

Zastosowanie hodowli pierwotnej komórek nerki jagnięcia w diagnostyce pryszczycy

GRAŻYNA PAPROCKA

Zakład Pryszczycy Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach,
ul. Wodna 7, 98-220 Zduńska Wola

Paprocka G.

Applying primary lamb kidney cell culture in diagnosing foot-and-mouth disease

Summary

Sensitive cell cultures, such as primary bovine thyroid cells and primary pig, calf or lamb kidney cells can be used for isolating foot-and-mouth disease virus (FMDV). Established cell lines IB-RS-2 and BHK-21 may also be applied for this purpose. The aim of this study was to assess the efficacy of primary lamb kidney cell culture for detecting FMDV in biological materials. The results of the study demonstrate that this cell culture may be a useful tool in diagnostic studies of FMD.

Keywords: FMDV, primary lamb kidney cell culture

Do wykrywania wirusa pryszczycy (FMDV) w materiale biologicznym stosowane są zarówno nowe techniki molekularne (PCR), jak i klasyczne metody, które dotychczas zachowały swoją wartość – izolacja wirusa w hodowlach komórkowych oraz test ELISA. Niewątpliwym postępowaniem w wirusologicznej diagnostyce laboratoryjnej było wprowadzenie na przełomie lat 50. hodowli komórek zwierzęcych *in vitro*. Stało się to możliwe dzięki zastosowaniu przez Endersa (12) trawienia trypsyną tkanek zwierzęcych oraz pracom Youngera (17) i Dulbecco (11), które przyczyniły się do uzyskania hodowli jednowarstwowej. W 1955 r. Sellers (16) oraz Bachrach, Hess i Callis (8) namnożyli po raz pierwszy FMDV w hodowli pierwotnej komórek nerki świni i cielęcia. Hodowle komórek okazały się doskonałym podłożem badawczym do namnażania wirusów.

Wrażliwość komórek na zakażenie FMDV zależy od obecności na ich powierzchni specjalnych receptorów (13). Do izolacji wirusa pryszczycy zalecane są hodowle pierwotne komórek tarczycy bydłej, nerki cielęcia, świni, jagnięcia. Mogą być także stosowane hodowle komórek linii ciągłych IB-RS-2 oraz BHK-21 (4).

Celem badań było opracowanie metody zakładania hodowli pierwotnej komórek nerki jagnięcia typu monolayer (jednowarstwowej) oraz określenie jej przydatności w diagnostyce pryszczycy.

Material i metody

Badania przeprowadzono na nerkach 2-4-tygodniowych jagniąt. Do badań użyto pożywki Eagle'a (MEM), surowicy bydłej płodowej, antybiotyków (penicylina, streptomycyna, amfoterycyna), PBS, 0,25% roztworu trypsyny w PBS bez jonów Ca^{2+} i Mg^{2+} , roztworu błękitu trypanu.

Przy zakładaniu hodowli pierwotnej wszystkie czynności wykonywano w warunkach ściśle aseptycznych. Postępowano zgodnie z obowiązującym w Zakładzie Pryszczycy systemem zarządzania jakością oraz zasadami Dobrej Praktyki Laboratoryjnej w Hodowli Komórek (14).

Pobrane nerki umieszczano w naczyniu zawierającym zimny PBS z dodatkiem antybiotyków i jak najszybciej dostarczano do laboratorium. Trypsynizację prowadzono dwiema metodami.

Metoda I. Nerkę jagnięcia wykładano na szalkę Petriego. Po zdjęciu torebki nerkowej wycinano kawałki kory i przenoszono do zlewki. Tkanek przepłukiwano buforem PBS z dodatkiem antybiotyków i cięto nożyczkami na małe kawałki, unikając miażdżenia. Rozdrobnioną tkankę po przepłukaniu $3 \times$ w PBS z dodatkiem antybiotyków przenoszono do kolbki Erlenmayera. Dodawano 0,25% roztwór trypsyny w proporcji 1 objętość tkanki : 3 objętości trypsyny. Proces trypsynowania prowadzono w $37^{\circ}C$ na mieszadle magnetycznym. Co 15 min. zlewano nadsącz z uwolnionymi komórkami do zlewki i wstawiano do lodówki (pierwszą zawiesinę komórek odrzucano). Do pozostałej niestrawionej tkanki nalewano nową porcję trypsyny i poddawano dalszemu trawieniu. Trypsynowanie powtarzano kilkakrotnie, w zależności od wymaganej ilości komórek. Zawiesinę uwolnionych w trawieniach komórek sączono przez siatkę nylonową w celu oddzielenia agregatów i resztek tkanki. Przesącz wirowano przy $400 \times g$ przez 10 minut. Do peletki komórek powstałej na dnie próbki wirowniczej dodawano PBS, zawieszając w nim komórki przez energiczne wciąganie pipetą i ponownie wirowano. Płukanie powtarzano trzykrotnie. Uzyskany osad komórek zawieszano w pożywce hodowlanej (MEM z dodatkiem 10% surowicy oraz antybiotyków). W celu określenia ilości komórek uszkodzonych $50 \mu l$ zawiesiny komórek mieszano z $50 \mu l$ 0,4% roztworu błękitu trypanu. Kroplę otrzymanej zawiesiny wprowadzano do komory Bürkera. Określano całkowitą liczbę komórek i osobno liczbę komórek zabarwionych. Komórki mar-

two wybarwiają się na kolor niebieski. Otrzymałą w procesie trypsynowania zawiesinę komórek dzielono na dwie części; jedną rozcieńczano pożywką hodowlaną do ilości $3-5 \times 10^5$ komórek/ml i zakładano hodowle w probówkach (tubes nunc-lon), drugą część, przeznaczoną do zamrożenia w ciekłym azocie zawieszano w medium krioprotekcyjnym, tak aby uzyskać około 3×10^7 komórek/ml. Hodowle inkubowano w temperaturze 37°C, kontrolowano pod mikroskopem, zwracano uwagę na gęstość hodowli, pH pożywki. W razie potrzeby pożywkę hodowlaną zmieniano.

Metoda II. Do zakładania hodowli używano drugiej nerki jagnięcia. Pierwsze trawienie rozdrobnionej tkanki wykonywano przy użyciu 0,25% roztworu trypsyny w 37°C, przez 20 min., uzyskaną zawiesinę odrzucano. Następnie dodawano nowy roztwór trypsyny i trawienie odbywało się przez noc, w 4°C, na wolnych obrotach mieszadła magnetycznego. Dalsze czynności prowadzono zgodnie z metodą I.

Przy przechowywaniu komórek nerki jagnięcia w ciekłym azocie wzorowano się na instrukcji nr I-09/ZPr/KJZ (1).

Przy zakładaniu hodowli komórek nerki jagnięcia z udziałem komórek przechowywanych w ciekłym azocie postępowano wg instrukcji nr I-10/ZPr/KJZ (2). Komórki liczono, rozcieńczano w pożywkę i wysiewano do naczyń hodowlanych w sposób opisany powyżej.

Do wykrywania wirusa pryszczycy (test izolacji) użyto materiału biologicznego otrzymanego z World Reference La-

boratory w Pirbright w ramach międzylaboratoryjnych porównań metod diagnostycznych. Badania wykonywano w oparciu o procedurę badawczą nr ZPr/PB-01 (5). Wyniki porównywano z uzyskanymi w hodowli komórek linii ciągłej IB-RS-2, przygotowanej wg instrukcji nr I-02/ZPr/PB-01,03,04 (3).

Pożywkę z hodowli, w której wystąpił efekt cytopatyczny badano na obecność wirusa pryszczycy testem ELISA zgodnie z procedurą badawczą nr ZPr/PB-02 (6). Wymienione procedury i instrukcje zostały opracowane w oparciu o zalecenia OIE (4).

Wyniki i omówienie

Trypsynowanie tkanki nerki jagnięcia wykonywano dwiema metodami, w 37°C (metoda I) oraz przez noc w 4°C (metoda II uproszczona). Przed założeniem hodowli oraz zamrożeniem komórek w ciekłym azocie określano ich żywotność. Odsetek komórek uszkodzonych był niski, w zawieszynie otrzymanej metodą I wynosił 2,5-2,9%, metodą II 3,2-3,5% (tab. 1, 2). Dla uzyskania dobrego wzrostu hodowli wymagana była gęstość zawiesiny $3-5 \times 10^5$ komórek/ml podłoża. Zawiesiny o wyższej gęstości powodowały szybkie odklejanie się hodowli i jej degenerację. Użycie zawiesin o niższej koncentracji komórek nie zapewniało uzyskania hodowli konfluentnej.

Następnie oceniano żywotność i zdolność do wzrostu komórek przechowywanych w okresie 1-8 miesięcy w ciekłym azocie (tab. 1, 2). Po ożywieniu komórek nerki jagnięcia po 8 miesiącach, odsetek komórek uszkodzonych wahał się od 4,0% do 6,9% (metoda I) oraz od 5,1% do 7,2% (metoda II). Wzrost komórek uzyskanych poprzez trypsynowanie tkanki nerki jagnięcia w 37°C oraz w 4°C był porównywalny. Komórki zarówno bezpośrednio po trypsynizacji, jak i przetrzymywane w głębokim zamrożeniu szybko podejmowały wzrost oceniony jako bardzo dobry. Po przyłączeniu się do dna próbki tworzyły różnej wielkości kolonie, które proliferując, powiększały się i tworzyły jedną warstwę (monolayer) po 48-72 godzinach. Komórki nie wymagały złożonych pożywek hodowlanych, stosowano medium Eagle'a MEM z dodatkiem 10% surowicy bydlęcej płodowej. House i House (15) przedstawili po raz pierwszy pozytywne rezultaty przechowywania komórek pierwotnych w zamrożeniu.

W dalszych badaniach określano wrażliwość na zakażenie wirusem pryszczycy hodowli przygotowanej z udziałem komórek nerki jagnięcia przechowywanych w ciekłym azocie 8 miesięcy, w porównaniu z aktualnie używaną do testu izolacji hodowlą komórek linii ciągłej IB-RS-2. Jak wynika z tab. 3, wystą-

Tab. 1. Charakterystyka komórek nerki jagnięcia (metoda I)

% komórek uszkodzonych	Ocena wzrostu komórek	Okres przechowywania komórek w ciekłym azocie (mies.)	% komórek uszkodzonych przechowywanych w ciekłym azocie	Ocena wzrostu komórek przechowywanych w ciekłym azocie
2,5-2,9	+++	1	2,6-2,9	+++
		2	2,6-2,9	+++
		3	2,7-3,0	+++
		4	2,7-4,0	+++
		5	2,8-4,5	+++
		6	2,8-4,5	+++
		7	3,6-6,0	+++
		8	4,0-6,9	+++

Objaśnienia: +++ – wzrost bardzo dobry, monolayer po 48-72 godz.

Tab. 2. Charakterystyka komórek nerki jagnięcia (metoda II)

% komórek uszkodzonych	Ocena wzrostu komórek	Okres przechowywania komórek w ciekłym azocie (mies.)	% komórek uszkodzonych przechowywanych w ciekłym azocie	Ocena wzrostu komórek przechowywanych w ciekłym azocie
3,2-3,5	+++	1	3,2-3,5	+++
		2	3,2-3,5	+++
		3	3,3-4,0	+++
		4	3,5-4,0	+++
		5	4,0-5,0	+++
		6	4,0-6,0	+++
		7	4,5-6,0	+++
		8	5,1-7,2	+++

Objaśnienia: jak w tab. 1.

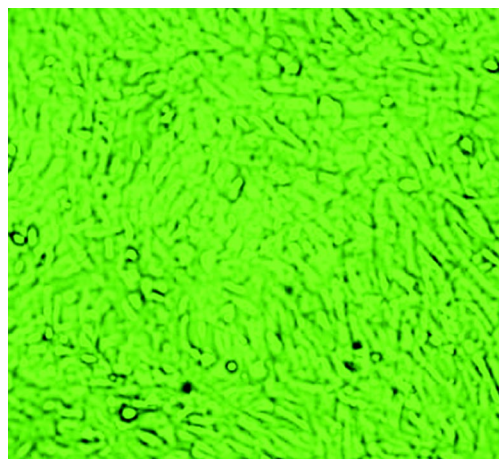
Tab. 3. Ocena wrażliwości hodowli pierwotnej komórek nerki jagnięcia na zakażenie FMDV

Oznaczenie próbki	Hodowla pierwotna komórek nerki jagnięcia		Hodowla komórek linii ciągłej IB-RS-2		Wynik testu ELISA
	Pasaż I CPE	Pasaż II CPE	Pasaż I CPE	Pasaż II CPE	
P321	-	-	-	-	nb
P328	CPE po 18 godz.	nb	CPE po 40 godz.	nb	serotyp O
P335	-	-	-	-	nb
P336	-	-	-	-	nb
P337	CPE po 24 godz.	nb	CPE po 42 godz.	nb	serotyp A
P338	-	-	-	-	nb
P340	-	-	-	-	nb

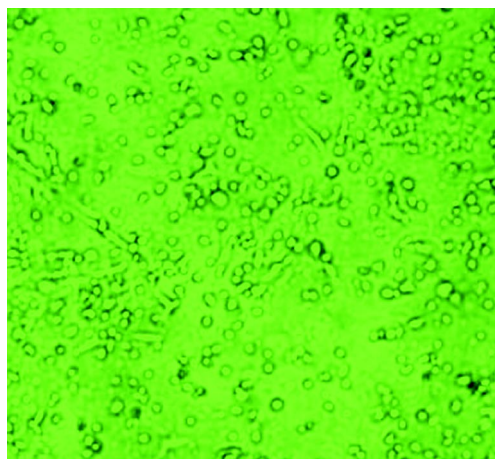
Objaśnienia: - brak CPE; nb - nie badano

pienie CPE (wynik dodatni) stwierdzono w obu hodowlach inokulowanych próbkami P328 i P337. Jednak zmiany cytopatyczne w hodowli komórek nerki jagnięcia pojawiły się wcześniej, po 18 i 24 godz. kolejno w próbce P328 i P337, natomiast w hodowli komórek linii ciągłej IB-RS-2 dopiero po 40 godz. w próbce P328 i po 42 godz. w P337 (ryc. 1, 2). Obecność wirusa pryszczycy w wymienionych próbkach potwierdzono testem ELISA.

Łatwe w użyciu hodowle komórek linii ciągłych IB-RS-2 oraz BHK-21 są powszechnie stosowane do rutynowych badań rozpoznawczych. Ocena ich wrażliwości jest stałym tematem dyskusji na sympozjach, na których omawiane są problemy związane ze standaryzacją metod diagnostycznych. Ważne są doniesienia wielu autorów, którzy wykazali zróżnicowaną wrażliwość na zakażenie FMDV klonów komórek linii BHK-21 używanych w różnych laboratoriach (7, 9, 10). Wyniki wcześniejszych badań własnych oraz przedstawionych w publikacjach wskazują na potrzebę dokonywania okresowej oceny posiadanych linii komórkowych pod względem ich przydatności do diagnozowania pryszczycy. Z innych badań wynika, że hodowle komórek linii ciągłych są mniej wrażliwe na zakażenie niż ko-



Ryc. 1. Hodowla komórek nerki jagnięcia (kontrola)



Ryc. 2. Hodowla komórek nerki jagnięcia zakażona wirusem pryszczycy (próbka P337)

mórki pierwotne, zwłaszcza przy niskim mianie infekcyjnym FMDV (4, 9). Powyższe dane motywują do wprowadzenia do izolacji wirusa hodowli komórek nerki jagnięcia.

Podsumowując należy stwierdzić, że zastosowanie uproszczonej metody trypsynowania oraz korzystanie z ożywionych komórek o sprawdzonym potencjale wzrostowym i wrażliwości na zakażenie FMDV, eliminuje wiele niedogodności i trudności organizacyjnych związanych z zakładaniem hodowli pierwotnej komórek nerki jagnięcia. Otrzymane wyniki jednoznacznie wskazują na użyteczność tej hodowli do wykrywania wirusa pryszczycy.

Piśmiennictwo

1. Anon.: Instrukcja nr I-09/ZPr/KJZ Przygotowanie komórek BHK-21 oraz IB-RS-2 do zamrożenia w ciekłym azocie. PIWet-PIB Zakład Pryszczycy, Zduńska Wola 2006.
2. Anon.: Instrukcja nr I-10/ZPr/KJZ Rozmrażanie komórek BHK-21, IB-RS-2 przechowywanych w ciekłym azocie oraz ich ożywianie. PIWet-PIB Zakład Pryszczycy, Zduńska Wola 2006.
3. Anon.: Instrukcja nr I-02/ZPr/PB-01,03,04 Prowadzenie hodowli komórek linii ciągłych. PIWet-PIB Zakład Pryszczycy, Zduńska Wola 2006.
4. Anon.: OIE Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals (mammals, birds and bees), Fifth Edition 2004, 111-128.
5. Anon.: Procedura badawcza nr ZPr/PB-01 Wykrywanie wirusa pryszczycy i wirusa choroby pęcherzykowej świń w materiale biologicznym - test izolacji wirusa. PIWet-PIB Zakład Pryszczycy, Zduńska Wola 2006.
6. Anon.: Procedura badawcza nr ZPr/PB-02 Wykrywanie antygenu wirusa pryszczycy i wirusa choroby pęcherzykowej świń - test ELISA (indirect sandwich ELISA). PIWet-PIB Zakład Pryszczycy, Zduńska Wola 2006.
7. Ahl R., Keller B.: Zur Diagnose der Maul-und-Klauenseuche und zur Stammidentifizierung von Maul-und-Klauenseuche- Virusisolaten. Arch. Exp. Vet. Med. 1987, 41, 784-790.
8. Bachrach H. L., Hess W. R., Callis J. J.: Foot-and-mouth disease virus: Its growth and cytopathogenicity in tissue culture. Science. 1955, 122, 1269-1275.
9. Clarke J. B., Spier R. E.: Variation in the susceptibility of BHK populations and cloned cell lines to three strains of foot-and-mouth disease virus. Arch. Virol. 1980, 63, 1-9.
10. Czalleng F., Zsitvay K., Egyhazi Zs., Baranyi M., Fazekas A.: Comparative analysis of BHK-21 cell lines of virus strains of foot-and-mouth disease. Arch. Exper. Vet. Med. 1987, 41, 791-796.
11. Dulbecco R.: Production of plaques in monolayer tissue cultures by single particles of an animal virus. Proc. Natl Acad. Sci. 1952, 38, 747-752.
12. Enders J. F., Wellers T. H., Robbins F. C.: Cultivation of the Lansing strain of poliomyelitis virus in cultures of various human embryonic tissues. Science 1949, 109, 85-90.
13. Fry E. E., Lea S. M., Jackson T.: The structure and function of a foot-and-mouth disease virus-oligosaccharide receptor complex. EMBO J. 1999, 18, 543-554.
14. Hartung T.: Good Cell Culture Practice. Altern. Lab. Anim. (ATLA) 2002, 30, 407-414.
15. House C., House J. A.: Evaluation of techniques to demonstrate FMDV in bovine tongue epithelium: comparison of the sensitivity of cattle, mice, primary cell cultures, cryopreserved cell cultures and established cell lines. Vet. Microbiol. 1989, 20, 99-109.
16. Sellers R. F.: Growth and titration of the viruses of foot-and-mouth disease and vesicular stomatitis in kidney monolayer tissue cultures. Nature 1955, 176, 547-550.
17. Yougner J. S.: Monolayer tissue cultures. Preparation and standardization of suspensions of trypsin-dispersed monkey kidney cells. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1954, 85, 202-210.

Adres autora: doc. dr hab. Grażyna Paprocka, ul. Wodna 7, 98-220 Zduńska Wola; e-mail: grazyna@piwzp.invar.net.pl