



PRACE ORYGINALNE



TOMASZ STADEJEK, ZYGMUNT PEJSAK

Diagnostyka różnicowa pestiwirusowych zakażeń świń przy użyciu amplifikacji DNA *in vitro*

Zakład Chorób Świń Państwowego Instytutu Weterynaryjnego, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Stadejek T., Pejsak Z.

Differential diagnosis of pestiviral infections of swine by means of reverse transcription and polymerase chain reaction

Summary

Classical swine fever (CSF) is a serious infectious disease of pigs which is widespread in Europe. Classical swine fever virus (CSFV) belongs to the Pestivirus genus of the Flaviviridae family. The aim of this work was the application of reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR) for the differentiation of pestiviral infections of swine.

Sixteen strains of BVDV and 59 strains of CSFV were used in the study. Total RNA was extracted by the Chomczynski method. After reverse transcription of viral RNA, cDNA was amplified using two sets of PCR primers. One set was constructed to detect all pestiviruses, by selecting primers from the highly conservative 5' untranslated region (5'UTR) of the pestivirus genome. The other set was constructed to detect CSFV strains only, by selecting primers from the E2 coding region. All the pestivirus strains used were detected by PCR with primers from 5'UTR. Only CSFV strains were detected by PCR with primers from E2. The sensitivity of the assay was from 0.1 to 10 TCID₅₀.

Wirus klasycznego pomoru świń (classical swine fever virus – CSFV), obok wirusa wirusowej biegunki bydła (bovine viral diarrhoea virus – BVDV) i wirusa choroby granicznej owiec (Border disease virus – BDV), należy do rodzaju *Pestivirus* rodziny *Flaviviridae* (23). Wymienione wirusy wywołują groźne, ważne ekonomicznie choroby świń, bydła, owiec, kóz, dzików oraz dzikich przeżuwaczy (4, 7–9, 12, 18). Pestiwirusy wykazują zdolność przekraczania barier gatunkowych. Chociaż dotychczas nie stwierdzono naturalnych przypadków zakażeń przeżuwaczy wirusem CSF, udowodniono taką możliwość doświadczalnie (3, 10, 16). Natomiast zakażenia BVDV i BDV mogą występować zarówno u bydła, owiec, kóz (11, 20) jak i świń (17, 22), powodując u tych ostatnich objawy podobne do pomoru klasycznego wywołanego przez CSFV o małej zjadliwości (21).

Pestiwirusy są bardzo blisko ze sobą spokrewnione co uwidacznia się m.in. w krzyżowych reakcjach serologicznych (13). Dla praktyki weterynaryjnej szcze-

gólne znaczenie posiada różnicowanie CSF od zakażeń świń wywołanych innymi pestiwirusami. Zwalczanie tej choroby odbywa się bowiem przez likwidację zakażonego stada i istotne ograniczenia w obrocie trzodą chlewną.

Przeciwciała monoklonalne (monoclonal antibodies – Mabs) są szeroko wykorzystywane w testach immunoenzymatycznych do wykrywania i różnicowania antygenów pestiwirusów jak i przeciwciał przeciw nim skierowanych. Jednakże antygenowa zmienność pestiwirusów w połączeniu z wysoką specyficznością Mabs stanowi istotny problem testów diagnostycznych z ich użyciem.

Ostatnio, coraz powszechniej w diagnostyce zakażeń pestiwirusowych stosuje się enzymatyczną amplifikację DNA *in vitro* (polymerase chain reaction – PCR) (15). Mechanizm tej reakcji polega na enzymatycznym powieleniu fragmentu DNA ograniczonego przez dwa oligonukleotydowe startery. Wielu autorów opublikowało prace opisujące zastosowanie PCR do

wykrywania pestiwirusów wykorzystując startery wybrane z regionów niekodujących 5'UTR, 3'UTR oraz regionów kodowania białek N^{PRO}, C, E^{RNS}, E1, E2 i NS2-3 (19). Większość, skupiała się na opracowaniu zestawu o możliwie szerokim spektrum specyficzności; natomiast Katz i wsp. (6) pierwsi podjęli udaną próbę zastosowania PCR do szybkiej różnicowej diagnostyki BVDV i CSFV.

Celem pracy było zastosowanie PCR w rutynowej diagnostyce różnicowej pestiwirusowych zakażeń świń.

Materiał i metody

Szczepy wirusów. W badaniach wykorzystano 16 szczepów BVDV oraz 59 laboratoryjnych, szczepionkowych i terenowych szczepów CSFV.

Organizacja laboratorium PCR.

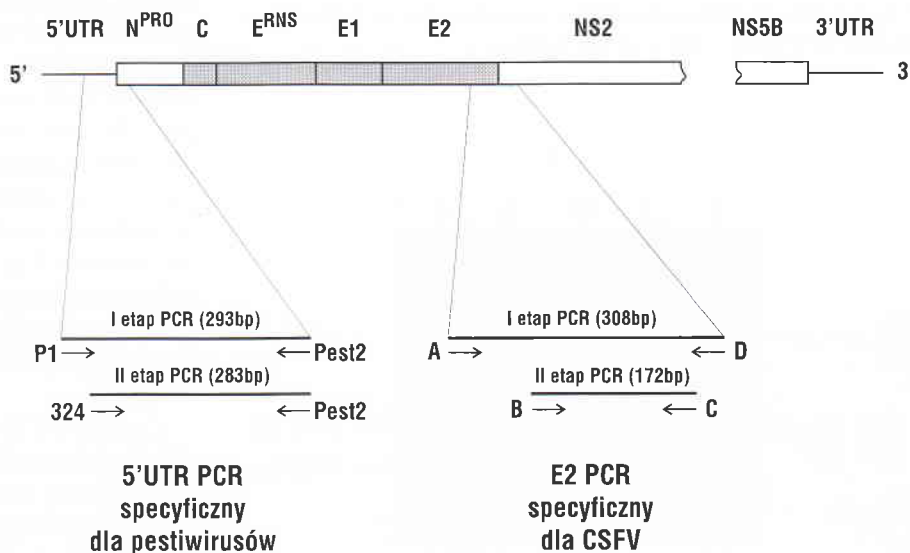
Dla uniknięcia wyników fałszywie dodatnich, laboratorium w którym wykonywano PCR podzielono na oddzielne części przeznaczone odpowiednio do: 1) wykonywania mieszanin reakcyjnych, 2) ekstrakcji RNA, reakcji RT, pierwszego etapu PCR, 3) nested PCR, 4) elektroforezy produktów PCR. Po szczególne etapy, z wyjątkiem elektroforezy, wykonywano w komorach laminarnych. Powierzchnie robocze zmywano 2% roztworem chloraminy i naświetlano promieniami UV. Każde stanowisko wyposażone było w oddzielny zestaw pipet. Stosowano końcówki z filtrem, zapobiegające przedostawaniu się aerozoli do wnętrza pipety oraz odpowiedniego typu stelaże do probówek. Wszystkie czynności wykonywano w często zmienianych, jednorazowych rękawiczkach lateksowych.

Postępowanie

Ekstrakcja RNA. Całkowite RNA ekstrahowano według metody Chomczyńskiego, zmodyfikowanej przez Ridpath i wsp. (14), z 59 hodowli szczepów CSFV i homogenizatów narządów wewnętrznych świń zakażonych-padłych. Do 375 µl homogenizatu próby, znajdującej się w 1,5 ml probówce typu Eppendorf, dodawano 375 µl roztworu denaturującego (4 M tioocyanian guanidyny, 15 mM cytrynian sodu, 0,5% sarkozyl, 0,1 M 2-merkaptotanol), 75 µl 2 M octanu sodu i wytrząsano 10 sek. Następnie dodawano 750 µl mieszaniny fenol/chloroform (5:1), pH 4,5, wytrząsano do uzyskania jednorodnej emulsji i inkubowano w łaźni lodowej przez 15 min. Po upływie tego czasu mieszaninę wirowano przez 15 min. przy 12 000×g. Fazę wodną przenoszono do nowej probówki, dodawano równą objętość alkoholu izopropylowego i po dokładnym wymieszaniu inkubowano przez 30 min. w -20°C. Precypitat RNA

Tab. 1. Sekwencje i lokalizacja starterów wykorzystanych w badaniach

Zestaw starterów	Nazwa startera	Kierunek 5'→3'	Sekwencja 5'→3'	Lokalizacja (Alfort)	Region genomu
1	324	→	ATGCCC(T/A)TAGTAGGACTAGCA	90–110	5'UTR
	P1	→	GAGGCTAGCCATGCCCTTAGT	80–100	5'UTR
	Pest2	←	TCAACTCCATGTGCCATGTAC	353–373	5'UTR/N ^{PRO}
2	A	→	ATATATGCTCAAGGGCGAGT	3378–3397	E2
	B	→	CTGTGGCTAATAGTGACCTAC	3499–3519	E2
	C	←	CATTCTTTATGGGCTCATC	3652–3671	E2/NS2
	D	←	ACAGCAGTAGTATCCATTCTTTA	3662–3685	E2/NS2



Ryc. 1. Schemat testu PCR zastosowanego w diagnostyce różnicowej pestiwirusów

osadzano przez 15 minutowe wirowanie przy 12 000×g. Po usunięciu supernatantu peletkę rozpuszczano w 300 µl roztworu denaturującego, po czym dodawano 300 µl izopropanolu i po dokładnym wymieszaniu inkubowano przez 30 min. w -20°C. Precypitat osadzano przez wirowanie, jak opisano powyżej. Po usunięciu alkoholu peletkę RNA przemywano 70% etanolem i suszono 15 min. w temperaturze pokojowej. Następnie RNA rozpuszczano w 15 µl wody i przechowywano w -70°C do czasu dalszej obróbki.

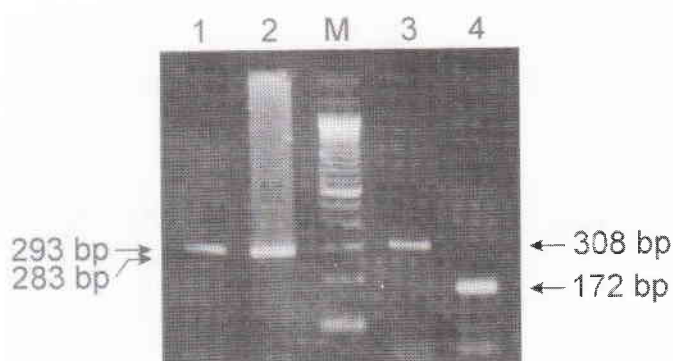
Odwrotna transkrypcja. Przed przeprowadzeniem reakcji odwrotnej transkrypcji (reverse transcription – RT), 5 µl roztworu RNA poddawano denaturacji termicznej w obecności 0,002 jednostek (U) heksanukleotydów (Pharmacia), w 65°C przez 5 min., pod warstwą oleju mineralnego, a następnie chłodzono w łaźni lodowej. Po dodaniu 5 µl 5× buforu do RT (5×first strand buffer) (BRL), 2,5 µl każdego z nukleotydów (dNTP) o stężeniu 2 mM, 24 U RNAGuard (Pharmacia), 200 U odwrotnej transkryptazy wirusa białaczki myszy (murine leukemia virus – MuLV) (BRL), mieszaninę inkubowano przez 5 min. w temperaturze pokojowej, następnie przez 90 min. w 37°C i przez 5 min. w 98°C. Całkowita objętość mieszaniny reakcyjnej wynosiła 28 µl.

Amplifikacja cDNA. W badaniach wykorzystano dwa zestawy starterów zaprojektowane na podstawie sekwencji nukleotydowych, odpowiednio 5'UTR i E2. Ich sekwen-

Tab. 2. Czulość PCR w wykrywaniu CSFV w homogenizatach narządów wewnętrznych

Próba	PCR			
	5'UTR		E2	
	I etap	II etap	I etap	II etap
1	10^{-1}	10^{-1}	n.w.	10^{-1}
2	10^{-2}	10^{-2}	n.w.	10^{-2}
3	10^{-2}	10^{-2}	10^{-1}	10^{-2}
4	10^{-2}	10^{-2}	n.w.	10^{-3}
5	10^{-2}	10^{-2}	n.w.	10^{-2}

Objaśnienie: Podano maksymalne rozcieńczenia, w których wykryto CSFV (n.w. – nie wykryto wirusa)



Ryc. 2. Porównanie wielkości produktów poszczególnych etapów PCR. Oznaczenia ścieżek: 1: I etap 5'UTR PCR, 2: II etap 5'UTR PCR, 3: I etap E2 PCR, 4: II etap E2 PCR, M: 100 bp DNA Ladder (Gibco BRL). Przy strzałkach podano wielkości uzyskanych produktów



Ryc. 3. Produkty I (ścieżki 1-5) i II (ścieżki 6-10) etapu 5'UTR PCR (a) i E2 PCR (b). Amplifikacji poddano nierozcieńczony homogenizat próby nr 5 (ścieżki 1, 6) oraz rozcieńczony 10^{-1} (2, 7), 10^{-2} (3, 8), 10^{-3} (4, 9). Ścieżki 5 i 10 zawierają produkty kontrolnych reakcji ujemnych

cje nukleotydowe i lokalizację w genomie szczepu Alfort CSFV zawiera tabela 1. Zestaw 1 opracowany na bazie konserwatywnej dla pestiwirusów sekwencji 5'UTR miał pozwolić na amplifikację wszystkich reprezentantów tego rodzaju. Natomiast zestaw 2, z regionu o stosunkowo dużej zmienności (glikoproteina E2) pozwalał wykryć szczepy CSFV, podczas gdy pozostałe pestiwirusy były niewykrywalne.

Amplifikację fragmentów 5'UTR i E2 z cDNA uzyskanego w wyniku reakcji RT wykonywano w dwóch etapach. W pierwszym amplifikowano DNA używając starterów zewnętrznych, w drugim etapie (nested PCR) przeprowadzano reamplifikację produktu pierwszej reakcji, używając primerów położonych wewnątrznie (nested) w stosunku do zastosowanych w pierwszym etapie (ryc. 1). Obie reakcje przeprowadzano w probówkach typu Eppendorf o pojemności 0,5 ml używając termocyklera PolyChain II (Polygen). W tym celu w probówce mieszano 5 μ l $10\times$ buforu dla termostabilnej polimerazy DNA PrimeZymeTM (Biometra), 2 μ l mieszaniny 10 mM dNTPs, 20 pmoli każdego ze starterów zewnętrznych, 1 U polimerazy PrimeZymeTM (Biometra) i 5 μ l produktu reakcji RT (I etap) lub 2 μ l produktu pierwszego PCR (II etap – nested PCR). Po uzupełnieniu wodą, objętość mieszaniny wynosiła 50 μ l. W czasie amplifikacji mieszanina była przykryta warstwą oleju mineralnego.

Czulość PCR w wykrywaniu CSFV. Dla określenia minimalnej dawki $TCID_{50}$ (tissue culture infectious dose 50%) wykrywalnej testem PCR, do 365 μ l-owych objętości homogenizatów narządów wewnętrznych świni wolnej od zakażeń pestiwirusowych dodawano po 10 μ l rozcieńczeń hodowli 5 różnych izolatów CSFV, dla uzyskania koncentracji dawki zakaźnej od 1000 do 0,01 $TCID_{50}/375 \mu$ l homogenizatu. Następnie określano największe rozcieńczenie homogenizatu, przy którym PCR dawał wynik dodatni.

Analiza uzyskanych produktów amplifikacji. Produkty PCR analizowano po przeprowadzeniu rozdzielu elektroforetycznego 10 μ l mieszaniny poreakcyjnej, w 2% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny o koncentracji 1 μ g/ml. Elektroforezę prowadzono przez 30 min. w buforze $1\times$ TBE (90 mM Tris-base, 90 mM kwas borsowy, 2 mM EDTA), przy stałym natężeniu prądu elektrycznego, równym 100 mA. Wynik PCR uznawano za dodatni jeżeli w żelu, w świetle UV transiluminatora był widoczny prążek DNA o spodziewanej dla danej pary starterów wielkości.

Wyniki i omówienie

Stosowanie szybkich, czułych i swoistych metod rozpoznawania jest podstawą zwalczania pomoru klasycznego świń. Metody te powinny zapewniać możliwość odróżnienia zakażeń CSFV od zakażeń świń pestiwirusami przeżuwaczy. Stosowane obecnie techniki pozwalają na wykrywanie antygenów wirusa bądź jego kwasu nukleinowego. W niniejszej pracy poddano ocenie przydatność testu PCR w diagnostyce różnicowej zakażeń pestiwirusowych świń.

Reakcja polimeryzacji łańcuchowej ze starterami z regionu 5'UTR pozwoliła na wykrycie wszystkich ba-

danych pestiwirusów na podstawie obserwacji w świetle UV transiluminatora, prążka DNA o wielkości 293 bp (I etap) i/lub 283 bp (II etap) w 2% żelu agarozowym po rozdziale elektroforetycznym 10 µl mieszaniny poreakcyjnej (ryc. 2). Natomiast PCR z użyciem zestawu starterów z regionu kodującego glikoproteinę E2 dał wynik dodatni w badaniu wszystkich szczepów referencyjnych oraz izolatów terenowych CSFV (prążki o wielkości 308 bp (I etap) i/lub 172 bp (II etap) (ryc. 2). Analiza produktów amplifikacji cDNA otrzymanego z RNA referencyjnych szczepów BVDV wykazała brak jakichkolwiek produktów PCR.

Badając czułość PCR określono także dawki 5 różnych szczepów CSFV jakie musiały być obecne w objętości homogenizatu wycinków narządów wewnętrznych aby były one wykrywalne. Limit PCR wahał się od 10 do 0,1 TCID₅₀ dla trzech szczepów limit wynosił 10, dla dwóch 1 a dla jednego 0,1 TCID₅₀.

Opisywana w piśmiennictwie (1) wysoka czułość nested PCR w porównaniu do testu jednoetapowego nie znalazła potwierdzenia w wynikach przeprowadzonych badań. Wykazano, że czułość może zależeć od doboru primerów i/lub regionu wybranego do amplifikacji (ryc. 3). Stwierdzono, że czułość amplifikacji fragmentu konserwatywnego regionu 5'UTR jest równa dla obydwu etapów. Z kolei amplifikacja fragmentu kodującego białko E2 dała wynik dodatni I PCR tylko w jednej z 5 reakcji. Do wykrycia wirusa w pozostałych 4 próbach konieczne było przeprowadzenie nested PCR (tab. 2). Przyczyną powyższego może być niepełna komplementarność zasad pomiędzy matrycą i starterem.

Uzyskane wyniki są zbliżone do opisanych przez Canal i wsp. (2). Osiągnięta przez nich czułość to 100 TCID₅₀ dla CSFV i 1 TCID₅₀ dla BVDV, przy użyciu tej samej pary primerów wybranych z regionu 5'UTR. Hamel i wsp. (5) stosując zmodyfikowaną metodę ekstrakcji i jednoetapowy RT-PCR donoszą o osiągniętym poziomie wykrywalności 0,1 TCID₅₀ lub 0,01 TCID₅₀ po przeprowadzeniu hybrydyzacji z sondą chemiluminescencyjną. Z kolei Liu i wsp. prowadząc amplifikację fragmentu białka E^{RNS} byli w stanie wykryć 10 000 TCID₅₀ w pojedynczym PCR, a 1-10 TCID₅₀ w nested PCR.

Warto podkreślić, że wynik PCR można otrzymać po upływie 24 godzin od otrzymania próby do badania, podczas gdy w przypadku stosowania odczynu immunoenzymatycznego musi upłynąć co najmniej 55 godzin.

Wniosek

Zastosowanie odpowiednio dobranych, dwóch zestawów starterów pozwala na wykorzystanie techniki PCR w szybkiej diagnostyce różnicowej pestiwirusowych zakażeń świń.

Piśmiennictwo

1. Belak S., Ballagi-Pordany A., Flensburg J., Virtanen A.: Arch. Virol. 108, 279, 153, 1989.
2. Canal C. W., Hotzel I., de Almeida L. L., Roehe P. M., Masuda A.: Vet. Microbiol. 40, 373, 122, 1996.
3. Dahle J., Liess B., Frey H. R.: Interspecies transmission of pestiviruses: experimental infections with bovine viral diarrhoea virus in pigs and hog cholera virus in cattle, w: J. W. Harkness (editor), Pestivirus infections of ruminants. EUR 10238 EN, pp. 195, 9, 1987.
4. Doyle L. G., Heuschele W. P.: J.A.V.M.A. 183, 1257, 5, 1983.
5. Hamel A. L., Wasylyshen M. D., Nayar G. P. S.: J. Clin. Microbiol. 33, 287, 101, 1995.
6. Katz J. B., Ridpath J. F., Bolin S. R.: J. Clin. Microbiol. 31, 565, 118, 1993.
7. Kocan A. A., Franzman A., Waldrup K. A., Kubat G. J.: J. Wildlife Dis. 22, 418, 6, 1986.
8. Laddomada A., Patta C., Oggiano A., Caccia A., Ruii A., Cossu P., Firinu A.: Vet. Rec. 134, 183, 2, 1994.
9. Leforban Y., Cariolet R.: Annales de Recherches Veterinaires 23, 93-103, 3, 1992.
10. Loan R. W., Storm M. M.: Am. J. Vet. Res. 29, 807, 8, 1968.
11. Loken T.: J. Comp. Path. 103, 1, 12, 1990.
12. Nettleton P. F., Herring J. A., Corrigan W.: Vet. Rec. 107, 425, 4, 1980.
13. Paton D. J.: Pestivirus diversity. J. Comp. Path. 112, 215, 79, 1995.
14. Ridpath J. F., Bolin S. R., Dubovi E. J.: Virology 205, 66, 129, 1994.
15. Saiki R. K., Gelfand D. H., Stoffel S., Scharf S. J., Higuchi R., Horn G. T., Mullis K. B., Ehrlich H. A.: Science 239, 487, 97, 1988.
16. Shimizu M., Kumagai T.: Vet. Microbiol. 20, 207, 10, 1989.
17. Snowdon W. A., French E. L.: Australian Vet. J. 44, 179, 13, 1968.
18. Soine C., Uatanaa G., Depner K. R.: Tropical Animal Health and Production 24, 125, 7, 1992.
19. Stadejek T.: Wykrywanie i charakterystyka szczepów wirusa klasycznego pomoru świń przy użyciu wybranych technik biologii molekularnej. Praca dokt. Państwowy Instytut Weterynaryjny, 1996.
20. Taylor W. P., Okeke A. N. C., Shidali N. N.: Trop. Animal Health and Production 9, 249, 11, 1977.
21. Terpstra C., Wensvoort G.: Res. Vet. Sci. 45, 137, 15, 1988.
22. Vilček Š., Belák S.: J. Virol. Methods 60, 103, 14, 1996.
23. Wengler G.: Family Flaviviridae, w: R. I. B. Francki, C. M. Fauquet, D. L. Knudson, F. Brown (editors), Classification and Nomenclature of Viruses. Fifth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses. Arch. Virol., Suppl. 2, 223, 1, 1991.

Adres autora: dr Tomasz Stadejek, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

LAVEN R. A., ANDREWS A. H.: Kontrola syndromu stłuszczenia wątroby w stadzie bydła rasy jersey poprzez zmianę diety i stosowanie rekombinantu somatotropiny bydłowej. (Control of fatty liver syndrome in Jersey herd by a change of diet and the use of recombinant bovine somatotropin). Vet. Rec. 142, 36-39, 1998 (2)

Zapotrzebowanie energetyczne krów mlecznych nie zawsze znajduje pokrycie w pożywieniu dostarczanym w okresie pierwszych 8 tygodni po wycieleniu. Celem pokrycia tych zwiększonych wydatków energetycznych ustrój mobilizuje rezerwy tłuszczu, węglowodanów i białka. Badania przeprowadzono w 4 grupach krów rasy jersey różniących się wydajnością mleka utrzymywanych na identycznej diecie kompletnej. Poziom β -hydroksymaślanu w plazmie był w normie. Natomiast występowała zwiększona aktywność aminotransferazy asparaginowej, dehydrogenazy glutaminianowej i niezesteryfikowanych kwasów tłuszczowych. Trzynaście krów z syndromem stłuszczenia wątroby podzielono na dwie grupy; jednej podano w iniekcji 640 mg rekombinantu somatotropiny bydłowej. Wydajność mleczna tych krów była znamienne wyższa w ciągu 2 tygodni po iniekcji. U tych krów też był wyższy poziom β -hydroksymaślanu i niezesteryfikowanych kwasów tłuszczowych a niższe stężenie mocznika po 7 dniach po iniekcji hormonu.