

JAN SZURMAN, ZDZISŁAW LARSKI

Próby oczyszczania wirusa choroby cieszyńskiej świń (*encephalo-myelitis enzootica suum*) oraz przeciwciał surowicy

Instytut Weterynarii
Pracownia Badań nad Chorobą Cieszyńską Świń — Gumna k/Cieszyna
Kierownik: Z. LARSKI

Według dostępnego nam piśmiennictwa oraz na podstawie prac własnych (1) stwierdza się brak reakcji serologicznych przy chorobie cieszyńskiej świń. Co do przydatności próby seroneutralizacji zdania są podzielone. Patočka (8) stwierdził niskie ale określone ilości przeciwciał zobojętniających wirus. Lépine i Atanasiu (9) uzyskali seroneutralizację przy użyciu równych ilości surowicy odpornościowej i wirusa w rozcieńczeniu 10^{-1} . Natomiast Horstmann (10) uzyskała w podobnym doświadczeniu wynik ujemny. Negatywne wyniki prób serologicznych (wiązania dopełniacza, precypitacji i dyfuzji na żelach), bardzo niskie miano wirusa choroby cieszyńskiej (LD_{50} — $10^{-3.0}$ do $10^{-3.5}$) pozwalają przypuszczać, że koncentracje przeciwciał w surowicach odpornościowych oraz koncentracje wirusa w emulsji mózgowej są bardzo niskie.

Ponieważ dla przebiegu reakcji serologicznej konieczne jest istnienie pewnych minimalnych stężeń przeciwciał oraz antygeny, przystąpiono do prób nad sensybilizacją układu koloidalnego surowicy oraz do prób oczyszczania i koncentracji wirusa choroby cieszyńskiej.

Zagadnieniu uczulenia surowic poświęcona jest praca Klingenberg (2). Z podanego przez niego wzoru empirycznego.

$$\frac{\gamma}{n \cdot AG} = R$$

gdzie: R — miano surowicy odpornościowej.

γ — ilość ogólna globulin (łącznie z przeciwciałami)
n — suma pozostałych białek surowicy.

AG — ilość antygeny.

wynika, że substancjami balastowymi w sensie immunochemicznym są wszystkie substancje białkowe poza przeciwciałami. Zachwianie równowagi koloidalnej surowicy osiąga Klingenberg przez wprowadzenie pozytywnie naładowanego koloidu hydrofobowego $Al(OH)_3$. Horejsi (3) oraz Krawczyński (4) referują metodę destabilizacji surowicy przy pomocy riwanolu. Według Horejsi riwanol nie działa denaturująco na przeciwciała.

Oczyszczaniem wirusa choroby cieszyńskiej zajmował się Patočka (5) oraz współpracownicy. Stosowane przez nich metody można w skrócie scharakteryzować następująco:

1. kwaśna precypitacja (przez obniżenie pH kwasem octowym do pH 4), 2. precypitacja metanolowa (destabilizacja nisko schłodzonym metanolem lub acetonem), 3. nadtrawianie enzymami papainą lub trypsyną, 4. destabili-

zacja układu protaminą wg Warren'a, Weil'a, Russ'a i Jeffries'a (cyt. wg 5) przy pomocy salmainsulfatu lub klupeninsulfatu.

Bardzo dobre wyniki uzyskali wyżej wymienieni autorzy w wypadku metody protaminowej.

Mając na uwadze, oprócz uzyskania reakcji immunochemicznej, również względy praktyczne — uzyskanie dużych ilości wirusa — szukano metody tańszej.

Destabilizujące działanie riwanolu na układ koloidalny surowicy, jego właściwości fizykochemiczne, oraz praca Gorodzkiej (7) nad zastosowaniem riwanolu do oczyszczania wirusa mozaiki tytoniowej, nasunęły celowość zastosowania go do oczyszczania wirusa choroby cieszyńskiej.

Cel pracy: a) Stwierdzenie działania riwanolu na układ koloidalny surowicy świń, b) Zastosowanie riwanolu w procesie oczyszczania wirusa.

Materiały i metodyka

Odczynniki — riwanol (2-Aethoxy — 6,9-diaminoacridinlactat) 0,4% świeżo przygotowany roztwór wodny.

Surowica świń — uzyskana w sposób ogólnie przyjęty.

Zawiesina mózgu — 45% zawiesinę mózgu w 0,85% NaCl zamrażano trzykrotnie w temp. -72° (mieszanina stałego CO_2 i alkoholu) oraz rozmrażano. Czas trwania 3-krotnego zabiegu 1 godzina. Emulsję poddano delipidacji eterem (stosunek 1:1) w ciągu 2 godzin. Po wirowaniu 3000 obr./min. przez 30 min., odciągano dolną warstwę a frakcję eterową oraz osad na granicy eter/emulsja odrzucono.

Przebieg działania riwanolu na białka plazmy kontrolowano przy pomocy elektroforezy bibułowej.

Dane techniczne: bibuła Schleicher Schüll 2043 b 25×2 cm, bufor boraks 0,1 M, napięcie 30 V/cm, natężenie 2,5 mA/cm, czas analizy 120 min.

Barwienie — błękit bromofenolowy wg Jencksa, Jettone i Durrum'a.

Przebieg pracy

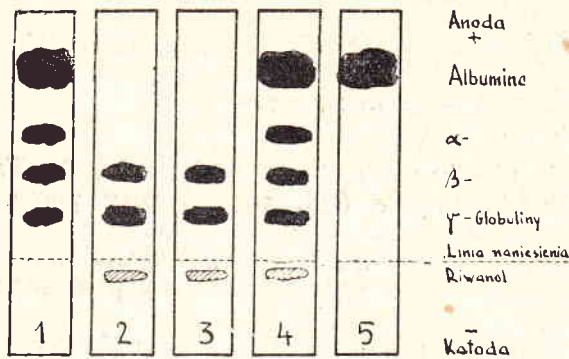
a) sensybilizacja surowicy.

1 ml surowicy + 3,5 ml 0,4% riwanolu
Po 60 minutach — wirowanie przez 30 minut przy 3000 obr./min. — otrzymano 2 frakcje osad + supernatans (płyn nad osadem).

Surowicę wyjściową oraz supernatans poddano analizie elektroforetycznej

Wynik widoczny jest na schemacie Nr. 1.

Schemat Nr 1.



Elektroforogram Nr 1 — surowica wyjściowa
Nr 2 — supernatans

Z analizy wynika, że riwanol destabilizuje i wiąże w surowicy świń albuminę oraz alfa-globulinę. W roztworze pozostają beta- i gamma-globuliny. Równocześnie stwierdza się słabą ruchliwość riwanolu w kierunku katody.

Do sporządzania zawiesiny mózgu świń chorych używano 0,85% roztworu NaCl. Ponieważ wprowadzany jest przez to do reagującego układu zawiesina-riwanol dodatkowy czynnik, zmieniający siłę jonową elektrolitu, przeprowadzono modelowe doświadczenie wstępne nad warunkami reakcji białek surowicy z riwanolem w obecności różnych koncentracji NaCl.

Do próbek zawierających po 1 ml surowicy dodano *in substantia* NaCl tak, że końcowa koncentracja wynosiła 2%, 10%, 20%, oraz jak poprzednio 3,5 ml 0,4% riwanolu. Po odwirowaniu supernatansu poddano go elektroforezie. Wyniki uwidacznia schemat Nr 1.

Elektroforogram Nr 3 — surowica + 2% NaCl + riwanol

Elektroforogram Nr 4 — surowica + 10% NaCl + riwanol

Dla 20% NaCl obraz elektroforetyczny jest analogiczny do Nr 4. Ze schematu wynika, że tworzenie się kompleksu riwanol-białka surowicy, zależne jest od aktualnej zawartości NaCl w reagującym układzie.

W wypadku obecności 10% oraz 20% NaCl riwanol nie wiąże albumin oraz alfa-globulin.

Celem stwierdzenia trwałości związku kompleksowego riwanol-albumina, alfa-globulina podziałano na osad, uzyskany przez działanie riwanolu na normalną surowicę, 1% roztworem NaCl. (Osad z 1 ml surowicy + 1 ml 10% NaCl przez 1 godz). Po odwirowaniu supernatans poddano elektroforezie.

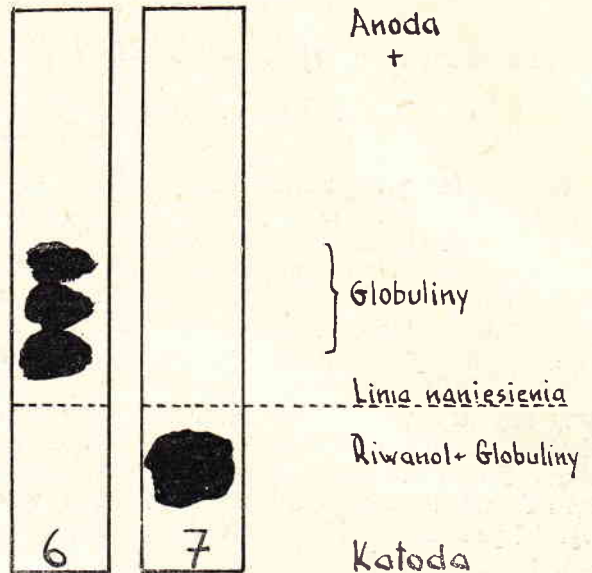
Elektroforogram Nr 5 wykazał, że albumina w danych warunkach została zwolniona z kompleksu i przeszła do roztworu soli.

b) oczyszczanie wirusa.

Delipidowaną zawiesinę mózgu świń chorych poddano analizie elektroforetycznej.

Wynik widoczny jest na schemacie Nr 2.

Schemat Nr 2



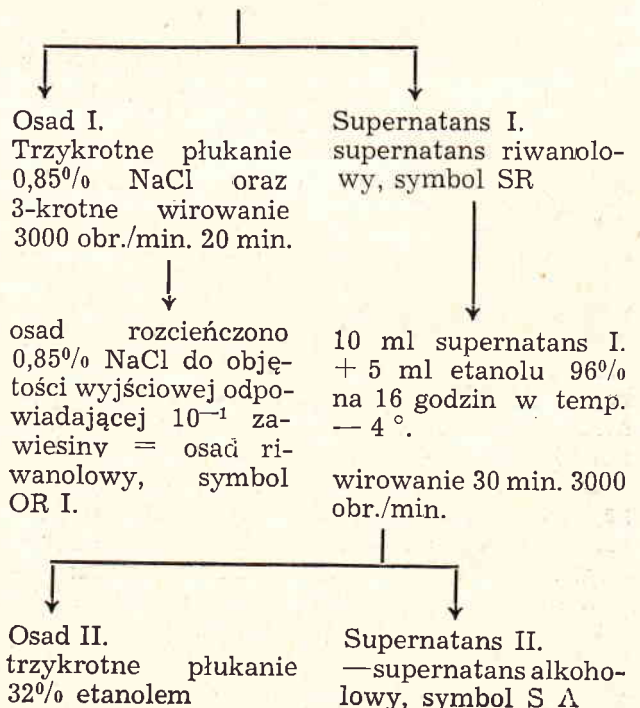
Z elektroforogramu Nr 6 wynika, że w zawieszynie znajdują się białka, których ruchliwość, w polu elektrycznym zbliżona jest do ruchliwości beta i gamma-globulin surowicy. Obecność wirusa choroby cieszyńskiej stwierdzono próbą biologiczną. Celem sprawdzenia działania riwanolu na zawiesinę przeprowadzono frakcjonowanie, analogiczne do frakcjonowania surowicy świń.

Przebieg ujęty jest schematem:

Schemat oczyszczania wirusa.

2,5 ml zawiesiny delipidowanej + 8,75 ml 0,4% riwanolu, czas działania 60 minut.

Wirowanie 30 min. 3000 obr./min.



wyjściowej w procesie oczyszczania pozwoli prawdopodobnie na uzyskanie wyższej czystości zarazka.

Piśmiennictwo

- 1) Larski Z., Szaflarski J.: Med. Wet. 12 (12) 1956.
 2) Klingenberg F.: Hoppe Seyl. Ztschr. Phys. Chem. 298, 185—192, 1954. 3) Horejsi J.: Angew. Chemie 67 (21) 1955. 4) Krawczyński J.: Pol. Tyg. Lek. 9, 311, 1954.
 5) Patočka F., Kubelka V., Slavik K., Bohace J.: Vestnik CAZV XXV (10) 461—475, 1951. 6) Golan, Marvin: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 67, 1948; 7) Gorodskaja O. S.: Biochimia 15, 507, 1950. 8) Patočka F.: Z referatu: Wirusologia w Czechosłowacji wygłoszonego w Polsce 1954 r. 9) Lépine P., Atanasiu P.: Ann. Inst. Pasteur 79, (2), 113—120, 1950. 10) Horstman D.: Jour. of Immunology 69, (4), 379—394, 1952. 11) Larski Z.: Med. Wet. 11, (10), 589—590, 1955. 12) Mc Ilwaine: Biochemistry and the central nervous system London, Churchill 1955.

Я. ШУРМАН .З. ЛАРСКИ

ПОПЫТКИ ОЧИСТКИ ВИРУСА ТЕШЕНСКОЙ БОЛЕЗНИ СВИНЕЙ И ПРОТИВОТЕЛ СЫВОРОТКИ

Изучено дестабилизирующее действие риванола на коллоидальную систему сыворотки свиней. Риванол дестабилизирует и связывает альбумины и алфа-глобулины. Механизм возникновения комплексных соединений

JERZY WIŚNIEWSKI

Odczyn hemolityczny w rozpoznaniu gruźlicy u bydła*)

(autoreferat)

Instytut Weterynarii, WZHW w Krakowie.
 Kierownik: Doc. dr A. RATOMSKI

Od roku 1948 tj. od czasu kiedy to Middlebrook i Dubos (1) wykazali, że czerwone krwinki baranie uczulone substancjami antygenowymi prątków swoiście aglutynują wobec surowic gruźlików, względnie ulegają rozpuczeniu po dodaniu dopełniacza (2), datuje się duże zainteresowanie serodiagnostyką gruźlicy i wartością tych metod. Przegląd ogólnego piśmiennictwa na temat rozwoju badań idących w tym kierunku podałem w swoim czasie w „Medycynie Weterynaryjnej” (3). W artykule tym obejmującym dostępne mi piśmiennictwo za okres lat 1948—1953 znajduje się wiele szczegółów, które są też wprowadzeniem do niniejszej pracy. Wobec tego ograniczę się obecnie do podania przeglądu i nieco szerszego omówienia prac wyłącznie weterynaryjnych wydanych do roku 1955 włącznie.

Znaczenie gruźlicy jako choroby hodowlanej jest tak dalece znane, że zbędne jest podkreślanie potrzeby badań mających za cel udoskonalenie rozpoznania. A właśnie taki cel miało podjęcie opisanych w tej pracy doświadczeń opartych zresztą na odczynie opracowanym przez Middlebrooka (2).

Medycyna weterynaryjna natrafiła w zwalczaniu gruźlicy u bydła na poważne trudności, między innymi też w dziedzinie rozpoznawania. Ze względów bowiem technicznych,

*) Praca w oryginale ukaże się w Rocznikach Nauk Rolniczych.

риванола с белками сыворотки зависит от ионной силы электролитов плазмы. Обезлигидованная взвесь мозга больных свиней в 0,85% NaCl содержит глобулины и вирус тешенской болезни. Риванол дает с вирусом комплексное соединение. При помощи 10% раствора NaCl вирусы элюируют из этого соединения.

JAN SZURMAN & ZDZISŁAW LARSKI

TRIALS ON THE PURIFICATION OF THE VIRUS OF TESCHEN DISEASE OF PIGS AND ANTIBODIES OF SERA

Summary

It was found that rivanol exerts a destabilizing effect on the colloidal system of swine serum. Rivanol destabilizes and combines with albumins and alfa-globulins. Mechanism of the formation of complex compounds of the plasma electrolites. A suspension of the brain tissue free of lipids obtained from pigs affected with the disease in a 0,85 per cent solution of NaCl contains globulins and the virus of Teschen disease. Rivanol forms with the virus of Teschen disease a complex compound. The virus may be regained from the compound by eluation using a 10 per cent solution of NaCl.

rozpoznanie przy zastosowaniu całego zespołu znanych metod rozpoznawczych jest niewykonalne w akcji masowej. Wobec tego stosuje się u zwierząt wyłącznie odczyn tuberkulinowy, na podstawie którego ocenia się bydło jako „reagujące pozytywnie“ i „niereagujące“. Ta ocena w praktyce równoznaczna jest z uznaniem danej sztuki za zakażoną gruźlicą względnie za zdrową. Odczyn tuberkulinowy jak wiadomo nie informuje o aktualnym stanie zdrowia lub choroby.

Jednym słowem nie mówi o ewentualnym aktywnym procesie gruźliczym. Ze względów praktycznych zmuszeni jesteśmy jednak zagadnienie uprościć. Uznajemy odczyn tuberkulinowy za podstawowe kryterium rozpoznania masowego i jak dotychczas za jedyne. Ostatecznie można by zdając sobie sprawę z pewnego odsetka rozbieżności w wynikach odczynu tuberkulinowego, uznać go za wystarczająco dobry i na tej podstawie dokonać wybrakowania i wybicia sztuk reagujących. Odczyn tuberkulinowy jest jednak odczynem jakościowym, a nie ilościowym, to też na jego podstawie nie można rozróżnić zwierząt o bardziej zaawansowanym procesie gruźliczym od zwierząt klinicznie zdrowych. Gruźlica, zwłaszcza w większych oborach, jest tak rozpowszechniona, że często musiałoby się zupełnie doszczętnie likwidować niektóre obory, w których całe поголовье reaguje pozy-