

MÕNEDE VVD VIIRUSE EESTI TÜVEDE FENOTÜÜBILINE ISELOOMUSTUS

A. Viltrop, J. Alaots, M. Pärn, K. Must

ABSTRACT. *Phenotypic characterisation of some BVDV strains from Estonia.* The antigenic variation of BVDV strains isolated from Estonian cattle was investigated using a panel of monoclonal antibodies. Other phenotypic characteristics of virus strains as cytopathogenic effect to cell cultures and the clinical manifestation of the infection were investigated. All virus strains isolated from serum of viraemic animals' (14) appeared to be non-cytopathogenic. Only one strain isolated from lung of a dead calf appeared to be cytopathogenic. The clinical manifestation of the infection in different herds was ranging from non-apparent effect to abortions and malformations in newborn calves. Diarrhoea and poor growth rate of young stock were reported as herd health problems in some BVDV persistently infected herds.

The BVDV strains, isolated from 7 different herds, reveal high antigenic variation. The strains were clearly herd specific according to their reactivity pattern with monoclonal antibodies. All strains could be classified as type 1 BVDV strains, however in three strains an unusual reactivity with one type 2 BVDV specific monoclonal antibody was discovered.

Keywords: Bovine viral diarrhoea virus, BVDV, antigenic variation, monoclonal antibodies.

Sissejuhatus

Flaviviridae sugukonna Pestivirus'e perekonda kuuluv veiste viirusdiarröa viirus (VVDV) on RNA viirus, mille virion koosneb üheahelalisest RNA molekulist, mis on ümbritsetud kapsiidiga, mida omakorda katab lipoproteiinkest e ümbris. Viiruse fenotüübilisteks tunnusteks on tema valguline struktuur ja bioloogilised omadused (virulentsus, kohastumine rakukultuuridega, toime rakukultuuridesse, liigispetsiifilisus jne). Nagu kõigil viirustel eristatakse VVDV-l struktuurseid ja mittestruktuurseid proteiine. VVDV struktuurseteks proteiinideks on ümbri moodustavad ja kapsiidi proteiinid. Mittestruktuursed proteiinid (näiteks ensüümid) on vajalikud viiruse paljunemise ajal. Need avalduvad vaid infitseeritud rakkudes ja ei kuulu virioni koostisesse.

VVDV lipoproteiin-ümbrises on kaks glükoproteiini – gp25 (E1) ja gp53 (E2). Lisaks sellele on virionides leitud veel ümbrisega nõrgalt seotud valku gp48 (E0), mille funktsioon ei ole teada. E0 indutseerib olulisel määral antikehade produktsiooni veise organismis, kuid tekkivate antikehade viirust neutraliseeriv toime on nõrk. Ümbriseproteiinid E1 ja E2 on omavahel seotud kovalentse disulfiidsidemega. E1 indutseerib antikehade sünteesi nõrgalt. E2 on aga väga tugeva antigeensusega ja vallandab peremeesorganismis viirust neutraliseerivate antikehade produktsiooni. E2 kodeeriv geenipiirkond sisaldab hüpervariaablit lõiku, mis võimaldab viirusel pidevalt uuendada oma ümbrise peamise antigeeni aminohappelist koostist. See peegeldab ühtlasi immuunsüsteemi selektiivset survet antud tunnusele.

Virioni kapsiidiproteiiniks on p14 (C), mille ainsaks ülesandeks on RNA sisepakkimine virioni moodustumisel. C praktiliselt ei indutseeri infitseeritud loomadel antikehade sünteesi.

VVDV mittestruktuursetest proteiinidest on tähelepanuväärseim p125 (NS23), mis on vältimatult vajalik viiruse paljunemiseks, kuid mille roll viiruse replikatsiooni protsessis ei ole täielikult selge. Üheks NS23 ülesandeks arvatakse olevat fikseerida viiruse replikatsiooni kompleks rakus selleks sobivas kohas. Samuti on selles eristatavad proteaasi ja helikaasi omadustega domäänid. Nimetatud ensüümidel arvatakse olevat kandev roll viiruse RNA replikatsioonil.

NS23 vastu tekib tugev antikeha reaktsioon loomulikult nakatunud või elusvaktsiiniga vaksineeritud loomadel. Surmatud vaktsiiniga vaksineeritud loomadel antikehi NS23 vastu ei teki.

VVDV NS23 kodeeriva genoomipiirkonna nukleotiidide järjestus on väga sarnane teiste flaviviiruste sama piirkonna järjestustega. Ometigi kodeerib nimetatud piirkond viimastel ühe asemel kahe erineva polüpeptiidi (NS2 ja NS3) sünteesi. Ka pestiviirustele iseloomulik NS23 koosneb kahest keemilistelt omadustelt erinevast osast – NS2-st ja NS3-st. Eraldi on need aga avaldunud vaid tsütopatogeensete VVDV tüvedega infitseeritud rakkudes, kus NS2 ja NS3 esinevad kõrvuti NS23-ga. NS2 (p54) ja NS3 (p80) on tsütopatogeensetes VVDV tüvedes asetleidva NS23 autoproteolüüsi produktid. NS23 lõhestumise kutsub esile kas peremeesrakkudest pärineva geneetiliste elementide insertioon NS23 kodeerivasse piirkonda või teatud geenilõigu duplikatsioon samas piirkonnas. Selle tulemusena tekkivatest polüpeptiididest on enam uuritud NS3-e (p80) omadusi, kuna see on tsütopatogeensete viirusetüvedega alati kaasnev peptiid, mille alusel on võimalik neid biokeemiliselt eristada mittetsütopatogeensetest tüvedest. Seega

on tegemist tsütopatogeensete viirusetüvede antigeense markeriga. NS3 sisaldab eelpool nimetatud proteaasi ja helikaasi domääne ning on kõige enam konserveerunud proteiin pestiviiruste perekonnas (pestiviiruste perekonna erinevate viiruste NS23-e vastu produtseeritud antikehad ristreageerivad sama perekonna viiruste NS23-dega). See polipeptiid on väga stabiilne nakatunud rakkudes ja väga immunogeenne peremeesorganismis.

Et NS3 esineb vaid tsütopatogeensete VVDV tüvede paljunemisel rakkudes, siis on ilmne, et temas sisalduvad ensüümid, proteaas ja helikaas põhjustavad otseselt või kaudselt rakkude hävimist. Selle protsessi biokeemiline mehhanism on aga siiani ebaselge.

NS2-te (p54) leitakse samuti ainult tsütopatogeensetes VVDV tüvedes, kuid seda mitte alati. See proteiin on eri tüvedel varieeruvate mõõtmetega, mis sõltub autolüüsi mehhanismist (insertsioon või duplikatsioon). See on madala immunogeensusega polipeptiid, mis ei indutseeri antikehade teket nakatunud veistel.

Lisaks nimetatud mittestruktuursetele proteiinidele on VVDV-l eristatavad veel neli mittestruktuurset proteiini (NS4A, NS4B, NS5A, NS5B), mille omadustest on aga vähe informatsiooni. Samuti ei ole nad olulised immuunuse seisukohast, kuna ei indutseeri veistel antikehade sünteesi (Donis, 1995).

VVDV üks omapärasid on eelpool kirjeldatud kahe, rakkultuuridele erinevalt toimiva viirusetüübi (biotüübi) eksisteerimine. Need on rakkultuure hävitavad (tsütopatogeensed – TP) tüved ja tüved, mis rakkude kasvu ja arengut nähtavalt ei häiri (mitte-tsütopatogeensed – MTP tüved). TP VVDV tüved tekivad MTP VVDV-ga püsiinfitseeritud (PI) loomade organismis (Greiser-Wilke jt, 1993). Seda protsessi on kirjeldatud eespool. Antigeensetelt omadustelt on MTP ja TP viirusetüved väga sarnased (Howard jt, 1987). Neid eristab vaid proteiini NS3 esinemine TP biotüübil. Kuigi TP viirusetüvi põhjustab PI-loomal mukooshaiguse väljakujunemist, ei erine homoloogsed TP ja MTP tüved teineteisest virulentsuse poolest immuunkompetentsete loomade suhtes (Jewett jt, 1990).

Seevastu on erinevad VVDV tüved sageli erineva virulentsusega (Bolin, Ridpath, 1992). Üldjuhul ei ole VVDV immuunkompetentsetele loomadele väga virulentne, põhjustades karjas kiiresti leviva infektsiooni taustal (nimetatakse akuutseks infektsiooniks vastandina püsiinfektsioonile) vaid kergeid kliinilisi sümptomeid (üldnähud, diarröa, lehmadel piimatoodangu langus). VVDV infektsiooniga kaasnev immuunsupressioon võib põhjustada mõnede teiste infektsioonide ägedamat kulgu, mille tõttu on täheldatud ka respiratoorseid haigusnähtumeid akuutse VVDV infektsiooni korral (Baker, 1990). Harvadel juhtudel kaasneb akuutse infektsiooniga raskekujuline haigestumine ja suur suremus (Hibberd jt, 1993). Selle põhjuseks on VVDV viirusetüved, mis geneetiliselt ja fenotüübiliselt erinevad tüüpilistest mäletsejate pestiviirustest. Nimetatud viirusetüved moodustavad eraldiseisva viirusetüvede rühma, mida nimetatakse tüüp-2 VVDV-ks (Pellerin jt, 1994; Ridpath jt, 1994).

VVDV on antigeenselt väga varieeruv, mistõttu tüvesid ei ole võimalik rühmitada kindlatesse serotüüpidesse. Küll aga on võimalik eristada tüvesid antigeensete erinevuste alusel. Viirusetüvede antigeensete erinevuste demonstreerimiseks kasutatakse viiruse ristneutralisatsiooni meetodit või erinevate monokloonsete antikehade (MAK) reageerivuse määramist viiruse antigeenidega. Viimasel juhul saadakse viirusetüve nn MAK muster (Xue jt, 1990). MAK mustri alusel on võimalik selgitada tüvede fülogeneetilist sugulust ning määratleda nende genotüübiline kuuluvus (tüüp-1 või tüüp-2 VVDV) (Corapi jt, 1990; Paton jt, 1991).

VVDV antigeenne varieeruvus omab tähtsust nii haiguse diagnostika kui tõrje seisukohast. Näiteks on selgunud, et viiruse antigeeni määramiseks mõeldud ELISA testidega, milles kasutatakse monokloonseid antikehi, ei ole võimalik tuvastada kõiki viirusetüvesid (Brown jt, 1997). Samuti võib viiruse neutralisatsiooni reaktsioonis kasutatav viirusetüvi olla halvasti neutraliseeritav loomal esinevate antikehade poolt, kui teda infitseeriv viirus antigeensetelt omadustelt sellest palju erineb. Ka antikehade tiiter viiruse neutralisatsiooni reaktsioonis sõltub oluliselt reaktsioonis kasutatavast viirusetüvest.

Erinevate viiruste poolt indutseeritud antikehade erinev neutraliseeriv toime viirusetüvedesse *in vitro* on püstitanud küsimuse ühel viirusetüvel põhinevate vaktsiinide protektiivsusest (Bolin jt, 1991)

Käesoleva uurimuse eesmärgiks oli selgitada VVDV antigeenset varieeruvust Eestis, viiruse eri biotüüpide ja antigeensete variantide esinemust ning nende osa erineva sümptomaatika kujunemisel infitseeritud karjades.

Võtmesõnad: veiste viirusdiarröa viirus, VVDV, antigeenne varieeruvus, monokloonsete antikehad.

Materjal ja meetodika

Viirusetüved

Uuringus tüpiseeriti 15 kohalikku viirustüve, mis pärinesid seitsmest karjast. Lisaks isoleeriti viirus kahelt imporditud mullikalt ning võrdluseks kasutati kahte viiruse referentstüve: NADL-i, mis on Põhja-Ameerika päritolu tsütopatogeenne tüüp-1 VVDV standardtüvi, ning W-8-t, mis on Suurbritannia päritolu tüüp-2 VVDV tüvi. Seega viidi läbi kokku 17 VVDV tüve antigeenne tüpiseerimine.

Karjas nr 1 isoleeriti 1996. aastal VVDV viielt püsiinfitseeritud noorloomalt, kellel ei täheldatud muid haigustunnuseid kui mahajäämus kasvus võrreldes eakaaslastega (keskmiselt 50 kg aastas). Üks VVDV tüvi isoleeriti 1999. aastal kliiniliselt tervelt püsiinfitseeritud noorloomalt.

Üks VVDV tüvi isoleeriti 2000. aastal lõppenud noorloomade kopsust, kellel oli kliiniliselt diagnoositud kopsupõletik.

Karjas nr 2 isoleeriti VVDV 1998. aastal ühelt noorloomalt, kes hilisemal uurimisel osutus seropositiivseks, mis tähendab, et viirus isoleeriti mööduva vireemia faasis ning tegemist ei olnud PI-loomaga.

Kliiniliselt ilmes noorkarja hulgas kängumist. Muid olulisi tervise probleeme uurimisperioodi vältel ei täheldatud.

Karjas nr 3 isoleeriti viirus 2000. aastal kliiniliselt tervelt püsiinfitseeritud noorloomalt. 3 kuud pärast nimetatud looma toomist karja aborteeris järjestikku kaks lehma, mõlemad umbes 7. tiinuskuul. Karjas oli kokku 10 lehma.

Karjas nr 4 isoleeriti viirus 1996. aastal püsiinfitseeritud noorloomalt, kellel mingeid haiguse tunnuseid ei täheldatud. Karjas esines sigimisega seotud probleeme. 1700 lehma kohta registreeriti uurimise aastal 70 aborti ja 107 surnultsündi. Lisaks sündis 6 väärarenditega vasikat, kellest viiel olid VVDV infektsioonile iseloomulikud muutused: silmakahjustus, jäsemete väärarendud. Muudest terviseprobleemidest tulevad esile noorloomade kängumine ning diarröa 3–12 kuu vanuste mullikate hulgas.

Karjas nr 5 isoleeriti viirus 1999. aastal kliiniliselt tervelt, kuid püsiinfitseeritud noorloomalt. Karjas oli probleemiks 1–3-kuuste vasikate diarröa.

Karjas nr 6 isoleeriti viirus 2000. aastal kliiniliselt tervelt püsiinfitseeritud noorloomalt. Omanik ei täheldanud karjas erilisi terviseprobleeme.

Karjas nr 7. isoleeriti viirus 1998. aastal kahelt Hollandist imporditud tiinelt mullikalt, kellest üks osutus püsiinfitseerituks ja teine akuutselt infitseerituks, kes ilmselt oli nakkuse saanud transpordi ajal nimetatud PI-loomalt. Mõlemad loomad olid kliiniliselt terved. PI looma vasikas sündis surnult ja loom ise praagiti hiljem madala toodangu tõttu. 1999. aastal isoleeriti viirus eelnimetatud akuutselt infitseerunud mullika järglaselt. Vasikas osutus püsiinfitseerituks ja ta praagiti madala kasvuiibe tõttu.

Viiruse isoleerimine

Viirus isoleeriti loomade vereseerumist või plasmast ning ühel juhul organmaterjalist. Selleks nakatati MDBK (*Madin-Darby Bovine Kidney*) rakuliin või primaarne rakukultuur. Viimane valmistati veise loote ninakarbike limaskestast. Rakukultuuride kasvusöötmes kasutati hobuseseerumit, vältimaks nende nakatumist turustatavas veise looteseerumis sageli leiduva VVDV-ga. Kasvusöötme koostis oli järgmine:

- 1) MEM Earle'i sooladega ja sööde Leibowitz-15, segatuna võrdsetes osades – 91%,
- 2) asendatavate aminohapetega rikastatud 100-kordse kontsentratsiooniga MEM lahus – 1%,
- 3) L-glutamiini 200 mM lahus – 1%,
- 4) hobuseseerum – 5%,
- 5) penitsilliini ja streptomütsiini lahus (penitsilliini-Na-sool 10 000 RÜ/ml; streptomütsiini 20 mg/ml) – 2%.

Viiruse isoleerimiseks inokuleeriti uuritav materjal 15 ml rakususpensiooni 25 cm²-ses plastikust raku-madratsis. Rakususpensiooni tihedus oli ligikaudu 400 000 rakku ml-s. Vereseerumi või plasma puhul inokuleeriti 200 µl uurimismaterjali otse rakususpensiooni, organmaterjali puhul inokuleeriti 200 µl 10% raku-kultuuri kasvusöötmes valmistatud koesususpensiooni. Nakatatud rakukultuuri inkubeeriti +37 °C juures CO₂ keskkonnas 5 ööpäeva. Iga isoleerimiskatse puhul inkubeeriti koos nakatatud rakumadratsitega negatiivse kontrollina nakatamata rakumadratsit veendumaks, et nakatamiseks kasutatud rakukultuur ei ole kontamineerunud VVDV-ga. Iga 24 tunni järel vaadeldi rakkude monokihti tsütopaatilise efekti tuvastamiseks. Viiendal inkubeerimise päeval tehti esimene viiruse passaaž. Selleks lõhustati rakud nende külmutamise ja kiire sulatamisega ning saadud supernatanti (1 ml) kasutati uue koguse rakususpensiooni nakatamiseks. Ühtlasi määrati VVDV sisaldumine esimese inkubeerimise järgselt saadud rakukultuuri supernatandis immunoperoksüdaasi testiga. Kõiki viirusetüvesid paljundati vähemalt kolmes passaažis, selgitamaks neil tsütopatogeensete omaduste esinemist või puudumist. Isoleeritud viirusetüvesid säilitati edasise uurimiseni –20 või –70 °C juures. Tüüpiseerimiseks kasutati esimeses või teises passaažis kogutud viirust, vältimaks mutatsioonidest tingitud muutusi antigeensetes omadustes.

Monokloonsed antikehad

Monokloonsete antikehade komplekt viirustüvede antigeenseks iseloomustamiseks pärines Inglismaa Veterinaaria Kesklaboratooriumist (*Central Veterinary Laboratory, Weybridge UK*). Komplekt sisaldab 8 antikeha ja võimaldab kindlaks määrata mäletsejaliste pestiviiruste tüübikuuluvuse (tüüp-1 VVDV, tüüp-2 VVDV e atüüpiline VVDV, Borderi haiguse viirus – BDV) ning antigeenseid erinevusi. Tabel 1 annab ülevaate monokloonsete antikehade reageerivusest viiruste ja nende antigeenidega.

Monokloonsete antikehade reageerivus viirustega tehti kindlaks mikroperoksüdaasi testiga, milleks kasutati hiire Ig vastu suunatud peroksüdaasiga konjugeeritud antikehi.

Tabel 1. Uurimuses kasutatud monokloonsete antikehade reageerivus pestiviiruste antigeenidega
Table 1. The protein and strain specificity of the panel of monoclonal antibodies used in the study

Monokloonne antikeha tähis <i>ID of the Mab</i>	Proteiini-spetsiifilisus <i>Protein specificity</i>	Reageerivus pestiviirustega <i>Strain specificity</i>
WB103/105	NS3	Kõik pestiviirused <i>All pestiviruses</i>
WB162	E2	Tüüp-1 VVDV <i>Type 1 BVDV</i>
WB210	E0	
WB215	E2	
WS433	E0	Tüüp-2 VVDV
WS538	E2	<i>Type-2 BVDV</i>
WB160	NS3	Tüüp-1 VVDV ja Borderi haiguse viirus <i>Type 1 BVDV and Border disease virus</i>
WS363	...	Borderi haiguse viirus <i>Border disease virus</i>

... – andmed puuduvad (*unknown*)

Mikroperoksüdaasi test

Mikroperoksüdaasi test viidi läbi mikromeetodil 96 auguga rakukultuuri kasvatamise mikroplaadil. Viiruse paljundamiseks mikroplaadil kasutati MDBK rakuliini, mida kasvatati eelkirjeldatud söötmes. Rakuspensioon nakatati viirusega mikroplaadi aukudes. Igasse mikroplaadi auku kanti 185 µl rakuspensiooni tihedusega umbes 100 000 rakku ml-s. Sellele lisati 15 µl viirust sisaldavat rakukultuuri supernatanti.

Iga monokloonne antikeha reageerivuse selgitamiseks nakatati rakukultuur sama viirusega kolmes paralleelses augus ning samas reas kahes augus olev rakk jäeti nakatamata (negatiivne kontroll). Mikroplaati inkubeeriti 37 °C juures CO₂ keskkonnas. Mittetsütopaatiliste tüvede korral määrati reageerivus monokloonsete antikehadega 72-tunnise inkubeerimise järel, tsütopaatiliste tüvede reageerivus määrati 48-tunnise inkubeerimise järel.

Peroksüdaasi test viidi läbi järgmiselt: rakud koos neis sisalduva viirusega fikseeriti plaadile 20% atsetooni lahusega. Pärast pesulahusega pesemist lisati monokloonsed antikehad lahjenduses 1:100 ja inkubeeriti 25 °C juures 15 minutit. Pärast järjekordset pesemisetappi lisati peroksüdaas-konjugaat lahjenduses 1:100 ja inkubeeriti 25 °C juures 10 minutit. Pärast pesemist lisati värskest valmistatud substraadi (H₂O₂) ja kromogeeni (amino-etiül-karbosool) lahus ning inkubeeriti 25 °C juures 15–30 minutit. Kui visuaalselt hinnates oli värvustumise intensiivsus saavutanud vajaliku taseme (tavaliselt 10–20 minutit), tühjendati plaat ja lisati pesulahust reaktsiooni peatamiseks. Tulemusi hinnati mikroskoopimisel 400-kordse suurendusega.

Tulemused

Isoleeritud 15 viirustüvest osutus tsütopatogeenseks üks (VTL-08-1.7). Ühtlasi saab loomal, kellel tsütopatogeenne viirus avastati, lugeda diagnoosituks mukooshaiguse. Nimelt on VVD viiruse transformeerumine tsütopatogeenseks viiruseks püsiinfitseeritud looma organismis mukooshaiguse tekkepõhjuseks. Kuigi kõnealusel hukkunud loomal domineerisid kliiniliselt kopsupõletiku nähud, kinnitab virooloogilise uuringu leid mukooshaiguse esinemist.

Tabelis 2 on toodud 8 monokloonne antikeha reageerivus viirustüvede struktuursete ja mittestruktuursete antigeenidega. Tabeli täidetud lahtrid tähistavad positiivseid reaktsioone immunoperoksüdaasi testis. Lahtri tähistus iseloomustab reaktsiooni tugevust. Must lahter tähistab rakukihi sajabrotsendilist värvustumist, topelt viirutus tähistab 50–90-protsendilist rakukihi värvustumist, ühekordne viirutus aga vähem kui 50-protsendilist rakkude värvustumist rakukihis.

Järjekorras esimene, kahe monokloonne antikeha segu (Mab103/105), reageerib kõikide seni tuntud pestiviirustega ning tüpiseerimise katse loeti õnnestunuks vaid juhul, kui rakukiht oli sellega töötlemisel värvustunud. Seega on selle näol tegemist katse positiivse kontrolliga.

MAK nr 8 (WS363) reageerib ainult Borderi haiguse viirustüvedega. Et WS363 ei reageeri ühegi Eesti VVDV tüvega, võib klassifitseerida kõik Eesti isolaadid VVDV-de hulka kuuluvaks.

MAK nr 7 (WB160) reageerib kõigi seni tuntud tüüp-1 VVDV ja Borderi haiguse viirustüvedega (mäletsejaliste pestiviirused) ega reageeri sigade klassikalise katku viiruse tüvedega. WB160 reageerib kõigi Eesti viirustüvedega, mis demonstreerib nende kuuluvust tüüp-1 VVDV gruppi. Tabeli 2 andmetest nähtub, et arvestades reageerivust viie nn tüübispetsiifilise monokloonne antikehaga (MAK nr 2–6) on võimalik eristada nelja erineva MAK mustriga viirustüvede gruppi. Võttes arvesse ka reaktsiooni ekstensiivsuse, on erinevaid MAK mustreid seitse.

Tabel 2. VVDV tüvede reageerivus erinevate monokloonsete antikehadega
Table 2. The Mab reactivity pattern of investigated BVDV strains

Kari nr Herd No	Tüve tähis* ID of the strain	Monokloonsed antikehad Monoclonals							
		1	2	3	4	5	6	7	8
		Mab 103/105	WB 162	WB 210	WB 215	WS 433	WS 538	WB 160	WS 363
X	NADL		■	■	■				
X	W8	■				■			
1	BVDV1/B/Est/VTL-08-1.1/1996	■		■	■				
	BVDV1/B/Est/VTL-08-1.2/1996	■		■	■				
	BVDV1/B/Est/VTL-08-1.3/1996	■		■	■				
	BVDV1/B/Est/VTL-08-1.4/1996	■		■	■				
	BVDV1/B/Est/VTL-08-1.5/1996	■		■	■				
	BVDV1/B/Est/VTL-08-1.6/1999	■		■	■				
	BVDV1CP/B/Est/VTL-08-1.7/2000	■		■	■				
2	BVDV1/B/Est/VTL-12-1/1998	■		■	■	■			
3	BVDV1/B/Est/VTL-12-2/2000	■	■	■	■	■			
4	BVDV1/B/Est/VTL-05-1/1996	■		■	■				
5	BVDV1/B/Est/VTL-05-2/1999	■		■	■				
6	BVDV1/B/Est/VTL-11-1/2000	■		■	■				
7	BVDV1/B/Est-Hol/VTL-04-1.1/1998	■		■	■	■			
	BVDV1/B/Est-Hol/VTL-04-1.2/1998	■		■	■	■			
	BVDV1/B/Est-Hol/VTL-04-1.3/1999	■		■	■	■			

* Eesti tüve tähis koosneb järgmistest komponentidest: viiruse genotüüp, biotüüp/päritoluriik/tüve valdaja (labor)-loomade asukoht (maakond)-isolaadi järjenumber maakonnas (kui ühest karjast mitu, siis karja järjenumber ja isolaadi järjenumber antud karjas)/isoleerimise aasta

Tähelepanuväärne on, et üks tüüp-2 VVDV spetsiifiline monokloonne antikeha (WS433) reageerib kahe Eesti loomadelt isoleeritud VVDV tüvega (VTL-12-1 ja VTL-12-2). Sama monokloonne antikeha reageerib ka imporditud mullikatel isoleeritud VVDV tüvedega (VTL-04-1.1 – VTL-04-1.3). Et tegemist on seni kirjeldamata reageerivusega antud MAK puhul, siis seda kontrolliti korduvates katsetes ning kasutades kahte erinevat MAK WS433 partiid. Reaktsioon tekkis kõikidel juhtudel.

MAK nr 2 (WB162) reageeris vaid ühe VVDV eesti tüvega (VTL-12.2). Tegemist on tüüp-1 VVDV spetsiifilise MAK-ga, mis on varieeruva reageerivusega VVDV tüvede suhtes.

Tüvi VTL-11-1-ga reageeris vaid üks tüübispetsiifiline Mak (WB210), mis näitab, et tegemist on väga eripärase viirustüvega. Tüvi pärineb Saaremaalt ning selle erinevus Mandri-Eestis levivatest VVDV tüvedest on seletatav suhtelises isolatsioonis kulgeva viiruse evolutsiooniga.

Karjast nr 1 saadud seitsmest viiruse isolaadist kuus olid mittetsütopaatilised ja üks tsütopaatiline. Kõik tsütopaatilised tüved on identse MAK mustriga, hoolimata sellest, et nende isoleerimine on toimunud suhteliselt pika ajavahemiku vältel 1996–1999. Tsütopaatilise viirustüve MAK muster erineb mittetsütopaatiliste tüvede MAK mustrist reaktsiooni ekstsensivsuse poolest kahe MAK puhul (WB210 ja WB215). Selle põhjuseks on ilmselt asjaolu, et viirustüve transformatsioon tsütopatogeenseks viiruseks muudab mõnevõrra viiruse poolt indutseeritud valkude koosseisu rakus (vt eespool), mistõttu võib muutuda ka reaktiivsus MAK-dega ning ilmselt ei ole tegemist uue viirustüve sissetungiga karja.

Vaid kahest karjast pärinevad viirustüved on identse MAK mustriga. Need on kari 4 ja 5, mis geograafiliselt asuvad lähestikku, mistõttu sama viirustüve esindatus neis on ka tõenäoline.

Arutelu

VVDV tüvede geneetiline ja antigeenne varieeruvus on üldtuntud tõsiasia ja ühine tunnus paljudele RNA viirustele. VVDV antigeense varieeruvuse uurimine on oluline VVDV infektsiooni epizootoloogiliste iseärasuste selgitamiseks. Senini on selgusetu, kuidas on infektsiooni erinev kliiniline manifestatsioon seotud teatud viiruse tüüpidega. Seni tüpiseeritud mäletsejaliste pestiviirused grupeeruvad nii antigeensete omaduste kui DNA homoloogia alusel kolme rühma: tüüp-1 VVDV, Borderi haiguse viirus ja atüüpiline e tüüp-2 VVDV. Siiski ei välista see rohkemate gruppide olemasolu ning vastavasisuliste uurimiste ülesandeks on nimetatud küsimustele vastuseid leida.

Käesoleva uurimuse tulemused tõendavad VVDV tüvede suurt antigeenset varieeruvust ka Eestis. Siin isoleeritud viirustüved olid selgelt karjaspetsiifilised. VVDV isoleeriti seitsmest karjast ja esindatud oli seitse erinevat MAK mustrit. Vaid kahes karjas (nr 4 ja 5) olid esindatud täpselt ühesuguse MAK mustriga viiruse isolaadid. Karjad, kust viirustüved isoleeriti, asetsesid üksteisest geograafiliselt suhteliselt eraldatult (kaks Järva ja Tartu, üks Põlva, Saare ja Jõgeva maakonnas), seetõttu võib karjaspetsiifilisust pidada loomulikuks.

Huvipakkuv oli asjaolu, et kaks 12-st Eesti viirustüvest ja Hollandist imporditud mullikatelt isoleeritud viirustüvi reageerisid tüüp-2 VVDV spetsiifiliste antikehadega. Patoni jt (1991) läbiiviidud ulatuslikus uurimises, milles uuriti mitmelt poolt maailmast pärinevate viirustüvede antigeenset varieeruvust, kasutades samu monokloonseid antikehi, ei reageerinud ükski tüüp-1 VVDV tüvi MAK-ga nr 5 (WS433), mistõttu loeti see tüüp-2 VVDV spetsiifiliseks. Käesoleva uurimuse tulemustest selgub aga, et nimetatud antikeha ei ole sajabrot-sendilisel tüüp-2 spetsiifiline või on antud tüvede puhul tegemist seni kirjeldamata viiruste genogrupiga. Viimasele küsimusele annab vastuse viirustüvede RNA nukleotiidide järjestuse määramine ja tüvede genotüüpiseerimine selle alusel. Et kirjeldatud MAK WS433 jaoks tavatu reageerivus esineb geograafiliselt päritolult kaugete tüvede suhtes, võib järeldada, et tegemist ei ole vaid lokaalse nähtusega ja selliseid viirustüvesid esineb Euroopas rohkem.

Lisaks sellele, et isoleeritud viirused osutusid karjaspetsiifiliseks, oli suhteliselt spetsiifiline ka karjades esinenud sümptokompleks. Kuigi võrdlusmaterjali hulk jäi väikeseks, võib kogutud kliiniliste andmete alusel väita, et karjades levivate viirustüvede virulentsus on erinev. Kui karjades nr 1, 3, 4 ja 5 esines loomadel selgelt väljendunud VVDV infektsioonile iseloomulik haigestumus, siis ülejäänud karjades seda ei täheldatud. Tõsiasi, et Eestisse imporditi üks VVDV-ga püsiinfitseeritud noorloom, näitab, et selline loom võib kliiniliselt olla täiesti terve ja viiruse patogeenne toime võib avalduda alles hilisemas elujärgus. Antud looma järglane hukkus looteeas, tema toodanguvõime osutus väga madalaks ning ta praagiti karjast enne esimese laktatsiooni lõppu. Kirjeldatud elukäik on väga tüüpiline VVDV PI-loomadele, kes arenevad noorloomana väliselt normaalselt, kes tiinestatakse ja tuuakse lüpsikarja, kuid kellest enamik praagitakse kiiresti madala toodangu, ahtruse või haiguste tõttu.

Epizootoloogilise protsessi kulg karjas 1 demonstreerib ilmekalt, et VVDV infektsioon võib jääda karja püsima väga pikaks ajaks, kusjuures selleks ei ole vajalik uute nakkusallikate karja toomine. Antud karja puhul tuvastati VVDV püsiinfitseeritud loomad juba 1994. aastal (Viltrop jt, 1996).

Kokkuvõte

1. Kõik kirjeldatud uurimistöö käigus Eesti veistelt isoleeritud VVDV tüved kuuluvad ilmselt tüüp-1 VVDV gruppi, kuna reageerivad tüüp-1 spetsiifiliste MAK-dega.
2. Üks tüüp-2 VVDV spetsiifilistest MAK-dest (WS 433) reageerib kahe Eestist ja ühe Hollandist pärineva viirustüvega, millest ilmneb, et antud MAK tüüp-2 VVDV spetsiifilisus ei ole absoluutne.
3. Eestist isoleeritud VVDV tüvesid iseloomustab suur antigeenne varieeruvus. Tüved on karjaspetsiifilised.
4. Vaatamata nappidele võrdlusandmetele ilmneb, et Eesti VVDV tüved erinevad ka virulentsuse poolest. Mitte kõikides karjades ei täheldatud VVDV infektsioonile iseloomulikku haigestumist, samuti erines infektsiooni kliiniline manifesteerumine karjades, kus kliinilist haigestumist täheldati.

Kirjandus

- Baker, J. C. Clinical aspects of bovine virus diarrhoea virus infection. – Rev. sci. tech. Off. int. Epiz., 9, p. 25...41, 1990.
- Bolin, S. R., Littledike, E. T., Ridpath, J. F. Serologic detection and practical consequences of antigenic diversity among bovine viral diarrhoea viruses in a vaccinated herd. – American-journal-of-veterinary-research (USA). Jul 1991, v. 52(7) p. 1033...1037.
- Bolin, S. R., Ridpath, J. F. Differences in virulence between two noncytopathic bovine viral diarrhoea viruses in calves. – American-journal-of-veterinary-research (USA). Nov 1992, v. 53(11) p. 2157...2163.
- Brown, L., Elliot, A., Shannon, A. Commercial BVDV antigen-detection ELISA-s: A cautionary tale, European symposium on control of BVD-virus infection in cattle, Lillehammer, Sept, 3–5, '97. Abstracts. p. 50, 1997.
- Corapi, W. V., Donis, R. O., Dubovi, E. J. Characterization of a panel of monoclonal antibodies and their use in the study of the antigenic diversity of bovine viral diarrhoea virus. – American-journal-of-veterinary-research. v. 51(9) p. 1388...1394, 1990.
- Donis, R. O. Molecular biology of bovine viral diarrhoea virus and its interactions with the host. The Veterinary Clinics of North America, Food Animal Practice, 11, No. 3, p. 521...547, 1995.
- Greiser-Wilke, I., Haas, L., Dittmar, K., Liess, B., Moening, V. RNA Insertions and Gene Duplications in the Nonstructural Protein p 125 Region of Pestivirus Strains and Isolates in Vitro and in Vivo. Virology, 193, p. 977...980, 1993.

- Hibberd, R. C., Turkington, A., Brownlie, J. Fatal bovine viral diarrhoea virus infection of adult cattle. *The Veterinary Record*, p. 227...228, 1993.
- Howard, C. J., Brownlie, J., Clarke, M. C. Comparison by the neutralisation assay of pairs of non-cytopathogenic and cytopathogenic strains of bovine virus diarrhoea virus isolated from cases of mucosal disease. *Vet. Microbiol.*, 13, p. 361...369, 1987.
- Jewett, C. J., Kelling, C. L., Frey, M. L., Doster, A. R. Comparative pathogenicity of selected bovine viral diarrhoea virus isolates in gnotobiotic lambs. *American journal of veterinary research (USA)*, v. 51(10) p. 1640...1644, 1990.
- Paton, D. J., Sands, J. J., Roehe, P. M. BVD monoclonal antibodies: relationship between viral protein specificity and viral strain specificity. *Arch. Viral. Suppl.* 3, p. 47...54, 1991.
- Pellerin, C., Hurk, J. van den; Locomte, J., Tussen, P. Identification of a new group of bovine viral diarrhoea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. *Virology*, v. 203(2) p. 260...268, 1994.
- Ridpath, J. F., Bolin, S. R., Dubovi, E. Segregation of Bovine Viral Diarrhoea Virus into genotypes, *Virology*, 205, p. 66, 1994.
- Viltrop, A., Alaots, J. Laht, T., Ronsholt, L. The seroepidemiological survey on the spread of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in Estonian cattle herds. – *Estonian Veterinary Review. Supplemental – Acta Veterinaria Baltica*. Tartu, 1996, lk 3...7.
- Xue, W., Blecha, F., Minocha, H. C. Antigenic variations in bovine viral diarrhoea viruses detected by monoclonal antibodies. – *Journal-of-clinical-microbiology (USA)*. Aug 1990, v. 28(8) p. 1688...1693.
- Uurimistööd finantseeris Eesti Teadusfond (ETF grant 1986, 3684).

Phenotypic Characterisation of Some BVDV Strains from Estonia

A. Viltrop, J. Alaots, M. Pärn, K. Must

Summary

14 strains of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) 12 of which were originating from Estonian cattle and 2 from heifers imported from Western Europe, were characterised using a panel of monoclonal antibodies (Mab). The panel of Mab-s consisted of seven group or type specific Mab-s and one pool of two Mab-s having panpestivirus reactivity (see table 1). The panel was obtained from the Central Veterinary Laboratory in Weybridge, UK.

Virus strains, originating from animals of 7 different cattle herds, were collected after first or second passage in MDBK cell-line and were investigated for their reactivity with Mab-s using a microperoxydase test. The reactivity of Mab with the virus strain was registered in three categories according to the extent of colour reaction on the cell monolayer. The following categories were established: 100% staining of the monolayer, 50–90% of cells stained, less than 50% of cells stained. The reactivity of each Mab was tested in three parallels in every experiment. With non-cytopathogenic strains the cell-monolayer was fixed and the reactivity with Mabs established, after 72-h incubation. With cytopathogenic strain this was done after 48-h incubation.

6 different patterns of Mab reactivity among Estonian BVDV strains was established, when the three categories of Mab reactivity were taken into account. The strains appear to be highly herd specific. Only the strains of two herds have exactly the same Mab pattern (see table 2). All other herds have the BVDV Mab pattern specific only to that herd.

Interestingly, one of the Mabs, considered to be BVDV type-2 specific (WS433), has given reaction with two type-1 BVDV strains from Estonia and the Western-European strain. Apparently the specificity of this Mab is not 100% type-2 BVDV. One strain, originating from island Saaremaa, gave reaction only with one type specific Mab (WB210), being apparently most distinct from other Estonian BVDV strains. The seven virus strains isolated from animals of one herd had the same Mab pattern although the isolates were collected over long time period (1996–2000). This indicates that the same virus strain can persist in the herd during a long time period and new introductions of the virus are not necessary to keep the virus circulating in the herd.