

WIESŁAW NIEDBALSKI, ANDRZEJ KĘSY, ANDRZEJ FITZNER, GRAŻYNA PAPROCKA

Choroba pęcherzykowa świń – aktualne metody diagnostyczne

Zakład Pryszczycy Państwowego Instytutu Weterynaryjnego, ul. Wodna 7, 98-220 Zduńska Wola

Aktualna sytuacja epizootyczna w zakresie choroby pęcherzykowej świń na świecie

Choroba pęcherzykowa świń (ang. Swine Vesicular Disease – SVD) jest zaraźliwą chorobą wirusową występującą w warunkach naturalnych u świń i dzików. Choroba przebiega ze zmianami pęcherzowymi umiejscowionymi w przestrzeniach międzyracicowych, na piętках, koronkach racic, skórze śródrecza i śródstopia, tarczy ryjowej i błonach śluzowych jamy gębowej, a także u macior na gruczole mlekowym i warzach sromowych, a u knurów na skórze napletka. Postaci pęcherzowej towarzyszyć może forma nerwowa; występuje ona sporadycznie i może się różnić objawami klinicznymi i przebiegiem. Objawy ze strony układu nerwowego pojawiają się zazwyczaj u zwierząt starszych, w kilka dni po wystąpieniu pęcherzy i spowodowane są nieropnym zapaleniem mózgu i opon mózgowych (14, 18, 24). U zwierząt chorych obserwuje się drgawki, tarcie ryjem, gryzienie krat, pienisty wyciek z pyska oraz ruchy maneżowe. Czas trwania choroby jest krótki; śmiertelność dochodzi do 100%.

Przebieg choroby może być ostry bądź łagodny, zdarza się jednak, że przybiera formę bezobjawową, subkliniczną. Uzależnione to jest od szczepu, dawki wirusa oraz drogi zakażenia i na ogół dotyczy zwierząt, które drogą pokarmową zetknęły się z małą dawką wirusa. Forma ta charakteryzuje się brakiem objawów klinicznych, przy równoczesnym pojawieniu się w surowicy krwi przeciwciał o wysokim mianie.

Powszechnie stosowanymi metodami zwalczania SVD jest wybijanie i niszczenie chorych i podejrzanych o zachorowanie świń (ang. „stamping out”) oraz kontrola i ograniczenie przemieszczania się zwierząt.

Czynnikiem patogennym wywołującym SVD jest enterowirus świń, z rodziny *Picornaviridae*, rodzaju *Enterovirus*. Właściwości morfologiczne oraz skład chemiczny wirusa SVD są zbliżone do wirusa pryszczycy, natomiast jego znaczna oporność na czynniki chemiczne i fizyczne zdecydowanie odróżniają go od innych enterowirusów (13). Wirus choroby pęcherzykowej świń wykazuje antygenowe i genetyczne pokrewieństwo z ludzkim wirusem Coxackie B-5 (4, 10, 21, 30).

Chorobę pęcherzykową świń stwierdzono po raz pierwszy w październiku 1966 r. na dwóch fermach w Lombardii (Włochy) (25). W latach 70-tych obserwo-

wano rozprzestrzenianie się choroby w licznych krajach Europy i Azji Wschodniej (5, 7, 16, 17, 32). W Polsce choroba pęcherzykowa świń wystąpiła po raz pierwszy w 1972 r., a w następnym roku wykazano liczne jej ogniska w różnych rejonach kraju (37). W tym samym roku, w dostarczonym z Polski do Światowego Laboratorium Referencyjnego (Pirbright), materiale klinicznym wyizolowano wirusa, określając go jako szczep Poland 73 (38).

Ze względu na dużą inwazyjność zarazka oraz znaczne straty ekonomiczne wywołane chorobą w hodowli trzody chlewnej, uznano ją za zwalczaną z urzędu i podlegającą obowiązkowi zgłaszania służbie weterynaryjnej (22). Obecnie, Polska posiada status kraju wolnego od SVD. W niektórych krajach Europy Zachodniej (Włochy, Holandia i Hiszpania) sytuacja w tym zakresie jest mniej korzystna, gdyż sporadycznie odnotowuje się tam ogniska choroby (3).

Diagnostyka laboratoryjna choroby pęcherzykowej świń

Szybka i niezawodna diagnostyka choroby pęcherzykowej świń jest podstawowym warunkiem jej zwalczania. Ponieważ SVD jest klinicznie nieodróżnialna od pryszczycy (19), podstawą do jej rozpoznania są wyniki badań laboratoryjnych potwierdzających obecność wirusa SVD lub specyficznych przeciwciał neutralizujących. Do badań wirusologicznych, najodpowiedniejszym materiałem diagnostycznym są ściany pęcherzy. Ponieważ materiał może zawierać wirus pryszczycy, powinien być transportowany w warunkach sprzyjających jego konserwacji, tzn. w temp. 4°C, w buforze PBS/gliceryna, pH 7,2-7,6 (w proporcji 1:1). Do badań serologicznych wykorzystuje się surowicę krwi, w której oznacza się specyficzne przeciwciała neutralizujące wirusa SVD. Badania takie wykonuje się w przypadku podejrzenia zwierzęcia o przechorowanie lub gdy choroba miała przebieg bezobjawowy, a także gdy zachodzi potrzeba oceny sytuacji epizootycznej wśród pogłowia świń.

Pierwszy etap badań rozpoznawczych, mających na celu różnicowanie wirusa pryszczycy i SVD w materiale klinicznym, polega na zastosowaniu testu immunoenzymatycznego (ELISA) lub odczynu wiązania dopełniacza (OWD). Ponadto, badanymi próbkami zakażane są pierwotne hodowle komórek nerki świńskiej

lub hodowle komórek linii ciągłej IB-RS-2, w których namnażają się zarówno wirus SVD jak i pryszczycy. Równoległe zakażenie pierwotnej hodowli komórek tarczycy lub nerki cielőcej, ewentualnie hodowli komórek linii ciągłej BHK-21 wrażliwych na zakażenie wirusem pryszczycy, pozwala na różnicowanie tych wirusów. Materiały uzyskane po zakażeniu hodowli są identyfikowane testem ELISA lub OWD. W przypadku braku zmian w hodowli (CPE) wywoływanych obecnością wirusa, wykonywane są trzy ślepe pasaże. Aktualnie zalecaną przez OIE (20) metodą identyfikacji wirusa choroby pęcherzykowej świń jest pośredni test ELISA. Odczyn ten, z powodu relatywnie wysokiej czułości, specyficzności oraz krótkiego czasu wykonania (33), jest najpowszechniej stosowaną metodą diagnostyczną. W 1993 r., test ten został wdrożony do rutynowych badań diagnostycznych prowadzonych w Zakładzie Pryszczycy PIWet. (27).

W celu oznaczenia różnic antygenowych wyizolowanych szczepów wirusa SVD, coraz powszechniej na świecie stosuje się metody immunoenzymatyczne oparte o przeciwciała monoklonalne (Mabs). Badacze z Istituto Zooprofilattico Sperimentale w Bresci (Włochy) wyprodukowali zestawy Mabs, przeciwko szczepom SVDV z 1973 r. (R178) i 1991 r. (R1046), które zastosowali do określenia różnic antygenowych 81 europejskich izolatów SVDV (36). Uzyskane wyniki okazały się bardzo użyteczne w badaniach epidemiologicznych ognisk chorobowych SVD w Europie. Zestaw Mabs przeciwko SVDV UKG27/72 wykorzystano również do oceny różnic antygenowych wybranych izolatów SVDV i wirusa Coxackie (21).

Dynamiczny rozwój biologii molekularnej przyczynił się do znacznego rozwoju diagnostyki chorób wirusowych zwierząt. Reakcja łańcuchowej polimeryzacji – PCR (23, 35) znalazła szerokie zastosowanie w rozpoznawaniu szeregu chorób, w tym również wywołanych przez enterowirusy (34). Pierwsze doniesienie opisujące zastosowanie nowej techniki w diagnostyce laboratoryjnej wirusa choroby pęcherzykowej świń, ukazało się w 1995 r. z Zakładu Pryszczycy w Zduńskiej Woli (29). Autorzy, do identyfikacji wirusowego RNA w zakażonych hodowlach tkankowych (29) oraz materiałach klinicznych (15, 28), zastosowali specyficzne primery flankujące sekwencje RNA z rejonu konserwatywnego genomu (2A) oraz fragmentu charakteryzującego się stosunkowo wysokim stopniem mutacji (VP1). W ostatnim okresie, metoda została udoskonalona i rozszerzona o techniki szczegółowej analizy produktów amplifikacji metodami bezpośredniego sekwencjonowania (30, 31). Do izolacji wirusowego RNA zastosowano komercyjnie dostępny zestaw RNasy (QIAGEN, Hilden), który pozwala otrzymać materiał genetyczny w ciągu 15 min., i co istotne, nie wymaga użycia jak ma to miejsce w metodach konwencjonalnych, niebezpiecznych dla zdrowia organicznych reagentów takich jak fenol i chloroform. Ponadto, eliminuje konieczność stosowania czaso-

chłonnych metod oczyszczania w gradiencie CsCl lub sacharozy. Reakcję RT-PCR wykonuje się wykorzystując wygodny i prosty w zastosowaniu zestaw Ready-To-Go You-Prime First-Strand Beads (Pharmacia), dzięki któremu cała procedura syntezy cDNA i jego amplifikacji zostaje skrócona do ok. 5 godzin. Uzyskane produkty PCR analizuje się stosując automatyczny system do elektroforezy i barwienia PhastSystem (Pharmacia), a żele analizuje wykorzystując Gel Documentation System Imagistore 5000 (U.K.). Podstawowym warunkiem uzyskania wiarygodnych wyników reakcji cyklicznego sekwencjonowania jest użycie oczyszczonych produktów PCR. W tym celu, wykonuje się elektroforezę produktów amplifikacji w 1,5% agarozie, z której fragmenty DNA ekstrahuje się przy zastosowaniu zestawu QIAquick Gel Extraction kit (QIAGEN). Reakcję cyklicznego sekwencjonowania wykonuje się z zastosowaniem mieszaniny ze znakowanym [α - P^{32}]CTP, a produkty sekwencjonowania, po oczyszczeniu przy użyciu zestawu QIAquick Nucleotide Removal kit (QIAGEN) rozdziela się elektroforetycznie i żele analizuje metodą autoradiografii. Powyższy sposób identyfikacji wirusowego RNA jest stosowany w Zakładzie Pryszczycy PIWet., jako uzupełniający i potwierdzający wymienione wcześniej konwencjonalne metody diagnostyczne. W laboratoriach wyposażonych w automatyczne systemy do sekwencjonowania, procedura cyklicznego sekwencjonowania wykonywana jest z wyznakowanymi fluorescencyjnie primerami lub ddNTPs, co znacznie ułatwia i przyspiesza wykonanie badania.

Jak wspomniano wcześniej, często z powodu występowania bezobjawowej formy choroby pęcherzykowej świń, jedynymi metodami jej diagnozowania są odczyny serologiczne umożliwiające ocenę statusu immunologicznego pogłowia świń, poprzez wykrywanie swoistych przeciwciał dla wirusa SVD. Wśród wielu znanych metod (8, 9), odczyn seroneutralizacji (SN) oraz ELISA, zalecane są przez OIE (20), jako kontrolne w handlu zwierzętami. Odczyn SN, wykonywany zgodnie z metodą opisaną przez Goldinga i wsp. (9), jest polecany jako standardowy test do wykrywania i ilościowej oceny przeciwciał SVD. Jednakże, z powodu ograniczeń wynikających ze stosunkowo dużej praco- i czasochłonności (2-3 dni), a także konieczności posiadania hodowli wrażliwych tkanek oraz manipulacji z żywym wirusem, odczyn ten ma ograniczone zastosowanie w przypadku prowadzonych na szeroką skalę badań screeningowych surowic świńskich i dlatego stosowany jest głównie w przypadku badań odwoławczych. Z drugiej jednak strony, należy zaznaczyć, że dotychczas stosowane metody ELISA, choć znacznie szybsze i mniej pracochłonne, dawały często fałszywie-dodatnie wyniki spowodowane, jak się powszechnie uważa, obecnością w surowicy świń przeciwciał dla innych, dotychczas nierozpoznanych enterowirusów (20). W ostatnich latach opracowano szereg modyfikacji testu ELISA, wykorzystywanego do

badan serologicznych. Sprawdzony w badaniach surowic bydlęcych w kierunku przeciwciał pryszczycowych, tzw. „liquid-phase” blockin ELISA (LPBE) (11, 12, 26), stanowił podstawę wprowadzenia tzw. bezpośredniego (6) i pośredniego odczynu ELISA (1) do wykrywania i miareczkowania przeciwciał SVD. Test w formie pośredniej, do końca 1996 r. stosowany był w Zakładzie Pryszczycy do rutynowych badań monitorowych surowic świńskich (27). Z powodu stwierdzanych wyników wątpliwych, fałszywie-pozytywnych (ok. 5%), zastąpiono go zalecanym przez OIE (20), a opracowanym przez Brocchi i wsp. (2), tzw. MAC-ELISA, opartym na zasadzie współzawodnicstwa specyficznych przeciwciał z przeciwciałami monoklonalnymi (anty-SVD Mab/5B7). Wysoka czułość i swoistość reakcji gwarantowana stosowaniem Mabs oraz niewielki odsetek wyników fałszywie dodatnich (0,45%), sprawiły, że metoda ta uznana została obecnie za najbardziej wiarygodną spośród dotychczas stosowanych (2). W pierwszym etapie ww. metody antygen wiązany jest do podłoża płytki za pośrednictwem Mab 5B7, jako przeciwciał chwytających, a zdolność testowanych surowic do hamowania wiązania się koniugatu (HRP-Mab 5B7) do antygeny oceniana jest na podstawie reakcji barwnej z substratem (OPD). Zgodnie z przyjętą procedurą, wszystkie surowice osiągające 70-80% hamowania w rozcieńczeniu 1/7,5 traktowane są jako dodatnie.

Wyniki badań serologicznych wykonywanych od kilku lat w laboratorium w Zduńskiej Woli, których celem jest ocena sytuacji epizootycznej naszego kraju w zakresie SVD potwierdzają, że Polska pozostaje krajem wolnym od tej choroby. Stwierdzany corocznie niewielki odsetek (ok. 0,1%) surowic pozytywnych, utrzymuje się niezmiennie na tym samym poziomie od kilku lat i mieści się w granicach błędu stosowanych metod badawczych, jak również może wynikać z nieswoistych reakcji krzyżowych z innymi, dotychczas niezidentyfikowanymi mikroorganizmami antygenowo zbliżonymi do wirusa SVD.

Jak wynika z przedstawionego przeglądu piśmiennictwa, w ostatnich latach nastąpił znaczny postęp w diagnostyce laboratoryjnej choroby pęcherzykowej świń dzięki wykorzystaniu nowych technik immunologii i biologii molekularnej.

Piśmiennictwo

1. Armstrong R. M., Barnett J. T. R.: J. Virol. Methods 25, 71, 1989.
2. Brocchi E., Berlinzani D., Gamba D., De Simone F.: J. Virol. Methods 52, 155, 1995.
3. Brocchi E., Zhang G., Knowles N. J., Wildsen G., McCauley J. W., Marquardt O., Ohlinger V. F., De Simone F.: Epidemiol. Infect. 118, 51, 1997.
4. Brown F., Talbot P., Burrows R.: Nature 245, 315, 1973.
5. Dawe P. S., Forman A. J., Smale C. J.: Nature 241, 540, 1973.
6. Dekker A., Moonen P. L. J., Terpstra C.: J. Virol. Methods 51, 343, 1995.
7. Dhenin L.: Bull. Acad. Vet. 46, 47, 1973.
8. Donaldson A. I., Ferris N. P., Knowles N. J., Barnett J. T. R.: Res. vet. Sci. 35, 295, 1983.
9. Golding S. M., Hedger R. S., Talbot P., Watson J.: Res. vet. Sci. 20, 142, 1976.
10. Graves J. H.: Nature 245, 314, 1973.

11. Hamblin C., Barnett J. T. R., Hedger R. S.: J. Immunol. Methods 93, 115, 1986.
12. Hamblin C., Barnett J. T. R., Hedger R. S.: J. Immunol. Methods 93, 123, 1986.
13. Hedger R. S., Mann J. A.: Swine vesicular disease virus. W: Virus Infections of Vertebrates, 2. Virus Infections of Porcines (Pensaert, M. M., wyd.), Elsevier Sci. Publ. B. V., 1989, s. 241-250.
14. Januszewski A.: Trzoda chlewna 5, 9, 1973.
15. Kęsy A., Niedbalski W., Fitzner A., Paprocka G.: Medycyna Wet. 53, 270, 1977.
16. Knowles N. J., Sellers R. F.: Swine Vesicular Disease. W: Beran G. W., wyd. Handbook of Zoonoses, Sec. B.: Viral. CRC Press Inc., Boca Raton, 1994, s. 437.
17. Kubin G.: Wiener tierärztl. Mschr. 60, 238, 1973.
18. Longhaus C., Mann J. A., Dowe J. T., Bradley R.: Res. vet. Sci. 21, 19, 1976.
19. Loxam J. G., Hedger R. S.: Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epizoot. 2, 11, 1983.
20. Manual of Standards for Diagnostic Tests and vaccines. OIE, Paris 1996.
21. Marquardt O., Ohlinger V. F.: J. Virol. Methods 53, 189, 1995.
22. Min. Roln. Dep. Wet.: Instrukcja z dnia 30.12.1977, nr WET z 4411/chp-7/177, w sprawie zwalczania choroby pęcherzykowej świń.
23. Mullis K. B., Faloona F.: Methods Enzymol. 155, 335, 1987.
24. Nardelli L.: Selezione Vet. 14, 1, 1973.
25. Nardelli L., Lodetti E., Gualandi G. L., Burrows R.: Nature 219, 1275, 1968.
26. Niedbalski W., Fitzner A., Paprocka G., Kęsy A.: Bull. vet. Inst. Puław 38, 105, 1994.
27. Niedbalski W., Kęsy A., Paprocka G., Fitzner A.: Instrukcja badania laboratoryjnego w kierunku pryszczycy i choroby pęcherzykowej świń (SVD), Nr 2/94 Min. Roln. i Gosp. Żywn., Departament Wet. z dn. 15 grudnia 1994 Nr WET z II 4611 dg - 1/94.
28. Niedbalski W., Kęsy A., Paprocka G., Fitzner A.: Materiały X Kongresu PTNW, Wrocław, 363, 1996.
29. Niedbalski W., Kęsy A., Paprocka G., Fitzner A.: Bull. vet. Inst. Puław 39, 85, 1995.
30. Niedbalski W.: Bull. vet. Inst. Puław 1997 (w druku).
31. Niedbalski W., Adam K-H., Marquardt O.: J. Virol. Methods 1997 (w druku).
32. OIE: Report of the Director. Swine vesicular disease. Bull. Off. Int. Epiz. 79, 879, 1973.
33. Roeder P. L., Le Blanc Smith P. M.: Res. vet. Sci. 43, 225, 1987.
34. Rotbart H. A.: PCR Amplification of Enteroviruses. PCR Protocol; W: A Guide to Methods and Application. Academic Press, 1990, s. 372.
35. Saiki R. K., Geffand D. H., Stoffer S., Scharf S. J., Higuchi R., Horn G. T., Mullis K. B., Erlich H. A.: Science 239, 487, 1988.
36. Samuel A. R., Knowles N. J., Samuel G. D., Crowther J. R.: Biologicals 19, 299, 1991.
37. Wiśniewski J.: Praca hab. Instytut Weterynarii w Puławach, 1978.
38. Wiśniewski J., Wijaszka T.: Sprawozdanie z wyjazdu służbowego do AVR1 - Pirbright 1973.

Adres autora: dr Wiesław Niedbalski, ul. Wodna 7, 98-220 Zduńska Wola

BROWNIE J., BOOTH P. J., STEVENS D. A., COLLINS M. E.: Ekspresja nie cytopatycznego wirusa biegunki bydła (BVDV) w oocytach i pęcherzykach trwale zakażonego bydła. (Expression of non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in oocytes and follicles of persistently infected cattle). Vet. Rec. 141, 335-337, 1997 (13)

Transfer zarodków bydła trwale zakażonego niecytopatycznym wirusem biegunki bydła (BVDV) stanowi potencjalne niebezpieczeństwo rozprzestrzenienia zakażenia. Przebadano występowanie antygeny tego wirusa i jego kwasu nukleinowego w oocytach i w pęcherzykach jajnikowych trzech krów w wieku 16-19 miesięcy trwale zakażonych wirusem BVDV. Antygen wirusa wykryto w preparatach histologicznych sporządzonych z jajników stosując w teście immunofluorescencji przeciwciała monoklonalne dla gp 33 i p. 80 wirusa BVDV. Obecność RNA wirusa wykryto metodą hybrydyzacji. Ponad 18% pęcherzyków badanych było zakażonych wirusem BVDV, zaś w 6% pęcherzyków były zakażone oocyty. Dlatego w technikach zapładniania *in vitro* jak również w transferze zarodków należy uwzględniać możliwość transmisji BVDV.