



FUNKČNÍ VZOREK

**Technické řešení: Izolace viru afrického moru
prasat z půdy kultivační metodou**

**RNDr. Jana Prodělalová, Ph.D.
Mgr. Lenka Kavanová, Ph.D.**

4712
2020

Funkční vzorek

4712/2020

**Technické řešení: Izolace viru afrického moru prasat z půdy kultivační
metodou.**

RNDr. Jana Prodělalová, Ph.D.
Mgr. Lenka Kavanová, Ph.D.

2020

ISBN 978-80-7672-002-2

Funkční vzorek

Technické řešení: Izolace viru afrického moru prasat z půdy kultivační metodou.

RNDr. Jana Prodělalová, Ph.D.

Mgr. Lenka Kavanová, Ph.D.

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i., Brno

Funkční vzorek byl vytvořen v rámci projektu Národní agentury pro zemědělský výzkum, číslo projektu QK1920187, název projektu Africký mor prasat v České republice: studium molekulární epizootologie a biologických vlastností tuzemských izolátů viru.

OBSAH

1. Úvod	3
2. Cíl metodiky funkčního vzorku	3
3. Vlastní popis funkčního vzorku	4
a. příprava primárních buněk k provedení testu	4
b. zpracování vzorku	4
c. provedení hemadsorpčního testu	5
d. odečtení výsledku	5
4. Seznam použité literatury	6
5. Srovnání novosti postupů	6
6. Popis uplatnění funkčního vzorku	6
7. Ekonomické aspekty	6
8. Dedikace	7

1. Úvod

Africký mor prasat (AMP) je virové onemocnění prasete domácího a prasete divokého (*Sus scrofa*) vyznačující se mimořádně vysokou letalitou u nakažených jedinců. Přestože onemocnění postihuje jen velmi úzký okruh hostitelů a není přenosné na člověka, pro chovatele prasat představuje obávanou hrozbu se závažnými ekonomickými dopady (Blome et al. 2020).

Česká republika je od 12.3.2019 opět uznána jako země AMP prostá, nicméně vzhledem k výskytu infekce na Slovensku, v Polsku a Maďarsku a nejnověji od září letošního roku také v Německu je možnost opětovného výskytu AMP na našem území stále aktuální a problematice je věnována stálá pozornost. Nadále pokračuje i monitoring u divokých prasat a v indikovaných případech i v chovech.

2. Cíl metodiky funkčního vzorku

Cílem je nabídnout efektivní metodu pro průkaz infekčního viru v půdě. Technický postup je určen pro případ nálezu uhynulého zvířete, kdy se dá předpokládat, že mohlo dojít ke kontaktu s dalšími jedinci. Další potenciální využití se nabízí pro ověření úspěšně provedené dekontaminace místa nálezu uhynulého jedince. Postup je také použitelný pro nejrůznější experimentální činnost, To by mohlo být velmi přínosné v případě opětovného výskytu AMP na našem území, kdy by bylo možné ověřit přežívání viru přímo v našich terénních podmínkách. V případě cíleně uměle kontaminované půdy je postup využitelný k modelování přežívání viru AMP za různých podmínek.

Metodika je založena na pozorování tzv. rozet ve světelném mikroskopu, které vznikají na základě hemadsorpce (HAD), tj. navázání prasečích erytrocytů na prasečí alveolární makrofágy (PAM), které byly infikovány virem afrického moru prasat. Izolace viru na primárních buňkách a jeho detekce pomocí HAD je metoda doporučená Evropskou referenční laboratoří pro africký mor prasat (EURL-ASF) pro potvrzení pozitivních výsledků získaných metodami PCR nebo testy založenými na principu imunofluorescence (<https://asf-referencelab.info/asf/en/procedures-diagnosis/sops>).

3. Vlastní popis funkčního vzorku

a. příprava primárních buněk k provedení testu

PAM jsou připraveny bronchoalveolární laváží plic prasete. Podrobný postup je popsán např. v publikaci Kavanová et al. (2015). Z utraceného prasete ve věku 6 – 8 týdnů se odeberou plíce, které se ihned vypláchnou sterilním pufrovaným fyziologickým roztokem (DPBS). Získané buňky se třikrát propláchnou DPBS a opatrně rozmíchají v kultivačním médiu RPMI 1640. Koncentrace buněk se upraví na 2×10^7 buněk na objem 1,5 ml kryoprotektivního média (75 % RPMI 1640, 20 % fetálního telecího séra (FBS) a 5 % dimethylsulfoxidu). Alikvoty buněk se uchovávají v kapalném dusíku do doby použití.

b. zpracování vzorku

Vzorek substrátu je nutné zpracovat do 24 hodin od odběru a uchovávat v chladu. Do 15 ml zkumavky se šroubovacím uzávěrem navázat 1 g substrátu. V případě, že je substrát příliš objemný, lze objem snížit až na 0,5 g. Přidat 10 ml kultivačního média DMEM (suplementované 2 % FBS a antibioticko-antimykotickou směsí o koncentraci dle doporučení výrobce) a třepat na vodorovné třepačce 20 minut při pokojové teplotě. Otáčky nastavit dle konkrétního modelu třepačky tak, aby docházelo ke středně intenzivnímu promíchávání obsahu. Poté suspenzi odstředit na centrifuze (5000 g/20 minut/ +6 °C) a supernatant zfiltrovat přes 0,45 µm sterilní filtr (je vhodné zvolit materiál filtru tak, aby se minimalizovala vazba proteinů). V případě, že se filtr ucpává, je nutné jich použít postupně několik. Filtrát se zakoncentruje s využitím ultrafiltrační kolony (Pierce Protein Concentrator PES, 30K MWCO, 5-20 ml) na objem v rozmezí 200 – 500 µl při 5000 g/+6 °C. To obvykle trvá 45 minut. Získaný koncentrát se využije k provedení hemadsorpčního testu.

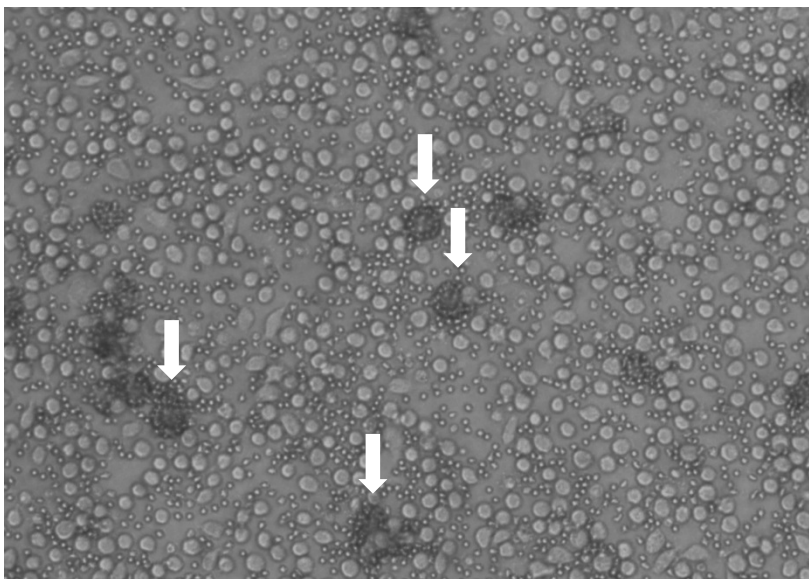
c. provedení hemadsopčního testu

Na 384-jamkovou kultivační desku (SPL) se nasadí PAM v koncentraci 3×10^4 na jamku (kultivační médium DMEM pro makrofágy - suplementované antibioticko-antimykotickou směsí dle doporučení výrobce a 10 % FBS). Kultivuje se přes noc při 37 °C a 5 % CO₂. Koncentrát získaný ultrafiltrací v předchozím kroku se naředí desítkovou řadou do ředění 10⁻⁸ v kultivačním médiu. Následně se 25 μl každého ředění přidá do pěti jamek destičky. Po 20 minutách se přidá 25 μl 0,1 % prasečích erytrocytů (ředěno v DMEM pro makrofágy) izolovaných z heparinizované krve pomocí Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich).

d. odečtení výsledku

Přítomnost viru se odečítá ve světelném invertovaném mikroskopu po sedmi dnech inkubace v 37 °C a v atmosféře 5 % CO₂. Přítomnost viru se projevuje hemadsorpcí erytrocytů na infikované makrofágy ve formě tzv. rozet (Obrázek 1). Virový titr se stanovuje metodou podle Reeda a Muencha (Reed and Muench, 1938).

Obrázek 1: Rozety (označené šipkou) pozorované ve světelném mikroskopu.



Zvětšení 100x

4. Seznam použité literatury

Blome, S., Franzke, K., Beer, M. 2020. African swine fever – A review of current knowledge. *Virus Research* 287,198099.

Kavanová, L., Prodělalová, J., Nedbalcová, K., Matiašovic, J., Volf, J., Faldyna, M., Salát., J. 2015. Immune response of porcine alveolar macrophages to a concurrent infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and *Haemophilus parasuis in vitro*. *Veterinary Microbiology* 180, 28-35.

Reed, L.J., and Muench, H.A. 1938. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *American Journal of Hygiene* 27,493-497.

5. Srovnání novosti postupů

Diagnostické metody využívané při průkazu viru AMP jsou obvykle založeny na průkazu virové nukleové kyseliny v biologickém materiálu, jako jsou například svalovina, kostní dřeň, krev (metody na bázi PCR) nebo protilátek v krevním séru (ELISA); případně mohou být využívány rychlé tzv. „pen-side“ testy určené pro diagnostiku v terénu. Všechny uvedené postupy potvrzují přítomnost patogena ve vyšetřovaném vzorku, nejsou však využitelné při průkazu infekčnosti viru, respektive přítomnosti infekčního patogena. Postup popsáný v tomto funkčním vzorku umožňuje detekci infekčního viru AMP v půdě nebo obdobném typu organického substrátu.

6. Popis uplatnění funkčního vzorku

Funkční vzorek nalezne uplatnění při výskytu viru AMP u divokých prasat v případě nutnosti potvrzení infekčnosti viru, například z důvodu rozhodování o použitém postupu sanace prostředí.

7. Ekonomické aspekty

Ekonomické aspekty funkčního vzorku nelze v danou chvíli hodnotit. Jedná se o nadstavbovou metodu, se značnou finanční, materiálovou, metodickou i časovou náročností, která ovšem, pokud bude správně použita, představuje značný přínos při řešení výskytu AMP u divočáků.

8. Dedikace

Funkční vzorek je dedikován projektu QK1920187 (Africký mor prasat v České republice: studium molekulární epizootologie a biologických vlastností tuzemských izolátů viru) v rámci Programu aplikovaného výzkumu MZe na období 2017 – 2025 ZEMĚ.

VÚVeL 

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.
Hudcova 296/70
621 00 Brno
Czech Republic

Tel.: +420 5 3333 1111; www.vri.cz; e-mail: vri@vri.cz