

ZBIGNIEW GRĄDZKI, STANISŁAW WINIARCZYK

artykuł przeglądowy

Metody rozpoznawania wirusowego zapalenia żołądka i jelit świń

Katedra Epizootologii i Klinika Chorób Zakaźnych Zwierząt Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, ul. Głęboka 30, 20-612 Lublin

Wirusowe zapalenie żołądka i jelit (TGE – Transmissible Gastroenteritis) jest zaraźliwą chorobą przewodu pokarmowego świń przebiegającą z objawami wymiotów, silnej biegunki, odwodnienia i zaburzeń metabolicznych oraz wysoką (ok. 100%) śmiertelnością osesków w wieku do 14 dnia życia (43). Czynnikiem etiologicznym TGE jest wirus (TGEV) należący do rodziny *Coronaviridae*, tworzący wspólną grupę antygenową z wirusem PRCV (wariant delecyjny wirusa TGE), koronawirusem psów (CCV) oraz wirusem zapalenia otrzewnej kotów (FIPV) i wirusem zapalenia jelit kotów (FECV) (44). U zakażonych prosiąt wirus namnaża się w cytoplazmie komórek nabłonka absorpcyjnego jelit cienkich, prowadząc do destrukcji enterocytów oraz skrócenia a następnie zaniku kosmków jelitowych, co stanowi przyczynę zaburzeń wchłaniania (19, 20). Choroba, po raz pierwszy opisana w 1946 r. w Stanach Zjednoczonych (9), występuje aktualnie na całym świecie i jest przyczyną znacznych strat ekonomicznych w hodowli trzody chlewnej (30). Straty powodowane chorobą są największe, gdy do zakażenia dochodzi w okresie oproszeń w stadzie dotychczas wolnym od zarazka. Wówczas choroba ma przebieg epizootyczny, szybko się szerzy i atakuje zwierzęta w każdym wieku. Prosięta w wieku powyżej 3 tyg. oraz świnię starsze zwykle przeżywają infekcję, a objawy kliniczne ograniczone są u nich do utraty apetytu i przemijającej biegunki. Prosięta ssące, warchlaki oraz świnię dorosłe stają się w wyniku zakażenia wektorem transmisji wirusa, co ma istotne znaczenie w przypadku wprowadzania takich zwierząt do nowych stad, nie mających uprzednio kontaktu z zarazkiem. W warunkach przemysłowego chowu świń wczesne i trafne rozpoznanie choroby ma kluczowe znaczenie dla ochrony stada. W przypadku zakażeń wirusem TGEV istotna jest zwłaszcza możliwość rozpoznania enzoptycznych postaci choroby, które klinicznie są zbliżone do kolibakteriozy lub biegunki rotawirusowej, a w praktyce często są mylnie diagnozowane (5). Fakt ten można częściowo tłumaczyć podobieństwem objawów klinicznych, zmian sekcyjnych a nawet obrazu histopatologicznego pomiędzy wspomnianymi jednostkami chorobowymi (43).

Niniejszy artykuł jest przeglądem wybranych współcześnie stosowanych metod diagnostycznych wykorzystywanych w rozpoznawaniu TGE u świń.

Mikroskopia elektronowa

Morfologia wirusa TGE jest charakterystyczna (14, 40, 48). Pleomorficzne cząsteczki wirionów o średnicy 60-160 nm posiadają wystające na zewnątrz charakterystyczne tylko dla rodziny koronawirusów maczugowate wypustki o długości około 20 nm, otaczające wirion na kształt korony słonecznej. Wykazanie w badanym materiale obecności takich cząsteczek przy pomocy mikroskopu elektronowego, przy współistnieniu typowych objawów klinicznych, stanowi pewną metodę potwierdzającą rozpoznanie choroby. Wykorzystując technikę kontrastu negatywnego, wirus TGEV można uwidocznić w mikroskopie elektronowym w próbkach z treści jelit oraz kału, pochodzących od chorych świń (39, 51). Metodę tę można także zastosować do potwierdzenia obecności wirusa w zakażonych hodowlach komórkowych zwłaszcza, że w pierwszych pasażach izolatów terenowych przeważnie nie obserwuje się efektu cytopatycznego (34). Mimo istotnych zalet mikroskopii elektronowej, technika ta nie jest stosowana w rutynowej diagnostyce zakażeń TGEV u świń. Uzyskanie pozytywnego efektu w obrazie elektronomikroskopowym wymaga obecności w badanym materiale dużej ilości cząstek wirusa, co w praktyce wiąże się z koniecznością pobrania materiału w okresie szczytowego nasilenia objawów klinicznych (35). U prosiąt ssących, u których choroba ma przebieg gwałtowny okres ten jest z reguły bardzo krótki, gdyż szybko dochodzi do zejść śmiertelnych na skutek odwodnienia i zaburzeń metabolicznych. W przebiegu enzoptycznym TGE charakterystycznym dla prosiąt starszych, nasilenie objawów klinicznych bywa zmienne, a zatem trudno jest uchwycić odpowiedni moment do pobrania prób do badań. Przydatność stosowania mikroskopii elektronowej w rozpoznawaniu TGE limitowana jest także rodzajem badanego materiału klinicznego. Treść jelit oraz kał z natury są zanieczyszczone domieszkami pozostałości komórkowych, które w obrazie elektronomikroskopowym mogą przybierać formy morfolo-

gicznie zbliżone do koronawirusów (42). Whitaker i wsp. (53) wykazali, że klasyczna mikroskopia elektronowa jest metodą znacznie mniej czułą w detekcji wirusa TGEV w porównaniu do testu immunofluorescencji. Z tego względu bardziej użyteczna diagnostycznie okazała się immunoelektronomikroskopia (IEM), której czułość oraz swoistość dorównują immunofluorescencji.

Immunoelektronomikroskopia (IEM)

Jest to metoda polegająca na wykrywaniu w mikroskopie elektronowym zagregowanych cząstek wirusa opłaszczonych swoistymi przeciwciałami. Technika ta została po raz pierwszy wykorzystana w 1941 r. przez Andersona i Stanleya (cyt. 42) w badaniach reakcji pomiędzy wirusem mozaiki tytoniowej a specyficznymi w stosunku do niego przeciwciałami. Aktualnie jest ona stosowana w wielu laboratoriach diagnostycznych do wykrywania w materiale patologicznym obecności wirusów, zwłaszcza takich, które trudno adaptują się do wzrostu w hodowlach komórkowych (21). Dzięki tworzeniu wielocząsteczkowych agregatów wirus-przeciwciało, łatwo widocznych w mikroskopie elektronowym, możliwe jest uzyskanie znacznie wyższej czułości metody w porównaniu z konwencjonalną techniką mikroskopii elektronowej. Istotne znaczenie ma fakt, że IEM można wykorzystywać do detekcji wirusów w kale, co czyni ją przydatną w diagnostyce przyżyciowej (21, 42). IEM może być stosowana do serotypowania wirusów przy wykorzystaniu specyficznych surowic typowo-swoistych (49). Saif i wsp. (42) zastosowali metodę IEM do wykrywania wirusa TGEV i rotawirusów w kale oraz treści jelitowej zakażonych świń. Oceniając czułość metody w odniesieniu do wirusa TGEV autorzy wykazali, że umożliwia ona wykrycie przynajmniej jednego kompleksu wirus-przeciwciało w polu widzenia, przy koncentracji wynoszącej 9×10^4 PFU/ml. Zastosowanie 10-krotnie niższej koncentracji wirusa nie pozwala już na jego uwidocznienie. Czułość metody można jednak zwiększyć poprzez zastosowanie pośredniej formy IEM z użyciem króliczej surowicy antyglobulinowej przeciwko IgG świni. W takim układzie możliwa jest detekcja zagregowanych cząstek wirusa o mianie $1-3 \times 10^3$ PFU/ml. Z wym. badań wynika, że IEM jest prostą, powtarzalną i czułą techniką wykrywania wirusa TGEV w materiale klinicznym pobranym w początkowym okresie trwania choroby. W próbkach takich z reguły nie jest możliwe wykazanie obecności wirusa metodą konwencjonalnej mikroskopii elektronowej. Zaletą bezpośredniej i pośredniej IEM w wykrywaniu wirusa TGEV jest jej specyficzność związana z obecnością swoistych przeciwciał. Ma to istotne znaczenie w przypadku badania treści jelitowej oraz próbek kału. W materiale takim wirus często przybiera wy-

gląd atypowy, co może manifestować się brakiem charakterystycznych dla koronawirusów wypustek powierzchniowych lub nawet częściową dezintegracją cząsteczki (39, 42). Zastosowanie IEM pozwala na wykazanie obecności wirusa TGEV już w 24 godz. po dostarczeniu materiału do pracowni diagnostycznej. Może być ona zatem wykorzystywana do postawienia wstępnego rozpoznania choroby, które o ile zachodzi potrzeba może być uzupełnione metodami hodowlanymi lub innymi testami diagnostycznymi. Umożliwia ona ponadto zróżnicowanie pomiędzy wirusem TGEV a rotawirusem świń. Zarazki te wywołują u zakażonych zwierząt podobne objawy kliniczne i zmiany anatomopatologiczne, a niejednokrotnie stanowią wspólną przyczynę syndromu biegunkowego prosiąt (5). Odmianą klasycznej immunoelektronomikroskopii jest metoda w fazie stałej (SPIEM-solid phase immune electron microscopy). Istotą tej metody jest zastosowanie tzw. pułapki serologicznej (serological trapping), dzięki której wirus zostaje zaadsorbowany na powierzchni siatki elektronomikroskopowej opłaszczonej białkiem A oraz swoistymi przeciwciałami antywirusowymi. Nieuwstadt i wsp. (32, 33) wykorzystali metodę SPIEM do wykrywania wirusa TGEV w kale biegunkowym pochodzącym od prosiąt podejrzanych o chorobę. Autorzy ci wykazali, że dzięki specyficznemu wychwytywaniu cząstek wirusowych oraz zapobieganiu adsorpcji zanieczyszczeń, technika ta jest około 100-krotnie bardziej czuła jeśli chodzi o możliwość detekcji wirusa w natywnym kale w porównaniu z konwencjonalną mikroskopią elektronową. Przy zastosowaniu wspomnianej metody wirus mógł być wykryty w próbkach kału już w okresie 1-2 dni po zakażeniu eksperymentalnym świń zjadliwym szczepem TGEV, oraz w okresie późniejszym, aż do zejścia śmiertelnego zwierząt doświadczalnych.

Histopatologia

Badanie anatomopatologiczne i histopatologiczne w przypadku TGE u świń może być podstawą do postawienia szybkiego rozpoznania choroby o ostrym przebiegu, któremu towarzyszą zejścia śmiertelne prosiąt oseków. Zmiany makroskopowe ograniczone są do przewodu pokarmowego, w obrębie którego zwraca uwagę scieżnienie ściany jelita cienkiego w odcinku czczym i biodrowym (4, 43). Spowodowane jest to wyraźnym skróceniem kosmków błony śluzowej wymienionych odcinków jelita cienkiego, które Hooper i Haelterman (19) określili mianem atrofii kosmków. Tego typu zmiany początkowo uważano za patognomiczne wyłącznie dla ostrej postaci TGE. Obecnie wiadomo, że mogą one pojawiać się także w przebiegu zakażenia rotawirusami, wirusem PEDV, *E. coli* a także inwazji kokcydii, jakkolwiek są wówczas słabiej wyrażone niż w przy-

padku TGE (5, 20). Stopień atrofii kosmków jelitowych najłatwiej określić można w badaniu histopatologicznym, w którym porównuje się ich długość z głębokością krypt Lieberkühna. Stosunek obu wymiarów u świń zdrowych wynosi około 7:1, natomiast u zakażonych przeważnie 1:1 (19). Badanie takie jest pracochłonne a jego specyficzność ograniczona jest do ostrej postaci choroby, stąd też częściej wykorzystywane są w diagnostyce metody z użyciem przeciwciał fluoryzujących oraz metody immunohistochemiczne, umożliwiające bezpośrednio wykazanie antygenów wirusowych w zainfekowanych tkankach. Wśród tych metod najpowszechniej stosowana jest technika immunofluorescencji.

Immunofluorescencja

Technika przeciwciał fluoryzujących okazała się niezmiernie cenną w badaniach patogenezы chorób wirusowych, dzięki możliwości lokalizowania antygenów zarazka w różnych tkankach w przebiegu infekcji. Konsekwencją tych badań było wykorzystanie metody immunofluorescencji (IF) do diagnostyki chorób wirusowych w tym grypy, wścieklizny, nosówki psów, choroby Aujeszky'ego, pomoru świń i innych (cyt. 37). W latach sześćdziesiątych McClurkin i wsp. (28) zastosowali test IF do potwierdzenia obecności niektórych cytopatogennych szczepów wirusa TGEV w warunkach *in vitro* w zakażonych hodowlach komórkowych jąder oraz nerki świni. Konishi i wsp. (23) wykorzystali wspomnianą metodę do detekcji antygenów wirusa TGEV w preparatach odciskowych wykonywanych z różnych tkanek w przebiegu doświadczalnego zakażenia świń. Pensaert i wsp. (37, 38) oraz Black (3) jako pierwsi opisali możliwość aplikacji metody IF do rozpoznawania terenowych przypadków zakażeń TGEV u świń. Autorzy ci wykazali obecność swoistej fluorescencji w mrożonych skrawkach jelita cienkiego pochodzących od świń ze wszystkich zakażonych stad. Taki sam odsetek wyników pozytywnych odnotowano jedynie w ocenie histopatologicznej badanych próbek. Obserwacje te wskazują, że technika przeciwciał fluoryzujących w odniesieniu do badania mrożonych skrawków jelita cienkiego jest specyficzną i wiarygodną metodą rozpoznawania TGE w zakażonych stadach świń. Autorzy podkreślają, że postawienie szybkiego i trafnego rozpoznania metodą IF uzależnione jest w dużej mierze od rodzaju materiału dostarczonego do badań. Z uwagi na fakt, że docelowym miejscem namnażania się wirusa TGEV u zakażonych świń jest nabłonek wyściełający jelito cienkie, zbadanie tego odcinka przewodu pokarmowego daje największe szanse na uzyskanie pewnego rozpoznania choroby. Świnie w zakażonych stadach znajdują się z reguły w różnych stadiach infekcji, co ma wpływ na różnice w nasileniu zmian makro- i mikroskopowych w obrębie

przewodu pokarmowego, a także na ilość komórek wykazujących fluorescencję. Największa liczba zakażonych wirusem komórek nabłonka jelitowego występuje w fazie degeneracyjnej infekcji i w tym okresie rozpoznanie choroby metodą IF jest najłatwiejsze. W warunkach eksperymentalnych stadium to ma miejsce w zależności od zjadliwości użytego szczepu między 9 a 16 godz. lub między 18 a 72 godz. po zakażeniu (29, 46). W fazie atrofii oraz w fazie regeneracyjnej natomiast, nieliczne tylko komórki nabłonkowe wykazują swoistą fluorescencję. W przypadku zakażenia naturalnego maksymalną ilość komórek z fluoryzującą cytoplazmą obserwowano u prosiąt w 3-5 dniu choroby, co łączyło się ze szczytowym nasileniem objawów klinicznych (46). U prosiąt starszych 6-7-dniowych liczba tych komórek była znacznie niższa, natomiast u 10-dniowych nie stwierdzano ich w żadnym odcinku jelita.

Metoda IF odpowiada specyficznością izolacji wirusa, przy czym detekcja wirusa w hodowli komórkowej lub u doświadczalnie zakażonych prosiąt jest metodą droższą, bardziej czasochłonną i kłopotliwą (2). Wykrywanie antygenów wirusa TGEV w komórkach nabłonkowych metodą IF wiąże się z koniecznością użycia do badań świeżego materiału klinicznego, ponieważ większość zakażonych wirusem komórek ulega uszkodzeniu w ciągu 24-72 godz. po wnikięciu zarazka (37, 43). Fakt ten czyni tę metodę mniej przydatną diagnostycznie w późniejszych etapach rozwoju choroby.

W Polsce badania nad laboratoryjnym rozpoznaniem TGE u świń w oparciu o metodę IF prowadzili Wijaszka i wsp. (54) oraz Sobiech i wsp. (46). Autorzy ci wykazali, że odczyn immunofluorescencji bezpośredniej w skrawkach parafinowych przygotowanych z jelit cienkich chorych prosiąt jest metodą w pełni przydatną do rutynowej diagnostyki choroby. Umożliwia ona bowiem postawienie diagnozy w ciągu 24 godz. po dostarczeniu materiału do badań, jest stosunkowo prosta w wykonaniu oraz w przypadku dostępności świeżego materiału patologicznego zapewnia w 100% trafne rozpoznanie.

Metody immunohistochemiczne

Techniki immunohistochemiczne są aktualnie szeroko stosowane do wykrywania antygenów różnych drobnoustrojów, w tym antygenów wirusowych. Metody te są w stanie wykazać dystrybucję antygenów zarazka w tkankach utrwalonych przy użyciu standardowych utrwalaczy takich jak formalina, a preparaty takie stanowią jednocześnie trwałą dokumentację rozpoznania choroby (17). Ponadto możliwa jest równoczesna ocena obecności i rozmieszczenia antygenów w badanych tkankach oraz zmian histopatologicznych (16). Na podkreślenie zasługuje fakt, że w odróżnieniu od immunofluorescencji obu ocen

dokonywane przy użyciu zwykłego mikroskopu świetlnego.

Technika immunologiczna połączona z barwieniem złotem (Immunogold Silver Staining – IGSS) stosowana jest do wykrywania różnych antygenów tkankowych w skrawkach parafinowych przygotowanych z materiału uprzednio utrwalonego formaliną (17). W patologii świń metodę tę stosowano m.in. do wykazania obecności wirusa choroby Aujeszky'ego (10), rotawirusów z grupy A (27) oraz ostatnio do detekcji wirusa TGEV (25). Zasada metody polega na wykorzystaniu układu podwójnych przeciwciał, z których jedno reaguje swoiście z antygenem, natomiast drugie będące przeciwciałami antyglobulinowymi sprzężone są z cząsteczkami złota koloidalnego i stanowią system detekcyjny reakcji. Użycie przeciwciał warunkuje swoistość reakcji, natomiast obecność złota pozwala na uwidocznienie kompleksów antygen-przeciwciało w badanych tkankach przy użyciu mikroskopu świetlnego. Dodatkowe zastosowanie soli srebra w ostatniej fazie reakcji wzmacnia efekt barwienia złotem (silver enhancement). IGSS nie jest metodą enzymatyczną co eliminuje problem ewentualnej interferencji ze strony endogennych enzymów tkankowych badanej próbki. Ponadto marker barwiący w postaci złota koloidalnego nie stanowi zagrożenia dla zdrowia człowieka w odróżnieniu od potencjalnie karcinogennych chromogenów stosowanych w metodach immunoenzymatycznych. Laroche i wsp. (25) oraz Magar i wsp. (27) zmodyfikowali wym. metodę, zastępując użycie skoniugowanej ze złotem surowicy antyglobulinowej sprzężonej ze złotem białkiem A (Protein A Gold – PAG) oraz wykorzystali ją do rozpoznawania zakażeń rotawirusowych i TGE u świń. Białko A jest chemicznie czystym produktem i odznacza się wyższym stopniem standaryzacji w porównaniu do przeciwciał antyglobulinowych. Ponadto reaguje ono z przeciwciałami klasy IgG wielu gatunków ssaków, co decyduje o jego swoistej uniwersalności. Przygotowanie kompleksu PAG jest proste i stosunkowo mało kosztowne w porównaniu z przygotowaniem i kosztem koniugatów enzymatycznych. Kompleksy PAG są ponadto bardzo stabilne, a ich bioreaktywność jest zachowywana przez wiele miesięcy, jeżeli przechowywane są w temp. 4°C (25, 27).

W obrazie elektronomikroskopowym wzorcowego szczepu Purdue TGEV oraz dwóch izolatów terenowych stwierdzono, że cząstki złota były ściśle związane z pojedynczymi wirionami a tło reakcji było minimalne. W preparatach kontrolnych nie obserwowano specyficznego barwienia w obrębie wirionów.

W skrawkach tkankowych, w obrębie enterocytów kosmków jelitowych obserwowano ciemne złogi barwnika zlokalizowane w cytoplazmie komórek. Zabarwione enterocyty były rozmieszczone w za-

kończeniach kosmków, zwłaszcza w miejscach, w których doszło do ich atrofii. Nie zaobserwowano obniżenia się kontrastu obrazu w przypadku zastosowania konkurencyjnego dobarwiania preparatów za pomocą hematoksyliny. Obok białka A do przygotowania koniugatu wykorzystano białko G, wykazujące również wysokie powinowactwo do immunoglobulin różnych gatunków ssaków. Ostatnio skonstruowano metodami inżynierii genetycznej tzw. białko chimeryczne, będące mieszaniną białka A i G (A/G) (12). Badania immunochemiczne wykazały, że takie białko wykazuje szersze spektrum reaktywności z immunoglobulinami różnych gatunków zwierząt, a także z przeciwciałami różnych podklas, w porównaniu do obydwu wyjściowych białek, tj. A lub G. Zwiększoną reaktywność wykazano także w odniesieniu do kompleksu PA/GG w porównaniu do analogicznej reaktywności oddzielnie do kompleksów PAG oraz PGG. Badania Laroche i Magyara (25) wykazały porównywalną aktywność białka-chimery (A/G) oraz białka A z przeciwciałami świni w metodzie IGSS.

Izolacja wirusa

Doświadczalne zakażenie wrażliwych prosiąt ssących poprzez doustne podanie podejrzanego materiału patologicznego jest czułą i pewną metodą detekcji żywych cząstek wirusa TGEV w badanych próbkach (11). Ponieważ procedura taka jest dość kosztowna, częściej wykorzystuje się do izolacji wirusa metodę zakażenia hodowli komórkowych (4, 5, 43). W tym celu bakteriologicznie jałowym przesączem badanego materiału zakaża się hodowle pierwotne lub ustalone linie komórek nerki, tarczycy lub jąder świni (58). Rzadziej wykorzystywane są pierwotne hodowle komórek ślinianek świni (47) oraz hodowle narządowe z przełyku, jelita biodrowego, ślepego i okrężnicy świni (41). W większości stosowanych hodowli komórkowych następstwem replikacji wirusa jest wystąpienie efektu cytopatycznego (CPE) (28, 57). Efekt ten wyraża się poprzez pojawienie się w hodowli jednowarstwowej komórek powiększonych, zaokrąglonych, czasem wydłużonych lub balonowatych, odrywających się od powierzchni wzrostowej. Często jednak, zwłaszcza w przypadku pierwotnej izolacji szczepów terenowych wirusa TGEV, efekt cytopatyczny nie pojawia się od razu po pierwszej inokulacji badanego materiału do hodowli komórek i konieczne jest wykonanie dodatkowych pasażów. Ponadto niektórzy autorzy zwracają uwagę na występowanie w populacji świń szczepów trudno lub w ogóle nie adaptujących się do wzrostu w hodowli komórkowej, których nie udaje się wyizolować w warunkach laboratoryjnych (50). Według niektórych autorów szanse wyizolowania szczepu terenowego TGEV można zwiększyć poprzez dodanie pankreatyny lub trypsyny do pod-

łoża hodowlanego, ewentualnie poprzez jednoczesne traktowanie enzymem inokulum wirusowego (5, 18, 22). Enzymatyczne nadtrawienie błony komórkowej miałyby ułatwić uwolnienie cząstek wirusa oraz późniejsze jego wnikanie do komórek hodowli. Pojawienie się w zakażonej hodowli komórkowej efektu cytopatycznego nie jest równoznaczne z potwierdzeniem obecności namnożonego wirusa. W tym celu najczęściej stosuje się metodę immunofluorescencji, seroneutralizacji, immunoelektronomikroskopii (4, 5, 43) a ostatnio również metody biologii molekularnej (15). W warunkach krajowych próby izolacji wirusa TGEV z materiału klinicznego podjęli Wijaszka i Tereszczuk (55), którym udało się wyizolować po raz pierwszy w Polsce pełnozjadliwy, cytopatogeny szczep TGEV w hodowli komórkowej nerki oraz tarczycy świni.

Badanie serologiczne

Bezpośrednie metody diagnostyczne pozwalają na postawienie rozpoznania TGE przebiegającego w typowej, ostrej formie jaką obserwuje się w stadach uprzednio wolnych od zarazka (43). Są one natomiast mało przydatne do diagnozowania enzoptycznych postaci choroby o łagodnym lub atypowym przebiegu z atakowaniem jedynie części zwierząt, przeważnie prosiąt odsadzanych oraz sztuk nowo wprowadzanych do stada. W takich przypadkach użyteczne diagnostycznie mogą być metody pośrednie, stwierdzające obecność przeciwciał przeciwko wirusowi TGEV w surowicy krwi. Świnie, które przeżywają zakażenie wirusem TGEV mogą stać się nosicielami zarazka i wówczas stanowią źródło infekcji dla wrażliwych zwierząt (8). W związku z tym konieczna jest dokładna kontrola serologiczna w celu wykrycia sztuk seropozytywnych przed wprowadzeniem ich do stada. Pozwala to na uniknięcie ryzyka zawleczenia choroby do stad nie mających wcześniej kontaktu z zarazkiem. Kontrola taka powinna dotyczyć także zwierząt eksportowanych do krajów wolnych od choroby. Serologiczna diagnostyka zakażeń TGEV u świń komplikowana jest jednak faktem, że przeciwciała poliklonalne nie różnicują infekcji wirusem TGEV oraz wirusem PRCV (24). W zakażonym ustroju wirus TGEV jak również spokrewniony z nim PRCV będący mutantem delecyjnym TGEV, indukują powstawanie przeciwciał neutralizujących reagujących w jednakowym stopniu z wirusem TGEV. Biorąc pod uwagę znaczne rozprzestrzenienie subklinicznych infekcji PRCV w populacji świń w Europie i na świecie (26), należy liczyć się z możliwością uzyskiwania wyników fałszywie dodatnich w przypadku stosowania konwencjonalnych metod diagnostyki serologicznej jak np. test seroneutralizacji. Metoda neutralizacji wirusa w hodowli komórek była przez wiele lat najczęściej stosowaną w serodiagnostyce i seroepidemiologii zakażeń

TGEV i w związku z tym uważana jest za referencyjną w odniesieniu do innych metod wykrywania przeciwciał surowicznych (31). Swoistość tej metody została znacznie ograniczona poprzez pojawienie się w Europie w latach 1983-1984 (6, 36) oraz w USA w 1989 r. (52) wirusa PRCV. Podjęto wówczas próby opracowania testu różnicującego przeciwciała przeciwko obydwu zarazkom. Wykorzystanie przeciwciał monoklonalnych skierowanych przeciwko epitopom wirusa TGEV zlokalizowanym w obrębie głównego białka strukturalnego wirionu, a nieobecnym u wirusa PRCV, umożliwia serologiczne różnicowanie obydwu koronawirusów przy zastosowaniu metody kompetycyjnej inhibicji – blocking ELISA (7, 13, 45).

Dynamiczny w ostatnich latach rozwój nauk biologicznych spowodował, że konwencjonalne metody diagnostyki chorób zakaźnych, w tym głównie chorób o etiologii wirusowej, zastępowane są w coraz większym stopniu technikami biologii molekularnej (56). Metody identyfikacji drobnoustrojów oparte na detekcji genomu lub tylko fragmentu jego sekwencji, cechują się wysoką swoistością. Ponadto umożliwiają one potwierdzenie obecności w badanej próbce nawet pojedynczych cząstek drobnoustrojów chorobotwórczych, a zatem odznaczają się wysokim stopniem czułości. Techniki biologii molekularnej stosowane są dzisiaj rutynowo w diagnostyce wielu chorób wirusowych (1). Od kilku lat są one adaptowane również do rozpoznawania zakażeń wirusem TGEV u świń. Zagadnienie wykorzystania metod biologii molekularnej w analizie genomu wirusa oraz w rozpoznawaniu TGE u świń omówione zostanie w kolejnym artykule.

Piśmiennictwo

1. Belak S., Ballagi-Pordany A.: Vet. Res. Commun. 17, 55, 1993.
2. Beyer J., Leopoldt D., Jange E., Stepanek J., Hornich M., Mensik J.: Mh. Vet. Med. 39, 547, 1984.
3. Black J. W.: Proc. US Anim. Health Ass. 75, 492, 1971.
4. Bohl E. H.: Coronaviruses: Diagnosis of Infections. w: Comparative Diagnosis of Viral Diseases, t. 4, wyd. Kurstak E. i Kurstak C. Academic Press New York 1981, s. 301.
5. Bohl E. H.: Diagnosis of Diarrhea in Pigs due to Transmissible Gastroenteritis Virus or Rotavirus, w: Viral Enteritis in Humans and Animals, wyd. Bricout F., Scherrer R., INSERM, Paris 1979, s. 341.
6. Brown J., Cartwright S.: Vet. Rec. 119, 282, 1986.
7. Callebaut P., Pensaert M. B., Hooberghs J.: Vet. Microbiol. 20, 9, 1989.
8. Cubero M. J., Bernard S., Leon L., Lantier I., Contreras A.: Vet. Res. 24, 47, 1993.
9. Doyle L. P., Hutchings L. M.: J. Am. Vet. Med. Ass. 108, 257, 1946.
10. Ducatelle R., Coussement W., Hoorens J.: Am. J. Vet. Res. 45, 1913, 1984.
11. Dulac G. C., Ruckerbauer G. M., Boulanger P.: Can. J. Comp. Med. 41, 357, 1977.
12. Eliasson M., Anderson R., Olsson A.: J. Immunol. 142, 575, 1989.
13. Garwes D. J., Stewart F., Cartwright S. F., Brown I.: Vet. Rec. 122, 86, 1988.
14. Granzow H., Meyer U., Solisch P., Lange E., Fitchner D.: Arch. Exp. Vet. med. 35, 177, 1981.
15. Grądzki Z., Winiarczyk S., Stadejek T.: Roczn. Wojsk. Inst. Hig. 32, 8, 1995.
16. Hacker G. W., Springall D. R., Cheung A.: J. Histochem. Cytochem. 34, 118, 1986.

17. Haines D. M., Clark E. G.: Can. Vet. J. 32, 295, 1991.
18. Honda E., Takahashi H., Okazaki K., Minetoma T., Kumagai T.: Jap. J. Vet. Sci. 52, 217, 1990.
19. Hooper B. E., Halterman E. O.: Can. J. Comp. Med. 33, 29, 1969.
20. Hornich M., Salajka E., Stepanek J.: Zntbl. Vet. med. (B) 24, 75, 1977.
21. Kapikian A. Z., James H. D., Kelly S. J., Vaughn A. L.: Infect. Immun. 7, 111, 1973.
22. Komaniwa H., Makabe T., Fukusho A., Shimizu Y.: Jap. J. Vet. Sci. 48, 1245, 1986.
23. Konishi S., Bankowski R. A.: Am. J. Res. 28, 937, 1967.
24. Lanza I., Rubio P., Munoz M., Carmenes P.: J. Vet. Diagn. Invest. 5, 21, 1993.
25. Laroche R., Magar R.: J. Vet. Diagn. Invest. 5, 16, 1993.
26. Laude H., Van Reeth K., Pensaert M.: Vet. Res. 24, 125, 1993.
27. Magar R., Laroche R.: J. Vet. Diagn. Invest. 4, 3, 1992.
28. McClurkin A. W., Norman J. O.: Can. J. Comp. Med. 30, 190, 1966.
29. Morin M., Morehouse L. G., Solorzano R. F., Olson L. D.: Can. J. Comp. Med. 37, 239, 1973.
30. Mousing J., Vagsholm I., Carpenter T. E., Gardner I. A., Herd D. W.: J. Am. Vet. Med. Ass. 192, 756, 1988.
31. Nelson L. D., Kelling C. L.: Am. J. Vet. Res. 45, 1654, 1984.
32. Nieuwstadt A. P., Cornelissen J. B., Vreeswijk J.: Res. Vet. Sci. 44, 286, 1988.
33. Nieuwstadt A. P., Cornelissen J. B., Zestra T.: Am. J. Vet. Res. 49, 1836, 1988.
34. Okaniwa A., Harada K., Kaji T.: Natl Inst. Anim. Health Q. (Tokyo) 8, 148, 1968.
35. Okaniwa A., Harada K., Park D. K.: Natl Inst. Anim. Health Q. (Tokyo) 8, 175, 1968.
36. Pensaert M., Callebaut P., Vergote J.: Vet. Quart. 8, 257, 1986.
37. Pensaert M., Haelterman E. O., Burnstein T.: Can. J. Comp. Med. 32, 555, 1968.
38. Pensaert M. B., Haelterman E. O., Burstein T.: Arch. Ges. Virusforsch. 31, 321, 1970.
39. Pensaert M. B., Haelterman E. O., Hinsman E. J.: Arch. Ges. Virusforsch. 31, 335, 1970.
40. Phillip J. I., Cartwright S. F., Scott A. C.: Vet. Rec. 88, 311, 1971.
41. Rubinstein D., Tyrrell A. J., Derbyshire J. B., Collins A. P.: Nature 227, 1348, 1970.
42. Saif L. J., Bohl E. H., Kohler E. M., Huges J. H.: Am. J. Vet. Res. 38, 13, 1977.
43. Saif L. J., Wesley R. D.: Transmissible Gastroenteritis. w: Diseases of Swine, Iowa State Univ. Press. Ames, Iowa 1992, s. 362.
44. Sanchez C. M., Jimenez G., Laviada M. D., Correa I.: Virology 174, 410, 1990.
45. Simkins R. A., Weilnu P. A., Van Cott J., Brim T. A., Saif L. J.: Am. J. Vet. Res. 54, 254, 1993.
46. Sobiech T., Bochdalek R., Łosieczka K.: Medycyna Wet. 28, 328, 1972.
47. Stepanek J., Pospisil Z., Mesaros E.: Acta Vet. Brno 40, 235, 1971.
48. Tajima M.: Arch. Ges. Virusforsch. 29, 105, 1970.
49. Vassal J. H., Ray C. G.: Appl. Microbiol. 28, 623, 1974.
50. Vaughn E. M., Paul P. S.: Vet. Microbiol. 36, 333, 1993.
51. Wagner J. E., Beamer P. D., Ristic M.: Can. J. Comp. Med. 37, 177, 1973.
52. Wesley R. D., Woods R. D., Hill H. T., Biwer J. D.: J. Vet. Diagn. Invest. 2, 312, 1990.
53. Whitaker H. K., Alderson C.: Proc. 23rd Ann. Meet. Am. Ass. Vet. Lab. Diag. Des Moines, Iowa 1980, s. 321.
54. Wijaszka T., Tereszczuk S., Mierzejewska M., Zadura J., Roszkowski J.: Medycyna Wet. 30, 217, 1974.
55. Wijaszka T., Tereszczuk S.: Medycyna Wet. 30, 68, 1973.
56. Winiarczyk S.: Medycyna Wet. 49, 260, 1993.
57. Witte K. H.: Zntbl. Vet. med. (B) 18, 770, 1971.
58. Woods R., Wesley R. D.: J. Tissue Cult. Methods 11, 95, 1988.

Adres autora: dr Zbigniew Grądzki, ul. Tatarakowa 2/52, 20-541 Lublin

Redakcja Wydawnictw PTNW

dysponuje jeszcze egzemplarzami książkowymi:

- Edmund K. Prost:

Polskie przepisy san.-wet. Tom I i II

wg stanu prawnego na dzień 1.06.1995 r. – Cena 20,- zł

- Maria Prost:

Choroby ryb – Cena 15,-

Wysyłka pocztowa wraz z fakturą – po przesłaniu zamówienia na adres:

**Redakcja „Medycyny Weterynaryjnej”
ul. Akademicka 12, 20-033 LUBLIN**

lub telefonicznie pod nr: (kierunkowy: 0-81) 37-66-76, 37-69-00;
fax: (0-81) 329-12.