

Zastosowanie Real Time PCR do wykrywania zakażeń pestivirusowych^{*)}

TOMASZ STADEJEK, KATARZYNA PODGÓRSKA, ZYGMUNT PEJSAK

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

Stadejek T., Podgórska K., Pejsak Z.

Applying Real Time PCR for detecting pestiviruses

Summary

Pestiviruses cause serious diseases in domestic and wild ruminants and swine. The aim of the study was to apply Real Time PCR with SYBR Green I intercalating dye for detecting pestiviruses. The study was performed with RNA extracted from BVDV-1 cell culture and CSFV, DNA templates with known copy numbers synthesized from CSFV, BVDV-1 and BDV and on cDNA samples representing different pestivirus species and strains. Two PCR kits were used in the study: AmpliTaq Gold (Applied Biosystems) with added fluorescent dyes, and QuantiTect SYBR Green PCR kits (Qiagen). PCR primers were selected from 5'UTR. All pestivirus species, or species-related samples were detected using the applied method and the results were observed as amplification curves. The specificity of amplification was confirmed by estimating the melting temperature of the PCR products. It was demonstrated that the melting temperature of amplicons obtained in reaction with QuantiTect kit was 86-87°C while those obtained with AmpliTaq Gold was 90-92°C. A higher assay sensitivity of 40 copies of CSFV, 400 copies of BVDV and 40 000 copies of BDV templates was obtained using the QuantiTect SYBR Green PCR kit. It should be stressed that the above method does not facilitate pestivirus species identification and may only be a preliminary method for detecting pestivirus infections in swine and must be supplemented with CSFV specific assay.

Keywords: pestivirus, Real Time PCR

Pestiwirusy należą do rodzaju *Pestivirus* rodziny *Flaviviridae* (9). Sklasyfikowano w nim następujące gatunki: wirus klasycznego pomoru świń (classical swine fever virus – CSFV), wirus wirusowej biegunki bydła, typ 1 (bovine viral diarrhoea virus – BVDV-1), wirus wirusowej biegunki i choroby błon śluzowych bydła, typ 2 (BVDV-2) oraz wirus choroby granicznej owiec (Border disease virus – BDV) (4). Oprócz wymienionych do rodzaju tego należy kilka rzadko występujących pestiwirusów izolowanych od żyrafy, renifera, które tymczasowo zostały sklasyfikowane jako odrębne gatunki (4). Wymienione wirusy wywołują groźne, ważne ekonomicznie choroby świń (14), bydła, owiec, kóz (17), dzików (2) oraz dzikich przeżuwaczy (8). Najważniejsze z nich to: pomór klasyczny świń (CSF) oraz wirusowa biegunka (BVD) i choroba błon śluzowych (MD) bydła. Polska jest uznana za kraj wolny od CSF od 1994 r. Niemniej choroba ta występuje we wszystkich krajach ościennych i stale stanowi zagrożenie dla hodowli świń w naszym kraju (3).

Badania przesiewowe (monitoring) wykonywane są metodami serologicznymi, natomiast w przypadku po-

dejrzenia CSF wymagane jest przeprowadzenie rozpoznania wirusologicznego w celu wykrycia wirusa lub/i jego materiału genetycznego (1).

Zakażenia BVDV i BDV mogą występować zarówno u bydła, owiec, kóz, jak i świń, powodując niekiedy u tych ostatnich objawy podobne do pomoru klasycznego wywołanego przez CSFV o małej zjadliwości (26). Podczas gdy stada świń zakażone CSFV są wybijane, a na obszarach zapowietrzonych i zagrożonych wprowadza się zakaz przemieszczania świń, wykrycie zakażeń trzody chlewnej pozostałymi pestiwirusami nie niesie za sobą żadnych konsekwencji. Mimo że przypadki zakażeń BVDV u świń należą do rzadkości (24), z epizootycznego punktu widzenia ważne jest różnicowanie pestiwirusów przy użyciu metod wirusologicznych i molekularnych. Ostatnio coraz powszechniej w diagnostyce zakażeń pestiwirusowych stosuje się enzymatyczną amplifikację DNA *in vitro* (polymerase chain reaction – PCR) oraz jej modyfikacje (7, 13, 21).

Celem badań było określenie możliwości zastosowania nowej techniki – Real Time PCR do wykrywania pestiwirusów. W badaniach wykorzystano właściwości fluorescencyjne barwnika interkalującego SYBR Green ITM (Molecular Probes) (16).

^{*)} Badania wykonane w ramach projektu badawczego KBN 6 P06K 029 21.

Material i metody

Szczepy pestiwirusów. W badaniach wykorzystano szczepy pestiwirusów CSFV-Alfort 187, BVDV-1-1138 namnażane i mianowane w hodowli komórkowej nerki świni (CSFV) lub nerki bydła (BVDV) według standardowych procedur (12).

Ekstrakcja RNA i odwrotna transkrypcja. Całkowite RNA ekstrahowano z 250 μ l hodowli komórkowych wirusów zestawem Total RNA Prep Plus (A&A Biotechnology) zgodnie z instrukcją producenta. Uzyskany roztwór eluowanego RNA poddawano reakcji odwrotnej transkrypcji (RT) lub przechowywano w -80°C do dalszych badań. Reakcję RT przeprowadzano w objętości 20 μ l w obecności buforu do odwrotnej transkrypcji (50 mM Tris-HCl pH 8,3; 75 mM KCl; 3 mM MgCl_2) (Invitrogen), 500 μ M każdego z dNTP (Fermentas), 10 jednostek Rnasinu (Promega), 100 jednostek odwrotnej transkryptazy M-MLV i 100 ng heksamerów (Pharmacia Biotech).

Real Time PCR. W badaniach wykorzystano dwa startery PCR opracowane na podstawie konserwatywnej niekodującej sekwencji z końca 5' genu pestiwirusów (5'UTR): #6 (5'-CTA GCC ATG CCC IYA GTA GGA-3') i #7 (5'-CTC CAT GTG CCA TGT ACA GCA-3') (25) pozwalające na amplifikację fragmentu 286, 287 lub 290 par zasad odpowiednio CSFV, BDV i BVDV-1. Fragment ten ma duże znaczenie w epizootologii molekularnej zakażeń pestiwirusowych i wielokrotnie był wykorzystywany w analizie porównawczej sekwencji nukleotydowych tego gatunku (18, 22).

Reakcję Real Time PCR prowadzono w probówkach optycznych MicroAmp Optical Tube (Applied Biosystems) zamykanych przy użyciu wieczek optycznych Optical Caps (Applied Biosystems). W badaniach wykorzystano polimerazę AmpliTaq Gold (Applied Biosystems) z buforem Gold Buffer (150 mM Tris-HCl pH 8,0; 500 mM KCl) oraz zestaw QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen). Zestaw ten stanowi mieszanina polimerazy HotStarTaq, buforu QuantiTect SYBR Green PCR, dNTP, 5 mM MgCl_2 oraz barwników SYBR Green I (barwnik interkalujący) i ROX (barwnik referencyjny) gotowa do użycia po dwukrotnym rozcieńczeniu w wodzie. Reakcje prowadzono w objętości 50 μ l po dodaniu 2 μ l cDNA w obecności 20 pmoli każdego startera (#6 i #7) i 3,5 mM MgCl_2 . Mieszanina reakcyjna z enzymem AmpliTaq Gold zawierała bufor dla polimerazy, 400 μ M każdy z dNTP, 1 jednostkę polimerazy AmpliTaq Gold, 4 μ l barwnika SYBR Green I rozcieńczonego w stosunku 1 : 100 000 w buforze TE oraz 0,5 μ l Fluorescein Calibration Dye (Bio-Rad) rozcieńczonego w buforze do PCR w stosunku 1 : 1000 służącego jako barwnik referencyjny i 2 mM roztwór szczawianu czterometyloaminy (TMAO) służący jako adjuwant PCR (11). Amplifikację prowadzono przy użyciu termocyklera i modułu optycznego iCycler pod kontrolą oprogramowania w wersji 3.0A (Bio-Rad) w 45 cyklach: 95°C – 15 sek., 59°C (reakcja z zestawem AmpliTaq Gold) lub 57°C (reakcja z zestawem Qiagen) – 15 sek., 72°C – 30 sek. Cykle PCR poprzedzono wstępną denaturacją cDNA w 95°C przez 5 min. (zestaw AmpliTaq Gold) lub 15 min. (zestaw Qiagen). Etap wstępny umożliwiał aktywację polimerazy AmpliTaq Gold i polimerazy HotStarTaq. Po przeprowadzeniu PCR próbki

reakcyjne inkubowano w 72°C przez 10 min. Bezpośrednio po tym określano temperaturę topnienia produktu amplifikacji DNA. W tym celu próbki inkubowano w 95°C przez 1 min., następnie w 25°C przez 1 min., po czym podgrzewano do 95°C w 140 krokach trwających po 5 sek., podwyższając temperaturę $0,5^{\circ}\text{C}$ w każdym. Moduł optyczny zaprogramowano do pomiaru emisji fluorescencji mieszanin reakcyjnych w każdym cyklu PCR na etapie wydłużania starterów oraz w czasie każdego ze 140 kroków oznaczania temperatury topnienia produktu.

Wynik PCR określano poprzez wartość Ct (threshold cycle), to jest numer kolejny cyklu PCR, w którym poziom fluorescencji emitowanej z próbki przekroczył wartość tła. Niska wartość Ct oznacza wysoką początkową liczbę kopii matrycy w badanej próbce, a wysoka wartość Ct oznacza niską liczbę kopii matrycy. Swoistość amplifikacji określano na podstawie swoistej dla danego fragmentu DNA temperatury topnienia.

W celu porównania skuteczności fluorescencyjnego wykrywania amplikonów w Real Time PCR, produkty reakcji analizowano również metodą tradycyjną przez rozdział elektroforetyczny w 2% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny o koncentracji 1 μ g/ml. Elektroforezę prowadzono przez 30 min. w buforze TBE (90 mM Tris, 90 mM kwas borny, 2 mM EDTA), przy stałym natężeniu prądu elektrycznego, równym 150 mA.

Ocena swoistości i czułości Real Time PCR. Do oceny czułości analitycznej metody, tj. wyrażonej w liczbie kopii DNA, wykorzystano kontrolne matryce DNA CSFV, BVDV-1 i BDV otrzymane z Danish Institute for Food and Veterinary Research w Kopenhadze. Wymienione fragmenty DNA uzyskano przez amplifikację cDNA wymienionych pestiwirusów przy użyciu starterów flankujących pozycje starterów diagnostycznych. Następnie produkty PCR oczyszczano w żelu agarozowym, spektrofotometrycznie mierzono zawartość DNA i obliczano liczbę kopii DNA produktu PCR. Następnie wykonywano szereg rozcieńczeń matryc w buforze TE zawierającym 10 ng/ μ l DNA plemników łososia. Jeden mikrolitr matrycy zawierającej od $0,4$ do 4×10^7 kopii matrycy wprowadzano do mieszaniny reakcyjnej PCR.

Czułość PCR w wykrywaniu CSFV określano dodatkowo, wykonując amplifikację cDNA otrzymanego z rozcieńczeń hodowli komórkowej szczepu Alfort-187 o określonym mianie wykonanym w homogenizacji nerki świni wolnej od zakażeń pestiwirusami.

Metodę poddano ocenie, analizując zakodowane próbki cDNA z Laboratorium Referencyjnego CSF Unii Europejskiej w Hanowerze otrzymane w ramach corocznych badań porównawczych europejskich laboratoriów diagnostyki CSF.

Wyniki i omówienie

Możliwość zastosowania szybkich, czułych i swoistych metod rozpoznawania zakażeń wirusowych zwierząt jest podstawowym warunkiem ich zwalczania. Metody te powinny również umożliwiać jednoczesne badanie wielu próbek. Jest to szczególnie ważne w przypadku epizootii chorób zwalczanych z urzędu lub w trakcie programów uwalniania ferm od zaka-

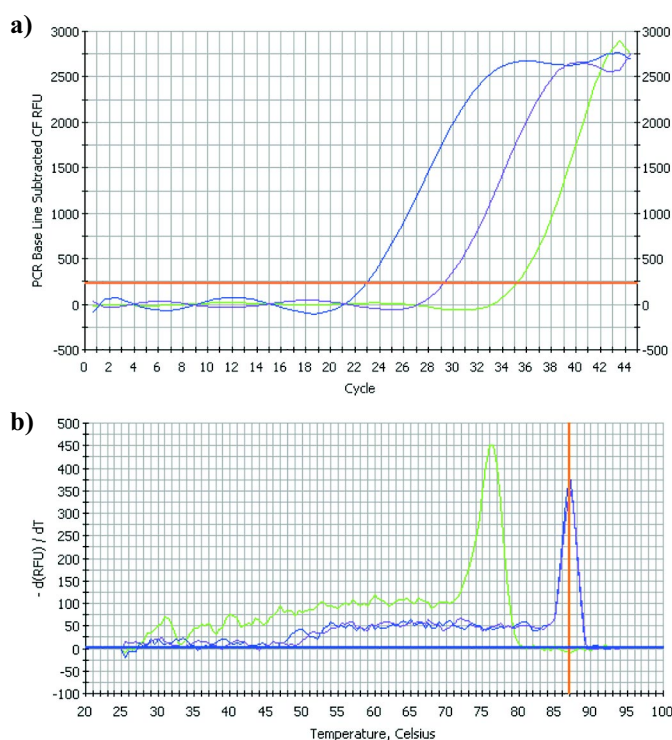
żeń enzootycznych. Na przykład, w trakcie epizootii CSF w Wielkiej Brytanii między sierpniem i grudniem 2000 roku laboratorium wirusologiczne Veterinary Laboratories Agency-Weybridge wykonało 2400 testów peroksydazowych (PLA) i 4000 reakcji PCR. Ostatecznie spośród 317 podejrzanych wystąpienie CSF potwierdzono jedynie w 16 przypadkach.

Tradycyjne metody wirusologiczne, choć wystarczająco czułe i swoiste, są pracochłonne. Natomiast poważnym czynnikiem ograniczającym szerokie zastosowanie PCR w diagnostyce wirusologicznej jest prawdopodobieństwo uzyskania wyników fałszywie dodatnich. Źródłem tego rodzaju problemów jest wieloetapowość metody i możliwość zanieczyszczenia środowiska laboratorium. Modyfikacje polegające na prowadzeniu reakcji w zamkniętej probówce (21) ograniczają niebezpieczeństwo kontaminacji próbek reakcyjnych w znacznym stopniu, lecz go nie eliminują całkowicie. Jednak elementem, który w największym stopniu ogranicza możliwości wykorzystania PCR na dużą skalę jest elektroforeza produktów reakcji ze względu na pracochłonność.

Eliminację etapu elektroforezy umożliwia Real Time PCR (15). Jest to reakcja, w przebiegu której produkty wykrywane są fluorescencyjnie w każdym cyklu, bez konieczności otwierania probówki i prowadzenia elektroforezy po jej zakończeniu. Przyrost fluorescencji w kolejnych cyklach jest wprost proporcjonalny do liczby amplikonów. Wynik reakcji jest wyrażany wartością Ct. Różnica 1 Ct odpowiada dwukrotnej różnicy w początkowej liczbie kopii matrycy DNA przy założeniu 100% wydajności PCR. Zastosowanie barwników interkalujących sprawia, że również nieswoiste produkty amplifikacji (np. dimery starterów PCR) są źródłem fluorescencji. Dlatego po zakończeniu PCR oznacza się temperaturę topnienia (dysocjacji) produktu, która zależna jest od długości podwójnego łańcucha DNA. Swoiste produkty PCR ulegają rozpadowi do pojedynczych nici w ściśle określonej temperaturze, czego wynikiem jest gwałtowny spadek fluorescencji (19). Celem przeprowadzonych badań było wykorzystanie zjawiska fluorescencji do wykrywania produktów amplifikacji fragmentu genomu pestiwirusów. W metodzie tej zastosowano barwnik SYBR Green I posiadający zdolność emisji światła o długości fali 530 nm w obecności dwuniciowego DNA pod wpływem wzbudzenia światłem o długości 490 nm (16).

W celu zwiększenia wydajności amplifikacji w badaniach wykorzystano adjuwant reakcji PCR, TMAO (11). Wcześniejsze wyniki badań własnych wykazały, że produkt reakcji PCR przeprowadzonej z dodatkiem 2 mM TMAO zawierał silniejszy prążek swoistego DNA oraz charakteryzował się wyższą czystością, co ma szczególne znaczenie w przypadku późniejszego oznaczania sekwencji nukleotydów produktu.

Reakcja polimeryzacji łańcuchowej ze starterami z regionu 5'UTR pozwoliła na wykrycie wszystkich badanych gatunków pestiwirusów na podstawie ob-



Ryc. 1. Krzywa amplifikacji cDNA CSFV-Alfort (linia niebieska i fioletowa) oraz cDNA próbki kontrolnej ujemnej (linia zielona) (a) oraz krzywa topnienia (denaturacji) produktów PCR (b). Linia w kolorze pomarańczowym oznacza linię bazową (a) lub temperaturę topnienia swoistego produktu PCR

serwacji krzywej amplifikacji (ryc. 1a). Swoistość amplifikacji potwierdzono, określając temperaturę topnienia produktu PCR (ryc. 1b). Wykazano, że temperatura topnienia produktów syntetyzowanych w reakcji z zestawem QuantiTect wynosiła 86-87°C, a produktów reakcji z AmpliTaq Gold 90-92°C. Zaobserwowaną różnicę można przypisać dużej zawartości detergentów w buforze QuantiTect mających na celu podniesienie swoistości amplifikacji. Najprawdopodobniej z tej samej przyczyny zaobserwowano różnicę w optymalnej temperaturze hybrydyzacji starterów w zależności od użytego zestawu (59°C dla AmpliTaq Gold i 57°C dla QuantiTect). Analiza elektroforetyczna wykazała, że produkty PCR miały wielkość około 290 par zasad (nie pokazano).

Badając czułość PCR wykorzystano roztwory amplikonów o znanej liczbie kopii DNA o sekwencjach odpowiadających CSFV, BVDV-1 i BDV. Metoda ta pozwala na oznaczenie czułości wyłącznie PCR przy eliminacji wpływu pozostałych etapów testu, takich jak ekstrakcja RNA oraz reakcja odwrotnej transkrypcji. Szczegółowe wyniki zawarto w tabeli 1. Wykazano, że limit czułości PCR wynosił od 40 do 4 mln kopii DNA w zależności od matrycy i polimerazy DNA (tab. 1). Wyższą czułość uzyskano w amplifikacji przy użyciu zestawu QuantiTect. Wynosiła ona od 40 kopii dla CSFV, 400 kopii dla BVDV oraz 40 000 kopii dla BDV. Analogiczne wyniki uzyskiwano we wszystkich pięciu powtórzeniach. Wyższe rozcieńczenia matrycy

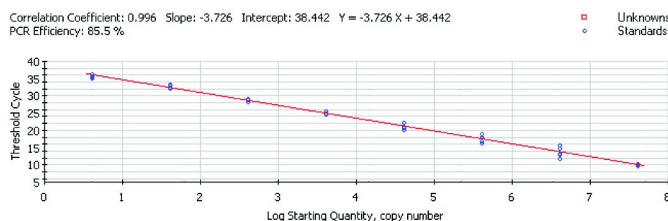
Tab. 1. Czulość Real Time PCR z barwnikiem interkalującym SYBR Green I. Czulość PCR określono przez oznaczenie najmniejszej liczby kopii DNA wykrywanej w reakcji PCR. Reakcje z wykorzystaniem zestawu QuantiTect wykonano w 5 powtórzeniach. Wartości podane przed nawiasem oznaczają uzyskanie 5 wyników dodatnich. Wartości w nawiasie określają minimalną liczbę wykrywanych kopii DNA oraz w ilu powtórzeniach amplifikacja dała wynik dodatni

Zestaw do PCR	Matryca DNA	Czulość PCR (liczba kopii DNA)
QuantiTect (Qiagen)	CSFV	40 (4: 4/5)
	BVDV	400 (4: 3/5)
	BDV	40 000 (4000: 1/5)
AmpliTaQ Gold (Applied Biosystems)	CSFV	4000
	BVDV	40 000
	BDV	4 000 000

dawały mniej powtarzalne rezultaty oceny czulości. I tak, 4 kopie matrycy CSFV wykryto w czterech spośród pięciu powtórzeń PCR z zestawem QuantiTect, 4 kopie matrycy BVDV w trzech z pięciu, a 4000 kopii matrycy BDV w jednym z pięciu. Najwyższą czulość opracowanej metody PCR w wykrywaniu CSFV należy przypisać najwyższej komplementarności starterów wykorzystanych w badaniach do genomu tego gatunku pestiwirusa.

Wartości Ct uzyskiwane w reakcji amplifikacji danych koncentracji poszczególnych matryc nie różniły się istotnie w zależności od użytego zestawu do PCR. Na przykład, wartości Ct dla 400 000 kopii matrycy CSFV wynosiły odpowiednio 19,97 i 19,21, odpowiednio przy wykorzystaniu zestawu AmpliTaQ Gold i QuantiTect. Obserwowane różnice w czulości PCR przy zastosowaniu dwóch wymienionych zestawów dotyczyły najwyższych rozcieńczeń matryc DNA. Ponieważ Taq polimeraza wchodząca w skład obu zestawów należy do tego samego typu umożliwiającego prowadzenie reakcji typu „hot start”, a więc aktywowanych po kilkuminutowej inkubacji w 95°C, przyczyny różnic w czulości PCR należy upatrywać w składzie buforu QuantiTect. Bufor ten umożliwia amplifikację o wyższej swoistości niż ma to miejsce w przypadku reakcji w środowisku, jakie zapewnia użycie buforu Gold. W przypadku zastosowania tego ostatniego buforu w cyklach PCR powyżej 28. obserwowano akumulację produktów nieswoistej amplifikacji DNA, co uniemożliwiało wykrycie produktów swoistych.

Analiza czulości Real Time PCR z zestawem QuantiTect przy użyciu rozcieńczeń matryc DNA pozwoliła na wykazanie, że opracowana metoda może służyć do bardzo precyzyjnych oznaczeń ilościowych liczby kopii pestiwirusów w tkankach i płynach ciała, np. przy badaniu kinetyki zakażeń, szczególnie CSFV i BVDV. Współczynnik korelacji określający zależność między ilością kopii DNA tych pestiwirusów wyrażoną w skali logarytmicznej i wartością Ct wynosił powyżej 0,99



Ryc. 2. Krzywa standardowa amplifikacji 4-40 mln kopii matrycy CSFV-Alfort-187. Reakcje PCR wykonano w pięciu powtórzeniach dla każdej liczby kopii. Na osi Y zaznaczono cykl, w którym krzywa amplifikacji przekroczyła obliczoną wartość tła (Threshold Cycle – Ct). Na osi X zaznaczono początkową liczbę kopii DNA wyrażoną w skali logarytmicznej. Współczynnik korelacji wyniósł 0,996, wydajność PCR wyniosła 85,5%

(ryc. 2). Nieco niższy współczynnik korelacji wynoszący 0,97 uzyskano dla krzywej standardowej amplifikacji matrycy BDV.

Izolacja wirusa w hodowli komórkowej jest zazwyczaj równie czuła, lecz na wynik może wpływać obecność przeciwciał neutralizujących. W celu określenia miana wirusa w tkankach czy płynach ciała wymaga ona wykonywania wielu rozcieńczeń badanego materiału. Real Time PCR umożliwia oznaczenie liczby kopii wirusa w badanym materiale po zbadaniu pojedynczej próbki bez konieczności wykonywania szeregu rozcieńczeń.

Czulość tej metody z zestawem QuantiTect oceniano również przez oznaczenie przybliżonej minimalnej liczby $TCID_{50}$ szczepu CSFV Alfort-187 wykrywalnej w Real Time PCR. Wartość ta wyniosła około 5 $TCID_{50}$. Uzyskane wyniki są zbliżone do opisanych przez Utenthal i wsp. (25), którzy określili limit czulości reakcji z identycznymi starterami w odniesieniu do CSF na 1 kopię. Czulość testu jest również porównywalna z wcześniej opisaną przy zastosowaniu elektroforetycznej detekcji produktu (5, 21).

Badanie cDNA otrzymanego z Laboratorium referencyjnego CSF w Hanowerze wykonano wyłącznie przy użyciu zestawu QuantiTect. Swoistość i czulość Real Time PCR do wykrywania BVDV, BDV i CSFV oceniono na 100% (tab. 2). Wszystkie próbki nie zawierające cDNA pestiwirusów dały wynik ujemny. W przypadku cDNA CSFV szczep 634 wykazano ścisłą korelację między rozcieńczeniem cDNA i wartością Ct. Wysoka wartość Ct amplifikacji próbki cDNA BDV szczep Moredun rozcieńczonej 1 : 100 może być wyjaśniona niską zawarością wirusa w materiale, z którego uzyskane zostało cDNA, jednak bardziej prawdopodobne jest, że wynika ona z niskiej czulości opracowanej metody w wykrywaniu BDV ocenionej w prezentowanych badaniach na 40 000 kopii.

Należy podkreślić, że opisana metoda nie pozwala na identyfikację gatunku pestiwirusa, a jedynie na wykazanie obecności wirusa należącego do tego rodzaju. Determinuje to ograniczone zastosowanie tej techniki w diagnostyce zakażeń świń. Dlatego też opracowana

Tab. 2. Wyniki badania próbek cDNA otrzymanych z Laboratorium Referencyjnego UE do diagnostyki CSF

cDNA	C _t	Charakterystyka próbki
1	15,6	CSF 634, 2.3 Uelzen 1 : 2
2	–	ujemna
3	26,9	CSF 634, 2.3 Uelzen 1 : 1000
4	24,1	BVDV Moredun 1 : 100
5	27,8	CSF 634, 2.3 Uelzen 1 : 10 000
6	15,1	CSF 277, 2.1 1 : 2
7	–	ujemna
8	17,3	BVDV NADL 1 : 100
9	24,1	CSF 634, 2.3 Uelzen 1 : 1000
10	–	ujemne
11	27,8	CSF 634, 2.3 Uelzen 1 : 10 000
12	–	ujemna
13	15,3	CSF 634, 2.3 Uelzen 1 : 2
14	–	ujemna
15	–	ujemne
16	28,3	CSF 634, 2.3 Uelzen 1 : 10 000
17	18,7	BVDV 7443 1 : 100
18	–	ujemna
19	15,2	CSF 277, 2.1 1 : 2
20	30,8	CSF 634, 2.3 Uelzen 1 : 100 000

metoda może być wykorzystywana wyłącznie do rozpoznania wstępnego. W przypadku uzyskania wyniku dodatniego niezbędne jest przeprowadzenie dodatkowego testu swoistego dla CSFV, np. jednoprobówkowego RT-nested PCR (21). Opisaną wyżej metodę można natomiast polecić do detekcji BVDV u bydła. Wiele krajów europejskich wprowadziło programy uwalniania stad od BVDV (20). Program zwalczania obejmuje identyfikację stad „dodatnich” i eliminację zwierząt trwale zakażonych BVDV – siewców wirusa. W tym celu często wykorzystywana jest technika PCR (10).

W celu pełnego wykorzystania zalet metody Real Time PCR w diagnostyce zakażeń pestiwirusowych konieczne jest podjęcie badań nad zastosowaniem metod wykorzystujących znakowane fluorescencyjnie sondy DNA. Techniki te umożliwiają jednoczesne wykrywanie więcej niż jednego drobnoustroju w próbce (6, 23).

Należy podkreślić, że przedstawione dane stanowią pierwszy w Polsce przykład zastosowania Real Time PCR w diagnostyce weterynaryjnej.

Piśmiennictwo

1. Anon.: Council Directive 2001/89/EC of 23 October 2001 on Community measures for the control of classical swine fever, L 316/5-L 316/35.
2. Albina E., Mesplede A., Chenut G., Le Potier M. F., Bourbao G., Le Gal S., Leforban Y.: A serological survey on classical swine fever (CSF), Aujeszky's disease (AD) and porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS)

- virus infections in French wild boars from 1991 to 1998. *Veterinary Microbiology* 2000, 77, 43-57.
3. Anon.: Annual Meeting of National Swine Fever Laboratories, Grange 2004.
4. Becher P., Orlich M., Kosmidou A., König M., Baroth M., Thiel H.-J.: Genetic diversity of pestiviruses: identification of novel groups and implications for classification. *Virology* 1999, 262, 64-71.
5. Canal C. W., Hotzel I., de Almeida L. L., Roehle P. M., Masuda A.: Differentiation of classical swine fever virus from ruminant pestiviruses by reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR). *Veterinary Microbiology* 1996, 48, 373-379.
6. Candotti D., Temple J., Owusu-Ofori S., Allain J. P.: Multiplex real-time quantitative RT-PCR assay for hepatitis B virus, hepatitis C virus, and human immunodeficiency virus type 1. *Journal of Virological Methods* 2004, 118, 39-47.
7. Dewulf J., Koenen F., Mintiens K., Denis P., Ribbens S., de Kruijf A.: Analytical performance of several classical swine fever laboratory diagnostic techniques on live animals for detection of infection. *Journal of Virological Methods* 2004, 119, 137-143.
8. Doyle L. G., Heuschele W. P.: Bovine viral diarrhoea virus infection in captive exotic ruminants. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1983, 183, 1257-1259.
9. Francki R. I. B., Fauquet C. M., Knudson D. L., Brown F.: Classification and nomenclature of viruses. Fifth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses 1991.
10. Greiser-Wilke I., Grummer B., Moennig V.: Bovine viral diarrhoea eradication and control programmes in Europe. *Biologicals* 2003, 31, 113-118.
11. Kovarova M., Draber P.: New specificity and yield enhancer of polymerase chain reactions. *Nucleic Acids Res* 2000, 28, E70.
12. Larski Z.: Diagnostyka wirusologiczna chorób zwierząt. PWRiL, Warszawa 1992.
13. Letellier C., Kerkhofs P., Wellemans G., Vanopdenbosch E.: Detection and genotyping of bovine diarrhoea virus by reverse transcription-polymerase chain amplification of the 5' untranslated region. *Veterinary Microbiology* 1999, 64, 155-167.
14. Liess B., Frey H. R., Prager D., Hafez S. M., Roeder P.: The course of the natural swine fever virus infection in individual swine and investigations on the development of inapparent SF infections. *Diagnosis and Epizootiology of Classical Swine Fever*. EUR 5486, 99-113. 76. Luxembourg, Commission of the European Communities.
15. Mackay I. M., Arden K. E., Nitsche A.: Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res* 2002, 30, 1292-1305.
16. Morrison T. B., Weis J. J., Wittwer C. T.: Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Bio-techniques* 1998, 24, 954-958, 960, 962.
17. Nettleton P. F., Entrican G.: Ruminant pestiviruses. *British Veterinary Journal* 1995, 151, 615-642.
18. Paton D. J., McGoldrick A., Greiser-Wilke I., Panchariyanon S., Song J. Y., Liou P. P., Stadejek T., Lowings J. P., Bjorklund H., Belak S.: Genetic typing of classical swine fever virus. *Veterinary Microbiology* 2000, 73, 137-157.
19. Ririe K. M., Rasmussen R. P., Wittwer C. T.: Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry* 1997, 245, 154-160.
20. Sandvik T.: Progress of control and prevention programs for bovine viral diarrhoea virus in Europe. *Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice* 2004, 151-169.
21. Stadejek T., Pejsak Z.: Diagnostyka pestiwirusowych zakażeń świń zmodyfikowanym testem RT-nested PCR. *Medycyna Wet.* 2000, 56, 121-124.
22. Stadejek T., Warg J., Ridpath J. F.: Comparative sequence analysis of the 5' noncoding region of classical swine fever virus strains from Europe, Asia and America. *Archives of Virology* 1996, 141, 771-777.
23. Templeton K. E., Scheltinga S. A., Beersma M. F., Kroes A. C., Claas E. C.: Rapid and sensitive method using multiplex real-time PCR for diagnosis of infections by influenza A and influenza B viruses, respiratory syncytial virus, and parainfluenza viruses 1, 2, 3, and 4. *Journal of Clinical Microbiology* 2004, 42, 1564-1569.
24. Terpstra C., Wensvoort G.: A congenital persistent infection of bovine virus diarrhoea virus in pigs: Clinical, virological and immunological observations. *Veterinary Quarterly* 1997, 19, 97-101.
25. Uttenthal A., Storgaard T., Oleksiewicz M. B., de Stricker K.: Experimental infection with the Paderborn isolate of classical swine fever virus in 10-week-old pigs: determination of viral replication kinetics by quantitative RT-PCR, virus isolation and antigen ELISA. *Veterinary Microbiology* 2003, 92, 197-212.
26. Vilcek S., Belak S.: Genetic identification of pestivirus strain Frijters as a border disease virus from pigs. *Journal of Virological Methods* 1996, 60, 103-108.

Adres autora: doc. dr hab. Tomasz Stadejek, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy; e-mail: stadejek@piwet.pulawy