

# Pryszczyca i choroba pęcherzykowa świń – różnicowanie metodą PCR

GRAŻYNA PAPROCKA, ANDRZEJ KĘSY, WIESŁAW NIEDBALSKI, ANDRZEJ FITZNER

Zakład Pryszczycy Państwowego Instytutu Weterynaryjnego, ul. Wodna 7, 98-220 Zduńska Wola

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

## Foot-and-mouth and swine vesicular diseases - differential diagnosis using PCR

### Summary

The usefulness of specific primers for a differential diagnosis of FMDV and SVDV by nested PCR was evaluated. The set of primers selected from FMDV genome sequence successfully amplified FMDV RNA. By using a set of primers selected from the SVDV genome sequence, it was possible to amplify cDNA derived solely from this virus. The chosen sets of primers allowed a rapid and precise differential diagnosis of FMD and SVD viruses.

**Keywords:** foot-and-mouth disease virus, swine vesicular disease virus, primers.

Pryszczyca (Foot-and-mouth disease – FMD) i choroba pęcherzykowa świń (Swine vesicular disease – SVD) są chorobami wirusowymi o wysokiej zakaźności, zwalczanymi z urzędu. Ich przebieg i występujące objawy kliniczne są identyczne, a charakterystyczne zmiany pęcherzykowe zlokalizowane najczęściej na skórze kończyn i błonach śluzowych jamy gębowej. Z tego powodu ostateczne rozpoznanie opiera się wyłącznie o wyniki diagnostycznych badań laboratoryjnych. Badania te powinny być szybkie i precyzyjne, a użyte metody czułe i swoiste. Od nich zależy bowiem rodzaj zastosowanych środków do zwalczania choroby oraz dalszego postępowania epizootycznego. Współczesny poziom wiedzy związany z rozwojem biologii molekularnej umożliwił wprowadzenie diagnostyki opartej na technikach DNA.

Celem pracy było określenie przydatności wybranych starterów do różnicowania wirusów pryszczycy i choroby pęcherzykowej świń metodą łańcuchowej reakcji polimeryzacji (Polymerase Chain Reaction, PCR).

### Materiał i metody

**Wirus.** W badaniach wykorzystano izolaty FMDV i SVDV pochodzące z własnej kolekcji, przechowywane w temperaturze  $-70^{\circ}\text{C}$  w postaci 10% homogenizatów nabłonków pęcherzy i zawiesiny zakażonych hodowli komórek. Kontrolą negatywną była nie zakażona zawiesina hodowli komórek.

**Oznaczenie infekcyjności próbek.** Wybranymi do badań izolatami zakażano wrażliwe hodowle komórek linii ciągłych IB-RS-2, BHK-21 i inkubowano w temperaturze  $37^{\circ}\text{C}$ . Wystąpienie efektu cytopatycznego (CPE) świadczyło o obecności infekcyjnego wirusa. Różnicowanie izolatów testem ELISA. Wirusy identyfikowano testem ELISA wg schematu przedstawionego we wcześniejszych pracach (10, 11).

**Ekstrakcja RNA.** Wirusowe RNA izolowano przy pomocy komercyjnego zestawu RNAsy (QIAGEN).

**Startery.** Do reakcji odwrotnej transkrypcji zastosowano starter p(dN)<sub>6</sub>. Reakcję nested PCR wykonywano przy użyciu dwóch zestawów starterów I, II. W skład I wchodziły pary starterów zewnętrznych P1, P3 i wewnętrznych NK, P3 zaprojektowanych w oparciu o sekwencję genomu wirusa pryszczycy. Zestaw II zawierał pary starterów zewnętrznych EX2, EX1, i wewnętrznych P1S, P1AS uzyskanych na podstawie sekwencji genomu wirusa choroby pęcherzykowej świń. Przy wyborze starterów wzorowano się na pracach innych autorów (1, 2, 4). Ich sekwencje i lokalizację w genomach wirusów przedstawiono w tab. 1.

**Reakcja odwrotnej transkrypcji (Reverse transcription – RT).** Do około 5  $\mu\text{g}$  RNA dodawano 75 ng startera p(dN)<sub>6</sub> (Boehringer). Po uzupełnieniu sterylną, dejonizowaną wodą do objętości 20  $\mu\text{l}$ , próbkę ogrzewano przez 5 minut w temperaturze  $70^{\circ}\text{C}$ , schładzano w łaźni lodowej, a następnie dodawano 5  $\mu\text{l}$  5  $\times$  buforu do RT (Boehringer), 2  $\mu\text{l}$  10 mM dNTPs i 1  $\mu\text{l}$  (20U) AMV odwrotnej transkryptyzy (Boehringer). Mieszaninę w objętości 50  $\mu\text{l}$  inku-

Tab. 1. Sekwencje starterów wykorzystanych w badaniach

PCR	Nested PCR
I etap	II etap
<b>Zestaw I</b> <b>Startery zewnętrzne:</b> <b>P1-5` GAAGGGCCAGGGTTGGACT 3`</b> <b>Lokalizacja w regionie 2A genomu FMDV</b> <b>P3-5` CCTACCTCCTTCAACTACGG 3`</b> <b>Lokalizacja w regionie 1D genomu FMDV</b>	<b>Zestaw I</b> <b>Startery wewnętrzne:</b> <b>NK-5` ACGTCTCCCGCCAACCTT 3`</b> <b>region 1D genomu FMDV</b> <b>P3-5` CCTACCTCCTTCAACTACGG 3`</b> <b>region 1D genomu FMDV</b>
<b>Zestaw II</b> <b>Startery zewnętrzne:</b> <b>EX2-5` TACACGGCACCAGACTGCT 3`</b> <b>Lokalizacja w regionie 2A genomu SVDV</b> <b>EX1-5`-ATTGCCCGCGTCGTGATA 3`</b> <b>Lokalizacja w regionie 1D genomu SVDV</b>	<b>Zestaw II</b> <b>Startery wewnętrzne:</b> <b>P1S-5` CGGACCAGTTAACTCGGAATC 3`</b> <b>region 1D genomu SVDV</b> <b>P1AS-5`CGTACAAGATAGTGCCACCCGG 3`</b> <b>region 1D genomu SVDV</b>

bowano 20 minut w temperaturze pokojowej, następnie przez 60 minut w temperaturze 37°C.

**Amplifikacja cDNA.** Amplifikacja odbywała się w 2 etapach. Produkt pierwszego etapu reakcji reamplifikowano w drugim (nested PCR), przy użyciu starterów położonych wewnątrznie w stosunku do zastosowanych w pierwszym etapie. Do 5 µl produktu reakcji RT (I etap) lub 2 µl produktu pierwszego PCR (II etap) dodawano 5 µl buforu 10 × PCR (Boehringer), 3 µl 10 mM dNTPs, 50 ng każdego ze starterów, 1,5 jednostki Taq polimerazy (Boehringer) oraz sterylną, dejonizowaną wodę do objętości 50 µl. Każdą próbkę badano dwukrotnie używając I i II zestawu starterów. Warunki reakcji w obu etapach były identyczne. Reakcje przebiegały podczas 30 cykli w aparacie Perkin-Elmer 480 wg następującego programu termicznego: 93°C – 2 min., 55°C – 2 min., 72°C – 5 min.

**Analiza uzyskanych produktów amplifikacji.** Produkty rozdzielano elektroforetycznie w 1,5% żelach agarozowych i barwiono bromkiem etydyny. Używano wzorca G316A (Promega). Żele analizowano przy użyciu automatycznego systemu – Imagistore 5000 (Ultra Violet Products Ltd. Cambridge, U.K.).

### Wyniki i omówienie

Z przeglądu piśmiennictwa wynika, że metoda PCR ze względu na swoje zalety takie jak wysoka czułość i specyficzność znalazła zastosowanie do wykrywania wirusów pryszczycy i choroby pęcherzykowej świń (3, 5, 8, 13, 14). W niniejszej pracy oceniono przydatność wybranych dwu zestawów starterów do różnicowania FMDV i SVDV metodą nested PCR. Uzyskane wyniki wykazały, że badane izolaty posiadają aktywność wyłącznie wobec specyficznych zestawów starterów. Pary starterów wyselekcjonowane w oparciu o sekwencję genomu wirusa pryszczycy umożliwiły wykrycie RNA izolatów tylko tego wirusa. Nie spowodowały natomiast amplifikacji cDNA izolatów wi-



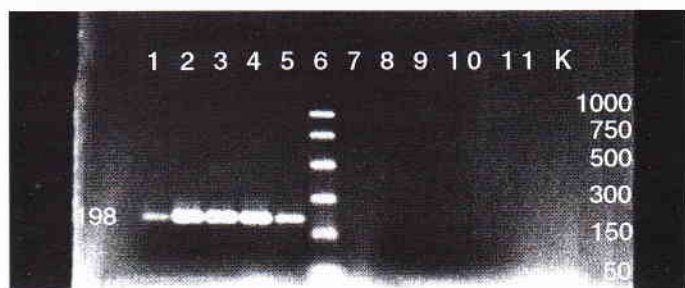
Ryc. 1. Elektroferogram produktów amplifikacji cDNA wirusa choroby pęcherzykowej świń i wirusa pryszczycy z wykorzystaniem pary starterów: EX1 i EX2 oraz P1AS i P1S. Ścieżka 1: wzorzec DNA (Promega), ścieżka 2: SVDVP1/73, ścieżka 3: SVDV6 (Wilcze), ścieżka 4: SVDV10 (Orneta), ścieżka 5: SVDV22 (Pasłek), ścieżka 6: SVDV30 (Jarocin), ścieżka 7: FMDV O/52, ścieżka 8: FMDV O/57, ścieżka 9: FMDV C/14, ścieżka 10: FMDV A/19, ścieżka 11: FMDV A/35, K: niezakażona hodowla komórek IBRS-2

rusa choroby pęcherzykowej świń. W reakcji nested PCR otrzymano produkt amplifikacji o oczekiwanej wielkości 198 pz. Stosując pary starterów zaprojektowane na podstawie sekwencji nukleotydowych genomu SVDV powielono wyłącznie fragment cDNA izolatów tego wirusa, wielkości 537 pz. W negatywnych próbkach kontrolnych produktów amplifikacji nie wykazano (ryc. 1, 2). Wyniki różnicowania badanych wirusów porównano i potwierdzono klasycznymi metodami diagnostycznymi zalecanymi przez Manual OIE (7). Schemat postępowania przedstawiono w tab. 2. Pozwalają one ocenić pozytywnie zastosowaną metodę jako użyteczną do różnicowania FMDV i SVDV. PCR jest aktualnie bez wątpliwości najważniejszą techniką biologii molekularnej, która umożliwia rozwój precyzyjnej diagnostyki wirusologicznej. Badania z

Tab. 2. Wykrywanie FMDV i SVDV

izolaty wirusów	Hodowla IB-RS-2	Hodowla BHK-21	Test ELISA	PCR Startery z genomu FMDV	PCR Startery z genomu SVDV
<b>FMDV:</b>					
1. O/52 nabłonek	+	+	typ O	+	-
2. O/57 hodowla	+	+	typ O	+	-
3. C/14 hodowla	+	+	typ C	+	-
4. A/19 nabłonek	+	+	typ A	+	-
5. A/35 hodowla	+	+	typ A	+	-
<b>SVDV:</b>					
1. P1/73 hodowla	+	-	SVDV	-	+
2. 6/Wilcze hodowla	+	-	SVDV	-	+
3. 10/Orneta hodowla	+	-	SVDV	-	+
4. 22/Pasłęk hodowla	+	-	SVDV	-	+
5. 10/Jarocin hodowla	+	-	SVDV	-	+

Objaśnienia: + dodatni wynik odczytu, - ujemny wynik odczytu, nabłonek - nabłonek z pęcherzy, hodowla - zawiesina zakażonych komórek.



Ryc. 2. Elektroferogram produktów amplifikacji cDNA wirusa wirusa pryszczycy i choroby pęcherzykowej świń z wykorzystaniem pary starterów: P1 i P3 oraz NK i P3. Ścieżka 1: FMDV O/52, ścieżka 2: FMDV O/57, ścieżka 3: FMDV C/14, ścieżka 4: FMDV A/19, ścieżka 5: FMDV A/35, ścieżka 6: wzorec DNA (Promega), ścieżka 7: SVDVPL/73, ścieżka 8: SVDV6 (Wilcze), ścieżka 9: SVDV10 (Orneta), ścieżka 10: SVDV22 (Pasłęk), ścieżka 11: SVDV30 (Jarocin), K: niezakażona hodowla komórek IBRS-2

ostatnich lat świadczą o przydatności łańcuchowej reakcji polimeryzacji do diagnozowania pryszczycy i choroby pęcherzykowej świń (6, 9, 12). Podkreślić należy, że w szczególnych okolicznościach, przy niewystarczającej ilości materiału do badań lub jego nieodpowiedniej jakości, kiedy użycie metod konwencjonalnych jest ograniczone lub wręcz niemożliwe, PCR stwarza szansę na uzyskanie szybkiego i pewnego rozpoznania. Pomyślnie włączenie łańcuchowej reakcji polimeryzacji do wykrywania FMDV i SVDV stano-

wi niewątpliwym postępowaniem w diagnostyce groźnych chorób, ważnych zarówno ze względów ekonomicznych jak i epizootycznych.

Użyte zestawy starterów pozwalają różnicować wirusy pryszczycy i choroby pęcherzykowej świń w łańcuchowej reakcji polimeryzacji.

### Piśmiennictwo

1. Donn A., Martin L. A., Donaldson A. I.: J. Virol. Methods 49, 179, 1994.
2. Forss S., Strebler K., Beck E., Schaller H.: Nucleic Acids Res. 12, 6587, 1984.
3. Hofner M., Carpentner W. C., Donaldson A. I.: J. Virol. Methods 42, 53, 1993.
4. Inoue T., Suzuki T., Sekiguchi K.: J. Gen. Virol. 70, 189, 1989.
5. Laor O., Yadin H., Chai D., Becker Y.: J. Vet. Med. 46, 127, 1991.
6. Locher F., Suryanarayana V. V. S., Tratschin I. D.: J. Clin. Microbiol. 42, 440, 1995.
7. Manual of Standards for Diagnostic Tests and vaccines. OIE, Paris 1996.
8. Marquardt O., Ohlinger V. F.: J. Virol. Methods 53, 189, 1995.
9. Mayer R., Brown C. C., House C., House I. A., Molitor T. W.: J. Virol. Methods 34, 161, 1991.
10. Niedbalski W., Kęsy A., Paprocka G., Fitzner A.: Instrukcja badania laboratoryjnego w kierunku pryszczycy i choroby pęcherzykowej świń. Puławy, 1994.
11. Paprocka G., Kęsy A., Niedbalski W., Fitzner A.: Biotechnologia 36, 131, 1997.
12. Reid S. M., Forsyth M. A., Hitchings G. H., Ferris N. P.: J. Virol. Methods 70, 213, 1998.
13. Rotbart H. A.: PCR amplification of Enteroviruses. Academic Press, Inc., 1990, s. 372.
14. Salt J. S.: Br. Vet. J. 149, 207, 1993.

Adres autora: dr Grażyna Paprocka, ul. Spacerowa 70/5, 98-220 Zduńska Wola