

środki działające na ośrodkowy układ nerwowy, leki przeciwwrzepowe. Klasycznym przykładem takiego działania był Talidomid – uważany za nietoksyczny i łagodnie działający lek uspokajający i nasenny. Przyjęty w początkowym okresie ciąży powodował deformację płodu. Również preparaty hormonalne ujawniają właściwości teratogenne. Podawanie kortyzonu myszom powoduje rozszczep podniebienia i inne anomalie u potomstwa. Znane są również przypadki rozszczepienia podniebienia u dzieci, których matki otrzymywały duże dawki kortyzonu w okresie wczesnej ciąży.

Efekt teratogeny może być również skutkiem działania fungicydów. Powodują one zmiany zwyrodnieniowe, obejmujące ośrodkowy układ nerwowy. Do substancji teratogennych zaliczamy także niektóre lotne substancje chemiczne takie, jak: aceton, alkohol izomasłowy, benzen czy toluen.

Przedstawione wyżej dane wskazują, że długotrwałe narażenie organizmu na różnorodne skażenia środowiska wywołuje szereg zaburzeń w procesach życiowych. Konieczne więc staje się zapobieganie jego degradacji. Pojawia się zatem pytanie, czy możemy temu zapobiec? Najlepszą odpowiedzią na tak postawione pytanie będzie wypowiedź niezującego już premiera Szwecji – Olofa Palme, który w 1972 r. na I Międzynarodowej Konferencji Ochrony Środowiska w Sztokholmie powiedział: „Chodzi o przeżycie na naszej ciasnej planecie. Problemy środowiska mogą doczekać się rozwiązania jedynie w świecie pokoju i międzynarodowej współpracy. Środowisko nie musi ulegać destrukcji. Możemy zapanować nad tymi

procesami, możemy stać się panami naszej przyszłości. Ale nie wystarczą narodowe wysiłki. Musimy pracować wspólnie, mamy bowiem tylko jedną Ziemię” (2).

Piśmiennictwo

1. *Brandys J.*: Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA) w: Chemiczne substancje toksyczne w środowisku i ich wpływ na zdrowie człowieka. Wyd. PAN, Wrocław 1990.
2. *Doński R.*: Perspektywy XXI wieku. KiW, Warszawa 1971.
3. *Gumińska M.*: Chemiczne substancje toksyczne w środowisku i ich wpływ na zdrowie człowieka. Wyd. PAN, Wrocław 1990.
4. *Jakimcuk P. P., Celikanov K. N.*: Material for hygienic establishment of 24 hours maxima permissible concentration of nitrogen dioxide in the atmosphere. w: Chemiczne substancje toksyczne w środowisku i ich wpływ na zdrowie człowieka. Wyd. PAN, Wrocław 1990.
5. *Jędrzychowski W.*: Zanieczyszczenia powietrza atmosferycznego pyłami i dwutlenkiem siarki. w: Chemiczne substancje toksyczne w środowisku i ich wpływ na zdrowie człowieka. Wyd. PAN, Wrocław 1990.
6. *Kieć E.*: Tlenki azotu w: Chemiczne substancje toksyczne w środowisku i ich wpływ na zdrowie człowieka. Wyd. PAN, Wrocław 1990.
7. *Przędziński Z.*: Biologiczne skutki chemizacji środowiska. PWN, Warszawa 1984.
8. *Schmidt M.*: Etiopatologia uszkodzenia wątroby kręgowców wywołanego działaniem hepatotoksyn (penta- i hepta-peptydów cyklicznych) z sinic. Konferencja „Adaptacje X” 2-5 VI 1992 Kielce (dane nie publikowane).
9. *Serćuk W.*: Toksykologia – podręcznik dla studentów farmacji. PZWL, Warszawa 1990.
10. *Starek A.*: Węglowodory chlorowane. w: Chemiczne substancje toksyczne w środowisku i ich wpływ na zdrowie człowieka. Wyd. PAN, Wrocław 1990.

Adres autora: mgr Marek Bieńko, ul. Gościńska 11/3, 20-532 Lublin

MARIAN GRUNDBOECK, JACEK KUŹMAK, EWA BUZAŁA

artykuł przeglądowy

Rozpoznawanie białaczki bydła testem syncytialnym – możliwości i ograniczenia

Pracownia Patologii Komórkowej oraz Zakład Biochemii Instytutu Weterynarii, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

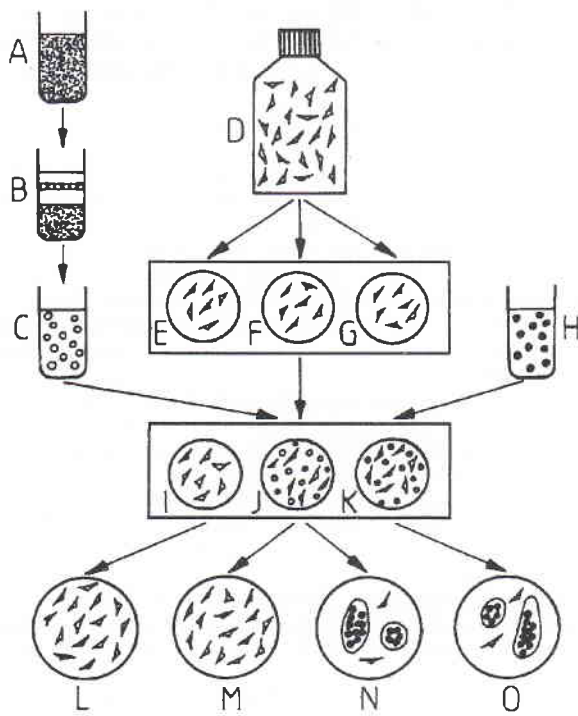
Test syncytialny polega na wprowadzaniu do hodowli komórek wskaźnikowych badanego materiału komórkowego lub bezkomórkowego. Pojawienie się w następstwie tego w hodowli olbrzymich komórek wielojądrowych (syncytiów) świadczy o obecności aktywnego wirusa. Czas inkubacji testu wynosi od kilkunastu godzin do 7 dni. Inaktywowane cząstki wirusa lub martwe limfocyty białaczkowe nie wywołują dodatniego odczynu. Schemat testu przedstawia ryc. 1.

Syncytiotwórcze właściwości wirusa enzoptycznej białaczki bydła (ebb) zostały opisane już w 1969 r. przez Cornfert-Jensen i wsp. (1), jednak test syncytialny jako metoda wykrywania wirusa i rozpoznawania białaczki został opracowany 7 lat później przez Ferrera i Diglio (2). Wiele publikacji w następnych latach poświęcono tej metodzie, umożliwiającej bezpośrednio wykrywanie czynnika zakaźnego w limfocytach lub stwierdzenie obecności przeciwciał testem zahamowania odczynu syncytialnego (6). Również w Polsce ukazały się na ten temat publikacje z ośrodków naukowo-badawczych w Puławach (3, 4, 5) i we Wrocławiu (7, 8, 9). Tym niemniej ani za

granicą, ani u nas test ten nie znalazł szerszego zastosowania w praktyce i jest wykorzystywany zazwyczaj w pracach o charakterze naukowo-poznawczym.

Klimentowski i wsp. (8) przebadali 98 cieląt i jałówek ze stada białaczkowego testem syncytialnym oraz testem ID. Wszystkie cielęta w wieku do 14 dni były serologicznie dodatnie w związku z występowaniem przeciwciał siarowych, lecz wykazywały one ujemny wynik testu syncytialnego. Stopniowy zanik przeciwciał zanotowano u badanych zwierząt od 6. tygodnia życia. Najmniej serologicznie dodatnich reagentów, bo tylko 19%, wykryto u półrocznych cieląt. Ale już połowa grupy 2-letnich jałówek wykazała obecność przeciwciał, co niewątpliwie było skutkiem transmisji wirusa. Dodatnie wyniki testu syncytialnego u starszych cieląt i jałówek wynosiły średnio 35%. Zwierzęta serologicznie ujemne, a wykazujące dodatni odczyn syncytialny były szczególnie liczne w wieku 5-6 miesięcy (19%), rzadziej zaś występowały u jałówek (5%).

Otachel-Hawranek i Boruta (10) użyły do badań 15 krów i 13 ich cieląt w wieku 3-4 tygodni. Wśród krów tylko jedna była serologicznie ujemna. Test syncytialny



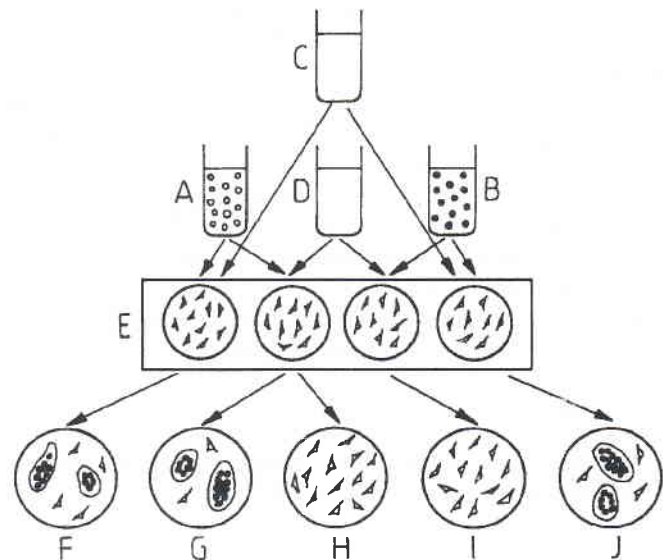
Ryc. 1. Schemat wykonania testu syncytialnego

A – próba krwi badanego zwierzęcia, B – izolacja limfocytów w gradiencie, C – zawiesina badanych limfocytów, D – hodowla komórek CC81, E-G – komórki CC81 w studzienkach płyty, H – limfocyty kontrolne białaczkowego zwierzęcia, I – studzienka kontrolna bez limfocytów, J – komórki CC81 z limfocytami badanymi, K – komórki CC81 z limfocytami kontrolnymi, L – kontrolny odczyn ujemny, M – odczyn ujemny (brak stwierdzenia wirusa), N – odczyn dodatni (rozpoznanie ebb), O – kontrolny odczyn dodatni.

w 6 przypadkach wypadł dodatnio, między innymi też u krowy nie wykazującej przeciwciał. Wśród 13 cieląt 9 było serologicznie dodatnich, a test syncytialny w 3 przypadkach dał wynik dodatni. W dwu przypadkach dotyczyło to cieląt serologicznie ujemnych, a w jednym przypadku cielęcia z niskim mianem przeciwciał.

W badaniach własnych (5) porównano wynik testu syncytialnego oraz testu ID u 188 sztuk młodego bydła w wieku do jednego roku oraz u 121 krów. Zgodność wyników obydwu testów wykazano u 80% zwierząt. Test ID okazał się czulszy od testu syncytialnego, ponieważ wykazał więcej odczynów dodatnich zarówno u młodego bydła (odpowiednio: 29 i 17%), jak i u dorosłego (57 i 46%). Nadto przeprowadzono porównanie wyników uzyskanych testem syncytialnym oraz metodą Polymerase Chain Reaction (PCR). Materiał do badań stanowiło 13 prób krwi krów wykazujących obecność przeciwciał dla wirusa ebb w teście ELISA oraz 16 prób od krów ujemnych w tym teście. Niezgodne wyniki stwierdzono tylko w 4 przypadkach (14%). W trzech przypadkach dodatni wynik PCR szedł w parze z ujemnym wynikiem testu syncytialnego, a w jednym przypadku była odwrotna sytuacja (9).

Ponieważ powstawanie syncytyw może być spowodowane również przez niektóre inne wirusy, opracowane zostały testy kontrolujące swoistość odczynu wzorcowymi surowicami. Schemat takiej metody kontrolnej, wykorzystującej hamowanie odczynu swoistego, dla wirusa ebb,



Ryc. 2. Kontrola swoistości testu syncytialnego

A – limfocyty badanego zwierzęcia, B – wzorcowe limfocyty białaczkowe, C – surowica zdrowego zwierzęcia (BLV-), D – surowica białaczkowego zwierzęcia (BLV+), E – 4 studzienki z komórkami CC81, F, I, J – odczyny kontrolne, G – odczyn testowy dodatni (brak hamowania, odczyn nieswoisty dla BLV), H – odczyn testowy ujemny (zahamowania odczynu, odczyn swoisty dla BLV)

przedstawia ryc. 2. Jeśli przeciwciała swoiste dla wirusa ebb nie zdołają zablokować odczynu, oznacza to, że jest on wywołany innym wirusem.

Jak wynika z powyższych rozważań, test syncytialny jest pracochłonny, czasochłonny, a zatem bardziej kosztowny niż rutynowo przeprowadzane badania serologiczne. Nadto jest on mniej czuły niż test ID. Z tego względu nie ma on szans na szerokie zastosowanie w diagnostyce choroby. Można go stosować w przypadkach, gdy dodatnie odczyny serologiczne budzą zastrzeżenia, albo gdy zależy nam szczególnie na wykluczeniu lub możliwie precyzyjnym stwierdzeniu zakażenia wirusem określonego zwierzęcia. Test syncytialny, wykonany obok badań serologicznych, zmniejsza wówczas znacznie prawdopodobieństwo pomyłki.

Nowoczesne metody laboratoryjne, takie jak PCR oraz hybrydyzacja DNA z sondami molekularnymi, są niewątpliwie czulsze i bardziej swoiste od testu syncytialnego. Są one jednak bardziej kosztowne, a rutynowo nie są one w kraju wykonywane. Metody te nadto nie są w stanie odróżnić zainaktywowanej cząstki wirusa od aktywnej, ani komórki żywej od martwej. W rozpoznawaniu aktywności wirusa ebb test syncytialny jest bezkonkurencyjny, ponieważ dostarcza on wyników szybciej niż diagnostyczne zakażenie owiec.

Test syncytialny jest wykonywany w Instytucie Weterynarii w Puławach, który podejmuje się również przeprowadzania badań diagnostycznych na zlecenie terenowej Służby Weterynaryjnej i hodowców. Serie badań, nie przekraczające 30 prób krwi, pobranych ściśle według instrukcji, mogą być przesyłane do Instytutu Weterynarii w Puławach we wcześniej uzgodnionych terminach. Instrukcję wykonywania odczynu można również otrzymać w Instytucie (4).

Piśmiennictwo

1. Cornefert-Jensen F., Hare W.C.D., Stock N.D.: Int. J. Cancer 4, 507, 1969.
2. Ferrer J.F., Diglio C.A.: Cancer Res. 36, 1068, 1976.
3. Grundboeck M., Buzala E.: Mat. VIII Kongresu PTNW, Warszawa 2, 210, 1987.
4. Grundboeck M., Buzala E.: Instrukcja wykrywania enzoptycznej białaczki bydła (ebb) testem syncytialnym. Wyd. IWet, Puławy, 1990.
5. Grundboeck M., Buzala E.: Bull. vet. Inst. Puławy, 35, 19, 1992.
6. Guillemain B., Mamoun R., Levy D., Astier T., Irgens K., Parodi A.L.: EEC Seminar „Bovine Leukosis: Various methods of molecular virology”, Bruxelles 1976, CEC Centre, Kirchberg, Luxembourg, 1977.
7. Klimontowski S., Pawęska J.: Medycyna Wet. 43, 556, 1987.
8. Klimontowski S., Pawęska J., Kuryszko J.: Medycyna Wet. 45, 470, 1989.
9. Kuźniak J.: dane nie publikowane.
10. Otachel-Hawranek J., Boruta J.: Medycyna Wet. 46, 392, 1990.

Adres autora: prof. dr hab. Marian Grundboeck, ul. C. Norwida 3/18, 24-100 Puławy

IWONA MARKOWSKA-DANIEL, ZYGMUNT PEJSAK

Wstępna ocena swoistości przeciwciał monoklonalnych do diagnostyki pomoru klasycznego świń^{*})

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

Summary

Evaluation of the specificity of monoclonal antibodies in the diagnosis of classical swine fever

The specificity of a panel containing 36 monoclonal antibodies (MAbs) for the diagnosis of swine fever (SF) was evaluated by the immunoperoxidase monolayer assay (IPMA).

For the test were utilized microplates coated with the PK-15A cells which were infected with the following Hog cholera virus (HCV) strains: Alfort-187, TVM-1 and 10 field isolates. MDBK cells propagated on microplates were infected with Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) of the NADL-158 strain.

By means of polyclonal antibodies the presence of all of the HCV and BVDV strains which were bred were demonstrated. Nine of 36 examined MAbs reacted exclusively with Alfort-187 strain and with all field isolates. The above-mentioned antibodies did not form immunocomplexes with TVM-1 and NADL-158 strains. They were defined as specific antibodies to HCV. One MAb detected epitopes was present in the Alfort strain and in all but one field HCV isolates. This antibody did not detect the TVM-1 strain. Two clones specific for BVDV used in this study reacted exclusively with the NADL-158 strain. Twenty four supernatants collected from hybridoma cell cultures produced distinct reactions on microplates coated with cells infected with the Alfort strain, field isolates and the NADL-158 strain. The above mentioned antibodies were defined as specific for the Pestivirus genus.

For the precise selection of MAbs, additional studies will be carried out, mainly in the range of evaluating MAbs with BVDV field strains.

Należące do rodzaju *Pestivirus*, rodziny *Flaviviridae* (7), wirusy: pomoru klasycznego świń (HCV), wirusowej biegunki i choroby błon śluzowych bydła (BVDV) oraz choroby granicznej owiec (BDV) charakteryzują się znacznym pokrewieństwem antygenowym (10), przy wyraźnej

heterogenności antygenowej w obrębie poszczególnych gatunków. Dodatkowo nie ma możliwości jednoznacznej serotypizacji pestiwirusów (4, 7).

Biorąc pod uwagę możliwość naturalnego lub sztucznego (poprzez zainfekowane szczepionki) zakażenia świń BVDV (3, 15, 16) lub BDV (17) oraz przedstawione uprzednio pokrewieństwo antygenowe tych wirusów uwiadcznia się problem rozpoznawania zakażeń wymienionymi drobnoustrojami.

Precyzyjne różnicowanie poszczególnych rodzajów pestiwirusów możliwe jest m.in. poprzez zastosowanie przeciwciał monoklonalnych (MAbs), skierowanych przeciw swoistym dla poszczególnych gatunków wirusów glikoproteinom (20). Zestawy MAbs, specyficzne dla HCV, opracowano już w kilku laboratoriach zachodnioeuropejskich (1, 4, 6, 14, 19) i coraz częściej wykorzystuje się je rutynowo w diagnostyce różnicowej zakażeń HCV i BVDV.

W niniejszej pracy przedstawiono wyniki oceny swoistości zestawu MAbs otrzymanego w ramach badań własnych.

Materiał i metody

Hodowle komórkowe

Do badań użyto linii ciągłej komórek nerki świni PK-15A.

Szczepy wirusowe

Posługiwano się następującymi szczepami laboratoryjnymi wirusa pomoru klasycznego świń: Alfort-187 o mianie $10^{6,3}$ TCID₅₀/50 μ l oraz TVM-1 o mianie $10^{4,5}$ TCID₅₀/50 μ l. W badaniach wykorzystano ponadto 10 izolatów terenowych wirusa pomoru, pochodzących z muzeum szczepów Zakładu Chorób Świń o mianie $10^{2,3}$ - $10^{3,5}$ TCID₅₀/50 μ l (tab. 1). W ocenie swoistości MAbs posługiwano się również mikropłytkami opłaszczonymi komórkami nerki bydła (MDBK), zainfekowanymi szczepem NADL-158 BVDV, który otrzymano dzięki uprzejmości prof. Liessa z Instytutu Wirusologii Wyższej Szkoły Weterynaryjnej w Hanowerze.

Podłoża i reagenty

Do kultywacji hodowli komórek PK-15A używano płynu Eagle'a z solami Earle'a (E/E), z dodatkiem gentamycyny 0,5 ml/100 ml hodowli oraz 7% surowicy płodowej bydłowej (FCS) wolnej od przeciwciał BVDV.

^{*})Praca została wykonana w ramach realizacji projektu PL-ARS 156, we współpracy z National Animal Disease Center, Ames, Iowa, USA, finansowanego przez II Polsko-Amerykański Wspólny Fundusz im. M. Skłodowskiej-Curie