

Zastosowanie metody „wiązanie wirusa przez przeciwciała – RT-PCR” do wykrywania krajowych szczepów wirusa krwotocznej choroby zający (EBHSV)

MARTA CHROBOCIŃSKA

Zakład Chorób Zwierząt Mięsożernych i Futerkowych Państwowego Instytutu Weterynaryjnego,
Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Chrobocińska M.

Studies on the use of immunocapture-RT-PCR assay for detection of Polish strains of the European brown hare syndrome virus (EBHSV)

Summary

Seven strains of EBHSV and 29 samples of internal organs of dead hares were used in the investigations. A Polish strain of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) as well as a negative antigen control was used for comparison. Among 29 samples from dead hares, 3 originated from hares experimentally infected with a standard Italian strain and 1 from a hare infected with the Polish strain, isolated in 1992. Studies confirmed the presence of viruses in 9 out of 38 samples, positive in ELISA and classic method of RT-PCR. Moreover, the presence of EBHS virus was detected by nested PCR conducted with a product of immunocapture-RT-PCR assay (IC-RT-PCR) in a sample originating from a hare infected with Italian strain, although ELISA was negative. IC-RT-PCR assay sensitivity was from 50 to 128-fold higher in comparison to ELISA. The prepared reagents used in IC-RT-PCR assay facilitated the detection of EBHS virus.

Keywords: European brown hare syndrome virus, immunocapture-RT-PCR assay

Wirus krwotocznej choroby zający (European brown hare syndrome virus – EBHSV) został zaklasyfikowany razem z wirusem krwotocznej choroby królików (wirus pomoru królików, Rabbit haemorrhagic disease virus – RHDV) do rodziny *Caliciviridae*, rodzaju *Lagovirus*. Obydwa wirusy wywołują chorobę o najczęściej ostrym przebiegu prowadzącą do licznych padnięć zwierząt. W celach diagnostycznych opracowano wiele metod, przy czym powszechnie stosuje się odczyny hemaglutynacji i zahamowania hemaglutynacji, immunofluorescencji oraz ELISA. Spośród metod biologii molekularnej opracowano RT-PCR i nested PCR (N-PCR). Różne techniki wykonania metody „wiązanie wirusa przez przeciwciała – RT-PCR” (Immunocapture – RT-PCR, IC-RT-PCR) zostały uprzednio opisane (2, 3, 4, 5). Wykazano, że cechuje się ona wysoką czułością i specyficznością, przy jednoczesnym zmniejszeniu czasochłonności i pracochłonności.

Celem badań było sprawdzenie możliwości zastosowania metody IC-RT-PCR do wykrywania wirusa EBHS w narządach wewnętrznych zający, przy użyciu reagentów przygotowanych we własnym zakresie.

Materiał i metody

Próbki. W badaniach użyto: 5 krajowych szczepów wirusa EBHS – izolowanych w latach 1992-2001 (NP11/92, W1/93, L/98, K5/01 i P1/01) i 29 prób narządów wewnętrznych padłych zający oraz 2 szczepy standardowe – włoski (W/st) i francuski (F/st). Spośród 29 próbek narządów wewnętrznych padłych zający 3 pochodziły od zający zakażonych standardowym wirusem włoskim (2/93, 3/93, 5/93) oraz 1 – wirusem krajowym wyizolowanym w 1992 r. (4/93). Porównawczo użyto również krajowy szczep wzorcowy (KGM) wirusa RHD królików z 1988 r. i ujemny antygen kontrolny. Z wycinków narządów wewnętrznych (śledziona, wątroba, płuca) przygotowywano 20% homogenizaty w PBS (pH 7,0), które następnie chloroformowano, a po ich odwirowaniu do badań używano supernatanty. Wszystkie próbki zostały wcześniej zbadane w ELISA, a 23 również w klastycznej metodzie RT-PCR.

Metoda „wiązanie wirusa przez przeciwciała – RT-PCR”. Wykonano zgodnie z techniką opisaną przez Le Gall-Recale i wsp. (2) z użyciem reagentów przygotowanych we własnym zakresie.

Wiązanie wirusa przez przeciwciała (IC). W badaniach używano płytki 96-basenikowe (Nunc Maxisorb). Baseni-

ki płytki opłaszczano stosując 50 µl IgG anti-EBHS oczyszczone z surowicy zajęcej (koncentracja 10 µg/ml) oraz surowicę kurzą anti-RHDV (z zestawu ELISA do wykrywania wirusa RHD, wyprodukowanego w Zakładzie Pryszczycy PIWet. w Zduńskiej Woli). Porównawczo zastosowano IgG specyficzne dla obu wirusów z zestawu komercyjnego, opracowanego w laboratorium Instytutu Zooprofilaktyki Doświadczalnej w Brescii, Włochy. Przeciwciała rozcieńczano w buforze węglanowo-dwuwęglanowym o pH 9,6. Po inkubacji przez noc w temperaturze 4°C i 3-krotnym płukaniu przy użyciu buforu PBST (pH 7,4) do baseników dodano 100 µl próby (rozcieńczonej 2-krotnie w PBST lub nie rozcieńczonej). Płytkę inkubowano w termostacie w temperaturze 37°C przez 1 h. Po inkubacji baseniki ponownie płukano 6-krotnie buforem PBST.

Odwrotna transkrypcja. Do baseników z próbami dodano 25 µl mieszaniny do RT zawierającej: 1 × bufor do RT (25 mM Tris-HCl, pH 8,3; 37,5 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂ – Gibco, BRL), 25 pmol oligo(dT)₁₂₋₁₈ (Invitrogen), 10 mM DTT, 1 mM mieszaniny trójfosforanowych deoxynukleotydów (dATP, dGTP, dCTP i dTTP – Gibco, BRL), 20 U RNasin (Promega) oraz 100 U odwrotnej transkryptazy M-MLV (Gibco, BRL). Płytkę ponownie inkubowano w temperaturze 37°C przez 1 h. Do reakcji PCR pobierano 5 µl każdego cDNA, zaś pozostałą objętość po przeniesieniu do próbek typu Eppendorf zamrażano w –20°C.

PCR. Amplifikowano fragmenty cDNA długości 528 pz lub 725 pz dla wirusa EBHS i 733 pz dla wirusa RHD, zlokalizowane na początku genu białka kapsydu (VP60). Startery reakcji, stosowane uprzednio w klasycznej metodzie PCR, zaprojektowano na podstawie dostępnych w NCBI Gene Bank sekwencji nukleotydów genomu szczepów obu wirusów. Sekwencje starterów dla wirusa EBHS przedstawia tab. 1, zaś dla RHDV były następujące (od 5' do 3'): P1 GTGAATGTTATGGAGGGCAA (5296-5315) i PRr AGGCCTGCGGGCGAAATTGA (6010-6029). Reakcję prowadzono w objętości 50 µl mieszaniny zawierającej: 1 × bufor do PCR (10 mM Tris-HCl, pH 8,3; 50 mM KCl; 1,1 mM MgCl₂ 0,01% żelatyny – InGen, Terpol), 0,25 mM MgCl₂ (Sigma), 0,2 mM mieszaniny trójfosforanowych deoxynukleotydów (dATP, dGTP, dCTP i dTTP – Gibco, BRL), 0,4 mM starterów i 1 U DNA Tag polimerazy (InGen, Terpol) oraz 5 µl cDNA. Przeprowadzono 35 cykli amplifikacji o następującym profilu temperaturowym: denaturacja – 94°C przez 30 s, hybrydacja starterów – 57°C lub 55°C przez 1 min., wydłużanie starterów – 72°C przez 1 min., z końcową inkubacją w 72°C przez 10 min. W przypadku ujemnego wyniku amplifikacji, w kierunku obecności wirusa EBHS, wykonywano N-PCR z użyciem starterów: P4 oraz P5. W N-PCR stosowano taką samą mieszaninę reakcyjną i 5 µl produktu PCR (startery P4 i PEr).

Badanie czułości metody. W badaniach tych zastosowano 2 szczepy wirusowe K5/01 i KGM. Przygotowano wstępnie dwukrotne rozcieńczenia szczepu K5/01 od 1/100 do 1/51 200 i dziesięciokrotne szczepu KGM od 10⁻¹ do 10⁻⁵.

Analiza elektroforetyczna. Produkty PCR rozdzielano elektroforetycznie w 1% lub 1,5% żelu agarozowym w obecności 1 × TBE o pH 8,3. Żele wybarwiano bromkiem etydydy i obecność amplikonów analizowano w świetle UV wobec wzorca DNA (Gene Ruler 100 bp DNA Ladder – MBI Fermentas).

Wyniki i omówienie

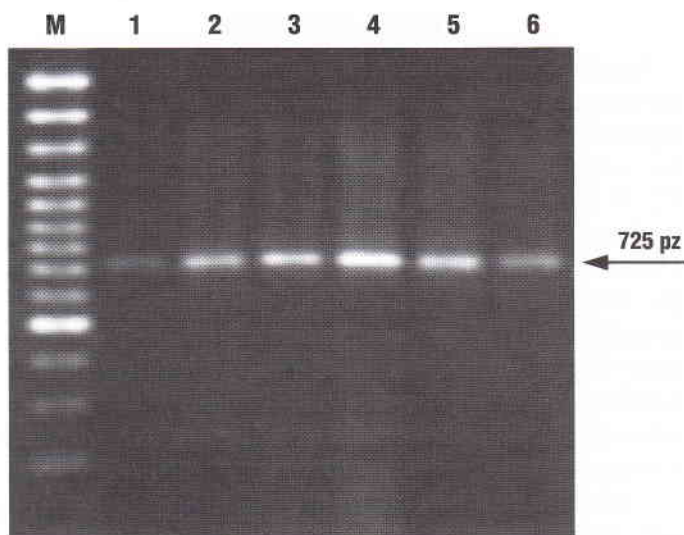
Spośród 38 zbadanych próbek, obecność amplifikowanych fragmentów długości 528 i 725 pz w PCR wykazano w 8 szczepach wirusa EBHS (standardowe: włoski – W/st i francuski F/st oraz krajowe: NP11/92, W1/93, L/98, K5/01, P1/01) (ryc. 1, 2 a i b) i w próbce od zajęcia zakażonego wirusem krajowym z 1992 r. – 4/93 oraz fragmentu długości 733 pz w szczepie KGM wirusa RHD. Nie stwierdzano obecności dodatkowych prążków, które mogłyby świadczyć o niespecyficznej amplifikacji. Spośród pozostałych próbek wynik pozytywny w N-PCR uzyskano z próbą 2/93 – od padłego zajęcia zakażonego standardowym wirusem włoskim. Wcześniejsze badania 38 próbek w ELISA i 23 również w metodzie klasycznej RT-PCR wykazały obecność antygenów wirusowych i wirusów w 9 próbkach (NP11/92, W/st, F/st, W1/93, L/98, K5/01, P1/01, 4/93 i KGM), zaś pozostałe były negatywne (w tym próbce 2/93). Zastosowanie IgG anti-EBHSV oraz surowicy kurzej anti-RHDV, wykazało obecność wirusów w tych samych próbkach, jak po zastosowaniu IgG komercyjnych, specyficznych dla obu wirusów.

Badanie czułości metody wykazało, iż w wyniku amplifikacji uzyskano fragmenty w rozcieńczeniach: dla K5/01 do 1/51 200 i dla KGM do 10⁻⁴ (ryc. 3).

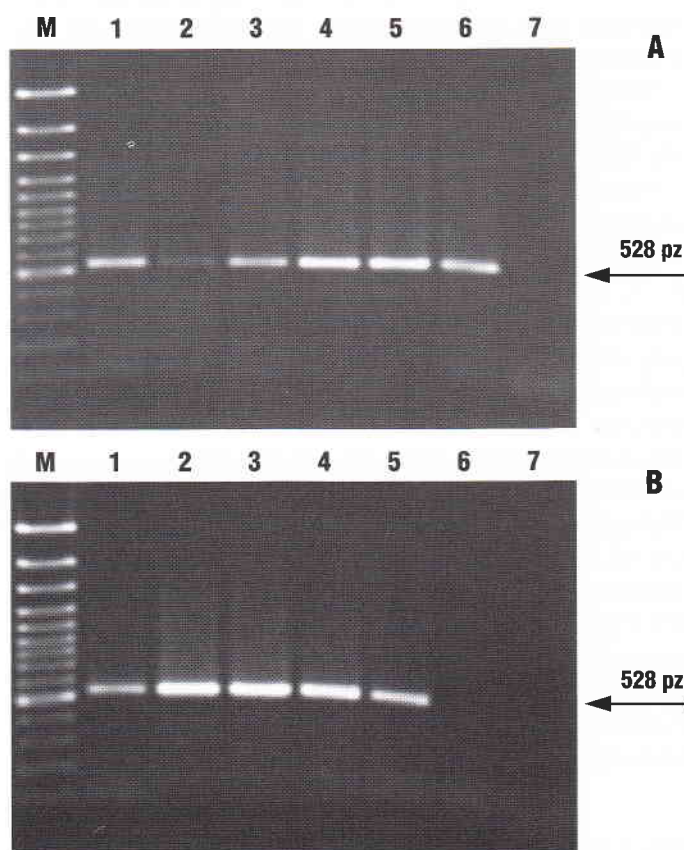
Po raz pierwszy metoda IC-RT-PCR została opisana przez Jansena i wsp. (3) i zastosowana do wykrywania wirusa zakaźnego zapalenia wątroby ludzi typu A. Le Gall i wsp. (2) wykorzystali tę metodę do wykrywania obecności w narządach wewnętrznych zajętych wirusa EBHS i królików – wirusa RHD. Badania tych autorów i innych badaczy (2, 3, 4, 5) wykazały jej wysoką czułość i specyficzność. W badaniach własnych zastosowano techniki opisane przez cytowanych autorów (2, 3) adaptując je do własnych reagentów. Wykazano, że czułość metody IC-RT-PCR przewyższa ELISA. Krajowy szczep K5/01 wirusa EBHS o mianie w ELISA równym 400, był wykrywany w IC-RT-PCR w rozcieńczeniu 128-krotnie wyższym; zaś szczep KGM wirusa RHD o mianie w ELISA – 2000, był wykrywany w rozcieńczeniu 50-krotnie wyższym. Potwierdza to wcześniejsze obserwacje o od 10 do 100-krotnie wyższej czułości tej metody niż ELISA (2, 4).

Tab. 1. Lokalizacja, orientacja i sekwencje nukleotydów zaprojektowanych starterów dla wirusa EBHS

Startery	Pozycja	Sekwencja nukleotydów od 5' do 3'	Produkt PCR
P4	+	5272-5297	TTGTGAAGCTTATGGAGGGTAAGCCT
PEr	-	5978-5997	AGAGCCACGAGGGGTTCACT
PS5	+	5579-5602	GCAGGTGCTGAGCCAAATGTATG
PSS'	-	6085-6107	ATTCCAGTGTCTGTTGGACGTAG
P4	+	5272-5297	TTGTGAAGCTTATGGAGGGTAAGCCT
P5	-	5658-5682	TGATTCTAGACAAGCCTTCGGCC

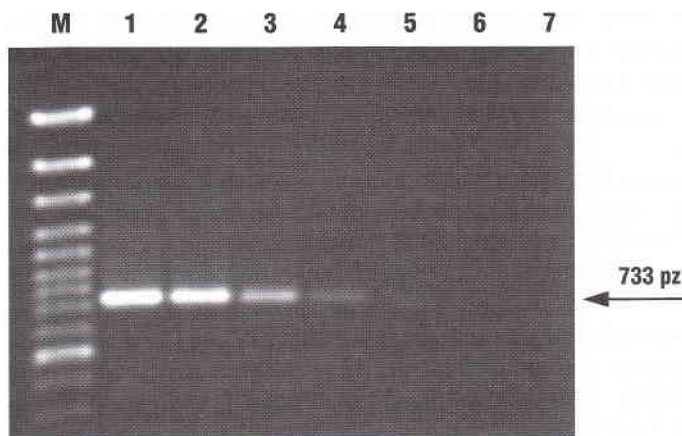


Ryc. 1. Analiza elektroforetyczna w 1% żelu agarozowym fragmentu długości 725 pz wirusa EBHS: ścieżki 1-6 – szczepu W1/93, L/98, P1/01, K5/01, W/st i F/st; M – Gene Ruler 50 bp DNA Ladder (MBI Fermentas)



Ryc. 2. Analiza elektroforetyczna w 1% żelu agarozowym fragmentu długości 528 pz szczepów wirusa EBHS. A – (w IC zastosowano do opłaszczania IgG anty-EBHSV) ścieżki 1-6 szczepu: P1/01, 4/93, W1/93, K5/01, W/st i F/st, ścieżka 7 – antygen ujemny; B – (w IC zastosowano do opłaszczania IgG specyficzne dla EBHSV i RHDV z zestawu komercyjnego) ścieżki 1-5 szczepu: W1/93, K5/01, W/st, F/st i L/98, ścieżka 6 – próba ujemna, ścieżka 7 – kontrola mieszaniny reagentów, M – Gene Ruler 50 bp DNA Ladder (MBI Fermentas)

Wetzel i wsp. (5) uzyskali nawet 5000-krotnie wyższą czułość tej techniki w porównaniu z ELISA. Wykaza-



Ryc. 3. Analiza elektroforetyczna w 1% żelu agarozowym fragmentu długości 733 pz szczepu KGM wirusa RHD. Ścieżki od 1 do 5 – kolejne rozcieńczenia od 10^{-1} do 10^{-5} , 6 – antygen ujemny, 7 – kontrola mieszaniny reagentów. M – Gene Ruler 100 bp DNA Ladder (MBI Fermentas)

nie w próbce 2/93 obecności wirusa EBHS, przy ujemnym wyniku w badaniu ELISA, również świadczy o wysokiej czułości zastosowanej metody. W uprzednich badaniach w RT-PCR stosowano klasyczną metodę izolacji RNA wirusowego, opisaną przez Chomczyńskiego i Sacchi (1). Do ekstrakcji RNA używano homogenizaty narządów wewnętrznych po wcześniejszym ich chloroformowaniu i trawieniu enzymem Proteinaza K. W wyniku odwrotnej transkrypcji, z zastosowaniem oligonukleotydów „random hexamers pd(N)₆” uzyskiwano całkowite cDNA. W porównaniu do tej klasycznej metody izolowania RNA wirusowego, metoda „wiązania wirusa przez przeciwciała” nie wymaga stosowania wielu odczynników i jest mniej czasochłonna. Użycie płytki 96-basenikowej również do reakcji RT, opisane przez Nolasco i wsp. (4), pozwala na uzyskanie cDNA bezpośrednio w baseniku, przez co zmniejsza się liczba manipulacji. Cytowani autorzy wykazali również możliwość prowadzenia RT w basenikach, po usunięciu z nich reagentów po wykonaniu ELISA.

Piśmiennictwo

1. Chomczyński P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 1987, 162, 156-159.
2. Le Gall-Recule G, Zwingelstein F, Portejoie T, Le Gall G: Immunocapture – RT-PCR assay for detection and molecular epidemiology studies of Rabbit Haemorrhagic disease and European brown hare syndrome viruses. *J. Virol. Methods* 2001, 97, 49-57.
3. Jansen R. W., Siegl G., Lemon S. M.: Molecular epidemiology of human hepatitis A virus defined by an antigen-capture polymerase chain reaction method. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990, 87, 2867-2871.
4. Nolasco G., de Blas C., Torres V., Ponz F.: A method combining immunocapture and PCR amplification in a microtiter plate for the detection of plant viruses and subviral pathogens. *J. Virol. Methods* 1993, 45, 201-218.
5. Wetzel T., Candresse T., Macquaire G., Ravelonandro M., Dunez J.: A highly sensitive immunocapture polymerase chain reaction method for plum pox potyvirus detection. *J. Virol. Methods* 1992, 39, 27-37.

Adres autora: dr Marta Chrobocińska, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy; e-mail: mchrob@piwet.pulawy.pl