

Postęp w laboratoryjnej diagnostyce pryszczycy

GRAŻYNA PAPROCKA

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

Paprocka G.

Advances in foot-and-mouth disease laboratory diagnoses

Summary

The aim of this study was to define the genetic characteristics of serotypes A and C FMDV isolates selected from the national collection of Poland and originating from FMD outbreaks in the country between 1959-67. The nucleotide sequences of the regional coding for VP1 protein were obtained by amplification and sequencing and analysed. The genetic similarity of most local isolates of A and C serotypes indicated the common source of their origin. Comparing the sequences of local isolates with those available in the electronic bank demonstrated the relationship of one C serotype isolate with western isolates of C1 Vosges Fr/60, C1 Loupogne BEL/53, C1 Turup DEN/61, C1 Haute Loire FR/69. Two serotype A isolates indicated a relationship with A22 550 USRR/65, and one of them with the group of A/Madrid(E)/1983, A/Portugal(P)/1983, A5/Allier(F)/1960, A5/Westerwald/58, A/Modena(I)/1984, A5/Parma(I)/1962, A/Marocco(MA)/1983.

Keywords: FMDV serotype A and C, RT-PCR, sequencing

Pryszczycyca (foot-and-mouth disease, FMD) jest chorobą wybitnie zakaźną, szybko szerzącą się wśród około 70 gatunków ssaków parzystokopytnych. Powoduje obniżenie produktywności i wysoką śmiertelność osobników młodych, zagraża bezpieczeństwu żywności oraz stabilności socjoekonomicznej społeczeństwa, jest problemem o zasięgu globalnym. Choroba występowała w większości regionów świata z wyjątkiem Grenlandii, Islandii, Nowej Zelandii i mniejszych wysp Oceanii. O tym jak realne jest to zagrożenie przypominała epizootia wywołana przez wirus serotypu O szczep O₁PanAsia, po raz pierwszy wyizolowany w 1990 r. w Indiach. W ciągu następnych kilku lat spowodował on ogniska choroby w Nepalu (1993), Arabii Saudyjskiej (1994), Turcji, Grecji, Bułgarii (1996), Chinach, Tajlandii i Malezji (1997), Korei, Mongolii, Rosji, Japonii i Południowej Afryce (2000). W lutym 2001 r. niespodziewanie wywołał katastrofalną w skutkach falę zachorowań w Wielkiej Brytanii, oraz w Północnej Irlandii, Francji i Holandii (3, 12).

FMD jest zwalczana z urzędu metodą radykalną przez likwidację zwierząt chorych, podejrzanych o chorobę i zakażenie, a także poprzez niszczenie wszelkich produktów pochodzących od takich zwierząt. Akceptowane jest również połączenie metody radykalnej i szczepień pierścieniowych, interwencyjnych na obszarach zagrożonych. W interesie społeczności świata szczególnie ważne jest podtrzymywanie wrażliwości na zagrożenie ponieważ zarówno zapobieganie jak i kontrola zależą przede wszystkim od odpowiedniego przygotowania, organizacji i środowisk zobowiązanych do podjęcia skutecznej interwencji.

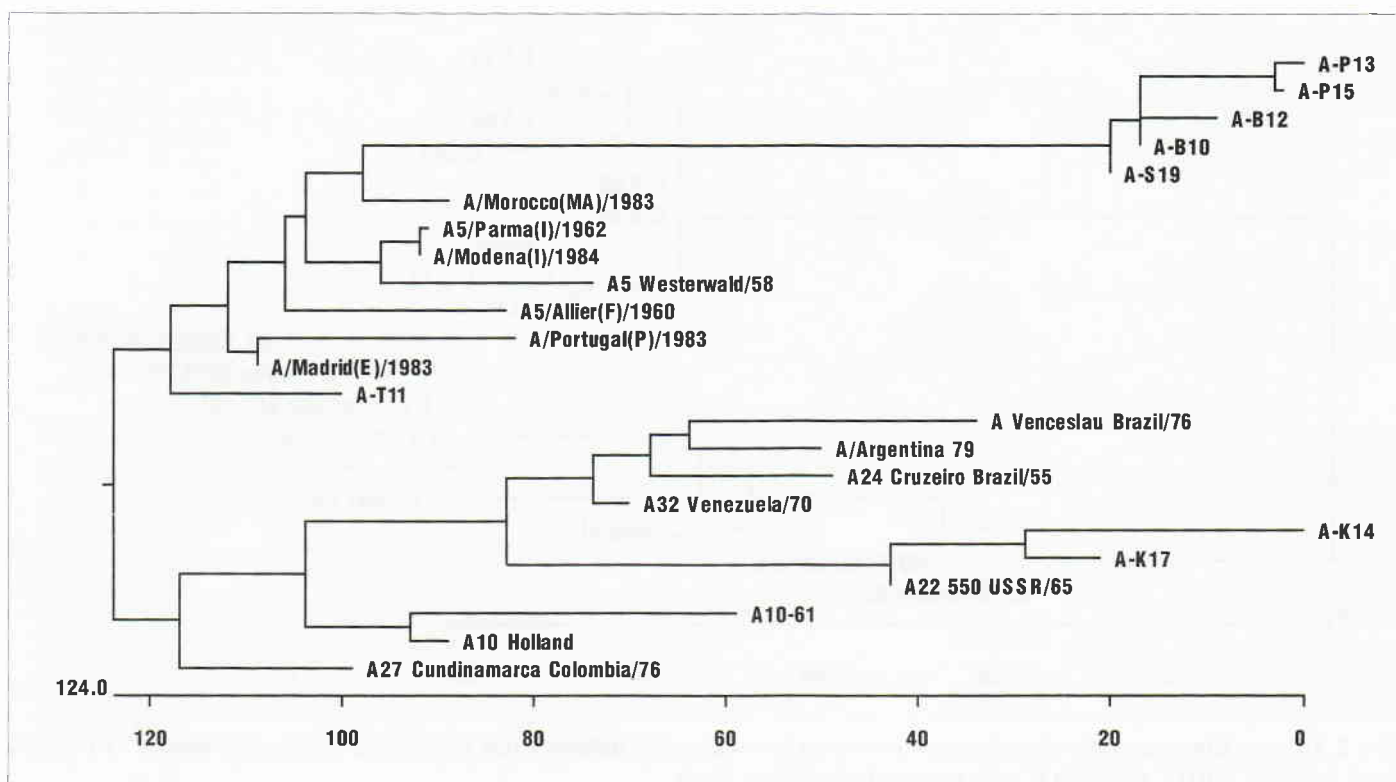
Pryszczycę wywołuje mały RNA wirus (foot-and-mouth disease virus, FMDV) z rodziny *Picornaviridae*, rodzaju *Aphthovirus*. Znanych jest 7 immunologicznie zróżnicowanych serotypów FMDV (A, O, C, Asia 1, SAT 1-3), wśród których występują liczne warianty antygenowe. Z tego powodu w przypadku pojawienia się choroby nie jest łatwo dokonać wyboru odpowiedniej szczepionki, a dryft antygenowy jest dodatkowym utrudnieniem. O wyborze skutecznej szczepionki decyduje pokrewieństwo antygenowe szczepu z ogniska i szczepionkowego. Pokrewieństwo to do niedawna określano tylko przy użyciu testów serologicznych i badań biochemicznych rekomendowanych przez OIE. Aktualnie do tego celu stosuje się metodę sekwencjonowania fragmentów genomu FMDV. Technika ta jest cennym narzędziem ułatwiającym również dochodzenie epizootyczne.

Celem badań była analiza genetyczna wybranych z kolekcji krajowych izolatów FMDV serotypu A oraz C.

Materiał i metody

Do badań użyto izolaty FMDV serotypu A (T11, S19, B12, P13, P15, B10, K14, K17) oraz C (L15, R16, K20, K22, Z40, R12, Z45, S13, S10, S15) w postaci nabłonków pęcherzy lub zakażonych hodowli komórek.

Ekstrakcję RNA wykonywano wzorując się na metodzie Chomczyńskiego (2). Do 200 µl próbki RNA dodawano kolejno 250 µl roztworu denaturującego (4 M tioctanian guanidyny, 1,5 mM cytrynian sodu, 0,5% sarcosyl, 0,1 M 2-mercaptoetanol), 50 µl 2 M octanu sodu o pH = 4,0 oraz 0,5 ml fenolu i 100 µl mieszaniny chloroform/alkohol izoamylowy (49 : 1). Całość intensywnie wytrząsano, inkubo-



Ryc. 1. Drzewo filogenetyczne skonstruowane na podstawie sekwencji nukleotydów fragmentu kodującego białko VP1 krajowych izolatów FMDV serotypu A oraz sekwencji z Gene Bank

wano 15 min. w łaźni lodowej i wirowano (30 min., 13 000 obr./min.). Następnie około 500 μ l fazy wodnej przenoszono do nowej probówki, dodawano jedną objętość izopropanolu i inkubowano w -20°C przez 60 min. Precypitat osadzano przez wirowanie (30 min., 13 000 obr./min.). Pelletkę rozpuszczano w 300 μ l roztworu denaturującego, dodawano jedną objętość izopropanolu i po wymieszaniu inkubowano w -20°C przez 60 min. Próbkę wirowano jak powyżej, a uzyskany osad przemywano etanolem i suszono w temperaturze pokojowej 30 min. RNA przechowywano pod 75% etanolem w -70°C .

Użyto startery – P1 3649/5'–GAAGGGCCCAGGGT-TGGACTC–3'/3669 dla regionu konserwatywnego 2A/2B, P2 2998/5'–GCGGATCCTGTCAACCACCACC–3'/3018 dla regionu 1D kodującego białko VP1. W reakcji odwrotnej transkrypcji (reverse transcriptase – RT) stosowano starter p(dN)₆ (Boehringer).

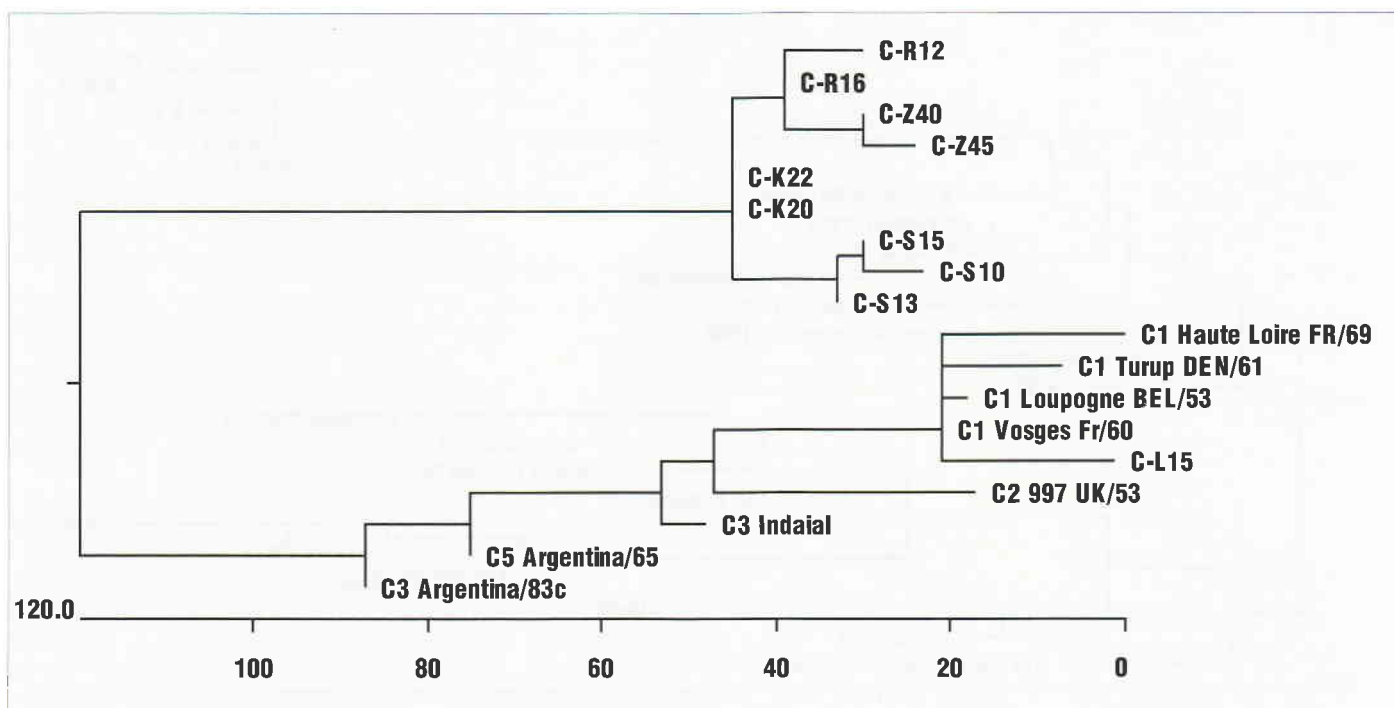
W celu syntezy cDNA 5 μ l roztworu RNA, który stanowił matrycę oraz 1 μ l (50 ng) startera ogrzewano w 70°C przez 5 min. pod warstwą oleju mineralnego i schładzano w łaźni wodnej. Następnie dodawano 5 μ l 5x buforu do RT (Boehringer), 2 μ l każdego z nukleotydów (dNTPs) o stężeniu 2 mM, 1 μ l RNase-inhibitor (Boehringer), 1 μ l (20 jednostek) AMV odwrotnej transkryptazy (Boehringer). Mieszaninę uzupełniano sterylną, destylowaną wodą do objętości 50 μ l po czym inkubowano w temperaturze pokojowej 20 min. oraz w 42°C 60 min.

Do reakcji amplifikacji użyto 5 μ l 10 x buforu dla polimerazy Taq (Boehringer), 3 μ l mieszaniny 10 mM dNTPs, 50 ng każdego ze starterów, 5 μ l cDNA, 1,5 jedn. polimerazy Taq oraz sterylną destylowaną wodę. Końcowa objętość mieszaniny wynosiła 50 μ l. Reakcja przebiegała pod

czas 30 cykli wg następującego programu termicznego: 96°C – 1 min., 56°C – 1 min., 72°C – 2 min. Wstępna denaturacja 95°C – 1 min., synteza w ostatnim cyklu – 10 minut. Kontrolę negatywną stanowił ekstrakt niezakaźnego nabłonka. Produkty amplifikacji rozdzielano elektroforetycznie w 1,5% żelu agarozowym i wybarwiano w roztworze bromku etydyny o stężeniu 0,5–1,0 $\mu\text{M}/\text{ml}$. Elektroforezę wykonywano w buforze TBE (90 mM Tris-base, 90 mM kwas borny, 2 mM EDTA) przy stałym natężeniu prądu elektrycznego 100 mA przez 40 min. Jako wzorca długości łańcucha nukleotydowego użyto G316A (Promega). Żele analizowano za pomocą automatycznego systemu analizy żeli – Imagistore 5 000 (Ultra Violet Products Ltd, Cambridge, UK). Wynik RT-PCR uznawano za dodatni, jeżeli w żelu w świetle UV był widoczny prążek cDNA o wielkości 672 pz – spodziewanej dla użytej pary starterów.

W świetle UV wycinano pasmo zawierające odpowiedni fragment cDNA, rozdrabniano, zawieszano w buforze do elucji (9) i wytrząsano w 37°C przez noc. Zawiesinę wirowano (15 000 obr./min., przez 10 min.) następnie dodawano 1 objętość fenolu o pH 8,0 i dwukrotnie mieszaninę chloroform/alkohol izoamylowy (24 : 1), za każdym razem wirując. Do fazy wodnej dodawano 2,5 objętości alkoholu etylowego. Fragment cDNA rozpuszczano w 20 μ l buforu TE (10) i poddawano działaniu polimerazy Klenow i restryktazy BamHI.

Do ligacji użyto 4 μ l cDNA, 5 μ l plazmidowego DNA (pBS+) uprzednio hydrolizowanego nukleazą restrykcyjną SmaI i BamHI, 2 μ l 10x buforu dla T4 DNA ligazy oraz 1 μ l ligazy DNA faga T4. Mieszaninę inkubowano w 16°C przez noc. Po tym czasie w temperaturze 0°C do 100 μ l



Ryc. 2. Drzewo filogenetyczne skonstruowane w oparciu o sekwencje nukleotydów fragmentu kodującego białko VP1 krajowych izolatów FMDV serotypu C oraz o sekwencje z Gene Bank

kompetentnych komórek *E. coli* dodawano 10 μ l mieszaniny ligacyjnej, inkubowano w łaźni lodowej przez 30 min. i dodawano 800 μ l medium SOC. Zawiesinę poddawano inkubacji przez 15 min. w temperaturze pokojowej, wytrząsano przez 1 godz. w 37°C i wysiewano na płytce z podłożem LB selekcyjnym transformanty (9).

W celu izolacji plazmidowego DNA do 3 ml pożywki LB przenoszono białą kolonię bakteryjną z płytki agarowej i bakterie hodowano przez 16 godzin w 37°C. Następnie hodowlę wirowano (2 min. 15 000 obr./min.). Osad bakterii zawieszano w 200 μ l buforu RI (50 mM glukozy, 25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA) i inkubowano 5 min. w łaźni lodowej. Po czym w temperaturze 0°C dodawano 400 μ l roztworu RII (0,2 N NaOH, 1% SDS). Mieszano, dodawano 300 μ l roztworu RIII (3 M octan potasu, 1,8 M kwas octowy) i inkubowano 5 minut w łaźni lodowej. Próbkę wirowano (5 min. 15 000 obr./min.). Do nowej próbki nalewano po 480 μ l izopropanolu, przenoszono po 800 μ l supernatantu i wirowano (3 min., 15 000 obr./min.). Do osadu dodawano 200 μ l etanolu i wirowano (2 min., 15 000 obr./min.) Osad rozpuszczano w 100 μ l roztworu RN-azy o stężeniu 0,1 mg/ml. Przydatność zrekombinowanych plazmidów do dalszej analizy sprawdzano w 1% żelach agarozowych.

Aby otrzymać jednoniciowy DNA, pojedyncze kolonie bakteryjne zawierające zrekombinowane plazmidy pBS(+) przenoszono do 3 ml pożywki 2xYT (9) i inkubowano w 37°C w czasie 1 godziny. Następnie dodawano 20 μ l faga M13KO7. Inkubację prowadzono 2 godziny z wytrząsaniem. Gdy hodowla stawała się mętna dodawano kanamycynę do stężenia 70 μ g/ml i hodowano w 37°C przez 18 godz. jednocześnie wytrząsając. Po odwirowaniu przez 10 minut przy 15 000 obr./min. do 1,2 ml supernatantu dodawano 200 μ l 20% PEG-u. Inkubowano w temp. pokojo-

wej 15 minut i wirowano (5 min., 15 000 obr./min.). Osad zawieszano w buforze TE pH 8,0, odbiałczano fenolem i mieszaniną chloroformu z alkoholem izoamylowym (24 : 1). Fazę wodną wytrącano 1/10 objętości octanu sodu i 2,5 objętościami etanolu. DNA rozpuszczano w 50 μ l H₂O.

Sekwencje ampliconów 2A/2B/1D określano metodą Sanger (13). Filmy rentgenowskie eksponowane z żelami sekwencyjnymi odczytywano po czym formatowano i analizowano wstępnie w programie EDITSEQ i MEGALIGN z pakietu LASERGENE (DNASTAR). Właściwą analizę filogenetyczną przeprowadzono przy pomocy pakietu programów PHYLIP, natomiast macierz dystansów genetycznych określano w programie DNADIST. Drzewa filogenetyczne konstruowano wg programu NEIGHBOR. Ich formatowanie i wydruk dokonano przy użyciu programu DRAWGRAM.

Wyniki i omówienie

Podczas 30 cykli PCR uzyskano amplifikację wszystkich osiemnastu badanych próbek cDNA FMDV otrzymanych w reakcji RT. Analiza żeli wykazała obecność prążków położonych w obszarze 672 pz markera. Kontrolę stanowił ekstrakt niezakażonego nabłonka – wynik ujemny. W niniejszej pracy zastosowano zestaw starterów P1-P2. Starter P1 został opracowany wcześniej przez Becka i Strohmaiera (1) na podstawie sekwencji regionu 2A/2B, natomiast P2 dla regionu 1D zaprojektowano przy użyciu programu komputerowego. Określone metodą Sanger sekwencje nukleotydowe fragmentu cDNA dziesięciu izolatów serotypu A oraz ośmiu izolatów serotypu C poddano analizie genetycznej. Badane izolaty pochodzą z ognisk pryszczycy w Polsce z lat 1959-67. Sekwen-

cje izolatów krajowych porównano z dostępnymi w banku elektronicznym. Program MEGALIGN pozwolił na jednoczesną analizę wielu sekwencji nukleotydowych umożliwiając ich grupowanie w klastery na podstawie pomiaru dystansów genetycznych między nimi. Otrzymane wykresy – drzewa filogenetyczne wskazują na zależności pomiędzy analizowanymi sekwencjami. Podobieństwo genetyczne większości izolatów krajowych zarówno w grupie serotypu A (ryc. 1) jak i O (ryc. 2) wskazuje na wspólne źródło ich pochodzenia. Obserwowane mutacje punktowe ograniczone były do pewnych pozycji nukleotydów i dotyczyły przeważnie trzeciej pozycji kodonów aminokwasów. Można przypuszczać, że brak znaczących różnic w sekwencji tych izolatów wynika z krótkiego odstępu czasu ich izolowania. Porównanie sekwencji nukleotydów izolatów krajowych z dostępnymi w banku elektronicznym wykazało pokrewieństwo jednego izolatu serotypu C (L15) z izolatami zachodnimi C1 Vosges Fr/60, C1 Loupogne BEL/53, C1 Turup DEN/61, C1 Haute Loire Fr/6. Natomiast w grupie serotypu A dwa izolaty (K14, K17) były spokrewnione z A22 550 USSR/65, jeden (T11) z izolatami A/Madrid(E)/1983, A/Portugal(P)/1983, A5/Allier(F)/1960, A5 Westerswald/58, A/Modena(I)/1984, A5/Parma(I)/1962, A/Marocco(MA)/1983.

Beck i Strohmaier (1) po raz pierwszy w 1987 r. zastosowali technikę sekwencjonowania do badań epidemiologicznych pryszczycy. Określili pochodzenie FMDV z ognisk wywoływanych przez serotypy O i A w Europie na przestrzeni 20 lat. Autorzy wykazali, że w większości wyizolowane szczepy były blisko spokrewnione z używanymi do produkcji szczepionki przeciwko pryszczycy. Od tej pory wyniki podobnych badań opublikowało wielu autorów (4-8, 10). Interesującą, obszerną analizę porównawczą przy użyciu technik filogenetycznych przedstawili Samuel i Knowles (12), którzy izolaty serotypu O pochodzące z różnych stron świata zakwalifikowali do 7 geograficznych grup –topotypów: Euro-SA (Europa-Ameryka Płd.), Cathay, WA (Afryka Zach.), EA (Afryka Wsch.), ME-SA (Środk. Wschód-Azja Płd.), SEA (Płd. Wsch. Azja) oraz ISA-1, ISA-2 topotypy indonezyjskie.

Reasumując należy stwierdzić, że analiza genetyczna krajowych izolatów FMDV pozwoliła na poznanie sekwencji nukleotydowej i precyzyjne określenie pokrewieństwa. Zastosowane techniki biologii molekularnej stanowią atrakcyjne uzupełnienie klasycznych metod diagnostycznych. Umożliwiają ustalenie pochodzenia oraz kierunki szerzenia się patogenów. Informacje te są niezwykle cenne dla skutecznej kontroli i zwalczania choroby.

Piśmiennictwo

1. Beck E., Strohmaier K.: Subtyping of European foot-and-mouth disease virus strains by nucleotide sequence determination. *J. Virol.* 1987, 61, 1621-1629.
2. Chomezyński P., Sacchi N.: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 1987, 162, 156-159.

3. Kęsy A., Paprocka G., Niedbalski W., Fitzner A.: Pryszczycza – stałe zagrożenie epidemiologiczne. *Medycyna Wet.* 2001, 57, 379-382.
4. Knowles N. J., Samuel A. R., Davies P. R., Kitching R. P., Venkataramanan R., Kanno T., Scherbakov A. V., Drygin V. V., Zhao Q.-Z., Xie Q.-G.: Emergence of a pandemic strain of foot-and-mouth disease virus serotype O. 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, Borovets, Bulgaria, 5-8, September 2000.
5. Malirat V., Auge de Mello P., Tiraboschi B., Beck E., Gomes I., Bergmann I. E.: Genetic variation of foot-and-mouth disease virus during persistent infection in cattle. *Virus Res.* 1994, 34, 31-48.
6. Marquardt O., Haas B.: VP1-coding sequences of recent isolates of foot-and-mouth disease virus types A, O and Asia 1. *Virus Genes* 1998, 16, 185-193.
7. Marquardt O., Rahman M. M., Freiberg B.: Genetic and antigenic variance of foot-and-mouth disease virus type Asia 1. *Arch. Virol.* 2000, 145, 149-157.
8. Reddy G. R., Tratschin J. D., Natarajan C., Suryanarayana V. V. V.: Capsid protein encoding (P1) sequence of foot-and-mouth disease virus type Asia 1 Ind 63/72. *Virus Genes* 1999, 18, 161-168.
9. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T.: Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, vol.1, 1.85-1.86.
10. Samuel A. R., Knowles N. J., Kitching R. P., Hafez S. M.: Molecular analysis of type O foot-and-mouth disease viruses isolated in Saudi Arabia between 1983 and 1995. *Epidem. Inf.* 1997, 119, 381-389.
11. Samuel A. R., Knowles N. J., Mackay D. K. J.: Genetic analysis of type O viruses responsible for epidemic of foot-and-mouth disease in North Africa. *Epidem. Inf.* 1999, 122, 529-538.
12. Samuel A. R., Knowles N. J.: Foot-and-mouth disease type O viruses exhibit genetically and geographically distinct evolutionary lineages (topotypes). *J. Gen. Virol.* 2001, 82, 609-621.
13. Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R.: DNA sequencing with chain termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1977, 74, 5463-5467.
14. Singh M., Mohan B. M., Suryanarayana V. V. S.: Serological and molecular analysis of serotype O foot-and-mouth disease virus isolated from disease outbreaks in India during 1987-91. *Virus Res.* 1996, 43, 45-55.
15. Stram Y., Chai D., Fawzy H., Molad T., Meiri N., Van-Ham M., El-Kilani S., Fahmy F., Moussa A., Yadin H.: Molecular epidemiology of foot-and-mouth disease (FMD) in Israel in 1994 and in other Middle-Eastern countries in the years 1992-1994. *Arch. Virol.* 1995, 140, 1791-1797.

Adres autora: doc. dr hab. Grażyna Paprocka, ul. Wodna 7, 98-220 Żduńska Wola; e-mail: grazyna@piwzp.invar.net.pl

MATEUSEN B., MAES D., VAN GOUBERGEN M., VERDONCK M., DE KRUIF A.: Skuteczność leczenia chlorowodorkiem linkomycyny względnie stosowanie szczepienia przeciwko *Mycoplasma hyopneumoniae* w zwalczaniu chronicznej choroby układu oddechowego w stadach świń. (Effectiveness of treatment with lincomycin hydrochloride and/or vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* for controlling chronic respiratory disease in a herd of pigs). *Vet. Rec.* 151, 135-140, 2002 (5)

Przebadano skuteczność trzech strategii zwalczania chronicznych chorób układu oddechowego w stadach świń. Badaniem objęto 245 prosiąt ze stada liczącego 200 macior uodpornionych przeciwko chorobie Aujeszzykego, parwoirowie z różycy. W żywieniu prosiąt stosowano karmę zawierającą salimycynę (40 ppm). Prosięta zaszczepiono przeciwko chorobie Aujeszzykego. W jednej grupie liczącej 61 zwierząt stosowano paszę z dodatkiem chlorowodoru linkomycyny w okresie od 71 do 91 dnia życia, drugą grupę zaszczepiono przeciwko *Mycoplasma hyopneumoniae* w wieku 4 i 28 dni, zaś w trzeciej grupie zastosowano paszę z dodatkiem salimycyny i zwierzęta zaszczepiono przeciwko *M. hyopneumoniae*, natomiast grupa czwarta stanowiła kontrolę. W okresie od 29 dnia życia do uboju codziennie przyrosty masy ciała i konwersja pokarmu była wyższa w trzech grupach doświadczalnych w porównaniu do grupy kontrolnej. Te różnice, jak również różnice w zachorowalności, śmiertelności, nasileniu objawów klinicznych i zmian sekcyjnych w układzie oddechowym, nie były jednak statystycznie istotne.