

# Skuteczność wykrywania RNA wirusa pryszczycy metodą PCR w zależności od starterów używanych do syntezy cDNA

Grażyna Paprocka  
Zakład Pryszczycy  
Państwowy Instytut Weterynaryjny  
Zduńska Wola

## Wstęp

**P**ryszczycza jest ważną ekonomicznie, agresywną chorobą zwierząt parzystopopytnych. Na zakażenie naturalne narażone jest w pierwszym rzędzie przede wszystkim bydło, a następnie świnie, kozy, owce oraz człowiek. Wnikanie wirusa do organizmu następuje przeważnie przez błony śluzowe górnych odcinków przewodu pokarmowego i układu oddechowego. Głównym źródłem zakażenia są zwierzęta w okresie inkubacji choroby lub w ostrym jej przebiegu. Wirus namnaża się w nabłonkach i płynie pęcherzy, które rozwijają się na błonach śluzowych przednich odcinków przewodu pokarmowego, na wymieniu i na racicach; na zewnątrz uwalnia się po pęknięciu pęcherzy, podczas wirerii znajduje się w całym organizmie. Mleko zawiera wirus aż do końca choroby (1-2).

Chociaż w zwalczaniu pryszczycy osiągnięto duży postęp, choroba występuje endemicznie w niektórych częściach Azji, Afryki, Europy Wschodniej i Ameryki Południowej. Ponieważ choroba nieustannie powraca do Europy, metody jej diagnozowania, które obejmują izolację wirusa, wykrywanie antygeny, przeciwciał i genomu są stale doskonalone. Genom wirusa pryszczycy jest zbudowany z pojedynczej nici RNA zamkniętej w kubicznym kapsydie o strukturze dwudziestościanu. Masa cząsteczkowa wirionu wynosi  $8,3 \times 10^6$  Da, a współczynnik sedymentacji 146S (3-5). Pojedyncza nić RNA składa się z około 8000 nukleotydów, posiada na swoim końcu 5' przyłączone białko (VPg), region poli(C) oraz sekwencję poli(A) na końcu 3'. Długa otwarta ramka odczytu koduje poliproteinę prekursorową wielkości 2332 aminokwasów o masie molekularnej 260 kDa, która ulega enzymatycznym przemianom. W wyniku proteolizy białka p88(region P1) powstają białka kapsydu uporządkowane w kolejności VP4-VP2-VP3-VP1 (6-9). Białko VP1 oraz jego fragmenty wywołują powstawanie przeciwciał neutralizujących u zwierząt. Anty-

genowe zróżnicowanie wirusa pryszczycy jest rezultatem zmian w strukturze tego białka (10-14). Celem pracy była ocena przydatności startera specyficznego i oligonukleotydów o przypadkowej sekwencji (random p(dN)<sub>6</sub>) do syntezy cDNA, który następnie używano do wykrywania genomu wirusa za pomocą PCR. Porównano obie metody syntezy cDNA z RNA otrzymanego z długo przechowywanych próbek. Ponadto próbki typowano testem ELISA oraz oznaczano ich infekcyjność w hodowli komórek.

## 2. Metodyka badań

### 2.1. Próbkki

Do badań użyto 14 próbek izolatów wirusa pryszczycy pochodzących z własnej kolekcji po długotrwałym przechowywaniu w ciekłym azocie lub w temperaturze -70°C. W 9 próbkach były nabłonki pęcherzy, w pozostałych 5 — zawiesiny hodowli komórek zakażonych materiałami klinicznymi. Kontrolą negatywną były zawiesiny nie zakażonych nabłonków i hodowli komórek.

### 2.2. Oznaczanie infekcyjności próbek

Nabłonki pęcherzy rozdrabniano w roztworze fizjologicznym buforowanym fosforanami (PBS), odwirowywano i 0,2 ml supernatantu zakażono hodowlę komórek linii ciągłej IB-RS-2 wrażliwe na wirus pryszczycy. Próbkami przechowywanymi w postaci zawiesiny zakażono hodowlę w podobny sposób. Zakażone hodowle inkubowano w temperaturze 37°C. Wystąpienie efektu cytotatycznego (CPE) świadczyło o obecności wirusa.

### 2.3. Typowanie wirusa testem ELISA

Do identyfikacji wirusa w próbkach używano pośredniego testu ELISA. Schemat jego wykonania przedstawiono we wcześniejszej pracy (15).

### 2.4. Ekstrakcja wirusowego RNA

Do badań użyto próbki izolatów w postaci zawiesin wirusowych, które nawarstwiano na 30% sacharozę i wirowano przez 3,5 godziny przy 28 000 rpm. Osad suszono i zawieszano w buforze TE (10 mM Tris pH 8,0; 1mM EDTA). RNA izolowano opierając się na metodzie Chomczyńskiego i Sacchi (16). Do 200 µl zawiesiny wirusa dodawano kolejno 250 µl roztworu D (4 M tjoecjanian guanidyny, 25 mM cytrynian sodu, 0,5% sarcosyl, 0,1 M mercaptoetanol), 50 µl 2 M octanu sodu, 1 objętość fenolu oraz 2/10 objętości mieszaniny chloroform: alkohol izoamyłowy (49:1). Całość intensywnie wytrząsano, inkubowano 15 min w temp. 4°C i wirowano (13 000 obr./min, 30 min). Do fazy wodnej dodawano 1 objętość izopropanolu i pozostawiano na noc w temp.

4°C, następnie wirowano (13 000 obr./min, 20 min). Osad zawieszano w 300 µl roztworu D, dodawano 1 objętość izopropanolu i pozostawiano w -20°C przez 1 godz. Po odwirowaniu (13 000 obr./min, 20 min) osad przemywano etanolem i suszono.

## 2.5. Startery

Posługiwano się starterami podanymi przez Laor i wsp.(17):

Oligo2-5' AGTTCGACCTAACGTCGGA 3', Oligo1-5' CAACTGCTTACCACAA-AAGG 3', oraz p(dN)<sub>6</sub> (Boehringer, Mannheim). Rejon amplifikowany obejmował 424 pary zasad sekwencji kodującej białko VP1.

## 2.6. Synteza cDNA

Każdą próbkę RNA badano dwukrotnie, stosując do reakcji odwrotnej transkrypcji startery p(dN)<sub>6</sub> i Oligo2. Syntezę cDNA prowadzono 45 min, w temp. 37°C przy użyciu odwrotnej transkryptazy AMV. Przyjęto postępowanie opisane w pracy Donn i wsp. (18).

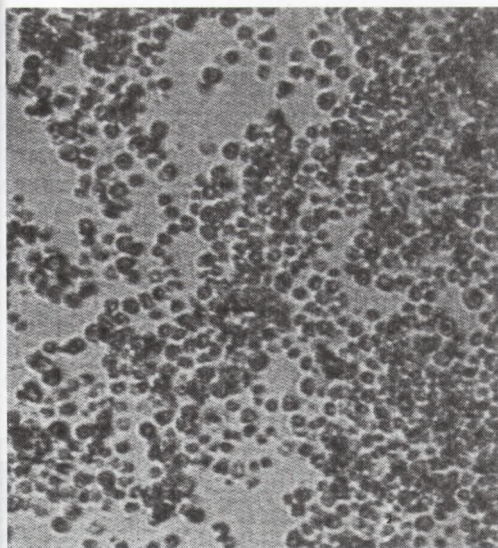
## 2.7. Metoda amplifikacji enzymatycznej (PCR)

Amplifikację wykonywano w mieszaninie reakcyjnej o objętości 50 µl. Każda próbka zawierała 5 µl cDNA, 3 µl 10 mM trifosforanów deoksyrybonukleozydów, 50 ng starterów Oligo1 i Oligo2, 5 µl buforu dla polimerazy Taq, 1,5 jednostki polimerazy Taq oraz sterylną, dejonizowaną wodę.

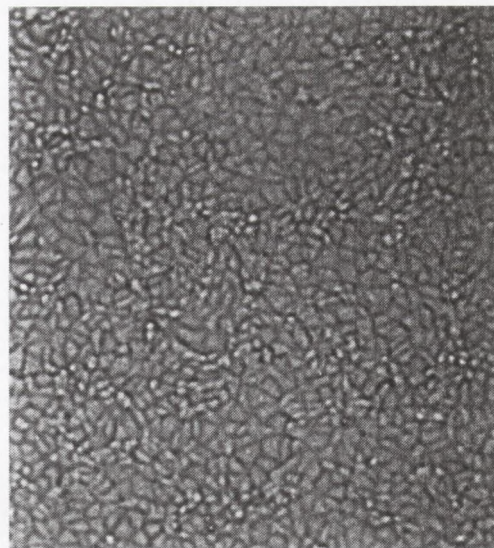
Amplifikacja odbywała się wg następującego programu: 30 cykli: 96°C — 1 min, 56°C — 1 min, 72°C — 2 min. Wstępna denaturacja: 95° — 3 min, synteza w ostatnim cyklu — 10 min. Produkty amplifikacji rozdzielano elektroforetycznie w 1,5% żelu agarozowym i barwiono bromkiem etydyny (19). Używano wzorca G316A (Promega). Żele analizowano za pomocą automatycznego systemu analizy żeli — Imagistore 5000 (Ultra Violet Products Ltd, Cambridge, UK) w oparciu na programie GelBase/GelBlotProPc, firmy Ultra Violet Products Ltd, Cambridge.

## 3. Omówienie wyników

Z przeglądu piśmiennictwa (20-30) wynika, że do wykrywania wirusa przyczynicy metodą PCR do reakcji odwrotnej transkrypcji czyli przepisania RNA na cDNA stosowane są zarówno startery specyficzne jak i p(dN)<sub>6</sub>. W przedstawionej pracy oceniono przydatność obu starterów do diagnozowania długo przechowywanych próbek w postaci nabłonków pęcherzy oraz zawiesin hodowli komórek zakażonych materiałami klinicznymi. Wymienionymi materiałami zakażano hodowlę komórek linii ciągłej IB-RS-2, wykonywano test ELISA i PCR przy użyciu kolejno dwóch rodzajów starterów do syntezy cDNA. Na podstawie wyraźnego efektu cytopatycznego w hodowlach komórek linii



a



b

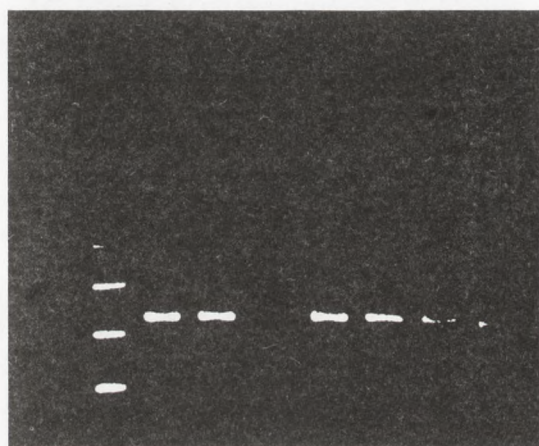
Fot. 1a. Hodowla komórek linii ciągłej IB-RS-2 zakażona wirusem pryszczycy typu O. 1b. Hodowla nie zakażona.

TABELA 1  
REZULTATY WYKRYWANIA WIRUSA PRYSZCZYCY

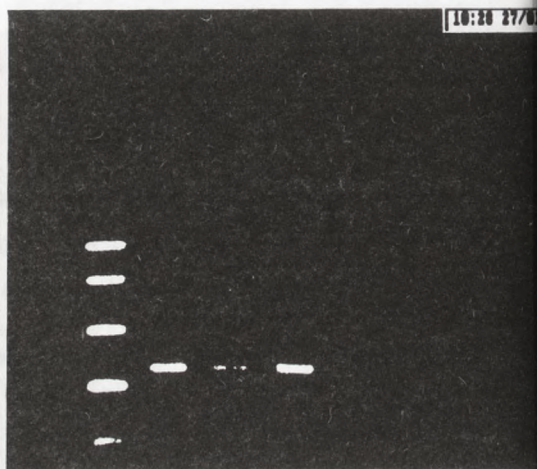
Próbki izolatów	Hodowla IB-RS-2	Test ELISA	PCR starter specyficzny	PCR starter p(dN) <sub>6</sub>
nabłonek	+	typ O	+	+
nabłonek	-	-	+	+
nabłonek	+	typ O	+	+
nabłonek	+	typ O	+	+
nabłonek	-	-	-	+
nabłonek	+	-	+	+
nabłonek	-	-	-	+
nabłonek	-	-	+	+
nabłonek	-	-	-	+
hodowla	+	typ O	+	+
hodowla	z	typ O	+	+
hodowla	+	typ O	+	+
hodowla	+	typ O	+	+
hodowla	+	typ O	+	+

z — zakażenie bakteryjne, brak odczytu

ciągłej IB-RS-2 wykazano obecność infekcyjnego wirusa w 8 z 13 badanych próbek (tab. 1, fot. 1a, 1b). Odczyt jednej próbki był niemożliwy z powodu zakażenia bakteryjnego. Zbliżone wyniki otrzymano stosując test ELISA, gdzie 8 z 14 badanych materiałów dało wynik pozytywny. Użycie do PCR cDNA uzyskanego za pomocą specyficznego startera pozwoliło wykryć wirusowy RNA w 11 z 14 badanych próbek. Natomiast zastosowanie cDNA otrzymanego za pomocą oligonukleotydów o przypadkowej sekwencji umożliwiło wykrycie RNA we wszystkich próbkach. W przeprowadzonej analizie żeli wykazano istnienie prążków położonych w obszarze 424 pz wzorca, podczas gdy przy kontroli negatywnej nie powstały wykrywalne produkty amplifikacji (fot. 2-4). W przypadku kiedy materiałami diagnostycznymi były nabłonki pęcherzy, użycie startera p(dN)<sub>6</sub> spowodowało wykrycie wirusowego RNA we wszystkich

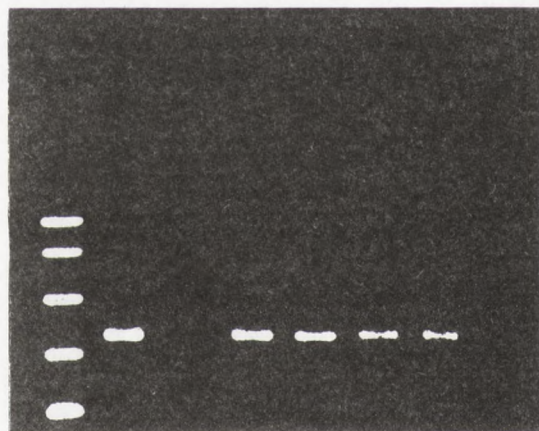


W 1 2 K 3 4 5 6



W 7 8 9 K

Fot. 2 Fot. 3



W 10 K 11 12 13 14

Fot. 4

Fot. 2-4. Produkty amplifikacji enzymatycznej fragmentu genu 1D(VP1) wielkości 424 pz.

Synteza cDNA wykonana z udziałem startera p(dN)<sub>6</sub>. Ścieżki: 1-14 izolaty wirusa przyszczycy typu O; K — negatywna kontrola; W — wzorzec (G316A Promega).

próbekach, natomiast po zastosowaniu specyficznego startera w 3 próbkach nie wykazano jego obecności. Nie stwierdzono różnicy w przydatności starterów używanych do badania zawiesin hodowli komórek zakażonych materiałami klinicznymi, gdzie koncentracja wirusowego RNA była większa.

Na podstawie otrzymanych wyników przypuszczać można, że użycie startera p(dN)<sub>6</sub> podwyższa czułość metody PCR do wykrywania RNA wirusa pryszczycy w próbkach klinicznych, gdzie jego ilość może znajdować się na granicy wykrywalności. Porównując wyniki wykazano, że PCR jest niewątpliwie najbardziej czułą techniką, a zastosowanie startera p(dN)<sub>6</sub> podwyższa jej skuteczność, w bezpośrednim diagnozowaniu materiałów klinicznych.

## Literatura

1. Beer J., (1980), *Choroby zakaźne zwierząt domowych*, PWRiL, Warszawa.
2. Larski Z., Truszczyński M., (1992), *Zarys mikrobiologii weterynaryjnej*, Wyd. ART, Olsztyn.
3. Doel T. R., (1996), *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 15(3), 883-911.
4. Doel T. R., Chong W. K. T., (1982), *Arch. Virol.*, 73, 185-191.
5. Doel T. R., Collen T., (1982), *J. Biol. Standard.*, 10, 69-81.
6. Forss S., Strelbel K., Beck E., Schaller H., (1984), *Nucleic Acids Res.*, 12, 6587-6601.
7. Grubman M. J., Robertson B. H., Morgan D. O., Moore D. M., Dowbenko D., (1984), *J. Virol.*, 50, 579-586.
8. Ruckert R. R., Wimmer E., (1984), *J. Virol.*, 50, 957-959.
9. Ryan M. D., King A. M. Q., Thomas G. P., (1991), *J. Gen. Virol.*, 72, 2727-2732.
10. Collen T., DiMarchi R., Doel T. R., (1991), *J. Immunol.*, 146, 749-755.
11. Doel T. R., Kanashiro M. M., Silva J. L., (1994), *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 59, 102-110.
12. Doel T. R., Williams L., Barnett P. V., (1994), *Vaccine*, 12,(7), 592-600.
13. Logan D., Abu-Ghazaleh R., Blakemore W., (1993), *Nature*, 362, 566-568.
14. Salt J. S., (1993), *Br. Vet. J.*, 149, 207-223.
15. Paprocka G., Kęsy A., Niedbalski W., Fitzner A., (1997), *Biotechnologia*, 1(36), 131-138.
16. Chomczyński P., Sacchi N., (1987), *Anal. Biochem.*, 162, 156-159.
17. Laor O., Torgersen H., Yadin H., Becker Y., (1992), *J. Vet. Med.*, 36, 197-208.
18. Donn A., Martin L. A., Donaldson A. J., (1994), *J. Virol. Methods*, 49, 179-186.
19. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T., (1989), *Molecular Cloning*, 2<sup>nd</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
20. Amaral-Doel C., Owen N., Ferris N., Kitching R., (1993), *Vaccine*, 11(4), 415-421.
21. Hofner M. C., Carpentner W. C., Donaldson A. J., (1993), *J. Virol. Methods*, 42, 53-62.
22. Hofner M. C., Carpentner W. C., Donaldson A. I., (1990), *Report to the Session of the Research Group of the Standing Technical Committee of the European Commission for the Control of FMD*, Lindholm, Denmark, (25-29 June).
23. Knowles N. J., Samuel A. R., (1994), *Polymerase chain reaction amplification and cycle sequencing of the 1D(VP1) gene of foot-and-mouth disease viruses. European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease*, Vienna, (19-22 September).
24. Krebs O., Marquardt O., (1992), *J. Gen. Virol.*, 73, 613-619.
25. Laor O., Yadin H., Chai D., Becker Y., (1991), *J. Vet. Med.*, 46, 127-133.
26. Locher F., Suryanarayana V. V. S., Tratschin I. D., (1995), *J. Clin. Microbiol.*, 42, 440-444.
27. Mayer R. F., Brown C. C., House C., House I. A., Molitor T. W., (1991), *J. Virol. Methods*, 34, 161-172.
28. Olive D. M., Al-Mufti S., Al-Mulla W., Khan M. A., Pasca A., Stanway G., Al-Nakib W., (1990), *J. Gen. Virol.*, 71, 2141-2147.

29. Pacciarini M., de Simone F., Ferrari S., (1990), *Report of the Session of the Research Group of the Standing Technical Committee of the European Commission for the Control of FMD*, Lindholm, Denmark (25-27 June), FAO, Roma, 103-105.
30. Rodriguez A., Martinez-Salas E., Dopazo J., Davila M., Saiz J. C., Sobrino F., (1992), *Virology*, 189, 363-367.

### Efficiency of detecting RNA of FMDV using PCR method according to the starters used for cDNA synthesis

#### Summary

Reverse- transcription polymerase chain reaction has been applied to the detection of FMD viral in samples. Total RNA was extracted with guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform method and reversely transcribed using specific or random primers. cDNA was used as a template for the amplification by RT-PCR of the 424 bp of the VP1 coding sequence. Random primers p(dN)<sub>6</sub> gave better results.

#### Key words:

foot-and-mouth disease virus (FMDV), RT-PCR, specific primer, random primer.

#### Adres do korespondencji:

Grażyna Paprocka, Zakład Pryszczycy, Państwowy Instytut Weterynaryjny,  
ul. Wodna 7, 98-220 Zduńska Wola.