

**PRIMENA LANČANE REAKCIJE POLIMERAZE (PCR) I  
METODE REAL-TIME PCR U BRZOJ IDENTIFIKACIJI  
GOVEĐEG HERPESVIRUSA 1\***  
*IMPLEMENTATION OF POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) AND  
REAL-TIME PCR IN QUICK IDENTIFICATION OF BOVINE  
HERPESVIRUS 1*

N. Milić, J. Nišavić, Ružica Ašanin, Aleksandra Knežević, Jelena Ašanin,  
D. Vidanović, M. Šekler\*\*

*Ukupno je ispitivano 65 uzoraka nosnih briseva prikupljenih od teladi i junadi sa kliničkim simptomima respiratorne infekcije na prisustvo goveđeg herpesvirusa 1 uporednom primenom molekularnih i standardnih metoda virusološke dijagnostike. Kod inokulisanih ćelijskih linija nije ustanovljena pojava citopatogenog efekta (CPE -) posle 24h, 48h i 72h od inokulacije ni posle dve uzastopne pasaže uzoraka ispitivanog materijala kroz navedene ćelijske linije. Primenom lančane reakcije polimeraze (PCR) uz korišćenje prajmera za glikoprotein B i timidin-kinazu, utvrđeno je prisustvo nukleinske kiseline goveđeg herpesvirusa 1 u jednom uzorku nosnog brisa, dok je ispitivanjem navedenih uzoraka nosnih briseva goveda metodom Real-Time PCR prisustvo pomenutog virusa ustanovljeno kod tri uzorka.*

*Ključne reči: goveđi herpesvirus 1, PCR, Real-time PCR*

**Uvod / Introduction**

Goveđi herpesvirus 1 (BHV1) pripada rodu *Varicellovirus*, podfamiliji *Alphaherpesvirinae* i familiji *Herpesviridae*. Izaziva infektivni bovini rinotraheitis, oboljenje goveda koje su prvi opisali Štedam (Steddham) 1889. i Parker, 1908, (B.

\* Rad primljen za štampu 14. 04. 2010. godine

\*\* Dr sci. med. vet. Nenad Milić, redovni profesor, dr sci. med. vet. Jakov Nišavić, docent, dr sci. med. vet. Ružica Ašanin, redovni profesor, Katedra za mikrobiologiju, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu; Aleksandra Knežević, Institut za mikrobiologiju i imunologiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu; dr sci. med. Jelena Ašanin, istraživač saradnik, Naučni institut za veterinarstvo Srbije, Beograd; D. Vidanović, Milanko Šekler, Veterinarski specijalistički institut "Kraljevo", Kraljevo

Mihajlović, 1987). Oni koji su se njome kasnije bavili različito su je imenovali – kon-tagiozna bronhopneumonija, emfizematozna bronhopneumonija i dr.

Infekcija organa za disanje nastaje kapljicama sekreta poreklom od inficiranih životinja, a ređe se prenosi indirektno (hranom, transportnim sredstvima...). Nepovoljni uslovi držanja i ishrane životinja olakšavaju nastanak bolesti. Virus napada sluzokožu gornjih respiratornih puteva (nosa, traheje), a nekada i bronhije, izazivajući pri tom kataralno zapaljenje. Usled sekundarnih bakterijskih infekcija proces se može proširiti descendentno na pluća što dovodi do pojave bronhopneumonije kod inficiranih životinja.

Infekcija goveda izazvana goveđim herpesvirusom 1 pojavljuje se u više kliničkih oblika. Prvi je infektivni bovini rinotraheitis (IBR) koji se manifestuje pojavom akutnog oboljenja gornjih respiratornih puteva, konjunktivitisom i bronhopneumonijom. Ovaj oblik infekcije izaziva 1.1 podtip goveđeg herpesvirusa 1. Drugi oblik navedene infekcije goveda se ispoljava kao oboljenje genitalnih organa poznato u Evropi kao *exantema coitale vesiculosum*, a u Americi kao infektivni pustulozni vulvovaginitis (IPV) koje izazivaju podtipovi 1.2a i 1.2b goveđeg herpesvirusa 1. Infekcija se manifestuje pojavom osipa i zapaljenja vulve i vagine krava, odnosno balanopostitisa kod bikova.

Pored standardnih metoda virusološke dijagnostike, koje obuhvataju izolaciju virusa na kulturi tkiva i njegovu identifikaciju primenom virus-serum neutralizacionog testa, za brzo i direktno dokazivanje prisustva nukleinske kiseline virusa u uzorcima ispitivanog materijala poreklom od goveda sve više se koriste molekularne metode zasnovane na lančanoj reakciji polimeraze kao što su PCR i Real-time PCR. Iz navedenih razloga i naša istraživanja imala su za cilj da utvrde opravdanost korišćenja navedenih molekularnih metoda za brzu detekciju i identifikaciju nukleinske kiseline goveđeg herpesvirusa 1 u nosnim brisevima goveda uzorkovanim na nekim farmama u Republici Srbiji.

### **Materijal i metode rada / *Material and methods***

#### *Uzorci nosnih briseva goveda / Samples of bovine nasal smears*

Ukupno je ispitivano 65 uzoraka nosnih briseva prikupljenih od teladi i junadi sa nekoliko farmi u Republici Srbiji. Životinje od kojih su uzimani brisevi imale su nespecifične kliničke znake respiratorne infekcije kao što su temperatura, otežano disanje i iscedak iz nosa. Brisevi su potapani u hranljivu podlogu Eagle – MEM sa 2% fetalnog telećeg seruma i čuvani na temperaturi od -20°C do ispitivanja.

#### *Referentni soj goveđeg herpesvirusa 1 / Reference strain of bovine herpesvirus 1*

U ispitivanjima je korišćen referentni soj goveđeg herpesvirusa 1 – TN-41, titra  $10^{8.1}$  TCID<sub>50</sub>/1 mL, lot 971119, American Bio Research, Sevierville Tennessee, USA.

#### *Ćelijska linija Vero / Vero cell line*

Posle obrade nosnih briseva teladi i junadi, suspektan material je inokulisan u kulturu tkiva radi ispitivanja na prisustvo govedeg herpesvirusa 1 kao i izvođenja testa virus-serum neutralizacije (VN testa). Za navedene svrhe korišćena je kontinuirana ćelijska linija Vero koja je održavana standardnom metodom tripsinizacije i suppasazama.

#### *Obrada uzoraka nosnih briseva ispitivanih na prisustvo virusa BHV 1 / Processing of nasal smear samples examined for presence of BHV 1*

Uzorci nosnih briseva goveda su neposredno posle uzimanja potapani u hranljivu podlogu Eagle – MEM sa 2% fetalnog telećeg seruma, a zatim dopremani u laboratoriju. U laboratoriji je sadržaj iz epruveta prebacivan u sterilne kivete i centrifugovan 15 minuta na 2500 o/min. Uzorci supernatantne tečnosti su zatim u količini od po 0,5 ml pojedinačno inokulisani u ćelijske linije Vero radi izolacije virusa BHV 1 i njegove identifikacije primenom metode virus-serum neutralizacije (VN testa). Talog ćelija dobijen centrifugovanjem uzoraka je direktno korišćen za izvođenje lančane reakcije polimeraze (PCR) i metode Real-time PCR.

#### *Postupak sa inokulisanim ćelijskim linijama / Procedure with inoculated cell lines*

Ćelijske linije Vero, pojedinačno inokulisane sa po 0,5 ml supernatantne tečnosti poreklom od centrifugovanih uzoraka nosnih briseva i inkubisane na temperaturi od 36°C, svakodnevno su posmatrane tokom 72h na pojavu citopatogenog efekta. Tokom ispitivanja su izvršene dve sukcesivne pasaže ispitivanog materijala kroz ćelijske linije Vero.

#### *Lančana reakcija polimeraze (PCR) / Polymerase Chain Reaction (PCR)*

##### *Ekstrakcija virusne DNK / Extraction of virus DNA*

Ekstrakcija virusne DNK iz uzoraka nosnih briseva goveda radi izvođenja lančane reakcije polimeraze vršena je primenom QIAmp DNA mini kiti (50) za 50 ekstrakcija DNK virusa iz tkiva i tkivnih tečnosti, proizvođača QIAGEN Inc., Valencia, CA, SAD, prema Uputstvu proizvođača.

##### *Procedura za izvođenje lančane reakcije polimeraze / Procedure for performing PCR*

Za izvođenje lančane reakcije polimeraze korišćeni su prajmeri koji amplifikuju deo gena na molekulu virusne DNK koji kodira sintezu timidin-kinaze (Yason i sar., 1994) i prajmeri koji amplifikuju deo gena na molekulu virusne DNK koji kodira sintezu glikoproteina B (gB) spoljašnjeg omotača virusa BHV1 (Yason i sar., 1994; Fuchs i sar., 1999). Lančana reakcija polimeraze je obuhvatala sledeće cikluse: preliminarnu denaturaciju na temperaturi od 95°C u trajanju od 1 minuta, zatim 34 ciklusa koji su podrazumevali denaturaciju na temperaturi od 95°C u tra-

janju od 1 minuta, vezivanje prajmera na temperaturi od 61°C u trajanju od 1 minuta i elongaciju na temperaturi od 72°C u trajanju od 1 minuta kao i finalni ciklus na temperaturama od 95°C u trajanju od 1 minuta, 61°C u trajanju od 1 minuta i 72°C u trajanju od 5 minuta. Za analizu dobijenih PCR produkata korišćena je horizontalna elektroforeza u agaroznom gelu. Veličina dobijenih fragmenata molekula DNK je upoređivana sa DNK standardom radi očitavanja rezultata reakcije. Otkrivanje PCR produkata odgovarajuće veličine sa određenim brojem baznih parova smatrano je pozitivnim nalazom.

#### *Real-time PCR / Real-time PCR*

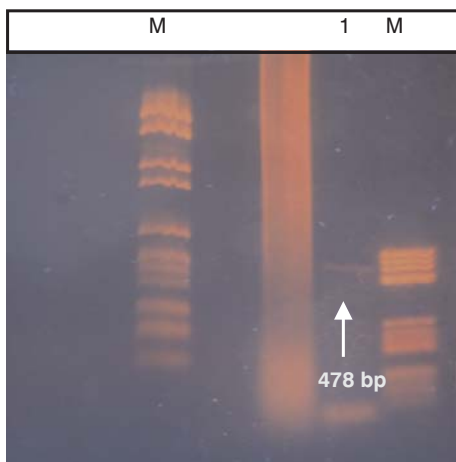
Otkrivanje prisustva, identifikacija i kvantifikacija goveđeg herpesvirusa 1 u uzorcima nosnih briseva goveda vršena je primenom metode Real-time PCR po proceduri propisanoj od strane Međunarodne organizacije za epizootije (OIE Manual, 2008), koja je uključivala prajmere i probu specifične za deo gena na molekulu virusne DNK koji kodira sintezu glikoproteina B (gB).

### **Rezultati i diskusija / Results and Discussion**

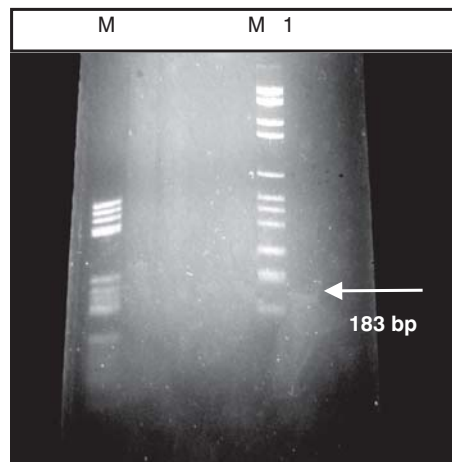
Uzorci ispitivanog materijala dobijeni obradom šezdeset pet nosnih briseva goveda su pojedinačno inokulisani u ćelijske linije Vero i svakodnevno posmatrani na pojavu citopatogenog efekta (CPE). Kod inokulisanih ćelijskih linija nije ustanovljena pojava citopatogenog efekta (CPE-) posle 24h, 48h i 72h od inokulacije ni posle dve uzastopne pasaže uzoraka ispitivanog materijala kroz navedene ćelijske linije.

S obzirom na to da izolacija virusa na kulturi tkiva radi njegove identifikacije virus-serum neutralizacionim testom često zahteva duži vremenski period i više supasaža ispitivanog materijala kroz ćelijske linije, posle kojih takođe može izostati pojava citopatogenog efekta, danas se u navedene svrhe sve više primenjuju molekularne metode virusološke dijagnostike. Navedene metode molekularne dijagnostike omogućavaju brzu i direktnu identifikaciju virusa dokazivanjem prisustva virusne DNK u uzorcima suspektog materijala. Od molekularnih metoda najčešće se koriste lančana reakcija polimeraze (PCR) i metoda Real-time PCR.

U istim uzorcima nosnih briseva je direktno ispitivano prisustvo nukleinske kiseline goveđeg herpesvirusa 1 primenom metode lančane reakcije polimeraze (PCR) uz korišćenje prajmera za glikoprotein B spoljašnjeg omotača virusa BHV 1 i timidin-kinazu. Kod jednog uzorka nosnog brisa goveda utvrđeno je prisustvo nukleinske kiseline navedenog virusa (1,53%). Posle elektroforetske analize uzoraka, ustanovljeno je da veličina amplifikovanog DNK fragmenta iznosi 478bp za glikoprotein B (slika 1) i 183bp za timidin-kinazu (slika 2).



Slika 1. *M – DNK standardi*  
*1 – DNK fragment virusa BHV 1 (gB)*  
 Figure 1. *M – DNA standard*  
*1 – DNA fragment of BHV 1 virus (gB)*



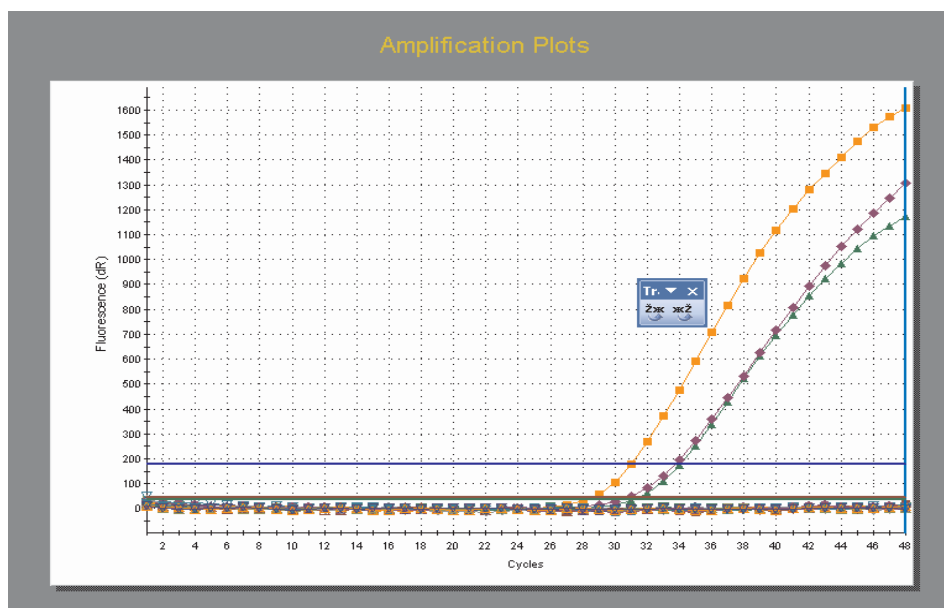
Slika 2. *M-DNK standardi,*  
*1 – DNK fragment virusa BHV 1 (tk)* /  
 Figure 2. *M – DNA standard*  
*1 – DNA fragment of BHV 1 virus (tk)*

Vilcek i sar. (1995) su ispitivali prisustvo virusa BHV 1 u uzorcima nosnih briseva, pluća, limfnih čvorova i trahealne mukoze goveda primenom više metoda: izolacije virusa na kulturi tkiva i VN testa kao i lančane reakcije polimeraze. Uzorci su sakupljeni u Škotskoj sa 16 područja u kojima je došlo do prijave herpesvirusne infekcije. Posle obrade, uzorci su inokulisani u ćelijsku liniju MDBK i svakodnevno praćeni na pojavu citopatogenog efekta. Ispitivanjem 27 uzoraka suspektnog materijala metodom izolacije virusa na kulturi tkiva, autori su prisustvo virusa utvrdili u 13 uzoraka (48,14%), dok je primenom lančane reakcije polimeraze nukleinska kiselina virusa BHV 1 ustanovljena u 18 uzoraka (66,66%). Ros i Belak (1999) su primenom lančane reakcije polimeraze (PCR) ispitivali sličnost u strukturi genoma nekoliko srodnih herpesvirusa i to govedeg herpesvirusa 1, govedeg herpesvirusa 5, herpesvirusa 1 koza i herpesvirusa 1 jelena, kao i mogućnost njihovog otkrivanja i identifikacije u uzorcima suspektnog materijala poreklom od navedenih životinja. Za izvođenje lančane reakcije polimeraze su pored ostalih prajmera za identifikaciju navedenih herpesvirusa koristili i prajmere za glikoprotein B. Na osnovu filogenetske analize gena koji kodiraju sintezu glikoproteina gB i gD virusa BHV1 autori su ustanovili visok stepen srodnosti između govedeg herpesvirusa 5 i govedeg herpesvirusa 1 kao i između podtipova 1 i 2 virusa BHV 1, odnosno filogenetska udaljenost od herpesvirusa 1 koza. Za izvođenje lančane reakcije polimeraze uz korišćenje prajmera za glikoprotein B spoljašnjeg omotača virusa može se ustanoviti i prisustvo virusa BHV5 u uzorcima nosnih briseva goveda, zbog veličine DNK fragmenta koja je iznosila 478bp. Radi sigurne identifikacije govedeg herpesvirusa 1 korišćena je i lančana reakcija po-

limeraze uz primenu prajmera za timidin-kinazu (TK). Navedeni prajmeri amplifikuju deo gena na molekulu virusne DNK koji je odgovoran za kodiranje sinteze timidin-kinaze. Izbor prajmera za timidin-kinazu izvršen je iz sledećih razloga (Moore i sar., 2000): a) enzim timidin-kinaza predstavlja značajan faktor patogenosti virusa BHV1, a sekvenca gena u molekulu virusne DNK koja kodira sintezu ovog enzima prisutna je kod svih patogenih sojeva navedenog virusa; b) nukleotidna sekvenca gena za timidin-kinazu nekoliko sojeva virusa BHV1 (soj 6660, LA i dr.) poznata je više godina; c) modifikovani mutanti BHV1 koji se koriste za pripremu vakcina kod goveda protiv ove herpesvirusne infekcije. Pošto su u vakcini ireverzibilno atenuisani postupkom koji podrazumeva deleciju gena odgovornih za kodiranje sinteze timidin-kinaze, korišćenje PCR procedure uz primenu prajmera za timidin-kinazu omogućava razlikovanje vakcinalnih sojeva virusa. Tako na primer tk soj BHV1 koji potiče od divljih sojeva virusa koji izazivaju prirodnu infekciju goveda i d) deo gena koji kodira sintezu timidin-kinaze je odvojen iz genoma virusa BHV5, tako da primena odgovarajućeg PCR protokola uz korišćenje prajmera za timidin-kinazu omogućava diferenciranje ovog virusa od virusa BHV1. Yason i sar. (1995) su ispitivali mogućnost primene lančane reakcije polimeraze uz korišćenje oligonukleotidnih prajmera za timidin-kinazu za otkrivanje prisustva virusa BHV1 u kulturi tkiva. Veličina amplifikovanih DNK produkata dobijenih primenom prethodno navedene metode je iznosila 183bp. Na osnovu rezultata ispitivanja, autori su utvrdili da je metoda PCR, korišćena za otkrivanje prisustva referentnog soja LA virusa, imala istu osetljivost kao metoda izolacije virusa u kulturi tkiva i da se uspostavljena procedura za izvođenje lančane reakcije polimeraze uz korišćenje prajmera za timidin-kinazu može uspešno koristiti u rutinskoj dijagnostici infekcije goveda izazvane goveđim herpesvirusom 1.

Uzorci nosnih briseva goveda koji su poticali sa naših farmi teladi i junadi su, pored izolacije na kulturi tkiva i metode lančane reakcije polimeraze uz korišćenje prajmera za timidin-kinazu i glikoprotein B, ispitivani na prisustvo nukleinske kiseline virusa BHV 1 i primenom metode Real-time PCR. Dobijeni rezultati ispitivanja su potvrdili prisustvo govedeg herpesvirusa kod tri uzorka nosnih briseva goveda (4,61%). Dobijene Ct vrednosti ispitivanih uzoraka su iznosile 30.94, 33.65 i 33.98 (slika 3).

Wang i sar. (2008) su koristili metodu Real-time PCR za detekciju govedeg herpesvirusa 1 u uzorcima semena bikova. Uzorci semena su bili poreklom od prirodno i veštački inficiranih bikova i semena poreklom od neinficiranih i seronegativnih bikova. Ove rezultate ispitivanja autori su upoređivali sa rezultatima dobijenim primenom metode izolacije virusa u kulturi tkiva i tada su ustanovili da je osetljivost i specifičnost metode Real-time PCR veća od osetljivosti i specifičnosti metode izolacije virusa na kulturi tkiva. Osetljivost metode Real-Time PCR iznosila je 82,7% u odnosu na 53,6% metode izolacije virusa na kulturi tkiva, a specifičnost metode Real-time PCR iznosila je 93,6%, a metode izolacije virusa na kulturi tkiva 84,6%.



Slika 3. Rezultati ispitivanja uzoraka nosnih briseva goveda primenom metode Real-time PCR (OIE Manual, 2008) /  
Figure 3. Results of examinations of bovine nasal smear samples using Real-time PCR method (OIE Manual, 2008).

Rezultati napred navedenih ispitivanja su potvrdili da savremene molekularne metode zasnovane na lančanoj reakciji polimeraze (PCR i Real-time PCR) zbog visoke osetljivosti i specifičnosti imaju prednost u brznoj i pouzdanoj identifikaciji goveđih herpesvirusa u odnosu na klasične metode virusološke dijagnostike.

#### **Zaključak / Conclusion**

Rezultati ispitivanja su potvrdili opravdanost korišćenja molekularnih metoda – lančane reakcije polimeraze (PCR) i Real-time PCR za direktnu detekciju i brzu identifikaciju goveđeg herpesvirusa 1 u uzorcima nosnih briseva goveda, bez prethodne izolacije virusa na kulturi tkiva i njegove identifikacije primenom testa virus-serum neutralizacije. Šira primena navedenih molekularnih metoda, zasnovanih na lančanoj reakciji polimeraze, omogućila bi brzu i pravovremenu dijagnostiku infekcije goveda izazvane goveđeim herpesvirusom 1. Kontinuirano praćenje ove infekcije bi značajno doprinelo sprečavanju njenog širenja, a uz primenu odgovarajućih profilaktičkih mera i uspešnom suzbijanju ovog oboljenja u populaciji goveda.

**NAPOMENA / ACKNOWLEDGEMENT:**

Istraživanja opisana u ovom radu finansirana su od strane Ministarstva za nauku Republike Srbije, u okviru projekta pod ev. brojem 20150. / *The investigations described in this work have been financed by the Republic of Serbia Ministry of Science within Project No. 20150.*

**Literatura / References**

1. Fuchs M, Hubert P, Detterer J, Rziha HJ. Detection of bovine herpesvirus type 1 in blood from naturally infected cattle by using sensitive PCR that discriminates between wild-type virus and virus lacking glycoprotein E. *J Clin Microbiol* 1999; 37(8): 2498-507.
2. Mihajlović B. Mikrobiologija III, Rikecije i virusi. Naučna knjiga. Beograd, 1987.
3. Moore S, Gunn M, Walls D. A rapid and sensitive PCR – based diagnosis assay to detect bovine herpesvirus 1 in routine diagnostic submissions. *Vet Microbiol* 2000; 75: 145-53.
4. OIE Manual, 2008.
5. Ros C, Belak S. Studies of genetic relationships between bovine, caprine, cervine and rangiferine alphaherpesviruses and improved molecular methods for virus detection and identification. *J Clin Microbiol* 1999; 37(5): 1247-53.
6. Vilcek S, Nettleton PF, Herring AJ. Detection of bovine herpesvirus 1 in clinical samples by the polymerase chain reaction. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 1995; 102(6): 249-50.
7. Wang J, O Keefe J, Orr D, Loth L, Banks M, Wakely P, West D, Card R, Ibata G, Van Maanen K, Thoren P, Isaksson M, Kerkhofs P. An international inter-laboratory ring trial to evaluate a real-time PCR assay for the detection of bovine herpesvirus 1 in extended bovine semen. *Vet Microbiol* 2008; 126: 11-9.
8. Yason CV, Harris LM, McKenna PK, Wadowska D, Kibenge FSB. 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* 1995; 59: 94-101.

**ENGLISH**

**IMPLEMENTATION OF POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) AND REAL-TIME PCR IN QUICK IDENTIFICATION OF BOVINE HERPESVIRUS 1**

**N. Milić, J. Nišavić, Ružica Ašanin, Aleksandra Knežević, Jelena Ašanin, D. Vidanović, M. Šekler**

Examinations were performed on 65 samples of nasal smears taken from calves and young cows with clinical symptoms of respiratory infection to determine the presence of the bovine herpesvirus 1 using parallel implementation of molecular and standard methods of virological diagnostics. The appearance of a cytopathogenic effect (CPE) was not established in inoculated cell lines 24h, 48h and 72h following inoculation, or after two successive passages of the examined material sample through these cell lines. The application of polymerase chain reaction (PCR) using a primer for glycoprotein B and thymidine – kinase, established the presence of bovine herpesvirus 1 nucleic acid in one



sample of a bovine nasal smear, while the presence of this virus was established in three samples in an examination of the nasal smear samples using the Real-Time PCR method.

Key words: bovine herpesvirus 1, PCR, Real-Time PCR

## РУССКИЙ

### ПРИМЕНЕНИЕ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ ПОЛИМЕРАЗЫ (ЦРП) И МЕТОДЫ *REAL-TIME* ЦРП В БЫСТРОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ ГОВЯЖЕГО ГЕРПЕСВИРУСА 1

**Н. Милич, Й. Нишавич, Ружица Ашанин, Александра Кнежевич, Елена Ашанин, Д. Виданович, М. Шеклер**

Совокупно испытывано 65 образчиков носовых мазков, собранных из телят и бычков (тёлок) с клиническими симптомами респираторной инфекции на присутствие говяжьего герпесвируса I сравнительным применением молекулярных и стандартных методов вирусологической диагностики. У инокулированных клеточных линий не установлено явление цитопатогенного эффекта (ЦПЭ-) после 24 ч, 48 ч. и 72 ч. от инокуляции ни после два следующих друг за другом пассажа образчиков испытыванного материала через приведённые клеточные линии. Применением цепной реакции полимеразы (ЦРП) при пользовании праймеров для гликопротеин В и тимидин-киназы, утверждено присутствие нуклеиновой кислоты говяжьего герпесвируса и в одном образчике носового мазка, пока испытыванием приведённых образчиков носовых мазков крупного рогатого скота методом *Real-Time* присутствие упомянутого вируса установлено у трёх образчиков.

Ключевые слова: говяжий герпесвирус I, ЦРП, *Real-Time* ЦРП