирусна изолация върху клетъчни култури.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Независимо, че изхождахме от еднакъв обем и титър вирусна суспензия за приготвяне на ДНК, количеството на получената ДНК с помощта на различните описани методи беше различно. В табл. 3 са посочени количествата ДНК, получени чрез 7^{-те} приложени метода, използвани за получаване на ДНК за последващо амплифициране.

Най-голямо количество ДНК в (ng/μl) след спектрофотометричното изследване, получихме при използването на 10% и 20% хелатна смола Chelex 100, следвано от кит Ферментас, хлороформ изоамилов алкохол, китове GFX, QIAamp и Illustra. При използване на хлороформ - изоамилов алкохол за обработка на незаразена клетъчна култура получихме стойности от 202.0 ng/μl.

При изследването на специфичността на реакцията чрез мултиплициране на ДНК от други херпесвируси - свински херпесвирус щам А2, говежди херпесвирус 4-щам Мовар 33/66, кози херпесвирус-Е/СН и аденовирус щам Казичене, получени чрез помощта на хлороформ изоамилов алкохол и амплифицирани със същите праймери както ГХВ 1, не установихме специфична амплификация с хетероложния аденовирус и родствените херпесвируси (фиг. 1).

При използването на праймери за амплифициране на gC гена получихме амплификационен продукт с големина 527 bp само при ГХВ 1 щамове - Озет и Оксфорд. При останалите изследвани херпесвирусни щамове не установихме специфичен ДНК продукт.

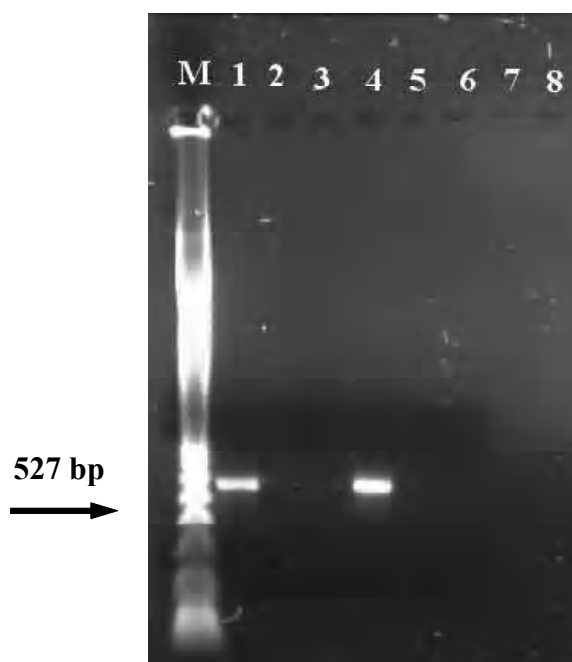
Чрез използваната InGene IBR PCR за мултиплициране на ДНК от различни ГХВ 1 щамове се получаваха идентични фрагменти с големина 390, 281 и 527 bp. На фиг. 2 са отразени резултатите от тези изследвания.

При извършване на сериини десетократни разреждания на получената ДНК от щам Озет, амплифицирана чрез същите праймери и при същите условия за доказване на g C гена установихме, че чрез PCR се получават фрагменти при разреждане на получената ДНК от 7.66×10^{-3} до 0.0766 ТКИД₅₀/ml. След това разреждане не установихме специфична амплификация (фиг.3).

Ползваните от нас праймери амплифицираха специфично gB, gC и gE гените на ГХВ 1 и получихме продукти с големина 478, 527 и 265 bp. При използване на реагенти от китове Ingene и Genekam получихме амплификати с големина 390, 281 и 173 bp (фиг.4).

Таблица 3. Данни за използваните методи за получаване на ДНК

| Използван метод за добиване на ДНК | Вирусен щам | Съотношение между фактор 1 и 2 при λ 260 и λ 280 | Количество на ДНК в ng/μl |
|------------------------------------|-------------------------------|--|---------------------------|
| ДНК кит GFX | Озет | 1.03 | 170.5 ng/μl |
| ДНК кит QIAamp | Озет | 0.87 | 163.5 ng/μl |
| ДНК кит Fermentas | Озет | 0.93 | 195.5 ng/μl |
| ДНК кит Illustra | Озет | 1.19 | 147 ng/μl |
| Хелатна смола Chelex 100 – 10% | Озет | 2.26 | 413.9 ng/μl |
| Хелатна смола Chelex 100 – 20% | Озет | 2.68 | 468.2 ng/μl |
| Хлороформ изоамилов алкохол | Озет | 1.17 | 184.2 ng/μl |
| Хлороформ изоамилов алкохол | незаразена клет. култура МДБК | 1.02 | 202.0 ng/μl |



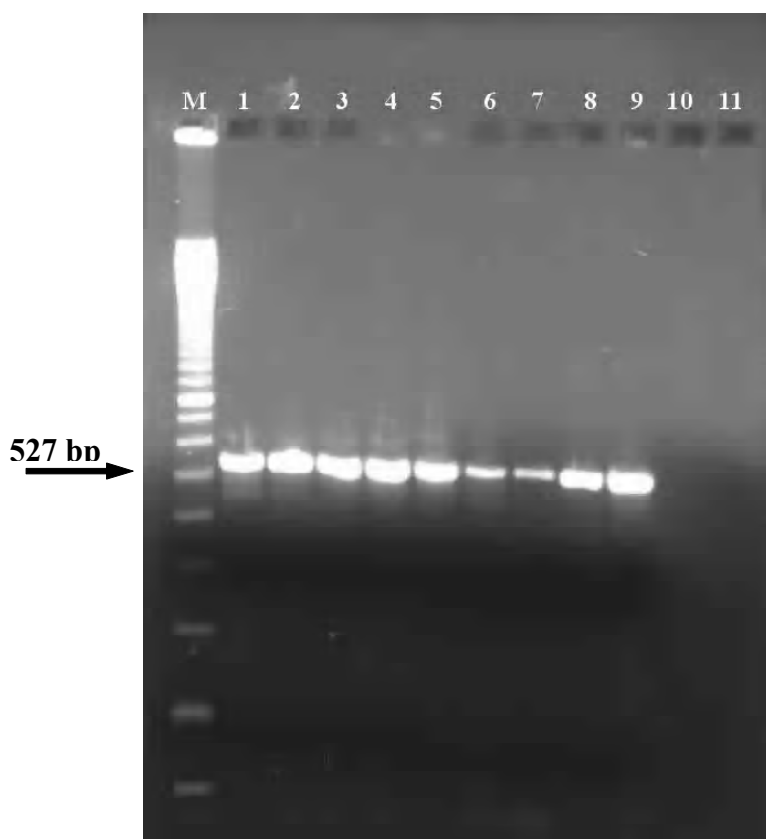
Фиг. 1. PCR на щамове на говежди херпес вирус 1, родствени херпес вируси и хетероложен ДНК аденовирус. С М е означен маркера на молекулните тегла.

1. GXV 1 - щам Оксфорд,
2. KXV 1 - щам E/CH,
3. GXV 4 - щам Мовар 33/66,
4. GXV 1 - щам Озет,
5. CXV 1 - щам А2,
6. Говежди аденовирус - щам Казичене,
7. Контролна незаразена клетъчна култура МДБК,
8. Негативна контрола от дестилирана вода.



Фиг. 2. Резултати от амплифициране на различни GXV 1 щамове с праймерите амплифициращи gC и gE гените на GXV 1. С М е означен маркера на молекулните тегла. Амплифициран gC ген на щамове:

1. Оксфорд, 2. Озет, 3. Червена вода, 4. Долни Чифлик 5. положителна контрола, Ingene;
- Амплифициран gE ген на щамове: 6. Оксфорд, 7. Озет, 8. Червена вода, 9. Долни Чифлик,
10. положителна контрола, Ingene; Амплифициран gC ген на щамове: 11. Оксфорд, 12. Озет,
13. Червена вода, 14. Долни Чифлик, 15. положителна контрола g C ген,
16. негативна контрола - дестилирана вода



Фиг. 3. Резултати от изследванията за определяне чувствителността на реакцията. Титрите на вирусите са отразени в ТКИД₅₀/ml. С М е означен маркера на молекулните тегла.

1. щам Оксфорд 10- 7.5 ТКИД₅₀,
2. Озет -7.66 x10-3ТКИД₅₀,
3. Озет - 7.66 x10-2ТКИД₅₀,
4. Озет - 7.66 x10 ТКИД₅₀,
5. Озет - 7.66 ТКИД₅₀,
6. Озет - 0.766 ТКИД₅₀,
7. Озет - 0.0766 ТКИД₅₀,
8. Червена вода,
9. Долни Чифлик,
10. незаразена клетъчна култура МДБК,
11. негативна контрола - дестилирана вода.

PCR представлява високо чувствителна и бърза реакция за доказване на копия от вирусният геном в клинични и биологични проби. За установяване генома на ГХВ 1 са разработени и приложени различни модификации на PCR, основаващи се на доказването на специфични продукти амплифициращи участъци от gB, Lyaku et al. (1996), gC Van Engelenburg et al. (1995) g D Wiedmann et al. (1993) и генът отговорен за ТК Kibenge et al. (1994).

За доказването на ГХВ 1 в клинични проби чрез изолация в клетъчни култури е необходимо да има вирусна екскреция. Вирусната екскреция е ограничена до 2 седмици след проявяване на клиничните признаци. При използването на PCR Engelenburg et al. (1995) установяват, че геномът на херпесвирусите може да се установява за по-продължително време след заразяването до 44 дни в сравнение с вирус изолационната реакция.

Yason et al. (1995) след приложение на различни методи за екстракция на вирусна ДНК установяват най-добри резултати при използване на комерсиален кит Gene ReleaserTM. Masri et al. (1996) използват детергент NP-40 и получават най-добри резултати.

Използваните в това проучване различни методики за получаване на ДНК позволяват добиването на достатъчно количество ДНК за извършване на последваща PCR чрез всеки един от 7-те приложени метода. Най-лесен за изпълнение, достъпен и евтин е методът чрез използване на хелатна смола "Chelex 100". Най-голямо количество вирусна ДНК получавахме при използването на 10% "Chelex 100", следвано от ДНК кит Ферментас и хлороформ изоамилов алкохол. По големите количества на получената ДНК вероятно се дължат на факта, че заедно с вирусната ДНК се получава и клетъчна ДНК, която обаче, не влияе на протичането на последващата PCR.

От голямо значение за успешното извършване на PCR е изборът на подходящ участък от ДНК, който да бъде амплифициран. Нуклеотидните последователности на тази ДНК матрица трябва да са консервативни и да присъстват във всички изолати. При изследванията като

мишена използвахме гените, кодиращи гликопротеини gB, gC и gE, които са консервативни и са установени във всички херпесвируси, като нуклеотидните им последователности са известни (Fuchs et al., 1999).

При прилагането на PCR за доказване на ГХВ 1 в посочения формат със специфични праймери за гликопротеин gE, установихме, че получената ДНК от различните херпесвирусни щамове се амплифицира успешно и се получава специфичен продукт с големина 265 bp характерен за ГХВ 1 геном, описан при други изследвания (Fuchs et al., 1999).

За правилна интерпретация на получените резултати е важно залагането на съответните контроли на реакциите. Указания за правилно протичане и интерпретиране на резултатите от реакциите са получените специфични бендове за позитивните и липсата на такива при негативните контроли.

За оздравяване от ГХВ 1 някои страни в ЕС са възприели приложението на живи и инактивирани маркерни генно делетирани ваксини. За контролиране изкореняването на заболяването е необходим придружаващ диагностичен ЕЛАЙЗА тест, чрез който трябва да се разграничават ваксинираните от заразените с вирулентен вирус животни (Van Oirschot et al., 1997). При изследванията избрахме праймерите амплифициращи генът кодиращ гликопротеин gE и тази модификация на PCR, защото чрез нея могат да се диференцират генно делетирани от вирулентни херпесвируси и по този начин да се докаже какви причинители циркулират в стадото.

Изолираните в нашата страна ГХВ 1, изследвани чрез PCR, не са генно делетирани, а имат геном, подобен на референтния ГХВ 1 щам Оксфорд, използван като положителна контрола. При проучванията на специфичността и чувствителността на използваната PCR установихме, че реакцията е специфична, тъй като с избраните олигонуклеотиди се доказва само ДНК, получена от ГХВ 1. ДНК, получена от родствени херпесвируси и аденовирус не се амплифицира. Също така не се амплифицира специфичен продукт от контролната, незаразена с херпес вирус клетъчна култура МДБК. Тези данни показват, че реакцията е специфична и тези олигонуклеотиди могат да амплифицират само специфични последователности от генома на ГХВ 1.



Фиг. 4. Амплификация на гени от ГХВ 1, кодиращи гликопротеини gC, gB и gE. На фигурата се виждат амплифицираните гени, кодиращи гликопротеини gC с молекулно тегло-527 bp, gB с молекулно тегло- 478 bp и gE с молекулно тегло-265 bp. С М е означен маркера на молекулните тегла.

1. Озет и 2. Червена вода - gC гени -527 bp,
3. Озет и 4. Оксфорд - gB гени-478 bp,
5. Озет и 6. Червена вода - gC гени-390 bp, Ingene,
7. Оксфорд - gE ген-265 bp,
8. Озет и 9. Червена вода - gE гени - 281 bp, Ingene,
10. Червена вода - gC ген -173 bp, Genekam,
11. отрицателна контрола

Според **Fuchs et al.** (1999) с олигонуклеотидните праймери, амплифициращи gC гена на ГХВ 1 се получават амплификати с ДНК, получена от кози херпесвирус. С праймерите, амплифициращи гликопротеин gC на ГХВ 1, не установихме мултипликация на ДНК, получена от кози херпесвирус. **Liaku et al.** (1996) съобщават също, че козият херпесвирус може да бъде доказан с праймерите, амплифициращи gV гена на ГХВ 1, като се получава продукт с големина 468 bp. При извършените изследвания използвахме праймери, които амплифицират специфично gV гена на ГХВ 1, но те са с различни последователности от използваните от **Liaku et al.** (1996). Това вероятно е и причина за получаването на по-голям продукт (478 bp) при амплифицирането и невъзможност на тези олигонуклеотидни последователности да мултиплицират gV гена на козия херпес вирус.

Според **Masri et al.** (1996) чрез разработената от тях PCR могат да се установят 0.25 до 2.5 ТКИД₅₀ от ГХВ 1, докато чрез вирус изолация могат да се докажат 250 ТКИД₅₀ от вируса. **Van Engelenburg et al.** (1993) чрез PCR, основаваща се на доказването на gC гена, установяват в еякулати от 3 до 5 молекули ГХВ 1 ДНК. Като имат предвид, че чрез вирус изолация може да се докажат 3-5 ТКИД₅₀ от вируса, и че отношението на вирусния геном към инфекциозните частици в семенната течност варира от 30 до 100 те заключават, че разработената от тях PCR е от 30 до 100 пъти по-високо чувствителна в сравнение с вирус изолационния метод.

При извършените проучвания върху аналитичната чувствителност на метода установихме, че чрез него може да се докажат специфични продукти до разреждане 0.766 ТКИД₅₀/ml. Върху клетъчни култури се установява вирусен растеж при разреждане 7.66 ТКИД₅₀/ml, което е с един десетичен логаритъм по-ниско от приложената PCR. Това потвърждава по-високата чувствителност на PCR в сравнение с изолацията върху клетъчни култури. При изолация на ГХВ 1 върху клетъчни култури са необходими два до три последователни пасажа на изолирания причинител и идентифицирането му, което отнема минимум 14 дни, а чрез PCR това време се намалява до два-три дни. Това се дължи на по-високата чувствителност на метода PCR и специфичното амплифициране на малки участъци от генома на ГХВ 1.

ИЗВОДИ

Приложената PCR е високо чувствителна и специфично амплифицира части от херпес-вирусния геном. Чрез нея успешно могат да се докажат гените, кодиращи гликопротеини gV, gE и gC.

Използваните варианти на PCR за установяване на gE гена може успешно да се използват за диференцирането на ваксинални от вирулентни ГХВ 1 щамове.

ЛИТЕРАТУРА

1. **Ackermann, M., R. Wyler.** The DNA of an IPV strain of bovid herpesvirus-1 in sacral ganglia during latency after intravaginal infection, *Vet. Microbiology*, 9, 53-63, 1984.
2. **Candido, A. L, A. S. Martins, P. B. Barros, M. Resende.** Detection of different brazilian strains of the bovine herpesvirus 1 (BHV-1) by polymerase chain reaction, *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*, 51 (3), 1-6, 2000.
3. **Dubin, G., E. Socolof, I. Frank, H. M. Friedmann.** Herpes simplex virus type 1 Fc receptor protects infected cells from antibody - dependent cellular cytotoxicity, *J. of Virology*, 68, 7046-7050, 1991.
4. **Fuchs, M., P. Hubert, J. Detterer, H. J. Rziha.** Detection of bovine herpesvirus type 1 in blood from naturally infected cattle by using a sensitive PCR that discriminates between wild type virus and virus lacking glycoprotein E, *J. of Clin. Microbiol.*, 37, 8, 2498-2507, 1999.

5. **Hung, S. L., C. Peng, I. Costavasili, H. M. Friedmann, G. D. Lambris, R. J. Eisenberg, G. H. Cohen.** The interaction of glycoprotein C of herpes simplex virus types 1 and 2 with the alternative complement pathway, *Virology*, 203, 299-312, 1994.
6. **Kibenge, F. S. B., L. M. Harris, P. K. Mc Kenna, D. Wadowska, C. V. Yason.** Amplification of strains of bovine herpesvirus 1 by use of polymerase chain reaction with primers in the thymidine kinase region, *Am. J. Vet. Res.*, 55, 1206-1212, 1994.
7. **Lyaku, J. R. S, S. Vilcek, P. F. Nettleton, H. S. Marsden.** The distinction of serologically related ruminant alphaherpesviruses by the polymerase chain reaction (PCR) and restriction endonuclease analysis, *Vet. Microbiol.*, 48, 135-142, 1996.
8. **Maniatis, T., E.F. Fritsch, J. Sambrook.** *Molecular cloning: A laboratory manual.*, New York: 545, 1982.
9. **Mayfield, J E., P.J. Good, H. J. Van Oort, A. R. Campbell, D. E. Reed.** Cloning and cleavage site mapping of DNA from bovine herpesvirus 1 (Cooper strain), *J. of Virol*, 47, 259-264, 1983.
10. **Masri, S. A, W. Olson, P. T. Nguyen, S. Prins, D. Deregt.** Rapid detection of bovine herpesvirus-1 in the semen of infected bulls by a nested polymerase chain reaction assay, *Can. J. Vet Res*, 60(2), 100-107, 1996.
11. **Msolla, P. M, E. M. Allan, I. E. Selman, A. Wiseman.** Reactivation and shedding of bovine herpesvirus 1 following dictiocaulus viviparous infection, *J. Comp. Pathol*, 93, 2-274, 1983.
12. **Rock, D., J. Lokensgard, T. Lewis, G. Kutish.** Characterization of dexametazon induced reactivation of latent bovine herpesvirus 1, *J. of Virology*, 66, 2484-2490, 1992.
13. **Rola, J., M. P. Polak, J. F. Zmudzinski.** Amplification of DNA of BHV 1 isolated from semen of naturally infected bulls, *Bull. Vet. Inst. Pulawy*, 47, 71-75, 2003.
14. **Roizman, B., R. C. Desrosier, B. Fleckenstein, C. Lopez, A. C. Minson, M. J. Studert.** Family Herpesviridae, *Virus taxonomy*, 6th Rep of the Int. Committee of taxonomy of Viruses, *Arch. Virology Suppl.* 10, 114-127, 1995.
15. **Schynts, F, E. Baranowski, M. Lemaire, E. Thiry.** A specific PCR to differentiate between gE negative vaccine and wildtype bovine herpesvirus type 1 strains, *Veterinary Microbiology*, 66, 187-195, 1999.
16. **Spear, P. G.** Entry of alphaherpesviruses into cells, *Seminars in Virology*, 4, 167-180, 1993.
17. **Thiry, E, J. Saliki, M. Bublot, P. P. Pastoret.** Reactivation of infectious bovine herpesvirus by transport, *Comp. Immun. Microbiol and Inf. Dis*, 10, 59-63, 1987.
18. **Van Oirschot, J. T., M. J. Kaashoek, M. A. Maris-Veldhuis, K. Weerdmester, F. A. M. Rijsewijk.** An enzyme-linked immunosorbent assay to detect antibodies against glycoprotein gE of bovine herpesvirus 1 allows differentiation between infected and vaccinated cattle, *J. Virol. Methods*, 67, 23-34, 1997.
19. **Van Engelenburg, F.A.C, R.K. Maes, J.T. Van Oirschot F.A.M. Rijsewijk.** Development of a rapid and sensitive polymerase chain reaction assay for detection of bovine herpesvirus 1 in bovine semen, *J. of Clin. Microbiol*, 31(12), 3129-3135, 1993.
20. **Van Engelenburg, F. A. C., F. W. Van Schil, F. A. M. Rijsewijk, J. T. Van Oirschot.** Excretion of bovine herpesvirus 1 in semen is detected much longer by PCR than by virus isolation, *J. of Clinical Microbiol.*, 33, 308-312, 1995.
21. **Vilcek, S.** Detection of the bovine herpesvirus-1 (BHV-1) genome by PCR, *J. Virol. Methods*, 41(2), 245-247, 1993.
21. **Wiedmann, M, R. Brandon, P. Wagner, E. J. Dubovi, C. A. Batt.** Detection of bovine herpesvirus -1 in bovine semen by a nested PCR assay, *J. Virol. Methods*, 44 (1), 129-140, 1993.
22. **Yason, C. V., L. M. Harris, P. K. Mc Kenna, D. Wadowska, F. S. B. Kibenge.** Establishment of conditions for the detection of bovine herpesvirus-1 by polymerase chain reaction using primers in the thymidine kinase region, *Can. J. Vet. Res.* 59, 94-101, 1995.

APPLICATION OF POLYMERASE CHAIN REACTION
FOR DIAGNOSIS OF INFECTIOUS BOVINE RHINOTRACHEITIS

*R. Peshev, L. Christova**

National Diagnostic and Research Veterinary Medical Institute - Sofia

**Institute of Biophysics - Bulgarian Academy of Science - Sofia*

SUMMARY

In present paper are described data from application of polymerase chain reaction (PCR) for detection of BHV 1 strains isolated in Bulgaria. Viral DNA are obtained by commercial DNA genome kits GFX, GiAmp, Fermentas, Ilustra, Chelex 100, fenol chloroform isoamyl alcohol. It was determined that the highest yield of DNA (ng/ μ l) after spectrofotometric investigation are obtained with 10% and 20% Chelex 100 followed from Fermentas, fenol chloroform isoamyl alcohol, GFX, GiAmp, Ilustra kits. For performance of PCR are used primers according to published DNA sequences in genome bank proving gB (M21474) gE (NU06934) and gC (M27491) genes coding for BHV 1 glycoproteins. These primers produced DNA products with size 527 bp for gC gen, 478 bp for gB gen and 265 bp for gE genes.

To prove DNA of IBR virus two commercial kits Genekam Biotechnology Germany and InGene IBR 12.IBR.K5, Ingenase Spain are used. By using InGene IBR PCR kit were amplified PCR products with size 390 bp and 281 bp for gC and gE genes respectively. After using reagents from Genekam Biotechnology Germany amplicons with 173 bp size for the gC gene were obtained.

After investigation for PCR specificity were established that DNA obtained from other herpesviruses, adeno and control non infected cell culture MDBK were not amplified.

Serial ten times dilution of DNA were performed and amplified with the same primers and conditions as described for gC gene for determination of PCR analytical sensitivity. By PCR are obtained a specific amplification of DNA fragments at dilutions up 7.6×10^3 to 0.0766 TCID 50/ml while on cell culture viral growth were at dilution 7.66 TCID 50/ml. This is evidence for higher PCR sensitivity in comparison with isolation on cell culture. The genes gB, gC and gE coding BHV 1 glycoproteins can be successfully demonstrated by PCR.



ИЗИСКВАНИЯ ЗА АВТОРИТЕ:

1. Авторът представя статията за рецензиране от Редакцията колегия в оформен по изискванията екземпляр, придружен задължително от диск.

2. Авторът носи лична отговорност за автентичността на представеното изследване, както и за точността на използваната научна терминология.

3. Заглавието на статията трябва да бъде написано кратко, точно и без езикови съкращения и да отразява конкретния обект на изследването. Името и фамилията на автора трябва да са изписани изцяло, както и точното наименование на научния институт, или др., където работи, посочва се и адрес за кореспонденция.

4. Статиите задължително трябва да съдържат резюме (на български и на английски език - с необходимите данни, посочени в т. 3), с обем, не по-повече от 160 думи. В резюмето трябва да са отразени предметът, методът, основните резултати и изводите от представеното изследване; посочват се и ключови думи.

5. Текстът задължително трябва да бъде с шрифт *Times New Roman* и във формат *Word for Windows (Word Document или RTF)*, а за графики и фигури - *XLS (EXSEL)*.

5. Таблиците и фигурите се представят на отделни страници, като заглавията трябва да бъдат изписани на български и английски език, и задължително да са цитирани в текста на статията.

6. Фигурите трябва да бъдат максимално изчистени от текст и с размер до 18,2 на 23,6 cm, където е възможно, и не по-голям от А4 за карти и схеми. Всички необходими означения се изнасят под основното заглавие на фигурата, написани също на български и английски език.

7. За обозначаване на измерителните единици се използва Международната система за измерителни единици - **SI**.

8. Прегледът на литературата трябва да отразява съвременното равнище на разглеждания въпрос, като авторите могат да се позовават само на оригинални трудове. При цитиране на литература в текста се посочва само автор - година, а когато броят на цитираните автори е повече от двама се посочва само първият от тях, последвано от "и др." - година. Ако се цитират изследванията на различни автори по един и същи въпрос, подредването им се прави в хронологичен ред.

9. Библиографията трябва да посочва имената на авторите и литературните източници без грешки и по азбучен ред - първо на кирилица, а след това на латиница. Посочва се само литературата, която е цитирана в текста. При цитиране се посочват: *на периодични издания* - автор, година, заглавие на статията, наименование на изданието, том, №, стр. (от-до); *на книги* - автор, година, заглавие, издателството, град, стр. (от-до); *на хабилитационни трудове* - автор, година, заглавие, институт, град, стр.; *на материали от конгреси и симпозиуми* - автор, година, тема, заглавие, дата и място на провеждане.

10. Научни трудове, които не отговарят на посочените по-горе изисквания, се връщат на авторите за корекция.

11. Не се приемат за публикуване статии, които са част от вече защитени дисертации, както и материали, които са под печат или са отпечатани в други издания.

12. Редакцията колегия на списанието, съгласно определените ѝ правомощия, взема окончателното решение конкретно за всеки рецензиран и докладван материал въз основа на становището на определения от нея рецензент.

13. Коректури се преглеждат от авторите за не по-късно от 2 дни след известие от редакцията. За коректури, които не са изчетени от автора, отговаря зам.-гл. редактор на списанието.

14. При необходимост авторът може да получи авторски отпечатъци на статията си от редакцията, преди отпечатването на съответната книжка.

16. **Всички материали, одобрени от редакцията колегия, се заплащат преди отпечатването по единна тарифа за научните издания на ССА за стандартна машинописна страница от 1800 знака.**

Забележка. При неспазване на посочените изисквания не се дава ход на материалите. Ръкописи не се връщат. Редакцията не носи отговорност за непотърсени до 6 (шест) месеца статии.