

DOLOČITEV PRVEGA CELOTNEGA GENOMA VIRUSA BOVINE VIRUSNE DIAREJE V SLOVENIJI

Ivan Toplak*, Darja Kušar, Bojan Papić, Urška Kuhar

Inštitut za mikrobiologijo in parazitologijo, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

ivan.toplak@vf.uni-lj.si

Okužbe z virusi bovine virusne diareje (BVD) spremljamo v Sloveniji od leta 1994 naprej. V predhodnih raziskavah smo med leti 1997 in 2004 z genotipizacijo 5'-nekodirajoče regije virusov BVD v okuženih rejah ugotovili kroženje štirih podtipov virusov BVD (1b, 1d, 1f, 1g). Leta 2006 smo v skupini uvoženih govedi v karantenskem hlevu dokazali akutno okužbo z virusom BVD in z genotipizacijo prvič ugotovili prisotnost virusa BVD podtipa 1e. Virus BVD smo iz seruma obolelih živali izolirali na celični kulturi. Z metodo sekvenciranja naslednje generacije (NGS) Ion Torrent smo določili celotni genom izolata BVD SLO2407/2006 dolžine 12.258 nukleotidov (nt). Primerjava zaporedja celotnega genoma z zaporedji virusov BVD v prosto dostopnih podatkovnih zbirkah je pokazala le 85% identičnost v nukleotidnem zaporedju z najbližjim izolatom BVD "Carlito" iz Švice. Virusni izolat BVD SLO2407/2006 ima značilno organizacijo genoma BVD s 5'-nekodirajočo regijo dolžine 376 nt, sledi regija, ki kodira enotni poliprotein v dolžini 3.899 aminokislin in 3'-nekodirajoča regija dolžine 184 nt. To je prvi virus BVD, ki smo mu v Sloveniji določili zaporedje celotnega genoma.

Ključne besede: Virus bovine virusne diareje; sekvenciranje Ion Torrent; sekvenciranje celotnega genoma; govedo

Uvod

V Sloveniji spremljamo okužbe z virusi bovine virusne diareje (BVD) pri govedu od leta 1994 naprej (1). Bolezen je v Sloveniji endemična, z virusom pa je okužena približno ena tretjina govejih čred. Med leti 1997 in 2004 smo z genotipizacijo 5'-nekodirajoče regije virusov BVD v okuženih rejah ugotavljali kroženje štirih podtipov BVD (1b, 1d, 1f, 1g). Virusi BVD se med slovenskimi rejami pogosto prenašajo (2). Zaradi velikih ekonomskih škod, ki jih okužba z virusi BVD v rejah povzroča, so se številne evropske države odločile za izkoreninjenje bolezni in tudi dosegle status države proste BVD. Tako so zmanjšale ekonomske škode in možnost novih okužb. Vnos virusa BVD v neokužene reje je mogoče preprečiti tudi z izvajanjem preventivnih ukrepov, občasno pa se novi sevi virusov vnesejo v naše reje z uvozom okuženih in nepregledanih živali (3).

Do nedavnega smo za genetsko tipizacijo sevov virusov BVD uporabljali klasično sekvenciranje po Sangerju in s primerjavo kratkih odsekov virusnega genoma uvrstili posamezni izolat v ustrezen podtip. Nova tehnologija sekvenciranja naslednje generacije (NGS) omogoča ugotavljanje različnih patogenov v vseh vrstah vzorcev. Določitev celotnega genoma posameznega patogena ne podaja le več informacij o samem patogenu, ampak omogoča tudi natančnejše filogenetske primerjave s sevi iz celega sveta. Za tovrstne raziskave so še posebej zanimivi sevi, ki se razlikujejo od zaporedij, objavljenih v prosto dostopnih podatkovnih zbirkah. Namen raziskave je bil določitev celotnega genoma iz arhivskega izolata virusa BVD, izoliranega na celični kulturi.

Material in metode

Leta 2006 so iz Francije v Slovenijo uvozili skupino 28 goved. V karantenskem hlevu je rejec v prvem tednu pri večini živali opazil klinično sliko pljučnice in driske ter posumil na okužbo z virusom BVD. Vsem živalim smo odvzeli vzorce seruma in jih preiskali z metodo RT-PCR ter pozitivne vzorce virusa tipizirali z določitvijo kratkega odseka v 5'-nekodirajoči regiji s sekvenciranjem po Sangerju (2). Iz pozitivnih vzorcev smo uspešno izvedli izolacijo virusa BVD na primarni celični kulturi turbinalnih nosnih školjk (2). Iz namnoženega izolata BVD smo celokupno nukleinsko kislino izolirali s kompletom QIAamp Viral RNA (Qiagen, Nemčija) in za določitev celotnega genoma virusa BVD uporabili metodo NGS Ion Torrent (Thermo Fisher Scientific, ZDA). Najpodobnejša nukleotidna zaporedja v podatkovni zbirki NCBI GenBank smo poiskali z algoritmom BLAST. Za analizo celotnega genoma smo uporabili program DNASTAR Lasergene.

Rezultati

V karantenskem hlevu smo pri 17 živalih (60,71%) z metodo RT-PCR dokazali prisotnost nukleinske kisline virusa BVD. Virus BVD SLO2407/2006 smo iz seruma obolelih živali izolirali na celični kulturi in ga do nadaljnjih preiskav hranili v arhivski zbirki. Filogenetska analiza zaporedja 5'-nekodirajoče regije, dolžine 243 nt, je pokazala, da se izolat uvršča med viruse BVD podtip 1e. Z metodo NGS smo uspešno določili zaporedje celotnega genoma virusa BVD, ki je dolgo 12.258 nt. Genom smo sestavili iz 1.823 pridobljenih odčitkov s povprečno dolžino 121 nt. Povprečna pokritost genoma je bila 18-kratna. Izolat BVD SLO2407/2006 ima značilno organizacijo genoma virusa BVD s (i) 5'-nekodirajočo regijo (376 nt), sledi (ii) regija, ki kodira enotni poliprotein v dolžini 3.899 aminokislin (kodirajoča regija v genomu obsega 11.697 nukleotidov, med pozicijama 377 in 12.074), in (iii) 3'-nekodirajoča regija (184 nt). Primerjava zaporedja celotnega genoma s sevi virusa BVD v podatkovni zbirki NCBI GenBank je pokazala le 85% identičnost v nukleotidnem zaporedju z njemu najbližjim izolatom BVD "Carlito" (KP313732), ki so mu celotni genom določili leta 2014 v Švici (4).

Razprava

Znotraj Slovenije se okužbe z virusom BVD najpogosteje širijo z nakupom nepregledanih živali. Občasno se v državo vnese tudi kakšen nov sev BVD, največkrat z nakupom nepregledanega goveda. V letu 2006 smo v karanteni 28 živali ugotovili prisotnost akutne okužbe z virusom BVD pri 17 živalih in prvič v Sloveniji ugotovili prisotnost novega podtipa virusa BVD 1e. Čeprav naj bi bile vse živali iz karantene po ugotovitvi virusa neškodljivo odstranjene, smo isti sev virusa BVD 1e ugotovili še v dveh rejah, leta 2014. Določitev prvega celotnega genoma virusa BVD v Sloveniji je pomembna iz več razlogov. Določili smo celotni genom popolnoma novega seva virusa BVD, ki se precej razlikuje od genomov virusov BVD v prosto dostopnih podatkovnih zbirkah. To potrjuje, da z metodo NGS lahko uspešno določimo kateri koli virusni genom brez predhodnega poznavanja njegovega nukleotidnega zaporedja. Izolat virusa BVD, ki ga hranimo v naši zbirki, predstavlja dodano vrednost k raziskavi, saj je do sedaj le malo objavljenih sevov s podobnim genomom. Najbolj podoben genom ima švicarski sev BVD "Carlito", ki se v celotnem nukleotidnem zaporedju razlikuje za 15%. Razlike, ki smo jih ugotovili, so enakomerno razporejene po celotnem genomu. Uspešno smo uporabili novo tehnologijo Ion Torrent, ki omogoča visoko zmogljivo

sekvenciranje celotnih genomov. Pridobljene izkušnje z NGS bomo lahko v prihodnje uporabili tudi pri diagnostiki in raziskovanju drugih virusov. Virus BVD SLO2407/2006 je prvi sev BVD v Sloveniji, ki smo mu uspeli določiti zaporedje celotnega virusnega genoma.

Reference

1. Grom J, Barlič-Maganja. Bovine viral diarrhoea (BVD) infections - control and eradication programme in breeding herds in Slovenia. *Vet Microbiol* 1999; 2: 259-264.
2. Toplak I. Molekularna epidemiologija bovine virusne diareje (BVD) v slovenskih ple-menskih rejah govedi: doktorska disertacija. 2004.
3. Toplak I, Hostnik P, Rihtarič D, Grom J. The voluntary programme for control and eradication of bovine viral diarrhoea virus infection in Slovenia. *First International Symposium of Veterinary Medicine - ISVM 2015*. Novi Sad: 2015: 36-41.
4. Stalder H, Schweizer M, Bachofen C. Complete genome sequence of bovine viral diarrhoea virus subgenotype 1e strain isolated in Switzerland. *Genome Announc* 2015; 3: e00636-15.

Determination of first complete genome of bovine viral diarrhoea virus in Slovenia

In Slovenia, bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections have been monitored since 1994. In our previous studies that included genotyping of the 5'-noncoding region of BVDV, it was discovered that four subtypes of BVDV (1b, 1d, 1f, 1g) were circulating in the infected cattle farms between 1997 and 2004. In 2006, an acute infection with BVDV was confirmed in a group of imported cattle under quarantine and genotyping revealed for the first time the presence of BVDV subtype 1e. BVDV was successfully isolated in cell culture from serum of diseased animals. Using the next generation sequencing (NGS) Ion Torrent technology, a complete genome of the BVDV isolate SLO2407/2006 comprising 12.258 nucleotides (nt) was determined. Comparison of the complete BVDV genome with other BVDV sequences in public databases revealed only 85% nucleotide identity with the closest isolate BVD "Carlito" from Switzerland. BVDV isolate SLO2407/2006 shows a typical BVDV genome organization, with a 5'-noncoding region of 376 nt, followed by a coding region for a single polyprotein with 3.899 amino acids and a 3'-noncoding region of 184 nt. This is the first report of a Slovenian BVDV isolate for which a complete genome sequence was determined.

Key words: Bovine viral diarrhoea virus; Ion Torrent sequencing; complete genome sequencing; cattle