

Izolacja i identyfikacja wirusa pryszczycy

GRAŻYNA PAPROCKA

Zakład Pryszczycy Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego,
ul. Wodna 7, 98-220 Zduńska Wola

Paprocka G.

Isolation and identification of the foot-and-mouth disease virus

Summary

Foot-and-mouth disease (FMD) is the most contagious disease of mammals and has great potential for causing severe economic losses in susceptible cloven-hoofed animals. FMD is caused by a virus of the genus *Aphthovirus*, family *Picornaviridae*. Serological tests in laboratories have identified seven different serotypes as O, A, C, SAT 1, SAT 2, SAT 3 and Asia 1. FMD is diagnosed by the virus isolation or demonstration of FMD viral antigen or nucleic acid in samples of biological specimens.

The purpose of the study was to apply the isolation test in cell culture and a RT-PCR assay for the detection of foot-and-mouth disease virus in biological materials. Out of the total of 14 examined samples, 6 (42.8%) were found positive using these methods. The antigen ELISA was used for the confirmation of specificity of the isolation assay. Primary bovine thyroid cells were found the most sensitive cell culture system for the detection of foot-and-mouth disease virus, followed by secondary lamb kidney and certain IB-RS-2 cells.

Keywords: foot-and-mouth disease, diagnosis, isolation test, RT-PCR

Pryszczycy (Foot-and-mouth disease – FMD) należy do najgroźniejszych chorób zakaźnych ssaków parzystokopytnych, jest problemem o zasięgu globalnym (3, 10). Chorobę wywołuje wirus z rodziny *Picornaviridae*, rodzaju *Aphthovirus* występujący w siedmiu serotypach: O, A, C, Asia 1, SAT 1, SAT 2, SAT 3. Genom wirusa stanowi jednoniciowy RNA o dodatniej polarności, długości około 8500 nukleotydów. RNA jest matrycą do syntezy pojedynczego białka, które jest następnie rozszczepiane do odpowiednich białek funkcjonalnych (5). Zasadniczym warunkiem skutecznego zwalczania FMD jest szybka i pewna laboratoryjna diagnoza.

Celem badań było wykrywanie wirusa pryszczycy (FMDV) w materiale biologicznym testem izolacji oraz RT-PCR.

Materiał i metody

Hodowle komórek. W badaniach użyto hodowli pierwotnej komórek tarczycy bydłowej, hodowli wtórnej komórek nerki jagnięcia oraz hodowli komórek linii ciągłej IB-RS-2, otrzymanej z Istituto Zooprofilattico Sperimentale Della Lombardia e dell'Emilia w Brescii.

Zakładanie hodowli pierwotnej komórek tarczycy bydłowej. Jedną część uprzednio rozdrobnionej tkanki trawiono przy użyciu dyspazy (Dispase II, 2 U/ml), drugą 0,25% trypsyną w 37°C, na mieszadle magnetycznym. Nadsąc z uwolnionymi komórkami zbierano co 15-30 minut. Proces izolowania komórek powtarzano aż do całkowitego strawienia tkanki. Uzyskaną zawiesinę wirowano przy 400 × g przez 10 min. Po trzykrotnym przepłukaniu komórek roztworem PBS osad zawieszano w 1 ml pożywki hodowlanej Eagle'a MEM z dodatkiem 10% surowicy bydłowej (FBS) oraz antybiotyków (100 i.u./ml penicyliny, 0,1 mg/ml streptomycyny, 0,25 µg/ml amfoterycyny). Komórki liczone w komorze Bürkera, jednocześnie sprawdzając

ich żywotność przy użyciu 0,4% błękitu trypanu, a następnie po rozcieńczeniu pożywką hodowlaną do ilości około 1×10^6 komórek/ml rozdzielano do 24-dołkowych płytek z płaskim dnem, po 500 µl na dołek. Hodowlę prowadzono w temp. 37°C.

Przygotowanie hodowli wtórnej komórek nerki jagnięcia. Konfluentną hodowlę pierwotną komórek nerki jagnięcia otrzymaną wg metody opisaną wcześniej (6) odklejało 0,25% trypsyną. Komórki odwirowywano przy 400 × g przez 10 min., zawieszano w medium do zamrażania (10% DMSO + 90% Eagle'a MEM z 20% FBS) w takiej ilości, aby uzyskać około 3×10^7 komórek/ml, następnie rozlewano do probówek mrożeniowych i przenoszono do ciekłego azotu. Po 24 miesiącach przechowywania w głębokim zamrożeniu komórki szybko rozmrażano w łaźni wodnej w temp. 37°C i liczone w sposób opisany powyżej. Policzono komórki rozcieńczano pożywką hodowlaną Eagle'a MEM wzbogaconą 10% FBS z dodatkiem antybiotyków, do ilości $3-5 \times 10^5$ komórek/ml, po czym wysiewano do 24-dołkowych płytek z płaskim dnem, po 500 µl na dołek i hodowano w temp. 37°C.

Test izolacji. Badany materiał biologiczny otrzymano z World Reference Laboratory w Pirbright (WRL), w ramach międzylaboratoryjnych porównań metod diagnostycznych. Założone na płytkach hodowle zakażano przez 30 min. adsorpcję, próbką w ilości 200 µl na dołek i inkubowano w temp. 37°C przez 48 godzin. Zakażone hodowle oglądano pod mikroskopem, codziennie sprawdzając pojawienie się efektu cytopatycznego (CPE). Przy jego braku hodowle komórek zamrażano, a następnie po odmrożeniu wykonywano pasaż. Jeżeli w dwóch kolejnych pasażach nie stwierdzono CPE, wynik był ujemny. Hodowle, w których wystąpił efekt cytopatyczny (wynik dodatni) badano metodą ELISA na obecność wirusów pryszczycy. Badania wykonywano metodami zgodnymi z OIE Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals (2, 4).

Reakcja polimeryzacji łańcuchowej z odwrotną transkrypcją (test RT-PCR). RNA wirusa pryszczycy ekstrahowano przy użyciu zestawu RNeasy Mini Kit, reakcje RT-PCR prze-

prowadzono z wykorzystaniem zestawu OneStep RT-PCR, firmy Qiagen. Sekwencje zastosowanych starterów oraz ich lokalizację w genomie przedstawiono w tab. 1. Amplifikację DNA przeprowadzono w termocyklerze Personal Mastercycler (Eppendorf) wg następującego profilu czasowo-termicznego: odwrotna transkrypcja – 30 min., 50°C, denaturacja wstępna – 15 min., 94°C, amplifikacja podczas 40 cykli: denaturacja – 1 min., 94°C, przyłączanie starterów – 1 min., 50°C, elongacja – 2 min., 72°C i końcowa synteza – 10 min. 72°C. Kontrolę dodatnią stanowił szczep referencyjny FMDV serotyp O, namnożony w hodowli komórek linii ciągłej IB-RS-2, kontrolę ujemną – próbka niezakażonego nabłonka.

Analiza produktów amplifikacji. Produkty amplifikacji analizowano po wykonaniu rozdzielania elektroforetycznego w 1,5% żelu agarozowym wybarwionym bromkiem etydyny. Elektroforezę prowadzono w buforze TBE przy stałym napięciu prądu 70 V. Wielkość produktów PCR określano na podstawie ich lokalizacji względem markera masowego (100 bp, Promega). Wynik uznawano za dodatni, jeżeli w żelu widoczny był prążek DNA o wielkości 216 p.z. Dokumentację fotograficzną sporządzano przy pomocy automatycznego systemu archiwizacji – Imagistore 5000 z oprogramowaniem GelBase/GelBlot Proc.

Wyniki i omówienie

W pierwszym etapie badań przygotowano hodowle komórkowe typu monolayer (jednowarstwowe) w celu wykonania testu izolacji. Oceniono przydatność powszechnie stosowanej trypsyny oraz dyspazy do zakładania hodowli pierwotnej komórek tarczycy bydlęcej. Dyspaza jest niespecyficzną proteazą otrzymaną z *Bacillus polymyxa* rozdziałającą błony podstawne różnych tkanek (9). Przy użyciu wymienionych enzymów wykonywano łagodne krótkie trawienia, które eliminowały ryzyko nadmiernego strawienia tkanki i zniszczenia receptorów błonowych komórek. Komórki izolowane dyspazą w krótkim czasie przytwierdzały się do podłoża, po 4-5 dniach tworzyły różnej wielkości kolonie, a po około 7 dniach jedną warstwę. W przypadku trawienia trypsyną hodowla rosła wolniej, tworząc monolayer po około 10 dniach. Do przyczepienia komórek tarczycy do podłoża i ich wzrostu niezbędne było wzbogacenie pożywki hodowlanej dodatkiem 10% FBS. W zależności od tempa proliferacji i metabolizmu komórek dokonywano zmiany pożywki, usuwając zawieszony w niej, nie przyczepione, martwe i uszkodzone komórki. Konfluentna hodowla pierwotna komórek tarczycy bydlęcej przechowywana w temperaturze 20-25°C była użyteczna do testu izolacji przez około 14 dni.

Hodowlę wtórną komórek nerki jagnięcia zakładano z komórek uwolnionych trypsyną z hodowli pierwotnej, a następnie przechowywanych 24 miesiące w ciekłym azocie. Wydajność mrożenia była wysoka, wynosiła 85,3%.

Tab. 1. Sekwencja i lokalizacja starterów

Startery	Sekwencja 5' - 3'	Lokalizacja w genomie	Pozycja nukleotydowa
P1	CCTACCTCCTCAACTACGG	1D(VP1)	3377-3396
P2	GAAGGGCCAGGGTTGGACTC	2A/2B	3572-3592

Odmrożone komórki zachowały dobrą żywotność i nie zmieniony potencjał wzrostowy. Już w pierwszym dniu przyczepiały się dobrze do podłoża, a po około 24-48 godzinach formowały monolayer, co świadczyło, że szybko produkowały czynniki adhezyjne oraz inne substancje konieczne do stworzenia optymalnego, swoistego środowiska hodowli. Hodowla wtórna komórek nerki jagnięcia w porównaniu z hodowlą pierwotną szybciej osiągała konfluencję i była bardziej homogenna dzięki selekcji komórek o większej sile proliferacyjnej.

Opisanych hodowli oraz rutynowo stosowanej w laboratorium hodowli komórek linii ciągłej IB-RS-2 pasaż 5 użyto do detekcji infekcyjnego wirusa pryszczycy. Badaniom poddano 14 próbek. Wyniki przedstawiono w tab. 2. Obecność FMDV stwierdzono w 6 (42,8%) próbkach. Dodatkowo reagowały próbki nr: 3, 8, 11, 12, 13, 14, pozostałe były ujemne. Widoczny efekt cytopatyczny wystąpił we wszystkich hodowlach w pierwszym pasażu. Pod wpływem zakażenia komórki zaokrąglaly się, miały wyraźniejsze kontury, w końcu następowała ich cytoliza i odklejanie się od podłoża (ryc. 1, 2). Należy zwrócić uwa-

Tab. 2. Wykrywanie wirusa pryszczycy w materiałach biologicznych

Nr próbki	Oznaczenie próbki	Test izolacji			Test ELISA	RT-PCR
		Hodowla pierwotna komórek tarczycy bydlęcej	Hodowla wtórna komórek nerki jagnięcia	Hodowla komórek linii ciągłej IB-RS-2		
1	FMD321	-	-	-	nb	-
2	FMD322	-	-	-	nb	-
3	FMD328	+ l p/19 godz.	+ l p/24 godz.	+ l p/36 godz.	serotyp O	+
4	FMD329	-	-	-	nb	-
5	FMD330	-	-	-	nb	-
6	FMD331	-	-	-	nb	-
7	FMD332	-	-	-	nb	-
8	FMD337	+ l p/24 godz.	+ l p/24 godz.	+ l p/42 godz.	serotyp A	+
9	FMD338	-	-	-	nb	-
10	FMD340	-	-	-	nb	-
11	FMD5/05	+ l p/18 godz.	+ l p/20 godz.	+ l p/24 godz.	serotyp Asia 1	+
12	FMD31/05	+ l p/24 godz.	+ l p/24 godz.	+ l p/40 godz.	serotyp A	+
13	FMD51/05	+ l p/18 godz.	+ l p/19 godz.	+ l p/24 godz.	serotyp A	+
14	FMD48/06	+ l p/24 godz.	+ l p/26 godz.	+ l p/30 godz.	serotyp O	+

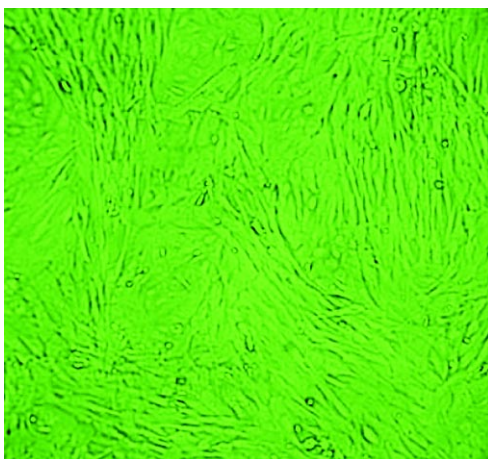
Objaśnienia: + wynik dodatni; - wynik ujemny; nb – nie badano; p – pasaż

ge, że w przypadku próbek dodatnich nr: 3, 11, 13, 14 efekt cytopatyczny pojawił się w hodowli pierwotnej komórek tarczycy bydłowej, odpowiednio, po 19, 18, 18, 24 godzinach, w hodowli wtórnej komórek nerki jagnięcia – po 24, 20, 19, 26 godzinach, a w hodowli komórek linii ciągłej IB-RS-2 – po 36, 24, 24, 30 godzinach. Próbki dodatnie nr: 8 i 12 powodowały CPE po 24 godzinach, zarówno w hodowli komórek tarczycy bydłowej, jak i nerki jagnięcia, natomiast w hodowli IB-RS-2, odpowiednio, po 42 i 40 godzinach. Przedstawione dane wskazują, że najbardziej wrażliwa na zakażenie wirusem pryszczycy była hodowla tarczycy bydłowej, następnie nerki jagnięcia i IB-RS-2. Hodowla pierwotna komórek tarczycy bydłowej ma ważne znaczenie diagnostyczne, jest preferowana wśród hodowli zalecanych przez OIE do izolacji FMDV, co potwierdzono w prezentowanych wynikach. Hodowle pierwotne są najlepszym podłożem do badań, w którym zachowane są właściwości tkanki lub narządu, z którego pochodzą.

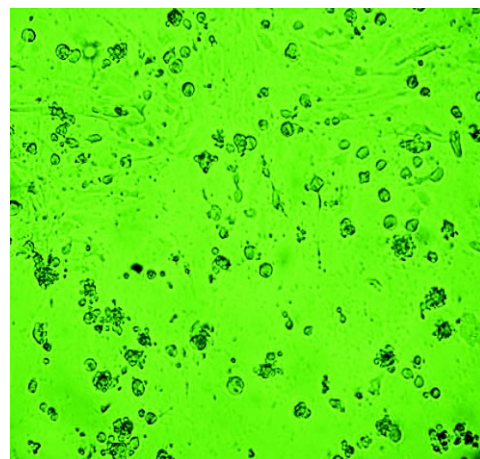
Specyficzność CPE potwierdzono testem ELISA z równoczesną identyfikacją serotypów. W próbkach nr: 3, 8, 11, 12, 13, 14 wykazano kolejno serotypy: O, A, Asia 1, A, A, O. Można więc stwierdzić, że użyte hodowle były przydatne do wykrywania wymienionych serotypów FMDV. Niektórzy autorzy uważają, że do namnożenia określonego szczepu wirusa pryszczycy ważny jest wybór odpowiedniej hodowli komórek (7). Z tego powodu laboratorium powinno dysponować hodowlami różnych komórek wrażliwych na zakażenie FMDV.

Następnie do wykrywania obecności wirusa pryszczycy w badanych próbkach zastosowano metodę RT-PCR. Użyto uniwersalnych starterów opisanych przez Amaral-Doel i wsp. (1, 8), opartych na sekwencji z wysoce konserwatywnego regionu genu 1D i 2A/2B, którymi można wykrywać wszystkie 7 serotypów FMDV. Uzyskane wyniki były zgodne z wynikami testu izolacji, wykazały obecność materiału genetycznego FMDV w próbkach nr 3, 8, 11, 12, 13, 14 (tab. 2, ryc. 3). Wielkość amplifikowanych produktów wynosiła 216 p.z. Nie stwierdzono amplifikacji w przypadku pozostałych próbek oraz kontroli ujemnej. Przedstawione dane wskazują, że w badanych próbkach występowały wiriony infekcyjne, nieaktywnych biologicznie nie wykryto.

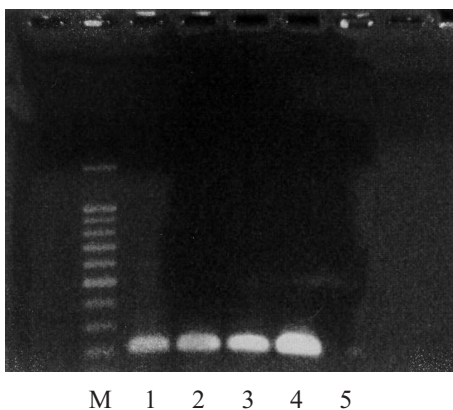
Podsumowując można stwierdzić, że zastosowane metody: izolacja/ELISA oraz RT-PCR zapewniają skuteczne wykrywanie wirusa pryszczycy w materiale biologicznym.



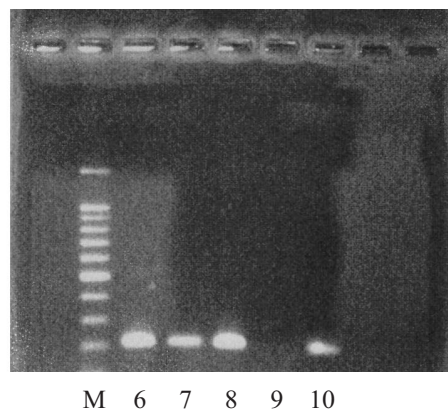
Ryc. 1. Hodowla komórek tarczycy bydłowej (kontrola)



Ryc. 2. Hodowla komórek tarczycy bydłowej zakażona wirusem pryszczycy (próbka FMD328)



Ryc. 3. Produkty reakcji RT-PCR. Ścieżki: M – marker; 1, 2, 3, 7, 8, 10 odpowiadają pozytywnie reagującym próbkom nr 3, 8, 11, 12, 13, 14; 5, 9 kontrola ujemna; 4, 6 kontrola dodatnia



216 pz

Piśmiennictwo

1. Amaral-Doel C. M. F., Owen N. E., Ferris N. P., Kitching R. P., Doel T. R.: Detection of foot-and-mouth disease viral sequences in clinical specimens and ethyleneimine-inactivated preparations by the polymerase chain reaction. *Vaccine* 1993, 11, 415-421.
2. Anon.: OIE Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals (mammals, birds and bees), Fifth Edition 2004, 111-128.
3. De Clercq K., Goris N., Barnett P. V., MacKay D. K.: The importance of quality assurance/quality control of diagnostics to increase the confidence in global foot-and-mouth disease control. *J. Vet. Med.* 2008, 11, 35-45.
4. Ferris N. P., King D. P., Reid S. M., Hutchings G. H., Shaw A. E., Paton D. J., Goris N., Haas B., Hoffmann B., Brocchi E., Bugnetti M., Dekker A., De Clercq K.: Foot-and-mouth disease virus: A first inter-laboratory comparison trial to evaluate virus isolation and RT-PCR detection methods. *Vet. Microbiol.* 2006, 117, 130-140.
5. Paprocka G.: Wirus pryszczycy i jego budowa molekularna. *Medycyna Wet.* 2006, 62, 753-756.
6. Paprocka G.: Zastosowanie hodowli pierwotnej komórek nerki jagnięcia w diagnostyce pryszczycy. *Medycyna Wet.* 2008, 64, 332-334.
7. Paprocka G., Kęsy A.: Zastosowanie hodowli komórek do namnażania wirusa pryszczycy. *Biotechnologia* 1992, 18, 15-20.
8. Reid S. M., Forsyth M. A., Hutchings G. H., Ferris N. P.: Comparison of reverse transcription polymerase chain reaction, enzyme linked immunosorbent assay and virus isolation for the routine diagnosis of foot-and-mouth disease. *J. Virol. Methods* 1998, 70, 213-217.
9. Tezel T. H., Priore L. V. D., Kaplan H. J.: Posterior vitreous detachment with dispase. *Retina* 1998, 18, 7-15.
10. Valarcher J. F., Leforban Y., Rweyemamu M., Roeder P. L., Gerbier G., Mackay D. K. J., Sumption K. J., Paton D. J., Knowles N. J.: Incursions of foot-and-mouth disease virus into Europe between 1985 and 2006. *J. Vet. Med.* 2008, 21, 14-34.

Adres autora: doc. dr hab. Grażyna Paprocka, ul. Wodna 7, 98-220 Zduńska Wola; e-mail: grazyna@piwzp.invar.net.pl