

# Zastosowanie metody amplifikacji w warunkach stałej temperatury (LAMP) do wykrywania wirusa zapalenia jelit kaczek

GRZEGORZ WOŹNIAKOWSKI

Zakład Chorób Wirusowych Drobiu, Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy w Puławach,  
Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Otrzymano 28.06.2013

Zaakceptowano 28.10.2013

Woźniakowski G.

## Application of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for the detection of duck enteritis virus

### Summary

Duck plague (DP) caused by duck enteritis virus (DEV) is an acute infection of waterfowl. Apart from geese and ducks free-ranging swans are susceptible to infection.

The exact epidemiological situation in relation to DEV infection in Eastern Europe is unknown. Therefore it was reasonable to conduct a study on DEV occurrence using the modern but simple loop-mediated isothermal amplification (LAMP). The use of LAMP facilitated DEV DNA detection in a time below 30 min. The method was also specific solely for DEV, while its detection limit was 1 pg of DNA. The aim of this study was the optimization of LAMP for detection of DEV infections among free-ranging water birds.

The presence of DEV DNA was identified in 96 birds (72.7%), predominantly in wild ducks (*Anas platyrhynchos*) and mute swans (*Cygnus olor*). The results were recorded in visible light as a green color of reaction mixtures and their fluorescence under ultraviolet light. The presented study indicates the usefulness of the developed LAMP technique for DEV detection and the high percentage of free-ranging water birds infected with this virus. The study will be continued in the future for the determination of DEV occurrence in domestic geese and ducks.

**Keywords:** duck enteritis virus, detection, loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

Wirus zapalenia jelit kaczek (DEV) jest czynnikiem etiologicznym pomoru kaczek (duck plague – DP), który jest jedną z najpoważniejszych chorób drobiu wodnego (4). Zakażenie może szerzyć się pomiędzy ptakami hodowanymi oraz wolno żyjącymi. Potencjalnie na zakażenie wrażliwych jest 48 gatunków ptaków związanych ze środowiskiem wodnym (6). Pomór kaczek jest przyczyną poważnych strat ekonomicznych. Śmiertelność podczas przebiegu choroby może dochodzić do 100% (4, 6).

Po raz pierwszy DP stwierdzono w 1923 r. w Holandii, w stadzie hodowlanym kaczek, a następnie chorobę notowano w Chinach, USA i innych krajach (3). U ptaków starszych kliniczna postać choroby nie jest obserwowana, lecz ptaki są siewcami wirusa (12). Jest to związane z charakterystyczną dla herpeswirusów fazą latencji.

Wirus zapalenia jelit kaczek należy do rodzaju *Varicellovirus*, rodziny *Herpesviridae*. Jego genom kodowany jest przez dwuniciową cząsteczkę DNA o długości około 160 kbp, która podzielona jest na region unikalny długi (UL) i unikalny krótki (US), ograniczony przez powtórzone i odwrócone sekwencje ( $IR_S$  i  $TR_S$ ). Układ poszczególnych regionów genomu DEV można zapisać jako: UL- $IR_S$ -US- $TR_S$ .

Klasyczne metody diagnostyki wirusologicznej, takie jak: izolacja wirusa w hodowlach fibroblastów zarodków kurzych SPF (CEF) lub w zarodkach kaczek (DEF), mikroskopia fluorescencyjna czy testy immunoenzymatyczne ELISA nie pozwalają na szybką i skuteczną diagnostykę zakażeń latentnych (5). Metody oparte na łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) (2, 8, 9) pozwalają na wykrywanie obecności materiału genetycznego DEV, a także na określanie liczby jego kopii w narządach wewnętrznych, co może znaleźć zastosowanie w badaniu poszczególnych faz zakażenia tym wirusem. Przełomem w diagnostyce zakażeń wirusowych okazała się metoda amplifikacji w warunkach stałej temperatury (LAMP), która dzięki prostocie wykonania i braku konieczności użycia specjalistycznej aparatury laboratoryjnej może być stosowana także przez niewielkie laboratoria (3). Specyficzność metody LAMP wykorzystującej polimerazy Bsm lub Bst pozwala na powielanie wybranego fragmentu genomu wirusa w czasie poniżej 30 min. Ponadto metoda ta charakteryzuje się bardzo wysoką czułością pozwalającą na wykrycie kilku kopii wirusowego DNA.

Zastosowanie metody LAMP do badań nad występowaniem DEV u wolno żyjących ptaków wodnych

wyduje się dogodnym rozwiązaniem. Bezpośredni odczyt wyników przeprowadza się nieuzbrojonym okiem w świetle dziennym lub po podświetleniu lampą UV. W próbkach zawierających powielony DNA wirusa po dodaniu barwnika SYBR Green® obserwowana jest zielona barwa mieszaniny, próbki ujemne zachowują barwę pomarańczową. W świetle UV próbki dodatnie wykazują silną zielonkawą fluorescencję, natomiast w próbkach ujemnych fluorescencja nie występuje.

Celem badań była optymalizacja metody LAMP do wykrywania zakażeń DEV u wodnych ptaków wolno żyjących do oceny aktualnej sytuacji epidemiologicznej w kraju.

### Material i metody

**Szczep standardowy.** Do badań użyto szczepu 1227 DEV izolowanego od dzikiej kaczki krzyżówki. Szczep ten izolowano w hodowlach fibroblastów zarodków kaczych (DEF) i tworzył on charakterystyczny efekt cytopatyczny (CPE) w postaci skupisk drobnych, okrągłych komórek załamujących promienie świetlne.

**Standardowy DNA.** Ponadto w celu oceny specyficzności metody LAMP użyto DNA szczepu 14/07 wirusa choroby Derzsy'ego (DDV), DNA szczepu 2003 wirusa krwotocznego zapalenia jelit gąsiąt (GHPV) oraz DNA szczepu P\_1\_03 cirkowirusa gęsiego (GCV).

**Próbki do badań.** Materiał do badań stanowiły wycinki wątroby pobrane od 132 wolno żyjących kaczek krzyżówek (*Anas platyrhynchos*), łabędzi niemych (*Cygnus olor*) oraz dzikich gęsi (*Anser anser*) w latach 2006-2013. Z pobranego materiału sporządzano homogenaty w zbuforowanym roztworze soli fosforanowych. DNA izolowano przy użyciu zestawu komercyjnego QIAamp Mini Kit według zalecanej przez producenta procedury (Qiagen, Hilden, Niemcy). Wyizolowany materiał genetyczny wirusów przechowywano w temperaturze  $-70^{\circ}\text{C}$ .

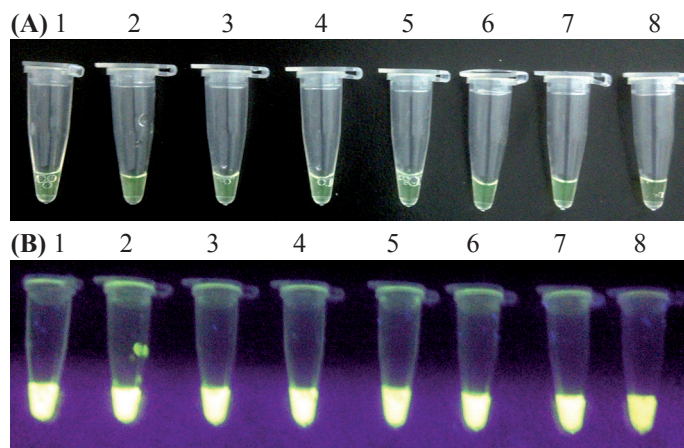
Kontrolę dodatnią stanowił DNA szczepu 1227, natomiast kontrolę ujemną DNA izolowany z komórek niezakażonych hodowli fibroblastów zarodków kurzych (CEF).

**LAMP.** Do wykrywania obecności materiału genetycznego DEV zaprojektowano 3 pary specyficznych starterów oligonukleotydowych komplementarnych do sekwencji U<sub>L</sub>30 DEV kodującej polimerazę DNA (GenBank EF643560). Reakcję przeprowadzono w łaźni wodnej o temperaturze  $60^{\circ}\text{C}$ . Objętość mieszaniny reakcyjnej wynosiła 15  $\mu\text{L}$  i zawierała 7,5  $\mu\text{L}$  buforu Isothermal Mastermix (OptiGene, United Kingdom), 4 mM (1  $\mu\text{L}$ ) starterów wewnętrznych FIP i BIP, 0,1 mM (0,25  $\mu\text{L}$ ) starterów zewnętrznych F3 i B3, 0,2 mM starterów tworzących „pętlę DNA” (LF i LR), wodę demineralizowaną o skali czystości oraz 2  $\mu\text{L}$  wyizolowanego DNA. Optymalizacji poddano temperaturę reakcji w zakresie od  $58,3^{\circ}\text{C}$  do  $64,6^{\circ}\text{C}$ . Określano optymalny czas reakcji w zakresie 15-90 min. Po zakończeniu reakcji do każdej próbki z mieszaniną reakcyjną dodawano 0,5  $\mu\text{L}$  barwnika SYBR Green®.

Za wynik dodatni uznawano zieloną barwę mieszanin reakcyjnych widoczną w świetle widzialnym lub silną zieloną fluorescencję pod wpływem światła lampy UV.

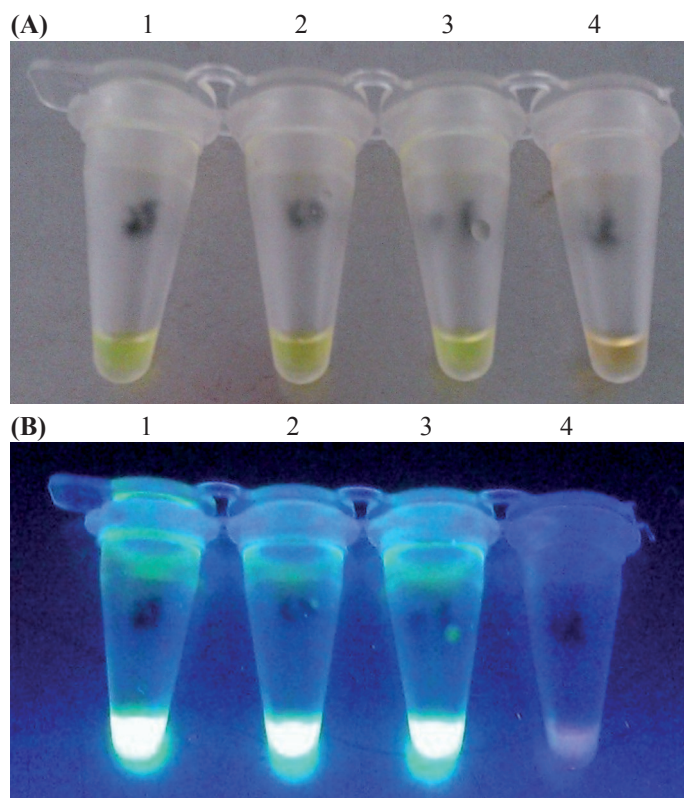
### Wyniki i omówienie

Opracowano i zoptymalizowano metodę LAMP do wykrywania zakażeń wirusem zapalenia jelit kaczek (DEV). Badania przeprowadzono z użyciem standar-

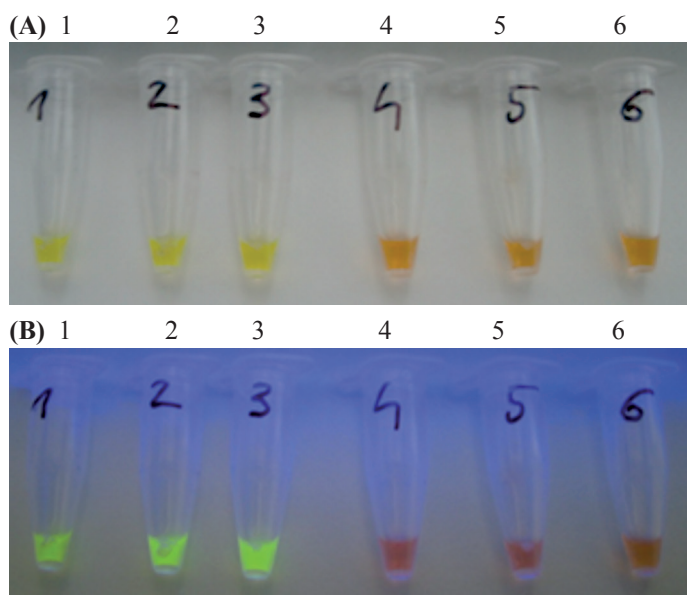


**Ryc. 1. LAMP DEV. Ustalenie optymalnej temperatury reakcji**  
Objaśnienia: 1 –  $58,3^{\circ}\text{C}$ ; 2 –  $59,6^{\circ}\text{C}$ ; 3 –  $60,0^{\circ}\text{C}$ ; 4 –  $61,2^{\circ}\text{C}$ ; 5 –  $62,1^{\circ}\text{C}$ ; 6 –  $62,8^{\circ}\text{C}$ ; 7 –  $63,5^{\circ}\text{C}$ ; 8 –  $64,6^{\circ}\text{C}$ . (A) widok w świetle widzialnym (B) widok w świetle UV

dowego szczepu DEV 1127. Określono sekwencje i stężenia starterów oraz temperaturę i czas reakcji. Zaprojektowano również dodatkową parę starterów tworzących pętlę DNA, co pozwoliło na 2-krotnie szybszą analizę. Zaprojektowane startery posiadały sekwencje komplementarne do regionu genu U<sub>L</sub>30 kodującego polimerazę DNA, dzięki czemu zwiększono specyficzność metody. Na podstawie przeprowadzonej optymalizacji metody ustalono, że do wykonania reakcji powinna być stosowana temperatura  $60^{\circ}\text{C}$  oraz czas 30 min. (ryc. 1 i 2). Jako granicę wykrywalności metody określono 1 pikogram DNA szczepu 1227 (ryc. 3). Nie obserwowano



**Ryc. 2. LAMP DEV. Ustalenie optymalnego czasu inkubacji mieszanin reakcyjnych**  
Objaśnienia: 1 – 90 min.; 2 – 60 min.; 3 – 30 min.; 4 – 15 min. (A) widok w świetle widzialnym (B) widok w świetle UV



Ryc. 3. LAMP DEV. Ustalenie progu wykrywalności materiału genetycznego

Objaśnienia: 1 – 100 pg DNA; 2 – 10 pg DNA; 3 – 1 pg DNA; 4 – 0,1 pg; 5 – 0,01 pg; 6 – 0,001 pg; 7 – 0,0001 pg; 8 – 0,00001 pg. (A) widok w świetle widzialnym (B) widok w świetle UV

również krzyżowych reakcji z DNA próbek kontrolnych: DDV, GHPV ani GCV. W próbkach tych nie obserwowano zielonego zabarwienia mieszaniny reakcyjnej ani fluorescencji, co wskazywało na wysoką czułość, specyficzność metody i rzetelność uzyskanych wyników.

Metoda LAMP w diagnostyce chorób ptaków wodnych była dotychczas opisana w odniesieniu do wirusa Zachodniego Nilu (7), grypy ptaków (15), parwowirusa gęśiego (11, 13) oraz wirusa zapalenia wątroby kacząt typu 1 (10). W odniesieniu do pomoru kaczek (DP) klasyczne metody identyfikacji czynnika zakaźnego, jak izolacja wirusa w hodowlach komórkowych czy na jednodniowych kaczętach pozostają najlepszą drogą potwierdzenia zakażenia, jednakże są czasochłonne oraz uzależnione od okresu lęgowego. Oprócz metod izolacji wirusa często stosowane są metody serologiczne, takie jak test ELISA, które są zależne od obecności specyficznych przeciwciał anti-DEV i nie wykrywają zakażeń latentnych. Zastosowanie metod molekularnych, takich jak PCR i real-time PCR pozwoliło na znacznie skuteczniejsze wykrywanie zakażeń DEV, jak również jakościową i ilościową analizę występowania tego wirusa (2, 8, 9). Wprowadzenie metody LAMP było rewolucyjnym krokiem w diagnostyce chorób wirusowych drobiu (13-17). Ji i wsp. (3) zaprojektowali dwie pary starterów do wykrywania DEV genu  $U_L6$ . W badaniach własnych, w celu zwiększenia specyficzności reakcji, przeprowadzono amplifikację bardziej konserwatywnego fragmentu genu  $U_L30$ . Ponadto opracowana metoda LAMP z użyciem dodatkowej pary starterów tworzących pętle DNA pozwoliła na co najmniej dwukrotne skrócenie czasu reakcji w porównaniu z wcześniej przeprowadzonymi badaniami Ji i wsp. (3).

Po optymalizacji LAMP przebadano próbki pochodzące z wycinków wątroby pobranych od ptaków wodnych wolno żyjących. Charakterystyczną zieloną barwę

mieszanin reakcyjnych i zieloną fluorescencję próbek obserwowano w 96 próbkach, co stanowiło 72,7%. Wskazuje to na dosyć powszechne zakażenie DEV ptaków dzikich i może stanowić problem dla hodowli drobiu wodnego. Poprzednie dane z Wielkiej Brytanii pochodzące z lat 1980-1989 na temat występowania DEV wykazały obecność tego wirusa u 46,4% badanych ptaków wolno żyjących (1). Badania te prowadzono metodą izolacji wirusa w hodowlach komórkowych. Przewagą użytej w badaniach własnych metody biologii molekularnej LAMP polega na wykrywaniu również zakażeń latentnych, które, jak wiadomo, są trudne do identyfikacji przy użyciu tradycyjnych metod wirusologicznych czy serologicznych.

Ze względu na wykazany w niniejszych badaniach wysoki odsetek ptaków, u których wykryto DEV, w przyszłości planowane są dalsze badania nad występowaniem tego wirusa u drobiu wodnego.

### Piśmiennictwo

1. Gough R. E., Alexander D. J.: Duck virus enteritis in Great Britain, 1980 to 1989. *Vet. Rec.* 1990, 126, 595-597.
2. Hansen W. R., Brown S. E., Nashold S. W., Knudson D. L.: Identification of duck plague virus by polymerase chain reaction. *Avian Dis.* 1999, 43, 106-115.
3. Ji J., Du L. Q., Xie Q. M., Cao Y. C., Zuo K. J., Xue C. Y., Ma J. Y., Chen F., Bee Y. Z.: Rapid diagnosis of duck plague virus infection by loop-mediated isothermal amplification. *Res. Vet. Sci.* 2009, 87, 53-58.
4. Kaleta E. F.: Herpesviruses of birds. *Avian Pathol.* 1990, 19, 193-211.
5. Kumar N. V., Reddy Y. N., Rao M. V. S.: Enzyme linked immunosorbent assay for detection of duck plague virus. *J. Ind. Vet.* 2004, 5, 481-483.
6. Leibovitz L.: Progress report: duck plague surveillance of American Anseriformes. *Wildl. Dis.* 1968, 4, 87-91.
7. Parida M., Posadas G., Inoue S., Hasebe F., Morita K.: Real-Time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of West Nile Virus. *J. Clin. Microbiol.* 2004, 42, 257-263.
8. Plummer P. J., Alefantis T., Kaplan S., O'Connell P., Shawky S., Schat K. A.: Detection of duck enteritis virus by polymerase chain reaction. *Avian Dis.* 1998, 42, 554-564.
9. Qi X., Yang X., Cheng A., Wang M., Zhu D., Jia R.: Quantitative analysis of virulent duck enteritis virus loads in experimentally infected ducklings. *Avian Dis.* 2008, 52, 338-344.
10. Song C., Wan H., Yu S., Han X., Qiu X., Hu Q., Tan L., Ding C.: Rapid detection of duck hepatitis virus type-1 by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *J. Virol. Methods* 2012, 182, 76-81.
11. Tarasiuk K., Woźniakowski G., Samorek-Salamonowicz E.: Loop-mediated isothermal amplification as a simple molecular method for the detection of Derzsy's disease virus. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 2013, 57, 19-23.
12. Wobeser G.: Experimental duck plague in blue-winged teal and Canada geese. *J. Wildl. Dis.* 1987, 23, 368-375.
13. Woźniakowski G., Kozdrui W., Samorek-Salamonowicz E.: Loop-mediated isothermal amplification for the detection of goose circovirus. *Virol. J.* 9, 110. DOI:10.1186/1743-422X-9-110.
14. Woźniakowski G., Samorek-Salamonowicz E., Kozdrui W.: Comparison of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and polymerase chain reaction (PCR) for the detection and differentiation of Marek's disease virus serotype 1,2 and 3. *Avian Dis.* 2013, 57, 539-543.
15. Yang L., Li J., Bi Y., Xu L., Liu W.: Development and application of a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of duck hepatitis A virus type 1. *Virus Genes* 2012, 45, 585-589.
16. Yang J. L., Rui Y., Cheng A. C., Wang M. S., Fu L. Z., Yang S. Q., Zhang S. H., Yang L., Xu Z. Y.: A simple and rapid method for detection of Goose Parvovirus in the field by loop mediated isothermal amplification. *Virol. J.* 2010, 7, 14. DOI: 10.1186/1743-422X-7-14.
17. Yoshida H., Sakoda Y., Endo M., Motoshima M., Yoshino F., Yamamoto N., Okamatsu M., Soejima T., Senba S., Kanda H., Kida H.: Evaluation of the reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) as a screening method for the detection of influenza viruses in the fecal materials of water birds. *J. Vet. Med. Sci.* 2011, 73, 753-758.

Adres autora: dr Grzegorz Woźniakowski, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy; e-mail: grzegorz.wozniakowski@piwet.pulawy.pl