

Praca oryginalna

Original paper

# Zastosowanie reakcji RT-PCR do identyfikacji szczepów wirusa krwotocznej choroby królików (RHD) wyisobnionych w Polsce

ANDRZEJ FITZNER, ANDRZEJ KĘSY, WIESŁAW NIEDBALSKI, GRAŻYNA PAPROCKA

Zakład Badania Przyszycy PIWet., ul. Wodna 7, 98-220 Zduńska Wola

Fitzner A., Kęsy A., Niedbalski W., Paprocka G.

## Application of RT-PCR for identification of viral haemorrhagic disease virus (RHDV) of rabbits isolated in Poland

### Summary

The aim of this study was to apply the method of reverse transcription coupled with PCR for the detection of RHDV RNA in livers of infected rabbits. All tested RHDV strains were isolated from outbreaks occurring in Poland over the last 10 years. The viral RNA was extracted by the guanidine thiocyanate-phenol-chloroform method or using the Rneasy Mini Kit (Qiagen) for rapid isolation of RNA. Each sample of purified RNA was reversely transcribed using AMV reverse transcriptase and antisense P5 (7071) primer chosen from 3'-end of the viral genome. The amplification of cDNA was performed in a reaction mixture containing two different pairs of primers: P1, P2 (320 bp) and P5, P6 (510 bp) from the capsid coding region of the viral genome. All isolates of RHDV gave positive RT-PCR products. RNA from livers of uninfected healthy rabbits gave negative results. The PCR technique is a rapid, specific and accurate diagnostic method and it can be useful for the detection of RHDV in diagnostic materials.

**Keywords:** Rabbit haemorrhagic disease virus, RNA detection, PCR.

Wirus krwotocznej choroby królików (RHDV) wywołuje zakaźną chorobę o ostrym przebiegu, dziesiątkującą hodowlę królika domowego. Po raz pierwszy został wyizolowany i opisany w Chinach ponad 14 lat temu (13). Od tego czasu ogniska wirusowej krwotocznej choroby królików (RHD) notuje się stale w Europie, Azji, Ameryce, Afryce. W Polsce pierwsze przypadki RHD stwierdzono w 1988 r., a wyizolowane szczepy wirusa oznaczono jako SGM i KGM (9). Na podstawie cech morfologicznych i właściwości fizyko-chemicznych wirus RHD został sklasyfikowany w rodzinie *Caliciviridae*. Spośród metod stosowanych do diagnostyki zakażeń wirusem RHD najpowszechniej wykorzystuje się odczyn hemaglutynacji (HA), którego ograniczeniem jest brak możliwości wykrywania tzw. szczepów HA-ujemnych; test immunoenzymatyczny (ELISA) używany w wielu modyfikacjach, polecany ze względu na czułość, swoistość reakcji i prostotę wykonania (5, 8, 10, 20) oraz techniki mikroskopii elektronowej, które ze względu na wysokie koszty nie są dostępne w każdym laboratorium.

Wirus RHD posiada dodatkowo spolaryzowaną (ss RNA+), pojedynczą nicię RNA zawartą w dwudziestociennym, bezotoczkowym kapsydzie. Genom wirusa (7,5 kb) został po raz pierwszy sklonowany przez Meyersa i wsp. (15), a następnie jego pełną sekwencję opublikował Rasschaert i wsp. wykazując 98% homologię sekwencji aminokwasowej (19). Sekwencje frag-

mentu genomu kodującego białko kapsydu przedstawili m.in. Boga i wsp. (2) dla szczepu wyizolowanego w Hiszpanii, Miltorn i wsp. (17) dla szczepów wyizolowanych w Czechach i Austrii, a także Guittre i wsp. (10), którzy wykazali identyczność sekwencji nukleotydów szczepów francuskich od 96 do 98%. Na podstawie badań molekularnych wiadomo, że genom wirusa RHD wykazuje znaczną homologię z innymi calicivirusami (Feline calicivirus – FCV, San Miguel sealion virus – SMSV, Vesicular exanthema virus of swine – VESV), jednakże jego organizacja jest odmienna, gdyż wyróżniono tylko dwie ramki odczytu – ORF, podczas gdy u innych członków tej rodziny występują 3 ORF. Sekwencja genomu RHDV wykazała duże podobieństwo z białkami niestrukturalnymi kociego kalicivirusu (FCV); stwierdzono, że N-końcowa część poliproteiny wirusa RHD, analogicznie do FCV, zawiera sekwencję aminokwasową helikazy (2C-like), rozpoznawaną u picornawirusów, hipotetyczny motyw proteazy cysteinowej (3C-like), a także pozycje GDD konserwatywnej polimerazy (RNA-dependent RNA polymerase). Różnice dotyczyły natomiast ekspresji genu odpowiedzialnego za produkcję białka strukturalnego. Główna ramka odczytu (ORF1) wirusa RHD o 2344 kodonach obejmuje prawie cały genom, od nukleotydu 10 do 7042 i koduje poliproteinę o wielkości 257 kDa, którą można rozdzielić na białka niestrukturalne (nt 1000 – 5000) i białko kapsydu VP60. Sekwen-

cja kodująca białko strukturalne znajduje się przy końcu 3' ORF1. Białko kapsydowe innych caliciwirusów jest kodowane przez oddzielną ramkę odczytu. Obok ORF1 występuje, mniejsza ramka odczytu – ORF2 (7025-7378) zawierająca 353 nukleotydy, która koduje białko VP12 o niesprecyzowanej dotychczas funkcji. Wyizolowano także subgenomowy RNA o wielkości 2,2 kb, który przypuszczalnie spełnia rolę w procesie replikacji (1–3, 12, 14–16, 18, 19).

W ostatnim okresie opisano zastosowanie reakcji RT-PCR, jako czulej i swoistej metody diagnostycznej, za pomocą której wykrywano RNA wirusa RHD. Badano liczne szczepy wirusa, głównie z europejskich ognisk choroby. Wirus ekstrahowano z różnych narządów wewnętrznych zakażonych królików (4, 10).

Celem pracy było zastosowanie metody PCR do identyfikacji RNA wirusa RHD – izolowanego z wątroby – z kolekcji szczepów wyosobnionych w kraju na przestrzeni ponad 10 lat od momentu pojawienia się choroby. Amplifikowano 2 fragmenty genomu, o wielkości 510 i 320 pz., pochodzące z konserwatywnej N-końcowej części regionu kodującego białko kapsydu i z 3'-końcowej części tego regionu.

### Materiał i metody

**Wirus RHD.** Wirus ekstrahowano z wątroby w postaci 20% zawiesiny w PBS, oczyszczonej przez chloroformowanie i odwirowanie. Do badań użyto oryginalne szczepy RHDV z własnej kolekcji: SGM-1988 (miano HA 1280), KGM-1988 (pasaż 3-1995, miano HA 10240), PD-1989 (miano HA 5120), MAL-1994 (miano HA 10240), BLA-1994 (HA-ujemny) i GSK-1998 (miano HA 2560) wyizolowany z ogniska chorobowego w hodowli królików miniaturowych. W przypadku szczepu KGM do ekstrakcji zastosowano materiał z 3 pasażu. Wirus ten oczyszczono przez odwirowanie w 17% poduszce sacharozy. Do próbek wirówkowych nawarstwiono po 1 ml 17% sacharozy i 2 ml wstępnie oczyszczonego antygeny. Wirowano przy 25 000 obr./min. w temp. 4°C przez 2 godz. 45 min (wirówka UP-65). Osad zawieszono w PBS.

Kontrolę negatywną stanowiła wątroba pobrana od królika zdrowego, wolnego od przeciwciał RHD.

**Izolowanie wirusowego RNA.** Wszystkie szczepy przed izolacją RNA poddano działaniu proteiny K (15 µl enzymu o stężeniu 14,4 µg/ml na 1000 µl zawiesiny) (Boehringer Mannheim) i inkubowano 1 godz. w temp. 37°C. RNA ekstrahowano wg metody Chomczyńskiego i Sacchi (7) stosując tiocjanian guanidyny, chloroform i fenol. Do 200 µl zawiesiny wirusa dodawano 400 µl buforu lizującego (4 M tiocjanian guanidyny, 25 mM cytrynian sodu pH 7, 0,5% sarcosyl i b-mercaptoethanol), 40 µl 2 M octanu sodu, 1 obj. fenolu oraz 2/10 obj. mieszaniny chloroform-alkohol izoamylowy (49:1). Po dokładnym wymieszaniu inkubowano 15 min. w 4°C i wirowano 30 min., 15 800 × g. Po zebraniu 2/3 fazy wodnej dodawano 1 obj. izopropanolu, inkubowano 2 godz. w temp. -20°C, po czym wirowano 30 min. 15 800 × g i supernatant odrzucano, osad suszono wirując 10 min. na wirówce próżniowej, zawieszano w 100 µl buforu lizującego, dodawano 10 µl 3 M octanu sodu. RNA precypitowano dodając 2,5 obj. etanolu, wytrząsano i inkubowano 1 godz. w -70°C. Po odwirowaniu osad przemywano etanolem, suszono i zawieszano w wodzie desty-

lowanej traktowanej DEPC. RNA izolowano także przy pomocy zestawu do szybkiej izolacji Rneasy Mini kit (Qiagen) wg procedury producenta.

**Primery (startery).** Użyto 2 par swoistych primerów oznaczonych jako P1 (5' gagctcgagcgcacaacaggc), P2 antysense (5' caaacacctgaccggcaac) oraz P5 antysense (5' gcacctgcaagtccaatccg) i P6 (5' acccagtagggcacaggctc). Ich wyboru dokonano za Guittre i wsp. (11, 12) na podstawie pełnej sekwencji genomu opublikowanej przez Meyersa i wsp. (15). Fragment P1 (5182-5201), P2 (5692-5671) o wielkości 510 pz pochodził z N-końcowej części regionu kodującego białko kapsydu, natomiast para P5 (7071-7051), P6 (6751-6770) koduje fragment 320 pz położony w końcu 3' regionu kodującego białko kapsydu. Syntezę primerów zlecono w firmie Isogen Bioscience B. V.

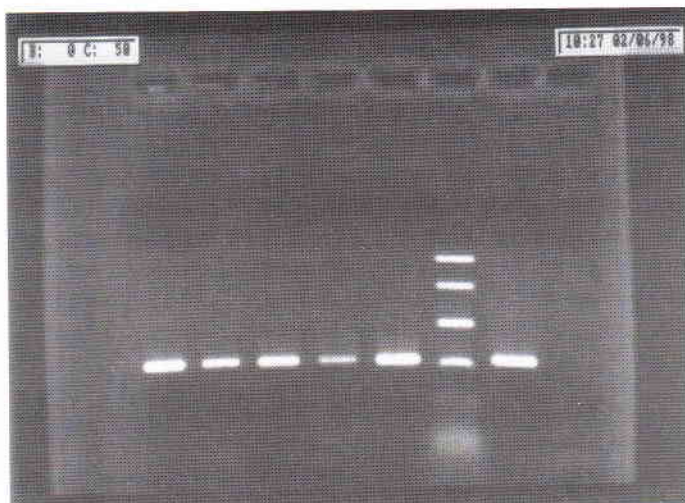
**Synteza cDNA.** Do reakcji odwrotnej transkrypcji użyto wirusowy RNA, swoisty antysensowny primer P5 (7071), mieszaninę dNTPa o koncentracji 10 mM każdy (Boehringer Mannheim), enzym odwrotną transkryptazę – AMV Reverse transcriptase (Boehringer Mannheim). Do 10 µl RNA zawieszonego w H<sub>2</sub>O DEPC dodano 1 µl (40 U/µl) inhibitora Rnazy, 2 µl primera antysensownego P5 RHDV i 10 µl H<sub>2</sub>O DEPC. Inkubowano 5 min. w 37°C i 20 min. w temp. pokojowej, a następnie dodano 4 µl buforu 5 × concentr. (z zestawu Rev. Transc. buffer – AMV Boehringer), 1 µl inhibitora RNazy, 2 µl dNTPs (mieszanina dATP, dCTP, dTTP, dGTP), 1 µl AMV Reverse Transcriptase (25 units/µl). Uzupełniono do 50 µl H<sub>2</sub>O dest. DEPC i inkubowano 20 min. w temp. pokojowej, a następnie 60 min. w temp. 42°C. Reakcję hamowano ogrzewając próbkę przez 3 min. w temp. 95°C. Próbkę cDNA przechowywano w temp. -20°C.

**Reakcja PCR.** Mieszanina reakcyjna PCR zawierała: parę primerów – P1 P2 lub P5 P6 po 2 µl, d(NTP)s – 2 µl, cDNA – 2 µl, 10 × bufor Taq polimerazy – 10 µl, Taq polimeraza (Ingen Sieradz) 1 µl (2,5 U/µl), H<sub>2</sub>O dest. do 100 µl, olej mineralny. Próbkę ogrzewano przez 1 min. w temp. 94°C. Reakcję amplifikacji prowadzono przez 35 cykli przy użyciu termocyklera Perkin-Elmer 480. Każdy cykl obejmował denaturację przez 1 min. w temp. 94°C, wiązanie primerów – 1 min. w temp. 55°C i elongację przez 1 min. w temp. 72°C. W ostatnim cyklu elongację prowadzono przez 10 minut.

**Analiza produktów PCR.** Produkty PCR rozdzielano w 1,3% żelu agarozowym i barwiono bromkiem etydyny. Stosowano marker PCR (Promega) – 1000, 750, 500, 300, 150, 50 pz. Produkt amplifikacji w obj. 10 µl mieszano z 2 µl barwnika denaturującego (98% formamid, 0,05% xylene cyanol, 0,05% błękit bromofenolowy, 10 mM EDTA, 2% glicerol), inkubowano 3 min. 95°C i наносzono na żel. Rozdział elektroforetyczny prowadzono w temp. pokojowej (100 V, 55 min.). Obraz dokumentowano przy pomocy systemu ImageStore 5000 (UVP).

### Wyniki i omówienie

Szczepy wirusa RHD – SGM, KGM, PD, MAL, BLA i GSK wyosobnione w Polsce w ciągu 10 lat od momentu wystąpienia pierwszych ognisk wirusowej krwotocznej choroby królików – identyfikowano na obecność RNA za pomocą metody RT-PCR. RNA wirusa RHD izolowano z tkanki wątrobowej metodą tiocjanian guanidyny-chloroform-fenol (7) lub stosując zestaw do szybkiej izolacji RNA (Qiagen). Każdą



Ryc. 1. Elektroforeza produktów PCR wirusa RHD dla pary primerów P5 (7071) i P6 (6751) – 320 p.z. w 1,3% agarozie. Szczepy wirusa (od lewej): 1 – SGM, 2 – KGM, 3 – BLA, 4 – PD, 5 – MAL, 6 – marker (1000, 750, 500, 300, 150, 50 p.z. – Promega), 7 – GSK, 8 – wątroba zdrowego królika (kontrola negatywna)

próbkę RNA poddano reakcji odwrotnej transkrypcji przy użyciu swoistego primera P5 (antysense), enzymu AMV Reverse Transcriptase (Boehringer) i użytkano cDNA. W reakcji amplifikacji użyto dwie pary swoistych primerów: P1, P2 (510 pz) z konserwatywnej części 5' kodującej białko kapsydu oraz P5, P6 (320 pz) z końca 3' tego regionu genomu.

W badaniach zidentyfikowano wirusowe RNA we wszystkich szczepach wirusowych w zawieszynie z wątroby, bez względu na zastosowaną metodę izolacji. Zarówno w szczepach hemaglutynujących jak i w szczepie HA-ujemnym uzyskano produkty o wielkości 320 i 510 p.z. z regionu kodującego strukturalne białko kapsydu. Nie otrzymano produktów amplifikacji RNA izolowanego z wątroby zdrowego królika – kontrola negatywna (ryc. 1 i 2) oraz z kontroli z wodą.

Uzyskane wyniki potwierdzają założenia, że zastosowana w naszym laboratorium reakcja RT-PCR jest wartościowym uzupełnieniem dotychczas wykorzystywanych testów diagnostycznych, która dostarcza nowej i wiarygodnej metody w diagnostyce RHD. Opublikowane pełne jak i częściowe sekwencje genomu wirusa, pochodzące z wielu ośrodków europejskich, wskazują, że jest on niezwykle stabilny wykazując 96-98% homologię nukleotydów dla różnych izolatów bez względu na rok izolacji, jak i pochodzenie geograficzne (2, 4, 10, 15, 17, 19). Primery określone na podstawie sekwencji genomu wirusa podanej przez Meyersa i wsp. (15) dobrze funkcjonują w reakcji odwrotnej transkrypcji i PCR (2, 4, 10, 11). Guitré i wsp. (10) dodaje, że reakcja RT-PCR jest  $10^4$  bardziej czuła niż test ELISA dla celów detekcji wirusa; granicę wykrywalności RNA określono na 12 kopii cDNA. Dotychczasowe badania wskazują też jednoznacznie, że genom wirusa RHD jest konserwatywny zarówno w części kodującej białka niestrukturalne jak i białko strukturalne. Jak podaje Milton (cyt. za 19) wysoka konserwatywność sekwencji aminokwasowej genomu



Ryc. 2. Elektroforeza produktów PCR wirusa RHD dla pary primerów P1 (5182) i P2 (5692) – 510 p.z. w 1,3% agarozie. Szczepy wirusa (od lewej): 1 – SGM, 2 – KGM, 3 – BLA, 4 – PD, 5 – MAL, 6 – marker (1000, 750, 500, 300, 150, 50 p.z. – Promega), 7 – GSK, 8 – wątroba zdrowego królika (kontrola negatywna)

znajduje potwierdzenie w efektach szczepień profilaktycznych. Jak dotąd nie stwierdzono przełamania odporności poszczepiennej na skutek zakażeń szczepami terenowymi wirusa.

Konserwatywne właściwości genomu wirusa RHD wykorzystano w badaniach diagnostycznych opartych o metody biologii molekularnej – reakcję odwrotnej transkrypcji i amplifikację cDNA. Łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR), ze względu na niezwykle czułość i swoistość, może być punktem wyjścia głównie do dalszych badań eksperymentalnych związanych z porównaniem sekwencji fragmentów genomu szczepów wirusa RHD wyisobnionych w Polsce.

## Piśmiennictwo

1. Boga J. A., Marin M. S., Casais R., Prieto M., Parra F.: *Virus Res.* 26, 33, 1992.
2. Boga J. A., Casais R., Marin M. S., Martin-Alonso J. M., Carmenes R. S., Prieto M., Parra F.: *J. Gen. Virol.* 75, 2409, 1994.
3. Boniotti B., Wirblich Ch., Sibilia M., Meyers G., Thiel H.-J., Rossi C.: *J. Virol.* 68, 6487, 1994.
4. Capucci L., Fusi P., Lavazza A., Pacciarani L. M., Rossi C.: *J. Virol.* 70, 8614, 1996.
5. Capucci L., Scicluna M. T., Lavazza A.: *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* 10 (2), 347, 1991.
6. Chasey D., Lucas M. H., Westcott D. G., Sharp G., Kitching A., Hughes S. K.: *Vet. Rec.*, 137 (7), 158, 1995.
7. Chomezyński P., Sacchi N.: *Analytical Biochemistry*, 162, 159, 1978.
8. Fitzner A., Niedbalski W.: *Bull. vet. Inst. Puławy* 40, 69, 1996.
9. Górski J., Mizak B., Mizak Z., Komorowski A.: *Zycie wet.* 63, 266, 1988.
10. Guitré C., Baginski I., Gall le G., Prave M., Trepo C., Cova L.: *Res. Vet. Sci.*, 58, 128, 1995.
11. Guitré C., Ruoven-Clouet N., Barraud L., Cherel Y., Baginski I., Prave M., Ganiere J. P., Trepo C., Cova L.: *J. Vet. Med. B* 43, 109, 1996.
12. Laurent S., Vautherot J.-F., Madeleine M.-F., Gall le G., Rasschaert D.: *J. Virol.* 68, 6794, 1994.
13. Liu S. J., Xue H. P., Pu B. Q., Qian N. H.: *Anim. Husb. Vet. Med.* 16, 253, 1984.
14. Martin Alonso J. M., Casais R., Boga J. A., Parra F.: *J. Virol.* 70, 1261, 1996.
15. Meyers G., Wirblich Ch., Thiel H.-J.: *Virology*, 184, 664, 1991.
16. Meyers G., Wirblich Ch., Thiel H.-J.: *Virology*, 184, 677, 1991.
17. Milton I. D., Vlasak R., Novotny N., Rodak L., Carter M. J.: *FEMSMicrob. Lett.* 93, 37, 1992.
18. Parra F., Boga J. A., Marin M. S., Casais R.: *Virus Res.* 27, 219, 1993.
19. Rasschaert D., Huguet S., Madelaine M.-F., Vautherot J.-F.: *Virus genes*, 9:2, 121, 1994.
20. Rodak L., Smid B., Valicek L., Vesely T., Stepanek J., Hampl J., Jurak E.: *J. gen. Virol.* 71, 1075, 1990.

Adres autora: dr Andrzej Fitzner, ul. Wodna 22/3, 98-220 Zduńska Wola