

TADEUSZ KOZIOŁ

## Zastosowanie mikrometody seroneutralizacji (SN) w rozpoznawaniu choroby Aujeszky'ego u świń

Z Zakładu Higieny Weterynaryjnej we Wrocławiu

W rozpoznawaniu choroby Aujeszky'ego (ch. A.) stosuje się próbę biologiczną, izolację wirusa oraz odczyn serologiczne, spośród których zwłaszcza odczyn seroneutralizacji uważany jest za szczególnie przydatny do wykrywania choroby o przebiegu poronnym względnie bezobjawowym (2, 4, 7). W ostatnich latach wykorzystuje się go również dla określenia stopnia rozprzestrzenienia choroby Aujeszky'ego na terenie kraju (2, 3). Zgodnie z obowiązującymi przepisami w Polsce odczyn SN wykonywany jest metodą próbkową (1).

Celem pracy było określenie przydatności mikrometody SN do wykrywania przeciwciał neutralizujących wirus ch. A. u świń w wybranych gospodarstwach Dolnego Śląska, w oparciu o badania Severa (5) i Witte (8, 9), którzy stosowali tę metodę w rozpoznawaniu innych chorób wirusowych.

### Materiał i metody

Materiał do badań stanowiło 2027 surowic macior z siedmiu gospodarstw Dolnego Śląska (tab. 2). 142 surowice pochodziły z gospodarstw J i Z, w których kliniczne rozpoznanie potwierdzono izolacją wirusa. 1598 surowic pochodziło z gospodarstwa G, w którym nie obserwowano charakterystycznych objawów choroby, natomiast serologicznie stwierdzono przeciwciała SN dla wirusa ch. A. 278 surowic pochodziło z gospodarstw M, KW, B i NWL, w których ch. A. nie występowała. Do wykonania odczynu używano linii komórkowej RK-13 (rabbit kidney) oraz szczepu TK-900 wirusa ch. A. Szczep ten po dziesięciokrotnym przepaszowaniu przez komórki linii RK-13 posiadał  $TCID_{50}$   $10^{-6,25}$ /ml. Kontrolę stanowiła standardowa dodatnia surowica przeciw wirusowi ch. A. oraz surowica ujemna otrzymana z Instytutu Weterynarii w Brnie. Surowice badane inaktywowano w łaźni wodnej w temperaturze  $56^{\circ}C$  przez 30 minut. Odczyn SN mikrometodą wykonywano na płytkach polisterynowych (firmy Cook Laboratory Products, USA), zawierających 96 cylindrycznych baseneków o płaskich dnach ułożonych w 8 rzędach. Do wykonywania rozcieńczeń surowic użyto mikrorozcieńczalników o pojemności 0,050 ml oraz kroplomierzy z zestawu do mikrometody Takátsego (typ OX-605).

Odczyn wykonywano w następujący sposób: do każdego z baseneków wlewano kroplomierzem 0,050 ml rozcieńczalnika (podłoże Eagle'a 1959 (MEM), 200 j. m. penicyliny kryst., 0,2 mg streptomycyny na ml). Mikrorozcieńczalnikiem pobierano 0,050 ml badanej surowicy i wykonywano szereg kolejnych dwukrotnych rozcieńczeń od 1:2 do 1:256. Następnie do każdego rozcieńczenia surowicy dodawano kroplomierzem 0,050 ml zawiesiny wirusa zawierającej 100  $TCID_{50}$  i inkubowano mieszaniny w temperaturze pokojowej przez 1 godzinę. Po upływie tego czasu wlewano kroplomierzem do baseneków 0,050 ml zawiesiny komórkowej o koncentracji  $6 \times 10^6$  komórek/ml w płynie wzrostowym. Płyn wzrostowy składał się z podłoża Eagle'a 1959, 30% surowicy płodu bydłowego,  $NaHCO_3$  (3 ml 7%  $NaHCO_3$ /100 ml) oraz antybiotyków w ilości uprzednio podanej. Płytki zawierające składniki odczynu inkubowano w temperaturze  $37^{\circ}C$  w atmosferze 5%  $CO_2$  przez 3 do 5

dni. Równocześnie prowadzono próby kontrolne odczynu z surowicą dodatnią i surowicą ujemną, kontrolę hodowli komórkowej nie zakażonej i zakażonej dawką 100  $TCID_{50}$  wirusa, oraz kontrolę każdej surowicy na obecność czynnika toksycznego dla hodowli komórkowej.

Wyniki odczynu oceniano na podstawie występowania charakterystycznego efektu cytopatycznego (CPE) w hodowlach komórkowych. Zmiany CPE w zależności od ich nasilenia oznaczano od + do +++.

Poziom przeciwciał neutralizujących wirus ch. A. w badanych surowicach obliczano w postaci logarytmu 50% miana odczynu posługując się wzorem na interpolację wg Spauna (6).

Badanie porównawcze seroneutralizacji wykonywanej metodą „mikro” i „makro” przeprowadzono z 30 surowicami macior, które przeżyły naturalne zakażenie wirusem ch. A. Uzyskane wyniki poddano ocenie statystycznej posługując się testem t Studenta (6).

### Wyniki i omówienie

W tab. 1 przedstawiono miana przeciwciał neutralizujących wirus ch. A. w surowicach macior ozdrowieńców, uzyskane w odczynie SN wykonywanym metodą próbkową oraz mikrometodą. Wyniki otrzymane metodą „mikro” były nieznacznie wyższe w stosunku do wyników uzyskanych metodą próbkową, jednak

Tab. 1. Miana przeciwciał neutralizujących wirus ch. A. w surowicach macior badanych metodą makro i mikro

Nr surowicy	Makrometoda SN	Mikrometoda SN
	log $ND_{50}/0,1$ ml	log $ND_{50}/0,050$ ml
1	2,13	2,25
2	1,75	1,75
3	1,73	1,95
4	1,44	1,65
5	1,83	2,05
6	1,58	1,97
7	2,05	2,15
8	1,87	1,90
9	1,49	1,65
10	1,97	1,68
11	1,59	1,75
12	1,86	1,95
13	1,90	2,00
14	1,90	2,05
15	2,10	2,15
16	1,75	1,85
17	1,96	2,05
18	1,80	1,80
19	2,05	2,05
20	2,15	2,20
21	1,35	1,50
22	1,58	1,65
23	1,63	1,72
24	1,95	2,05
25	1,25	1,30
26	1,85	2,00
27	1,95	1,95
28	2,02	2,05
29	1,95	1,95
30	1,64	1,75

różnice nie przekraczały jednego rozcieńczenia i były one statystycznie nieistotne w przedziale ufności 0,01.

Rezultaty wykonanego mikrometodą SN przeglądu serologicznego w 7 wybranych obiektach Dolnego Śląska zawiera tab. 2. W 4 gospo-

Tab. 2. Występowanie przeciwciał SN dla wirusa ch. A. u macior w wybranych gospodarstwach Dolnego Śląska

Gospodarstwa	Liczba badanych surowic	Wyniki badań		Izolacja wirusa	
		dotądnie	ujemne		
Nie-zakażone	M	85	—	85	nie badano
	KW	98	—	98	
	B	68	—	68	
	NWL	36	—	36	
Zakażone	J	25	8	13	+
	Z	117	117	—	+
	G	1598	210	1388	—

darstwach wolnych od ch. A. nie stwierdzono przeciwciał SN. W gospodarstwach J i Z, w których przed ok. miesiącem wystąpiła ostra forma ch. A., oprócz stwierdzenia wysokich mian dodatnich wyizolowano wirus ch. A. W gospodarstwie G na ogólną liczbę 1598 przebadanych macior stwierdzono miana dodatnie u 210 sztuk, tj. u około 13%. W obiekcie tym nie obserwowano objawów klinicznych wskazujących na ch. A., natomiast wzrosła ilość seroreagentów w kolejnych badaniach prowadzonych w okresie 6 miesięcy. Może to świadczyć o tym, że badane stado uległo bezobjawowemu zakażeniu. Przemawia za tym również fakt, że z 30 loszek pochodzących z obiektu wolnego od ch. A. i serologicznie ujemnych po 30 dniach od chwili wstawienia do gospodarstwa G — u 8 stwierdzono przeciwciała SN dla wirusa ch. A.

Odczyn seroneutralizacji wykonywany mikrometodą okazał się przydatny do rozpoznawania ch. A. dając podobne efekty jak metoda próbówkowa. Prostota wykonania, znacznie mniejsze zużycie reagentów i szkła laboratoryjnego potrzebnego do wykonania próby — sugerują możliwość wprowadzenia tej metody do rutynowego serologicznego rozpoznawania ch. A.

#### Piśmiennictwo

1. Instrukcja nr 34 Min. Rol. — Dep. Wet. z dnia 10 stycznia 1974 r. w sprawie zasad laboratoryjnego rozpoznawania choroby Aujeszky.
2. Janowski H., Janowska I.: *Medycyna Wet.* 32, 462, 1976.
3. Janowski H., Wijaszka T.: *Medycyna Wet.* 23, 721, 1967.
4. Kretschmar Ch.: *Die Aujeszksyche Krankheit.* VEB Gustav Fischer Verlag, 1970.
5. Sever J. L.: *J. Immunol.* 88, 320, 1962.
6. Slopek St.: *Immunologia praktyczna, PZWL.* 1970.
7. Wawrzekiewicz J.: *Medycyna Wet.* 21, 18, 1965.
8. Witte K. H.: *Arch. ges. Virusforsch.* 33, 171, 1971.
9. Witte K. H., Easterday B. C.: *Amer. J. vet. Res.* 29, 1409, 1968.

Adres autora: lek. wet. Tadeusz Kozioł, ul. Kochanowskiego 94 a, 51-601 Wrocław.

Kozioł T. — **Применение микрометода серонейтрализации (СН) в распознавании болезни Ауески у свиней.**

Dla serologicznych badań względnie choroby Ауески у свиней была применена реакция серонейтрализации, выполняемая микрометодом. Было получено соответствие результатов с реакцией серонейтрализации, выполняемой в пробирках. Исследование было проведено с 2027 сыворотками свиноматок, происходящих из хозяйств, инфицированных вирусом б. А. а также свободных от этой болезни. На основе полученных результатов констатировалась пригодность микрометода СН для рутиновой серологической диагностики болезни Ауески у свиней.

Kozioł T. — **Seroneutralization micromethod in the diagnosis of Aujeszky's disease.**

The examinations were carried out on 2027 sow sera received from free farms and infected with Aujeszky's disease virus. Two methods of seroneutralization, i. e. performed in tubes and micromethod were compared. It was found that the micromethod was useful to routine serological diagnosis of pseudorabies.

JOHNSTON L. A. Y., TRUEMAN K. F., LEATCH G., WILSON A. J.: Porównanie przydatności metody immunofluorescencji bezpośredniej i metody barwienia wg Giemzy do pośmiertnego rozpoznawania anaplazmozy. (A comparison of direct fluorescent antibody and Giemsa staining for the post-mortem diagnosis of anaplasmosis). *Aust. vet. J.* 56, 116-118, 1980 (3).

Laboratoryjne rozpoznanie anaplazmozy u bydła opiera się o wykazanie obecności pasożytów w preparatach z krwi oraz w preparatach odciskowych z narządów wewnętrznych. Dotychczas preparaty wybarwiano wg metody Giemzy. Badania preparatów sporządzonych od 11 cieląt zarażonych doświadczalnie *Anaplasma marginale* wykazały, że wprowadzenie odczynu immunofluorescencji bezpośredniej zwiększa odsetek wyników dodatnich. W oparciu o ten odczyn możliwe jest odróżnienie *Anaplasma spp.* od *Babesia bovis* i *B. bigemina* przy występowaniu reakcji krzyżowych między *A. marginale* i *A. centrale*. Rozmazy krwi uzyskane z podskórnych naczyń kończyn nadają się lepiej do badań diagnostycznych w porównaniu do preparatów odciskowych z nerek, serca i płuc.

G.

NIEC R., BONAZZI E., EDDI C., NUNEZ J. L., MUNOZ CABENAS M. E., MOLTEDO H. L.: Działanie owicydne oksfendazolu na nicienie u owiec. (Ovicidal action of oxfendazole on sheep nematodes). *Vet. Rec.* 107, 248-249, 1980 (11).

Zwalczanie pasożytów żołądkowo-jelitowych u bydła i owiec opiera się głównie o stosowanie leków działających na pasożyty. W przypadku gdy lek wywiera działanie owicydne w przewodzie pokarmowym ulega obniżeniu zanieczyszczenie środowiska jajami pasożytów. Działanie owicydne oksfendazolu prześledzono na 20 owcach w 4 grupach doświadczalnych zarażonych na drodze naturalnej nicieniami żołądkowo-jelitowymi. Preparat stosowano w dawce 2,5; 3,5 i 4,5 mg/kg wagi ciała. W próbkach kału pobieranych w okresie 120 godzin po podaniu preparatu określano ilość jaj (met. Mc Mastera) oraz działanie owicydne (metoda Corticelli Lai i Niec). Już po 5 godzinach po podaniu leku wykazano jego działanie owicydne na jaja nicieni żołądkowo-jelitowych. W okresie 8 godzin po podaniu preparatu 99,7% jaj pasożytów uległo sterylizacji, zaś po 3 dobach nie stwierdzono w kale owiec obecności jaj nicieni żołądkowo-jelitowych.

G.