

należy kierować się następującymi kryteriami: jak najniższym działaniem ubocznym, łatwością kontrolowanego podawania przy jednoczesnym dużym jednorazowym stężeniu środka oraz działaniem preparatu ukierunkowanym na makrofagi, które odgrywają rolę w prawidłowej inicjacji reakcji odpornościowej.

Piśmiennictwo

1. Al-Izzi S. A., Marie M. G.: Am. J. Vet. Res. 43, 2244, 1982.
2. Bartnicka B.: Wpływ doświadczalnego zarażenia prosiąt larwami *Oesophagostomum dentatum* oraz stosowania preparatów bódźcowych na wybrane parametry odporności komórkowej. Praca dokt., Puławy, 1984.
3. Bartnicka B., Kondraki M.: Medycyna Wet. 40, 693, 1984.
4. Bogdanikowa B.: Post. Hig. 33, 125, 1979.
5. Brunner C. J., Muscoplat C. C.: J. Am. Vet. med. Ass. 176, 1159, 1980.
6. Cygan Z.: Medycyna Wet. 33, 654, 1977.
7. Cygan Z., Barez I., Sikorski T.: Medycyna Wet. 37, 458, 1981.
8. Dąbrowska M., Oriowski K.: Wład. lek. 41, 1665, 1988.
9. Dębowy J., Obmińska-Tomorzak B.: Medycyna Wet. 43, 357, 1987.
10. Euzeby J. P.: Rev. Med. Vet. 137, 417, 1986.
11. Euzeby J. P.: Rev. Med. Vet. 137, 499, 1986.
12. Fischer G. W., O'Brien J., Hokama Y., Maybee D., Chou S. C.: Cancer Treatment Rep. 32, 1637, 1978.
13. Fliszar-Maliszewska E.: Skojarzone działanie cytostatyków i immunomodulatorów na rozwój przeszczepialnych nowotworów. Praca dokt., Wrocław 1982.
14. Flaming K. P., Blecha F., Fedorka-Craay P. J., Anderson G. S.: Am. J. Vet. Res. 10, 1653, 1989.
15. Furowicz A., Brocla D., Łoczewski P., Czernomysy-Furowicz D.: Medycyna Wet. 5, 289, 1989.
16. Furowicz A., Gos Z., Grupiński T., Czernomysy-Furowicz D.: Medycyna Wet. 45, 30, 1989.
17. Furowicz A., Czernomysy-Furowicz D., Gos Z., Grupiński T., Lewandowska S.: Nowości Wet. 2, 77, 1989.
18. Furowicz A., Grupiński T., Czernomysy-Furowicz D.: Nowości Wet. 3-4, 143, 1989.
19. Furowicz A.: Przegl. hod. 8, 28, 1989.
20. Furowicz A., Czernomysy-Furowicz D., Lewandowska S., Grupiński T., Łoczewski P.: Przegl. hod. 9, 10, 1989.
21. Garbuliński T.: Mat. VIII Kongresu PTNW, Warszawa 1987.
22. Gieldanowski J.: Immunoterapia. Wszelchnica PAN, Ossolineum, 1984.
23. Gieldanowski J.: Post. Hig. 38, 557, 1984.
24. Gil J.: Badania doświadczalne i kliniczne nad działaniem preparatu *Propionibacterium granulosum* w zakażeniach wirusowych wątroby ze szczególnym uwzględnieniem PAZW HBS Ag (-). Praca hab., Warszawa 1984.
25. Gil J., Ziemka J., Brzośko W. J., Dąbrowski M., Dobrowska-Bernstein B., Szmigielski S., Ko H. L., Jeljaszewicz J., Pulverer G.: Hepato-gastroenterd. 31, 109, 1984.
26. Hennessy K. J., Blecha F., Polmann D. S., Kluber E. F.: Am. J. Vet. Res. 48, 477, 1987.
27. Hof H., Pulverer G.: Med. Microbiol. Immunol. 176, 75, 1987.
28. Izdebska-Szymona K., Sitnicka E.: Post. Hig. 41, 211, 1987.
29. Jakontuk P., Sacha P., Borowski J.: Med. Dośw. 41, 15, 1989.
30. Janiak M.: Modyfikacja nieswoistych reakcji cytotoksyczności komórkowej pod wpływem preparatu *Propionibacterium granulosum* KP-45. Praca hab., Warszawa 1986.
31. Janusz M.: Post. Hig. 42, 173, 1988.
32. Koller L. D.: JAVMA, 181, 1102, 1982.
33. Kowalska M., Denys A., Szudłowska T., Biatek J.: Mat. IV Kraj. Symp. Wirusol. Łódź 1985.
34. Lefrancier P.: Comp. Immun. 3, 171, 1985.
35. Malinowski E.: Skojarzone leczenie antybiotykami i środkami wspomagającymi podklinicznych postaci zapalenia gruczołu mlekowego krów w okresie laktacji. Praca hab., Puławy 1989.
36. Matusiewicz R., Wacek W.: Przegl. lek. 42, 557, 1985.
37. Matusiewicz R., Wacek W.: Przegl. lek. 41, 1630, 1988.
38. Płużńska A., Stęprżyńska J., Szmigielski S., Łuczak M., Jeljaszewicz J., Pulverer G.: Anticancer Res. 5, 521, 1985.
39. Purswell B. J., Dave D. L., Brown J., Williams D. J.: Am. J. Vet. Res. 49, 356, 1988.
40. Reza H. R., Ardeholi S., Fabbri B., Teplitz R. L.: Nat. Immun. Cell. Growth. Regul. 6, 167, 1987.
41. Roszkowski K., Gil J., Roszkowski W., Szmigielski S., Nowakowski W., Ko H. L., Pulverer G., Jeljaszewicz J.: Eur. J. Respir. Dis. 62, 425, 1985.
42. Sachochocki Z.: Nieswoista immunostymulacja w leczeniu przewlekłej czyrączności. Praca dokt., Warszawa 1985.
43. Skórski T.: Postępy Biol. 13, 51, 1986.
44. Soroko W.: Ocena czynności układu granulocytów u żołnierzy z nawracającą czynnością leczonych preparatem immunostymulującym *Propionibacterium granulosum*. Praca dokt., Warszawa 1985.
45. Wojskiewicz J.: Post. Hig. 32, 443, 1978.
46. Wójcik M.: Farm. Pol. 41, 133, 1985.

Adres autora: lek. wet. Iwona Markowska-Daniel, ul. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

KONRAD MALICKI, ANNA ŁADYŃSKA, ELŻBIETA MALICKA *

Morfologia i właściwości hemaglutynujące koronawirusa jelitowego cieląt. II. Koronawirusowa hemaglutynacja i elucja z erytrocytami szczura*)

Zakład Wirusologii Katedry Mikrobiologii
i * Katedra Patologii Wydziału Weterynaryjnego SGG-AR,
ul. Grochowska 272, 03-849 Warszawa

Summary

Morphology and haemagglutinating activity of calf intestinal coronavirus. II. Haemagglutination and elution procedures of calf coronavirus with rat erythrocytes

The detection of coronaviruses in calf faeces by the haemadsorption-elution-haemagglutination assay (HE-HA), described by van Balken et al. (1), may be employed in different laboratory procedures. The experiments were done with coronavirus 800 (11), propagated in faetal lung cells of the calf (10), and rat erythrocytes. There were determined: a) the influence of erythrocyte concentrations on the effectiveness of the haemadsorption-elution assay (Table 1), b) the receptor capacity of erythrocytes assessed in suspensions of a different concentration (Table 2), c) the conditions of the effective elution assay after prior repeated adsorption to erythrocytes (Table 3, 4), d) the possibility of the eluted coronavirus to bind to new erythrocytes, e) the influence of temperature (37—70°C) on the activity of coronavirus haemagglutinin. The usefulness of the obtained parameters was checked using gut washings from diarrhoeic calves. Virions of the virus following the haemadsorption procedure to the surface of rat erythrocytes have been presented (Fig. 1, 2).

Wykrywanie koronawirusa w biegunkowych odchodach cieląt przez zastosowanie techniki hemadsorpcji-elucji w próbie hemaglutynacji (HE-HA), opisane przez van Balkena i wsp. (1), może mieć szersze zastosowanie laboratoryjne, np. do oczyszczania i zagęszczania koronawirusa namnażanego *in vitro*, wykrywania swoistych przeciwciał w testach blokowania itp. Celem pracy było bliższe poznanie parametrów koronawirusowej hemaglutynacji-elucji.

Materiał i metody

Do badania użyto Coronawirusa 800 (11), uzyskanego od Dr W. Eichhorna z Instytutu Mikrobiologii i Chorób Zakaźnych Wydziału Weterynaryjnego w Monachium. Koronawirus namnażano w subkulturach komórek płodowych płuc cieląt (2, 10). W kolejnych pasażach uzyskiwano miano zakaźne rzędu $10^{4,0-4,4}$ CCID₅₀/ml i hemaglutynacyjne 32—128 HJ. Warunki wykonywania hemaglutynacji (HA) wzorowano na sposobach, jakie podali Larski (5) i Chengping (2). Przy wykonywaniu adsorpcji dodawano do wirusa o znanym mianie odpowiednią objętość przepłukanych erytrocytów szczura, potrzebną do uzyskania żądanej, końcowej koncentracji i inkubowano w temperaturze 4°C przez 1 h. Następnie materiał wirowano z szybkością 1500 obr./min. przez 10 minut i zbierano supernatant do wykonania prób kontrolnych. Osad erytrocytów ze związanym wi-

*) Badania finansowane w C.P.B.P. 04.02., temat 1.6.10.

ruszem płukano za pomocą PBS w temperaturze 4°C, po czym ponownie wirowano w tych samych co poprzednio warunkach. Supernatanty uzyskiwane po adsorpcji i po płukaniu sprawdzano na obecność niezwiązanego koronawirusa w teście HA, mikrometodą płytkową z 0,5% zawiesiną erytrocytów, uzyskanych od dekapitowanych białych szczurów. Jako rozcieńczalnika używano fosforanowego, buforowanego roztworu fizjologicznego (NaCl-PP) z dodatkiem 1% płodowej surowicy cielęcej (PSC). Elucję wirusa z erytrocytów wykonywano inkubując materiał przez 2 h w temperaturze 37°C stacjonarnie (łaźnia wodna) lub z zastosowaniem wytrząsania (cieplarka). Następnie materiał wirowano jak uprzednio w celu uzyskania supernatantów do badań kontrolnych dla wykazania, ewentualnie zmianowania wirusa. Odzyskiwane erytrocyty badano na zdolność wiązania się ze świeżą porcją wirusa lub też uwalniania wirusa w kolejno powtarzanych zabiegach elucji. Przy oznaczaniu wrażliwości koronawirusowej hemaglutyniny na temperaturę, próbki wirusa o znanym mianie ogrzewano przez 30 minut w łaźniach wodnych o temp. 37°, 45°, 50°, 55°, 60°C, 70°C, po czym ponownie mianowano wirus w HA. Kontrolę stanowiły próbki przechowywane w temperaturze pokojowej. Do prób HE-HA wykorzystano popłuczyny jelitowe padłych lub zgładzonych cieląt, chorujących z objawami biegunki. Miano HA popłuczyn określało przy użyciu 1% i 0,1% zawiesiny erytrocytów szczura. Podejmowano próby obserwacji w mikroskopie elektronowym, koronawirusów zaadsorbowanych do powierzchni erytrocytów oraz w preparatach wykonywanych z osadów uzyskiwanych po cwirowaniu supernatantów powstałych po adsorpcji i elucji. Zawiesiny koronawirusa i krwinek kontrastowano negatywnie solą sodową kwasu fosforowolframowego lub octanem uranylu. Dokumentację sporządzano w mikroskopie elektronowym transmisyjnym JEM 100 C.

Wyniki i omówienie

Wpływ koncentracji zawiesiny erytrocytów na wyniki adsorpcji i elucji koronawirusa

Do zawiesiny koronawirusa 800 o mianie zakaźnym $10^{4.4} \text{CCID}_{50}/\text{ml}$ i mianie HA-64 HJ, dodano erytrocyty w objętości niezbędnej do uzyskania końcowej koncentracji 5%. Po zakończonej adsorpcji i następnie elucji, oznaczano miano HA supernatantów mikrometodą płytkową oraz zdolność erytrocytów do wiązania nowej porcji koronawirusa. Wirus został całkowicie zaadsorbowany do erytrocytów, natomiast wydajność elucji była niewielka. Odzyskane erytrocyty nadal wiązały nową porcję tego samego wirusa, mimo pewnej utraty zdolności do spontanicznego osiadania. W kolejnych doświadczeniach dodawano różne objętości erytrocytów do takiej samej zawiesiny koronawirusa, w celu uzyskania końcowych koncentracji 5%, 3%, 1%, 0,5%, 0,1% i wykonywano adsorpcję i elucję w tych samych warunkach. Wyniki podano zbiorczo w tab. 1. Przy każdej użytej koncentracji erytrocytów adsorpcja wirusa była pełna, natomiast wydajność elucji była odwrotnie proporcjonalna do koncentracji erytrocytów. Zdolność do elucji wydawała się być zależna od wzajemnych ilościowych stosunków koronawirusowej hemaglutyniny i „pojemności receptorowej” dodanych erytrocytów.

Określenie receptorowej pojemności erytrocytów szczura

Doświadczenie polegało na trzykrotnym dodaniu świeżych porcji koronawirusa do tych samych erytrocytów, stanowiących 5% objętości powstałej zawiesiny i wykonaniu tylko adsorpcji. Okazało się, że 5% zawiesina erytrocytów posiada dużą pojemność receptorową, której nie wypełnia zastosowany system wysycenia koronawirusem (po 3 adsorpcji nadal nie stwierdzano obecności wolnego koronawirusa w supernatancie). W kolejnych doświadczeniach zastosowano niższe końcowe

Tab. 1. Wyniki elucji w zależności od koncentracji erytrocytów użytych do adsorpcji koronawirusa

Rodzaj supernatantu	Miano HA po adsorpcji i po elucji wirusa do erytrocytów szczura o koncentracji:				
	5%	3%	1%	0,5%	0,1%
Po adsorpcji	0	0	0	0	0
Po elucji	0	2	8	32	64
Po przepłukaniu erytrocytów PBS	0	0	2	4	8

Tab. 2. Zdolność erytrocytów szczura użytych w różnych koncentracjach do wychwytywania koronawirusa 800 w kolejnych adsorpcjach

Kolejna adsorpcja	Miano HA supernatantów po kolejnej adsorpcji do erytrocytów użytych w koncentracji:			
	1%		0,5%	0,1%
	128 HJ *	64 HJ *	64 HJ *	64 HJ *
1	0	0	0	2
2	0	0	2	nb
3	2	0	6	nb
4	4	2	nb	nb
5	32	2-4	nb	nb

Objaśnienie: * — wyjściowe miano HA koronawirusa użytego do adsorpcji.

Tab. 3. Wyniki elucji koronawirusa 800 wykonanej po jednokrotnej adsorpcji wirusa do erytrocytów szczura

Kolejne elucje	Miano HA supernatantu po elucji w temp. 37°C wykonanej:					
	stacjonarnie			ze wstrząsaniem		
	po adsorpcji koronawirusa o mianie HA:					
	64 HJ *		24 HJ *			
	Koncentracja erytrocytów:					
	0,5%	0,1%	0,5%	0,1%	0,5%	0,1%
1	16	16	0	8	0	16
2	32	16	4	8	4	8
3	16	4	4	8	4	8
4	8	8	4	4	4	4
5	2	2	nb	nb	nb	nb
Suma odzyskanych HJ	72	46	12	28	12	36

Objaśnienie: * — wyjściowe miano HA zaadsorbowanego koronawirusa 800.

koncentracje erytrocytów: 1%, 0,5%, 0,1% i nowe porcje wirusa dodawano kilkakrotnie, aż do stwierdzenia w supernatancie niezwiązanego koronawirusa po kolejnej adsorpcji. Uzyskane wyniki zestawiono zbiorczo w tab. 2. Stwierdzono prostą ilościową zależność między koronawirusem i erytrocytami szczura we wzajemnym wiązaniu się w procesie adsorpcji.

Wydajność elucji koronawirusa z erytrocytami szczura

Oceniono wydajność koronawirusowej elucji przeprowadzonej w temperaturze 37°C stacjonarnie i z zastosowaniem wytrząsania, z użyciem erytrocytów szczura w koncentracji 0,1% i 0,5%, poddanych jednokrotnie adsorpcji z wirusem o mianie 24 HJ lub 64 HJ i w koncentracji 0,5%, poddanych trzykrotnie adsorpcji wirusem o mianie 64 HJ. Wyniki przedstawiono w tab. 3.

i tab. 4. Nie stwierdzono wpływu wytrząsania na wydajność pierwszej i dwóch kolejno po niej wykonanych elucji. Wydaje się, że elucje, zwłaszcza pierwsza, zależą głównie od wzajemnych optymalnych proporcji koronawirusowej hemaglutyniny i krwinkowych receptorów. Wydajność pierwszej elucji w temperaturze 37°C zależy także od stopnia wysycenia erythrocytowych receptorów. W celu sprawdzenia prawidłowości wyciągniętych wniosków, dotyczących ilościowych zależności we wzajemnym oddziaływaniu koronawirusowej hemaglutyniny i receptorów krwinkowych oraz w celu uzyskania zawiesiny oczyszczonego i zagęszczonego koronawirusa 800, wykonano pięć następujących po sobie adsorpcji wirusa do tych samych erythrocytów, sprawdzając po każdej adsorpcji miano HA supernatantu. Następnie wykonano trzy kolejne elucje, z oznaczeniem każdorazowo miana HA odzyskiwanego wirusa. Wyniki doświadczeń przedstawiono zbiorczo w tab. 5. Potwierdzają one istnienie wspomnianych zależności. Uzyskany w tych doświadczeniach koronawirus został użyty do wykonania badań w mikroskopie elektronowym (6) i do immunizacji królików.

Zdolność eluowanego koronawirusa do ponownego wiązania z receptorami erythrocytów szczura

Po oczyszczaniu i zagęszczaniu koronawirusa techniką HE-HA, może zachodzić potrzeba ponownego adsorbowania koronawirusa z erythrocytami. Supernatanty zawierające eluowany wirus, pochodzące z różnych doświadczeń połączono razem, oznaczono miano HA powstałej zawiesiny i zaadsorbowano do 0,1% erythrocytów szczura. Uzyskane wyniki wskazują, że po pierwszej adsorpcji-elucji wirus obniża swoją zdolność do ponownego uwalniania się z erythrocytów i przypuszczalnie traci tę zdolność po trzeciej adsorpcji. Nie jest wykluczone, że wchodzi tutaj w rachubę niedostateczne wysycenie receptorów erythrocytowych.

Wrażliwość koronawirusowej hemaglutyniny na temperaturę

Koronawirus 800 o mianie 24 HJ podzielono na porcje i ogrzewano w sposób opisany w wstępie. Wynik ogrzewania sprawdzano przez badanie zdolności koronawirusa do HA i uwalniania się wirusa (hemaglutyniny) w dwóch następujących po sobie procesach elucji. Uzyskane wyniki nie pozwalają na wysunięcie dokładniejszych wniosków odnośnie różnic wrażliwości funkcji wiązania się i funkcji uwalniania się hemaglutyniny lub koronawirusa. Przypuszczalnie inaktywacja tych właściwości następuje w przedziale temperatury 60—70°C.

Zastosowanie HE-HA

Zastosowanie HE-HA do wykrywania czynnika hemaglutynacyjnego w popłuczynach z jelit cieląt dało zachęcające wyniki. Przydatność HE-HA do rozpoznawania koronawirusowej etiologii w przypadkach biegunk cieląt była opisana przez różnych autorów (1, 3, 4, 7, 8). Aktualnie prowadzone są próby namnażania *in vitro* koronawirusów terenowych uzyskanych z popłuczyn jelita lub biegunkowych techniką HE-HA. Szczególnie interesujące byłoby opracowanie laboratoryjnej techniki i warunków badania biologicznych aktywności adsorbowanych i eluowanych koronawirusów cieląt.

Badanie w mikroskopie elektronowym

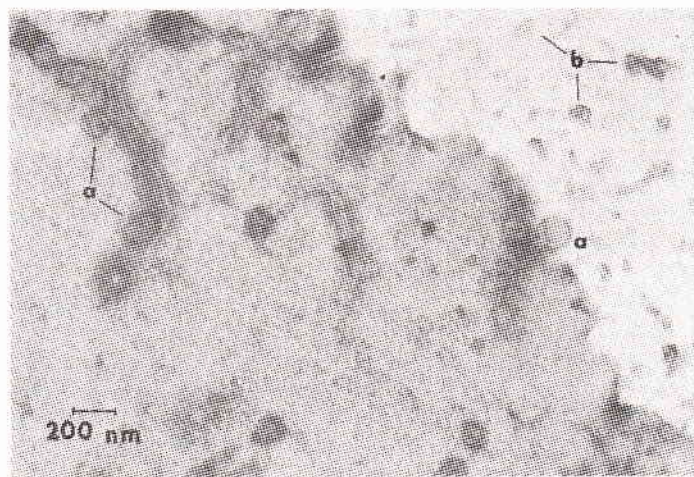
Tab. 4. Wyniki elucji koronawirusa 800 z erythrocytów szczura wykonanej po jednokrotnej* i trzykrotnej** adsorpcji wirusa o mianie HA — 64 HJ

Kolejne elucje	Miano HA supernatantu po elucji w temp. 37°C wykonanej:			
	stacjonarnie		ze wstrząsaniem	
	z erythrocytami o koncentracji:			
	0,1%*	0,5%**	0,1%*	0,5%**
1	24	128	32	128
2	8	24	16	6
3	2	12	2	4
Suma odzyskanych HJ	34	164	50	138

Tab. 5. Wyniki oczyszczania i zagęszczania koronawirusa 800 przez 5-krotną adsorpcję do 1% zawiesiny erythrocytów szczura i 3-krotną elucję w temperaturze 37°C

Procedura	Miano HA supernatantów po kolejnych adsorpcjach i elucjach:		
	1. 64 HJ*	2. 64 HJ*	3. 128 HJ*
Kolejne odsorpcje:			
1	0	0	0
2	0	0	0
3	0	0	0
4	0	0	4
5	4	2	32
Kolejne elucje:			
1	512	512	1024
2	512	128	512
3	nb	64	512
Suma odzyskanych HJ	1024	704	2048

Objaśnienia: * — miano HA koronawirusa użytego w kolejnych adsorpcjach w doświadczeniach 1, 2 i 3.



Ryc. 1. Wiriony koronawirusa 800 na powierzchni erythrocytu szczura, pow. 40 000 ×

Objaśnienia: a — koronawiriony o typowej morfologii i wymiarach w zakresie 120—160 nm; b — inne struktury o wymiarach ca 40 nm, przypuszczalnie podjednostki koronawirusów, nie podlegające hemadsorpcji

Pozwoliło ono na uwidocznienie koronawirusów na powierzchni erythrocytów (ryc. 1). Adsorpcji na powierzchni podlegają tylko pełne wiriony, o wymiarach ca 120—160 nm, których rozpoznanie jest możli-

we na podstawie ich morfologicznych cech (ryc. 1a). Inne struktury o wymiarach ca 40 nm (ryc. 1b), będące przypuszczalnie podjednostkami koronawirusów, nie podlegają hemadsorpcji. Ich identyfikacja (6) wymaga zastosowania techniki znakowanych przeciwciał.

Wnioski

1. Technika HE-HA może być stosowana do oczyszczania i zagęszczania koronawirusów namnożonych w hodowli komórek.

2. Dobre wysycenie erytrocytowych receptorów i wydajną elucję koronawirusa można uzyskać przez kilkakrotnie powtarzaną adsorpcję ze świeżymi porcjami wirusa w temperaturze 4°C i następnie kilkakrotną elucję w temperaturze 37°C.

3. Obecność koronawirusa w supernatancie po przeprowadzonej jedno- lub kilkakrotnej adsorpcji do erytrocytów można uważać za przejaw pełnego wysycenia erytrocytowych receptorów.

Piśmiennictwo

1. Van Balken J. A. M., De Leeuw R. W., Ellens D. J., Straver P. J.: Vet. Microbiol. 3, 205, 1978/79.
2. Chengping L.: Isolierung, Charakterisierung und Epizootiologie Boviner Coronaviren. Praca dokt. Wydział Weterynaryjny Uniwersytetu w Monachium, 1985.
3. Grover Y. P., Srivastava R. N., Pandey Sharma V. K.: Vet. Rec. 106, 467, 1980.
4. Haralambiev H. E., Popov G. V., Mitov B. K., Ignatov G. T.: Dokl. Bolg. Akad. Nauk 31, 257, 1978.
5. Larski Z.: Diagnostyka wirusologiczna chorób zwierząt. PWRiL, Warszawa 1977, s. 174.
6. Malicki K., Malicka E., Ładyńska A., Bańbura M. W.: Medycyna Wet. (w druku).
7. Sato K., Inaba Y., Kurogi H., Takahashi E., Satoda K., Omori T., Matumoto M.: Vet. Microbiol. 2, 83, 1977.
8. Sharpee R., Mebus C. A., Bass E. P.: Am. J. Rec. 37, 1031, 1976.
9. Štěpánek J., Menšík P., Menšík J., Franz J., Smid B., Valíček L.: Vet. Med. 27, 1, 1982.
10. Toth T. E.: Am. J. Vet. Res. 43, 967, 1982.
11. Wellemans G., Oyaert W., Muylle E., Thoonen H. van Opdenboch E.: Vlaams Diergeneesk. Tijdschr. 46, 249, 1977.

Adres autora: prof. dr hab. Konrad Malicki, ul. J. Bruna 14 m. 20, 02-594 Warszawa

ZBIGNIEW SZYMKIEWICZ, MARIAN BINEK, DANUTA ROMANOWSKA **,
FADEUSZ JAKUBOWSKI *, KRYSZYNA SAWICKA-WRZOSEK **

Odczyn mikroaglutynacji płytowej w rozpoznaniu dyzenterii świń w stadzie. I. Optymalizacja metodyki wykonania mikroaglutynacji płytowej (MAP)*

Katedra Mikrobiologii oraz Katedra Epizootiologii Wydziału Weterynaryjnego SGGW-AR,
ul. Grochowska 272, 03-849 Warszawa

** Zakład Higieny Weterynaryjnej, ul. Lechicka 21, 02-156 Warszawa

Summary

Microagglutination test in the diagnosis of swine dysentery. I. Optimization of microagglutination test for the detection of *Treponema hyodysenteriae* antibody in pig sera

The microagglutination test (MAT) for the detection of *Treponema hyodysenteriae* antibody in pig sera has been described. From the faeces and colon contents of pigs there have been isolated 115 *T. hyodysenteriae* and 38 *T. innocens* strains. The isolates represented mostly serotype 2 biotype I. A suspension of *Treponema* spp inactivated with formalin (0.1%) proved to be most useful. No decrease of antibodies against *T. hyodysenteriae* in sera with positive titres against *Leptospira* was found following absorption with antigens against *Leptospira* spp.

Jones i wsp. (6) sugerowali, że odczyn mikroaglutynacji (MA) z zastosowaniem zawiesiny krętków uzyskiwanych przez splukanie bakterii z podłoża stałego i inaktywowanie ich mertiolatem albo temperaturą, pozwalała na wykrycie przeciwciał przeciwko chorobotwórczym szczepom *Treponema hyodysenteriae*. Stwierdzili, że odczyn ten jest swoisty i daje powtarzalne wyniki. Egan i wsp. (5) porównali przydatność odczynu mikroaglutynacji (MAP) z odczynem ELISA do wykrywania poziomu przeciwciał przeciwko *T. hyodysenteriae*. Wykazali wyższą czułość odczynu ELISA, jednakże z 11 stad wolnych od dyzenterii w 3 z nich stwierdzono tym odczynem pozytywne miana przeciwciał przeciwko *Treponema hyodysenteriae*. Testem mikroaglutynacji (MA) ogólnie wykryto mniejszą liczbę pozytywnych surowic w stadach zakażonych, lecz wszystkie

badane surowice pochodzące ze stad wolnych dały negatywne wyniki. Może to sugerować, że odczyn ELISA jest bardzo czuły, lecz mniej swoisty, natomiast MA jest mniej czuła, ale bardziej swoista. Baum i Jones (1) określili 4 najczęściej występujące w Ameryce serotypy *Treponema hyodysenteriae*, natomiast Lemcke i Bew (7) sugerowali występowanie dodatkowych serotypów w Anglii.

W kraju nie prowadzono dotychczas tego typu badań. Wstępne badania przeprowadzone przez Szymkiewicza i wsp. (9) na małej liczbie szczepów *T. hyodysenteriae* wskazywały na dominację serotypu 2 tego zarazka w kraju oraz istnienie w obrębie tego serotypu szczepów epidemicznych. Konieczne było zbadanie większej liczby szczepów *Treponema hyodysenteriae* izolowanych w kraju w celu wytypowania odpowiedniego szczepu do przygotowania antygeny diagnostycznego.

Celem pracy było:

- a) oznaczenie serotypów *Treponema hyodysenteriae* występujących w kraju,
- b) określenie przydatności różnych metod inaktywacji krętków w celu przygotowania antygeny do odczynu MAP,
- c) sprawdzenie trwałości antygenów w czasie ich przechowywania,
- d) wstępne określenie poziomu przeciwciał przeciwko *Treponema hyodysenteriae* oraz *Treponema innocens* w leptospiro-ujemnych surowicach świń,
- e) sprawdzenie wpływu adsorpcji przeciwciał przeciwko *Leptospira* sp. surowic świń leptospiro-dodatnich na wynik odczynu MAP z antygenami *Treponema hyodysenteriae*.

* Praca wykonana w ramach CPBR 10.4 finansowanego przez Instytut Weterynarii w Puławach.