

Zastosowanie multiplex PCR w diagnostyce różnicowej wybranych enteropatii krwotocznych świń^{*)}

JACEK ŻMUDZKI, TOMASZ STADEJEK, ZYGMUNT PEJSAK

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

Żmudzki J., Stadejek T., Pejsak Z.

Differential diagnosis of swine dysentery and proliferative enteropathy by multiplex PCR

Summary

Laboratory diagnosis of swine dysentery (SD) and proliferative enteropathy (PE) by standard bacteriological methods is time consuming and bears the risk of false negative results. Limitations concerning the isolation of *L. intracellularis* and difficulties with conventional bacteriological procedures were the primary reasons for developing a PCR for the diagnosis of PE and SD. The aim of this study was to develop a multiplex PCR for the detection of *B. hyodysenteriae* and *L. intracellularis* and to determine the usefulness of this technique in diagnosing the above mentioned diseases. The investigations were evaluated on strains of *B. hyodysenteriae* B204 and the bacterial filtrate of *L. intracellularis*. In order to determine the sensitivity of multiplex PCR from bacterial suspension (*B. hyodysenteriae* – 2×10^8 cfu/ml) and (*L. intracellularis* – 1.1×10^6 cfu/ml) 10-fold dilutions were prepared in a Tris-HCl, pH 8.5 buffer or in supernatant of swine feces in Tris-HCl, pH 8.5 buffer. The elaborated multiplex PCR was able to detect 1.1×10^4 cfu/ml *L. intracellularis* and 2×10^5 cfu/ml *B. hyodysenteriae*. In analyzing the sensitivity of multiplex PCR in the presence of the two mentioned species of bacteria in feces it was assumed that the presence of a 2000 times greater number of *B. hyodysenteriae* cells in fecal sample than *L. intracellularis* did not decrease the sensitivity of multiplex PCR in the detection of *L. intracellularis*. At the same time about a two times higher amount of *L. intracellularis* cells than *B. hyodysenteriae* decreased the sensitivity of multiplex PCR for the detection of *B. hyodysenteriae* by 200 times. However the presence of porcine feces which contain inhibitory factors decreased the detection of *L. intracellularis*. Amplification of extracted DNA from feces suspension gave a 100 times lower sensitivity than amplification of extracted DNA from Tris-HCl, pH 8.5 buffer with the same number of CFU/ml *L. intracellularis*. On the other hand sensitivity of the method was satisfying even if the number of *B. hyodysenteriae* cells was 2000 times higher. The results proved that multiplex PCR for the detection of *B. hyodysenteriae* was not susceptible to inhibitory substances, however twice as high a number of *L. intracellularis* cells than *B. hyodysenteriae* in a sample hampered the amplification specific to *B. hyodysenteriae*. The results of this study demonstrated that multiplex PCR is useful for the detection of *L. intracellularis*. In case of an intensive infection of pigs by both pathogens multiplex PCR has limitations in the diagnosis of *B. hyodysenteriae*.

Keywords: *Brachyspira hyodysenteriae*, *Lawsonia intracellularis*

Enteropatie krwotoczne, obejmujące rozrostowe zapalenie jelit (PE) oraz dyzenterię świń (SD), stanowią poważny problem ekonomiczny w hodowli trzody chlewnej. Głównym objawem klinicznym tych chorób jest biegunka zawierająca zazwyczaj domieszkę krwi. W ostatnich latach w Polsce obserwuje się rosnącą liczbę przypadków PE oraz nasilające się występowanie chronicznej postaci SD, przy czym dotychczas nie opracowano szybkich i wiarygodnych metod do diagnostyki obu jednostek chorobowych. W wielu przypadkach kliniczne i sekcyjne rozpoznanie wymienionych chorób nie jest możliwe (2-4, 9-11).

W rozpoznaniu laboratoryjnym enteropatii krwotocznych, ze względu na ograniczenia związane ze sto-

sowaniem metod bakteriologicznych (czasochłonność, uzyskiwanie wyników fałszywie ujemnych po antybiotykoterapii) oraz brak możliwości izolacji *Lawsonia intracellularis* (*L. intracellularis*) z próbek kału, wprowadzono do diagnostyki laboratoryjnej PE i SD technikę PCR.

Celem badań było opracowanie metody multiplex PCR do wykrywania bakterii *L. intracellularis* i *Brachyspira hyodysenteriae* (*B. hyodysenteriae*) oraz określenie jej przydatności w diagnostyce różnicowej enteropatii krwotocznych.

Materiał i metody

Szczepy bakteryjne. W badaniach wykorzystano 3-dniową hodowlę szczepu *B. hyodysenteriae* B204, na agarze tryptozowo-sojowym z dodatkiem 10% odwłóknionej krwi baraniej oraz

^{*)} Badania wykonane w ramach grantu promotorskiego KBN 3P06K 013 24.

filtrat bakteryjny *L. intracellularis* otrzymany z Danish Institute for Food and Veterinary Research w Kopenhadze. Do oceny swoistości opracowanej metody dodatkowo wykorzystano izolaty terenowe: *E. coli*, *S. Typhimurium*, *S. Choleraesuis*, *B. intermedia*, *B. innocens*, *B. pilosicoli* i *B. murdochii*.

Ekstrakcja DNA. Izolację DNA wykonano przy użyciu zestawu Genomic DNA Prep Plus (Heliconius, A&A Biotechnology, Gdynia) zgodnie z procedurą podaną przez producenta.

Multiplex PCR. Reakcję PCR wykonywano z użyciem dwóch par starterów: H1 5'-GAATATGTGCATAGTGAAGG-3' i H2 5'-GGAGAGATGGTTCTATTAAC-3' swoistych dla genu *tlyA* *B. hyodysenteriae* oraz LawA 5'-TATGGCTGTCAA-ACACTCCG-3' i LawB 5'-TGAAGGTATTGGTATTCTCC-3' pozwalających na amplifikację genu 16S rRNA *L. intracellularis* (5, 12). Reakcję multiplex PCR prowadzono w objętości 50 µl, wykorzystując zestaw HotStartTaq Master Mix (Qiagen) w obecności 2,5 mM MgCl₂, 400 µM dNTP, 20 pmoli każdego ze starterów, 2,5 U polimerazy HotStart (Qiagen) i 3 µl DNA.

Reakcje amplifikacji DNA były przeprowadzone w termocyklerze T3 Thermocycler (Biometra), w następujących warunkach: wstępna denaturacja 95°C – 15 min., 35 cykli denaturacji (40 sek. – 94°C), przyłączania starterów (40 sek. – 53°C) i wydłużania nici DNA (90 sek. – 72°C). Końcowe wydłużanie produktów amplifikacji prowadzono przez 7 min. w 72°C.

Ocena czułości i swoistości multiplex PCR. W celu określenia czułości reakcji multiplex PCR z zawiesiny bakterii (*B. hyodysenteriae* – 2×10^8 jednostek tworzących kolonie na mililitr (j.t.k./ml)) i (*L. intracellularis* – $1,1 \times 10^6$ j.t.k./ml) przygotowywano szeregi 10-krotnych rozcieńczeń w buforze Tris-HCl, pH 8,5 lub w zawiesinie kału świni w buforze Tris-HCl, pH 8,5.

Analiza uzyskanych produktów amplifikacji. Produkty PCR analizowano po przeprowadzeniu rozdzielania elektroforetycznego 10 µl mieszaniny poreakcyjnej w 2% żelu agarozowym. Elektroforezę prowadzono przez około 35 minut w buforze 1 × TAE przy stałym natężeniu prądu 350 mA. Żel barwiono w roztworze bromku etydyny o koncentracji 1 µl/ml i fotografowano przy użyciu zestawu BioPhotonics oraz Mighty Bright (Hoefer Scientific Ins.). Wielkość produktu oceniano przez porównanie jego położenia z markerem masy molekularnej GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus (Fermentas, Litwa).

Wyniki i omówienie

Możliwość zastosowania szybkiej, czulej i swoistej techniki PCR jest szczególnie przydatna w diagnostyce zakażeń drobnoustrojami, które są trudne w izolacji, np. *L. intracellularis*. Bakterie te namnaża się wyłącznie w hodowli komórek enterocytów szczura linii komórkowej IEC-18 lub w hodowli komórek płodowych człowieka INT-407 (7). Materiałem do badań bakteriologicznych w kierunku *L. intracellularis* jest zeszkrobina błony śluzowej jelit cienkich (jelito biodrowe). Metoda ta nie może być stosowana do przyżyciowej diagnostyki PE. Z kolei *B. hyodysenteriae* wymaga do swojego wzrostu agaru tryptozowo-sojowego z dodatkiem 10% odwłóknionej krwi baraniej i specyficznych warunków beztlenowych (13).

Zastosowanie dwóch par starterów w reakcji multiplex PCR umożliwiło wykrycie *B. hyodysenteriae* i *L. intracellularis* w próbkach kału. Nie zaobserwowano amplifikacji DNA innych bakterii bytujących w przewodzie pokarmowym. Startery swoiste dla *L. intracellularis* pozwoliły na uzyskanie fragmentu o wiel-

Tab. 1. Czulość multiplex PCR do wykrywania *B. hyodysenteriae* i *L. intracellularis* wyrażona j.t.k./ml

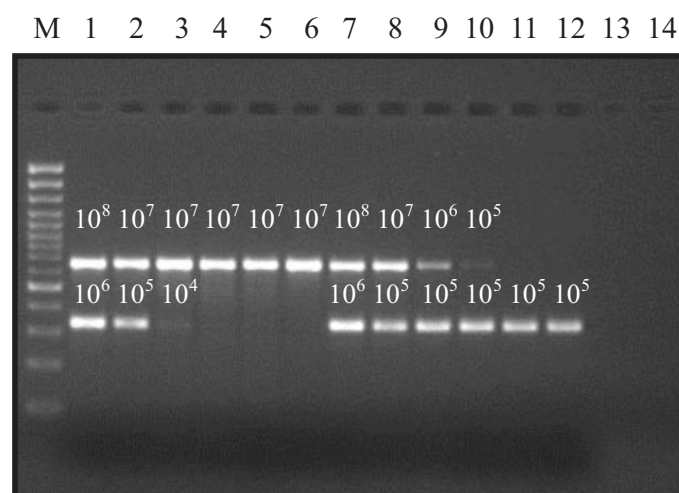
Gatunek bakterii	Tris-HCl, pH 8,5	Zawiesina kału w Tris-HCl, pH 8,5
<i>B. hyodysenteriae</i>	2000	2000
<i>L. intracellularis</i>	110	11 000

kości 319 par zasad (pz). Produkty PCR ze starterami swoistymi dla *B. hyodysenteriae* miały wielkość 658 pz. Opracowany multiplex PCR umożliwił wykrycie $1,1 \times 10^4$ j.t.k./ml *L. intracellularis* i 2×10^5 j.t.k./ml *B. hyodysenteriae* (tab. 1).

Analizując czulość multiplex PCR przy jednoczesnej obecności dwóch gatunków bakterii w kale stwierdzono, że obecność w próbce kału 2000 razy większej liczby komórek *B. hyodysenteriae* niż *L. intracellularis* nie powodowała zmniejszenia czułości multiplex PCR w wykrywaniu *L. intracellularis*. Jednocześnie już około dwukrotnie większa liczba komórek *L. intracellularis* niż *B. hyodysenteriae* powodowała zmniejszenie czułości multiplex PCR dla *B. hyodysenteriae* 200 razy (ryc. 1).

Na czulość PCR mogą wpływać różne zanieczyszczenia przedostające się do ekstraktu DNA. Z tego powodu zastosowano metodę ekstrakcji opartą na wiązaniu się DNA z membraną krzemionkową, co pozwoliło na uzyskanie DNA o wyższej czystości.

Reakcja amplifikacji DNA *L. intracellularis* okazała się wrażliwa na inhibitory zawarte w kale. Am-



Ryc. 1. Czulość multiplex PCR przy jednoczesnej obecności *L. intracellularis* i *B. hyodysenteriae* w kale

Poszczególne ścieżki: M – wzorzec masy molekularnej GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus (Fermentas); 1 – kontrola dodatnia *B. hyodysenteriae* B204 (2×10^8 j.t.k./ml) i *L. intracellularis* ($1,1 \times 10^6$ j.t.k./ml); 2-12 – dziesięciokrotne rozcieńczenia *B. hyodysenteriae* i *L. intracellularis* w supernatancie zawiesiny kału w Tris-HCl, pH 8,5; 13 – Tris-HCl, pH 8,5 (kontrola ujemna); 14 – kontrola mieszaniny reakcyjnej PCR.

Liczby podane przy prążkach DNA odpowiadają liczbie j.t.k./ml zawiesiny kału. Górne produkty odpowiadają amplifikacji materiału genetycznego *B. hyodysenteriae* o wielkości 658 pz, a dolne produkty PCR o masie 319 pz odpowiadają amplifikacji DNA *L. intracellularis*.

plifikacja DNA ekstrahowanego z zawiesiny kału była 100-krotnie mniej czuła niż amplifikacja DNA ekstrahowanego z buforu Tris-HCl, pH 8,5 zawierającego taką samą liczbę j.t.k./ml *L. intracellularis*. Z drugiej strony, zaobserwowano wysoką wydajność (czułość) nawet w obecności dużego (2000 ×) nadmiaru komórek *B. hyodysenteriae*. Teoretycznie można więc przyjąć, że nawet w trakcie ostrej postaci dyzenterii świń możliwe jest wykrycie *L. intracellularis*.

Multiplex PCR dla *B. hyodysenteriae* okazał się niewrażliwy na działanie inhibitorów, z drugiej strony – dwukrotnie większa liczba komórek *L. intracellularis* niż *B. hyodysenteriae* w próbce powodowała zahamowanie amplifikacji swoistej dla *B. hyodysenteriae* (ryc. 1).

Jak zaznaczono wcześniej, obecność w kale takich inhibitorów reakcji PCR, jak produkty rozkładu hemoglobiny, polisacharydy oraz sole kwasów żółciowych (6) obniża skuteczność amplifikacji poprzez enzymatyczną i chemiczną degradację kwasów nukleinowych i zahamowanie aktywności enzymatycznej Taq polimerazy, co w skrajnych przypadkach prowadzi do uzyskania wyników fałszywie ujemnych (8, 14). W omawianym przypadku nie wydaje się, że mamy do czynienia z degradacją DNA ani hamowaniem aktywności enzymatycznej polimerazy Taq, gdyż problem dotyczy tylko amplifikacji z jedną parą starterów. Można więc przypuszczać, że dochodzi do interferencji między zanieczyszczeniami DNA a starterami dla *L. intracellularis* lub miejscami ich wiązania się z matrycą DNA.

W prezentowanej pracy kluczowym elementem umożliwiającym oznaczenie czułości multiplex PCR było wykorzystanie próbek kału, co pozwoliło maksymalnie zredukować do minimum błędy wykonywane podczas oceny czułości prezentowanej metody laboratoryjnej. Badania z zastosowaniem multiplex PCR w diagnostyce *L. intracellularis*, *B. hyodysenteriae* i *Salmonella* sp., prowadził, między innymi, Elder i wsp. (1). Wspomniani autorzy wykazali, że w przypadku, gdy zastosowano różne stężenia oczyszczonego DNA, udało się uzyskać specyficzne produkty reakcji multiplex PCR nawet przy mniejszej wyjściowej liczbie wykrywanych drobnoustrojów i obecności znacznych ilości bakterii innych gatunków. Z przedstawionych przez autora faktów wynika, że wzajemne relacje i stężenia opisywanych bakterii nie mają wpływu na proces amplifikacji. Jak wiadomo, kinetyka reakcji PCR oraz wzajemne relacje pomiędzy matrycą jednego drobnoustroju a matrycą drugiego mają znaczący wpływ na prawidłowy proces amplifikacji. Cytowani autorzy w swoich doświadczeniach uwzględnili model doświadczalny oparty tylko na hodowli bakteryjnej, nie biorąc pod uwagę istotnego wpływu inhibitorów zawartych w kale (1). Z danych przedstawionych w prezentowanych badaniach wynika, że różne proporcje *L. intracellularis* i *B. hyodysenteriae* w badanym materiale oraz hamujący wpływ zanieczyszczeń

DNA mogą w istotnym stopniu wpływać na czułość PCR.

Znaczenie opisanej wzajemnej zależności dla praktycznej diagnostyki enteropatii krwotocznych i określenie zagrożenia wynikami fałszywie ujemnymi w obecności obu drobnoustrojów, wymagać będzie dodatkowych badań z wykorzystaniem materiału biologicznego pobranego od warchlaków i tuczników wykazujących objawy kliniczne SD i PE. Należy również wspomnieć, że wyniki badań laboratoryjnych są jedynie elementem uzupełniającym proces rozpoznawania przedstawionych chorób zakaźnych przewodu pokarmowego świń.

Wnioski

1. Metoda multiplex PCR jest wysoce przydatna w wykrywaniu materiału genetycznego *L. intracellularis*.
2. Test ten ma jednak ograniczoną przydatność w jednoczesnym wykrywaniu *L. intracellularis* i *B. hyodysenteriae*.
3. W przypadku równoczesnego intensywnego zakażenia *L. intracellularis* i *B. hyodysenteriae* metoda ta może mieć ograniczoną przydatność w różnicowej diagnostyce SD i PE.

Piśmiennictwo

1. Elder R. O., Duhamel G. E., Mathiesen M. R., Erickson E. D., Gebhart C. J., Oberst R. D.: Multiplex polymerase chain reaction for simultaneous detection of *Lawsonia intracellularis*, *Serpulina hyodysenteriae* and *Sallmonellae* in porcine intestinal specimens. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1997, 9, 281-286.
2. Jakubowski T., Plawińska J., Rzewuska M., Kizerwetter M., Binek M.: Występowanie *Lawsonia intracellularis* i *Brachyspira* sp. u świń w Polsce. *Medycyna Wet.* 2003, 59, 406-409.
3. Janowski H., Szveda W., Janowski T. E.: Dyzenteria świń. Szczegółowa patologia i terapia chorób świń. Wyd. ART Olsztyn, 1997, tom 2, 138-156.
4. Janowski H., Szveda W., Janowski T. E.: Rozrostowe zapalenie jelit. Szczegółowa patologia i terapia chorób świń. Wyd. ART Olsztyn, 1997, tom 2, 168-173.
5. Jones G. F., Ward G. E., Murtaugh M. P., Lin G., Gebhart C. J.: Enhanced detection of intracellular organism of swine proliferative enteritis, ileal symbiont *intracellularis*, in feces by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 1993, 31, 2611-2615.
6. Lantz P., Matsson M., Wadström T., Rådström P.: Removal of PCR inhibitors from human faecal samples through the use of an aqueous two-phase system for sample preparation prior to PCR. *J. Microbiol. Meth.* 1997, 28, 159-167.
7. Lawson G. H. K., McOrist S., Jasni S., Mackie R. A.: Intracellular bacteria of porcine proliferative enteropathy: cultivation and maintenance in vitro. *J. Clin. Microbiol.* 1993, 31, 1136-1142.
8. Monteiro L., Gras N., Vidal R., Cabrita J., Mégraud F.: Detection of *Helicobacter pylori* DNA in human feces by PCR: DNA stability and removal of inhibitors. *J. Microbiol. Meth.* 2001, 45, 89-94.
9. Pejsak Z.: Nowe dane nt. etiologii, patogenez i terapii rozrostowego zapalenia jelit u świń. *Medycyna Wet.* 1996, 52, 411-415.
10. Pejsak Z., Żmudzki J., Stankevicus A.: Rozprzestrzenienie zakażeń *Lawsonia intracellularis* w populacji świń w Polsce. *Medycyna Wet.* 2001, 57, 887-889.
11. Pejsak Z., Kneblewski P., Pawłowski R., Kozłowski J.: Przypadki rozrostowego zapalenia jelit w krajowych fermach trzody chlewnej. *Medycyna Wet.* 1997, 53, 30-32.
12. Rzewuska M., Jakubowski T., Kizerwetter M., Binek M.: Detection of *Brachyspira* sp. in samples of swine faeces based on culture method and on PCR technique. *Cell. Biol. Mol. Lett.* 2001, 6, 813-814.
13. Szynkiewicz Z. M., Binek M.: Evaluation of selective media for primary isolation of *Treponema hyodysenteriae* and *Treponema innocens*. *Immun. Microbiol. Infect.* 1986, 9, 71-77.
14. Wilde J., Eiden J., Yolken R.: Removal of inhibitory substances from human fecal specimens for detection of group A rotaviruses by reverse transcriptase and polymerase chain reactions. *J. Clin. Microbiol.* 1990, 28, 1300-1307.

Adres autora: dr Jacek Żmudzki, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy;
e-mail: jaca@piwet.pulawy.pl