

ZYGMUNT CYGAN, TADEUSZ JASTRZĘBSKI, BARBARA ŁOSOWSKA, DOROTA DEPTUŁA

Próby ustalenia etiologii martwicowego zapalenia jamy ustnej u jagnięcia

Z Zakładu Higieny Weterynaryjnej w Lublinie

Z Instytutu Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych
Wydziału Weterynaryjnego AR w Lublinie

Etiologia wielu schorzeń ludzi i zwierząt wywołanych przez beztlenowce niezarodnikujące tj. tzw. florę endogenną *Veillon* nie została jeszcze dostatecznie poznana. Powodem tego były trudności metodyczne związane z hodowlą, a przede wszystkim z identyfikacją tych drobnoustrojów (2, 10, 22, 29). Dotychczasowe metody oparte na właściwościach morfologicznych i fermentacyjnych, a częściowo serologicznych nie stwarzały możliwości powtarzalnej i pewnej identyfikacji. Dopiero badania Guillaume i wsp. (18) oraz Beerensa i wsp. (5) nad beztlenowcami niezarodnikującymi wykorzystujące analizę kwasów tłuszczowych jako produktów metabolizmu glukozy i treoniny oraz badania Sebald (26) kwasów nukleinowych pozwoliły na uproszczenie i uporządkowanie systematyki tej grupy zarazków. W oparciu o powyższe metody udało się ustalić właściwą pozycję taksonomiczną beztlenowych bakterii wywołujących zanokcicę owiec (8). Obecnie metoda ta weszła już jako podstawowa do praktyki badawczej.

Jednym spośród schorzeń beztlenowcowych zwierząt o mało zbadanej etiologii jest martwicowe zapalenie jamy ustnej „SNA” („stomatitis necroticans agnorum”, „stomatitis of lambs”, „Lammerdiphtheroid”, „stomatite necrotique”, „niekrotczeskiej stomatit”, dawniejsza nazwa polska — dyfteria jagniąt). Dostępne podręczniki chorób owiec i mikrobiologii podają, że powyższa jednostka chorobowa jest wywoływana przez pałeczkę niezarodnikującą *Fusobacterium necrophorum* (19, 24). Jednak odnośny pogląd jest oparty, jak się wydaje, na wynikach badań dawniej przeprowadzonych. W przejrzanym nowszym piśmiennictwie krajowym i zagranicznym żadnych prac dotyczących „SNA” nie znaleziono. Dlatego zbadanie etiologii z użyciem nowoczesnej metodyki identyfikacyjnej tego rzadko występującego schorzenia jagniąt, należy uznać całkowicie za uzasadnione i potrzebne.

W związku z powyższym jako cel niniejszej pracy przyjęto zbadanie flory beztlenowców niezarodnikujących występującej przy tej chorobie.

Material i metody

1. Materiał. Badaniu poddano padłe jagnię z RSP „Z”, rasy mieszanej — długowiełnej, w wieku 8—10 tygodni, wykazujące silne, martwicowe zapalenie jamy ustnej. Posiewy na beztlenowce niezarodnikujące oraz na tlenowce wykonano z próbek tkanki znajdującej się pod zmienioną chorobowo błoną śluzową jamy

ustnej. Poza tym przebadano rutynowo narządy mięszone oraz treść z jelit cienkich w kierunku patogennej flory tlenowej.

2. Izolacja beztlenowców niezarodnikujących. Wysiewy wykonywano na podłożu agarowo-surowicze AS (2,5% agar mięsno-peptynowy, glukoza — 0,5%, chlorowodorek cysteiny 0,05%, surowica końska 15%, pH 7,6). Zasiane podłoża inkubowano przez 5 dni w 37°C metodą pyrogallową według Pestiego (23). Pojedyncze kolonie, charakterystyczne dla beztlenowców niezarodnikujących, wycinano wraz z agarem i namnażano przez 7 dni w 37°C w półpłynnym podłożu opisanym w pracy Cygana i wsp. (12). Uzyskane hodowle sprawdzano na morfologiczną jednorodność kolonii i na brak zanieczyszczeń florą tlenową — przez wysiewy w warunkach beztlenowych i tlenowych na podłożu agarowo-surowicznym AS oraz na agarze Zeisslera z 10% krwi owczej.

3. Identyfikacja beztlenowców niezarodnikujących. Dla określenia przynależności rodzajowej odnośnych zarazków zastosowano metodykę badania kwasów tłuszczowych, wytwarzanych w 7 dniowej hodowli beztlenowców w bulionie z glukozą przygotowanym według Guillaume i wsp. (18). Kwasy tłuszczowe ekstrahowano według Charlesa i Barretta (9), a identyfikowano przy użyciu chromatografii cienkowarstwowej opisaną w pracy Lynesa (21). Ponadto stosownie do metody Barnes i Goldberga (3) badano wzrost zarazka w bulionie z glukozą i 10% żółci oraz określano pH w 4 dniowej hodowli bulionowej. Zdolność beztlenowców niezarodnikujących do produkowania dehydrogenazy treoniny sprawdzano metodą Beerensa i Tahon — Castel (6), a dekarboksylazy kwasu l-glutaminowego według Suzuki i wsp. (28).

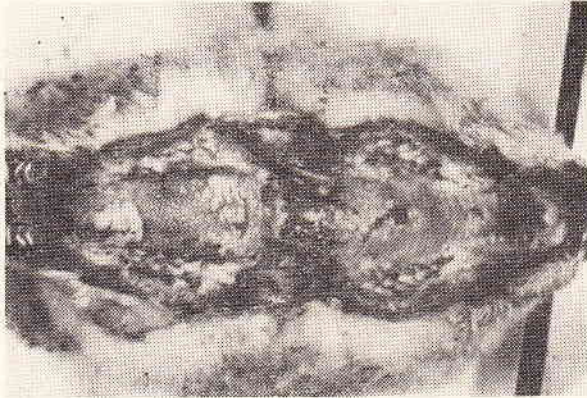
Identyfikacja gatunkowa wyosobnionych szczepów obejmowała badanie morfologii komórki i kolonii, określanie zdolności fermentowania laktozy, glukozy, sacharozy, maltozy, mannitu, salicyny, trehalozy, mannozy, arabinozy, produkcji indolu, H₂S, NH₃ i azotynów oraz aktywności proteolizy ściętej surowicy końskiej (80°C — 1 godz.) z zastosowaniem metodyki podanej w poprzednich pracach własnych (11, 12).

4. Badanie chorobotwórczości szczepów beztlenowców niezarodnikujących. Właściwości chorobotwórcze wyosobnionych szczepów sprawdzano przez wprowadzenie dootrzewnowo białym myszkom 1 ml hodowli 48 godzinnej zarazka z podłoża Wrzoska z 0,5% glukozy. Padłe myszy poddawano badaniu na obecność makroskopowych zmian anatomo-patologicznych.

Wyniki

1. Opis schorzenia. Dostarczone do badania padłe jagnię wykazywało rozległe zmiany martwicowe grubości 2—3 mm, szaro-żółte, zlokalizowane na grzbietowej powierzchni języka, na podniebieniu, dookoła dziąseł oraz na wewnętrznej powierzchni policzków i warg (ryc. 1). Innych zmian chorobowych, poza ogólnym wychudzeniem, nie zaobserwowano. W stadzie liczącym około 150 owiec, w tym kilkanaście jagniąt, chorowało w tym czasie 20—30% owiec

dorosłych z objawami przewlekłej kulawizny, przypominającymi zanokcicę. Zmian stwierdzonych u jagnięcia personel ovczarni u innych zwierząt nie zauważył. Całe stado było żywione niedostatecznie i jednostronnie głównie sianem o złej jakości. Ponadto dalszym niedociągnięciem były — duża wilgotność ściółki oraz brak właściwej higieny i pielęgnacji.



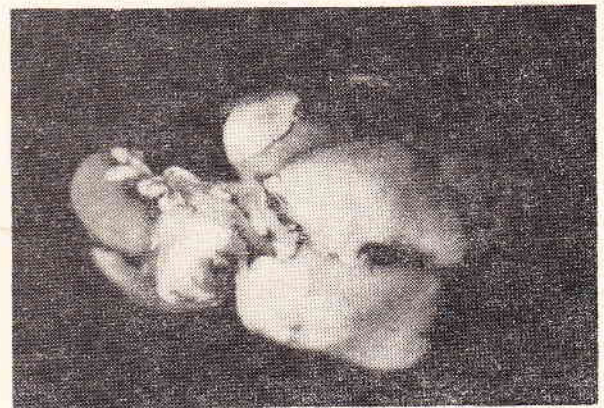
Ryc. 1.

2. Badanie bakteriologiczne. Rutynowe badanie próbek z padłego jagnięcia wykazało jedynie niezbyt liczną florę zawierającą *Staph. albus*, gamma hemolit. *E. coli* i alfa hemolit. paciorkowce. Z posiewów na podłożach inkubowanych w warunkach beztlenowych wyosobniono niemal w czystej kulturze 2 różne szczepy beztlenowców niezarodnikujących, które oznaczono Nr 1743 i Nr 1744.

Hodowle szczepu Nr 1743 zawierały drobne, niezarodnikujące pałeczki gramujemne, o zaokrąglonych końcach, a niekiedy duże formy „cytrynowate”. Na agarze surowiczym AS szczep ten wytwarzał kolonie wielkości 2—3 mm, wypukłe mięte, o równych brzegach. Produktami metabolizmu glukozy były 2 kwasy tłuszczowe: bursztynowy i octowy. Wzrost tych pałeczek w bulionie stymulował dodatek 15% żółci. W czasie wzrostu drobnoustroju w bulionie z 1% glukozy dochodziło do silnego zakwaszenia hodowli do pH 4,9. Z badanych enzymów zarazek wytwarzał dekarboksylazę kwasu 1-glutaminowego, a nie produkował dehydrogenazy treoniny. Całokształt posiadanych właściwości był typowy dla beztlenowców rodzaju *Bacteroides*. Dla określenia gatunku sprawdzono dodatkowo właściwości fermentacyjne i proteolityczne szczepu. Fermentował on silnie glukozę, maltozę i mannozę, słabiej laktozę i arabinozę, nie zakwaszał sacharozy, mannitu, salicyny i trehalozy. Ponadto redukował azotany do azotynów i NH_3 , rozpuszczał ściętą surowicę końską, nie produkował indolu i H_2S . Powyższe rezultaty badań pozwoliły zidentyfikować go jako *Bacteroides oralis*.

Wyosobniony drugi szczep beztlenowca Nr 1744 wytwarzał pałeczki długie, nitkowate, gramujemne i niepolimorficzne. Na podłożu

agarowo-surowiczym AS dawał kolonie wypukłe, o średnicy 2—3 mm, o równym brzegu. Przy badaniu metabolicznej rozbudowy glukozy w podłożu bulionowym stwierdzono 2 kwasy: masłowy i bursztynowy. Wzrost zarazka w bulionie z 10% żółci był zahamowany. Końcowe zakwaszenie hodowli w bulionie z 1% glukozy wynosiło pH 6,2. Szczep produkował dehydrogenazę treoniny, a nie wytwarzał dekarboksylazy kwasu 1-glutaminowego. Na podstawie powyższych właściwości odnośny zarazek zaszeregowano do rodzaju *Fusobacterium*. Pozostałe analizowane właściwości szczepu Nr 1744 ważne dla przeprowadzenia identyfikacji gatunkowej przedstawiają się następująco. Pod względem biochemicznym drobnoustroj wykazywał aktywność w stosunku do glukozy, maltozy i mannozy, redukował azotany do azotynów i NH_3 , rozpuszczał ściętą surowicę końską (80° — 1 godz.) i wytwarzał H_2S ; nie produkował indolu, nie zakwaszał podłoży z sacharozą, laktozą, arabinozą, mannitem, salicyną i trehalozą. Porównując powyższe właściwości tego szczepu z danymi prototypowych szczepów poszczególnych gatunków *Fusobacterium*, według obowiązującej międzynarodowej systematyki z 1972 r. „Bergey's manual of determinative bacteriology”, — nie można było ustalić jego przynależności gatunkowej.



Ryc. 2.

3. Właściwości chorobotwórcze szczepów Nr 1743 i Nr 1744. Obydwa wyosobnione szczepy beztlenowców niezarodnikujących okazały się silnie chorobotwórcze dla myszy. Zmiany anatomico-patologiczne u myszy padłej w ciągu 48 godz. po zakażeniu szczepem *Bacteroides oralis* Nr 1743 przedstawiają się jako różnej wielkości ogniska martwicowo-włóknikowe oraz ropnie w wątrobie (ryc. 2). Podobne zmiany wystąpiły na wykazującej ostry obrzęk śledzionie. Pałeczki *Fusobacterium* sp. Nr 1744 powodowały śmierć zakażonej nimi myszy na 4 dzień ze zmianami analogicznymi do wyżej opisanych.

Dyskusja

Według przyjętego od dawna, ostatnio nie sprawdzanego poglądu, martwicowe zapalenie jamy ustnej jagniąt „SNA” jest powodowane

przez *Fusobacterium necrophorum* (19, 24). Niższe badania własne wskazują na obecność przy „SNA” flory beztlenowców niezarodnikujących złożonej z *Bacteroides oralis* i bliżej niezidentyfikowanego gatunku *Fusobacterium* (nie odpowiadającego *Fusobacterium necrophorum*). Podkreślić przy tym należy, że powyższe drobnoustroje zostały wyosobnione prawie w czystej kulturze, co przy braku innej flory patogennej, zdaje się przemawiać za ich rolą etiologiczną w opisanym przypadku. Przyczyną uzyskania odmiennych wyników było prawdopodobnie zastosowanie, po raz pierwszy przy tym schorzeniu, nowoczesnej metodyki diagnostycznej. Możliwe też, że etiologia „SNA”, podobnie zresztą jak to wykazano przy zbliżonym morfologicznie schorzeniu człowieka, jest niejednolita (16, 25). Za takim tłumaczeniem przemawia również wyosobnienie z badanego, padłego jagnięcia beztlenowca *Bacteroides oralis*, które dopiero od niedawna jest uznawany za czynnik przyczynowy w procesach zapalnych jamy ustnej człowieka (8).

Co do właściwości biologicznych szczepu *Bacteroides oralis* Nr 1743, to były one zgodne z danymi podręcznika „Bergey's of manual determinative bacteriology” (8) oraz z opisem podanym przez Felnera i Dowella (14). Na podkreślenie zasługuje duża chorobotwórczość zbadanego szczepu dla myszy, u których wywoływał charakterystyczne zmiany, głównie martwicowe, a częściowo ropne. Według ostatnich badań, wywoływane przez beztlenowce niezarodnikujące procesy o charakterze martwicznym, zależą od lipidu A we frakcji lipopolisacharydowej zarazka, odpowiadającej właściwościom endotoksyny (7, 15).

Przedyskutowania wymaga nietypowy dla żadnego opisanego w „Bergey's of manual determinative bacteriology” (8) gatunku — szczep *Fusobacterium* sp. Nr 1744. Szczep ten różnił się zasadniczo od *Fusobacterium necrophorum* szeregiem właściwości biochemicznych, a mianowicie bezgazową fermentacją cukrów, brakiem właściwości hemolitycznych, niewytwarzaniem indolu oraz zupełnie odmienną morfologią kolonii. Jedynie występowanie zarazka w postaci długich nici zbliżało go do wyglądu pałeczek *Fusobacterium necrophorum*. Jednak właściwości morfologiczne beztlenowców niezarodnikujących, przeważnie nigdy nie są stałe i dlatego nie mogą stanowić pewnej podstawy do identyfikacji gatunku. Niedawno podobne trudności mieli przy badaniu szczepów ptasich Barnes i Goldberg (4), a świńskich Aalbaek (1).

Martwicowe zapalenie jamy ustnej u człowieka oraz u zwierząt jest niewątpliwie związane z namnożeniem się flory endogennej normalnie bytującej w warunkach pełnego zdrowia makroorganizmu. Podstawowymi czynnikami stymulującymi u człowieka rozwój tej flory są: sposób przylegania zarazka do błony śluzowej, uwarunkowany między innymi jego cechami morfologicznymi (13, 17); zdolność polimeryzo-

wania cukrów stabilizujących osadzanie się zarazka (16); niski potencjał oksydo-redukcyjny w miejscu styku zębów i dziąseł (20) i wreszcie niedobory witaminy C i kwasu nikotynowego (27). Prawdopodobnie szereg z tych czynników, między innymi niedobory witamin, mogły odegrać istotną rolę również w opisanym przypadku.

Reasumując, należy sądzić, że etiologia „SNA” jest bardziej złożona i niejednolita, niż to wynika z dawniej przeprowadzonych prac. W tej sprawie potrzebne są dalsze badania na większym materiale.

Piśmiennictwo

1. Aalbaek B.: Acta vet. scand. 13, 228, 1972.
2. Barnes E. M.: Methods in Microbiology 3B, Academic Press, London and New York 1969.
3. Barnes E. M., Goldberg H. S.: Ernährungsforschung 10, 489, 1965.
4. Barnes E. M., Goldberg H. S.: J. gen. Microbiol. 51, 313, 1968.
5. Beerens H., Castel M. M., Fievez L.: Abstracts VIII th. Int. Congr. Microbiol., Montreal 1962.
6. Beerens H., Tahon-Castel M. M.: Anns Inst. Pasteur, Paryż 108, 682, 1965.
7. Bjornson H. S., Hill E. I.: Infect. Immun. 8, 911, 1973.
8. Buchanan R. E., Gibbons N. E.: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, The Williams and Wilkins Company, Baltimore 1972.
9. Charles A. B., Barrett F. L.: J. med. Lab. Technol. 20, 263, 1963.
10. Crowley N.: J. clin. Path. 23, 166, 1970.
11. Cygan Z., Jastrzębski T.: Medycyna Wet. 27, 231, 1971.
12. Cygan Z., Jastrzębski T., Gałęza J., Pielecki M.: Pol. Arch. wet. 17, 237, 1974.
13. Ellen R. P., Gibbons R. J.: Infect. Immun. 5, 826, 1972.
14. Felner J. M., Dowell V. R.: Am. J. Med. 50, 767, 1971.
15. Garcia M. M., Chariton K. M., McKay K. A.: Infect. Immun. 11, 371, 1975.
16. Gibbons R. J., van Houte J.: A. Rev. Microbiol. 29, 19, 1975.
17. Gibbons R. J., van Houte J., Liljemark W. F.: J. Dent. Res. 51, 424, 1972.
18. Guillaume J., Beerens H., Osteux R.: Anns Inst. Pasteur, Lille 8, 13, 1956.
19. Kattich R. V.: Les maladies des animaux domestiques causees par les microbes anaerobies, Ed. Freres Vigot, Paris 1965.
20. Kenney E. B., Ash M. M.: J. Periodontol. 40, 630, 1969.
21. Lynes A.: J. Chromat. 15, 108, 1964.
22. Moore W. E. C., Cato E., Holdeman L. V.: J. infect. Dis. 119, 641, 1969.
23. Festi L.: Acta vet. hung. 15, 447, 1965.
24. Prevot A. R., Turpin A., Kaiser P.: Les bacteries anaerobies, Dunod, Paris 1967.
25. Rosenberg T., Clark A. R., Engel S. G., Tevgs F.: J. infect. Dis. 87, 217, 1950.
26. Sebald M.: Etude sur les bacteries anaerobies gramnegatives asporules. These, Paris 1962.
27. Smith L. D.S.: Introduction of the pathogenic anaerobes. The University of Chicago Press 1955.
28. Suzuki S., Ushijima T., Ischinose H.: J. Microbiol. 10, 193, 1966.
29. Szawatkowski M. V.: Med. Lab. Sci. 33, 5, 1976.

Adres autora: doc. dr habil. Zygmunt Cygan, ul. Słowicza 27, 20-336 Lublin.

Цыган З., Ястшембски Т., Лосовска Б., Дзптула Д. — Попытки обнаружения этиологии некротического стоматита у ягнёнка.

Провели, используя современный метод идентификации микробов, исследования по этиологии некротического стоматита у павшего ягнёнка — главным образом в направлении на неспороносных анаэробов. Во время исследований выделили почти в чистой культуре 2 штаммы анаэробов *Bacteroides oralis* (№ 1743) и ближе неидентифицированный *Fusobacterium* sp. (№ 1744). Оба штамма подвергли тщательным диагностическим исследованиям. Исследования не подтвердили появления при некротическом стоматите ягнят присутствия палочек *Fusobacterium necrophorum*. На основании полученных результатов авторы полагают что этиология некротического стоматита ягнят является более сложной и неоднородной.

Cygan Z., Jastrzębski T., Łosowska B., Deptuła D. — **Attempts to establish the etiology of necrotic stomatitis in a lamb.**

The examinations were carried out in order to establish the etiology of stomatitis in a dead lamb. Mainly there were taken into consideration non-sporing anaerobic bacteria. In the course of examination two strains almost in a pure culture were

isolated, i.e. *Bacteroides oralis* No 1743 and a pathogen of *Fusobacterium* sp. designated as No 1744. Their characteristics were estimated. On the strength of the examinations the authors did not confirm the view that *Fusobacterium necrophorum* was present in case of necrotic stomatitis in lambs. It seems that the etiology of this disease is more complicated and heterogeneous.

STANISŁAW KARPIŃSKI, STANISŁAW TERESZCZUK

Badania nad przeżywalnością wirusa choroby pęcherzykowej świń (SVD) w różnych warunkach środowiskowych

Z Zakładu Badania Chorób Świń Instytutu Weterynarii w Puławach

Choroba pęcherzykowa świń (SVD) wciąż jeszcze występuje — w mniejszym lub większym nasileniu — w niektórych krajach mimo energicznego jej zwalczania przy zastosowaniu wszystkich znanych metod, łącznie nawet z wybijaniem całego pogłowia świń w zapowietrzonych gospodarstwach. Za jedną z przyczyn tego wysoce niekorzystnego zjawiska należy uznać dużą oporność wydalanego przez zakażone zwierzęta zarazka na działanie czynników fizycznych, a zwłaszcza chemicznych (1, 3, 4, 5, 6, 7) i związaną z tym stosunkowo długą jego przeżywalnością w środowisku zewnętrznym.

W weterynaryjnym piśmiennictwie światowym ukazało się już na ten temat kilka publikacji (2, 3, 4). Ze względu jednak na fakt, że nie wszystkie aspekty tego bardzo ważnego dla praktyki zagadnienia zostały w wymienionych publikacjach wyjaśnione, podjęto niniejsze badania własne. Celem ich było m. in. poznanie — w różnych temperaturach przechowywania próbek — dynamiki spadku miana wirusa SVD znajdującego się w środowisku sztucznie nim zakażonych popłuczyn mięsnych, gnojowicy, wody pobranej bezpośrednio z rzeki (Wisły), wody wodociągowej, wody wodociągowej chlorowanej chlorem gazowym oraz w środowisku nasiąkniętej gnojowicą ziemi, którą po zakażeniu wirusem poddawano suszeniu. Należy zaznaczyć, że w dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono danych na temat przeżywalności wirusa SVD w wymienionych warunkach środowiskowych.

Materiał i metody

Do badań użyto:

- cytopatyczny szczep wirusa SVD namnożony w hodowli komórek IBRS-2. Wirus zawieszony w płynie Eagle'a z 2% dodatkiem surowicy rozlewano do próbek i przechowywano w temp. -18°C ;
- stałą linię komórek nerki świni IBRS-2 (De Castro) namnożoną w butlach Roux. Jako płynu wzrostowego używano 85% płynu Eagle'a, 15% surowicy cielęcej i antybiotyków w ilościach ogólnie stosowanych;
- popłuczyny mięsne (rzeźniane);
- gnojowicę z chlewni;
- ziemię nasiąkniętą gnojowicą;

- wodę wodociągową;
- wodę rzeczną;
- wodę wodociągową chlorowaną chlorem gazowym bez- i z dodatkiem 10% surowicy cielęcej.

Wirus namnożony w hodowli komórek IBRS-2, o mianie 10^8TCID_{50} , mieszano w stosunku 1:9 z popłuczynami mięsnymi, z gnojowicą, wodą wodociągową oraz z wodą rzeczną. Część każdej ze sporządzonych w powyższy sposób mieszanin (prób) umieszczano w temp. $18-22^{\circ}\text{C}$, część w temp. chłodni 4°C , a część zamrożono i przechowywano w temp. -18°C . Następnie w poszczególnych próbach określano — okresowo — wysokość mian wirusa SVD, z tym, że próby przechowywane w temp. $18^{\circ}-22^{\circ}\text{C}$ poddawano badaniu jeden raz w tygodniu, próby z chłodni badano jeden raz w miesiącu, a próby z zamrażarki poddano badaniu po 3 i 8 miesiącach przechowywania.

Wirus przygotowywany jak wyżej mieszano również z ziemią nasiąkniętą gnojowicą (100 g ziemi + 10 ml wirusa) a następnie ziemię tę poddawano łagodnemu suszeniu strumieniem powietrza o temp. 18°C i przechowywano w temperaturze pokojowej — w ciemni. Izolacje wirusa wykonywano trzykrotnie: po 24 godz., po 4 dniach i po 7 dniach od czasu wysuszenia.

Wirus przygotowany jak wyżej mieszano też z wodą chlorowaną (1 ml wirusa + 99 ml wody), zawierająca 1, 2, 4, 6 lub 8 mg wolnego chloru w 1 l (chlor określano metodą orto-tolidynową), albo też z wodą chlorowaną i.w., do której dodawano 10% surowicy cielęcej (białkowy osłaniacz dla wirusa). Określenie miana wirusa wykonywano po 30 min. od chwili sporządzenia mieszaniny.

Dla wyizolowania wirusa z zakażonych popłuczyn mięsnych, z gnojowicy, wody rzecznej i wodociągowej przyjęto następujący tok postępowania:

- do 4,5 ml PBS zawierającego 400 j.m. (1 ml penicyliny krystalicznej i 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycyny) dodawano 0,5 ml badanego materiału;
- uzyskana w powyższy sposób zawiesinę wstawiano do łaźni wodnej na 1 godzinę (temp. 37°C), a następnie wirowano przy 5 tys. obr/min przez 20 minut;
- powstały w trakcie wirowania osad odrzucano a supernatant poddawano kolejnym rozcieńczeniom od 10^{-1} do 10^{-8} w PBS;
- przy użyciu 0,1 ml każdego z kolejnych rozcieńczeń zakażano po 3 próbówki z 24 godz. hodowlą komórek IBRS-2;
- po półgodzinnej adsorbcji zalewano zakażone komórki płynem utrzymującym, składającym się z 98% płynu Eagle'a i 2% surowicy cielęcej;
- odczyt wykonywano po 48 godz. od chwili zakażenia;
- obecność wirusa stwierdzano na podstawie powstawania efektu cytopatycznego.