

PRAKTYKA LABORATORYJNA

ANDRZEJ FITZNER, ANDRZEJ KĘSY, MARTA CHROBOCIŃSKA *

Porównanie zdolności aglutynowania erytrocytów człowieka grupy O, A, B i AB przez wirus krwotocznej bronchopneumonii królików (RHDV)

Zakład Badania Pryszczycy Instytutu Weterynarii, ul. Wodna 7, 98-220 Zduńska Wola
* Pracownia Immunoprofilaktyki Instytutu Weterynarii, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Summary

Capacity of human erythrocytes O, A, B and AB groups to agglutinate the rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV)

The usefulness of human erythrocytes taken from donors of different blood groups was assessed in respect to their capacity to react with a suspension of rabbit organs derived from infected animals with RHDV. According to the authors HA test should be carried out in a 0.85 per cent NaCl solution (pH = 7.0) at room temperature and the results should be read after 2–3 hours.

Krwotoczną bronchopneumonię królików, określaną również nazwą pomór królików, rozpoznano w Polsce w 1988 r. (1). Pierwsze przypadki tej choroby wystąpiły w 1984 r. w Chinach (3, 16). Chorobę określa się nazwą Viral Haemorrhagic Disease (VHD), a w ostatnim okresie również Rabbit Haemorrhagic Disease, a jej czynnik etiologiczny jest nazywany Rabbit Haemorrhagic Disease Virus (RHDV) i określono to przyjęto w pracy (6, 7, 8, 14). Rozwinięto szereg metod diagnostyki laboratoryjnej, w tym m.in. test immunoenzymatyczny, immunofluorescencyjny, barwienie histologiczne i mikroskopię elektronową (1, 2, 4, 5, 8, 9, 11, 13, 14, 15, 16). Jednak najbardziej przydatnym ze względu na łatwość wykonania, czułość i niezawodność okazał się odczyn hemaglutynacji z erytrocytami człowieka (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 12, 16). W początkowym okresie zarówno autorzy zagraniczni, jak i krajowi, używali wyłącznie erytrocytów ludzkich grupy O. W warunkach krajowych stanowiło to znaczną niedogodność, gdyż tylko 32,5% populacji w Polsce posiada krew tej grupy (10). W związku z powyższym postanowiono sprawdzić przydatność krwinek od dawców o różnych grupach krwi oraz określić optymalne warunki wykonania odczynu, z uwzględnieniem temperatury i czasu reakcji oraz pH buforu używanego do rozcieńczania materiału wirusowego i zawieszania erytrocytów. Wydawało się to tym bardziej celowe, gdyż już w 1988 r. w pojedynczych badaniach uzyskiwano wyniki pozytywne z krwinkami dawców pozostałych grup bez względu na czynnik Rh (5).

Material i metody

Szczepy wirusa. Wykorzystano 2 szczepy wirusowe izolowane w 1988 r. KGM i SGM (1) oraz szczep PD wyizolowany w 1989 r. i szczep ZD w 1990 r. Szczepy używano w postaci 20% zawiesiny narządów wewnętrznych padłych królików poddanej zamrożeniu, oczyszczeniu chlo-roformem i odwirowaniu lub w postaci liofilizowanej. Materiał płynny przechowywano w zamrożeniu w ok. -20°C, a liofilizaty w temperaturze ok. 4°C. Materiał wirusowy

badano w dwukrotnie wzrastających rozcieńczeniach rozpoczynając od 1/5, ewentualnie 1/10.

Erytrocyty. Świeżą krew pobierano na 3,8% cytrynian sodu lub do płynu Alsevera i oznaczano grupę oraz czynnik Rh. Krew była przydatna do badań przez ok. 3 tygodnie. Korzystano również z próbek banku krwi w Szpitalu Miejskim w Zduńskiej Woli lub w Puławach. Do sporządzonych rozcieńczeń wirusa dodawano 0,75% (początkowo 1%) krwinki zawieszono w 0,85% roztworze NaCl o pH ok. 7,0. Przy badaniach wpływu pH na miano hemaglutynacyjne przygotowano bufor o pH 3, 5, 7 i 9 i używano je zarówno do rozcieńczania wirusa, jak i zawieszania krwinek.

Obliczanie wyników. Po odczytaniu reakcji wyniki dodatnie podano jako wartość wykładnika potęgi przy podstawie 2. Wyniki negatywne podano jako wartość < 10. Odczyn nastawiano w objętości 1 ml.

Wyniki i omówienie

Z danych tab. 1 wynika, że miano HA szczepu SGM odczytane przy nastawieniu odczynu w temperaturze 4°C i 22°C było bardzo zbliżone lub identyczne. Nie odnotowano także wyraźnej różnicy związanej z czasem odczytu. Natomiast miano liofilizatu było nieco wyż-

Tab. 1. Czas reakcji i wysokość miana hemaglutynacyjnego RHDV z erytrocytami człowieka (grupa 0+) w temperaturze 4°C i 22°C

Nazwa szczepu i sposób przygotowania	Temperatura reakcji	Wysokość miana po upływie:			
		2 h	3 h	7 h	20 h
SGM liofilizat SGM zawiesina	4°C	10×2 ⁹	10×2 ⁹	10×2 ⁹	10×2 ⁹
		10×2 ⁷	10×2 ⁷	10×2 ⁷	10×2 ⁷
SGM liofilizat SGM zawiesina	22°C	10×2 ⁹	10×2 ⁸	10×2 ⁸	10×2 ⁸
		10×2 ⁷	10×2 ⁶	10×2 ⁶	10×2 ⁶

Tab. 2. Czas reakcji i wysokość miana HA liofilizowanego wirusa RHDV -- szczep SGM z erytrocytami człowieka w temperaturze 37°C

Grupa krwi (różni dawcy)	Wysokość miana				
	w temperaturze 37°C po upływie:				w 22°C po powtórny-m zmieszaniu i pozostawieniu na 1 h
	45'	1 h	2 h	3 h	
0	10×2 ⁸	10×2 ⁷	10×2 ⁷		10×2 ⁵
A ₁ +	< 10	< 10	< 10		10×2 ⁷
A ₁ +	< 10	< 10	< 10		10×2 ⁷
A ₁ +	10×2 ³	10×2 ⁵	< 10		
A ₂	10×2 ⁹	10×2 ⁸	10×2 ⁸	10×2 ⁴	
AB+	10×2 ⁸	10×2 ⁸	10×2 ⁸	10×2 ⁷	
B+	10×2 ⁸	10×2 ⁹	10×2 ⁹	10×2 ⁹	

Tab. 3. Wysokość miana HA wybranych szczepów RHDV w temperaturach 4°, 22° i 37°C

Nazwa szczepu	Grupa krwi (różni dawcy)	Wysokość miana			
		4°C 4 h	22°C 2 h	37°C 2 h	w 22°C po powtórnym zmieszaniu i pozostawieniu na 1 h prób badanych w 37°C
ZD po filtracji 0,22 um	A+	10×2^{10}	10×2^{10} 10×2^{11}	< 10 < 10	10×2^{10} 10×2^{11}
PD zawiesina	A+	10×2^6	10×2^6	< 10	10×2^5
SGM liofilizat	A+		10×2^7 10×2^8 10×2^8	< 10 < 10 10×2^4	10×2^6 10×2^8 10×2^8
SGM liofilizat	B+ 0+ 0-	10×2^8 10×2^8 10×2^8	10×2^7 10×2^8	10×2^7 < 10 10×2^7	10×2^6

Tab. 4. Wysokość miana HA wybranych szczepów RHDV w temperaturze pokojowej wobec erytrocytów ludzi o różnych grupach krwi

Grupa krwi (różni dawcy)	Nazwa szczepu RHDV							
	SGM		KGM		PD		ZD	
	liczba badań	\bar{x} miana	liczba badań	\bar{x} miana	liczba badań	\bar{x} miana	liczba badań	\bar{x} miana
0	14	$10 \times 2^{8,2}$	3	$10 \times 2^{8,3}$	15	10×2^9	3	$10 \times 2^{8,7}$
A	8	$10 \times 2^{8,2}$	1	10×2^8	9	$10 \times 2^{7,5}$	2	$10 \times 2^{8,5}$
B	8	$10 \times 2^{8,4}$	1	10×2^8	3	$10 \times 2^{9,3}$	1	10×2^{10}
AB	8	10×2^8	1	10×2^8	7	10×2^9	—	—

sze (o 2 rozcieńczenia) niż wirusa przechowywanego w stanie zamrożonym. W tab. 2 przedstawiono wyniki reakcji w 37°C. Wśród nich zasługują na uwagę rezultaty ujemne. W tych przypadkach po 2 godzinach przetrzymywania w 37°C i po ponownym wymieszaniu, odczyn dodatni wystąpił po ok. 1 godz. przetrzymywania w temperaturze pokojowej. Obserwację tę dodatkowo potwierdzają dane zebrane w tab. 3, które wskazują, że odczyn przeprowadzony w cieplarni jest bardziej zawodny niż przy badaniu w temperaturze chłodni lub pokojowej. Potwierdzono wystąpienie reakcji dodatniej w temperaturze pokojowej z materiałem określonym jako ujemny w 37°C. Dodatkowe próby wykazały, że wirus jest całkowicie adsorbowany na erytrocytach, gdyż w płynie pobranym z nad krwinek jego obecności nie wykazano. Natomiast uzupełnienie płynu do początkowej objętości, ponowne zmieszanie erytrocytów i przeprowadzenie reakcji w temperaturze pokojowej dawało wynik identyczny, lub różniący się o jedno rozcieńczenie, z odczytanym dla odczynu nastawionego w temperaturze pokojowej. Z przeprowadzonych badań wynika, że najodpowiedniejszą temperaturą do badania miana HA okazała się temperatura pokojowa (w zakresie od 18 do 25°C).

Badania nad wpływem pH wykazały, że powtarzalne wyniki uzyskiwano przy pH od 5,0 do 7,5. W pH 3 szybko następowała hemoliza krwinek. Natomiast w pH 9 wyniki były ujemne.

Zbiornicze zestawienie wyników badań przedstawiono w tab. 4. Używano krwi dawców grup A, B, AB i 0, zarówno Rh⁺, jak i Rh⁻. Obliczone średnie miana HA okazały się bardzo zbliżone, gdyż dla poszczególnych

szczepów różnice nie przekroczyły wartości potęgi 0,4 (maksymalnie dla szczepu PD 1,8 z krwinkami B $10 \times 2^{7,5}$, z pozostałymi od $10 \times 2^{9,0}$ do $10 \times 2^{9,3}$). Natomiast próby zastąpienia erytrocytów człowieka innymi krwinkami (psa, kury, barana i królika) dały wynik ujemny. Wynik ten jest zgodny z danymi uzyskanymi przez Mizak i wsp. (dane niepublikowane), podczas gdy Liu i wsp. (3), Nianxing Du (6), Von Soike i wsp. (12) podali, że reakcję dodatnią uzyskiwali także z erytrocytami kury, barana, świnki morskiej i gęsi, jednak określone miano HA było wielokrotnie niższe i niestabilne.

Reasumując wyniki badań można stwierdzić, że odczyn HA może być wykorzystywany w diagnostyce laboratoryjnej RHD. Na równi przydatnymi do wykonania odczynu są erytrocyty człowieka grupy 0, jak i krwinki grupy A, B i AB. Materiał badany należy rozcieńczać w 0,85% roztworze NaCl o pH zbliżonym do obojętnego i stosować 0,75—1% krwinki zawieszony w tym samym roztworze. Odczytu reakcji należy do-

konać po 2—3 godzinach lub następnego dnia. Odczyn ten jest szczególnie przydatny przy rozpoznawaniu choroby u zwierząt wykazujących mało charakterystyczne zmiany w narządach wewnętrznych, a zwłaszcza w płucach. Uzyskiwany wynik pozytywny lub negatywny jest rozstrzygający dla potwierdzenia rozpoznania klinicznego i anatomopatologicznego.

Piśmiennictwo

- Górski J., Mizak B., Mizak Z., Komorowski A.: *Zycie wet.* 63, 266, 1988.
- Lee C. S., Park C. K.: *Korean J. vet. Res.* 27, 277, 1987.
- Liu S. J., Xue H. P., Pu B. Q., Qian N. H.: *Anim. Husb. Vet. Med.* 16, 153, 1984.
- Mizak B., Chrobocińska M., Górski J.: *Medycyna Wet.* w druku.
- Mizak B., Górski J., Kozaczyński W.: *Bull. Inst. Vet.* 34, 1991.
- Nianxing Du.: *Dt. tierärztl. Wschr.* 97, 114, 1990.
- Novotny N. von, Fuchs A., Schilcher F., Loupal G.: *Wien. tierärztl. Mschr.* 77, 19, 1990.
- Ohlänger V. F. von, Haas B., Ahl R., Weiland F.: *Tierärztl. Umschau* 44, 384, 1989.
- Pu B. Q., Qian N. H., Cui S. J.: *Chin J. vet. Med.* 11, 16, 1985.
- Rudowski W., Pawełski S.: *Współczesna transfuzjologia.* PZWL, Warszawa, 1979, s. 151.
- Smid B., Valíček L., Stěpánek J., Jurák E., Rodák L.: *J. Vet. Med.* B 36, 237, 1989.
- Soike D. von, Wilke I., Tutte B., Stropp M., Rösler D., Rummel H. J., Richter W., Werdler H., Schlüter H., Böhme R.: *Mh. Vet.-Med.* 44, 375, 1989.
- Sołtysiak Z., Michalska Z.: *Medycyna Wet.* 65, 521, 1989.
- Valíček L., Smid B., Rodák L., Kudrna J.: *Arch. Virol.* 112, 271, 1990.
- Wei J. S., Yu N. S., Yang Y. F., Zhang X. S., Long P. R., Shen J. R.: *Chin. J. vet. Sci. Technol.* 3, 20, 1987.
- Xu Z. J., hen W. X.: *Vet. Res. Communications* 13, 25, 1989.

Adres autora: dr Andrzej Fitzner, ul. Wodna 7, 98-220 Zduńska Wola