

9. Kuleta Z. *at all*: Acta Acad. Agricult. Techn. Olst. Veterinaria 19, 214, 1990.
10. Laflamme L.F., Connor M.L.: Can. J. Anim. Sci. 72, 843, 1992.
11. Markusfeld O., Nahari N., Adler H.: Isr. J. Vet. Med. 44, 176, 1988.
12. Paulova J., Janečkova L., Novotny L., Kmošták S., Čechova J.: Biol. chem. Vet. (Praha) 26, 457, 1990.
13. Reid J.M., Dew S.M., Collins R.A.: J. agric. Sci. Camb. 101, 499, 1983.
14. Sokol J., Reichel P., Vrzgula L.: Biol. chem. Vet. (Praha) 24, 531, 1988.

15. Sommer H.: Vet. Med. Rev. 1, 13, 1975.
16. Staples C.R., Thatcher W.W., Clark J.H.: J. Dairy Sci. 73, 938, 1990.
17. Ubaldi A., Sabatini A.P., Corbella E.: Proceedings of The 2-nd International Symposium of Vet. Lab. Diagnosticians, Lucerna 1980 s. 478.
18. Yasuda J., Syuto B., Kimehiko T., Ohfujii S.: Jpn J. Vet. Sci. 51, 733, 1989.

Adresa autora: dr Michał Bronicki, Os. Wichrowe Wzgórze 36i/82, 61-699 Poznań

GRAŻYNA PAPROCKA, ANDRZEJ KĘSY, WIESŁAW NIEDBALSKI, ANDRZEJ FITZNER

## Przydatność jednowarstwowych hodowli komórek do wykrywania wirusa pryszczycy

Zakład Badania Pryszczycy Instytutu Weterynarii, ul. Wodna 7, 98-220 Zduńska Wola

### Summary

Usefulness of cell lines for the detection of foot and mouth disease virus

The growth power of different cell lines: calf kidney, heart fibroblasts, thymus and foetal testicles, as well as porcine kidney in 17 types of media prepared on the basis of Hanks, Eagle's and Parker's media were studied. The conditions for the preparation of cell suspensions for deep freeze storage and the optimal conditions for cell growth after thawing were determined. The titers and intensity of CPE of FMD virus, type A, O and C, propagated in cell cultures obtained directly after trypsinization and after 6 months of storing the cells in liquid nitrogen ( $-196^{\circ}\text{C}$ ), were similar in calf kidney cells, pig kidney cells and calf thyroid cells. No cytopathic effects were observed in cultures of calf heart and foetal calf testicles infected with FMDV type A, O and C.

Hodowle komórek odgrywają istotną rolę w doskonaleniu metod diagnostycznych oraz produkcji szczepionek przeciwko pryszczycy. Wrażliwość komórek na zakażenie wirusem pryszczycy zależy od obecności na ich powierzchni odpowiednich receptorów (5). Posiadają je tkanki różnych gatunków zwierząt (1, 2, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13).

Celem podjętych badań było określenie optymalnych warunków wzrostu jednowarstwowych hodowli komórek: nerek, mięśnia sercowego i jąder płodów cieląt oraz nerek prosiąt i tarczycy cieląt. W drugim etapie określano wrażliwość na zakażenie wirusem pryszczycy hodowli uzyskanych bezpośrednio po trypsinowaniu tkanek oraz po przechowywaniu komórek w temperaturze  $-196^{\circ}\text{C}$ .

### Materiał i metody

Zwierzęta. Nerki, serca i jądra pochodziły od 3 – 6-miesięcznych płodów cieląt. Nerki prosiąt pobierano od zwierząt o masie około 3 kg. Tarczycę uzyskiwano od 4 – 6-miesięcznych cieląt.

Podłoża. Zastosowano 17 modyfikacji podłoży wzrostowych Hanksa, Eagle'a i Parkera. Wszystkie podłoża zawierały 30  $\mu\text{g/ml}$  gentamycyny i 25  $\mu\text{g/ml}$  amfoterycyny. Wprowadzone modyfikacje przedstawiono w tab. 1.

Hodowle komórkowe. Hodowle uzyskiwano przez trypsynowanie tkanek w temperaturze 37 lub  $4^{\circ}\text{C}$  wg ogólnie przyjętej metody. Komórki liczone w komorze Bürkera po zabarwieniu błękitem trypanu i określano odsetek komórek uszkodzonych. Zawiesiny w podłożach wzrostowych dzielono na dwie części: z jednej bezpośrednio po trypsinizacji zakładano hodowle komórek, drugą przeznaczano do zamrożenia w ciekłym azocie. Inkubacja odbywała się w temperaturze  $37^{\circ}\text{C}$ . Komórki tarczycy cielęcej umieszczano w cieplarni z przepływem  $\text{CO}_2$ .

Przechowywanie komórek w ciekłym azocie. Do zamrażania komórek nerek, jąder, mięśnia sercowego płodów cieląt i nerek prosiąt używano płynu Hanksa z dodatkiem 15% DMSO (Dimethyl Sulfoxide) i 15% surowicy cielęcej. Komórki tarczycy zamrażano w płynie Eagle'a z dodatkiem 15% DMSO oraz 15% surowicy płodowej. Osad komórek zawieszano w mieszaninie zamrażającej tak, aby w końcowym efekcie uzyskać około  $3 \times 10^7$  komórek/ml. Zawiesinę rozlewano do 2 ml ampulek po 1,5 ml. Ampułki umieszczano w styropianowym pudełku i przechowywano do następnego dnia w zamrażarce ( $-20^{\circ}\text{C}$ ). Następnie przenoszono do ciekłego azotu w naczyniach Dewara.

Zakładanie hodowli z komórek przechowywanych w ciekłym azocie. Po wyjęciu z ciekłego azotu ampułki wkładano do łaźni wodnej o temperaturze około  $40^{\circ}\text{C}$ . Zawartość ampułki przenoszono do probówki, rozcieńczano podłożem wzrostowym i wirowano przy 1000 obr./min. przez 5 minut. Osad komórek zawieszano w podłożu wzrostowym. Komórki ponownie liczone oraz określano odsetek komórek uszkodzonych. Hodowle zakładano na mikropłytkach, w probówkach i w butelkach Roux.

Mianowanie wirusa pryszczycy. Miano  $\text{TCID}_{50}$  wirusa pryszczycy namnożonego w nabłonku języków bydłych określano na podstawie zmian cytopatycznych w hodowlach przygotowanych z komórek bezpośrednio po trypsinowaniu tkanek oraz z komórek przechowywanych w temperaturze  $-196^{\circ}\text{C}$ . Wyniki obliczano metodą Reeda i Muencha (4) i podano w  $\log \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ .

### Wyniki i omówienie

Z danych przedstawionych w tab. 2 wynika, że najlepszy wzrost hodowli komórek nerek, jąder, mięśnia sercowego płodów cieląt oraz nerek prosiąt uzyskano stosując podłoża o składzie: płyn Hanksa z dodatkiem 10% surowicy cielęcej, 0,5% hydrolizatu laktoalbuminy i 1% buforu Hepes oraz pod-

Tab. 1. Charakterystyka wariantów podłoża wzrostowych

Nazwa podłoża podstawowego	Wariant nr:	Dodatki uzupełniające do podłoża						
		10% surowicy cielęcej	10% surowicy płodowej	0,5% hydrolizatu laktoalb.	1% buforu Hepes	1% ekstraktu drożdżowego	10% bulionu fosforanu tryptozy	1% L-Glutaminy
Hanksa	1	+		+				
"	2	+		+	+			
"	3	+		+				
"	4	+		+		+		
"	5	+		+				+
"	6	+		+			+	+
Eagle'a	7	+						
"	8	+					+	+
"	9	+						+
"	10	+					+	
"	11	+						
"	12		+					
Parkera	13	+						
"	14	+						+
"	15	+						
"	16	+					+	
"	17	+					+	+

Tab. 2. Ocena mikroskopowa wzrostu hodowli przy stosowaniu różnych podłoży wzrostowych

Hodowle komórek	Podłoże – wariant nr:																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Nerek płodów cieląt	++	+++	++	++	+++	+++	++	+++	++	++	++	+	+	+	+	+	nb
Mięśnia sercowego płodów cieląt	+	+++	+	++	+	+++	++	+++	+	++	+	+	+	+	+	+	nb
Jąder płodów cieląt	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	++	++	nb
Nerek prosiąt	+++	+++	++	+++	+++	+++	+	+	+	+	+	++	++	+	+	+	nb
Tarczycy cieląt	+	+	+	+	+	+	+	++	++	++	++	+	+	+	+	+	+++

Objaśnienia: +++ intensywne, liczne podziały komórek, monolayer powstaje po 2-3 dniach inkubacji; ++ liczne podziały komórek, monolayer powstaje po 3-4 dniach; + pojedyncze komórki z podziałami, monolayer powstaje w ciągu 5-6 dni po dodatkowej zmianie płynu wzrostowego lub nie udaje się go uzyskać; nb – nie badano

łożę Hanksa z dodatkiem 10% surowicy cielęcej, 10% bulionu fosforanu tryptozy, 1% L-Glutaminy i 0,5% hydrolizatu laktoalbuminy. Hodowle komórek tarczycy cielęcej najlepiej wyrastały w płynie Eagle'a z 10% surowicą płodową.

Wymagana koncentracja komórek do założenia hodowli z nerek, jąder, mięśnia sercowego płodów cieląt oraz nerek prosiąt wynosiła  $2 - 3 \times 10^5$  komórek/ml, a z tarczycy cieląt  $1 \times 10^6$  komórek/ml. Zawiesiny o wyższej gęstości szybko osiągały całkowite pokrycie powierzchni, ale zakwaszały środowisko, co prowadziło do odklejania się hodowli od szkła i jej degeneracji. Użycie zawiesin o niższej koncentracji komórek nie zapewniało uzyskania jednolitej ich warstwy. W celu sporządzenia hodowli używano nerek i jąder pobranych od 3 – 6-miesięcznych płodów cieląt, natomiast hodowle komórek mięśnia sercowego można było uzyskać z tkanek pobranych wyłącznie od płodów około 3-miesięcznych.

Jak wynika z tab. 3 przy zastosowaniu do podłoża wzrostowych surowicy cielęcej lub płodowej nie wykazano różnic we wzroście hodowli komórek nerek, mięśnia sercowego, jąder płodów cieląt oraz nerek prosiąt otrzymywanych z ko-

mórek przechowywanych w temperaturze  $-196^{\circ}\text{C}$ . Hodowle komórek tarczycy cielęcej uzyskiwano używając do podłoża wzrostowego surowicy płodowej. Na podstawie wyników badań przedstawionych w wymienionej tabeli stwierdzono, że komórki nerek, jąder, mięśnia sercowego płodów cieląt oraz nerek prosiąt przechowywane w ciekłym azocie do 6 – 7 miesięcy zachowały dobrą żywotność i nie zmieniony potencjał wzrostowy. Aby uzyskać hodowle po dłuższym okresie przechowywania komórek należało używać około dwukrotnie większej ich liczby, niż do zakładania hodowli z komórek otrzymywanych bezpośrednio po trypsinowaniu tkanek. Komórki tarczycy cieląt badane po okresie 4-miesięcznego zamrożenia były przydatne do założenia hodowli. W dostępnym piśmiennictwie zagranicznym tylko nieliczne prace dotyczą omawianego zagadnienia. House i House (3) przedstawili pozytywne rezultaty przechowywania komórek pierwotnych w zamrożeniu.

W tab. 4 przedstawiono wyniki mianowania wirusa pryszczycy typu A, O, C w hodowlach komórek. Wrażliwe na zakażenie wirusem były hodowle komórek nerek płodów cieląt,

Tab. 3. Charakterystyka komórek

Zawiesina komórek	% komórek uszkodzonych przed zamrożeniem	Wzrost hodowli komórek bezpośrednio po trypsynizacji	Okres przechowywania w temp. -196°C (w m-cach)	% komórek uszkodzonych po przechowywaniu w temp. -196°C	Wzrost komórek po zamrożeniu	
					w płynie z surowicą	
					cielęcą	płodową
Nerek płodów cieląt	7	+++	2	7,0-9,2	+++	+++
			3	7,0-9,5	+++	+++
			4	7,3-9,5	+++	+++
			5	7,5-9,7	+++	+++
			6	8,0-10,0	+++	+++
			7	8,2-10,0	++	++
			8	8,5-10,5	+	+
Mięśnia sercowego płodów cieląt	5	+++	2	5,0-7,0	+++	+++
			3	5,0-7,0	+++	+++
			4	5,3-7,0	+++	+++
			5	5,5-7,2	+++	+++
			6	6,0-7,5	+++	+++
			7	6,2-7,5	+++	+++
			8	6,5-8,0	++	++
Jąder płodów cieląt	2	+++	2	2,0-2,5	+++	+++
			3	2,3-5,5	+++	+++
			4	2,5-5,5	+++	+++
			5	3,0-5,5	+++	+++
			6	3,5-6,0	+++	+++
			7	3,5-6,0	+++	+++
			8	3,7-6,5	++	++
Nerek prosiąt	5	+++	2	5,0-7,5	+++	+++
			3	5,0-7,8	+++	+++
			4	5,2-7,8	+++	+++
			5	5,5-8,0	+++	+++
			6	5,5-8,0	+++	+++
			7	5,9-8,3	++	++
			8	6,2-9,0	++	++
Tarczycy cieląt	6	+++	2	6,0-8,5	+	+++
			3	6,0-8,7	+	+++
			4	6,3-9,0	+	+++

Objaśnienia: jak w tab. 2.

nerek prosiąt i tarczycy cieląt. W hodowlach komórek mięśnia sercowego i jąder płodów cieląt nie obserwowano zmian cytopatycznych. Wyniki te nie potwierdzają doniesień innych autorów (3, 13).

Prezentowane wyniki badań jednoznacznie wskazują na możliwość wykorzystania do diagnostyki wirusa pryszczycy komórek nerek płodów cieląt, nerek prosiąt i tarczycy cieląt przechowywanych w temperaturze -196°C co najmniej do 6 miesięcy.

Biorąc pod uwagę fakt, że od wyjęcia ampułki z komórkami do czasu uzyskania hodowli upływa zwykle tylko 48 godzin, możliwe jest skrócenie terminu uzyskania wyniku już w 4 dni po otrzymaniu materiału do badań, łącznie z identyfikacją serologiczną. Tradycyjny sposób sporządzania hodowli wymaga prac przygotowawczych i najczęściej wydłuża ten okres o kilka dni. Nie zawsze bowiem jest dostępna odpowiednia tkanka, a w czasie przygotowania hodowli komórek możliwe jest przypadkowe zakażenie lub brak potencjału wzrostowego. Niedogodności te eliminuje użycie zawiesiny o sprawdzonym potencjale wzrostowym, wolnej od zakażeń ubocznych, które mogą nastąpić w czasie pobierania lub trypsynowania tkanek.

Tab. 4. Miano wirusa pryszczycy (w log TCID<sub>50</sub>) w komórkach rosnących bezpośrednio po trypsynizacji oraz po ich przechowywaniu w głębokim zamrożeniu

Hodowle komórek	Sposób przygotowania hodowli					
	z komórek bezpośrednio po trypsynowaniu			z komórek zamrożonych (6 miesięcy)		
	Typ A	Typ O	Typ C	Typ A	Typ O	Typ C
Nerek płodów	7,5	7,6	6,8	7,4	7,6	6,7
Mięśnia sercowego płodów cieląt	brak CPE	brak CPE	brak CPE	brak CPE	brak CPE	brak CPE
Jąder płodów cieląt	brak CPE	brak CPE	brak CPE	brak CPE	brak CPE	brak CPE
Nerek prosiąt	7,5	7,6	6,9	7,5	7,7	6,9
Tarczycy cieląt	7,6	7,6	6,9	7,6	7,6	6,9

## Wnioski

1. Zawiesina komórek uzyskana metodą trypsynizacji z tkanki płodowych bydła (mięsień sercowy, jądra, nerki) i tarczycy cieląt oraz z nerek prosiąt może być poddawana głębokiemu zamrożeniu i zachowuje nie zmieniony potencjał wzrostowy przez co najmniej 6 miesięcy.

2. Najodpowiedniejszym podłożem do wzrostu komórek nerek, mięśnia sercowego, jąder płodów cieląt oraz nerek prosiąt uzyskanych bezpośrednio po trypsynizacji, jak i przechowywanych w stanie głębokiego zamrożenia jest płyn Hanksa z 10% surowicą cielęcą i 0,5% hydrolizatem laktoalbuminy oraz 1% buforem Hepes lub z dodatkami: 10% surowicy cielęcej, 10% bulionu fosforanu tryptozy, 1% L-Glutaminy i 0,5% hydrolizatu laktoalbuminy; komórki tarczycy cielęcej najlepiej wyrastają w płynie Eagle'a z 10% surowicą płodową.

3. Wysokości miana TCID<sub>50</sub> oraz intensywność zmian cytopatycznych powodowanych przez wirus pryszczycy typu A, O, C w hodowlach otrzymanych z komórek bezpośrednio

po trypsynizacji i po przechowywaniu przez 6 miesięcy w stanie głębokiego zamrożenia nie różnią się.

## Piśmiennictwo

1. Bachrach H.L., De Boer J.C., Hamblet F.E.: Am. J. Vet. Res. 23, 608, 1962.
2. Bindrich H., Kuwert E.: Arch. exper. Vet. med. 14, 142, 1959.
3. House C., House J.: Vet. Microbiol. 20, 99, 1989.
4. Larski Z.: Diagnostyka wirusologiczna chorób zwierząt. PWRiL, Warszawa 1977.
5. Lebedev A., Gogolev M.M., Mutuzkin L.J., Mutuzkina Z.P.: Veterinarija 1, 31, 1972.
6. Loddo B., Medda A.: Vet. Ital. 11, 659, 1960.
7. Medda A., Loddo B.: Atto Soc. Ital. Sci. Vet. 14, 770, 1969.
8. Melendez L.V., Gaggera A., Rodriquez T., Noramuena G.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 95, 696, 1957.
9. Misra V.C.: J.Remount. Vet. Corps. Hissar. 9, 21, 1970.
10. Paprocka G., Kęsy A.: Biotechnologia P I, 3, 15, 1992.
11. Sellers R.F.: Nature 176, 547, 1955.
12. Snowdon W.A.: Nature 210, 1079, 1966.
13. Willems R., Marchal A.: Bull. Off. Int. Epizoot. 61, 969, 1964.

Adres autora: dr Grażyna Paprocka, ul. Spacerowa 70/5, 98-220 Zduńska Wola

EWA SZARSKA

## Ocena wydolności koni podczas zawodów konkurencji WKKW

Zakład Fizjologii Pracy Wojskowego Instytutu Higieny i Epidemiologii, ul. Kozielska 4, 01-163 Warszawa

### Summary

#### Evaluating the fitness of horses during a three-day competition

Blood samples were taken from 21 horses before competition (S), after a race (W) and after a 30 min. rest period (R). Five-year-old horses taking part in a championship were compared with older horses starting in the Championship of Poland. The distance for young horses was shorter than the one for older ones. The changes of parameters such as Ht, Hb, LA, Glu and TP in the blood of five-year-old horses were higher than those of older horses. It was found that most of the five-year-old horses starting in the championship had not been well trained for the competition, while the older horses participating in the Championship of Poland were prepared properly for that race.

Przygotowanie koni do konkurencji Wszechstronnego Konkursu Konia Wierzchowego (WKKW) musi być wielokierunkowe i uwzględniać równoległy rozwój takich cech, jak: siła, szybkość i wytrzymałość z jednoczesnym doskonaleniem techniki skoku i jazdy ujeżdżeniowej. Z punktu widzenia ogólnej wydolności organizmu najtrudniejszym elementem zawodów jest cross czyli terenowy bieg z przeszkodami. Zawody WKKW mogą być rozgrywane w formie pełnej lub skróconej – tzw. zawody kombinowane. W dniu próby terenowej, w pełnym WKKW, konie mają do pokonania, różnym tempem, 4 odcinki trasy: a) drogi i ścieżki – kłus, b) stepl – galop z przeszkodami po płaskim torze, c) drogi i ścieżki – kłus, d) cross – galop z przeszkodami w terenie. W zawodach kombinowanych nie ma odcinków a i b. Najważniejszym startem krajowym dla koni

dorosłych są Mistrzostwa Polski, a dla koni młodych – Championat koni pięcioletnich.

Celem pracy było określenie wydolności koni na podstawie wyników badań hematologicznych i biochemicznych krwi:

– porównanie reakcji na wysiłek koni starszych startujących w Mistrzostwach Polski i koni młodszych startujących w Championacie koni 5-letnich.

– ocena przygotowania do startu koni w obu grupach wiekowych.

### Materiał i metody

Obiektem badań było 21 koni: 10 koni starszych startujących w Mistrzostwach Polski seniorów i 11 koni 5-letnich startujących w Championacie. Obie imprezy to pełne WKKW. Dla lepszego porównania podano długości poszczególnych odcinków trasy, przewidziane tempo i liczbę przeszkód.

Mistrzostwa Polski		Championat	
a.	3080 m 220 m/min.	3080 m	220m/min.
b.	2760 m 690 m/min. 8 przeszkód	1500 m	600m/min. 5 p.
c.	9240 m 220 m/min.	3300 m	220m/min.
d.	6270 m 570 m/min. 26 przeszkód	3000 m	550m/min. 20 p.
	21 350 m	10	880 m

Badanym koniom w dniu startu trzykrotnie pobierano krew rano w stajni: w spoczynku (S), bezpośrednio po zakończeniu wysiłku (W) i 30' po ukończeniu crossu (R).

We krwi oznaczano następujące wskaźniki hematologiczne: OB, Ht i Hb oraz biochemiczne: poziom kwasu mlekowego (LA), glukozy i białka całkowitego. Kwas mlekowy oznaczano testem firmy Boehringer, glukozę w pełnej krwi testem firmy Cormay, a białko i hemoglobinę testami firmy Alpha Diagnostic.