

Wykorzystanie łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) do wykrywania i określania rozprzestrzeniania się wirusa krwotocznego zapalenia jelit w organizmie indyków

BEATA MAZUR-LECH, ANDRZEJ KONCICKI, MICHAŁ JANTA

Zakład Chorób Ptaków Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UWM, ul. Oczapowskiego 13, 10-957 Olsztyn

Mazur-Lech B., Koncicki A., Janta M.

Investigations on using a polymerase chain reaction (PCR) to detect and evaluate the distribution of haemorrhagic enteritis virus in turkeys

Summary

The aim of the study was to evaluate the usefulness of the PCR method for detecting and investigating the distribution of haemorrhagic enteritis virus (HEV) in turkeys after oral inoculation. For the experiment forty-one day old turkey poults (But 9) were used. The birds were divided into two groups (20 birds in each group). The turkeys from the first group were orally challenged with a Polish HEV isolate at a dose of $10^{4.3}$ EID₅₀, while turkeys from the second group were the unchallenged control group. Subsequently, three birds from each group were euthanized after 24, 48, 72, 96 and 120 hours of inoculation, and swabs were taken of spleen, kidneys, duodenum, cecal tonsils, bursa of Fabryci, heart, pancreas, thymus, brain, breast muscle, liver and gizzard during the autopsy. After conducting the PCR reaction with the starters HEV 1: 5'-TACTGCTGCTATTTGTTGTG-3' and HEV2: 5'-TCATTA ACTCCAGCAATTGG-3' the final amplification product made of 1647 bp was received. The HEV was detected after 96 hours of inoculation in the duodenum, cecal tonsils, bursa of Fabryci, and in the spleen. 120 h after inoculation, the viral DNA not only was found in the same organs but also in the breast muscle and in the liver. The viral DNA was not detected after 24 and 72 h of the inoculation in the examined organs and after 96 and 120 h of inoculation in the kidneys, pancreas and in the gizzard.

The results of the study show that PCR method enables an earlier detection of HEV in infected turkeys than the AGP test and confirms its usefulness for detecting infections caused by this virus.

Keywords: haemorrhagic enteritis virus, turkeys, PCR

Występowanie chorób zakaźnych w wielkostatnej hodowli drobiu przynosi straty ekonomiczne związane nie tylko z padnięciami ptaków, ale także ze zmniejszonymi przyrostami i gorszymi wskaźnikami wykorzystania paszy. Straty te można ograniczyć podejmując szybkie zwalczanie choroby, które musi być jednak poprzedzone postawieniem właściwej diagnozy. Wśród nowoczesnych technik stosowanych w laboratoriach diagnostycznych dużym uznaniem cieszy się łańcuchowa reakcja polimerazy, charakteryzująca się wysoką czułością i specyficnością. W diagnostyce zakaźnych chorób ptaków jest to metoda, która w różnych modyfikacjach jest stosowana do rozpoznawania i różnicowania wielu patogenów m.in.: wirusa choroby Mareka (15), rzekomego pomoru drobiu i grypy (7), wirusów białaczek ptasich (22) czy też mykoplazm (25). Metoda ta ma szczególne znaczenie w przypadkach, gdy diagnostyka i izolacja patogenu jest długotrwała i pracochłonna. Przykładem takiego patogenu jest szeroko rozpowszechniony w stadach in-

dyków wirus krwotocznego zapalenia jelit (Haemorrhagic enteritis virus – HEV) (13, 14).

Wirus ten należący do rodzaju *Siadenovirus* (dawniej do II podgrupy rodzaju *Aviadenovirus*), w przeciwieństwie do większości adenowirusów ssaków i ptaków, nie namnaża się w zarodkach ptaków ani w powszechnie stosowanych hodowlach komórkowych (2, 19). Replikacja wirusa *in vitro* zachodzi jedynie w oryginalnej, transformowanej nowotworowo wirusem choroby Mareka linii limfoblastów B indyka, znanej jako MDTC-RP 19 (17, 18), a także w hodowli leukocytów krwi obwodowej indyka (9, 10).

Rozpoznanie choroby na podstawie objawów klinicznych nie jest możliwe, a charakterystyczne zmiany anatomopatologiczne występujące w śledzionie (powiększenie i marmurkowatość) wskazują jedynie na możliwość wystąpienia HE.

W rozpoznawaniu HE używany jest powszechnie odczyn precypitacji dyfuzyjnej w żelu agarowym (test AGP) (1, 4) oraz badania histopatologiczne na obec-

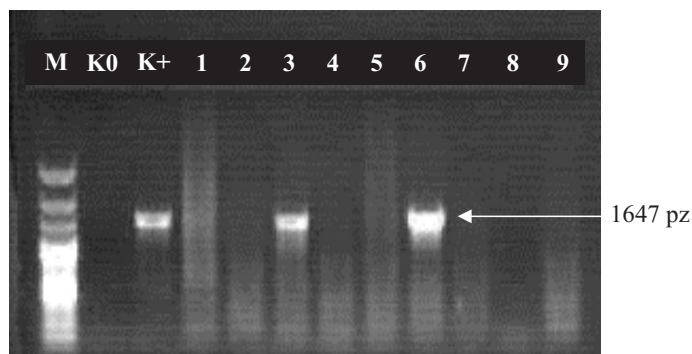
ność ciałek wtętotowych (6, 12, 16, 24), test ELISA (11) i metody immunochemiczne – immunofluorescencji i immunoperoksydazowa (5, 21). Rzadziej natomiast w diagnostyce HE są wykorzystywane metody biologii molekularnej – hybrydyzacja *in situ* (23) i PCR (8, 23), pomimo że znana jest budowa genomu adenowirusów ptaków, które należą do trzech rodzajów (3, 8, 19, 20). Autorzy cytowanych prac do konstrukcji starterów wybrali geny kodujące białka heksonowe wirusa HE, a konserwatywne i zmienne regiony tych genów ustalili na podstawie modelu genu kodującego białka heksonowe ludzkiego adenowirusa 2.

Celem badań było określenie przydatności łańcuchowej reakcji polimerazy do wykrywania i badania rozprzestrzeniania się krajowego izolatu wirusa HE w organizmie indyków po zakażeniu doustnym.

Materiał i metody

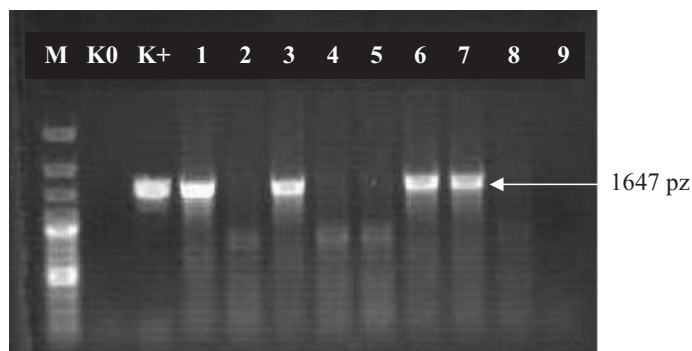
W doświadczeniu użyto 40 jednodniowych piskląt indyckich typu BUT 9 obu płci. Pisklęta od pierwszego dnia życia odchowywano w izolowanych pomieszczeniach dla ptaków Zakładu Chorób Ptaków i karmiono *ad libitum* mieszankami pełnoporcjowymi zgodnie ze standardami wiekowymi. Ptaki w wieku 6 tygodni podzielono na dwie grupy, po 20 osobników każda. Indyki jednej z nich zakażono krajowym izolatem wirusa HE, drugiej – stanowiły niezakażoną kontrolę. Wirus podawano sondą do wola, po 1 ml zawiesiny zawierającej HEV w dawce $10^{4.3}$ EID₅₀ (13). Następnie, odpowiednio, po 24, 48, 72, 96 i 120 h od zakażenia poddawano eutanazji po trzy ptaki z obu grup i podczas sekcji pobierano wycinki śledziony, nerek, dwunastnicy, migdałków jelitowych, torby Fabrycjusza, serca, trzustki, grasicy, mózgu, mięśnia piersiowego, wątroby i żołądka gruczołowego. Próby do czasu badań przechowywano w temperaturze -20°C . Przed przystąpieniem do izolacji wirusowego DNA badane tkanki homogenizowano, a następnie trzykrotnie zamrażano i rozmrażano celem uwolnienia wirusa.

Izolację genomowego DNA przeprowadzono z wykorzystaniem zestawu Genomic Mini (A&A Biotechnology, Poland) zgodnie z protokołem załączonym przez producenta. Do przeprowadzenia reakcji PCR użyto starterów dla zmienionego segmentu genomu o następujących sekwencjach HEV 1: 5'-TACTGCTGCTATTTGTTGTG-3' oraz HEV 2: 5'-TCATTAAGTCCAGCAATTGG-3' (8). Zastosowana reakcja PCR została wcześniej zoptymalizowana i zwalidowana. Mieszanina reakcyjna o objętości 25 μl składała się z: 3 μl wyizolowanego DNA; 2,5 μl Taq buforu z KCl; 2,5 μl mieszaniny dezoksynukleotydów (0,2 mM dNTP); 6 μl MgCl₂ (3 mM); 0,125 μl każdego ze starterów (0,1 μM); 0,2 μl Taq DNA polimerazy (1 U/25 μl) oraz 13,55 μl wody dejonizowanej. Amplifikację DNA prowadzono w termocyklerze Mastercycler egradientS (Eppendorf) według następującego profilu czasowo-temperaturowego: wstępna denaturacja DNA: $94^{\circ}\text{C}/5$ min., 30 cykli; właściwa denaturacja DNA: $94^{\circ}\text{C}/5$ min., przyłączanie starterów: $47^{\circ}\text{C}/1$ min., przyłączanie oligonukleotydów przez polimerazę: $70^{\circ}\text{C}/1,5$ min.; zakończenie reakcji: $70^{\circ}\text{C}/5$ min. Kontrolę dodatnią stanowił standardowy szczep wi-



Ryc. 1. Rozdział elektroforetyczny w 0,5% żelu agarozowym produktów amplifikacji DNA wirusa HE w reakcji PCR po 96 h od zakażenia

Objaśnienia: M – marker; K0 – kontrola zerowa; K+ – kontrola dodatnia (DNA wyizolowany ze szczepu referencyjnego wirusa HE); ścieżka 3 zawiera DNA wirusa HE wyizolowany ze śledziony, ścieżka 6 – z torby Fabrycjusza; ścieżki 1 i 2 (śledziona), 4 i 5 (torba Fabrycjusza), 7 i 8 (nerki) oraz 9 (żołądek gruczołowy) – brak wirusowego DNA



Ryc. 2. Rozdział elektroforetyczny w 0,5% żelu agarozowym produktów amplifikacji DNA wirusa HE w reakcji PCR po 120 h od zakażenia

Objaśnienia: M – marker; K0 – kontrola zerowa; K+ – kontrola dodatnia (DNA wyizolowany ze szczepu referencyjnego wirusa HE); ścieżki 1 i 3 zawierają DNA wirusa HE wyizolowany z dwunastnicy, ścieżki 6 i 7 – z toreb Fabrycjusza; ścieżka 2 (dwunastnica), 4 i 5 (nerki), 8 (torba Fabrycjusza) i 9 (żołądek gruczołowy) – brak wirusowego DNA



Ryc. 3. Rozdział elektroforetyczny w 0,5% żelu agarozowym produktów amplifikacji DNA wirusa HE w reakcji PCR po 24, 48 i 72 h od zakażenia

Objaśnienia: M – marker; K0 – kontrola zerowa; K+ – kontrola dodatnia (DNA wyizolowany ze szczepu referencyjnego wirusa HE); ścieżki 1-7 brak wirusowego DNA w śledzionie, dwunastnicy, torbie Fabrycjusza, wątrobie i sercu

rusa HE z handlowej szczepionki Dindoral SPF (Merial, Francja, seria L232020, dw. 15.06.2009).

Wizualizacji produktu amplifikacji, wielkości 1647 pz, dokonano w 0,5% żelu agarozowym z dodatkiem roztworu bromku etydy w promieniowaniu UV przy użyciu Systemu Gel Doc™ EQ (Bio Rad, Herkules, USA). Do określenia wielkości produktu końcowego otrzymanego w reakcji PCR użyto markera masy molekularnej Gene Ruler 100 kb Ladder Plus (A&A Biotechnology, Poland). Elektroforezę prowadzono przy napięciu 75 V przez 45 minut. Ponadto obecność wirusa HE w śledzionach zakażonych indyków potwierdzano metodą AGP z dodatnią surowicą anty-HE (13).

Wyniki i omówienie

Wirusa HE wykryto po 96 h od zakażenia w torbie Fabrycjusza oraz śledzionie (ryc. 1), a po 120 h w wymienionych narządach oraz w dwunastnicy (ryc. 2), mięśniu piersiowym i wątrobie. Nie stwierdzono obecności wirusowego DNA po 24, 48 i 72 h od zakażenia w żadnym z badanych narządów (ryc. 3), a po 96 i 120 h od zakażenia także w nerce, sercu, trzustce i żółtku gruczołowym (ryc. 1 i 2) oraz po 120 h w grasicy i mózgu. Obecność wirusa HE w śledzionach po 120 h od zakażenia potwierdzono metodą AGP.

Na podstawie uzyskanych wyników można wnioskować, że krajowy izolat wirusa HE po zakażeniu dostnym wykazuje największe powinowactwo do dwunastnicy, torby Fabrycjusza i śledziony. Dane te korespondują z wynikami badań Koncickiego (13). Natomiast Suresh i Sharma (23) wykazali obecność wirusa HE w tych narządach już w czasie od 24 h po zakażeniu, co mogło być spowodowane użyciem do badań wirusa o większej zjadliwości i zastosowaniem bardziej czulej metody hybrydyzacji *in situ*. Z powyższych danych wynika, że różnice w czasie pojawiania się i wykrywania wirusa HE w poszczególnych narządach są zależne od drogi zakażenia, dawki wirusa, patogenności szczepu oraz zastosowanej metody diagnostycznej (1, 8, 13, 23).

Reasumując należy stwierdzić, że metoda PCR pozwala na wcześniejsze wykrywanie HEV w organizmie zakażonych indyków w porównaniu z powszechnie stosowanym testem AGP i może być standardowo wykorzystywana do badań w laboratoriach diagnostycznych.

Piśmiennictwo

- Allan G. M., McNulty M. S., Adair B. M.: A comparison of four methods for the detection of turkey hemorrhagic enteritis virus and antigen in experimentally infected turkeys. *Avian Pathol.* 1987, 16, 107-113.
- Carlson H. C., Al-Sheikly F., Pettit J. R., Seawright G. L.: Virus particles in speans and intestines of turkeys with hemorrhagic enteritis. *Avian Dis.* 1974, 18, 67-73.
- Chiocca S., Kurzbaner R., Schaffner G., Baker A., Mautner V., Cotten M.: The complete DNA sequence and genomic organization of the avian adenovirus CELO. *J. Virol.* 1996, 70, 2939-2949.
- Domermuth C. H., Gross W. B., Dubose R. T.: Microimmunodiffusion test for hemorrhagic enteritis of turkey. *Avian Dis.* 1973, 17, 439-444.
- Fitzgerald S. D., Reed W. M., Burnstein T.: Detection of type II avian adenoviral antigen in tissue sections using immunohistochemical staining. *Avian Dis.* 1992, 36, 341-347.

- Gross W. B., Domermuth C. H.: Spleen lesions of hemorrhagic enteritis in turkeys. *Avian Dis.* 1976, 20, 455-466.
- Guan J., Chan M., Ma B., Grenier C., Wilkie D. C., Pasick J., Brooks B. W., Spencer J. L.: Development of methods for detection and quantification of avian influenza and Newcastle disease viruses in compost by real-time reverse transcription polymerase chain reactions and virus isolation. *Poultry Sci.* 2008, 87, 838-843.
- Hess M., Raue R., Hafez H. M.: PCR for specific detection of hemorrhagic enteritis virus of turkeys, an avian adenovirus. *J. Virol.* 1999, 81, 199-203.
- Hurk J. V. van den.: Propagation of group II avian adenoviruses in turkey and chicken leukocytes. *Avian Dis.* 1990, 34, 12-25.
- Hurk J. V. van den.: Propagation of hemorrhagic enteritis virus in normal cell culture. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1985, 187, 307.
- Hurk J. V. van den.: Quantitation of hemorrhagic enteritis virus antigen and antibody using enzyme-linked immunoadsorbent assays. *Avian Dis.* 1985, 30, 662-671.
- Itakura C., Carlson H. C.: Pathology of spontaneous hemorrhagic enteritis of turkeys. *Can J. Comp. Med.* 1975, 39, 310-315.
- Koncicki A.: Charakterystyka krajowych izolatów adenowirusa krwotocznego zapalenia jelit (HE) indyków i ocena sytuacji epizootycznej w Polsce. *Acta Acad. Agricult. Tech. Olst., Veterinaria* 1996, 22, 1-43.
- Koncicki A.: Pierwsze przypadki adenowirusowego krwotocznego zapalenia jelit indyków w Polsce. *Medycyna Wet.* 1990, 46, 16-17.
- Kozdruń W., Samorek-Salamonowicz E., Czekał H., Król K.: Opracowanie multi PCR do wykrywania szczepów wirusa choroby Mareka. *Medycyna Wet.* 2005, 61, 711-714.
- Meteyr C. U., Mohammed H. O., Chin R. P., Bickford A. A., Trampel D. W., Klein P. N.: Relationship between age of flock seroconversion to hemorrhagic enteritis virus and appearance of adenoviral inclusions in the spleen and renal tubule epithelia of turkeys. *Avian Dis.* 1992, 36, 88-96.
- Nazerian K., Fadly A. M.: Further studies on in vitro and in vivo assays of hemorrhagic enteritis virus (HEV). *Avian Dis.* 1987, 31, 234-240.
- Nazerian K., Fadly A. M.: Propagation of virulent and avirulent turkey hemorrhagic enteritis virus in cell culture. *Avian Dis.* 1982, 26, 816-827.
- Pierson F. W., Fitzgerald S. D.: Hemorrhagic enteritis and related infections, [w:] Saif Y. M. (red.): *Diseases of Poultry*. Iowa State Press, Ames, Iowa 2003, 237-247.
- Pitcovski I., Muallem M., Rei-Koren Z., Krispel S., Shumeli E., Peretz Y., Gutter B., Gallili G. E., Michael A., Goldberg D.: The complete DNA sequence and genome organization of the avian adenovirus, hemorrhagic enteritis virus. *J. Virol.* 1998, 249, 307-315.
- Saunders G. K., Pierson F. W., van den Hurk J. V.: Hemorrhagic enteritis virus infection in turkeys: a comparison of virulent and avirulent virus infection, and a proposed pathogenesis. *Avian Pathol.* 1993, 22, 47-58.
- Silva R. F., Fadly A. M., Taylor S. P.: Development of a polymerase chain reaction to differentiate Avian Leukosis Virus (ALV) subgroups: Detection of an ALV contaminant in commercial Marek's disease vaccines. *Avian Dis.* 2007, 51, 663-667.
- Suresh M., Sharma J. M.: Pathogenesis of type II avian adenovirus infection in turkeys: in vivo immune cell tropism and tissue distribution of the virus. *J. Virol.* 1996, 70, 30-36.
- Trampel D. W., Meteyer C. U., Arthur A., Bickford A. A.: Hemorrhagic enteritis virus inclusions in turkey renal tubular epithelium. *Avian Dis.* 1992, 36, 1086-1091.
- Wang H., Fadl A. A., Khan M. J.: Multiplex PCR for avian pathogenic mycoplasmas. *Mol. Cell. Probe.* 1997, 11, 221-216.

Adres autora: dr Beata Mazur-Lech, ul. Popieluszki 3/33, 10-693 Olsztyn; e-mail: bmg@uwm.edu.pl