

## **Sérologická diagnostika obrny vepřů (Kloboukovy nemoci)**

*Серологическая диагностика паралича свиней (болезнь Клобоука)*

*Die serologische Diagnostik der Schweinelähme (Klobouk'schen Krankheit)*

Bohuslav KORYCH, Eduard ŠRAJBR, František PATOČKA, Vladimír KUBELKA,  
Milan CHÝLE

*Ústav pro lékařskou mikrobiologii a imunologii K. U. Praha*

Došlo dne 3. X. 1960

### **Úvod**

Pro sérologickou diagnostiku Kloboukovy nemoci je propracována neutralizační reakce a reakce precipitační. Nejvíc bylo jinde i u nás používáno seroneutralizace, která je poměrně snadno proveditelná, bez zvláštních nároků a jejíž výsledky jsou dobře hodnotitelné. Průkaz neutralizačních protilátek je ukazatelem stavu imunity buď pro překonání přirozeného onemocnění nebo v důsledku arteficiální imunizace ať již virem aktivním, inaktivním nebo avirulentním.

Naše sdělení se bude zabývat průkazem, hodnocením a eventuálně dynamickým vzestupem především protilátek neutralizačních. Zároveň jsme se pokusili o průkaz praktické použitelnosti komplementfixačních protilátek a protilátek aglutinujících virem sensibilizované krvinky.

### **Materiál a metodika**

**Virus:** Ve všech pokusech bylo pracováno s virem I. O. vepřů kmen Praha s počtem více než 100 *i. c.* pasáží na vepřích a dvanácti pasážích na tkáňových kulturách.

**Tkáňové kultury:** Bylo užito buněk stabilní linie epithelu vepřových ledvin (kmen PK). Kultury byly udržovány a připravovány způsobem popsáným jedním z autorů 1960 (1). Zkumavkové kultury byly zakládány s počtem 40 000 živých buněčných elementů na 1 ml a zkumavku, v kultivačním mediu složeném z 0,5 % laktalbuminhydrolyzátu v Earlově nárazníkovém roztoku a 10 % telecího séra. Zpravidla do šesti dnů byly kultury konfluentní a mohly být vzaty k pokusu.

**Infekce kultur:** Konfluentní zkumavkové kultury byly po odsátí media promyty Hanksovým nárazníkovým roztokem a infikovány množstvím 0,1 ml viru v příslušném ředění. Po 15 min., kdy byly zkumavky uloženy v horizontální poloze, bylo přidáno udržovací medium v množství 0,9 ml. Jako udržo-

vací medium po infekci kultur bylo užito Earlova nárazníkového roztoku s 0,5 % laktalbuminhydrolyzátu a 2 % telecího séra. pH kultur bylo upraveno na hodnotu 7,6–7,7.

**S é r u m k r e a k c í m** bylo vzato z imunizačních pokusů při použití viru inaktivovaného formalinem nebo beta-propiolaktonem, dále z vepřů z lokalit, kde se infekční obrna vepřů vyskytovala a z lokalit, kde se infekční obrna ve formě klinicky zřejmých infekcí nevyskytovala. Paralelně ve všech případech terénních vzorků jsme si ověřili, zda byla v dané lokalitě vakcinováno proti I. O. nebo ne. U vzorků krví odebíraných v terénu bylo pokud možno co nejdříve odděleno sérum, které pak bylo odesláno do laboratoře v sérologických zkumavkách.

**N e u t r a l i z a č n í p o k u s :** Inaktivované vzorky séra dvojnásobně ředěné udržovacím médiem od počátečního ředění 1 : 4 do ředění 1 : 1024 byly smíchány se stejným objemem příslušného ředění viru, po promíchání inkubovány 1 hod. při pokojové teplotě (22° C) a pak přidány v množství 0,1 ml do zkumavkové kultury. Virus byl užit v ředění odpovídajícímu 3000 TCID<sub>50</sub> v 0,1 ml. Paralelně byla do pokusu zařazena příslušná kontrola viru ředěného stejným dílem udržovacím médiem.

V orientačních testech byla provedena ředění séra od 1 : 4 do 1 : 64.

Hodnocení neutralizačního pokusu bylo prováděno v době, kdy v kontrolních zkumavkách byly změny vyvolané virem hodnotitelné ++ (mnohočetné ložiskové změny).

**C o l o r - t e s t y** byly prováděny ve zkumavkových kulturách PK buněk infikovaných při zakládání kultury. V tomto případě byl počet živých buněčných elementů na 1 ml a zkumavku 15 000, udržovací medium se skládalo z Earlova nárazníkového roztoku s 0,5 % laktalbuminhydrolyzátu a 5 % telecího séra. pH kultur bylo upraveno na iniciální hodnotu 7,6. Ředění séra, množství viru i inkubace byly stejné jako v neutralizačním pokusu na konfluentních tkáních.

### **Komplementfixační reakce**

**P ř í p r a v a s é r :** vepřová séra byla před použitím k reakci vazby komplementu zbavena prokomplementarity metodou podle **B o u l a n g e r a** (2). U jednotlivých vzorků bylo sníženo pH pomocí N/1 HCl na hodnotu 4,6 a inkubováno 6 až 8 hod. při 4° C. Tato doba byla vybrána jako nejvhodnější z testovaných inkubací 2, 4, 6, 8 a 18 hod. Po inkubaci séra za sníženého pH byla reakce upravena na hodnotu 7,0 přidáním N/1 NaOH. Takto připravená séra po inaktivaci 30 min. při 56° C byla vzata k reakci.

**K o m p l e m e n t :** Jako komplementu bylo použito směsi morčecích sér konservovaných podle **S o n n e n s c h e i n a**. Do reakce bylo používáno 1,5 a v některých případech 1,25 jedn. komplementu podle předchozí titrace v objemu 0,1 ml.

**H e m o l y t i c k ý s y s t é m :** Bylo užíváno 1 % beranních krvinek sensibilizovaných dvěma jednotkami amboceptoru (ÚSOL). Do reakce bylo užito množství 0,2 ml.

**A n t i g e n :** Jako antigenu bylo užito centrifugované medium tkáňových kultur, které byly infikovány virem Kloboukovy obrny. Medium pro přípravu antigenu bylo složeno z 0,5 % laktalbuminhydrolyzátu v Earlově nárazníkovém roztoku s 1 % morčecího inaktivovaného séra.

**P r o v e d e n í K F R :** Reakce byla prováděna metodou podle **K o l m e r a** (3) a v některých případech pro srovnání byla užita metoda podle **R i c e** (4).

Při ledničkové Kolmerově metodě bylo do reakce vzato 0,1 ml antigenu, 0,1 ml séra v příslušném dvojnásobném ředění počínaje 1 : 4 a 0,1 ml komple-

mentu. Po inkubaci přes noc při 4° C byl přidán hemolytický systém a směs opět inkubována 30 min. ve vodní lázni při 37° C.

Výsledky byly hodnoceny čtyřstupňovitě, za pozitivní reakci v příslušném ředění séra byla pokládána ředění, kde hemolýza nedosahovala 50 % erythrocytů (+++). Titr vyjadřuje původní ředění séra.

Při vazbě komplementu metodou podle Rice byl komplement naředěný ve veronálovém nárazníku (5) v poměru 1 : 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 80, 100, přidáván v množství 0,1 ml ke směsi 0,1 ml antigenu a 0,1 ml séra standardně naředěného 1 : 4. Výsledky jsou v tomto způsobu reakce udávány tzv. indextitrem, který vyjadřuje numericky jednotky vázaného komplementu.

Veronálový nárazníkový roztok: Při reakci vazby komplementu byl užíván pro ředění veronálový nárazníkový roztok podle M a y e r a a spol. (5), pH roztoku 7,2–7,3.

Detekce protilátek aglutinujících virem sensibilizované krvinky byla prováděna metodou podle B o y d e n a (6). Lidské krvinky skupiny 0 byly třikrát proprány ve fyziologickém roztoku o pH 7,2. Sediment krvinek byl smíchán se stejným dílem roztoku tanninu, ředěného 1 : 40 000 ve fyziologickém roztoku. Směs byla inkubována 30 min. při laboratorní teplotě. Pak byly krvinky třikrát promyty fyziologickým roztokem, resuspendovány nakonec na 2% suspenzi ve fyziologickém roztoku. K propraným tanninovaným erythrocytům byl přidán antigen, tj. virus Kloboukovy obrny (připravený stejným způsobem jako pro KFR) ve stejném poměru a směs byla ponechána 30 min. při laboratorní teplotě. Pak byly krvinky znovu třikrát proprány ve fyziologickém roztoku s 1 % inaktivovaného králičího séra. Po posledním proprání byla ze sedimentu krvinek připravena 1% suspenze ve fyziologickém roztoku s 1 % inaktivovaného séra. Ve vlastním pokusu pak byly tyto krvinky smíchány se stejným dílem inaktivovaného séra (0,2 ml séra a 0,2 ml krvinek). Směs byla inkubována při pokojové teplotě po dobu 1–2 hod. Jako kontroly bylo užito tanninovaných krvinek bez virového antigenu.

## V ý s l e d k y

V tab. I uvádíme výsledky naší séroneutralizační reakce, a to u sér získaných z terénu. Séra byla rozdělena do pěti skupin. Neutralizační testy byly prováděny s ředěním 1 : 8, 1 : 16, 1 : 32 a 1 : 64. První skutečností, která z tabulky vyplývá, je ta okolnost, že s výjimkou 3 zvířat z celkového počtu 44, u nichž nebyl zjištěn vůbec žádný titer protilátek, byl u všech titer alespoň 1 : 16, a to nepřihlížeje ani k tomu, zda byl chov označen jako zamořený nebo jako takový, v němž obrna pozorována nebyla.

### I.

Počet vzorků	Titr séra v % vzorků						
	0	8	16	32	64	> 64	
14	21,4	0	21,4	14,2	21,4	21,4	zam. chov
5	0	0	60	40	0	0	zam. chov
10	0	0	30	20	40	10	zam. chov
10	0	0	40	30	0	30	nezam. chov
5	0	0	40	40	0	20	očkov. chov

Titry neutralizačních protilátek u zvířat imunizovaných vakcinou inaktivovanou formolem nebo beta-propiolaktonem jsou zachyceny na tab. II. Rozdíl v titrech protilátek před očkováním a po šestinedělním intervalu ukazuje jasné stoupnutí hladiny protilátek.

II.

Inaktivní virus			Virulentní virus		
Číslo	Titr		Číslo	Titr	
	před	po		před	po
806	< 4	1 : 128	244	1 : 4	1 : 512
809	1 : 4	1 : 128	242	1 : 8	1 : 512
804	1 : 8	1 : 512	235	1 : 8	1 : 1024
808	1 : 16	1 : 512	243	1 : 16	1 : 512

III.

Vzorek séra č.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
NT	0	0	0	8	30	8	8	64	32	64	64	32	64	4	32
KFR	0	0	0	4	4	4	4	4	4	4	4	8	8	0	0

Neutralizační reakce zaznamenané na tab. I a II byly paralelně prováděny na konfluentních tkáních a metodou color-testů. Výsledky získané oběma metodami byly dobře porovnatelné.

Tab. III znázorňuje výsledky srovnání neutralizačního testu s KFR, tab. IV rozšiřuje toto porovnání ještě o reakci podle Boydena.

Porovnání výsledků neutralizačních testů s KFR u terénních pokusů ukázalo tyto výsledky: z celkem testovaných 20 vzorků vepřových sér odebraných v lokalitách s výskytem I. O. vepřů a z míst, kde bylo prováděno očkování proti I. O., dávala reakce vazby komplementu a neutralizační reakce souhlasné výsledky v 16 případech, ve 3 případech byly výsledky nesouhlasné. V jednom případě bylo sérum antikomplementární (neutralizační test byl negativní), u 3 nesouhlasných případů byly přítomny jen neutralizační protilátky. U pěti vzorků sér hovězího dobytka a pěti vzorků sér kozích odebraných v lokalitách s výskytem I. O. vepřů, nebyly prokázány neutralizační ani KF protilátky.

V jiném experimentu byl sledován výskyt virusneutralizačních protilátek u zvířat v místech, kde se I. O. nevyskytuje a nebylo vakcinováno. Z orientačního pokusu z 20 vzorků sér ředěných 1 : 4 a 1 : 8 obsahovaly všechny vzorky i v ředění 1 : 8 tolik protilátek, že neutralizovaly 3000 TCID<sub>50</sub>.

IV.

Vzorek séra č.	NT	KFR	BOYDEN
1	64	8	16
2	128	4	32
3	128	16	16
4	512	16	64
5	512	8	32
6	512	8	128



Naše sdělení se zabývá průkazem, hodnocením a eventuálně dynamickým vzestupem především protilátek neutralizačních. Pokusili jsme se o důkaz praktické použitelnosti protilátek vázajících komplement a protilátek aglutinujících virem sensibilizované krvinky. Jsme si vědomi, že naše zkušenosti v tomto směru jsou pouze v iniciální fázi. KFR i reakce podle Boydena může podle našich zkušeností mít orientační význam a mají tu výhodu, že jsou realizovatelné i v tom typu rutinních diagnostických laboratoří, pro které by metodika neutralizačního testu byla příliš náročná.

Prozatím nikdo u nás nemá zkušenosti s tím, jaké titry je možno považovat za specifické a které za nespecifické. Podle údajů M a y r a (7) mají býti titry do 1 : 8 alespoň u mladších zvířat považovány za nespecifické. Zhruba titry 1 : 30 za pochybné a od 1 : 60 za specifické. Podstata tohoto třídění a jeho odůvodnění nám není zcela jasné. Vzhledem však k tomu, že u nás přece jen existují zvířata se zcela negativními titry protilátek a pak vzhledem k tomu, co hodnotíme mimo rámeček tohoto sdělení, tj. pozorování byť i zatím ojedinělé, že i u tzv. nespecifických titrů jsme zachytili po vstříknutí specifického antigenu vyslovený boosterovací efekt, soudíme, že již titry při nejmenším 1 : 16 v našich pokusech svědčí nejpravděpodobněji pro kontakt zvířete s virem obrny. V tom případě by ovšem z naší tab. I vyplývalo, že řada našich chovů, ne-li většina, je promořena virem obrny, která infikuje v inaparentní formě většinu zvířat, jak zcela určitě můžeme podle rigorózního kritéria soudit. Svědčí o tom čtyři pozitivně reagující zvířata s titrem větším než 1 : 64 z 29 zvířat ze zamořených chovů při srovnání s třemi zvířaty z 10 s titrem větším než 1 : 64 z chovů označených jako nezamořené.

Na okraj našich pozorování citujeme práci H e c k e h o (8), který jinou metodikou a jiným propočítáváním dosáhl ve dvou promořených obcích, kde proběhla epizootie, u inaparentních infekcí výsledky, které jsou s našimi analogizovatelné.

Vzhledem k tomu, že užíváme vyšší dávky viru k neutralizačním testům, musí býti nutně námi udávané titry přísněji specifické.

Sami jsme propracovali a zde poprvé předkládáme své zkušenosti s reakcí vazby komplementu a s hemaglutinací podle Boydenova principu. Pokud je nám známo, většina autorů považuje první z těchto reakcí u vepřové obrny za nerealizovatelnou a nevíme, zda byla také v sérologii vepřové obrny použita. U reakce vazby komplementu se zdají být dosavadní neúspěchy způsobeny zvláštním složením séra vepřů. Proto jsme se snažili tyto nevídané vlastnosti séra odstranit metodou podle Boulanger (2) odstraněním prokomplementarity séra.

Výsledky námi uvedené ukazují na porovnatelnost KFR s neutralizačními testy.

Porovnání metody NT, KFR a Boydenovy ukazuje, že i při větší citlivosti Boydenovy metody proti KFR nejlepším testem pro detekci i malých kvant protilátek zůstává neutralizační reakce a že reakce vazby komplementu a aglutinace krvinek metodou podle Boydena by mohla být jednoduchou dostačující metodou pro detekci vyššího titru protilátek, eventuálně jednoduchou kontrolou imunizačního efektu terénního očkování.

## Souhrn

1. Propracována standardní metodika průkazu protilátek neutralizujících cytopatogenní efekt viru KN na stabilní linii epithelu vepřových ledvin (PK). Dosa-

žené výsledky jdou paralelně s color-testem za užití stejných buněk. Jako zdroje protilátek použito nejprve imunizovaných zvířat, kde dosaženo titru až 1 : 512. V další sérii pokusů pátráno týmiž metodami po protilátkách u vepřového bravu v terénu, kde byly opětovně zjištěny jejich podstatně nižší titry. Specificita nízkých titrů protilátek je v práci diskutována.

2. Použitá metodika adsorpce viru na taninované krvinky podle Boydena. Imunní séra jasně aglutinují takto značené krvinky. Referováno o možnostech této metodiky pro rutinní detekci vyššího titru protilátek a možnostech použití k orientačnímu průkazu imunizačního efektu. Pro průkaz protilátek, jež jsou důsledkem terénního promoření, se zdá tato metodika málo citlivá.

3. Jsou předloženy výsledky sérologických pokusů z použití reakce vazby komplementu.

\*

Literatura k dispozici u autorů.

### **Серологическая диагностика паралича свиней (болезнь Клобука)**

1. Была подготовлена стандартная методика достоверности антител, нейтрализующих цитопатогенный эффект вируса болезни Клобука на стабильных линиях эпителии почек свиней (РК). Достигнутые результаты параллельны цветному тесту при использовании одинаковых клеток. В качестве источника антител использовались, в первую очередь, иммунизированные животные, у которых был достигнут титр 1 : 512. В дальнейшей серии опытов теми же методами искали антитела у свиней в стадах, у которых были повторно установлены существенно более низкие титры. Специфика низких титров антител была продискутирована в работе.

2. Была применена методика адсорбции вируса на танинные кровяные тельца по методу Бойдена; иммунные сыворотки явно агглютинируют таким образом обозначенные кровяные тельца. В работе сообщается о возможностях применения этой методики для рутинной детекции более высокого титра антител и о возможностях применения для ориентировочной достоверности иммунизационного эффекта. Для достоверности антител, которые являются результатом местного заражения, эта методика оказывается мало подходит.

3. В работе представлены результаты серологических опытов с применением реакции связывания компонента.

### **Die serologische Diagnostik der Schweinelähme (Klobouk'schen Krankheit)**

1. Es wurde eine Standardmethodik zum Nachweis von Antikörpern, die den zytopathogenen Effekt des Virus der KK auf eine stabile Linie von Nierenepithel (PK) neutralisieren, ausgearbeitet. Die erzielten Ergebnisse gehen parallel mit dem Farbttest bei Verwendung der gleichen Zellen. Als Quelle der Antikörper wurden zuerst immunisierte Tiere verwendet, wobei Titer bis 1:512 erzielt wurden. In einer weiteren Versuchsserie wurde mittels derselben Methoden nach Antikörpern bei Schweinen im Terrain gefahndet, wo diese wiederholt in erheblich niedrigeren Titern festgestellt werden konnten. Besprochen wird die Spezifität der niedrigen Titer der Antikörper.

2. Es wurde die Methodik der Adsorption des Virus an mit Tannin vorbehandelte Blutkörperchen nach Boyden angewandt. Die Immunsere agglutinieren die so behandelten Blutkörperchen. Besprochen wird die Möglichkeit, diese Methodik zur Routinedetektion höherer Titer der Antikörper zu verwenden, sowie zum orientierenden Nachweis des Immunisationseffekts. Für den Nachweis von Antikörpern, die eine Folge der Terrainverseuchung sind, scheint diese Methode nicht empfindlich genug zu sein.

3. Berichtet wird über die Ergebnisse serologischer Versuche mit Benützung der Komplementbindungsreaktion.