

DNA-basert diagnostikk på *Toxoplasma gondii* hos sau

WENCHE OKSTAD TORSTEINBØ¹, KJETIL BÅRDSSEN¹, ELI BRUNDTLAND¹ OG JOSTEIN BJØRRLAND¹

Norges veterinærhøgskole, Institutt for produksjonsdyrmedisin, Seksjon for småfeforskning og dyrehelse, Høyland feltstasjon, 4325 Sandnes¹

Innledning

Infeksjon med *Toxoplasma gondii* er utbredt hos sau i Norge og er en hyppig årsak til kasting i mange land. Den encellede parasitten kan infisere alle fugler og pattedyr, også menneske. Kattedyr er endeverter, mens andre arter fungerer som mellomverter. Mottagelige søyer kan smittes i løpet av de 3-4 første månedene av drektigheten. Parasitten inntas gjennom fôr og vandrer gjennom forskjellige stadier fra tarmen og ut i vevene hvor den kapsler seg inn og danner vevscyster. Sauen blir bærer på livstid og dermed immun mot reinfeksjon (Buxton et al, 2007).

Seksjon for småfeforskning og dyrehelse har utstyr for å utføre DNA-basert diagnostikk. Real-time PCR har i de siste 2 år blitt utprøvd for påvisning av *T. gondii* i hjernevev fra kastefoster og i fosterhinner fra mordyret.

Vevscystene i kastefoster kan være vanskelige å påvise, noe vi har erfart i tidligere arbeid ved å sammenligne tradisjonell PCR og musepodning. PCR har gitt relativt mange falske negative resultater sammenlignet med musepodning som regnes som gullstandard. Med dette som bakgrunn ble det i denne undersøkelsen brukt varierende mengder vev til DNA-isolering med tanke på å øke sensitiviteten til real-time PCR. I tillegg var hensikten vært å sammenligne to ulike oppsett av real-time PCR til diagnostikk av *T. gondii* hos sau.

Materiale og metoder

Materiale

Hjernevev fra aborterte foster og kotelydoner fra mordyrets fosterhinner ble fryst på – 18 °C etter obduksjonen.

PCR betingelser

To ulike PCR oppsett (A og B) ble gjennomført på templatere fra samme DNA-isoleringer:

A. SYBR Green I Master for LightCycler[®] 480 (Roche), betegnet SYBR, med primere som påviser den repeterbare B1 gensekvensen (amplikon) som er spesifikk for *T. gondii* (Pelloux et al, 1996, Wastling et al, 1993). Standardkurve for

kvantifisering er produsert ved laboratoriet og inneholder 10-600 molekyler av repeterbar B1 sekvens.

B. *T. gondii* LightMix[®] kit (TIB Molbiol) med LightCycler[®] 480 Probes Master (Roche) med FRET prinsipp (Aldape et al, 2002), betegnet LightMix, har ukjente *T. gondii* primere, men gjenkjennbart fragment i toksoplasmagenomet har angitt størrelse på 134 bp. Kittet inneholder ferdig standardkurve på 10^1 - 10^6 *T. gondii* DNA kopier.

For begge oppsettene ble det brukt en positiv kontroll fra podede mus (stamme T45) pluss en negativ kontroll (RNase-fritt vann). PCR ble utført etter anbefalt prosedyre for SYBR og LightMix. Beregning av resultatene på real-time PCR ble gjennomført ved absolutt kvantifisering hvor standardkurvens CP (crossing point) legges til grunn for beregning av prøvenes CP. Utbyttet av PCR amplifiseringen bør ligge på ca 2. For SYBR er det mulig å utføre en smeltepunktanalyse i tillegg til real-time PCR for å verifisere riktig produkt.

Vevsbetingelser

Analysene ble utført ved bruk av ulike mengde vev (Metode 1 og 2), ulike typer og mengde lyseringsbuffer, forskjellig mekanisk forbehandling (knusing av vev), samt forskjellige inkuberings temperaturer. DNA-konsentrasjonen ble målt i et Qubit Fluorometer.

Resultater

Ulike PCR betingelser

CP-verdiene for prøvene ved LightMix ligger jevnt over lavere enn ved SYBR. Totalt var 8 prøver negative på begge metodene. Videre var én prøve negativ på SYBR men klart positiv på Lightmix PCR, mens en annen prøve var positiv (under 10 kopier som er laveste standard) på SYBR og negativ på LightMix PCR. De resterende prøvene var positive på begge metodene.

Ulike vevsbetingelser

I Metode 1 (0.025 g vev) var 33 % positive på kotyledon mot 29 % i Metode 2 (1.0 g vev). Resultatene fra hjerne var i antall de samme for begge metodene, men to prøver gav ulike resultat for de to metodene (Se Tabell 1 *).

Forsøket gav samsvar mellom resultatene for kotyledonene og hjernematerialet til fosteret fra samme mordyr (resultatene ikke vist i Tabell 1)..

Tabell 1. Resultater av real-time PCR Lightmix ved to metoder (Metode 1 og 2) basert på ulik mengde og forbehandling av vev. Tallene viser antall, med % i parentes. N=21.

Metode	Kotyledon		Hjerne*	
	Positiv	Negativ	Positiv	Negativ
Metode 1	7 (33)	0 (0)	8 (38)	6 (29)
Metode 2	6 (29)	1 (5)	8 (38)	6 (29)

Diskusjon og konklusjon

For å få et hurtig svar på hvorvidt kasting i flokken skyldes infeksjon med *T. gondii*, gir DNA-basert diagnostikk nye muligheter sammenlignet med musepoding. Vår undersøkelse demonstrerer bruk av to PCR-metoder som begge var sensitive ned til laveste standard (10 kopier av *T. gondii* sekvensen). Likevel gav LightMix prober med FRET prinsippet et mer spesifikt og kvantitativt høyere resultat enn SYBR, hvor probene binder seg til alt dobbeltrådig DNA. Bruk av SYBR krevde også hyppigere fortynninger av templat. En annen undersøkelse (Masala et al, 2003) viste at en B1 PCR var sensitiv ned til 10 parasitter i kotyledoner, og var like sensitiv som musepoding. Toxo LightMix med real-time PCR detekterte og kvantifiserte mengden *T. gondii* i vev ned til 0,1 pg av genomisk DNA av parasitten.

Tidligere sammenligninger av våre ulike PCR metoder og musepoding har resultert i en del falske negative PCR resultater. Siden musepoding krever ferskt materiale (levende parasitter), har PCR den fordel at den kan detektere døde parasitter. Problemstillingen blir å finne ut hvorfor forekomst av vevscyster ikke nødvendigvis lar seg påvise ved PCR. En forklaring kan være at mengde vev brukt til DNA-isolering er for liten, eller at knusingen av vevet ikke er tilfredsstillende. Derfor økte vi mengde vev (Metode 2), brukte forskjellige lyseringsbuffer og knuste vevet med keramiske kuler og høy hastighet. Utbyttet av DNA-isoleringen var som forventet høyere ved bruk av metode 2, med mulighet for høyere forekomst av *T. gondii* DNA. Resultatene viste at denne endringen av vevsmengde og templat ikke hadde vesentlig betydning.

Det gjenstår å finne ut om LightMix real-time PCR, som synes å være den mest spesifikke metoden, kan erstatte musepodingene. Videre arbeid blir å optimalisere ytterligere gjennom gjentatte real-time PCR analyser og sammenligne metoden med musepoding.

Referanser

Aldape K.,Ginzinger D. G., Godfrey T. E.,2002 Real-time Quantitative Polymerase Chain Reaction: A Potential Tool for Genetic Analysis in Neuropathology. Brain pathol 2002;12:54-66.

Buxton et al. 2007. Toxoplasma gondii and ovine toxoplasmosis: New aspect of and old history. Veterinary Parasitology 149 (2007)25-28.

Masala G., et al. 2003. Survey of ovine and Caprine toxoplasmosi by IFAT and PCR assays in Sardinia, Italia. Vet.Parasitol. 2003 Nov 3;-117(1-2):15-21

*Pelloux et al 1996 A new set of primers for the detection of Toxoplasma gondii in amniotic fluid using polymerase chain reaction. FEMS Microbiology Letters 138 (1996)11-45.
44,3 % av 194 flokker var seropositive for T.gondii*

Wastling J.M , Nicoll S.,og Buxton D., 1993. Comparison of two gene amplification methods for the detection of Toxoplasma gondii in experimentally infected sheep. J.Med. Microbiol.-Vol.38 (1993), 360-365