

MÕNEDE VVD-VIIRUSE EESTI TÜVEDE GENOTÜPISEERIMINE JA INFEKTSIOONI MOLEKULAAREPIDEMIOLOOGIA EESTIS

A. Viltrop, J. Alaots, S. Põldma, J. Parik, M. Pärn, K. Must

ABSTRACT. *Genetic typing of some BVDV strains from Estonia and molecular epidemiology of the infection.* The report describes the results of the genetic typing of the Estonian BVDV strains on the bases of polymorphism of the 5' untranslated region (UTR) of the virus genome. 11 virus strains originating from four administrative districts of Estonia were genetically typed. The phylogenetic analysis of Estonian strains together with foreign strains was performed and the genotype of Estonian BVDV strains was established.

All the Estonian BVDV isolates investigated in the present study appear to belong to the BVDV genotype 1 and are closely related to Western-European strains: 9 of the strains could be classified as BVDV genotype 1b (the sequence homology with strain Osloss >93%). Two Estonian strains were distinct from the rest of Estonian strains having sequence homology less than 90% with other strains. These two strains could be classified as BVDV genotype 1f when compared to strains of different BVDV genotypes.

The Estonian BVDV strains are highly herd-specific. Only in two herds identical virus strains were discovered. In one herd the introduction of a new virus strain could be identified as the isolates dating back to 1995 were clearly distinct from isolates of 1999 and 2000.

Keywords: Bovine viral diarrhoea virus, BVDV, genotypes, 5' untranslated region, molecular epidemiology.

Sissejuhatus

Flaviviridae sugukonna *Pestivirus* perekonna viirusi, mille hulka kuulub ka veiste viirusdiarröa viirus (VVDV), iseloomustab väga suur antigeenne varieeruvus, mille tõttu eksisteerib sama liigi piires palju antigeenidelt erinevaid viirustüvesid. Viiruste antigeensete omaduste muutuste aluseks on ümberkorraldused viiruse genotüübis.

VVDV on RNA-viirus, mille virion koosneb üheaheelalisest RNA molekulist, mis on ümbritsetud kapsiidiga, mida omakorda katab lipoproteiidkest e ümbris. Virioni RNA molekulis, millesse on kätketud viiruse kogu geneetiline informatsioon, on üks avatud kodeeriv piirkond (*open reading frame* – ORF), mille otstes on suhteliselt pikad mittekodeerivad piirkonnad (*untranslated region* – UTR) – vastavalt 5'UTR ja 3'UTR. VVDV genoom sisaldab kogu vajalikku geneetilist informatsiooni viiruse paljunemiseks, kaasa arvatud RNA replikaasi geen (Dubovi, 1994; Donis, 1995).

VVDV genoomis on 12 308 nukleotiidi (Nt). Genoomi ORF sisaldab 3898 koodonit ja algab 386. nukleotiidist (Collett jt, 1988). ORF-ile eelnevas 385 Nt pikkuses 5'UTR-s on ribosoomiga seondumise piirkond translatsiooni algatamiseks ning lookus, mis moduleerib nii translatsiooni kui ka viiruse RNA replikatsiooni (Poole jt, 1995; Yu jt, 2000). Ka 3'UTR, mille pikkus on 226 Nt-d, on seotud RNA replikatsiooniga, sisaldades lookust replikaasi seondumiseks.

VVDV ORF-ilt transleeritakse esmalt üks ebastabiilne viiruse polüproteiin, mis viiruse ja raku endoproteinaaside toimel lõhustatakse vähemalt 12-ks erineva funktsiooniga struktuurseks ja mittestruktuurseks viiruse proteiiniks (Collett jt, 1988; Elbers jt, 1996).

VVD-viiruse, nagu ka kõigi teiste pestiviiruste genoomis on eristatavad erineva mutatsioonisagedusega genoomiosad, nn hüpermutantsed ja konserveerunud piirkonnad. Hüpermutantseks piirkonnaks VVD-viiruse genoomis on näiteks viiruse peamist kapsliproteiini gp53/E2 kodeeriv geen. Seetõttu on ühede viirustüvede poolt indutseeritavate antikehade neutraliseeriv toime teistesse viirustüvedesse erinev, olles tugevam geneetiliselt lähedasemate tüvede ja nõrgem geneetiliselt kaugemate tüvede suhtes. Samas on pestiviiruste genoomis konserveerunud lookused, kus mutatsioonisagedus on äärmiselt madal, mistõttu RNA nukleotiidide järjestuse homoloogsus antud lõikudes on perekonna eri liikide vahel suhteliselt suur, rääkimata ühe liigi eri tüvede sarnasusest (Collett jt, 1988). VVDV genoomi 5'UTR sisaldab kõige enam konserveerunud RNA lookuseid. Samas on nimetatud piirkonnas teatud lookused, kus mutatsioonisagedus on suurem ning nende alusel on võimalik määratleda tüvede erinevusi (Ridpath jt, 1994).

VVDV tüvede RNA nukleotiidijärjestuse sarnasuse alusel on need jaotatud kahte genotüüpi – VVDV genotüüp-1 ja VVDV genotüüp-2 (Pellerin jt, 1994). Ridpath jt (1994) leidsid, et sama genotüübi viirustüvede 5'UTR-i Nt-järjestuse homoloogsus on 86–93%, samas kui genotüüpidesse 1 ja 2 kuuluvate viirustüvede Nt-järjestuse homoloogsus antud piirkonnas on väiksem kui 75%. Lisaks sellele eristatakse VVDV genotüüp-1 sees alarühmi – genogruppe. Esmalt liigitati genotüüp-1 tüved kahte rühma: genotüüp-1a, millesse rühmituvad

viirustüved sarnanevad VVDV referentstüvega NADL (nn Põhja-Ameerika tüved), ning genotüüp-1b, millesse kuuluvad viirustüved sarnanevad VVDV referentstüvega Osloss (nn Euroopa tüved) (van Rijn jt, 1997). Hiljem on leitud, et genotüüp-1 tuleks jaotada enamateks alarühmadeks. Erinevad autorid pakuvad alarühmade arvuks kuni 11 (Tajima jt, 2001; Vilček jt, 2001). Nii on VVDV genotüüpe 1c ja 1d leitud Lõuna-Aafrikas, 1c Jaapanis, 1f ja 1g Saksamaal ja Austrias, 1e Prantsusmaal, 1i Inglismaal (Baule jt, 1997; Nagai jt, 2001; Tajima jt, 2001; Vilček jt 2001).

VVDV genotüüp-1 ja genotüüp-2 tüved erinevad virulentsuse poolest nii genotüübi piires kui genotüübiti (Nuttall jt, 1980; Jewett jt, 1990; Bolin, Ridpath, 1992; Toppliff, Kelling, 1998). VVDV genotüüp-2 tüvede hulgas on palju neid, mis põhjustavad veiste postnataalse nakatumise korral ägedat raskekujulist trombotsütopeenia, hemorraagilise diateesi ja lõppemisega kulgevat haigestumist (Pellerin jt, 1994; Ridpath jt, 1994).

VVDV genotüüp-2 tüvedega on sageli saastunud veise rakuliinid. Samuti on neid isoleeritud vaktsineeritud lehmade intrauteriinselt nakatunud loodetelt ja vasikatelt, kes on nakkuse saanud saastunud vaktsiinist (Ridpath jt, 1994). Tõenäoliselt on VVDV genotüüp-2 VVDV muteerunud variant, mis on tekkinud viiruse paljukordse rakukultuurides passeerimise tulemusena.

Kuigi VVDV genotüüp-1 tüved on maailmas enam levinud, on Ameerika Ühendriikides täheldatud genotüüp-2 leviku laienemist. Seda saab seostada VVDV vaktsiinide laialdase kasutamisega Põhja-Ameerikas. Sama tendentsi täheldatakse ka teistes maades, kus VVDV-vastane vaktsineerimine on levinud (Lindberg, Alenius, 1999).

VVDV suur geneetiline varieeruvus on asjaolu, mida peab arvestama VVDV-vastaste vaktsiinide väljatöötamisel. Praegusel ajal põhinevad maailmas kasutatavad VVDV-vastased elusvaktsiinid tavaliselt ühel VVDV tüvel (Anon, 2000) Inaktiveeritud vaktsiinides on kasutatud ka kahe ja enama viirustüve kombinatsiooni (Bolin, 1995; Brusckhe jt, 1999; Hamers jt, 2002). Samas ei välista tänapäeval kasutusel olevad vaktsiinid täielikult loote nakatumist. Seda esineb nii elus – kui inaktiveeritud vaktsiinide kasutamisel (van Oirschot jt, 1999). On ilmne, et selle põhjuseks on suuresti VVDV antigeenne varieeruvus (Bolin jt, 1991).

Eeltoodust tulenevalt on püsivalt aktuaalne VVDV tüvede geneetilise ja antigeense varieeruvuse uurimine. Käesoleva uurimuse eesmärkideks oli genotüüpiseerida Eestis leivad VVDV tüved ning võrrelda neid Euroopas ja mujal maailmas isoleeritud viirustüvedega ning selgitada VVDV molekulaarepidemioloogiat Eestis.

Võtmesõnad: veiste viirusdiarröa viirus, VVDV, 5' mittekodeeriv piirkond, genotüüp, molekulaarepidemioloogia.

Materjal ja meetodika

VVD viirustüved

Viirustüved, mida käesolevas töös kasutati geneetiliseks iseloomustamiseks, olid kogutud aastatel 1995–2000. Fülogeneetilisel analüüsil kasutati võrdluseks kirjanduses avaldatud andmeid mujal maailmas isoleeritud VVDV tüvede geneetilise struktuuri kohta. Tüvede RNA nukleotiidjärjestus saadi Interneti andmebaasist NCBI GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Töös kasutatud Eesti VVDV tüvede iseloomustus on esitatud tabelis 1 ning võrdluseks kasutatud välismaiseid viirustüvesid on kirjeldatud tabelis 2.

Pöördtranskriptsioon-poliümeraas-ahelreaktsioon (RT-PCR)

Viirustüvede geneetiliseks iseloomustamiseks määrati viiruse genoomi 5' mittekodeeriva (UTR) piirkonna 288 Nt-se fragmendi nukleotiidide järjestus, milleks kasutati vastavast genoomipiirkonnast pöördtranskriptsioon-poliümeraas-ahelreaktsiooni abil amplifitseeritud cDNA-d. Vastava geenipiirkonna amplifitseerimiseks kasutati Vilčeki jt (1994) poolt kirjeldatud praimerite paari [Nr 324(+); 326(-)], mille järjestused on järgmised:

Nr 324 – 5' ATG CCC T/ATA GTA GGA CTA GCA 3'

Nr 326 – 5' TCA ACT CCA TGT GCC ATG TAC 3'

Vältimaks võimalikke ristasaastumisest tekkivaid vigu, isoleeriti viiruse RNA üldjuhul otse viirust sisaldavast materjalist (vereseerum või plasma). Kahel juhul (tüved V9 ja V10) isoleeriti viirus esmalt MDBK rakuliinis ning siis viiruse RNA rakukultuuri viirust sisaldavast supernatandist.

Viiruse RNA isoleerimiseks võeti 200 µl vereseerumit, plasmat või rakukultuuri supernatanti ja töödeldi TRIZOL® reagentiga (GIBCO BRL) vastavalt tootja juhendile.

RT-PCR läbiviimisel rakendati Vilčeki jt (1994) poolt kirjeldatud ja mõnevõrra modifitseeritud tööjuhendit, kasutades *MBI Fermentas*'e (Leedu) reagente. Lühidalt oli RT-PCR läbiviimise protseduur järgmine.

Tabel 1. Genotüüpiseeritud VVD Eesti viirustüvede iseloomustus
Table 1. Description of VDDV strains from Estonia used in this study

Tähis <i>Marking</i>	Tüvi <i>ID of the strain</i>	Isoleerimise aasta/ maakond <i>Year of isolation/ county</i>	Reageerivus mono- kloonsete antiikehadega ¹ <i>Reactivity with monoclonal antibodies</i>	Märkused looma kohta <i>Remarks on origin of the isolate</i>
V1	BVDV1/B/Est/VTL-08-1.1	1995 – Põlva	WB210, WB215, WB160	PI, kängumine
V2	BVDV1/B/Est/VTL-08-1.2	1995 – Põlva	WB210, WB215, WB160	PI, kängumine
V3	BVDV1/B/Est/VTL-08-1.3	1995 – Põlva	WB210, WB215, WB160	PI, kängumine
V4	BVDV1/B/Est/VTL-08-1.6	1999 – Põlva	WB210, WB215, WB160	Vireemia (tõumüük)
V5	BVDV1/B/Est/VTL-05-2	1999 – Järva	WB210, WB215, WB160	PI
V6	BVDV1/B/Est-Hol/VTL-04-1.1	1998 – Jõgeva	WB210, WB215, WB160, WS433 ²	PI (import Hollandist)
V7	BVDV1/B/Est/VTL-11-1	2000 – Saare	WB210, WB160	PI
V8	BVDV1/B/Est/VTL-05-1	1997 – Järva	WB162, WB210, WB215, WB160, WS433 ²	PI
V9	BVDV1/B/Est/VTL-12-1	1998 – Tartu	WB210, WB215, WB160, WS433 ²	PI
V10	BVDV1CP/B/Est/VTL-08-1.7	2000 – Põlva	WB210, WB215, WB160	mukooshaigus
V11	BVDV1/B/Est/VTL-12-2	2000 – Tartu	WB162, WB210, WB160, WS433 ²	PI

¹ Vt Viltrop jt 2002 / See Viltrop et al., 2002

² VDDV tüüp 2 spetsiifiline monokloonne antiikeha / BVDV type 2 specific monoclonal antibody

Tabel 2. Välismaiste viirustüvede iseloomustus
Table 2. Description of foreign VDDV strains used in this study

Nr <i>No</i>	Tüvi <i>ID of the strain</i>	Genotüüp/grupp <i>Genotype/groupe</i>	Päritolumaa <i>Country of origin</i>	Kirjandusallikas <i>Reference</i>
1.	NADL	1a	Referentstüvi – USA	Collett jt, 1988
2.	28/1	1a	Suurbritannia	Vilček jt, 2001
3.	17-112	1a	Prantsusmaa	Vilček jt, 2001
4.	Osloss	1b	Referentstüvi – Saksamaa	De Moerlooze jt, 1993
5.	24/15	1b	Suurbritannia	Vilček jt, 2001
6.	P	1b	Austria	Vilček jt, 2001
7.	T	1b	Austria	Vilček jt, 2001
8.	16-111	1d	Prantsusmaa	Vilček jt, 2001
9.	F	1d	Austria	Vilček jt, 2001
10.	3186V6	1e	Itaalia	Vilček jt, 2001
11.	10-84	1e	Prantsusmaa	Vilček jt, 2001
12.	20-V661-2	1e	Prantsusmaa	Vilček jt, 2001
13.	BVD1f11207	1f	Saksamaa	Tajima jt, 2001
14.	R	1f	Austria	Vilček jt, 2001
15.	W	1f	Austria	Vilček jt, 2001
16.	J	1f	Austria	Vilček jt, 2001
17.	BVD1g1891	1g	Saksamaa	Tajima jt, 2001
18.	A	1g	Austria	Vilček jt, 2001
19.	G	1h	Austria	Vilček jt, 2001
20.	KM	1h	Slovakkia	Vilček jt, 2001
21.	23/15	1i	Suurbritannia	Vilček jt, 2001
22.	4-5174	2	Prantsusmaa	Vilček jt, 2001
23.	15-103	2	Prantsusmaa	Vilček jt, 2001

Pöörd-transkriptsioon

Isoleeritud RNA denatureerimiseks kuumutati seda 90 °C juures 5 min ning seejärel jahutati jääl.

2,5 µl proovi RNA-d sisestati reaktsioonilahusesse, mille koostises oli RT pealagus [250 mM KCl, 250 mM Tris HCl (pH 8,3), 20 mM MgCl₂ ja 50 mM DTT], 1 mM igat dNTP-d, 20 pmol antisenss praimerit

Nr 326, 25 ühikut MMLV pöördtranskriptaasi, 10 ühikut ribonukleaasi inhibiitorit ning steriilne ribonukleasivaba deioniseeritud vesi. Reaktsioonilahuse (koos proovi RNA-ga) kogumaht oli 20 µl.

Reaktsiooni läbiviimiseks inkubeeriti reaktsioonilahust *Biometra*TM termotsükleris järgmisel režiimil: 60 min. 37 °C juures, 10 min 98 °C juures. Saadud cDNA-d kasutati kohe PCR-i läbiviimiseks või säilitati – 20 °C juures.

Polümeraas-ahelreaktsioon

2,5 µl cDNA-d sisestati reaktsioonilahusesse, mille koostises oli PCR-i pealagus [50 mM KCl, 10 mM Tris HCl (pH 8,8), 1,5 mM MgCl₂ ja 50 mM DTT], 0,2 mM igat dNTP-d, 10 pmol kumbagi praimerit, 1 ühik Taq-polümeraasi ning steriilne deioniseeritud vesi. Reaktsioonilahuse (koos cDNA-ga) kogumaht oli 25 µl.

Reaktsiooni läbiviimiseks inkubeeriti reaktsioonilahust *Biometra*TM termotsükleris järgmisel režiimil: cDNA denatureerimine – 5 min 94 °C juures; 35 amplifikatsiooni tsükli – 60 sek 94 °C juures, 60 sek 56 °C juures, 60 sek 74 °C juures, millele järgnes ekstensiooni faas: 10 min 72 °C juures.

Elektroforees

Amplifitseeritud cDNA lõikude elektroforeetiline analüüs tehti 2%-ses agarosgeelis kasutades TBE puhvrit (pH 8,2). cDNA visualiseerimiseks lisati geelile etiidumbromiidi. Elektroforees viidi läbi 300 V juures kestusega 30 min. Lõigu suuruse määramiseks kanti geelile DNA marker.

cDNA visualiseerimiseks geelis kasutati UV-transillumiinatorit. Tulemus fikseeriti polaroidkaameraga võetud fotol.

Viirustüvede RNA nukleotiidjärjestuse määramine

Viirustüvede genoomi 5'UTR-i amplifitseeritud 288 Nt-te cDNA lõikude Nt-järjestused määrati automaat-järjestusemäärajaga ABI PRISM 377, kasutades *DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit*[®] reaktiivikomplekti (*valmistaja Amersham Pharmacia Biotech Inc.*). Nt-järjestused määrati otse PCR-is amplifitseeritud cDNA lõikudest, kasutades samu primereid kui RT-PCR-i puhul.

Järjestused reastati kasutades GCG tarkvarapaketti.

Fülogeneetiline analüüs

Fülogeneetiliseks analüüsiks kasutatud 5'UTR-i lõik asus positsioonide vahemikus 108–385 (NADL-i Nt-järjestuse alusel).

Nukleotiidjärjestuste analüüsiks kasutati tarkvarapakette *BioEdit 5.0.9* (Hall, 1999) ja *Biology WorkBench 3.2* (<http://workbench.sdsc.edu/>).

Arvutiprogrammi *MView 1.4.1* (Brown jt, 1998) (paketi *Biology WorkBench*) abil määrati viirustüvede homoloogsus paarikaupa. Tüvede distantmaatriks genereeriti programmi *ClustalW* (Thompson jt, 1994) (paketi *Biology WorkBench*) abil, mis kasutab DNA Nt-järjestuste vaheliste erinevuste kalkuleerimiseks *Neighbour Joining* meetodit (Saitou, Nei, 1987).

ClustalW poolt genereeritud distantmaatriksi alusel koostati tüvede fülogeneetiline puu, kasutades selleks arvutiprogrammi *Phylip* (paketi *Biology WorkBench – Drawgram ja Drawtree 3.5*) (Felsenstein, 1989).

Üks fülogeneetiline puu koostati eraldi Eesti tüvedele. Teiseks koostati ühine fülogeneetiline puu Eesti-, referents- ja andmebaasist võrdluseks valitud tüvedele. Ühtlasi määrati Eesti tüvede genotüüp ja genogrupp ning hinnati nende võimalikku päritolu.

Tulemused

PCR ja amplifitseeritud genoomiosade nukleotiidjärjestuse määramine

Kõikide viirustüvede 5'UTR piirkonnast õnnestus amplifitseerida eeldatud 288 Nt-ne lõik. Seda kontrolliti lõigu molekulmassi alusel, mis määrati geel-elektroforeesil võrdluses vastava molekulmassi markeriga. Amplifitseeritud cDNA lõikude spetsiifilisust kontrolliti nende nukleotiidjärjestuse alusel, võrreldes neid referentstüvede vastava piirkonna järjestustega. Kõik amplifitseeritud cDNA lõigud pärinesid ettenähtud piirkonnast.

Eesti VVDV tüvede 5' UTR nukleotiidjärjestus ja nende võrdlustulemused

Joonisel 1 on esitatud Eesti VVDV tüvede genoomi 5' UTR-ist amplifitseeritud 240 Nt-ste cDNA-lõikude konsensusjärjestus ning iga tüve kohta nukleotiidide asendused polümorfsetes piirkondades. Järjestuste paariviisilise homoloogsuse analüüsi tulemused on esitatud tabelis 3. Tabelist selgub, et kõikide tüvede omavaheline samasus on suurem kui 80%, mistõttu need kuuluvad ilmselt ühte genotüüpi. Enamiku tüvede omavaheline homoloogsus on suurem kui 90%. Tüvede V7 ja V11 homoloogsus teiste Eesti VVDV tüvedega on aga 84–87%. See on aluseks nende klassifitseerimiseks eraldi genogruppi. Nimetatud tüvede omavaheline homoloogsus on 93%.

	10	20	30	40	50	60
Konsensus	AAA	AAGGAGGGT	TAGCAACAGTGGT	GAGTTCGTTGGATGGCT	GAAGCCCTGAGT	TACAGGG
V1	..T	..G
V2	..T	..G
V3	..T	..G
V4	.G	.C
V5	..CG
V6	NG	.C
V7	T	TTGG	CA
V8	..C
V9	..CG
V10	.G	.C
V11	..TTGG	CA
	70	80	90	100	110	120
Konsensus	TAGTCGTCAGTGGTTCGACGCTT	G	T	ACAAGCCTCGAGATGCCACGTGGACGAGGG		
V1	-C	.GAGG
V2C	.GAGG
V3C	.GAGG
V4T	TG.G
V5A	TA.T.G
V6G	T.TG.G
V7C	TAGTGTG.T
V8TT	TG.A.TA
V9A	TA.T.GN
V10T	TG.G
V11C	CAGA.TGT.G
	130	140	150	160	170	180
Konsensus	ATGCCCACAGCACATCTTAACTGAGCGGGGTCGTTACAGGTAAAAACGGTTTAAAC	AC				
V1GG
V2GG
V3GG
V4GGGA
V5ACCA
V6GA
V7	.CGACCC
V8CG-
V9ACC
V10GTG
V11CCN
	190	200	210	220	230	240
Konsensus	CGCTACGAATACAGCCTGATAGGGTGCTGCAGAGGCCACTGTATTGCTACTAAAAATCT					
V1GC
V2C
V3C
V4
V5
V6
V7	..T	..TGGCCC
V8
V9
V10CC
V11	..T	..TGTCCC

Joonis 1. VVDV Eesti tüvede 5'UTR piirkonna Nt-järjestus (positsioonide vahemik 129–369 VVDV NADL järgi)
Figure 1. The nucleotide sequence of 5'UTR of Estonian BVDV strains (positions 129–369 according to the sequence of the strain NADL)

Tabel 3. VVDV Eesti tüvede genoomi 5'UTR-i nukleotiidjärjestuse paariviisiline homoloogsus
Table 3. Pairwise homology of sequences of 5'UTR of the Estonian BVDV strains

Tähis Marking	VVDV tüvi Strain ID	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	V9	V10	V11
V1	VTL-08-1.1	99,2%	99,2%	93,9%	93,5%	93,9%	85,7%	92,7%	93,1%	91,8%	89,8%
V2	VTL-08-1.2		100,0%	94,7%	94,3%	94,7%	85,7%	93,5%	93,9%	92,7%	89,8%
V3	VTL-08-1.3			94,5%	94,1%	95,0%	85,7%	93,3%	93,9%	92,9%	89,5%
V4	VTL-08-1.6				95,0%	98,7%	84,0%	96,2%	94,7%	98,3%	87,4%
V5	VTL-05-2					95,4%	87,0%	95,0%	99,6%	93,3%	89,5%
V6	VTL-04-1.1						84,9%	96,6%	94,7%	97,1%	88,2%
V7	VTL-11-1							85,3%	86,1%	84,0%	93,3%
V8	VTL-05-1								94,7%	94,5%	87,4%
V9	VTL-12-1									92,7%	89,4%
V10	VTL-08-1.7										87,4%
V11	VTL-12-2										X

Tüvede V1–V3, mis pärinesid ühe karja loomadelt, Nt-järjestuse võrdlus näitab, et tegemist on praktiliselt identsete viirustüvedega. Tüvede V2 ja V3 omavaheline homoloogsus on 100%, V1 erineb kahest eelnevast ühe deletsiooni ja ühe aluse asenduse poolest. Sellele vaatamata on V1 homoloogsus V2 ja V3 suhtes suurem kui 99%. Tüved V4 ja V10, mis pärinevad sama karja loomadelt, kuid on isoleeritud neli aastat hiljem kui V1, V2 ja V3, erinevad viimastest oluliselt. Nimetatud kahe viiruste rühma omavaheline homoloogsus on vaid 92–93%, samas kui rühmadesisene homoloogsus on 98% (V4 ja V10) kuni 99% (V1, V2, V3).

Tüvi V10 on ilmselt mittetsütopatogeense tüve V4 tsütopatogeenne homoloog-viirus, kuid TP viiruseks transformeerumise protsessis toimunud geneetilised muutused on muutnud selle geneetilist struktuuri sellisel määral, et ka 5'UTR piirkonna homoloogsus kahe tüve vahel on vähenenud.

Samas sarnanevad tüved V4 ja V10 suurel määral V6-ga, mis isoleeriti Hollandist imporditud loomalt. Tüvede V6 ja V4 omavaheline homoloogsus on 98%, mis viitab nende geneetilisele sugulusele.

Tüvede V5 ja V9 Nt-järjestuse analüüs näitab, et tegemist on kahe praktiliselt identse viirustüvega (järjestuste homoloogsus 99,6%). Ometigi on tegemist kahest erineva karja loomadelt isoleeritud tüvedega, mille MAK-profiil erines ühe MAK reaktiivsuse poolest (vt tabel 1).

VVDV Eesti tüvede ja erinevatesse VVDV genogruppidesse kuuluvate viirustüvede 5'UTR-i Nt-järjestuse paariviisilise homoloogsuse analüüsi tulemused on esitatud summeeritult tabelis 4.

Tabel 4. VVDV Eesti tüvede Nt-järjestuse paariviisiline homoloogsus erinevatesse VVDV genogruppidesse kuuluvate viirustüvede 5'UTR'i Nt-järjestusega

Table 4. Pairwise homology of sequences of 5'UTR of the Estonian BVDV strains and the strains of different BVDV genogroups

VVDV eesti tüved Estonian strains	VVDV Genotüüp/grupp (võrreldud tüvede arv n) BVDV genotype/groupe (No of strains compared)								
	1a (n=3)	1b (n=4)	1d (n=2)	1e (n=4)	1f (n=4)	1g (n=1)	1h (n=2)	1i (n=1)	2 (n=2)
V1									
V2	87-92%	95-97%	86-87%	89-90%	85-87%	89%	86-87%	88%	73-74%
V3									
V4	87-91%	95-98%	85%	88-90%	85-87%	87%	84-86%	88%	72-73%
V10	85-90%	93-97%	84-85%	87-88%	85-87%	85%	83-84%	86%	72-73%
V6	88-91%	95-99%	85-86%	87-90%	86-88%	87%	85-86%	88%	72-73%
V5									
V9	88-91%	94-96%	86-87%	88-90%	86-87%	90%	84-85%	88%	72-73%
V8	88-90%	93-97%	85-86%	85-89%	86-87%	86%	85-86%	87%	71-72%
V7	85-87%	84-86%	85-87%	83-87%	89-92%	90%	87%	84%	69-71%
V11	85-90%	87-89%	87-88%	87-90%	88-92%	90%	86%	85%	71-73%

Võrreldes Eesti VVDV tüvede sarnasust erinevate VVDV genogruppide viirustüvedega selgub, et enamiku Eesti tüvede homoloogsus on suurim VVDV genogrupi 1b esindajatega (referentstüvi Osloss), küündides 93–98%. Erandiks on vaid tüved V7 ja V11, mille homoloogsus genogrupi 1b tüvedega on 84–89%. Nende kahe tüve homoloogsus on suurim genogrupi 1f tüvedega, olles enamikuga neist suurem kui 90%. Vaid ühe

viirustüvega (BVD1f11207), mis on varem klassifitseeritud kui VVDV 1f (Tajima jt 2001), on tüvede V7 ja V11 homoloogsus väiksem kui 90% (vastavalt 89% ja 88%).

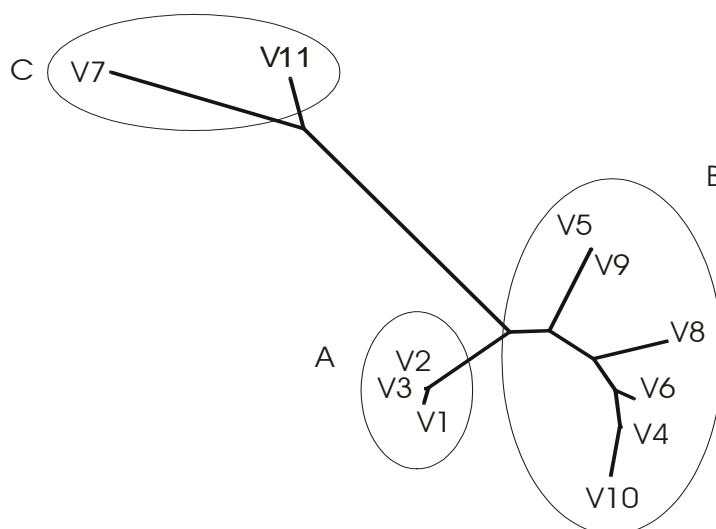
Tüvede homoloogsuse analüüs näitab, et kõik Eesti VVDV tüved kuuluvad genotüüpi 1 ning ilmselt genogruppidesse 1b ja 1f. Kõigi teiste genogruppide tüvedega on Eesti tüvede homoloogsus väiksem, küündides üksikjuhtudel kuni 92%-ni.

Fülogeneetilise analüüsi tulemused. VVDV molekulaarepidemioloogia Eestis

Eesti VVDV tüvede RNA 5'UTR-ist amplifitseeritud lõikude Nt-järjestuse alusel koostatud fülogeneetiline puu on esitatud joonisel 2. Fülogeneetilise analüüsi tulemusena rühmituvad Eesti VVDV isolaadid kolme klastrisse. Ühe neist moodustavad karjast 1 1995. aastal isoleeritud tüved (klaster A), mis on praktiliselt identsed. Teise klasteri moodustab enamik ülejäänud tüvedest, mis on isoleeritud erinevate maakondade karjadest ajavahemikus 1997–2000 (klaster B). Sellesse klastrisse rühmitub ka Hollandist imporditud viirustüvi (V6) ja karjast nr 1 1999 ja 2000 isoleeritud tüved (V4 ja V11). Klastrisse B kuuluvate tüvede omavaheline homoloogsus on keskmiselt 95–98% ja homoloogsus klasteri A tüvedega 92–95%. Kolmandasse klastrisse rühmituvad teistest tüvedest kõige enam erinevad tüved – V7 ja V11 (klaster C), mille homoloogsus teiste tüvedega on vaid 84–86% (omavahel 93%). Klasteri C tüvedest üks on isoleeritud Saaremaa karjast ja teine Tartumaa karjast.

Eesti VVDV tüvede ja mujal maailmas isoleeritud viirustüvede ühine fülogeneetiline puu on esitatud joonisel 3. Analüüsi tulemustest ilmneb, et ükski Eesti VVDV tüvi ei rühmitu tüüp-2 VVDV tüvedega ühte klastrisse. Kõik tüved, v.a V7 ja V11, on suhteliselt tihedas rühmas koos genotüüp-1b tüvedega. Tüved V7 ja V11 rühmituvad aga samasse klastrisse genotüüp-1f Austria tüvedega.

Saksamaal isoleeritud tüvi BVD1g1891, mis on Tajima jt (2001) poolt klassifitseeritud kui genogrupi 1g tüvi, rühmitub samasse klastrisse Vilčeki jt (2001) poolt määratletud genogrupi 1e tüvedega.

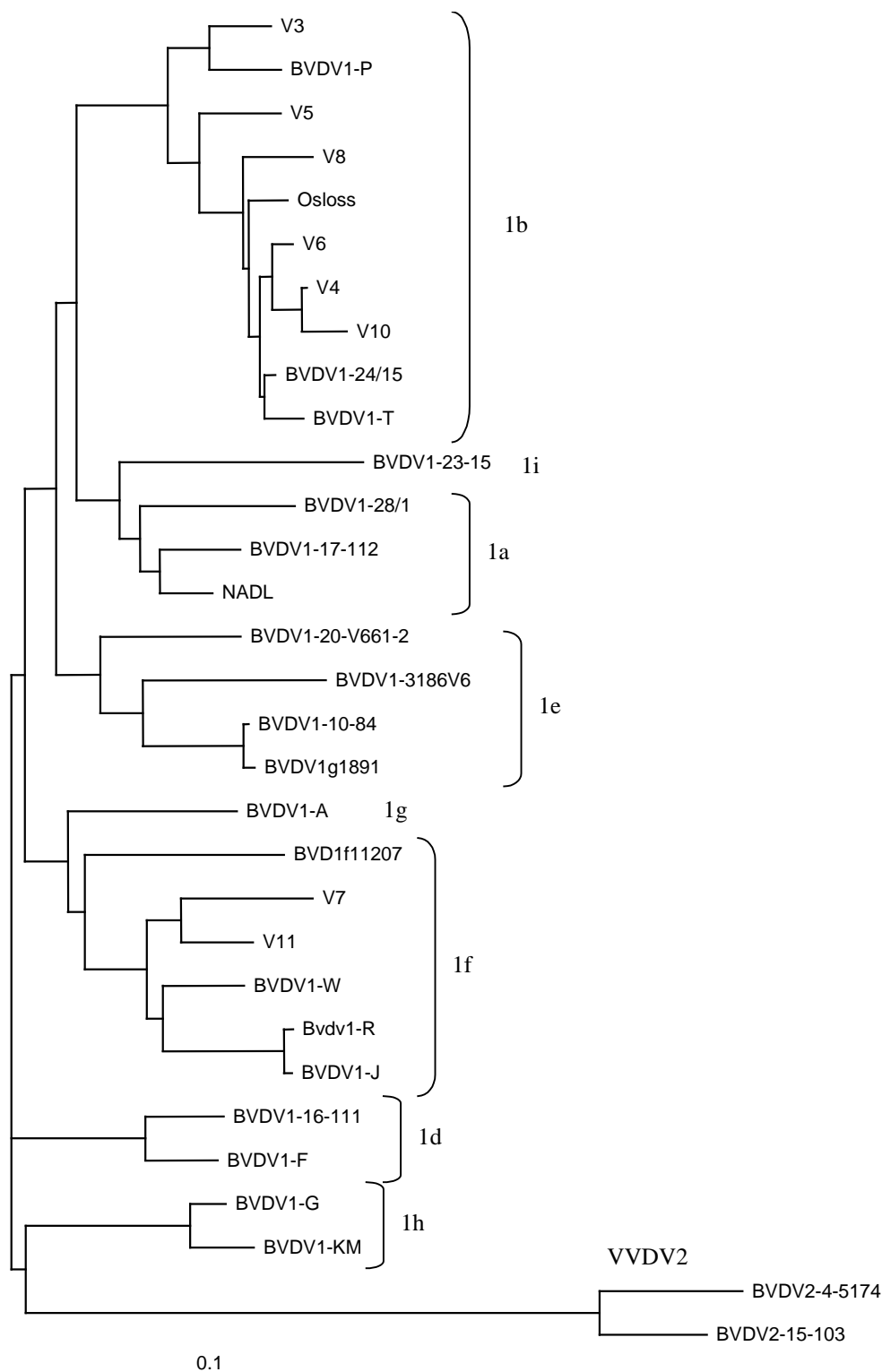


Joonis 2. VVDV Eesti tüvede RNA 5'UTR-ist amplifitseeritud lõikude Nt-järjestuse alusel koostatud fülogeneetiline puu. A, B ja C tähistavad viirustüvede klastreid

Figure 2. The phylogenetic tree of Estonian BVDV strains based on nucleotide sequence differences of the 5'UTR of the virus genome

Arutelu

Uurimuse tulemustest nähtub, et kõik seni tüüpiseeritud Eesti VVDV tüved kuuluvad genotüüpi 1. Seejuures on esindatud vähemalt kaks genogruppi – VVDV1b ja VVDV1f. Samas tõstatas mõne VVDV tüüp-1 tüve antigeenide reageerivus VVDV tüüp-2-e spetsiifilise MAK-ga (WS433) küsimuse, kas tegemist ei ole uue, seni kirjeldamata VVDV genotüübiga? (vt Viltrop jt, 2002). Käesoleva uurimuse tulemusel selgus, et nimetatud tüved kuuluvad siiski kõik genotüüpi 1. Seejuures ei moodusta nad eraldiseisvat klasterit Eesti tüvede hulgas, mis võiks anda alust rühmitada nad eraldi genogruppi. Seega on tegemist viirustüvede fenotüübi eripäraga, mis ei kajastu 5'UTR-i struktuuris.



Joonis 3. Eesti ja välismaiste VVDV tüvede RNA 5'UTR-ist amplifitseeritud lõikude Nt-järjestuse alusel koostatud fülogeneetiline puu

Figure 3. The Phylogenetic tree of all BVDV strains used in this study based on nucleotide sequence differences of the 5'UTR of the virus genome

Kuigi uuritud viirustüved pärinesid vaid nelja maakonna karjadest, annab ka üldine VVDV-alane epizootiline olukord alust oletada, et tüüp-2 VVDV viirustüved ei ole Eestisse jõudnud. Võib täheldada seaduspära, et tüüp-2 VVDV tüved on enam levinud maades, kus kasutatakse veiste vaktsineerimiseks elusvaktsiine. Elusvaktsiinid on sageli saastunud VVDV tüüp-2-ga, mida leidub rakuliinides ja veise loote seerumis, mida

vaktsiinide tootmisel kasutatakse. Eriti keeruline on avastada sellist kontaminatsiooni VVDV elusvaktsiinides. Et Eestis ei ole seni VVDV-vastaseid vaktsiine laialdaselt kasutatud, siis ei ole ka nendega VVDV tüüp-2-e tüvesid tõenäoliselt maale toodud.

Analüüsidest Eesti VVDV tüvede rühmitumist välismaalt pärinevate tüvede suhtes ühiselt genereeritud fülogeneetilises puus, ilmneb enamiku meie tüvede sarnasus Lääne-Euroopa genogrupp-1b tüvedega. Vaid tüved V7 ja V11 rühmituvad samasse klastrisse genogrupp-1f tüvedega. Arvestades fülogeneetilise analüüsi tulemusi võib järeldada, et meil levivad viirustüved pärinevad Lääne-Euroopa mandriosast, kuna Põhja-Ameerikas ja Briti saartel laialt levinud genotüüp 1a esindajaid siin ei ole avastatud.

Tähelepanuväärne on tüvede V4 ja V10 erinevus tüvedest V1–V3. Et tegemist on sama karja loomadelt 4-aastase vahega isoleeritud viirustüvedega, annab see tunnistust nimetatud karja hiljutisest uuest nakatumisest. Samas jääb selgusetuks infektsiooni karja toomise tee. Omaniku andmetel ei ole alates 1990-ndate algusest karja ostetud ühtegi veist, seega on välistatud uue viirustüve sissetoomine viirusekandja loomaga. Võimalike nakkuse karja toomise moodustena tulevad kõne alla VVDV-d sisaldava imporditud sperma kasutamine, VVDV-ga saastunud vaktsiinide kasutamine, viiruse karja toomine saastunud transpordivahendite või muu sellisega.

Analüüsidest Eesti VVDV tüvede omavahelist sarnasust ilmneb, et need on enamasti karjaspetsiifilised. Vaid tüved V5 ja V9 osutusid 5'UTR-i Nt-järjestuse võrdluse alusel praktiliselt identseteks. Samas pärinesid nad karjadest, mis paiknesid üks Järvamaal, teine Tartumaal. Ajalises mõttes isoleeriti viirused lähestikku, üks 1998. ja teine 1999. aastal. Siiski ei õnnestunud meil tuvastada otsest kontakti kahe karja vahel, mistõttu küsimus, kuidas need kaks karja nakatusid sama viirustüvega, jääb esialgu vastusetu.

Kokkuvõte ja järeldused

Uurimise tulemusena tuvastati, et Eestis levivad VVDV tüüp-1 viirustüved, mis kuuluvad vähemalt kahte genogrüppi: VVDV1b ja VVDV1f. VVDV tüüp-2 tüvesid käesoleva uurimistöökäigus ei avastatud. Eestis isoleeritud viirustüvede karjaspetsiifilisus viitab sellele, et viirus tsirkuleerib karjas piisavalt kaua geneetiliste muutuste kinnistumiseks viiruse subpopulatsioonis. Ühes Põlvamaa karjas tuvastatud uue viirustüve karja sissetoomine ilma, et sinna oleks loomi juurde ostetud, on oluline signaal sellest, et Eestis ei ole tõkestatud kõik võimalikud VVD viiruse levikuteed, sealhulgas viiruse importimine sperma või vaktsiinidega.

Kirjandus

- Anon. Bovine viral diarrhoea. Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines. 4th ed., OIE, Paris, 2000, http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00115.htm.
- Baule, C., van Vuuren, M., Lowings, J. P., Belak, S. Genetic heterogeneity of bovine viral diarrhoea viruses isolated in Southern Africa. – *Virus Res.*, 52, 2, p. 205–220, 1997.
- Bolin, S. R. Control of bovine viral diarrhoea infection by use of vaccination. – *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 11, 3, p. 615–625, 1995.
- Bolin, S. R., Littlejohn, 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*, 52, 7, p. 1033–1037, 1991.
- Bolin, S. R., Ridpath, J. F. Differences in virulence between two noncytopathic bovine viral diarrhoea viruses in calves. – *Am. J. Vet. Res.*, 53, p. 2157–2163, 1992.
- Brown, N. P., Leroy, C., Sandaer, C. MView: A Web compatible database search or multiple alignment viewer. – *Bioinformatics*, 14, 4, p. 380–381, 1998.
- Bruschke, C. J., van Oirschot, J. T., van Rijn, P. A. An experimental multivalent bovine virus diarrhoea virus E2 subunit vaccine and two experimental conventionally inactivated vaccines induce partial fetal protection in sheep. *Vaccine*, 9, 17, 15–16, p. 1983–1991, 1999.
- Collett, M. S., 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*, 1988, 165, 1, p. 191–199.
- De Moerloose, L., Lecomte, C., Brown-Shimmer, S., Schmetz, D., Guiot, C., Vandenberg, D., Allaer, D., Rossius, M., Chappuis, G., Dina, D. Nucleotide sequence of the bovine viral diarrhoea virus Oslo strain: comparison with related viruses and identification of specific DNA probes in the 5' untranslated region. – *J. Gen. Virol.*, 74, 7, p. 1433–1438, 1993.
- 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, 3, p. 521–547, 1995.
- Dubovi, E. J. Bovine Viral Diarrhoea Virus and Border Disease Virus. In: Webster, R. G., Granoff, A. (editors), *Encyclopedia of Virology*. Vol. 1. Academic Press, London, p. 175–181, 1994.
- Elbers, K., Tautz, N., Becher, P., Stoll, D., Rumenapf, T., Thiel, H. J. Processing in the pestivirus E2-NS2 region: identification of proteins p7 and E2p7. – *J. Virol.*, 70, 6, p. 4131–4135, 1996.
- Felsenstein, J. PHYLIP – Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics*, 5, p. 164–166, 1989.

- Hall, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp.*, 41, p. 95–98, 1999.
- Hamers, C., Di Valentin, E., Lecomte, C., Lambot, M., Joris, E., Genicot, B., Pastoret, P. P. Virus neutralising antibodies against 22 bovine viral diarrhoea virus isolates in vaccinated calves. – *Vet. J.*, 163, 1, p. 61–67, 2002.
- Jewett jt: Jewett, C. J., Kelling, C. L., Frey, M. L., Doster, A. R., Comparative pathogenicity of selected bovine viral diarrhoea virus isolates in gnotobiotic lambs. – *Am. J. Vet. Res.*, 51, p. 1640–1644, 1990.
- Lindberg, A. L. E., Alenius, S. Principles for eradication of bovine viral diarrhoea virus (BVDV infections in cattle populations. – *Veterinary Microbiology*, 64, p. 197–222, 1999.
- Nagai, M., Ito, T., Sugita, S., Genno, A., Takeuchi, K., Ozawa, T., Sakoda, Y., Nishimori, T., Takamura, K., Akashi, H. Genomic and serological diversity of bovine viral diarrhoea virus in Japan. – *Arch. Virol.*, 146, 4, p. 685–696, 2001.
- Nuttall, P. A., Stott, E. J., Thomas, L. H. Experimental infection of calves with two strains of bovine virus diarrhoea virus: virus recovery and clinical reactions. – *Res. Vet. Sci.*, 28, 1, p. 91–95, 1980.
- van Oirschot, J. T., Bruschke, C. J., van Rijn, P. A. Vaccination of cattle against bovine viral diarrhoea. – *Vet. Microbiol.*, 64, 2–3, p. 169–183, 1999.
- 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*, 203, p. 260–268, 1994.
- Poole, T. L., Wang, C., Popp, R. A., Potgieter, L. N., Siddiqui, A., Collett, M. S. Pestivirus translation initiation occurs by internal ribosome entry. – *Virology*, 10, 206, p. 750–754, 1995.
- Ridpath, J. F., Bolin, S. R., Dubovi, E. Segregation of Bovine Viral Diarrhoea Virus into genotypes. – *Virology*, 205, p. 66–74, 1994.
- van Rijn, P. A., van Gennip, H. G., Leendertse, C. H., Bruschke, C. J., Paton, D. J., Moormann, R. J., van Oirschot, J. T. Subdivision of the pestivirus genus based on envelope glycoprotein E2. – *Virology*, 27, 237, 2, p. 337–348, 1997.
- Saitou, N., Nei, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. – *Mol. Biol. Evol.*, 4, 4, p. 406–425, 1987.
- Tajima, M., Frey, H. R., Yamato, O., Maede, Y., Moennig, V., Scholz, H., Greiser-Wilke, I. Prevalence of genotypes 1 and 2 of bovine viral diarrhoea virus in Lower Saxony, Germany. – *Virus. Res.*, 76, 1, p. 31–42, 2001.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. – *Nucleic Acids Res.*, 22, p. 4673–4680, 1994.
- Topliff, C. L., Kelling, C. L. Virulence markers in the 5' untranslated region of genotype 2 bovine viral diarrhoea virus isolates. – *Virology*, 10, 250, 1, p. 164–172, 1998.
- Vilček, S., Herring, A. J., Herring, J. A., Nettleton, P. F., Lowings, J. P., Paton, D. J. Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. – *Arch. Virol.*, 136, p. 309–323, 1994.
- Vilček, S., Paton, D. J., Durkovic, B., Strojny, L., Ibata, G., Moussa, A., Loitsch, A., Rossmannith, W., Vega, S., Scicluna, M. T., Paifi, V. Bovine viral diarrhoea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups. – *Arch. Virol.*, 146, 1, p. 99–115, 2001.
- Viltrop, A., Alaots, J., Pärn, M., Must, K. Mõnede VVD viiruse Eesti tüvede fenotüübiline iseloomustus. – *Agraarteadus*, 2002, (trükis).
- Yu, H., Isken, O., Grassmann, C. W., Behrens, S. E. A stem-loop motif formed by the immediate 5' terminus of the bovine viral diarrhoea virus genome modulates translation as well as replication of the viral RNA. – *J. Virol.*, 74, 13, p. 5825–5835, 2000.

Tänuavaldused

Käesolevat uurimust finantseeris Eesti Teadusfond (grant nr 3684).

Genetic Typing of Some BVDV Strains from Estonia and Molecular Epidemiology of the Infection.

A. Viltrop, J. Alaots, S. Põldma, J. Parik, M. Pärn, K. Must

Summary

11 BVD virus strains isolated from animals of 7 dairy farms in Estonia (see Table 1) were genetically typed on the bases of polymorphism of the 5' untranslated region (UTR) of the virus genome. The 288 nt long fragment of the 5'UTR of viral RNA was amplified with help of RT-PCR using the primers published by Vilček and co-workers (1994). In most cases the viral RNA was isolated directly from serum or plasma of the viraemic cattle. In two cases (strains V9, and V10) the virus was first isolated in the cell-culture and RNA isolated from supernatant of the infected cell-culture.

The amplified fragments of the virus genome were sequenced on automated sequencer ABI PRISM 377 using DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit® (Amersham Pharmacia Biotech Inc.). The sequencing was done directly on PCR amplicons using the same primers as in RT-PCR. The sequences were lined with help of GCG software.

The analyses of sequence data was performed using software packages BioEdit 5.0.9, and Biology WorkBench 3.2 (<http://workbench.sdsc.edu/>). The consensus sequence of Estonian BVDV strains was established and heterologous loci in sequences were determined (Figure 1).

The pair wise homology analyses of sequences of Estonian BVDV strains was performed using MView 1.4.1 software (included in package Biology WorkBench) (see Table 3). The Estonian BVDV strains were also compared to the foreign BVDV strains belonging to several BVDV genogroupes (see Table 2) and pair wise homology analyses was performed using our and published sequence data (Table 4).

To generate the distance matrix of sequences the Neighbour Joining method was used (ClustalW software, included in package Biology WorkBench). With help of Phylip software (included in package Biology WorkBench), two phylogenetic trees were generated – one for Estonian BVDV strains (Figure 2) and the second common to Estonian and foreign BVDV strains (Figure 3).

As a result of these investigations it can be concluded that all studied Estonian BVDV isolates belong to the BVDV genotype 1 and are closely related to Western-European strains (See Figure 3). Nine of the strains could be classified as BVDV genotype 1b (the sequence homology with strain Osloss >93%) (Table 4). Two local strains were distinct from the rest of Estonian strains having sequence homology lower than 90% with others (Table 3). These two isolates could be classified as BVDV genotype 1f (Table 4 and Figure 3).

The isolated virus strains were highly herd-specific (Figure 2). Only in two herds identical virus strains were discovered. In one herd the introduction of a new virus strain could be identified, as the isolates from this herd dating back to 1995 (V1–V3) were clearly distinct from isolates of 1999 (V4) and 2000 (V10) (see Table 3 and Figure 2).