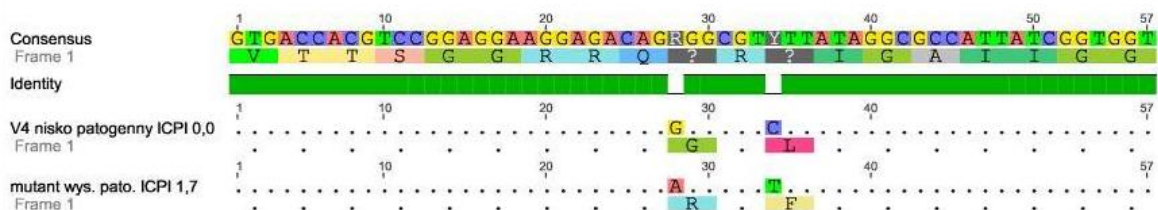


## Zastosowanie technik elektroforetycznego rozdziłu jednoniciowego DNA oraz Real-time PCR (qPCR) do detekcji i różnicowania zakażeń wirusem rzekomego pomoru drobiu.

Epidemie powodowane przez wysokopatogennego wirusa rzekomego pomoru drobiu (NDV - *ang. Newcastle disease virus*) z rodziny *Paramyxoviridae* stanowią obecnie jedno z większych zagrożeń dla hodowli ptactwa domowego na świecie. Jednak w przeszłości szerokie rozpowszechnienie w środowisku szczepów o niskiej zjadliwości nie wzbudzało dużych obaw ze strony służb weterynaryjnych czy hodowców drobiu, pomimo dowodów na to, że obecność wirusa powodującego rzekomy pomór drobiu w populacji zwierząt może utrzymywać się nawet przez dwa lata (Kapczyński i King 2005, Samuel i Spadbrow 1989). Szeroko zakrojona akcja szczepień teoretycznie zapewniała ochronę przed kolejnymi epidemiami tej ptasiej choroby. Poczucie względnego spokoju nie trwało jednak długo, gdyż okazało się, że niegroźne i powszechnie występujące szczepy wirusa rzekomego pomoru drobiu mogą poprzez nabycie zaledwie dwóch mutacji punktowych przekształcić się w typ o wysokiej zjadliwości. Pierwsze udokumentowane nabycie cech wysoce patogenego szczepu wirusa rzekomego pomoru drobiu odkryto w Irlandii w 1990 roku (Collins i wsp. 1993, Collins i wsp. 1998). Następnie zauważono, że australijski szczep niskopatogeny, będący przez 30 lat szeroko rozpowszechniony na tym kontynencie, uzyskał dwie mutacje punktowe w genie kodującym białko F (izolowano również „stadia przejściowe” z pojedynczymi mutacjami). Spowodowało to wzrost indeksu domózgowej zjadliwości (ICPI – *ang. intracerebral pathogenicity index*) z 0 do 1,7 (wszystkie szczepy uzyskujące ICPI powyżej 0,7 uznaje się za patogenne). Epidemia wysoce zjadliwym mutantem trwała od 1998 do 2000 roku i spowodowała olbrzymie straty w gospodarce.



**Rycina nr 1.** Porównanie sekwencji nukleotydowej fragmentów genu *f*, którego dwie mutacje punktowe powodują znaczny wzrost zjadliwości.

Wirusy podobne do australijskiego szczepu V4 izolowane są w takich krajach jak: Nowa Zelandia, Malezja, Japonia, Niemcy, Francja, Włochy, Hiszpania czy Wielka Brytania. Stwarza to duże zagrożenie, że i w tych krajach może dojść do pojawienia się nowego, bardzo niebezpiecznego szczepu wirusa choroby Newcastle. Wyżej wymienione obserwacje zostały potwierdzone doświadczalnie, gdy udowodniono, że kilkukrotne pasażowanie niskopatogennego wirusa w workach powietrznych oraz mózgu kurcząt może doprowadzić do znacznego zwiększenia wirulencji (Alexander i Senne 2008). Hipoteza powstawania spontanicznych mutacji, a co za tym idzie ciągle zmieniającej się struktury genetycznej populacji wirusów (z jednoczesnym zachowaniem form przejściowych) była wielokrotnie przedstawiana dla wielu niespokrewnionych gatunków patogenów (Delwart i Gordon 1997, Sanchez i wsp. 2003, Figlerowicz i wsp. 2010). Ta zmienność jest szczególnie widoczna w wirusach RNA ze względu na brak mechanizmów naprawczych w trakcie replikacji genomu (Domingo i wsp. 1996, Lauring i wsp. 2013).

W związku z tym niezwykle ważne jest wprowadzenie badań przesiewowych pozwalających zarówno na szybkie określenie wirulencji, jak i wykrycie nowych potencjalnie groźnych szczepów NDV. Aktualnie stosowane metody diagnostyki molekularnej oparte na wykrywaniu specyficznych sekwencji nukleotydowych poprzez zastosowanie sond typu TaqMAN w real-time PCR nie nadają się do tego celu z powodu bardzo małych i trudnych do przewidzenia zmian w genomie, wymaganych do transformacji patotypu wirusa. Mutacje te uniemożliwiają przyłączenie się sond do badanego DNA, co skutkuje błędnym odczytem (Kim i wsp. 2006). Natomiast każdorazowe sekwencjonowanie dużej ilości izolatów jest zarówno czasochłonne jak i kosztowne, nawet przy wykorzystaniu techniki pyrosekwencjonowania (de Battisti i wsp. 2013). Pomocne w tym przypadku mogą być dwie niezależne metody, które opracowałem w trakcie mojego doktoratu.

W pierwszej z dołączonych publikacji zaprezentowałem możliwość odróżnienia patogennych szczepów NDV od szczepionkowych poprzez wykorzystanie zdegenerowanych starterów do powielenia fragmentów odpowiadających za wirulencję wirusa za pomocą techniki RT-PCR (odwrotna transkrypcja z łańcuchową reakcją polimerazy) z dodatkiem barwnika interferującego do DNA (SYBR Green I) i analizą krzywych topnienia (Nidzworski

i wsp. 2011). Dziewięćdziesięcio-dwu nukleotydowe fragmenty DNA różnych izolatów NDV, tworzyły dwie grupy charakteryzujące się odmiennymi punktami topnienia (*ang. melting peak*). Dla szczepów niskopatogennych był to przedział 81,62°C-82,35°C, a dla średnio i wysoko patogennych 85,22°C-87,52°C. Specyficzność zdegenerowanych starterów była sprawdzona między innymi na grupie najbliższej spokrewnionych wirusów z pozostałych serotypów APMV (*ang. avian paramyxovirus*). Dzięki zastosowaniu powyższej metody możliwe jest szybkie patotypowanie izolatów NDV bez konieczności stosowania klasycznych technik, takich jak ustalanie domózkowego indeksu zjadliwości (ICPI).

Wadą metod opartych na technikach real-time PCR jest duża trudność w detekcji zakażeń wieloszczepowych lub rozróżnienia populacji zawierającej swoiste pod-gatunki, czyli „quasispecies”. Do tego celu można wykorzystać technikę SSCP (*ang. single-stranded conformational polymorphism*) opisaną po raz pierwszy przez M. Orita w roku 1989. Wykorzystuje ona zmienną mobilność pojedynczej nici DNA w żelu poliakrylamidowym w zależności od sekwencji tej nici przy jej jednakowej długości. Prowadzenie elektroforezy w zmiennych warunkach temperaturowych dodatkowo poprawia możliwości rozdzielcze techniki. Taką odmianę SSCP nazywamy MSSCP (*ang. multitemperature single-stranded conformational polymorphism*) (Kaczanowski i wsp. 2001). W drugiej z załączonych publikacji przedstawiłem metodę opartą na powyższej technice, dzięki której możliwe jest nie tylko specyficzne rozróżnianie konkretnych szczepów czy izolatów NDV, ale również wykrywanie ich mieszanek w jednej próbce (Rąbalski i wsp. 2014). Nieosiągalna dla techniki real-time PCR specyficzność w tym przypadku pozwala na śledzenie rozprzestrzeniania się wirusa w populacji, jak również na monitorowanie jego stabilności genetycznej. W swoich badaniach symulowałem zakażenia quasispecies-NDV, które miały miejsce w Australii w latach 1998-2002 oraz potencjalny rozwój infekcji wysokopatogennym szczepem wirusa u wcześniej zaszczepionej kury. Obydwa przypadki wykazały, że zastosowanie w tych celach metody MSSCP przynosi bardzo dobre rezultaty i może stać się alternatywą dla drogich sekwencjonowań.