

DANUTA ROMANOWSKA, NATALIA ZALEWSKA-SCHÖNTHALER

Odczyny nieswoiste w teście immunodyfuzji w żelu agarowym przy rozpoznawaniu niedokrwistości zakaźnej koni

Z Zakładu Higieny Weterynaryjnej w Warszawie

Prowadzone od 1976 r. badania w kierunku niedokrwistości zakaźnej koni wykazują systematyczny wzrost liczby reakcji nieswoistych.

Stosowany w diagnostyce laboratoryjnej test immunodyfuzji pozwala na uzyskanie prawidłowych wyników w 95% badanych surowic (1, 2, 6). Istnieje możliwość uzyskania pewnego procentu wyników błędnych. Fałszywie dodatnie wyniki można otrzymać np. w przypadku nabycia przez zwierzęta odporności biernej (1, 5). Pewien procent wyników fałszywie dodatnich lub niespecyficznych wystąpić może również w przypadku badania surowic zwierząt poddanych uprzednio szczepieniu przeciwko tężcowi oraz zakaźnemu zapaleniu mózgu i rdzenia koni (5).

Precypityny wykrywane testem immunodyfuzji reagują z antygenowo różnymi szczepami wirusa niedokrwistości zakaźnej koni (7), nie reagują natomiast krzyżowo z innymi wirusami jak wirus grypy, zakaźnego roniczenia kłaczy itp. (1).

Przeciwciała precypitujące w teście immunodyfuzji należą do klasy immunoglobulin 7S (11), w związku z czym nie jest możliwe wyeliminowanie ich przy pomocy dwumerkaptoetanolu, który znalazł zastosowanie przy eliminacji innych odczynów niespecyficznych, np. w diagnostyce brucelozy czy mykoplazm.

Celem pracy była próba ustalenia źródła pochodzenia odczynów nieswoistych stwierdzanych w badanych surowicach.

Materiał i metody

Surowice

A. Surowice badane uzyskane z różnych źródeł:

- 16 surowic reagujących dodatnio w treści immunodyfuzji, pochodzących od 8 koni używanych do produkcji surowicy przeciwgrzyźcowej. Konie badano w odstępie jednego miesiąca.
- 23 surowice końskie reagujące niespecyficznie w teście immunodyfuzji.

B. (Surowice kontrolne:

1. NZK (Pitman — Moore, seria 745-845),
2. przeciwgrzyźcowa „Rhusionormin” (Biowet”),
3. antysurowica bydłeca uzyskana z Instytutu Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych SGGW-AR w Warszawie.

Antygeny:

1. NZK (Pitman — Moore, seria 745-845),
2. płyn Eagle'a (Wytwórnia Surowic i Szczepionek w Lublinie),
3. płyn Eagle'a z dodatkiem 10% surowicy bydłeczej („Biomed” w Lublinie),
4. hodowla bulionowa 34 szczepów laboratoryjnych włoskowca różycy z dodatkiem 10% surowicy końskiej (18 szczepów serotypu A, 13 szczepów serotypu B, 3 szczepy z grupy N) („Biowet” w Drwałewie) oraz 3 szczepów terenowych,
5. bulion z dodatkiem 10% surowicy końskiej.

Test immunodyfuzji w żelu agarowym wykonano zgodnie z instrukcją Pitman — Moore'a (9).

Przy badaniu surowic reagujących dodatnio stosowano kolejne antygeny 1, 3, 4, 5, natomiast przy badaniu surowic reagujących niespecyficznie antygeny 1—3.

Antygeny od 1—3 stosowano w zestawieniu z surowicą kontrolną NZK, antygeny 4 i 5 kolejno z surowicami 1 i 2.

Z 11 losowo wybranymi surowicami reagującymi niespecyficznie wykonano dodatkowo immunoelektroforezę stosując rozdział antygenów od 1—3 używając do precypitacji jako kontroli surowice 1 i 3.

Wyniki i omówienie

1. Surowice reagujące dodatnio w teście immunodyfuzji

Surowice uzyskane od koni używanych do produkcji surowicy przeciwgrzyźcowej, badane w kierunku NZK, tworzyły linie precypitacyjne łączące się z liniami powstającymi pomiędzy antygenem a surowicą kontrolną, sugerując dodatni wynik testu (ryc. 1). Linie te powstawały w nie zawsze jednakowych odległościach pomiędzy basenem z antygenem a basenem z badaną surowicą. Identyfikacyjny obraz linii precypitacyjnych przy badaniu wymienionych surowic uzyskano stosując antygen NZK, a zamiast surowicy kontrolnej NZK, surowicę przeciwgrzyźcową „Rhusionormin”.

W przypadku stosowania jako antygenu hodowli bulionowej włoskowca różycy oraz jako surowicy kontrolnej — dodatniej surowicy NZK, uzyskano linie precypitacyjne jedynie pomiędzy antygenem a badanymi surowicami. Brak było linii precypitacyjnych pomiędzy antygenem a surowicą kontrolną NZK (ryc. 2).

Przy zastosowaniu jako antygeny tygodniowych bulionowych hodowli włoskowca różycy uzyskano pomiędzy antygenem a badanymi surowicami mniejsze lub większe pola zmętnienia, które stanowią prawdopodobnie strefę rozlanej precypitacji (ryc. 3, 4). Surowicę kontrolną stanowiła surowica przeciwgrzyźcowa „Rhusionormin”.

Przy zastosowaniu jako antygeny szczepów serotypu A włoskowca różycy uzyskano pomiędzy antygenem a kontrolną surowicą w 72,2% przypadków podwójne linie precypitacyjne na granicy pola zmętnienia, w 11,1% linie precypitacyjne pojedyncze, w 16,7% brak było wyraźnej linii precypitacyjnej.

Szczepy serotypu B włoskowca różycy jako antygen w 30,7% tworzyły z kontrolną surowicą podwójne linie precypitacyjne na granicy pola zmętnienia, w 7,7% linie precypitacyjne pojedyncze, natomiast w 61,6% brak było linii precypitacyjnych. Występowały dwa rodzaje pola nieograniczonego liniami precypitacyjnymi: 1 — pole dobrze wyrażone (ryc. 4), odpowiadające konturami zarysom pól powstających z analogicznymi surowicami, tworzącymi pojedyncze lub podwójne linie precypitacyjne na granicy pola zmętnienia (46,2%), 2 — pole małe, słabo wyrażone, występujące jedynie bezpośrednio przy basenie z antygenem, zanikające stopniowo w miarę oddalania się od basenu (15,4%).

Szczepy z grupy N włoskowca różycy użyte jako antygen dawały w 66,7% pole zmętnienia ograniczone pojedynczymi liniami precypitacyjnymi, a w 33,3% pole zmętnienia odpowiadało opisanemu w punkcie 2.

Użyte jako antygeny szczepy terenowe włoskowca różycy tworzyły silnie wyrażone linie precypitacyjne

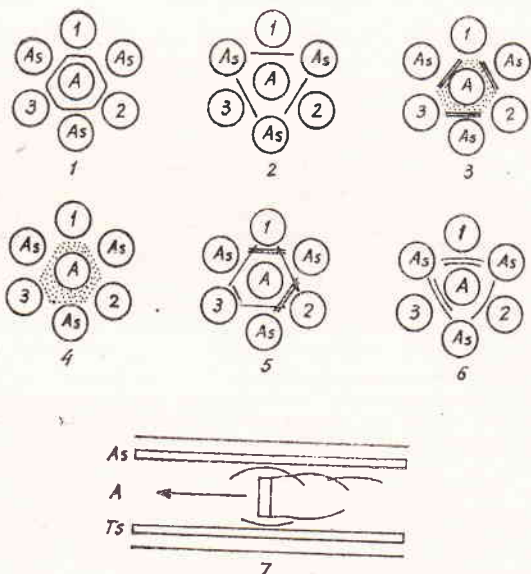
oraz wyraźniejsze pola zmętnienia w stosunku do szczepli laboratoryjnych.

W żadnym z zastosowanych dwóch układów kontrolnych, w których jako antygen użyto bulionu z dodatkiem 10% surowicy końskiej, a jako surowic kontrolnych surowicy przeciwróżycowej „Rhusionormin” i surowicy dodatniej NZK, nie uzyskano linii precypitacyjnych.

Zastosowanie jako antygeny płynu Eagle'a z dodatkiem 10% surowicy cielęcej oraz płynu Eagle'a bez dodatku surowicy w przypadku surowic reagujących dodatkowo w teście immunodiffuzji nie doprowadziło do utworzenia linii precypitacyjnych. Próby krwi pobrane po upływie 1 miesiąca dawały wyniki identyczne z przedstawionymi. Powtórne badanie tych samych surowic wykonane po upływie 7 miesięcy dało takie same wyniki.

2. Surowice reagujące niespecyficznie w teście immunodiffuzji

Surowice reagujące niespecyficznie dawały linie precypitacyjne (pojedyncze lub podwójne) pomiędzy surowicami a antygenem, które krzyżowały się z liniami precypitacyjnymi utworzonymi pomiędzy antygenem a surowicą kontrolną (ryc. 5).



Ryc. 1. 1, 2, 3 — Surowice badane reagujące dodatnio; As — Surowica NZK kontrolna dodatnia; A — Antygen NZK

Ryc. 2. 1, 2, 3 — Surowice badane reagujące dodatnio; As — Surowica NZK kontrolna dodatnia; A — Hodowla bulionowa szczepli X włoskowca różycy z dodatkiem 10% surowicy końskiej

Ryc. 3. 1, 2, 3 — Surowice badane reagujące dodatnio; As — Surowica przeciwróżycowa „Rhusionormin”; A — Hodowla bulionowa szczepli X włoskowca różycy z dodatkiem 10% surowicy końskiej

Ryc. 4. 1, 2, 3 — Surowice badane reagujące dodatnio; As — Surowica przeciwróżycowa „Rhusionormin”; A — Hodowla bulionowa szczepli Y włoskowca różycy z dodatkiem 10% surowicy końskiej

Ryc. 5. 1, 2, 3 — Surowice badane reagujące niespecyficznie; As — Surowica NZK kontrolna dodatnia; A — Antygen NZK

Ryc. 6. 1, 2, 3 — Surowice badane reagujące niespecyficznie; As — Surowica NZK kontrolna dodatnia; A — Płyn Eagle'a z dodatkiem 10% surowicy cielęcej

Ryc. 7. T.S. — Surowica badana reagująca niespecyficznie w teście immunodiffuzji; As — Anty-surowica bydłowa; A — Antygen NZK

Zastosowanie jako antygeny płynu Eagle'a z dodatkiem 10% surowicy cielęcej pozwoliło uzyskać pomiędzy użytym antygenem a badanymi surowicami jedną lub więcej linii precypitacyjnych. Liczba linii precypitacyjnych, nie była analogiczna do liczby linii uzyskanych w układzie poprzednim (ryc. 6).

W przypadku zastosowania jako antygeny płynu Eagle'a bez dodatku surowicy cielęcej nie uzyskano linii precypitacyjnych.

W wyniku zastosowania immunoelektroforezy do rozdziału antygeny NZK w przypadku 8 badanych surowic uzyskane łuki precypitacyjne odpowiadały precypitatom anty-surowicy bydłowej zastosowanej jako kontrola (ryc. 7).

Rozdział płynu Eagle'a z dodatkiem 10% surowicy cielęcej dał identyczny układ jak przy rozdziale antygeny NZK, natomiast rozdział samego płynu Eagle'a nie doprowadził do utworzenia łuków precypitacyjnych.

Stosowanie jako surowicy kontrolnej dodatniej surowicy NZK nie dawało w powyższych układach łuków precypitacyjnych. Pozostałe 3 surowice spośród 11 badanych metodą immunoelektroforezy nie tworzyły łuków precypitacyjnych.

Dodatnie wyniki badań w kierunku NZK, uzyskane testem immunodiffuzji z surowicami koni używanymi do produkcji surowicy przeciwróżycowej, jak również uzyskanie takich samych dodatnich wyników z antygenem NZK i surowicą przeciwróżycową „Rhusionormin” może przemawiać za występowaniem powinowactwa antygenowego pomiędzy wirusem NZK a włoskowcem różycy. Brak linii precypitacyjnych pomiędzy hodowlą włoskowca różycy jako antygenem a surowicą kontrolną NZK nie przeczy takiemu przypuszczeniu. Podobne zjawisko obserwuje się w przypadku reakcji krzyżowych pomiędzy wirusem biegunki bydła (BVD) a wirusem pomoru świń. W tym ostatnim przypadku wspólne ugrupowania antygenowe odgrywają istotną rolę w reakcji z surowicą anty BVD, natomiast mają niewielkie znaczenie w reakcji z przeciwciałami homologicznymi dla wirusa pomoru świń (10). Potwierdzenie lub odrzucenie postawionej hipotezy wymaga oczywiście dalszych szczegółowych badań immunochemicznych. Niemniej jednak można już obecnie stwierdzić, że uzyskanie dodatnich wyników w teście immunodiffuzji nie zawsze świadczy o zakażeniu wirusem NZK.

Na występowanie fałszywie dodatnich i niespecyficznych wyników w teście immunodiffuzji zwrócili uwagę Gaskin i wsp. (5). Autorzy ci stwierdzili, że surowice, które w teście immunodiffuzji dawały wyniki dodatnie lub niespecyficzne, zawierały przeciwciała skierowane przeciwko frakcjom surowicy płodów cielęcych.

Uzyskane przez nas wyniki badań 23 surowic reagujących niespecyficznie w teście immunodiffuzji potwierdzały wyniki badań wyżej wymienionych autorów. Należy jednak zaznaczyć, że w żadnym przypadku z opisanymi w naszym doświadczeniu surowicami, nie uzyskano linii precypitacyjnych o charakterze dodatnim, co odbiega od wyników Gaskina i wsp. (5).

Występowanie odczynów niespecyficznych było już wcześniej obserwowane przez innych autorów (8, 9). Autorzy ci zwracają uwagę na fakt, że dostępny w handlu antygen NZK stanowi zakażoną wirusem NZK hodowlę tkankową. Stosując go można uzyskać w pewnych przypadkach linie precypitacyjne pomiędzy pozostałościami surowicy płodów cielęcych, zawartymi w antygenie, a przeciwciałami przeciwko frakcjom tejże surowicy, powstałym w wyniku szczepienia badanego zwierzęcia. Potwierdzają to również uzyskane przez nas wyniki immunoelektroforezy, w których stosując rozdział antygeny uzyskano identyczne łuki precypitacyjne z badaną surowicą, jak i z anty-surowicą bydłową.

Wielu autorów uważa (1, 2, 3, 5), że stosowanie antygeny ze śledziony zwierzęcia zakażonego wiru-

sem NZK, a więc nie zawierającego pozostałości surowicy płodów cielęcych, pozwala uniknąć wystąpienia reakcji niespecyficznych.

Brak zmian charakteru linii precypitacyjnych w odczynie immunodiffuzji, wykonanym z próbami surowic, pobranymi w odstępie jednego miesiąca od koni używanych do produkcji surowicy przeciwróżycowej oraz uzyskanie identycznych wyników odczynu z wymienionymi surowicami po upływie 7 miesięcy od daty ich pobrania sugerują, że występujące w badanych surowicach precypityny mogą utrzymywać się przez dłuższy okres czasu.

Przeprowadzone badania pozwoliły ustalić w naszym przypadku pochodzenie reakcji niespecyficznych i dodatnich w teście immunodiffuzji.

Reakcje niespecyficzne w teście immunodiffuzji spowodowane były zawartymi w badanych surowicach przeciwciałami przeciwko frakcjom surowicy płodów cielęcych, natomiast linie odpowiadające precypitatom swoistym powstały w wyniku szczepienia badanych koni wieloważną szczepionką przeciwróżycową. Istnieje również teoretyczna możliwość występowania dodatniego odczynu w wyniku naturalnego zakażenia koni włoskowcem różycy.

Piśmiennictwo

1. Böhm H. O.: Dtsch. tierärztl. Wschr. 82, 184, 1975.
2. Böhm H. O.: Tierärztl. Prax. 3, 323, 1975.
3. Coggins L., Norcross N. L.: Cornell Vet. 60, 330, 1970.
4. Equine Infectious Anemia Immunodiffusion Antigen, Equine Cell Line Origin and Reagent Serum, Equine Origin. Pitman-Moore, INC., Washington Crossing, N.J., US Veterinary Licence nr 264, 1974.
5. Gaskin J. M., Neal F. C., Rubin H. L.: Am. J. vet. Res. 38, 373, 1977.
6. Kemen M. J.: Cornell Vet. 67, 178, 1977.
7. Kono Y., Kobayashi K.: Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart. 6, 194, 1966.
8. Kono Y., Yokomizo Y.: Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart. 8, 182, 1968.
9. Malmquist W. A., Barnett D., Becvar C. S.: Arch. Ges. Virus — forsch., 42, 361, 1973.
10. Matthaeus W., Van Aert A.: Arch. ges. Virusforsch. 34, 385, 1971.
11. Nakajima H., Kono Y., Uschimi C.: J. Immun. 107, 869, 1971.

Adres autora: lek. wet. Danuta Romanowska, ul. Mickiewicza 34/36 m. 8, 01-616 Warszawa.

Романовская Д., Залевская-Шенталер Н. — Неспецифические реакции в тесте иммунодиффузии в агаровом геле при распознавании инфекционной анемии лошадей.

Для установления источника происхождения неспецифических реакций в тесте иммунодиффузии при инфекционной анемии лошадей исследовали 16 лошадиных сывороток, реагирующих положительно, и 23 сыворотки, реагирующие неспецифически. Получили идентичный результат теста иммунодиффузии с 16 сыворотками, реагирующими положительно, применяя в качестве контроля положительную сыворотку ИАЛ и сыворотку против рожки „Rhusionormin”. 23 сыворотки, реагирующие неспецифически с антигеном ИАЛ в тесте иммунодиффузии, образовали также преципитационные линии при использовании как антигена жидкости Игла с прибавкой 10% телячьей сыворотки. 8 сывороток, реагирующих неспецифически в тесте иммунодиффузии при распределении антигена в иммуноэлектрофорезе, образовали идентичные преципитационные дуги с антисывороткой крупного рогатого скота. Результаты проведенных исследований позволили установить в исследуемых сыворотках причину возникновения неспецифических реакций в тесте иммунодиффузии.

Romanowska D., Zalewska-Schönthaler N. — Unspecific reactions in case of the diagnosis of equine infectious anaemia by agar gel immunodiffusion test.

In order to elucidate the reason of unspecific reactions sixteen horse positive sera and twenty three sera reacting unspecifically have been examined. Identical result was obtained with 16 positive EIA sera and anti-erysipelas „Rhusionormin” serum in immunodiffusion test. Twenty three sera reacting unspecifically with EIA antigen produced also precipitation lines with Eagle's medium supplemented with 10 per cent calf serum. Eight sera reacting unspecifically produced precipitation arcs identical with those formed with bovine antiserum after separation of the antigen by immunoelectrophoresis. The findings of the examinations permitted to establish in the sera under study the cause of unspecific reactions found in case of the use of immunodiffusion test.

YONKES T. D., STURM R. R., THOMAS R. W.: Porównanie skuteczności linkomycyny i tylozyny w formie iniekcji w terapii mykoplazmy u nowo narodzonych prosiąt i warchlaków. (Comparative efficacy of injectable lincomycin and tylosin in treatment of mycoplasmosis in neonatal and growing swine). Vet. Med. small anim. Clin. 74, 1324—1328, 1979 (9).

Celem badań było określenie wpływu linkomycyny i tylozyny stosowanych w formie iniekcji u nowo narodzonych prosiąt i warchlaków zakażonych Mycoplasma hyorhinis na przyrosty wagowe i stopień wykorzystania paszy. Obserwacje trwające przez okres 8 tygodni przeprowadzono na 221 prosiątach pochodzących z 21 miotów w trzech grupach: grupa 1 nie leczona stanowiła kontrolę, prosięta z grupy 2 otrzymywały iniekcje domięśniowe tylozyny w dawce 4 mg/funt wagi ciała, jeden raz dziennie przez 3 kolejne dni, zaś prosiętom z grupy 3 podawano linkomycynę domięśniowo w dawce 5 mg/funt, codziennie przez 3 kolejne dni. Ponownie antybiotyki podano prosiętom w wieku 4 tygodni. U prosiąt otrzymujących antybiotyki przyrosty wagi ciała były większe w odniesieniu do kontroli. Ten wzrost był jednakże statystycznie istotny jedynie u prosiąt u których stosowano linkomycynę. Również współczynnik wykorzystania paszy był wyższy u prosiąt z grup doświadczalnych w porównaniu

do kontroli. Zaobserwowane różnice nie były statystycznie istotne.

G.

ANDERSON N., LORD V.: Skuteczność przeciw pasożytnicza oksfendazolu, fenbendazolu i lewamizolu u bydła zarażonego na drodze naturalnej Ostertagia ostertagii i Trichostrongylus axei. (Anthelmintic efficacy of oxfendazole, fenbendazole and levamisole against naturally acquired infections of Ostertagia ostertagii and Trichostrongylus axei in cattle). Aust. vet. J. 55, 158—164, 1979 (4).

Badania przeprowadzono na krowach wypasanych na pastwiskach zanieczyszczonych larwami nicieni. W pierwszym eksperymencie stosowano doustnie oksfendazol w dawce 0,625; 1,25; 2,5 i 5,0 mg/kg, fenbendazol w dawce 2,5; 5,0; 10,0 i 20,0 mg/kg względnie lewamizol w dawce 3,5; 7,0; 14,0 i 21 mg/kg. W drugim doświadczeniu stosowano wyłącznie fenbendazol jednorazowo w dawce 7,5 mg/kg wagi ciała. Badania wykazały, że oksfendazol i fenbendazol cechują się identyczną efektywnością w przypadkach zarażeń wywołanych przez Ostertagia ostertagii. Steżenie leków osiągało maksymalny poziom w okresie 24—48 godzin po podaniu doustnym, zaś okres półtrwania wynosił 24—26 godzin.

G.