

Zastosowanie izotermalnej metody amplifikacji DNA w identyfikacji wirusa choroby Mareka u drobiu

AGATA JÓZEFAK, MAGDALENA KUFEL*, JAROSŁAW WILCZYŃSKI**

Instytut Weterynarii, Wydział Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, ul. Wołyńska 35, 60-637 Poznań

*Studentka IV roku Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

**Weterynaryjne Laboratorium Diagnostyczne LAB-VET Sp. z o.o., ul. Okrężna 8, 62-080 Tarnowo Podgórne

Otrzymano 16.05.2016

Zaakceptowano 24.08.2016

Józefiak A., Kufel M., Wilczyński J.

Applying the isothermal DNA amplification method in identifying the Marek's disease virus in poultry

Summary

Marek's disease is a viral disease, a type of poultry cancer. It is caused by MDV serotype 1 (Marek's disease virus, MDV) viruses, also referred to as Gallid herpesvirus 2 belonging to the family Herpesviridae. The complete, fully infectious virus particles are present in the feathers and the nodules months can survive in the environment for many months. The use of isothermal amplification methods of genetic material (Loop-Mediated Isothermal Amplification, LAMP) virus MDV enables rapid and precise identification of the virus in difficult diagnostic material, including dust. By optimizing the reaction conditions and using at least two pairs of primers which bind to specific sites in the genome of the virus, this technique has high sensitivity and specificity. The technique makes it possible to detect of single copies of the meq oncogene – a unique region of DNA of the first type of virus MDV.

Keywords: MDV, Marek's disease, LAMP, meq

Choroba Mareka to wysoce zakaźna choroba wirusowa drobiu grzebiącego, rozpatrywana w szerokim zakresie, jednak przede wszystkim jako chłoniak T-komórkowy (8). Mimo iż po raz pierwszy została opisana w 1907 r. przez Josepha Mareka (26), to pierwsze przypadki tej choroby w Polsce pojawiły się dopiero w latach 70. (19). Niestety, nadal występują w stadach hodowlanych, co prowadzi do poważnych strat ekonomicznych. Z uwagi na brak obowiązku rejestracji dokładne dane na temat występowania tej choroby są trudne do oszacowania.

Czynnikiem etiologicznym jest wirus choroby Mareka MDV serotypu 1 określane również *Gallid herpesvirusem* typu drugiego (*Gallid herpesvirus 2* – GaHV-2) należący do rodziny *Herpesviridae*, podrodziny *Alphaherpesvirinae*, rodzaju *Mardivirus* (27).

Wirus MDV z powodu swej limfotropowej natury początkowo klasyfikowany był jako *Gammaherpesvirinae*, jednak w 2002 r., po uzyskaniu pełnej sekwencji genomu nastąpiła jego reklasyfikacja do nowego rodzaju *Mardivirus* (41), w obrębie którego wyodrębniono jeszcze 4 inne gatunki, tj.: *Gallid herpesvirus 3* (GaHV-3), *Meleagrid herpesvirus 1* (MeHV-1) – znany także pod nazwą herpesvirus indyków (HVT), *Anatid herpesvirus 1* i *Columbid herpesvirus 1*. GaHV-3 i HVT infekują drób, ale nie są dla niego patogenne (14).

Od lat 70. XX w. stosowane są rutynowe szczepienia ochronne przeciw MDV-1, jakkolwiek wg danych piśmiennictwa wirus ten nadal występuje w środowisku, prowadząc do poważnych strat ekonomicznych. W niniejszej pracy zostało opisane zastosowanie izotermalnej metody amplifikacji unikalnych sekwencji genu meq w materiale genetycznym wirusa MDV izolowanym z kurzu ferm drobiu.

Epidemiologia

W Polsce opisano obecność wirusa choroby Mareka została stwierdzona po raz pierwszy w latach 70. ub. wieku przez Cąkałę, Grundboeckę i Golnika (19). Do dnia dzisiejszego pomimo obowiązkowych szczepień przeciwko wirusowi MD choroba jest nadal odnotowywana. Liczba jej przypadków z roku na rok wzrasta.

Według Wieliczko i Mazurkiewicza (19), w 1993 r. na terenie dawnego województwa wrocławskiego zanotowano 20 przypadków MD. Rok później liczba ta wzrosła do 35, natomiast w 1995 r. wirus wystąpił u 30 sztuk drobiu. W kolejnych trzech latach liczba chorych osobników zmalała. W 1999 r. odnotowano kolejny wzrost, który wyniósł 47 przypadków zachorowań, natomiast w 2000 r. było ich już 49.

W latach 2000-2010 choroba najczęściej pojawiała się u drobiu pomiędzy 16. a 22. tygodniem życia.

Początkowo występowała faza ostra, po niej forma przewlekła. Największą liczbę zachorowań odnotowano w województwach: wielkopolskim, dolnośląskim i śląskim (34).

Wyniki badań sanitarno-weterynaryjnych drobiu grzebiącego w Polsce przeprowadzone w 2009 r. wskazują na ciągłą obecność wirusa choroby Mareka. Wirus odnotowano u kurcząt. Ubojowi poddano prawie 592 mln sztuk, aż u 2364 kurcząt wirus MD był obecny. Stanowi to 0,36% badanych ptaków. Wirus nie wystąpił u kur, indyków i innych gatunku drobiu (24).

Charakterystyka choroby Mareka (MD)

Choroba Mareka to choroba wirusowa drobiu grzebiącego, o podłożu nowotworowym, atakująca głównie kury, przepiórki japońskie oraz indyki (29). Jest schorzeniem limfoproliferacyjnym, obecnym w prawie każdym stadzie kurcząt (11). Od około 100 lat jest jedną z najbardziej niebezpiecznych chorób, zdolnych do infekcji także innych gatunków ptaków (39). Straty powodowane przez wirus MD rocznie na całym świecie wynoszą około 1-2 miliarda dolarów (29). Choroba ta przyczynia się między innymi do: zwiększenia współczynnika śmiertelności, brakowań tuszek, spadku produkcji nieśnej oraz do wyższych kosztów produkcji. Uważa się, że główną przyczyną strat ekonomicznych w stadach MDV pozytywnych jest wzrost liczby występowania serotypów o podwyższonej patogenności, zdolnych do przełamywania odporności poszczepiennej (43).

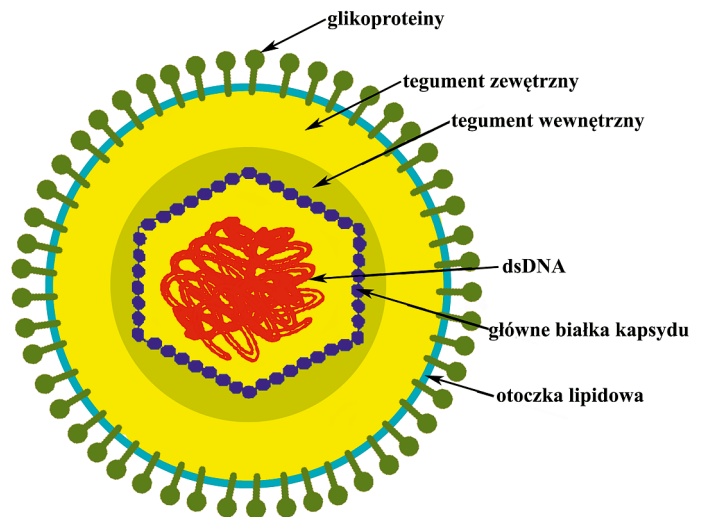
Choroba ta ujawnia się zarówno u szczepionych, jak i nieszczepionych ptaków. Uważa się, że występowanie MD u szczepionych gatunków ma związek ze zróżnicowanym poziomem skuteczności stosowanych szczepionek i rozprzestrzenianiem się bardziej wirulentnych szczepów (30).

Wirus MDV

Wirus choroby Mareka MDV serotypu 1, określane również jako *Gallid herpesvirus* typu drugiego (*Gallid herpesvirus 2* – GaHV-2), należy do rodziny *Herpesviridae*, podrodziny *Alphaherpesvirine*, rodzaju *Mardivirus* (27). Do tej rodziny należą również wirusy powodujące chorobę Aujeszky'ego u świń (wścieklizna rzekoma), otręt koni oraz zapalenie nosa i tchawicy u bydła (IBR). U ludzi herpeswirusy wywołują zmiany skórno-słuzówkowe, takie jak: opryszczka, ospa wietrzna oraz półpasiec (21).

Budowa wirionu MDV (ryc. 1). Wirus MDV jest kolisty o symetrii ikosaedralnej. Jego kapsyd osiąga średnicę od 100 do 200 nm. Składa się z 162 kapsomerów otoczonych charakterystyczną dla wszystkich herpeswirusów amorficzną strukturą, określaną jako tegument. Z zewnątrz wirion posiada otoczkę lipidowo-białkową z wbudowanymi kompleksami glikoprotein, rozpoznającymi receptory komórkowe gospodarza.

Wszystkie wirusy należące do rodzaju *Mardivirus* mają podobny schemat organizacji genomu. Ich ma-



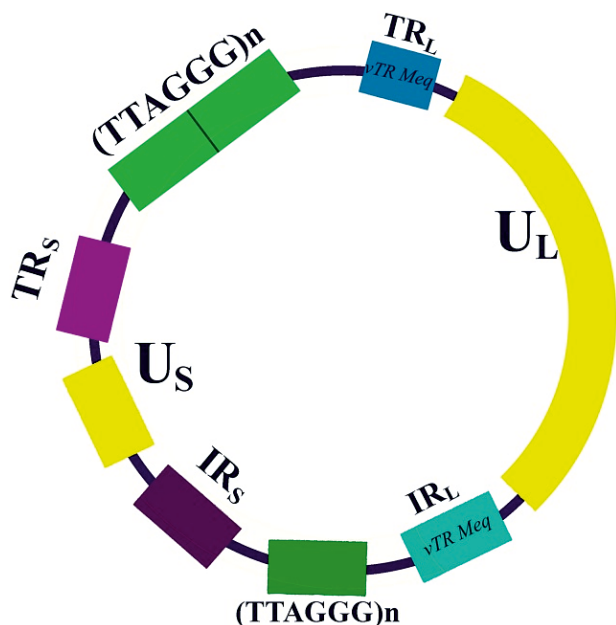
Ryc. 1. Budowa wirionu MDV

teriał genetyczny stanowi liniowy dsDNA o wielkości 175-180 kbp (27).

Genom zbudowany jest z kilku regionów sekwencji unikatowych, tj. długich (*unique long* – U_L) i krótkich (*unique short* – U_S) oflankowanych regionami długimi z zewnątrz TR_L (*terminal repeats long*) i wewnątrz IR_L (*internal repeats long*) oraz odpowiednimi sekwencjami krótkimi, tj. TR_S (*terminal repeats short*) i IR_S (*internal repeats short*) (22). W formie liniowej genomu wirusa MDV powtórzenia sekwencji (TTAGGG) stanowią odcinki telomerowe genomu, natomiast w formie episomalnej (kolistej) są ze sobą połączone. Regiony IR_S i IR_L stanowią sekwencje odwrócone regionów TR_S i TR_L . Pomiędzy nimi znajduje się region bogaty w sekwencje powtórzeniowe (TTAGGG). W regionach długich TR_L i IR_L zlokalizowany jest gen kodujący wirusową telomerazę vTR oraz gen meq, odpowiednio, jedna kopia dla regionu (27). Onkogenny serotyp 1 od pozostałych serotypów odróżnia obecność onkogenu wirusowego meq oraz innych sekwencji unikatowych, takich jak geny: pp38, vIL8, i vTR w regionach powtórzeniowych, głównie zlokalizowanych w regionie TR_L (22, 30). W genach tych zakodowana jest „unikatowa” informacja genetyczna pozwalająca MDV na aktywację i transformację limfocytów T (48).

Organizacja genomu wirusa MDV. Forma episomalna (kolista) (ryc. 2). Wirus MDV w organizmie gospodarza występuje w dwóch formach, tzw. cell associate i cell free. Pierwsza forma wirusa jest związana z materiałem genetycznym komórki gospodarza. W takiej postaci wirus jest groźny tylko dla gospodarza. Kompletna cząstka wirusa, czyli forma cell free jest obecna tylko w brodawkach piór i jest zakaźna (20).

Wśród trzech serotypów wirusa choroby Mareka, różniących się wirulencją, zdolnościami do indukcji procesów nowotworzenia w obrębie układu limfatycznego oraz właściwościami antygenowymi, szczepy serotypu pierwszego są onkogenne. Serotyp drugi oraz serotyp trzeci są apatogenne.



Ryc. 2. Organizacja genomu wirusa MDV. Forma episomalna (kolista)

Ze względu na różną zdolność wirusa do wirulencji w obrębie serotypu pierwszego wyróżnia się następujące patotypy:

- łagodny szczep mMDV – szczep o niewielkiej patogenności,
- zjadliwy szczep vMDV – szczep wywołujący zmiany nowotworowe,
- bardzo zjadliwy szczep vvMDV – szczep indukujący procesy nowotworzenia, o podwyższonej onkogenności,
- bardzo zjadliwy szczep plus vv+MDV – szczep charakteryzujący się zdolnością do przełamania odporności poszczepiennej (43).

Współcześnie w fermach drobiarskich dominują szczepy vvMDV oraz vv+MDV (18).

Patogeneza

W fermie drobiarskiej zakażone ptaki roznoszą w pełni wirulentne cząstki wirusa do otoczenia wraz ze złuszczeniami się fragmentami naskórka okolic brodawek piór.

Wirus ten następnie bytuje w cząsteczkach kurzu oraz pyłu. W takim środowisku, wewnątrz złuszczonej komórki naskórka może przetrwać okres nawet 8 miesięcy (20).

Do zakażenia ptaków wirusem choroby Mareka dochodzi poprzez układ oddechowy. Wirus bytujący w złuszczonej komórce naskórka wraz z drobinami pyłu oraz kurzu jest transportowany do płuc młodych ptaków. Przypuszcza się, że replikacja wirusa choroby Mareka przebiega już w okolicach tchawicy, płuc oraz w workach powietrznych (2, 10). Następnie jest on resorbowany przez makrofagi płucne. Poprzez makrofagi pęcherzyków płucnych jest transportowany do narządów limfatycznych, takich jak: śledziona, grasica i torba Fabrycjusza (7). W narządach limfatycz-

nych jest wykrywany w ciągu 1-2 dni od zakażenia. W 3. dniu zakażenia dochodzi do atrofii grasicy i torby Fabrycjusza, co jest konsekwencją rozpoczęcia się fazy półproduktywnej wirusa. Pomiędzy 4. a 5. dniem trwania choroby pojawia się wczesna faza cytolityczna. W tych dniach faza ta osiąga swój największy wymiar. Zakażeniu ulegają limfocyty B, w ich wnętrzu dochodzi do lizy komórek. Intensywność wczesnej fazy infekcji cytolitycznej znacznie spada pomiędzy 6. a 7. dniem od zakażenia. W tym okresie infekcji uaktywniają się antygeny wirusowe, dochodzi do atrofii torby Fabrycjusza oraz grasicy i rozwoju immunosupresji. Jest to etap, w którym zahamowaniu ulega cykl replikacyjny wirusa (35).

Równoległe z fazą lityczną limfocytów B w narządach limfatycznych obserwuje się zakażenie limfocytów T w grasicy oraz w naczyniach obwodowych. W nich dochodzi do rozwoju infekcji latentnej i inicjacji procesu nowotworowego (5, 6).

Pomiędzy 14. a 21. dniem rozwoju choroby pojawia się kolejna faza cytolityczna (10). Wirus ulega ponownej reaktywacji w komórkach latentnych. Fazie tej towarzyszy trwała immunosupresja odpowiedzi komórkowej oraz humoralnej. Zahamowanie odpowiedzi komórkowej oraz humoralnej prowadzi między innymi do braku możliwości wytworzenia przeciwciał skierowanych przeciwko antygenom wirusa MDV oraz zwiększenia wrażliwości komórek na inne czynniki infekcyjne (38). W tym czasie do komórek nabłonkowych okolic brodawek piór transportowane są zakażone limfocyty T. Wirus namnaża się w zainfekowanych komórkach i przechodzi swój pełny cykl replikacyjny, przebiegający z wytworzeniem w pełni dojrzałych i zakaźnych cząstek, co prowadzi do rozwoju stanu zapalnego oraz martwicy komórek nabłonka skóry (31). Kompletne cząstki wirusa, zakaźne dla innych osobników, mogą bytować w złuszczonej komórce nabłonka przez kilka miesięcy w temperaturze 20-25°C, natomiast w temperaturze 4°C są obecne nawet przez kilka lat (37).

Pomiędzy 14. a 21. dniem infekcji latentne limfocyty T ulegają horyzontalnemu przemieszczaniu się układem krwionośnym, powodując powstanie kolejnego etapu infekcji, jakim jest transformacja nowotworowa. Występuje ona wewnątrz zainfekowanych latentnych komórek. Do transformacji nowotworowej dochodzi w nerwach obwodowych oraz w wewnętrznych organach. Efektem jej powstania jest paraliż kończyn oraz rozwój chłoniaków (5).

Istniejąca wysoka immunosupresja we wczesnych etapach infekcji wirusem MDV chroni komórki transformowane przed rozpoznaniem przez układ odpornościowy gospodarza. Wirulencja towarzyszy ptakom przez całe życie (37).

Objawy kliniczne

Choroba Mareka powoduje szereg objawów klinicznych. Decydujące znaczenie ma poziom zjadliwości

szczeptu terenowego oraz podatność kurcząt na zakażenia (3, 5, 30, 33). Charakterystycznymi objawami klinicznymi dla wirusa choroby Mareka są: paraliż kończyn, zahamowanie wzrostu oraz kręcz szyi. Oprócz widocznych gołym okiem schorzeń u chorych ptaków pojawiają się zmiany nowotworowe. Są one obecne głównie w wątrobie, śledzionie, jajnikach, żołądka gruczołowym oraz w innych narządach. Dodatkowo pojawiają się one również w okolicach skóry (36).

Postaci kliniczne

Wyróżnia się kilka postaci klinicznych choroby Mareka:

a) forma nadostra – powoduje straty sięgające kilkudziesięciu procent hodowanego drobiu. Pojawiają się one już w pierwszych czterech tygodniach odchowu piskląt. U ptaków dochodzi do rozwoju procesu nowotworowego, mimo braku widocznych objawów klinicznych (18);

b) forma ostra – czas jej rozwoju wynosi około 2-3 tygodnie. Może występować bez charakterystycznych objawów klinicznych, lecz z trwającymi procesami nowotworowymi przyczyniającymi się do śmiertelności wynoszącej nawet 70% stada drobiu. Wysoka śmiertelność występuje w pierwszych tygodniach życia, następnie obserwuje się spadek śmiertelności do kilku ptaków w stadzie. Wówczas widoczne są objawy kliniczne. Ptaki zaczynają chudnąć. Skóra kurcząt staje się blada. Występuje również porażenie nóg, skrzydeł i szyi. Charakterystycznym objawem jest postawa szpagatu (18).

Forma ta występuje także u zakażonych wirusem brojlerów. Na 2-3 dni przed sprzedażą ptaki chudną, stają się blade. Dodatkowo często pojawiają się objawy porażenne. W większości przypadków bardzo trudno jest wskazać na obecność wirusa MDV u brojlerów tylko na podstawie objawów klinicznych. Trudności te wynikają z mało swoistego obrazu klinicznego. Krótki okres hodowli nie pozwala na pełne ujawnienie infekcji wirusowej (39);

c) forma klasyczna – współczynnik śmiertelności wynosi od 10% do 15% ptaków w stadzie. Widocznymi objawami klinicznymi choroby są porażenia nóg, skrzydeł oraz szyi. Wśród ptaków pojawia się również postawa przypominająca szpagat. Mogą być również obecne zmiany w gałce ocznej: zmiana kształtu źrenicy, pojawienie się plamek na oku, szarości tęczówki oraz braku zdolności do akomodacji. Dodatkowo mogą występować dolegliwości związane z układem oddechowym (problem z wentylacją płucną) oraz z układem trawiennym (pojawianie się biegunki). Wszystkie te objawy są spowodowane uszkodzeniem nerwów przez zmiany rozrostowe (19);

d) paraliż przejściowy: jest rzadko występującą formą kliniczną choroby Mareka. Pojawia się u kurcząt pomiędzy 5. a 18. tygodniem życia i obejmuje do 50% ptaków w stadzie. Paraliż występuje nagle i zazwyczaj po 36 godz. jego objawy ustępują (19).

Obraz anatomopatologiczny

Nacieki spowodowane krążeniem w krwi obwodowej zakażonych limfocytów przyczyniają się do powstania zmian nowotworowych w narządach wewnętrznych oraz w okolicach nabłonka brodawek piór.

W badaniach anatomopatologicznych stwierdza się atrofię torby Fabrycjusza oraz zmiany nowotworowe pojawiające się w śledzionie, wątrobie, jajniku, nerkach, płucach, sercu i w żołądka gruczołowym. Wewnątrz tych narządów lub na ich powierzchni są obecne szare lub białoszare guzy nowotworowe. Dodatkowo obserwuje się zgrubiałe nerwy obwodowe (nerwy kulszowe i splotu barkowego). Zmiany skóry objawiają się jej przekrwawieniami, zgrubieniami oraz zniekształceniami brodawek piór (19).

Szczepienia

Choroba Mareka jest jedyną chorobą wirusową o podłożu nowotworowym, w przypadku której stosuje się szczepienie. Stosuje się szczepionki zawierające wirusy atenuowane (szczepionkowe) chroniące przed rozwojem choroby, ale nie hamujące procesu wniknięcia wirusa (45).

Pierwsza szczepionka przeciwko chorobie Mareka została wprowadzona w 1970 r. Opracowano ją na podstawie herpeswirusa indyjskiego HVT. Początkowo bardzo dobrze chroniła przed rozwojem wirusa. Pod koniec 1979 r. zauważono obniżoną jej skuteczność. Przyczyną spadku jej skuteczności była interferencja z przeciwciałami matczynymi oraz pojawienie się szczepów terenowych o podwyższonej zjadliwości (45).

W 1990 r. po raz pierwszy zastosowano szczepionkę „Rispena”. Szczepionka ta jest oparta na szczepie CVI988 należącym do serotypu pierwszego wirusa choroby Mareka. Atenuacja szczepu polegała na seryjnych jego pasażach w hodowlach komórek. W wyniku licznych pasażów szczep ten utracił zdolność do indukcji atrofii grasicy i torby Fabrycjusza oraz do tworzenia guzów nowotworowych, natomiast nadal pozostał zakaźny (45).

Do dnia dzisiejszego szczepionka ta jest powszechnie stosowana przez wszystkie kraje. Najefektywniej chroni przed rozwojem szczepów bardzo zjadliwych (vv) i bardzo zjadliwych plus (vv+) (27). Produkt leczniczy występuje pod nazwą Nobilis Rismavac. Można go stosować *in ovo*, jak też podawać domięśniowo i podskórnie pisklątom.

In ovo szczepi się 18-dniowe embriony przy użyciu systemu do szczepienia jaj, natomiast podskórnie podaje się jednodniowym pisklątom. Każdego roku szczepieniu poddawanych jest około 4,2 miliarda niosek, 0,5 miliarda stad rodzicielskich i 17 miliardów brojlerów (6).

Po podaniu szczepionki u ptaków obserwuje się stały rozwój wirusa szczepionkowego. Samo szczepienie nie chroni ptaków przed wniknięciem i całkowitym

zahamowaniem rozwoju zjadliwego wirusa terenowego. Infekcja wirusem szczepionkowym powoduje późniejszą wiramię patogennego wirusa terenowego, obniżenie jej poziomu oraz zapobieganie powstawaniu zmian nowotworowych i śmierci ptaków.

Po zakażeniu szczepionych ptaków zjadliwym wirusem terenowym nadal dochodzi do jego namnażania i siewstwa do otoczenia. Jest to szczególnie niebezpieczne dla wrażliwych szczepionych kurcząt, w przypadku których wirus ten powoduje powstawanie zmian nowotworowych, a następnie ich śmierć. Konsekwencją replikowania się zjadliwego wirusa terenowego oraz jego rozprzestrzeniania się wśród innych ptaków jest również pojawienie się szczepów o zdolnościach do przełamania odporności poszczepiennej. Wynika to z presji selekcyjnej wywieranej na szczepy terenowe (28).

Identyfikacja wirusa

Podstawową techniką wykorzystywaną do identyfikacji zakażeń wirusowych w badanym materiale tkankowym jest reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR). Z metodą tą wiążą się jednak pewne ograniczenia, tj. konieczność posiadania termocyklerów, zapewniających precyzyjne cykliczne zmiany temperatur oraz obecność inhibitorów reakcji, dlatego w ostatnich latach trwają intensywne badania nad rozwojem metod diagnostycznych opartych na izotermalnej amplifikacji kwasów nukleinowych. Techniki te są coraz częściej stosowane w detekcji patogenów zarówno zwierzęcych, jak i roślinnych. Jedną z takich metod jest amplifikacja kwasów nukleinowych w stałej temperaturze z wytworzeniem pętli. Zastosowanie kilku różnych par starterów reakcji oraz polimerazy DNA o zdolności przemieszczania nici (*strand displacement*) pozwala uzyskać bardzo wysoką czułość reakcji.

Identyfikacji wirusa choroby Mareka dokonuje się na podstawie analizy genu meq w badanym materiale biologicznym. Badany region genu jest bardzo konserwatywny i swoisty dla serotypu pierwszego wirusa choroby Mareka.

Gen ten koduje białko meq o wielkości 339 aminokwasów i masie cząsteczkowej około 40 kDa (23). Polipeptyd ten jest najlepiej poznanym i scharakteryzowanym białkiem onkogennym wirusa MDV. Jego ekspresja zachodzi w limfocytach komórkach nowotworowych. Wstępowanie białka meq charakterystyczne jest tylko dla szczepów serotypu 1 MDV (25).

Aktualnie dostępne są komercyjne zestawy diagnostyczne, takie jak Ampli – LAMP MDV Herpesvirus (Novazym Polska, Poznań), które umożliwiają przeprowadzenie reakcji LAMP w łaźni wodnej lub bloku grzewczym. Wynik można obserwować w świetle UV, dzięki obecności barwnika fluorescencyjnego oraz na zasadzie widocznego gołym okiem zmętnienia próby. Metodę tę można również zastosować w badaniach ilościowych z użyciem aparatów pracujących w technice Real-Time.

Technika LAMP

Pierwsza publikacja naukowa opisująca techniką LAMP została opublikowana w 2000 r. przez zespół japoński badaczy (32), natomiast pierwszy komercyjny zestaw do przeprowadzenia reakcji LAMP pojawił się na światowym rynku 2 lata później (15).

Aktualnie metoda LAMP stosowana jest w diagnostyce weterynaryjnej, środowiskowej i rolniczej oraz w badaniach żywności. Według dostępnych danych literaturowych, technika ta została zastosowana w identyfikacji zakażeń wirusowych, tj.: wirus grypy A, wirus opryszczki (HSV), wirus Ebola (EV), porowirus świń (PPV), wirus epidemicznej biegunki świń (PEDV), cirkowirus świń typu 2 (PCV2), wirus brodawczaka ludzkiego (HPV) (8), wirus choroby Derzsyego (DDV) (37), wirus afrykańskiego pomoru świń (ASFV) (14), parowirus gęsi (GPV), cirkowirus gęsi (GCV), wirus retikuloendoteliozy (REV) (15).

Znalazła także zastosowanie w identyfikacji zakażeń bakteryjnych powodowanych przez: *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Vibrio cholerae*, *Clostridium difficile*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium botulinum*, *Salmonella*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes* (9).

Stosowana jest również w identyfikacji zakażeń grzybiczych, np.: *Paracoccidioides brasiliensis*, *Candida*, *Pneumocystis pneumonia* oraz pierwotniaków, takich jak: *Toxoplasma gondii*, *Wuchereria bancrofti* i *Plasmodium falciparum* (9), *Babesia canis*, *Eimeria acervulina*, *Eimeria maxima*, *Eimeria necatrix*, *Eimeria tenella* (15).

Dostępne są pojedyncze dane literaturowe na temat zastosowania tej techniki w diagnostyce choroby Mareka u drobiu (4).

LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) jest nowatorską metodą amplifikacji kwasów nukleinowych, przebiegającą w warunkach izotermalnych. W czasie trwania reakcji powstają produkty o różnej wielkości. Są budową wg różnych autorów przypominają łańcuchy-pętle oraz kalafior lub koniczynę. Specyfiką reakcji jest krótki czas amplifikacji, wynikający z braku konieczności cyklicznych zmian temperatur. Reakcja wyróżnia się wysoką czułością, specyficznością i wydajnością. Cechą charakterystyczną tej metody jest również obecność polimerazy DNA o zdolnościach do zastępowania nici oraz zastosowanie kilku specyficznych par starterów (2 lub 3) reakcji dla poszczególnych regionów nici kwasu nukleinowego. Każdy z tych starterów rozpoznaje inny region. W nich można wyróżnić dwa startery zewnętrzne tzw. (outer primer) i dwa startery wewnętrzne tzw. (inner primer).

W pierwszym etapie reakcji kluczową rolę pełnią startery wewnętrzne. Zawierają one sekwencje komplementarne do nici sensownej i antysensownej. Podczas przyłączenia się tych starterów do nici kwasu nukleinowego dochodzi do inicjacji reakcji LAMP.

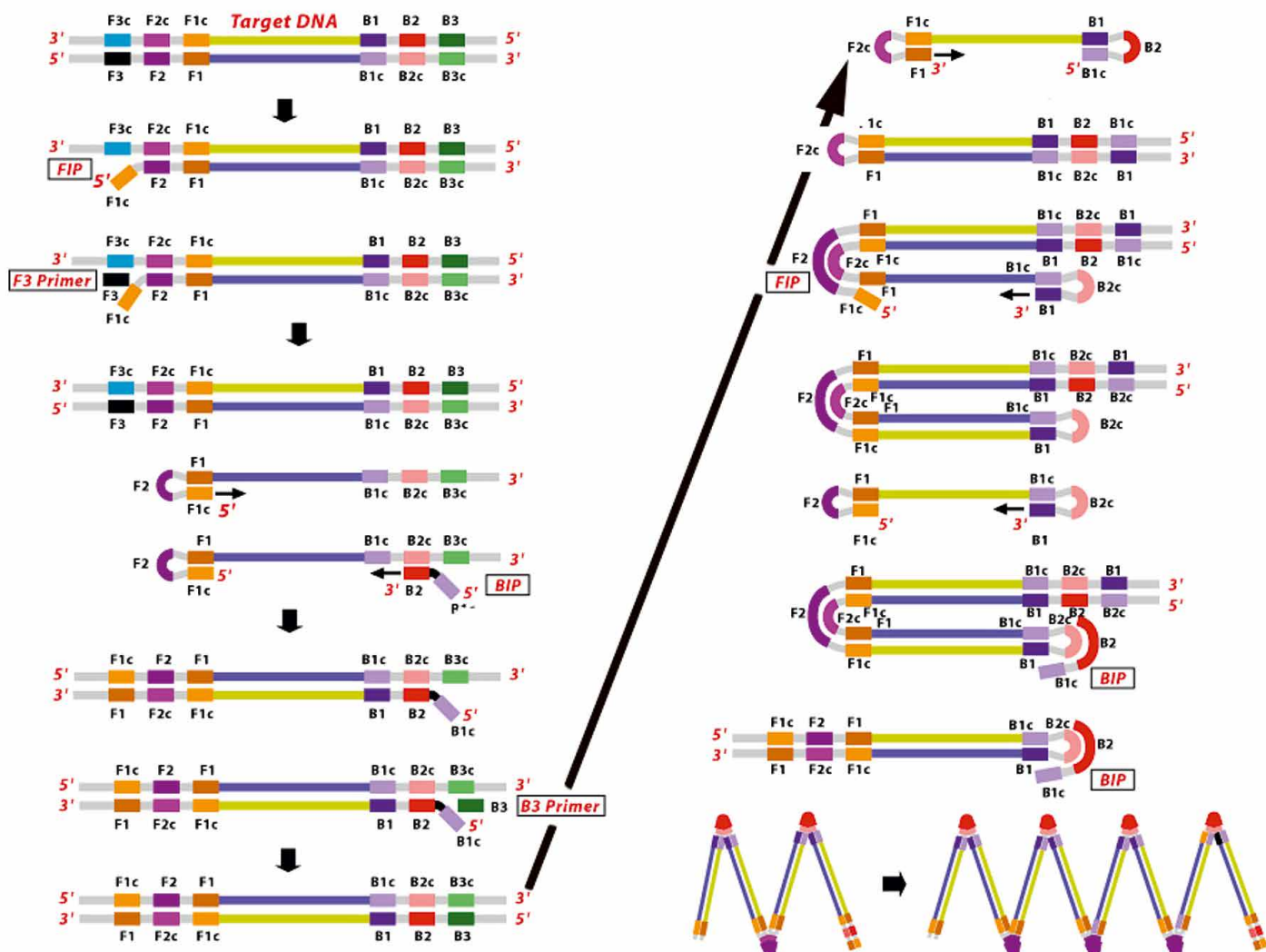
W tym samym czasie równolegle do nici sensownej i antysensownej przyłączają się startery zewnętrzne i następuje ich wydłużanie. Prowadzi to do zastępowania nici kwasu nukleinowego przez nowo syntetyzowaną pojedynczą nić DNA, która stanowi matrycę dla drugiego startera wewnętrznego i zewnętrznego. Elongacja startera zewnętrznego powoduje kolejne zastępowanie nici, wcześniej syntetyzowanej przez starter wewnętrzny, przez nowo powstałą nić dzięki starterowi zewnętrznemu. W końcowym efekcie pierwszego etapu reakcji dochodzi do uwolnienia pojedynczej nici DNA. Powstały ssDNA przypomina strukturę hantli. Nić ta stanowi matrycę dla kolejnego etapu reakcji LAMP (ryc. 3).

W drugiej fazie reakcji LAMP do ssDNA przyłącza się jeden ze starterów wewnętrznych. Następnie starter ten ulega elongacji i ponownie dochodzi do procesu zastępowania nici. Powstające w tym etapie reakcji amplifikowane produkty składają się z na przemian odwróconych powtórzeń ssDNA. Dodatkowo w tym cyklu dochodzi również do uwolnienia struktur, które swym kształtem przypominają lodygo-pętle. Utworzona w drugim etapie reakcji LAMP lodygo-pętla służy jako matryca do trzeciego etapu reakcji.

W trzecim stadium reakcji dochodzi do wydłużenia powstałej lodygo-pętli poprzez przyłączenie się starterów wewnętrznych i do jej recykliczacji. W efekcie powstają struktury przypominające koniczynę lub kalafior. Posiadają one kilka kopii szukanej, amplifikowanej sekwencji (32).

Reakcja LAMP trwa tak długo, aż dojdzie do nagromadzenia się 10^9 kopii sekwencji matrycowej. Taka liczba kopii jest osiągnięta w niespełną jedną godzinę trwania reakcji (17). Zastosowanie polimerazy DNA GspSSD izolowanej z bakterii *Geobacillus* sp. SSD pozwala na szybszą i wydajniejszą amplifikację kwasów nukleinowych w porównaniu z polimerazą DNA – Bst I, natomiast zastosowanie polimerazy GspSSD 2.0 dodatkowo skraca czas reakcji nawet o 30% (9).

Identyfikacja patogenu następuje w kilkanaście do kilkudziesięciu minut w zależności od ilości i długości amplifikowanego regionu DNA (9). Detekcję można przeprowadzić z zastosowaniem elektroforezy w żelu agarozowym oraz „gołym okiem” – poprzez analizę zmętnienia w próbówce lub obserwując świecenie produktów w świetle UV. W tym celu można wykorzystać także dowolnego aparatu Real-Time PCR i dokonać ilościowej oceny produktów reakcji (qLAMP) oraz



Ryc. 3. Zasada działania reakcji LAMP (na podst. 9, http://www.novazym.pl/skrypt_o_LAMP)

analizy krzywych topnienia produktów, jednak są to urządzenia dużo bardziej kosztowne niż klasyczny PCR czy łaźnia wodna. Niemniej zastosowanie takiego sposobu detekcji nie wymaga wizualizacji w żelu agarowym. Reakcja zachodzi w systemie zamkniętym, co zmniejsza ryzyko kontaminacji prób.

Technikę LAMP charakteryzuje bardzo wysoka specyficzność i czułość. Pozwala na detekcję szczepów patogenów nawet na podstawie polimorfizmów pojedynczych nukleotydów (9). Czułość reakcji LAMP w detekcji wirusa MDV jest określana na poziomie od 0,1-2 log₁₀ PFU/ml. Czułość reakcji PCR w detekcji wirusa MDV w odniesieniu do reakcji LAMP jest ok. 10 × niższa (46, 47). Dostępne są także dane literaturowe na temat detekcji wirusów MD z zastosowaniem reakcji real-time PCR (2, 16, 21, 42, 47). Pewnych trudności dostarcza porównanie wyników uzyskanych przez autorów badań. Dostępne wyniki literaturowe podawane są w odmiennych jednostkach np. VCN, jednak ogólnie przyjęty jest fakt, iż technika real-time PCR jest czulsza niż klasyczny PCR, chociaż istnieją jego odmiany jak np. nested-PCR, którego zastosowanie pozwala zwiększyć czułość metody w identyfikacji materiału genetycznego patogenów. Wykazano, że technika LAMP oraz nested PCR jest 100-krotnie czulsza od klasycznej reakcji PCR. Wyniki niektórych badaczy wskazują, iż metod Real-Time PCR jest czulsza od LAMP oraz nested PCR, jednak wymaga stosowania wysoko oczyszczonej matrycy DNA w przeciwieństwie do reakcji LAMP, gdzie reakcję można przeprowadzić nawet na nieoczyszczonym DNA. Porównanie technik qLAMP oraz qPCR w innych badaniach wykazuje wyższą czułość pierwszej techniki od drugiej o ok. 10-100-krotności (13). W przypadku detekcji MDV wykazano, że z zastosowaniem reakcji LAMP można wykryć 10 kopii genu meq wirusa MD w jednej reakcji, podczas gdy reakcja PCR umożliwia wykrycie 100 kopii wym. genu MDV (4). Minimalny próg detekcji wirusa MD z zastosowaniem reakcji real-time PCR oraz barwnika SYBR stanowi 15 kopii genu meq (1). Zdecydowaną przewagą technik qPCR oraz qLAMP nad klasyczną reakcją PCR jest możliwość przeprowadzenia analizy ilościowej oraz weryfikacja specyficzności produktów PCR poprzez analizę krzywych topnienia produktów reakcji.

Metoda ta ma także pewne ograniczenia, które związane są przede wszystkim z projektowaniem starterów reakcji. Zastosowanie kilku par starterów rozpoznających 6-8 miejsc na matrycy z zachowaniem wysokiej specyficzności reakcji wymaga przejrzenia wielu sekwencji docelowych oraz przeprowadzenia różnych eksperymentów. Ponadto, nie dla wszystkich sekwencji DNA reakcja LAMP jest specyficzna i nie można jej wykorzystać do badania nieznanymi sekwencji DNA lub RNA. Autorom nie są znane dane piśmiennictwa potwierdzające możliwość przeprowadzenia reakcji „multi” LAMP, tzn. detekcji kilku fragmentów DNA

czy kilku patogenów w jednej reakcji, dlatego też kontrolę reakcji – amplifikację genu kontrolnego – przeprowadza się w odrębnych probówkach, w przeciwieństwie do klasycznej reakcji PCR czy real-time PCR, w których to amplifikacja genu kontrolnego lub identyfikacja kilku patogenów może zachodzić w jednej reakcji (jednej próbce). Wysoka czułość reakcji zwiększa także ryzyko pojawienia się wyników fałszywie pozytywnych w wyniku kontaminacji prób, dlatego też konieczne jest wydzielenie odrębnych stanowisk pracy dla izolacji oraz amplifikacji badanego materiału.

Podsumowanie

Metoda LAMP jest szybka, tania i skutecznie wpisuje się ogólnoswiatowy trend diagnostyczny, który ma na celu zminimalizować koszty oraz czas, przy zachowanej wysokiej czułości i swoistości badania. Technika ta pozwala na wykrywanie szerokiego grona patogenów zarówno wirusowych, jak i bakteryjnych, grzybiczych oraz pierwotniakowych. Z uwagi na specyfikę reakcji przebiegającej bez konieczności denaturacji DNA oraz zastosowanie polimerazy o aktywności przemieszczania nici ryzyko inhibicji reakcji zostało zminimalizowane praktycznie do zera. Cecha ta jest szczególnie przydatna w identyfikacji wirusa choroby Mareka. Materiał diagnostyczny może stanowić kurz z obiektów inwentarskich, w którym wirus potrafi przeżywać przez wiele miesięcy, co czyni tę technikę szczególnie przydatną w badaniach nad wirusem izolowanym zarówno z materiałów klinicznych, jak i środowiska hodowlanego drobiu.

Piśmiennictwo

1. Abdul-Careem M. F., Hunter B. D., Nagy E., Read L. R., Sanei B., Spencer J. L., Sharif S.: Development of real-time PCR assay using SYBR Green chemistry for monitoring Marek's disease virus genome. *J. Virol. Methods* 2006, 133, 34-40.
2. Adldinger H. K., Calnek B.: Pathogenesis of Marek's disease: early distribution of virus and viral antigens in infected chickens. *J. Natl. Cancer Inst.* 1973, 50, 1287-1298.
3. Anderson D. P., Eidson C. S., Richey D. J.: Age susceptibility of chickens to Marek's disease. *Am. J. Vet. Res.* 1971, 32, 935-938.
4. Angamuthu R., Baskaran S., Gopal D. R., Devarajan J., Kathaperumal K.: Rapid Detection of Marek's Disease Viral Genome in Chicken Feathers by Loop Mediated Isothermal Amplification. *J. Clin. Microbiol.* 2012, 50, 961-965.
5. Baigent S. J., Davison F.: Marek's disease virus: biology and life cycle, [w:] Davidson F., Nair V. (red.): Marek's Disease. Elsevier Academic Press, London 2004, s. 62-76.
6. Baigent S. J., Smith L. P., Nair V. K., Currie R. J. W.: Vaccinal Control of Marek's Disease: Current Challenges and Future Strategies to Maximize Protection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2006, 112, 78-86.
7. Barrow A. D., Burgess S. C., Baigent S. J., Howes K., Nair V. K.: Infection of Macrophages by a Lymphotropic Herpesvirus: A New Tropism for Marek's Disease Virus. *J. Gen. Virology* 2003, 84, 2635-2645.
8. Burgess S. C., Young J. R., Baaten B. J. G., Hunt L., Ross I. N. J., Parcells M. S., Kumar P. M., Tregaskers C., Lee L. F., Davison T. F.: Marek's disease is a natural model for lymphomas overexpressing Hodgkin's disease antigen (CD30). *Proc. Nat. Academy Science USA* 2004, 101, 13879-13884.
9. Burzyński A., Jankowska M.: Amplifikacja in vitro wybranych odcinków DNA i RNA metodą Loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Novasym.* 2014, 4, 1-24.
10. Calnek B. W.: Marek's disease: A model for herpesvirus oncology. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* 1986, 12, 293-320.

11. Calnek B. W.: Pathogenesis of Marek's Disease Virus Infection. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2001, 255, 25-55.
12. Cantello J. L., Parcels M. S., Anderson A. S., Morgan R. W.: Marek's Disease Virus Latency-Associated Transcripts Belong to a Family of Spliced RNAs That Are Antisense to the ICP4 Homolog Gene. *J. Virol.* 1997, 71, 1353-1361.
13. Ciskowicz E.: Wykorzystanie izotermalnej amplifikacji DNA za pośrednictwem pętli w diagnostyce roślin. *Post. Biol. Kom.* 2012, 39, 653-668.
14. Couteaudier M., Denesvre C.: Marek's disease virus and skin interaction. *Vet. Res.* 2004, 45, 1-12.
15. Futoma-Koloch B., Migdal I., Burzyński A., Jankowska M., Woźniakowski G.: LAMP – szybka i specyficzna detekcja patogenów. *Diagn. Laborat.* 2014, 5-6, 32-37.
16. Gopal S., Manoharan P., Kathaperumal K., Chidambaram B., Divya K. C.: Differential Detection of Avian Oncogenic Viruses in Poultry Layer Farms and Turkeys by Use of Multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2012, 50, 2668-2673.
17. James H. E., Ebert K., McGonigle R., Reid S. M., Boonham N., Tomlinson J. A., Hutchings G. H., Denyer M., Oura C. A., Dukes J. P., King D. P.: Detection of African swine fever virus by loop-mediated isothermal amplification. *J. Virol. Methods* 2010, 164, 68-74.
18. Kozdrui W.: Choroba Mareka – problem nadal aktualny. *Pol. Drobiarstwo* 2006, 14, 24-28.
19. Kozdrui W.: Zakażenia herpeswirusowe u drobiu. *Pol. Drobiarstwo* 2012, 19, 30-32.
20. Król K., Samorek-Salamonowicz E., Kozdrui W.: Molekularna charakterystyka genów i białek wirusa choroby Mareka. *Post. Mikrobiol.* 2005, 44, 351-356.
21. Laurent S., Esnault E., Dambrine G., Goudeau A., Choudat D., Rasschaert D.: Detection of Avian Oncogenic Marek's Disease Herpesvirus DNA in Human Sera. *J. Gen. Virol.* 2001, 82, 233-240.
22. Lee L. F., Wu P., Sui D., Ren D., Kamil J., Kung H. J., Witter R. L.: The complete unique long sequence and the overall genomic organization of the GA strain of Marek's disease virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2000, 97, 6091-6096.
23. Lee S. I., Takagi M., Ohashi K., Sugimoto C., Onuma M.: Difference in the Meq Gene between Oncogenic and Attenuated Strains of Marek's Disease Virus Serotype 1. *J. Vet. Med. Sci./Jap. Soc. Vet. Sci.* 2000, 62, 287-292.
24. Lis H., Górski K.: Wyniki badań sanitarno-weterynaryjnych drobiu rzeźnego w Polsce w 2009 r. *Życie Wet.* 2011, 5, 391-393.
25. Liu J. L., Lee L. F., Ye Y., Qian Z., Kung H. J.: Nucleolar and Nuclear Localization Properties of a Herpesvirus bZIP Oncoprotein, MEQ. *J. Virology* 1997, 7, 3188-3196.
26. Marek J.: Multiple Nervenentzündung (Polyneuritis) bei Hühnern. *Dt. Tierarztl. Wschr.* 1907, 15, 417-442.
27. McPherson M. C., Delany M. E.: Virus and Host Genomic, Molecular, and Cellular Interactions during Marek's Disease Pathogenesis and Oncogenesis. *Poultry Sci.* 2016, 00, 1-18.
28. Morimura T., Ohashi K., Sugimoto C., Onuma M.: Pathogenesis of Marek's Disease (MD) and Possible Mechanisms of Immunity Induced by MD Vaccine. *J. Vet. Med. Sci./Jap. Soc. Vet. Sci.* 1998, 60, 1-8.
29. Morrow C., Fehler F.: Marek's disease: a worldwide problem, [w:] Davison F., Nair V. (red.): Marek's Disease. Elsevier Academic Press, London 2004, s. 49-61.
30. Nair V.: Evolution of Marek's disease – a paradigm for incessant race between the pathogen and the host. *Vet. J.* 2005, 170, 175-183.
31. Niikura M., Witter R. L., Jang H. K., Ono M., Mikami T., Silva R. F.: MDV Glycoprotein D Is Expressed in the Feather Follicle Epithelium of Infected Chickens. *Acta Virol.* 1999, 43, 159-163.
32. Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., Yonekawa T., Watanabe K., Amino N., Hase T.: Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000, 28, E63.
33. Payne L. N.: Pathological responses to infection, [w:] Davison F., Nair V. (red.): Marek's Disease. Elsevier Academic Press, London 2004, s. 49-61.
34. Samorek-Salamonowicz E.: Choroba Mareka – obecne zagrożenia oraz strategie prowadzące do lepszego zabezpieczenia stad. *Magazyn Wet.* 2011, 20, 390-394.
35. Samorek-Salamonowicz E.: Choroba Mareka – wybrane zagadnienia. *Med. Weter.* 2009, 65, 812-816.
36. Samorek-Salamonowicz E., Król K., Kozdrui W.: Choroba Mareka – patogenesa, klinika, immunoprofilaktyka i aktualna sytuacja w Polsce. *Pol. Drobiarstwo* 2008, 16, 64-66.
37. Schat K. A., Nair V.: Marek's disease, [w:] Y. M. Saif. (red.): Diseases of Poultry. Blackwell Publishing, USA 2008, s. 452-514.
38. Schat K. A., Xing Z.: Specific and Nonspecific Immune Responses to Marek's Disease Virus. *Develop. Comp. Immunol.* 2000, 24, 201-221.
39. Szeleszczuk P., Karpińska E., Kosowska G., Malicka E., Żbikowski A.: Przypadek choroby Mareka u kurcząt brojlerów – opis zmian sekcyjnych. *Magazyn Wet.* 2005, 14, 54-57.
40. 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. Puławy* 2013, 57, 19-23.
41. Tulman E. R., Afonso C. L., Lu Z., Zsak L., Rock D. L., Kutish G. F.: The genome of a very virulent Marek's disease virus. *J. Virol.* 2000, 74, 7980-7988.
42. Walkden-Brown S. W., Islam A. F., Groves P. J., Rubite A., Sharpe S. M., Burgess S. K.: Development, application, and results of routine monitoring of Marek's disease virus in broiler house dust using real-time quantitative PCR. *Avian Dis.* 2013, 57, 544-554.
43. Witter R. L.: Increased Virulence of Marek's Disease Virus Field Isolates. *Avian Diseases* 1997, 41, 149-163.
44. Witter R. L.: The changing landscape of Marek's disease. *Avian Pathol.* 1998, 27, 46-53.
45. Witter R. L., Schat K. A.: Marek's disease, [w:] Saif Y. M. (red.): Diseases of Poultry. Iowa State University Press, USA 2001, s. 407-465.
46. Woźniakowski G., Niczyporuk J. S.: Detection of specific UL49 sequence of Marek's disease virus CVI988/Rispens strain using loop-mediated isothermal amplification. *J. Virol. Methods* 2015, 221, 22-28.
47. Woźniakowski G., Samorek-Salamowicz E., Kozdrui W.: Comparison of loop-mediated isothermal amplification and PCR for the detection and differentiation of Marek's disease virus serotypes 1, 2, and 3. *Avian Dis.* 2013, 57, 539-543.
48. Zelnik V.: Marek's disease virus research in the postsequencing era: new tools for the study of gene functions and virus-host interactions. *Avian Pathol.* 2003, 32, 323-333.

**Adres autora: dr n. biol. Agata Józefiak, ul. Wołyńska 35, 60-637 Poznań;
e-mail: agata.jozefiak@up.poznan.pl**