

ZYG MUNT PEJS AK

## Zastosowanie testu immunoperoksydazowego do wykrywania obecności wirusa pomoru klasycznego świń \*)

Zakład Chorób Świń Instytutu Weterynarii, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

### Summary

#### The application of peroxidase linked assay for the detection of hog cholera virus (HCV)

With immunofluorescence techniques large foci are visible in frozen sections of the tonsils and spleen of pigs infected with virulent strains of HCV. Low or moderate-virulent strains induce small, weakly fluorescent foci under the same conditions. This sometimes causes diagnostic problems. Therefore, under such conditions, isolation of virus in cell cultures should be applied for HC diagnosis. The culture might be examined for the presence of HCV by direct IFT using immunoenzymatic methods (PLA). The usefulness of the PLA for the diagnosis of HC was compared with IFT. Forty samples of tonsils, spleens and kidneys were collected from 10 pigs experimentally infected and from 5 field cases of HC. Isolation was performed on rapidly growing PK-15 cells seeded in flat bottomed microtitre plates. The cultures after 48 h were fixed and stained with hiperimmune porcine HC antiserum and after that with anti-porcine IgG-HRPO conjugate. The results were read microscopically using 50 × magnification. The results were considered positive if stained reddish-brown infected cells were detected. The applied immunoenzymatic method enables the detection of HCV in all samples, from experimentally infected pigs and field cases of HC. Using IFT, in some cases, it was difficult to determine exactly the results of examination.

Pomór klasyczny świń (pkś) nie przestaje być w Europie jedną z najgroźniejszych chorób zakaźnych i zaraźliwych wspomnianego gatunku zwierząt. Jak wskazują na to dane przedstawione w trakcie ostatniego (maj, 1992) spotkania epizootologów z krajów EWG w Brukseli (9), chorobę tę stwierdzano w 1991 roku w większości krajów zachodnioeuropejskich. Dla przykładu we Francji zarejestrowano 48, w Niemczech 8, a w Holandii 3 przypadki pkś. W 1992 roku ogniska tej zarazy zdiagnozowano m.in. w Czecho-Słowacji — do maja, 33 przypadki (9), a także w naszym kraju (8).

Problemem epizootycznym, komplikującym zwalczanie pkś, jest coraz częstsze występowanie średnio i mało zjadliwych szczepów wirusa pomoru, czego konsekwencją jest pojawienie się mało typowych przypadków tej choroby (1, 11). Wspomniane szczepy pkś charakteryzują się właściwościami biologicznymi utrudniającymi rutynową diagnostykę laboratoryjną omawianej choroby, opierającą się przede wszystkim na wykrywaniu obecności antygeny wirusowego przy pomocy techniki immunofluorescencyjnej — IF (5). Wykazano bowiem, że przy badaniu materiału biologicznego pochodzącego od świń zainfekowanych mało lub średnio zjadliwymi szczepami wirusa pkś, w badaniu IF obserwuje się jedynie małe, charakteryzujące się słabo wyrażoną intensywnością świeceń, ogniska fluorescencyjne (1).

Biorąc pod uwagę konieczność usprawnienia diagnostyki pkś podjęto próbę zastosowania w tym celu testu immunoperoksydazowego (3). Metoda ta umożliwia na-

mnożenie wirusa *in vitro*, co z kolei ułatwia jego wykrycie przy pomocy metod immunoenzymatycznych.

W prezentowanej pracy przedstawiono zasady wykonania testu oraz wyniki jego zastosowania w diagnostyce pkś.

### Materiał i metody

Zwierzęta. Do badań użyto 10 warchlaków o masie ciała (m.c.) około 35 kg, nie szczepionych przeciw pomorowi. Świnie te zakażono zjadliwym szczepem Washington wirusa pkś, dawką 100 000 dawek zakaźnych (ID<sub>50</sub>) na zwierzę. Wszystkie zakażone warchlaki zachorowały i padły w ciągu 6—14 dni po infekcji z typowymi dla pomoru objawami klinicznymi i zmianami sekcijnymi.

Materiał do badań. Od każdej padłej świni do badań laboratoryjnych pobrano wycinki migdałków, nerek i śledziony. W badaniach wykorzystano również wycinki migdałków i nerek pobrane od 5 świń padłych, z objawami pkś, w warunkach terenowych. Jako kontroli użyto w badaniach próbek tych samych narządów pobranych od 5 świń klinicznie zdrowych. W sumie do badań wykorzystano 40 prób materiału biologicznego pobranego od 15 świń zakażonych różnymi szczepami wirusa pomoru oraz 10 prób uzyskanych od świń zdrowych. Do momentu podjęcia badań laboratoryjnych materiał biologiczny przechowywano w -70°C.

Postępowanie. Wszystkie pobrane próby przebadano w kierunku obecności wirusa pkś przy pomocy testu immunoperoksydazowego (peroxidase linked assay — PLA). Uzyskane rezultaty porównano z wynikami IF; badania IF w kierunku obecności antygeny wirusa pkś, w badanym materiale, wykonywano zgodnie ze stosowaną instrukcją (5).

### Wykonanie testu immunoperoksydazowego.

#### I. Bufory i reagenty

1. Bufor do płukania: NaCl — 8,85 g; Tween 80 — 5,0 ml; H<sub>2</sub>O — dest. — do 1000 ml, (pH buforu — 7,6, ustalano używając nasyconego roztworu Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>).

2. Bufor do rozcieńczania koniugatu/surowicy: NaCl — 29,5 g; Tween 80 — 10,0 ml; H<sub>2</sub>O dest. — do 1000 ml. (pH buforu — 7,6 ustalano jak uprzednio).

3. Bufor do utrwalania: 30% roztworu acetonu w płynie fizjologicznym o pH 7,2.

4. Bufor octanowy: A. CH<sub>3</sub>COOH — 2,86 ml; H<sub>2</sub>O dest. do — 1000 ml. B. CH<sub>3</sub>COOH × H<sub>2</sub>O — 13,6 g; H<sub>2</sub>O dest. — do 2000 ml. Bufor B mieszano z buforem A aż do uzyskania pH 5,0.

5. Substrat. 3-amino-9 ethylcarbazole — 2 mg rozpuszczano bezpośrednio przed użyciem w 0,3 ml dimethylformamide; następnie mieszano z 5 ml 0,05% buforu octanowego o pH 5,0. Przed użyciem dodawano 50 μl 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

6. Wysokowartościowa surowica świń immunizowanych szczepionką Lapest i zakażonych zjadliwym szczepem Washington wirusa pkś; (rozcieńczana 1:100 lub 1:200 w zależności od miana, w buforze do rozcieńczania).

7. Koniugat — znakowana peroksydazą chrzanową surowica królicza skierowana przeciwko IgG świni (producent Dakopats, Dania).

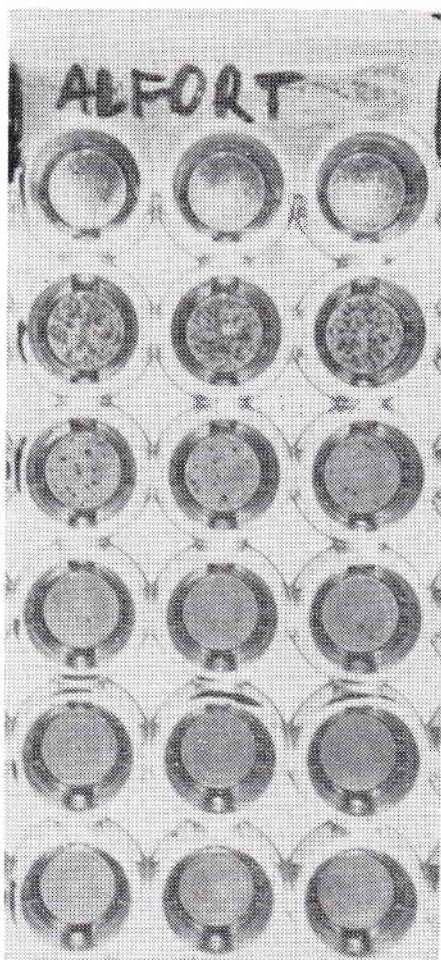
\*) Praca została wykonana w ramach realizacji projektu PL-ARS-153, we współpracy z National Animal Disease Center, Ames Iowa, USA, finansowanego przez II Polsko-Amerykański Wspólny Fundusz im. M. Skłodowskiej-Curie.

## II. Wykonanie odczynu.

1. Przygotowanie materiału do badań. Bezpośrednio przed badaniem przygotowano oddzielnie zawiesiny z migdałków, śledziony oraz nerek padłych zwierząt. Zawiesiny wykonano zgodnie z powszechnie obowiązującymi zasadami (6). Poszczególne supernatanty z odwirowanych zawiesin rozcieńczano w probówkach: 1:5, 1:10, 1:100, 1:1000, w płynie Eagla, bez dodatku surowicy.

2. Przygotowanie hodowli komórkowej. W badaniach wykorzystano zawiesinę komórek linii PK-15 o koncentracji około 150.000 komórek/1 ml; komórki zawieszono w płynie E/E zawierającym 10% surowicy cielęcej, bez przeciwciał dla wirusa wirusowej biegunki bydła i wprowadzono w ilości po 150  $\mu$ l do wszystkich baseników mikroplątki o płaskim dnie (Nunclon).

3. Zakażenie hodowli komórkowej badanym materiałem. Do trzech pierwszych baseników pierwszego rzędu mikroplątki wprowadzono po 50  $\mu$ l rozcieńczonego 1:5 badanego materiału; następne rozcieńczenie — 1:10 wprowadzono do trzech pierwszych baseników drugiego rzędu itd. W sumie do zbadania jednej próby wykorzystywano 12 baseników. Kontrolę testu stanowiły baseniki z hodowlą zakażoną znanym wirusem pkś, w rozcieńczeniach od  $10^{-1}$  do  $10^{-8}$ , każde rozcieńczenie w trzech powtórzeniach oraz baseniki z samymi komórkami. Po przykryciu mikroplątkę inkubowano w warunkach  $CO_2$  przez 48—72 godz. w  $37^\circ C$ .



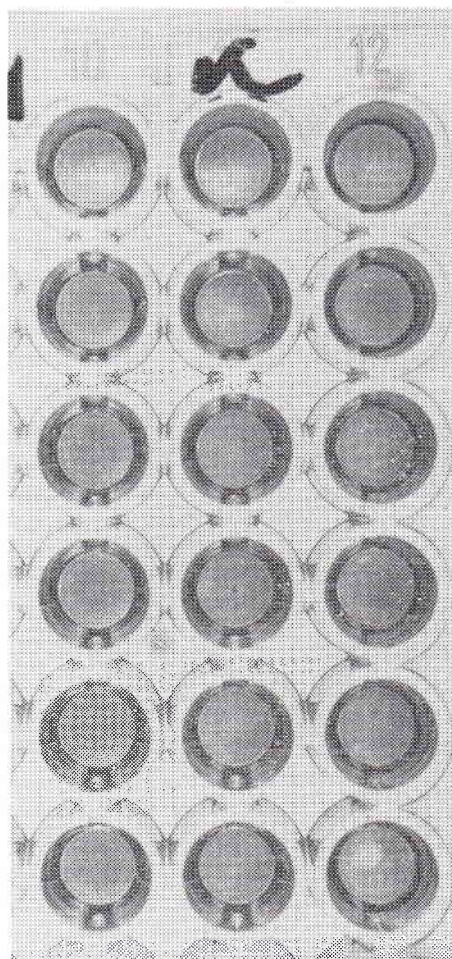
Ryc. 1. Mianowanie wirusa pkś, szczep Alfort (wstępny pasaż). W basenikach mikroplątki widoczne są brązowo-czerwone złogi kompleksów, antygenu wirusowego z przeciwciałami, zlokalizowanych w cytoplazmie komórek hodowli PK-15

4. Utrwalanie. Po inkubacji zlewano z mikroplątki płyn hodowlany i przepłukiwano jednokrotnie buforem do utrwalania, następnie tym samym buforem zalewano baseniki mikroplątki na 10 minut. Po zlaniu buforu płytkę osączano i suszono przez co najmniej 2 godziny pod lampą (20—25 cm od żarówki 60 W).

5. Barwienie. Do wszystkich baseników wlewano po 50  $\mu$ l surowicy świni zawierającej przeciwciała dla pkś, po tym inkubowano mikroplątkę na wytrząsarce, pod lampą j.w. przez 20 minut; z kolei mikroplątkę płukano  $3 \times 5$  minut w buforze do płukania, osączano na bibule i wprowadzano do wszystkich baseników po 50  $\mu$ l koniugatu rozcieńczonego w zależności od zaleceń producenta. Zawartość mikroplątki inkubowano z koniugatem w warunkach podanych uprzednio. Po inkubacji mikroplątkę płukano  $3 \times 5$  min. w buforze do płukania. Po osączeniu mikroplątki do wszystkich baseników wlewano po 50  $\mu$ l substratu (przygotowanego bezpośrednio przed użyciem) i inkubowano do momentu pojawienia się barwnych złogów w basenikach z kontrolą dodatnią (czas inkubacji około 10—20 minut); reakcję zatrzymywano przez jednokrotne przepłukanie mikroplątki płynem fizjologicznym i ponowne wlanie 100  $\mu$ l tego płynu do baseników.

6. Odczytywanie wyników. Rezultaty testu odczytywano przy użyciu mikroskopu odwróconego Telaval 3 (Carl Zeiss Jena) przy powiększeniu 50—100 razy.

Interpretacja wyników. Badaną próbę uznawano za pkś dodatnią w przypadku stwierdzenia przynajmniej w jednym z 12 baseników, w których badano materiał, brązowo-czerwonych złogów, czyli kompleksów anty-



Ryc. 2. Kontrola mianowania. Nie zakażona wirusem pkś hodowla komórek PK-15, brak złogów

genu wirusowego ze swoistymi przeciwciałami. Złogi te były zlokalizowane w cytoplazmie komórek hodowli PK-15 (ryc. 1). Badaną próbę uznawano za ujemną, jeżeli w basenikach z badanym materiałem nie stwierdzano opisanych uprzednio złogów, a inkubowana z badanym materiałem biologicznym hodowla komórek PK-15 charakteryzowała się wyglądem typowym dla hodowli nie zakażonej (ryc. 2).

### Wyniki i omówienie

Przy pomocy testu PLA wykazano obecność wirusa pks we wszystkich 30 próbach pobranych od świń zakażonych doświadczalnie oraz we wszystkich próbach pochodzących z terenu. W materiale biologicznym pobranym od zwierząt kontrolnych — nie zakażonych — nie wykazano obecności wirusa pomoru. Wyniki badań materiału terenowego potwierdzały rezultaty badań klinicznych i anatomopatologicznych wskazujących, że przyczyną zachorowań badanych zwierząt był pks.

Badaniem IF obecność antygenu wirusa pks wykazano we wszystkich próbkach migdałków i śledzion pobranych od świń zainfekowanych doświadczalnie; badaniem skrawków nerek obecność antygenu wirusa pks wykazano w 8 przypadkach, w dwóch pozostałych wynik IF był wątpliwy. W badaniu materiału terenowego odczynem IF wykazano obecność antygenu wirusa pks we wszystkich skrawkach uzyskanych z migdałków; badaniem skrawków z nerek w trzech przypadkach uzyskano wynik dodatni, a w dwóch wątpliwy. Należy podkreślić, że odczytywanie wyników testu PLA było łatwiejsze niż odczytywanie preparatów IF.

Reasumując stwierdzono, że wykrywanie obecności wirusa pks przy pomocy testu PLA jest zdecydowanie pewniejsze od odczynu IF; ma to szczególne znaczenie przy rozpoznawaniu infekcji świń wywołanych średnio i mało zjadliwymi szczepami wirusa omawianej choroby.

Przydatność przedstawionej metody wykrywania zakażeń wywołanych wirusami pozbawionymi właściwości cytopatycznych wykazana została po raz pierwszy przez Holm — Jensen (3). W późniejszym okresie tę metodę w diagnostyce pks zastosowali Hyera i wsp. (4) oraz Terpstra i Wensvoort (10). Wymienieni autorzy wykazali przydatność odczynu PLA w wykrywaniu wirusa pomoru, a także w serologicznej diagnostyce różnicowej zakażeń świń pestivirusami (3, 11). Warto zwrócić uwagę, że przedstawiony test może być z powodzeniem zastosowany przy określaniu miana wirusów pks (ryc. 1), w tym przy ocenie żywych szczepionek, zawierających w swoim składzie tego rodzaju antygeny wirusowe. Powyższą możliwość wykorzystano m.in. przy kontroli miana wirusa w szczepionce przeciw pomorowi świń Cellpest. Godnym zwrócenia uwagi jest fakt, że przedstawiony test zalecany jest, jako metoda z wyboru w diagnostyce pomoru klasycznego świń, w opublikowanym ostatnio przez O.I.E. podręczniku dotyczącym zasad diagnostyki i immunoprofilaktyki chorób zakaźnych zwierząt (7).

### Piśmiennictwo

1. Aynaud J., Galicher A., Lombard J., Bibard C., Mierzejewska M.: *Ann. Rech. Vet.*: 3, 309, 1972.
2. Dahle J., Moennig V., Coulibaly C., Liess B.: *J. Vet. Med. B* 38, 764, 1991.
3. Holm Jensen M.: *Acta vet. scand.* 22, 75, 1981.
4. Hyera J., Dahle J., Liess B., Moennig V., Frey H.: *Dt. tierärztl. Wschr.* 94, 141, 1987.
5. Instrukcja tymczasowa nr 24 Min. Rol. — Dep. Wet. z dnia 29 maja 1972 w sprawie zasad laboratoryjnego rozpoznawania klasycznego pomoru świń metodą immunofluorescencji.
6. Larski Z.: Diagnostyka wirusologiczna chorób zwierząt. PWRiL, Warszawa 1992.
7. Manual of recommended diagnostic techniques and requirements for biological products for list A and B diseases. O.I.E. Paris, 1990.
8. Pejsak Z., Truszczyński M.: *Zycie Wet.* 67, 152, 1992.
9. Report on meeting of National Swine Laboratories within the European Communities, Brussels, 16—17 June 1992.
10. Terpstra C., Wensvoort G.: *Vet. Microb.* 16, 123, 1983.
11. Van Oirschot J. T.: Persistent and inapparent infections with swine fever virus of low virulence. Their effects on the immune system. Praca dokt. Universytet w Utrechtie, 1980.

Adres autora: prof. dr hab. Zygmunt Pejsak, ul. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

JANUSZ A. MADEJ  
Wrocław

### artykuł przeglądowy

## Komórki nowotworowe i komórki linii płciowej — analogiczne nośniki „nieśmiertelności”

Spór dotyczący dziedziczenia cech jest ciągle aktualny. Toczy się on na poziomie komórek linii płciowej i dotyczy problemu, czy komórki rozrodcze mnożą się przez wieki i w każdym pokoleniu budują ciało ludzi lub zwierząt jako swoją „osłonę”, czy też ciało osobnika w odpowiednim momencie rozwoju produkuje gamety na drodze zróżnicowania się komórek somatycznych (2, 10, 13, 18, 20). I tak u pewnych gatunków, zwłaszcza u zwierząt wyższych, komórki prapłciowe są oddzielone od komórek somatycznych na wczesnych etapach stadium rozwoju zarodkowego i są jedynym źródłem gamet dla tych zwierząt (2, 11). Natomiast u zwierząt stojących nisko w systematyce ewolucyjnej, linia płciowa nie jest ciągła, a gamety powstają z komórek o charakterze embrionalnym w taki sam sposób, jak komórki somatyczne (2).

Komórki somatyczne używają się i są zastępowane

nowymi, powstającymi na drodze mitozy, przy czym komórki potomne mają identyczne chromosomy, jak ich komórki macierzyste. Jednocześnie doświadczalnie wykazano, że skład genów w chromosomach komórek somatycznych nie różni się od tegoż w komórkach linii płciowej (10, 13, 18). Wyjątek stanowią gatunki u których dochodzi do gubienia (dyminucji) fragmentów chromatyny, ale i w tym wypadku odrzucone zostają tylko powtarzalne odcinki DNA (6). Komórki somatyczne zawsze starzeją się i w końcu ulegną obumarciu wraz ze śmiercią organizmu (6, 10). Natomiast komórki płciowe, tj. komórka jajowa i plemnik — stanowią pomost między pokoleniami zapewniając ciągłość życia. Zapłodniona komórka jajowa ma w sobie całość informacji genetycznej potrzebnej do wytworzenia nowego organizmu i trylionów jego komórek somatycznych. Komórki linii płciowej mają zatem szanse być