

Marta CHROBOCIŃSKA

Poziom przeciwciał w surowicach królików szczepionych i zakażonych wirusem myksomatozy

The Level of Antibodies in Sera of Rabbits Vaccinated and Infected with Myxoma Virus

Wzrastająca w Polsce po 1980 r. liczba ognisk myksomatozy królików (np. w 1983 r. chorobę stwierdzono w 29 województwach, w 5663 ogniskach i zlikwidowano 53401 królików) uzasadnia szerokie stosowanie szczepień zapobiegawczych (9). W ostatniej dekadzie wiele przypadków przebiegało podklinicznie, a nawet występowały zakażenia bezobjawowe (obserwacje własne). Celem badań było sprawdzenie występowania i wysokości miana przeciwciał u królików szczepionych zapobiegawczo, zakażonych doświadczalnie oraz u zwierząt szczepionych, a następnie zakażonych zjadliwym wirusem myksomatozy, a także porównanie niezawodności i czułości badania serologicznego wykonanego odczynem wiązania dopełniacza (OWD) i precypitacji w żelu agarowym (PŻ).

MATERIAŁ I METODY

Szczepy wirusa. Wykorzystano namnożony w hodowli komórek RK₁₃ szczep atenuowany MAV oraz namnożony przez zakażenie doświadczalne zjadliwy szczep wirusa myksomatozy ZA (5, 9). Miano szczepu MAV wynosiło $10^{5.5}$ TCID₅₀ w 1 ml, a miano oznaczone przy miareczkowaniu na skórze królików jako ID₅₀ – $10^{6.3}$ w 1 ml. Szczep ZA osiągnął wartość ID₅₀ $10^{6.5}$ w 1 ml. Szczepienie i zakażanie królików wykonano przez podskórne wprowadzanie 1 ml szczepu MAV lub 1 ml 20% homogenizatu skóry z miejsc zmienionych chorobowo królików zakażonych ZA (5).

Surowice do badań. Przed szczepieniem lub zakażeniem kontrolnym od wszystkich królików pobierano krew i przygotowane surowice zamrażano. W ten sam sposób postępowano z krwią pobraną w różnym okresie po szczepieniu i zakażeniu.

Odczyn wiązania dopełniacza (OWD) wykonano w sposób opisany w instrukcji Ministerstwa Rolnictwa nr 52 z 30 maja 1980, wprowadzając zmiany niezbędne przy badaniach wirusologicznych, natomiast odczyn precypitacji w żelu agarowym (PŻ) według instrukcji z 10 sierpnia 1974 r. W obydwu odczynach używano surowic kontrolnych: ujemną i dodatnią, uzyskaną od królika poddanego immunizacji szczepem MAV. Jako miano w OWD przyjęto odwrotność najwyższego rozcieńczenia surowicy, w którym nastąpiło 50% zahamowanie hemolizy erytrocytów barana. Jako antygenu używano szczepu MAV w optymalnym rozcieńczeniu, określonym badaniem w układzie szachownicy. W odczynie PŻ jako antygenu używano szczepu ZA w postaci 20% homogenizatu skóry z miejsc zmienionych chorobowo.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Na podstawie danych (tab. 1) należy stwierdzić, że u 1 z 8 królików szczepionych szczepem MAV przeciwciała o mianie 2 stwierdzono już po 4 dniach. Najwyższy odsetek królików wykazujących przeciwciała stwierdzono w surowicach pobranych 14 dnia po szczepieniu (wynosił on 42,3%). Po tym okresie liczba królików wykazujących przeciwciała i wysokość miana w OWD systematycznie się zmniejszała. Badania surowic w odczynie PŻ dało wynik ujemny.

Analiza zebranych wyników (tab. 2) wskazuje, że po zakażeniu szczepem ZA odsetek królików wykazujących w surowicach przeciwciała wynosił po 7 dniach 25%, po 11–22 dniach ponad 90%. Między 27 a 119 dniem (dalej nie badano) przeciwciała stwierdzano we wszystkich surowicach. Najwyższe miana przeciwciał wiążących dopełniacz wystąpiły między 3 a 6 tygodniem po zakażeniu i wynosiły 256.

Podane wyniki OWD u królików szczepionych i zakażonych szczepem ZA (tab. 3) zarówno w przypadku dynamiki odpowiedzi serologicznej, jak i procentu królików posiadających przeciwciała różniły się wyraźnie od danych w tab. 1 i były podobne do danych w tab. 2. Wysokość średniej arytmetycznej miana przeciwciał i odsetek królików posiadających przeciwciała ulegał zmniejszeniu w końcowym okresie obserwacji (ryc. 1). Wynik ten odbiega od oczekiwanego, gdyż należało się spodziewać, w efekcie dwukrotnego działania antygeny, wzrostu wysokości miana przeciwciał w konsekwencji takiego samego, tj. 100% odsetka królików posiadających przeciwciała w surowicach z krwi pobranej między 3 a 7 tygodniem obserwacji po zakażeniu kontrolnym. Wykazano zatem, że skróceniu uległ okres utrzymywania się przeciwciał u królików szczepionych i zakażonych w porównaniu do królików zakażonych wyłącznie doświadczalnie (tab. 2).

Wielu badaczy doniosło o braku przeciwciał przy ostrym przebiegu myksomatozy, prowadzącym w ciągu 10–15 dni do śmierci (1, 3, 6, 7, 8). Goodrich i wsp. (4) przy pomocy metody seroneutralizacji wykryli obecność przeciwciał w 6 dniu po zakażeniu, ale ich wzrost nie korelował z przeżywalnością królików. Picavet (10) wzmiankował o jednoczesnym występowaniu antygeny i przeciwciał w krwi do 20 dnia po zakażeniu. Przy przebiegu przewlekłym przeciwciała wykrywano od 10 dnia po zakażeniu (1, 7, 8). Wetherall i wsp. (11) wykazali najwyższy poziom przeciwciał w teście Elisa w 4 tygodniu po zakażeniu królików szczepem atenuowanym FS 98. W populacji królików wolno żyjących po epizootii myksomatozy stwierdzili podniesiony poziom przeciwciał u 80% królików. Również inni badacze obserwowali występowanie przeciwciał (wykazywanych przy pomocy testu PŻ) u królików ozdowieńców po epizootiach myksomatozy w Australii (2, 12).

Badania własne wykazały, że testem PŻ niezawodnie wykrywano przeciw-

Tab. 1. Występowanie i miano przeciwciał w OWD w surowicach królików szczepionych atenuowanym wirusem myksomatozy (szczep MAV)
Antibody titre in CF test in sera of rabbits vaccinated with attenuated myxoma virus (Mav strain)

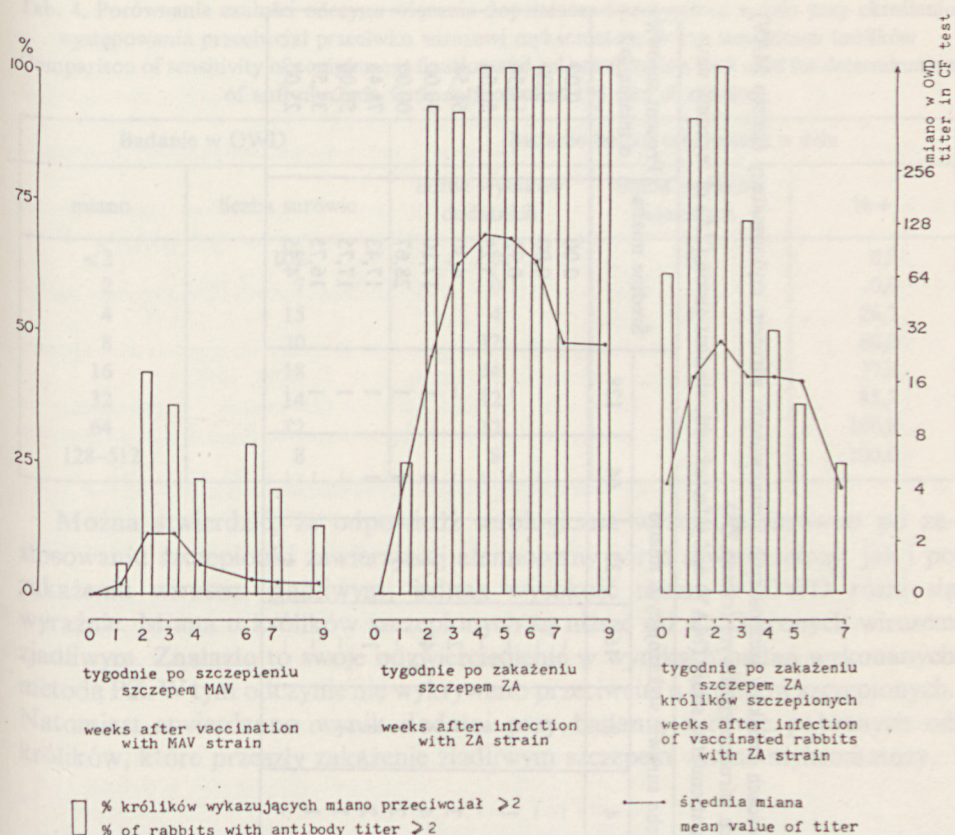
Dni p.v.	Liczba bada- nych surowic	Liczba surowic wykazujących miano					Średnia miana	Procent surowic o mianie ≥ 2
		<2	2	4	8	16		
0	30	30	—	—	—	—	0,00	0,00
4	8	7	1	—	—	—	0,25	12,50
7-10	34	32	—	1	1	—	0,35	5,88
14-15	26	15	2	4	5	—	2,31	42,31
19-22	25	16	1	4	3	1	2,32	36,00
27-28	9	7	1	—	1	—	1,11	22,22
41	7	5	2	—	—	—	0,57	28,57
49-53	10	8	2	—	—	—	0,40	20,00
63-64	15	13	1	1	—	—	0,40	13,33

Objaśnienia do tab. 1-3: p.v. – po szczepieniu, p.i. – po zakażeniu, OWD – odczyn wiązania dopełniacza.

Explanation to Tables 1-3: p.v. – post vaccination, p.i. – post infection, CF – complement fixation.

Tab. 2. Występowanie i miano przeciwciał w OWD w surowicach królików zakażonych zjadliwym wirusem myksomatozy (szczep ZA)
 Antibody titre in CF test in sera of rabbits infected with virulent myxoma virus (ZA strain)

Dni p.v.	Liczba bada- nych surowic	Liczba surowic wykazujących miano									Średnia miana	Procent surowic o mianie ≥ 2
		<2	2	4	8	16	32	64	128	256		
0	11	11	—	—	—	—	—	—	—	—	0,00	0,00
7	16	12	—	—	—	3	1	—	—	—	5,00	25,00
11-14	14	1	2	2	2	3	2	1	1	—	23,71	92,86
19-22	12	1	—	—	—	—	2	4	5	—	80,00	91,67
27-28	3	—	—	—	—	—	1	1	—	1	117,33	100,00
35	7	—	—	—	—	1	2	1	1	2	112,00	100,00
40-43	5	—	—	—	—	—	1	2	2	—	83,20	100,00
48-55	4	—	—	—	—	1	3	—	—	—	28,00	100,00
62-69	5	—	—	—	1	2	1	1	—	—	27,20	100,00
119	3	—	—	—	1	1	1	—	—	—	18,67	100,00



Ryc. 1. Kształtowanie się miana w OWD i odsetek królików wykazujących przeciwciała po szczepieniu (szczep MAV) i zakażeniu (szczep ZA) wirusem myksomatozy
Changes of antibody titre in CF test and percentage of rabbits with antibodies after vaccination (strain MAV) and infection (strain ZA) with myxoma virus

ciała o mianie w OWD 64 i powyżej (tab. 4). Surowice, których miano w OWD wynosiło 2 i 4, były w PŻ ujemne. Przy kolejnych wartościach miana w OWD, tj. 8, 16 i 32, zwiększał się odsetek wyników dodatnich w PŻ (tab. 4). Podobną ocenę przydatności odczynów OWD i PŻ przedstawił Picavet (10), który 100% wyników dodatnich w PŻ uzyskał także przy badaniu surowic wykazujących w OWD miano ≥ 64 . Biorąc pod uwagę fakt, że najwyższe miano w OWD po zastosowaniu szczepionki wynosiło 16 (tylko w jednej surowicy) można uznać z wysokim prawdopodobieństwem, że wynik dodatni badania serologicznego w odczynie PŻ świadczy nie o szczepieniu, ale o przebyciu zakażenia zjadliwym wirusem myksomatozy.

Tab. 3. Występowanie i miano przeciwciał w OWD w surowicach królików szczepionych atenuowanym wirusem myksomatozy (szczep MAV) i zakażonych wirusem zjadliwym (szczep ZA)

Antibody titre in CF test in sera of rabbits vaccinated with attenuated strain (MAV) and infected with virulent strain (ZA) of myxoma virus

Dni		Liczba badanych surowic	Liczba surowic wykazujących miano								Średnie miana	Procent surowic o mianie ≥ 2
p.v.	p.i.		<2	2	4	8	16	32	64	128		
0	—	13	13	—	—	—	—	—	—	—	0,00	0,00
4	—	4	4	—	—	—	—	—	—	—	0,00	0,00
7–10	—	13	11	—	1	1	—	—	—	—	0,92	15,38
14–15	—	8	4	1	—	3	—	—	—	—	3,25	50,00
21–25	0	13	5	2	3	1	2	—	—	—	4,30	61,54
28–32	7	20	2	3	4	4	4	1	1	1	17,10	90,00
35–39	14	9	—	1	2	3	—	1	1	1	28,67	100,00
40–46	19–21	14	4	2	2	3	1	—	1	1	17,43	71,43
49–54	28–29	8	4	1	1	1	—	—	—	1	17,75	50,00
56–61	35–36	8	5	1	1	—	—	—	—	1	16,75	37,50
74	49	8	6	1	—	—	—	1	—	—	4,25	25,00

Tab. 4. Porównanie czułości odczynu wiązania dopełniacza i precypitacji w żelu przy określaniu występowania przeciwciał przeciwko wirusowi myksomatozy w 196 surowicach królików
Comparison of sensitivity of complement fixation and gel precipitation tests used for determination of anti-myxoma virus antibodies in 196 sera of rabbits

Badanie w OWD		Badanie testem precypitacji w żelu		
miano	liczba surowic	liczba wyników dodatnich	liczba wyników ujemnych	% +
<2	102	0	102	0,0
2	7	0	7	0,0
4	15	4	11	26,7
8	20	12	8	60,0
16	18	14	4	77,8
32	14	12	2	85,7
64	12	12	0	100,0
128-512	8	8	0	100,0

Można stwierdzić, że odpowiedź serologiczna występuje zarówno po zastosowaniu szczepionki zawierającej atenuowany wirus myksomatozy, jak i po zakażeniu wirusem zjadliwym, jednak wysokość miana w OWD różni się wyraźnie. Miana u królików szczepionych są niższe niż u zakażonych wirusem zjadliwym. Znalazło to swoje odzwierciedlenie w wynikach badań wykonanych metodą PŻ. W tym odczynie nie wykrywano przeciwciał u królików szczepionych. Natomiast stwierdzono wynik dodatni przy badaniu surowic pobranych od królików, które przeszły zakażenie zjadliwym szczepem wirusa myksomatozy.

PIŚMIENNICTWO

1. Chapple P. J., Bowen E. T. W., Lewis N. D.: Some observations on the use of the Ouchterlony gel diffusion technique in the study of myxomatosis. *J. Hyg., Camb.* **61**, 373, 1963.
2. Edmonds J. W., Shepherd R. C. H., Nolan I. F.: Myxomatosis: the occurrence of antibody to soluble antigen of myxoma virus in wild rabbits, *Oryctolagus cuniculus* (L.), in Victoria, Australia. *J. Hyg., Camb.* **81**, 245, 1971.

3. Fenner F., Woodroffe G. M.: The pathogenesis of infectious myxomatosis: the mechanism of infection and the immunological response in the European rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). Brit. J. Exp. Pathol. **34**, 400, 1953.
4. Goodrich J. M., Lee K. W., Hinze H. C.: *In vitro* and *in vivo* inhibition of myxoma virus by treatment with phosphonoacetic acid. Arch. Virol. **70**, 157, 1981.
5. Górski J., Mizak B., Mizak Z.: Wyosobnienie i niektóre właściwości krajowych szczepów wirusa myksomatozy. Medycyna Wet. **41**, 282, 1985.
6. Hamon F. M.: Contribution a l'etude serologique de la myxomatose application des techniques d'immunofluorescence indirect et des techniques immunoenzymatiques. These Doct. Vet., Ecole Nationale Veterinaire de Toulouse, No 85, 1984.
7. Mansi W.: Serological investigation of myxoma and fibroma viruses. I. Complement-fixation test. J. Comp. Path. **67**, 208, 1957.
8. Mansi W., Thomas V.: Serological investigation in the study of myxoma and fibroma viruses. II. The gel diffusion precipitation test. J. Comp. Path. **68**, 1988, 1958.
9. Mizak B.: Właściwości wybranych szczepów wirusów fibromatozy i myksomatozy ze szczególnym uwzględnieniem przydatności do produkcji szczepionki. Praca doktorska, Instytut Weterynarii, Puławy 1987.
10. Picavet D. P.: Contribution a l'etude serologique de la myxomatose. These Doct. Vet., Ecole Nationale Veterinaire de Toulouse, No 43, 1978.
11. Wetherall J. D., Clay D. E., King D. R.: Humoral immunity to myxoma virus in wild rabbits. Aust. Wildl. Res. **10**, 277, 1983.
12. Williams R. T., Dunsmore J. D., Sobey W. R.: Fluctuations in the titre of antibody to a soluble antigen of myxoma virus in field populations of rabbits, *Oryctolagus cuniculus* (L.), in Australia, J. Hyg., Camb. **71**, 487, 1973.

SUMMARY

The level of antibodies anti-myxoma virus was investigated by complement fixation (CF) and gel precipitation (GP) tests in sera of rabbits vaccinated with MAV strain and/or infected with ZA strain. In vaccinated rabbits antibodies in CF test were detected after 14 days and only in 42% tested sera and that was the highest percentage of positive sera. At the same time antibodies tested by CF test were noted in 92.8% of sera collected from rabbits infected with virulent strain and during 119 days of observation antibodies were present in all tested sera. The antibody titre in vaccinated and infected rabbits differ significantly and they were higher in infected rabbits. The GP test enabled detection of anti-myxoma antibodies only in rabbits which survived infection with virulent strain.