

BEATA MIZAK, ANDRZEJ BOROWSKI\*

# Zastosowanie testu PLA do oceny namnażania wirusa nosówki, adenowirusa typu 1 oraz parwowirusa psów w hodowlach komórkowych

Zakład Chorób Zwierząt Mięsożernych i Futerkowych Państwowego Instytutu Weterynaryjnego,  
Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

\*Biowet Puławy, Spółka z o.o., ul. Arciucha 2, 24-100 Puławy

Mizak B., Borowski A.

## Application of PLA test for the evaluation of canine distemper virus, adenovirus type 1 and parvovirus replication in cell cultures

### Summary

The infection of dogs with distemper virus (CDV), adenovirus type 1 (CAV-1) and parvovirus (CPV) is still being diagnosed by practitioners, even in vaccinated dogs. Laboratory techniques used for the isolation and identification of these viruses are usually time consuming and often their accuracy is not satisfactory. The presented studies concentrated on the adaptation of PLA (Peroxidase Linked Assay) for the evaluation of CDV, CAV-1 and CPV replication in tissue cultures.

Comparable studies on titration of viruses tested on the basis of cytopathic effects and results of PLA revealed that the titre of CDV and CPV evaluated by CPE was lower than calculated using PLA. The difference was equal to 0.6 log for CDV and 0.7 log CPV. These results confirm four to five-fold higher sensitivity of PLA. Titre of adenovirus type 1 measured by both methods did not demonstrate significant differences which can be explained by production of regular and characteristic CPE and rapid spread of cell destruction. Results of PLA revealed that the expression of viral antigens takes place between 18 and 24 hours after cell inoculation, whereas the first cytopathic effect was visible after 48-96 hours. The repeatability of results obtained by PLA was significantly higher with  $p < 0.05$  than titration of viruses on the bases of CPE in the case of CAV-1 and CDV.

The presented results confirm the high sensitivity and specificity of PLA, which could be widely used in studies on CDV, CAV-1 and CPV.

Zakażenia psów wirusem nosówki, adenowirusem typu 1 oraz parwowirusem, mimo stosowania od lat szczepień profilaktycznych, nadal stanowią zagrożenie dla zdrowia zwierząt.

Obecność wirusów w badanym materiale biologicznym może być potwierdzona różnymi metodami laboratoryjnymi. W przypadku parwowirusa psów (CPV) jest to najczęściej jego izolacja w hodowlach komórkowych, test immunofluorescencji, mikroskopia elektronowa i odczyn hemaglutynacji z zawiesiną erytrocytów świni lub małpy (1, 2, 4). Pierwsze trzy metody są czasochłonne i kosztowne. W przypadku oceny efektu cytopatycznego lub swoistej fluorescencji interpretacja wyników jest bardzo subiektywna. Odczyn hemaglutynacji jest natomiast mało precyzyjny i występują w nim reakcje nieswoiste. Do wykrycia wirusa nosówki (CDV) używane są hodowle fibroblastów zarodka kurzego, linie ciągłe komórek ssaków oraz test immunofluorescencji (1, 7, 9), zaś do diagnostyki adenowirusa typu 1 (CAV-1) izolacja w hodowlach komórek nerki psa oraz w ograniczonym zakresie test

immunofluorescencji (1). O ile efekt cytopatyczny (CPE) towarzyszący replikacji wirusa CAV-1 jest bardzo charakterystyczny, CPE w przypadku wirusa CDV może nie wystąpić lub być mylnie interpretowany szczególnie w przypadku obecności zmian degeneracyjnych występujących w hodowlach komórkowych (9). Wydawało się zatem wskazane opracowanie testu do wykrywania i mianowania opisanych wirusów w hodowlach komórkowych, umożliwiającego uzyskanie swoistych i powtarzalnych wyników. Przedstawione poniżej badania dotyczyły adaptacji do tego celu testu immunoenzymatycznego PLA (Peroxidase Linked Assay), który znalazł zastosowanie w diagnostyce innych wirusów zwierzęcych (11, 13).

Ogólna zasada testu PLA nie odbiega od innych metod immunoenzymatycznych i polega na wiązaniu swoistych nie znakowanych przeciwciał z antygenem. Miejsce reakcji jest wykrywane przeciwciałami znakowanymi peroksydazą o swoistości homologicznej do przeciwciał nie znakowanych. Aktywność enzymu jest uwidaczniana odpowiednim chromogenem (10).

## Material i metody

**Hodowle komórek.** Do badań użyto hodowlę linii ciągłej płuc kota (Fc), nerki psa (MDCK – Madin Darby Canine Kidney) oraz hodowlę pierwotną fibroblastów zarodka kurzego. Komórki Fc namnażano w płynie MEM (Minimal Essential Medium, Sigma), z dodatkiem 2% surowicy płodowej (Sera Tech). Komórki MDCK i fibroblasty zarodka kurzego namnażano w płynie MEM z dodatkiem 7% surowicy cielęcej (Gibco), zaś płynem utrzymującym był płyn 199 (Sigma), bez dodatku surowicy. Hodowle komórkowe prowadzono według ogólnych zasad (8).

Koncentrację komórek i ich żywotność określano w komorze Burkera, po uprzednim wybarwieniu błękitem trypanu.

**Wirusy.** W badaniach zastosowano atenuowane szczepki wirusów: nosówki – Led, adenowirusa typu 1 – Hep HCC oraz parwowirusa psów – PD pochodzące z kolekcji Biowet Puławy Spółka z o.o. Wirusy namnażane według ogólnie przyjętych zasad (8) osiągały miano TCID<sub>50</sub> równe log 5,5 dla wirusa nosówki, log 6,0 dla adenowirusa typu 1 oraz log 7,0 dla parwowirusa.

**Namnażanie wirusa CPV.** Przygotowano 10-krotne rozcieńczenie płynu wirusowego w płynie MEM, a następnie nanoszono je do baseników płaskodennej mikropłytki Nunclon TM (jedno rozcieńczenie w sześciu powtórzeniach). Do wszystkich baseników wprowadzono po 150 µl komórek Fc ( $2 \times 10^{4,0}$ ) o żywotności nie mniejszej niż 95%. Komórki inkubowano w temperaturze 37°C, w atmosferze 4% CO<sub>2</sub> przez 72 godziny. Następnie płytki przeznaczone do PLA utrwalało 75% acetonem w wodzie redestylowanej, w temperaturze -20°C, przez 10 minut i suszono przez 1 godzinę w temperaturze 37°C.

**Namnażanie wirusów CAV 1 i CDV.** Hodowle komórek zakładano w płaskodennych płytkach Nunclon TM wprowadzając do każdego basenika  $10^{4,0}$  komórek MDCK oraz  $10^{5,0}$  komórek fibroblastów zarodka kurzego. Po 24-48 godzinach inkubacji i osiągnięciu co najmniej 90% pokrycia płytki zlewano płyn wzrostowy i do baseników wprowadzono po 50 µl 10-krotnych rozcieńczeń wirusa nosówki lub adenowirusa typu 1. Adsorpcję wirusa przeprowadzano w temperaturze pokojowej przez 60 minut, a następnie do baseników z wirusem dodawano po 150 µl płynu utrzymującego. Płytki zakażone wirusem nosówki inkubowano w temperaturze 37°C przez 72 godziny, zaś inokulowane adenowirusem typu 1 przez 48 godzin. Płytki przeznaczone do testu PLA utrwalało w sposób opisany przy CPV.

**Surowice.** Do wykonania testu PLA użyto surowic psów immunizowanych wirusem nosówki, adenowirusem typu 1 oraz parwowirusem, o mianie przeciwciał neutralizujących równych 512 dla CDV, 256 dla CAV-1 oraz 1280 dla CPV. We wstępnych doświadczeniach ustalono, że optymalne rozcieńczenia surowic przeznaczonych do użycia w teście PLA winny wynosić: 1:40 dla CDV, 1:50 dla CAV 1 i 1:30 dla CPV.

**Test PLA.** Do baseników utrwalałych płytek nanoszono bufor blokujący (20% surowica królicza, rozcieńczona w buforze do rozcieńczania surowicy lub koniugatu) i inkubowano je w temperaturze 37°C przez 30 minut. Po odsą-

czeniu buforu blokującego do kolejnych baseników wprowadzono po 50 µl swoistej dla poszczególnych wirusów surowicy odpornościowej, w rozcieńczeniach podanych powyżej, w buforze o składzie 500 mM NaCl, 0,5% Tween 80 o pH 7,6. Płytki inkubowano w temperaturze 37°C przez 30 minut, a następnie płukano je czterokrotnie buforem o składzie: 150 mM NaCl, 0,5% Tween 80 o pH 7,6 i nanoszono koniugat (królicze anty-psie IgG znakowane peroksydazą, Sigma), rozcieńczony 1:300. Po 30 minutowej inkubacji w temperaturze 37°C płytki ponownie płukano i dodawano substrat: 3 amino 9 etylokarbazol (Sigma), przygotowany zgodnie z metodą Jensena (5). Reakcję barwną hamowano przepłukując baseniki płynem fizjologicznym. Wynik testu odczytywano w mikroskopie Jenaval FA (Carl Zeiss Jena), przy powiększeniu 100×.

Dla każdego z wirusów oznaczenia wykonano w trzech próbkach. Każdą próbkę badano trzykrotnie.

**Określanie miana wirusów na podstawie występowania efektu cytopatycznego.** Końcowego odczytu w kierunku obecności typowego dla każdego wirusa efektu cytopatycznego dokonywano po inkubacji hodowli komórkowych przez 96 godzin dla CPV i CDV oraz 72 godziny dla CAV-1. Miano TCID<sub>50</sub> badanych wirusów określano metodą Reeda-Muencha (12).

Dla każdego z wirusów oznaczenia wykonano w trzech próbkach badanych trzykrotnie.

**Określanie czasu pojawiania się pierwotnych ognisk replikacji wirusów.** Hodowle komórkowe prowadzone w sposób opisany uprzednio zakażano wprowadzając co 6 godzin do kolejnych baseników dawkę 10-20 TCID<sub>50</sub> badanych wirusów. 6 godzin po ostatniej inokulacji płytki utrwalało. Równocześnie prowadzono hodowle komórek dawką 10-20 TCID<sub>50</sub> badanych wirusów, do czasu wystąpienia pierwszych zmian cytopatycznych.

**Obliczenia statystyczne.** Obliczenia statystyczne wykonywano testem t-Studenta używając programu komputerowego InStat wersja 2,0 (GraphPad Software, Inc.).

## Wyniki i omówienie

Morfologia zmian cytopatycznych w przypadku zakażenia komórek wirusami CDV, CAV-1 oraz CPV jest odmienna dla każdego z nich i wynika z miejsca replikacji i dystrybucji wirionów w komórce. Replikacja parwowirusa zachodzi w jądrach zakażonych komórek, stąd intensywne, brązowo-czerwone zabarwienie tych struktur (ryc. 1).

Proces replikacji adenowirusów odbywa się pierwotnie w jądrze komórki, skąd nowo powstałe cząstki wirusowe migrują do cytoplazmy (6). Odzwierciedleniem tego procesu jest obecność komórek z wybarwionymi jądrami lub jądrami i cytoplazmą (ryc. 2).

Miejsca replikacji wirusa CDV mają charakter polimorficznych syncytiów (ryc. 3).

Wyniki miareczkowania badanych wirusów w hodowlach komórek na podstawie efektu cytopatycznego porównano z wartościami uzyskanymi w teście PLA. Dane przedstawione w tab. 1 wskazują, że miano wirusów określone na podstawie efektu cytopatycznego było średnio niższe o 0,6 log w przypadku CDV



Ryc. 1. Wynik dodatni testu PLA dla parwowirusa psów



Ryc. 3. Wynik dodatni testu PLA dla wirusa nosówki



Ryc. 2. Wynik dodatni testu PLA dla adenowirusa typu 1

i 0,7 log dla parwowirusa, co jednoznacznie dokumentuje 4-5-krotnie wyższą czułość testu PLA w stosunku do odczytu CPE. Wyjątek stanowi adenowirus typu 1, którego miano określone obydwoi metodami było zbliżone ( $p < 0,05$ ). Wynik ten jest spowodowany charakterystycznym i bardzo wyraźnym efektem cytopatycznym stwierdzanym w zakażonych komórkach oraz szybkim rozprzestrzenianiem się zmian. Wysoką czułość testu PLA potwierdzają dane zamieszczone w tab. 2, z których wynika, że ekspresja antygenów wirusowych, wykrywalnych testem immunoenzymatycznym ma miejsce już po 18-24 godzinach inkubacji, podczas gdy pierwsze zmiany cytopatyczne stwierdzone były, w zależności od wirusa, po 48-96 godzinach.

Uzyskana w teście PLA powtarzalność oznaczeń dla wirusa CAV-1 i CDV była istotnie wyższa ( $p < 0,05$ ), w stosunku do otrzymanych w odczycie na podstawie widocznego CPE. Wyjaśnienia wymagają wyniki uzyskane dla CPV (nieznaczne różnice w odczycie wyników na podstawie CPE). W wysokich rozcieńczeniach badanego płynu wirusowego, szczególnie w tzw. rozcieńczeniach granicznych, stwierdzenie obecności efektu cytopatycznego, mimo zakażenia komórek niewielką liczbą cząstek wirusowych, nie jest możliwe. Natomiast test immunoenzymatyczny pozwala na rozróżnianie pojedynczych, zakażonych komórek. Wynikająca z tabeli powtarzalność wyników uzyskanych na podstawie CPE jest zatem obciążona błędem zaniżenia odczytu. Warunkiem powtarzalności rezultatów badań z zastosowaniem testu PLA jest zwrócenie uwagi osoby wykonującej test na dokładne wysuszenie baseników po utrwaleniu komórek, co pozwoli

Tab. 1. Średnie miano  $TCID_{50}$  wirusów w próbkach zakażonych hodowli komórkowych, oceniane na podstawie testu PLA i CPE ( $\bar{x} \pm s$ )

Wirus użyty do badań	Linia komórek	Nr próby	PLA	CPE
CPV	Fc	1	$5,52 \pm 0,20$	$4,83 \pm 0,06$
		2	$6,72 \pm 0,14$	$5,88 \pm 0,14$
		3	$4,35 \pm 0,32$	$3,80 \pm 0,00$
CAV-1	MDCK	1	$3,13 \pm 0,14$	$3,05 \pm 0,32$
		2	$3,95 \pm 0,06$	$3,88 \pm 0,14$
		3	$5,08 \pm 0,18$	$5,03 \pm 0,32$
CDV	fibroblasty zarodka kurzego	1	$5,30 \pm 0,25$	$4,67 \pm 0,32$
		2	$3,68 \pm 0,13$	$2,93 \pm 0,32$
		3	$4,43 \pm 0,23$	$3,97 \pm 0,31$

Tab. 2. Zastosowanie testu PLA do wykrywania pierwotnych ognisk replikacji wirusów CPV, CAV-1 oraz CDV w porównaniu do odczytu na podstawie CPE

Wirus	Metoda	Czas po zakażeniu hodowli komórek (h)							
		6	12	18	24	36	48	72	96
CPV	PLA	-	-	-	+	+	+	+	+
	CPE	-	-	-	-	-	-	-	+
CAV-1	PLA	-	-	+	+	+	+	+	+
	CPE	-	-	-	-	-	+	+	+
CDV	PLA	-	-	-	+	+	+	+	+
	CPE	-	-	-	-	-	-	+	+

Objaśnienia: + dodatni wynik odczytu, - ujemny wynik odczytu

zapobiec ich odklejaniu się od podłoża. Ważne jest też stosowanie odpowiedniego rozcieńczenia surowic odpornościowych i koniugatu, ponieważ ich zbyt wysoka koncentracja wywołuje przebarwienie tła i powstanie artefaktów. Na uwagę zasługuje również fakt, iż wprowadzenie etapu inkubacji utrwalonej hodowli komórkowej z buforem blokującym miejsca niespecyficznego wiązania koniugatu pozwala na poprawę warunków odczytu poprzez zwiększenie kontrastu między komórkami zakażonymi i kontrolnymi (3).

Określanie miana wirusów na podstawie efektu cytopatycznego wymaga, zwłaszcza w przypadku konieczności uzyskania precyzyjnego, powtarzalnego wyniku, przedłużonego czasu inkubacji zakażonej hodowli komórek. Wielodniowe utrzymywanie stabilnej hodowli jednowarstwowej wymaga ponadto wymiany płynów utrzymujących. Mimo to występują zmiany degeneracyjne komórek, które zwłaszcza w przypadku wirusa CDV mogą być mylone z efektem cytopatycznym powstającym w wyniku jego replikacji. Także zbyt niska koncentracja wirusa w badanej próbce może nie wywoływać w zakażonej hodowli komórek charakterystycznych zmian mikroskopowych. Precyzyjne określenie swoistych zmian cytopatycznych nie zawsze jest możliwe i w związku z tym konieczne jest przeprowadzenie dodatkowych metod identyfikacyjnych.

Test PLA, dzięki znacznej powtarzalności uzyskiwanych wyników, możliwości skrócenia czasu wykonania badania oraz jednoczesnej identyfikacji serologicznej badanych wirusów, może znaleźć zastosowanie w badaniach diagnostycznych wirusa nosówki, adenowirusa typu 1 oraz parwowirusa psów.

### Piśmiennictwo

1. Appel M. J.: Virus Infections of Carnivores. Elsevier Sci. Publ. B. V., Amsterdam 1987.
2. Arens M., Krauss H.: Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 93, 156, 1980.

3. Beesley J. E.: Immunocytochemistry a practical approach. Oxford Univ. Press, New York 1993.
4. Carmichael L. E., Joubert J. C., Pollock R. V. H.: Am. J. Vet. Res. 41, 784, 1980.
5. Jensen M. H.: Acta vet. Scand. 22, 85, 1981.
6. Kotopoulos G., Cornwell H. J. C.: Vet. Bull. 51, 135, 1981.
7. Kristensen B., Vandeveld M.: Am. J. Vet. Res. 39, 1017, 1978.
8. Larski Z.: Diagnostyka wirusologiczna chorób zwierząt. PWRiL, Warszawa, 1992.
9. Lavander J. F.: Am. J. Vet. Res. 34, 1198, 1973.
10. Mackiewicz S.: Immunologia, Warszawa, PZWL, 1991.
11. Pejsak Z.: Medycyna Wet. 49, 265, 1993.
12. Reed L. J., Muench H.: Am. J. Hyg. 27, 493, 1938.
13. Rutka J., Wójcik J., Buzala E.: Medycyna Wet. 51, 738, 1995.

Adres autora: doc. dr hab. Beata Mizak, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

### MURATA H.: Wpływ kastracji byczków metodą Burdizzo na parametry limfocytów krwi obwodowej. (Effects of Burdizzo castration on peripheral blood lymphocyte parameters in calves). Vet. J. 153, 229-231, 1997 (2)

Kastracja metodą bezkrwawą wg Burdizzo jest wykonywana rutynowo u buhajków. Obniża ona znacznie ryzyko infekcji, ale jest silnym czynnikiem stresogennym ponieważ powoduje silny ból. Efektem działania stresu jest stymulacja osi podwzgórze-przysadka-nadnercza, zwiększenie wydzielania kortyzolu co powoduje zaburzenia w funkcji leukocytów. Badania nad wpływem kastracji metodą Burdizzo na limfocyty krwi obwodowej przeprowadzono na 12 buhajkach kastrowanych w wieku 3-4 miesięcy. U zwierząt z grupy kontrolnej poziom kortyzolu w płazmie wynosił  $17,7 \pm 14,6$  nmol/L, a u zwierząt kastrowanych osiągał on maksymalną wartość wynoszącą  $91,1 \pm 37,13$  nmol/L po 30 minutach po zabiegu. Po godzinie po kastracji poziom kortyzolu w płazmie krwi wynosił  $62,1 \pm 11,9$  nmol/L. Powrót do wartości przed kastracją następował po 2 godzinach po zabiegu. Kastracja obniżała znacznie liczbę limfocytów subpopulacji  $E_{AET}^{+}$  w dniu kastracji. Powrót do wartości wyjściowej miał miejsce drugiego dnia po kastracji. Natomiast poziom komórek  $sIg^{+}$  nie ulegał zmianom. Obserwowany spadek liczby limfocytów T we krwi obwodowej był efektem ich redystrybucji z krwi do narządów wewnętrznych pod wpływem zwiększonego stężenia kortyzolu we krwi.