

JAN RUŁKA

Diagnostyka serologiczna parainfluenzy bydła przy użyciu mikrotestu zahamowania hemaglutynacji z krwinkami gęsi

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

Diagnostyka serologiczna chorób wirusowych zwierząt i ludzi jest podstawowym elementem rozpoznawania wielu jednostek chorobowych. Od czasu gdy po raz pierwszy Takatsy (10) wprowadził test mikro do zahamowania hemaglutynacji (HI), wielu badaczy wniosło do niego nowe elementy (1, 2, 5, 6). Jedną z podstawowych trudności sprawiających największe kłopoty w metodyce HI są niespecyficzne inhibitory. Wielu autorów usiłowało usunąć je z badanych surowic bądź przez użycie różnych związków chemicznych jak — kaolin, bentonit, nadjodan potasu, tripsyna, RDE — Receptor Destroying Enzyme (2, 3, 7), bądź przez absorpcję na erytrocytach wielu gatunków zwierząt (5, 7, 8, 9).

Celem badań była ocena mikrotestu zahamowania hemaglutynacji do diagnostyki serologicznej parainfluenzy bydła z użyciem płytek firmy PLASTOMED i erytrocytów krwi gęsi.

Materiał i metody

Wirus. Do badań użyto szczepu M/PI₃ wirusa parainfluenzy bydła namnożonego na hodowli komórek MDBK. Miano TCID₅₀ (Tissue Culture Infective Dose) na MDBK wynosiło 10^{4,33}/0,2 ml, zaś miano hemaglutynacyjne (Ha) 1:80.

Rozcieńczalnik. Zarówno do przygotowania zawiesiny 30% i 0,75% krwinek gęsi, jak i do rozcieńczeń wirusa i surowic badanych zwierząt, używano jałowego 0,9% NaCl na H₂O redest.

Krwinki czerwone gęsi. Krew od gęsi pobierano przez nakłucie żyły skrzydłowej do naczyń z cytrynianem sodu: — cytrynian sodu — 3,8; chlorek sodu — 0,9 i H₂O ad 100 ml. Pobraną próbkę krwi do cytrynianu w stosunku 4:1 odstawiano na 60 min. w temperaturze pokojowej (20—22°C), po czym wirowano 5 min. przy 2000 obr./min. Odwirowany osad krwinek płukano 3-krotnie 0,9% NaCl i standaryzowano przez wirowanie 10 min. przy 1000 obr./min. Tak przygotowane krwinki gęsi stanowiły pulę wyjściową do przygotowania zawiesiny 30% do absorpcji inhibitorów nieswoistych i zawiesiny 0,75% do wykonania testu hemaglutynacji i zahamowania hemaglutynacji.

Surowice. W badaniach użyto ogółem 23 surowic bydłych z gospodarstwa T oraz bydłej surowicy referencyjnej (R) dla wirusa PI₃. Wszystkie surowice badane inaktywowano w temp. 56°C przez 60 min., po czym do 0,7 ml surowicy dodawano 0,05 ml 24-godzinnych 30% krwinek gęsi celem absorpcji inhibitorów nieswoistych. Absorpcję prowadzono w temp. 37°C przez 30 min., po czym krwinki odwirowywano, zaś surowicę odlewano do jałowej próbki. Tak przygotowana surowica była gotowa do badania serologicznego.

Odczyn hemaglutynacji (Ha). Test wykonywano wg Larskiego w modyfikacji Rułki (4).

Odczyn zahamowania hemaglutynacji (HI). Mikrotest wykonywano wg Severa (8) w mody-

fikacji własnej. Odczyn wykonywano wg zasady: pierwszy rząd basenów (1) od A do H służył do wstępnego rozcieńczenia surowicy 1:5, rzędy 2—11 służyły do wykonania kolejnych rozcieńczeń badanej surowicy w postępie 0,2 log w zawiesinie 4 jednostek hemaglutynacyjnych wirusa PI₃, zaś rząd 12 stanowił kontrolę badanej surowicy w rozcieńczeniu 1:20. Odczyn HI na płycie dużej z pleksiglasu wykonywano wobec 2 jednostek Ha wirusa PI₃.

Technika wykonania mikrotestu HI. Najpierw rozlewano à 0,025 ml 0,9 NaCl do basenów rzędu 12 i 0,1 ml (4 krople à 0,025 ml) do basenów rzędu 1. Następnie rozlewano à 0,05 ml wirusa stanowiącego 4 jednostki Ha do basenów 2—11. Z kolei do rzędu 1 dodawano bagietką 0,025 ml badanej surowicy, mieszano ją i przenoszono 0,025 ml do basenu nr 12. Teraz zmieniano bagietkę o pojemności 0,05 ml, pobierano z pierwszego basenu 0,05 ml surowicy z rozcieńczenia 1:5 i przenoszono ją do basenu nr 2, by po wymieszaniu przenieść 0,05 ml do basenu nr 3 itd. Z basenu nr 11 wyrzucano 0,05 ml surowicy, zaś do basenu nr 12 uzupełniano 0,025 ml 0,9% NaCl. W ten sposób przygotowano I fazę seroneutralizacji mikrotestu HI. Po 30 minutach inaktywacji wirusa PI₃ przez swoiste przeciwciała, dodawano do wszystkich basenów (z wyjątkiem rzędu 1) a 0,05 ml 0,75% krwinek gęsi (faza II). Następnie wytrząsano płytki ręcznie przez 3 min., po czym po 30 minutach odczytywano wynik reakcji.

Wyniki i omówienie

Uzyskane rezultaty wykazały pozytywny wpływ absorpcji niespecyficznych receptorów badanych surowic przez krwinki gęsi. Wyniki ilustruje tab. 1. Dodanie 0,025 ml czy 0,075 ml 30% zawiesiny krwinek do 0,7 ml badanej surowicy, nie zmienia jej właściwości serologicznych. Czyni to mikrotest HI odczynem wysoce czułym, ujawniając faktyczny poziom przeciwciał HI dla wirusa PI₃. Powtórzenie odczynu na 3 płytkach firmy PLASTOMED nie wykazało istotnych różnic w wysokości miana

Tab. 1. Poziom miana przeciwciał HI dla wirusa PI₃ w surowicach absorbowanych i nie absorbowanych w zależności od użytej ilości krwinek gęsi

Erytrocyty	Miano przeciwciał HI dla PI ₃ surowic absorbowanych	Miano przeciwciał HI dla PI ₃ surowic nie absorbowanych						
		102	R	175	215	200	192	013
3,1×10 ⁷ 0,025 ml	40 320± 80	40± 320	80	40± 320	80	320	—	
6,3×10 ⁷ 0,05 ml	40 320 80	80	80	320 80	320	—		
9,2×10 ⁷ 0,075 ml	20 320 40± 40	160± 80	160± 80	—				
Surowice nie absorbowane								
6,3×10 ⁷ 0,05 ml	40 320 40± 80*	320*	40± 320	40± 320	40± 320	40± 320	40± 320	40± 320

Objaśnienia: x — w rozcieńczeniu 1:10—1:40 notowano nieswoiste zlepianie krwinek gęsi, ± — wątpliwy wynik testu H w kolejnym rozcieńczeniu surowicy, R — surowica bydła referencyjna.

przeciwciał dla tych samych surowic. Dodanie 0,075 ml 30% krwinek gęsi powoduje w niektórych przypadkach obniżenie miana HI, co wiąże się zapewne z rozcieńczeniem surowicy przez zawiesinę krwinek. Surowice nie absorbowane wykazywały podobne miana HI jak surowice absorbowane, jednakże przy niskich mianach przeciwciał wyniki były trudne do oceny. W przypadku surowicy 215 i 200 oraz surowicy ujemnej (392), notowano w pierwszych rozcieńczeniach (1:10—1:20) wyraźną aglutynację krwinek gęsi. Z własnych obserwacji nie objętych doświadczeniem wynika, że niespecyficzną aglutynację krwinek gęsi można obserwować do rozcieńczenia 1:80, a nawet 1:160. Istotne jest również to, że przy wystąpieniu silnej aglutynacji krwinek gęsi w przypadku surowic ujemnych nie absorbowanych (surowica 392), następuje szybkie ich opadanie, dając w efekcie typowy guziczek dla dodatniego wyniku HI. Przy odczycie takiej reakcji w czasie późniejszym niż 30 minut daje fałszywie dodatni wynik reakcji serologicznej, zacierając tym samym charakterystyczny obraz mikrotestu dla surowicy ujemnej.

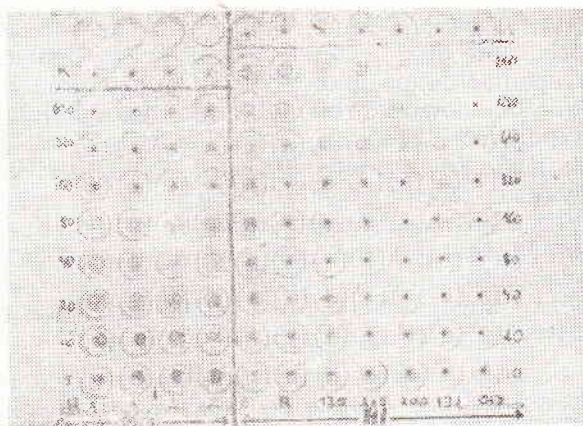
Przeprowadzone badania w kierunku zgodności wyników mikrotestu HI na trzech płytkach firmy PLASTOMED wskazują na powtarzalność wyników. Występujące różnice miana do jednego rozcieńczenia są mało istotne i mieszczą się w granicach błędu metody. Przy porównywaniu wyników mikrotestu na płytkach PLASTOMED z wynikami na dużych płytkach z pleksiglasu, odnotowano jeden wynik wyższego miana HI (1:1280) na dużej płycie — surowica nr 013. Pozostałe wyniki były zgodne lub różniły się mianem w granicach jednego rozcieńczenia. Uzyskane rezultaty przedstawia tab. 2 oraz ryc. 1, 2 i 3.

Przedstawione wyniki, jak również dwuletnie obserwacje własne wskazują na stosunkowo dużą ilość surowic bydłych zawierających niespecyficzne inhibitory. W badaniach nie objętych eksperymentem ilość niespecyficznie reagujących surowic wynosiła niekiedy 73—85%. Zastosowanie inaktywacji w temp. 56°C przez 60 min. i absorpcji krwinkami gęsi w temp. 37°C przez 30 minut pozwoliło na zupełne wyeliminowanie inhibitorów nieswoistych z bada-

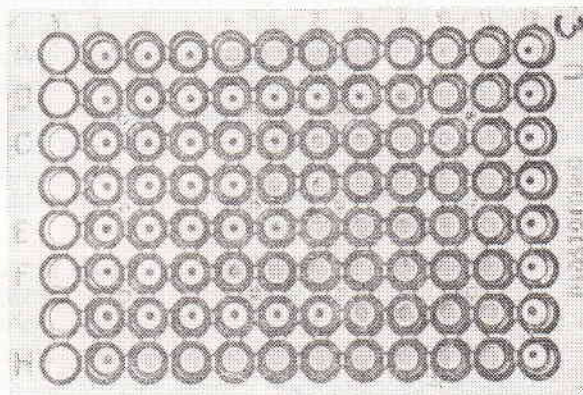
Tab. 2. Powtarzalność wyników mikrotestu HI dla przeciwciał wirusa PI₃ na płytkach firmy PLASTOMED w odniesieniu do testu na dużej płycie z pleksiglasem

Nr płytki	Liczba jed. dośł.	Miana	Powtarzalność HI dla PI ₃ (surowicy)						
			102	R	175	215	200	192	013
1	4	40*	320±	80	40±	320	80	320	—
2	4	20±	640	80±	40±	160	40	320	—
3	4	20±	640	80±	40±	160	40	320	—
Duża płytka	2	40	320±	160±	160±	320	80	1280	n.b.

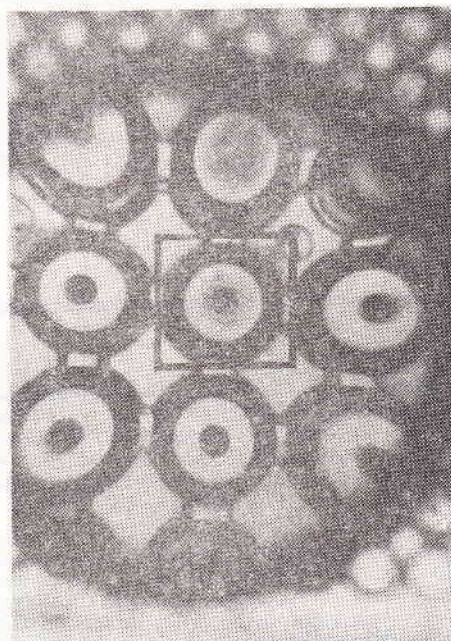
Objaśnienia: x — dodatni wynik testu w rozcieńczeniu surowicy 1:40, ± — wątpliwy wynik testu HI w kolejnym rozcieńczeniu surowicy, R — surowica bydła referencyjna.



Ryc. 1. Wyniki testu hemaglutynacji i zahamowania hemaglutynacji na płycie z pleksiglasu



Ryc. 2. Mikrotest HI na płycie firmy PLASTOMED



Ryc. 3. Wątpliwy wynik mikrotestu na płycie firmy PLASTOMED w powiększeniu pod lupą (3X)

nych surowic. Istotne jest to, że surowice absorbowane 30% krwinkami gęsi nie wykazywały spadku miana przeciwciał w mikroteście HI. Fakt ten dowodzi również braku jakiegokolwiek szkodliwości krwinek gęsi na swoistość odczynu. Dodatkową zaletą użytych krwinek gęsi jest szybkość występowania reakcji serologicznej. Miarodajny wynik testu uzyskano już po 15 minutach, Biorąc jednak pod uwagę występowanie ewentualnych różnic miana przeciwciał, ostateczny wynik testu należy ocenić po 25 lub co najwyżej po 30 minutach.

Podobne wyniki braku spadku miana przeciwciał HI dla wirusa PI₃ zanotowali również Keter i wsp. (2) po zastosowaniu kaolinu i RDE. Dowson (1) z kolei stwierdził, że surowice poddane działaniu zarówno kaolinu, RDE, trypsyny, nadjodanu potasu i bentonitu, wykazywały niższe miana przeciwciał HI niż surowice nie traktowane tymi związkami. Rossi i Kiesel (3) wykazali, że surowice bydłące poddane działaniu trypsyny i nadjodanu potasu, nierzadko wykazują niższe miana przeciwciał HI, co więcej — brak jest korelacji pomiędzy mianem przeciwciał w surowicach przed i po ich działaniu. Autorzy podkreślają, że surowice cieląt wykazują ponadto różną wrażliwość na działanie trypsyny i nadjodanu potasu.

Badania własne, w których użyto 30% krwinek gęsi do absorpcji niespecyficznych inhibitorów w surowicach bydła pozwoliły na opracowanie czułego i swoistego mikrotestu zahamowania hemaglutynacji. Należy zaznaczyć, że dzięki zastosowaniu mikrotestu HI, wzrosło około 20—25-krotnie możliwości przebadania większej ilości surowic niż przy wykonywaniu odczynu HI na dużej płycie z pleksiglasu lub przy zastosowaniu tradycyjnej metody próbkiowej. Możliwości te odbiegają od pełnej automatyzacji odczynu zahamowania hemaglutynacji wykazanych przez Weberta i Cohena (11), jednakże wykorzystanie do mikrotestu HI krwinek gęsi stwarza nowe możliwości szybkiej i swoistej metody w diagnostyce serologicznej parainfluenzy bydła.

Piśmiennictwo

1. Dowson P. S.: *J. comp. Path.* 73, 328, 1963.
2. Ketter A. V., Hamparian V. V., Hilleman M. R.: *J. Immunol.* 87, 126, 1961.
3. Rossi C. R., Kiesel G. K.: *Appl. Microbiol.* 22, 32, 1971.
4. Rułka J.: *Medycyna Wet.* 43, 342, 1987.
5. Sentsui H., Kono Y.: *Infect. Immunol.* 14, 325, 1976.
6. Sentsui H., Kono Y.: *Arch. Virology.* 67, 75, 1981.
7. Sentsui H., Thorn R. M., Kono Y., Ferrer J. F.: *J. gen. Virol.* 59, 83, 1982.
8. Sever J. L.: *J. Immunol.* 88, 320, 1962.
9. Sibal L. R., Fink M. A., Vice J. L., Brendt B. L.: *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 122, 591, 1966.
10. Takatsy G.: *Acta microbiol. hung.* 3, 191, 1955.
11. Webert D. W., Cohen D.: *Appl. Microbiol.* 22, 66, 1971.

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

Rułka J. — Серологическая диагностика параинфлюэнцы скота с применением микротеста затормождения гемагглютинации с кровяными тельцами гусей

Отмечено положительное влияние абсорбции неспецифических рецепторов в сыворотках скота при применении 30% суспензии кровяных телец гусей. Абсорбция проводилась в темп. 37°C в течение 30 мин. с использованием $3,1 \times 10^7$ — $9,2 \times 10^7$ эритроцитов/0,7 мл сыворотки. Добавка телец к исследуемой сыворотке в отношении 1:10, не влияет отрицательно на титр противотел для виртуса PI₃ в микротесте HI. Результаты теста, проведенного на 3 плитках, указывают на повторяемость полученных результатов. Неабсорбированные сыворотки, дающие отрицательный результат тесте, после абсорбции показывали титр 1:10—1:40±. Проведенные исследования указывают на полную пригодность кровяных телец гусей и плиток фирмы PLASTOMED к кутиновой серологической диагностике параинфлюэнцы скота.

Rułka J. — Serological diagnosis of bovine parainfluenza by HI micromethod using goose erythrocytes

A profitable influence of non-specific absorption of inhibitors from bovine sera by means of a 30 per cent suspension of goose erythrocytes was found. The process of absorption was carried out at 37°C for 30 minutes using 3.1×10^7 — 9.2×10^7 erythrocytes per 0.7 ml of serum. The addition of erythrocytes to the serum in relation 1:10 did not influence the level of antibodies against PI-3. The results of the microtest were reproducible. Non-absorbed sera reacting negatively following absorption had titres from 1:10 to 1:40. The examinations point to the usefulness of goose erythrocytes and plates, produced by Plastomed, for serological tests performed with bovine parainfluenza virus.

ALEXANDER A. D., RULE P.: Ocena penicylin, cefalosporyn, tetracyklin i erytromycyny w leczeniu doświadczalnej leptospirozy chomików. (Evaluation of penicillins, cephalosporins, tetracyclines and erythromycin in treatment of experimental leptospirosis in adult hamsters). *Isr. J. Vet. Med.* 43, 296-306, 1988 (4)

Przebadano skuteczność penicylin, cefalosporyn, tetracyklin i erytromycyny w leczeniu zakażenia *L. interrogans serovar. bataviae* u chomików syryjskich, które padły bez leczenia po 6—7 dniach po zakażeniu. Leki stosowano początkowo w dawce 10, 40 i 160 mg/kg masy ciała jednorazowo 2 dni po zakażeniu. Te antybiotyki, które przyniosły efekt stosowano następnie 4 i 5 dnia po zakażeniu w dawce 2,5 lub 5,0

mg/kg przez 5 kolejnych dni. Zwierzęta, które przeżyły 21 dni po zakażeniu badano na nosicielstwo leptospir w nerkach. Bardzo skuteczna okazała się ampicylina, bekampicylina, cyclociaina, piperacilina, doksyacylina, chlorotetracyklina, cefotaksyn i imoxalaktam. Słabe efekty lub brak efektów notowano po stosowaniu cefaleksyny, cefadroxilu, cefamandolu, cefaperazonu i erytromycyny. Wszystkie antybiotyki, które były skuteczne zastosowane na 1—2,5 dni przed padnięciem powodowały przeżycie zwierząt. Obecność leptospir w nerkach stwierdzono u chomików leczonych doksyacyliną, chlorotetracykliną, cyclociainą i piperacyliną.

G.