

Wykorzystanie metody hemi-nested RT-PCR do różnicowania zakażeń wywołanych klasycznym wirusem wścieklizny i EBLV 1 u zwierząt lądowych

MARCIN SMRECZAK, ANNA ORŁOWSKA, PAWEŁ TRĘBAS, JAN F. ŻMUDZIŃSKI

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

Smreczak M., Orłowska A., Trębas P., Żmudziński J. F.

Application of hemi-nested RT-PCR method for differentiation of classical rabies and EBLV 1 infection in terrestrial animals

Summary

Currently in the routine diagnosis of rabies three techniques are recommended: the florescent antibody test, mouse inoculation test and tissue culture inoculation test. Unfortunately these methods do not allow us to differentiate the classical rabies virus from an EBLV 1 infection in terrestrial animals. Such a possibility is provided by using hemi-nested RT-PCR with specific primers.

Conditions of the hnRT-PCR method have been previously established. It makes it possible to detect genetic material both of lyssavirus genotypes as well as to establish a differentiation between genotypes. Application of the hnRT-PCR method for rabies discrimination between two genotypes allows for an easier and more reliable diagnosis of rabies in terrestrial animals.

Keywords: rabies, EBLV1 infection

Lyssawirusy należą do rodziny *Rhabdoviridae* i rodzaju *Lyssavirus*, w obrębie którego wyróżnia się 7 genotypów. W Polsce, jak dotychczas, stwierdzono występowanie dwóch spośród 7 genotypów lyssawirusów. Są to: klasyczny wirus wścieklizny (genotyp 1), który wywołuje chorobę u zwierząt lądowych oraz European Bat Lyssavirus 1 – EBLV 1 (genotyp 5) występujący u nietoperzy. Do niedawna uważano, że transmisja wirusa od nietoperzy do zwierząt lądowych nie występuje. W ostatnich latach stwierdzono kilka przypadków wścieklizny u zwierząt lądowych (owce, kuna), a także u człowieka wywołanych wirusem pochodzącym od nietoperzy (1, 3-6, 9).

W rutynowej diagnostyce wścieklizny stosowany jest test immunofluorescencji oraz izolacja wirusa wścieklizny, które przeprowadza się na myszach bądź w hodowli komórek mysiego nerwiaka (neuroblastomy). Metody te pozwalają na stwierdzenie zakażenia, nie umożliwiają jednak rozróżnienia, jakim genotypem lyssawirusa zakażone było zwierzę. Szanse takie daje zastosowanie metody hemi-nested RT-PCR. Stosując odpowiednie pary starterów w pierwszym etapie wykrywany jest materiał genetyczny wspólny dla wszystkich 7 genotypów należących do lyssawirusów. W drugim zaś wykrywany jest produkt charakterystyczny dla genotypu 5. Ze względu na coraz częstsze przypadki

wścieklizny u nietoperzy pojawiła się konieczność szybkiego różnicowania zakażeń u zwierząt lądowych, w celu określenia, czy zakażenia takie mają miejsce i jakie jest realne zagrożenie transmisją wirusa od nietoperzy na zwierzęta lądowe, w tym także na człowieka. Metoda określania genotypu pozwala także na różnicowanie izoform (a i b) występujących w obrębie genotypu 5, a wprowadzenie jej jest pierwszym krokiem do szczegółowej genetycznej analizy izolatów pochodzących od nietoperzy (7, 8, 10).

Celem badań było określenie możliwości wprowadzenia metody hemi-nested RT-PCR (hnRT-PCR) do wykrywania i różnicowania zakażeń u zwierząt lądowych wywołanych klasycznym wirusem wścieklizny oraz wirusem wścieklizny nietoperzy europejskich – EBLV 1.

Materiał i metody

Izolaty wirusowe. Do badań wykorzystano izolaty wirusa wścieklizny pochodzące od nietoperzy i zwierząt lądowych z różnych regionów Polski. Próbkami stanowiły mózgowia zwierząt, u których zdiagnozowano wściekliznę w teście immunofluorescencji bezpośredniej.

Namnażanie izolatów wirusa wścieklizny. Z mózgowi pochodzących od nietoperzy wykonano zawiesinę, którą następnie zakażano białe myszy drogą domózgową w ilości-

ci 0,03 ml/zwierzę. Po inokulacji myszy były kontrolowane każdego dnia. Od każdego padłego zwierzęcia pobierano mózgowie w celu przeprowadzenia dalszych badań.

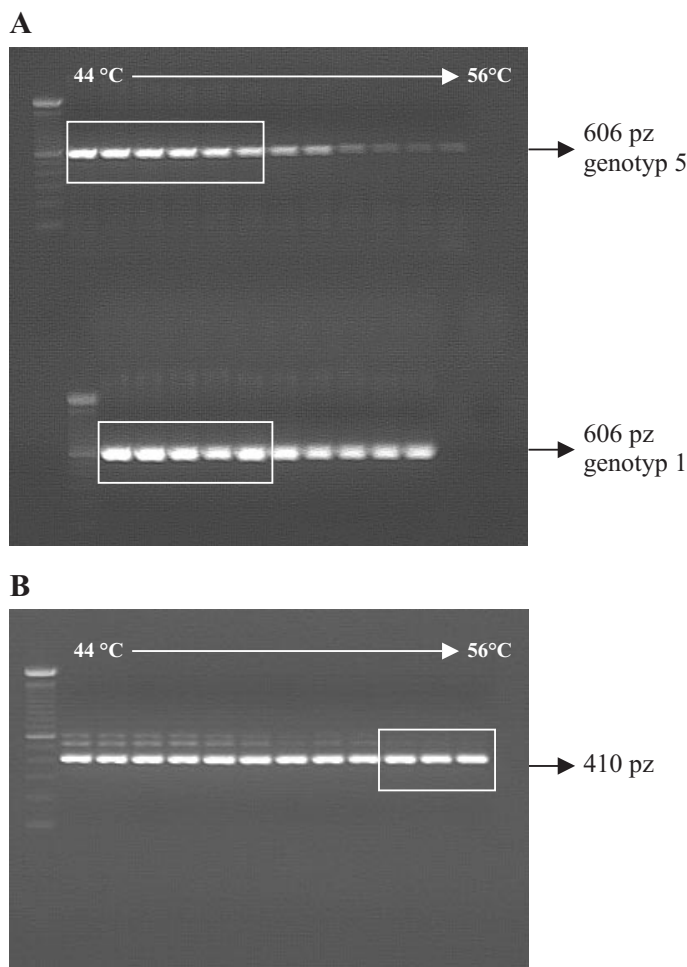
Test immunofluorescencji bezpośredniej. Z pobranych od padłych myszek mózgowie wykonano preparaty odciskowe na szkiełku podstawowym. Następnie preparaty utrwalono nad płomieniem i nanoszono specyficzny koniugat antywściekliznowy. Po 30-minutowej inkubacji (37°C w wilgotnej komorze) preparaty płukano, suszono i oglądano w świetle UV pod mikroskopem szukając świeceń charakterystycznych dla zakażeń wirusem wścieklizny.

Ekstrakcja RNA. Materiał genetyczny wirusa wścieklizny – RNA – ekstrahowano bezpośrednio z tkanki mózgowej. Ekstrakcję całkowitego RNA przeprowadzono z wykorzystaniem odczynnika TRIzol (Gibco) zgodnie z procedurą podaną przez producenta. Do 1 ml odczynnika TRIzol dodawano około 100 mg tkanki mózgowej, którą następnie rozdrabniano, wykorzystując do tego ręczny homogenizator. Następnie próbkę inkubowano przez 5 minut w temperaturze pokojowej, po czym dodano 0,2 ml chloroformu. Powstałą mieszaninę wytrząsano na wytrząsarce przez około 15 sekund. Następnie próbkę inkubowano w temperaturze pokojowej przez 5 minut. Po inkubacji próbkę wirowano przy $12\ 000 \times g$ w temperaturze 4°C przez 15 minut. Górną, wodną frakcję przenoszono do nowej probówki i dodawano 0,5 ml izopropanolu. Próbkę wytrząsano, następnie inkubowano w temperaturze pokojowej przez 5 minut i wirowano przy $12\ 000 \times g$ w temperaturze 4°C przez 10 minut. Supernatant zlewano, a do probówki dodawano 1 ml 75% etanolu, wytrząsano na wytrząsarce i wirowano przy $12\ 000 \times g$ w 4°C przez 5 minut. Następnie etanol usuwano, a uzyskaną peletkę suszono w temperaturze pokojowej. Wyekstrahowane i sprecypitowane RNA zawieszono poprzez delikatne mieszanie w 100 µl jałowej wody traktowanej DEPC. Tak zawieszona RNA przechowywano w temperaturze -70°C do czasu dalszej analizy.

Optymalizacja RT-PCR oraz hemi-nested-PCR. Przed zastosowaniem hnRT-PCR do wykrywania i różnicowania zakażeń wywołanych lyssawirusami dokonano optymalizacji warunków RT-PCR oraz hnPCR. Optymalne warunki ustalano biorąc pod uwagę temperatury przyłączania starterów JW12 (5'-ATG TAA CAC CYC TAC AAT G-3') oraz JW6DPL (5'-CAA TTC GCA CAC ATT TTG TG-3') dla RT-PCR oraz JW12 i Jeb11 (5'-GTC CCG AGT GAG ATC TTG A-3') dla hnPCR (2, 8). Dobrano również odpowiednie ilości starterów oraz jonów Mg^{2+} w mieszaninach reakcyjnych. Ponieważ RT-PCR pozwala na wykrycie genotypu 1 jak i 5 lyssawirusów, dlatego też optymalizację warunków RT-PCR przeprowadzono dla obu genotypów. Dobór najlepszych warunków reakcji hn-PCR wykonano dla genotypu 5.

Ustalanie właściwej temperatury przyłączania starterów zarówno dla reakcji RT-PCR, jak i hnPCR przeprowadzono w termocyklerze gradientowym (Tgradient, Biometra) w 12-stopniowym gradiencie temperatur (44°C-56°C).

Określanie optymalnej ilości starterów przeprowadzono w mieszaninach reakcyjnych zawierających, odpowiednio, dla RT-PCR startery JW12 i JW6DPL w stężeniu 1,25-40 pmoli/15 µl oraz JW12 i Jeb11 w stężeniu 1,25-50 pmoli/20 µl dla hnPCR.

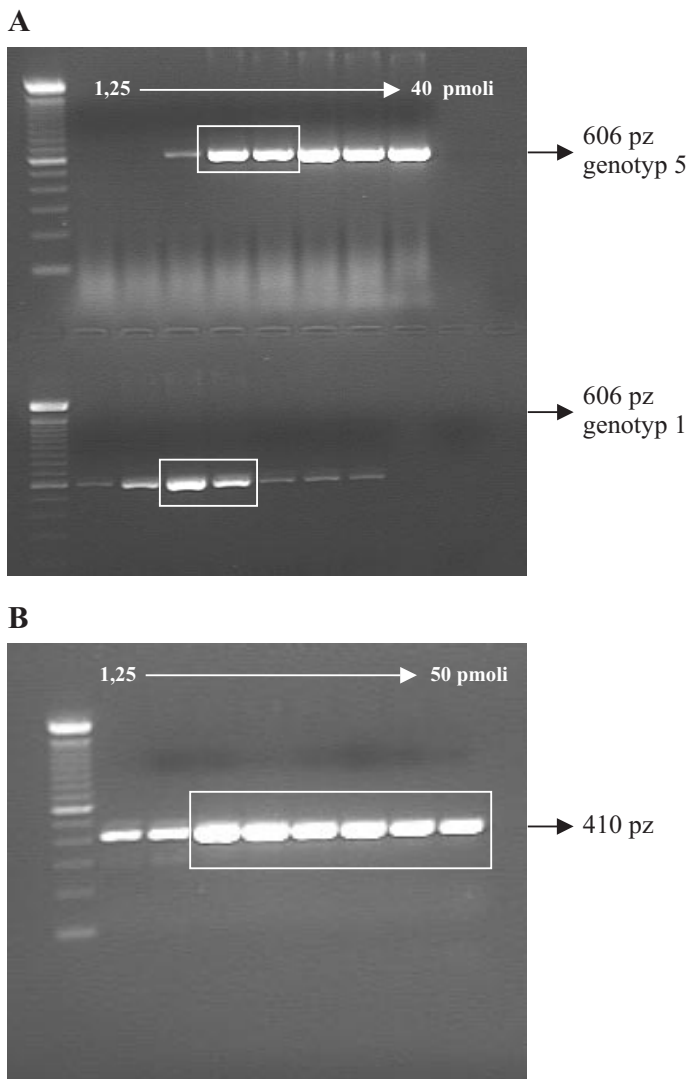


Ryc. 1. Dobór optymalnej temperatury przyłączania starterów JW12 i JW6DPL (A) oraz JW12 i Jeb11 (B)

Dobór optymalnego stężenia jonów Mg^{2+} w mieszaninach reakcyjnych przeprowadzono w stężeniach 0,25-5 mM.

Odwrotna transkrypcja i pierwszy PCR. Reakcje RT-PCR przeprowadzono z wykorzystaniem zestawu One-Step RT-PCR firmy Qiagen. Do 2 µl wirusowego RNA dodawano po 10 pmol każdego ze starterów JW12 i JW6DPL oraz 13 µl mieszaniny reakcyjnej zawierającej 3 µl $5 \times$ Qiagen One step RT-PCR bufor; 0,6 µl dNTPs w stężeniu 10 mM; 0,5 µl inhibitora RNaz; 0,6 µl mieszaniny enzymów odwrotnej transkryptazy i polimerazy oraz 7,3 µl wody PCR. Amplifikację DNA przeprowadzono w termocyklerze Personal Cycler (Biometra) według następującego profilu czasowo-temperaturowego: odwrotna transkrypcja – 30 min. 50°C, denaturacja – 15 min. 95°C, amplifikacja – 35 cykli: denaturacja – 30 sek. 94°C, przyłączanie starterów – 30 sek. 49°C, elongacja – 1 min. 72°C i końcowa elongacja – 10 min. 72°C.

Hemi-nested-PCR (hnPCR). Do przeprowadzenia reakcji hn-PCR użyto zestawu Enhanced Avian HS RT-PCR firmy Sigma. Jako starterów użyto oligonukleotydów o sekwencjach komplementarnych do genu nukleoproteiny genotypu 5 lyssawirusa (EBLV-1). Jednym z nich był użyty wcześniej starter JW12, a drugim Jeb11, które razem amplifikowały fragment o wielkości 410 pz specyficzny dla EBLV-1. Do 19 µl mieszaniny reakcyjnej zawierającej: 2,6 µl $10 \times$ AccuTaq bufor; 1 µl dNTPs w stężeniu 2 mM; 10 pmol starterów JW12 i Jeb11; 0,25 µl polimerazy oraz



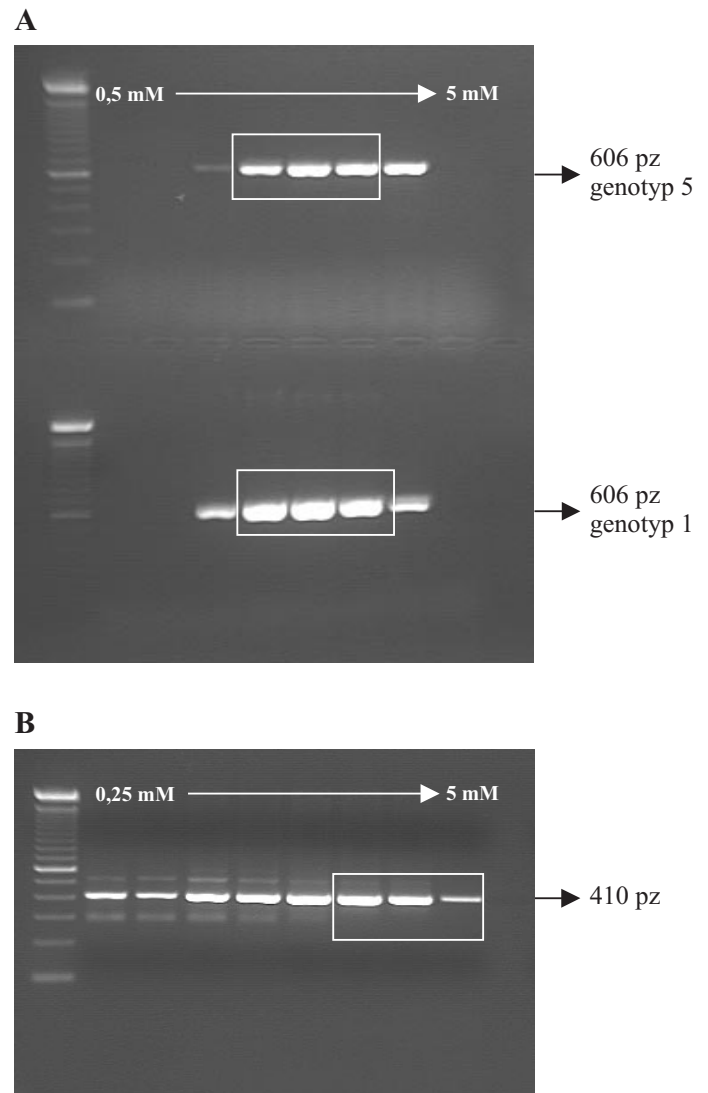
Ryc. 2. Dobór optymalnego stężenia starterów JW12 i JW6DPL do reakcji RT-PCR (A) oraz starterów JW12 i Jeb11 do przeprowadzenia reakcji hn-PCR (B)

13,15 μ l wody PCR dodawano 1 μ l rozcieńczonego w stosunku 1/10 produktu PCR. Reakcje hn-PCR przeprowadzano w termocyklerze według następującego profilu czasowo-temperaturowego: denaturacja wstępna – 5 min. 94°C, amplifikacja – 30 cykli: denaturacja – 30 sek. 94°C, przyłączenie starterów – 30 sek. 55°C, elongacja – 1 min. 72°C i końcowa elongacja – 10 min. 72°C.

Analiza uzyskanych produktów amplifikacji. Produkty amplifikacji analizowano po przeprowadzeniu rozdzielania elektroforetycznego w 2% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny o koncentracji 10 μ g/ml. Elektroforezę przeprowadzano w buforze TAE przez 30 minut przy stałym natężeniu prądu elektrycznego 90 mA. Uzyskane rozdziały obserwowano w świetle UV na transiluminatorze oraz sporządzano dokumentację fotograficzną.

Wyniki i omówienie

Z otrzymanych mózgowi pochodzących od zwierząt lądowych oraz nietoperzy zakażonych wścieklizną izolowano materiał genetyczny wirusa. RNA ekstrahowano bezpośrednio z zakażonej tkanki mózgowej bądź



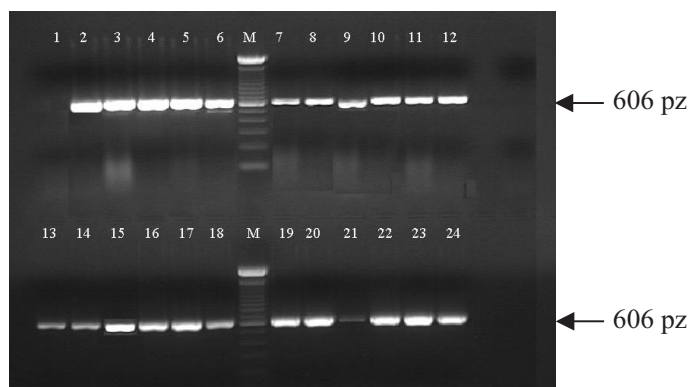
Ryc. 3. Optymalizacja stężenia jonów Mg^{2+} do reakcji RT-PCR (A) oraz do przeprowadzenia reakcji hn-PCR (B)

z mózgowia myszek zakażonych homogenizatem mózgowia nietoperzy, u których testem immunofluorescencji bezpośredniej zdiagnozowano wściekliznę.

Dokonano optymalizacji warunków RT-PCR i hn-PCR, w efekcie czego w pierwszym etapie uzyskano wyraźny produkt amplifikacji o masie 606 pz wspólny dla obydwu genotypów lyssawirusów. Natomiast optymalizacja warunków reakcji hn-PCR pozwoliła na uzyskanie produktu o wielkości 410 pz charakterystycznego dla genotypu 5.

Optymalna temperatura przyłączania starterów JW12 i JW6DPL mieściła się w zakresie 44°C-52,1°C i była niższa od optymalnej temperatury przyłączania starterów JW12 i Jeb11 (54,8°C-56°C) ryc. 1.

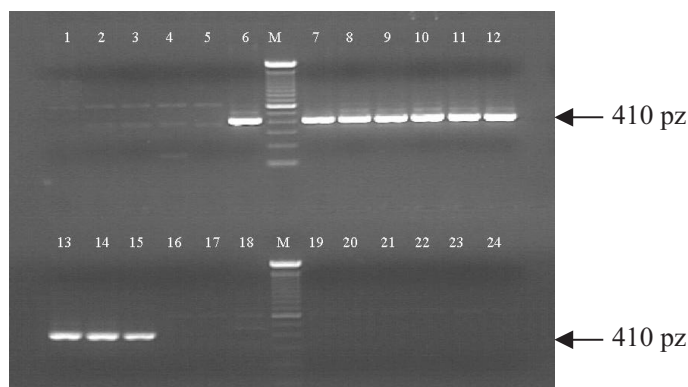
Przy określaniu właściwych ilości starterów w mieszaninach reakcyjnych najwyraźniejsze produkty amplifikacji uzyskano przy stężeniu starterów JW12 i JW6DPL równym 5-10 pmoli/15 μ l. Dla pary JW12 i Jeb11 optymalne stężenie starterów zawierało się w szerokim zakresie i wynosiło 5-50 pmoli/20 μ l mieszaniny reakcyjnej (ryc. 2).



Ryc. 4. Wynik amplifikacji izolatów pochodzących od zwierząt lądowych i nietoperzy z użyciem starterów JW12 i JW10DPL. Próbkki: 1 – kontrola ujemna, 2-5 i 16-24 – genotyp 1, 6-15 – genotyp 5

Istotną rolę podczas syntezy DNA odgrywa stężenie jonów Mg^{2+} . Niedobór jonów Mg^{2+} w mieszaninie reakcyjnej hamuje działanie polimerazy, nadmiar zaś prowadzi do powstawania produktów niespecyficznych. Najlepsze warunki reakcji RT-PCR uzyskano przy zastosowaniu Mg^{2+} w stężeniu 2-3 mM. Dla hn-PCR optymalne stężenie Mg^{2+} wynosiło 2,5-3 mM (ryc. 3).

Ustalone warunki reakcji hnRT-PCR zastosowano do wykrywania materiału genetycznego obydwu genotypów lyssawirusów (ryc. 4), a w dalszej kolejności do różnicowania zakażeń wywołanych nietoperzowym wirusem wścieklizny. Stosując parę starterów komplementarnych do EBLV-1 w efekcie końcowym uzyskano charakterystyczny produkt o wielkości 410 pz (ryc. 5). Wydaje się, iż zastosowanie tej metody pozwoli na łatwe i wiarygodne diagnozowanie i różnicowanie zakażeń lyssawirusami u zwierząt lądowych. Metoda ta może także być stosowana do diagnozowania zakażeń EBLV-1 u nietoperzy.



Ryc. 5. Produkty reakcji hn-PCR z użyciem starterów JW12 i Jeb11. Próbkki: 1 – kontrola ujemna, 2-5 i 16-24 – genotyp 1, 6-15 – genotyp 5

Piśmiennictwo

1. Amengual B., Whitby J. E., King A., Serra Cobo J., Bourhy H.: Evolution of bat lyssaviruses. *J. Gen. Virol.* 1997, 78, 2319-2328.
2. Heaton P. R., Johnstone P., McElhinney L. M., Cowley R., O'Sullivan E., Whitby J. E.: Heminested PCR assay for detection of six genotypes of Rabies and Rabies-related viruses. *J. Clin. Microbiol.* 1997, 35, 2762-2766.
3. Johnson N., Lipscomb D. W., Stott R., Gopal Rao G., Mansfield K., Smith J., McElhinney L. M., Fooks A. R.: Investigation of a human case of rabies in the United Kingdom. *J. Clin. Virol.* 2002, 351-356.
4. Luomio J., Hillbrom M., Roine R., Ketonen L., Haltia M., Valle M., Neuvonen E., Laehdevirta J.: Human rabies of bat origin in Europe. *Lancet* 1986, 15, 378.
5. McColl K. A., Tordo N., Aguilar Setien A.: Bat lyssavirus infections. *Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz.*, 2000, 19, 177-196.
6. Mueller T., Cox J., Peter W., Schaefer R., Johnson N., McElhinney L. M., Geue J. L., Tjornehoj K., Fooks A. R.: Spill-over European Bat Lyssavirus type 1 into stone marten (*Martes foina*) in Germany. *J. Vet. Med. B* 2004, 51, 49-54.
7. Picard-Mayer E., Barrat J., Tissot E., Bruyere V., Cliquet F.: Genetic analysis of European bat lyssavirus type 1 isolates in France. *Vet. Rec.* 2004, 19, 589-595.
8. Picard-Mayer E., Bruyere V., Tissot E., Barrat J., Cliquet F.: Development of a heminested RT-PCR method for the specific determination of European Bat Lyssavirus 1 Comparison with other rabies diagnostic methods. *Vaccine* 2004, 22, 1921-1929.
9. Ronsholt L.: A new case of European Bat Lyssavirus (EBL) infection in Danish sheep. *Rabies Bull. Eur.* 2002, 2, 15.
10. Smreczak M.: Laboratoryjna diagnostyka wścieklizny. Monografia, Puławy 2004.

Adres autora: dr Marcin Smreczak, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy;
e-mail: smreczak@piwet.pulawy.pl