

STEFAN SAMÓL

Wartość odczynu immunofluorescencji w laboratoryjnej diagnostyce klasycznego pomoru świń

Zakład Higieny Weterynaryjnej w Warszawie
Kierownik: dr S. SAMÓL

Szybka i wiążąca diagnostyka laboratoryjna w rozpoznawaniu pomoru świń nabiera coraz większego znaczenia. Wpływa to z występowania coraz liczniejszych ognisk pomoru o nietypowym przebiegu i wylaniającymi się stąd trudnościami w ustaleniu diagnozy na podstawie objawów klinicznych i zmian anatomo-patologicznych. Wprowadzony u nas w 1953 r. obowiązek przesyłania prób do badań laboratoryjnych w przypadku podejrzenia pomoru nie miał większego znaczenia praktycznego, ponieważ Zakłady Higieny Weterynaryjnej nie przeprowadzały badań wirusologicznych, a ograniczały się z reguły do badań bakteriologicznych. Zmiany anatomo-patologiczne natomiast terenowy lekarz weterynarii może na świeżym materiale określić dokładniej aniżeli jest to możliwe w laboratorium na podstawie nadesłanych prób. Terenowa służba weterynaryjna była przeto pozbawiona pomocy laboratorium w wykrywaniu pomoru świń o latentnym względnie nietypowym przebiegu. Unowocześnie diagnostyki laboratoryjnej, jak to starano się wykazać już uprzednio (15), wydaje się zatem jednym z podstawowych warunków skutecznego zwalczania pomoru świń.

Prace Salarzano i wsp. (14), Meylinga i wsp. (11), Kubin'a i wsp. (6) wskazują na stosowanie przeciwciał znakowanych fluorochromami do wykrycia antygeny pomoru świń w materiale biologicznym — jako metodę z wyboru. Metoda ta zdaje się mieć pewną przewagę nad pozostałymi w tym również metodą wiązania dopełniacza (4, 5) jak i immunodyszufuzji w żelu agarowym (19). Odczyn wiązania dopełniacza i immunodyszufuzji w żelu nie wymaga takiego wyposażenia jak immunofluorescencja, metody te są jednak mniej czułe. Zastosowania praktycznego nie znalazł dotychczas cały szereg innych metod laboratoryjnego rozpoznawania pomoru świń, za wyjątkiem histologicznego badania mózgu i testu leukocytnego, które to badania mają jedynie orientacyjne znaczenie. W piśmiennictwie krajowym brak jest do tej chwili doniesień dotyczących zastosowania immunofluorescencji w rozpoznawaniu pomoru świń.

Celem niniejszej pracy było zatem stwierdzenie, w naszych warunkach, możliwości praktycznego stosowania metody przeciwciał fluorescencyjnych w diagnostyce rutynowej klasycznego pomoru świń w materiale bezpośrednim z uwzględnieniem różnych technik i możliwości diagnostyki przyżyciowej.

Materiał i metody

Materiał ze zwierząt zakażonych sztucznie).*

Użyto narządów i tkanek od 8 świń o wadze 40—60 kg (6 sztuk) i 24—25 kg (2 sztuki), zakażonych szczepem „W” wirusa pomoru świń w dawce 1 ml na sztukę. Świnie poddawane były ubojowi na 5—6 dzień po zakażeniu, w stanie przedagonalnym.

Zmiany anatomo-patologiczne były typowe dla ostrej formy pomoru. Bezpośrednio po uboju pobrano kawałki śledziony, trzustki, nerki, płuc, migdałków, śliniankę, przyusznice wraz z węzłem chłonny i węzły chłonne krezkowe. Materiał przechowywano w temp. -20°C i używano do doświadczeń w okresie do 4 miesięcy. Krew w ilości 20 ml pobrano od 6 świń w czasie uboju dokonanego na 5 i 6 dzień po zakażeniu, a od 2 sztuk przed zakażeniem oraz na 2, 3, 4, 5 i 6 dzień po zakażeniu.

Powyższy materiał służył do początkowych badań jako dodatni. Materiał ujemny pobrano od 6 świń niewykazujących żadnych objawów klinicznych ani zmian anatomo-patologicznych.

Materiał terenowy

Materiał ze 155 podejrzanych o zakażenie naturalne zwierząt przysyłany do tutejszego Zakładu, badano bezzwłocznie względnie po przetrzymaniu 12—24 godzin w temp. 4°C . Sporządzono preparaty odciskowe najczęściej ze śledziony, węzłów chłonnych i nerek. W nielicznych przypadkach użyto do badań zeszkrobiny z błony śluzowej pęcherza moczowego, żołądka i górnego odcinka tchawicy.

Odczynniki:

- 1) surowica świń hyperimmunizowanych, znakowana izotocyjanianem fluoresceiny (FITC) z Central Veterinary Laboratory — Weybridge, Anglia,
- 2) dito — Tierärztliche Hochschule Hannover, NRF,
- 3) surowica p. pomorowa prod. Biowet Puławy seria 41266.

Surowice znakowane (konjugaty) przechowywano w temp. -20°C , a rozcieńczone do odpowiedniego stężenia przechowywano w temp. 4°C do zużycia w przeciągu kilkunastu dni.

Przygotowanie preparatów

Na cienkie szkiełka podstawowe ze szkła nie dającego własnej fluorescencji, dokładnie odtłuszczone, nakładano skrawki kriostatowe (najlepiej 5—6 μ grubości) badanego materiału, względnie sporządzano preparaty odciskowe. W tym ostatnim przypadku do miejsca świeżo przeciętej (skalpelem, żyłką) tkanki przyciskano lekko podgrzane nad płomieniem szkiełko podstawowe. Preparaty (zarówno kriostatowe jak i odciskowe) w kolejności: suszono na powietrzu, (pod wiatraczkiem) utrwalono w acetonie w -20°C przez 10 do 15 min., suszono na powietrzu, pokrywano kroplą konjugatu, pozostawiano w komorze wilgotnej przez 30 min. w temp. 37°C . (barwienie), zlewano resztę konjugatu, płukano 2×5 min. w roztworze fizjologicznym NaCl o pH 7,6 (0,01 M PO_4) i w końcu zanurzano w wodzie destylowanej. Na wysuszone

* Materiał użyty do badań od sztuk zakażonych wirusem pomoru pochodził częściowo z Zakładu Technologiczno-Badawczego Przemysłu Bioweterynaryjnego w Puławach. Za udostępnienie tego materiału składam serdeczne podziękowanie Kierownikowi Zakładu dr Stanisławowi Majdanowi i Jego Współpracownikom.

w temp. pokojowej preparaty nakładano szkiełko nakrywkowe po uprzednim nakropieniu gliceryny buforowanej o pH 7,6 (0,1 M PO₄).

Preparaty z krwi sporządzano wg metody opisanej przez Mihajłowic'a (12). Krew odwiłkowaną w ilości 10 ml od sztuki odwirowywano; warstwę białych ciałek zdejmowano pipetą do 9 ml wody destylowanej. Mieszano kilka minut, a następnie dodawano 1 ml 9,5% roztworu NaCl. Po odwirowaniu osad białych ciałek krwi rozmazywano na szkiełku. Suszenie i barwienie jak wyżej. Badania kontrolne oparto o równoległe badania materiałów od sztuk zdrowych, głównie jednak na „wygaszaniu” świeceń przy użyciu niezakowanej surowicy odpornościowej p. pomorowi świń. Utrwalone i wysuszone preparaty j.w. — traktowano przed barwieniem dodatkowo surowicą odpornościową niezakowaną w komorze wilgotnej przez 30 min. w temp. 37°C.

Ocena preparatów

Preparaty oceniano w mikroskopie Nf C. Zeiss (monokular) z przystawką HBO-50 produkcji NRD. W układzie C. Zeiss HBO-50 używano kuwety z 5% roztworem wodnym CuSO₄; filtr pobudzający UG, 1,5 ochronny G1/GG. Mikroskop wyposażono w kondensator Apl. 1,4. Układ optyczny 40×5.

Ocena wyników

Preparaty z materiału ze zwierząt sztucznie zakażonych oceniano:

- +++ — cały obiekt świecący, wyraźne błyszczenie,
- ++ — obiekt znaczny — wyraźne błyszczenie,
- +
- ± — obiekt widzialny bez błyszczenia,
- ± — obiekt zaledwie widzialny.

W przypadku oceny wyników z materiału terenowego uwzględniono trzy ewentualności: dodatni, ujemny i wątpliwy, a w sposobie odczytu nie brano pod uwagę błyszczenia.

Wyniki

Zakażenie doświadczalne. Do badań wstępnych użyto materiał pochodzący od świń zakażonych zjadliwym szczepem „W” wirusa pomoru świń. Zwierzęta poddawane były uboju w stadium przedagonalnym na 5—6 dzień po zakażeniu. Przebieg choroby oraz zmiany anatomo-patologiczne typowe dla ostrej postaci pomoru świń. Wyniki badań zestawiono w tabl. 1.

Tab. 1. Wyniki badań immunofluorescencyjnych techniką kriostatową i preparatów odciskowych materiału ze świń zakażonych szczepem „W” wirusa pomoru i sztuk kontrolnych.

Grupa	Nr świni	Preparaty kriostatowe					Preparaty odciskowe						
		śledziona	węzły chł.	migdałek	przyusz-nica	trzustka	nerka	śledziona	węzły chł.	migdałek	przyusz-nica	trzustka	nerka
doświadczalna	1	##	##	##	##	##	+	##	##	##	+	##	+
	2	##	##	##	##	##	+	##	##	##	+	##	+
	3	-	##	##	##	##	+	-	##	##	##	##	##
	4	##	##	##	##	##	+	##	##	##	##	##	##
	5	-	-	##	##	##	+	-	##	##	##	##	##
	6	##	##	##	##	##	+	##	##	##	##	##	##
	7	##	##	##	##	##	+	##	##	##	##	##	##
	8	##	##	##	##	##	+	##	##	##	##	##	##
kontrolna	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Komórki zakażone wykazywały intensywne świecenia cytoplazmy przy czym jądra pozostają nie zabarwione. Świecenie specyficzne jest koloru czystej zieleni (trawy) z natężeniem intensywności błyszczenia („halo”) wokół jądra. Komórki niezakażone są koloru szarozółtego. Liczba zakażonych komórek (zasięg świecenia) jest różna zależnie od badanego materiału. W preparatach ze śledziony i węzłów chłonnych obserwuje się najczęściej świecenia w całym skrawku względnie odcisku — rzadziej w grupie komórek.

Diagnozę w tych narządach często utrudnia intensywna żółtawa, granulowana fluorescencja komórek leukocytopodobnych i czerwona — czerwonych ciałek krwi. W migdałkach świeci najczęściej nabłonek wyściełający jamki mieszkowe, lecz występuje również fluorescencja komórek limfoidalnych wraz z ośrodkami rozmnażania. Dobrą reakcją barwną wykazują zakażone komórki gruczołów ślinowych. Wartość diagnostyczna trzustki limitowana jest stosunkowo szybką autolizą (2—3 godz. temp. pokojowa) co prowadzić może do niespecyficznych reakcji i mylnej oceny: w stanie świeżym wykazuje doskonale świecenia grup komórek a nawet całego skrawka. Specyficzna reakcja w komórkach białych ciałek krwi występuje już w dwa dni po zakażeniu przy czym dotyczy ona w tym okresie największej liczby komórek (ponad 50%). Z upływem czasu liczba zakażonych leukocytów zmniejsza się. W dniu uboju u wszystkich sztuk stwierdzono jednak leukocyty ze specyficznie zieloną zabarwioną plazmą i niewybarwionymi jądrami. Zarówno w krwi sztuk zakażonych jak i kontrolnych spotykano białe ciała w których plazmie występowała silna fluorescencja koloru żółtawego w postaci drobnych ziarenek, której nasilenie zmniejsza się względnie całkowicie ustępuje z chwilą wystąpienia specyficznej reakcji. Takie samo świecenie spotykano w około 10% przypadków w preparatach ze śledziony i węzłów chłonnych.

Technika skrawkowa posiada znaczną przewagę nad odciskową i rozmazami. Ocena preparatu skrawkowego jest dokładniejsza i łatwiejsza. Preparaty skrawkowe ponadto nie ulegają spłukaniu jak to niejednokrotnie ma miejsce z preparatami odciskowymi. Preparaty odciskowe ze względu na konsystencję tkanki najłatwiej sporządza się ze śledziony i węzłów chłonnych — najtrudniej z gruczołów ślinowych.

Najbardziej nadającą się do badań tkanką, dającą najlepiej widoczne i zgodne wyniki jest migdałek oraz świeża trzustka. Dobre rezultaty uzyskuje się w kolejności z nerki, węzłów chłonnych, śledziony i gruczołów ślinowych.

Materiał terenowy. Badania immunofluorescencyjne w celu wykrycia obecności wirusa pomoru świń przeprowadzono na materiale pochodzącym łącznie od 155 sztuk. Żądany kie-

runek badań w 128 przypadkach — pomór świń, w 19 — badanie bakteriologiczne, w 6 — choroby zaraźliwe i zatrucie w 2 przypadkach. Wyniki badań anatomo-patologicznych, immunofluorescencyjnych i bakteriologicznych zestawiono w tab. 2. Na 41 przypadków gdzie

Tab. 2. Wyniki badań anatomo-patologicznych, immunofluorescencyjnych i bakteriologicznych materiału biologicznego ze świń podejrzanych o pomór.

skierowano do badań	zmiany anat.-pat. %				badanie immunofluorescencyjne			bakteriologicznie stwierdzono				
	liczb.	+	±	-	+	±	-	rodzaje świń	pasz. moist.	salmo. netta	E. coli hem.	E. coli. niehem.
pomór świń	128	38	66	24	97	4	27	+	3	-	9	5
choroby zaraźliwe	6	3	3	-	4	-	2	2	-	-	-	1
badania bakteriologiczne	19	-	15	4	8	-	11	2	+	+	4	2
zatrucia	2	-	2	-	2	-	-	-	-	-	-	1

+/+ zmiany typowe dla pomoru, co najmniej w trzech narządach
 ± zmiany nadsyłające objawy pomoru w jednym lub dwóch narządach
 - brak zmian wskazujących na pomór

zmiany anat.-pat. były znamienne dla pomoru, antygen pomoru świń wykazano w 40 przypadkach a w jednym uzyskano wynik wątpliwy. W materiale od 86 świń w którym nie stwierdzono zmian typowych dla pomoru — w 52 przypadkach otrzymano wynik dodatni w jednym wątpliwy, a w 33 ujemny. W 28 przypadkach gdzie nie stwierdzono zmian anat.-pat. przemawiających za pomorem — w 19 otrzymano wynik dodatni, w 2 wątpliwy a w 7 ujemny. Badania tych ostatnich przeprowadzono na życzenie lekarzy wet. kierujących materiałem głównie od sztuk pochodzących z uboju diagnostycznego a także padłych po szczepieniu szczepionką lapinizowaną i CVV.

Nadsyłany materiał nie zawsze był dostatecznie świeży a niekiedy brak było pożądanego do badania narządów. Wynik określano jako ujemny jeżeli co najmniej w trzech preparatach z różnych narządów danego zwierzęcia nie wykazano antygeny pomoru świń. Tabela 3 przedstawia częstotliwość wyników do-

Tab. 3. Częstotliwość wyników dodatnich z poszczególnych narządów pochodzących od 111 świń uznanych za zakażone pomorem.

tkanka	badano immunofluorescencyjnie			
	łącznie	z wynikiem		
		+	±	-
nerka	107	65	2	40
śledziona	101	92	1	8
węzły chł.	62	56	3	3
migdałek	12	11	1	-
przyusznica	3	1	1	1
ptuca	2	1	1	-

datnich w poszczególnych narządach od 111 świń uznanych za zakażone pomorem świń. Wynika z niej, uwzględniając rodzaj nadsyłanych i badanych tkanek, że antygen pomoru daje się wykazać najczęściej w migdałku, a następnie w kolejności w węzłach chłonnych, śledzionie i nerce. Również w przypadku materiału terenowego najbardziej pewne wyniki otrzymywano z migdałka. Ocena preparatów z

nerki jest również dokładna, lecz w przypadku nerki specyficzna reakcja występuje dopiero po dłuższej chorobie.

Próbne badania rozmazów z powierzchniowej warstwy błony śluzowej pęcherza moczowego, żołądka i tchawicy pozwalają wnioskować, że świeżego materiału z tych narządów można użyć do badań immunofluorescencyjnych.

Dyskusja

W przeprowadzonych badaniach zastosowano technikę kriostatową, preparatów odciskowych i mazanych dla wykazania odczynem immunofluorescencji antygeny pomoru świń w materiale bezpośrednim ze świń zakażonych doświadczalnie zjadliwym wirusem pomoru, względnie podejrzanych o pomór. Technika skrawków mrożonych pozwala na zachowanie struktury histologicznej badanej tkanki co znacznie ułatwia ocenę wyniku. W przypadku materiału świeżego ze zwierząt zakażonych doświadczalnie ocena jest jednoznaczna. Otrzymane wyniki pokrywają się z wynikami Stair'a i wsp. (17), Mengeling'a i wsp. (9, 10), Aiken'a i wsp. (1, 2), Maess'a i Liss'a (7), Kubin'a i Kölbl'a (6). Technika preparatów odciskowych nie wymaga urządzeń do sporządzania skrawków, jednak wykonywanie preparatów zwłaszcza z niektórych gruczołów jest uciążliwe. Preparaty mazane z zeszkobin błon śluzowych (13) mogą być przydatne w badaniach poznawczych, nie wydaje się jednak, aby znalazły szersze zastosowanie w rutynowej diagnostyce za wyjątkiem rozmazów z krwi. U zwierząt doświadczalnych obecność wirusa pomoru może być wykazana już w 48 godzin po zakażeniu domięśniowym w białych ciałkach krwi. Fakt ten jak się wydaje, będzie można wykorzystać w diagnostyce przyżyciowej we wczesnym stadium choroby. Przydatność migdałków w rutynowej diagnostyce pomoru świń w świetle otrzymanych wyników i doniesień cyt. już autorów, zdaje się nie budzić wątpliwości. Migdałek jest również tym gruczołem który może być eksterpowany przyżyciowo co pozwala na zaniechanie ubojów diagnostycznych. W przeprowadzonych badaniach w kilku przypadkach wykazano obecność wirusa w materiale pochodzącym od świń padłych po szczepieniach szczepionką lapinizowaną. Z doświadczeń Aiken'a i wsp. (3), Treebhen'a i wsp. (18), Sirbu i wsp. (16) wynika, że metodą immunofluorescencyjną nie można praktycznie biorąc odróżnić szczepów wirusa zjadliwego od lapinizowanego względnie inaktywowanego. Wszelkie szczepienia czynne przy użyciu wirusa pomoru świń utrudniają przeto diagnozę pomoru. Z drugiej jednak strony odczyn immunofluorescencji, w przypadku pomoru świń, jest reakcją wysoce specyficzną. Związki antygenowe wirusa pomoru świń z innymi wirusami za wyjątkiem wirusa biegunki bydła nie zostały ujawnione (8).

Z powyższego wynika, że odczyn immunofluorescencji jest próbą wysoce specyficzną. Reakcja dodatnia poszczególnych narządów nie zawsze występuje jednocześnie, a jest uzależniona od miana, zjadliwości wirusa i czasu trwania choroby.

Piśmiennictwo

1. Aiken J. M., Hoopes K. H., Stair E. L.: Sc. Prac. Am. vet. med. Ass. 282, 1964.
2. Aiken J. M., Hoopes K. H., Stair E. L., Rhodes M. B.: J.A.V.M.A. 144, 1395, 1964.
3. Aiken J. M., Hoopes K. H., Rhodes M. B., Twiehaus M. J.: J.A.V.M.A. 150, 59, 1967.
4. Boulanger P.: Canad. J. comp. Med. 24, 262, 1960.
5. Boulanger P., Appel M., Bannister G. L., Ruckerbauer G. M., Mori K., Gray D. P.: Canad. J. comp. Med. 29, 201, 1965.
6. Kubin G., Kölbl O.: Wien. tierärztl. Mschr. 55, 578, 1968.
7. Maess J., Liess B.: Zb. Vet. Med. 13(B), 660, 1966.
8. Mengeling W. L., Pirtle E. C., Porrey J. P.: Can. J. Comp. Med. Vet. Sc. 27, 249, 1963.
9. Mengeling W. L., Torrey J. P.: Am. J. Vet. Res. 28, 1653, 1967.
10. Mengeling W. L.: Arch. gesamt. Virusforsch. 23, 27, 1958.
11. Meyling A., Scherning-Thiesen K.: Acta vet. scand. 9, 50, 1968.
12. Mihajlovic B., Jarmolenko G., Kuzmanovic M.: Zentbl. Bakt. Parasit. I Orig. 203, 300, 1963.
13. Ressang A. A., den Boer J. L.: Neth. J. vet. Sci. 1, 72, 1968.
14. Salarzano R. F., Thigpen J. E., Bedell D. M., Schwartz W. L.: J.A.V.M.A. 149, 31, 1966.
15. Samól S.: Pol. Arch. Wet. — w druku.
16. Sirbu Z., Bran L., Michailov L.: Arch. vet. 4 (Romania) 19, 1968.
17. Stair E. L., Rhodes M. B., Grace O. D., Aiken J. M.: Proc. U.S. Liverst. San. A. 67, 559, 1963.
18. Teebken L., Aiken J. M., Twiehaus M. J.: Amer. vet. med. Ass. 15, 53, 1967.
19. Wittman F., Schmir D., Bergmann H.: Arch. Exp. Vet. Med. 17, 1345, 1963.

Adres autora: dr Stefan Samól, Warszawa, ul. Lechicka 21.

Самуль С. — Ценность реакции иммунофлуоресценции в лабораторной диагностике классической чумы свиней.

Исследовали разные органы и ткани 8 свиней искусственно зараженных вирусом чумы свиней (штамм Вашингтон) методом иммунофлуоресценции (РИФ) и применением техники криостатовой, отпечатков а в случае крови также мазков. Исследовали также методом РИФ техникой отпечатков 155 случаев чумы выступающей в сельском хозяйстве. Установили высокую специфичность РИФ. Сомнительные результаты получали при низком титре вируса в исследуемом органе, при слабой вируленции возбудителя или при несвежем материале. Самыми ценными для РИФ были в практических условиях посредственно: миндалины, лимф-узлы, селезенка и почки. В прижизненной диагностике можно исследовать миндалины и, особенно в первом периоде болезни, кровь.

Samól S. — The value of immunofluorescence test in laboratory diagnosis of hog cholera.

The samples of various internal organs and tissues have been taken from 8 pigs artificially infected with the W hog cholera virus. They were investigated by means of direct immunofluorescence technique acc. to cryostatic method, impressed preparations and in the case of blood — smeared preparations. In addition, 155 field cases were also examined with the impressed technique. The results of the investigations of the material derived from artificially infected pigs were in agreement with the data from literature. The results of field examinations were highly specific too. Doubtful results were obtained in the case of low titre of the virus in examined organs, low virulence of the virus and when the examined material was not fresh. The most useful for immunofluorescence examinations, from practical point of view, were the following organs: tonsil, lymph nodes, spleen and kidney. For supravital examinations apart from tonsils — blood might be used — especially in the first period of the disease.

EDWARD NOLEWAJKA, ZOFIA KAPP, JAN SZURMAN, JERZY SZAFIARSKI

Próba fotodynamicznej inaktywacji atenuowanego szczepu wirusa choroby cieszyńskiej

Katedra i Zakład Mikrobiologii Śląskiej Akademii Medycznej w Katowicach
Kierownik: prof. dr J. SZAFIARSKI

Materiał i metody

Enterowirusy na ogół nie ulegają uczuleniu na światło widzialne pod wpływem barwników akrydynowych (1, 4, 8). W pewnych jednak, ściśle dobranych warunkach pH, temperatury i składu środowiska udaje się uczulić enterowirusy na działanie światła widzialnego w nadmiarze tych barwników (10, 11, 12).

Jeśli replikacja enterowirusów przebiega w komórkach utrzymywanych w płynie odżywczym zawierającym barwniki akrydynowe, uzyskuje się zbiór wirusa wrażliwego na promienie światła widzialnego (1, 5, 8).

Ostatnio bada się możliwości wykorzystania fotodynamicznej inaktywacji do produkcji zabitych szczepionek wirusowych o dobrych właściwościach immunogennych (14).

W przedstawianej pracy podjęto próbę fotodynamicznej inaktywacji atenuowanego szczepu wirusa choroby cieszyńskiej.

W badaniach używano linię ciągłą komórek nerki płodu świni — RES (3). Komórki RES hodowano na szkle w płynie odżywczym wzrostowym zawierającym płyn Hanksa z dodatkiem 0,5% hydrolizatu laktoalbuminy oraz 10% surowicy cielęcej. W płynie utrzymującym stężenie surowicy cielęcej obniżano do 2%.

Wirus choroby cieszyńskiej, szczep atenuowany przez Szurmana (9) otrzymano z Pracowni Instytutu Zootechniki w Grodźcu Śl. w 1964 r.

Mianowanie wirusa przeprowadzano w jednowarstwowych hodowlach komórek RES w butelkach o pojemność 125 ml. Po zlanii i odsączeniu płynu odżywczego na komórki nanoszono zawiesinę kolejnych rozcieńczeń wirusa choroby cieszyńskiej. Na jedną hodowlę nanoszono 0,2 ml wirusa.

Do każdego rozcieńczenia używano 2 butelek. Adsorbacja wirusa przebiegała w temperaturze pokojowej przez 60 min. Po tym czasie komórki pokrywano agar odżywczym w ilości 8 ml na butelkę. Po 72 godz. inkubacji w temp. 37°C na agar odżywczy wylewano agar barwiący w ilości 4 ml na butelkę i po dalszych