

Zastosowanie metody real-time PCR i systemu LightCycler® do wykrywania DNA wirusa zakaźnego ronienia klaczy (EHV-1)

TOMASZ DZIECIĄTKOWSKI, MACIEJ PRZYBYLSKI, ANNA CHMIELEWSKA*, ANNA TUCHOLSKA*, AGNIESZKA TUROWSKA*, MARCIN BANBURA*

Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej AM, ul. Chałubińskiego 5, 02-004 Warszawa

*Katedra Nauk Przedklinicznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa

Dzieciatkowski T., Przybylski M., Chmielewska A., Tucholska A., Turowska A., Banbura M.
Evaluation of a real-time PCR assay using the LightCycler® system for detection of equine herpesvirus type 1 DNA

Summary

Equine herpesvirus type 1 (EHV-1) is one of the major horse diseases, causing considerable worldwide losses. A variety of techniques, including nested PCR, have been used to diagnose EHV-1 infections. In this paper, a real-time PCR assay that uses non-specific SYBR Green I® fluorochrome for the detection of EHV-1 DNA is described. This method does not require post-amplification manipulations, thereby reducing the risk of cross-contamination. The assay was sensitive enough to detect EHV-1 sequences in neuronal cell cultures and also different clinical samples. The technique is specific: it was not reactive with other herpesviruses or opportunistic bacterial pathogens such as *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis* and *Enterococcus faecium*. In comparison to virus isolation or the nested PCR used previously, the test was more sensitive and should be useful for the common diagnosis based on its specificity and rapidity.

Keywords: EHV-1, real-time PCR, horses

Wirus zakaźnego ronienia klaczy (Equine Herpesvirus-1, EHV-1) jest występującym powszechnie na całym świecie α -herpeswirusem (9), stanowiącym ważny czynnik etiologiczny licznych zakażeń górnych dróg oddechowych i zaburzeń neurologicznych koni oraz powodującym ronienia u klaczy (2).

Pierwotne objawy kliniczne zakażeń EHV-1 ze strony układu oddechowego występują głównie u młodych, niedojrzałych immunologicznie źrebiąt. Zachorowalność wśród nich sięga nawet 100%, jednak śmiertelność, będąca wynikiem powikłań bakteryjnych jest niska (2). Zaburzenia neurologiczne mogą występować u osobników w różnym wieku. Objawiają się one niechęcią do ruchu i ataksją z towarzyszącym powłóceniem nogami, które wynikają z uszkodzenia rdzenia kręgowego. W cięższych przypadkach śmierć następuje na skutek niewydolności oddechowo-kръżeniowej spowodowanej porażeniem mięśni (2). Największe znaczenie, głównie z przesłanek ekonomicznych, mają jednak zakażenia przebiegające z poronieniami (2). Mogą one występować jako reaktywacja latentnego wirusa lub też zazwyczaj jako reinfekcja układu oddechowego ciężarnych klaczy, które przebyły wcześniej zakażenie, zwykle w ostatnim trymestrze ciąży bez uprzednich objawów klinicznych (2).

Isolacja wirusa w hodowlach komórkowych jest wciąż przyjętym standardem diagnostyki zakażeń EHV-1. Materiałem stosowanym do ich zakażenia mogą być rozmaite próbki kliniczne, jak: wymazy z błon śluzowych, leukocyty krwi obwodowej oraz próbki tkanek. Diagnostyka serologiczna wykazuje większą czułość, wymaga jednak stosowania odpowiednich koniugatów (14) oraz szybkiego transportu materiałów badanych do laboratorium. Opisywane metody ulegają stopniowemu zastępowaniu przez łańcuchową reakcję polimeryzacji (Polymerase Chain Reaction, PCR). Prócz odmiany tradycyjnej (3) do diagnostyki zakażeń EHV-1 stosowane są także warianty nested PCR (6) czy też multiplex PCR, pozwalający na identyfikację i różnicowanie wirusa typu 1 i 4 (7).

Zastosowanie w badaniach wirusologicznych techniki PCR z analizą przyrostu ilości produktu w czasie rzeczywistym (real-time PCR) pozwoliło na zwiększenie czułości i specyficzności detekcji w porównaniu z wariantem tradycyjnym (11, 18). Metoda ta znalazła zastosowanie w diagnostyce zakażeń wirusami ludzi (12), a obecnie jest rozpowszechniana również w medycynie weterynaryjnej (10). Wyznacznikiem ilości matrycowego DNA jest w niej liczba cykli, po których kinetyka reakcji wchodzi w fazę logarytmicznego

wzrostu ilości produktu. Jednym z pierwszych wariantów techniki real-time PCR jest analiza przyrostu ilości amplikonów poprzez znakowanie DNA fluorochromem SYBR Green I, który emituje światło tylko w przypadku związania się z dwuniciowym DNA. Technika ta jest prosta w zastosowaniu, lecz ze względu na brak specyficzności wiązania fluorochrom-DNA bardziej podatna na błędy (13). Z tego też powodu wymaga analizy krzywych topnienia produktów (melting curves analysis), w celu określenia specyficzności amplifikacji. Wariantem real-time PCR o większej swoistości jest reakcja z sondami typu TaqMan lub Molecular Beacon, które na końcu 5' mają fluorescencyjny znacznik (R), a na końcu 3' wygaszacz (Q). Podczas wydłużania produktu reakcji sonda ulega degradacji przez Taq polimerazę o własnościach 5'-egzonukleazy, w wyniku czego fluorochrom zostaje oddzielony od wygaszacza. Proces ten powoduje emisję fluorescencji, której natężenie mierzone jest w każdym cyklu reakcji (8).

Celem badań było opracowanie metody real-time PCR do diagnostyki zakażeń końskim herpeswirusem typu 1, określenie jej specyficzności oraz porównanie jej czułości z tradycyjną metodą nested PCR (6).

Material i metody

Do badań użyto dwóch szczepów standardowych EHV-1 (Rac-H oraz A IV) oraz izolatu terenowego Jan-E, pochodzących z kolekcji szczepów Pracowni Wirusologii Katedry Nauk Przedklinicznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW. Szczepy namrażane były w komórkach linii ED utrzymywanych w podłożu Eagle'a (WSiS Lublin) z dodatkiem 10% płodowej surowicy bydłowej (Gibco). DNA ekstrahowano standardową metodą (17), przy pomocy mieszaniny fenol : chloroform : alkohol izoamylowy, a następnie precypitowano 100% etanolem. Uzyskany wysuszony osad DNA rozpuszczano w 20 μ l buforu TE o pH = 8,0.

W celu amplifikacji DNA EHV-1 zastosowano parę starterów specyficznych do genu glikoproteiny B (gB) wirusa zakaźnego ronienia kłaczy, o sekwencji P1: 5'-TCT ATT GAG TTT GCT ATG CT-3' oraz P2: 5'-TCC TGG TTG TTA TTG GGT AT-3' (6). Do reakcji real-time PCR użyto mieszaniny amplifikacyjnej FastStart DNA Master SYBR Green Kit® (Roche Diagnostics) w objętości końcowej 20 μ l, na którą składało się po 0,5 μ l każdego ze starterów, 3 mM MgCl₂ oraz 5 μ l badanego DNA. Pierwszy etap rozpoczynała denaturacja przez 10 min. w 95°C. Po cyklu wstępnym następowało 45 cykli obejmujących: denaturację 95°C – 10 s, przyłączanie starterów 58°C – 5 s i wydłużanie łańcuchów 72°C – 27 s oraz analiza krzywych topnienia w temp. 65-95°C. Całość badania trwała ok. 55 min. i była prowadzona w aparacie LightCycler 2.0 (Roche Diagnostics). W trakcie trwania reakcji stale analizowany był poziom fluorescencji wynikły z wiązania się fluorochromu SYBR Green I do amplifikowanego dwuniciowego DNA. Następnie przeprowadzono analizę krzywych topnienia produktów, co pozwalało dodatkowo na ustalenie specyficzności amplifikacji.

Do określenia swoistości reakcji użyto DNA EHV-1 szczepów Rac-H, A IV oraz Jan-E. Jako kontrole ujemne wykorzystano DNA wyekstrahowane z niezakażonych linii ED oraz Vero, zaś za kontrole specyficzności reakcji posłużyło

DNA izolowane z końskiego herpeswirusa typu 2 (EHV-2), ludzkich herpeswirusów typu 1, 2, 3 i 5 oraz DNA pochodzące z bakterii *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis* i *Enterococcus faecium*.

W celu półilościowego określenia czułości metody real-time PCR przeprowadzono reakcję z wykorzystaniem serijnych rozcieńczeń DNA wyekstrahowanego ze szczepu Rac-H w jałowej wodzie dejonizowanej. Rozcieńczenia wykonano w zakresie od 10⁰ do 10⁻⁵ (od 2,3 μ g do 0,26 ng DNA).

Badania materiału klinicznego przeprowadzono na grupie 26 próbek – 6 izolatów wirusa z hodowli komórkowych (w tym 4 z hodowli neuronów mysich), 5 wymazów z błon śluzowych oraz 15 próbek leukocytów krwi obwodowej. DNA izolowano w sposób opisany powyżej i używano do amplifikacji metodą real-time PCR.

Wszystkie opisane badania prowadzono w dwukrotnych, niezależnych powtórzeniach.

Wyniki i omówienie

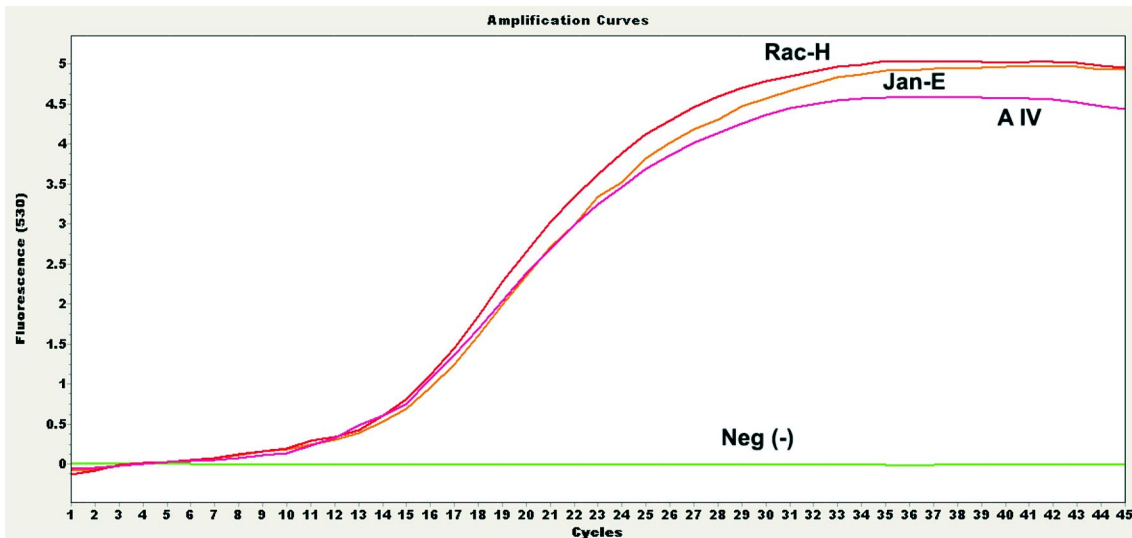
Wynik dodatni, wyrażony wykładniczym przyrostem fluorescencji, osiągnięto we wszystkich próbkach zawierających DNA szczepów standardowych EHV-1 (ryc. 1). Analiza krzywych topnienia produktów PCR wykazała specyficzność reakcji we wszystkich przypadkach (ryc. 2). Amplifikacji nie zaobserwowano natomiast w próbkach stanowiących kontrole ujemne oraz w materiałach pochodzących z innych herpeswirusów i bakterii.

Podczas określania zakresu czułości wariant real-time PCR wykrywał wszystkie użyte rozcieńczenia wirusowego DNA w zakresie od 10⁰ do 10⁻⁵ (ryc. 3). Jest to przedział około dziesięciokrotnie większy od uprzednio stosowanej metody.

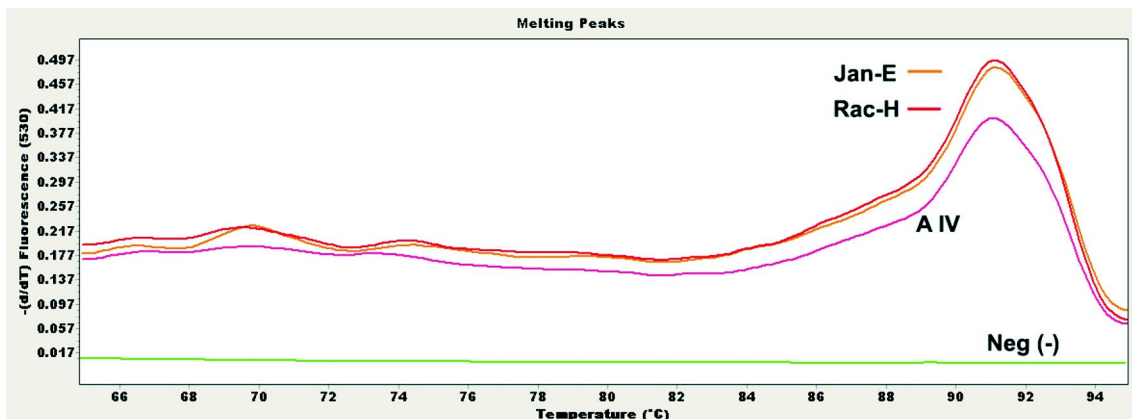
W badaniu materiałów klinicznych test real-time PCR wykrył specyficzne sekwencje EHV-1 w 18 próbkach, które dały także wynik dodatni w nested PCR. Dwa preparaty pochodzące z warstwy leukocytarnej, określone metodą tradycyjną jako pozytywne, dały także dodatni odczyt fluorescencji w aparacie LightCycler 2.0, lecz analiza krzywych topnienia produktów sugerowała niespecyficzną amplifikację (tab. 1).

Końskie herpeswirusy ze względu na swe rozpowszechnienie i patogenność od dawna stanowiły istotny problem w praktyce weterynaryjnej. W latach 1996-1999 dokonano w Pracowni Wirusologii Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW pierwszych identyfikacji herpeswirusów za pomocą techniki PCR (4). Część spośród izolowanych wirusów określono wówczas jako EHV-1, przynależność innych pozostawała nadal nieokreślona (4, 5). Dopiero dalsze badania z zastosowaniem starterów specyficznych dla sekwencji EHV-2 i EHV-5 pozwoliły na zaliczenie ich do typu 2 oraz 5 (15, 16).

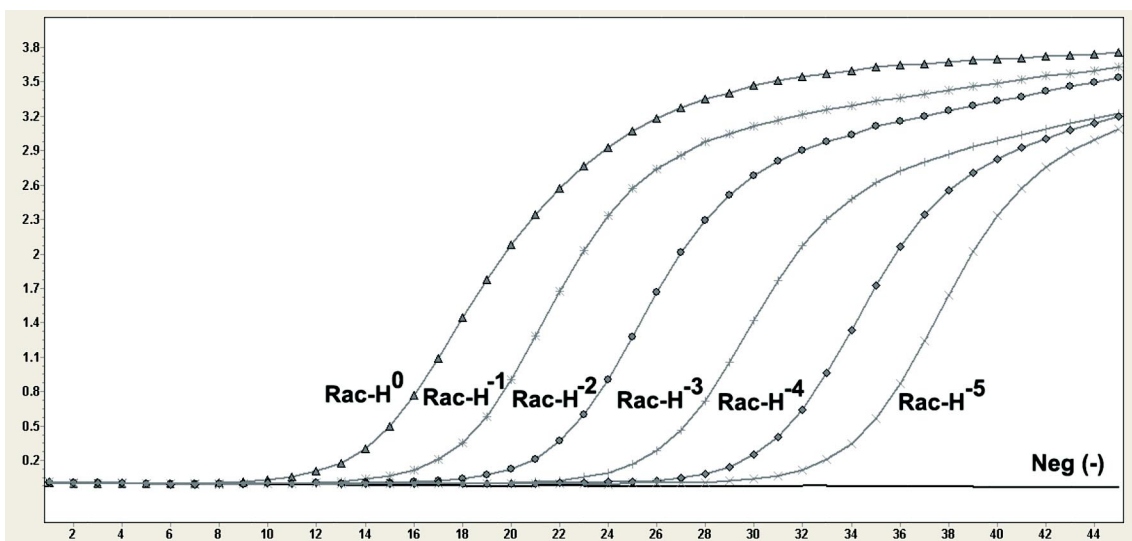
Zastosowanie w diagnostyce wirusologicznej real-time PCR pozwala na istotne skrócenie czasu oczekiwania na wynik oraz podwyższenie progu czułości metody (11, 18). Technika ta staje się obecnie testem z wyboru w medycynie ludzkiej, zwłaszcza w przypadkach neurologicznych (1).



Ryc. 1. Wynik reakcji real-time PCR w kierunku wykrywania wirusa zakaźnego ronienia kłaczy. Poszczególne krzywe oznaczają DNA szczepów standardowych EHV-1 (Rac-H i A IV) oraz izolatu terenowego (Jan-E). K (-) – kontrola ujemna reakcji: DNA izolowane z niezakażonej linii ED



Ryc. 2. Analiza krzywych topnienia produktów, będąca pomiarem specyficzności reakcji, w reakcji real-time PCR wykrywającej EHV-1. Poszczególne krzywe oznaczają DNA szczepów Rac-H, A IV oraz Jan-E. K (-) – kontrola ujemna reakcji



Ryc. 3. Badanie czułości metody real-time PCR w kierunku wykrywania wirusa zakaźnego ronienia kłaczy. Poszczególne krzywe oznaczają seryjne rozcieńczenia DNA EHV-1 (szczepu Rac-H) w zakresie od 10^0 do 10^{-5} . K (-) – kontrola ujemna reakcji

Przedstawiona metoda real-time PCR do wykrywania wirusa zakaźnego ronienia kłaczy jest szybsza do wykonania i bardziej czuła niż typowa reakcja łańcuchowej polimerizacji połączona z elektroforezą żelową. Mniejsze jest również ryzyko przypadkowego zanieczyszczenia próbek ze względu na brak obróbki poamplifikacyjnej. Jest także wysoce powtarzalna i wykazuje liniowy przedział detekcji w zakresie rozcieńczeń od 10^0 do 10^{-5} , co może pomóc w ilościowym określaniu kopijności wirusa. Czułość jest na tyle wysoka, że pozwala na wykrywanie DNA EHV-1 w hodowlach zakażonych neuronów mysich, co było nie możliwe przy zastosowaniu nested PCR. Pewną rozbieżność z metodą tradycyjną stanowią dwie próbki DNA izolowane z leukocytów krwi obwodowej, w których real-time PCR wykazał niespecyficzną amplifikację. Wynik ten mógł być spowodowany przez obecność w wyekstrahowanym DNA inhibitorów reakcji real-time PCR (śladowych ilości alko-

holu etylowego) lub też przez punktową mutację w obrębie sekwencji docelowej. Wariant detekcji z niespecyficznym fluo-rochromem SYBR Green I jest tani i łatwy do optymalizacji, lecz wymaga analizy krzywych topnienia produktu jako elementu gwarantującego specyficzną badania. Specyficzność i czułość metody można dodatkowo zwiększyć, wykorzystując znakowane fluorescencyjnie sondy typu TaqMan, co wiąże się jednak z dodatkowymi kosztami.

Wraz z opracowaniem testu real-time PCR do wykrywania zakażeń EHV-1 medycyna weterynaryjna zyskuje nową metodę, która może znaleźć zastosowanie w diagnostyce niskokopijnych zakażeń herpeswirusami koni oraz w badaniu patogenyzy ich chorób. Wskazane są dalsze badania, które zmierzają będą do opracowania podobnych testów do wykrywania infekcji końskimi herpeswirusami, zwłaszcza tymi wywoływanymi przez EHV-2.

Piśmiennictwo

- Aberle S. W., Aberle J. H., Steininger C., Puchhammer-Stöckl E.: Quantitative real time PCR detection of varicella-zoster virus DNA in cerebrospinal fluid in patients with neurological disease. *Med. Microbiol. Immunol.* (Berl). 2005, 94, 7-12.
- Allen G. P., Bryans J. T.: Molecular epizootiology, pathogenesis, and prophylaxis of equine herpesvirus-1 infections. *Prog. Vet. Microbiol. Immunol.* 1986, 2, 78-144.
- Ballagi-Pordany A., Klingeborn B., Flensburg J., Belak S.: Equine herpesvirus type 1: detection of viral DNA sequences in aborted fetuses with the polymerase chain reaction. *Vet. Microbiol.* 1990, 22, 373-381.
- Bañbura M., Chmielewska A., Tucholska A., Malicki K.: Test PCR w diagnostyce wirusowego zakaźnego ronienia klaczy. *Medycyna Wet.* 1998, 54, 772-774.
- Bañbura M., Chmielewska A., Tucholska A., Malicki K.: Występowanie wirusa zakaźnego ronienia klaczy w leukocytach krwi obwodowej koni. *Medycyna Wet.* 2000, 56, 521-523.
- Borchers K., Slater J.: A nested PCR for the detection and differentiation of EHV-1 and EHV-4. *J. Virol. Methods* 1993, 45, 331-336.
- Carvalho R., Passos L. M., Martins A. S.: Development of a differential multiplex PCR assay for equine herpesvirus 1 and 4 as a diagnostic tool. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health* 2000, 47, 351-359.
- Clementi M.: Quantitative Molecular Analysis of Virus Expression and Replication. *J. Clin. Mic.* 2000, 38, 2030-2036.
- Davison A., Eberle R., Hayward G. S., McGeoch D. J., Minson A. C., Pellet P. E.: Herpesviruses, [w:] Faquet C. M., Mayo M. A., Maniloff J., Desselberger U., Ball L. A. (red.): *Virus taxonomy – classification and nomenclature of viruses. Eighth report of ICTV.* Elsevier Academic Press, San Diego 2005, 193-212.
- Diallo I. S., Hewitson G., Wright L. L., Kelly M. A., Rodwell B. J., Corney B. G.: Multiplex real-time PCR for the detection and differentiation of equid herpesvirus 1 (EHV-1) and equid herpesvirus 4 (EHV-4). *Vet. Microbiol.* 2007, 123, 93-103.
- Dzieciatkowski T., Przybylski M., Tomaszewska A., Rokicka M., Łuczak M.: Comparison of two methods used for monitoring low-copy cytomegalovirus infection in a patient with chronic myeloid leukemia after unrelated umbilical cord blood transplantation. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 2007, 55, 199-203.
- Espy M. J., Uhl J. R., Mitchell P. S., Thorvilson J. N., Svien K. A., Wold A. D., Smith T. F.: Diagnosis of herpes simplex virus infections in the clinical laboratory by LightCycler PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2000, 38, 795-799.
- Mackay I. M., Arden K. E., Nitsche A.: Real-time PCR in virology. *Nucl. Acids Res.* 2002, 30, 1292-1305.
- Rola J., Żmudziński J.: Herpeswirus koński typ 1 (EHV-1) przyczyną poronień u klaczy w Polsce. *Medycyna Wet.* 1997, 53, 268-269.
- Ruszczyk A.: Genetyczna zmienność szczepów EHV-2 wyizolowanych od koni w Polsce. *Medycyna Wet.* 2003, 59, 620-622.
- Ruszczyk A., Chmielewska A., Tucholska A., Bañbura M. W.: Izolacja i identyfikacja herpeswirusa koni typu 2 (EHV-2). *Medycyna Wet.* 2001, 57, 603-606.
- Strauss W. M.: Preparation of genomic DNA from mammalian tissue, [w:] Ausubel F. M., Brent R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman J. G., Smith J. A., Struhl K. (red.): *Current Protocols in Molecular Biology.* Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York 1992, 2.2.1-2.2.3.
- Watzinger F., Suda M., Preuner S., Baumgartinger R., Ebner K., Baskova L., Niesters H. G., Lawitschka A., Lion T.: Real-time quantitative PCR assays for detection and monitoring of pathogenic human viruses in immunosuppressed pediatric patients. *J. Clin. Microbiol.* 2004, 42, 5189-5198.

Adres autora: dr Tomasz Dzieciatkowski, ul. Chałubińskiego 5, 02-004 Warszawa; e-mail: dzieciatkowski@wp.pl

Tab. 1. Zestawienie materiałów badanych techniką real-time PCR w kierunku EHV-1 oraz uzyskanych wyników

Nazwa próbki	Wynik	Tm (°C)	Ct	Nazwa próbki	Wynik	Tm (°C)	Ct
Vero	-	-	-	Hod. neuronów 3	+	92,55	34
ED	-	-	-	Hod. neuronów 4	+	92,43	35
A IV	+	92,48	11	Wymaz 17	+	92,21	20
Jan-E	+	92,34	11	Wymaz 19	+	92,33	24
Rac-H	+	92,21	11	Wymaz 23	+	92,41	23
Rac-H ⁻¹	+	92,31	15	Wymaz 24	+	92,34	28
Rac-H ⁻²	+	92,45	19	Wymaz 8	-	-	-
Rac-H ⁻³	+	92,26	23	Leukocyty 7	+	92,23	36
Rac-H ⁻⁴	+	92,51	27	Leukocyty 402	+	92,42	22
Rac-H ⁻⁵	+	92,38	31	Leukocyty 404	- (niesp.)	88,19	-
EHV-2 Limpopo	-	-	-	Leukocyty 407	+	92,37	29
HHV-1 McIntyre	-	-	-	Leukocyty 408	- (niesp.)	86,21	-
HHV-2 PT368	-	-	-	Leukocyty 420	+	92,44	31
HHV-3 Ellen	-	-	-	Leukocyty 422	+	92,57	30
HHV-5 AD169	-	-	-	Leukocyty 423	+	92,29	27
<i>E. coli</i>	-	-	-	Leukocyty 430	+	92,20	29
<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	Leukocyty 433	+	92,45	28
<i>E. faecium</i>	-	-	-	Leukocyty 434	+	92,47	27
Hodowla ED 1	+	92,35	21	Leukocyty 436	+	92,43	30
Hodowla ED 2	+	92,28	25	Leukocyty 437	-	-	-
Hod. neuronów 1	+	92,47	36	Leukocyty 438	+	92,31	31
Hod. neuronów 2	+	92,42	35	Leukocyty 439	+	92,48	30

Objaśnienia: Tm – temperatura topnienia produktów reakcji; Ct – numer cyklu reakcji, przy którym fluorescencja próbki osiągnęła fazę logarytmicznego wzrostu; niesp. – amplifikacja niespecyficzna