

**MOGUĆNOST UPOTREBE *RT-PCR* TEHNIKE U  
UTVRĐIVANJU PRISUSTVA VIRUSA GOVEĐE VIRUSNE  
DIJAREJE U SPERMI PRIPLODNIH BIKOVA\***  
*POSSIBILITY FOR USE OF RT-PCR TECHNIQUE IN ESTABLISHING  
PRESENCE OF BOVINE VIRAL DIARRHEA VIRUS IN SPERM OF  
BREEDING BULLS*

T. Petrović, S. Lazić, M. Jovičin, Bosiljka Đuričić\*\*

*Virus goveđe virusne dijareje (BVD-a) je značajan zdravstveno-ekonomski patogen kod goveda koji može da se izlučuje i širi i putem sperme trajno i akutno inficiranih bikova. Nativna sperma šest bikova, za koju je izolacijom virusa i RT-PCR metodom utvrđeno da je negativna na BVD virus, eksperimentalno je inokulisana desetostrukim razređenjima necitopatogenim 22146 sojem BVD virusa titra  $10^{5.5}$ . Na ovaj način dobijena su razređenja BVD virusa od  $10^{-1}$  do  $10^{-6}$  ( $5 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub> do 0,5 TCID<sub>50</sub> BVD virusa) u 0,1 ml nativne sperme. Iz ovako inokulisane sperme obavljena je reizolacija virusa na kulturi ćelija FTB u mikrotitar ploči sa 96 bazenčića, u kojoj je svaki uzorak inficirane sperme postavljen u tri primerka, a svaki od njih je titriran od razređenja 1:2 do 1:256. Prisustvo BVD virusa je dokazano tehnikom fluorescentnih antitela u drugoj slepoj pasaži na kulturi ćelija FTB. Za kulturu ćelija je utvrđen izrazito toksičan efekat nativne sperme do razređenja 1:64. Virus BVD-a je reizolovan iz sperme u sva tri primerka uzoraka sperme sa  $5 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^3$  i  $5 \times 10^2$  TCID<sub>50</sub>, a nije reizolovan iz sperme sa 50, sa 5 i sa 0,5 TCID<sub>50</sub> BVD virusa u 0,1 ml nativne sperme. Istovremeno izvedeno je dokazivanje prisustva BVD virusnog genoma RT-PCR metodom u istim uzorcima virusom inokulisane nativne sperme bikova. Pozitivan rezultat je utvrđen u nativnoj spermi sa  $5 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^3$ ,  $5 \times 10^2$  i 50 TCID<sub>50</sub> BVD virusa u 0,1 ml nativne sperme.*

*Eksperiment je ukazao da RT-PCR metoda ima prednosti u odnosu na izolaciju BVD virusa iz uzoraka nativne sperme bikova. To su: brzina ispitivanja (jedan do dva dana) i veća osetljivost (deset puta u*

\* Rad primljen za štampu 21. 1. 2005. godine

\*\* Mr Tamaš Petrović, istraživač saradnik; dr Sava Lazić, viši naučni saradnik; dr Milovan Jovičin, viši naučni saradnik, Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad”, Novi Sad; dr Bosiljka Đuričić, redovni profesor, Fakultet veterinarske medicine, Beograd

*odnosu na izolaciju virusa). Izolacija virusa traje najmanje deset dana, a njena manja osetljivost je, pre svega, rezultat citotoksičnog efekta native sperme bikova na kulturu ćelija.*

*Ključne reči: BVD virus, nativna sperma bikova, izolacija virusa, RT-PCR*

## Uvod / Introduction

Virus goveđe virusne dijareje (virus *BVD*) je pestivirus koji uzrokuje gastrointestinalna, respiratorna i reproduktivna oboljenja kod goveda [1]. On predstavlja značajan zdravstveno-ekonomski patogen u govedarstvu, pri čemu se taj značaj indirektno ispoljava u vidu velikog broja (više od 140) registrovanih vakcina na tržištu [2] i napora koje ulažu pojedine zemlje Evropske unije za njegovu eradikaciju [3]. U veliki broj načina i puteva širenja *BVD* virusne infekcije, ubraja se i njegovo izlučivanje putem sperme trajno i akutno inficiranih bikova [1, 4, 5]. Perzistentna infekcija nastaje još intrauterino prilikom infekcije ploda u prvih 125 dana gestacije, pri čemu, zbog nerazvijenosti imunog sistema fetusa, virus *BVD* ne prepoznaje imuni sistem kao antigen, već se uspostavlja imunotolerancija koja omogućava razvoj perzistentne infekcije i nesmetano umnožavanje i izlučivanje virusa *BVD* tokom celog života buduće jedinke [6, 7]. Preko duboko zamrznutog semena perzistentno inficiranih (PI) bikova virus *BVD* lako se prenosi na osemenjene prijemčive životinje i na taj način se infekcija brzo širi u populaciji goveda. Posledice koitalne infekcije uključuju smanjenu koncepciju, rana embrionala uginuća, abortuse i rađanje perzistentno inficiranih životinja [4, 5]. Akutna *BVD* virusna infekcija bika nastaje u slučaju infekcije prijemčive, imunokompetentne životinje. Većim brojem ispitivanja je utvrđeno da virus *BVD* može da se izoluje i iz sperme akutno inficiranih bikova u stadijumu viremije, dok mogućnost njegove izolacije iz sperme izostaje nakon pojavljivanja specifičnih antitela [8, 9]. Meyling i Jensen [5] ustanovili su pozitivan serološki odgovor kod svih 12 seronegativnih junica posle veštačkog osemenjavanja semenom PI bika, a kod samo tri od 60 seronegativnih junica utvrđen je pozitivan serološki odgovor posle veštačkog osemenjavanja semenom akutno inficiranog bika.

Osnovni problem native sperme bikova i komercijalnog semena kao uzorka za izolaciju virusa je u citotoksičnom efektu native sperme i komponentama razređivača za kulturu ćelija na kojima se obavlja izolacija virusa, kao i u poznatom virulicidnom efektu seminalne plazme [10, 11]. Usled ovih razloga često se pojavljuju „lažno” negativni rezultati izolacije *BVD* virusa iz sperme, naročito ukoliko je u pitanju mali broj virusnih čestica. Prema podacima iz literature količina virusa *BVD* u ejakulatu akutno inficiranog bika najčešće je između 5 i 75 CCID<sub>50</sub> u jednom mililitru ejakulata [8, 12]. Značajan problem predstavlja i veliko razređenje ejakulata u komercijalnom semenu bikova i serološki odgovor akutno inficiranih bikova nakon infekcije. Naime, veći broj autora je ustanovio da se *BVD* virus ne

može da izoluje iz sperme bikova posle pojavljivanja specifičnih antitela u krvi, iako je on prisutan u spermi [8, 9, 12, 13]. Na ovaj način dobija se lažno negativan nalaz. Kod perzistentno inficiranih bikova virusom *BVD* to nije slučaj, zato što izostanka serološkog odgovora, postoji stalna i nesmetana replikacija i izlučivanje virusa *BVD* svim sekretima i ekskretima, pa i spermom u velikoj količini (od  $10^4$  do  $10^7$  CCID<sub>50</sub> u ml ejakulata, 9). Međutim, na pravi problem ukazuju Givens i saradnici [13] koji izveštavaju o prisustvu virusa *BVD* u spermi sedam meseci nakon akutne infekcije odraslog serološki negativnog imunokompetentnog bika. Pri tome je virus *BVD*, posle kratkotrajne viremije i pojavljivanja specifičnih antitela nestao iz krvi. Izolacija virusa *BVD* u nativnoj spermi je bila pozitivna do pojave serološkog odgovora, a nakon toga virus nije mogao da se utvrdi ovom metodom, dok je *RT-PCR* metodom virus *BVD* utvrđen u većem broju ejakulata do sedam meseci nakon nastanka infekcije. Kada su se ovi, *RT-PCR* metodom pozitivni a u izolaciji virusa negativni, uzorci sperme aplikovali serološki negativnoj teladi nastala je infekcija i sinteza specifičnih antitela. Na ovaj način nesumnjivo je potvrđeno prisustvo virusa *BVD* u pomenutim uzorcima sperme [13].

Cilj ovoga rada je da ukaže na mogućnost utvrđivanja prisustva virusa *BVD* u nativnoj spermi bikova pomoću reverzne transkripcije - polimeraza lančane reakcije (*RT-PCR*) i njenu prednost u odnosu na klasičnu izolaciju virusa.

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

Kao materijal u ispitivanju osetljivosti metoda za utvrđivanje prisustva virusa *BVD* u spermi korišćeni su uzorci native sperme šest bikova i necitopatogeni (ncp) soj virusa *BVD* 22146, titra  $10^{5.5}$ , na sekundarnoj kulturi ćelija fetalnog telećeg bubrega (FTB). Radi utvrđivanja statusa bikova donora sperme u odnosu na *BVD* virusnu infekciju, obavljena su ispitivanja prisustva specifičnih antitela (serumneutralizacioni test) i virusnog antigena (*ELISA* test - IDEXX HerdChek antigen/serum test kit) u krvnom serumu. Ispitivanjem nije utvrđeno prisustvo specifičnih antitela za virus *BVD*, niti je utvrđeno prisustvo *BVD* virusnog antigena. Nativna sperma 6 bikova, za koju je prethodno izolacijom virusa i *RT-PCR* metodom utvrđeno da je negativna na virus *BVD*, eksperimentalno je inokulisana desetstrukim razređenjima ncp 22146 soja virusa *BVD*. Pre dodavanja virusa, nativna sperma je podeljena u tri jednaka dela po 0,45 ml. Jedan deo je inokulisan virusom, jedan deo je služio kao negativna kontrola u ispitivanjima, a treći deo je ostavljen za slučaj potreba ponavljanja nekog dela eksperimenta. Inokulacija virusom je obavljena tako što su uzorci native sperme prethodno razređeni dodavanjem fiziološkog rastvora u razmeri 1:1 (na 0,45 ml native sperme dodato je 0,45 ml fiziološkog rastvora). Na 0,9 ml ovako razređenih uzoraka native sperme dodato je po 0,1 ml desetstrukih razređenja 22146 soja *BVD* virusa u fiziološkom rastvoru, počev od koncentrovanog virusa do  $10^{-5}$ . Na ovaj način su dobijena razređenja *BVD* virusa od  $10^{-1}$  do  $10^{-6}$  u 0,1 ml native sperme. Ovakav način veštačke infekcije je odabran radi što tačnije procene količine virusa koja se nalazi

u 0,1 ml inficiranih uzoraka sperme. Negova količina u uzorcima nativne sperme je bila  $5 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub>,  $5 \times 10^3$  TCID<sub>50</sub>,  $5 \times 10^2$  TCID<sub>50</sub>,  $5 \times 10^1$  TCID<sub>50</sub>, 5 TCID<sub>50</sub> i 0,5 TCID<sub>50</sub>. Na ovaj način dobili smo različit broj virusnih čestica, pri čemu nativna sperma sa svim svojim osobinama nije bila razređivana. Na isti način su razređeni parni uzorci nativne sperme koja je ostavljena za negativnu kontrolu, s tim da je umesto 0,1 ml razređenja virusa dodavano 0,1 ml fiziološkog rastvora (0,45 ml nativne sperme + 0,45 ml fiziološkog rastvora + 0,1 ml fiziološkog rastvora).

Iz ovako pripremljenih uzoraka sperme bikova, nakon homogenizacije (vortex 15 sekundi) i centrifugovanja (3000 rpm u trajanju od pet minuta), obavljena je reizolacija virusa na kulturi ćelija FTB. Za izolaciju je korišćen supernatant nativne sperme posle centrifugovanja. Reizolacija virusa *BVD* obavljena je u mikrotitar ploči sa 96 bazenčića u kojoj je svako razređenje virusa u nativnoj spermi postavljeno u tri primerka, a svako od njih je titrovano u medijumu za kulturu ćelija od razređenja 1:2 do 1:256. U svaki bazenčić mikroploče je postavljeno 0,1 ml supernatanta inokulisanih uzoraka sperme, na prethodno opisan način, na koje je dodato 0,1 ml suspenzije FTB ćelija u medijumu za rast kulture ćelija. Ovakva postavka reizolacije virusa *BVD* iz sperme je sprovedena zbog poznatog i očekivanog toksičnog efekta za kulturu ćelija i utvrđivanja količine virusa koja predstavlja granicu detekcije u izolaciji virusa *BVD* iz nativne sperme. Kao medijum za rast i održavanje kulture ćelija korišćen je Eagle MEM sa hepesom (SIGMA) i 10% fetalnog govedeg seruma za koji je prethodno utvrđen da je „slobodan” od virusa *BVD*, kao i specifičnih antitela za virus *BVD*. Posle pet dana inkubacije na temperaturi od 37°C mikrotitar ploče, na kojima je obavljena reizolacija virusa *BVD* smrznute su i nakon tri uzastopna ciklusa zamrzavanja-odmrzavanja uzorci su, u istom rasporedu u količini od 20 µl, prebačeni na nove mikrotitar ploče. Na njih je dodato po 0,1 ml suspenzije novih FTB ćelija, a inkubacija na temperaturi od 37°C trajala je četiri dana. Na isti način, u istom rasporedu i u istim uslovima su inokulisani i supkultivisani uzorci pripremljene nativne sperme kao negativne kontrole. S obzirom da virusni soj koji je korišćen u eksperimentu pripada necitopatogenom biotipu virusa *BVD* (kakav je najčešće prisutan u prirodi), njegovo prisustvo, u kulturi ćelija druge slepe pasaže uzoraka, indirektno je potvrđivano tehnikom fluorescentnih antitela (poliklonska antitela za *BVDV* konjugovana FITC-om; American Bioresearch, USA).

Istovremeno, obavljeno je dokazivanje prisustva *BVD* virusnog gena *RT-PCR* metodom u istim uzorcima nativne sperme bikova inokulisane virusom. Izolacija RNA je obavljena, iz iste količine (0,1 ml) supernatanta inficiranih uzoraka sperme koja su postavljena na izolaciju virusa, korišćenjem reagensa *Trizol*<sup>®</sup>LS (Gibco BRL) po upustu proizvođača. Izolovana RNA je resuspendovana u 40 µl DEPC-tretirane vode. Umnožavanje sekvence od 300 bp 5'UTR dela gena *BVD* virusa sprovedeno je pomoću „one-tube *RT-PCR*” metode (*Access RT-PCR system*, Promega, USA) po uputstvu proizvođača i po opisanoj proceduri Barlič-Maganje i Groma [14] i Toplaka i saradnika [15], korišćenjem prajmera *Pest2-L* i *P1-U* opisanih u tabeli 1. U *RT-PCR* reakciji je korišćeno 4 µl izolovanih

RNA uzoraka. Dobijeni PCR produkt je izdvojen na 1,5% agaroznom gelu. Paralelno je, radi ispitivanja osetljivosti *RT-PCR* metode i odabranih prajmera u detekciji 22146 soja virusa *BVD*, sprovedena *RT-PCR* detekcija desetostrukih razređenja ovog virusa koja su korišćena za inokulaciju native sperme bikova.

Tabela 1. Detalji oligonukleotidnih prajmera koji su korišćeni u *RT-PCR* reakciji. Pozicija u genomu i predviđena veličina umnožene sekvence genoma odgovaraju referentnom *BVDV* soju *NADL* [16]

Table 1. Details of oligonucleotide primers used in the *RT-PCR* reaction. The genome position and predicted size of multiplied genome sequence correspond to the referent *BVDV* strain of *NADL* [16]

Prajmer / Primer	Sekvenca / Sequence (5' - 3')	Pozicija u genomu / Position in genome	Veličina i lokacija u genomu / Size and location in genome
P1-U	AGAGGCTAGCCATGCCCTTAGT	97-118	oko 300 bp
Pest2-L	TCAACTCCATGTGCCATGTAC	395-375	5'-UTR

## Rezultati ispitivanja / Results

Za kulturu ćelija FTB u prvoj slepoj pasaži utvrđen je izrazito toksičan efekat native sperme do razređenja 1:64. Toksičan efekat, koji se ogledao u potpunosti citomorfološkoj destrukciji i deformaciji ćelija i nemogućnosti njihove adhezije za mikrotitar ploču, bio je uočljiv nakon prva 24 časa na razređenjima native sperme 1:2 do 1:16. U bazenčićima mikrotitar ploče, u kojima je sperma bila razređena 1:32 i 1:64, nakon prva 24 časa inkubacije, toksičnost se ogledala u morfološkim promenama ćelija, najviše u vidu vakuolizacije u citoplazmi, promejenom obliku i stvaranju sincicijuma. Nakon naredna 24 časa i u tim bazenčićima je nastalo odvajanje ćelija od podloge. Ovakav efekat je ispoljila sperma kako virusom inokulisana, tako i neinokulisana sperma. U drugoj slepoj pasaži (supkultivaciji) toksičan efekat je ustanovljen, u zavisnosti od uzorka native sperme, najčešće do razređenja 1:8.

U razređenjima 1:8, 1:16 i 1:32 druge slepe pasaže virusom inokuliranih uzoraka native sperme, prisustvo virusa *BVD* nije moglo da se dokaže tehnikom fluorescentnih antitela ni u jednom uzorku desetorostrukih razređenja virusa. Virus *BVD*-a je reizolovan i njegovo prisustvo je dokazano tehnikom fluorescentnih antitela u razređenjima 1:64, 1:128 i 1:256 u sva tri primerka uzoraka native sperme sa  $5 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^3$  i  $5 \times 10^2$  TCID<sub>50</sub> 22146 virusa *BVD* u 0,1 ml. Virus *BVD*-a nije reizolovan iz uzoraka native sperme sa  $5 \times 10^1$  (50) TCID<sub>50</sub>, 5 TCID<sub>50</sub> i 0,5 TCID<sub>50</sub> 22146 virusa *BVD* u 0,1 ml (tabela 2).

U istim uzorcima virusom inokulisane native sperme bikova dokazano je prisustva *BVD* virusnog genoma *RT-PCR* metodom. Ispitivanja su obavljena samo u po jednom primerku razređenja 22146 virusa *BVD* u spermi. Pozitivan rezultat na 1,5% agaroznom gelu, koji se ogledao u vidu očekivanog fragmenta

Tabela 2. Prikaz rezultata izolacije 22146 soja BVD virusa iz inokulisane native sperme bikova na kulturi ćelija sekundarnog fetalnog telećeg bubrega

Table 2. Results of isolation of 22146 strain of the BVD virus from artificially infected native sperm of bulls in cell culture of secondary fetal calf kidney

Inficirana sperma / Infected sperm	Sperma 1 / Sperm 1 5 x 10 <sup>4</sup> TCID <sub>50</sub> BVD virusa / BVD virus		Sperma 2 / Sperm 2 5 x 10 <sup>3</sup> TCID <sub>50</sub> BVD virusa / BVD virus		Sperma 3 / Sperm 3 5 x 10 <sup>2</sup> TCID <sub>50</sub> BVD virusa / BVD virus		Sperma 4 / Sperm 4 5 x 10 <sup>1</sup> TCID <sub>50</sub> BVD virusa / BVD virus		Sperma 1 / Sperm 1 5 TCID <sub>50</sub> BVD virusa / BVD virus		Sperma 1 / Sperm 1 0.5 TCID <sub>50</sub> BVD virusa / BVD virus		Kontrola ćelija / Control cell
	Razređenje / Dilution												
1:2	- <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1:4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1:8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1:16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1:32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1:64	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1:128	+ <sup>b</sup>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
1:256	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-

a – Virus BVD-a nije izolovan / BVD virus not isolated;

b – Virus BVD-a je izolovan / BVD virus isolated

(benda) umnožavanja veličine 300 bp utvrđen je u uzorcima native sperme sa  $5 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^3$ ,  $5 \times 10^2$  i  $5 \times 10^1$  TCID<sub>50</sub> virusa *BVD* u 0,1 ml. U uzorcima native sperme bikova sa 5 TCID<sub>50</sub> i 0,5 TCID<sub>50</sub> virusa *BVD* nije utvrđeno prisustvo specifičnog benda (slika 1).



Slika 1. *Detekcija PCR produkata na gelu. S leva na desno uzorci native sperme sa  $5 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^3$ ,  $5 \times 10^2$  i  $5 \times 10^1$ , 5 TCID<sub>50</sub> i 0,5 TCID<sub>50</sub> virusa BVD. Sedmi uzorak je negativna kontrola, na osmom mestu je marker 100 bp /*

*Figure 1. Detection of PCR products on gel. From left to right – samples of native sperm with  $5 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^3$ ,  $5 \times 10^2$ , and  $5 \times 10^1$ , 5 TCID<sub>50</sub> and 0,5 TCID<sub>50</sub> BVD virus. The seventh sample is a negative control, on the eighth is the 100 bp marker*

Prilikom ispitivanja desetostrukih razređenja 22146 soja virusa *BVD* u fiziološkom rastvoru, kojima su inokulisani uzorci native sperme bikova i koja je sprovedena istovremeno i pod istim uslovima kao i ispitivanja prisustva virusa *BVD* u spermi, pozitivan rezultat *RT-PCR* metodom je dobijen u razređenjima  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  i  $10^{-5}$ , odnosno detektovan je virus *BVD* titra  $5 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub>,  $5 \times 10^3$  TCID<sub>50</sub>,  $5 \times 10^2$  TCID<sub>50</sub>,  $5 \times 10^1$  TCID<sub>50</sub> i 5 TCID<sub>50</sub> virusa *BVD* u 0,1 ml. Samo u razređenju  $10^{-6}$  (0,5 TCID<sub>50</sub>) ovom metodom nije ustanovljeno prisustvo virusa *BVD* u fiziološkom rastvoru. Pri tome, količina RNA koja je korišćena u *RT-PCR* reakciji bila je identična (4  $\mu$ l), kao i ona kod ispitivanja prisustva virusa *BVD* u uzorcima inficirane sperme.

#### **Diskusija / Discussion**

Izolacijom na kulturi ćelija FTB, pozitivan rezultat je utvrđen u uzorcima inokulisane native sperme u kojima je količina virusa *BVD* bila  $5 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^3$  i  $5 \times 10^2$  TCID<sub>50</sub> u 0,1 ml. Virus *BVD*-a nije reizolovan iz uzoraka native sperme bikova u kojima je njegova količina bila  $5 \times 10^1$  TCID<sub>50</sub>, 5 TCID<sub>50</sub> i 0,5

TCID<sub>50</sub> u 0,1 ml. Pozitivan rezultat prisustva *BVD* virusnog genoma *RT-PCR* metodom je utvrđen u nativnoj spermi u kojoj je količina virusa *BVD* bila  $5 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^3$ ,  $5 \times 10^2$  i  $5 \times 10^1$  TCID<sub>50</sub> u 0,1 ml, dok njegovo prisustvo nije utvrđeno u uzorcima sa 5 TCID<sub>50</sub> i 0,5 TCID<sub>50</sub> virusa *BVD* u 0,1 ml.

Eksperiment je ukazao na prednosti koje ima *RT-PCR* metoda u odnosu na izolaciju virusa *BVD* u uzorcima native sperme bikova. Utvrđene prednosti *RT-PCR* metode su: brzina ispitivanja (jedan do dva dana) i veća osetljivost. Metoda *RT-PCR* je, pri tome, pokazala deset puta veću osetljivost (50 TCID<sub>50</sub>) u odnosu na izolaciju virusa (500 TCID<sub>50</sub>), iako je u reakciji korišćeno 4 µl od 40 µl izolovane RNA iz uzorka. Do sličnih rezultata su došli i drugi autori [11, 17, 13] Izolacija virusa traje najmanje deset dana, a njena manja osetljivost je, pre svega, rezultat toksičnog efekta native sperme bikova za kulturu ćelija. Naime, ispitivanja su ukazala na toksičan efekat native sperme do razređenja 1:64 za kulturu ćelija FTB u prvoj slepoj pasaži. Toksičan efekat se preneo i na uzorke u drugoj slepoj pasaži do razređenja 1:8. Izrazito toksičan efekat native sperme bikova za kulturu ćelija spominju i drugi autori u svojim ispitivanjima [11, 18, 19]. Toksičan efekat native sperme je posebno izražen za primarne i sekundarne kulture ćelija koje se koriste kod izolacije virusa *BVD* zbog njihove veće osetljivosti i usled česte latentne kontaminacije komercijalnih ćelijskih linija virusom *BVD*. Usled toksičnog efekta native sperme do razređenja 1:64, virus *BVD* koji je u uzorcima bio prisutan u titru  $5 \times 10^1$  TCID<sub>50</sub>, 5 TCID<sub>50</sub> i 0,5 TCID<sub>50</sub> nije mogao da se veže i umnoži u kulturi ćelija. U većim razređenjima (1:128 i 1:256) ovih uzoraka sperme, verovatnoća prisustva virusa *BVD* je bila veoma mala (zbog razređenja), pa se iz tih razloga nije ni mogao da reizoluje.

Metodom *RT-PCR* nije se utvrdilo prisustvo 5 TCID<sub>50</sub> virusa *BVD* u uzorku native sperme bika, iako je ova količina virusa utvrđena u fiziološkom rastvoru, prilikom utvrđivanja limita detekcije ove metode. Rezultat ukazuje na prisustvo inhibitornog efekta native sperme na *RT-PCR* reakciju. Ovaj fenomen je opisao veći broj autora [20, 17, 11], koji su utvrdili inhibitorni efekat native sperme na reverznu transkripciju. Da Silva i sar [17] ukazuju da je radi povećanja osetljivosti *RT-PCR* metode u detekciji virusa *BVD* u uzorcima sperme, neophodno da se prethodno obavi obrada sperme hromatografskom kolonom Sephacryl S-400. Posle obrade sperme autori su uspeali da utvrde pozitivnu reakciju u spermi sa 0,4 TCID<sub>50</sub> virusa *BVD*. Givens i sar [13] ističu kao posebnu prednost mogućnost *RT-PCR* metode da utvrdi prisustvo virusa *BVD* u prisustvu specifičnih antitela i nezamenljiv značaj ove metode kod utvrđivanja perzistentne *BVD* infekcije lokalizovane u testisima priplodnih bikova. Naime, ovi autori su ustanovili prisustvo virusa *BVD* u većem broju ejakulata bika do sedam meseci nakon akutne infekcije, pri čemu virus nije mogao da se izoluje ni iz jednog uzorka ejakulata posle pojavljivanja specifičnih antitela u krvi.

Utvrdivanje prisustva virusa *BVD* u nativnoj spermi i komercijalnom semenu bikova je od velikog zdravstvenog i ekonomskog značaja u govedarstvu. Praktičan značaj je još veći kod nemogućnosti ispitivanja bika donora sperme,



odnosno semena, u slučajevima uvoza semena ili ukoliko bik nije više u eksploataciji. Voges i saradnici [12] utvrdili su perzistentnu *BVD* virusnu infekciju u testisima seropozitivnog, neviremičnog bika u centru za VO. Virus, prosečnog titra  $10^{3.3}$  TCID<sub>50</sub>/ 0,1 ml, ustanovljen je u većem broju ejakulata tokom svih jedanaest meseci ispitivanja, pri čemu ni jednom slučaju nije ustanovljen u krvi. Kod pomenutog bika je utvrđen izuzetno visok titar antitela koji je bio veći od 1:4096, a na homologni virus (izolovan iz sperme) u jednom slučaju i 1:100000. Sperma pri tome nije bila značajnije morfološki promenjena i bik se neko vreme koristio za proizvodnju semena. Autori smatraju da ova pojava može da se objasni akutnom infekcijom imunokompetentnog bika pre puberteta, odnosno pre uspostavljanja gustog spoja između Sertolijevih ćelija u testisima nazvanog krvno-testisna barijera. Virus lokalizovan u testisima je nakon formiranja barijere potpuno zaštićen od imunog sistema životinje, što mu omogućava nesmetanu replikaciju i izlučivanje spermom. Ovakvi i slični slučajevi govore u prilog mišljenju da je kod ispitivanja statusa *BVD* virusne infekcije kod bikova za priplod neophodno da se pored ispitivanja prisustva virusa *BVD* i specifičnih antitela za virus *BVD* u krvi, obavi i ispitivanje prisustva virusa *BVD* u spermi, odnosno komercijalnom semenu.

Na osnovu naših ispitivanja i podataka iz literature možemo, na osnovu osetljivosti i vremena trajanja ispitivanja, da preporučimo upotrebu standardizovane *RT-PCR* metode u utvrđivanju prisustvu virusa *BVD* u uzorcima native sperme bikova.

#### Literatura / References

1. Houe H.: Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infections. *Veterinary Microbiology* 64, 89-107, 1999.
2. Ridpath J. F., Neill J. D., Frey M., Landgraf J. G.: Phylogenetic, antigenic and clinical characterization of type 2 BVDV from North America. *Veterinary Microbiology* 77, 145-155, 2000.
3. Lindberg A. L., Alenius S.: Principles for eradication of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections in cattle populations. *Veterinary Microbiology* 64, 197-222, 1999.
4. Kirkland P. D., McGowan M. R., Mackintosh S. G., Moyle A.: Insemination of cattle with semen from a bull transiently infected with pestivirus. *Veterinary Record* 140, 124-127, 1997.
5. Meyling A., Jensen A. M.: Transmission of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) by artificial insemination (AI) with semen from a persistently-infected bull. *Veterinary Microbiology* 17, 97-105, 1988.
6. Bronwlie J., Clarke M. C., Howard C. J.: Experimental production of fatal mucosal disease in cattle. *Veterinary Record* 114, 535-536, 1984.
7. Bolin S. R., McClurkin A. W., Cutlip R. C., Coria M. F.: Severe clinical disease induced in cattle persistently infected with noncytotoxic bovine viral diarrhoea virus by superinfection with cytopathic bovine viral diarrhoea virus. *American Journal of Veterinary Research*, 46, 3, 573-576, 1985.
8. Kirkland P. D., Richards S. G., Rothwell S. G., Stanley J. F.: Replication of bovine viral diarrhoea virus in the reproductive tract and excretion of virus in semen during acute and chronic infections. *Veterinary Record* 128, 587-590, 1991.
9. Paton D. J., Goodey R., Brockman S., Wood L.: Evaluation of the quality and virological status of semen from bulls acutely infected with BVDV. *Veterinary Record* 124, 63-64, 1989.
10. Kahrs R. F., Gibbs E. P. J., Larsen R. E.: The search for viruses in bovine semen: a review. *Theriogenology* 14, 151-165, 1980.
11. Givens M. D., Heath A. M., Carson R. L., Brock K. V., Edens M. S. D., Wenzel J. G. W., Stringfellow D. A.: Analytical sensitivity of assays used for detection of bovine viral diarrhoea virus in

semen samples from the Southeastern United States. *Veterinary Microbiology* 96, 145-155, 2003. - 12. Voges H., Horner G. W., Rowe S., Wellenberg G. J.: Persistent bovine pestivirus infection localized in the testes of an immuno-competent, non-viremic bull. *Veterinary Microbiology* 61, 165-175, 1998. - 13. Givens M. D., Heath A. M., Brock K. V., Broderson B. W., Carson R. L., Stringfellow D. A.: Detection of bovine viral diarrhoea virus in semen obtained after inoculation of seronegative postpubertal bulls. *American Journal of Veterinary Research*, 64, 4, 428-434, 2003/a. - 14. Barlič-Maganja D., Grom J.: Highly sensitive one-tube RT-PCR and microplate hybridisation assay for the detection and for the discrimination of classical swine fever virus from other pestiviruses. *Journal of Virological Methods* 95, 101-110, 2001. - 15. Toplak I., Petrović T., Grom J., Hostnik P., Barlič-Maganja D.: Genetic diversity of recent bovine viral diarrhoea viruses from Slovenia and Yugoslavia. „5. jugoslovenski epizootiološki dani”, Palić, Subotica, 3-5. aprila 2003., Zbornik referata i kratkih sadržaja, 31-38 2003. - 16. Collett M. C., Larson R., Gold C., Strick D., Anderson D. K., Purchio A. F.: Molecular cloning and nucleotide sequence of the pestivirus bovine viral diarrhoea virus. *Virology* 165, 191-199, 1988. - 17. Da Silva N., Zardoya R., Santurde G., Solana A., Castro J. M.: Rapid and sensitive detection of the viral diarrhoea virus genome in semen. *Journal of Virological Methods* 55, 209-218 1995. - 18. Revell S. G., Chasey D., Drew T.W., Edwards S.: Some observations on the semen of bulls persistently infected with bovine virus diarrhoea virus. *Veterinary Record* 123, 122-125, 1988. - 19. Horner G. W., Tham K. M., Orr D., Ralston J., Rowe S., Houghton T.: Comparison of an antigen capture enzyme-linked assay with reverse transcription-polymerase chain reaction and cell culture immunoperoxidase tests for the diagnosis of ruminant pestivirus infections. *Veterinary Microbiology* 43, 75-84, 1995. - 20. Reddy E.S.P., Das M.R., Reddy E.P., Bhargava P.M.: Inhibition of reverse transcriptases by seminal plasmin. *Biochemistry Journal*, 209, 183-188, 1983.

## ENGLISH

### POSSIBILITY FOR USE OF RT-PCR TECHNIQUE IN ESTABLISHING PRESENCE OF BOVINE VIRAL DIARRHEA VIRUS IN SPERM OF BREEDING BULLS

T. Petrović, S. Lazić, M. Jovičin, Bosiljka Đuričić

The bovine viral diarrhoea (BVD) virus is a significant health-economic pathogen in cattle which can be excreted and spread also through sperm of persistently or acutely infected bulls. Native sperm of 6 bulls, found to be negative to the BVD virus by isolating the virus and using the RT-PCR method, was experimentally infected with a tenfold dilution of the non-cytopathogen 22146 strain of the BVD virus with a titer of  $10^{5.5}$ . This way, dilutions of the BVD virus from  $10^{-1}$  to  $10^{-6}$  ( $5 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub> to 0.5 TCID<sub>50</sub> BVD virus) in 0.1 ml native sperm were obtained. From sperm infected in this way, the virus was reisolated on FTB cell culture in a microtiter plate with 96 pools in which each sample of the infected sperm was set up in three samples, and each of them was titrated to a dilution of 1:2 to 1:256. The presence of the BVD virus was proven using the technique of fluorescent antibodies in a second blind passage on FTB culture cells. For cell culture, an extremely toxic effect of native sperm to a dilution of 1:64 was established. The BVD virus was reisolated from sperm in all three sperm samples with  $5 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^3$ , and  $5 \times 10^2$  TCID<sub>50</sub>, and it was not reisolated from sperm with 50, with 5, and with 0.5 TCID<sub>50</sub> BVD virus in 0.1 ml native sperm. At the same time, the presence of the BVD viral genome was proved using the RT-PCR method in the same samples of artificially infected native sperm of bulls. A positive re-

sult was established in native sperm with  $5 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^3$ ,  $5 \times 10^2$ , and 50 TCID<sub>50</sub> BVD virus in 0.1 ml native sperm.

The experiment proved that the RT-PCR method has advantages over the isolation of the BVD virus from samples of native sperm of bulls. These are: short-term investigations (1 to 2 days) and greater sensitivity (10 times bigger than the isolation of the virus). The isolation of the virus takes at least 10 days, and its greater sensitivity is primarily a result of the cytotoxic effect of native sperm of bulls on cell culture.

Key words: BVD virus, native sperm of bulls, virus isolation, RT-PCR.

## РУССКИЙ

### ВОЗМОЖНОСТЬ УПОТРЕБЛЕНИЯ РТ-ПЦР ТЕХНИКИ В УТВЕРЖДЕНИИ ПРИСУТСТВИЯ ВИРУСА ГОВЯЖЕЙ ВИРУСНОЙ ДИАРЕИ В СПЕРМЕ ПЛЕМЕННЫХ БЫКОВ

Т. Петрович, С. Лазич, М. Йовичин, Босилька Джуричич

Вирус говяжьей вирусной диареи (ВГВД/ГВД) значительный здравоохранительно-экономический патоген у крупного рогатого скота, который можно выделять и расширять и путём спермы персистентно и остро инфицированных быков. Нативная сперма 6 быков, для которой изоляцией вируса и РТ-ПЦР методом утверждено, что отрицательная на ГВД вирус, экспериментально инфицирована десятикратными разрежённостями нецитопатогенными 22146 штаммом ГВД вируса от  $10^{-1}$  до  $10^{-6}$  ( $5 \times 10^{-4}$  ТЦИД<sub>50</sub> до 0,5 ТЦИД<sub>50</sub> ГВД вируса) в 0,1 мл нативной спермы. Из такой же инфицированной спермы совершена реизоляция вируса на культуре клеток ФТБ в микролитр плите с 96 бассейников в которой каждый образчик инфицированной спермы поставлен в три экземпляра, а каждый образчик инфицированной спермы поставлен в три экземпляра, а каждый из них титрован от разрежённости 1:2 до 1:256. Доказательство присутствия ГВД вируса совершено техникой флуоресцентных антител в другом слепом пассаже на культуре клеток ФТБ. Для культуры клеток утверждён выразительно токсический эффект нативной спермы во всех трёх экземплярах образчиков спермы с  $5 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^3$  и  $5 \times 10^2$  ТЦИД<sub>50</sub>, а не реизолирован из спермы с 50, с 5 и с 0,5 ТЦИД<sub>50</sub> ГВД вируса в 0,1 мл нативной спермы. Одновременно совершено доказывание присутствия ГВД вирусного генома РТ-ПЦР методом в тот же образчиках искусственно инфицированной нативной сперме с  $5 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^3$ ,  $5 \times 10^2$  и 50 ТЦИД<sub>50</sub> ГВД вируса в 0,1 мл нативной спермы.

Эксперимент указал, что РТ-ПЦР метод имеет преимущества в отношении изоляции ГВД вируса из образчиков нативной спермы быков. Это суть: быстрота испытания (1 до 2 дня) и большая чувствительность прежде всего результат цитотоксического эффекта нативной спермы быков на культуру клеток.

Ключевые слова: ГВД вирус, нативная сперма быков, изоляция вируса, РТ-ПЦР