

VĚDECKÝ ČASOPIS



VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

8

ROČNÍK 31 (LIX)
PRAHA
SRPEN 1986
CENA 10 Kčs
CS ISSN 0590-3214

ČESKOSLOVENSKÁ AKADEMIE ZEMĚDĚLSKÁ
ÚSTAV VĚDECKOTECHNICKÝCH INFORMACÍ
PRO ZEMĚDĚLSTVÍ

Vědecký časopis

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

Rídí redakční rada:

akademik Otto Jaroslav Vrtiak (předseda), akademik Koloman Boďa, MVDr. Miroslav Dvořák, CSc., prof. MVDr. Ján Elečko, CSc., MVDr. Miloš Halaša, CSc., prof. MVDr. Jozef Hrušovský, DrSc., prof. MVDr. Dagmar Ježková, DrSc., doc. MVDr. Evžen Jurák, CSc., prof. MVDr. Ladislav Polák, CSc., MVDr. Josef Straka, CSc., prof. MVDr. Bohumil Ševčík, DrSc.

Za vedení časopisu odpovídá akademik Otto Jaroslav Vrtiak

Redaktorka ing. Jovanka Václavíčková

© Ústav vědeckotechnických informací pro zemědělství,
Praha 1986

■
Vědecký časopis VETERINÁRNÍ MEDICÍNA uveřejňuje studie, rozboru a vědecká pojednání o vyřešených úkolech výzkumu z oboru veterinární medicíny. Vydává Československá akademie zemědělská — Ústav vědeckotechnických informací pro zemědělství. Vychází měsíčně. Redakce: 120 56 Praha 2, Slezská 7, telefon 257541. Celoroční předplatné Kčs 120,—.

■
Научный журнал VETERINÁRNÍ MEDICÍNA публикует обзоры, анализы и научные статьи о решенных заданиях по научному исследованию в области ветеринарии. Издает Чехословацкая сельскохозяйственная академия — Институт научно-технической информации по сельскому хозяйству. — Выход в свет ежемесячно. Редакция 120 56 Прага 2, Слезска 7.

■
The scientific journal VETERINÁRNÍ MEDICÍNA publishes studies, analyses and scientific treatises about the solved research tasks in the line of the veterinary medicine. Published by the Czechoslovak Academy of Agriculture — Institute of Scientific and Technical Information for Agriculture. Issued monthly. Editorial office 120 56 Prague 2, Slezská 7.

■
Die wissenschaftliche Zeitschrift VETERINÁRNÍ MEDICÍNA veröffentlicht Studien, Analysen und wissenschaftliche Abhandlungen über die gelösten Forschungsaufgaben aus dem Gebiete der Veterinärmedizin. Herausgegeben von der Tschechoslowakischen landwirtschaftlichen Akademie — Institut für wissenschaftlich-technische Information der Landwirtschaft. Erscheint monatlich. Redaktion 120 56 Prag 2, Slezská 7.

Výsledky XVII. zjazdu KSČ

Hlavným výsledkom XVII. zjazdu KSČ je „prijatie stratégie urýchlenia ekonomického, sociálneho a spoločenského rozvoja, ktorá je založená predovšetkým na intenzívnom uplatnení vedeckotechnického pokroku“, ako to vyjadril generálny tajomník ÚV KSČ s. Gustáv Husák vo svojom záverečnom prejave, keď charakterizoval obsah línie strany pre nastávajúce obdobie.

Ide o kvalitatívne nové úlohy, ktoré nadväzujú na všetko pozitívne, čo bolo vytvorené v posledných 15 rokoch, ale zároveň dialekticky negujú všetko to, čo zabraňuje nášmu rýchlejšiemu napredovaniu na kvalitatívne vyššej úrovni vo všetkých oblastiach spoločenského života. Vedomie, že ide o kvalitatívne nové úlohy, musí preniknúť do činnosti každého z nás, do riešenia objektívneho rozporu boja nového so starým ako hybnej sily postupu vpred, do riešenia dialektiky spoločenských, skupinových a osobných záujmov s vedomím, že plnenie celospoločenských potrieb je zároveň napĺňaním záujmov a potrieb kolektívov i jednotlivcov.

Stratégia urýchlenia rozvoja prihliada k vnútorným i vonkajším podmienkam našej spoločnosti, k stavu objektívnych vzťahov súčasného triedne rozdeleného sveta i k podmienkam celosvetového procesu vedeckotechnickej revolúcie. Hlavným cieľom nášho napredovania však zostáva „trvalé zvyšovanie hmotnej a kultúrnej úrovne ľudu“. Zárukou smerovania k tomuto cieľu je uplatňovanie princípov vedúcej úlohy robotníckej triedy a jej najuvedomelejšieho predvoja Komunistickej strany Československa vo všetkých oblastiach a úrovniach nášho spoločenského života.

Splnenie náročných úloh urýchlenia rozvoja vyžaduje uplatňovať v každodennej činnosti tvorivú aktivitu, skúsenosti, poznatky ľudu, všetkých tých, čo sú schopní svojím objektívnym úsilím riešiť progresívne úlohy spoločenského vývoja.

Vedeckotechnický pokrok, jeho intenzívne uplatňovanie vo výrobe, sa týka nielen vedcov, vedeckých inštitúcií, riadiacej sféry, vedúcich pracovníkov, ale predovšetkým bezprostredných výrobcov materiálnych hodnôt. Vedecké poznatky, dokonalejšie pracovné prostriedky, nové materiály vyvinuté vedcami sa stávajú zložkami výrobných spoločenských síl až vtedy, keď sa premietnú do nových výrobkov, keď sa objektivizujú do všetkých zložiek materiálneho spôsobu výroby. Nikdy nesmieme zabudnúť na ľudský faktor nášho urýchleného napredovania. Záruka jeho plnenia je v skúsenostiach a v poznatkoch, v odhodlaní a vlastníctve nášho ľudu.

Urýchlenie sociálno-ekonomického rozvoja vyžaduje prenikavo zvýšiť aj kvalitu a účinnosť práce vysokých škôl ako veľmi dôležitého článku prípravy kádrov a prenosu vedeckých poznatkov do výrobnnej činnosti, do rozvoja všetkých spoločenských vzťahov. Dosiahnuť obrat v tejto oblasti vyžaduje dôsledne uplatňovať nové prístupy a metódy vo výchovno-vzdelávacej, vo vedeckovýskumnej i spoločensko-politickej činnosti vysokoškolských učiteľov i študentov.

XVII. zjazd KSČ vysoko vyzdvihol úlohu kádrov pri realizácii strategickej línie strany, ale aj vysoké nároky na ich prácu.

Akademik O. J. V r t i a k

PRŮKAZ PROTILÁTEK PROTI VIRU BOVINNÍ LEUKÓZY CYTOTOXICKÝM TESTEM VE SROVNÁNÍ S JINÝMI SÉROLOGICKÝMI METODAMI

M. Granátová, I. Svoboda

GRANÁTOVÁ, M. — SVOBODA, I. (Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno): *Průkaz protilátek proti viru boviní leukózy cytotoxickým testem ve srovnání s jinými sérologickými metodami*. Veter. Med. (Praha), 31, 1986 (8) : 451-458.

Na souboru 95 vzorků sér ze stáda pětiletého až sedmiletého skotu silně zamořeného boviní leukózou byly pro průkaz protilátek proti viru boviní leukózy použity čtyři sérologické metody: cytotoxický test, imunodifúzní test v agaru, imunoenzymatický test a test séroneutralizační. Bylo zjištěno, že nejcitlivější je séroneutralizační test, kterým bylo diagnostikováno o sedm pozitivních reagentů více než testem imunoenzymatickým; cytotoxický a imunodifúzní testy v agaru mají citlivost nejnižší a vykazují přibližně stejné výsledky. U 40 titrovaných vzorků bylo zjištěno, že séroneutralizační test je až 20X citlivější než test imunoenzymatický a ten je asi 50X citlivější než test cytotoxický a imunodifúzní.

cytotoxický test; imunodifúzní test v agaru; imunoenzymatický test; séroneutralizační test; titrace sér

Sérologická diagnostika je v současné době těžištěm pro terénní depistáž leukózy skotu (Musgay a Kaaden, 1978; Ressang, 1978).

Honma aj. (1980) zjistili, že cytotoxickým testem (CDAC — complement dependent antibody cytotoxicity) lze detekovat cytolytické protilátky v diagnostikovaných sérech, která obsahují protilátky proti glykoproteinovému obalu gp 51 viru boviní leukózy (bovine leukemia virus — BLV). Antisérum proti vnitřnímu proteinu p24 tyto cytolytické protilátky neobsahuje (Watarai aj., 1981).

Imunodifúzní test v agaru (AGID — agar gel immunodiffusion) používá k detekci protilátek v krevním séru jako precipitační antigen virový glykoprotein gp 51 anebo směs virových antigenů — „double antigen“ (Paulsen aj., 1975; Miller a van der Maaten, 1976, 1977; Ferrer aj., 1977; Forschner aj., 1980; Burny aj., 1980).

Imunoenzymatický test (ELISA — enzyme-linked immunosorbent assay) je založen na detekci protilátek vázaných na antigen, který je fixován na pevném nosiči. Na protilátky se naváže antiimmunoglobulin označený enzymem (křenovou peroxidázou). Důkaz enzymové aktivity (oxidace chromogenu kyslíkem uvolněným z H₂O₂) je současně důkazem přítomnosti protilátek proti fixovanému antigenu (Poli aj., 1981; Biancifiiori a Cenci, 1982; Meyer a Schilow, 1984).

Séroneutralizační test (SNT) využívá k průkazu protilátek ve vyšetřovaném séru pseudotyp viru BLV a vezikulární stomatitidy, kmen Indiana — VSV/BLV (Z á v a d a, 1976; Z á v a d a aj., 1979).

MATERIÁL A METODY

SÉRA

Bylo vyšetřeno 95 vzorků krevních sér odebraných ze stáda pětiletého až sedmi-letého skotu silně zamořeného bovinní leukózou. Séra byla uchovávána při teplotě -25°C ; séra vyšetřovaná neutralizačním a cytotoxickým testem byla inaktivována 30 minut při teplotě 56°C .

CYTOTOXICKÝ TEST

K provedení cytotoxického testu bylo užito linie buněk FLS (fetal lamb spleen), klon G I/II (laskavě poskytl ing. Č. Altaner, DrSc., z Onkologického ústavu SAV, Bratislava), trvale produkující virus BLV. Buňky byly pěstovány v médiu MEM s 10 % fetálního nebo polyetylen glykolem 6000 upraveného bovinního séra (Gránátová a Kozáková, 1985). Krev z 30 králíků byla smíchána, odstředěna v chlazené odstředivce a získané sérum bylo ihned zmrazeno v ampulích a užito jako zdroj komplementu. Protože citlivost reakce klesá s ředěním komplementu, byl užít komplement neředěný (Watarai aj., 1981). Jeho lytické účinky na buňky FLS se v kontrolách pohybovaly kolem 1 %. Každé vyšetřované sérum bylo ředěno na konečné koncentrace 1 : 2, 1 : 5 a 1 : 7. Monolayer buněk FLS byl třikrát opláchnut fyziologickým roztokem, trypsinován, resuspendován v médiu MEM bez séra a naředěn na koncentraci 5×10^6 buněk na mililitr.

Do jamek destičky (Koh-I-Noor Hardtmuth) bylo pipetou naneseno 25 μm buněčné suspenze, 25 μm vyšetřovaného krevního séra v příslušném ředění a 25 μm neředěného králíčího komplementu. Po 45 minutách inkubace při teplotě 37°C byla určena vitalita buněk trypanovou modří.

Při vyhodnocení výsledků byl určen index cytotoxicity (IC); $\text{IC} < 28,4$ v negativních sérech, $\text{IC} > 28,4$ v pozitivních sérech (Honma aj., 1980).

IMUNODIFÚZNÍ TEST V AGARU

K provedení tohoto testu byla použita souprava na sérologickou diagnostiku leukózy skotu AGEBION BVL, Bioveta, n. p., Nitra.

IMUNOENZYMATICKÝ TEST

Test byl proveden diagnostickým setem pro stanovení protilátek proti BLV. Set vyrábí Bioveta, n. p., Ivanovice na Hané (Franz aj., 1984).

SÉRONEUTRALIZAČNÍ TEST

Virový leukotický antigen je povrchový glykoprotein gp 51 ve vnější části pseudotypu VS/BLV (laskavě poskytl RNDr. J. Závada, DrSc., z Virologického ústavu SAV, Bratislava). Nejsou-li ve vyšetřovaném krevním séru přítomny protilátky proti BLV, vytvoří vnitřní část pseudotypu, tvořená VSV, cytopatický efekt na monolayeru buněk VERO; naopak protilátky z pozitivního krevního séra se naváží na glykoproteinový obal pseudotypu VSV/BLV, a tím zabrání rozvoji cytopatického efektu.

VÝSLEDKY

Při posuzování výsledků získaných v cytotoxickém testu v ředěních krevního séra 1 : 2, 1 : 5 a 1 : 7 bylo jako pozitivní hodnoceno takové sérum, které alespoň ve dvou ředěních mělo hodnotu IC větší než 28,4; přitom největší lytická účinnost séra byla zjištěna v ředění 1 : 5. Jako negativní byla posuzována séra, která ve dvou ředěních ze tří měla hodnoty IC menší než 28,4; největší průměrná hodnota IC byla v ředění 1 : 2. Výsledky jsou uvedeny v tab. I.

I. Průměrné hodnoty indexu cytotoxicity (IC) v cytotoxickém testu pro jednotlivá ředění sér — Average values of the index of cytotoxicity (IC) in cytotoxic test with respect to various serum dilutions

Průměrná hodnota IC	Ředění séra		
	1 : 2	1 : 5	1 : 7
59 pozitivních sér	51,54	60,62	51,20
36 negativních sér	11,95	11,65	10,83

V dalším hodnocení cytotoxického testu byly posuzovány pouze hodnoty IC v ředění 1 : 5.

Výsledky všech čtyř testů byly navzájem porovnány tak, aby bylo zjištěno, který ze sledovaných testů je v diagnostice bovinní leukózy nejcitlivější. Srovnání těchto výsledků je uvedeno v tab. II. (Pokud byl v některém testu opakovaně zjištěn dubiozní výsledek, je sérum posuzováno jako pozitivní.)

II. Srovnání citlivosti čtyř testů při detekci protilátek proti viru bovinní leukózy (BLV) — Comparison of the sensitivity of four tests for detection of the antibodies to bovine leukosis virus (BLV)

Celkem 95 testovaných sér	CDAC		AGID		ELISA		SNT	
	+	—	+	—	+	—	+	—
Počet sér	58	37	64	31	69	26	75	20
% sér	61	39	67	33	73	27	79	21

Kromě toho, že byla posuzována citlivost testů, byla také zjišťována shodnost výsledků u jednotlivých vzorků krevních sér (tab. III).

Z údajů v tab. III je zřejmé, že nejcitlivějším testem je SNT, neboť jím bylo z celkového počtu 95 vzorků diagnostikováno o sedm pozitivních krevních sér více než ostatními testy; titr protilátek těchto sér v SNT byl 1 : 16 až 1 : 64. Jedno sérum v ředění 1 : 5 bylo pozitivní pouze v cytotoxickém testu, rovněž jeden vzorek posuzovaný metodou ELISA opakovaně vykazoval dubiozní výsledek.

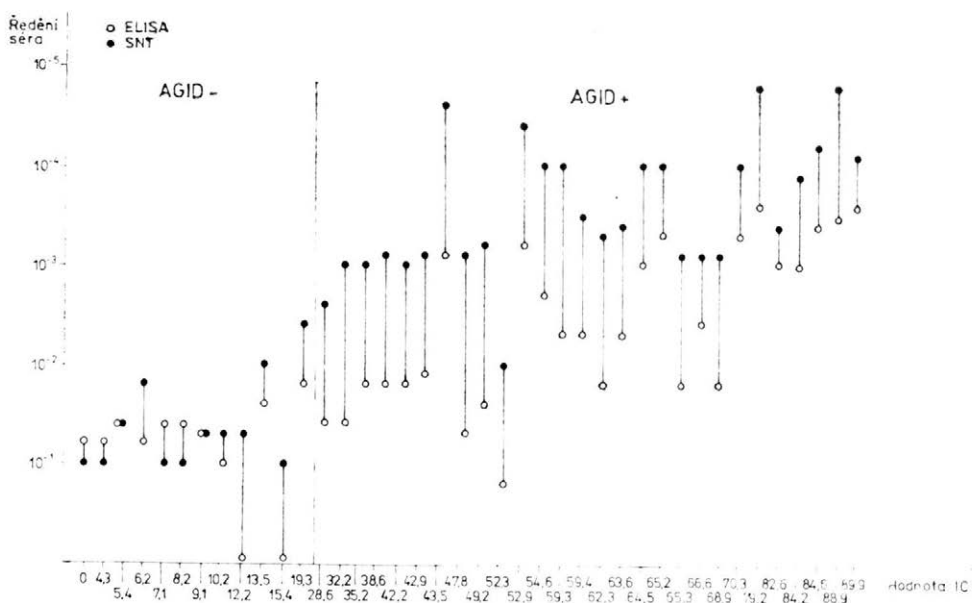
III. Přehled reakcí 95 sér ve čtyřech testech — A survey of the reactions of 95 sera in the four tests

Pozitivní séra v								Negativní séra v
CDAC	CDAC	AGID		CDAC	AGID			CDAC
AGID								AGID
ELISA	ELISA	ELISA	ELISA			ELISA		ELISA
SNT	SNT	SNT	SNT				SNT	SNT
56	1	8	3	1	0	1	7	18

Pro další posuzování citlivosti imunodifúzního, imunoenzymatického a séroneutralizačního testu bylo ze souboru 95 vzorků vybráno 40 krevních sér, která byla dále ředěna a byl zjišťován nejvyšší titr, v němž sérum ještě dává pozitivní výsledky. Aby se výsledky všech testů daly navzájem srovnat, jsou v obr. 1 uspořádána krevní séra podle stoupající hodnoty IC v cytotoxickém testu a je rovněž vyznačen výsledek v testu imunodifúzním.

Nejnižší ředění séra u SNT je 1 : 10, protože se každý vzorek ředí desetkrát roztokem s pseudotypem VSV/BLV a takto ředěné sérum se potom používá k provedení vlastního testu.

Z výsledků uvedených v obr. 1 je zřejmé, že u 34 sér ze 40 byly testem SNT zjištěny protilátky proti BLV ve vyšším ředění (až 1 : 80 000) než u imunoenzymatického testu (nejvyšší ředění 1 : 4000).



1. Uspořádání sér podle stoupající hodnoty indexu cytotoxicity — The order of the sera by increasing values of the index of cytotoxicity

U dvou vzorků byly protilátky zjištěny séroneutralizačním i imunoenzymatickým testem ve stejném ředění 1 : 40 a u čtyř vzorků byly zjištěny vyšší titry protilátek imunoenzymatickým testem, ale rozdíly se pohybovaly v rozmezí titrů 1 : 10 až 1 : 40. V této skupině sér bylo jedno vyhodnoceno jako dubiozní pouze testem imunoenzymatickým (tab. III).

DISKUSE

Honma aj. (1980) užili jako cílové buňky v cytotoxickém testu FLK (fetal lamb kidney), trvale produkující virus BLV. Bylo zjištěno, že lze užít i buňky FLS (fetal lamb spleen), klon G I/II, které jsou rovněž trvale infikovány virem BLV (Granátová a Kozáková, 1985).

Asi 80 % těchto buněk má na svém povrchu antigenní determinanty gp BLV, které jsou v cytologickém testu rozeznány cytolytickými protilátkami. Ty se ovšem mohou uplatnit i proti povrchovým nádorově specifickým antigenům, neboť buňky FLS jsou transformované buněčné linie; např. po jejich subkutánní aplikaci se u myši tvoří nádory. Tyto nádorově specifické antigeny jsou přítomny v bovinních lymfosarkomových buňkách, a proto se v cytotoxickém testu mohou uplatnit i cytotoxické protilátky namířené proti těmto antigenům.

Zdá se, že hodnota IC vzrůstá s rozvojem nemoci, na rozdíl od cytotoxické aktivity periferních lymfocytů proti buňkám FLS, kdy je nejvyšší cytotoxicita zjišťována u zdravých kontrol nebo u BLV infikovaných, ale klinicky zdravých krav; v průběhu nemoci se však postupně snižuje (Yamamoto aj., 1984). Tato cytotoxická aktivita v rámci buňkami zprostředkované imunity je způsobena buňkami NC (natural cytotoxic), podobně jako např. u myši (Kiessling aj., 1975; Stutman aj., 1978).

Při srovnání cytotoxického testu s ostatními metodami se SNT projevila jako nejcitlivější metoda, která zachytila o 7,5 % více reagentů než ostatní testy. Podobné výsledky uvádějí Balgavá aj. (1984). Přes svoji nesporně nejvyšší citlivost a specifitu se však SNT nedá použít jako rutinní diagnostická metoda, neboť je pracná a vyžaduje sterilní práci s buněčnými kulturami. Nachází uplatnění jako „arbitrážní“ metoda ve sporných vyšetřeních metodou ELISA nebo RIA a dále je použitelná pro efektivní ozdravování menších skupin zvířat, např. geneticky cenných chovů nebo při kontrole plemenných býků apod.

Pokud se týká porovnání testů AGID a ELISA, zjistili jsme v souhlase s literárními údaji větší citlivost metody ELISA, i když záchytnost (tj. počet pozitivních sér) byla u metody ELISA vyšší pouze o 5 %. Je to způsobeno vysokým procentem a dobou promoření vyšetřovaného stáda; protilátky jsou proto přítomny ve značně velkém titru. Perlberg aj. (1984) zjistili, že při titraci krevních sér je metoda ELISA 80× citlivější než AGID. Meyer a Schilow (1984) uvádějí, že AGID má diagnostickou hodnotu, ale v případě sér s malým množstvím protilátek je nutné vyšetřovat metodou ELISA. U přirozeně infikovaného skotu se metodou ELISA prokazují protilátky o 5 až 14 týdnů dříve než imunodifúzí, u telat se kolostrální protilátky detekují až o deset týdnů déle metodou ELISA než AGID.

Při srovnání jsou titry krevních sér v testech SNT a ELISA celkově v dobré korelaci, i když u některých sér jsou v hodnotách rozdíly. Je to

pochopitelné, protože oba testy jsou založeny na jiném principu a ne vždy je zachytáván stejný druh protilátek. Naše výsledky ukazují, že citlivost cytotoxického testu je srovnatelná s imunodifúzním testem. I když lze vyhodnocení cytotoxického testu urychlit značením cílových buněk ^{51}Cr [Portetelle aj., 1978], nenajde v diagnostice leukózy skotu větší uplatnění pro poměrnou náročnost a menší citlivost na provedení.

Literatura

- BALGAŮVÁ, S. — GÁCIKOVÁ, E. — KUČERA, J.: Comparison of the gel immunodiffusion test with virus neutralization test employing vesicular stomatitis virus (bovine leukemia virus) pseudotypes in the serological detection of enzootic bovine leukemia. Arch. exp. Veter.-Med., 38, 1984, s. 493-496.
- BIANCIFIORI, F. — CENCI, G.: ELISA test for detection of antibodies to enzootic bovine leukosis virus. In: Fourth International Symposium on bovine leukosis (ed. O. C. Straub). The Hague (Boston) London, Martinus Nijhoff Publ. 1982, s. 167-179.
- BURNÝ, A. — BRUCK, C. — CHANTRENNE, H. — CLEUTER, Y. — DEKEGEL, D. — GHYSDAEL, J. — KETTMANN, R. — LECLERQ, M. — LEUNEN, J. — MEMMERICKX, M. — PORTETELLE, D.: Bovine leukemia virus: Molecular biology and epidemiology. In: Viral Oncology (ed. G. Kelin). New York, Raven Press 1980, s. 231-252.
- FERRER, J. F. — PIPER, C. E. — BALIGA, V.: Diagnosis of BLV-infection in cattle of various ages. In: Bovine leucosis (ed. A. Burný). Commission of European Communities, Luxembourg 1977, s. 323-327.
- FORSCHNER, E. — KEYSERLINGK, P. — EBERIUS, M.: Enzootische Rinderleukose: Aktuelle Kontrolle und Sicherung der Beurteilungskontinuität des ID-Testes durch routine-mäßigen Einsatz eines Prüfsets. Dtsch. tierärztl. Wschr., 87, 1980, s. 338-342.
- FRANZ, J. — SVOBODA, I. — HAMPL, J. — GRANÁTOVÁ, M. — MÁDR, V. — KOZÁKOVÁ, A. — MACHATKOVÁ, M. — HOFÍREK, B. — HOŘÍN, P. — JAGOŠ, P. — DEDEK, L. — MACURA, B.: Diagnostika leukózy skotu. [Výzkumná zpráva.] Brno, Výzkumný ústav veterinárního lékařství 1984. 48 s.
- GRANÁTOVÁ, M. — KOZÁKOVÁ, A.: Cytotoxický test v diagnostice leukózy skotu. Veter. Med. (Praha), 30, 1985, s. 449-456.
- HONMA, T. — ONUMA, M. — SUNEYA, M. — KIKAMI, T. — IZAWA, H.: Cytotoxic antibody in cattle and sheep exposed to bovine leukemia virus. Arch. Virol., 66, 1980, s. 293-299.
- KIESSLING, R. — KELIN, E. — WIGZELL, H.: Natural killer cells in mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse leukemia cells. Eur. J. Immunol., 5, 1975, s. 112-117.
- MEYER, N. — SCHILOW, W. F.: Der Enzym-Immunoassay für die Bestimmung von Antikörpern gegen das bovine Leukosevirus. Arch. exp. Veter.-Med., 38, 1984, s. 219-222.
- MILLER, J. M. — van der MAATEN, M. J.: Serological detection of bovine leukemia virus infection. Veter. Microbiol., 1, 1976, s. 195-199.
- MILLER, J. M. — van der MAATEN, M. J.: The use of a glycoprotein antigen in an improved immunodiffusion test antibodies to bovine leukemia virus. Eur. J. Cancer, 13, 1977, s. 1369-1373.
- MUSSGAY, M. — KAADEN, O. R.: Progress in studies on the etiology and serologic diagnosis of enzootic bovine leukosis. Curr. Top. Microbiol. Immunol., 1978, s. 43-74.
- PAULSEN, J. — BERTELSMANN, K. I. — SCHLIESSER, T.: Weitere Untersuchungen zum Vorkommen von Antikörpern gegen C-Typ-Virus spezifischen Antigen in Seren von Rindern aus Leukoseversuchten, -verdächtigen und -unverdächtigen Beständen. Zentbl. Veter.-Med., R. B, 22, 1975, s. 596-605.
- PERLBERG, K. W. — MIKO, A. — WEISS, R. — GÜHRING, R. — BAEHR, R.: Untersuchungen zum Nachweis von Antikörpern gegen das bovine Leukosevirus bei neugeborenen Kälbern mit Hilfe eines Enzymimmuntests im Vergleich zum Immunodiffusionstest. Mh. Veter.-Med., 39, 1984, s. 129-133.
- POLI, G. — BALSARI, A. — TONIOLO, A. — PONTI, W. — VACIRCA, G.: Microplate enzyme-linked immunosorbent assay for bovine leukemia virus antibody. J. clin. Microbiol., 13, 1981, s. 46-48.

PORTETELLE, D. — BRUCK, C. — BURNY, I. — DEKEGEL, D. — MAMMERICKX, M. — URBAIN, J.: Detection of complement-dependent lytic antibodies in sera from bovine leukemia virus-infected animals. *Ann. Rech. vétér.*, 9, 1978, s. 667-674.

RESSANG, A. A.: The serological diagnosis of the enzootic bovine leukosis. Luxembourg, Commission of the European Communities 1978.

STUTMAN, O. — PAIGE, C. J. — FIGARELLA, E. F.: Natural cytotoxic cells against solid tumors in mice. I. Strain and age distribution and larger cell susceptibility. *J. Immunol.*, 121, 1978, s. 1819-1826.

WATARAI, S. — ONUMA, M. — MIKAMI, T. — IZAWA, H.: Enhancement of antibody activity to bovine leukemia virus by complement. *Arch. Virol.*, 68, 1981, s. 135-142.

YAMAMOTO, S. — ONUMA, M. — KODAMA, M. — MIKAMI, T. — IZAWA, H.: Suppression of natural cytotoxic activity of lymphocytes from cattle and sheep during the progress of bovine leukosis. *Veter. Microbiol.*, 9, 1984, s. 105-111.

ZÁVADA, J.: Viral pseudotypes and phenotypic mixing. Short review. *Arch. Virol.*, 50, 1976, s. 1-15.

ZÁVADA, J. — ČERNÝ, L. — ZÁVADOVÁ, Z. — BOŽOŇOVÁ, J. — ALTSTEIN, A. D.: A rapid neutralization test for antibodies to bovine leukemia virus with the use of rhabdovirus pseudotypes. *J. Nat. Cancer Inst.*, 62, 1979, s. 95-101.

Došlo dne 15. 1. 1986

ГРАНАТОВА, М. — СВОБОДА, И. (Научно-исследовательский институт ветеринарии, Брно): **Доказательство наличия антител против вируса бычьего лейкоза цитотоксическим испытанием в сравнении с другими серологическими методами.** *Veter. Med. (Praha)*, 31, 1986 (8) : 451-458.

У совокупности 95 проб сывороток из сильно пораженного бычьим лейкозом стада пяти-семилетнего крупного рогатого скота для установления наличия антител против вируса бычьего лейкоза были применены четыре серологических метода: цитотоксический тест, иммуно-диффузионный тест на агаре, иммуно-ферментный тест и сывороточно-нейтрализационный тест. Установили, что наиболее чувствителен сывороточно-нейтрализационный тест, при помощи которого было установлено на семь положительных реагентов больше, чем иммуно-ферментным тестом; цитотоксический и иммуно-диффузионный тесты в агаре имеют наименьшую чувствительность и дают примерно одинаковые результаты. У 40 титрированных проб установили, что сывороточно-нейтрализационный тест даже в 20 раз более чувствителен, чем иммуно-ферментационный, который в свою очередь приблизительно в 50 раз чувствительнее, чем цитотоксический и иммуно-диффузионный тесты.

цитотоксический тест; иммуно-диффузионный тест на агаре; иммуно-ферментационный тест; сывороточно-нейтрализационный тест; титрация сывороток

GRANÁTOVÁ, M. — SVOBODA, I. (Veterinary Research Institute, Brno): *Demonstration of the Antibodies to Bovine Leukosis Virus by a Cytotoxic Test in comparison with Other Serological Methods.* *Veter. Med. (Praha)*, 31, 1986 (8) : 451-458.

In ninety-five serum samples taken in a herd of five-year to seven-year cattle that was heavily infected by bovine leukosis virus, the four serological assays were used for demonstration of the antibodies to bovine leukosis virus; cytotoxic test, immunodiffusion test in agar-agar, immunoenzymatic test and serum neutralizing test. The serum neutralizing test was found to be the most sensitive: further seven positive reagents were diagnosed in comparison with immunoenzymatic test; cytotoxic and immunodiffusion tests in agar-agar have the lowest sensitivity and the results of these tests are almost identical. It was found out in forty titrated samples that serum neutralizing test was by as much as 20 times more sensitive than immunoenzymatic test, the latter being about 50 times more sensitive than cytotoxic and immunodiffusion tests.

cytotoxic test; immunodiffusion test in agar-agar; immunoenzymatic test; serum neutralizing test; serum titration

GRANÁTOVÁ, M. — SVOBODA, I. (Forschungsinstitut für Veterinärmedizin, Brno): *Nachweis von Antikörpern gegen das Virus der bovinen Leukose durch zytotoxischen Test, im Vergleich mit anderen serologischen Methoden.* Veter. Med. (Praha), 31, 1986 (8) : 451-458.

In einer Kollektion von 95 Serumproben aus einer stark durch bovine Leukose verseuchten Herde von fünf- bis siebenjährigen Rindern wurden für den Nachweis von Antikörpern gegen das Virus der bovinen Leukose vier serologische Methoden angewandt: der zytotoxische Test, der Immunodiffusionstest in Agar, der immuno-enzymatische Test und der Serumneutralisationstest. Es wurde festgestellt, daß der Serumneutralisationstest am empfindlichsten ist, da mit dessen Hilfe um sieben positive Reaktanten mehr diagnostiziert werden konnten als aufgrund des immuno-enzymatischen Tests; der zytotoxische und der Immunodiffusionstest in Agar weisen die niedrigste Sensibilität auf und ergeben ungefähr gleiche Ergebnisse. Bei 40 titrierten Proben wurde festgestellt, daß der Serumneutralisationstest bis zu 20mal empfindlicher ist als der immunoenzymatische Test und dieser wiederum etwa 50mal empfindlicher als der zytotoxische und der Immunodiffusionstest.

zytotoxischer Test; Immunodiffusionstest in Agar; immunoenzymatischer Test; Serumneutralisationstest; Serumentitation

Adresa autorů:

RNDr. Marta Granátová, MVDr. Ivan Svoboda, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32 Brno

RADIOIMUNOLOGICKÝ PRŮKAZ PROTILÁTEK PROTI VIRU LEUKÓZY SKOTU

J. Franz, J. Hampl, B. Hofírek, F. Škrobák, I. Svoboda, M. Granátová

FRANZ, J. — HAMPL, J. — HOFÍREK, B. — ŠKROBÁK, F. — SVOBODA, I. — GRANÁTOVÁ, M. (Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno; Vysoká škola veterinární, Brno): *Radioimunologický průkaz protilátek proti viru leukózy skotu*. Veter. Med. (Praha), 31, 1986 (8) : 459-468.

Byla vypracována radioimunologická metoda (RIA) pro průkaz sérových protilátek proti viru leukózy skotu (VBL). Zvolený postup využívá schopnosti vazby virového antigenu na pevnou fázi polystyrenového nosiče. Metoda byla srovnána s metodou ELISA a s pseudoneutralizačním a imunodifúzním testem. Mezi metodami RIA a ELISA bylo dosaženo vysoké shody výsledků, dosahující 95 %. Svojí citlivostí převyšuje metoda RIA imunodifúzní test.

enzootická bovinní leukóza; diagnostika; RIA; ELISA; pseudoneutralizační test; imunodifúzní test

Rozsáhlá vyšetřování uskutečněná na území ČSR v letech 1982 až 1984 potvrdila výskyt i pokračující prevalenci enzootické bovinní leukózy (EBL). Vzhledem k závažnosti této nákazy, která by v budoucnu mohla negativně ovlivnit další rozvoj chovu skotu, byl u nás vytyčen program jejího tlumení. Prvním předpokladem kontroly a prevence cirkulace jakéhokoli infekčního agens, tedy i viru leukózy skotu (VBL), je účinná diagnostická metoda. Po hematologické diagnostice (Bendixen, 1959; Tolle, 1965; Rademacher a Kraus, 1967; Mammerrickx aj., 1976), kterou nemohla být otázka tlumení leukózy zásadně řešena, vystoupily vzápětí po odhalení původce tohoto onemocnění, tj. VBL (Miller aj., 1969), do popředí metody sérologické. Tím se otevřela cesta k širokým séroepidemiologickým studiím na principu stanovení protilátek proti VBL, sloužícím kontrole a eradikaci tohoto onemocnění. Nejjednodušší sérologickou metodou je bezpochyby imunodifúzní test (ID), který vzhledem ke svým vlastnostem brzy našel široké uplatnění v diagnostických zařízeních na celém světě. Jako precipitační antigeny byly v ID použity strukturální proteiny viru jak p 24 a p 12 (Ferrer aj., 1972; Mammerrickx aj., 1976; Olson aj., 1976; Kaaden aj., 1977; Frenzel aj., 1978; Straub, 1978), tak i antigeny glykoproteinového charakteru gp 51 (Onuma aj., 1975). S posledně jmenovaným antigenem bylo dosaženo velice optimistických výsledků, a proto je i nadále používán k rutinní diagnostice (Frenzel aj., 1977; Miller a van der Maaten, 1977; Mammerrickx aj., 1978; Straub, 1978; Bex aj., 1979; Nougayrede a Pellen, 1982) a jeho výsledky slouží jako podklady pro tlumení EBL. Na základě

dílčích zkušeností (Hofírek aj., 1976, 1978, 1980; Hofírek a Vařejka, 1976) byl i v ČSSR zaveden ID do běžné diagnostické praxe státních veterinárních laboratoří. Program tlumení nákazy je pak postaven na principu eliminace, resp. izolace sérologicky pozitivních kusů zvířat z ozdravovaného chovu. První výsledky těchto akcí postavené na principu ID však ukázaly, že se pravidelně v chovech již ozdravených opakovaně vyskytují další nová sérologicky pozitivní zvířata. Tento jev je bezpochyby způsoben limitovanou citlivostí ID testu, který nezachytí zvířata s nízkým obsahem protilátek a ta zůstávají dále v chovech jako potenciální nosiči další infekce (Salaj aj., 1984; Hofírek aj., 1985).

Kvalitativní úroveň sérologické diagnostiky protilátek proti VBL byla významně posunuta vpřed zavedením pseudoneutralizačního testu (PsNT) (Žávrda aj., 1978, 1979). Zmínění autoři využili pseudotypu jako antigenu v neutralizačním testu, jehož význam tkví především ve vysoké specifitě a citlivosti. Touto metodou lze úspěšně ozdravit zamořené stádo, nezdá se však, že by mohl být PsNT využíván — vzhledem k značné náročnosti na provedení — k plošnému vyšetřování velkých souborů vzorků.

Z tohoto pohledu nabývá na významu vývoj nových, dostatečně citlivých a specifických metod s možností automatizace a s velkou kapacitou vyšetření. Těmto požadavkům plně vyhovují imunoanalytické metody s využitím pevných nosičů, ať již v modifikaci radioimunoanalýz (RIA) nebo ELISA. Předkládaná publikace řeší metodicky variantu RIA ve srovnání s metodou ELISA.

MATERIÁL A METODY

VYŠETŘOVÁNÍ KREVNIHO SÉRA

K ověření metody byly použity tyto soubory vzorků:

- výběr 102 krevních sér dojníc ze zamořeného chovu; séra byla testována v RIA, ELISA, IDT a PsNT,
- 272 krevních sér ze zamořeného stáda; u těchto sér byly srovnány výsledky RIA a ELISA,
- 640 krevních sér dojníc ze Školního zemědělského podniku VŠV Nový Jičín; séra byla testována v RIA a ELISA jako součást ozdravovacího programu.

Krevní séra byla uskladňována při teplotě -20°C až do sérologického zpracování.

RADIOIMUNOLOGICKÉ STANOVENÍ PROTILÁTEK

Radioimunologické stanovení protilátek proti bovinní leukóze je založeno na využití komerční ELISA soupravy k diagnostice leukózy skotu, vyráběné n. p. Bioveta Ivanovice na Hané. Jedinou výjimku tvoří protilátka značená radionuklidem ^{125}J .

Jako pevná fáze pro vazbu antigenu byly použity polystyrenové mikrozkuhavky s rovným dnem, umístěné v nosičových plotnách z umělé hmoty. Antigen ředěný v poměru 1 : 100 0,1 mol.l⁻¹ uhličitanovým pufrům pH 8,8 se pipetuje v objemu 0,05 ml do mikrozkuhacek. Inkubace antigenu probíhá ve vlhké komůrce 16 hodin při laboratorní teplotě, resp. po dobu dvou hodin v termostatu při teplotě 37 °C. Po skončení inkubace se antigen odsaje a mikrozkuhavky se třikrát promyjí 0,4 ml promývacího roztoku.

Vyšetřovaná krevní séra, včetně standardních sér pozitivních a negativních, v ředění 1:10 až 1:1280 se pipetují v duplikátech do mikrozkušavek v objemu 0,05 ml a inkubují se ve vlhké komůrce dvě hodiny v termostatu při teplotě 37 °C. Po skončení inkubace se inkubovaná séra odsají a mikrozkušavky se třikrát promyjí 0,4 ml promývacího roztoku.

Do každé mikrozkušavky se napipetuje 0,05 ml ^{125}J značené gamaglobulinové frakce RaB IgG, resp. SwaB IgG protilátky. Radioaktivita je upravena ředěním PBS pH 7,2 s obsahem 0,5 % králíčího albuminu tak, aby v jedné dávce bylo cca 420 s⁻¹. Inkubace probíhá 90 minut ve vlhké komůrce při laboratorní teplotě. Po ukončení inkubace se značená protilátka odsaje a mikrozkušavky se třikrát promyjí 0,5 ml promývacího roztoku.

Jako detekční zařízení k měření radioaktivity byl využit přístroj NE 1600 (Nuclear Enterprises). Radioaktivita jednotlivých vzorků se po odečtení hodnoty pozadí vyjadřuje za sekundu. U každého ředění séra se navzájem srovnává radioaktivita testovaného séra a standardního negativního séra. Určitý titr (ředění) vyšetřovaného krevního séra se považuje za pozitivní, je-li poměr mezi radioaktivitou zjištěnou u tohoto séra a radioaktivitou standardního negativního séra vyšší než 2,0; poměr v rozmezí 1,5 až 2,0 je hodnocen jako nález dubiozní.

METODA ELISA

Pro průkaz protilátek proti VBL v krevních sérech skotu byly použity diagnostické ELISA soupravy z Biovety Ivanovice na Hané. Pracovní postup byl dodržen podle předpisu, který udává výrobce. Jako pevná fáze byly použity polystyrenové mikrotitrační plotny s 96 jamkami, na jejichž povrch byl vázán v předepsané koncentraci antigen VBL rozpuštěný ve vazném roztoku. Krevní séra byla nanášena do jamek ředěná v poměru 1:100 v ředícím roztoku. Jako konjugát byly použity prasečí protilátky značené křenovou peroxidázou. Reakce byla vizualizována substrátem sestaveným z roztoku peroxidu vodíku a kyseliny 5-aminosalicylové. Výsledky byly hodnoceny fotometricky ve srovnání se standardními negativními a pozitivními séry na přístroji Titertek Multiscan (Flow Laboratories). Testovaná séra, jejichž absorbance byla větší než dvojnásobek absorbance srovnávacích sér negativních, byla hodnocena jako pozitivní.

PSEUDONEUTRALIZAČNÍ TEST (PsNT)

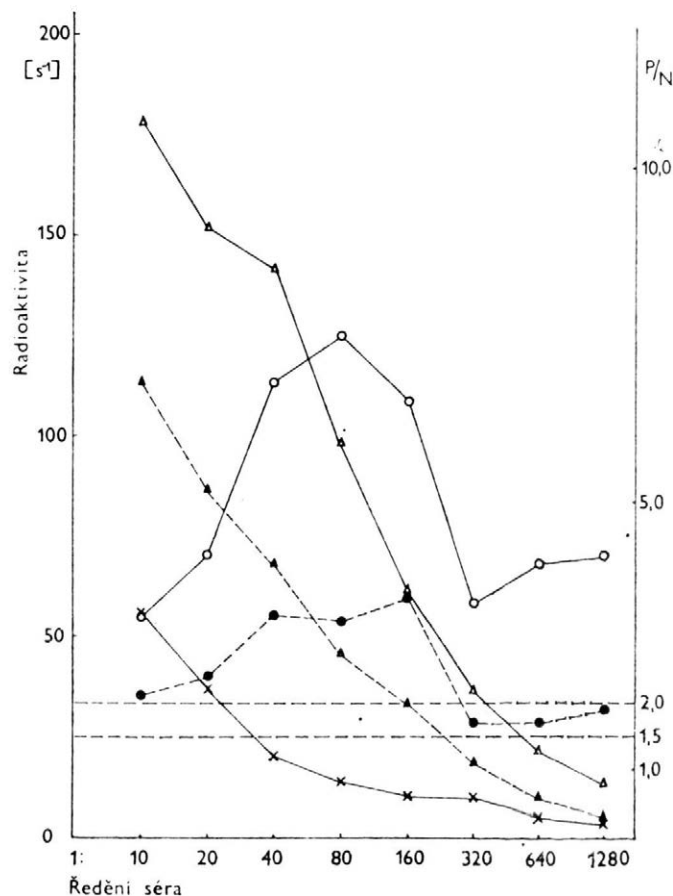
Princip testu spočívá v reakci protilátek s pseudotypem viru leukózy skotu s virem vesikulární stomatitidy (VBL/VSF) (Závrha aj., 1978). V případě nepřítomnosti protilátek proti VBL dojde na monolayeru infikovaných buněk VERO k cytopatickému efektu — k tvorbě plaků. Jsou-li v testovaném séru přítomny protilátky, naváží se na pseudotyp VBL/VSF a plaky se nevytvářejí. Hodnocení výsledků je založeno na počtu vytvořených plaků.

IMUNODIFÚZNÍ TEST (IDT)

Precipitační reakce probíhala v 0,8% agaru na Petriho miskách z polystyrenu. Jako antigen byl použit komerční přípravek AGEBION (Bioveta Nitra, n. p.). Výsledky byly hodnoceny za 48 až 72 hodin.

VÝSLEDKY

Krevní séra s protilátkami proti VBL a směs sér negativních jsme ředili dvojnásobně v rozsahu od 1:10 do 1:1280. Jejich vyšetřením metodou RIA a grafickým vyhodnocením byly získány titrační křivky s typickým průběhem (obr. 1). Pozitivita testovaného séra se vyjadřuje jako poměr radioaktivity séra testovaného a séra negativního v tomtéž ředění



1. Radioaktivita v jednotlivých ředěních standardního pozitivního, standardního negativního a terénního pozitivního séra s vyjádřením poměru P/N — The radioactivities in the dilutions of standard positive, standard negative, and field positive sera, P/N ratio expressed

- △——△ radioaktivita standardního pozitivního séra
 ×——× radioaktivita standardního negativního séra
 ○——○ poměr P/N standardního pozitivního a standardního negativního séra
 ▲——▲ radioaktivita terénního pozitivního séra
 ●——● poměr P/N terénního pozitivního a standardního negativního séra

I. Průkaz protilátek proti viru leukózy skotu (VBL) různými metodami (náhodný výběr pozitivních a negativních vzorků) — Demonstration of the antibodies to BLV by various methods (random selection of positive and negative samples)

Metoda	%		
	+	±	—
PsNT	64	4	32
ELISA	65	4	31
RIA	69	—	31
ID	52	11	37

II. Srovnání výskytu protilátek proti viru leukózy skotu (VBL) metodami RIA a ELISA a imunodifúzním testem (ID) s výsledky pseudoneutralizačního testu (PsNT) (náhodný výběr pozitivních a negativních vzorků) — Comparison of the occurrence of the antibodies to BLV, demonstrated by the RIA and ELISA methods and immunodiffusion test (ID), with the results of pseudoneutralizing test (PsNT) (random selection of positive and negative samples)

PsNT/n	Z toho %								
	ELISA			RIA			ID		
	+	±	—	+	±	—	+	±	—
Pozitivní/64	98	0	2	95	0	5	81	17	2
Dubiózní/6	33	17	50	67	0	33	17	0	83
Negativní/32	3	9	87	16	0	84	0	0	100

n = počet kusů

— P/N. Jako pozitivní je hodnoceno ředění, jehož poměr P/N je větší než 2,0. Ta ředění sér, jejichž P/N je v rozsahu 1,5 až 2,0, jsou považována za dubiízní. Tento způsob hodnocení se běžně používá jak pro RIA, tak pro ELISA metody a je v souladu i se statistickým hodnocením dosahovaných výsledků. Při zachování stanovených pracovních podmínek testu, tj. určené koncentrace vázaného antigenu a koncentrace značených antihovězích protilátek, se maximální hodnoty P/N testovaných sér vyskytovaly v rozsahu ředění 1 : 40 až 1 : 160. V tomto rozmezí se proto vyšetřovala i krevní séra ve srovnávacích pokusech i při dalších terénních vyšetřeních.

Specifita a citlivost metody RIA byly ověřovány na mnoha souborech vzorků. Reprezentativní výsledky jsou demonstrovány na výběru 102 krevních sér, která byla paralelně vyšetřena na obsah protilátek proti VBL také metodami ELISA, PsNT a IDT.

Z celkového počtu vyšetřovaných vzorků bylo v RIA 69 % vzorků pozitivních ve srovnání s 64 % a 65 % vzorků pozitivních v PsNT, resp. v ELISA. V IDT bylo pozitivních jen 52 % vzorků (tab. I). Dokonalejší přehled o specifitě výsledků podává tab. II, v níž jsou výsledky vyjádřeny jako procento shody, resp. neshody s PsNT, který byl považován za stan-

III. Porovnání výskytu protilátek proti viru leukózy skotu (VBL) pomocí metod RIA a ELISA v silně zamořeném stádě — Comparison of the occurrence of the antibodies to BLV, demonstrated by the RIA and ELISA methods, in a heavily infested herd

Metoda	Výsledek vyšetření			Neshoda	
	%				
	+	±	—	ELISA + RIA —	ELISA — RIA +
RIA	40,7	12,0	47,3	5,0	3,7
ELISA	46,5	12,0	41,5		

dardní. Z tohoto pohledu bylo dosaženo 95% shody RIA v pozitivních výsledcích a 84% shody v negativních výsledcích. Vzhledem k nižší citlivosti IDT bylo v pozitivitě výsledků dosaženo shody jen v 81 %, v negativitě naopak ve 100 %.

Na druhém souboru krevních sér, pocházejících ze silně zamořeného stáda, byla srovnávána RIA metoda s metodou ELISA (tab. III). Metodou RIA bylo detekováno z celkového počtu vyšetření 40,7 % pozitivních výsledků a 47,3 % negativních výsledků. V tomto případě byl metodou ELISA záchyt pozitivních sér vyšší, tj. 46,5 %. Zásadní neshoda mezi oběma metodami, tzn. RIA + : ELISA —, resp. RIA — : ELISA +, nepřesáhla 5 % z počtu vyšetřených krevních sér.

Praktické využití metody RIA bylo ověřeno jejím zařazením do ozdravovacího programu jednoho zamořeného stáda. Výsledky byly vyhodnoceny počítačem a opět porovnávány s metodou ELISA. Bylo vyšetřeno celkem 640 krevních sér dojníc, z nichž bylo pozitivních v metodě RIA 61 a v metodě ELISA 55. K neshodám mezi oběma metodami došlo pouze ve 3 % vyšetření (tab. IV).

IV. Porovnání výskytu protilátek proti viru leukózy skotu (VBL) pomocí metod RIA a ELISA v ozdravovaném stádě — Comparison of the occurrence of the antibodies to BLV, demonstrated by the RIA and ELISA methods, in a sanitated herd

Počet vyšetření	Z toho				Neshoda ve výsledcích _n _n
	pozitivních		negativních		
	FLISA	RIA	ELISA	RIA	
640	55	61	585	579	3

DISKUSE

Rozvoj dalších nových metod v oblasti diagnostiky enzootické leukózy skotu je motivován především schválením programu tlumení této nákazy na území CSSR. Na základě získaných zkušeností, vyplývajících ze studií tvorby, vývoje i kolísání titru protilátek při experimentálních a přirozených infekcích skotu VBL (Hofírek aj., 1936), jakož i ze zkušeností s tlumením EBL ve velkochovech za použití sérologických metod (Hofírek aj., 1985), začíná u nás převládat názor, že pomocí samotného IDT (AGEBION), s ohledem na jeho limitovanou citlivost, nelze úspěšně v co nejkratší době dosáhnout vytčeného cíle. Ze škály u nás dostupných metod diagnostiky VBL vyhovují účelům hromadného vyšetřování metody imunoanalytické, ať již v modifikaci RIA nebo ELISA. Ve srovnání s doposud používaným IDT jsou sice pracnější, ale tuto nevýhodu kompenzuje zejména jejich vyšší citlivost a možnost automatizace téměř celého pracovního procesu. K podobným závěrům zřejmě došli i v zahraničí, kde mnozí autoři využili imunoanalytických metod, zvláště techniky ELISA, k průkazu protilátek proti VBL (Ressang aj., 1978; Todd a Adair, 1980; Poli aj., 1981; Meyer aj., 1933; Mammerickx aj., 1984a, b), a to v některých případech úspěšně

i k hromadnému vyšetřování (Mammerickx aj., 1984c; Toma aj., 1984). Protože metodu ELISA je již možné v našich diagnostických zařízeních uplatňovat na bázi komerčně vyráběných setů (Franz aj., 1985), přistoupili jsme v této práci k vypracování modifikace RIA, která je obecně považována za jednu z nejcitlivějších metod k průkazu antigenů i protilátek. Rozhodujícím faktorem ovlivňujícím specifitu a reprodukovatelnost těchto citlivých metod jsou zvolené podmínky provedení, zejména však způsob přípravy, resp. stupeň čistoty použitých virových antigenů. K průkazu sérových protilátek proti VBL byly v metodě RIA použity jak antigen p 24 (Ferrer aj., 1972; Devare aj., 1977, 1978; Levy aj., 1977; Bex aj., 1979), tak i antigen gp 51 (Portetelle aj., 1977; Devare a Stephenson, 1978; Bex aj., 1979) s dobrými výsledky s tím, že RIA převyšuje citlivost IDT. V našich pokusech jsme použili komerčně vyráběný antigen VBL (Bioveta Ivanovice na Hané, n. p.), který svojí kvalitou vyhovoval požadavkům kladeným na metodu RIA, neboť výsledky s ním dosažené jsou v souladu s názorem citovaných autorů. Bylo dosaženo vždy většího počtu zachytu sérologicky pozitivních kusů ve srovnání s IDT. Tato skutečnost se projevuje zvláště v lokalitách s nízkým procentem zamoření, v nichž mohou být sledovaná zvířata v časně fázi po infekci a s nízkými hladinami protilátek. To je dokumentováno i výsledky dosaženými v různých evropských laboratořích, ve kterých zjistili u sér velmi slabě a slabě pozitivních v RIA jen 40 až 50 % pozitivních v IDT (Hofírek, 1985), zatímco u sér RIA velmi silně pozitivních byla shoda až 100%.

Z dosažených výsledků vyplývá, že obě metody jsou svojí citlivostí srovnatelné a vzájemně zastupitelné. Tento výsledek lze očekávat i proto, že s výjimkou značené protilátky jsou všechny reakční komponenty společné. Určité rozdíly v zachytu pozitivních sér, které jsou dokumentovány v tab. I a III, je možné přičítat i té skutečnosti, že analýzy neprobíhaly ve stejném časovém úseku.

Podle našeho názoru je pro tak závažný program, jako je tlumení EBL, třeba mít k dispozici další alternativní a citlivou metodu s možností automatizace téměř celého pracovního procesu. Těmto požadavkům v našich současných podmínkách nejlépe vyhovuje námi propracovaná radioimunologická diagnostická metoda.

Literatura

- BENDIXEN, H. J.: Sur les manifestations, au Denmark, de la leucose des bovidés et sur la valeur diagnostique des examens hématologiques. Bull. Off. int. Epizoot., 52, 1959, s. 282-293.
- BEX, F. — BRUCK, C. — MAMMERICKX, M. — PORTETELLE, D. — GHYSDAEL, J. — CLEUTER, Y. — LECLERCQ, M. — DEKEGEL, D. — BURNY, A.: Humoral antibody response to bovine leukemia virus infection in cattle and sheep. Canc. Res., 39, 1979, s. 1118-1123.
- DEVARE, S. G. — STEPHENSON, J. R.: Radioimmunoassay for the major internal antigen (p 24) and envelope glycoprotein (gp 51) of bovine leukemia virus. In: The serological diagnostics of enzootic bovine leukosis (ed. A. A. Rensang). Luxembourg, Commission of European Communities 1978, s. 43-55.
- DEVARE, S. G. — OROSZLAN, S. — STEPHENSON, J. R.: Application of radioimmunologic techniques to epidemiologic studies of lymphosarcoma in domestic cattle. Ann. Rech. vétér., 9, 1978, s. 689-697.
- DEVARE, S. G. — CHANDER, S. — SAMAGH, B. S. — STEPHENSON, J. R.: Evaluation of radioimmunoprecipitation for the detection of bovine leukemia virus in domestic cattle. J. Immunol., 119, 1977, s. 277-282.

- FERRER, J. F. — AVILA, L. — STOCK, N. O.: Serological detection of type-C viruses found in bovine cultures. *Canc. Res.*, 32, 1972, s. 1864-1870.
- FRANZ, J. — SVOBODA, I. — JURÁK, E. — HAMPL, J. — GRANÁTOVÁ, M. — HOFÍREK, B.: Další perspektivy diagnostiky enzootické leukózy. *Veterinářství*, 35, 1985, s. 150-151.
- FRENZEL, B. — KAADEN, O. R. — MUSSGAY, M.: Purification of a glycoprotein from bovine leukemia virus (BLV). *Z. Naturforsch.*, 32c, 1977, s. 301-304.
- FRENZEL, B. — KAADEN, O. R. — MUSSGAY, M.: Nachweis von Antikörpern gegen das Rinderleukosevirus und seine Strukturproteine p 15, p 24 und GP 59. *Fortschr. Veter.-Med.*, 28, 1978, s. 164-166.
- HOFÍREK, B. — VAREJKA, F.: Použití imunodifuze (ID) v sérologické diagnostice leukózy skotu. *Veterinářství*, 29, 1979, s. 154-156.
- HOFÍREK, B. — VAREJKA, F. — HOJOVCOVÁ, M.: Studium výskytu protiláték ve stádě s enzootickou leukózou skotu. *Veterinářství*, 30, 1980, s. 249-252.
- HOFÍREK, B. — JAGOŠ, P. — KOUBA, V. — RADEMACHER, R. — TESAŘ, A.: Quelques questions concernant le diagnostic et la lutte contre la leucose enzootique bovine en Tchécoslovaquie. *Bull. Off. int. Epizoot.*, 85, 1976, s. 311-316.
- HOFÍREK, B. — JAGOŠ, P. — POLÁK, L. — ČERNÝ, L. — RADEMACHER, R. — TESAŘ, A. — VAREJKA, F. — ZÁVADA, J.: Diagnostics of enzootic leukosis in cattle in Czechoslovakia and the methods of its suppression. *Ann. Rech. vétér.*, 9, 1978, s. 739-742.
- HOFÍREK, B. — HOŘÍN, P. — GRANÁTOVÁ, M. — MACHATKOVÁ, M. — FRANZ, J. — SVOBODA, I. — BLECHA, J.: Experimentální a přirozená infekce virem enzootické leukózy skotu (BLV). *Veter. Med. (Praha)*, 31, 1986, s. 129-140.
- HOFÍREK, B. — KABELÍK, V. — FRANZ, J. — GRANÁTOVÁ, M. — SVOBODA, I. — HOJOVCOVÁ, M. — DACÍK, F. — PANTŮČEK, B.: Výsledky použití sérologických metod při tlumení enzootické leukózy skotu ve velkochovech. *Veterinářství*, 35, 1985, s. 103-105.
- KAADEN, O. R. — FRENZEL, B. — DIETZSCHOLD, B. — WEILAND, F. — MUSSGAY, M.: Isolation of a p 15 polypeptide from bovine leukemic cattle. *Virology*, 77, 1977, s. 501-509.
- LEVY, D. — DESHAYES, L. — PARODI, A. L. — LEVY, J. P. — STEPHENSON, J. R. — DEVARE, S. G. — GILDEN, R. V.: Bovine leukemia virus specific antibodies among French cattle. II. Radioimmunoassay with the major structural protein (BLV p 24). *Int. J. Canc.*, 20, 1977, s. 543-550.
- MAMMERICKX, M. — PORTETELLE, D. — BURNY, A.: La detection de la leucose bovine enzootique à l'aide d'un test immuno-enzymatique (ELISA) effectué sur des mélanges de sérum. *Ann. Méd. vétér.*, 128, 1984a, s. 203-209.
- MAMMERICKX, M. — PORTETELLE, D. — BRUCK, C. — BURNY, A.: La diagnostique de la leucose bovine enzootique à l'aide d'un test immuno-enzymatique (ELISA) impliquant un anticorps monoclonal. *Ann. Méd. vétér.*, 128, 1984b, s. 55-63.
- MAMMERICKX, M. — PORTETELLE, D. — NYS, J. — BURNY, A.: Le dépistage de masse de la leucose bovine enzootique en Belgique à l'aide d'un test immuno-enzymatique (ELISA) effectué sur mélanges de sérum. *Ann. Méd. vétér.*, 128, 1984c, s. 455-465.
- MAMMERICKX, M. — CORMANN, A. — BURNY, A. — DEKEGEL, D. — PORTETELLE, D.: Eradication of enzootic bovine leukosis based on the detection of the disease by the gp immunodiffusion test. *Ann. Rech. vétér.*, 9, 1978, s. 885-894.
- MAMMERICKX, M. — PORTETELLE, D. — KETTMANN, R. — GHYSDAEL, J. — BURNY, A. — DEKEGEL, D.: Comparative study of two diagnostic methods of bovine leukosis: Hematology and immunodiffusion. *Veter. Microbiol.*, 1, 1976, s. 203-210.
- MEYER, V. — SCHILOW, F. W. — STARICK, E. — KLUGE, K. H. — HEIM, F.: Vergleich der Empfindlichkeit des Enzymimmunoassay und des Agargel-Immunodiffusionstestes für Bestimmung von Antikörpern gegen das bovine Leukosevirus. *Arch. exp. Veter.-Med.*, 37, 1983, s. 661-666.
- MILLER, J. M. — van der MAATEN, M. J.: Use of glycoprotein antigen in the immunodiffusion test for bovine leukemia virus antibodies. *Eur. J. Cancer*, 13, 1977, s. 1369-1375.
- MILLER, J. M. — MILLER, L. D. — OLSON, C. — GILLETTE, K. G.: Virus-like particles in phytohaemagglutinin-stimulated lymphocyte cultures with reference to bovine lymphosarcoma. *J. Nat. Cancer Inst.*, 43, 1969, s. 1297-1305.
- NOUGAYREDE, P. — PELLEN, J.: Enzootic bovine leukosis: joint study of serum samples by the gel immunodiffusion test. *Épidémiologie et Santé Animale*, 1982, s. 11-18.

- OLSON, C. — BAUMGARTENER, L. E. — MILLER, J. M. — van der MAATEN, M. J.: A comparison of tests on reference serum for BLV antibody. *Veter. Microbiol.*, 1, 1976, s. 275-278.
- ONUMA, M. — OLSON, C. — BAUMGARTENER, L. E. — PEARSON, L. D.: An ether-sensitive antigen associated with bovine leukemia virus infection. *J. Nat. Cancer Inst.*, 55, 1975, s. 1155-1158.
- POLI, G. — BALSARI, A. — TONIOLO, A. — PONTI, W. — VACIRCA, G.: Microplate enzyme-linked immunosorbent assay for bovine leukemia virus antibody. *J. clin. Microbiol.*, 13, 1981, s. 46-48.
- PORTETELLE, D. — MAMMERICKX, M. — BEX, F. — BURNY, A. — CLEUTER, Y. — DEKEGEL, D. — GHYSDAEL, J. — KETTMANN, R. — CHANTRENNE, H.: Purification of BLV gp70 and BLV p24. Detection by radioimmunoassay of antibodies directed against these antigens. In: *Bovine leucosis: Various methods of molecular virology* (ed. A. Burny). 1977, s. 131-152.
- RADEMACHER, R. — KRAUS, J.: Studies on hematologic key used for diagnosis of leukosis in Bohemian spotted cattle in Czechoslovakia. *Med. veter.*, 12, 1967, s. 679-686.
- RESSANG, A. A. — GIELKENS, A. L. J. — QUAK, S. — MASTENBROEK, N. — TUPPERT, C. — de CASTRO, A.: Studies on bovine leukosis. VI. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to bovine leukosis virus. *Ann. Rech. vétér.*, 9, 1978, s. 663-666.
- SALAJ, I. — HOFÍREK, B. — KABELÍK, V. — HORYNA, J.: Sensitivity of immunodiffusion (ID) and pseudotype neutralization (PsNT) tests for the serological diagnosis of bovine leukemia virus infection. In: *Fifth International Symposium on Bovine Leukosis* (ed. O. C. Straub). Tübingen, 1984, s. 410-416.
- STRAUB, O. C.: Preliminary results of a new sanitation program for the eradication of enzootic bovine leukosis. *Ann. Rech. vétér.*, 9, 1978, s. 895-898.
- STRAUB, O. C.: Diagnosis of enzootic bovine leukosis: A comparison of haematological and immunodiffusion tests. *Res. veter. Sci.*, 25, 1978, s. 13-15.
- TODD, D. — ADAIR, B. M.: An enzyme-linked immunosorbent assay for enzootic bovine leukosis virus antibodies. *Veter. Rec.*, 107, 1980, s. 124-126.
- TOLLE, A.: Zur Übertragbarkeit der Rinderleukose. *Zbl. Bakt. Orig. A*, 198, 1965, s. 142-149.
- TOMA, B. — VUILLAUME, A. — MANET, G. — DURET, C. — ELOIT, M. — CRESPEAU, F. — CHAPPUIS, G. — PARODI, A. L.: Dépistage de la leucose bovine enzootique par application du test ELISA sur le lait. *Rec. Med. vétér.*, 1984, s. 53-60.
- ZÁVADA, J. — ČERNÝ, L. — ALTSTEIN, A. D. — ZÁVADOVÁ, Z.: Pseudotype particles of vesicular stomatitis virus with surface antigens of bovine leukaemia virus — VSV (BLV) — as a sensitive probe for detecting antibodies in the sera of spontaneously infected cattle. *Acta virol.*, 22, 1978, s. 91-96.
- ZÁVADA, J. — ČERNÝ, L. — ZÁVADOVÁ, Z. — BOŽNOVÁ, J. — ALTSTEIN, A. D.: A rapid neutralization test for antibodies to bovine leukemia virus, with the use of rhabdovirus pseudotypes. *J. Nat. Cancer Inst.*, 62, 1979, s. 95-101.

Došlo dne 22. 7. 1985

ФРАНЦ, Я. — ГАМПЛ, Я. — ГОФИРЕК, Б. — ШКРОБАК, Ф. — СВОБОДА, И. — ГРАНАТОВА, М. (Научно-исследовательский институт ветеринарии, Брно; Ветеринарный институт, Брно): Радиоиммунологическое выявление антител против вируса лейкоза крупного рогатого скота. *Veter. Med. (Praha)*, 31, 1986 (8) : 459-468.

Разработан радиоиммунологический метод (RIA) для выявления сывороточных антител против вируса лейкоза крупного рогатого скота (VBL). Методика использует способности вирусного антигена связываться с твердой фазой полистиренового носителя. Метод сравнивается с методом ELISA и с псевдонейтрализационным и иммунодиффузионным тестами. Между методами RIA и ELISA было достигнуто высокое соответствие результатов, доходящее до 95 %. Метод RIA своей чувствительностью превосходит иммунодиффузионный тест.

энзоотический бычий лейкоз; диагностика; RIA; ELISA; псевдонейтрализационный тест; иммунодиффузионный тест

FRANZ, J. — HAMPL, L. — HOFÍREK, B. — ŠKROBÁK, F. — SVOBODA, I. — GRANÁTOVÁ, M. (Veterinary Research Institute, Brno; University of Veterinary Medicine, Brno): *Radioimmunologic Demonstration of the Antibodies to Bovine Leukosis Virus*. Veter. Med. (Praha), 31, 1986 (8) : 459-468.

The radioimmunologic assay (RIA) was elaborated for a demonstration of serum antibodies to bovine leukosis virus. The procedure makes use of the viral antigen bond to the fixed phase of a polystyrene carrier. The method was compared with the ELISA method and pseudoneutralizing and immunodiffusion tests. High congruence of the results of the RIA and ELISA methods was achieved, making 95 %. The RIA method is more sensitive than the immunodiffusion test.

enzootic bovine leukosis; diagnostics; RIA; ELISA; pseudoneutralizing test; immunodiffusion test

FRANZ, J. — HAMPL, L. — HOFÍREK, B. — ŠKROBÁK, F. — SVOBODA, I. — GRANÁTOVÁ, M. (Forschungsinstitut für Veterinärmedizin, Brno; Veterinärmedizinische Hochschule, Brno): *Radioimmunologischer Nachweis von Antikörpern gegen das Virus der Rinderleukose*. Veter. Med. (Praha), 31, 1986 (8) : 459-468.

Es wurde eine radioimmunologische (RIA-) Methode zum Nachweis von Serumantikörpern gegen das Virus der Rinderleukose (VBL) ausgearbeitet. Dieses Verfahren macht sich die Fähigkeit einer Bindung des Virusantigens auf die feste Phase des Polystyrolträgers zunutze. Diese Methode wurde mit der ELISA-Methode und mit dem Pseudoneutralisations- und Immunodiffusionstest verglichen. Zwischen der RIA- und der ELISA-Methode wurde eine hohe, bei 95 % liegende Übereinstimmung verzeichnet. Durch ihre Sensibilität überragt die RIA-Methode den Immunodiffusionstest.

enzootische bovine Leukose; Diagnostik; RIA; ELISA; Pseudoneutralisationstest; Immunodiffusionstest

Adresy autorů:

RNDr. Jaroslav Franz, CSc., RNDr. Jaroslav Hampl, CSc., MVDr. Ivan Svoboda, RNDr. Marta Granátová, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32 Brno

Doc. MVDr. Bohumír Hofírek, CSc., František Škrobánek, Vysoká škola veterinární, Palackého 1-3, 612 42 Brno

ELEKTRONOVÁ MIKROSKOPIE VIRU AUJESZKYHO CHOROBY (ACH) V EXPLANTÁTECH GASSEROVA GANGLIA Z PRASAT S LATENTNÍ INFEKČÍ

L. Valíček, B. Šmíd, L. Rodák, E. Jurák

VALÍČEK, L. — ŠMÍD, B. — RODÁK, L. — JURÁK, E. (Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno): *Elektronová mikroskopie viru Aujeszkyho choroby (ACH) v explantátech Gasserova ganglia z prasat s latentní infekcí*. Veter. Med. (Praha), 31, 1986 (8) : 469-476.

U dvou prasat latentně infikovaných virem Aujeszkyho choroby (ACH) byla elektronově mikroskopicky prokázána různá vývojová stadia viru ACH v ultratenkých řezech kultivovanými fragmenty Gasserova ganglia (G. g.). U prasete vakcinovaného inaktivovanou vakcínou proti ACH byl virus zjištěn v buňkách G. g. za 186 dnů po čelení virem, přičemž reaktivace latence bylo dosaženo po imunosupresi dexamethazonem. U nevakcinovaného prasete byl virus prokázán v buňkách G. g. za tři měsíce po experimentální infekci. V ultratenkých řezech bylo největší množství viru lokalizováno v jádrech a v cytoplasmě satelitních a Schwannových buněk, dále pak ve vazivových buňkách a v extracelulárním prostoru. V gangliových buňkách byl virus přítomen v cytoplasmě a ojedinelé v myelinizovaných axonech.

vývojová stadia viru Aujeszkyho choroby; inaktivovaná vakcína; čelení virem; reaktivace latence

Existence latentní infekce virem Aujeszkyho choroby (ACH) u prasat byla potvrzena již dříve (Sabó a Rajčáni, 1976), ale z hlediska epizootologie a kontroly nákazy je mnohem závažnější nedávné zjištění, že latenci je možné navodit i po infekci prasat vakcinovaných inaktivovanou vakcínou (Wittman aj., 1983; Šmíd aj., 1983). Latentní virus byl prokázán v různých orgánech a tkáních prasat, nejvyšší frekvence aktivace viru však byla zjištěna v explantátech Gasserova ganglia nervu trigeminu (Sabó a Rajčáni, 1976). V našich pokusech o průkaz latentní infekce virem ACH, uskutečňovaných i u prasat vakcinovaných inaktivovanou vakcínou proti ACH, jsme prokazovali virus v kultivovaných explantátech Gasserova ganglia pouze izolačně (Šmíd aj., 1982, 1983), a proto cílem této práce bylo elektronově mikroskopické určení typů buněk, ve kterých probíhá replikace viru v explantátech.

MATERIÁL A METODY

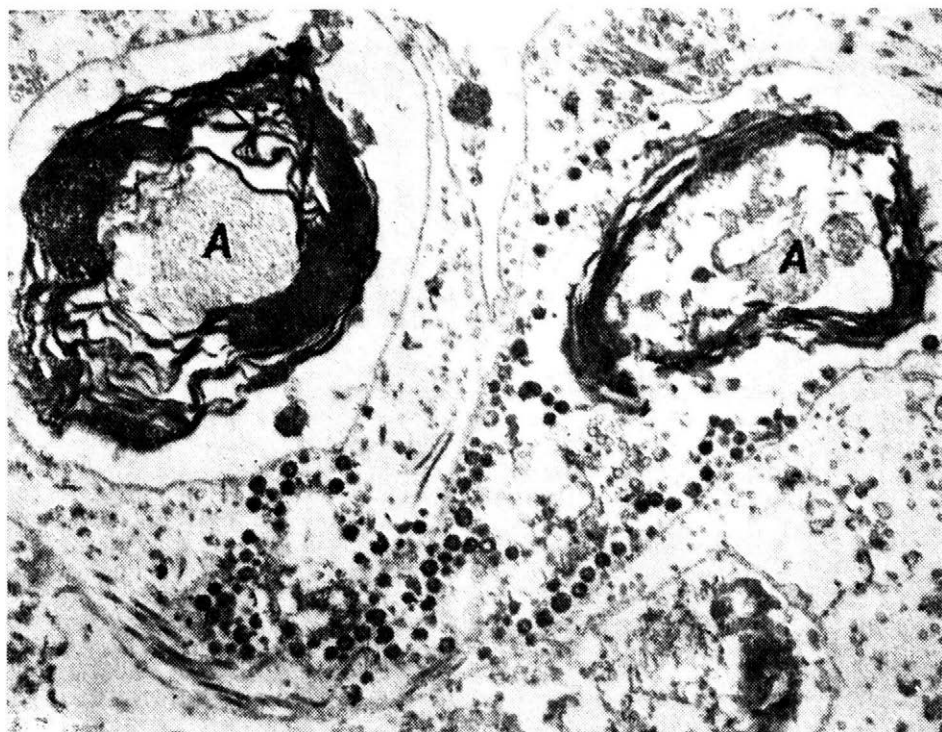
K elektronově mikroskopickému průkazu viru ACH jsme používali ultratenké řezy kultivovanými fragmenty Gasserova ganglia nervu trigeminu. Ganglia byla získána od dvou prasat latentně infikovaných virem ACH.

První prase bylo v sedmi týdnech věku vakcinováno a za tři týdny revakci-

nováno inaktivovanou vakcínou proti ACH (výrobce Bioveta, n. p., Ivanovice na Haně). Za 35 dnů po revakcinaci bylo prase perorálně infikováno virem ACH, a to 1 ml virové suspenze (kmen TOP; infekční dávka $3 \cdot 10^5$ PFU $\cdot$ ml $^{-1}$). Za 186 dnů po infekci byly praseti aplikovány perorálně tři dávky dexamethazonu tři dny po sobě (600 mg, 600 mg a 500 mg; Dexamethazon Spofa, tabl.), poslední dávka dva dny před porážkou. Po odporažení jsme odebrali pravé a levé Gasserovo ganglion, které jsme rozstříhali na fragmenty o velikosti asi 1 mm 3 . Fragmenty byly dále přeneseny do Petriho misek a kultivovány v Eaglově médiu s 10 % bovinního fetálního séra v atmosféře s 5 % kyslíčniku uhličitého (Šmíd aj., 1983). Z misek, v nichž byl v kultivačním médiu prokázán izolací na buňkách linie RK 13 virus ACH, byly fragmenty ganglií po 25 dnech kultivace odebrány a zpracovány pro elektronovou mikroskopii. Fragmenty byly fixovány ve 3 % glutaraldehydu ve fosfátovém pufru (pH 7.2), postfixovány v 1 % OsO $_4$, odvodněny v acetonu a zality do směsi Epon-Araldit. Ultratenké řezy byly zhotoveny na Ultratomu III a prohlíženy v elektronovém mikroskopu Tesla BS 513.

Druhé prase, nevakcinované proti ACH, bylo ve věku 16 měsíců perorálně infikováno 10 ml viru ACH (kmen DK-M, titr $4 \cdot 10^6$ PFU $\cdot$ ml $^{-1}$). Za tři měsíce po infekci bylo prase odporaženo, bylo mu vyňato pravé a levé Gasserovo ganglion a fragmenty ganglia byly kultivovány v Petriho miskách. Médium z misek jsme ve dvoudenních až třídenních intervalech odebírali a vyšetřovali na přítomnost viru ACH na buněčné linii RK 13. Pro elektronové mikroskopický průkaz viru jsme fragmenty odebírali devátý den kultivace, fixovali jsme je a zpracovali již popsaným způsobem.

U obou prasat jsme v době odporažení odebrali krev a vyšetřovali jsme krevní sérum virusneutralizačním testem na přítomnost protilátek proti ACH (Šmíd aj., 1983).

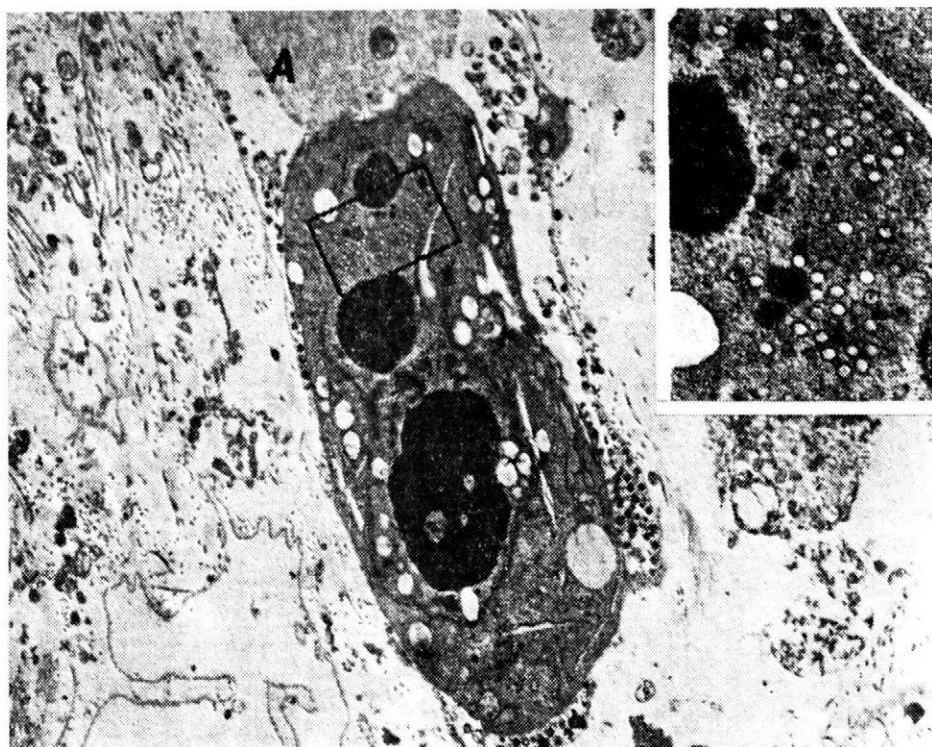


1. Myelinizované axony (A) se silně porušenou strukturou. Velké množství virových partikul v cytoplasmě Schwannových buněk a v rozšířených intercelulárních prostorech — Myelinated axons (A) with heavily damaged structure. Large amounts of virus particles in the cytoplasm of Schwann's cells and in the dilated intercellular space

VÝSLEDKY

U vakcinovaného prasete jsme prokázali virus ACH ve fragmentech Gasserova ganglia odebraných za 186 dnů po infekci prasete, u něhož byl titr virusneutralizačních protilátek v krevním séru 8. Před zpracováním pro elektronovou mikroskopii byly explantáty ganglia 25 dnů kultivovány. Dlouhá doba kultivace spolu s pokročilou virovou infekcí měly za následek silné poškození struktury ganglií. Mnoho buněk různého typu bylo poškozeno nebo bylo ve stadiu rozpadu, intercelulární prostory byly velmi rozšířené, takže přesná identifikace typů buněk byla často značně obtížná, popřípadě i nemožná.

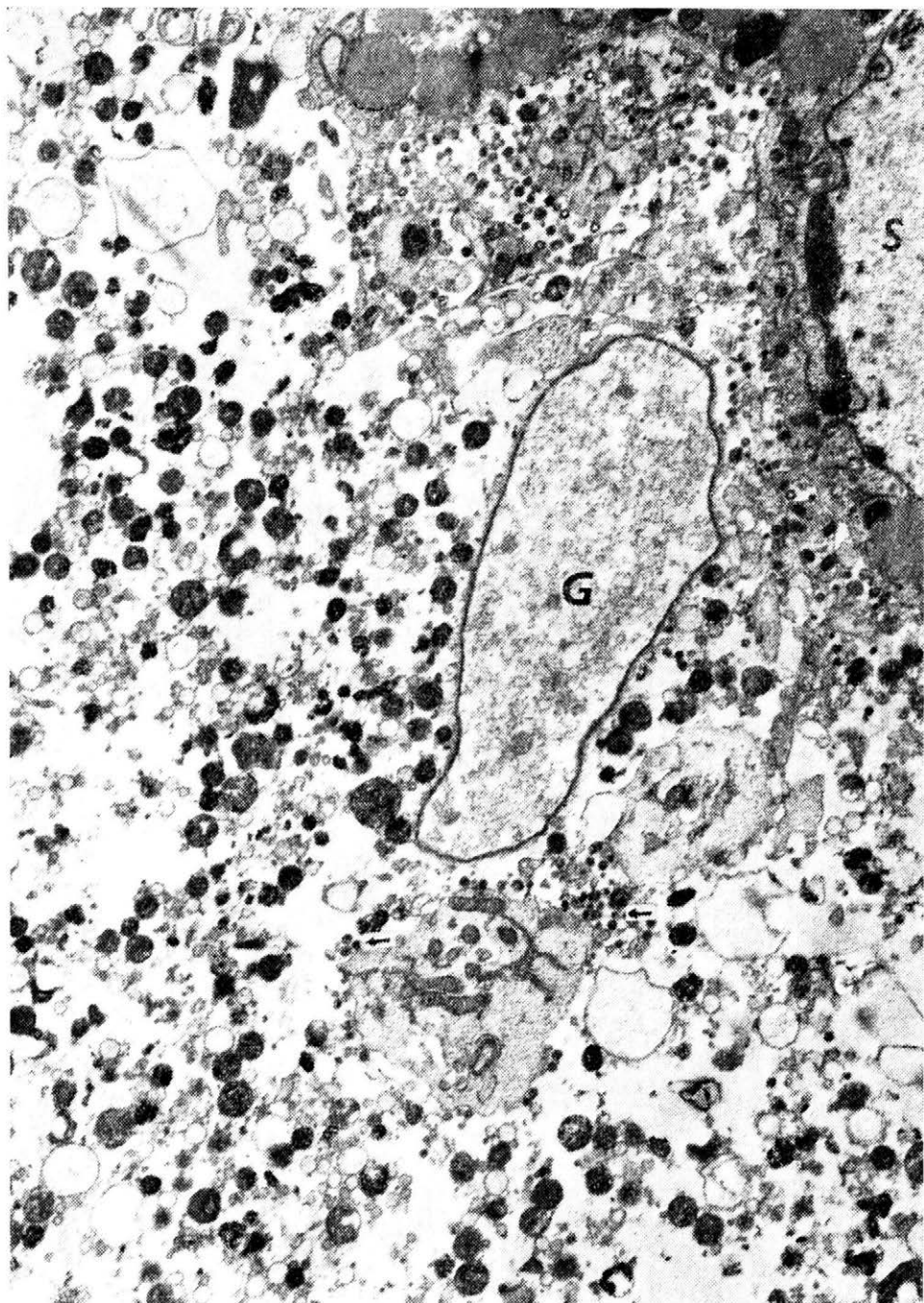
Největší množství virových partikulí ACH bylo zjištěno především extracelulárně (obr. 1) a dále v jádrech i cytoplasmě satelitních buněk kolem neuronů. Různá vývojová stadia viru i kompletní viriony jsme nacházeli i ve Schwannových a vazivových buňkách. V některých případech jsme prokázali formaci nukleokapsid v jádrech těchto buněk, ojedinelé byly nukleokapsidy v jádře v krystalickém uspořádání (obr. 2). V gangliových buňkách jsme zjišťovali viriony ACH pouze intracytoplazmaticky, nepodařilo se nám prokázat virus v jádře.



2. Silně poškozená buňka v sousedství axonu (A) s krystalicky uspořádanými nukleokapsidami viru ACH v rozpadajícím se jádře (výřez) a s velkým množstvím extracelulárních virových partikulí — A heavily damaged cell in the proximity of axon (A) with crystalline arrangement of nucleocapsids of ADV in a disintegrating nucleus (inset) and with a large amount of extracellular virus particles



3. Myelinizovaný axon (MA) s virionem v axoplasmě (velká šipka). Schwannova buňka (S) s nukleokapsidami v jádře (šipky) a s velkým množstvím virionů v intercelulárních prostorech — Myelinated axon (MA) with virion in the axoplasm (large arrow). Schwann's cell (S) with nucleocapsids in the nucleus (arrows) and with a large amount of virions in the intercellular space



4. Část jádra (G) a cytoplazmy poškozené gangliové buňky s viriony v cytoplazmě (šípky). S — jádro satelitní buňky — Part of nucleus (G) and cytoplasm of a damaged ganglion in the cytoplasm (arrows). S — nucleus of the satellite cell

U nevakcinovaného prasete jsme prokázali latentní infekci virem ACH v kultivovaných fragmentech Gasserova ganglia za tři měsíce po infekci prasete virem ACH. Titr virusneutralizačních protilátek v krevním séru prasete byl 16.

Struktura fragmentů ganglií byla zachovalejší než u ganglií získaných od předchozího prasete, poněvadž tkáň pro elektronovou mikroskopii byla zpracována po devíti dnech kultivace. Také v tomto gangliu jsme prokázali největší množství virových partikulí extracelulárně, dále pak v jádrech i cytoplasmě satelitních a Schwannových buněk (obr. 3) a ve vazivových buňkách. Virus jsme našli i v cytoplasmě myelinizovaného axonu (obr. 3), ale v gangliových buňkách byl prokázán pouze v neuroplasmě, jeho průkaz v jádře se nepodařil (obr. 4).

DISKUSE

Primárním místem multiplikace viru ACH u prasat je především nazofaryngeální oblast, odkud se pak virus šíří neurální cestou do CNS. Předpokládá se, že transport viru do CNS se uskutečňuje axoplasmou periferních nervů, kdežto buňky glie přitom hrají jen malou úlohu (Mc Cracken aj., 1973; Field a Hill, 1974).

Při elektronově mikroskopickém studiu replikace viru ACH v nervové tkáni byl virus prokázán ve spinálních gangliích králíků, kde byl přítomen jak v nervových buňkách, tak ve Schwannových buňkách glie (Becker, 1976). U selat prokázali virus ACH po experimentální infekci v solárních gangliích Narita aj. (1983), a to jak v gangliových, tak v gliových buňkách.

Při studiu latentní infekce u prasat se o identifikaci typů buněk, ve kterých začíná replikace viru ACH v explantátech Gasserova ganglia, pokusili Sabó a Rajčáni (1976). Imunofluorescenční technikou prokázali antigen v explantátech v době, kdy se infekční virus vyskytoval i v kultivačním médiu. Virový antigen byl přítomen nejenom v neuronech, ale i v satelitních buňkách kolem neuronů a ve Schwannových buňkách. I když se uvedeným autorům nepodařilo přímo určit typ buněk, které umožňují přežívání viru v gangliu v latentním stavu, předpokládají na základě výsledků izolace viru z explantátů různých tkání, že tuto úlohu může plnit více typů buněk.

Naše výsledky elektronově mikroskopického studia replikace viru ACH v explantátech Gasserova ganglia jsou v souladu s imunofluorescenčními průkazy antigenu. Nález různých vývojových forem viru v jádrech satelitních, Schwannových a vazivových buněk svědčí o replikaci viru v těchto buněčných typech. I když se nám nepodařilo prokázat formaci nukleokapsid viru v jádru gangliových buněk, předpokládáme, že tyto buňky jsou iniciálním místem virové replikace při aktivaci latentní infekce v Gasserově gangliu a že virus uvolněný z těchto buněk infikuje ostatní buněčné typy. Naše zjištění viru pouze v neuroplasmě a axonech gangliových buněk a jeho nepřítomnost v jádru těchto buněk si vysvětlujeme tím, že jsme zpracovávali explantáty až po dlouhé době kultivace (25 a 9 dnů), tj. v pozdním stadiu infekce.

Literatura

BECKER, C. H.: Zur DNS-Synthese in Spinalganglien von Kaninchen nach der Herpes-suis-Infektion. Elektronenmikroskopisch-autoradiographische Befunde. Arch. exp. Veter.-Med., 30, 1976, s. 127-143.

FIELD, H. J. — HILL, T. J.: The pathogenesis of pseudorabies in mice following peripheral inoculation. J. gen. Virol., 23, 1974, s. 145-157.

Mc CRACKEN, R. M. — Mc FERRAN, J. B. — DOW, C.: The neural spread of pseudorabies virus in calves. J. gen. Virol., 20, 1973, s. 17-28.

NARITA, M. — OSADA, M. — FUKUSHO, A.: An electronmicroscopic study of solar ganglia in piglets infected with Aujeszky's disease virus. Nat. Inst. anim. Hlth., 23, 1983, s. 61-66.

SABÓ, A. — RAJČÁNI, J.: Latent pseudorabies virus infection in pigs. Acta virol., 20, 1976, s. 208-214.

ŠMÍD, B. — VALÍČEK, L. — RODÁK, L. — HERZIG, I. — SABÓ, A. — MATIS, J. — DVORÁČEK, L.: Aujeszkyho choroba (ACH) prasat. [Výzkumná zpráva.] Brno, Výzkumný ústav veterinárního lékařství 1982. 27 s.

ŠMÍD, B. — VALÍČEK, L. — RODÁK, L. — JURÁK, E. — HERZIG, I. — SABÓ, A. — DVORÁČEK, L.: Latentní infekce Aujeszkyho choroby (ACH) u prasat a přežívání viru v prasečí kejdě. [Výzkumná zpráva.] Brno, Výzkumný ústav veterinárního lékařství 1983. 20 s.

WITTMANN, G. — OHLINGER, V. — RZIHA, H. J.: Occurrence and reactivation of latent Aujeszky's disease virus following challenge in previously vaccinated pigs. Arch. Virol., 75, 1983, s. 29-41.

Došlo dne 15. 4. 1985

ВАЛИЧЕК, Л. — ШМИД, Б. — РОДАК, Л. — ЮРАК, Э. (Научно-исследовательский институт ветеринарии, Брно): **Электронная микроскопия вируса болезни Ауески (ACH) в эксплантатах ганглия Гассера у свиней со скрытой инфекцией.** Veter. Med. (Praha), 31, 1986 (8) : 469-476.

У двух латентно зараженных вирусом болезни Ауески свиней путем электронной микроскопии доказали разные стадии вируса АСН на ультратонких срезах с помощью культивированных фрагментов ганглия Гассера (G. g.). У свиньи, вакцинированной инактивир. вакциной против АСН, вирус обнаружен в клетках G. g. через 186 дней после заражения, причем реактивность латентности отмечена после иммуносупрессии дексаметазоном. У невакцинированной свиньи вирус доказан в упомянутых клетках через 3 мес. после заражения. В ультратонких срезах наибольшее количество вируса локализовано в ядрах и цитоплазме сателлитных и Шванновских клеток, потом в клетках соединительных тканей и во внеклеточном пространстве. В клетках же ганглия вирус присутствует в цитоплазме и в отдельных случаях — в миелинизированных аксонах.

стадии развития вируса болезни Ауески; инактивированная вакцина; заражение вирусом; реактивирование латентности

VALÍČEK, L. — ŠMÍD, B. — RODÁK, L. — JURÁK, E. (Veterinary Research Institute, Brno): **Electron Microscopy of the Aujeszky's Disease Virus in the Explants of the Gasserian Ganglion of Pigs with Latent Infection.** Veter. Med. (Praha), 31, 1986 (8) : 469-476.

Different developmental stages of the Aujeszky's disease virus were demonstrated by electron microscopy in the ultra-thin slices by the cultivated fragments of the Gasserian ganglion (G. g.) of two pigs latently infected with the Aujeszky's disease virus (ADV). In a pig vaccinated with the inactivated vaccine against the disease, the virus was detected in the G. g. cells 186 days after virus challenge, the reactivation of latency being obtained after immunosuppression with dexamethazone. In the non-vaccinated pig the virus was detected in G. g. cells after three months from

experimental infection. In the ultra-thin slices the largest amount of virus was located in the nuclei and cytoplasm of satellite and Schwann's cells, in the connective-tissue cells and in the extracellular space. In the ganglion cells the virus was present in the cytoplasm and sporadically in the myelinated axons.

developmental stages of Aujeszky's disease virus; inactivated vaccine; virus challenge; reactivation of latent infection

VALÍČEK, L. — ŠMÍD, B. — RODÁK, L. — JURÁK, E. (Forschungsinstitut für Veterinärmedizin, Brno): *Elektronenmikroskopie des Virus der Aujeszky'schen Krankheit (ACH) in Explantaten des Gasserschen Ganglions aus Schweinen mit latenter Infektion*. Veter. Med. (Praha), 31, 1986 (8) : 469-476.

Bei zwei, mit dem Virus der Aujeszky'schen Krankheit (ACH) latent infizierten Schweinen wurden elektronenmikroskopisch verschiedene Stadien des ACH-Virus in ultradünnen Schnitten kultivierter Fragmente des Gasserschen Ganglions (G. g.) nachgewiesen. Bei einem mit inaktivierter Vakzine gegen ACH vakzinierten Schwein wurde das Virus in den G. g.-Zellen 186 Tage nach der Challenge durch das Virus festgestellt, wobei eine Reaktivierung der Latenz nach Immunsuppression durch Dexamethazon erreicht wurde. Bei einem nicht vakzinierten Schwein wurde das Virus in G. g.-Zellen drei Monate nach der experimentellen Infektion nachgewiesen. Die größten Mengen des Virus in den ultradünnen Schnitten wurden in den Kernen und im Zytoplasma der Satellit- und der Schwannschen Zellen, ferner dann in den Bindegewebezellen und im extrazellulären Raum lokalisiert. In den Ganglienzellen war das Virus im Zytoplasma und vereinzelt in den myelinisierten Axonen vorhanden.

Entwicklungsstadien des Aujeszky-Virus; inaktivierte Vakzine; Viruschallenge; Latenzreaktivierung

Adresa autorů:

MVDr. Lubomír Valíček, CSc., MVDr. Bedřich Šmíd, CSc., MVDr. Ladislav Rodák, CSc., doc. MVDr. Evžen Jurák, CSc., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32 Brno

SPONTÁNNÍ INFEKCE BUNĚČNÝCH LINIÍ MYKOPLAZMATY A JEJÍ DETEKCE FLUORESCENČNÍ METODOU

M. Machatková, K. Jurmanová, J. Hampl, V. Šnejdar

MACHATKOVÁ, M. — JURMANOVÁ, K. — HAMPL, J. — ŠNEJDAR, V. (Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno; Výzkumný ústav hematologie a epidemiologie, Praha): *Spontánní infekce buněčných linií mykoplazmaty a její detekce fluorescenční metodou*. Veter. Med. (Praha), 31, 1986 (8) : 477-485. Kontinuální buněčné linie bovinních ledvin MDBK a AUBK i opičích ledvin VERO byly v průběhu dlouhodobé kultivace spontánně infikovány mykoplazmaty *M. arginini* a *A. laidlawii*. Mykoplazmová infekce významně snížila růstovou aktivitu buněk a negativně ovlivnila jejich morfologii. K průkazu infekce se osvědčila metoda nepřímého průkazu mykoplazmat bisbenzimidem Hoechst, která byla modifikována na jednoduchý a rychlý test. Umožnila prokázat i počáteční infekci v době, kdy množství infikovaných buněk v kultuře bylo relativně nízké.

kontinuální buněčné linie; kontaminace; fluorescenční test

Buněčné kultury představují optimální substrát pro proliferaci mykoplazmat, která se v nich množí do vysokých infekčních titrů.

Zatímco primární buněčné kultury jsou mykoplazmaty kontaminovány pouze ojediněle [Mc Garrity aj., 1978; O'Brien aj., 1981], patří latentní mykoplazmová infekce mezi časté příčiny neúspěchu při kultivaci kontinuálních linií [Barile, 1977].

Vliv mykoplazmové infekce na kultury je určován mnoha faktory, z nichž některé, jako jsou druh mykoplazmat a vnímavost kultur k infekci, jsou dominantní a spolu s kultivačními podmínkami rozhodují o stupni rozvoje infekce.

V kontaminovaných buňkách dochází k různým funkčním změnám [Gololobovová, 1978; Barile, 1979], které mohou významně ovlivnit i produkci virových antigenů [Fogh, 1973].

Řešení problémů mykoplazmových infekcí buněčných kultur je v posledních letech úzce spojeno s vývojem nových citlivých metod detekce. Mezi metody nejčastěji používané ke kontrole buněčných linií patří vedle již klasických metod cytologických [Russell aj., 1976; Gololobovová, 1978; Djakonov aj., 1980] a kultivačních [Edward, 1969; Barile, 1973] i metoda autoradiografická [Schneider aj., 1974], elektronoptická [Fogh, 1973] a fluorescenční [Chen, 1977; Stanbridge, 1981].

V naší práci jsou shrnuty poznatky o spontánní infekci kontinuálních buněčných linií mykoplazmaty a o její detekci jednoduchou a citlivou fluorescenční metodou.

MATERIÁL A METODY

BUNĚČNÉ LINIE

V experimentální práci byly sledovány kontinuální linie bovinních ledvin MDBK a AUBEK a opičích ledvin VERO. Všechny linie byly kultivovány v médiu Eagle-MEM obsahujícím 10 % inaktivovaného telecího séra pro TK komerčního původu, doplněném 200 m. j. penicilinu a 200 μ g streptomycinu na mililitr média.

SPONTÁNNÍ INFEKCE KULTUR

Kultury kontinuálních linií MDBK, AUBEK a VERO, pasážované za aseptických podmínek běžnou trypsinační technikou, byly mezi pátou až desátou pasáží spontánně infikovány mykoplazmaty.

Původní infekce prosté kultury, uchovávané v tekutém dusíku a rozmražené bezprostředně před použitím, sloužily jako kontrolní.

PROLIFERAČNÍ AKTIVITA KULTUR

Ve stanovených časových intervalech byly buňky uvolněny trypsinem a počítány v Bürkerově komůrce. Získané hodnoty byly dosazeny do vzorce pro výpočet proliferačního indexu, vyjadřujícího poměr celkového množství buněk narostlých k nasazeným.

METABOLICKÁ AKTIVITA KULTUR

Pro stanovení syntézy proteinu byly kultury po dobu 72 hodin kultivovány v médiu obsahujícím 37 kBq ^3H leucinu na mililitr média. Po 72hodinové kultivaci byly buňky zpracovány podle metody popsané Rozkošným aj. (1979). Kultury určené ke sledování utilizace glukózy byly po 48hodinové kultivaci v médiu obsahujícím 37 kBq ^{14}C glukózy dvakrát opláchnuty a kultivovány dalších 48 hodin v neznačeném médiu. Po ukončení kultivace bylo médium odstředěno a v supernatantu byla stanovena radioaktivita ^{14}C glukózy. Všechny uvedené údaje jsou přepočty na 100 tisíc buněk a jsou průměrným výsledkem dosaženým u tří vzorků.

DETEKCE MYKOPLAZMAT V KULTURÁCH

Fluorescenční vyšetření

Kultury byly pravidelně vyšetřovány metodou průkazu mykoplazmat bisbenzimidem 33258 — Hoechst, popsanou Chenem (1977) a modifikovanou takto: Kultury, které rostly na sklíčkách vložených do zkumavek a dosáhly 50 až 70% monolayeru, byly deset minut fixovány absolutním metanolem a po stejnou dobu barveny 0,001% roztokem bisbenzimidu v metanolu. Ihned po obarvení byla sklíčka řádně opláchnuta destilovanou vodou a po oschnutí montována pomocí pufru s glycerinem. Pro vlastní vyšetření fluorescenčním mikroskopem Fluoval bylo použito zvětšení 400 až 600krát.

Kultivační vyšetření

Současně s fluorescenčním vyšetřením byly kultury vyšetřovány na přítomnost mykoplazmat i kultivačně (Jurmanová aj., 1983).

VÝSLEDKY

VLIV MYKOPLAZMOVÉ INFEKCE NA MORFOLOGICKÉ A RŮSTOVÉ VLASTNOSTI KULTUR

V počátečním stadiu infekce se buňky kontaminovaných kultur morfologicky nelišily od buněk kultur infekce prostých. Pokud se v někte-

I. Vliv mykoplazmové infekce na morfologické a růstové vlastnosti linií — The influence of mycoplasmic infection on the morphological and growth properties of the lines

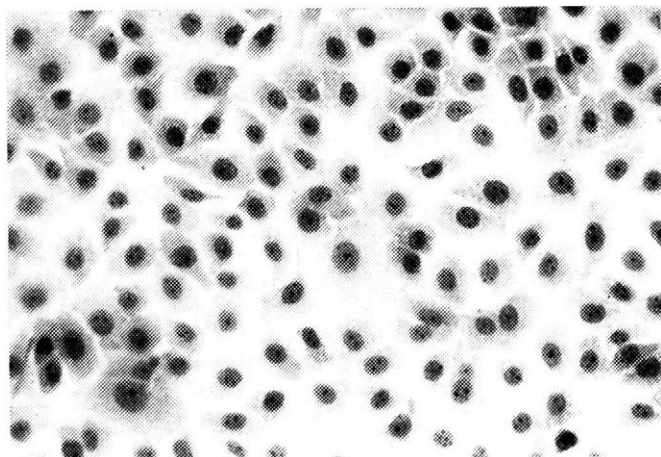
Morfologická a růstová charakteristika kultur					
kontaminovaných			infekce prostých		
kultury nasazené	rostoucí	přežívající	nasazené	rostoucí	přežívající
nízký počet adheřujících buněk	nerovnoměrný růst, ostře ohraničené buněčné kolonie	tvorba cytopatického efektu	vysoká vitalita a adheze buněk	rovnoměrný růst, splývající buněčné kolonie	dlohodobé přežívání konfluentní kultury
atypický tvar, tvorba dlouhých cytoplazmatických výběžků	nízká buněčná denzita monolayeru	rychlá destrukce kultur	charakteristický tvar epiteloidního nebo fibroblastického typu	vysoká buněčná denzita monolayeru	pomalé fyziologické stárnutí buněk
zrnitá cytoplazma	shlukování buněk, vznik ložisek morfologicky změněných buněk	neschopnost dalšího růstu	cytoplazma bez morfologických změn	morfologická uniformita kultury	schopnost proliferace dlohodobě uchovávaných kultur

rych kulturách objevily málo zřetelné morfologické změny, měly reverzibilní charakter a snadno unikaly pozornosti. Také v růstové aktivitě buněk nebyly zjištěny signifikantní rozdíly. Byly pozorovány pouze některé nespecifické projevy infekce, především snížená schopnost buněk tvořit klony a rychlejší stárnutí kultur.

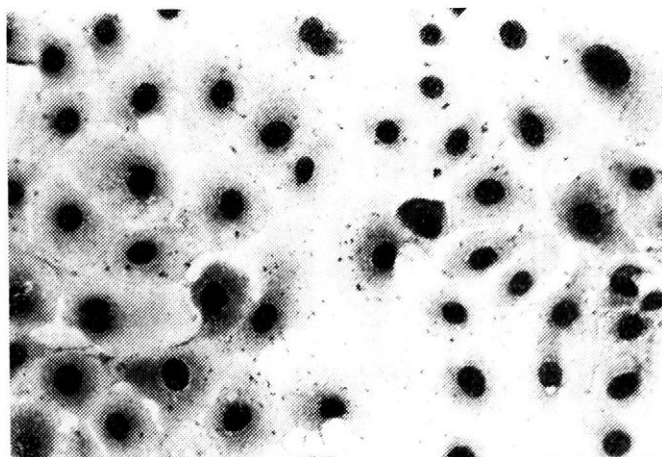
S dalším rozvojem infekce se morfologická a růstová charakteristika kultur postupně měnila. Zásadní morfologické změny byly zjištěny nejdříve u přežívajících, později i u nasazených kultur. U nativních kul-

II. Vliv mykoplazmové infekce na růst a metabolismus buněk linie VERO — The influence of the mycoplasmic infection on the growth and metabolism of the VERO line cells

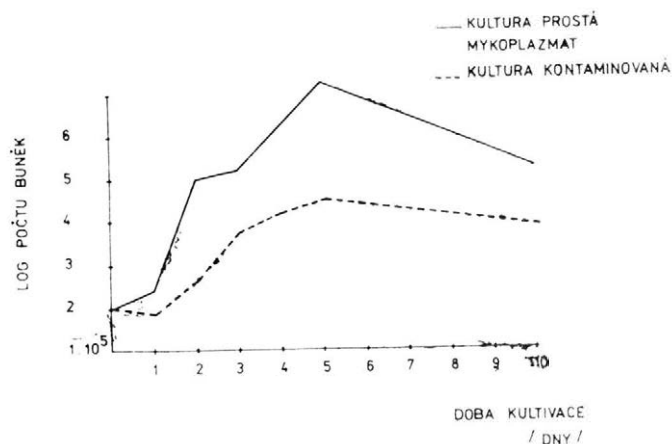
Kultura	Kontrola na mykoplazmata	Morfologie kultury	Proliferační index	Inkorporace ³ H leucinu imp/min.	Inkorporace ¹⁴ C glukózy imp/min.
1	kontaminovaná <i>A. laidlawii</i>	buněčná degenerace	2,4	132	124
2	kontaminovaná (neidentifikováno)	reverzibilní morfologické změny	3,3	347	103
3	infekce prostá	charakteristická morfologie	4,6	403	65



1. Buňky kontinuální linie AUBEK (barveno HE) — The cells of the continual line AUBEK (stained with HE)

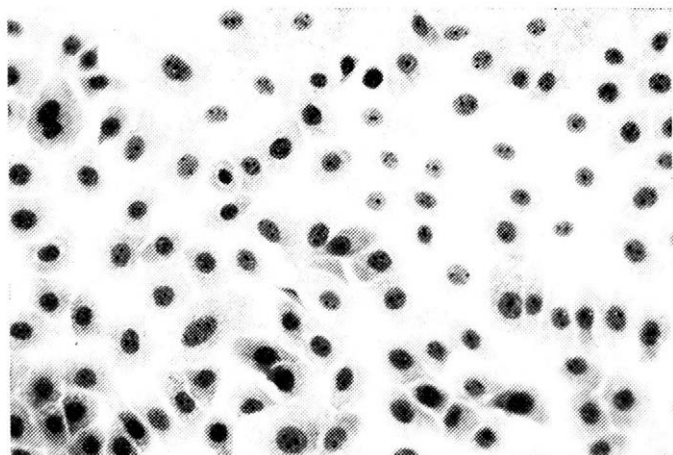


2. Kultury kontinuální linie AUBEK kontaminované *A. laidlawii* (barveno HE) — The cultures of the continual line AUBEK contaminated by *A. laidlawii* (stained with HE)

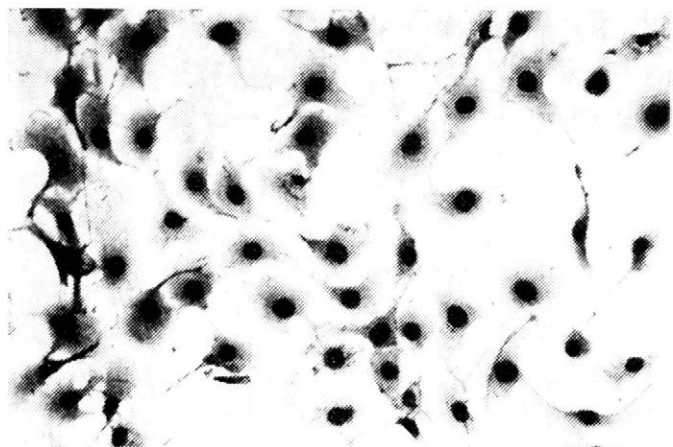


3. Růstová křivka buněk kontinuální linie MDBK — The growth curve of the cells of the continual line MDBK

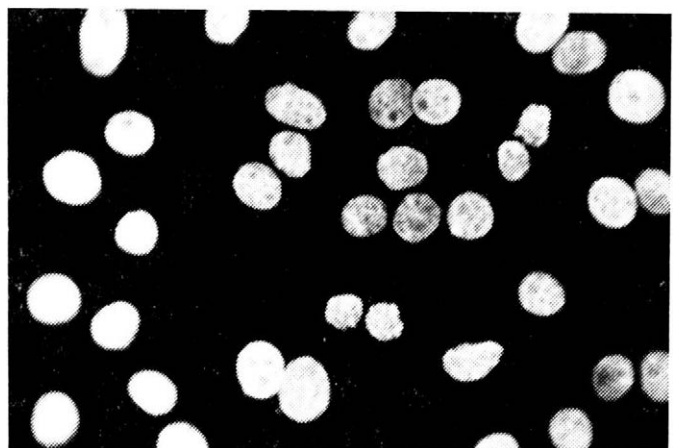
4. Buňky kontinuální linie MDBK (barveno HE) — The cells of the continual line MDBK (stained with HE)

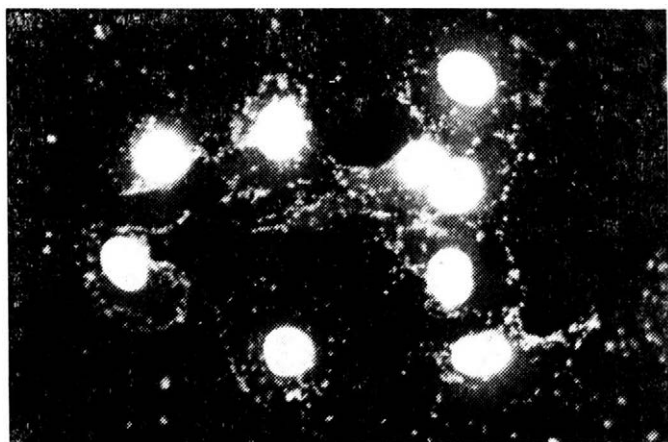


5. Morfologické změny vyvolané *A. laidlawii* v kulturách MDBK (barveno HE) — Morphological changes caused by *A. laidlawii* in the MDBK cultures (stained with HE)



6. Fluoreskující buněčná jádra ve sterilních kulturách (barveno bisbenzimidem) — Fluorescent cellular nuclei in sterile cultures (stained with bisbenzimid)





7. Pozitivní fluorescen-
ce v cytoplasmě konta-
minovaných buněk (bar-
veno bisbenzimidem) —
Positive fluorescence in
the cytoplasm of con-
taminated cells (stained
with bisbenzimid)

tur byly pozorovány pouze na konci stacionární fáze jako důsledek rychlého poklesu pH kultivačního média.

Specifické morfologické změny byly v tomto období detekovány pouze cytologickým vyšetřením. V kulturách infikovaných buněk se vyskytovalo množství bazofilních zrn lokalizovaných na povrchu buněk i kultivačního skla (obr. 1, 2).

Morfologické změny byly doprovázeny i poklesem růstové aktivity kultur. Původní populace buněk, dobře se množící a tvořící monolayer o vysoké denzitě, byla během dalších deseti pasáží vystřídána buňkami s nízkou schopností adheze po trypsinaci a nerovnoměrným růstem (tab. I). Proliferační indexy kontaminovaných buněk klesly ve srovnání s indexy buněk infekce prostých průměrně o 50 % (obr. 3).

Výrazné morfologické změny specifické pro mykoplazmovou infekci se v rostoucích kulturách objevily teprve mezi 25. až 30. pasáží, v době masivní infekce linií. Již za 20 až 24 hodiny po nasazení ztratily buňky typickou morfolologii a získaly protáhlý špičatý tvar. Část tvořila dlouhé cytoplazmatické výběžky a v jejich cytoplasmě byla pozorována tmavá granula (obr. 4, 5). V konfluentních kulturách vznikla třetí až pátý den kultivace ložiska kulatých buněk, přecházející rychle ve specifický cytopatický efekt a končící v některých případech úplnou degeneraci kultur.

Stupeň morfologických změn byl přímo úměrný zvýšené utilizaci ^{14}C glukózy a inhibici inkorporace ^3H leucinu (tab. II).

DETEKCE MYKOPLAZMAT

Rozvoj kontaminace v kulturách bylo možné sledovat fluorescenční metodou. Metoda je založena na vysoké afinitě bisbenzimidu k desoxyribonukleové kyselině a umožňuje vizualizovat DNA všech druhů mykoplazmat.

Na rozdíl od kultur sterilních, ve kterých fluoreσκοvala pouze buňčná jádra (obr. 6), byla v infikovaných kulturách pozorována granulární fluorescenční v rozsahu celé buňky (obr. 7).

Množství fluoreσκοujících bodů se měnilo v závislosti na rozvoji infekce. Zatímco ještě v desáté pasáži byla oblast cytoplazmy převážně

většiny buněk negativní a fluorescenčně pozitivní buňky byly v kulturách zjišťovány pouze ojediněle, byla ve 20. pasáži kontaminace buněk již 100%. Počet fluoreskujících bodů, které byly na začátku infekce lokalizovány především na obvodu buněk, se další kultivací rychle zvyšoval, takže ve 25. pasáži již pokrývaly podstatnou část povrchu buněk. Od 15. pasáže byla mykoplazmata v kulturách prokazována i kultivačně. Později byla infekce identifikována jako *M. arginini* a *A. laidlawii*.

DISKUSE

Na význam latentních infekcí při kultivaci buněk ukázaly již naše předcházející práce, ve kterých jsme prokázali, že růst buněčných kultur a jejich morfologii významně ovlivňuje endogenní virová infekce (Menšík aj., 1979; Machatková aj., 1981, 1982).

Z uvedených výsledků je zřejmé, že také mykoplazmová infekce působí na biologické vlastnosti buněk kultivovaných *in vitro*.

Shodně s dalšími autory (Barile, 1979, 1981; Adams, 1983; Rakovská aj., 1983) jsme pozorovali negativní vliv mykoplazmat na buněčnou morfologii, metabolismus a růst. *M. arginini* a *A. laidlawii* signifikantně snížily proliferační aktivitu kontinuálních linií bovinních ledvin MDBK a AUBEK i opičích ledvin VERO a vyvolaly v nich specifické morfologické změny.

Nástup těchto změn však byl podmíněn určitou koncentrací mikroorganismů v kulturách; specifické projevy infekce byly pozorovány až v době intenzivního rozvoje kontaminace.

Předpokladem toho, že bude dosaženo standardní kvality kontinuálních linií, je proto pravidelná kontrola kultur na mykoplazmata, umožňující detekovat kontaminaci již ve stadiu latence.

Pro tyto účely se osvědčil nepřímý průkaz mykoplazmat fluorescenční metodou, která byla modifikována na časově nenáročný a metodicky jednoduchý test. Fluorescenční metodou byla prokazována infekce již v době, kdy počet infikovaných buněk v kulturách byl relativně nízký.

Vysokou citlivost metody potvrdili i Barile (1981) a Stanbridge (1981). Naproti tomu Marcus aj. (1980) a McGarrity (1982) považují za rozhodující kritérium sterility kultur metodu kultivační. Také v našich pokusech byly kultury vedle fluorescenčního vyšetření testovány i kultivačně, přičemž získané výsledky byly ve všech případech shodné. Na základě zkušeností s použitím obou metod se proto domníváme, že detekce mykoplazmat fluorescenční metodou je pro svoji citlivost, univerzálnost i časovou nenáročnost významným přínosem pro virologická pracoviště i laboratoře tkáňových kultur. Umožňuje pravidelnou kontrolu buněčných linií a spolu s metodou kultivační zajišťuje trvalou sterilitu kultur, která je nezbytným předpokladem jejich vysoké kvality.

Literatura

- ADAMS, R.: Metody kultury kletok dlja biochimikov. Moskva, Mir 1983. 263 s.
BARILE, M. F.: Mycoplasma contamination of cell cultures: incidence, source, origin, prevalence, spread, prevention and problems of elimination. In: Kruse, P. F.

- Patterson, M. K.: Methods and applications of tissue culture. New York, Academic Press 1973, s. 729-734.
- BARILE, M. F.: Mycoplasma contamination of cell cultures: a status report. In: Action, R. (Ed.): Cell cultures and its applications. New York, Academic Press 1977, s. 291-334.
- BARILE, M. F.: Mycoplasma-tissue cell interactions. In: Barile, M. F. — Razin, S. — Tully, S. G. — Whitcomb, R. F.: The mycoplasmas. New York, Academic Press 1979, s. 425-474.
- BARILE, M. F.: Mycoplasma infections of cell cultures. Israel med. Sci., 17, 1981, s. 555-562.
- DJAKONOV, L. P. — POZDNJAKOV, A. A. — GOLOLOBOVA, G. A. — GRICENKO, V. V. — SUCHAREVA, N. N. — GORBATOV, V. A. — NADTOČEJ, G. A.: Metodickéskije rekomendacii po diagnostike mikoplazma-kontaminacii i dekontaminacii kletočnych kultur. Moskva, Metodickéskije rekomendacii VIEV 1980.
- EDWARD, D. G.: Mycoplasmas as contaminants and their detection. Progr. immunobiol. Stand., 3, 1969, s. 17-22.
- FOGH, J.: Contamination in tissue culture. New York, Academic Press 1973. 288 s.
- GOLOLOBOVA, M. T.: Metody citologického kontrolja perevivajemych kletok. Bjull. Vsesojuz. Inst. eksp. Veter., 33, 1978, s. 22-25.
- CHEN, T. R.: In situ detection of mycoplasma contamination in cell cultures by fluorescent Hoechst 33258 stain. Exp. Cell Res., 104, 1977, s. 255-262.
- JURMANOVÁ, K. — MACHATKOVÁ, M. — HÁJKOVÁ, M. — ČERNÁ, J. — CHLUPOVÁ, L.: Detekce mykoplazmat v buněčných kulturách. [Výzkumná zpráva.] Brno, Výzkumný ústav veterinárního lékařství 1983. 50 s.
- MACHATKOVÁ, M. — MENŠÍK, J. — ROZKOŠNÝ, V.: Růst fetálních bovinních buněk po intrauterinní virové infekci plodů. Veter. Med. (Praha), 26, 1981, s. 525-532.
- MACHATKOVÁ, M. — MENŠÍK, J. — ROZKOŠNÝ, V. — POSPÍŠIL, Z.: Vliv intrauterinní virové infekce na buňky a tkáně hovězích fetů kultivované *in vitro*. Acta veter. (Brno), 5, 1982, s. 67-68.
- MARCUS, M. — LAVI, V. — NATTENBERG, A. — ROTTEM, S. — MARKOWITZ, O.: Selective killing of mycoplasmas from contaminated mammalian cells in cell cultures. Nature, 285, 1980, s. 659-661.
- McGARRITY, G. J. — MURPHY, D. G. — NICHOLS, W. W.: Mycoplasma infection of cell culture. New York, Plenum Press, 3, 1978. 342 s.
- McGARRITY, G. J.: Detection of mycoplasmal infection of cell cultures. Cell Cult., 2, 1982, s. 99-131.
- MENŠÍK, J. — MACHATKOVÁ, M. — POSPÍŠIL, Z. — HOLUB, A. — ROZKOŠNÝ, V. — MACHATÝ, J. — VLČEK, Z.: Ontogenetické změny fetálních bovinních buněk a tkání po virové infekci. [Výzkumná zpráva.] Brno, Výzkumný ústav veterinárního lékařství 1979. 39 s.
- O'BRIEN, S. J. — SIMONSON, J. M. — GRABOWSKI, M. V. — BARILE, M. F.: An analysis of multiple isoenzyme expressions among 22 species of *Mycoplasma* and *Achdeplasma* X. J. Bact., 146, 1981, s. 222-225.
- RAKOVSKAJA, I. V. — MILLER, G. G. — JAGUŽINSKAJA, O. E.: Povedenije mikoplazm v kulture perevivajemych kletok počki embriona ovcy producirujuščich virus lejkoza. Vopr. Virusol., 6, 1983, s. 737-740.
- ROZKOŠNÝ, V. — HAMPL, J. — MENŠÍK, J.: Metody stimulace krevních a tkáňových lymfocytů k hodnocení imunologické vybavenosti telat. [Výzkumná zpráva.] Brno, Výzkumný ústav veterinárního lékařství 1979. 35 s.
- RUSSELL, C. W. — NEWMAN, C. — WILLIAMSON, D. H.: A simple cytochemical technique for demonstration of DNA in cells infected with mycoplasmas and viruses. Nature, 253, 1976, s. 461-462.
- SCHNEIDER, E. L. — STANBRIDGE, E. J. — EPSTEIN, C. J.: Incorporation of ³H-uridine and ³H-uracil into RNA — a simple technique for the detection of mycoplasma contamination of cultured cells. Exp. Cell Res., 84, 1974, s. 311-318.
- STANBRIDGE, E. J.: Mycoplasma detection — an obligation to scientific accuracy. Israel J. med. Sci., 17, 1981, s. 563-568.

Došlo dne 15. 8. 1985

МАХАТКОВА, М. — ЮРМАНОВА, К. — ГАМПЛ, Я. — ШНЕЙДАР, В. (Научно-исследовательский институт ветеринарии, Брно; Научно-исследовательский институт гематологии и эпидемиологии, Прага): *Спонтанное заражение клеточных линий микоплазмами и его определение флюоресцентным методом*. Veter. Med. (Praha), 31, 1986 (8) : 477-485.

Непрерывные клеточные линии бычьих почек MDBK и AUBEK, а также обезьяньих почек VERO, в ходе долгосрочного культивирования спонтанно заразились микоплазмами *M. arginini* и *A. laidlawii*. Микоплазмозная инфекция достоверно понизила ростовую активность клеток и отрицательно сказалась на их морфологии. Для установления инфекции хорошо себя зарекомендовал метод косвенного доказательства микоплазм бисбензими́дом Гёхст, причем этот метод был модифицирован на простой и быстрый тест, который позволил установить и начальную стадию инфекции еще при относительно низком количестве содержащихся в культуре зараженных клеток.

непрерывные клеточные линии; загрязнение; флюоресцентный тест

MACHATKOVÁ, M. — JURMANOVÁ, K. — HAMPL, J. — ŠNEJDAR, V. (Veterinary Research Institute, Brno; Research Institute of Hematology and Epidemiology, Praha): *Spontaneous Infection of Cellular Lines by Mycoplasmas and its Detection by a Fluorescent Method*. Veter. Med. (Praha), 31, 1986 (8) : 477-485.

The continual cellular lines of bovine kidneys MDBK and AUBEK and of monkey kidneys VERO were infected spontaneously in the course of long-range cultivation by the mycoplasmas *M. arginini* and *A. laidlawii*. The mycoplasmic infection reduced significantly the growth activity of the cells and influenced negatively their morphology. The method of an indirect proof of mycoplasmas by bisbenzimid Hoechst suited well to demonstrate the infection; it had been modified to a simple and rapid test. The starting infection could be demonstrated already at the time when the amount of infected cells in the culture was relatively low.

continual cellular lines; contamination; fluorescent test

MACHATKOVÁ, M. — JURMANOVÁ, K. — HAMPL, J. — ŠNEJDAR, V. (Forschungsinstitut für Veterinärmedizin, Brno; Forschungsinstitut für Hämatologie und Bluttransfusion, Praha): *Spontane Infektion von Zelllinien durch Mykoplasmen und ihre Detektion mittels Fluoreszenzmethode*. Veter. Med. (Praha), 31, 1986 (8) : 477-485.

Kontinuierliche Zelllinien der Rindernieren MDBK und AUBEK sowie Affennieren VERO wurden im Verlauf einer langfristigen Kultivierung durch Mykoplasmen *M. arginini* und *A. laidlawii* spontan infiziert. Die mykoplasmatische Infektion setzte die Wachstumsaktivität der Zellen stark herab und bewirkte negativ ihre Morphologie. Für den Nachweis der Infektion bewährte sich die Methode des indirekten Nachweises von Mykoplasmen mittels Bisbenzimid Hoechst, die zu einem einfachen und raschen Test modifiziert wurde. Auf diese Weise wurde es möglich, selbst eine beginnende Infektion zum Zeitpunkt nachzuweisen, wo die Menge der infizierten Zellen in der Kultur noch relativ gering war.

kontinuierliche Zelllinien; Kontamination; Fluoreszenztest

Adresy autorů:

Ing. Marie Machatková, CSc., RNDr. Květa Jurmanová, CSc., RNDr. Jaroslav Hampl, CSc., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32 Brno

MVDr. Vítězslav Šnejdar, Vojenský ústav hematologie, epidemiologie a mikrobiologie, U nemocnice 1, 120 00 Praha

200. výročí Vysoké školy veterinární v Budapešti

Jak jsme již oznámili v jednom z předchozích čísel Veterinární medicíny, Vysoká škola veterinární v Budapešti oslaví ve dnech 25. až 29. května 1987 200. výročí začátku veterinárního školství v Maďarsku.

Při oslavách budou uspořádány konference u kulatého stolu, panelové přednášky a výstava nástrojů a léčiv z těchto tematických okruhů: fyziologie, morfologie, patologie, epizootologie a mikrobiologie, farmakologie, toxikologie, klinická medicína, zdravotní problémy volně žijících zvířat a zvířat chovaných v zoologických zahradách. Přihlášku na oslavy, popřípadě i téma krátkého referátu (10 minut) nebo panelové přednášky sdělte nejpozději do 31. ledna 1987 předsedovi organizačního výboru.

Adresa předsedy organizačního výboru: prof. dr. Gy. Petthes, Budapest VII, Landler J. u. 2, P. O. Box 2, H-1400 Budapest; telefon 223-044 nebo 222-660, linka 131; telex 224439.

DETEKCE PROTILÁTEK PROTI MYKOPLAZMATŮM ENZYMOIMUNOLOGICKOU METODOU

M. Hájková, K. Jurmanová

HÁJKOVÁ, M. — JURMANOVÁ, K. (Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno): *Detekce protilátek proti mykoplazmatům enzymoimunologickou metodou*. Veter. Med. (Praha), 31, 1986 (8) : 487-496.

Detekce protilátek proti druhu *Mycoplasma bovis* v séru a mléce dojníc ze stáda s výskytem mastitid je dobrým příkladem využití imunoenzymologické metody (ELISA) v mykoplazmologii. Vyšetřením vzorků od 75 dojníc a současně také testem nepřímé hemaglutinace jsme stanovili dobrou korelaci výsledků získaných oběma testy. Protilátky proti druhu *Ureaplasma diversum* jsme metodou ELISA prokázali jak v séru skotu, tak v mléce dojníc s mírnými mastitidami. Ze čtyř antigenů připravených z různých kmenů *U. diversum* jsme vybrali ten, který ve vybraných vzorcích sér detekoval maximální titry. Králičí hyperimunní séra, vyrobená proti 26 kmenům mykoplazmat různých druhů, byla (po odstranění protilátek proti komponentám média) použita k identifikaci dvou antigenů. Specifická reakce byla získána s antiséry proti *M. hyorhinis* a *M. arginini*.

průkaz protilátek proti mykoplazmatům a ureaplazmatům; srovnání metody ELISA a nepřímé hemaglutinace; identifikace antigenů pomocí hyperimunních králíčích sér

Úloha mykoplazmat při vzniku a průběhu nemocí hospodářských zvířat v intenzivní produkci roste, jak se získávají nové poznatky pomocí dokonalejších metod jejich studia (Tully a Whitcomb, 1979). Mykoplazmata jsou mikroorganismy o velikosti středně velkých virů a parazitují na buňkách živočichů, rostlin a hmyzu. Název je obecně užíván pro všechny čeledi a rody řazené do třídy *Mollicutes* — jako *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Spiroplasma* atd. Některé druhy jsou obávanými patogeny. K antibiotikům jsou mykoplazmata většinou necitlivá a používání vakcín je problematické. Jejich diagnostika je založena na kultivačních metodách, které jsou většinou málo citlivé, a na nepřímém průkazu pomocí specifických protilátek (Cassell aj., 1984).

V našich předchozích pracích jsme vyhodnocovali citlivost a specifitu sérologických testů pro detekci protilátek proti mykoplazmatům u skotu a jako vhodný jsme vybrali test nepřímé hemaglutinace (Jurmanová aj., 1976, 1978, 1979). Přesto, že test nepřímé hemaglutinace je považován za citlivý, spolehlivý a specifický (Ernø, 1974; Cho aj., 1976), nemohl jsme jím v některých případech prokázat protilátky v krevních serech skotu, především proti ureaplazmatům. Metoda ELISA (Bruggmann aj., 1977; Engvall a Perlmann, 1972) byla popsána mnoha autory jako vysoce citlivá a snadno proveditelná

i pro detekci protilátek proti mykoplazmatům (Voller aj., 1976; Onoviran a Taylor — Robinson, 1979; Boothy aj., 1981; Ort Mayer aj., 1982 a další). Pro eradikaci respirační mykoplazmózy myši a krys se již komerčně vyrábí diagnostická souprava na principu metody ELISA (Mia aj., 1981).

Cílem této práce je ukázat na příkladech možnosti využití metody ELISA pro nepřímou evidenci výskytu mykoplazmat a ureaplazmat v populaci skotu i pro identifikaci mykoplazmového antigenu pomocí specifických králičích protilátek a současně porovnat výsledky vyšetření protilátek v krevním séru a v mléce skotu, získané metodou ELISA a nepřímou hemaglutinací.

MATERIÁL A METODY

METODA ELISA

Pracovali jsme podle postupu, který byl podrobně popsán dříve (Jurmanová aj., 1985). Antigeny, které byly získány odstředěním kultury mykoplazmat z tekuté kultivační půdy a dezintegrovány ultrazvukem, byly uchovávány jednak zmrazené při teplotě -20°C , jednak v lyofilizovaném stavu. Výsledky byly odečítány buď vizuálně podle intenzity zabarvení substrátu ve srovnání s negativní kontrolou, nebo spektrofotometricky na přístroji Titertek Multiskan (Flow Laboratories) při vlnové délce 492 nm. Jako pozitivní byly hodnoceny vzorky s dvojnásobnou hodnotou absorpance negativního kontrolního vzorku.

TEST NEPŘÍMÉ HEMAGLUTINACE (NHT)

Pro srovnání uvádíme výsledky vyšetření obsahu protilátek testem NHT, jehož provedení jsme popsali dříve (Jurmanová aj., 1978).

VYŠETŘENÍ PROTILÁTEK PROTI DRUHU *MYCOPLASMA BOVIS*

Použili jsme vzorky krevních sér a mléka odebírané od krav pocházejících z mastitidního stáda, které nám byly předány v rámci spolupráce s dr. H. Pfütznem z Institut für bakterielle Tierseuchenforschung, Jena, DDR. Jako antigen byl použit typový kmen *M. bovis* PG 45.

VYŠETŘENÍ PROTILÁTEK PROTI DRUHU *UREAPLASMA DIVERSUM*

Antigeny

Pro detekci protilátek ve vzorcích krevních sér a mléka jsme připravili čtyři antigeny:

- A — kmen izolovaný z inseminační dávky spermatu býka ABE 57,
- B — kmen izolovaný z ejakulátu býka vyšetřovaného ve VÚVeL pod číslem 409,
- C — kmen izolovaný z nosního výtěru telete s onemocněním respiračního traktu z lokality Ko.,
- D — kmen izolovaný z nosního výtěru telete s onemocněním respiračního traktu z lokality Vl.

Séra telat

Pro vyšetření bylo vybráno 30 krevních sér z lokality Uj. a 14 krevních sér z lokality Ko. V obou lokalitách probíhalo onemocnění respiračního traktu. U všech testovaných telat jsme provedli kultivační vyšetření nosních výtěrů a ze 73 % vzorků jsme izolovali kmeny *M. bovirhinis* a *U. diversum*. Protilátky jsme vyšetřovali antigeny C a D.

STANOVENÍ POTENCE ANTIGENŮ

U antigenů A, B, C, D jsme stanovili výšku titru protilátek v jednotném ředění všech testovaných krevních sér, a to v ředění 1 : 80. Použili jsme těchto vzorků krevních sér: dvě séra telat z lokality Uj. a dvě séra telat z lokality Ko., která jsme již popsali, dále dvě séra býků s poruchou reprodukce z lokality Ho. a dvě séra krav s onemocněním genitálního traktu a výtokem z vagin z lokality Li.

Vzorky mléka

Pro stanovení protilátek proti druhu *U. diversum* jsme vybrali 57 vzorků mléka z lokalit Bo., Ne. a Kl., ve kterých se vyskytovaly klinické a subklinické záněty mléčné žlázy a u kterých nebylo prokázáno infekční agens. Vzorky nám byly předány dr. D. Ryšánkem z VÚVeL v Brně. Protilátky jsme stanovili antigenem B. Mléko jsme vyšetřovali ve zředění 1 : 20 až 1 : 2560.

IDENTIFIKACE ANTIGENŮ KRÁLÍČÍMI HYPERIMUNNÍMI SÉRY

Pro demonstraci jsme použili antigeny připravené z kmenů mykoplazmat, které jsme ve spolupráci s dr. P. Dráberem z UMG ČSAV v Praze (Dráber a Jurmanová, 1984) izolovali z hybridomních linií produkujících protilátky. Při jednorázovém vyšetření 12 vzorků linií jsme izolovali dva kmeny mykoplazmat. Z nich jsme připravili antigeny, které jsme v testu ELISA použili k identifikaci některých monoklonálních protilátek vyprodukovaných testovanými liniemi. Metodou ELISA jsme také identifikovali neznámé antigeny pomocí specifických králíčích protilátek. K identifikaci antigenů byla použita králíčí hyperimunní krevní séra proti 12 typům kmenů druhů mykoplazmat skotu, vyrobená v naší laboratoři, a 16 antisér proti druhům mykoplazmat člověka, drůbeže, myši, koně a prasat, která nám poskytl MVDr. F. Kukša z VÚVeL v Brně. Z králíčích hyperimunních sér byly před použitím v metodě ELISA odstraněny nespecifické protilátky, vytvořené proti komponentám kultivačního média, způsobem popsaným dříve (Jurmanová aj., 1976).

VÝSLEDKY

POROVNÁNÍ VÝSLEDKŮ VYŠETŘENÍ OBSAHU PROTILÁTEK METODOU ELISA A NHT

Výsledky vyšetření obsahu protilátek proti druhu *M. bovis* ve vzorcích krevních sér a mléka od krav pocházejících ze stáda s výskytem mastitidy jsou uvedeny v tab. I. Titry v krevním séru krav stanovené metodou ELISA se pohybovaly od 1 : 200 do 1 : 102 400 a v mléce od 0 do 1 : 25 600. Titry protilátek stanovené testem NHT byly v krevních sérech od 1 : 32 do 1 : 16 384 a v mléce od 0 do 1 : 8192. Z porovnání výšky titrů protilátek získaných oběma testy je zřejmé, že titry v testu ELISA jsou vyšší, v některých případech dosahují až padesátinásobně vyšší hodnoty. Korelace titrů získaných metodou ELISA a NHT je znázorněna na obr. 1, na kterém jsou uvedeny výsledky vyšetření 75 vzorků krevních sér a mléka dojníc z téhož stáda. Je zřejmé, že výsledky získané oběma testy vzájemně dobře korelují, což potvrzuje vypočtený korelační koeficient $r = 0,84$.

STANOVENÍ PROTILÁTEK PROTI DRUHU *UREAPLASMA DIVERSUM*

Vyšetření vzorků krevních sér telat

Metodou ELISA jsme vyšetřili 44 vzorky krevních sér telat z lokalit s onemocněním respiračního traktu. Použili jsme antigeny C a D, připravené z kmenů izolovaných z nosních výtěrů telat. Ve vzorcích krevních

I. Titry protilátek proti *Mycoplasma bovis* v mléce a séru dojníc, stanovené metodou ELISA a testem nepřímé hemaglutinace (NHT) — The titres of antibodies to *Mycoplasma bovis* in the milk and serum of dairy cows, determined by the ELISA method and by the indirect hemagglutination test (NHT)

Číslo dojnice	Datum odběru	Sérum		Mléko		Klinická* mastitida	Izolace* <i>M. bovis</i>
		ELISA	NHT	ELISA	NHT		
7030	8. 8.	25 600 ⁺	2 048	0	0	+	+
	3. 10.	25 600	2 048	200	64		
	9. 1.	102 400	16 384	12 800	16	+	+
7389	8. 8.	12 800	2 048	0	16	+	+
	7. 11.	25 600	512	25 600	8192		
	13. 2.	800	256	0	0		
7376	8. 8.	1 600	128	0	0	0	+
	7. 11.	800	128	0	0		
	9. 1.	800	128	0	0		
7083	8. 8.	51 200	2 048	400	32	0	+
	7. 11.	51 200	2 048	200	16		
	13. 2.	51 200	2 048	100	16		
7322	8. 8.	3 200	512	8		0	0
	7. 11.	800	512	0	0		
	9. 1.	800	512	0	0		
7996	8. 8.	1 600	64	0	0	0	0
	5. 12.	800	32	0	0		
	13. 2.	800	32	0	0		

* = tato zjištění nejsou vázána na uvedená data odběrů, ale byla získána v průběhu sledování dojnice

+ = titer protilátek

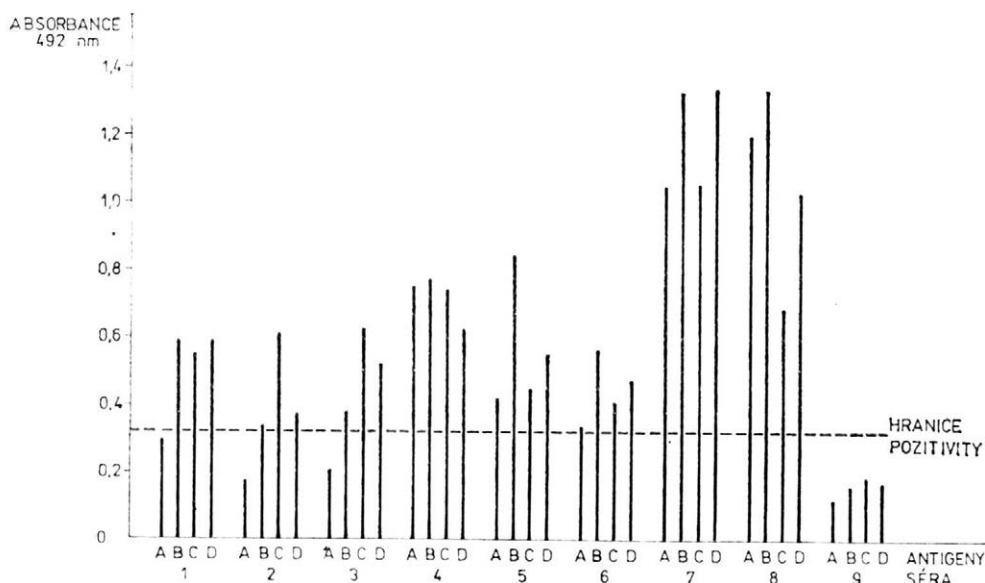
sér jsme našli titry protilátek od 0 do 1 : 360, ale výsledky získané dvěma antigeny se různily ve výšce titru.

Stanovení potence antigenů

Na základě vyšetření devíti vzorků krevních sér pocházejících z telat býků a krav jsme srovnáním výšky titrů zjistili, že antigen B je nejvhodnější pro vyšetření protilátek, neboť v pěti případech z osmi dosáhl maximálního titru (obr. 2).

Průkaz protilátek ve vzorcích mléka

V tab. II jsou shrnuty výsledky vyšetření vzorků mléka pocházejících ze tří lokalit antigenem B. Z celkového počtu 57 vzorků nebyly protilátky nalezeny u 12 vzorků. Nejčastěji se protilátky vyskytovaly v titrech 1 : 40, 1 : 80 a 1 : 160, celkem u 33 vzorků. Titr 1 : 2560 byl nalezen ve třech případech.



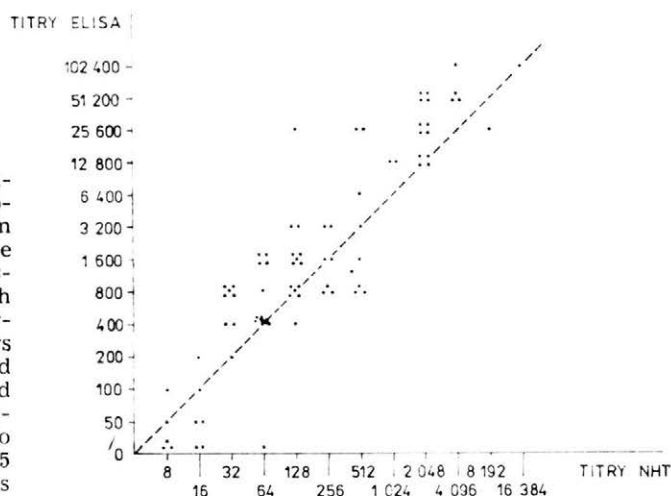
1. Stanovení potence antigenů *Ureaplasma diversum* — Determination of the potency of antigens to *Ureaplasma diversum*

Vysvětlivky: A = kmen ABE — izolovaný z inseminační dávky spermatu býka
 B = kmen 409 — izolovaný z ejakulátu býka
 C = kmen Ko 7 — izolovaný z nosního výtěru telete
 D = kmen Vl 1 — izolovaný z nosního výtěru telete

Testovaná séra: 1 = tele Uj 57644
 2 = tele Uj 57753
 3 = tele Ko 11935
 4 = tele Ko 11937
 5 = býk Ho 28
 6 = býk Ho 99
 7 = kráva Li 9
 8 = kráva Li 13
 9 = kontrolní negativní sérum

Hodnoty absorbance byly měřeny v sérech ředěných 1 : 80

2. Korelace titrů protilátek stanovených metodou ELISA a testem nepřímé hemaglutinace (NHT) proti *Mycoplasma bovis* v 75 vzorcích séra a mléka — Correlations of the titers of antibodies determined by the ELISA method and by indirect hemagglutination test to *Mycoplasma bovis* in 75 serum and milk samples



II. Protilátky proti *Ureaplasma diversum* v mléce dojnic ze tří lokalit — The antibodies to *Ureaplasma diversum* in the milk of dairy cows coming from three localities

Výška titru	Lokalita			Celkem
	Bo	Ne	Kl	
0	3 ⁺	7	2	12
20	1	4	0	5
40	2	2	4	8
80	5	2	6	13
160	8	0	4	12
320	0	1	0	1
640	0	1	2	3
1280	0	0	0	0
2560	0	1	2	3
Vzorů celkem	19	18	20	57

+ = číslo vyjadřuje počet vzorků mléka s uvedeným titrem

III. Identifikace antigenů pomocí specifických králičích protilátek — Identification of the antigens by means of specific rabbit antibodies

Typ protilátky	Antigeny			
	č. 100	č. 101	<i>M. hyorhinis</i> TR-32	<i>M. arginini</i> G230
Monoklonální:				
E ascit	327 680 ⁺	0	655 360	0
B ascit	320	0	320	0
O ascit	1 310 720	0	1 310 720	0
F ascit	640	0	1 204	0
L ascit	160	80	320	160
I medium	640	0	1 280	0
Králičí proti kmenu:++				
<i>M. arginini</i> G230	0	1600	0	12 800
<i>M. hyorhinis</i> BTS-7	12 800 ⁺⁺⁺	0	12 800	0
<i>M. hyorhinis</i> K 121	12 800	0	12 800	0
<i>M. hyorhinis</i> TR-32	12 800	0	12 800	0
<i>M. hyorhinis</i> NI 6	12 800	0	12 800	0

+ = titr protilátek

++ = bylo testováno celkem 28 antisér proti typovým kmenům různých druhů mykoplazmat; kromě uvedených výsledků byly ostatní výsledky negativní

+++ = výše nebylo testováno

V tab. III jsme uvedli pozitivní výsledky testování antigenů proti monoklonálním protilátkám a králičím protilátkám proti kmenům různých druhů mykoplazmat. Výsledky testů s monoklonálními protilátkami ukázaly, že antigeny č. 100 a 101 se podílely na jejich vzniku. Některé monoklonální protilátky reagovaly pozitivně s typovými kmeny druhu *M. hyorhinis* a *M. arginini*.

Použitím specifických králičích protilátek jsme prokázali, že antigen č. 100 je kmen druhu *M. hyorhinis* a antigen č. 101 je kmen druhu *M. arginini*.

DISKUSE

Pro demonstraci využití metody ELISA v mykoplazmologii jsme použili jednak příklady nepřímého důkazu výskytu mykoplazmat v chovech skotu, jednak možnost použití hyperimunních králičích sér k identifikaci neznámého antigenu. V současné době je již vyvrácen názor na neomylnost kultivačních metod pro nález mykoplazmat v hostiteli a průkaz specifických protilátek je považován za samozřejmou součást komplexního mykoplazmologického vyšetření (Cassell aj., 1984). Zabývali jsme se volbou vhodných metod pro průkaz specifických protilátek a na základě srovnání sedmi sérologických metod na souboru hyperimunních králičích sér jsme vyvolili test nepřímé hemaglutinace (Jurmanová aj., 1976), který jsme pak prověřili pro stanovení protilátek v hostiteli (Jurmanová, 1978). Podle četnosti výskytu druhů mykoplazmat skotu, které jsme izolovali ze skotu v ČSSR, jsme připravili antigeny pro sérologické studie (Jurmanová aj., 1979, 1982).

Abychom mohli správně interpretovat nálezy protilátek proti jednotlivým druhům mykoplazmat v krevním séru jednoho hostitele, studovali jsme výskyt společných antigenů mezi jednotlivými druhy mykoplazmat skotu (Jurmanová aj., 1976), obdobně jako jiní autoři (Nicolet aj., 1980; Boothby aj., 1983; Minion aj., 1983; Opitz aj., 1983 a další). Srovnáváním citlivosti a specifity testů nepřímé hemaglutinace a ELISA pro průkaz protilátek v krevních sérech a v mléce skotu proti druhu *M. californicum* a *M. bovis genitalium* jsme se zabývali v naší předchozí práci (Jurmanová aj., 1985). V naší současné práci jsme na základě srovnání nálezů protilátek proti druhu *M. bovis* v krevním séru a v mléce dojníc stanovili, že výsledky získané oběma testy dobře korelují a že metoda ELISA je citlivější a snadnější.

Problémem detekce protilátek proti druhu *Ureaplasma diversum* je volba vhodného antigenu, neboť na základě nedávných studií DNA a polypeptidů obsahuje tento druh tři skupiny kmenů, které mohou být dále děleny sérologickými metodami (jako např. metabolismus inhibičním testem), využívajícími antigeny produkované živými ureaplazmaty do prostředí (Howard, 1984). Metodou ELISA se pracuje s antigeny připravenými z lyzovaných buněk, což znamená, že obsahují směs antigenů povrchových a vnitřních. Brown aj. (1983), kteří použili lyzovaný antigen druhu *Ureaplasma urealyticum* pro detekci protilátek u pacientů s negonokokovou uretritidou, považují metodu ELISA za výhodnou vzhledem k možnosti zachytu širokého spektra antigenů proti

metabolismus inhibičnímu testu, v němž reagují pouze jednotlivé sérovary. V naší laboratoři v současné době volíme vhodný antigen na základě výsledků titrace stanoveného souboru vzorků, což se osvědčilo, neboť se nám podařilo detekovat protilátky proti *U. diversum* v mléce dojníc z různých chovů, jak o tom referujeme v této práci, a také sledovat vzplanutí mastitidy v jedné lokalitě [Jurmanová aj., v tisku].

Identifikaci dvou neznámých antigenů metodou ELISA jsme uvedli jednak jako příklad dalšího možného využití tohoto testu v mykoplazmologii, jednak jako důkaz specifity testu. Ze 26 použitých hyperimunních králíčích sér reagovala pouze séra proti druhu *M. hyorhinis* a *M. arginini*. Předpokladem specifické reakce je odstranění nespecifických protilátek proti komponentám médií používaným pro kultivaci kmenů mykoplazmat [Jurmanová aj., 1976].

Literatura

- BOOTHBY, J. T. — JASPER, D. E. — ROLLINS, M. T. — THOMAS, C. B.: Detection of *Mycoplasma bovis* specific IgG in bovine serum by enzyme-linked immunosorbent assay. Amer. J. veter. Res., 42, 1981, s. 1242-1247.
- BOOTHBY, J. T. — JASPER, D. E. — ROLLINS, M. T.: Characterization of antigens from mycoplasmas of animal origin. Amer. J. veter. Res., 44, 1983, s. 433-439.
- BROWN, M. B. — CASSELL, G. H. — TAYLOR-ROBINSON, D. — SHEPARD, M. C.: Measurement of antibody to *Ureaplasma urealyticum* by an enzyme-linked immunosorbent assay and detection of antibody responses in patients with non-gonococcal urethritis. J. clin. Microbiol., 17, 1983, s. 288-295.
- BRUGGMANN, S. — KELLER, H. — BERTSHINGER, H. U.: Quantitative detection of antibodies to *Mycoplasma suisneumoniae* in pigs' sera by an enzyme-linked immunosorbent assay. Veter. Rec., 101, 1977, s. 109-111.
- CASSELL, G. H. — DAVIS, J. K. — COX, N. R. — DAVIDSON, M. K. — LINDSEY, J. R.: *Mycoplasma pulmonis* detection in rodents: lessons for diagnosis in other species. Israel J. med. Sci., 20, 1984, s. 859-865.
- DRÁBNER, P. — JURMANOVÁ, K.: Myši lymfocytární hybridom produkující protilátku proti mykoplazmatům druhu *Mycoplasma hyorhinis*. Přihláška vynálezu 1984.
- ENGVAL, E. — PERLMANN, P.: Enzyme-linked immunosorbent assay. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labelled antiimmunoglobulin in antigen coated tubes. J. Immunol., 109, 1972, s. 129-135.
- ERNØ, H.: Bovine mycoplasmas. Theses. Inst. of Med. Microbiol., University of Aarhus 1974. 95 s.
- HOWARD, C. J.: Animal ureaplasmas: their ecological niche and role in disease. Israel J. med. Sci., 20, 1984, s. 954-957.
- CHO, H. J. — RUHNKE, H. L. — LANGFORD, E. V.: The indirect hemagglutination test for the detection of antibodies in cattle naturally infected with mycoplasmas. Can. J. comp. Med., 40, 1976, s. 20-29.
- JURMANOVÁ, K. — HÁJKOVÁ, M. — ASMEROVÁ, D.: The use of ELISA for detection of antibodies against mycoplasmas and ureaplasmas in milk of mastitic cows. Arch. exp. Veter.-Med. (v tisku).
- JURMANOVÁ, K. — HÁJKOVÁ, M. — ČERNÁ, J.: Serological studies of bovine mycoplasmas. I. Diagnostic value of seven tests. II. Determination of taxonomical relatedness by means of seven tests. Zbl. Veter.-Med., R. B, 23, 1976, s. 49-65.
- JURMANOVÁ, K. — HÁJKOVÁ, M. — ČERNÁ, J.: The detection of mycoplasmas in bovine populations by indirect evidence. Rev. inf. Dis., 4, 1982, s. 272-273.
- JURMANOVÁ, K. — HÁJKOVÁ, M. — ČERNÁ, J. — JIRÁNEK, E.: Průběh mastitid u krav infikovaných do mléčné žlázy kmeny *Mycoplasma bovis* a *M. arginini*. Veter. Med. (Praha), 23, 1978, s. 587-596.
- JURMANOVÁ, K. — HÁJKOVÁ, M. — ČERNÁ, J. — BORSUKOVÁ, O. — VĚVODA, J.: Výskyt mykoplazmových mastitid v Československu. Veter. Med. (Praha), 30, 1985, s. 149-156.
- JURMANOVÁ, K. — HÁJKOVÁ, M. — ČERNÁ, J. — RYŠÁNEK, M. — MAZUROVÁ, J. — JIRÁNEK, E. — HAVELKA, B. — POPELKA, P.: Studium výskytu

mykoplazmat v chovech skotu metodou přímého a nepřímého průkazu. [Výzkumná zpráva.] Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno 1979. 30 s.

MIA, A. S. — KRAVČAK, D. M. — CASSELL, G. H.: Detection of mycoplasma pulmonis antibody in rats and mice by a rapid microenzyme-linked immunosorbent assay. Lab. Anim. Sci., 31, 1981, s. 356-359.

MINION, F. C. — BROWN, M. B. — CASSELL, G. H.: Identification of cross-reactive antigens between *Mycoplasma pulmonis* and *Mycoplasma arthritidis*. Infect. and Immun., 43, 1983, s. 115-121.

NICOLET, J. — PAROZ, P. — BRUGGMANN, S.: Tween 20 soluble proteins of *Mycoplasma hyopneumoniae* as antigen for an enzyme-linked immunosorbent assay. Res. veter. Sci., 29, 1980, s. 305-309.

ONOVIRAN, O. — TAYLOR-ROBINSON, D.: Detection of antibody against *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* in cattle by an enzyme-linked immunosorbent assay. Veter. Rec., 105, 1979, s. 165-167.

OPITZ, H. M. — DUPLESSIS, J. B. — CYR, M. J.: Indirect microenzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to *Mycoplasma synoviae* and *M. gallisepticum*. Avian Dis., 27, 1983, s. 773-786.

ORTMAYER, M. B. — FARVER, T. B. — FERRIER, W. T. — YAMAMOTO, R.: Indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of antibodies to *Mycoplasma gallisepticum*. IV. IOM Congress for Mycoplasmaology, Tokyo 1982, s. 158.

TULLY, J. G. — WHITCOMB, R. F.: The mycoplasmas. Vol. II. Human and animal mycoplasmas. New York, Acad. Press 1979.

VOLLER, A. — BIDWELL, D. E. — BARTELETT, A.: Enzyme immunoassays in diagnostic medicine. Bull. WHO, 1976, s. 55-65.

Došlo dne 22. 7. 1985

ГАЙКОВА, М. — ЮРМАНОВА, К. (Научно-исследовательский институт ветеринарии, Брно): **Определение антител против микоплазм ферментно-иммунологическим методом.** Veter. Med. (Praha), 31, 1986 (8) : 487-496.

Выявление антител против вида *Mycoplasma bovis* в сыворотке и молоке коров из стада с наличием маститов является хорошим примером использования иммуно-ферментологического метода (ELISA) в микоплазматологии. Путем обследования проб от 75 коров и параллельно также тестом косвенной гемагглютинации установили хорошую корреляцию полученных обоими тестами результатов. Антитела против вида *Ureaplasma diversum* методом ELISA установили как в сыворотке скота, так и в молоке коров со слабыми маститами. Из четырех приготовленных из разных штаммов *U. diversum* антигенов выбрали тот, который в пробах сывороток выявлял максимальные титры. Кроличьи сверхиммунные сыворотки, изготовленные против 26 штаммов микоплазм разных видов, были (после удаления антител против компонентов среды) использованы для идентификации двух антигенов. Специфическая реакция была достигнута при использовании антител против *M. hyorhinis* и *M. arginini*.

определение антител против микоплазм и уреоплазм; сравнение методов ELISA и косвенной гемагглютинации; идентификация антигенов при помощи сверхиммунных кроличьих сывороток

HAJKOVÁ, M. — JURMANOVÁ, K. (Veterinary Research Institute, Brno): **Detection of Mycoplasma Antibodies by an Enzymoimmunologic Method.** Veter. Med. (Praha), 31, 1986 (8) : 487-496.

Detection of the antibodies to the species *Mycoplasma bovis* in the serum and milk of dairy cows coming from a mastitis-infected herd is a good example of utilization of the ELISA immunoenzymologic method in the mycoplasmaology. Examining the samples from 75 dairy cows and applying the indirect hemagglutination test, good correlation of the results of the two tests was determined. The antibodies to the species *Ureaplasma diversum* were demonstrated by the ELISA method both in the bovine serum and in the milk of dairy cows infected slightly with mastitis. We chosen that strain which detected the maximum titres in the selected samples of the sera out of four antigens prepared from various strains of *U. diversum*. Rabbit sera hyperimmune to 26 strains of the mycoplasmas of various species were

used to identify two antigens (after removing the antibodies to the components of the media). Specific reaction was obtained with the antisera to *M. hyorhinis* and *M. arginini*.

demonstration of antibodies to mycoplasmas and ureaplasmas; comparison of the ELISA method and of indirect hemagglutination; identification of antigens by means of hyperimmune rabbit antisera

HÁJKOVÁ, M. — JURMANOVÁ, K. (Forschungsinstitut für Veterinärmedizin, Brno): *Detekce von Antikörpern gegen Mykoplasmen mit Hilfe der enzymoimmunologischen Methode*. Veter. Med. (Praha), 31, 1986 (8) : 487-496.

Die Detekce von Antikörpern gegen die Art *Mycoplasma bovis* im Serum und in der Milch von Kühen aus einer mit Mastitis verseuchten Herde, ist ein gutes Beispiel der Anwendung der immunoenzymologischen Methode (ELISA) in der Mykoplasmologie. Durch Untersuchungen von Proben von 75 Milchkühen und parallel auch durch indirekten Hämagglutinationstest konnten wir eine gute Übereinstimmung der mittels der beiden Tests gewonnenen Ergebnisse verzeichnen. Antikörper gegen die Art *Ureaplasma diversum* wiesen wir mit Hilfe der ELISA-Methode sowohl im Serum der Rinder als auch in der Milch von Kühen mit mäßiger Mastitis nach. Unter vier, aus verschiedenen Stämmen des *U. diversum* zubereiteten Antigenen, wählten wir jenes aus, das in ausgesuchten Serumproben die maximalen Titer erfaßte. Hyperimmune Kaninchenserum, die gegen 26 Stämme von Mykoplasmen verschiedener Arten hergestellt wurden, wandte man (nach Beseitigung der Antiseren gegen die Komponenten des Mediums) zur Identifizierung zweier Antigene an. Eine spezifische Reaktion wurde mit Antiseren gegen *M. hyorhinis* und *M. arginini* erzielt.

Nachweis von Antikörpern gegen Mykoplasmen und Ureaplasmen; Vergleich der Methoden ELISA und der indirekten Hämagglutination; Antigenidentifizierung mittels hyperimmuner Kaninchenserum

Adresa autorů:

MVDr. Marie Hájková, RNDr. Květa Jurmanová, CSc., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32 Brno

I. Svoboda, L. Rodák, J. Franz, J. Štěpánek, L. Valíček

SVOBODA, I. — RODÁK, L. — FRANZ, J. — ŠTĚPÁNEK, J. — VALÍČEK, L. (Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno): *Diferenciální diagnostika virových průjmů telat*. Veter. Med. (Praha), 31, 1986 (8) : 497-504.

Je popsáno využití enzymoimunologické (ELISA) metody k průkazu rotavirů a koronavirů ve vzorcích trusu telat s průjemem. Srovnání s výsledky získanými elektronovou mikroskopií ukazuje, že metodou ELISA se dosahuje až o 50 % vyšší záchytnosti při vysoké specifitě reakce. Metoda je vhodná i k detekci humánního rotaviru ve stolici dětí.

rotavirus; koronavirus; diagnostika ELISA; elektronová mikroskopie

Při velkovýrobní technologii odchovu skotu, zvláště při otevřeném obratu stáda, často dochází k hromadnému výskytu infekčních chorob. Mezi jiným jsou to i střevní infekce, které mnohdy propukají masivně a průjmy v některých extrémních případech postihují až 90 % populace novorozenců telat. I když jsou gastroenteritidy telat charakterizovány jednotným klinickým syndromem, jsou z hlediska etiologického komplexním onemocněním a mohou být způsobovány bakteriemi, plísněmi, mykoplazmaty a v neposlední řadě i viry. Z těch jsou to zejména rotaviry a koronaviry a virus slizniční choroby (Stair aj., 1972; Mebus aj., 1973; Peterson a Spendlove, 1976).

O rotavirech jako o příčině průjmů jsou první zmínky v roce 1969, kdy se o nich ještě hovořilo jako o „reo-like-virech“. Nedlouho potom byly zjištěny křížové imunologické reakce mezi lidským, opičím a hovězím rotavirem (Kapikan, 1974; Peterson a Spendlove, 1976; Fauvel aj., 1978; Cukor aj., 1978; Wyatt aj., 1979).

Diagnostika rotavirových infekcí prošla v krátké době mnoha kvalitativně odlišnými etapami. Po zvládnutí izolace a pomnožení viru na buněčných kulturách (Barnett aj., 1971; Babiuk aj., 1977) byl rotavirus purifikován a byly popsány jeho fyzikálně-chemické vlastnosti. Odtud byl jen krok k rutinním diagnostickým metodám, jejichž vývoj šel od elektronové mikroskopie (EM) přes komplement-fixační test (CF), vstřícnou imunoelektroforézu (CIEP), imunofluorescenci (IF), imuno-elektronovou mikroskopii (IEM) — (Barnett aj., 1975; Ellens aj., 1978; Fauvel aj., 1978) — až konečně byly vytvořeny předpoklady k diagnostice radioimunoanalýzou (RIA), enzymoimunoanalýzou (ELISA) a enzymofluorescenční imunoanalýzou (ELFA) (Ellens aj., 1978; Cukor aj., 1978; Yolken a Stopa, 1979). Náhorně zde vidíme postup od metod pracnějších a méně citlivých k metodám většinou méně pracným

a citlivějším, využitelným k rutinní diagnostice, i když se potřebné kvalitní reakční komponenty získávají složitěji.

U koronavirů proběhlo poznání virového agens a jeho diagnostiky s jistým časovým zpožděním. Jako etiologické agens neonatálních průjmů telat byl popsán až na začátku sedmdesátých let (Stair aj., 1972; Mebus aj., 1973). Rozvoj diagnostických metod k průkazu koronavirových infekcí měl podobný průběh jako u rotaviru. Kromě precipitace, hemaglutinace, imuno fluorescence byla rozpracována i metoda elektronové mikroskopie, která je velice specifická, ale v běžné diagnostické praxi vzhledem k nákladnému přístrojovému vybavení málo uplatňovaná (Sharpe aj., 1976; Sato aj., 1977; Dea aj., 1979). Z tohoto pohledu nabývá i zde na významu rozvoj nových metod, zejména na bázi enzymoimunoanalýzy (Callebaut aj., 1982).

V předložené práci je popsána a ověřena metoda pro diferenciální diagnostiku infekčních průjmů telat rotavirového a koronavirového původu.

MATERIÁL A METODY

VZORKY TRUSŮ A JEJICH ZPRACOVÁNÍ

Vzorky trusů byly odebrány od telat 1 až 30 dnů starých, pocházejících z různých chovů s výskytem průjmů. Trusy byly až do zpracování uloženy při teplotě -20°C .

Po rozmrazení byly smíchány s 0,01 mol/l fosfátem sodným pufrovaným fyziologickým roztokem (PBS) pH 7,2, homogenizovány skleněnou tyčinkou a centrifugovány při 3000 X g 20 minut. Množství přidaného PBS se řídilo konzistencí vzorku tak, aby vzniklo alespoň 0,5 ml supernatantu, který byl použit k vyšetření.

ELEKTRONOVĚ MIKROSKOPICKÉ VYŠETŘENÍ (EM)

Byla použita metoda negativního barvení 2% kyselinou fosfowolframovou nebo 2% molybdenanem amonným (Brenner a Horne, 1959). Vzorky byly prohlíženy na elektronovém mikroskopu Tesla BS 513.

VIRY A JEJICH PURIFIKACE

Bovinní rotaviry a koronaviry byly pomnoženy na buněčných kulturách ledvinových buněk telecích fetů nebo na linii buněk MDBK (Štěpánek aj., 1981).

Virus uvolněný do kultivačního média infikované tkáňové kultury byl purifikován a použit k imunizaci králíků.

Koronavirus byl připraven diferenciální ultracentrifugací 200 ml média při 100 000 X g dvě hodiny při teplotě 4°C . Získaný sediment byl resuspendován ve 2 ml PBS a použit k imunizaci.

Rotavirus byl připraven tímto způsobem: 2000 ml infekčního média, ze kterého byl odstraněn buněčný detritus (1500 ot/min, 30 minut při teplotě 4°C), bylo centrifugováno při 100 000 X g dvě hodiny při teplotě 4°C . Získaný sediment byl resuspendován v 5 ml PBS, nanesen na vrstvy 10 ml 60% sacharózy a 20 ml 20% sacharózy a centrifugován při 100 000 X g tři hodiny při teplotě 4°C . Mezivrstva na rozhraní 60% a 20% sacharózy byla odebrána, resuspendována v PBS a sedimentována při 100 000 X g dvě hodiny při teplotě 4°C . Sediment byl resuspendován v malém množství PBS, doplněn roztokem CsCl na specifickou hmotnost $1,36 \times 10^6 \text{ g m}^3$ a ultracentrifugován do rovnovážného stavu při 200 000 X g (22 hodiny při teplotě 4°C). Opaleskující vrstvy obsahující virus byly odebrány, resuspendovány do PBS a použity k imunizaci králíků.

KONJUGÁTY

Pro metodu ELISA byly použity protilátky proti hovězím imunoglobulinům konjugované s křenovou peroxidázou (Wilson a Nakane, 1978). Protilátky proti hovězímu Ig, určené ke konjugaci, byly izolovány z králíčích sér buď jako gamaglobulinová frakce získaná srážením do 40% nasycení $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ nebo afinitní chromatografií na koloně s navázaným proteinem A, anebo jako specifické protilátky proti hovězímu IgG získané z imunosorbentu připraveného ze Sepharosy 4B s konvalentně navázaným bovinným IgG₁ + IgG₂. Lze použít i komerční konjugáty Px-Swab IgG z ÚSOL Praha.

ANTISÉRA

Hovězí hyperimunní séra s obsahem protilátek proti rotavirům a koronavirům byla připravena kombinací perorální a intravenózní imunizace novorozených telat (Štěpánek aj., 1981) tkáňovými viry. Králíčí séra proti rotaviru a koronaviru byla připravena z krve imunizovaných zvířat purifikovanými virovými antigeny, které jim byly podávány i. d. a třikrát opakovaně i. m. v emulzi s kompletním a inkompletním Freundovým adjuvans.

Nespecifické reakce králíčích antikoronavirových sér byly odstraněny tak, že byly vysyceny na koloně Sepharosy 4B s navázanými solubilními antigeny neinfikovaných buněčných kultur. Antirotavirové sérum zpravidla úpravu nevyžadovalo.

Z králíčích antivirových sér byl izolován IgG vysolením $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ v kombinaci s iontoměničovou chromatografií na koloně DEAE celulózy.

ELISA PRŮKAZ KORONAVIRŮ A ROTAVIRŮ

Do jamek mikrotitračních desek s plochým dnem (Koh-I-Noor) se nanese 0,1 ml roztoku králíčích antivirových protilátek v 0,05 mol/l pufru $\text{NaHCO}_3\text{-Na}_2\text{CO}_3$, pH 8,8 až 9,6, o koncentraci 10 až 50 μg proteinu na mililitr roztoku. Desky se inkubují ve vlhké komůrce buď přes noc při teplotě 4 °C, nebo dvě hodiny při teplotě 37 °C. Jamky se třikrát promyjí promývacím roztokem (PBS s 0,2 % Tween 20, pH 7,2) a přidá se 0,1 ml suspenze testovaných vzorků trusů ředěných podle potřeby od 1 : 2 v ředícím roztoku, který obsahuje PBS, 0,2 % Tween 20 a 1 % laktalbuminu hydrolyzátu — LAH. Po 1,5hodinové inkubaci při teplotě 37 °C se jamky promyjí a nanese se do nich hyperimunní antivirové hovězí sérum příslušně zředěné v ředícím roztoku (1 : 400). Po 1,5hodinové inkubaci při teplotě 37 °C se jamky promyjí a přidá se 0,1 ml konjugátu proti hovězím imunoglobulinům. Konjugát se ředí ředícím roztokem v poměru předem určeném v boxových titracích. Inkubuje se opět 1,5 hodiny při teplotě 37 °C. Nakonec se reakce mezi protilátkou a antigenem vizualizuje 0,1 ml roztoku substrátu, který se skládá z 0,01 % peroxidu vodíku a 5-aminosalicylové kyseliny. Stejně se zpracují i srovnávací vzorky pozitivní a negativní, které se zařazují do každé série vyšetření.

Po 30 minutách inkubace při laboratorní teplotě a opatrném protřepání desek je možné odečítat výsledky buď vizuálně, nebo fotometricky. Jako pozitivní se hodnotí všechny testované vzorky, jejichž intenzita zbarvení je zjevně vyšší než negativní kontrolní vzorek. V případě fotometrického hodnocení musí mít pozitivní vzorek alespoň dvojnásobnou hodnotu absorbance než negativní kontrola. To vše za předpokladu, že pozitivní kontrola je zřetelně tmavě vybarvena. K fotometrickému měření je výhodné použít spektrofotometr Multiscan (Labsystems, Finsko) při 492 nm, který umožňuje měřit přímo v polystyrenových deskách.

VÝSLEDKY

PRŮKAZ ROTAVIRU

Byly vyšetřeny celkem 192 vzorky trusů trojnásobně vyředovaných v poměru od 1 : 5 do 1 : 10 935. Virus byl prokázán v 75 % případů. Citlivost metody ELISA byla srovnána s elektronově mikroskopickým

I. Srovnání výsledků získaných metodou ELISA a vyšetřením elektronovou mikroskopií u vzorků trusů na přítomnost rotaviru — Comparison of the results obtained by the ELISA method and by electron microscopy in the samples of excrements examined for the presence of rotavirus

ELISA	+	—	+	—
EM	+	—	—	+
Počet vzorků	46	32	48	5
%	35,2	24,4	36,6	3,8
Shodných	59,6 %			

(EM) vyšetřením. Společně bylo vyšetřeno 131 vzorků. Shodné výsledky byly získány u 59,6 % vyšetření. ELISA měla vyšší zachyt než EM u 36,6 % vzorků a byla méně citlivá u 3,8 % vzorků. V těchto případech se výhradně jednalo o výskyt ojedinělých partikulí zachycených v EM (tab. I a III).

PRŮKAZ KORONAVIRU

Byly zpracovány celkem 193 vzorky, stejně ředěné jako u rotaviru v poměru od 1:5 do 1:10 935. Virus byl prokázán v 81,4 % vzorků. Citlivost a specifita metody byla u 132 vzorků ověřena srovnáním s výsledky EM vyšetření, které je obecně uznáváno jako specifická vyšetřovací metoda. U obou metodik byly shodné výsledky zjištěny u 71,2 % případů. ELISA ukázala vyšší zachyt koronaviru v 19,7 % případů, menší citlivost u 9,1 % vzorků. Celkově dobrá shoda byla prokázána i u koncentrace virových partikulí zjištěných EM a stupněm ředění vzorků pozitivních při vyšetření metodou ELISA. Výsledky jsou shrnuty v tab. II a III.

Specifita ELISA metod průkazu rotaviru a koronaviru byla opakovaně potvrzena vyšetřením infekčních médií získaných homogenizací buněčných kultur infikovaných rotaviry nebo koronaviry, ve kterých byla přítomnost viru ověřena EM. Při křížovém vyšetření nedocházelo v ELISA metodě k nespecifickým pozitivním výsledkům, tj. detekce jednoho viru nebyla ovlivněna přítomností viru druhého.

II. Srovnání výsledků získaných metodou ELISA a vyšetřením elektronovou mikroskopií u vzorků trusů na přítomnost koronaviru — Comparison of the results obtained by the ELISA method and by electron microscopy in the samples of excrements examined for the presence of coronavirus

ELISA	+	—	+	—
EM	+	—	—	+
Počet vzorků	79	15	26	12
%	59,8	11,4	19,7	9,1
Shodných	71,2 %			

III. Srovnání výsledků získaných metodou ELISA a vyšetřením elektronovou mikroskopií u vzorků trusů telat při stanovení koronaviru a rotaviru (četnost výskytu virových částic při vyšetření elektronovou mikroskopií označena + až +++) — Comparison of the results obtained by the ELISA method and by electron microscopy in the samples of calf excrements examined for coronavirus and rotavirus (frequency of the occurrence of viral particles determined by electron microscopy is designated by + to +++)

Číslo vzorku	Koronavirus		Rotavirus	
	EM	ELISA titr	EM	ELISA titr
T9	+++	1 : 405	—	neg.
T1	—	1 : 5	+++	1 : 45
VA-1	++	1 : 15	—	neg.
VA-2	—	1 : 5	++	1 : 405
VA-3	—	1 : 45	++	1 : 405
TM-151	+	1 : 5	+	±
TM-152	—	neg.	+	neg.
TM-188	++	1 : 135	—	±
TM-218	++	1 : 45	++	1 : 3645
TM-178	—	neg.	++	1 : 405
TM-179	+	neg.	+	neg.
T ₁ M ₁	++	1 : 405	++	1 : 405
TM-213	+++	1 : 1215	—	neg.
TM-122	—	neg.	++	1 : 405
TM-111	++	1 : 45	—	1 : 405
TM-217	++	1 : 1215	—	1 : 15
TM-37	+++	1 : 405	—	neg.
TM-106	+++	1 : 135	—	1 : 15
N-318/2	+	1 : 405	+	1 : 405
1341	—	neg.	++	1 : 405

DISKUSE

Průkaz koronavirů a rotavirů v trusu telat s průměrem potvrdil vysokou specifitu a citlivost vyvinutých metod ELISA i vysoký stupeň postižení našich chovů těmito infekcemi. Ve srovnání s EM vyšetřením byla prokázána shoda i vyšší citlivost průkazu virového antigenu jak u koronaviru (metodou ELISA shoda u 71,2 % vzorků a prokázáno o 19,7 % pozitivních vzorků navíc), tak u rotaviru (shoda u 59,6 % vzorků a prokázáno navíc 36,6 % pozitivních vzorků). Naopak nižší citlivost byla zjištěna u 9,1 % vzorků u koronaviru a 3,8 % u rotaviru. Téměř výhradně se jednalo o vzorky, v nichž byly elektronmikroskopicky prokazovány pouze ojedinělé virové částice. Vyšší citlivost metod ELISA proti EM vyšetření je popisována ve všech dostupných sděleních (např.

Ellens aj., 1978; Callebaut aj., 1982). Z dosažených výsledků vyplývá, že metoda ELISA je citlivější než vyšetření EM. Ve shodě s uvedenými autory jsme i my sporadicky nalézali vzorky v ELISA vyšetření negativní a EM pozitivní. Vysvětlení může spočívat buď v existenci kmenů virů odlišného antigenního složení, nebo v blokování dostupných antigenních determinant viru protilátkami, takže antigenně inertní virové částice nejsou metodou ELISA prokazatelné. Tento předpoklad potvrzují Ellens aj. (1978), kteří uvádějí, že vzorky trusu telat a prasat mohou obsahovat virus-protilátkové komplexy, které pak často činí potíže při imunofluorescenčním vyšetření. Relativně vyšší procento výskytu pozitivních výsledků technikou ELISA je vysvětlitelné přítomností solubilních antigenů viru, které nejsou postihnutele EM, svědčících však již o proběhlé infekci zvířete.

Výsledky dosažené v této práci byly podkladem pro výrobu setů na průkaz rotavirů v trusu telat v n. p. Bioveta Ivanovice na Hané. Slouží velmi dobře nejen pro průkaz tohoto agens v trusu telat, ale osvědčily se i v humánní medicíně pro diagnostiku novorozeneckých průjmů virového původu. Srovnáním s podobným setem zahraniční výroby bylo dosaženo až 98% shody výsledků.

Výhody metod ELISA k průkazu koronavirů a rotavirů ve srovnání s elektronovou mikroskopií nespočívají pouze ve vyšší citlivosti detekce. Metod ELISA lze využít při vyšetření velkého počtu vzorků a výsledky jsou získány téhož dne. Všechny použité reagenty jsou stabilní. Metody nevyžadují nákladné přístrojové vybavení a hodnotit je možné pouhým okem. Tyto výhody předurčují metody ELISA k širokému praktickému využití.

Literatura

- BARNETT, B. B. — SPENDLOVE, R. S. — PETERSON, M. W. — HSU, L. Y. — La SALLE, V. A. — EGBERT, L. N.: Immunofluorescent cell assay of neonatal calf diarrhea virus. *Can. J. comp. Med.*, 39, 1975, s. 462-465.
- BRENNER, S. — HORNE, E. W.: A negative staining method for high resolution electronmicroscopy of viruses. *Biochim. biophys. Acta*, 34, 1959, s. 103-110.
- CALLEBAUT, P. — DEBOUCK, P. — PENSAERT, M.: Enzyme linked immunosorbent assay for the detection of the coronavirus-like agent and its antibodies in pigs with porcine epidemic diarrhea. *Veter. Microbiol.*, 7, 1982, s. 295-306.
- CUKOR, G. — BERRY, M. K. — BLACKLOW, N. R.: Simplified radioimmunoassay for detection of human rotavirus in stools. *J. infect. Diseases*, 138, 1978, s. 906-910.
- DEA, S. — ROY, R. S. — BEGIN, M. E.: Bovine coronavirus isolation and cultivation in continuous cell lines. *Amer. J. veter. Res.*, 41, 1980, s. 30-38.
- ELLENS, D. J. — de LEEUW, P. W. — STRAVER, P. J. — van BALKEN, J. A. M.: Comparison of five diagnostic methods for the detection of rotavirus antigens in calf faeces. *Med. Microbiol. and Immunol.*, 166, 1978, s. 157-163.
- FAUVEL, M. — SPENCE, L. — BABIUK, L. A. — PETRO, R. — BLOCH, S.: Hemagglutination and hemagglutination-inhibition studies with a strain of Nebraska calf diarrhea virus (bovine rotavirus). *Intervirology*, 9, 1978, s. 95-105.
- MEBUS, C. A. — STAIR, E. L. — RHODES, M. B. — TWITEHAUS, M. J.: Pathology of neonatal calf diarrhea induced by a coronavirus-like agent. *Veter. Path.*, 10, 1973, s. 45-64.
- PETERSON, M. W. — SPENDLOVE, R. S. — SMART, R. A.: Detection of neonatal calf diarrhea virus, and a coronavirus using the fluorescent precipitin test. *J. clin. Microbiol.*, 3, 1976, s. 376-377.

- SATO, K. — INABA, Y. — KUROGI, H. — TAKAHASHI, E. — SATODA, K. — OMORI, T. — MATUMOTO, M.: Hemagglutination by calf diarrhea coronavirus. *Veter. microbiol.*, 2, 1977, s. 83-87.
- SHARPEE, R. L. — MEBUS, C. A. — BASS, E. P.: Characterization of a calf diarrheal coronavirus. *Amer. J. veter. Res.*, 37, 1976, s. 1031-1041.
- STAIR, E. L. — RHODES, M. B. — WHITE, R. G. — MEBUS, C. A.: Neonatal calf diarrhea: Purification and electron microscopy of a coronavirus-like agent. *Amer. J. veter. Res.*, 33, 1972, s. 1147-1156.
- STOTT, E. J. — THOMAS, L. H. — BRIDGER, J. C. — JEBBETT, N. J.: Replication of a bovine coronavirus in organ cultures of foetal trachea. *Veter. Microbiol.*, 1, 1976, s. 65-69.
- ŠTĚPÁNEK, J. — PŠIKAL, I. — MENŠÍK, J. — SALAJKA, E. — FRANZ, J. — CHROUSTOVÁ, E. — MENŠÍK, P. — POSPÍŠIL, Z. — SALAJKOVÁ, Z. — SVOBODA, I. — SMÍD, B. — TOMAN, M. — VALÍČEK, L.: Analýza příčin gastroenteritid u novorozeneých telat. [Výzkumná zpráva.] Brno, Výzkumný ústav veterinárního lékařství 1981. 32 s.
- YOLKEN, R. H. — STOPA, P. J.: Enzyme linked fluorescence assay: Ultrasensitive solid-phase assay for detection of human rotavirus. *J. clin. Microbiol.*, 10, 1979, s. 317-321.
- YOLKEN, R. H. — WYATT, R. G. — MATA, L. — URRUTIA, J. J. — GARCIA, B. — CHANOCK, R. M. — KAPIKIAN, A. Z.: Secretory antibody direct against rotavirus in human milk-measurement by means of enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Pediat.*, 93, 1978, s. 916-921.
- WILSON, H. B. — NAKANE, P. K.: Immunofluorescence and related techniques. (Knapp, W. — Holubar, K. — Wick, G. eds.). Amsterdam, Elsevier/North Holland Biomedical Press 1978, s. 215-225.
- WYATT, R. G. — MEBUS, CH. A. — YOLKEN, R. H. — KALICA, A. R. — JAMES, H. D. — KAPIKAN, A. Z. — CHANOCK, R. M.: Rotaviral immunity in gnotobiotic calves: Heterologous resistance to human virus induced by bovine virus. *Science*, 203, 1979, s. 548-550.

Došlo dne 22. 7. 1985

СВОБОДА, И. — РОДАК, Л. — ФРАНЦ, Я. — ШТЕПА́НЕК, Я. — ВАЛИ́ЧЕК, Л. (Научно-исследовательский институт ветеринарии, Брно): **Дифференциальная диагностика вирусных поносов телят.** *Veter. Med. (Praha)*, 31, 1986 (8) : 497-504.

Описано применение ферменто-иммунологического метода (ELISA) для установления ротавирусов и коронавирусов в образцах помета страдающих поносом телят. Сравнение с результатами, полученными методом электронной микроскопии, показывает, что при методе ELISA достигают даже на 50 % большего эффекта при высокой специфичности реакции. Метод годен и для выявления человеческого ротавируса в стуле детей.

ротавирус; коронавирус; диагностика ELISA; электронная микроскопия

SVOBODA, I. — RODÁK, L. — FRANZ, J. — ŠTĚPÁNEK, J. — VALÍČEK, L. (Veterinary Research Institute, Brno): **Differential Diagnostics of Viral Diarrheas in Calves.** *Veter. Med. (Praha)*, 31, 1986 (8) : 497-504.

There is a description of the enzymeimmunologic method (ELISA), which was used for demonstration of rotaviruses and coronaviruses in the samples of excrements of the calves suffering from diarrheas. It is shown by a comparison with the results obtained by electron microscopy that the ELISA method provides by up to 50 % higher capture rate and the reaction is highly specific. The method can also be applied to a detection of human rotavirus in the children's stool.

rotavirus; coronavirus; ELISA diagnostics; electron microscopy

SVOBODA, I. — RODÁK, L. — FRANZ, J. — ŠTĚPÁNEK, J. — VALÍČEK, L. (Forschungsinstitut für Veterinärmedizin, Brno): *Differentialdiagnostik von Virusdurchfällen der Kälber*. Veter. Med. (Praha), 31, 1986 (8) : 497-504.

Beschrieben wird die Anwendung der enzymoimmunologischen (ELISA-) Methode zum Nachweis von Rotaviren und Koronaviren in Kotproben von Kälbern mit Durchfall. Der Vergleich mit durch Elektronenmikroskopie gewonnenen Ergebnissen zeigt, daß mit der ELISA-Methode eine bis um 50 % höhere Erfassungsrate bei hoher Spezifität erreicht werden kann. Die Methode ist auch zur Ermittlung humaner Rotaviren im Stuhl von Kindern geeignet.

Rotavirus; Koronavirus; ELISA-Diagnostik; Elektronenmikroskopie

Adresa autorů:

MVDr. Ivan Svoboda, MVDr. Ladislav Rodák, CSc., RNDr. Jaroslav Franz, CSc., MVDr. Jan Štěpánek, CSc., MVDr. Lubomír Valíček, CSc., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32 Brno

ENZYMOIMUNOLOGICKÁ (ELISA) DIAGNOSTIKA JARNÍ VIRÉMIE KAPRŮ

L. Rodák, Z. Pospíšil, J. Tománek, T. Veselý, J. Hampl

RODÁK, L. — POSPÍŠIL, Z. — TOMÁNEK, J. — VESELÝ, T. — HAMPL, J. (Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno): *Enzymoimunologická (ELISA) diagnostika jarní virémie kaprů*. Veter. Med. (Praha), 31, 1986 (8) : 505-512.

Je popsáno využití enzymoimunologické (ELISA) metody k diagnostice jarní virémie kaprů. Metoda je založena na stanovení specifických protilátek proti *Rhabdovirus carpio* ve vyšetřovaných rybích sérech. Specifita reakce je ověřena použitím virového a kontrolního antigenu, vyšetřením pozitivních a negativních sér a kontrolní inkubací bez séra. Metoda ELISA umožňuje stanovit přítomnost antivirových protilátek po infekci nebo vakcinaci, a proto je vhodná pro podrobné studie i stanovení vhodných léčebných a preventivních opatření.

enzymoimunologická metoda (ELISA); rybí protilátky; *Rhabdovirus carpio*

Kostnaté ryby (*Teleostei*) patří z fylogenetického hlediska mezi nejranější skupiny živočichů, u nichž byl prokázán imunitní systém charakteristický přítomností sérových imunoglobulinů. Jde o jeden typ imunoglobulinů, podobný IgM savců, který se vyskytuje ve formě tetrameru o molekulové hmotnosti 610 000. Plazmatické buňky odpovědné za tvorbu těchto imunoglobulinů jsou zjišťovány ve slezině a v ledvinách, které u kostnatých ryb patří k orgánům se smíšenou exkretční, hemopoetickou a lymfopoetickou funkcí (Richter aj., 1973; Fiebig a Ambrosius, 1975; Hädige aj., 1979; Machulla aj., 1979; Secombes a Manning, 1980; Egberts aj., 1983).

Při hodnocení protilátkové odpovědi ryb je proto třeba brát zřetel na existenci jediné třídy produkovaných imunoglobulinů IgM typu. Vyjdeme-li z analogie u savců, pak baktericidní, hemolytická a aglutinační schopnost IgM protilátek je 100× až 1000× vyšší než IgG protilátek, což je dáno polymerním charakterem a několikanásobně vyšším počtem vazebných míst u IgM imunoglobulinu. Na druhé straně však protilátková odpověď typu IgG u ptáků a savců představuje vyšší a dokonalejší typ humorální imunity, který se projevuje vyšší specifitou při rozeznávání antigenních determinant, vyšší účinností při precipitačních reakcích a zejména přítomností dlouhodobé imunitní paměti. I když u ryb byl jistý druh imunitní paměti zjištěn (Avtalion, 1969, 1981; Lemers a Haas, 1983), zdaleka nedosahuje úrovně imunitní paměti savců.

Intenzitu tvorby protilátek u ryb dále velmi výrazně ovlivňuje teplota okolního prostředí. Intenzita metabolismu a syntéza proteinů, včetně imunoglobulinů, je u poikilotermních živočichů silně závislá na teplotě

vody (Cone a Marchalonis, 1972; Avtalion aj., 1973; Haschmeyer a Mathews, 1982, 1983).

Zvláštnosti humorální imunity a závislost tvorby protilátek na teplotě okolního prostředí představují dva hlavní faktory, které nepříznivě ovlivňují odolnost ryb a omezují účinnost ochranných vakcinací u jarní virémie kaprů. Pro epizootologické studie může být stanovení sérumneutralizačních protilátek proti *Rhabdovirus carpio*, původci jarní virémie kaprů, ukazatelem stavu imunity u populací kaprů v jednotlivých rybnících (Kölbl a Kainz, 1977; Wizigman aj., 1980). Z více laboratoří je však známo, že rybí séra, zvláště v nízkých ředěních, mohou být toxická pro buněčné kultury používané při kultivaci rybích virů (Wizigman aj., 1983), a proto může být výsledek sérumneutralizačního testu zkreslený. Stanovení antivirových protilátek pomocí specifitějších a citlivějších metod je tedy žádoucí proto, aby byly stanoveny protilátky nejen po přirozené infekci osádek rybníků, ale i po ochranných vakcinacích kaprů. Proto jsme přikročili k vývoji enzymoimunologické (ELISA) metody stanovení protilátek proti původci jarní virémie kaprů, která je ve srovnání se sérumneutralizačním testem podstatně výhodnější a citlivější.

MATERIÁL A METODY

ZVÍŘATA A MATERIÁL

Krevní séra kaprů byla získávána od ryb vakcinovaných proti JVK (jarní virémie kaprů) i ryb kontrolních nevakinovaných. Dále byla vyšetřena séra odebraná od kaprů (K₁, K₂, K₃) odlovených k jiným výzkumným účelům nebo při projevech klinických a patoanatomických příznaků onemocnění JVK. Krevní séra byla po odběru uchovávána při teplotě -20 °C nebo byla smísená aa s konzervačním roztokem (50 ml pufrovaný fyziologický roztok — PFR, 50 ml glycerín, 20 mg azid sodný) a uchovávána při teplotě 4 °C. Pro metodu ELISA byla krevní séra ředěna dvojnásobně v rozsahu 1 : 50 až 1 : 6400 pomocí PFR s obsahem 0,05 % Tween 20 a 0,5 % hovězího sérového albuminu (BSA).

VIROVÝ KONTROLNÍ ANTIGEN

Rouxovy láhve s narostlými buňkami linie FHM (Fathead minnow — střevle) v médiu Eagle MEM, obsahujícím 100 m. j. penicilinu, 100 µg streptomycinu a 1 % bovinního fetálního séra, byly infikovány virem *Rhabdovirus carpio* (RVC) a inkubovány při teplotě 22 °C. Na vrcholku cytopatického efektu byly láhve opakovaně zmrazeny a buněčný detritus odstraněn centrifugací 15 minut při 200 X g. Ze získaného infekčního média pak byl virus koncentrován a izolován ultracentrifugací (Ahne, 1978). Takto byl získán RVC pozitivní virový antigen pro metodu ELISA. Naprosto stejným způsobem byl připravován RVC negativní kontrolní antigen z buněčných kultur, které nebyly infikovány virem. Oba antigeny v PFR byly uchovávány při teplotě -20 °C. Pro použití v ELISA testu byly 100X ředěny pomocí 0,05 M karbonát-bikarbonátového pufru pH 0,5.

PŘÍPRAVA ANTISÉR A KONJUGÁTU

Kapří imunoglobulin (CCIg — *Cyprinus carpio* Ig) byl izolován ze séra kombinací izolačních postupů zahrnujících precipitaci síranem amonným, gelovou filtrací na Sephadexu G-200 a iontoměničovou chromatografii na DEAE Sephadexu A-50 (Marchalonis, 1971; Hädge aj., 1979; Machulla aj., 1979; Clerx aj., 1980). Antiséra proti kapřímu imunoglobulinu (CCIg) i proti plnému kapřímu séru (CCS) byla připravena opakovanou imunizací králíků emulzemi antigenů ve Freundově adjuvans. Kvalita připravených antisér byla kontrolována imuno elektroforézou.

Dalším postupem byly z antiséra proti CCIG izolovány specifické protilátky pomocí imunosorbentu (CNBr aktivovaná Sepharose 4B, Pharmacia) s kovalentně navázaným kapřím imunoglobulinem. Tyto specifické protilátky pak byly konjugovány s křenovou peroxidázou (Boehringer, Mannheim, Grade I, RZ 3,0) perjodátovou metodou (Wilson a Nakane, 1978). Konjugát enzym-protilátka byl upraven na koncentraci 2 mg protilátek na mililitr a uchováván v zatavených ampulích při teplotě -70°C . Pro vyšetření ELISA byl tento zásobní roztok konjugátu ředěn 500X až 1000X pomocí PFR s obsahem 0,05 % Tween 20 a 0,5 % hovězího sérového albuminu (BSA).

ROZTOK SUBSTRÁTU

Roztok obsahující 8 mg 5-aminosalicylové kyseliny (Fluka AG) v 10 ml 0,05 M citrát-fosfátového pufru pH 5,8 byl těsně před použitím doplněn 1 ml 0,05 % peroxidu vodíku.

PRINCIP METODY ELISA A HODNOCENÍ VÝSLEDKŮ

Kolmé řady jamek polystyrenových mikrotitračních ploten (Koh-I-Noor, Dalečín) jsou střídavě naplněny roztoky virového a kontrolního antigenu. S antigeny navázanými na stěny jamek pak při inkubaci s vyšetřovanými kapřími séry (90 minut při teplotě 37°C ve vlhké komůrce) reagují přítomné antivirové protilátky. Při další inkubaci potom s navázanými kapřími protilátkami reagují protilátky proti kapřím imunoglobulinům konjugované s peroxidázou. Reakce je vizualizována po naplnění jamek roztokem substrátu, který je enzymem štěpen za vzniku barevného reakčního produktu. Mezi jamkami s navázanými virovými a kontrolními antigeny lze po inkubaci s pozitivním sérem pozorovat výrazný rozdíl ve stupni zbarvení roztoku substrátu. Po inkubaci s negativním sérem nebo bez séra je stupeň zbarvení velmi slabý nebo žádný, mezi jamkami s oběma antigeny není rozdíl.

Při fotometrickém hodnocení výsledků byla stanovena absorbance roztoku substrátu při 492 nm. Vyšetřované sérum bylo hodnoceno jako pozitivní, jestliže po inkubaci se stejným ředěním séra byla absorbance roztoku v jamce s virovým antigenem nejméně dvakrát vyšší než v jamce s kontrolním negativním antigenem. K měření je výhodné použít komerčně vyráběné vícekanálové spektrofotometry (Dynatech, Flow Laboratories), které umožňují měřit přímo v polystyrenových plotnách.

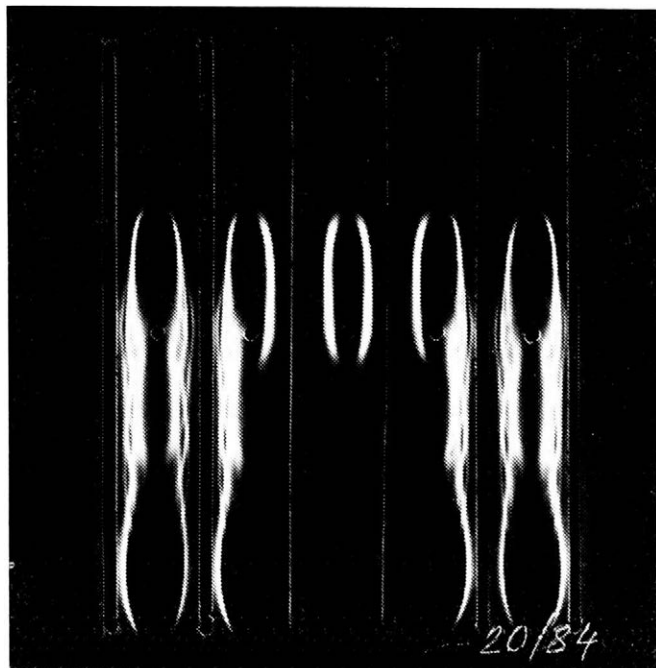
VÝSLEDKY

HODNOCENÍ KVALITY PŘIPRAVENÝCH PROTILÁTEK

Kvalita antisér připravených imunizací králíků purifikovaným kapřím imunoglobulinem (CCIG) byla testována imunoelektroforézou. Při reakci s elektroforeticky rozděleným plným kapřím sérem vytvářela tato antiséra precipitační linii pouze s kapřím Ig, s dalšími proteinovými složkami séra nereagovala (obr. 1). Stejných výsledků bylo dosaženo i při kontrole specifických protilátek izolovaných z těchto antisér afinitní chromatografií. To poskytuje záruku, že tyto protilátky konjugované s enzymem reagují při vyšetření metodou ELISA pouze s kapřími imunoglobuliny specificky navázanými na *Rhabdovirus carpio*.

VYŠETŘENÍ TERÉNNÍCH VZORKŮ

Citlivost ELISA stanovení antivirových protilátek byla ověřena vyšetřením několika set vzorků kapřích krevních sér. Výsledky vyšetření terénních vzorků byly v dobrém souladu s epizootologickou situací v dané lokalitě i s výsledky morfologického a virologického vyšetření. Podrobněji jsou pro názornost uvedeny výsledky vyšetření vzorků ze dvou



RACCS RACCIg RACCS

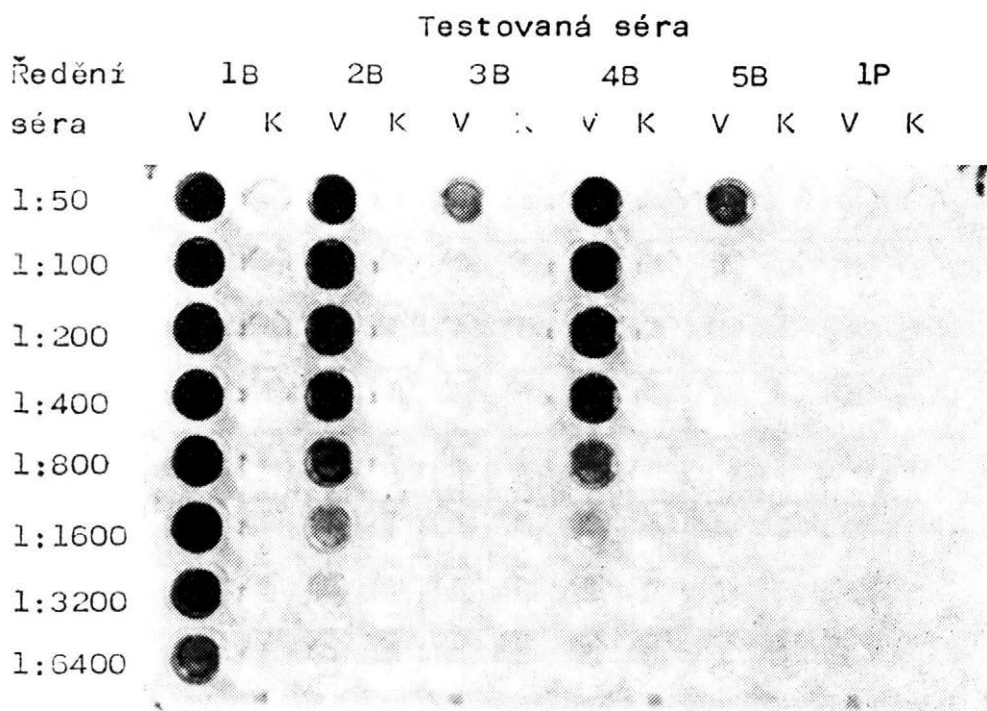
1. Imunoelektroforetická kontrola králíčího séra proti kapřímu imunoglobulinu (RACCIg). Kapří sérum nanesené do startů bylo po elektroforetickém rozdělení precipitováno králíčím sérem proti kapřím sérovým proteinům (RACCS) nebo kapřímu imunoglobulinu (RACCIg) — Immunoelectrophoretic control of rabbit serum against carp immunoglobulin (RACCIg). Carp serum applied to the starters was precipitated, after electrophoretic separation, by rabbit serum against carp serum proteins (RACCS) or carp immunoglobulin (RACCIg).

rybníků, v nichž byli hromadně vyšetřováni kapři pro podezření na jarní virémii.

R y b n í k D.: V rybníku se po vysazení násady kapra objevilo akutní hynutí. Patomorfologickým vyšetřením bylo v dutině tělní zjištěno menší množství serózní tekutiny. Při virologickém vyšetření byl izolován původce jarní virémie *Rhabdovirus carpio*. Antivirové protilátky zjištěné metodou ELISA byly z dodaných vzorků prokázány pouze v základním ředění 1 : 50.

R y b n í k B.: V rybníku osazeném K2 došlo k úhynu ryb v delším časovém období. Výrazné byly patomorfologické změny: zvětšení dutiny tělní obsahující serózní tekutinu, na povrchu těla rozsáhlé vředovité změny sahající hluboko do svaloviny. K virologickému vyšetření byl odebrán směsný vzorek parenchymatózních orgánů pěti kusů ryb, ale virus se nepodařilo izolovat (2 pasáže). Metodou ELISA bylo vyšetřeno pět vzorků krevních sér stejných ryb. Výsledky jsou demonstrovány přehledně na obr. 2 a v tab. I. Obr. 2 znázorňuje mikrotitrační plotnu po skončeném vyšetření ELISA pěti krevních sér kaprů z rybníka B (sérum č. 1B—5B) a jednoho negativního séra kapra z rybníka P. (sérum č. 1P). Dokazuje snadnost hodnocení výsledků ELISA vyšetření pouhým okem a soulad těchto výsledků s výsledky dosaženými pomocí spektrofotometru.

Podrobné výsledky spektrofotometrického měření u pozitivního (1B) a negativního (1P) séra jsou uvedeny v tab. I. Z ní vyplývá, že poměr absorbancí V : K v jamkách s virovým (V) a kontrolním (K) antigenem



2. Mikrotitrační plotna připravená po ukončení metody ELISA k hodnocení výsledků. Testovaná séra kaprů z rybníku Bezruč (1B — 5B) a rybníku Písečná (1P) byla nanášena v ředěních 1:50 až 1:6400 do dvojice jamek pokrytých virovým (V) a kontrolním (K) antigenem — Microtitration plate to be used for an evaluation of the results when the ELISA method was finished. The tested sera of carp coming from the ponds Bezruč (1B — 5B) and Písečná (1P) were applied at dilution ratios 1:50 and 1:6400 to the pairs of pits with viral (V) and control (K) antigen

I. Enzymoimunologické výsledky spektrofotometrického měření absorbancí v jamkách s virovým (V) a kontrolním (K) antigenem a poměry V:K u pozitivního séra 1B a negativního séra 1P — Enzymoimmunologic results of the spectrophotometric measurement of absorbancies in the pits with viral (K) and control (K) antigen and the V:K ratios in positive serum 1B and negative serum 1P

Ředění séra	Sérum 1B			Sérum 1P		
	E _{492nm}		poměr V : K	E _{492nm}		poměr V : K
	V-Ag	K-Ag		V-Ag	K-Ag	
1 : 50	1,379	0,146	9,45	0,197	0,142	1,38
1 : 100	1,353	0,089	15,20	0,107	0,091	1,17
1 : 200	1,327	0,116	11,44	0,116	0,086	1,35
1 : 400	1,187	0,080	14,84	0,103	0,083	1,24
1 : 800	0,967	0,065	14,88	0,095	0,063	1,51
1 : 1600	0,764	0,055	13,89	0,097	0,075	1,29
1 : 3200	0,571	0,088	6,49	0,099	0,077	1,28
1 : 6400	0,374	0,076	4,92	0,110	0,081	1,35

je u pozitivního séra 1B v celém rozsahu ředění vyšší než 2,0, což je kritérium pro hodnocení positivity, a nejvyšší dosažený poměr V : K = 15,2. U séra 1P se poměr V : K v celém rozsahu ředění pohybuje kolem 1,3 a sérum je hodnoceno jako negativní.

DISKUSE

Srovnání výsledků sérologického (ELISA) a virologického vyšetření kaprů po přirozené infekci *Rhabdovirus carpio* ukázalo, že při akutním projevu onemocnění bývá prokazován pouze nízký titr antivirových protilátek v krvi nemocných ryb a obvykle se daří izolovat virus. Při chronickém průběhu onemocnění bývají titry protilátek vyšší a z orgánů ryb s vysokým titrem protilátek je izolace viru neúspěšná — pravděpodobně v důsledku neutralizace viru protilátkami. Výrazné patomorfologické změny zjišťované při chronické formě onemocnění jsou zřejmě v souvislosti se sekundární bakteriální infekcí, ke které u ryb oslabených virovou infekcí dochází (neuvedené výsledky pokusů).

Obdobné problémy s bakteriálními komplikacemi pozoroval po infekci kaprů rhabdovirem i Goerlich (1983). Také neúspěšná izolace viru u chronického průběhu onemocnění v našich pokusech je v souladu s výsledky jiných autorů (Hattori aj., 1984), kteří použili metody ELISA k průkazu viru infekční nekrózy pankreatu u pstruhů. Zjistili, že po dosažení vrcholu onemocnění se infekčnost viru inaktivovala, i když virový antigen bylo možné v tkáních prokázat.

Při ELISA průkazu protilátek proti RVC je vyšetřovaný vzorek séra současně inkubován v jamkách s pozitivním virovým i kontrolním negativním antigenem. Specifita reakce je zajištěna tím, že v jamkách s navázanými oběma antigeny jsou provedeny kontrolní inkubace s pozitivním a negativním sérem i inkubace bez séra.

Imunologické zvláštnosti rybího organismu a závislost stupně imunitní odpovědi ryb na vyšší teplotě vody, rozvoj sekundární bakteriální infekce u ryb oslabených virovou infekcí — to vše naznačuje problémy při ochraně a tlumení jarní virémie kaprů. Nově vyvinutá metoda ELISA umožňuje stanovit tvorbu antivirových protilátek po infekci i vakcinaci, a může se tak významně uplatnit při stanovení léčebných a preventivních opatření.

V současné době již n. p. Bioveta Ivanovice na Hané připravil nultou sérii ELISA soupravy k diagnostice jarní virémie kaprů. To umožní diagnostikovat a studovat toto onemocnění i na pracovištích, která nejsou pro práci v rybí virologii vybavena.

Literatura

- AHNE, W.: Laboratoriumsdiagnostik fischpathogener Viren. Tierärztl. Umsch., 33, 1978, s. 584-594.
AVTALION, R. R.: Temperature effect on antibody production and immunological memory in carp (*Cyprinus carpio*) immunized against bovine serum albumin (BSA). Immunology, 17, 1969, s. 927-931.
AVTALION, R. R.: Environmental control of the immune response in fish. In: Critical reviews in environmental control (ed.: C. P. Straub). Florida, CRC Press 1981, s. 163-188.
AVTALION, R. R. — WOJDANI, A. — MALIK, Z. — SHAHRABANI, R. — DUCZYMER, M.: Influence of environmental temperature on the immune response

- in fish. Current topics in microbiology and immunology. Berlin, Springer-Verlag 1973. 35 s.
- CLERX, J. P. M. — CASTEL, A. — BOL, J. F. — GERWIG, G. J.: Isolation and characterization of the immunoglobulin of pike (*Esox lucius* L.). *Veter. Immunol. Immunopathol.*, 1, 1980, s. 125-144.
- CONE, R. E. — MARCHALONIS, J. J.: Cellular and humoral aspects of the influence of environmental temperature on the immune system of poikilothermic vertebrates. *J. Immunol.*, 108, 1972, s. 952-957.
- EGBERTS, E. — SECOMBES, C. J. — WELLINK, J. E. — van GRONINGEN, J. J. M. — van MUISWINKEL, W. B.: Analysis of lymphocyte heterogeneity in carp, *Cyprinus carpio* L., using monoclonal antibodies. *Dev. Comp. Immunol.*, 7, 1983, s. 749-754.
- FIEBIG, H. — ABMROSIUS, H.: Strukturelle und immunochemische Untersuchungen am Immunoglobulin des Karpfens (*Cyprinus carpio* L.). III. Valenz und Affinität von Anti-dinitrophenyl-Antikörpern. *Acta biol. med. germ.*, 34, 1975, s. 1681-1695.
- GOERLICH, R.: Untersuchungen zur Immunantwort beim Karpfen (*Cyprinus carpio* L.) unter besonderer Berücksichtigung des Temperatureinflusses. [Inaugural Dissertation.] Bonn 1983. 128 s.
- HÄDGE, D. — RICHTER, R. F. — AMBROSIUS, H.: Strukturelle und immunochemische Untersuchungen am Immunoglobulin des Karpfens (*Cyprinus carpio* L.). V. Tryptische Fragmente des Immunoglobulins M des Karpfens (*Cyprinus carpio* L.). *Acta biol. med. germ.*, 38, 1979, s. 1347-1360.
- HASCHEMEYER, A. E. — MATHEWS, R. W.: Effects of temperature extremes on protein synthesis in liver of toadfish, *Opsanus tau*, in vivo. *Biol. Bull.*, 162, 1982, s. 18-27.
- HASCHEMEYER, E. V. — MATHEWS, R. W.: Temperature dependency of protein synthesis in isolated hepatocytes of Antarctic fish. *Physiol. Zool.*, 56, 1983, s. 78-87.
- HATTORI, M. — KODAMA, H. — ISHIGURO, S. — HONDA, A. — MIKAMI, T. — IZAWA, H.: In vitro and in vivo detection of infectious pancreatic necrosis virus in fish by enzyme-linked immunosorbent assay. *Amer. J. veter. Res.*, 45, 1984, s. 1876-1879.
- KÖLBL, O. — KAINZ, E.: Die Verbreitung des Erregers der infektiösen Bauchwassersucht bzw. der Frühlingsvirämie in österreichischen Karpfenteichwirtschaften. *Österr. Fisch.*, 30, 1977, s. 80-83.
- LAMERS, C. H. J. — de HAAS, M. J. M.: The development of immunological memory in carp (*Cyprinus carpio* L.) to a bacterial antigen. *Dev. comp. Immunol.*, 7, 1983, s. 713-714.
- MACHULLA, K. G. — RICHTER, R. F. — GRUHN, R. — AMBROSIUS, H.: Untersuchungen zur Antikörperheterogenität beim Karpfen (*Cyprinus carpio* L.). I. Elektrophoretische und isoelektrische Spektren von Anti-DNP-Antikörpern. *Acta biol. med. germ.*, 38, 1979, s. 1607-1614.
- MARCHALONIS, J. J.: Isolation and partial characterization of immunoglobulins of gold fish (*Carassius auratus*) and carp (*Cyprinus carpio*). *Immunology*, 20, 1971, s. 161-173.
- RICHTER, R. — FRENZEL, E. M. — HÄDGE, D. — KOPPERSCHLAGER, G. — AMBROSIUS, H.: Strukturelle und immunochemische Untersuchungen am Immunoglobulin des Karpfens (*Cyprinus carpio* L.). I. Analyse am Gesamtmolekül. *Acta biol. med. germ.*, 30, 1973, s. 735-749.
- SECOMBES, C. J. — MANNING, M. J.: Comparative studies on the immune system of fishes and amphibians: antigen localization in the carp *Cyprinus carpio* L. *J. Fish Dis.*, 3, 1980, s. 399-412.
- WILSON, M. B. — NAKANE, P. K.: In: Immunofluorescence and related techniques (eds.: K. Knapp, K. Holubar, G. Wick). Amsterdam, Elsevier/North Holland Biomedical Press 1978, s. 215-225.
- WIZIGMAN, G. — AHNE, W. — SCHLOTTFELDT, J.: Laboratoriumsdiagnose von Virusinfektionen bei Süßwasserfischen unter besonderer Berücksichtigung der viralen hämorrhagischen Septikämie (VHS), der infektiösen Pankreasnekrose (IPN) und der Frühlingsvirämie (SVC). *Tierärztl. Umsch.*, 38, 1983, s. 129-131; s. 197-200.
- WIZIGMAN, G. — PFEIL-PUTZIEN, C. — BAATH, C. — DANGSCHAT, H. — KÖPPEL, G.: Serologische Untersuchungen über das Vorkommen von Antikörpern gegenüber *Rhabdovirus carpio* bei Karpfen in bayerischen Teichwirtschaften. *Fisch u. Umwelt.*, 8, 1980, s. 31-36.

Došlo dne 22. 7. 1985

РОДАК, Л. — ПОСПИШИЛ, З. — ТОМАНЕК, Й. — ВЕСЕЛЫ, Т. — ГАМПЛ, Я. (Научно-исследовательский институт ветеринарии, Брно): Ферменто-иммунологическая диагностика (ELISA) весенней виремии карпа. Veter. Med. (Praha), 31, 1986 (8) : 505-512.

Описано применение ферменто-иммунологического метода (ELISA) для диагностики весенней виремии карпа. Метод основан на определении специфических антител против *Rhabdovirus carpio* в обследуемых рыбных сыворотках. Специфика реакции проверяется при помощи вирусного и контрольного антигенов, путем обследования положительных и отрицательных сывороток и контрольного инкубирования без сыворотки. Метод ELISA позволяет установить присутствие антивирусных антител после заражения или вакцинации и потому он пригоден для подробного исследования и определения годных терапевтических и профилактических мероприятий.

ферменто-иммунологический метод (ELISA); рыбы антитела; *Rhabdovirus carpio*

RODÁK, L. — POSPÍŠIL, Z. — TOMÁNEK, J. — VESELÝ, T. — HAMPL, J. (Veterinary Research Institute, Brno): Enzymoimmunologic (ELISA) Diagnostics of Spring Viremia in Carp. Veter. Med. (Praha), 31, 1986 (8) : 505-512.

The enzymoimmunologic (ELISA) method was used to diagnose spring viremia in carp. The specific antibodies to *Rhabdovirus carpio* in the fish sera were detected by this method. Reaction specificity was tested by the use of viral and control antigens, by examination of positive and negative sera and by serum-free control incubation. Applying the ELISA method, the antiviral antibodies can be detected after infection or vaccination: this method is therefore suitable for thorough studies and when choosing the appropriate treatments and preventive measures.

enzymoimmunologic (ELISA) method; fish antibodies; *Rhabdovirus carpio*

RODÁK, L. — POSPÍŠIL, Z. — TOMÁNEK, J. — VESELÝ, T. — HAMPL, J. (Forschungsinstitut für Veterinärmedizin, Brno): Enzymoimmunologische (ELISA-) Diagnostik der Frühjahrsvirämie der Karpfen. Veter. Med. (Praha), 31, 1986 (8) : 505-512.

Es wird die Anwendung der enzymoimmunologischen (ELISA-) Methode für die Diagnostik der Frühjahrsvirämie der Karpfen beschrieben. Die Methode beruht auf der Ermittlung spezifischer Antikörper gegen *Rhabdovirus carpio* in den untersuchten Karpfenserum. Die Spezifität der Reaktion wird durch Einsatz des Virus- und des Kontrollantigens, durch Untersuchung positiver und negativer Seren und durch Kontrollinkubation ohne Serum, geprüft. Die ELISA-Methode ermöglicht es, das Vorhandensein von Antivirus-Antikörpern nach der Infektion oder Vakzination zu ermitteln. Es ist daher für ausführliche Studien sowie für die Bestimmung zweckentsprechender therapeutischer und präventiver Maßnahmen geeignet.

enzymoimmunologische Methode (ELISA); Antikörper der Fische; *Rhabdovirus carpio*

Adresa autorů:

MVDr. Ladislav Rodák, CSc., MVDr. Zdeněk Pospíšil, CSc., MVDr. Josef Tománek, CSc., ing. Tomáš Veselý, RNDr. Jaroslav Hampl, CSc., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32 Brno

Vrtiak O. J.: Výsledky XVII. zjazdu KSČ	449
Granátová M., Svoboda I.: Průkaz protilátek proti viru bovinní leukózy cytotoxickým testem ve srovnání s jinými sérologickými metodami	451
Franz J., Hampl J., Hofírek B., Škrobák F., Svoboda I., Granátová M.: Radioimunologický průkaz protilátek proti viru leukózy skotu	459
Valíček L., Šmíd B., Rodák L., Jurák E.: Elektronová mikroskopie viru Aujeszkyho choroby (ACH) v explantátech Gasserova ganglia z prasat s latentní infekcí	469
Machatková M., Jurmanová K., Hampl J., Šnejdar V.: Spontánní infekce buněčných linií mykoplazmaty a její detekce fluorescenční metodou	477
Hájková M., Jurmanová K.: Detekce protilátek proti mykoplazmatům enzymoimunologickou metodou	487
Svoboda I., Rodák L., Franz J., Štěpánek J., Valíček L.: Diferenciální diagnostika virových průjmů telat	497
Rodák L., Pospíšil Z., Tománek J., Veselý T., Hampl J.: Enzymoimunologická (ELISA) diagnostika jarní virémie kaprů	505

СОДЕРЖАНИЕ

Гранатова М., Свобода И.: Доказательство наличия антител против вируса бычьего лейкоза цитотоксическим испытанием в сравнении с другими серологическими методами	451
Франц Я., Гампл Я., Гофирек Б., Шкробак Ф., Свобода И., Гранатова М.: Радиоиммунологическое выявление антител против вируса лейкоза крупного рогатого скота	459
Валичек Л., Шмид Б., Родак Л., Юрак Э.: Электронная микроскопия вируса болезни Ауески (ACH) в эксплантатах ганглия Гассера у свиней со скрытой инфекцией	469
Махаткова М., Юрманова К., Гампл Я., Шнейдар В.: Спонтанное заражение клеточных линий микоплазмами и его определение флюоресцентным методом	477
Гайкова М., Юрманова К.: Определение антител против микоплазм ферментно-иммунологическим методом	487
Свобода И., Родак Л., Франц Я., Штепанек Я., Валичек Л.: Дифференциальная диагностика вирусных поносов телят	497
Родак Л., Поспишил З., Томанек Й., Веселы Т., Гампл Я.: Ферментно-иммунологическая диагностика (ELISA) весенней виремии карпа	505

CONTENTS

Granátová M., Svoboda I.: Demonstration of the Antibodies to Bovine Leukosis Virus by a Cytotoxic Test in comparison with Other Serological Methods	451
Franz J., Hampl J., Hofírek B., Škrobák F., Svoboda I., Granátová M.: Radioimmunologic Demonstration of the Antibodies to Bovine Leukosis Virus	459
Valíček L., Šmíd B., Rodák L., Jurák E.: Electron Microscopy of the Aujeszky's Disease Virus in the Explants of the Gasserian Ganglion of Pigs with Latent Infection	469
Machatková M., Jurmanová K., Hampl J., Šnejdar V.: Spontaneous Infection of Cellular Lines by Mycoplasmas and its Detection by a Fluorescent Method	477

Hájková M., Jurmanová K.: Detection of Mycoplasma Antibodies by an Enzymoimmunologic Method	487
Svoboda I., Rodák L., Franz J., Štěpánek J., Valíček L.: Differential Diagnostics of Viral Diarrheas in Calves	497
Rodák L., Pospíšil Z., Tománek J., Veselý T., Hampl J.: Enzymoimmunologic (ELISA) Diagnostics of Spring Viremia in Carp	505

INHALT

Granátová M., Svoboda I.: Nachweis von Antikörpern gegen das Virus der bovinen Leukose durch zytotoxischen Test, im Vergleich mit anderen serologischen Methoden	451
Franz J., Hampl J., Hofírek B., Škrobák F., Svoboda I., Granátová M.: Radioimmunologischer Nachweis von Antikörpern gegen das Virus der Rinderleukose	459
Valíček L., Šmíd B., Rodák L., Jurák E.: Elektronenmikroskopie des Virus der Aujeszky'schen Krankheit (ACH) in Explantaten des Gasser'schen Ganglions aus Schweinen mit latenter Infektion	469
Machatková M., Jurmanová K., Hampl J., Šnejdar V.: Spontane Infektion von Zelllinien durch Mykoplasmen und ihre Detektion mittels Fluoreszenzmethode	477
Hájková M., Jurmanová K.: Detektion von Antikörpern gegen Mykoplasmen mit Hilfe der enzymoimmunologischen Methode	487
Svoboda I., Rodák L., Franz J., Štěpánek J., Valíček L.: Differentialdiagnostik von Virusdurchfällen der Kälber	497
Rodák L., Pospíšil Z., Tománek J., Veselý T., Hampl J.: Enzymoimmunologische (ELISA-) Diagnostik der Frühjahrsvirämie der Karpfen	505

Rukopisy odevzdány k tisku 5. 5. 1986 — Podepsáno k tisku 27. 6. 1986

Rozšiřuje PNS. Informace o předplatném podá a objednávky přijímá každá administrace PNS, pošta, doručovatel a PNS-ÚED Praha, závod 01 — AOT, Kafkova 19, 160 00 Praha 6; PNS-ÚED Praha, závod 02, Obránců míru 2, 656 07 Brno; PNS-ÚED Praha, závod 03, Kubánská 1539, 708 72 Ostrava-Poruba. Objednávky do zahraničí vyřizuje PNS — ústřední expedice a dovoz tisku Praha, závod 01, administrace vývozu tisku, Kafkova 19, 160 00 Praha 6. Vytiskl MÍR, novinářské závody, n. p., závod 6, tř. Lidových milicí 22, 120 00 Praha 2.