

Pryszczycyca — aktualne metody diagnostyczne

Grażyna Paprocka

Andrzej Kęsy

Wiesław Niedbalski

Andrzej Fitzner

Zakład Pryszczycy

Państwowy Instytut Weterynaryjny

Zduńska Wola

1. Wstęp

Pryszczycyca jest klasyczną epizootią wywołaną przez zjadliwy wirus o znacznej oporności na wpływy środowiska zewnętrznego. Na zakażenie naturalne wrażliwe jest przede wszystkim bydło, świnie, kozy, owce oraz dzikie zwierzęta racicowe. Wirus występuje w siedmiu typach serologicznych: A, O, C, SAT1, SAT2, SAT3 i Asia 1. Przebycie choroby pozostawia odporność na powtórne zakażenie tym samym typem zarazka (1).

W 1991 r. Europa została uznana za region wolny od pryszczycy. Na podstawie ustaleń Unii Europejskiej wprowadzono zakaz szczepień i ograniczono import zwierząt wyłącznie do krajów wolnych od pryszczycy i nie wykonujących szczepień ochronnych od co najmniej 12 miesięcy. Obecnie, istotne znaczenie ma ochrona przed przeniesieniem zarazka z regionów bezpośrednio graniczących z Europą, gdyż pryszczycyca należy do chorób o bardzo dużej dynamice szerzenia się. Dotyczy to zwłaszcza Turcji i terenów byłego ZSRR. Europejska Komisja Kontroli Pryszczycy FAO podejmuje od wielu lat odpowiednie działania w tzw. strefie buforowej, która przebiegała początkowo na terenach europejskiej części Turcji (Tracja), a ostatnio została przesunięta na tereny zachodniej Anatolii w której choroba występuje endemicznie. Poważnym zagrożeniem dla Europy są ogniska w innych regionach świata, dotyczy to Afryki i Azji. Zagrożenie stanowi również Ameryka Południowa. Strefę buforową z północną częścią kontynentu amerykańskiego utrzymuje się na terytorium Kolumbii graniczącym z Panamą.

Fakt zaprzestania szczepień wymaga zaostżenia rygorów weterynaryjnych dotyczących importu, prowadzenia badań monitorowych, a ponadto zobowiązuje do stałej gotowości diagnostycznej umożliwiającej identyfikację wirusa. Szybka, laboratoryjna diagnoza jest zasadniczym warunkiem skutecznego zwalczania choroby. Z uwagi na niebezpieczeństwo rozsiania zarazka badania rozpoznawcze wykonuje się w specjalnie do tego celu przystosowa-

nych laboratoriach. W Polsce prowadzi je Zakład Pryszczycy Państwowego Instytutu Weterynaryjnego w Zduńskiej Woli.

2. Pobieranie i przesyłanie prób do badań

Niezawodność wyników laboratoryjnych zależy od jakości materiału klinicznego. Do badań rozpoznawczych w kierunku pryszczycy używany jest nabłonek ze świeżych pęcherzy. Wirus może być wykryty, jeżeli próbki są pobierane nie później niż w ciągu 4 dni od wystąpienia zmian chorobowych. Należy pobrać możliwie jak najwięcej materiału. Gdy epithelium jest niedostępne mogą być pobrane próbki płynu przełykowo-gardłowego, krwi oraz mleko. Płyn przełykowo-gardłowy zawierający komórki nabłonkowe pobiera się również w celu stwierdzenia nosicielstwa wirusa (*Probang Test*). Okres nosicielstwa u bydła wynosi 2-3 lata, u owiec do 9 miesięcy. Pobrany materiał nie może być zanieczyszczony krwią i treścią pokarmową.

Próbki do badań powinny być pobrane sterylnie i umieszczone w szczelnie zamkniętej, oznakowanej buteleczce z roztworem o pH 7,2-7,6 składającym się z PBS (buforowany fosforanami roztwór fizjologiczny) i glicerolu w równych objętościach. Materiał zakaźny powinien być właściwie opakowany i transportowany, aby uniknąć jego zanieczyszczenia i zniszczenia, jak również zanieczyszczenia środków transportu i rozsiania zarazka. W tym celu zaleca się, aby buteleczkę z odpowiednio pobranym materiałem umieścić w wodoodpornym pojemniku, który należy zaplombować i zdezynfekować. Następnie wskazane jest opakowanie w dwa kolejne, odporne na wstrząsy, zdezynfekowane pojemniki. Po starannym zamknięciu, przesyłka z dokładnym pismem przewodnim powinna być transportowana w chłodzie, ale nie zamrożona.

3. Metody wykazywania obecności wirusa

3.1. Test ELISA

Od wielu lat powszechnie stosowaną metodą do typowania wirusa pryszczycy był odczyn wiązania dopełniacza (2). Znaczny postęp w badaniach diagnostycznych uzyskano dzięki wprowadzeniu przez Hamblina testu ELISA (3-5). Ze względu na wyższą czułość (ok. 1000 razy od OWD) i specyficzność, metoda ta jest rekomendowana przez Komisję Standardów Międzynarodowego Urzędu do Spraw Epizootii (OIE) do identyfikacji wirusa. Od 1993 r. pośredni test ELISA (*indirect sandwich ELISA*) jest techniką rutynowo stosowaną w Zakładzie Pryszczycy. Test wykonuje się na mikroplycie Maxi Sorp F96 firmy Nunc wg schematu:

1. Oplaszczanie płytki homologiczną, antypryszczycową, króliczą surowicą (przed dodaniem każdego następnego reagentu płytkę płucze się w celu usunięcia nie związanego składnika reakcji).

2. Inkubacja z testowanymi próbkami.

3. Inkubacja z homologiczną, antypyszczycową surowicą świnki morskiej.
4. Reakcja z koniugatem (znakowane peroksydazą królicze IgG przeciwko immunoglobulinom świnki morskiej).
5. Wywołanie reakcji barwnej (substrat: chlorowodorek o-fenylendiaminy). Reakcję immunoenzymatyczną hamuje się H_2SO_4 . Wyniki analizowane są spektrofotometrycznie przy A_{492} na czytniku mikroplitek firmy Dynatech.

3.2. Próba biologiczna

W celu wykazania obecności wirusa w badanym materiale zakaża się świnki morskie i oseski mysie. Świnki morskie zakaża się przez wtarcie badanej zawiesiny w skaryfikowane opuszki tylnych łapek. Proces zapalny i powstanie pęcherza po około 48 godzinach świadczą o wyniku pozytywnym. W tym przypadku materiał zebrany z miejsc zmienionych chorobowo jest identyfikowany serologicznie. Oseski mysie, 2-7-dniowe zakaża się badanym materiałem dootrzewnowo, a padłe po około 5 dniach bada się za pomocą odczynów serologicznych.

3.3. Zakażenie hodowli komórek

Istotne znaczenie w doskonaleniu metod rozpoznawczych w kierunku pryszczycy miało wprowadzenie hodowli komórek. Informacje na ten temat zawarte są w pracy Paprockiej i Keşego (6). Do izolacji wirusa pryszczycy polecane są przede wszystkim hodowle komórek tarczycy i nerki cielęcej, nerki świni oraz ciągłe linie komórek BHK-21 i IB-RS-2. W badaniach wykonanych w Zakładzie Pryszczycy wykazano, że zawiesina komórek uzyskana metodą trypsynizacji z tkanki płodowej bydła (nerki), tarczycy cieląt oraz z nerek prosiąt może być poddawana głębokiemu zamrożeniu i zachowuje niezmienny potencjał wzrostowy przez co najmniej 6 miesięcy (7). Wirus pryszczycy wywołuje wyraźny efekt cytopatyczny, co w przypadku pozytywnym pozwala na jego izolację i identyfikację.

4. Badania serologiczne

W celu określenia obecności i ilości przeciwciał w surowicach zwierząt, w Zakładzie Pryszczycy wykonuje się odczyn seroneutralizacji (SN) i test ELISA.

4.1. Odczyn seroneutralizacji

Do wykrywania przeciwciał neutralizujących wirus pryszczycy stosuje się mikroodczyn seroneutralizacji z udziałem wymienionych hodowli komórek. Jest to metoda ekonomiczna, efektywna, a uzyskane wyniki są zgodne z klasycznym odczynem seroneutralizacji próbówkowej. Do odczynu używane są płaskodenne mikroplátky firmy Nunc. Sposób jego wykonania jest ogólnie znany i zgodny z zasadami obowiązującymi w metodzie tradycyjnej (8).

4.2. Blokujący test ELISA (*liquid-phase blocking sandwich ELISA*)

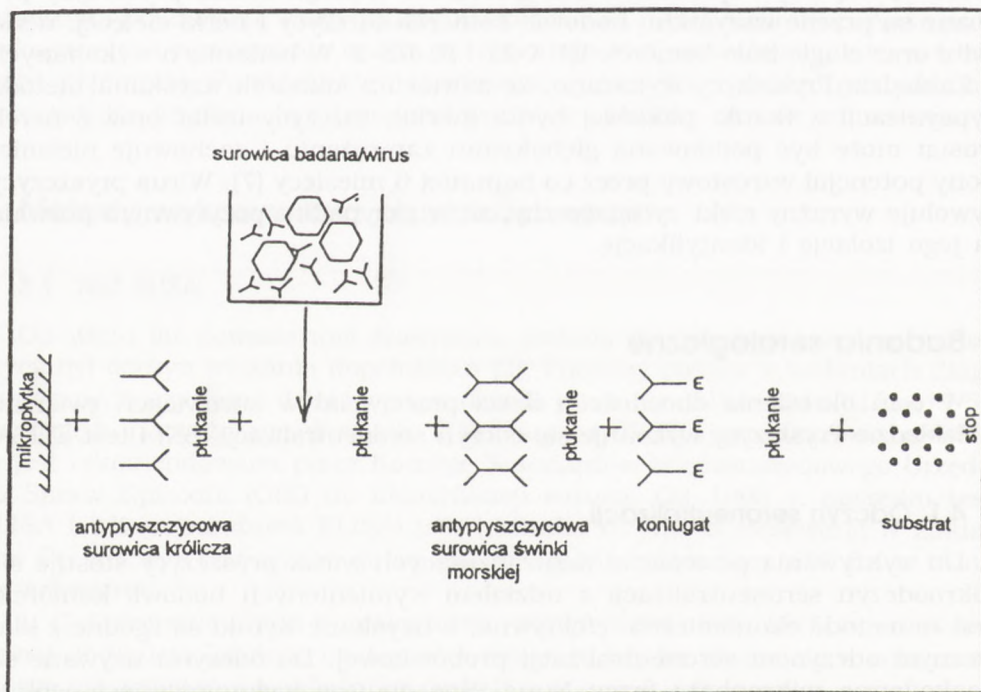
OIE zaleca stosowanie tej odmiany testu do badań monitorowych mających na celu ocenę sytuacji epizootologicznej odnośnie do pryszczycy oraz do badań skriningowych w zakresie eksportu i importu. Test jest szczególnie przydatny do wykonywania badań na szeroką skalę. Porównanie z odczynem seroneutralizacji wskazuje na jego wysoką czułość i specyficzność (9-11). Przedstawiony na rycinie 1 test wykonuje się w płaskodennych mikroplótkach Maxi Sorp F96 firmy Nunc, natomiast mieszaninę antygen/surowica inkubuje się w mikroplótkach okrągłodennych. Sposób wykonania jest następujący:

I dzień

1. Opłaszczenie płytki homologiczną, antypyszczycową, króliczą surowicą (przed dodaniem kolejnego reagentu płytkę płucze się).
2. Przygotowanie mieszaniny: antygen-badana surowica (*liquid-phase*).

II dzień

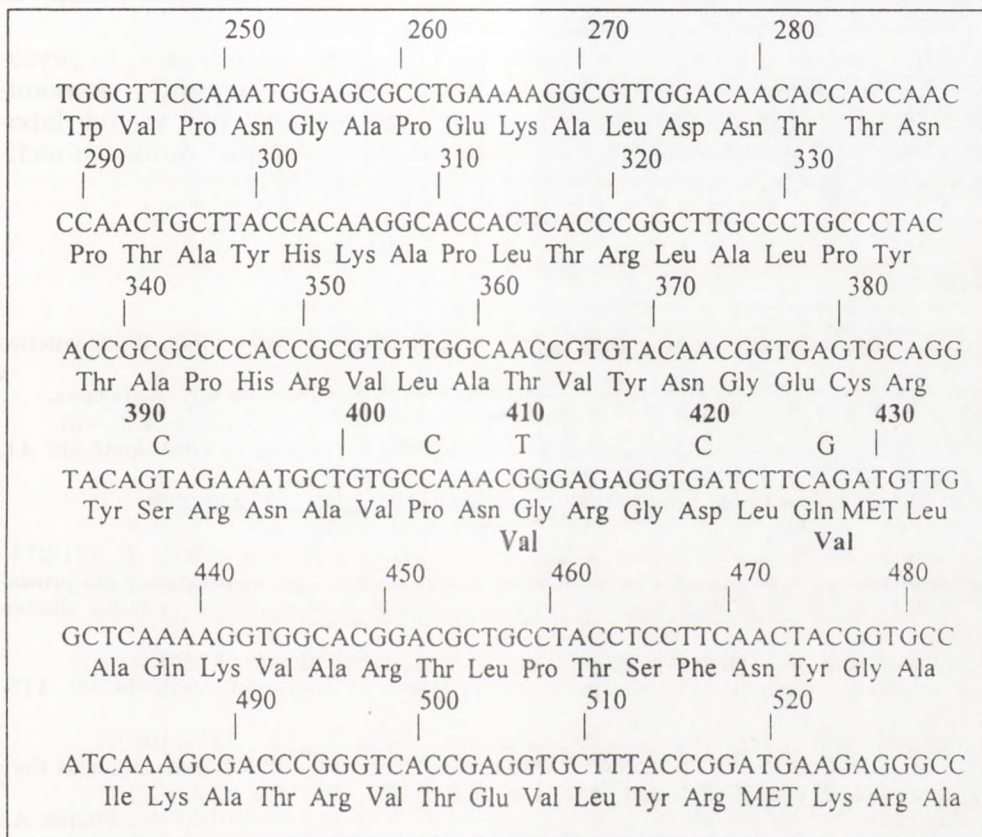
1. Do odpowiednich zagłębień opłaszczonej płytki przenosi się mieszaninę antygen/badana surowica.
2. Inkubacja z homologiczną, antypyszczycową surowicą świnki morskiej.
3. Reakcja z koniugatem (znakowane peroksydazą królicze IgG przeciwko immunoglobulinom świnki morskiej).
4. Wywołanie reakcji barwnej (substrat: chlorowodorek o-fenylenodiaminy). Reakcję hamuje się H_2SO_4 , a wyniki analizuje spektrofotometrycznie.



Ryc. 1. Wykrywanie przeciwciał testem ELISA (wg 10).

5. Metody biologii molekularnej

Wirus pryszczycy posiada jednoniciowy RNA o długości 8000 nukleotydów. W skład kapsydu wirusa wchodzi cztery strukturalne polipeptydy, z których VP1 jest głównym białkiem immunogennym. W ostatnich latach nastąpił znaczny postęp w badaniach diagnostycznych na poziomie genetycznym. Donn i wsp. (12) wykazali na podstawie badań porównawczych materiałów pobranych od zakażonych zwierząt, większą czułość techniki PCR do wykrywania cDNA wirusa pryszczycy, od metody izolowania wirusa w hodowli komórek. Nowe techniki diagnostyczne pozwalające na porównywanie sekwencji nukleotydowej materiału genetycznego stały się pomocne w razie stwierdzenia ogniska choroby i potrzeby ustalenia źródła pochodzenia infekcji. Klasykne metody typowania wirusa są w tym przypadku mało precyzyjne i niewystarczające. Obecnie, molekularna epizootologia pryszczycy opiera się głównie na analizowaniu różnic genetycznych między izolatami wirusa. W Zakładzie



Ryc. 2. Fragment sekwencji nukleotydów i aminokwasów kodujących białko VP1 wirusa pryszczycy typu O1 Zduńska Wola (wg 13). Zaznaczone różnice dotyczą porównania z typem O1 Campos.

Pryszczycy prowadzone są również badania w tym kierunku (13). Została określona sekwencja nukleotydów fragmentu cDNA kodującego białko VP1 wirusa typu O. Materiałem do badań był nabłonek z pęcherzy pryszczycowych pochodzący z kolekcji Zakładu. Po wyizolowaniu wirusowego RNA wykonano reakcję odwrotnej transkrypcji. Do powielenia metodą PCR wybrano region kodujący białko VP1, zawarty między 22 a 694 parą zasad. Fragment cDNA o długości 672 pz sklonowano w wektorze plazmidowym pBS(+). Plazmidy zawierające sklonowane fragmenty DNA transformowano w bakterie *E. coli* MV1193. Plazmidowy DNA izolowano z klonów bakterii tworzących na podłożu selekcyjnym transformanty, bezbarwne kolonie. Po sprawdzeniu za pomocą analizy restrykcyjnej skuteczności klonowania otrzymano jednoniciową formę DNA, która posłużyła do ustalenia sekwencji sklonowanego fragmentu metodą Sangera. Otrzymaną sekwencję nukleotydową porównano z wcześniej opublikowanymi (14). Wykazano podobieństwo badanego serotypu do O1 Campos. Różnice dotyczą dziesięciu nukleotydów. Pięć z nich występuje w zmiennym regionie między 390 a 430 parą zasad, co spowodowało zmianę dwóch aminokwasów (ryc. 2).

Podjęte badania są kontynuowane, gdyż nie ulega wątpliwości, że pryszczycza nadal stanowi aktualny, ważny problem epizootologiczny i ekonomiczny. Z tego względu istnieje stała potrzeba doskonalenia metod laboratoryjnego jej rozpoznawania, opierając się na postępie naukowo-technicznym.

Literatura

1. Larski Z., Truszczyński M., (1992), *Zarys mikrobiologii weterynaryjnej*, Wydawnictwo ART, Olsztyn.
2. Larski Z., (1992), *Diagnostyka wirusologiczna chorób zwierząt*, PWRiL, Warszawa.
3. Hamblin C., Armstrong R. M., Hedger R. S., (1984), *Vet. Microbiol.*, 9, 435-443.
4. Hofner M. C., Carpenter W. C., Lyons S.A., Hamblin C., (1993), *J. Virol. Methods*, 41, 239-244.
5. Roeder P. L., Le Blanc Smith P. M., (1987), *Res. Vet. Sci.*, 43, 225-232.
6. Paprocka G., Kęsy A., (1992), *Biotechnologia*, 3(18), 15-20.
7. Paprocka G., Kęsy A., Niedbalski W., Fitzner A., (1994), *Medycyna Wet.*, 6, 271-274.
8. Paprocka G., Kęsy A., (1992), *Opracowanie mikroodczynu seroneutralizacji do prowadzenia badań monitoringowych w kierunku pryszczycy. Metodyka do użytku służbowego.*
9. Armstrong R. M., Barnett I. T. R., (1989), *J. Virol. Methods*, 25, 71-80.
10. Hamblin C., Barnett J. T. R., Hedger R. S., (1986), *J. Immunol. Methods*, 93, 115-121.
11. van Maanen C., Tepstra C., (1989), *J. Immunol. Methods*, 124, 111-119.
12. Donn A., Martin L.A., Donaldson A.J., (1994), *Proceedings XVII World Bujiatrics Congress*, Bologna, Italy, 805-808.
13. Paprocka G., Płucienniczak G., Płucienniczak A., Kęsy A., Niedbalski W., Fitzner A., (1996), *Medycyna Wet.*, 2, 111-113.
14. Beck E., Strohmaier K., (1987), *J. Virol.*, 61, 1621-1629.

Foot and mouth disease (FMD) — actual diagnostic methods

Summary

This paper describes the present FMD epizootic situation and virus isolation and identification methods, including new molecular biology diagnostic techniques.

Key words:

foot-and-mouth disease virus (FMDV), epithelium, probang test, virus neutralisation test (VN), ELISA, PCR.

Adres do korespondencji:

Grażyna Paprocka, Zakład Pryszczycy, Państwowy Instytut Weterynaryjny,
ul. Wodna 7, 98-220 Zduńska Wola.