

MARCIN BAÑBURA, ANNA CHMIELEWSKA,
ANNA TUCHOLSKA, KONRAD MALICKI

Test PCR w diagnostyce wirusowego zakaźnego ronienia klaczy^{*})

Katedra Mikrobiologii i Immunologii Wydziału Weterynaryjnego SGGW, ul. Grochowska 272, 03-849 Warszawa

Bañbura M., Chmielewska A., Tucholska A., Malicki K.

Polymerase chain reaction in diagnosis of equine herpesvirus-1 miscarriage

Summary

The nested PCR technique (Borchers and Slater, 1993) was applied for the diagnosis of EHV-1 infections. DNA samples were isolated from livers of miscarried fetuses or dead foals. After amplification we detected EHV-1 specific sequences in 9 out of 15 fetuses and in 2 out of 6 foals. PCR results were compared to results of routinely performed immunofluorescent detection of viral antigen in cryosections of tissues. Six tested fetuses were FAT-positive, 7 FAT-negative and 2 were questionable. One FAT-negative fetus and two questionable were PCR-positive. All foals were FAT-negative. We have demonstrated that PCR is more sensitive than FAT and allows verification of inconclusive results of antigen detection. PCR is also suitable for detection of EHV-1 specific sequences in archival samples frozen up to 3 years.

Z zakaźnym wirusowym ronieniem klaczy (*rhino-pneumonitis equorum*) związane są dwa czynniki zakaźne należące do rodziny *Herpesviridae*, podrodziny *α-herpesvirinae* – herpeswirusy koni: typ 1 (*Equid herpesvirus type 1*; EHV-1) i typ 4 (EHV-4, dawniej EHV-1, podtyp 2) (3). Pierwszy z nich powoduje ronienia, zakażenia górnych dróg oddechowych oraz zaburzenia neurologiczne, natomiast drugi odpowiedzialny jest głównie za zakażenia górnych dróg oddechowych, choć okazjonalnie izolowany był także z przypadków poronień (13-15). Z ekonomicznego punktu widzenia, największe znaczenie mają zakażenia EHV-1 przebiegające z poronieniem, występujące u źrebnych klaczy.

Zakaźne wirusowe ronienie klaczy (wzrk) stwierdzano w Polsce począwszy od lat czterdziestych (8, 18) do chwili obecnej (9). Do niedawna diagnostyka laboratoryjna wzrk opierała się na: a) badaniu histopatologicznym tkanek poronionego płodu (ciałka wtrętowe Dimocka), b) immunofluorescencyjnym wykrywaniu wirusowego antygenu w histopatologicznych skrawkach z narządów wewnętrznych poronionych płodów, c) izolacji wirusa w hodowlach komórek wrażliwych na zakażenie EHV, d) serologicznym badaniu surowic pochodzących od podejrzanych zwierząt (np. klaczy, które poroniły). Diagnostyka serologiczna ma jednak ograniczoną wartość ze względu na występowanie przeciwciał będących efektem szczepień ochronnych; badanie histopatologiczne i izolacja wirusa są natomiast technikami pracochłonnymi i stosunkowo

długotrwałymi. Dlatego też w ostatnich latach w diagnostyce zakaźnego ronienia klaczy zastosowano łańcuchową reakcję polimeryzacji (Polymerase Chain Reaction, PCR) (1, 2, 5-7, 11, 16, 17). PCR (10), poprzez cykliczną amplifikację, pozwala na wykrycie w odpowiedniej próbce pojedynczych kopii poszukiwanego (target) DNA.

W niniejszej pracy przedstawiono wyniki zastosowania PCR do wykrywania obecności DNA EHV-1 w tkankach poronionych płodów i źrebiąt padłych w różnym wieku.

Materiał i metody

Materiał. Badania przeprowadzono na wycinkach płuc i wątroby płodów poronionych w różnym czasie przed porodem lub źrebiąt padłych w wieku od 2 dni do 5 miesięcy. Badaniami objęto zarówno świeże tkanki, dostarczane na bieżąco do Zakładu Wirusologii, jak i próbki z lat 1994-1996, przechowywane w temperaturze -20°C. Z próbek wątroby izolowano DNA całkowity (12) i używano jako matrycy do amplifikacji. Kontrolę pozytywną stanowiły: a) DNA ekstrahowany z hodowli komórek nerki królika RK₁₃ (ATCC) zakażonych EHV-1, szczepem RacH (19), b) DNA ekstrahowany z hodowli komórek skóry konia (equine dermal cells, ED) zakażonej EHV-1, szczepem Austria IV. Kontrolę swoistości amplifikacji stanowił DNA ekstrahowany z hodowli komórek ED zakażonych EHV-4, szczepem T252. DNA izolowany z hodowli komórek RK₁₃ i ED niezakażonych wirusem służył jako kontrola negatywna. Szczepy Austria IV, T252 oraz hodowlę komórek ED otrzymano od dr Kerstin Borchers, Institut für Virologie, Freie Universität Berlin, Niemcy.

^{*}Praca finansowana w ramach grantu KBN 5PO6K 038 09.

PCR. Zastosowano tzw. nested PCR polegającą na dwóch cyklach reakcji według wcześniej opracowanego schematu (2). Użyte startery umożliwiają amplifikację typowo swoistych sekwencji genu glikoproteiny B (gB) EHV-1, nie obserwuje się natomiast amplifikacji EHV-4 (2). Startery zsyntetyzowano w firmie Ransom Hill Bioscience, Ramona, CA, USA.

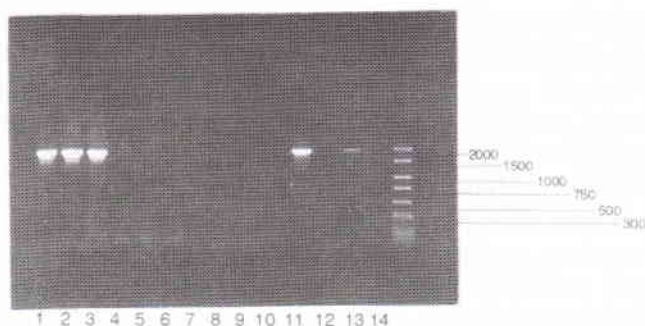
Koktajl amplifikacyjny (PCR mix) zawierał w 50 μ l: 100 ng badanego DNA, 0,4 μ M każdego startera, po 0,2 mM każdego deoksynukleotydu (Sigma, USA), 1,5 mM MgCl₂, albuminę bydlęcą, 1,5 jednostki polimerazy Taq (MBI Fermentas, Litwa) i bufor dla polimerazy Taq (MBI Fermentas). Amplifikację przeprowadzano w termocyklerze MiniCycler (MJ Research, USA), w dwóch etapach: I. ze starterami zewnętrznymi, po wstępnej denaturacji przez 4 min. przy 94°C następowały 33 cykle: denaturacja 94°C przez 2 min., przyłączanie starterów przez 2 min. przy 56°C, dobudowanie łańcucha przez 2 min. przy 72°C; amplifikację kończyło wydłużanie łańcucha przez 10 min. II. produkt powstały w I etapie rozcieńczano 1:1000 i 1 μ l reamplifikowano ze starterami wewnętrznymi, w takich samych warunkach.

Analizę elektroforetyczną produktów amplifikacji przeprowadzano w 0,8% żelu agarozowym (Sigma) z dodatkiem bromku etydyny, w buforze TBE (Tris, Borate, EDTA) przy 10V/cm przez 45 minut. Do określania wielkości produktów amplifikacji używano wzorzec masowy DNA firmy Sigma, nr kat. P-9577.

Immunofluorescencja. Wykonywano skrawki mrożeniowe z narządów wewnętrznych poronionych płodów i padłych źrebiąt, które po utrwaleniu w acetonie barwiono koniugatem fluorescencyjnym Gamakon, firmy Bioveta Nitra (Republika Czeska), zgodnie z zaleceniami producenta.

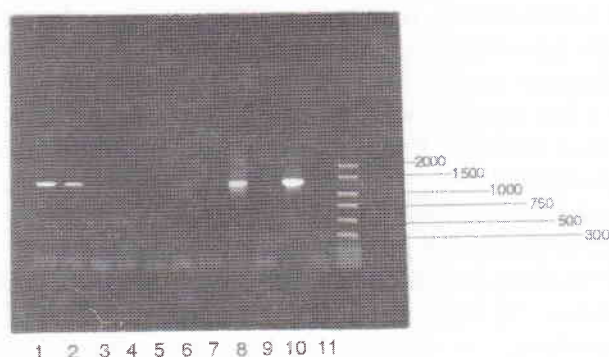
Wyniki i omówienie

Wyniki I etapu amplifikacji DNA izolowanego z wątrób poronionych płodów i padłych źrebiąt oraz DNA zakażonych i niezakażonych hodowli komórkowych przedstawia ryc. 1. W pozytywnych próbkach kontrolnych (próbki 11, 13, 14) stwierdzano amplifi-



Ryc. 1. Wyniki pierwszego etapu amplifikacji DNA izolowanego z wątrób poronionych płodów i padłych źrebiąt

Objaśnienia: 1-4, 6, 8-9 – DNA izolowane z wątrób poronionych płodów; 5 i 7 – DNA izolowane z wątrób padłych źrebiąt; 10 i 12 – DNA izolowane z niezakażonych wirusem hodowli komórkowych RK₁₃ i ED; 11 – DNA izolowane z hodowli komórkowej RK₁₃ zakażonej szczepem EHV-1 RacH; 13-14 – DNA izolowane z hodowli komórkowych ED zakażonych szczepami EHV-1 Austria IV i EHV-4 T252.



Ryc. 2. Wyniki reamplifikacji próbek DNA, w których w pierwszym etapie nie stwierdzono widocznych produktów amplifikacji

Objaśnienia: 1, 3, 5-6 – DNA izolowane z wątrób poronionych płodów; 2 i 4 – DNA izolowane z wątrób padłych źrebiąt; 7 i 9 – DNA izolowane z niezakażonych wirusem hodowli komórkowych RK₁₃ i ED; 8 – DNA izolowane z hodowli komórkowej RK₁₃ zakażonej szczepem EHV-1 RacH; 10-11 – DNA izolowane z hodowli komórkowych ED zakażonych szczepami EHV-1 Austria IV i EHV-4 T252.

Tab. 1. Porównanie wyników badania poronionych płodów i padłych źrebiąt w kierunku EHV-1 metodami PCR i IF w latach 1995-1997

Badany materiał	Liczba ogółem	PCR			IF		
		poz. (+)	neg. (-)	wątpl.	poz.	neg.	wątpl.
Płody	15	I tura	5	4	0	1	
		II tura	4	2	1	1	
		neg. (-)	6	0	6	0	
Źrebięta	6	I tura	0	0	0	0	
		II tura	2	0	0	0	
		neg. (-)	4	0	6	0	

kację fragmentu o oczekiwanej wielkości 1.88 kb. Taki sam fragment uzyskano w próbkach 1-3. Próbkę 4-9, w których w pierwszym etapie amplifikacji nie stwierdzono, poddano reamplifikacji ze starterami wewnętrznymi. Wyniki drugiego etapu ilustruje ryc. 2. W pozytywnych próbkach kontrolnych (próbki 8, 10, 11) uzyskiwano amplifikację fragmentu o długości 1.28 kb. Fragment o tej samej długości widoczny jest w badanych próbkach 1 i 2. W obu etapach PCR nie stwierdzano amplifikacji w kontrolnych próbkach negatywnych oraz w kontroli swoistości reakcji.

Ogółem przebadano materiał pochodzący od 15 poronionych płodów oraz od 6 padłych źrebiąt (tab. 1). Zaobserwowane rozbieżności wyników PCR i immunofluorescencji nie są zaskakujące, ponieważ czułość zagnieżdżonej PCR dla zastosowanych starterów określono na 1 fg wirusowego DNA, co odpowiada 3 kopiom genomu wirusa (2).

Zalety PCR sprawiają, że znajduje ona coraz szersze zastosowanie w rozpoznawaniu zarówno wirusowych, jak i bakteryjnych zakażeń ludzi i zwierząt (4). Wykazano na przykład, że możliwa jest amplifikacja DNA bez jego izolacji z próbki (1), co dodatkowo skraca czas badania. Ponadto, do uzyskania zadowalających wyników wirus nie musi być aktywny – z powodzeniem wykonywano PCR z tkanek przechowywanych w bloczkach parafinowych do 3 lat (7).

Wyrażany jest także pogląd, że jest mniej prawdopodobne, by takie czynniki, jak niewłaściwy sposób przesyłania materiału do badań czy obecność przeciwciał neutralizujących, pojawiających się w przebiegu zakażenia, mogły mieć istotny wpływ na wynik PCR i rozpoznanie (16). W powyższej pracy skupiono uwagę na wykrywaniu swoistych sekwencji DNA EHV-1. PCR stwarza jednak znacznie szersze możliwości. Połączenie z analizą restrykcyjną produktów amplifikacji pozwala na różnicowanie EHV-1 i EHV-4 (6, 17). Podobne różnicowanie dwóch typów wirusa możliwe jest także dzięki zastosowaniu odpowiednio do-

branych starterów (2, 16) lub kombinacji PCR z hybridyzacją (11).

Wnioski

1. Ponad 50% poronień u kłaczy spowodowanych jest zakażeniami EHV-1.
2. Padnięcia źrebiąt mogą mieć związek z zakażeniami EHV-1.
3. PCR jest metodą bardziej czułą niż immunofluorescencja.
4. Trzyletni okres przechowywania próbek w zamrozeniu nie wpływa na przydatność DNA do amplifikacji.

Piśmiennictwo

1. Ballagi-Pordany A., Klingeborn B., Flensburg J., Belak S.: Vet. Microbiol. 22, 373, 1990.
2. Borchers K., Slater J.: J. Virol. Meth. 45, 331, 1993.
3. Bryans J. T., Allen G. P. W: Herpesvirus Diseases of Cattle, Horses, and Pigs. G. Wittman (Wydawca), Kluwer Academic Publishers, Boston 1989, s. 176.
4. Kuźmak J., Grundboeck J.: Medycyna Wet. 49, 151, 1993.
5. McCann S. H. E., Mumford J. A., Binns M. M.: J. Virol. Meth. 52, 184, 1995.
6. O'Keefe J. S., Murray A., Wilks C. R., Moriarty K. M.: Res. Vet. Sci. 50, 349, 1991.
7. O'Keefe J. S., Julian A., Moriarty K., Murray A., Wilks C. R.: New Zealand Vet. J. 42, 93, 1994.
8. Parnas J., Kunicki-Goldfinger W., Stepkowski S.: Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, Lublin, 4, 217, 1949.
9. Rola J., Żmudziński J.: Medycyna Wet. 53, 268, 1997.
10. Saiki R. K., Gelfand D. H., Stoffel S. J., Higuchi R., Horn G. T., Mullis K. B., Erlich H.: Science 239, 487, 1988.
11. Sharma P. C., Culinnae A. A., Onions D. E., Nicolson L.: Eq. Vet. J. 24, 20, 1992.
12. Strauss W. M. W.: Current Protocols in Molecular Biology. T. 1, Ausubel F. M., Brent R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman J. G., Smith J. A., Struhl K. (Wydawcy). Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York, 1992, s. 2.2.1-2.2.3.
13. Studdert M. J., Simpson T., Roizman B.: Science 214, 562, 1981.
14. Studdert M. J.: Arch. Virol. 77, 249, 1983.
15. Studdert M. J., Fitzpatrick D. R., Horner G. W., Westbury H. A., Gleeson L. J.: Aust. Vet. J. 61, 345, 1984.
16. Wagner W. N., Bogdan J., Haines D., Townsend H. G. G., Misra V.: Can. J. Microbiol. 38, 1193, 1992.
17. Welch H. M., Bridges C. G., Lyon A. M., Griffiths A. M., Edington N.: J. Gen. Virol., 73, 261, 1992.
18. Woyciechowska S.: Medycyna Wet. 5, 1, 1950.
19. Woyciechowska S.: Med. Dośw. i Mikrobiol. 12, 255, 1960.

Adres autora: dr Marcin W. Bańbura, ul. Lokajskiego 28 m. 30, 02-793 Warszawa

HIRVONEN J., PYORALA S.: Odpowiedź ostrej fazy u krów mlecznych z chirurgicznie leczonymi zaburzeniami narządów jamy brzusznej. (Acute-phase response in dairy cows with surgically-treated abdominal disorders). Vet. J. 155, 53-61, 1998 (1)

Określono poziom białek plazmy, łącznie z fibrynogenem i haptoglobina, oraz elementy komórkowe krwi u 97 krów mlecznych przed operacją oraz po wykonaniu zabiegu operacyjnego. Podstawą do operacji było głównie zapalenie czepca i otrzewnej oraz przemieszczenie trawieńca. Oznaczenie ogólnej liczby erytrocytów, poziomu hemoglobiny, wartości hematokrytu, liczby krwinek białych, obrazu jakościowego krwinek białych, poziomu albumin, globulin i haptoglobiny nie wystarczy do prognozowania zejścia choroby. Znajomość poziomu fibrynogenu umożliwia monitorowanie komplikacji pooperacyjnych takich jak np. zapalenie otrzewnej. Poziom haptoglobiny u 55% krów był wysoki przed zabiegiem operacyjnym i wzrastał w okresie 2-3 dni po zabiegu. Określanie wartości tego parametru może też być pomocne w prognozowaniu występowania komplikacji pooperacyjnych. Natomiast oznaczenie poziomu haptoglobiny, fibrynogenu i globulin jest pomocne w rozpoznaniu różnicowym urazowego zapalenia czepca i otrzewnej od innych schorzeń przewodu pokarmowego.

G.

FECTEAU G., VAN METERE D. C., PARE J., SMITH B. P., HIGGINS R., HOLMBERG C. A., JANG S., GUTERBOCK W.: Bakterie wyhodowane z krwi śmiertelnie chorych nowo narodzonych cieląt. (Bacteriological culture of blood from critically ill neonatal calves). Can. Vet. J. 38, 95-100, 1997 (2)

Badania przeprowadzono w lecie 1991 r. i 1993 r. w fermie liczącej ponad 1500 cieląt na 90 cielętach w wieku 1-16 dni (badanie 1) oraz 100 cielętach w wieku 1-19 dni (badanie 2) z ostrą biegunką. W badaniu 1 bakteriamiem występowała u 31% zwierząt w badaniu 2 u 24% chorych zwierząt. *Escherichia coli* stanowiła 51% izolowanych izolatów, inne gram ujemne pałeczki jelitowe 25,5%, gram ujemne beztlenowce 5,9%, gram dodatnie ziarniaki 11,8%, gram dodatnie laseczki 5,9%. Średni wiek cieląt u których występowała bakteriemia wynosił 5,5 dni, zaś bez bakteriemii 7,5 dni. Średni poziom surowiczych IgG był znacznie niższy u cieląt z bakteriamią (1,146 g/l) niżeli u cieląt bez bakteriami (3,077 g/l). Śmiertelność w grupie cieląt z bakteriamią wynosiła 57,4%, bez bakteriemii 15,1%.

G.