

# Przydatność RT-PCR w diagnostyce pryszczycy

GRAŻYNA PAPROCKA

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

Paprocka G.

## Usefulness of RT-PCR in the diagnostics of foot-and-mouth disease

### Summary

Foot-and-mouth disease virus (FMDV) from the family Picornaviridae, genus Aphthovirus, exists in the form of seven different serotypes: O, A, C, Asia 1 and SAT 1-3. Infection with one serotype does not confer immunity against another. Foot-and-mouth disease is one of the greatest threats to animal health in European countries. The rapid and accurate detection of FMDV is of the utmost importance.

The RT-PCR assay was used to detect the presence of FMDV in samples. Positive results of the RT-PCR assay were found in all samples and in the positive control, the negative control reacted negatively. No cytopathic effects in primary bovine thyroid cells were observed in 2 samples that had been thawed several times. The reference strains of FMDV was used to determine the sensitivity of the test. The sensitivity of RT-PCR for detection of FMDV (serotype O, A) was 1 TCID<sub>50</sub> and 10 TCID<sub>50</sub> (serotype C, Asia 1) by gel electrophoresis.

**Keywords:** Foot-and-mouth disease virus (FMDV), diagnostics, RT-PCR

Należący do rodzaju *Aphthovirus* rodziny *Picornaviridae* wirus pryszczycy (foot-and-mouth disease virus, FMDV) egzystuje w siedmiu serotypach: O, A, C, Asia 1, SAT 1-3. Infekcja wywołana przez jeden z wymienionych serotypów nie pozostawia odporności na zakażenie innym serotypem (1, 3). Pryszczycyca jest jednym z największych zagrożeń dla zdrowia zwierząt w krajach europejskich. W okresie 1985-2006 r. wystąpiła 37 razy w 14 krajach. Serotyp O był najczęściej wykrywany w ogniskach, następnie A, C i Asia 1 (6, 9, 10). Testy diagnostyczne stosowane obecnie umożliwiają izolację wirusa, wykrywanie antygenów bądź wirusowego kwasu nukleinowego. Zaakceptowaną przez OIE metodą identyfikacji kwasu nukleinowego FMDV jest reakcja polimeryzacji łańcuchowej z odwrotną transkrypcją (reverse-transcription polimerase chain reaction, RT-PCR) (3, 4).

Celem badań było zastosowanie RT-PCR do wykrywania wirusa pryszczycy oraz ocena czułości metody.

### Materiał i metody

**Próbki.** Badany materiał biologiczny pochodził z kolekcji własnej (próbki nr 1-6, zawiesina hodowli komórkowej) oraz z World Reference Laboratory w Pirbright (próbki nr 7-10, nabłonek od zwierząt chorych).

**Ekstrakcja wirusowego RNA.** Całkowite RNA izolowano stosując zestaw RNeasy Mini Kit, firmy Qiagen.

**RT-PCR.** Reakcje polimeryzacji łańcuchowej z odwrotną transkrypcją przeprowadzono przy użyciu zestawu One-Step RT-PCR firmy Qiagen. Starterami była para oligonukleotydów o sekwencji P1-5' CCTACCTCCTTCAAC-

TACGG3', P2-5' GAAGGGCCCAGGGTTGGACTC3', które amplifikowały fragment długości 216 pz (2). Amplifikacja przebiegała następująco: 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. Reakcje wykonywano w termocyklerze Personal Mastercycler (Eppendorf).

Kontrolę dodatnią stanowił laboratoryjny szczep FMDV serotyp O namnożony w hodowli komórek linii ciągłej BHK-21, kontrolę ujemną – wirus choroby pęcherzykowej świń (SVDV) namnożony w hodowli komórek linii ciągłej IB-RS-2.

**Analiza uzyskanych produktów PCR.** Produkty amplifikacji rozdzielano elektroforetycznie w 1,5% żelu agarozowym w obecności buforu TBE, przy stałym napięciu prądu 70 V. Po elektroforezie żele wybarwiano bromkiem etydyny. Obecność produktów PCR określano na podstawie porównania ich lokalizacji względem markera masowego (100 bp, Promega). Wynik uznawano za dodatni, jeżeli w żelu widoczny był prążek DNA o oczekiwanej dla pary starterów wielkości. Dokumentację fotograficzną sporządzano przy pomocy automatycznego systemu archiwizacji – Imager 5000 z oprogramowaniem GelBase/GelBlot Proc.

**Ocena czułości RT-PCR.** Do określenia czułości metody użyto szczepów referencyjnych FMDV serotyp O, A, C, Asia 1 o mianach infekcyjnych, odpowiednio, 10<sup>5.5</sup>, 10<sup>5.4</sup>, 10<sup>5.2</sup>, 10<sup>5.0</sup> TCID<sub>50/50 μl</sub> określonych w hodowli pierwotnej komórek tarczycy bydłej. Po przygotowaniu rozcieńczeń wirusów od 10<sup>-1</sup> do 10<sup>-6</sup> (10 000 – 0,1 TCID<sub>50</sub>) izolowano RNA i amplifikowano metodą RT-PCR. Następnie określano najwyższe rozcieńczenie, przy którym występowała reakcja dodatnia.

**Test izolacja/ELISA.** Badania wykonywano zgodnie z OIE Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals (3).

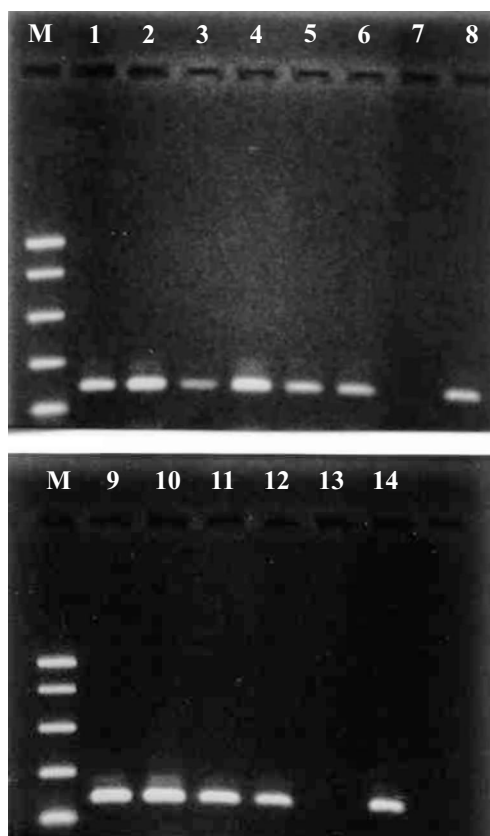
### Wyniki i omówienie

Przebadano 10 próbek na obecność wirusa pryszczycy metodą RT-PCR. Wyniki przedstawiono w tab. 1 i na ryc. 1. Materiał genetyczny wirusa wykazano we wszystkich badanych próbkach. Reakcja PCR z zastosowanymi starterami dawała produkty o długości 216 pz. Użyte startery nie wykazały komplementarności

**Tab. 1.** Wykrywanie wirusa pryszczycy w materiale biologicznym

Nr próbki	Oznaczenie próbki	RT-PCR	Izolacja/ELISA
1	FMD/12	+	serotyp A
2	FMD/35	+	serotyp C
3	FMD/66	+	–
4	FMD/74	+	serotyp O
5	FMD/75	+	–
6	FMD/97	+	serotyp O
7	FMD/07/1	+	serotyp Asia 1
8	FMD/07/2	+	serotyp O
9	FMD/07/3	+	serotyp A
10	FMD/08	+	serotyp A

Objaśnienia: + wynik dodatni, – wynik ujemny

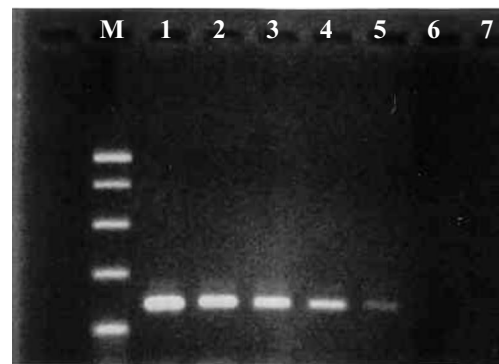


**Ryc. 1.** Elektroforetyczny rozdziel produktów amplifikacji  
Ścieżki: M – marker; 1-6, 9-12 odpowiadają kolejnym próbkom; 7, 13 – kontrola ujemna; 8, 14 – kontrola dodatnia

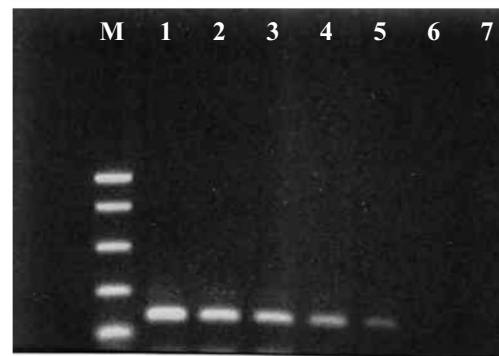
ci w stosunku do cDNA wirusa choroby pęcherzykowej świń (SVDV), również przedstawiciela rodziny *Picornaviridae*. W próbce kontrolnej, którą był SVDV namnożony w hodowli komórek linii ciągłej IB-RS-2 produktów amplifikacji nie wykazano.

Czułość metody oceniono w odniesieniu do referencyjnych szczepów FMDV serotyp O, A, C, Asia 1. Obecność amplifikowanych fragmentów stwierdzono w rozcieńczeniach od  $10^{-1}$  do  $10^{-5}$  w przypadku serotypów O i A oraz w rozcieńczeniach od  $10^{-1}$  do  $10^{-4}$

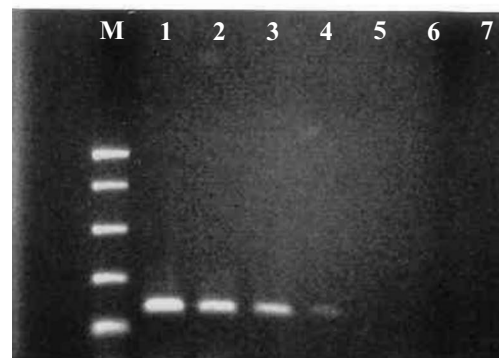
serotyp O



serotyp A



serotyp C



serotyp Asia 1



**Ryc. 2.** Czułość RT-PCR

Ścieżki: M – marker; 1-6 rozcieńczenia serotypów FMDV ( $10^6$  –  $0,1$  TCID<sub>50</sub>); 7 – kontrola mieszaniny reagentów

dla C i Asia 1 (ryc. 2). Użycie opisanych powyżej starterów oraz metody detekcji amplikonów w żelu agarozowym pozwoliło uzyskać czułość rzędu 1 TCID<sub>50</sub> dla serotypów O i A oraz 10 TCID<sub>50</sub> dla C i Asia 1. Opublikowane dane na ten temat są zróżnicowane ze względu na stosowanie odmiennych procedur wykonywania reakcji RT-PCR, różnych starterów, jak również metod detekcji amplikonów (5). Meyer i wsp. (7) uzyskali czułość testu na poziomie 10<sup>3</sup> TCID<sub>50</sub> dla serotypu C, stosując do detekcji produktów PCR rozdział elektroforetyczny w żelu agarozowym. Wyższą czułość, 10 TCID<sub>50</sub> osiągnięto dzięki nested PCR, natomiast najwyższą, rzędu 0,1 TCID<sub>50</sub>, przy użyciu hybrydyzacji do wykrywania produktów PCR. Amaral-Doel i wsp. (2) otrzymali czułość reakcji na poziomie 10<sup>-2,3</sup> TCID<sub>50</sub> w odniesieniu do serotypu O. Inni autorzy (8) wykazali, że serotypy O, A, C wykrywane w hodowli komórek w rozcieńczeniu 10<sup>-7,0</sup> można było wykryć metodą RT-PCR w rozcieńczeniu 10<sup>-5,0</sup> (serotyp O, A) i 10<sup>-1,0</sup> (serotyp C).

W dalszych badaniach stosowano do wykrywania wirusa pryszczycy test izolacji. Wyniki przedstawiono w tab. 1. W dwóch próbkach nr 3 i nr 5, zawierających materiał genetyczny FMDV, nie udało się wykazać obecności infekcyjnych wirionów w hodowli pierwotnej komórek tarczycy bydłej. Nie stwierdzono występowania efektu cytopatycznego (CPE) w trzech kolejnych pasażach. Pozostałe próbki reagowały dodatnio. Specyficzność CPE potwierdzono testem ELISA z równoczesnym określeniem serotypu. W badanych próbkach wykazano obecność serotypu O (próbki nr 4, 6, 8), A (próbki nr 1, 9, 10), C (próbka nr 2), Asia 1 (próbka nr 7). Można więc stwierdzić, że zastosowana metoda RT-PCR jest przydatna do wykrywania wirusa pryszczycy niezależnie od serotypu. Porównując łańcuchową reakcję polimerazową i test izolacja/ELISA trzeba zwrócić uwagę, że wynik ujem-

ny w tym teście uzyskano dla próbek pochodzących z kolekcji własnej, przechowywanych przez kilka lat w zamrożeniu. Należy więc sądzić, że wyższa skuteczność RT-PCR niż testu izolacja/ELISA wynikała z możliwości amplifikacji fragmentu RNA nieaktywnych biologicznie wirionów.

## Piśmiennictwo

- Alexandersen S., Zhang Z., Donaldson A. I., Garland A. J. M.: The pathogenesis and diagnosis of foot-and-mouth disease. *J. Comp. Pathol.* 2003, 129, 1-36.
- 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.
- Anon.: OIE Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals (mammals, birds and bees). Fifth Edition 2004, 111-128.
- 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.
- 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.
- Knowles N. J., Samuel A. R., Davies P. R., Midgley R. J., Valarcher J. F.: Evolution and spread of a pandemic strain of foot-and-mouth disease virus serotype O. *Emerg. Infect. Dis.* 2005, 11, 1887-1893.
- Meyer R. F., Brown C. C., House C., House J. A., Molitor T. W.: Rapid and sensitive detection of foot-and-mouth disease virus in tissues by enzymatic RNA amplification of the polymerase gene. *J. Virol. Methods* 1991, 34, 161-172.
- 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.
- Rweyemamu M., Roeder P., MacKay D., Sumption K., Saraiva V., Brownlie J., Leforban Y., Valarcher J. F., Wint W.: Epidemiological patterns of FMD worldwide. *Emerg. Transboundary Dis.* 2008, 65, 57-72.
- 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