

## 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 enzootycznej 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<sup>\*</sup>)

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.

#### Szczepienia wirusowe

Posługiwano się następującymi szczepami laboratoryjnymi wirusa pomoru klasycznego świń: Alfort-187 o mianie  $10^{6,3}$  TCID<sub>50</sub>/50  $\mu$ l oraz TVM-1 o mianie  $10^{4,5}$  TCID<sub>50</sub>/50  $\mu$ l. W badaniach wykorzystano ponadto 10 izolatów terenowych wirusa pomoru, pochodzących z muzeum szczepów Zakładu Chorób Świń o mianie  $10^{2,3}$  -  $10^{3,5}$  TCID<sub>50</sub>/50  $\mu$ 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.

<sup>\*</sup>)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

Ocenę swoistości produkowanych przez komórki *hybrydoma* MAbs oparto o rezultaty testu IPMA (immunoperoxidase monolayer assay) (18).

Bufory i reagenty do testu IPMA:

1. Bufor do płukania oraz rozcieńczania koniugatu i MAbs – PBS z dodatkiem 1% Tweenu 80.

2. Bufor octanowy do rozpuszczania substratu, pH 5,0.

3. Koniugat – gatunkowo specyficzne anty-mysie biotynylowane immunoglobuliny (Anti-mouse Ig biotynylated species-specific whole antibody) oraz kompleks biotynylowanej peroksydazy chrzanowej skoniugowanej ze streptawidyną (Streptavidin-biotynylated horseradish peroxidase complex) (Amersham), w rozcieńczeniu 1:200.

4. Substrat – 3 amino-9 ethylcarbazole (Sigma) rozpuszczony w dimetyloformamidzie i zmieszany z buforem octanowym.

#### Postępowanie

Szczepy laboratoryjne oraz izolaty terenowe HCV namnażano w hodowli komórek PK-15A w sposób zgodny z ogólnie przyjętymi zasadami (9).

Komórki *hybrydoma* produkujące MAbs uzyskiwano w sposób przedstawiony w pierwszej części pracy (11).

Ocenie swoistości poddano zestaw 34 MAbs wybranych z 83 klonów i zakwalifikowanych w wyniku izotypowania (5) do klasy IgG1, IgG2a i IgG2b (tab. 2). Dodatkowo w badaniach użyto 2 przeciwciał monoklonalnych swoistych dla BVDV uzyskanych od profesora B. Liessa z Instytutu Wirusologii w Hanowerze.

Test IPMA wykonano zgodnie z metodyką podaną przez Wensvoorta (18).

W mikropłytkach o płaskim dnie (Nunc) zakładano hodowlę komórek PK-15A, o koncentracji 150.000 komórek/ml w płynie E/E z dodatkiem 10% FCS. Komórki zakażano wspomnianymi szczepami HCV, dawką 100 TCID<sub>50</sub>/50 µl. Każdym użytym do badań szczepem wirusa infekowano hodowlę PK-15A w czterech mikropłytkach. Obecność poszczególnych szczepów pestiwirusowych w zakażonych hodowlach kontrolowano przy pomocy przeciwciał poliklonalnych dla HCV. Kontrolę testu stanowiły baseniki z nie zakażoną hodowlą komórkową. Mikropłytki inkubowano w temperaturze 37°C, w atmosferze 5% CO<sub>2</sub> przez 48-72 godz., po czym utrwalano je termicznie w temperaturze 80°C przez 2 godz. Utrwalone mikropłytki przechowywano w zamrażarce -80°C do chwili użycia. W dniu wykonywania odczynu IPMA mikropłytki ogrzewano 20 min. w temperaturze 37°C, płukano jednokrotnie w roztworze PBS, a następnie wprowadzano do poszczególnych baseników mikropłytki po 100 µl testowanych przeciwciał monoklonalnych w rozcieńczeniach od 1:2 do 1:256. Mikropłytki inkubowano w temperaturze pokojowej przez 1 godz., po czym płukano je 3-krotnie w buforze do płukania. Następnie komórki barwiono wlewając do wszystkich baseników po 100 µl biotynylowanych anty-mysich immunoglobulin. Płytki ponownie inkubowano 1 godz. w temperaturze pokojowej, płukano 3 razy w buforze do płukania, po czym wlewano po 100 µl kompleksu biotynylowanej peroksydazy chrzanowej skoniugowanej ze streptawidyną i poddawano je inkubacji j.w. Po zakończeniu inkubacji z koniugatem płytki płukano jak uprzednio i dodawano po 100 µl roztworu substratu. Po 15 – 20 minutach inkubacji z substratem zatrzymywano reakcję barwną przez przepłukanie mikropłytki wodą destylowaną. Rezultaty testu IPMA odczytywano przy użyciu mikroskopu odwróconego Telaval 3 (Carl Zeiss Jena), przy powiększeniu 50 x.

#### Wyniki i omówienie

Przy pomocy przeciwciał poliklonalnych wykazano obecność wszystkich namnażanych szczepów HCV i BVDV w użytych do badań mikropłytkach. Wskazuje to jedno-

Tab. 1. Pochodzenie szczepów i izolatów HCV i BVDV

Wirus	Pochodzenie
Szczepy laboratoryjne HCV:	
Alfort-187	EEC Liason Laboratory, Hannover (Prof. Liess), 1992
TVM-1	Laboratorium diagnostyczne, Drezno (Dr. Ulbrich), 1987
Szczepy terenowe HCV:	
1/92	izolat terenowy "S"
2/92	izolat terenowy "G"
3/92	izolat terenowy "SP"
4/92	izolat terenowy "B"
5/92	izolat terenowy "K"
6/92	izolat terenowy "K"
7/92	izolat terenowy "K"
8/92	izolat terenowy "K"
9/92	izolat terenowy "BP"
10/92	izolat terenowy "P"
Szczep laboratoryjny BVDV:	
NADL-158	Instytut Wirusologii, Hannover (Prof. Liess), 1993

Tab. 2. Izotypy wybranych przeciwciał monoklonalnych (MAbs)

MAbs	Izotypy	Pochodzenie
17-18; 22-27; 30; 32	IgG1	IWet Puławy
1-5; 8-10; 13-14; 16; 20; 33	IgG2a	IWet Puławy
6-7; 11-12; 15; 19; 21; 28-29; 31; 34	IgG2b	IWet Puławy
C16; C45	brak danych	Instytut Wirusologii, Hannover

Tab. 3. Aktywność sekrecyjna panelu 36 MAbs

Szczepy pestiwirusowe (HCV, BVDV)	Przeciwciała monoklonalne reagujące ze szczepami
Alfort-187 (HCV)	1-34
TVM-1 (HCV)	-
Izolaty terenowe (HCV) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10	1-34
Izolat terenowy (HCV) 7	17, 18, 22-25, 27, 30, 32
NADL-158 (BVDV)	C16; C45

znacznie, że wykorzystane do badań szczepy pestiwirusowe charakteryzują się obecnością wspólnych antygenów.

Dziewięć (17, 18, 22, 23, 24, 25, 27, 30, 32) spośród 36 charakteryzowanych serologicznie MAbs reagowało ze szczepem Alfort – 187 (w mianach 1:32 – 1:128) oraz ze wszystkimi terenowymi izolatami HCV. Przeciwciała te nie tworzyły kompleksów immunologicznych ze szczepem TVM-1 oraz szczepem NADL-158. Na podstawie uzyskanych wyników wspomniane MAbs określono jako swoiste dla HCV. Charakteryzowały się one obecnością epitopów konserwatywnych dla HCV, a nieobecnych w użytym szczepie BVDV oraz atenuowanym szczepie TVM-1. Na uwagę zasługuje fakt przynależności wszystkich wymienionych przeciwciał do podklasy IgG1 (tab. 2).

MAbs oznaczone numerem 26 wykrywało epitopy obecne w szczepie Alfort i w prawie wszystkich, z wyjątkiem

jednego, terenowych szczepach HCV. Przeciwciała to nie wykrywało szczepu TVM-1.

Dwa użyte w badaniach klony (C16 i C45), swoiste dla BVDV, reagowały wyłącznie ze szczepem NADL-158 BVBV, nie tworząc immunokompleksów z żadnym innym, użytym do badań szczepem pestiwirusów. Zgodnie z danymi opublikowanymi wcześniej przez Hessa i wsp. (6) oraz wynikami badań własnych przeciwciała te zaliczono do swoistych dla BVDV.

Dwadzieścia cztery supernatanty z hodowli komórek *hybrydoma* dawały wyraźną reakcję barwną na mikropłytkach opłaszczonych komórkami zakażonymi szczepem Alfort oraz izolatami terenowymi w mianie 1:8 – 1:128, a także szczepem NADL – 158 w mianie 1:4 – 1:32. Przeciwciała te określono jako swoiste dla rodzaju *Pestivirus*. Warto nadmienić, że wszystkie te przeciwciała należały do podklasy IgG2a oraz IgG2b.

Wykazana krzyżowa reakcja charakteryzowanych MAb's ze szczepem BVDV wskazuje na uwidocznione już przez Mengelinga i wsp. (12) oraz Corthiera i wsp. (2) pokrewieństwo antygenowe między wirusami HC i BVD.

Warto podkreślić, że żadne MAb's nie wykrywało obecności atenuowanego szczepu wirusa pomoru świń TVM-1. Wskazuje to, że wspomniany szczep pozbawiony jest epitopów charakterystycznych dla terenowych szczepów HCV oraz referencyjnego szczepu Alfort. Szczep TVM-1 wykorzystywany był do produkcji atenuowanej szczepionki przeciw pomorowi świń w Czechosłowacji (8) oraz w Polsce (13). W krajach tych wykazano wysoką wartość ochronną szczepionki, zawierającej wspomniany szczep. Biopreparat ten w wielokrotnie powtarzanych doświadczeniach chronił uodporniane świny przed kontrolnym zakażeniem wysoce zjadliwymi terenowymi szczepami HCV. Uzyskany w badaniach własnych wynik wskazuje, że brak w szczepie TVM-1 epitopów wykrywalnych przez uzyskane MAb's nie wpłynął w sposób istotny na utratę przez ten szczep właściwości immunogennych, ograniczając jednocześnie w sposób zasadniczy jego zjadliwość. Wcześniej wykazano (20), że różnorodność epitopowa szczepów HCV nie jest skorelowana z ich zjadliwością; cytowany autor wykazał, że szczepy charakteryzujące się obecnością takich samych epitopów różniły się istotnie pod względem zjadliwości. Można sądzić, że uzyskane MAb's mogą być wykorzystane do rozróżnienia zakażeń

świń terenowymi szczepami HCV od obecnego w migdałkach świń, w określonych sytuacjach (do 2-3 tygodni po immunizacji), szczepionkowego szczepu TVM-1.

Reasumując przedstawione wyniki należy podkreślić, że prezentowana praca jest etapem na drodze do uzyskania zestawu przynajmniej dwóch specyficznych i charakteryzujących się wysokim mianem MAb's dla HCV.

Uzyskanie zestawu dziewięciu przeciwciał monoklonalnych wykrywających wszystkie terenowe i referencyjne szczepu wirusa pomoru świń stwarza podstawę do opracowania serologicznych metod diagnostyki – ELISA, umożliwiających jednoznaczne odróżnienie zakażeń HCV i BVDV u świń.

#### Piśmiennictwo

1. Caij A., Muijldermans G., De Smet A., Hamers R., Koenen F.: Arch. Virol. 131, 185, 1993.
2. Corthier G., Aynaud J. M., Galicher A. C., Gelfi J.: Ann. Rech. Vet. 5, 373, 1974.
3. Dahle J., Liess B., Frey H. R.: Dt. tierarz. 1. Wschr. 94, 590, 1987.
4. Edwards S., Sands J., Harkness J.: Arch. Virol. 102, 197, 1988.
5. Goding J. W.: Monoclonal Antibodies: Principles and Practice. Academic Press, London 1986.
6. Hess R. G., Culibaly C. D., Greiser-Wilke I., Moennig V., Liess B.: Vet. Microb. 16, 315, 1988.
7. Horzinek M. C.: Arch. Virol. Suppl. 3, 1, 1991.
8. Jerabek J., Cupera Z., Jordan V.: Veterinarstvi, 21, 548, 1975.
9. Larski Z.: Diagnostyka wirusologiczna chorób zwierząt. PWRiL, Warszawa 1992.
10. Liess B., Moennig V.: Rev. sci. tech. Off. int. Epiz. 9, 151, 1990.
11. Markowska-Daniel I., Pejsak Z.: Medycyna Wet. – w druku.
12. Mengeling W. L., Gutenkunst D. E., Fernelius A. L., Pirtle E. C.: Can. J. Comp. Med. 27, 162, 1963.
13. Pejsak Z., Lipowski A., Markowska I., Dzierżawski A., Mokrzycka A.: Medycyna Wet. 47, 461, 1991.
14. Peters W., Greiser-Wilke I., Moennig V., Liess B.: Vet. Microb. 12, 195, 1986.
15. Snowdown W. A., French E. L.: Aust. vet. J. 44, 179, 1968.
16. Terpstra C., Wensvoort G.: Res. vet. Sci. 45, 137, 1988.
17. Vannier P., Leforban Y., Carnero R., Cariolet R., Anns Rech. vet. 19, 283, 1988.
18. Wensvoort G., de Kluyver E. P., Boonstra J., Terpstra C.: Vet. Microb. 12, 101, 1986.
19. Wensvoort G., Terpstra C.: Res. vet. Sci. 45, 143, 1988.
20. Wensvoort G.: Epitopes on structural proteins of hog cholera (swine fever) virus. Praca dokt., Utrecht 1989.

Adres autora: dr Iwona Markowska-Daniel, ul. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

SAVINI G., DUNSMOVE J. D., ROBERTSON I. D.: Badanie psów w Zachodniej Australii w kierunku zarażenia *Sarcocystis* sp. i innymi pasożytami jelitowymi. (A survey of Western Australian dogs for *Sarcocystis* spp. and other intestinal parasites). Aust. Vet. J. 70, 275-276, 1993 (7)

Badano kał od 132 psów w wieku od 3 miesięcy do 17 lat na obecność oocyst i sporocyst *Sarcocystis* sp.. Próbkę kału pochodziły od psów stale przebywających w psiarniach, psów myśliwskich oraz psów przebywających na farmach. *Sarcocystis* występował częściej aniżeli inne pasożyty w kale wszystkich trzech grup psów (31,1%). Trzy psy przebywające na farmie były zarażone *Isospora ohioensis* i *I. burrowsi*, dwa z psiarni *I. canis*. Cysty *Giardia* spotykano częściej u psów z psiarni, przy czym 11,9% psów w wieku do 2 lat i 3,0% psów starszych było zarażonych tym pasożytem. Jedno szczenię i sześć dorosłych osobników było zarażonych przez *Uncinaria stenocephala*. *Sarcocystis* zakażał częściej psy karmione mięsem nie poddanym obróbce termicznej, zwłaszcza mięsem owiec.

G.

VAN BERKY A. G., TOWNSEND W. L.: Zależność między częstotliwością występowania zmian w macicy a stosowaniem octanu medroksyprogesteronu do kontroli wielkości populacji psów. (The relationship between the prevalence of uterine lesions and the use of medroxyprogesterone acetate for canine population control). Aust. Vet. J. 70, 249-250, 1993 (7)

Określono zależność pomiędzy występowaniem zmian chorobowych w macicy a stosowaniem w celu zahamowania rui octanu medroksyprogesteronu (MPA). Badaniami objęto 175 suk. U 42 zastosowano MPA w formie iniekcji. Zmiany chorobowe w macicy wystąpiły u 14,9% suk, przy czym dotyczyły one 45% suk otrzymujących MPA i 5% suk z grupy kontrolnej. Uzyskane wyniki wskazują na istnienie wysokiej korelacji pomiędzy stosowaniem MPA a występowaniem zmian chorobowych w macicy. Występowała przy tym wyraźna zależność pomiędzy wiekiem suk (ponad 2 lata) a pojawieniem się zmian patologicznych w macicy. Liczba porodów nie wpływała natomiast na częstotliwość tych zmian.

G.