

JAN RULKA

## Zastosowanie erytrocytów ptasich do testu hemaglutynacji z wirusem parainfluenzy $PI_3$

Pracownia Patologii Komórkowej Instytutu Weterynarii, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Zaobserwowane i opisane przez Hirsta zjawisko zlepiania czerwonych krwinek zwierząt przez niektóre wirusy, posłużyło za podstawę do opracowania testu hemaglutynacji (Ha). Jednym z wirusów, który może być wykrywany tym testem jest wirus parainfluenzy  $PI_3$ , będący jedną z przyczyn zapaleń górnych dróg oddechowych u bydła. Wirus ten namnaża się w organizmie wrażliwych zwierząt (1, 2, 4, 5, 8, 16), zarodkach kurzych (14, 16) oraz w hodowlach komórek (3, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 15). W zależności od szczepu, pasażu, rodzaju użytej tkanki oraz czasu zbioru, miano wirusa w hodowli waha się w szerokich granicach od  $10^{1.0}$  do  $10^{8.8}$  TCID<sub>50</sub>. Większość szczepów wirusa  $PI_3$ , pasażowanych w hodowlach komórek wykazuje właściwości hemaglutynacyjne z erytrocytami świnki morskiej, bydła, owiec, kury, królika i człowieka (4, 7, 10, 14, 15, 16).

Według Hamdy (7) najwyraźniejszy odczyn hemaglutynacji uzyskuje się z krwinkami świnki morskiej i kury, przy czym miano Ha wynosiło 1:1280. Również Reisinger i wsp. (14), używając krwinek świnki morskiej uzyskali miano Ha 1:2048.

Celem podjętych badań było określenie wartości diagnostycznej erytrocytów kury, kaczki, gęsi i indyka w odczynie Ha z wirusem parainfluenzy  $PI_3$ , namnożonym w hodowli komórek MDBK (Madin Darby Bovine Kidney).

### Materiał i metody

Wirus. Do badań użyto 10 pasażu krajowego szczepu wirusa  $PI_3$  wyizolowanego w Zakładzie Wirusologii Instytutu Weterynarii w Puławach. Wirus ten był namnażany przez 6 kolejnych dni w hodowli komórek MDBK. Miano wirusa w płynie z hodowli wynosiło  $10^{6.66}$  TCID<sub>50</sub>/0,2 ml.

Test hemaglutynacji (Ha). Wykonano go według Larskiego (13) metodą rozcieńczeń w postępie 0,3 log. na płytach z pleksiglasu zawierających 110 studzienek o średnicy 19 mm i pojemności 4 ml.

Krwinki czerwone. Do badań użyto krwinek kury, kaczki, gęsi, indyka oraz świnki morskiej. Krew od ptaków pobierano przez nakłucie żyły skrzydłowej, zaś od świnki morskiej przez punkcję serca. Próbkę krwi pobierano do następujących antykoagulantów: A. roztwór wersenianu dwusodowego z formaliną — wersenian dwusodowy 20,0, formalina obojętna 25 ml, woda redest. 225 ml.; B. roztwór wersenianu dwusodowego bez formaliny — wersenian dwusodowy 25,0; woda redest. 225 ml, C. roztwór cytrynianu sodu — cytrynian sodu 3,8, chlorek sodu 0,9; woda redest. 100 ml. Następnie próbki krwi pozostawiano przez 60 min. w temp. pokojowej (20–22°C), po czym wirowano je przez 5 min. przy 2500 obr./min. Odwirowany osad krwinek płukano 3-krotnie 0,9% NaCl i standaryzowano przez wirowanie 10 min. przy 1000 obr./min.

Tak przygotowane krwinki używano do testu hemaglutynacji w postaci zawiesiny 0,75%.

Stężenie jonów wodorowych (pH). Odczyn Ha przeprowadzano używając PBS o pH 5,7; 6,8; 7,2 i 9,0. Skład podstawowego roztworu PBS o pH 7,2 był następujący: NaCl 16,0, KCl 0,4, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>×12H<sub>2</sub>O 5,8, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,4, woda redest. ad 2000 ml. Wyższe i niższe pH uzyskiwano dodając do buforu podstawowego odpowiednie ilości 1 N HCl lub 1 N NaOH.

### Wyniki i omówienie

Przeprowadzone badania wykazały, że wirus  $PI_3$  aglutynuje krwinki gęsi, indyka i świnki morskiej (tab. 1). Przy użyciu krwinek gęsi minimalny czas hemaglutynacji z wirusem rozcieńczonym 1:5 wynosił średnio 2,5 min. Analogiczny czas z krwinkami indyka wynosił oko-

Tab. 1. Minimalny czas inkubacji dodatniej reakcji hemaglutynacji wirusa  $PI_3$  z krwinkami różnych gatunków zwierząt

Gatunek zwierząt	Czas inkubacji odczynu Ha
Kura	—
Kaczka	—
Gęś	1–3 min.
Indyk	2–5 min.
Świnka morska	60–90 min.

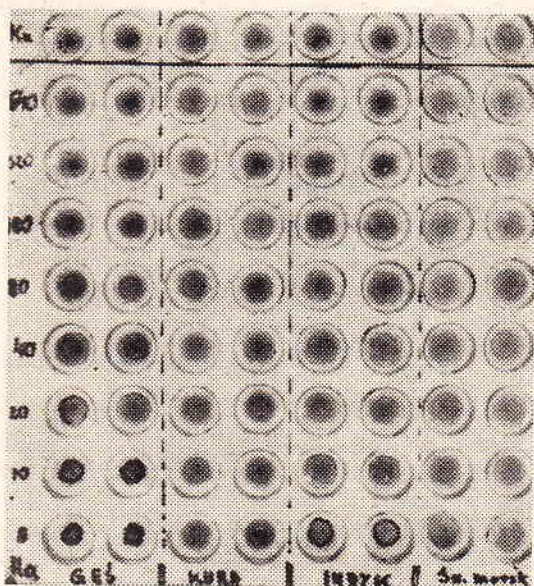
Tab. 2. Przebieg odczynu Ha z erytrocytami różnych gatunków zwierząt

Gatunek zwierząt	Miano Ha wirusa $PI_3$ w czasie: (min)				
	15	30	60	90	120
Kura	0	—	—	—	—
Kaczka	0	—	—	—	—
Gęś	1:160	1:160	E	E	E
Indyk	0	1:160	1:160	1:160	1:160
Świnka morska	0	0	0	1:80 (±160)	1:80

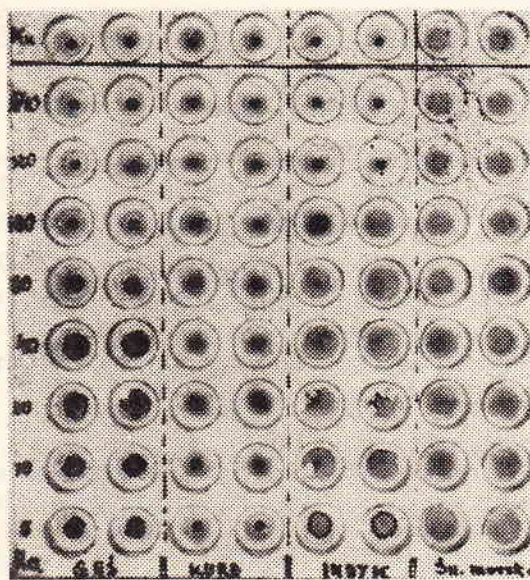
Objaśnienia: E — elucja, 0 — brak dostatecznego opadnięcia krwinek w odczynie Ha, — — ujemny wynik odczynu hemaglutynacji.

Tab. 3. Wpływ pH na miano hemaglutynacyjne wirusa  $PI_3$  przy użyciu krwinek różnych gatunków zwierząt

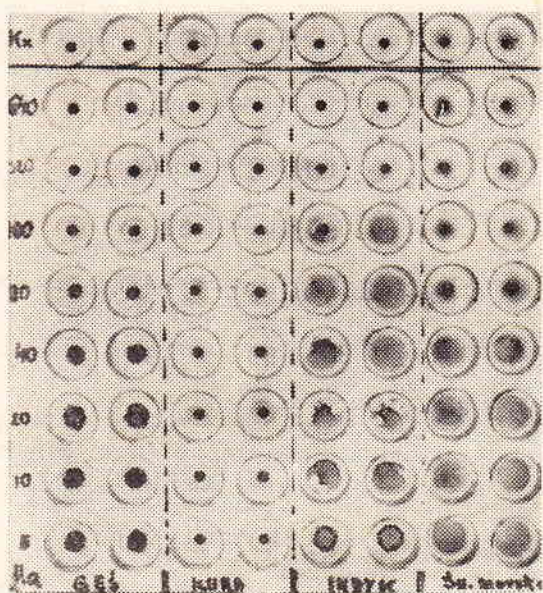
pH	Kura	Kaczka	Gęś	Indyk	Świnka morska
5,7	—	—	1:320	1:160 (±320)	1:80 (±160)
6,8	—	—	1:160	1:160	1:160
7,2	—	—	1:160	1:160	1:160
9,0	—	—	1:80	1:80	1:80



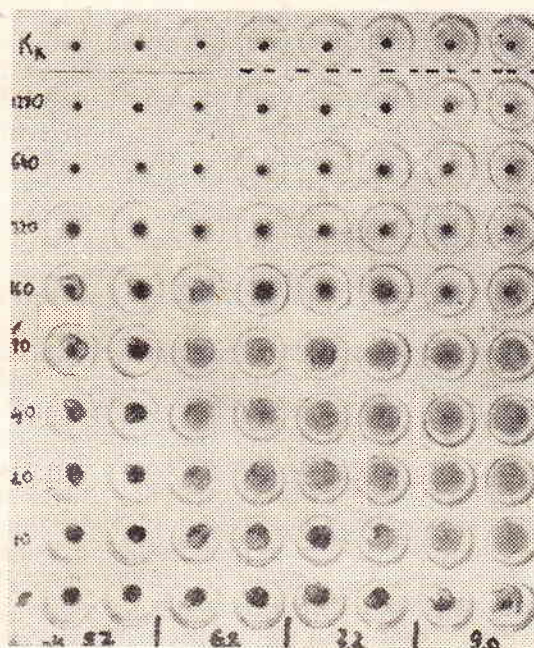
Ryc. 1. Odczyn Ha po 15 min.



Ryc. 2. Odczyn Ha po 30 min.



Ryc. 3. Odczyn Ha po 90 min.



Ryc. 4. Odczyn Ha z krwinkami gęsi po 30 min. z uwzględnieniem różnych warunków pH

ło 3,5 min., a z krwinkami świnki morskiej ponad 60 min. Przebieg odczynu Ha z różnymi rodzajami krwinek przedstawiono w tab. 2. Jak wykazano, wynik odczynu z krwinkami gęsi można było odczytać już po 15 min. (ryc. 1), z krwinkami indyka po 30 min. (ryc. 2), zaś z krwinkami świnki morskiej dopiero po 90—120 min. (ryc. 3). Używając krwinek kury i kaczki nie stwierdzono zjawiska hemaglutynacji podczas 2 godzin obserwacji.

Wpływ pH na miano Ha wirusa parainfluenzy z krwinkami różnych gatunków zwierząt, pobranymi do powszechnie stosowanego cytrynianu sodu, przedstawia tab. 3. Dodatni wynik hemaglutynacji wykazano tylko z krwinkami gęsi, indyka i świnki morskiej. Miano Ha wi-

rusa PI<sub>3</sub> z wymienionymi krwinkami uzależnione było od pH środowiska. Najwyższe wartości miana Ha uzyskano w pH 5,7 (1:320), zaś najniższe (1:80) w pH 9,0. Wpływ pH na miano Ha z krwinkami gęsi ilustruje ryc. 4. Mimo szerokiego zakresu pH nie notowano dodatniego odczynu Ha z krwinkami kury i kaczki.

Wpływ antykoagulantu na miano Ha przedstawia tab. 4. Najlepsze wyniki uzyskano z antykoagulantem A (roztwór wersenianu dwusodowego z formaliną). Przy jego użyciu miano Ha wirusa PI<sub>3</sub> nie spadło poniżej 1:160. Gorsze wyniki uzyskano z antykoagulantem B, zwłaszcza w odniesieniu do krwinek świnki morskiej.

Tab. 4. Wysokość miana hemaglutynacyjnego wirusa PI<sub>3</sub> w zależności od krwinek, pH i antykoagulantu

pH	Gęś			Indyk			Świnaka morska		
	antykoagulant A	antykoagulant B	antykoagulant C	antykoagulant A	antykoagulant B	antykoagulant C	antykoagulant A	antykoagulant B	antykoagulant C
5,7	1:320	1:160	1:320	1:160	1:320	1:320	1:160	1:160	1:320
6,8	1:160	1:160	1:160	1:160	1:320	1:160	1:160	1:80	1:160
7,2	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:80	1:160
9,0	1:160	1:160	1:80	1:160	1:160	1:80	1:160	1:80	1:80

Objaśnienia: A — Wersenian dwusodowy z formaliną, B — Wersenian dwusodowy bez formaliny, C — Cytrynian sodu.

Największy rozrzut wyników notowano przy użyciu krwinek pobranych do cytrynianu sodu (wariant C). Miano Ha z krwinkami gęsi w pH 5,7 wynosiło 1:320, a w pH 9,0 1:80. Podobną zależność miana Ha od pH odczynu wykazano z krwinkami indyka i świnki morskiej.

Najlepsze wyniki hemaglutynacji uzyskano z 0,75% krwinkami gęsi. Miarodajny wynik testu uzyskano już po 15 min. Biorąc jednak pod uwagę nieunikniony rozrzut wartości miana Ha należy zalecić odczytywanie wyniku hemaglutynacji po 30 minutach. Jak się wydaje, na tak szybkie występowanie dodatniego odczynu Ha, istotny wpływ ma niewątpliwie masa samej krwinki. Podobne rezultaty jak z krwinkami gęsi uzyskano z erytrocytami indyka. Porównawcze badania z powszechnie stosowanymi krwinkami świnki morskiej wskazują na 4—6 krotne opóźnienie odczynu Ha w stosunku do testu wykonywanego z krwinkami gęsi lub indyka.

Nieoczekiwanym stwierdzeniem był brak dodatniego odczynu Ha z krwinkami kury i kaczkami. Rezultaty te są niezgodne z wynikami Reisingera i wsp. (17) i Hamdy (7). Autorzy ci podkreślają, że najwyraźniejszy odczyn uzyskuje się z krwinkami świnki morskiej lub kury. Według Reisingera i wsp. (17), najwyższe miano Ha dla krwinek świnki morskiej wynosiło 1:2048, zaś według Hamdy (7) 1:1280. Kita (10) podaje, że miano Ha krajowych szczepów wirusa PI<sub>3</sub> z krwinkami świnki morskiej wynosiło od 1:80 do 1:160. Badania Hamdy (7) wykazały ponadto, że spośród 13 szczepów wirusa PI<sub>3</sub> 5 z nich nie wykazywało właściwości hemaglutynacyjnych w stosunku do krwinek kury, a w przypadku 8 pozostałych miano Ha wynosiło od 1:10 do 1:160. Utratę właściwości hemaglutynacyjnych szczepu RG wirusa PI<sub>3</sub> z krwinkami kury obserwował również Larski (14).

Z przeprowadzonych badań wynika również, że najlepsze rezultaty hemaglutynacji uzyskano stosując jako antykoagulant wersenian dwusodowy z formaliną. Krwinki gęsi, indyka i świnki morskiej pobrane do cytrynianu sodu wykazują dużą wrażliwość na pH odczynu, wyrazem czego jest znaczna rozbieżność wyników.

Badania wielu autorów (10, 14, 15, 17, 18) oraz uzyskane rezultaty własne pozwalają

stwierdzić, że obserwowane różnice wysokości miana hemaglutynacyjnego wirusa PI<sub>3</sub> namnożonego w hodowli komórek mogą kryć się w odmienności badanego szczepu, rodzaju krwinek, stosowanego antykoagulantu, jak i warunków prowadzonej reakcji, a więc pH.

Wprowadzenie krwinek gęsi lub indyka do testu hemaglutynacji z wirusem parainfluenzy PI<sub>3</sub>, stwarza nowe możliwości szybkiego określania ilości wirusa oraz szybkiej oceny poziomu przeciwciał anty PI<sub>3</sub> w surowicach badanych zwierząt testem zahamowania hemaglutynacji (HI).

#### Piśmiennictwo

- Bögel K.: *Mh. Tierhk.* 13, 162, 1961.
- Charton A., Faye P., Leccanet J., Lamont P. H.: *Bull. Acad. vet. Fr.* 38, 126, 1965.
- Craighead J. E.: *J. Bact.* 92, 751, 1966.
- Dawson P. S.: *Res. vet. Sci.* 5, 81, 1964.
- Dawson P. S., Darbyshire I. H., Lamont P. H.: *Res. vet. Sci.* 6, 108, 1965.
- Gale C., King N. B.: *J. Am. vet. med. Ass.* 138, 253, 1961.
- Hamdy A. H.: *Cornell Vet.* 4, 623, 1965.
- Hamdy A. H., Trapp A. L., Gale C., King N. B.: *Am. J. vet. Res.* 24, 287, 1963.
- Kahn D. E., Kita J., Gillespie J. H.: *Cornell Vet.* 3, 431, 1969.
- Kita J.: *Pol. Arch. wet.* 14, 511, 1971.
- Kita J.: *Cornell Vet.* 58, 217, 1968.
- Kita J., Kenny R. M., Gillespie J. H.: *Cornell Vet.* 59, 355, 1969.
- Larski Z.: *Wirusologia weterynaryjna*. PWRiL, Warszawa 1965.
- Larski Z., Grabowska G.: *Med. dośw.* 27, 373, 1975.
- Majewska H., Baczyński Z.: *Bull. vet. Inst. Puławy* 19, 79, 1973.
- Marschall R.: *J. Bact.* 88, 267, 1964.
- Reisinger R. C., Heddleston K. L., Manthel C. A.: *J. Am. vet. med. Ass.* 135, 147, 1959.
- Woods G. T., Skibmovic K., Segree D., Thurman J.: *Am. J. vet. Res.* 25, 1021, 1964.

Adres autora: dr Jan Rułka ul. Dzierżyńskiego 17/6, 24-100 Puławy

Рулка Я. — Применение птичьих эритроцитов для критерия геммагглютинации с вирусом параинфлюэнцы PI<sub>3</sub>

Проведенные исследования показали, что вирус параинфлюэнцы PI<sub>3</sub> агглютинирует кровяные тельца гуся, индейки и морской свинки, не агглютинирует же кровяных телец курицы и утки. Положительный результат критерия геммагглютинации (Ha) с кровяными тельцами гуся отмечался по истечении 15 мин., с кровяными тельцами индейки — через 30 мин., а с кровяными тельцами морской свинки — лишь через 90—120 мин. Наблюдалась отчетливая зависимость титра Ha вируса PI<sub>3</sub> от pH реакции. Наивысше титру получено, используя эритроциты крови, для которой в качестве антикоагулянта применялся двунаатриевый версенат с формалином.

Rulka J. — **Employing of poultry erythrocytes to the HA test in case of parainfluenza PI3 virus**

Erythrocytes of geese, turkeys and guinea pigs, except hens and ducks, agglutinated under the influence of PI-3 virus. The positive results of haema-

gglutination with red blood cells of geese, turkeys and guinea pigs took place after 15, 30 and 90—120 min., respectively. There was a close relationship between the HA titre of the virus and pH of the solution used. The highest titre was found when erythrocytes were suspended in a disodium versenate solution with formalin.

## HIGIENA ŻYWNOŚCI ZWIERZĘCEGO POCHODZENIA

JAN URADZIŃSKI, JOANNA SZTEYN, STANISŁAW KAFEL

### Badania nosicielstwa drobnoustrojów rodzaju *Campylobacter* u zwierząt rzeźnych

Katedra Higieny Produktów Zwierzęcych Wydziału Weterynaryjnego ART,  
10-957 Olsztyn-Kortowo II~

Rola drobnoustrojów rodzaju *Campylobacter* w schorzeniach przewodu pokarmowego u ludzi i zwierząt jest już w pewnym stopniu poznana. Drobnoustroje te rozpowszechnione są wśród zwierząt jako komensale, które w określonych warunkach mogą wywołać chorobę (2, 3, 4, 6, 16, 17, 21). Od kilku lat *Campylobacter jejuni* (coli) uważany jest za ważny czynnik etiologiczny ostrych zatruc pokarmowych u ludzi (2, 7—10, 14, 27). Jak wynika z danych opublikowanych przez WHO (26) na terenie Anglii, Walii i Północnej Irlandii, gdzie badania w kierunku *Campylobacter sp.* prowadzone są systematycznie od kilku lat, zanotowano kilkakrotny wzrost liczby przypadków zatruc pokarmowych wywołanych przez te bakterie. W 1985 r. liczba zachorowań wywołanych przez *C. jejuni*/coli w tych krajach przekroczyła 23 tysiące i była 2-krotnie wyższa w porównaniu z liczbą przypadków, w których czynnikiem etiologicznym były pałeczki *Salmonella* (26). Należy podkreślić, że przedstawione dane obejmują jedynie zachorowania zgłoszone urzędowo. Główne źródło zakażenia dla ludzi stanowiła zanieczyszczona tymi bakteriami żywność oraz woda (1, 3—5, 8, 10, 11, 13, 15, 19, 22—25).

Wśród wielu gatunków zwierząt istotną rolę w łańcuchu epizootologiczno-epidemiologicznym kampylobakterioz odgrywają zwierzęta rzeźne oraz drób (1, 3, 5, 17—21, 23—25, 27). W licznych publikacjach (1, 3—5, 8, 13, 17, 18, 24, 27) zwraca się szczególną uwagę na drób i dzikie ptactwo jako największy rezerwuuar drobnoustrojów z rodzaju *Campylobacter*. W Polsce odczuwa się wyraźny brak danych dotyczących częstości występowania drobnoustrojów z rodzaju *Campylobacter* u zwierząt rzeźnych. W związku z tym podjęto badania własne, których celem było określenie częstości nosiciel-

stwa tych bakterii u świń, bydła oraz drobiu rzeźnego z terenu województwa olsztyńskiego.

#### Materiał i metody

Badaniom bakteriologicznym poddano 993 próbki kału pochodzące od świń, bydła, kurcząt, gęsi, kaczek i indyków.

Kał, bezpośrednio po pobraniu, wysiewano eż na podłoże wybiórcze Skirrow zawierające: Brucella agar (Difco) — 43 g/l l, krew końską odwióknioną — 70 ml/l l oraz zestaw antybiotyków — wankomycyna 10 mg, polimyksyna B 2500 i.u., trimethoprim 5 mg/l l (wg Bio-Mériéux — Francja).

Posiane podłoża inkubowano w temp. 42°C przez 48 godz. w mieszaninie gazów zawierającej: 5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> i 90% N<sub>2</sub>. Po okresie inkubacji każdy typ wyrosłych kolonii podejrzanych o przynależność do rodzaju *Campylobacter* badano w mikroskopie kontrastowo-fazowym, a następnie stosowano testy różnicujące: wytwarzanie katalazy i oksydazy, zdolność do wzrostu w temp. 25°C i 42°C, wzrost na podłożu zawierającym 1% glicyny i 3,5% NaCl, wrażliwość na cefalotynę i kwas nalidyksowy oraz zdolność hydrolizy hippuranu sodu (12, 18).

Wszystkie wyizolowane bakterie Gramujemne, katalazododatnie i oksydazododatnie, posiadające kształt wydłużony, spiralnie skręcone, wykazujące charakterystyczny ruch postępowo-zwrotny klasyfikowano jako *Campylobacter*. Szczepy wykazujące zdolność hydrolizy hippuranu sodu określano jako *C. jejuni*, a nie posiadające tej cechy jako *C. coli*. Szczepy odporne na kwas nalidyksowy uznawano za *C. laridis* (NARTC). Biotyp *Campylobacter jejuni* określano w oparciu o test na wytwarzanie H<sub>2</sub>S w podłożu FBP (18).

#### Wyniki i omówienie

Uzyskane wyniki badań zestawiono w tab. 1 i 2.

W tab. 1 przedstawiono częstość występowania drobnoustrojów z rodzaju *Campylobacter* u świń, bydła oraz drobiu rzeźnego. Spośród 6 gatunków badanych zwierząt, drobnoustroje te najczęściej izolowane były od kaczek —