

# Wykrywanie wirusa pryszczycy w materiale biologicznym

GRAŻYNA PAPROCKA, ANDRZEJ KĘSY

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

Paprocka G., Kęsy A.

## Detection of foot-and-mouth disease virus (FMDV) in biological material

### Summary

Foot-and-mouth disease (FMD) still exists in Europe. Rapid diagnosis is essential for a precise and effective eradication of the disease.

The aim of this work was to compare two methods used in diagnosing FMD: by viral isolation (VI) – ELISA and RT-PCR. Samples of epithelium from FMDV infected animals and supernatant from inoculated susceptible cell culture from the authors own collection of FMDV infected materials were used. The results obtained were: 81.3% positive results using VI and 53.1% using ELISA. The effectiveness in detecting FMDV increased to 87.5% after applying both methods. RT-PCR appeared to be the most effective method of viral RNA (vRNA) detection in all tested samples. The reaction was performed with primers from the 3D coding region of viral genomes. The specificity of PCR was confirmed by restriction analysis of amplicans.

The specificity and sensitivity of RT-PCR justifies its inclusion into routine FMDV diagnosis. Thanks to this technique it was possible to detect vRNA in material which had been thawed several times as well as in poor quality (contaminated) materials.

**Keywords:** foot-and-mouth disease (FMD), virus detection, diagnostic methods

Wirus pryszczycy (foot-and-mouth disease virus – FMDV) wykryty przez Loefflera i Froscha w 1897 r. należy do rodziny *Picornaviridae*, rodzaju *Aphthovirus*. Pryszczycza występuje endemicznie w większości krajów Afryki, w niektórych częściach Azji, Europy Wschodniej i Ameryki Południowej (2). W marcu 2000 r. zanotowano ogniska w Korei, a w kwietniu, w Japonii. Europa aktualnie jest wolna od pryszczycy. Należy jednak pamiętać, że dla naszego kontynentu choroba ta stanowi nadal realne zagrożenie, o czym świadczą ogniska np. we Włoszech (1993), Grecji (1994, 1996), Bułgarii, Albanii, Macedonii (1996). Bardzo ważnym ogniwem w skutecznym zwalczaniu pryszczycy jest szybka i precyzyjna diagnostyka. Z tego powodu niezbędne jest doskonalenie metod i utrzymywanie gotowości do podjęcia badań diagnostycznych w pełnym zakresie.

Od szeregu lat nie słabnie zainteresowanie metodami biologii molekularnej i możliwościami ich wykorzystania w diagnostyce pryszczycy (5, 6, 8, 14-16). Coraz częściej stosuje się reakcję polimeryzacji łańcuchowej – PCR, która umożliwia selektywną amplifikację wybranych fragmentów cDNA w warunkach *in vitro*. Do reakcji wykorzystywane są startery zaprojektowane na podstawie regionów genomu 2A/2B/1D, 3B, 3C, 3D (1, 3, 9, 10, 12).

Celem badań była ocena przydatności do diagnostyki pryszczycy metody odwrotnej transkrypcji PCR (RT-PCR) z użyciem starterów dla regionu 3D w porównaniu do standardowych testów izolacji i ELISA.

### Material i metody

**Hodowle komórek.** W badaniach używano hodowlę komórek linii ciągłej nerki chomika – BHK-21 (CT) otrzymaną z Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere w Tübingen. Pożywkę stanowił płyn Eagle'a z solami Earle'a (E/E) z dodatkiem 10% bydlęcej surowicy płodowej, skontrolowanej na obecność przeciwciał dla wirusa pryszczycy odczynem seroneutralizacji (SN) i testem ELISA (liquid-phase blocking sandwich ELISA) (13).

**Wirus.** W badaniach wykorzystano próbki izolatów wirusa pryszczycy z kolekcji Zakładu w postaci nabłonków pęcherzy pryszczycowych od zakażonych zwierząt lub zakażonych hodowli komórek. Ich wykaz zawiera tab. 1.

**Izolacja FMDV.** Z wymienionych w tab. 1 próbek izolowano wirus w hodowli komórek. Do 5 ml zawiesiny komórek w płynie wzrostowym E/E (lub na wyrośniętą hodowlę z płynem utrzymującym E/E) w butelkach plastikowych o powierzchni wzrostowej 25 cm<sup>2</sup> wprowadzano 0,5 ml badanej zawiesiny wirusowej, a następnie inkubowano przez 48-72 godz. w 37°C. W przypadku małej ilości materiału, 0,2 ml zawiesiny wirusa wprowadzano do probówki Leightona z komórkami zawieszonymi w 1,5 ml płynu

wzrostowego lub zawiesziny wirusa zakażano jednowarstwowe hodowle komórek. Jeżeli materiałem był nabłonek z pęcherzy pryszczycowych przygotowywano 10% homogenizat w PBS, który wirowano. Supernatant sączone przez filtr 0,45 µm. Przesączeniem zakażano hodowle komórek w sposób opisany powyżej. W przypadku braku namnażania się wirusa wykonywano trzy ślepe pasaże.

**Wykrywanie wirusa testem ELISA (indirect sandwich ELISA).** Próbkki izolatów wymienione w tab. 1 oraz zawiesziny otrzymane po zakażeniu nimi hodowli komórek badano testem ELISA (13).

**Ekstrakcja RNA.** Całkowite RNA izolowano z zakażonych hodowli komórek oraz homogenizatów nabłonka pęcherzy pryszczycowych wzorując się na metodzie Chomczyńskiego (4). Do 200 µl próby w 1,5 ml probówce typu Eppendorf dodawano kolejno 250 µl roztworu denaturującego (4 M tioocyanian guanidyny, 1,5

**Tab. 1.** Materiał wykorzystany w badaniach

Nr izolatu	Pochodzenie	Rodzaj materiału
1	terenowy	nabłonek pęcherzy
2	terenowy	nabłonek pęcherzy
3	terenowy	hodowla komórek
4	terenowy	hodowla komórek
5	terenowy	hodowla komórek
6	terenowy	hodowla komórek
7	b.d.	hodowla komórek
8	b.d.	hodowla komórek
9	terenowy	hodowla komórek
10	terenowy	hodowla komórek
11	terenowy	hodowla komórek
12	terenowy	hodowla komórek
13	terenowy	hodowla komórek
14	terenowy	hodowla komórek
15	terenowy	hodowla komórek
16	terenowy	nabłonek pęcherzy
17	terenowy	nabłonek pęcherzy
18	terenowy	nabłonek pęcherzy
19	terenowy	nabłonek pęcherzy
20	terenowy	nabłonek pęcherzy
21	terenowy	nabłonek pęcherzy
22	terenowy	nabłonek pęcherzy
23	terenowy	hodowla komórek
24	terenowy	hodowla komórek
25	terenowy	hodowla komórek
26	terenowy	hodowla komórek
27	terenowy	hodowla komórek
28	terenowy	hodowla komórek
29	terenowy	hodowla komórek
30	terenowy	nabłonek pęcherzy
31	terenowy	nabłonek pęcherzy
32	terenowy	nabłonek pęcherzy

Objaśnienie: b.d. – brak danych

mM cytrynian sodu, 0,5% sarkozyl, 0,1 M 2-merkaptoetanol), 50 µl 2 M octanu sodu o pH = 4,0; 0,5 ml fenolu i 100 µl mieszaniny chloroform/alkohol izoamyłowy (49: 1). Całość intensywnie wytrząsano, inkubowano w łaźni lodowej przez 15 minut i wirowano przy 13 000 obr./min. przez 30 min. Następnie około 500 µl fazy wodnej przenoszono do nowej probówki, dodawano 1 objętość izopropanolu i po dokładnym wymieszaniu inkubowano przez 60 minut w -20°C. Precypitat osadzano przez wirowanie (warunki j.w.). Po usunięciu supernatantu peletkę rozpuszczano w 300 µl roztworu denaturującego, dodawano 1 objętość izopropanolu, wymieszano i ponownie inkubowano przez 60 minut w -20°C. Precypitat osadzano przez wirowanie. Po usunięciu alkoholu peletkę RNA przemywano etanolem i suszo-

no 30 minut w temperaturze pokojowej. RNA do dalszych badań przechowywano pod 75% etanolem w -70°C.

**Startery.** W badaniach zastosowano startery dla regionu 3D polimerazy o następujących sekwencjach nukleotydowych: 1DS – 5' TCAGGGTTGCAAAGACCGC 3', 1US – 5' AGGACAAAGCGCTGTTCCGC 3'. Natomiast do reakcji odwrotnej transkrypcji – RT zastosowano starter p(dN)<sub>6</sub> (Boehringer) – mieszanina sześcienukleotydów.

**Odwrotna transkrypcja – RT.** przed wykonaniem reakcji, 5 µl roztworu RNA oraz 1 µl (50 ng) startera ogrzewano w 70°C przez 5 minut pod warstwą oleju mineralnego, po czym schładzano w łaźni lodowej. Po dodaniu 5 µl 5 × buforu do RT (Boehringer), 2 µl każdego z nukleotydów (dNTPs) o stężeniu 2 mM, 1 µl RNase-inhibitor (Boehringer), 1 µl (20 jednostek) AMV odwrotnej transkryptazy (Boehringer) mieszaninę uzupełniano sterylną, destylowaną wodą do objętości 50 µl, a następnie inkubowano 20 minut w temperaturze pokojowej oraz przez 60 minut w 42°C.

**Amplifikacja cDNA.** Amplifikację wykonywano w objętości 50 µl. Do probówki typu Eppendorff 0,5 ml dodawano kolejno 5 µl 10 × buforu dla polimerazy Taq (Boehringer), 3 µl mieszaniny 10 mM dNTPs, 50 ng każdego ze starterów, 5 µl produktu reakcji RT, 1,5 jednostki polimerazy Taq oraz sterylną dejonizowaną wodę. Na mieszaninę nawarstwiano kroplę oleju mineralnego. Reakcja przebiegała podczas 30 cykli w aparacie Perkin-Elmer 480 wg programu termicznego: 95°C – 1 min, 56°C – 1 min, 72°C – 2 min. Wstępna denaturacja: 95°C – 1 min, synteza w ostatnim cyklu – 10 minut.

**Analiza produktów amplifikacji.** Produkty amplifikacji rozdzielano elektroforetycznie w 1,5% żelu agarozowym i wybarwiono w roztworze bromku etydyny o stężeniu 0,5-1,0 µM/ml. Elektroforezę prowadzono w buforze TBE (90 mM Tris-base, 90 mM kwas borny, 2 mM EDTA), przez 40 minut, przy stałym natężeniu prądu elektrycznego 100 mA. Jako wzorca długości łańcucha nukleotydowego używano G316A (Promega). Żele analizowano za pomocą automatycznego systemu analizy żeli – Imagistore 5000 (Ultra Violet Products Ltd, Cambridge, UK). Wynik RT-PCR uznawano za dodatni, jeżeli w żelu w świetle UV transiluminatora widoczny był prążek DNA o wielkości spodziewanej dla danej pary starterów. Kontrolę negatywną stanowiły nie zakażone nabłonki lub hodowle komórek.

**Analiza restrykcyjna RFLP (restriction fragment length polymorphism).** Do 5 µl każdego z produktów RT-PCR dodawano 3 µl 10× stęż. buforu do trawienia, dejonizowaną, sterylną wodę i 1 µl enzymu restrykcyjnego NcoI (10 jedn./µl) (Boehringer). Mieszaninę reakcyjną w objętości 30 µl inkubowano przez 2 godziny w temperaturze 37°C. W celu sprawdzenia wyniku reakcji trawienia wykonywano elektroforezę w 1,5% żelu agarozowym w buforze 1 × TBE z bromkiem etydyny (0,5 µg/ml) i przy napięciu prądu elektrycznego 70 V. Wynik odczytywano na transiluminatorze w świetle UV i oceniano względem markera wielkości G316A (Promega).

## Wyniki i omówienie

Obecność wirusa pryszczycy w badanych próbkach wykazano metodą izolacji w hodowlach komórek li-

nii BHK-21 (CT), testem ELISA oraz RT-PCR (tab. 2). Spośród 32 próbek badanych metodą izolacji wirusa, 26 było dodatnich (81,2%), trzy ujemne. Działanie cytopatogenne towarzyszące zakażeniu komórek prowadziło do powstania w hodowlach szeregu zmian morfologicznych. Komórki ulegały zaokragleniu, a ich kontury stawały się bardziej wyraźne. W drugiej kolejności następowała cytoliza komórek, ich całkowity rozpad i odklejanie się od szkła. Replikację wirusa w hodowlach komórek potwierdzano testem ELISA. Wszystkie próbki izolatów, które wywołały efekt cytopatyczny w hodowlach komórek, ocenione techniką immunoenzymatyczną okazały się dodatnie. Niedogodnością był brak możliwości odczytu wyniku próbek nr 10, 18, 24 na skutek zanieczyszczenia hodowli. Z powodu zbyt małej ilości dostępnego materiału nie udało się ich odpowiednio przygotować do badania. Jednakże w próbkach nr 10, 18 wykazano obecność antygeny FMDV testem ELISA. Odsetek wyników dodatnich uzyskanych przy użyciu obu metod wynosił 87,5%. Bezpośrednie wykrywanie antygeny FMDV testem ELISA wykazało jego obecność w 53,1% badanych próbek. Następnie do wykrywania FMDV zastosowano reakcję RT-PCR, w wyniku której, w czasie 30 cykli uzyskano amplifikację wszystkich próbek cDNA (100%). Efektem amplifikacji były produkty wielkości 454 pz. widoczne po rozdziale elektrofore-

Tab. 2. Wykrywanie FMDV metodą izolacji w hodowli komórek linii BHK-21(CT), testem ELISA i RT-PCR

Nr izolatu	Izolacja/CPE	ELISA	ELISA <sup>b</sup>	RT-PCR
1	+	+	-	+
2	+	+	+	+
3	+	+	-	+
4	+	+	-	+
5	+	+	+	+
6	+	+	+	+
7	-	-	-	+
8	+	+	+	+
9	+	+	+	+
10	z	+	+	+
11	+	+	+	+
12	+	+	+	+
13	+	+	-	+
14	+	+	+	+
15	+	+	-	+
16	-	-	-	+
17	+	+	-	+
18	z	+	+	+
19	+	+	+	+
20	+	+	-	+
21	+	+	-	+
22	-	-	-	+
23	+	+	+	+
24	z	-	-	+
25	+	+	-	+
26	+	+	+	+
27	+	+	+	+
28	+	+	+	+
29	+	+	+	+
30	+	+	-	+
31	+	+	+	+
32	+	+	-	+

Objaśnienia: - wynik ujemny, + wynik dodatni, z - zmętnienie w hodowli komórek, ELISA - badanie próbek po izolacji w hodowli komórek, ELISA<sup>b</sup> - bezpośrednie badanie prób

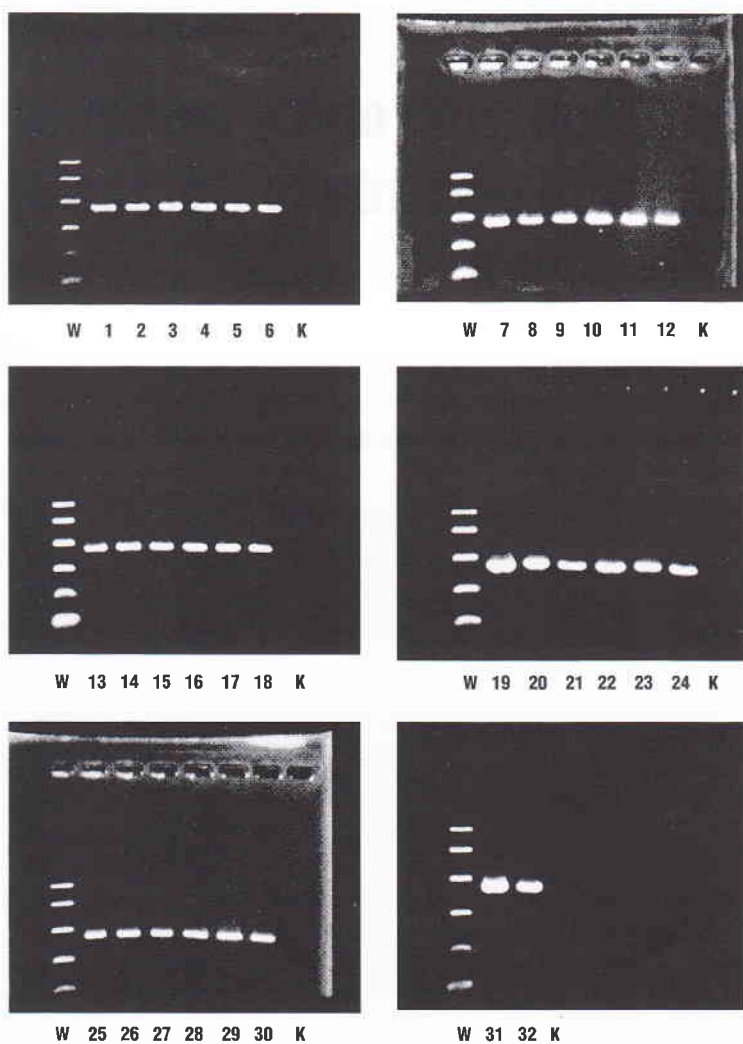
tycznym w 1,5% żelu agarozowym (ryc. 1). Reakcja polimeryzacji łańcuchowej zakończyła się wynikiem ujemnym w przypadku nie zakażonych nabłonków lub hodowli komórek. Region 3D kodujący polimerazę RNA stanowi wysoce konserwatywną część genomu FMDV (86,5% podobieństwa wśród serotypów), a zatem użycie starterów z tego regionu powinno umożliwić wykrywanie wszystkich serotypów wirusa przyszczy (11). Specyficzność uzyskanych amplikonów oceniano analizą restrykcyjną. Amplifikowany obszar genu zawiera unikalne miejsce dla endonukleazy NcoI (7). Metodą RFLP przy użyciu tego enzymu otrzymano dwa fragmenty długości 330 i 124 pz potwierdzające specyficzność wszystkich badanych produktów RT-PCR (ryc. 2). Reakcja polimeryzacji łańcuchowej okazała się najbardziej czułą metodą wykrywania FMDV w badanych próbkach. Należy podkreślić, że użyty materiał był długo przechowywany, wielokrotnie odmrażany i zamrażany, a niektóre próbki znajdowały się w stanie gnilnego rozkładu. Uzyskane RT-PCR pozytywne rezultaty świadczą o wysokiej czułości metody i możliwości amplifikacji materiału genetycznego również tych wirusów, które nie są już zdolne do namnażania.

### Podsumowanie

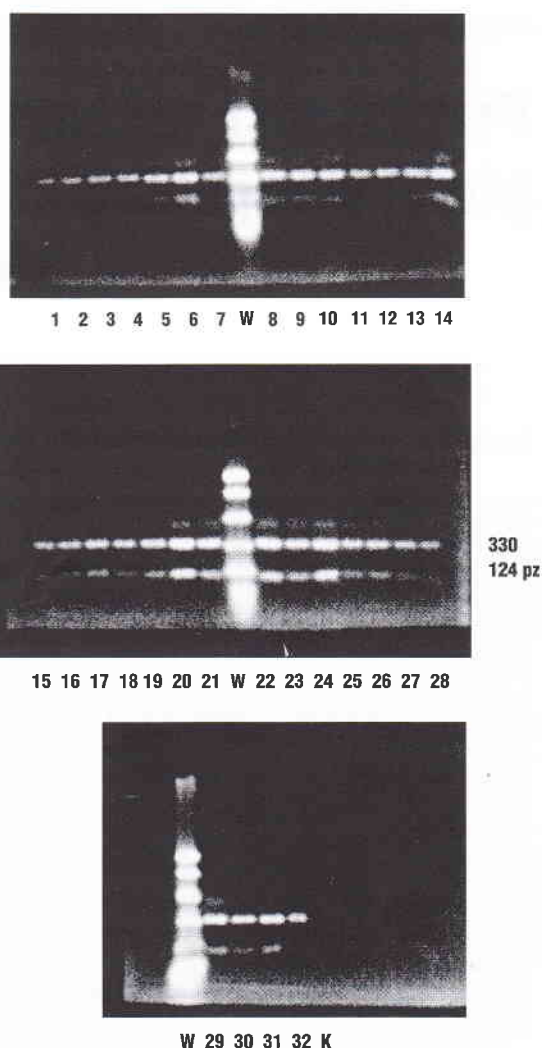
Reakcja polimeryzacji łańcuchowej jest najbardziej czułą metodą do wykrywania RNA FMDV (100% wyników dodatnich) w materiale biologicznym. Metodą izolacji w hodowlach komórek uzyskano 81,2% wyników pozytywnych, ELISA - 53,1%. Zastosowanie obu metod, izolacji i ELISA, zwiększyło skuteczność wykrywania RNA FMDV do 87,5%. Metoda RT-PCR umożliwia wykrywanie RNA FMDV również w próbkach złej jakości. Czułość i specyficzność tej metody uzasadnia włączenie jej do rutynowej diagnostyki przyszczy.

### Piśmiennictwo

1. Amaral-Doel C. M. F., Owen N. E., Ferris N. P., Kitching R. P., Doel T. R.: Detection of foot-and-mouth disease viral sequences in clinical specimens and ethyleneimine inactivated preparations by the polymerase chain reaction. *Vaccine* 1993, 11, 415-421.
2. Anon., *Bull. OIE* 1996, 7, 527-530.
3. Callens M., DeClercq K., Gruisa M., Danes M.: Detection of foot-and-mouth disease by reverse transcription polymerase chain reaction and virus isolation in contact sheep without clinical signs of foot-and-mouth disease. *Vet. Q.* 20 Suppl. 1998, 2, 37-40.
4. Chomeżyński P., Sacchi N.: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 1987, 162, 156-159.
5. Forsyth M. A., Mackay D., Sobrino F., Ferris N. P.: Report of the Session of the Research Group of the Standing Technical Committee of the European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease, Venna, Austria, 19-22 September 1994, s. 27-31.
6. Forsyth M. A., Belsham J., Felipe E., Mackay D.: Report of the Session of the Research Group of the Standing Technical Committee of the European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease, Pirbright, UK, 14-18 September 1998.
7. House C., Meyer F.: The detection of foot-and-mouth disease virus in oesophageal-pharyngeal samples by a polymerase chain reaction technique. *J. Virol. Methods* 1993, 43, 1-6.
8. Höfner M. C., Carpentner W. C., Donaldson A. I.: Report to the Session of the Research Group of the Standing Technical Committee of the Commission for the Control of FMD. Lindholm, Denmark, 25-29 June, 1990.



Ryc. 1. Produkty amplifikacji enzymatycznej fragmentu genu 3D wielkości 454 pz. Synteza cDNA wykonana z udziałem startera p(dN)<sub>6</sub>. Ścieżki 1-32 izolaty wirusa pryszczycy, K – kontrola negatywna, W – wzorzec (G316A Promega).



Ryc. 2. Wynik analizy restrykcyjnej RFLP produktów amplifikacji cDNA przedstawionych na ryc. 1.

- Höfner M. C., Carpentner W. C., Donaldson A. I.: Detection of foot-and-mouth disease virus RNA in clinical samples and cell culture isolates by amplification of the capsid coding region. J. Virol. Methods 1993, 42, 53-62.
- Laor O., Torgersen H., Yadin H., Becker Y.: Detection of FMDV RNA amplified by the polymerase chain reaction (PCR). J. Virol. Methods 1992, 36, 197-208.
- Locher F., Suryanarayana V. V., Tratschin J. D.: Rapid detection and characterization of foot-and-mouth disease virus by restriction enzyme and nucleotide sequence analysis of PCR products. J. Virol. Methods 1995, 33, 440-444.
- Marquardt O., Straub O. C., Ahl R., Haas B.: J. Detection of foot-and-mouth disease virus in nasal swabs of asymptomatic cattle by RT-PCR within 24 hours. J. Virol. Methods 1995, 53, 255-261.
- Paprocka G., Kęsy A., Niedbalski W., Fitzner A.: Pryszczycza – aktualne metody diagnostyczne. Biotechnologia 1997, 131-137.
- Reid S. M., Forsyth M. A., Hutchings G. H., Ferris N. P.: Comparison of reverse transcription polymerase chain reaction, enzyme linked immunosorbent assay and virus isolation for the routine diagnosis of foot-and-mouth disease. J. Virol. Methods 1998, 70, 213-217.
- Rodriguez A., Nunez J., Nolasco G., Ponz F., Sobrino F.: Direct PCR detection of foot-and-mouth disease virus. J. Virol. Methods 1993, 47, 345-349.
- Vangrysperre W., De Clercq K.: Rapid and sensitive polymerase chain reaction based detection and typing of foot-and-mouth disease virus in clinical samples and cell culture isolates, combined with a simultaneous differentiation with other genomically and/or symptomatically related viruses. Arch. Virol. 1996, 141, 331-344.

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

**AZYLING R. D., BAKER S. E., NICHOLAS R. A. J., PECH M. L., SIMON A. J. .:** Porównanie aktywności *in vitro* danofloksacyny, florfenikolu, oksytetracykliny, spektynomycyny i tylmykozyny w stosunku do *Mycoplasma mycoides subspecies mycoides* tworzących drobne kolonie. (Comparison of *in vitro* activity of danofloxacin, oxytetracycline, spectinomycin and filmicosin against *Mycoplasma mycoides subspecies mycoides* small colony type). Vet. Rec. 146, 243-246, 2000 (9)

*Mycoplasma mycoides subsp. mycoides* tworząca drobne kolonie (Mmmsc) wywołuje zarazę płucną bydła, chorobę znajdującą się na liście A chorób OIE. Określono wartość minimalnego stężenia hamującego (MIC) oraz minimalnego stężenia bójczego (MMC) danofloksacyny, florfenikolu, oksytetracykliny, spektynomycyny i tylmykozyny w stosunku do 20 izolatów Mmmsc. Izolaty pochodziły z ognisk zarazy płucnej w Portugalii, Hiszpanii, Włoch, Australii i Afryki. Wartość MIC (µg/ml) wynosiła dla danofloksacyny 0,125-1,0, florfenikolu 0,25-8,0, oksytetracykliny 0,125-4,0, spektynomycyny 4->128, tylmykozyny < 0,008-0,25. Wartości MIC<sub>50</sub> wynosiły odpowiednio: 0,25; 1,0; 0,5; 8,0 i 0, 015. Wartość MMC kształtowała się w sposób następujący: danofloksacyna 0,25-4,0; florfenikol 1,0- 16,0; oksytetracyklina 0,5-32,0; spektynomycyna 4,0->128,0, tylmykozyna <0,008->128,0. Natomiast wartość MMC<sub>50</sub> wynosiła odpowiednio: 0,5; 8; 16; 0,06. Żaden z izolatów nie był oporny na danofloksacynę.