

HALINA MAJEWSKA, ZBIGNIEW BACZYŃSKI

Badania nad modyfikacją metod diagnostycznych zakażenia wirusem IBR/IPV

Z Pracowni Diagnostyki Wirusologicznej Instytutu Weterynarii w Puławach

Metoda seroneutralizacji (SN) stosowana rutynowo w diagnostyce wirusologicznej, w przypadku wirusa otrętu i zakaźnego zapalenia jamy nosowej i tchawicy bydła IBR/IPV, nie zawsze daje zadowalające wyniki. Poziom przeciwciał wykrywanych tą metodą jest niski a u wrażliwego bydła, naturalnie zakażonego wirusem IBR/IPV, często nie stwierdza się przeciwciał odpornościowych (4).

Doniesienia współczesnego piśmiennictwa wskazują na konieczność zwiększenia czułości odczynu SN (1, 2, 3, 5) oraz opracowania i adaptowania innych metod serologicznych, przydatnych do szybkiego rozpoznawania zakażeń wywołanych wirusem IBR/IPV (6, 8, 9, 10).

Celem pracy jest opracowanie różnych modyfikacji odczynu seroneutralizacji (SN) oraz adaptacji odczynu biernej hemaglutynacji (PHT) i immunofluorescencji pośredniej z wiązaniem dopełniacza (IF), do badań nad wykrywaniem przeciwciał dla wirusa IBR/IPV w surowicach zwierząt podejrzanych o zakażenie.

Materiał i metody

Do badań użyto wirusa IBR/IPV szczepu Oxford otrzymanego od dr Stuarta z Central Veterinary Laboratory Weybridge, o mianie infekcyjnym (TCID₅₀/10⁻⁶/0,1 ml).

Do odczynu seroneutralizacji (SN) i immunofluorescencji (IF) używano nieoczyszczonego wirusa IBR/IPV, namnożonego na komórkach nerki cieląt. Do odczynu biernej hemaglutynacji (PHT) użyto wirusa oczyszczonego i zagęszczonego na ultrawirówce MSE 60. Płyn z zakażonej hodowli nerki cielęcej wirowano wstępnie przy 1800 g przez 15 min., osad odrzucano a supernatant wirowano przy 60 000 g przez 90 min. Uzyskany w minimalnej ilości osad zawieszano w PBS o pH 7,2 w 1/10 początkowej objętości, następnie rozlewano w małych ilościach do ampulek. Materiał ten, przeltrzymywany w temp. -20°, stanowił antygen do biernej hemaglutynacji (PHT).

Surowice odpornościowe dla wirusa IBR/IPV przygotowywano na królikach, którym podawano dożylnie, w odstępach 4-dniowych, 8 wzrastających dawek (od 0,5—2 ml) oczyszczonego wirusa. Pierwszą dawkę podano podskórnie z pełnym adiuwantem Freund'a. Króliki skrwawiano po 7 dniach od ostatniego uodpornienia.

Surowice precipitacyjne anty-dopełniaczowi świnki morskiej, używane do odczynu immunofluorescencji (IF), produkowano wg metody Kleina i Burkholdera (7). Królikom podawano w odstępach tygodniowych, gamma-globulinę świnki morskiej wraz z adiuwantem Freund'a, w ilości 4 mg białka/królika. Króliki skrwawiono po 7 dniach od ostatniego szczepienia.

Odczyn seroneutralizacji (SN) wykonano stosując 2-krotne rozcieńczenia surowicy badanej (od 1:2—1:1024) w objętości 0,5 ml oraz różne stałe dawki

wirusa: 10, 100, 1000 TCID₅₀. Ponadto stosowano modyfikację odczynu SN, polegającą na dodaniu do mieszaniny wirusa i surowicy 5% dopełniacza świnki morskiej (5). Do rozcieńczonej surowicy dodawano w równej objętości wirus, wstrząsano przez 3 min. i inkubowano w temp. 37° przez 90 min. Po tym okresie inkubacji mieszaninę wirusa i surowicy zakażono 6 probówek hodowli komórek nerki cielęcej, w ilości po 0,2 ml. Miano seroneutralizacji surowic obliczano metodą Reeda i Muencha.

Mianowanie surowic w pośrednim odczynie immunofluorescencji (IF) za pomocą układu dopełniacz — antydopełniacz wykonywano na szkiełkach podstawowych z wgłębieniami, na których robiono rozmazy antygenu w trzech różnych rozcieńczeniach, zawierających: 10, 100 i 1000 TCID₅₀. Szkiełka z rozmazem utrwalano w płomieniu. Na wysuszony rozmaz nakładano kolejno 2-krotne rozcieńczenia surowicy badanej (uprzednio inaktywowanej w 56° przez 30 min.), zmieszanej w równej objętości z dopełniaczem, rozcieńczonym w PBS (pH 7,2) w stosunku 1:10. Mieszaninę z antygenem inkubowano w komorze wilgotnej przez 60 min. w temp. 37°. Po tym okresie czasu preparaty płukano w PBS i po wysuszeniu barwiono przez 30 min. w temp. 37° w komorze wilgotnej koniugatą (przeciwciała anty globulinie świnki morskiej, znakowane izotocyjanianem fluoresceiny). Preparaty ponownie płukano w PBS, suszono w temp. pokojowej i oglądano w mikroskopie fluorescencyjnym. Do wykonania obydwu odczynów użyto 2 grup surowic A i B pochodzących z różnego okresu ich produkcji.

Hemaglutynację bierną (PHT) wykonano wg metody Vengrisa i Maré (8), na płytkach z pleksiglasu o otworach pojemności 0,05 ml, (stosując mikro-metodę Takacy'ego), przy użyciu spiralnej pipety o pojemności 0,025 ml.

Krwinki do biernej hemaglutynacji przygotowywano według opracowanego schematu. 1. Krwinki barana pobierano do płynu Alsewera w stosunku 1:1, 3 razy przemywano w PBS (pH 7,2) i sporządzano z nich 10% zawiesinę. 2. Równe ilości 10% krwinek mieszano z 3% formaliną, następnie mieszaninę inkubowano w temp. 37° przez 20 godz. 3. Formalizowane krwinki przemywano 3 razy w PBS a następnie sporządzano ponownie 10% zawiesinę, którą mieszano w równej ilości z kwasem taninowym, rozcieńczonym w PBS w stosunku 1:20.000. Mieszaninę inkubowano w łaźni wodnej w temp. 37° przez 20 min. wstrząsając 4 razy. 4. Krwinki formalizowane i tanizowane (FTK) przemywano 2 razy w PBS i przechowywano w postaci 10% zawiesiny przez 1 miesiąc.

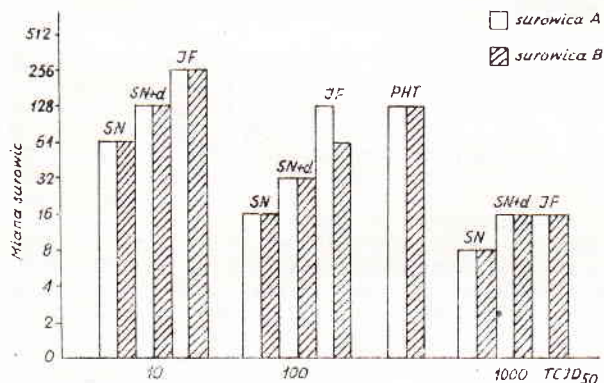
Do właściwej próby biernej hemaglutynacji (PHT) używano rozcieńczalnika w postaci normalnej surowicy królika, rozcieńczonej 1:100 w PBS. Surowice badane oraz surowicę normalną królika inaktywowano w temp. 56° przez 30 min., a następnie adsorbowano na FTK (1 ml surowicy + 1 ml 10% krwinek), przez 30 min. w łaźni wodnej w temp. 37°, w celu usunięcia niespecyficznych inhibitorów.

Adsorbację wirusa IBR/IPV na FTK wykonywano w łaźni wodnej w temp. 37° przez 60 min. W tym celu 3 ml oczyszczonego wirusa mieszano z 2 ml PBS (pH 6,4) i z 1 ml 10% FTK. Po tym czasie krwinki przemywano 2 razy w PBS (pH 7,2) i sporządzano 1% zawiesinę. Krwinki z wirusem przechowywano 48 godz. w temp. 4° (maksymalny okres użycia).

Na płytkach z pleksiglasu sporządzano spiralną pipetą 2-krotne rozcieńczenie badanej surowicy w objętości 0,025 ml. Do każdego rozcieńczenia dodawano 0,025 ml wirusa, adsorbowanego na krwinkach (FTKV). Mieszankę wstrząsano przez 2 min. i umieszczano na 18 godz. w temp. 4°. Jednocześnie nastawiano kontrolę krwinek w rozcieńczalniku i krwinek z wirusem (FTK) i (FTKV) oraz z surowicą normalną królika. Negatywny wynik, podobnie jak przy aglutynacji próbkowej, charakteryzował się występowaniem na dnie wgłębień małych, okrągłych guzików utworzonych z opadających krwinek, pozytywny zaś — uformowaniem drobnoziarnistej aglutynacji.

Wyniki i omówienie

Wyniki uzyskane z mianowania surowic odpornościowych A i B dla wirusa IBR/IPV, wykonanego metodą seroneutralizacji klasycznej (SN), oraz zmodyfikowanej z użyciem 5% dopełniacza świnki morskiej, jak również metodą immunofluorescencji pośredniej (IF), przy użyciu różnych dawek infekcyjnych wirusa i metodą biernej hemaglutynacji (PHT) przedstawia ryc. 1. Z wykresu tego wyraźnie widać, że w odczynie SN, SN + dopełniacz i IF uzyskano wyższe miana surowic odpornościowych, przy użyciu 10 dawek infekcyjnych wirusa aniżeli 100 lub 1000 dawek. Wartości mian surowic A i B w odczynie SN przy 10, 100, 1000 TCID₅₀ wirusa wynoszą odpowiednio: 64, 16, 8 i są 4-krotnie niższe przy 100 TCID₅₀, a 8-krotnie przy 1000 TCID₅₀, w porównaniu z wartością mian uzyskanych w doświadczeniu z 10 dawkami wirusa.



Ryc. 1.

W odczynie SN z dodatkiem 5% dopełniacza świnki morskiej, miana tych samych surowic przy różnych dawkach wirusa były 2-krotnie wyższe, gdyż w porównaniu z mianami uzyskanymi w odczynie SN bez dopełniacza wynosiły: 128, 32 i 16.

Podobne zjawisko obserwowano w odczynie IF. W miarę 10-krotnego wzrostu dawek infekcyjnych wirusa, wartości mian obniżały się odwrotnie proporcjonalnie w zależności do wielkości dawki. Przy 10 TCID₅₀ miana surowic A i B wynosiły 256, przy 100 TCID₅₀, 128 i 64, a przy 1000 TCID₅₀ 16. Wartości mian surowic

przy 100 dawkach infekcyjnych wirusa były 2-krotnie mniejsze dla surowicy A i 4-krotnie dla surowicy B, w porównaniu z wartościami mian uzyskanymi przy zastosowaniu 10 TCID₅₀ wirusa, oraz 16-krotnie niższe przy użyciu 1000 TCID₅₀ wirusa.

Wartości mian surowic uzyskanych metodą biernej hemaglutynacji (PHT) porównano z wartościami mian uzyskanych w odczynie SN, SN + d i IF, przy użyciu 100 TCID₅₀, stosowanych powszechnie w rutynowych badaniach diagnostycznych. Miana surowic A i B uzyskanych tą metodą wynosiły 128 i były 8 i 4-krotnie wyższe od mian uzyskanych w odczynie SN i SN + d oraz 2-krotnie wyższe (dla surowicy B) i równe (dla surowicy A) w odczynie IF.

Wnioski

1. Metoda immunofluorescencji pośredniej z wiązaniem dopełniacza (IF) i biernej hemaglutynacji (PHT) okazała się czulszą próbą aniżeli odczyn seroneutralizacji (SN) i dlatego może mieć praktyczne zastosowanie w badaniach serologicznych, zwłaszcza przy określaniu niskiego poziomu przeciwciał w surowicach zwierząt chorych.

2. Metoda seroneutralizacji z 5% dopełniaczem świnki morskiej (SN + d) daje 2-krotnie wyższe miano surowic odpornościowych dla wirusa IBR/IPV, aniżeli powszechnie używana w rutynowych badaniach diagnostycznych metoda SN bez dopełniacza.

3. Zastosowane w doświadczeniu metody serologiczne dają lepsze wyniki z wirusem IBR/IPV, przy użyciu 10 TCID₅₀, aniżeli przy użyciu dawek większych, co szczególnie jest ważne przy wykrywaniu niskiego miana przeciwciał u zwierząt nosicieli.

Piśmiennictwo

1. Bitsch V.: Acta vet. scand. 11, 606, 1970.
2. Bitsch V.: Acta vet. scand. 14, 683, 1973.
3. Bitsch V.: Acta vet. scand. 14, 767, 1973.
4. Darbyschire J. H., Shanks P. L.: Vet. Rec. 75, 397, 1963.
5. Haralambiev H.: Second International Symposium of Veterinary specialist in infection disease Bulgaria — Varna 1973.
6. Kirby F. D., Martin H. T., Ostler D. C.: Vet. Rec. 94, 361, 1974.
7. Klein P., Burkholder P.: J. exp. Med. 111, 93, 1960.
8. Vengris V. E., Mare C. J.: Can. J. Comp. Med. 35, 289, 1971.
9. Whitman J. E., Hetrick F. M.: Cornell vet. 55, 613, 1965.
10. Zjambo G. C., Dennett D. P., Johnson R. H.: Aust. vet. J. 49, 409, 1973.

Adres autora: Halina Majewska, ul. Leśna 21/23, 24-100 Puławy.

Маевска Х., Бачиньски З. — Исследования по модификации диагностических методов инфекции вирусом IBR/IPV.

Провели модификацию и адаптацию серодиагностических методов SN, ПНТ и IF (при помощи системы комплемент-антикомплемента) с целью выявления низких титров антител для вируса IBR/IPV у крупного рогатого скота.

Установили, что метод SN является менее чувствительным чем методы PHT и IF. Метод SN в присутствии 5% комплемента морской свинки дает двукратно более высокие титры чем применяемый повсеместно в рутинных исследованиях метод SN без прибавления комплемента. Установили также, что методы SN и IF при применении дозы 10 и.д. вируса IBR/IPV обнаруживают более высокие титры антител чем при применении более высоких доз вируса. Авторы подчеркивает значение этого факта в диагностике IBR/IPV при низких титрах антител.

Majewska H., Baczyński Z. — **Examinations on the modification of diagnostic methods in case of infection with JBR/JPV virus.**

There were modified and adapted to diagnostic examinations seroneutralization technique (SN), passive haemagglutination test (PHT), and immunofluorescence performed by means of the system: complement-anticomplement. The purpose of the techniques was to determine low antibody levels against IBR/IPV virus. It was found that PHT and IF tests were more sensitive than SN method. SN technique with the addition of 5% of guinea-pig serum gave twice higher titers than that without complement. Higher titres in case of SN and IF were found when there were used 10 infective doses of IBR/IPV virus than when higher doses of virus were applied. That is important to discover low levels of antibodies in animals infected.

HUBERT ZEMBRZUSKI

Przypadek listeriozy w fermie zarodowej owiec

Z Kliniki Chorób Zakaźnych Wydziału Weterynaryjnego AR-T w Olsztynie

W związku z rozwojem hodowli wielostadnej owiec, zmianą warunków żywienia i znacznym uszlachetnieniem ras, stwierdza się u tego gatunku zwierząt coraz częstsze występowanie chorób, które nie miały dotychczas znaczenia gospodarczego. Do chorób tych należy listerioza.

Przedmiotem niniejszego doniesienia jest opis przypadku listeriozy owiec, stwierdzony przez tutęjszą Klinikę.

Opis przypadku. W gospodarstwie PGR S., woj. O. — liczącym łącznie z jagniętami 295 owiec — wystąpiły początkowo pojedyncze później zaś coraz liczniejsze przypadki zachorowań i padnięć jagniąt w wieku 6—9 tyg. W niektórych dniach zachorowywało równocześnie 8 jagniąt. U owiec dorosłych i jagniąt poniżej 1 mies. życia choroba nie wystąpiła.

Klinicznie stwierdzono na początku choroby zmniejszony apetyt, posmutnienie, odłączanie się jagniąt od stada, brak łaknienia, a następnie pojawił się wypływ surowiczno-śluzowy z nosa, ślinotok oraz silne łzawienie. W trzecim dniu choroby dołączyły się zaburzenia ze strony układu nerwowego w postaci chwiejnego chodu, trudności przy wstawaniu, jednostronnego porażenia małżowiny usznej, zaburzeń przytomności, a w końcu porażenia kończyn. W tym okresie chore zwierzęta przeważnie leżały na boku z podciągniętą do tułowia głową i wypadniętym językiem. Temperatura ciała wynosiła 40,5°—41°C. Śmierć zwierząt następowała zwykle 5—7 dnia choroby. W fermie tej w ciągu 3 tyg. na przełomie lutego i marca, padło wśród wyżej opisanych objawów ponad 20 jagniąt.

Badania własne

U sekcjonowanych 5 jagniąt padłych stwierdzono silne obustronne zapalenie spojówek, a u 3 sztuk ponadto silne zapalenie (zmętnienie) i owrzodzenie rogówki — przeważnie jednostronne.

We wszystkich przypadkach stwierdzono nieżyt błony śluzowej jamy ustnej i nosowej, znaczną ilość piasku względnie ziemi w przedłożkach, zapalenie nieżytowe jelit cienkich, przekrwienie wątroby oraz silny obrzęk i przekrwienie opon mózgowych, mózgu i liczne wybroczyny w moście Warola i rdzeniu przedłużonym.

Z sekcjonowanych 5 padłych jagniąt pobrano mózgi do badania bakteriologicznego. Z każdego mózgu wykonano posiewy bakteriologiczne na agar z surowicą i na agar z krwią. W każdym z posiewów po 24 godz. inkubacji w temperaturze 37°C w warunkach tlenowych uzyskano obfity wzrost w postaci jednolitych kolonii o średnicy ok. 1 mm, okrągłych, o brzegach regularnych, wypukłych i błyszczących oraz przeświecających w świetle przechodzącym. Na agarze z krwią stwierdzono wokół kolonii hemolizę typu beta. Rozcierem przygotowanym z każdego mózgu w stosunku 1:10 zakażono dotrzewnowo po dwie myszki białe oraz gołębia. Użyte myszki padły po 48—72 godz. Z narządów wewnętrznych i krwi padłych myszek wyhodowano na analogicznych podłożach kolonie nie różniące się makroskopowo od kolonii uzyskanych z mózgu padłych jagniąt. Gołąb pozostał zdrowy — podobnie jak gołąb zakażony zawiesiną bakterii uzyskanych z posiewów mózgow padłych jagniąt. W preparatach odciskowych z narządów padłych owiec i myszek oraz w preparatach sporządzonych z kolonii wyrosłych na podłożach agarowych stwierdzono liczne, kokopodobne gramodatnie pałeczki, które w kropli wiszącej w temperaturze pokojowej wykazywały ruch.

Tab. 1. Właściwości szczepu *Listeria monocytogenes* wyosobnionego z mózgu padłych owiec

Barwienie Gramem	Próba na ruch	Typ hemolizy	Fermentacja laktozy	Próba MR	Próba VP	Próba na katalazę	Chorobotwórczość	
							myszki	gołąb
+	+	beta	—	+	+	+	+	—