

Zastosowanie przeciwciał monoklonalnych oraz polimeryzacji łańcuchowej DNA w diagnostyce weterynaryjnej

Iwona Markowska-Daniel
Zygmunt Pejsak
Tomasz Stadejek
Zakład Chorób Świń
Państwowy Instytut Weterynarii
Puławy

1. Wstęp

U płynęło prawie dwadzieścia lat od czasu opublikowania przez Köhlera i Milsteina pierwszej pracy o uzyskaniu przeciwciała monoklonalnego (MAb) *in vitro* metodą hybrydoma, kiedy to po raz pierwszy „nieśmiertelność” populacji komórek nowotworowych, czyli ich utrzymującą się zdolność do podziałów, wykorzystano do wytworzenia hybrydu komórkowego w wyniku połączenia go z uczulonym na określony antygen limfocytom B (1,2,3). Uczulony limfocyt B jest partnerem wnoszącym do tworzonego hybrydu komórkowego informację genetyczną do wytwarzania przeciwciała o określonej swoistości oddziaływania z antygenem użytym w procesie immunizacji. Poza zdolnością do wytwarzania immunoglobuliny o aktywności przeciwciała ważne jest, by stosowane do wytworzenia hybrydu komórkowego limfocyty B posiadały związane z błoną komórkową enzymy: hypoksantyno-guaninofosforybazylo-transferazę (HGPRT) oraz kinazę tymidylanową (TK) (3).

Drugim partnerem do fuzji jest komórka nowotworowa, która powinna spełniać następujące warunki: wykazywać defekt enzymatyczny dotyczący wytwarzania enzymów HGPRT oraz TK, a także nie powinna wytwarzać własnych immunoglobulin (3).

W procesie hybrydyzacji, zwanym fuzją, powstaje komórka, która zawiera synkarion, tzn. ma podwójny materiał genetyczny i utrzymuje nowotworową zdolność do podziałów i wytwarzania przeciwciała o określonej swoistości.

Komórki hybrydoma wykazujące produkcję przeciwciał monoklonalnych poddaje się procesowi klonowania zmierzającemu do uzyskania rosnącego

klonu — kolonii wywodzącej się z pojedynczej komórki hybrydoma, u której zdolność wytwarzania do podłoża hodowlanego żądanego przeciwciała jest cechą stałą. Końcowym etapem jest produkcja MAb's metodą *in vitro* poprzez namnażanie wyselekcjonowanych hybrydom lub *in vivo* poprzez produkcję wysięku otrzewnowego będącego źródłem żądanych przeciwciał. Użyta do tego celu mysz powinna posiadać ten sam antygen zgodności tkankowej, co mysz będąca dawcą śledziona do hybrydyzacji. Po 2-3 tygodniach w jamie otrzewnowej myszy powstają nowotwory, towarzyszy temu produkcja płynu otrzewnowego w ilości 0,5-5 ml/mysz. Płyn ten oraz surowica myszy zawierają przeciwciała monoklonalne, których aktywność jest 75-100 razy wyższa niż aktywność surowic myszy immunizowanych metodą klasyczną, poza tym jest to metoda znacznie bardziej efektywna bowiem w 1 ml wysięku można uzyskać około 1-20 mg immunoglobulin, podczas gdy w hodowli komórkowej jedynie około 10-30 $\mu\text{g/ml}$ (3).

Wprowadzenie przeciwciał monoklonalnych zostało określone jako „rewolucja w immunologii”. Znalazły one szerokie zastosowanie w medycynie ludzkiej m.in. w badaniach struktury białek, technikach diagnostycznych, w immunoterapii, bakterilogii, wirusologii, parazytologii, transplantologii, w badaniach nad diagnostyką i terapią nowotworów, w patomorfologii i w wielu innych dziedzinach, pozwalając na przełamanie barier istniejących w tradycyjnie stosowanych technikach badawczych (3).

Metodą, która w nie mniejszym stopniu wpłynęła na postęp badawczy w wymienionych uprzednio dziedzinach nauki jest reakcja łańcuchowej polimeryzacji DNA (ang. *polymerase chain reaction* — PCR). Mechanizm tej reakcji polega na enzymatycznym powielaniu fragmentu DNA ograniczonego przez dwa oligonukleotydowe startery. Hybrydują one do przeciwnych nici DNA o specyficznej sekwencji (ang. *target sequence*), skierowane do siebie swoimi końcami 3'. Cykliczna, termiczna denaturacja matrycy, hybrydyzacja starterów do jej sekwencji oraz ich wydłużanie katalizowane przez polimerazę DNA daje w rezultacie amplifikację segmentu DNA zdefiniowanego przez końce 5' starterów. Ponieważ produkt wydłużenia każdego startera może służyć jako matryca w kolejnym cyklu, każdy cykl podwaja ilość fragmentów DNA zsyntetyzowanych w poprzednim (4,5). Należy pamiętać, że amplifikacja RNA musi zostać poprzedzona jego enzymatyczną transkrypcją na DNA przez odwrotną transkryptazę.

Po raz pierwszy PCR zastosowano do diagnostyki anemii sierpowatej (4). Wówczas konieczne było uzupełnianie zawartości polimerazy po każdym etapie denaturacji. Termolabilny enzym Klenowa ulegał bowiem inaktywacji w podwyższonej temperaturze. Przełomem stało się zastosowanie termostabilnej polimerazy DNA izolowanej z termofilnych bakterii *Thermus aquaticus* (Taq polimerazy) (6). Taq polimeraza zachowuje swoje właściwości po ogrzaniu jej do 95°C. Zastosowanie tego enzymu umożliwiło automatyzację procesu, a przez to jego uproszczenie. Termostabilność enzymu pozwoliła ponadto na podwyższenie temperatury hybrydyzacji (ang. *annealing*) starterów z matrycą. Dzięki temu osiągnięto lepszą specyficzność PCR. Wyższa stała się również

wydajność reakcji, poprzez minimalizację niespecyficznego wiązania starterów i enzymu.

Obecnie PCR przeprowadza się w urządzeniach sterowanych mikroprocesorem umożliwiających szybkie zmiany temperatur (1-2°C/s). Mieszanina reakcyjna umieszczana jest w probówkach typu Eppendorf w objętości 50-100µl, i zwykle przykrywana jest niewielką objętością oleju mineralnego dla zabezpieczenia przed parowaniem wody. Odpowiednio zaprogramowane urządzenie cyklicznie zmienia temperaturę mieszaniny (zwykle 25-35 cykli). W każdym cyklu pierwszym etapem jest denaturacja matrycy czyli rozdzielenie podwójnej nici DNA. Dochodzi do tego w temperaturze 90-95°C. Następnie temperatura jest obniżana do 40-60°C, w której dochodzi do hybrydyzacji (ang. *annealing*) starterów z matrycą DNA. Temperaturę dobiera się tak aby zapewnić wiązanie starterów jedynie w miejscach pełnej komplementarności sekwencji nukleotydów. Zależy ona od długości i składu nukleotydowego starterów. Zwykle jednodominutowa inkubacja mieszaniny w tej temperaturze jest w pełni wystarczająca. Po tym czasie temperatura zostaje podniesiona do 72°C, wartości optymalnej dla aktywności Taq polimerazy, w której dochodzi do wydłużania starterów czyli syntezy DNA. Najprostszym sposobem identyfikacji produktu PCR jest jego elektroforeza w żelu agarozowym i barwienie bromkiem etydyny. W tym przypadku określa się jedynie wielkość łańcucha DNA otrzymanego w reakcji. Innymi bardziej specyficznymi sposobami identyfikacji jest przeprowadzenie analizy restrykcyjnej, hybrydyzacja z sondą molekularną lub wykorzystanie metod kolorymetrycznych takich jak DIANA (7) lub CODAF (8). Czas 35 cykli trwa od 2,5 do 3,5 godziny w zależności od dobranego okresu poszczególnych etapów oraz użytego urządzenia.

Czułość testu zależy w dużym stopniu od czystości preparatu DNA użytego do amplifikacji. Określając czułość PCR w wykrywaniu wirusa choroby Aujeszky'ego w nasieniu Stadejek i współ. (9) stwierdzili, że istnieje zależność pomiędzy zastosowaną metodą ekstrakcji DNA a uzyskaną czułością testu PCR. Najmniejsza wykrywalna ilość wirusa wynosiła od $2,5 \times 10^2$ do $2,5 \times 10^{-2}$ jednostek lysinkotwórczych (ang. *plaque forming units* — pfu)/ml. Czułość testu można podnieść poprzez reamplifikację produktu z użyciem starterów wewnętrznych w stosunku do poprzednio użytej pary — jest to tzw. *nested* — PCR. Stanowi to równocześnie potwierdzenie specyficzności pierwszej reakcji PCR.

2. Zastosowanie przeciwciał monoklonalnych w diagnostyce weterynaryjnej

W medycynie weterynaryjnej przeciwciała monoklonalne (MAb) wykorzystywane są przede wszystkim do diagnostyki chorób zakaźnych i inwazyjnych. Są one niezwykle ważnym narzędziem zwłaszcza w diagnostyce i badaniach wirusologicznych. Dzięki poznaniu antygenowej różnorodności wirusów, funkcji poszczególnych białek wirusowych, selekcji nowych wariantów antygeno-

wych o zmienionych właściwościach biologicznych i patogennych, MAbs pozwalają na różnicowanie szczepów wirusowych oraz umożliwiają prowadzenie badań epizootiologicznych, których celem jest śledzenie dróg szerzenia się szczepów wirusa o określonych cechach antygenowych. Wykazano, np. że szczepy wirusa wścieklizny izolowane w różnych rejonach geograficznych mogą mieć odmienną budowę antygenową. Budowa antygenowa lokalnie izolowanych szczepów odbiegać może od budowy szczepów szczepionkowych, co może prowadzić do nieskuteczności szczepień przeciw wściekliznie i w związku z tym konieczności przygotowywania preparatów szczepionkowych o właściwościach antygenowych zbliżonych do szczepu aktualnie krążącego w populacji (10).

Przeciwciała monoklonalne mogą być wykorzystywane do selekcji genetycznej zwierząt opornych na pewne choroby, np. kur opornych na chorobę Mareka (11).

W parazytologii zastosowanie MAbs pozwala na badanie struktur antygenowych poszczególnych form rozwojowych pasożytów, co stwarza szansę produkcji skutecznych immunopreparatów przeciw pasożytniczych (12).

Zespół naukowców z Central Veterinary Laboratory w Weybridge opracował zestaw przeciwciał monoklonalnych umożliwiających szybkie i precyzyjne różnicowanie zakażeń bydła koronawirusami, rotawirusami grupy A oraz *E. coli*, które są głównymi czynnikami etiologicznymi chorób biegunkowych u cieląt (13,14). Badacze holenderscy za pomocą MAbs scharakteryzowali właściwości antygenowe i adhezyjne podjednostki FaeG, głównej podjednostki antygeny fimbrialnego K88 (15); z kolei Duchet-Suchaux i współ. wykazali możliwość biernego uodporniania osesków mysich na enterotoksynę F41 (czynnik adhezyjny) po dożylniej inokulacji matek przeciwciałami monoklonalnymi przeciwko wspomnianej toksynie (16). Morris, Thorns i Woolley określają za pomocą MAbs determinanty antygenowe *Mycobacterium bovis* (17). Zastosowanie MAbs w diagnostyce zakażeń *Corynebacterium pseudotuberculosis* u małych przeżuwaczy było z kolei przedmiotem badań ter Laak i współ. (18). Savio, Pacciarini, Cinco i Tagliabue (19) dokonali identyfikacji bydłych oraz świńskich szczepów *Leptospira interrogans* w oparciu o wyprodukowane MAbs.

Do eliminacji *Salmonella enteritidis* w stadach kur w Holandii opracowano zestaw DAS-ELISA (ang. *double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay*) z użyciem MAbs przeciwko antygenom rzęskowym *Salmonella enteritidis* oraz zestaw ELISA zawierający przeciwciała dla frakcji lipopolisacharydowej wspomnianej bakterii (20).

Spośród nowotworowych chorób ptaków, największy problem w hodowli kur stanowi białaczka limfatyczna. Współczesna diagnostyka białaczek drobiu, jak również innych chorób tego gatunku zwierząt, np. choroby Newcastle (rzekomego pomoru drobiu), zakaźnego zapalenia torby Fabrycjusza ptaków (choroba Gumboro) oparta jest w dużym stopniu na wykorzystaniu przeciwciał monoklonalnych (21,22,23,24,25).

W produkcji trzody chlewnej duże straty ekonomiczne powoduje wirus choroby Aujeszky'ego, należący do rodziny *Herpesviridae*. W Szwecji opraco-

wano m.in. zestaw *blocking ELISA* umożliwiający zwalczanie wspomnianej choroby, dzięki możliwości jednoznacznego różnicowania świń zakażonych naturalnie od świń szczepionych oraz nie posiadających przeciwciał dla wirusa choroby Aujeszky'ego, w oparciu na przeciwciałach monoklonalnych (26). Ostatnio w Polsce — w Instytucie Weterynarii w Puławach podjęte zostały podobne prace doświadczalne, zmierzające do opracowania MAbs, umożliwiających serologiczne odróżnianie świń zakażonych naturalnie od uodpornianych delecyjnym szczepem wirusa choroby Aujeszky'ego, co stanowiłoby podstawę zwalczania wspomnianej choroby świń w naszym kraju.

Przeciwciała monoklonalne wykorzystywane są do badania systemu odpornościowego i określania klas przeciwciał dla wirusa wirusowego zapalenia jelit i żołądka prosiąt (TGEV) oraz rotawirusa świń (27).

Terpstra, Dekker i Wensvoort (28) opracowali zestaw *ELISA* do diagnostyki choroby pęcherzykowej świń. W Danii przeciwciała monoklonalne wykorzystywane są do diagnostyki zakażeń świń *Mycoplasma hyopneumoniae*. Opracowany zestaw *blocking ELISA* z zastosowaniem przeciwciał monoklonalnych pozwala na precyzyjną serologiczną diagnostykę zakażeń wspomnianymi drobnoustrojami (29).

Hansen, Frandsen oraz Meyling opracowali przeciwciała monoklonalne do wykrywania β -toksyny *Clostridium perfringens*, typ C w zeszkrobinach ze zmian dermonekrotycznych oraz z jelit świń zakażonych tym drobnoustrojem (30).

W Anglii, wykorzystując zestaw swoistych MAbs, dokonano klasyfikacji uzyskanych od świń izolatów *Actinobacillus pleuropneumoniae*, reprezentujących 12 różnych serotypów (31,32). Podobne prace wykonali badacze japońscy (33) oraz amerykańscy (34).

Diagnostyka nowych chorób zwierząt, o nie w pełni znanej etiologii, narażona jest na wiele problemów, zwłaszcza gdy czynnik patogenny trudno adaptuje się do hodowli komórkowych, a konwencjonalnie stosowane techniki diagnostyczne nie pozwalają na precyzyjne rozpoznanie choroby. Taka sytuacja miała miejsce, gdy w USA oraz w Europie na początku lat dziewięćdziesiątych pojawiła się tzw. tajemnicza choroba świń (ang. *Mystery swine disease*), powodująca olbrzymie straty gospodarcze. Obecnie w Holandii oraz w USA używano przeciwciała monoklonalne, skoniugowane z fluoresceiną lub peroksydazą chrzanową, które wykorzystuje się do wykrywania czynnika etiologicznego tej choroby — *Lelystad virus*, testem immunofluorescencji oraz immunoperoksydazowym (35).

Głównym przedmiotem naszego zainteresowania jest zastosowanie przeciwciał monoklonalnych do wykrywania wirusa pomoru klasycznego świń, bardzo groźnej i zwalczanej metodami administracyjnymi choroby świń. Dysponowanie precyzyjnymi metodami diagnostyki pomoru świń opartymi na przeciwciałach monoklonalnych ma bardzo duże znaczenie nie tylko z punktu widzenia epizootologicznego, ale również ekonomicznego. Komisja Weterynaryjna UE wymaga obecnie aby kraje prowadzące międzynarodowy obrót zwierzętami, oraz mięsem i produktami zwierzęcego pochodzenia były „wolne” od pomoru świń. Szczególne konsekwencje epizootyczne i ekonomiczne mogą

mieć wyniki fałszywie dodatnie w kierunku pomoru, związane z naturalnym zakażeniem badanych świń należącymi do tej samej rodziny i pokrewnymi antygenowo: wirusem biegunki i choroby błon śluzowych bydła lub wirusem choroby granicznej owiec. W Zakładzie Chorób Świń Instytutu Weterynarii w Puławach opracowany został zestaw przeciwciał monoklonalnych umożliwiający różnicowanie poszczególnych rodzajów pestiwirusów (36). Celem naszych aktualnych badań jest opracowanie odpowiedniego zestawu ELISA opartego na przeciwciałach monoklonalnych, umożliwiających serologiczne różnicowanie świń zakażonych jednym z wymienionych pestiwirusów.

3. PCR w weterynaryjnej diagnostyce wirusologicznej

Pierwsze doniesienia na temat zastosowań PCR w weterynaryjnej diagnostyce wirusologicznej pojawiły się na przełomie lat osiemdziesiątych i dziewięćdziesiątych. Technika ta znajduje zastosowanie wszędzie tam, gdzie tradycyjne metody diagnostyczne wymagają długich i skomplikowanych procedur. Poniżej przedstawione są przykłady zastosowań PCR w rutynowej diagnostyce.

3.1. Choroba Aujeszky'ego (AD)

Choroba ta występuje u świń i jest wywoływana przez wirus (Aujeszky disease virus — ADV) należący do podrodziny *Alphaherpesvirinae* w rodzinie *Herpesviridae*. Z punktu widzenia epizootiologii bardzo ważne jest, że w organizmie zwierzęcia może on występować w postaci latentnej (37). Cząsteczki wirusowego DNA znajdują się w komórkach kilku narządów wewnętrznych, może dochodzić do transkrypcji, zwykle jednak nie zachodzi translacja. Latentnie zakażona świnia nie wykazuje objawów choroby. Okresowo jednak może dochodzić do translacji i reaktywacji wirusa w organizmie nosiciela, wydalenia go do środowiska zewnętrznego i zakażenia wrażliwych zwierząt. Podczas gdy ostra postać choroby jest łatwa do rozpoznania przy użyciu metod konwencjonalnych, nie ma praktycznych i czułych metod wykrywania latentnych przypadków choroby. Dopiero zastosowanie techniki PCR umożliwiło opracowanie skutecznej metody diagnostycznej. Testy z wykorzystaniem PCR opracowali m.in. Dangler, Deaver, Kolodziej i Rupprecht (38). Do amplifikacji wybrano fragmenty genów: gII, gp50, gX oraz TK. Kolejnym zastosowaniem PCR w diagnostyce AD jest określanie statusu zakażonego tzw. *single reactor pigs*. Terminem tym określa się pojedyncze zwierzęta wykazujące obecność przeciwciał dla ADV, żyjące w stadach wolnych od tej choroby. Ich obecność jest niekiedy stwierdzana podczas przeglądów serologicznych. Powszechnie uważa się, że są to wyniki fałszywie dodatnie, jednak izolacja wirusa po immunosupresyjnej stymulacji takich zwierząt dowodzi, że w pewnych przypadkach przyczyną mogą być zakażenia latentne. Pracuje się również nad testem pozwalającym na jednoczesną amplifikację dwóch regionów:

fragmentu genu gII (kodujące białka niezbędne dla rozwoju wirusa), oraz genów gI lub TK (ich delecja nie wpływa na zdolność do zakażenia komórek i replikacji wirusa). W krajach, gdzie stosuje się mutanty delecyjne wirusa AD (gI- lub TK-) jako żywe szczepionki, rekombinacje genetyczne jakie mogą zachodzić pomiędzy szczepami wirusa, dzikimi a szczepionkowymi mogą powodować trudności w diagnostyce i eradykacji AD. Test oparty na PCR pozwala na precyzyjne określenie genotypu izolowanego wirusa w odniesieniu do obecności lub braku delecji (38).

3.2. Białaczka bydła

Czynnikiem etiologicznym tej choroby jest wirus (ang. *bovine leukemia virus* — BLV) należący do rodziny *Retroviridae*. Obecnie do diagnostyki białaczki bydła wykorzystuje się metody serologiczne. Są one proste i na ogół wystarczające do określenia rozprzestrzenienia się zakażenia w stadzie. Jednak w pojedynczych przypadkach mogą one dawać wyniki fałszywie ujemne. Również we wczesnej fazie zakażenia i u zwierząt trwale zakażonych wirusem BVDV testy serologiczne mogą dawać wyniki fałszywie ujemne. U cieląt niemożliwe jest odróżnienie przeciwciał siarowych, otrzymanych od zakażonej krowy, od tych przeciwciał, które powstały po zakażeniu wirusem cielęcia. Jako uzupełnienie serologii powinna być stosowana bezpośrednia metoda diagnostyczna, pozwalająca na wykrycie wirusa. Jednak techniki konwencjonalne, takie jak: hodowla limfocytów *in vitro*, mikroskopia elektronowa lub próba biologiczna na owcach są kosztowne, długotrwałe i pracochłonne. PCR jako bezpośrednią metodę wykrywania zakażeń BLV stosuje się w wielu laboratoriach, w tym również w Polsce (39,40). Testy takie w większości opierają się na wykrywaniu prowirusowego DNA w leukocytach krwi.

3.3. Wirusowa biegunka i choroba błon śluzowych bydła

Wirus wywołujący tę chorobę (ang. *bovine viral diarrhoea virus* — BVDV) należy do rodzaju *Pestivirus*, rodziny *Flaviviridae*. Występuje on w dwóch biotypach: cytopatycznym (cp), indukującym efekt cytopatyczny w hodowli tkankowej oraz niecytopatycznym (ncp) nie wywołującym takiego efektu (41). Obydwa biotypy są patogenne dla bydła wywołując ostrą, wirusową biegunkę oraz przewlekłą, chorobę błon śluzowych. Podczas gdy wirusowa biegunka charakteryzuje się wysoką zachorowalnością i niską śmiertelnością, choroba błon śluzowych występuje z niską zachorowalnością i wysoką śmiertelnością. Wirus BVD może przenikać łożysko i zakażać płody, skutkiem czego jest ronienie, rodzenie martwych cieląt, zniekształcenia płodu lub powstanie immunotolerancji (42). Takie cielęta są trwale zakażone wirusem, który rozsiewają w środowisku, lecz seronegatywne. Powtórne zakażenie wirusem BVD może wywołać u nich chorobę błon śluzowych (43). Dodatkowym zagrożeniem jakie niesie zakażenie płodu *in utero*, jest zanieczyszczenie wirusem surowicy

używanej do hodowli komórek. Konwencjonalne metody diagnostyczne oparte są na izolacji wirusa lub serologii. Poza tym, że metody te są zbyt czasochłonne i nieodpowiednie dla masowych badań; ncp warianty wirusa BVD wymagają niekiedy 2-3-krotnego piasażowania dla namnożenia wykrywalnych ilości wirusa. PCR znalazł zastosowanie zarówno w wykrywaniu wirusa w materiale patologicznym, pobieranym od podejrzanych o zakażenie zwierząt, jak i w surowicy płodowej oraz hodowlach komórkowych wykorzystywanych w laboratoriach wirusologicznych (44,45,46).

3.4. Klasyczny pomór świń

Choroba ta jest jedną z najgroźniejszych, zakaźnych i zaraźliwych chorób trzody chlewnej oraz dzików. Powoduje ona duże straty w pogłowie tych zwierząt. Czynnikiem etiologicznym jest wirus pomoru klasycznego świń (*Hog cholera virus* — HCV) należący razem z wirusem BVD i wirusem choroby granicznej (ang. *border disease virus* — BDV) do rodzaju *Pestivirus*. Diagnostyka choroby opiera się na izolacji wirusa (PLA) lub wykrywaniu jego antygenów (IF). Ponieważ materiał do badania (migdałki, nerki, śledziona) dociera do laboratoriów w różnym czasie po śmierci zwierzęcia, niekiedy dochodzi do autolizy tkanek, co powoduje trudności w postawieniu prawidłowej diagnozy. Wirus traci zdolność do zakażenia hodowli komórkowych, natomiast produkty rozkładu tkanek mogą dawać wyniki fałszywie dodatnie. W takich przypadkach PCR jest jedyną metodą pozwalającą na wykrycie wirusa. Zarówno do wykrywania BVDV jak i CSFV najczęściej wykorzystuje się amplifikację fragmentu regionu niekodującego z końca 5' genomu wirusa (47,48,49,50). Region ten jest konserwatywny i homologiczny dla pestiwirusów.

Innym problemem wiążącym się z diagnostyką CSF jest odróżnianie tej choroby od infekcji wirusem BVD, który ma zdolność przekraczania barier gatunkowych i zakażenia świń. Zwykle zakażenie takie przebiega bezobjawowo, niekiedy jednak dochodzi do wystąpienia objawów podobnych do nietypowych przypadków CSF. Tradycyjnie używa się do różnicowania takich zakażeń przeciwciał monoklonalnych. Wyniki badań przeprowadzonych we współpracy z Instytutem Weterynarii w Uppsali wskazują na możliwość różnicowania BVDV i CSFV na podstawie amplifikacji fragmentu regionu kodującego białko p80, które jest proteazą serynową biorącą udział w dojrzewaniu poliproteiny wirusa (49). Inni autorzy wskazują na przydatność amplifikacji regionu kodującego glikoproteinę gp53 wchodzącą w skład otoczki wirusa i indukującą powstanie przeciwciał neutralizujących wirusa (50).

Literatura

1. Köhler G., Milstein C., (1975), *Nature*, 52, 495-497.
2. Kurpisz M., (1993), *Biotechnologia*, 2 (21), 105-120.
3. Radzikowski C., Wiedłocha A., (1988), *Problemy biotechnologii*, Wszechnica PAN, 145-176.
4. Saiki R. K., Scharf S., Faloona F. A., Mullis K. B., Horn G. T., Erlich H. A.,

- Arnheim N., (1985), *Science*, 230, 1350-1354.
5. Mullis K. B., Faloona F. A., (1987), *Methods in Enzymology*, 155, 335-350.
 6. Saiki R. K., Gelfand D. H., Stoffel S., Scharf S. J., Higuchi R., Horn G. T., Erlich H. A., (1988), *Science*, 230, 487-491.
 7. Wahlberg J., Lundeberg J., Hultman T., Uhlen M., (1990), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 6569-6573.
 8. Belák S., Ballagi-Pordány A., (1993), *Mol. Cell. Probes*, 7, 241-248.
 9. Stadejek T., Kreutz L. C., Mengeling W. L., (1994), *Mat. XXX Zjazdu PTBioch.*, 27.
 10. Jankowski M., (1988), *Problemy biotechnologii*, Wszechnica PAN, 269-285.
 11. Longenecker B. M., Mosmann T. R., Shiozawa C., (1979), *Immunogenetics*, 9, 137-139.
 12. Cox F. E. G., (1980), *Nature*, 284, 304-305.
 13. Thorns C. J., Bell M. M., Chasey D., Chesham J., Roeder P. L., (1992), *Am. J. Vet. Res.*, 53, 1, 36-43.
 14. Morris J. A., Thorns C. J., Boarer C., (1985), *Res. Vet. Sci.*, 39, 75-79.
 15. Bakker D., Willemsen P. T. J., Simons L. H., van Zijderveld F. G., Graaf F. K., (1992), *Molecular Microbiology*, 6, 247-255.
 16. Duchet-Suchaux M., Menanteau P., van Zijderveld F. G., (1992), *Infection and Immunity*, 60, 2828-2834.
 17. Morris J. A., Thorns C. J., Woolley J., (1985), *Gen Microbiol.*, 131, 1825-1831.
 18. ter Laak E. A., Bosch J., Bijl G. C., Schreuder B. E. C., (1992), *Am. J. Vet. Res.*, 53, 1125-1132.
 19. Savio M. L., Pacciarini M. L., Cinco M., Tagliabue S., (1993), *Microbiologica*, 16, 315-322.
 20. van Zijderveld F. G., van Zijderveld-van Bommel A. M., Anakotta J., (1992), *J. Clin. Microbiol.*, 30, 2560-2566.
 21. Minta Z., (1989), *Uzyskanie przeciwciał monoklonalnych przeciwko białku P 27 wirusów białaczek ptaków*, pr. habil., Instytut Weterynarii, Puławy.
 22. Pokric B., Sladic D., Juroš S., Cajavec S., (1993), *Vaccine*, 11, 6, 655-659.
 23. Sato T., Taira H., Matsuura Y., Iwasaki K., Katsumata T., (1993), *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 57, 4, 566-570.
 24. Sharma J. M., Dohms., Walser M., Snyder D. B., (1993), *Avian Diseases*, 37, 3, 741-748.
 25. Eterradossi N., Picault J. P., Drouin P., Guittet M., Lhospitalier R., Bennejean G., (1992), *J. of Vet. Med. B.*, 39, 9, 683-691.
 26. Grom J., Linde N., Ljung S., (1992), *Monoclonal Blocking ELISA detecting Aujeszky's disease virus antibodies to the glycoproteins gI and gII*, 12th International Pig Veterinary Society, 82.
 27. Paul P. S., Mengeling W. L., Saif L. J., (1985), *Detection of Classes of Antibodies to Transmissible Gastroenteritis Virus and Rotavirus of Swine Using Class-Specific Monoclonal Antibodies to Porcine Immunoglobulins*, 66th Annual Meeting of the Conference of Research Workers in Animal Disease, 265.
 28. Lee B. J., Hampson D. J., (1994), 13th International Pig Veterinary Society, 198.
 29. Barford K., Sorensen V., Feld N. C., (1994), 13th International Pig Veterinary Society, 189.
 30. Hansen K. M., Frandsen P. L., Meyling A., (1992), *Clostridium perfringens type C -toxin. Improved method of toxin detection by sandwich ELISA using monoclonal antibody*, 12th International Pig Veterinary Society, 297.
 31. Smith I. K. M., Lida J., (1990), *Research in Veterinary Science*, 49, 144-150.
 32. Lida J., Smith I.M., (1990), *Research in Veterinary Science*, 49, 8-13.
 33. Nakai T., Kawahara K., Horiguchi Y., Danbara H., Kume K., (1992), *Am. J. Vet. Res.*, 53, 9, 1519-1523.
 34. Dayalu K. I., Keich R. L., Nelson M. J., McConnell K., Kaufman T., (1992), *An in vivo model for determining the role of specific monoclonal antibodies in redu-*

- cing/preventing lung lesions upon challenge with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 1, 5 and 7, 12th International Pig Veterinary Society, 189.
35. Wensvoort G., Terpstra C., Pol J. M. A., et al., (1991), *The Veterinary Quarterly*, 13, 3, 121-130.
 36. Markowska-Daniel I., Pejsak Z., (1994), *Medycyna Wet.*, 50, 5, 207-209.
 37. Kluge J. P., Beran G. W., Hill H. T., Platt K. B., (1992), *Diseases of Swine*, Eds. Leman A. D., Straw B. E., Mengeling W. L., et al., Iowa State University Press, Ames, IA, 312-323.
 38. Dangler C. A., Deaver R. E., Kolodziej C. M., Rupprecht J. D., (1992), *Am. J. Vet. Res.*, 53, 904-908.
 39. Kuźmak J., Grundboeck J., (1993), *Medycyna Wet.*, 49, 4, 151-154.
 40. Kuźmak J., Grundboeck J., Kozaczyńska B., (1993), *Medycyna Wet.*, 49, 7, 312-315.
 41. Gillespie J. H., Baker J. A., McEntee K., (1960), *Cornell Vet.*, 50, 73-79.
 42. Brownlie J., (1991), *Arch. Virol.*, suppl. 3, 79-96.
 43. Bolin S. R., Matthews P. J., Ridpath J. F., (1991), *J. Vet. Diagn. Invest.*, 3, 199-203.
 44. Alansari H., Brock K. V., Potgieter L. N. D., (1993), *J. Vet. Diagn. Invest.*, 5, 148-153.
 45. Hooft van Iddekinge B. L. J., van Wamel J. L. B., van Gennip H. G. P., Moormann R. J. M., (1992), *Vet. Microbiol.*, 30, 21-34.
 46. Bolin S. R., Ridpath J. F., Black J., Macy M., Roblin R., (1994), *J. Virol. Meth.*, 48, 211-221.
 47. Boye M., Kamstrup S., Dalsgaard K., Wirz B., Tratschin J. D., Muller H. K., Mitchell D. B., (1993), *J. Clin. Microbiol.*, 31, 1148-1154.
 48. Vilcek S., Herring A. J., Herring J. A., Nettleton P. F., Lowings J. P., Paton D. J., (1994), *Arch. Virol.*, 136, 309-323.
 49. Stadejek T., Pejsak Z., (1993), *Mat. symp. „Biotechnologia zwierząt” — badania oraz zastosowanie w hodowli i weterynarii*, Kraków.
 50. Katz J. B., Ridpath J. F., Bolin S. R., (1993), *J. Clin. Microbiol.*, 31, 565-568.

The application of monoclonal antibodies and polymerase chain reaction of DNA to veterinary diagnosis

Summary

Applications of new techniques such as monoclonal antibodies (MAbs) and polymerase chain reaction (PCR) to veterinary diagnosis are presented. The conventional diagnostic method used in veterinary medicine are usually expensive and time consuming; also, they do not allow for the determination of antigenic structure or do not differentiate between field and vaccine viruses. Using of both specific MAbs and PCR amplification technique in laboratory diagnosis enable precise diagnosis of viral and bacterial diseases of animals and may help to solve the diagnostic problems.

Key words:

monoclonal antibodies, polymerase chain reaction, application to veterinary diagnosis

Adres dla korespondencji:

Zygmunt Pejsak, Zakład Chorób Świń, Państwowy Instytut Weterynaryjny, ul. Partyzantów 57, 24-100 Puławy.