

Metody biologii molekularnej w rozpoznawaniu wirusowego zapalenia żołądka i jelit świń

Katedra Epizootiologii i Klinika Chorób Zakaźnych Zwierząt Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, ul. Głęboka 30, 20-612 Lublin

Wirusowe zapalenie żołądka i jelit świń (TGE – Transmissible Gastroenteritis) stanowi istotny problem w hodowli trzody chlewnej z uwagi na wysoką śmiertelność osesków, brak skutecznych metod leczenia oraz ograniczoną efektywność dostępnych szczepionek (31). Kontrola występowania wirusa w populacji świń pozwala zapobiec wprowadzaniu nośniceli zarazka oraz zwierząt z infekcją subkliniczną do stad wolnych od choroby, co łączy się także z wymaganiami eksportowo-importowymi w zakresie międzynarodowego obrotu trzodą chlewną. Osiągnięcie tego celu jest możliwe przy zastosowaniu metod pozwalających na przyżyciowe wykrywanie niewielkich ilości zarazka w kale świń dorosłych, stanowiących najistotniejsze ogniwo w łańcuchu epizootycznym choroby.

W poprzednim artykule (11) omówione zostały konwencjonalne metody rozpoznawania wirusowego zapalenia żołądka i jelit świń, polegające na wykrywaniu w materiale klinicznym cząstek wirusa, jego antygenów lub detekcji specyficznych przeciwciał w surowicy krwi. Zwrócono uwagę, że niektóre z tych metod aktualnie stosowane rutynowo w rozpoznawaniu choroby nie nadają się do diagnostyki przyżyciowej lub wymagają kosztownej aparatury specjalistycznej jak np. mikroskopia elektronowa. Serologiczna diagnostyka komplikowana jest natomiast faktem pojawiania się krzyżowych reakcji związanych z występowaniem w populacji świń subklinicznych infekcji powodowanych przez koronawirus układu oddechowego świń (PRCV) będący mutantem delecyjnym wirusa TGE (19).

W niniejszym artykule przedstawione zostaną możliwości wykorzystania metod biologii molekularnej w rozpoznawaniu tej choroby.

Odkrycie w 1953 r. przez Watsona i Cricka (41) struktury DNA oraz roli jaką odgrywa on w sterowaniu cyklem reprodukcyjnym komórki stworzyło podstawy do rozwoju nowych dyscyplin naukowych takich jak inżynieria genetyczna i biotechnologia. Konsekwencją tego przełomowego odkrycia było także wprowadzenie technik biologii molekularnej do diagnostyki chorób zakaźnych, dające możliwość detekcji nawet śladowych ilości drobnoustrojów cho-

robotwórczych w oparciu o wykrywanie materiału genetycznego zarazków (30, 45). Metody biologii molekularnej oraz techniki rekombinacji DNA zostały wykorzystane także do analizy genomu wirusów oraz w produkcji szczepionek nowej generacji (22).

Zasadniczym elementem warunkującym praktyczne zastosowanie osiągnięć biologii molekularnej do rozpoznawania wirusowych chorób ludzi i zwierząt jest znajomość budowy genomu zarazków, a szczególnie pierwszorzędowej struktury kwasu nukleinowego zapisanej w postaci sekwencji nukleotydów tworzących cząsteczkę DNA lub RNA. Pomimo istotnego znaczenia ekonomicznego TGE w hodowli trzody chlewnej, wirus TGEV należy do najmniej poznanych w porównaniu do innych koronawirusów takich jak IBV czy MHV. Z końcem lat osiemdziesiątych dokonał się olbrzymi postęp w zakresie rozwoju nauk biologicznych, dzięki któremu uzyskano m.in. nowe dane na temat biologii molekularnej tego wirusa (18). Wydaje się zatem uzasadnione podanie na wstępie podstawowych informacji z tego zakresu.

Wirus zapalenia żołądka i jelit świń (TGEV) należy do rodzaju *Coronavirus* rodziny *Coronaviridae* obejmującej wirusy posiadające otoczkę, których materiałem genetycznym jest pojedyncza, poliadenylowana, pozytywnie spolaryzowana nić kwasu RNA o długości około 28 500 nukleotydów (8). Cząstkę wirionu tworzą trzy białka strukturalne (17). Glikoproteina S zwana białkiem peplomeru jest miejscem lokalizacji głównych determinant antygenowych wirusa, z których dwie (A i B) odgrywają kluczową rolę w indukcji przeciwciał neutralizujących. Glikoproteina M (białko transmembranowe) odgrywa istotną rolę w tworzeniu architektury wirionu oraz pośredniczy w indukowaniu przeciwciał wiążących dopełniacz i w syntezie α -interferonu. Fosforylowane białko N (nukleoproteina) stanowi zrąb dla nukleokapsydu o symetrii helikalnej i łączy się bezpośrednio z wirusowym RNA. Epitopy zlokalizowane w obrębie białka N prawdopodobnie biorą udział w indukcji odpowiedzi immunologicznej typu komórkowego.

Genomowy RNA wirusa zorganizowany jest w siedmiu regionach (17, 18). Dzięki zastosowaniu

technik klonowania molekularnego oraz metody sekwencjonowania DNA, pod koniec lat osiemdziesiątych poznano i określono sekwencję nukleotydową sześciu spośród tych regionów (6, 16, 28, 29). Obszar ten obejmuje około 9000 nukleotydów z końca 3' genomowego RNA i zawiera trzy główne geny kodujące białka strukturalne wirionu. Obecność dodatkowych otwartych ramek odczytu (ORF) w obrębie sekwencjonowanego obszaru jest dowodem istnienia kilku białek niestrukturalnych, których funkcja nie została dotychczas określona (5, 27). Pozostała część genomu tj. około 20 000 nukleotydów z końca 5' (gen 1) odpowiedzialna jest za kodowanie RNA-zależnej polimerazy RNA biorącej udział w replikacji wirusa. Ten odcinek genomu został wysekwencjonowany dopiero w 1995 r. (8) i w ten sposób wirus TGEV stał się czwartym koronawirusem obok IBV, MHV i HCV – 229E, dla którego określona została kompletna sekwencja genomowego RNA.

Ekspresja genów kodujących białka strukturalne i niestrukturalne TGEV uwarunkowana jest syntezą w zakażonej komórce 6-8 subgenomowych mRNA (12, 17, 20, 37, 43) w zależności od szczepu wirusa, które łącznie z RNA genomowym tworzą charakterystyczny układ odcinków o wspólnym poliadenylowanym końcu 3' oraz różnej długości w kierunku 5' (3'coterminal nested set structure). Matrycą do syntezy poszczególnych mRNA w procesie transkrypcji jest nić negatywnie spolaryzowana (antygenom) o długości pełnego genomu, syntetyzowana na matrycy genomowego RNA przy udziale RNA polimerazy. Synteza subgenomowych mRNA odbywa się w procesie tzw. przerywanej transkrypcji (discontinuous transcription process) (14, 15), w którym podstawową rolę odgrywa krótki odcinek RNA zwany sekwencją liderową (leader sequence) o długości 70-90 nukleotydów (23). Sekwencja ta ma zdolność wielokrotnego oddysocjowywania po transkrypcji od końca 3' antygenomu i ponownej hybrydyzacji w różnych miejscach w obrębie ujemnej nici RNA, dając początek kolejnym informacyjnym mRNA. Istotnym elementem inicjującym proces transkrypcji z udziałem kompleksu lider – polimeraza RNA jest występowanie w obrębie regionów międzygenowych genomu TGEV krótkich obszarów nietranslacyjnych (NTR) w postaci tzw. miejsc inicjujących transkrypcję (TAS – transcription associated sequences) (21, 38). Przyjmuje się, że miejsca te służą jako promotery dla syntezy subgenomowych mRNA ponieważ w regionach tych dochodzi do wiązania wolnych sekwencji liderowych pełniących od tego momentu funkcję startera procesu transkrypcji (leader primed transcription). Poszczególne rodzaje mRNA różnią się długością sekwencji, przy czym każdy kolejny krótszy mRNA stanowi wycinek sekwencji swojego poprzednika. Częścią aktywną translacyjnie pozostaje jednak tylko ten fragment każdego mRNA, który nie pokrywa się z kolejnym krótszym subgeno-

momym mRNA. W procesie translacji każdy odcinek mRNA staje się matrycą dla syntezy pojedynczego polipeptydu, jakkolwiek pozostaje to w sprzeczności z potencjałem kodującym wszystkich rodzajów mRNA z wyjątkiem najkrótszego (mRNA-8).

Techniki klonowania i rekombinacji DNA oraz sekwencjonowania przyczyniły się do określenia sekwencji nukleotydowej genomów większości wirusów chorobotwórczych dla ludzi i zwierząt. Sekwencja nukleotydowa kwasu nukleinowego stanowiącego materiał genetyczny drobnoustrojów jest różna u różnych patogenów. Unikatowość pierwszorzędowej struktury DNA lub RNA zarazków stworzyła podstawy do opracowania i wprowadzenia do praktyki laboratoryjnej dwóch nowoczesnych metod diagnostycznych tj. hybrydyzacji molekularnej oraz łańcuchowej reakcji polimerazowej (PCR) (30, 45), polegających na detekcji kwasu nukleinowego drobnoustrojów. W niektórych przypadkach użycie wspomnianych metod diagnostycznych umożliwia zróżnicowanie odrębnych serotypów tego samego zarazka lub izolatów terenowych oraz użytych do produkcji szczepionek, co ma istotne znaczenie w badaniach epidemiologicznych (25, 26). Diagnostyczna aplikacja wymienionych metod wymaga określenia sekwencji nukleotydowej przynajmniej fragmentu genomu badanego zarazka. Selekcja takiego regionu diagnostycznego dokonywana jest w oparciu o analizę genomu i wybór sekwencji konserwatywnych w odniesieniu do różnych szczepów tego samego drobnoustroju lub grupy zarazków spokrewnionych ze sobą.

Detekcja kwasów nukleinowych opiera się na zdolności do wzajemnej reakcji ze sobą dwóch komplementarnych jednoniciowych fragmentów DNA lub RNA (45). Jeśli jeden z tych fragmentów jest wyznakowany i stanowi tzw. sondę diagnostyczną, możliwe jest potwierdzenie obecności w badanym materiale drugiego, komplementarnego fragmentu w metodzie hybrydyzacji. Alternatywnie, stosując dwa krótkie oligonukleotydy (startery) komplementarne do sekwencji ograniczających poszukiwany fragment genomu oraz odpowiednie warunki reakcji, możliwa jest detekcja nawet niewielkich ilości patogennych drobnoustrojów poprzez enzymatyczną amplifikację określonego fragmentu DNA w metodzie PCR. W obu przypadkach istotą reakcji na poziomie molekularnym jest komplementarne łączenie się ze sobą (parowanie) zasad azotowych kwasów nukleinowych. Procedura hybrydyzacji przeważnie wymaga użycia klonowanego w wektorze plazmidowym lub fagowym diagnostycznego fragmentu DNA. Alternatywnie, sondę mogą stanowić syntetyzowane *in vitro* odcinki RNA, produkty PCR lub oligonukleotydy uzyskiwane w całości drogą syntezy chemicznej (30).

Najczęściej stosowanymi odmianami hybrydyzacji molekularnej w diagnostyce medycznej i wete-

rynaryjnej są hybrydyzacja membranowa (dot blot, slot blot), w której ekstrahowany z badanej próbki kwas nukleinowy immobilizowany jest na filtrze nylonowym lub nitrocelulozowym oraz hybrydyzacja *in situ*, w której cała reakcja zachodzi bezpośrednio w skrawku badanej tkanki. W obu wariantach metody użyta sonda może być znakowana przy użyciu markerów radioaktywnych lub nieizotopowych (biotyna, digoksygenina). Obydwa rodzaje hybrydyzacji znalazły zastosowanie w rozpoznawaniu zakażeń świń powodowanych przez wirus TGEV (1, 34, 36, 40).

Punktem wyjścia do wykorzystania sond molekularnych w diagnostyce tej choroby było wykazanie w oparciu o porównawczą analizę sekwencyjną, że koniec 3' genu wirusa jest odcinkiem wysoce konserwatywnym wśród wszystkich szczepów TGEV oraz koronawirusów tworzących z nim wspólną grupę antygenową (FCoV, CCV, PRCV, HCV-229E). Koniec 5' genu kodującego glikoproteinę S jest natomiast konserwatywny tylko dla szczepów wirusa TGEV (13, 44).

Po raz pierwszy zastosowanie sondy cDNA oraz techniki hybrydyzacji do detekcji RNA TGEV opisano w pracy Shockley i wsp. (34). Autorzy ci wykazali przydatność metody dot blot do wykrywania RNA wirusa w materiale klinicznym. Wykazano, że sonda o długości 2000 par zasad pochodząca z końca 3' genu atenuowanego szczepu Purdue może być stosowana do wykrywania RNA TGEV w hodowli komórkowej oraz w kale pochodzącym od świń zakażonych doświadczalnie.

W oparciu o dane sekwencyjne, Benfield i wsp. (3) opracowali na bazie zjadliwego szczepu Miller sondy cDNA komplementarne do końca 3' genu wirusa (pA2 i pB4) oraz końca 5' genu S (pD24 i pE21), które zastosowano do wykrywania RNA wirusa TGEV w zakażonej hodowli komórkowej oraz w próbkach kału świń. Autorzy wykazali, że wszystkie użyte sondy reagowały z RNA TGEV pochodzącym z wzorcowych szczepów zjadliwych, atenuowanych oraz izolatów terenowych. Nie obserwowano natomiast hybrydyzacji z RNA ekstrahowanym z tkanki na której namnażano wirusy. Każda z sond wykrywała wirusowy RNA w koncentracji 200 pg, przy słabej intensywności sygnału. Mocniejszy i lepiej widoczny sygnał uzyskiwano przy stężeniu RNA 10-krotnie większym (2000 pg). Pozytywny sygnał z RNA pochodzącym z wirusów antygenowo pokrewnych uzyskano przy użyciu sond komplementarnych do sekwencji z końca 3' genu. Sondy z końca 3' genu oraz końca 5' genu S były jednakowo czułe w detekcji RNA z hodowli komórkowej, natomiast wykazano wyższą czułość sond z końca 5' genu S w odniesieniu do detekcji RNA z próbek kału pochodzącego od świń naturalnie zakażonych. Wyniki hybrydyzacji potwierdzają dane sekwencyjne odnośnie niezmienności regionu nietranslacyjnego 3' genu wśród szczepów TGEV

oraz innych koronawirusów spokrewnionych antygenowo (3, 34). Nie jest on jednak konserwatywny w odniesieniu do wszystkich koronawirusów, ponieważ nawet w warunkach reakcji umożliwiających hybrydyzację wysokiego odsetka niedopasowanych nukleotydów pomiędzy matrycą i sondą (low stringency), nie uzyskano pozytywnego sygnału z RNA szczepów nie spokrewnionych antygenowo z TGEV. Sonda pD24 z końca 5' genu S reagowała natomiast tylko z RNA wirusa TGEV (3). Czułość sond w detekcji RNA ekstrahowanego z oczyszczonych wirionów TGEV była porównywalna do uzyskiwanej między innymi w badaniach nad rotawirusami (7), jakkolwiek Shockley i wsp. (34) wskazują na możliwość detekcji RNA TGEV w granicach 20-25 pg. Teoretycznie fakt ten wytłumaczyć można długością użytych sond. Sondy dłuższe powinny dawać mocniejszy sygnał ponieważ hybrydują do dłuższego odcinka wirusowego RNA. Badania Benfielda i wsp. (3) nie potwierdziły jednak takiej zależności gdyż koncentracja wykrywanego RNA była porównywalna dla sond o różnej długości sekwencji.

Obok aplikacji diagnostycznych istotne znaczenie ma możliwość zastosowania sond molekularnych do różnicowania wirusa TGEV z innymi koronawirusami, a zwłaszcza z koronawirusem układu oddechowego świń (PRCV). W oparciu o analizę sekwencji genu tego wirusa zidentyfikowano delecję długości 621-681 nukleotydów w zależności od szczepu, zlokalizowaną w obszarze końca 5' genu S (19, 24, 39). Porównanie sekwencji nukleotydowych tego regionu pomiędzy wirusem TGEV a innymi koronawirusami ze wspólnej grupy antygenowej wykazało, że procent homologii sekwencji waha się w granicach 49-98% w zależności od obszaru użytego do badań (44). Jackwood i wsp. (13) opisali zastosowanie dwóch sond cDNA pochodzących ze szczepu zjadliwego Miller, komplementarnych do wspomnianych regionów o wysokiej i niskiej homologii sekwencji, do rozpoznawania oraz różnicowania infekcji powodowanych przez TGEV i koronawirusy pokrewne antygenowo. Zgodnie z założeniem autorów, sonda o względnie wysokiej homologii sekwencji hybrydyzowała z różnymi szczepami wirusa TGEV, a także z jego wariantem oddechowym (PRCV) oraz koronawirusem kotów (FCoV) i psów (CCV). Sonda o niskiej homologii sekwencji reagowała tylko z RNA TGEV. Porównawcza analiza sekwencji użytych sond oraz końca 5' genu S użytych w badaniach szczepów wykazała, że delecja występująca u wirusa PRCV położona jest w regionie rozpoznawanym przez sondę o niskiej homologii sekwencji. Tłumaczy to możliwość wykorzystania tej sondy do diagnostyki różnicowej TGEV oraz PRCV u świń. Analogiczne wyniki uzyskali Bae i wsp. (1), którzy oceniali przydatność wspomnianych sond do wykrywania i różnicowania RNA pochodzącego z różnych koronawirusów. Interesującym w tych badaniach wydaje

się fakt pojawiania się słabego sygnału w hybrydyzacji sondy o niskiej homologii sekwencji z RNA koronawirusa psów (CCV) w umiarkowanych warunkach hybrydyzacyjnych (moderate stringency). Sygnał ten zniknął jednak po zmianie warunków reakcji na takie, które umożliwiały istnienie w obrębie komplementarnych nici jedynie niewielkiego odsetka niedopasowanych zasad (high stringency). W takich warunkach sonda reagowała tylko z RNA TGEV.

Czułość oraz specyficzność detekcji RNA TGEV w metodzie hybrydyzacji determinowana jest wieloma czynnikami, z których najważniejszym jest wybór właściwego regionu diagnostycznego do przygotowania sondy. Wesley i wsp. (42) porównali wartość diagnostyczną dwóch klonów cDNA wirusa TGEV, z których jeden (pG3BS) pochodził z końca 5' genu S, a drugi (pRP3) zawierał sekwencje końca 3' genu S, region międzygenowy S-M oraz cały gen M. W badaniach wykazano, że sonda pG3BS wykrywała 0,5 ng czystego RNA TGEV, natomiast dłuższa sonda pRP3 była w stanie wykryć 0,1 ng RNA. Sonda bardziej czuła nie różnicowała jednak TGEV z koronawirusami pokrewnymi antygenowo w odróżnieniu od pG3BS. Dane te potwierdzają informacje uzyskane przez innych autorów, zgodnie z którymi sekwencje nukleotydów zlokalizowane w okolicy końca 5' genu glikoproteiny S w genomie TGEV są wysoce konserwatywne tylko w obrębie różnych szczepów tego samego wirusa (3, 13).

We wszystkich cytowanych badaniach autorzy wykorzystywali sondy znakowane radioaktywnym fosforem (^{32}P). Stosowanie radioizotopów stanowiło przez wiele lat metodę z wyboru znakowania sond. Aktualnie coraz częściej zarysowuje się tendencja do zastępowania markerów radioizotopowych nieradioaktywnymi, co związane jest głównie z bezpieczeństwem pracy oraz możliwością wielokrotnego używania znakowanych sond. Vaughn i wsp. (40) opisali wykorzystanie dwóch sond cDNA znakowanych digoksygeniną do detekcji i różnicowania RNA wirusa TGEV i PRCV. Sekwencje obydwu sond były komplementarne do regionu 5' genu S, natomiast sonda różnicująca (FP1) obejmowała obszar delecyjny genu S wirusa PRCV. Jako system detekcyjny reakcji autorzy ci zastosowali metodę immunochemiluminescencji. Ocena czułości metody wykazała, że obie sondy były w stanie wykryć około 1,25 pg genomowego RNA TGEV. Wskazuje to, że zastosowany w cytowanych badaniach system znakowania i detekcji sondy gwarantuje przeszło 100-krotnie wyższą czułość reakcji w porównaniu z systemem znakowania radioizotopowego.

Klasyczne metody hybrydyzacji membranowej typu dot blot lub slot blot wiążą się z koniecznością wykonywania wstępnej ekstrakcji kwasu nukleinowego z badanej próbki. W procesie tym zawsze istnieje ryzyko wystąpienia degradacji materiału genetycznego, zwłaszcza jeśli izolowany jest RNA

(30). Technika pozwalająca na wykazanie obecności kwasu nukleinowego zarazka bezpośrednio w zakażonych komórkach jest metoda hybrydyzacji *in situ*. Sirinarumitr i wsp. (36) zastosowali wspomnianą metodę do detekcji wirusa TGEV i PRCV w zakażonych hodowlach komórkowych, do różnicowania komórek zakażonych obydwooma wirusami oraz do detekcji tych wirusów w tkankach utrwalonych formaliną, pochodzących od świń zakażonych eksperymentalnie lub naturalnie. Zastosowane w cytowanych badaniach sondy znakowane radioaktywnie (^{35}S) cechowały się wysoką specyficznością w detekcji RNA TGEV i PRCV. Ci sami autorzy (35) podjęli ostatnio próbę zastosowania w diagnostyce i różnicowaniu TGEV i PRCV techniki hybrydyzacji *in situ* z użyciem sond znakowanych nieizotopowo. W badaniach wykazano, że sondy znakowane fluoresceiną były równie skuteczne w detekcji RNA jak sondy znakowane izotopem siarki. Wprawdzie metoda izotopowa okazała się czulsza od nieizotopowej, ale technika fluorescencyjna skuteczniej eliminowała pojawianie się niespecyficznych sygnałów w reakcji hybrydyzacji i była mniej pracochłonna. Niewątpliwą zaletą metody hybrydyzacji *in situ* jest możliwość równoległej obserwacji zmian histopatologicznych w zakażonych komórkach, a także śledzenia dróg szerzenia się infekcji w poszczególnych tkankach, co ma istotne znaczenie dla wyjaśnienia mechanizmów patogenezy zakażenia.

Podstawową wadą stosowania sond molekularnych oraz metody hybrydyzacji jest brak możliwości detekcji drobnoustrojów chorobotwórczych występujących w badanej próbce w niewielkich koncentracjach. W oparciu o wyniki uzyskiwane przez autorów cytowanych w niniejszej pracy można przyjąć, że czułość metody hybrydyzacji w odniesieniu do detekcji TGEV w lizatach hodowli komórkowej waha się w granicach 10^5 – 4×10^7 wirionów. Wartości te odpowiadają ilości 1,25–500 pg genomowego RNA wirusa, przy założeniu, że ilość 2×10^6 wirionów TGEV jest ekwiwalentna do 25 pg genomowego RNA (34).

Techniką, która zrewolucjonizowała współczesną diagnostykę laboratoryjną chorób zakaźnych, zwłaszcza wywoływanych przez wirusy, jest opisana przez Saiki i wsp. (32, 33) łańcuchowa reakcja polimerazowa (PCR), dzięki której można wykrywać śladowe ilości drobnoustrojów w materiale klinicznym. Istotą tej metody jest enzymatyczna amplifikacja określonego fragmentu DNA do ilości milion-krotnie przewyższającej wyjściową ilość matrycowego kwasu nukleinowego, co pozwala na jego uwidocznienie w obrazie elektroforetycznym (2). Krytycznym momentem decydującym o przydatności tej techniki do detekcji drobnoustrojów w materiale klinicznym jest odpowiednie przygotowanie matrycowego DNA lub RNA. Ekstrahowana próbka kwasu nukleinowego musi być wolna od zanieczyszczeń

substancjami blokującymi lub hamującymi reakcję enzymatyczną. Istotne jest zatem aby procedura ekstrakcji skutecznie eliminowała obecność substancji inhibicyjnych w próbce DNA lub RNA.

Metoda PCR nie była dotychczas szerzej wykorzystywana do laboratoryjnej diagnostyki przyżyciowej zakażeń TGEV u świń. Wydaje się, że jedną z przyczyn mogą być trudności w optymalizacji warunków reakcji, a zwłaszcza w ekstrakcji jednoniciowego RNA z kału świń. Dzięki możliwości amplifikacji dowolnie wybranego fragmentu genomu w oparciu o znajomość jego sekwencji, technika PCR stosowana była natomiast do analizy genomu wirusa oraz do przygotowania określonych odcinków cDNA w celu ustalenia ich struktury pierwszorzędowej metodą sekwencjonowania (4, 27). Wykorzystanie techniki PCR do diagnostyki zakażeń TGEV oraz do różnicowania tego wirusa z koronawirusem układu oddechowego świń (PRCV) łączyło się z koniecznością uprzedniej izolacji zarazka w hodowli komórkowej a następnie ekstrakcji RNA i wykonania reakcji RT-PCR. Uzyskiwane produkty reakcji były porównywane z pochodzącymi z wzorcowych hodowli kontrolnych (24, 39). Alternatywnie w celu potwierdzenia obecności wirusa w zakażonej hodowli komórkowej można zastosować odpowiednie sondy cDNA oraz metodę hybrydyzacji.

Autorzy niniejszej publikacji podjęli próbę zastosowania metody RT-PCR do przyżyciowego wykrywania obecności wirusa TGEV w kale pochodzącym od świń zakażonych eksperymentalnie i naturalnie (9, 10). W oparciu o opublikowane sekwencje nukleotydowe głównych genów kodujących białka strukturalne wirionu TGEV (5), wytypowano 6 par starterów komplementarnych do sekwencji konserwatywnych zlokalizowanych w obrębie genu kodującego nukleoproteinę (N), glikoproteinę S oraz polimerazę (Pol) wirusa. W badaniach tych autorzy zastosowali oryginalną metodę ekstrakcji jednoniciowego RNA wirusa z próbek kału, polegającą na wykorzystaniu guanidyny oraz proszku szklanego. Uwolniony z wirionów pod wpływem działania guanidyny genomowy RNA wirusa, związany następnie z proszkiem szklanym, jest niepodatny na degradację i może być wielokrotnie odpłukiwany w celu usunięcia zanieczyszczeń białkowych. Pozytywne wyniki uzyskiwane w reakcji RT-PCR świadczą, że procedura taka jest szczególnie przydatna do izolacji RNA z materiału biologicznego takiego jak kał. Dzięki wykorzystaniu mianowanego wirusa namnożonego w hodowli komórkowej oraz próbek kału pochodzących od zdrowych zwierząt ustalono, że metoda RT-PCR umożliwiała detekcję RNA wirusa TGEV o mianie $10^{2,83}$ TCID₅₀.

Wysoka czułość metody PCR, zwykle wyższa od metod konwencjonalnych powoduje, że technika ta jest w stanie zastąpić wiele aktualnie stosowanych metod szybkiej detekcji patogennych drobnoustro-

jów w badanym materiale klinicznym, w tym wirusa TGEV. Po zoptymalizowaniu warunków reakcji RT-PCR, metoda ta może być wykonywana rutynowo nawet w skromnie wyposażonych pracowniach diagnostycznych i przy niewielkich nakładach finansowych.

Piśmiennictwo

1. Bae I., Jackwood D. J. i wsp.: Clin. Microbiol. 29, 215, 1991.
2. Belak S., Ballagi-Pordany A.: Vet. Res. Commun. 17, 55, 1993.
3. Benfield D. A., Jackwood D. J. i wsp.: Arch. Virol. 116, 91, 1991.
4. Britton P., Kottier S. i wsp.: The use of PCR genome mapping for the characterisation of TGEV strains. w: Coronaviruses: molecular biology and virus-host interactions. Plenum Press, New York 1994, s. 29.
5. Britton P., Mawditt K. L., Page K. W.: Virus Res. 21, 181, 1991.
6. Britton P., Page K. W.: Virus Res. 18, 71, 1990.
7. Eiden J. J., Firoozmand F. i wsp.: J. Clin. Microbiol. 27, 422, 1989.
8. Eleouet J. F., Rasschaert D. i wsp.: Virology 206, 817, 1995.
9. Grądzki Z., Winiarczyk S., Britton P.: Proc. 14th IPVS Congress, Bologna, Italy 1996, s. 121.
10. Grądzki Z., Winiarczyk S., Stajek T.: Roczn. Wojsk. Inst. Hig. 32, 8, 1995.
11. Grądzki Z., Winiarczyk S.: Medycyna Wet. 52, 553, 1996.
12. Hiscox J. A., Cavanagh D., Britton P.: Virus Res. 36, 119, 1995.
13. Jackwood D. J., Bae I., Jackwood R. J., Saif L. J.: Transmissible gastroenteritis virus and porcine respiratory coronavirus: molecular characterisation of the S gene using cDNA probes and nucleotide sequence analysis. w: Coronaviruses. Plenum Press, New York 1994, s. 43.
14. Jeong Y. S., Makino S.: J. Virol. 66, 3339, 1992.
15. Jeong Y. S., Makino S.: J. Virol. 68, 2615, 1994.
16. Kapke P. A., Brian D. A.: Virology 151, 41, 1986.
17. Lui M. M. C.: Ann. Rev. Microbiol. 44, 303, 1990.
18. Laude H., Rasschaert D. i wsp.: Vet. Microbiol. 23, 147, 1990.
19. Laude H., Van Reeth K., Pensaert M.: Vet. Res. 24, 125, 1993.
20. Luytjes W.: Coronavirus gene expression. w: The Coronaviridae. Plenum Press, New York 1995, s. 33.
21. Marle G., Luytjes W. i wsp.: J. Virol. 69, 7851, 1995.
22. McCullough K. C.: Rev. sci. tech. Off. int. Epiz. 12, 325, 1993.
23. Page K. W., Britton P., Boursnell M. G.: Virus Genes 4, 289, 1990.
24. Paul P. S., Halbur P. G., Vaughn E. M.: Compend. Cont. Educ. Pract. Vet. 16, 1223, 1994.
25. Paul P. S.: Proc. 14th IPVS Congress, Bologna, Italy 1996, s. 10.
26. Paul P. S.: Vet. Microbiol. 24, 409, 1990.
27. Pulford D. J., Britton P., Page K. W., Garwes D. J.: Edv. Exp. Med. Biol. 276, 233, 1990.
28. Rasschaert D., Gelfi J., Laude H.: Biochimie 69, 591, 1987.
29. Rasschaert D., Laude H.: J. Gen. Virol. 68, 1883, 1987.
30. Rodriguez M., Schudel A. A.: Rev. sci. tech. Off. int. Epiz. 12, 405, 1993.
31. Saif L. J., Wesley R. D.: Transmissible Gastroenteritis. w: Diseases of Swine. Iowa State Univ. Press, Ames, Iowa 1992, s. 362.
32. Saiki R. K., Gelfand D. H. i wsp.: Science 239, 487, 1988.
33. Saiki R. K., Scharf S. i wsp.: Science 230, 1350, 1985.
34. Shockley L. J., Kapke P. A. i wsp.: Microbiol. 25, 1591, 1987.
35. Sirinarumitr T., Paul P. S. i wsp.: Proc. 14th IPVS Congress, Bologna, Italy 1996, s. 90.
36. Sirinarumitr T., Paul P. S. i wsp.: J. Virol. Meth. 56, 149, 1996.
37. Spaan W., Cavanagh D., Horzinek M. C.: J. Gen. Virol. 69, 2939, 1988.
38. Van der Most R. G., Spaan W. M.: Coronavirus replication, transcription and RNA recombination w: The Coronaviridae. Plenum Press, New York 1995, s. 11.
39. Vaughn E. M., Halbur P. G., Paul P. S.: J. Clin. Microbiol. 32, 1809, 1994.
40. Vaughn E. M., Halbur P. G., Paul P. S.: J. Vet. Diagn. Invest. 8, 241, 1996.
41. Watson J. D., Crick F. C.: Nature (London) 171, 964, 1953.
42. Wesley R. D., Wesley I. V., Woods R. D.: J. Vet. Diagn. Invest. 3, 29, 1991.
43. Wesley R. D., Woods R. D., Cheung A. K.: J. Virol. 64, 4761, 1990.
44. Wesley R. D.: Adv. Exp. Med. Biol. 276, 301, 1991.
45. Wolcott M. J.: Clin. Microbiol. Rev. 5, 370, 1992.