

## Streszczenie

Wirusowa biegunka bydła i choroba błon śluzowych (BVD-MD) jest jedną z ważniejszych jednostek chorobowych, związanych z zaburzeniami ze strony układu pokarmowego, oddechowego i rozrodczego, powodując przy tym milionowe straty w nowoczesnej hodowli bydła. Zdolność wirusa biegunki bydła i choroby błon śluzowych (BVDV) do przekraczania bariery łożyskowej we wczesnym okresie ciąży (40-120 dzień) może wywołać u płodu stan zakażenia trwałego (PI). Zwierzęta PI wydzielają wirus o wysokim mianie przez całe swoje życie we wszystkich wydalinach i wydzielinach będąc głównym źródłem tego patogenu w stadzie. Zwalczanie zakażeń wiąże się z identyfikacją i usuwaniem ze stada osobników PI. Wskaźnik występowania zwierząt PI na poziomie stada jest niski i wynosi od 0,5% do 2%, dlatego wykrycie tych zwierząt wymaga zbadania całego stada, a duże zróżnicowanie genetyczne i antygenowe wirusa dodatkowo utrudnia identyfikację zakażonych zwierząt. Różnorodność genetyczna wirusa w Polsce nie była określona. Brak badań dotyczących charakterystyki molekularnej wirusa występującego w naszym kraju sprawił, że jednym z celów pracy była charakterystyka molekularna i analiza filogenetyczna izolatów BVDV krążących na terenie Polski.

Analizę filogenetyczną wykonano dla dwóch fragmentów genomu wirusa: 5'UTR i N<sup>pro</sup>. Wszystkie izolaty wirusa należały do jednego z pięciu podtypów genotypu 1 wirusa 1b, 1d, 1e, 1f i 1g oraz do jednego podtypu genotypu 2, a mianowicie 2a. Wśród analizowanych izolatów nie zidentyfikowano genotypu BVDV-1a (dominującego w szczepionkach) oraz atypowego pestiwirusa bydłowego BVDV-3 (opisanego niedawno w Ameryce Południowej i we Włoszech). Tylko w jednym stadzie stwierdzono obecność dwóch różnych podtypów 1b i 1f wirusa. W przypadku stad, gdzie zidentyfikowano więcej niż 1 zwierzę PI zakażone tym samym podtypem wirusa, stwierdzono wysoki procent identyczności sekwencji nukleotydowych tych izolatów. Genotyp 2 BVDV spowodował znaczne straty ekonomiczne w stadzie szczepionym przeciwko BVDV-1 i został wyizolowany od zdrowych klinicznie zwierząt. Nie stwierdzono zależności geograficznej względem występowania poszczególnych podtypów wirusa. Na podstawie badań wirusologicznych i filogenetycznych przedstawionych w prezentowanej rozprawie można stwierdzić, że występowanie BVDV na terenie Polski ma charakter powszechny, choć odsetek osobników PI w badanych stadach kształtował się na normalnym poziomie poniżej 3%.

Założeniem drugiego etapu badań było opracowanie technik biologii molekularnej do wykrywania i określania statusu zakażeń BVDV oraz metod genotypowania bez konieczności

sekwencjonowania wyisobnionych izolatów. Jak wykazały badania własne, metoda real-time RT-PCR z zastosowaniem sond TaqMan pozwala na szybką, jakościową i ilościową ocenę obecności materiału genetycznego BVDV w badanej próbce. Metoda może być wykorzystana do badania zwierząt niezależnie od ich wieku, statusu immunologicznego i tego jakim podtypem wirusa były zakażone. Za pomocą wyznaczonych progów wartości granicznych Ct możliwe było odróżnienie zakażenia ostrego od zakażenia trwałego podczas jednokrotnego badania. Wysoka czułość opracowanej metody, która znacznie przewyższała czułość testu ELISA antygenowa (ELISA Ag) pozwalała także na pulowanie próbek, co znacznie zmniejszało koszty badania. Metoda cechuje się wysoką powtarzalnością, czułością i specyficnością.

Zaprojektowana metoda analizy restrykcyjnej produktów amplifikacji klasycznego RT-PCR na podstawie sekwencji izolatów terenowych pozwoliła na skuteczne rozróżnienie podtypów BVDV-1: 1a, 1b, 1d, 1e, 1f, 1g oraz BVDV-2a izolatów występujących w populacji bydła w Polsce. Za pomocą wybranych enzymów uzyskano 7 wzorów restrykcyjnych, z których każdy był specyficzny tylko dla jednego podtypu wirusa. Dzięki zastosowaniu analizy do badania wcześniej niesklasyfikowanych izolatów udało się zidentyfikować po raz pierwszy w Polsce podtyp 1e wirusa, uzyskując nowy wzór restrykcyjny. Wynik ten został potwierdzony metodą sekwencjonowania. Przeprowadzone badania pozwoliły na stwierdzenie, że analiza restrykcyjna umożliwia szybkie genotypowanie izolatów BVDV z dokładnością zbliżoną do sekwencjonowania.

Opracowana oryginalna metoda amplifikacji krzyżowej (CPA) z użyciem dwóch zestawów starterów umożliwia szybkie i ekonomiczne wykrywanie zakażeń BVDV-1 oraz BVDV-2. Technika CPA nie wymaga zastosowania drogiego i specjalistycznego sprzętu, a reakcja przeprowadzana jest w łaźni wodnej w warunkach stałej temperatury. Granica wykrywalności dla tej metody została oznaczona z użyciem rozcieńczeń standardów RNA, a jej czułość była wystarczająca, aby wykryć zwierzęta zakażone trwale. Jest to metoda jakościowa, która nie umożliwia rozróżnienia genotypów wirusa. Za pomocą tej metody można wykryć wszystkie genotypy wirusa, które do tej pory zidentyfikowano w Polsce. Oba zestawy starterów nie wykrywają izolatów atypowego pestiwirusa bydłowego, nie uzyskano również wyników fałszywie dodatnich w przypadku próbek ujemnych i kontroli ujemnej. Otrzymane wyniki zostały potwierdzone testem real-time RT-PCR oraz RT-PCR. Opracowana metoda diagnostyczna jest pierwszą na świecie, która wykorzystuje technikę CPA do wykrywania zakażeń BVDV.