

# Wykrywanie i charakterystyka szczepów wirusa myksomatozy królików z zastosowaniem metod molekularnych

## Streszczenie

Myksomatoza należy do najgroźniejszych zakaźnych chorób wirusowych królików. U chorych zwierząt obserwuje się zmiany w postaci guzów, obrzęki skóry i tkanki podskórnej, a także objawy związane z wtórnymi zakażeniami bakteryjnymi. Inną kliniczną formą choroby jest postać atypowa, która charakteryzuje się brakiem lub niewielkimi zmianami na skórze, natomiast zmiany zapalne głównie dotyczą płuc. Ze względu na możliwy atypowy przebieg choroby, jak również pojawianie się przypadków myksomatozy poszczepiennej konieczne jest wprowadzenie metod diagnostycznych, które pozwolą na szybkie rozpoznanie i umożliwią podjęcie stosownych działań zmierzających do ograniczenia rozprzestrzeniania się wirusa w stadzie. Dlatego też celem pracy było opracowanie i zastosowanie metod molekularnych, opartych na amplifikacji kwasów nukleinowych w warunkach *in vitro*, do przyżyciowej i pośmiertnej diagnostyki myksomatozy, a także do różnicowania zjadliwych i atenuowanych szczepów wirusa. Z kolei brak danych naukowych nt. zmienności genetycznej krajowych szczepów wirusa myksomatozy (MYXV) stanowił podstawę do podjęcia badań nad ich molekularną charakterystyką.

Do badań użyto referencyjny szczep Lausanne MYXV, atenuowane szczepionkowe szczepy wirusa, szczepy pochodzące z ognisk choroby stwierdzanej w Polsce od roku 1983 i wymazy z worka spojówkowego chorych na myksomatozę zwierząt. Na podstawie przeprowadzonej analizy sekwencyjnej 24 różnych fragmentów genów, zjadliwych i atenuowanych szczepów wirusa, zaprojektowano startery w obrębie genu M071L, które zastosowano w metodzie IAC-PCR („diagnostyczny” IAC-PCR) do wykrywania zakażeń MYXV u królików. Z kolei zmiany nukleotydowe obserwowane w genie M009L w szczepach szczepionkowych umożliwiły dobór kolejnej pary starterów, które przyłączały się do specyficznej sekwencji genomowego DNA obecnej w zjadliwych szczepach wirusa pozwalając na ich różnicowanie z atenuowanymi szczepami MYXV w „różnicującym” IAC-PCR. Ze względu na często obserwowaną inhibicję reakcji enzymatycznych metod molekularnych i związane z tym ryzyko otrzymywania fałszywie ujemnych wyników badań, zaprojektowano, a następnie włączono w przebieg analiz kontrolę wewnętrzną amplifikacji (IAC). Opracowane

metody IAC-PCR („diagnostyczny” i „różnicujący”) potwierdziły swoją przydatność do przyżyciowej i pośmiertnej diagnostyki choroby, jak również do różnicowania atenuowanych i zjadliwych szczepów wirusa. IAC-PCR „diagnostyczny” służący do wykrywania zakażeń MYXV u królików poddano walidacji, w której określono następujące parametry: specyficzność (ASp) i czułość analityczną (ASe), specyficzność (DSp) i czułość diagnostyczną (DSe), dokładność (AC), a także powtarzalność i odtwarzalność. Przeprowadzone analizy wykazały 100% specyficzność i czułość metody z limitem detekcji na poziomie 10 TCIU/ml zawiesiny wirusa. Badania wykonane na etapie przedwalidacyjnym, a następnie właściwej walidacji również potwierdziły odporność testu na zmianę warunków prowadzenia reakcji i jego niską wrażliwość na obecność w środowisku reakcji substancji, które mogą zakłócać przebieg amplifikacji. Opracowana metoda charakteryzuje się wysoką selektywnością ze 100% zgodnością otrzymanych wyników w badaniu powtarzalności i odtwarzalności.

Zgodnie z wymaganiami OIE dotyczącymi walidacji metod laboratoryjnych, wartość diagnostyczną metody oceniano na podstawie badania próbek tkanek zwierząt zawierających niską i wysoką koncentrację wirusa oraz tkanek pobranych od padłych królików z ognisk myksomatozy. Oceniano DSe „diagnostycznego” IAC-PCR w porównaniu do testu AGID uznanego za „złoty standard” w laboratoryjnej diagnostyce zakażeń MYXV. Do analizy wyników parametrów walidacyjnych użyto metod statystycznych. W przypadku analizy próbek o wysokiej koncentracji wirusa, tj. zawierających co najmniej 3125 PCRU, IAC-PCR charakteryzował się podobną wartością DSe w porównaniu do testu AGID ( $Kappa = 1,0$ ). W przypadku próbek o niskiej zawartości wirusa (1 PCRU), 100% czułość posiadała tylko metoda IAC-PCR. Biorąc pod uwagę wyniki analiz zarówno próbek tkanek zwierząt o znanej koncentracji wirusa, jak i pochodzących z ognisk myksomatozy, zgodność pomiędzy porównywanymi metodami była przeciętna ( $Kappa = 0,423$ ). Najbardziej prawdopodobna wartość DSe dla metody IAC-PCR przy zakładanym 95% przedziale ufności wynosiła 0,976 (0,914 - 1,00), natomiast wartość DSp była równa 0,955 (0,839 - 0,999). Analizując wyniki czułości ocenianych metod stwierdzono, że w przypadku 95% badanych próbek, które będą zawierać wyższą koncentrację wirusa niż 3125 PCRU, liczba próbek uznanych za fałszywie ujemne w teście AGID wynosić będzie 12%. Natomiast wszystkie próbki zostaną prawidłowo zidentyfikowane metodą IAC-PCR.

W dalszej części badań przeprowadzono analizę filogenetyczną w oparciu o sekwencje nukleotydowe fragmentu genu M036L szczepów MYXV krążących w Polsce od

1983 r. i zagranicznych szczepów wirusa. Stwierdzono wysokie, tj. 99% wzajemne podobieństwo krajowych szczepów MYXV krążących w różnych regionach Polski. Szczepy te wykazały również wysokie, co najmniej 95% podobieństwo do zagranicznych szczepów MYXV, chociaż było ono wyższe w stosunku do szczepów wykrywanych na terenie Europy (Hiszpania, Wielka Brytania) niż w Australii. Analiza filogenetyczna potwierdziła pochodzenie polskich szczepów, które podobnie jak i inne europejskie szczepy wirusa wywodzą się ze szczepu Lausanne, wprowadzonego do Europy w celu eradykacji nadmiernej populacji dzikich królików. Niska zmienność w obrębie analizowanych genów wirusa pozwala sądzić, że komercyjnie dostępne szczepionki nadal zapewniają skuteczną ochronę przed wystąpieniem klinicznej postaci choroby.

## Summary

Myxomatosis is a highly infectious viral disease reported in wild and farmed rabbits worldwide. The typical nodular form of the disease is characterized by swelling and large myxomas over the whole body as well as conjunctivitis with purulent ocular and nasal discharge. The atypical form of the disease is associated with lung infections while nodular skin changes are limited or absent. Diagnosis of the atypical form of the disease is difficult, and the occurrence of myxomatosis in rabbits after administration of vaccines containing live attenuated virus can even complicate disease recognition. For these reasons it is necessary to use sensitive diagnostic methods known to be able to detect and identify the virus strains. Diagnosis of the disease and subsequent application of the appropriate control measures will limit the spread of the virus in the herd when they are timely. The aim of the study was the development and application of PCR-based assays for intravital and postmortem detection of myxomatosis, as well as for identification of and differentiation between wild-type and attenuated strains of myxoma virus (MYXV). Advocating this work further was the lack of scientific data on genetic variation among Polish wild-type MYXV strains, which triggered studies on their molecular characteristics.

The reference MYXV Lausanne strain, attenuated vaccine strains, and wild-type virus strains responsible for outbreaks of disease in Poland since 1983 were used in the studies. In addition, conjunctival swabs taken from animals showing signs of myxomatosis were also included in the analysis. On the basis of the nucleotide sequence analysis of 24 different gene fragments of the wild-type and vaccine virus strains, a primer pair targeting the M071L virus gene was designed and subsequently used in a “diagnostic” internal amplification control PCR (IAC-PCR) for detection of MYXV infections in rabbits. Likewise the nucleotide changes observed in the M009L gene sequences of the attenuated vaccine strains allowed the selection of other primer set for use in the next IAC-PCR developed for the differentiation of wild-type and vaccine MYXV strains. These primers only recognised a specific genomic DNA sequence of the wild-type strains. To control possible inhibition of molecular methods and to reduce the risk of getting false negatives, an IAC was developed and incorporated into the molecular methods. The elaborated “diagnostic” and “differentiating” IAC-PCRs confirmed their applicability for virus detection in outbreaks of myxomatosis as well as for differentiation of wild-type from

attenuated vaccine strains. Furthermore, the “diagnostic” IAC-PCR was validated to confirm its suitability for the detection of rabbit myxomatosis. The validation process included an assessment of the method’s analytical and diagnostic specificity (ASp, DSp) and sensitivity (ASe, DSe), accuracy (AC), and its repeatability and reproducibility. The validation demonstrated that the method possessed 100% specificity and sensitivity, and established the detection limit at the level of 10 TCID<sub>50</sub>/ml of the virus in tested suspension. Moreover, the high robustness of the method under changing reaction conditions and to the presence of inhibitory substances that may hinder the amplification was confirmed. The developed method is characterized by high selectivity and 100% repeatability and reproducibility of the results.

According to the OIE requirements relating to the validation of each diagnostic assay, the applicability of the elaborated IAC-PCR should be evaluated through testing of spiked samples with known virus concentrations along with animal tissues taken from rabbits dead in myxomatosis outbreaks. The DSe of the IAC-PCR was compared to an AGID test considered the “gold standard” assay commonly used for detection of MYXV infections, and the validation parameters were assessed using appropriate statistical methods. The DSe for IAC-PCR was comparable to the AGID test (Kappa = 1.0) only when the tested samples contained a high virus concentration (i.e. at least 3125 PCRU). However, if samples contained a low amount of the virus (1 PCRU), only the IAC-PCR possessed 100% sensitivity. Taking into account the results obtained for both types of analysed samples (tissues with known virus concentration and outbreak samples) the methods’ concordance was average (Kappa = 0.423). The most probable DSe value for IAC-PCR was 0.976 (0.914 - 1.00) with 95% confidence interval, while the calculated DSp value was 0.955 (0.839 - 0.999). Based on the comparison of the methods’ sensitivities, the predicted percentage of misidentified samples would be 12% for the AGID test, assuming that 95% of these samples contained a higher concentration of the virus than 3125 PCRU. However, when using the IAC-PCR all samples would be properly identified.

In addition, a phylogenetic analysis of the nucleotide sequences of the M036L gene fragment for the foreign and Polish MYXV strains circulating since 1983 was conducted. Between Polish strains circulating in different regions of the country, the similarity found was 99%. These strains also showed at least 95% similarity to foreign MYXV strains and especially to the European virus strains. The phylogenetic analysis

revealed that Polish and other European MYXV strains originate from the Lausanne virus strain, which was introduced into Europe to eradicate the growing population of wild rabbits. The low variability observed within the analyzed genes of Polish MYXV strains suggests that commercially available vaccines should still effectively protect rabbits against the disease.