

# Różnicowanie wirusa choroby pęcherzykowej świń (SVDV) metodą amplifikacji DNA *in vitro*

WIESŁAW NIEDBALSKI, ANDRZEJ KĘSY, ANDRZEJ FITZNER

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

Niedbalski W., Kęsy A., Fitzner A.

## Differential diagnosis of swine vesicular disease virus (SVDV) by DNA amplification *in vitro*

### Summary

The aim of the study was to estimate the usefulness of RT-PCR for differential diagnosis of SVDV and other picornaviruses. Amplification of cDNA was performed using three pairs of primers selected from conservative and variable regions of the SVDV genome. A comparison was made between the effectiveness of amplifying chosen fragments of SVDV, anti-genically related Coxsack virus (CAV-16D) and foot-and-mouth disease virus (FMDV) causing similar clinical symptoms.

Our results indicate that the most suitable primers for SVDV detection were from the 2A (or 1D/2A) viral genome, whereas amplimers from the highly variable 1B coding region should be used to differentiate virus strains. Applying these primers resulted in differentiating SVDV isolates from the 1970s and 90s. A high sensitivity and specificity of RT-PCR was found. By means of this technique it was possible to detect RNA in virus preparations with a titre of  $10^5$  TCID<sub>50</sub>. The specificity was evaluated by restriction analysis (RFLP) with nuclease AluI of 1D/2A amplicon. One specific site was recognised by this enzyme and, as the result of digestion, two products (440 and 225 bp) were obtained.

**Keywords:** swine vesicular disease virus (SVDV), diagnostics, RT-PCR, differentiation.

Choroba pęcherzykowa świń (SVD) – zakaźna choroba, której czynnikiem etiologicznym jest enterowirus świń, z rodziny *Picornaviridae*, rodzaju *Enterovirus* (20). W latach siedemdziesiątych wirus choroby pęcherzykowej świń (SVDV) spowodował panzootię w Europie oraz na znacznych obszarach Azji (13). W Polsce również odnotowano pojedyncze ogniska choroby, zostały one jednak szybko zlikwidowane i od 1974 r. kraj posiada status wolnego od SVD. W Europie na początku lat dziewięćdziesiątych choroba wystąpiła ponownie we Włoszech, Holandii, Hiszpanii i Belgii (17). Najnowsze dane Międzynarodowego Urzędu ds. Epizootii (OIE) w Paryżu, potwierdzają jej występowanie w Lombardii (Włochy) od listopada 1998 r. do lutego 1999 r. (1).

Intensywna wymiana handlowa i turystyczna, a także polityka wolnego rynku powodują, że na obszarze Europy i państw sąsiadujących wzrasta realnie zagrożenie wybuchem choroby. Sprzyja temu szczególnie handel żywymi zwierzętami, mięsem oraz produktami zwierzęcego pochodzenia. Utrzymanie korzystnej sytuacji epizootycznej w Polsce wymaga odpowiednich działań profilaktycznych. Jednym z nich jest doskonalenie laboratoryjnych metod diagnostycznych, które umożliwiają szybką i precyzyjną ocenę stanu zdrowia zwierząt.

W Zakładzie Pryszczycy PIWet. rutynowo stosuje się metodę izolacji wirusa we wrażliwych hodowlach komórkowych oraz test ELISA (22). Ponadto opracowano i wdrożono technikę PCR do wykrywania SVDV w hodowlach wrażliwych komórek (23) oraz w materiałach klinicznych (16, 24, 26). Zastosowanie reakcji amplifikacji z użyciem specyficznych starterów wyselekcjonowanych z konserwatywnego i zmiennego mutacyjnie fragmentu genomu wirusa SVD pozwoliło ocenić pokrewieństwo polskiego izolatu SVDPL/73 i brytyjskiego UKG27/72 (23).

Celem pracy była ocena przydatności metody PCR w diagnostyce różnicowej szczepów wirusa SVD i innych pikornawirusów.

### Materiał i metody

**Wirusy.** Do badań użyto pięć polskich szczepów wirusa SVD wyizolowanych w różnych regionach kraju w latach 1972-1974: SVD/6 (Wilcze), SVD/15 (Kraków-Pawlikowice), SVD/22 (Pasłęk), SVDPL/73 (Manieczki) oraz SVDPD (Dobiegiew), z własnej kolekcji oraz uzyskane dzięki uprzejmości Prof. dr hab. K. Malickiego z Wydziału Weterynaryjnego SGGW w Warszawie. Wirusy namnażano w hodowli komórek linii IB-RS-2 zgodnie z metodą opisaną uprzednio (23). Miana infekcyjne wirusów w zależności od szczepów wynosiły od  $10^6$  do  $10^8$  TCID<sub>50</sub>/ml.

Do badań wykorzystano także inaktywowane szczepy wirusa SVD udostępnione komercyjnie wraz z zestawami diagnostycznymi: izolat brytyjski – UKG27/73 (Stafford) i włoski – ITL/2/73 (Lazio) oraz inaktywowane antygeny wirusa pryszczycy: A<sub>5</sub>Allier, O<sub>1</sub>BFS i C<sub>3</sub>Resende, ze Światowego Laboratorium Referencyjnego ds. Pryszczycy w Pirbright (Anglia).

**Izolacja RNA.** Całkowite RNA izolowano stosując standardową procedurę ekstrakcji mieszaniną: tjoecjanian guanidyny-fenol-chloroform i wytrącanie etanolem (8). Stosowano także zestaw do szybkiej izolacji: RNAasy kit (QIAGEN) (25). Ponadto badano preparaty RNA wyizolowane z następujących szczepów wirusa SVD: niemiecki – D6494/74 (Krefeld), włoski – ITL/92 (Marche) i holenderski – NET/3/92 (Edge) oraz Coxsackie CAV-16 D, otrzymane dzięki uprzejmości dr hab. O. Marquardt'a z Federalnego Centrum Chorób Wirusowych Zwierząt w Tübingen (Niemcy).

**Startery.** Krótkie fragmenty oligonukleotydom komplementarne do fragmentu regionu kodującego białka kapsydowe 1D i 1B oraz niestrukturalne 2A zaprojektowano w oparciu o pełną sekwencję genomu wirusa SVD i Coxsackie (14, 15, 30, 32). Sekwencję, pozycję nukleotydową oraz lokalizację w genomie poszczególnych starterów przedstawiono w tab. 1.

**RT-PCR.** Syntezę cDNA oraz jego amplifikację metodą PCR wykonano zestawem Ready-To-Go You-Prime First-Strand Beads (Pharmacia) (25).

**Czułość reakcji PCR.** Minimalna liczba cząstek wirusa, którą można wykryć metodą amplifikacji cDNA, została określona wobec laboratoryjnego szczepu SVD/6 (Wileze) o mianie infekcyjnym w hodowli komórek IBRS-2  $10^8$  TCID<sub>50</sub>/ml. Po wykonaniu 10-krotnych rozcieńczeń od  $10^{-3}$  do  $10^{-8}$  (100 000-0,01 TCID<sub>50</sub>), izolowano RNA, a następnie cDNA syntetyzowano i amplifikowano w reakcji RT-PCR.

**Specyficzność procesu amplifikacji.** Wykonano analizę restrykcyjną (ang. Restriction Fragment Length Polymorphism-RFLP) endonukleazą AluI ampikonu zawierającego fragment regionu genomu kodującego polipeptyd 1D/2A. Enzym ten rozpoznaje i przecina łańcuch DNA w obrębie specyficznej sekwencji czterech par nukleotydów: 5'....AG/CT....3', gdzie znak / oznacza miejsce rozszczepienia. Do 20 µl produktu PCR dodawano 3 µl 10 × buforu stabilizującego reakcję nukleazy oraz 3 µl (8-12 jedn.) enzymu restrykcyjnego AluI (Boehringer). Proces trawienia prowadzono przez 3 godz. w temp. 37°C, a następnie produkty cięcia analizowano elektroforetycznie.

**Analiza produktów PCR i trawienia restryktazą AluI.** Do 5 µl próbki dodawano 1 µl buforu obciążającego (0,05% cyjanoksylen, 0,05% błękit bromofenolowy, 10 mM EDTA i 3% glicerol) i nanoszono na 1,3% żel agarozowy. Elektroforezę prowadzono przez 1 godz. przy 70V w buforze 1 × TBE (0,04 M Tris-HCl, 89 mM kwas borowy i 2 mM EDTA). Jako wzorzec masy molekularnej stosowano PCR marker (Promega) o wielkości fragmentów: 1000, 750, 500, 300, 150 i 50 pz. Po zakończeniu rozdzielania elektrofore-

Tab. 1. Startery stosowane w reakcji amplifikacji cDNA wirusa SVD

Starter	Sekwencja	Pozycja nukleotydowa	Lokalizacja w genomie
1A	CGACAACCTTCGCCTACTGGGT	2704-2724	1D (VP1)
1B	CCACACACAGTTTTGCCAGTC	3377-3398	2A
2A	CTGGTGGTGGGAAGTTCCCTGACG	1180-1203	1B (VP2)
2B	CTTGTGTCTGAACATGTTGTCCA	1575-1598	1B (VP2)
SVDV3244	ACCCACTGGTGTGACTGAGGGTA	3244-3266	1D(VP1)
SVDV3502	TCAAATGTGACTGGATAGTGCT	3503-3523	2A

tycznego żele barwiono w roztworze bromku etydydy (1 µg/ml) i analizowano przy pomocy automatycznego systemu – Imagestore 5000 z oprogramowaniem GelBase/GelBlot ProPc (Ultra Violet Products Ltd, Cambridge, U.K.).

### Wyniki i omówienie

Różnicowanie wirusa choroby pęcherzykowej świń wykonywano dotychczas za pomocą konwencjonalnych metod serologicznych (3-6, 9, 21) i biochemicznych (10, 11, 12). W ostatnich latach coraz powszechniej jednak wprowadzane są wysoce czułe i specyficzne metody biologii molekularnej. Umożliwiają one bardziej precyzyjną charakterystykę wirusa i ocenę jego zmienności (2, 25, 27-29, 33). W niniejszej pracy poddano ocenie przydatność testu PCR do różnicowania szczepów SVDV i pokrewnego mu wirusa Coxsackie, a także powodującego podobne objawy kliniczne wirusa pryszczycy.

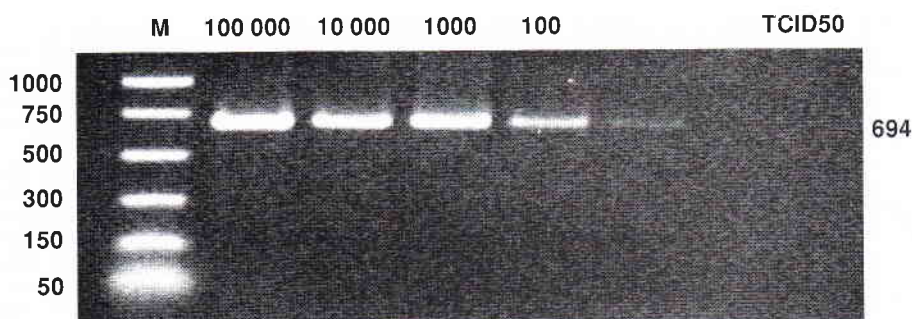
Wyniki amplifikacji cDNA *in vitro* ujawniły różnice w skuteczności powielania określonych regionów genomu wirusa SVD oraz Coxsackie i pryszczycy w zależności od użytych starterów (tab. 2). Reakcja PCR ze starterami 3 i 4 dała produkty o długości 694 pz dla wszystkich badanych izolatów wirusa SVD, natomiast nie zachodziła z wirusami Coxsackie (CAV-16 D) oraz pryszczycy typu A, O i C. Różnice zarówno w obrębie szczepów wirusa SVD jak i pomiędzy nimi i CAV-16D wykazano ze starterami 7 i 8 flankującymi fragment regionu 1B(VP2); w wyniku amplifikacji cDNA krajowych izolatów SVDV oraz UKG27/73, ITL/2/73 i D6494/73 powstał produkt o długości 418 pz. Próba powielenia cDNA izolatów z lat dziewięćdziesiątych (ITL/92 i NET/92), a także wirusa Coxsackie i pryszczycy dała wynik ujemny. Wykrycie wszystkich szczepów SVDV oraz wirusa Coxsackie możliwe było dzięki zastosowaniu w reakcji PCR pary ampimerów 9-10 z konserwatywnego regionu genomu, kodującego białko niestrukturalne 2A. Wynikiem amplifikacji cDNA wszystkich badanych enterowirusów był produkt o wielkości 279 pz.

Na podstawie uzyskanych rezultatów należy stwierdzić, że do diagnostyki rozpoznawczej SVDV najbardziej odpowiednie są startery wyselekcjonowane z re-

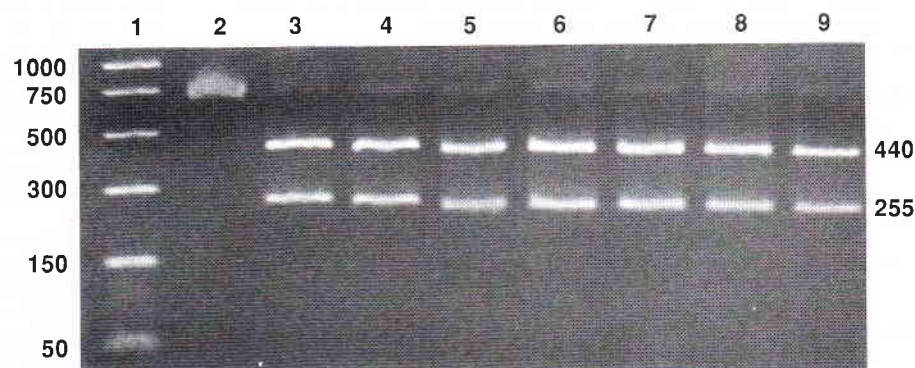
gionu kodującego 2A, natomiast do jego różnicowania – amplimery z regionu 1B o najwyższej zmienności genetycznej (31).

Próg czułości metody RT-PCR został oznaczony na poziomie 10 TCID<sub>50</sub> (ryc. 1). Określona przez Lina i wsp. (18, 19) dziesięciokrotnie niższą czułość amplifikacji fragmentu 1D wirusa ITL/93 można wyjaśnić nieco odmiennymi warunkami reakcji PCR oraz użyciem innych starterów. Callens i DeClerq (7) opracowali ostatnio immunoenzymatyczną metodę detekcji amplikonów znakowanych digoksygeniną (DIG-PCR-ELISA), która pozwoliła uzyskać czułość reakcji RT-PCR na poziomie 0,1 TCID<sub>50</sub>.

Dowodem wysokiej specyficzności reakcji amplifikacji są wyniki analizy restrykcyjnej nukleazą AluI amplikonu kodującego region 1D/2A. W obrębie tego fragmentu stwierdzono występowanie miejsca restrykcyjnego rozpoznawanego



Ryc. 1. Czulość metody RT-PCR



Ryc. 2. Elektroferogram produktów trawienia nukleazą AluI amplikonu z regionu 1D/2A wirusa SVD. Ścieżka 1: marker (Promega), ścieżka 2: kontrola (produkt PCR wirusa SVD/6 nie trawiony enzymem), ścieżki 3-9: SVDPL/73, SVD/6, SVD/22, SVD/15, ITL/2/73, ITL/92, NET/3/92

Tab. 2. Wyniki reakcji RT-PCR szczepów wirusa SVD, Coxsackie i pryszczycy ze starterami powielającymi trzy różne regiony genomu

Izolaty		Powielany region genomu (startery)		
		1D/2A (1-2)	1B (3-4)	2A (5-6)
SVDV	SVDPL/73	+	+	+
	SVD/6	+	+	+
	SVD/15	+	+	+
	SVDPD	+	+	+
	UKG27/73	+	+	+
	ITL/72	+	+	+
	D6494	+	+	+
	ITL/92	+	-	+
Coxsackie	CAV-16D	-	-	+
	A <sub>3</sub> Allier	-	-	+
Wirus pryszczycy:	O <sub>1</sub> BFS	-	-	-
	C <sub>3</sub> Resende	-	-	-

Objaśnienia: + wynik dodatni, - wynik ujemny.

przez enzym i w wyniku cięcia uzyskano dwa produkty o spodziewanej wielkości 440 i 255 pz (ryc. 2).

Reasumując można stwierdzić, że technika PCR, ze względu na wysoką czułość i specyficzność, jest skuteczną metodą umożliwiającą różnicowanie szczepów SVDV wyisobnionych w latach siedemdziesiątych i dziewięćdziesiątych. Na tej podstawie możliwa jest ocena pokrewieństwa terenowych izolatów SVDV z różnych ognisk chorobowych. Metoda amplifikacji cDNA *in vitro* pozwala ponadto określić odrębność genetyczną wirusa SVD i innych pikornawirusów.

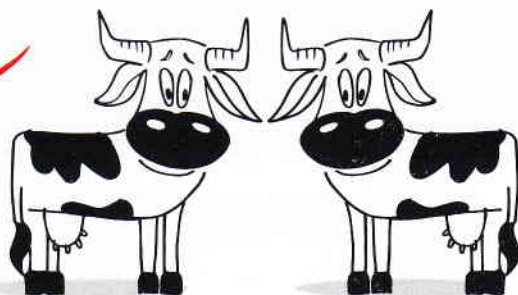
## Piśmiennictwo

- Anon. Swine vesicular disease – Italy (Lombardy & Lazio) <http://www.healthnet.org/programs/promed.html>
- Brocchi E., Zhang G., Knowles N. J., Wilsden G., McCauley J. W., Marquardt O., Ohlinger V. F., De Simone F.: Molecular epidemiology of recent outbreaks of swine vesicular disease: two genetically and antigenically distinct variants in Europe, 1987-94. *Epidemiol. Infect.* 1997, 118, 51-58.
- Brooksby J. B.: Swine vesicular disease: A statement from Pirbright. *Vet. Rec.* 1972, 91, 681-685.
- Brown F., Talbot P., Burrows R.: Antigenic differences between isolates of swine vesicular disease virus and their relationship to Coxsackie B-5 virus. *Nature/London/* 1973, 245, 315-316.
- Brown F., Wild T. F., Rowe L. W., Underwood B. O., Harris T. J. R.: Comparison of swine vesicular disease virus and Coxsackie B5 virus by serological and RNA hybridisation methods. *J. Gen. Virol.* 1976, 31, 231-238.
- Burrows R., Mann J. A., Goodridge D.: Swine vesicular disease: comparative studies of viruses isolated from different countries. *J. Hyg. Camb.* 1974, 73, 109-116.
- Callens M., De Clercq K.: Highly sensitive detection of swine vesicular disease virus based on a single tube RT-PCR system and DIG-ELISA detection. *J. Virol. Methods* 1999, 77, 87-96.
- Chomezyński P., Sacchi N.: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 1978, 162, 156-159.

9. De Simone, Panina G. F., Lodetti E.: Diagnosi sierologica della malattia vesicolare dei suini da enterovirus. Vet. Italiana 1974, 25, 220-223.
10. Harris T. J. R., Brown F.: Correlation of polypeptide composition with antigenic variation in the swine vesicular disease and coxsackie B5 viruses. Nature 1975, 258, 758-759.
11. Harris T. J. R., Doel T. R., Brown F.: Molecular aspects of the antigenic variation of swine vesicular disease and Coxsackie B5 viruses. J. Gen. Virol. 1977, 35, 299-306.
12. Harris T. J. R., Underwood B. O., Knowles N. J., Crowther J. R., Brown F.: Molecular approach to the epidemiology of swine vesicular disease: Correlation of variation in the virus structural polypeptides with serological properties. Infect. Immunol. 1979, 24, 593-540.
13. Hedger R. S., Mann J. A.: Swine vesicular disease virus. W: Virus infections of vertebrates 2, virus infections of porcines (Pensaert, M. M., ed), Elsevier Science Publishers B. V., 1989, s. 241-250.
14. Izuka N., Kuge S., Namoto A.: Complete nucleotide sequence of the genome of Coxsackie virus B1. Virology 1987, 156, 919-925.
15. Inoue T., Suzuki T., Seiguchi K.: The complete nucleotide sequence of swine vesicular disease virus. J. Gen. Virol. 1989, 70, 919-934.
16. Kęsy A., Niedbalski W., Fitzner A., Paprocka G.: Wykrywanie RNA wirusa choroby pęcherzykowej świń (SVD) w materiałach klinicznych metodą PCR. Medycyna Wet. 1997, 53, 270-273.
17. Knowles N. J.: Worldwide occurrence of swine vesicular disease (1966-1999) <http://www.iah.bbsrc.ac.uk/virus/Picornaviridae/enterivirus/svdvdist.htm>
18. Lin F., Mackay D. K. J., Knowles N. J.: The persistence of swine vesicular disease virus infection in pigs. Epidemiol. Infect. 1998, 121, 459-468.
19. Lin F., Mackay D. K. J., Knowles N. J.: Detection of swine vesicular disease RNA by reverse transcription-polymerase chain reaction. J. Virol. Methods 1997, 65, 111-126.
20. Murphy F. A., Fauquet C. M., Bishop D. H. L., Ghabrial S. A., Jarvis A. W., Martelli G. P., Mayo M. A., Summers M. D. (eds): Virus taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Sixth Report of the International Committee on taxonomy of Viruses, Springer, Wien., New York, Arch. Virol., Suppl. 1995, 10, s. 586.
21. Mowat G. N., Derbyshire J. H., Huntley J. F.: Differentiation of a vesicular disease of pigs in Hong Kong from foot-and-mouth disease. Vet. Rec. 1972, 90, 618-624.
22. Niedbalski W., Kęsy A., Fitzner A., Paprocka G.: Choroba pęcherzykowa świń – aktualne metody diagnostyczne. Medycyna Wet. 1998, 54, 449-454.
23. Niedbalski W., Kęsy A., Paprocka G., Fitzner A.: Detection of SVD RNA amplified by the polymerase chain reaction (PCR). Bull. Vet. Inst. Pulawy, 1995, 39, 85-90.
24. Niedbalski W., Kęsy A., Paprocka G., Fitzner A.: Wykrywanie RNA wirusa choroby pęcherzykowej świń (SVD) w materiałach klinicznych metodą PCR. Abstr. X Kongresu PTNW, Wrocław, 1996, s. 363.
25. Niedbalski W.: Genetic analysis of Polish isolate of swine vesicular disease virus (SVDV POL/73) by RT-PCR and nucleotide sequencing of the VP1/2A coding region. Bull. Vet. Inst. Pulawy 1998, 42, 3-11.
26. Niedbalski W.: Application of different diagnostic methods for the detection of SVD infections in pigs. Bull. Vet. Inst. Pulawy 1999, 43, 11-18.
27. Niedbalski W., Kęsy A., Brocchi E., Borrego B., Malicki K.: Analiza antygenowa polskich izolatów wirusa choroby pęcherzykowej świń. Medycyna Wet. 1999, 55, 181-185.
28. Niedbalski W.: Phylogenetic analysis of Polish isolates of swine vesicular disease virus (SVDV). Bull. Vet. Inst. Pulawy 1999, 43, 139-147.
29. Nijhar S. K., Mackay D. K. J., Brocchi E., Ferris N. P., Kitching R. P., Knowles N. J.: Identification of neutralizing epitopes on a European strain of swine vesicular disease virus. J. Gen. Virol. 1999, 80, 277-286.
30. Secchurn P., Knowles N. J., McCauley M. J.: The complete nucleotide sequence of a pathogenic swine vesicular disease virus. Virus Res. 1990, 16, 255-274.
31. Zhang G., Wilsden G., Knowles N. J., McCauley J. W., Mackay D.: Nucleotide sequence analysis of recent European isolates of swine vesicular disease. Foot-and-Mouth Disease Newsletter 1994, 1, 25-28.
32. Zhang G., Wilsden G., Knowles N. J., McCauley J. W.: Complete nucleotide sequence of a coxsackie B5 virus and its relationship to swine vesicular disease virus. J. Gen. Virol. 1993, 74, 845-853.
33. Zhang G., Haydon D. T., Knowles N. J., McCauley W.: Molecular evolution of swine vesicular disease virus. J. Gen. Virol. 1999, 80, 639-646.

Adres autora: dr Wiesław Niedbalski, ul. Wodna 7, 98-220 Zduńska Wola;  
e-mail: piwzp@invarnet.inwar.com.pl

## Apteka Dobrej Ceny



3,40 zł\*  
tubka

## cloxamed ts

natychmiastowe i długie działanie  
osłona antybiotykowa w okresie zasuszenia

- natychmiastowe działanie dzięki zawartości soli sodowej kloksacyliny
- dobre stężenie substancji aktywnych
- praktyczny dozownik zapobiegający zbyt głębokiemu wprowadzeniu konusa (dokładna i jałowa aplikacja leku)

prostMedica

74-106 Stare Czarnowo 77; tel.(091) 31 24 290, 31 24 236; tel./fax (091) 31 24 117

\*Ceny dla lekarzy weterynarii.  
cloxamed ts: olejowa zawiesina dowymieniowa. Skład: 1 tubostrzykawką 8,0 g zaw. 200 mg soli sodowej kloksacyliny jednowodnej, 800 mg kloksacyliny benzatynowej. Wskazania: leczenie i profilaktyka stanów zapalnych wymienia u bydła w okresie zasuszenia. **Przeciwwskazania:** uczulenie zwierząt na penicylinę i cefalosporynę, odporność drobnoustrojów na kloksacylinę; nie stosować w okresie laktacji. **Działania uboczne:** reakcje alergiczne. **Interakcje:** unikać stosowania leku łącznie z innymi środkami ze względu na możliwy antagonizm. **Okres karencji:** 6 dni dla mleka i mięsa pozyskanego od zwierząt leczonych nie później niż 35 dni przed ocielaniem; 40 dni dla mleka i mięsa pozyskanego od zwierząt leczonych później niż 35 dni przed ocielaniem. **Wydaje się z przepisu lekarza weterynarii.**