

EDWARD TRYBAŁA

Właściwości hemaglutynacyjne wirusów choroby Aujeszkyego i opryszczki zwykłej. Doniesienie wstępne

Katedra Mikrobiologii Weterynaryjnej Wydziału Weterynaryjnego AR-T,
Kortowo II, bl. 105, 10-957 Olsztyn

Badania właściwości hemaglutynacyjnych wirusów, oprócz korzyści teoretycznych wynikających z faktu poznania mechanizmów interakcji wirus-komórka, znajdują także praktyczne zastosowanie w teście hamowania hemaglutynacji (SI), najprostszym odczynie serologicznym możliwym do wykonania prawie w każdych warunkach. Spośród wirusów rodziny *Herpesviridae* właściwości hemaglutynacyjne opisano u zaledwie kilku z nich, tj. u wirusa zapalenia krtani i tchawicy kotów (1, 5), wirusa zapalenia krtani i tchawicy kur (4), wirusa ronienia klaczy (3) i u wirusa zapalenia nosa i tchawicy oraz otrętu bydła (2). Te ostatnie badania autorów radzieckich, wykonane przy użyciu krwinek myszy szczepu C57Br, wzbudziły większe zainteresowanie dopiero po ich powtórzeniu w ośrodku kanadyjskim (6). W Katedrze Mikrobiologii Wet. AR-T od kilku lat prowadzone są próby poszukiwania właściwości hemaglutynacyjnych u innego ważnego herpeswirusa — wirusa choroby Aujeszkyego, a także u prototypowego herpeswirusa — wirusa opryszczki zwykłej człowieka.

Materiał i metody

Do badań użyto szczepów TK-900/4a i NIA-3 (Katedra Epizootiologii Wydziału Weterynaryjnego AR-T w Olsztynie) wirusa choroby Aujeszkyego oraz szczepów McIntyre (Zakład Wirusologii AM w Warszawie), HSZP (Zakład Wirusologii Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej we Wrocławiu), a także izolatów „oko” (Zakład Wirusologii PZH w Warszawie) i MJ-87 (izolat własny) wirusa opryszczki zwykłej człowieka. Wirus choroby Aujeszkyego namnażano w hodowli komórek nerki królika (RK-13), zaś wirus opryszczki w hodowlach komórek nerki małpy (Vero, CV-1, GMK) i w RK-13. Hodowle zakażano dawką około 1 TCID₅₀ na komórkę i po odpowiednim czasie od chwili zakażenia pobierano zakaźny płyn utrzymujący (płyn Parkera bez surowicy) zarówno z hodowli 3-krotnie zamrażanych i odmrażanych, jak i nie poddanych temu zabiegowi. Przed badaniem właściwości hemaglutynacyjnych płyny wirowano przy 4000 X g przez 20 min. Kontrolę stanowiły hodowle nie zakażone.

Test hemaglutynacji wykonano metodą Trépaniera i wsp. (6) używając płytek typu „V” (Plastomed) oraz 0,4% krwinek bydła, konia, owcy, psa, świni, człowieka, królika, świnki morskiej, kury, 15-dniowego zarodka kurzego, gęsi, indyka oraz myszy szczepów NMRI i C57Bl10/su. Krwinki pobierano do 3,8% roztworu cytrynianu sodowego i natychmiast płukano je 3-krotnie izotonicznym 0,02M buforem fosforanowym o pH 7,0.

Test hamowania hemaglutynacji (HI) wykonano sposobem opisanym dla wirusa zapalenia nosa i tchawicy oraz otrętu bydła przez Trépaniera i wsp. (6), z tym, że surowice nie były wstępnie rozcieńczane przed usuwaniem nieswoistych inhibitorów, wirus inkubowano z surowicą przez 2 h w 37°C, a po dodaniu krwinek płytki wstrząsano i umieszczano w tempera-

turze 4°C na 2 h. Surowice ludzkie, dodatnie i ujemne dla wirusa opryszczki otrzymano z Instytutu Mikrobiologii AM w Krakowie. Źródłem dodatnich surowic dla wirusa choroby Aujeszkyego były świnię miniaturę dwukrotnie immunizowane szczepionką „Suivac” w odstępie 14 dni. Surowice przed badaniem inaktywowano w temperaturze 56°C przez 30 min.

Test seroneutralizacji (SN) wykonano mikrometodą z użyciem seryjnych dwukrotnych rozcieńczeń surowicy i 100 TCID₅₀ wirusa.

Wyniki i omówienie

Wirusy choroby Aujeszkyego i opryszczki zwykłej aglutynowały jedynie krwinki myszy szczepu C57Bl10/su. Z krwinkami myszy NMRI otrzymano niewyraźny obraz hemaglutynacji.

Tab. 1. Odwrotność mian hemaglutynacyjnych szczepów wirusa choroby Aujeszkyego i opryszczki zwykłej namnażanych w hodowlach komórek linii ciągłych RK-13, Vero, CV-1 i GMK

Wirus	Hodowla komórek			
	RK-13	Vero	CV-1	GMK
Opryszczki zwykłej (30h):				
szcep McIntyre	32	32	32	64
szcep HSZP	<2	<2	<2	<2
izolat „oko”	16	32	32	64
izolat „MJ-87”	16	8	16	16
choroby Aujeszkyego (48h):				
szcep TK-900/4a	128	n.b.	n.b.	n.b.
szcep NIA-3	16	n.b.	n.b.	n.b.
Kontrola	<2	<2	<2	2

Objaśnienie: n.b. — nie badano; w nawiasach podano czas zbioru wirusa po zakażeniu

Tab. 2. Miana HI i SN dodatnich i ujemnych surowic dla wirusów choroby Aujeszkyego i opryszczki zwykłej

Surowica dla wirusa opryszczki zwykłej	Odwrotność miana HI	Odwrotność miana SND ₅₀
królicza nr 1	<4	<4
królicza nr 2	16	45
ludzka nr 3603	<4	<4*
ludzka nr 3891	<4	<4*
ludzka nr 3645	64	178
ludzka nr 3647	64	294
choroby Aujeszkyego		
świńska nr 2	<4	<4
świńska nr 6	<4	<4
świńska nr 7	<4	<4
świńska nr 8	<4	<4
świńska nr 27	16	22
świńska nr 31	32	89
świńska nr 32	128	112
świńska nr 33	64	211

Objaśnienie: x — miana w odczynie wiązania dopełniacza wykonanym w Instytucie Mikrobiologii AM w Krakowie.

Wirus choroby Aujeszkyego wykazywał właściwości hemaglutynacyjne jedynie w temperaturze 4°C, natomiast wirus opryszczki aglutynował krwinki również w temperaturze pokojowej i w 37°C, jednakże uzyskane miana były od 2 do 8-krotnie niższe niż w 4°C. Zamrażanie i odmrażanie zakażonych komórek pozwalało na wykazanie właściwości hemaglutynacyjnych obu wirusów w znacznie krótszym czasie po zakażeniu. Miana hemaglutynacyjne szczepów wirusa choroby Aujeszkyego i opryszczki zwykłej namnażanych w hodowlach komórek różnych linii ciągłych, poddanych 3-krotnemu zamrażaniu i odmrażaniu w momencie zbioru, przedstawiono w tab. 1. Fuzjogeny szczep HSZP wirusa opryszczki również wykazywał właściwości hemaglutynacyjne w preparatach pobranych w co najmniej 36 h po zakażeniu komórek. Trépanier i wsp. (5) nie stwierdzili właściwości hemaglutynacyjnych u szczepu Mayo 1814 wirusa opryszczki wobec krwinek myszy C57Bl/HPB. Różnice te tłumaczyć można odmiennym sposobem zbioru wirusa, który w badaniach tych autorów nie był uwalniany z komórek przez zamrażanie i odmrażanie, lub też użyciem krwinek nieco innego szczepu myszy.

Specyficzność reakcji hemaglutynacji zarówno u wirusa choroby Aujeszkyego, jak

i opryszczki zwykłej potwierdzono testem HI (tab. 2). Tylko dodatnie surowice w teście seroneutralizacji miały zdolność do hamowania hemaglutynacji.

Obecnie w Katedrze Mikrobiologii Wet. AR-T w Olsztynie prowadzone są prace dotyczące standaryzacji testu HI do wykrywania przeciwciał dla wirusa choroby Aujeszkyego.

Piśmiennictwo

1. Gillespie J. H., Judkins A. D., Scott F. W.: Cornell Vet. 61, 159, 1971.
2. Kryukov N. N., Solugub V. K., Suljak A. F.: Veterinarija, Moskwa (1), 26, 1982.
2. McCollum W. H., Doll E. R., Bryans J. T.: Am. J. vet. Res. 17, 267, 1956.
4. Prokofieva M. T., Babkin V. F.: Veterinarija, Moskwa (2), 24, 1965.
5. Trepanier P., Minocha H. C., Ibrahim A. L., Sheikh Omar A. R., Montpetit C., Lecomte J., Alain R., Lussier G., Trudel M.: Vet. Microbiol. 18, 219, 1988.
6. Trepanier P., Seguin C., Bastien Y., Boulay G., Lussier G., Trudel M.: Vet. Microbiol. 10, 517, 1985.

Adres autora: dr Edward Trybała, Kortowo bl. 45D m. 4, 10-957 Olsztyn

Trybała E. — Haemagglutination Aujeszky's disease virus and herpes simplex virus type 1. A preliminary report

Two strains (TK-900/4a and NIA-3) of Aujeszky's disease virus as well as two strains (McIntyre and HSZP) and two clinical isolates of herpes simplex virus type 1 were found to agglutinate C57Bl10/su mouse red blood cells. This haemagglutination was inhibited by antisera that neutralize viral infectivity.

STANISŁAW KLIMENTOWSKI, JANUSZ PAWĘSKA*, JAN KURYSZKO**

Przydatność testów SIA i AGID oraz badań ultrastrukturalnych do wykrywania zakażeń wirusem enzootycznej białaczki bydła*)

Katedra Epizootologii i Kliniki Chorób Zakaźnych; * Katedra Mikrobiologii Weterynaryjnej;
** Katedra Histologii i Embriologii Wydziału Weterynaryjnego AR, Pl. Grunwaldzki 45, 50-366 Wrocław

Materiał i metody

Badania wykonano u 98 cieląt i jałówek rasy ncb, pochodzących od krów ze stada, w których odsetek zakażeń BLV wynosił ponad 80%. Zwierzęta podzielono na 6 grup wiekowych:

- grupa I — 10 cieląt w wieku 3—5 dni;
- grupa II — 9 cieląt w wieku 7—14 dni;
- grupa III — 10 cieląt w wieku 6—8 tygodni;
- grupa IV — 32 cielęta w wieku 5—6 miesięcy;
- grupa V — 22 jałówki w wieku 16—18 miesięcy;
- grupa VI — 20 jałówek w wieku 22—24 miesięcy (7—8 miesiąc ciąży).

Kontrolę ujemną stanowiło 5 cieląt w wieku 3—5 dni, pochodzących z obory uznanej za wolną od EBB.

Badania serologiczne testem AGID wykonano przy użyciu antygeny gp firmy „Hoechst”.

Do badań SIA użyto limfocytów krwi obwodowej pobranej do sterylnych strzykawek z heparyną (10 μm/lml krwi), izolowanych następnie przy użyciu Ficollu (Pharmacia) i Uropoliny o ciężarze właściwym 1,069 g/ml. Układ wskaźnikowy stanowiła hodowla komórek CC81 (Cat Cells 81 — fibroblasty kota transformowane wirusem mięsaka myszy). Macierzystą hodowlę komórek CC81 prowadzono w butelkach o powierzchni wzrostu 75 cm². Po 72—96-go-

We wcześniejszym opracowaniu przedstawiono wyniki badań nad adaptacją testu syncytialnego (SIA — Syncytial Infectivity Assay) do wykrywania BLV (Bovine Leukemia Virus) w limfocytach krwi obwodowej naturalnie zakażonego bydła (9). SIA wydaje się być szczególnie przydatnym do diagnostyki zakażeń BLV u cieląt posiadających przeciwciała siarowe oraz u zwierząt zakażonych latentnie, u których brak jest reakcji serologicznych. Ma to duże znaczenie epizootologiczne, ponieważ pozwala eliminować ze stada zwierzęta reagujące ujemnie w badaniach serologicznych, obniżając w ten sposób ryzyko nowych zakażeń.

W niniejszej pracy przedstawiono wyniki badań porównawczych nad wartością diagnostyczną testu SIA, AGID oraz badań ultrastrukturalnych limfocytów u cieląt i jałówek objętych programem uwalniania od enzootycznej białaczki bydła (EBB).

*) Praca wykonana w ramach CPBR nr 10.4.