

PIOTR GAŻDZIŃSKI, ANNA CĄKAŁA

## Zastosowanie odczynu immunodyszufji radialnej do wykrywania zakażenia wirusem choroby Mareka u kur

Z Zakładu Badania Chorób Drobitu Instytutu Weterynarii w Puławach

Wykrywanie swoistych przeciwciał precypitacyjnych w surowicach zakażonych ptaków, jako sposób rozpoznawania zakażenia wirusem choroby Mareka, jest mało przydatny od czasu wprowadzenia powszechnych szczepień ochronnych przeciwko tej chorobie. Bowiem zarówno atenuowane lub apatogenne szczepy wirusa choroby Mareka (MD) jak i stosowany powszechnie do szczepień, także i w naszym kraju, wirus *Herpes* wyosobniony z indyków (HVT), wykazują znaczne pokrewieństwo antygenowe, a rozróżnienie przeciwciał precypitacyjnych swoistych dla wirusa MD czy HVT jest w rutynowej diagnostyce trudne.

W 1972 r. Marquardt (8) opisał odczyn immunodyszufji radialnej (radioimmunodyszufion — RID), polegający na wykrywaniu antygeny wirusa choroby Mareka w brodawkach piór zakażonych ptaków. Wiadomo, że jedynym dotychczas poznany miejscem replikacji kompletnych cząstek wirusa choroby Mareka są komórki skóry, a przede wszystkim komórki nabłonka brodawek piór (3, 9). Antygen wirusowy w tych komórkach stwierdzili Calnek i wsp. (4) Casnocha i Salaj (5).

Celem przedstawionej pracy było prześledzenie pojawiania się i utrzymywania antygeny wirusowego w brodawkach piór ptaków zakażonych doświadczalnie wirusem choroby Mareka, ptaków poddanych szczepieniu p-ko chorobie Mareka indyczym szczepem wirusa *Herpes* oraz możliwości wykrywania antygeny wirusowego w brodawkach piór ptaków padłych na chorobę Mareka.

### Materiał i metody

Ptaki. Badanie przeprowadzono na 180 kurczętach (krzyżówki ras ogólnoużytkowych); ptaki trzymano w klatkach i żywiono mieszkanką DKA — starter, DKA — finisz oraz DK.

Szczep zjadliwy wirusa choroby Mareka (MDV). Do zakażenia ptaków używano standardowego szczepu HPRS 16 wirusa choroby Mareka. Materiał do zakażenia stanowiła zawiesina komórek śledziony oraz białych ciałek krwi kurcząt zakażonych omawianym szczepem. Komórki zawieszano w płynie Eagle'a w stosunku 1:10 i wprowadzano je ptakom dootrzewnowo po 0,2 ml.

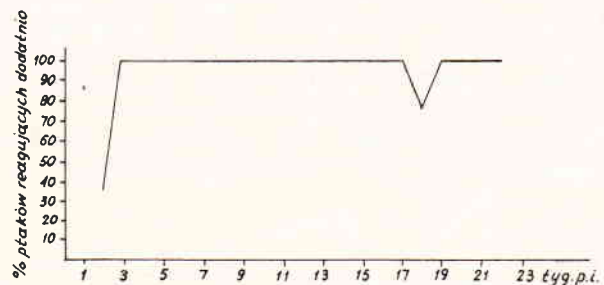
Szczep szczepionkowy. Do badań użyto szczepu FC 126 indyczego wirusa *Herpes* namnażanego w hodowli fibroblastów zarodka kurzego, wg metodyki podanej przez Cąkałą i Dziekanowską (2). Miano TCID<sub>50</sub> sporządzonej wg tej metodyki szczepionki „płynnej” wynosiło 10<sup>4,26</sup> w 0,2 ml. Szczepionkę przechowywano w temperaturze ciekłego azotu.

Surowica przeciwko zjadliwemu szczepowi wirusa MD. Uzyskano je zakażając 20 jednodniowych piskląt zjadliwym szczepem HPRS 16 domięśniowo w dawce po 0,2 ml. Kurczęta skrwawiano w wieku 16 tyg., kiedy u wszystkich stwierdzono obecność swoistych przeciwciał precypitacyjnych w surowicy. Miano precypitacyjne tych surowic wahało się od 1:4 do 1:6.

Surowica p-ko szczepionkowemu szczepowi wirusa (HVT). Uzyskano ją wprowadzając domięśniowo 20 jednodniowym pisklątom szczepionkę „płynną” w dawce po 0,2 ml. Kurczęta skrwawiano w wieku 5 miesięcy. Miano precypitacyjne zlewki uzyskanych surowic wynosiło 1:8.

Pobieranie piór do odczynu precypitacji. Pobierano je ze skrzydeł i szlaku grzbietowego. Do odczynu używano wyłącznie piór, które posiadały grubą, wilgotną brodawkę. Po delikatnym wyciągnięciu pióra z brodawki skórnej, część, która tkwiła w skórze odcinano ostrymi nożyczkami na długość około 0,5 cm. Od jednego ptaka pobierano do badań przynajmniej 5 piór.

Odczyn immunodyszufji radialnej (RID). Wykonano na płytkach Petriego o średnicy 5 cm, do których wlewano mieszaninę agaru z surowicą odpornościową przeciwko wirusowi choroby Mareka lub wirusowi szczepionkowemu (HVT). Używano 0,7% agaru Nobel-Difco, rozpuszczonego w buforze fosforanowym z dodatkiem 8% NaCl; pH agaru wynosiło 7,2. Stosunek surowicy do agaru wynosił 1:5. Mieszaninę agaru z surowicą przechowywano przez okres 7 dni w temp 4°C. Odczyn RID przeprowadzano wkluwając końcówki pobranych piór do agaru, do połowy grubości jego warstwy. Odległość między końcówkami piór wynosiła około 1 cm. Następnie płytki nakrywano i umieszczano w komorze wilgotnej w temp. 37°C. Wynik odczytywano po 12 i 24 godz. inkubacji, przy oświetleniu bocznym. Wystąpienie wyraźnej strefy precypitacji (ryc. 1) w promieniu co najmniej 2 mm od brodawki pióra uznawano za wynik dodatni.



Ryc. 1. Występowanie antygeny wirusowego w brodawkach piór kurcząt zakażonych domięśniowo wirusem choroby Mareka

### Przebieg doświadczeń i wyniki

Do badań użyto 130 kurcząt, które podzielono na 5 następujących grup:

- grupa I — 30 ptaków zakażonych domięśniowo zjadliwym szczepem MDV,
- grupa II — 30 ptaków poddanych kontaktowemu zakażeniu przez umieszczenie ich w 5 dniu życia we

wspólnym pomieszczeniu z ptakami zakażonymi zjadliwym wirusem MD,

grupa III — 30 ptaków zaszczipionych „płynną” szczepionką p-ko chorobie Mareka, a następnie, w wieku 10 dni poddanych kontaktowemu zakażeniu zjadliwym wirusem MD przez umieszczenie ich razem z ptakami zakażonymi,

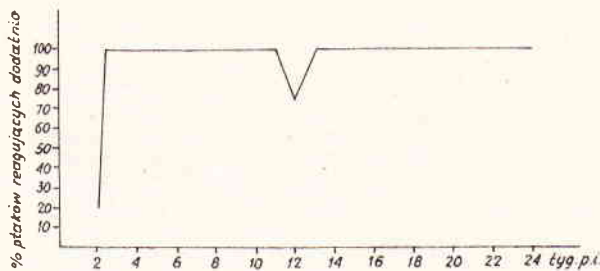
grupa IV — 30 ptaków zaszczipionych „płynną” szczepionką p-ko chorobie Mareka,

grupa V — kontrolna — 10 ptaków nie szczepionych i nie zakażonych.

Szczipienie i zakażenie ptaków przeprowadzono w 1 dniu życia, wprowadzając materiał domięśniowo, w dawce po 0,2 ml.

Pióra do odczynu RID pobierano początkowo co 4 dni, a po uzyskaniu pierwszych wyników dodatnich, w odstępach tygodniowych przez okres 6 miesięcy, kiedy doświadczenie zakończono. Reakcję RID każdorazowo przeprowadzano używając agaru zmieszanego z surowicą zawierającą przeciwciała przeciwko zjadliwemu wirusowi MD oraz agaru zmieszanego z surowicą swoistą anti-HVT.

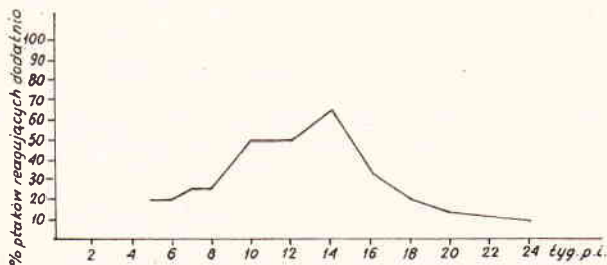
Obecność antygeny wirusa MD w brodawkach piór ptaków grupy I (ryc. 2) stwierdzono po raz pierwszy w 14 dniu po zakażeniu; w tym czasie zareagowało dodatnio 37% kurcząt. W 17 dniu p.i. już wszystkie badane ptaki reagowały dodatnio; reakcje te występowały u 100% ptaków aż do końca doświadczenia. Jedynie w 18 tyg. p.i. zanotowano obniżenie się procentu ptaków reagujących dodatnio do 75%.



Ryc. 2. Występowanie antygeny wirusowej w brodawkach piór kurcząt zakażonych kontaktowo wirusem choroby Mareka

Dodatnich wyników w odczynie RID z surowicą anti-HVT nie stwierdzono. Pierwsze upadki ptaków na skutek ostrej formy choroby Mareka wystąpiły w 29 dniu po zakażeniu. Do końca doświadczenia padło 68% ptaków.

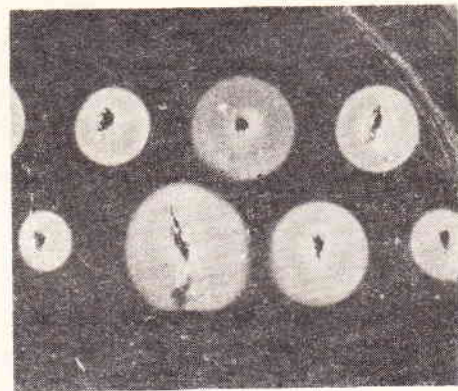
Obecność antygeny wirusa choroby Mareka w brodawkach piór grupy II (ryc. 3) stwierdzono



Ryc. 3. Występowanie antygeny wirusowej w brodawkach piór kurcząt zaszczipionych HVT, a następnie zakażonych kontaktowo wirusem choroby Mareka

no u 20% ptaków w 14 dniu po narażeniu ich na kontaktowe zakażenie. Następnie od 18 dnia aż do końca doświadczenia, dodatnie wyniki odczynu RID stwierdzano u 100% badanych ptaków. Wyjątek stanowiło badanie przeprowadzone w 12 tygodniu, kiedy dodatnie wyniki stwierdzono u 75% ptaków. Z surowicą anti — HVT dodatnich wyników w odczynie RID nie stwierdzono. W tej grupie kurcząt, w okresie trwania doświadczenia padło na skutek ostrej formy choroby Mareka 36% ptaków.

W grupie III — ptaków szczepionych, a następnie poddanych kontaktowemu zakażeniu zjadliwym szczepem wirusa choroby Mareka, po 5 tygodniach 20% kurcząt posiadało w brodawkach piór swoisty antygen wirusowy (ryc. 4). Liczba kurcząt dodatnio reagujących w odczynie immunodiffuzji z surowicą anti-MDV wzrastała do 14 tygodnia. W tym czasie u 62% ptaków stwierdzano dodatni odczyn RID. W następnych tygodniach odsetek ptaków dodatnio reagujących wyraźnie obniżył się. W 24 tyg. doświadczenia reagowało tylko 10% ptaków. W tej grupie doświadczalnej odczyn immunodiffuzji z surowicą zawierającą przeciwciała przeciwko szczepionkowemu wirusowi indyczemu (HVT) przez cały okres badania dawał wyniki ujemne. W ciągu 6 miesięcy padło w tej grupie na skutek ostrej formy choroby Mareka 20% ptaków.



Ryc. 4. Dodatni wynik odczynu immunodiffuzji radialnej — strefy precipitacyjne

Fot. M. Gembał

W grupie IV — kurcząt poddanych wyłącznie szczepieniu w 4 tyg. życia w brodawkach piór 2 ptaków stwierdzono obecność antygeny wirusowej MDV. Reakcja ta utrzymywała się u nich do 14 tyg. życia, kiedy obydwaj ptaki padły. Na sekcji stwierdzono zmiany charakterystyczne dla choroby Mareka. U pozostałych ptaków tej grupy w całym okresie trwania doświadczenia nie stwierdzono dodatnich reakcji w odczynie RID w układzie heterologicznym (z surowicą anti-MDV). Odczyn RID przeprowadzony w układzie homologicznym (z surowicą anti-HVT) przez cały czas dawał również wyniki ujemne.

W grupie V kontrolnej, obejmującej 10 nie uodpornionych i nie zakażonych kurcząt, u 8

z nich przez cały okres doświadczenia, zarówno w homo- jak i heterologicznym układzie odczynu RID, stwierdzono wyniki ujemne. Jedynie u 2 ptaków tej grupy notowano dodatni wynik odczynu RID w 5 tyg. życia. Obydwa ptaki padły w 14 tyg. życia, wykazując typowe dla choroby Mareka zmiany sekcyjne.

Dodatkowo przeprowadzono doświadczenie mając na celu określenie przydatności do odczynu RID piór pochodzących z ptaków padłych. Do badania użyto 5 kurcząt pochodzących z II grupy doświadczalnej (poddanych kontaktowemu zakażeniu MDV), padłych w 10 tygodniu życia. Kurczęta te od 17 dnia po połączeniu ich z ptakami zakażonymi wykazały dodatnie reakcje w odczynie RID.

Padłe ptaki przez pierwsze 36 tyg. trzymane w temperaturze pokojowej, a następnie w chłodni (+4°C). Pióra od nich pobierano po 12, 32, 100, 124, 150, 174 godzinach od chwili padnięcia. We wszystkich próbach i u wszystkich ptaków w odczynie RID z surowicą anty-MDV wystąpiły wyniki dodatnie. Natomiast z surowicą anty-HVT uzyskano wyniki ujemne.

#### Omówienie wyników

W przeprowadzonych badaniach własnych potwierdzono przydatność odczynu immunodiffuzji (RID) do wykrywania u zakażonych wirusem choroby Mareka ptaków, swoistego antygeny zlokalizowanego w brodawkach piór. W grupie ptaków zakażonych, czy to domięśniowo czy kontaktowo wirusem MD, swoisty antygen w brodawkach wykrywano już w 14 dniu po zakażeniu (odpowiednio u 37% i 20% ptaków). W 3 tygodnie po zakażeniu stwierdzano go już u 100% ptaków i utrzymywał się u nich przez cały okres trwania doświadczenia, tzn. 6 miesięcy. Marquardt (8) badając obecność antygeny wirusa MD w brodawkach piór po raz pierwszy stwierdził jego obecność w 3 tygodnie po zakażeniu u 14 na 15 badanych kurcząt.

W badaniach własnych najwcześniejsze pojawienie się stref precypitacji stwierdzono po 4 godzinach przetrzymywania próby w temp. 37°C. Optymalny czas odczytywania wyniku reakcji przypadał na 12 godz. po nastawieniu. Liczba dodatnich reakcji nie zwiększała się po 24—72 godz. inkubacji. Również Marquardt (8) uważa czas między 12 a 18 godz. za optymalny do odczytywania reakcji.

Wykazane w badaniach własnych utrzymywanie się antygeny wirusowego w brodawkach piór przez co najmniej 6 miesięcy wydaje się wskazywać na dość długi okres, w którym opisana próba mogłaby być stosowana. W dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono dokładnych danych określających czas utrzymywania się i możliwości wykrywania antygeny wirusowego w brodawkach piór, jednakże wiadomo (7, 8), że zakażenie wirusem choroby Mareka utrzymuje się u większości kur w stadzie

przez cały okres produkcyjny i być może przez ten cały czas antygen wirusowy jest obecny w piórach.

Najcenniejszą zaletą odczynu immunodiffuzji radialnej w żelu agarowym jest jej swoistość. Próba ta pozwala bowiem na wykrywanie wyłącznie antygeny wirusa choroby Mareka, a nie antygeny wirusa szczepionkowego. W przeprowadzonych badaniach ani razu nie stwierdzono dodatniego odczynu RID z surowicą anty-HVT bez względu na to, czy użyte do odczynu pióra pochodziły z ptaków szczepionych, czy też nie. Stanowi to jeszcze jedno potwierdzenie, że indycy wirus *Herpes* u kur nie replikuje się w komórkach nabłonka brodawek piór, jak to stwierdzili również inni autorzy (5, 9). Wyniki uzyskane w przebiegu doświadczenia wykazały, że u kurcząt szczepionych, a następnie narażonych na kontaktowe zakażenie zjadliwym wirusem MD, nie u wszystkich ptaków dochodziło do namnożenia zjadliwego wirusa. Antygen wirusowy MD w brodawkach piór stwierdzono dopiero w 5 tyg. i to tylko u 20% ptaków. Pod koniec doświadczenia procent dodatnio reagujących ptaków nie przewyższał 10%. W grupie IV, ptaków tylko zaszczepionych oraz w grupie kontrolnej — nie szczepionych i nie zakażonych, po 2 ptaki zareagowały dodatnio w odczynie RID i padły ze zmianami charakterystycznymi dla MD.

Wprawdzie ptaki te trzymane w oddzielnych pomieszczeniach, jednakże, mając na uwadze znaną — dużą rozsiewalność wirusa choroby Mareka (1, 6, 10) należy przypuszczać, że izolacja ptaków tych grup była niewystarczająca i doszło do ich zakażenia. Wydaje się to być dalszym potwierdzeniem przydatności metody RID, ponieważ u wszystkich 4 ptaków zakażenie, które początkowo udało się wykazać tą metodą, zostało potem potwierdzone w badaniu sekcyjnym.

Jak wykazano w badaniach własnych swoisty antygen wirusa choroby Mareka wykryć można z łatwością nie tylko w piórach ptaków żywych, ale i padłych, gdzie utrzymywał się on przynajmniej przez 7 dni od padnięcia ptaka.

Reasumując odczyn immunodiffuzji radialnej z końcówkami piór należy ocenić jako próbę łatwą do wykonania, tanią i swoistą. W odróżnieniu od innych metod wykrywających przeciwciała, odczyn ten polegający na stwierdzeniu swoistego antygeny wirusowego pozwala nam na ujawnienie zakażenia terenowym wirusem MD również u ptaków zaszczepionych szczepionką sporządzoną z indyczego szczepu wirusa *Harpes*.

#### Piśmiennictwo

1. Biggs P. M.: *World's Poultry Sci. J.* 29, 227, 1973.
2. Cakala A., Samorek-Dziewkanowska E.: *Pol. Arch. wet.* (w druku).
3. Calnek B. W., Hitchner S. B.: *J. Nat. Cancer Inst.* 43, 935, 1969.
4. Calnek B. W., Aldinger H. K., Kahn D. E.: *Avian Dis.* 14, 219, 1970.

5. Casnocha E., Salaj J.: Veterinarni Med. 18, 491, 1973.
6. Eidson C. S., Fletcher O. J., Kleven S. H., Anderson D. P.: J. Nat. Cancer Inst. 45, 113, 1971.
7. Halder S. A., Lapen R. F., Kenzy G.: Poult. Sci. 49, 1654, 1970.
8. Marquardt W. W.: Appl. Microbiol. 23, 942, 1972.
9. Nazerian K., Witter R. L.: J. Virol. 5, 338, 1970.
10. Witter R. L.: World's Poultry Sci. J. 14, 255, 1970.

Adres autora: lek. wet. Piotr Gażdźński, ul. 20-lecia PRL 6 m 1, 24-100 Puławy.

Гаждзиньски П., Цонкала А. — Применение реакции радиальной иммунодиффузии для обнаружения заражения вирусом болезни Марэка у кур.

Исследовали пригодность реакции радиальной иммунодиффузии (РРИ) для обнаруживания специфического антигена локализованного в сосочках перьев цыплят зараженных вирусом болезни Марэка (MD). В группах чувствительных птиц зараженных внутримышечно или путем контакта положительные реакции с сывороткой анти — MD появились в 2 недели после заражения, а в 3 недели реагировали уже все птицы. Положительные реакции сохранялись до конца исследований (6 месяцев). У птиц вакцинированных индеечным штаммом вируса Herpes (HVT), а потом зараженных путем контакта положительные реакции выступили на 5 неделе после заражения только у части птиц. В группах чувствительных или вакцинированных птиц, которые не подверглись инфекции вирусом

MD положительных результатов не установили. Реакция радиальной иммунодиффузии с сывороткой против индеечного штамма вируса Herpes (HVT) во всех группах птиц была отрицательная. У птиц павших вследствие болезни Марэка положительный результат РРИ удерживался меньше всего 7 дней после смерти.

Gażdźński P., Cakała A. — Radial immunodiffusion test for the detection of Marek's disease virus in hens.

The usefulness of RID test to detect specific antigen situated in feather sacks of chickens infected with Marek's disease virus (MDV) was evaluated. In groups of sensitive antiserum against i.m. or by contact positive reactions with antiserum against MDV appeared after 2 weeks since infection. After 3 weeks all chickens gave positive reactions. These positive results were observed to the end of the experiment, i.e. up to 6 months. In poultry vaccinated with turkey strain of Herpesvirus (HVT) and then infected by contacts positive tests were noticed in the 5th week p.i. only in some chicks. In the group of chickens sensitive or vaccinated, which were resistant to MDV infection, positive reactions were not found. RID test in the presence of HVT antiserum was always negative. In dead chicks due to Marek's disease positive results were being stated by the use of RID at least for 7 days since death.

STEFAN FURMAGA, JERZY LECH GUNDLACH, JÓZEF PATYRA

## Skuteczność Fenbendazolu (Panacur - Hoechst) i Cambendazolu (MSD) przeciw nicieniom przewodu pokarmowego koni

Z Zakładu Parazytologii i Chorób Inwazyjnych  
Wydziału Weterynaryjnego AR w Lublinie

Z Wytwórni Surowic i Szczepionek w Lublinie

Wyniki krajowych badań faunistycznych wskazują, że ekstensywność inwazji nicieni jelitowych u koni jest wysoka i sięga do 94%, przy równoczesnej bardzo znacznej intensywności (15). Inwazje te, wywoływane głównie przez *Parascaris equorum*, *Oxyuris equi*, *Strongylus sp.* i przedstawicieli *Trichoneminae*, stanowią ważny problem zarówno dla hodowców indywidualnych, jak i dla hodowli stadnej tych zwierząt. Nie są one wprawdzie przyczyną masowych upadków śmiertelnych, niemniej jednak powodują znaczne straty gospodarcze, wynikające z zahamowania rozwoju, zmniejszenia wykorzystywania paszy i wydajności użytkowej zwierząt.

Dotychczas do zwalczania nematodów u koni stosowano wiele różnorodnych leków, przede wszystkim fenotiazynę, sole piperazyny, a ostatnio Tiabendazol, Pyrequan, Equigard (10, 14). Spośród wymienionych preparatów, do powszechnego użytku wprowadzono u nas Hippo-*verm*-Polfa, którego substancją czynną jest tiabendazol, wykazujący zadowalającą skuteczność w zwalczaniu słupekowców i owsików, a przy zwiększonej dawce, również i glistnicy u koni (7).

Prowadzone w ostatnich latach intensywne badania nad nowymi antyhelmintykami, uwieńczone zostały powodzeniem, do jakich należy zaliczyć syntezę karbaminianów benzimidazolu, charakteryzujących się bardzo wysoką tolerancją przez organizmy zwierzęce i jednocześnie wyjątkowo dobrą skutecznością przeciwko różnym gatunkom nicieni.

Jednym z nich jest Fenbendazol (HOE 881, Panacur) firmy Hoechst, antyhelmintyk, który w dotychczasowych krajowych badaniach okazał się wysoce skuteczny przeciwko robaczycom żołądkowo-jelitowym oraz diktiokaulozie u przeżuwaczy, jak również robaczycom u świń (3, 11).

Fenbendazol, jest to bezbarwny proszek, rozpuszczalny jedynie w dwumetylosulfotlenku, o wzorze sumarycznym  $C_{15}H_{13}N_3O_2S$ , będący karbaminianem metyl 5-/fenyl-tio/-2-benzimidazolu (c. cz. 299,2) (1). Lek ten, w postaci handlowej, pod nazwą Panacur, przeznaczony dla koni, stanowi wodną zawiesinę lub granulację. Panacur 10% jest wodną zawiesiną (1 ml zawiera 100 mg substancji czynnej), przeznaczoną do indywidualnego podawania *per os* w dawce 3 ml na każde 40 kg c.c., tj. 7,5 mg substancji