STANISŁAW KARPIŃSKI, MARIA MIERZEJEWSKA, KRZYSZTOF RUTKOWSKI

Bezpośredni odczyn immunofluorescencji (if) w wykrywaniu wirusa choroby pęcherzykowej świń (SVD) w hodowlach komórek

Z Zakładu Badania Chorób Świń Instytutu Weterynarii w Puławach

Choroba pęcherzykowa świń (SVD) stwierdzona po raz pierwszy we Włoszech w 1966 r. (11), pojawiła się w ostatnich latach w wielu krajach, stając się dla niektórych z nich dość poważnym problemem epizootiologicznym a także ekonomicznym (5, 6, 7, 8, 10).

Ze względu na to, że SVD pod względem objawów klinicznych i zmian anatomopatologicznych jest podobna do pryszczycy, bardzo istotną sprawą stało się opracowanie dokładnych laboratoryjnych metod diagnostycznych, pozwalających na rozpoznanie omawianej choroby. Wśród tych metod na pierwszym miejscu należy wymienić metody serologiczne. Jak wynika z piśmiennictwa najpierw do diagnostyki SVD zastosowano odczyn wiązania dopełniacza (OWD) (4, 6, 9, 12), a następnie odczyn seroneutralizacji (2, 9). Szybkie i miarodajne rozpoznanie choroby pęcherzykowej przy pomocy OWD uzyskuje się jednak tylko wówczas, jeśli nadesłany do badania materiał patologiczny (pęcherze od chorych świń) zawiera dostatecznie wysokie miano wirusa, a swoista surowica odpornościowa pochodzi od świnek morskich hyperimmunizowanych wirusem omawianej choroby. Odczyn seroneutralizacji nie nadaje się do rozpoznawania choroby w pierwszym okresie jej trwania w gospodarstwie, poza tym na uzyskanie wyniku sn należy czekać ok. 48—72 godz. Z powyższych względów Chapman i wsp. (3, 4), Larenaudie i wsp. (9) podjęli próby zastosowania do diagnostyki SVD odczynu immunofluorescencji (if). Uzyskane wyniki wykazały, że odczyn ten jest w pełni swoisty, a wykrycie obecności wirusa SVD przy jego użyciu jest możliwe już po upływie 3—5 godz. od zakażenia hodowli komórek nadesłanym do badania materiałem patologicznym.

Mając na uwadze wciąż aktualne zagrożenie naszego kraju zarówno pryszczycą jak i chorobą pęcherzykową świń, podjęto niniejsze badana nad przydatnością immunofluorescencji bezpośredniej w wykrywaniu wirusa choroby pęcherzykowej świń, w zakażonych hodowlach komórek, przy użyciu koniugat wyprodukowanych z surowic królików i świń sztucznie zakażonych homologicznym szczepem wirusa SVD.

Materiał i metody

Do badań użyto:

1. Cytopatyczny szczep wirusa choroby pęcherzykowej o mianie 10^7 (13).

2. Hodowle komórek:

— linia ciągła komórek nerki świni IBRS-2,
— linia ciągła komórek nerki świni PK15,
— linia ciągła komórek wątroby bydlęcej Heb,
— pierwotna hodowla komórek nerki świni.

3. Króliki mieszańce o ciężarze ciała 4—5 kg.

4. Świnie rasy wb o ciężarze ciała ok. 50 kg.

Ryc. 1. Linia ciągła komórek nerki świni IBRS-2 w 4 godz. po zakażeniu wirusem SVD, barwiona swoistą koniugatą

Przygotowanie surowic odpornościowych anty-SVD na królikach.

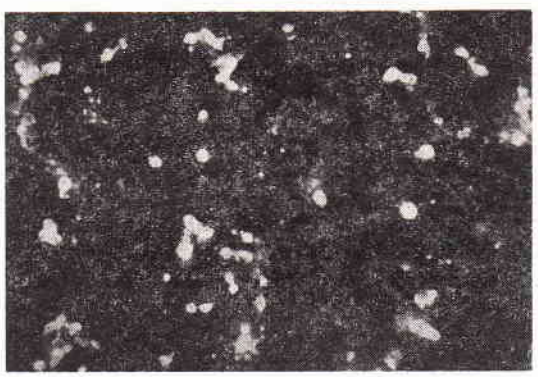
24 godz. hodowle komórek IBRS-2 zakażano wirusem i namnażano w 37°C. Po uzyskaniu pełnego efektu cytopatycznego hodowle 2 razy zamrażano i odmrażano, zagęszczano siarczanem amonu i oczyszczano na kolumnie z sephadexem G 50 coarse. Otrzymany w ten sposób wirus użyto do uodparniania królików posługując się następującą metodą: szczepienie pierwsze i czwarte — dożylnie 3 ml wirusa oraz domięśniowo 5 ml wirusa i 5 ml adjuwantu kompletnego Freunda; szczepienie drugie, trzecie i piąte — dożylnie 3 ml wirusa. Szczepień dokonywano w odstępach jednotygodniowych. W tydzień po ostatnim szczepieniu miano przeciwciał SVD wynosiło 1 : 1280. Króliki wykrwawiono a surowicę użyto do sporządzenia koniugaty.

Przygotowanie surowic odpornościowych anty-SVD na świniach.

Do uodparniania użyto 2 świnie. Każda otrzymała domięśniowo 2 ml wirusa SVD, atenuowanego drogą kolejnych pasaży w hodowli komórek Heb. 28 dni później świniom podano ponownie ww. wirus w dawce 20 ml. W miesiąc po drugim szczepieniu świnie otrzy-

mały dwukrotnie domięśniowo 5 i 10 ml zjadliwego szczepu SVD. W miesiąc po ostatniej iniekcji miano przeciwciał wynosiło 1 : 2560. Świnie wykrwawiono. Z uzyskanych surowic królików i świń przygotowano koniugaty wg metody Aynaud (1).

Postępowanie. Szkiełka nakrywkowe z namnożonymi hodowlami komórek IBRS-2, PK15, Heb i hodowlą pierwotną komórek nerki świni zakażano zjadliwym szczepem wirusa SVD w ilości 0,5 ml na szkiełko, wirus adsorbowano 1 godz. na hodowli komórek, dodawano płyn utrzymujący z dodatkiem 1% surowicy cielęcej i inkubowano w 37°C przez 4, 18 oraz 24 godz. Następnie hodowle utrwalano alkoholem metylowym w −70°C przez 30 min., suszono w temperaturze pokojowej, barwiono koniugatą 1 godz. w 37° w zamkniętej komorze wilgotnej, przemywano kilkakrotnie płynem PBS i wodą destylowaną, suszono i oglądano w mikroskopie fluorescencyjnym.



Ryc. 2. Linia ciągła komórek nerki świni IBRS-2 w 24 godz. po zakażeniu wirusem SVD, barwiona swoistą koniugatą

Wyniki i omówienie

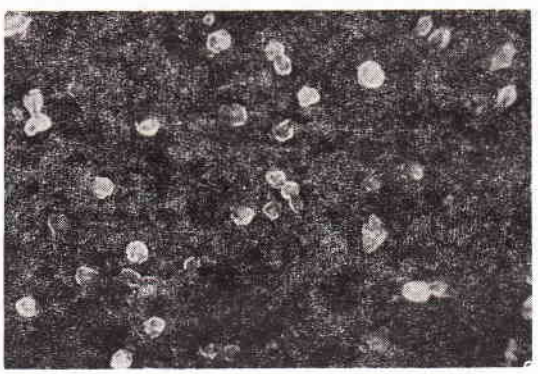
Obraz mikroskopowy linii ciągłej komórek IBRS-2 w 4 godz. po zakażeniu, wybarwiony swoistą koniugatą, przedstawia ryc. 1, a taki sam obraz hodowli w 24 godz. po zakażeniu — ryc. 2.

Jak wynika z ryc. 1, już po upływie 4 godz. po zakażeniu obserwuje się liczne skupiska komórek wykazujących intensywną fluorescencję cytoplazmy na tle komórek niefluoryzujących. Po upływie 24 godz. stwierdzono w założonej hodowli dużą ilość komórek fluoryzujących oraz efekt cytopatyczny (ryc. 2). W hodowli niezakażonej nie obserwowano fluorescencji.

Obraz mikroskopowy hodowli komórek wątroby bydlęcej Heb w 24 godz. po zakażeniu, wybarwiony swoistą koniugatą, przedstawia ryc. 3.

Z przedstawionej ryc. 3 wynika, że w 24 godz. po zakażeniu stwierdza się w komórkach Heb wyraźną immunofluorescencję wszystkich komórek, z równoczesnym efektem cytopatycznym.

Obraz mikroskopowy hodowli pierwotnej komórek nerki świni w 4 godz. po zakażeniu, barwionej swoistą koniugatą przedstawia ryc. 4, a ryc. 5 taki sam obraz hodowli w 18 godz. po zakażeniu.



Ryc. 4. Pierwotna hodowla komórek nerki świni w 4 godz. po zakażeniu wirusem SVD, barwiona swoistą koniugatą

Jak wynika z ryc. 4, hodowla pierwotna komórek nerki świni wykazuje w 4 godz. po zakażeniu intensywną fluorescencję prawie wszystkich komórek. Po upływie 18 godz. stwierdzono w zakażonej hodowli skupianie się komórek fluoryzujących, efekt cytopatyczny i pojawianie się nieupostaciowanych fluoryzujących punktów rozpadu komórek (ryc. 5).

Użyte w niniejszych badaniach hodowle linii ciągłej komórek nerki świni PK15 po upływie zarówno 4 jak i 24 godzin po zakażeniu wyka-

Ryc. 3. Linia ciągła komórek wątroby bydlęcej Heb w 24 godz. po zakażeniu wirusem SVD, barwiona swoistą koniugatą

Ryc. 5. Pierwotna hodowla komórek nerki świni w 18 godz. po zakażeniu wirusem SVD, barwiona swoistą koniugatą

zywały tylko pojedyncze komórki fluoryzujące.

Należy podkreślić, że odczyn if we wszystkich rodzajach użytych hodowli komórkowych wykazywał jednakowo intensywną fluorescencję niezależnie od tego, czy stosowano koniugatę sporządzoną z surowicy króliczej, czy też świńskiej.

Wyniki przedstawionych badań własnych wraz z danymi z piśmiennictwa (3, 4, 9) wykazują jednoznacznie, że odczyn immunofluorescencji bezpośredniej może być stosowany do wczesnego wykrywania wirusa choroby pęcherzykowej świń w zakażonych hodowlach komórek takich jak IBRS-2 i hodowla pierwotna komórek nerki świni. Przy użyciu tych hodowli i zastosowaniu odpowiedniej koniugaty wynik uzyskuje się już po ok. 4 godz. po zakażeniu.

Piśmiennictwo

1. *Aynaud J. M., Bibard C.*: Cah. Méd. vét. 40, 1, 1971.
2. *Burrows R., Greig A., Goodridge C.*: Res. vet. Sci. 15, 141, 1973.
3. *Chapman W. G., Burrows R.*: Res. vet. Sci. 15, 397, 1973.
4. *Chapman W. G., Buckley L., Burrows R.*: XIV-th Conference of the OIE Commision on Foot-and-Mouth Disease. Paris, 11—14 March. Report 504, 1975.
5. *Cvetnić S.*: Praxis Veterinaria, Pliva, 22, 131, 1974.
6. *Dave P. S., Forman A. J., Smale C. J.*: Nature, Lond. 241, 540, 1973.
7. *Dhennin L., Dhennin L.*: Bull. Acad. vet. Fr. 46, 47, 1973.
8. *Guerche J., Delagneau C. F., Adamowicz Ph., Durand M., Prunet P.*: Bull. Acad. vet. Fr. 46, 385, 1973.
9. *Larenaudie B., Dhennin L., Gourreau J. M., Dhennin L.*: Bull. Soc. Sci. vet. et Med. comparée, Lyon 75, 337, 1973.
10. *Mowat G. N., Derbyshire J. H., Huntley J. F.*: Vet. Rec., 90, 618, 1972.
11. *Nardelli L., Lodetti E., Gualandi G. L., Burrows R., Goodridge D., Brown F., Cartwright B.*: Nature, Lond., 219, 1275, 1968.
12. *Simone F., Panina G. F., Lodetti E.*: Vet. ital., 25, 220, 1974.
13. *Wawrzkiewicz J.*: Medycyna wet. 31, 202, 1975.

Adres autora: lek. wet. Stanisław Karpiński, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy.

EWA KARPIŃSKA, WOJCIECH KARCZEWSKI

Próby uzyskania i konserwacji surowicy diagnostycznej przeciwko zakaźnemu zapaleniu oskrzeli kur do odczynu precypitacji w żelu agarowym

Z Zakładu Badania Chorób Drobiu Instytutu Weterynarii w Puławach

Odczyn precypitacji w żelu agarowym zastosowany do rozpoznawania zakaźnego zapalenia oskrzeli kur (IB) po raz pierwszy przez Woernle'go (8), służyć może zarówno do wykrywania swoistych przeciwciał w surowicy ptaków, jak i do stwierdzenia obecności i identyfikacji zarazka przy próbach jego izolacji na zarodkach kurzych.

W pierwszym przypadku oprócz znanego antygenu i badanych surowic celowe jest nastawienie kontroli w postaci surowicy dodatniej, ze względu na mogące czasami występować odczyny nieswoiste. W przypadku wykrywania antygenu wirusowego w rozcierach błon kosmówkowo-omoczniowych zakażonych zarodków, posiadanie dodatnich surowic o odpowiednim mianie jest warunkiem niezbędnym.

O ile produkcja antygenu (rozcier błon kosmówkowo-omoczniowych zakażonych wirusem IB zarodków kurzych) jest rzeczą stosunkowo prostą, to uzyskanie dodatniej surowicy o wysokim mianie precypitacyjnym sprawia w warunkach laboratoryjnych dość duże trudności. Wg Woernle'go (10), ptaki wytwarzają precypityny o wysokim mianie jedynie w cięższym przebiegu schorzenia. W warunkach terenowych do takiego przebiegu dochodzi najczęściej na skutek komplikacji spowodowanych przez dodatkowe zakażenie innymi zarazkami (np. *M. gallisepticum* lub *E. coli*).

Konieczność posiadania do celów diagnostycznych monowalentnej surowicy dodatniej uniemożliwia przy jej produkcji prowokowanie zakażeń mieszanych.

Odczyn precypitacji w żelu agarowym, jako stosunkowo prosty i szybki, może mieć duże zastosowanie w diagnostyce rutynowej prowadzonej w Zakładach Higieny Weterynaryjnej. Dlatego wydało się słusznym podjęcie pracy nad wyborem odpowiedniej metody hiperimmunizacji kurcząt dla uzyskania dodatniej surowicy anty-IB oraz sprawdzeniem możliwości jej konserwacji.

Materiał i metody

Kurczęta. Doświadczenie przeprowadzono na 67 kurczętach w wieku 6—10 tygodni, rasy ogólnoużytkowej. Wykonane próby nie wykazały w surowicach tych kurcząt obecności przeciwciał neutralizujących wirus IB ani swoistych dla tego zarazka precypityn.

Wirus. Do zakażenia użyto szczepu Moreau (Mo), wirusa IB, typ Massachussets. Wirus dla uzjadliwienia przepasażowano 4-krotnie przez 3-tygodniowe kurczęta, a następnie 2-krotnie przez zarodki kurze. Do zakażenia kurcząt używano rozcieru błon kosmówkowo-omoczniowych lub płynów owodniowo-omoczniowych. Koncentracja wirusa w 1 ml płynu owodniowo-omoczniowego, używanego do zakażenia wynosiła $10^{7,7}$ EID_{50}.