

ANTONI SCHOLLENBERGER, JAN PRANDOTA

Test zahamowania migracji leukocytów jako wskaźnik immunogenności szczepionki przeciwko zakaźnemu zapaleniu nosa i tchawicy

Instytut Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych Wydziału Weterynaryjnego SGGW-AR,
ul. Grochowska 272, 03-049 Warszawa

Lokalny charakter zakażenia wirusem zakaźnego zapalenia nosa i tchawicy bydła (IBR), ograniczającego się zwykle do śluzówki dróg oddechowych sprawia, że w odporności na nie główną rolę odgrywają mechanizmy odporności miejscowej. Właściwym sposobem uzyskania tej odporności jest uodpornienie drogą donosową. Donosowe podanie atenuowanej szczepionki pobudza miejscowe wytwarzanie interferonu oraz lokalną odpowiedź immunologiczną, związaną zarówno z wytwarzaniem przeciwciał, jak i odpornością komórkową. Uodpornienie drogą domięśniową silniej pobudza ogólną odpowiedź immunologiczną, lecz również przypuszczalnie przez osiedlanie się uczulonych limfocytów w podśluzówce dróg oddechowych może przyczyniać się do pobudzenia odporności miejscowej (3). Szczególne znaczenie odporności miejscowej nie oznacza jednak, że odporność ogólna nie odgrywa żadnej roli w przebiegu zakażenia wirusem IBR, gdyż przeciwciała surowicy mogą zarówno chronić przed wirusem, jak i przedostawać się na powierzchnię błon śluzowych skutkiem zmian przepuszczalności naczyń włosowatych pod wpływem mediatorów odczynu zapalnego. Stąd przy ocenie immunogenności, będącego w naszym posiadaniu, atenuowanego szczepu wirusa IBR stosowano zarówno uodpornianie donosowe, jak i drogą domięśniową.

Celem pracy było określenie w jakim stopniu badany szczep pobudza ogólną odpowiedź immunologiczną: humoralną i komórkową. Odporność humoralną określano na podstawie miana przeciwciał neutralizujących w surowicy, a odporność komórkową na podstawie wyników testu hamowania migracji leukocytów krwi obwodowej.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na 5 klinicznie zdrowych cielętach rasy nizinnej czarno-białej w wieku od 8 do 12 tygodni. U dwóch spośród nich przed rozpoczęciem doświadczenia stwierdzono obecność przeciwciał neutralizujących wirus IBR. Cielęta uodporniano dwukrotnie. Po raz pierwszy donosowo, podając do każdego otworu nosowego po 1 ml szczepionki. Po dwu tygodniach wszystkim cielętom podawano domięśniowo po 5 ml tej samej szczepionki. Krew do badań pobierano z żyły jarzmowej.

Przygotowanie szczepionki. Szczepem wyjściowym do produkcji szczepionki był 47 pasaż krajowego atenuowanego szczepu wirusa zakaźnego zapalenia nosa i tchawicy bydła oznaczony symbolem B-184/PL.

Wirus namnażano w hodowli nerki płodu bydła. Zbioru wirusa dokonywano w 48 godzin po zakażeniu. Płyn zebrany z hodowli trzykrotnie zamrażano i odmrażano i po odwirowaniu przechowywano w temperaturze -20°C . Miano wirusa obliczone metodą Karber wynosiło $10^{5.5}$ TCID₅₀/ml. Każdą serię szczepionki sprawdzano na jałowość.

Badania serologiczne. Poziom przeciwciał określano metodą seroneutralizacji (SN). Odczyn SN wykonywano metodą alfa używając 10-krotnego rozcieńczenia wirusa oraz równą objętość surowicy w rozcieńczeniu 1:4. Miano przeciwciał wyrażano w logarytmach indeksu neutralizacji.

Wykonywanie odczynu zahamowania migracji leukocytów. Zawiesinę leukocytów do wykonania odczynu uzyskiwano według metody opisanej przez Moreno-Lopez (5). Test hamowania migracji wykonywano z użyciem rurek kapilarnych, podobnie jak to opisano w pracy Frymusa (2). Jako antygen używano wirusa szczepionkowego. We wstępnych próbach określono miano wirusa, które nie wywoływało hamowania migracji leukocytów pobranych przed uodpornieniem. W próbach kontrolnych zamiast antygeny wirusowego dodawano odpowiednią objętość płynu z hodowli zakażonej hodowli komórkowej. Komory z kapilarami inkubowano 18 godzin w temperaturze 37°C . Strefy migracji odrysowywano na kalce technicznej z ekranu mikroskopu projekcyjnego, wycinano i ważono. Każdy wynik był średnią migracji z 6 kapilar. Procent migracji obliczano z wzoru:

$$\frac{\text{migracja w obecności antygeny IBR}}{\text{migracja w obecności antygeny kontrolnego}} \times 100$$

Wyniki i omówienie

Uzyskane wyniki przedstawiono w tab. 1. Z zachowania się mian seroneutralizacyjnych wynika, że w dwa tygodnie po uodpornieniu w surowicy wszystkich cieląt wykazano obecność przeciwciał anti-IBR. Nie stwierdzono natomiast w tym czasie pobudzenia odporności komórkowej, czego wyrazem był brak hamowania migracji leukocytów krwi obwodowej. Druga domięśniowa dawka szczepionki spowodowała podwyższenie miana przeciwciał surowicznych, które osiągnęły najwyższy poziom między 3 i 4 tygodniem od jej podania. Hamowanie migracji leukocytów wykazano u czterech spośród pięciu cieląt, u jednego po 2 tygodniach, a u trzech po 4 tygodniach od domięśniowego podania szczepionki.

W przebiegu zakażenia wirusem IBR u bydła, podobnie jak ma to miejsce w innych zakażeniach wirusami *Herpes*, podstawową rolę odgrywają mechanizmy odporności komórkowej (1). Stąd przy ocenie immunogenności na podstawie badań *in vitro* ważniejszymi niż po-

Tab. 1. Odpowiedź immunologiczna cieląt uodpornionych donosowo i domięśniowo szczepem B-184/PL wirusa IBR

Numer cielęcia		Przed uodpornieniem	Tydzień po uodpornieniu				
			2 po pierwszym	2 po drugim	3 po drugim	4 po drugim	5 po drugim
162	miano SN	0,8	2,8	3,2	3,2	3,0	2,2
	% migracji	110	96	72	46	70	n.b.
163	miano SN	0	1,8	2,2	3,0	3,2	2,2
	% migracji	117	97	110	105	56	n.b.
164	miano SN	0	1,2	2,8	2,2	2,2	1,2
	% migracji	104	100	117	113	109	n.b.
15744	miano SN	0	2,2	3,2	4,2	3,2	2,2
	% migracji	112	116	108	118	75	n.b.
15749	miano SN	1,0	2,0	2,2	2,8	3,2	2,0
	% migracji	103	108	118	116	66	n.b.

Objaśnienie: n.b. — nie badano.

ziom mian przeciwciał wydają się wyniki in-nych prób pozwalających określić tę odpor-ność. Jednym z takich testów jest odczyn ha-mowania migracji leukocytów krwi obwodo-wej, którego dodatni wynik wskazuje na poja-wienie się we krwi limfocytów, wytwarzają-cych pod wpływem antygeny szczepionkowego limfokiny oddziaływujące na leukocyty obda-rzone zdolnością ruchu. Za wskaźnik reakcji dodatniej przyjmuje się zwykle migrację mniejszą niż 80% migracji w środowisku nie zawierającym antygeny (6, 9). We wstępnych badaniach, podobnie jak w pracy Kańtocha i wsp. (4), starano się ustalić dawkę wirusa nie wywołującą samoistnego hamowania migracji. Napotkano jednak na trudności w jej okreś-leniu, gdyż dawki wirusa nieco mniejsze od hamujących migrację wywoływały pobudzenie leukocytów. W związku z tym w dalszych ba-daniach stosowano dawki wirusa, które zwięk-szały migrację w porównaniu z antygenem kontrolnym. Stąd wartość migracji przed wy-stąpieniem komórkowej odpowiedzi immunolo-gicznej są większe niż 100%.

Przyczyna tego zjawiska jest trudna do wy-tłumaczenia. Pojawienie się pobudzenia migra-cji leukocytów zamiast hamowania w okresie po uodpornieniu jest przez niektórych uważane za wskaźnik komórkowej odpowiedzi immunolo-gicznej, związanej z wytwarzaniem limfoki-ny zwanej czynnikiem pobudzenia migracji-MEF (8). Wobec tego, że w naszych badaniach podobnie reagowały leukocyty od zwierząt nieuodpornionych reakcję tę traktowano jako nieswoistą.

Z prac nad uodpornianiem donosowymi ate-nuowanymi szczepionkami wirusowymi wyni-ka, że wyzwała ono podobną ogólną reakcję immunologiczną jak uodpornianie domięśniowe (3, 5). Potwierdzone to zostało we własnych badaniach, gdyż u wszystkich cieląt w dwa tygodnie po uodpornieniu stwierdzono w surowicy znaczne miana przeciwciał neutralizują-cych wirus IBR. W tym samym czasie nie wy-

kazano natomiast żadnych objawów pobudze-nia odporności komórkowej, mimo tego, że po-jawia się ona zwykle przed humoralną odpo-wiedzią immunologiczną. Druga, domięśniowa dawka szczepionki spowodowała wzrost miana przeciwciał neutralizujących w surowicy, a także wywołała reakcję komórkową u jednego cielęcia po 2 tygodniach, a u trzech dopiero w 4 tygodnie po uodpornieniu. Jedno ciele, mimo znacznego miana przeciwciał surowi-czych, nie wykazało hamowania migracji leu-kocytów do końca okresu obserwacji. Przy-czynny takiego zachowania się odpowiedzi im-munologicznej należy prawdopodobnie szukać we właściwościach szczepu użytego do sporządzenia szczepionki. Wobec tego, że inny pasaż tego samego szczepu podany donosowo pobu-dzał komórkową odpowiedź immunologiczną już po dwu tygodniach (7) można przypusz-czać, że w trakcie pasażowania podlega on zmianom antygenowym, dotyczącym antyge-nów odpowiedzialnych za pobudzenie limfocy-tów T. Z faktu, że po kilku tygodniach ha-mowanie migracji się jednak pojawiało, można jednak wnosić, że zmiany antygenowe miały raczej charakter ilościowy niż jakościowy. W tym czasie dochodziło prawdopodobnie do namnożenia się w organizmie uodpornianych cie-ląt wirusa szczepionkowego i powstania wys-tarczającej dawki hipotetycznego antygeny stymulującego odporność komórkową.

Z uzyskanych danych wynika więc, że nale-ży określić, które antygeny wirusa IBR są od-powiedzialne za pobudzenie odporności komór-kowej by móc kontrolować ich obecność w trakcie pasażowania. Możliwość taka istnieje w przypadku wirusa parainfluenzy-3, u którego zdolność pobudzania odporności komórkowej zależy od ilości wytwarzanej neuraminidazy (3). Dopóki nie będzie takiej możliwości w przypadku wirusa IBR przy ocenie immuno-genności szczepionki konieczne jest badanie komórkowej odpowiedzi immunologicznej, gdyż mimo zapoczątkowania wytwarzania przeciw-

ciał neutralizujących wirus może nie dochodzić do pobudzenia komórkowych mechanizmów odpornościowych.

Piśmiennictwo

1. Davies D. H., Carmichael L. E.: Infect. Immun. 3, 510, 1973.
2. Frymus T.: Zentbl. VetMed B 27, 742, 1980.
3. Gerber J. D., Marron A. E., Kucera C. J.: Am. J. vet. Res. 39, 753, 1978.
4. Kantoch M., Litwińska B., Fałęcka W., Sadowski W., Litwińska J.: Acta Microbiol. pol. 26, 421, 1977.
5. Moreno-Lopez J.: Zentbl. VetMed B 24, 231, 1977.
6. Russel A. S., Kaiser J., Lao V. S.: J. Immunol. Meth. 9, 273, 1976.
7. Schollenberger A., Prandota J.: dane nieopublikowane.
8. Weisbart R. H., Bluestone R., Goldberg L. S., Pearson G. M.: Proc. natn. Acad. Sci. USA 71, 875, 1974.
9. Woods R. D.: Am. J. vet. Res. 38, 1267, 1977.

Adres autora: dr Antoni Schollenberger, ul. Zamiany 10 m. 22, 02-786 Warszawa.

Шолленбергер А., Прадота Я. — Тест заторможения миграции лейкоцитов как показатель иммуногенности вакцины против инфекционного воспаления носа и трахеи крупного рогатого скота

Celb badań sostojała w określeniu immunizowanych swoich jedno z pasażerów atenuowanego sztammu wirusa IBR. Tęciat immunizowali wnostrz nosa i wnostrzmięszczo wakiacynoi, izgotowlennoii z tego sztammu. Immunizacja wyzwała chorošo wyrażennoii humoralnoii immuno-

logiczeskii otwet, kletocnoii że immunitet, określejamnoii na osnowe tormozenia migracji leukocytów perifericzeskoi krwi, powojala się liioż czeresz niekilożo niedel. W swołzi s tem, cto drugoi pasaż togo że samego sztammu wozbuzdał kletocnoii immunologiczeskii otwet znacitelno ranioše, wyraziłi przedpolozenie, cto posleadowali koliczeswenne antygenne izmienia wirusa. Iz provedennoii issledowanii wytekaet, cto neobchodimo issledowanii kletocnoii immunologiczeskoi otweta pri określeniu immunogenności wakiacynoii.

Schollenberger A., Prandota J. — Leukocyte migration test as an indicator of immunogenicity of IBR vaccine

The purpose of the work was to determine the immunological properties of an attenuated strain of IBR virus. Calves were immunized intranasally and intramuscularly by a vaccine prepared of the afore named strain. Immunization evoked a good humoral response but cellular immunity, determined by leukocyte migration inhibition test, occurred only after several weeks. As an other passage of the same strain induced cellular response much earlier than the aforeging, the authors concluded that same quantitative changes in the antigenic structure had to take place. The results indicate that in case of vaccine evaluation cellular response should be examined as well.

WŁODZIMIERZ KLUCIŃSKI, JOANNA KOPEC-SZLĘZAK, IZABELLA SZCZEPAŃSKA,
WANDA BORZEMSKA, EWA SITARSKA, PIOTR SZELESZCZUK, MICHAŁ PFEFFER,
GRAZYNA JAMIAŁKOWSKA

Zastosowanie „testu jąderkowego” limfocytów w diagnostyce białaczki limfatycznej u kur

Zakład Chorób Drobiu Wydziału Weterynaryjnego SGGW-AR,
ul. Grochowska 272, 03-849 Warszawa
Zakład Fizjopatologii Instytutu Hematologii, ul. Chocimska 5, 00-957 Warszawa

W przebiegu białaczki limfatycznej u kur nie stwierdzono dotychczas charakterystycznych dla tej choroby zmian w elementach komórkowych krwi. W obrazie hematologicznym obserwowano występowanie niedojrzałych form, szczególnie dużych limfoblastów i dużych limfocytów. W komórkach tych stwierdzono wypustki lub intensywnie barwiący się wąski rąbek cytoplazmy wokół dużego jądra o gąbczastej strukturze. Zmiany te podobnie jak spadek liczby erytrocytów i leukocytoza, mają charakter przejściowy i zależą od okresu choroby (1).

Z dotychczasowych badań własnych wynika, że choroby kur o wirusowej etiologii atakujące układ limfatyczny powodują wyraźnie jakościowe i ilościowe zmiany w jąderkach limfocytów krwi obwodowej. W świetle tych badań na szczególną uwagę zasługują zmiany w jąderkach limfocytów krwi obwodowej kur chorych na białaczkę limfatyczną (4). Wyniki tych obserwacji zdają się wskazywać, że ocena morfologicznych zmian jąderek w limfocytach (tzw. test jąderkowy) stanowi nowy element w przyżyciowej diagnostyce tej choroby. Jest to stosunkowo prosta metoda, dająca obiektywne wyniki.

Celem pracy było zbadania przydatności testu jąderkowego do eliminacji ze stada ptaków chorych na białaczkę limfatyczną przed wystąpieniem u nich objawów klinicznych, a następnie niedopuszczenie ich do rozrodu. Postępowanie takie mogłoby pozwolić na przerwanie pionowej, a więc głównej drogi rozprzestrzeniania się białaczki limfatycznej u kur (2, 9).

Materiał i metody

Badania przeprowadzono w fermie zarodowej, w której u kur rasy Sussex (Sx 44) wystąpiła enzootia trzewnej formy białaczki limfatycznej o śmiertelności 12,3%, zagrażająca koniecznością likwidacji rodu. Badaniami objęto 336 niosek w wieku 35 tygodni ze stadek hodowlanych będących w szczycie choroby. Diagnostyka białaczki limfatycznej została oparta na badaniach anatomopatologicznych i histopatologicznych wycinków narządów nowotworowo zmienionych od wszystkich kur padych. Wszystkie wyniki potwierdziły rozpoznanie białaczki limfatycznej. Testem radiodiffuzji w żelu agarowym wykluczono chorobę Mareka.

Wyliminowane na podstawie „testu jąderkowego” nioski były izolowane w oddzielnym pomieszczeniu i pozostawały pod obserwacją do czasu zejścia śmiertelnego. Równocześnie wyliminowano z hodowli całe potomstwo (jaja, embriony, kurczęta) od tej grupy niosek. Pozostałe nioski, u których test jąderkowy nie wykazywał wzrostu odsetka odsetka limfocytów z jąderkami aktywnymi pozostawiono do dalszego cy-