

Wykrywanie wirusa choroby pęcherzykowej świń w materiale biologicznym

GRAŻYNA PAPROCKA

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

Paprocka G.

Detection of swine vesicular disease virus (SVDV) in biological material

Summary

Swine vesicular disease virus (SVDV) is a member of the genus Enterovirus in the family Picornaviridae. This virus appears to have evolved from human coxsackievirus B5. Pigs infected with this virus show almost identical clinical signs to foot-and-mouth disease in pigs. Vesicular diseases must be differentiated with laboratory tests.

The purpose of the study was to apply the isolation test in cell culture and RT-PCR assay for the detection of swine vesicular disease virus in the epithelial and fecal samples. Out of a total of 11 examined samples, 10 were found positive using these methods. The antigen ELISA was used for the confirmation of specificity of isolation assay. Primary piglet kidney cells and certain IB-RS-2 cells were a sensitive cell culture system for the detection of swine vesicular disease virus, whereas secondary lamb kidney cells not.

Keywords: swine vesicular disease, isolation test, RT-PCR

Choroba pęcherzykowa świń (swine vesicular disease – SVD) została rozpoznana po raz pierwszy we Włoszech w 1966 r., w Polsce jej ogniska stwierdzono w latach 70. W okresie od 2002 r. do 2008 r. notowano ogniska we Włoszech oraz w latach 2003-2004 i 2007 r. w Portugalii. Polityka wolnego rynku powoduje, że utrzymuje się zagrożenie wybuchem choroby na obszarze Europy. Chorobę pęcherzykową świń wywołuje wirus (swine vesicular disease virus – SVDV) z rodziny *Picornaviridae*, rodzaj *Enterovirus*, spokrewniony antygenowo z wirusem ludzkim Coxsackie B5 (3, 4, 10). Materiałem genetycznym SVDV jest pojedyncza nić RNA o dodatniej polarności (2, 5, 6).

Choroby pęcherzowe, do których należy SVD, są klinicznie nie do odróżnienia, prawidłowe ich rozpoznanie umożliwia badania laboratoryjne. W Europie zasadnicze znaczenie ma diagnostyka różnicowa pryszczycy i choroby pęcherzykowej świń. W przypadku stwierdzenia u świń pęcherzy, pobrane od zwierząt próbki badane są w kierunku obu chorób równocześnie (9). Metody wykrywania wirusa pryszczycy zalecane przez OIE opisano wcześniej (7).

Celem niniejszej pracy było zastosowanie testu izolacji i RT-PCR do wykrywania obecności wirusa choroby pęcherzykowej świń w materiale biologicznym.

Materiał i metody

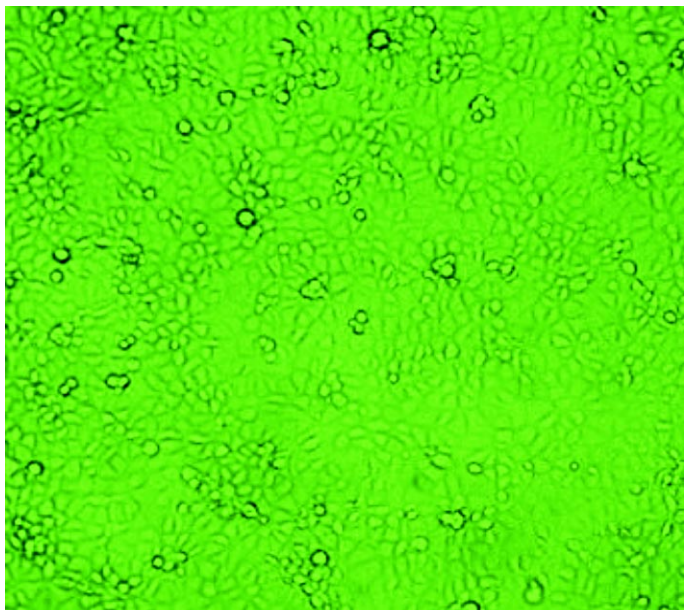
Materiałem do badań były próbki w postaci nabłonka (nr 1-8) oraz kału (nr 9-11), otrzymane z World Reference Laboratory w Pirbright.

Do detekcji wirusa choroby pęcherzykowej świń użyto hodowli komórek linii ciągłej IB-RS-2, hodowli wtórnej komórek nerki jagnięcia, które zakładano w sposób przedstawiony w innej pracy (7), oraz hodowli pierwotnej komórek nerki prosięcia.

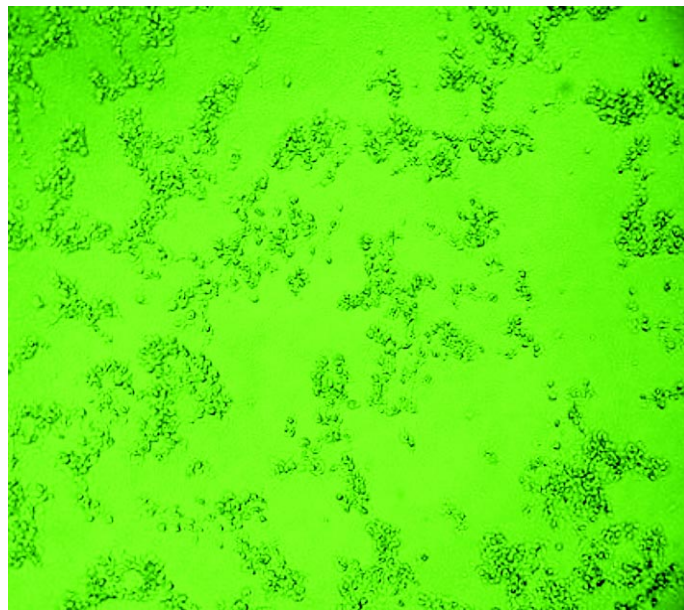
Przygotowanie hodowli pierwotnej komórek nerki prosięcia. Rozdrobnioną tkankę trawiono enzymatycznie 0,25% roztworem trypsyny w 37°C na mieszadle magnetycznym. Postępowano podobnie jak przy zakładaniu hodowli pierwotnej komórek nerki jagnięcia (8). Po zakończonym trypsynowaniu uzyskaną zawiesinę rozcieńczano do ilości około $3,5 \times 10^5$ komórek/ml pożywką hodowlaną G-MEM wzbogaconą 15% surowicą bydlęcą (FBS) oraz dodatkiem antybiotyków (100 i.u./ml penicyliny, 0,1 mg/ml streptomycyny, 0,25 µg/ml amfoterycyny) i wysiewano do 24-dołkowych płytek hodowlanych. W zależności od tempa proliferacji i metabolizmu komórek pożywkę zmieniano lub wymieniano tylko jej część (conditioned medium). Komórki przyczepiały się do podłoża w ciągu 1-2 dni, tworząc kolonie. Po 3-4 dniach wzrostu tworzyły jednowarstwową konfluentną hodowlę.

Izolacja wirusa. Badania wykonywano według metody podanej wcześniej, zgodnie z OIE Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals (1, 7). Hodowle, w których wystąpił efekt cytopatyczny (CPE), badano testem ELISA na obecność antygeny wirusa choroby pęcherzykowej świń. Wynik uznawano za negatywny, jeżeli w trzech kolejnych pasażach nie stwierdzono CPE.

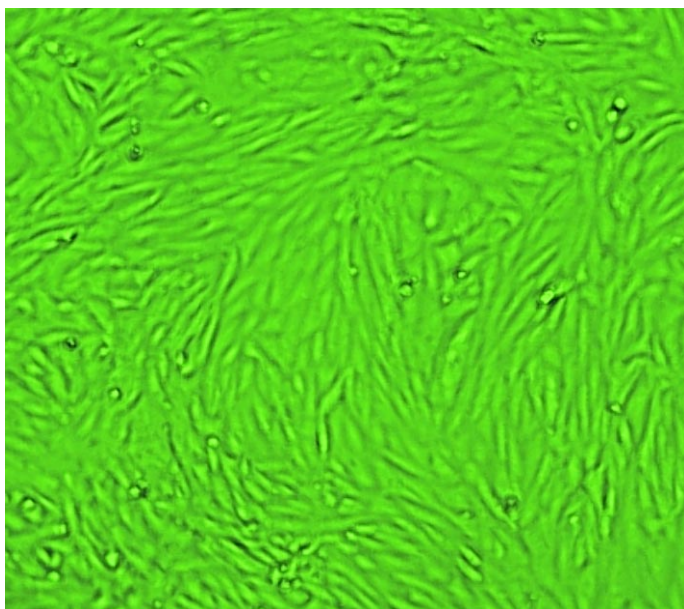
Ekstrakcja wirusowego RNA. Całkowite RNA izolowano przy użyciu zestawu RNeasy Mini Kit, firmy Qiagen.



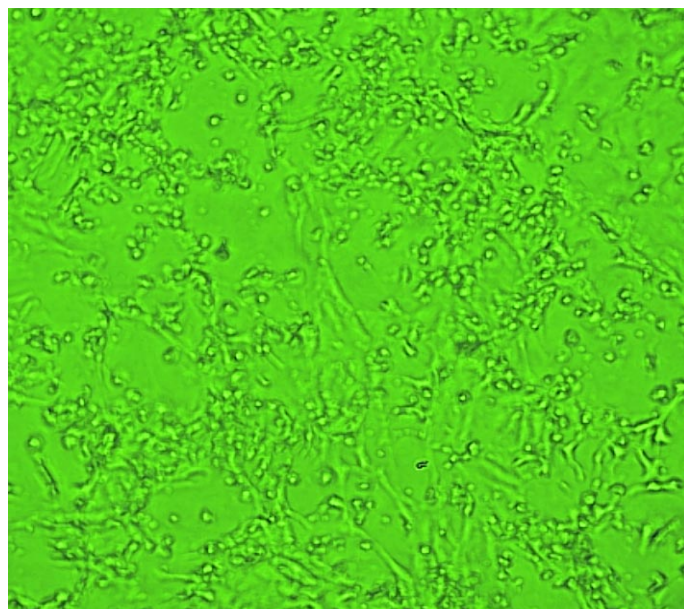
Ryc. 1. Hodowla komórek linii ciągłej IB-RS-2 (kontrola)



Ryc. 2. Hodowla komórek linii ciągłej IB-RS-2 zakażona wirusem choroby pęcherzykowej świń (próbka nr 6)



Ryc. 3. Hodowla pierwotna komórek nerki prosięcia (kontrola)



Ryc. 4. Hodowla pierwotna komórek nerki prosięcia zakażona wirusem choroby pęcherzykowej świń (próbka nr 6)

Oligonukleotydy. Jako starterów użyto dwóch oligonukleotydów dla regionu 3D opisanych przez Nunez i wsp. (6). Ich sekwencje i lokalizacja w genomie były następujące: SA2 1098 – 5' TCACGTTTGTCCAGGTTACC 1117, SS4 964-5' TTCAGAATGATTGCATATGGGG 985. Region amplifikowany obejmował 154 pary zasad (pz).

Odwrotna transkrypcja i amplifikacja. Do reakcji wykorzystano zestaw OneStep RT-PCR, firmy Qiagen. Po wykonaniu odwrotnej transkrypcji – 30 min., 50°C i denaturacji wstępnej – 15 min., 94°C, przeprowadzono 40 cykli amplifikacji: denaturacja – 1 min., 94°C, przyłączanie starterów – 1 min., 50°C, elongacja – 2 min., 72°C i końcowa synteza – 10 min. 72°C. Używano termocyklera Personal Mastercycler (Eppendorf). Kontrolę dodatnią stanowił szczep referencyjny wirusa choroby pęcherzykowej świń (SVDV p. 4/05), ujemną – wirus pryszczycy (FMDV p. 5/07 serotyp O), które namnożono w hodowli komórek linii ciągłej IB-RS-2.

Elektroforeza. Po amplifikacji mieszaninę reakcyjną наносono na 1,5% żel agarozowy i poddawano elektroforezie w buforze TBE przy napięciu prądu 70 V przez 1 godz. Następnie żel wybarwiano bromkiem etydy. Wielkość 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 wielkości 154 pz. Dokumentację fotograficzną sporządzano przy pomocy automatycznego systemu archiwizacji – Imagistore 5000 z oprogramowaniem GelBase/GelBlot Proc.

Wyniki i omówienie

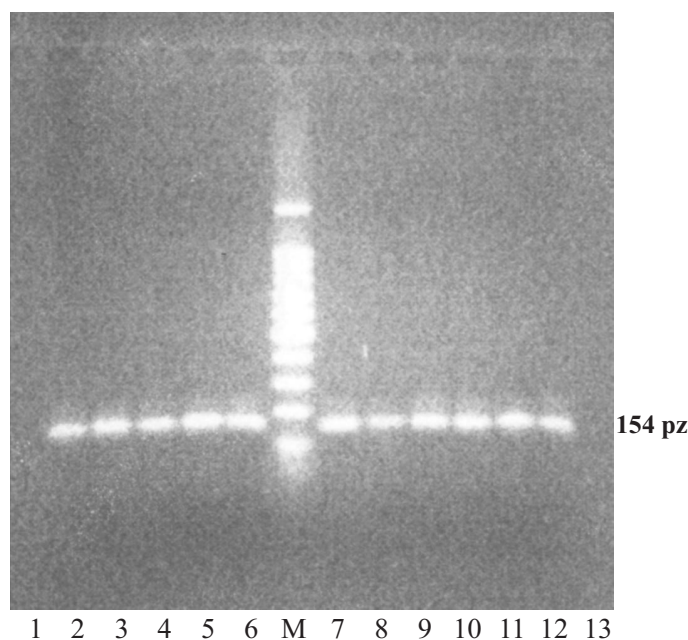
Badanymi próbkami inokulowano jednowarstwową hodowlę komórek linii ciągłej IB-RS-2, hodowlę pierwotną komórek nerki prosięcia oraz hodowlę wtórną

Tab. 1. Wykrywanie wirusa choroby pęcherzykowej świń w materiale biologicznym

Nr próbki	Oznaczenie próbki	Hodowla komórek linii ciągłej IB-RS-2	Hodowla pierwotna komórek nerki prosięcia	Test ELISA	Hodowla wtórna komórek nerki jagnięcia	RT-PCR
1	SVD/495/08	-	-	nb	-	-
2	SVD/597/08	+/I p	+/I p	SVDV	-	+
3	SVD/C/07	+/II p	+/II p	SVDV	-	+
4	SVD/D/07	+/II p	+/I p	SVDV	-	+
5	SVD/E/07	+/II p	+/II p	SVDV	-	+
6	SVD/A/06	+/I p	+/I p	SVDV	-	+
7	SVD/C/06	+/II p	+/II p	SVDV	-	+
8	SVD/E/06	+/II p	+/II p	SVDV	-	+
9	SVD/A1/07	+/II p	+/II p	SVDV	-	+
10	SVD/C1/06	+/I p	+/I p	SVDV	-	+
11	SVD/E1/06	+/I p	+/I p	SVDV	-	+

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

komórek nerki jagnięcia. Wyniki izolacji przeprowadzonej w wymienionych systemach hodowli komórkowej przedstawiono w tab. 1 oraz na ryc. 1-4. Obecność infekcyjnego wirusa stwierdzono w 10 próbkach na 11 badanych, zarówno w hodowli komórek linii ciągłej IB-RS-2, jak i w hodowli pierwotnej komórek nerki prosięcia, jedynie próbka nr 1 reagowała negatywnie. W hodowli komórek linii ciągłej IB-RS-2 trzy próbki, nr 6, 10, 11 powodowały efekt cytotatyczny w pierwszym pasażu, pozostałe siedem, nr 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9 w pasażu drugim. Wyniki te nieznacznie różnią się od uzyskanych w hodowli pierwotnej komórek nerki prosięcia, w której w pierwszym pasażu pięć



Ryc. 5. Produkty reakcji RT-PCR. Ścieżki: 1-11 odpowiadają kolejnym próbkom nr 1-11, M – marker, 12 – kontrola dodatnia, 13 – kontrola ujemna

próbek, nr 2, 4, 6, 10, 11 reagowało pozytywnie. Identyfikacji wirusa wywołującego efekt cytotatyczny dokonano testem ELISA.

Generalnie przyjmuje się, że wirus choroby pęcherzykowej świń namnaża się w hodowlach komórek pochodzących od świń, ale istnieje doniesienie, że może być również wyizolowany w hodowli wtórnej komórek nerki jagnięcia (1). W badaniach własnych nie udało się wykryć infekcyjnego wirusa w hodowli wtórnej komórek nerki jagnięcia w żadnej z próbek podczas trzech kolejnych pasażi.

Równolegle poddano próbki badaniom na obecność materiału genetycznego wirusa choroby pęcherzykowej świń. Uzyskane wyniki ilustruje tab. 1, ryc. 5. We wszystkich próbkach, które były dodatnie, w teście izolacji wykazano również SVDV metodą RT-PCR. Otrzymano oczekiwany produkt wielkości 154 pz.

Zastosowana para starterów umożliwiła wykrywanie RNA wirusa choroby pęcherzykowej świń. Nie obserwowano specyficznego amplikonu w przypadku próbki nr 1 oraz w kontroli ujemnej, którą był materiał genetyczny wirusa pryszczycy.

Uzyskane wyniki testów izolacji i RT-PCR były zgodne i świadczyły o obecności w próbkach dodatnich infekcyjnego wirusa choroby pęcherzykowej świń. Można więc stwierdzić, że zastosowane testy były jednakowo skuteczne w wykrywaniu zakaźnych wirionów w badanym materiale biologicznym.

Piśmiennictwo

1. Anon.: OIE Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals (mammals, birds and bees), Sixth Edition 2008, 1139-1145.
2. Escribano-Romero E., Jimenez-Clavero M. A., Ley V.: Swine vesicular disease virus. Pathology of the disease and molecular characteristics of the virion. Anim. Health. Res. Rev. 2000, 1, 119-126.
3. Jimenez-Clavero M. A., Escribano-Romero E., Ley V., Spiller O. B.: More recent swine vesicular disease virus isolates retain binding to coxsackie-adenovirus receptor, but have lost the ability to bind human decay-accelerating factor (CD55). J. Gen. Virol. 2005, 86, 1369-1377.
4. Knowles N. J., Wadsworth J., Reid S. M., Swabey K. G., El-kholly A. A., Abd El-Rahman A. O., Soliman H. M., Ebert K., Ferris N. P., Hutchings G. H., Statham R. J., King D. P., Paton D. J.: Reappearance of swine vesicular disease virus in Portugal. Emerg. Infect. Dis. 2007, 13, 1593-1596.
5. Lin F., Mackay D. K. J., Knowles N. J.: Detection of swine vesicular disease virus RNA by reverse transcription-polymerase chain reaction. J. Virol. Methods 1997, 65, 111-121.
6. Nunez J. I., Blanco E., Hernandez T., Gomex-Tejedor C., Martin M. I., Dopazo J., Sobrino F.: A RT-PCR assay for the differential diagnosis of vesicular viral diseases of swine. J. Virol. Methods 1998, 72, 227-235.
7. Paprocka G.: Izolacja i identyfikacja wirusa pryszczycy. Medycyna Wet. 2008, 64, 1404-1406.
8. Paprocka G.: Zastosowanie hodowli pierwotnej komórek nerki jagnięcia w diagnostyce pryszczycy. Medycyna Wet. 2008, 64, 332-334.
9. Reid S. M., Ferris N. P., Hutchings G. H., Zhang Z., Belsham G. J., Alexander S.: Sensitivity of primary cells immortalised by oncogene transfection for the detection and isolation of foot-and-mouth disease and swine vesicular disease viruses. J. Virol. Methods 2002, 105, 67-80.
10. Verduguer N., Jimenez-Clavero M. A., Fita I., Ley V.: Structure of swine vesicular disease virus: mapping of changes occurring during adaptation of human coxsackie B5 virus to infect swine. J. Virol. 2003, 77, 9780-9789.

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