

WETERYNARIA	N O R M A B R A N Ź O W A	BN-81
	Drób	9102-18
	Metody laboratoryjnego rozpoznawania zakaźnego zapalenia krtani i tchawicy	Grupa katalogowa 1578

1. WSTĘP

1.1. Przedmiot normy. Przedmiotem normy są metody laboratoryjnego rozpoznawania zakaźnego zapalenia krtani i tchawicy u kur i bażantów.

1.2. Zakres stosowania normy. Normę należy stosować w przypadkach oceny zdrowotności stada reprodukcyjnego, z którego pochodzą pisklęta i jaja wylęgowe będące przedmiotem wymiany towarowej między PRL a pozostałymi krajami RWPG.

2. ZASADY OGÓLNE

2.1. Charakterystyka drobnoustroju. Drobnoustrój, wywołujący zakaźne zapalenie krtani i tchawicy, zaliczany jest do grupy wirusów Herpes, zawiera kwas dezoksyrybonukleinowy (DNA), a jego wielkość wynosi 250 nm.

2.2. Rozpoznawanie choroby. Rozpoznawanie zakaźnego zapalenia krtani i tchawicy stawia się na podstawie danych epizootologicznych, objawów klinicznych, zmian anatomopatologicznych i wyników badania laboratoryjnego.

2.3. Wrażliwość drobiu na chorobę. Na chorobę wrażliwe są tylko kury i bażanty wszystkich ras i wieku, niezależnie od pory roku i sposobu chowu. Choroba rozprzestrzenia się szybko, przebiega w formie enzoozji, z różnymi wskaźnikami zachorowalności i śmiertelności.

2.4. Okres wylegania choroby trwa od 6 do 12 dni. U ptaków chorych obserwuje się osowiałość, utrudnione oddychanie, kichanie, charczenie, napady kaszlu z wyrzucaniem śluzu, często z domieszką krwi lub mas serowatowłóknikowych. Lekka postać choroby charakteryzuje się łzawieniem, zapaleniem spojówek, wyciekaniem z nosa, obrzękiem zatok podoczodołowych i obniżeniem nieśności.

2.5. Zmiany anatomopatologiczne i histologiczne. W czasie sekcji u ptaków najczęściej stwierdza się wybroczyny w tchawicy i krtani, wysięk krwawy lub masy serowate o zabarwieniu żółtawym zatykające światło tchawicy i powodujące uduszenie. Płuca bywają często przekrwione, w niektórych przypadkach stwierdza się zapalenie płuc ze stanem zapalnym worków powietrznych.

3. BADANIA

3.1. Badanie wirusologiczne polega na pobieraniu wyćinka błony śluzowej krtani, tchawicy, spojówek, przewodów nosowych (włączając wysięk) oraz płuc od świeżo padłych lub poddanych ubojowi diagnostycznemu wykazania swoistych wewnątrzkomórkowych ciałek wtrętowych w materiałach patologicznych istnieje tylko w początkowej fazie choroby, między 2 a 7 dniem od zakażenia. Pobrany materiał do badań wirusologicznych należy zamrozić i przechowywać w temperaturze minus 20 °C lub niższej.

3.2. Badanie serologiczne polega na pobraniu krwi 14 i 28 dnia, licząc od początku choroby, nie mniej niż 5 ptaków, po 5 cm³ od każdego ptaka. Następnie wydzielić surowicę i do rozpoczęcia badań przechowywać (bez dodatku konserwantów) w stanie zamrożonym w temperaturze minus 20 °C lub niższej.

4. METODA WYKRYWANIA WEWNĄTRZKOMÓRKOWYCH CIAŁEK WTRĘTOWYCH

4.1. Zasada metody. Metoda polega na mikroskopowym wykrywaniu kwasochłonnych wewnątrzkomórkowych ciałek wtrętowych (ciałka Seifrieda), które uważa się za patognomoniczne.

4.2. Aparatura i odczynniki

- Mikroskop.
- Szkiełka podstawowe.
- Płytki Petriego.
- Barwnik Giemzy.

4.3. Opis metody. W celu wykazania wewnątrzkomórkowych ciałek wtrętowych należy na szkiełku podstawowym przygotować preparaty mazane z błony śluzowej narządów wymienionych w 3.1, zabarwić je roztworem barwnika Giemzy (1 kropla na 1 cm³ wody destylowanej), następnie przetrzymać w ciągu 12 ÷ 13 h w temperaturze pokojowej lub 2 h w temperaturze 37 °C i przejrzeć w mikroskopie pod immersją.

4.4. Ocena wyników badania. O obecności wewnątrzkomórkowych ciałek wtrętowych świadczy następujący obraz badanego preparatu: jądra zmienionych komórek są powiększone, ich błony są zabarwione znacznie in-

Zgłoszona przez Instytut Weterynarii
Ustanowiona przez Ministra Rolnictwa dnia 13 maja 1981 r.
jako norma obowiązująca od dnia 14 sierpnia 1981 r.
(Dz. Norm. i Miar nr 13/1981 poz. 59)

tensywniej na ciemnofioletowo, cytoplazma zabarwia się na jasnoniebiesko, a ciała wtrętowe wewnątrzjądrowe (okrągłe, owalne, trójkątne) — na czerwono. Dookoła ciałek wtrętowych występuje strefa nie zabarwiona.

5. METODA IZOLACJI WIRUSA

5.1. Zasady metody. Metoda polega na izolowaniu wirusa na zarodkach kurzych lub w hodowli komórkowej.

5.2. Aparatura, materiały, odczynniki i podłoża

- a) Termostat lub inkubator.
- b) Moździerz porcelanowe.
- c) Wirówki.
- d) Homogenizator do rozdrabniania tkanek.
- e) Probówki.
- f) Butelki.
- g) Strzykawki i igły.
- h) Termometr.
- i) Penicylina.
- j) Streptomycyna.
- k) Zarodki kurze 9 ÷ 12 dniowe.
- l) Hodowla komórek nerki zarodków kurzych i kurcząt.

l) Hydrolizat laktoalbuminy 0,5 % w płynie Hanksa.

5.3. Przeprowadzenie badań

5.3.1. Przygotowanie materiału do badania. Materiał patologiczny, pobrany w celu wyizolowania wirusa (wg 3.1), poddać homogenizacji w izotonicznym roztworze buforowym w stosunku 1 ÷ 5, w homogenizatorze lub moździerzu z piaskiem kwarcowym. Mieszaninę wirować przy 1500 ÷ 2000 obr/min w ciągu 10 ÷ 15 min. Płyn z nad osadu zlać, dodać po 1000 jednostek penicyliny i streptomycyny na 1 cm³ zawiesiny i przetrzymać w temperaturze 2 ÷ 4 °C w ciągu 3 ÷ 12 h.

5.3.2. Izolowanie wirusa. Przy izolacji wirusa na zarodkach kurzych do każdej próby użyć po 10 9 ÷ 12-dniowych zarodków kurzych. Przygotowany zgodnie z 5.3.1 materiał wprowadzić na błonę kosmówkowo-omoczniową w ilości po 0,1 ÷ 0,2 cm³. Zarodki zakażone oraz kontrolne inkubować jednocześnie w temperaturze 37 °C przez 8 dni. Zarodki prześwietlać nie rzadziej niż jeden raz na dobę, odrzucając zamarłe w ciągu pierwszych 24 h. Zamarłe później natychmiast usuwać i przechowywać w chłodni w temperaturze +4 °C. Pozostałe zarodki poddać schłodzeniu 6 ÷ 8 dnia po zakażeniu, umieszczając je na 2 ÷ 3 h w temperaturze +4 °C.

5.4. Ocena wyników badań

5.4.1. Wykrywanie wirusa. Patogenne szczepy wirusa zakaźnego zapalenia krtani i tchawicy zabijają zarodki w ciągu 4 ÷ 6 dni; w przypadku zakażenia bardziej łagodnymi szczepami zarodki giną później lub pozostają żywe, lecz są zahamowane w rozwoju, pomniejszone i lżejsze. Dla wykrycia swoistego zakażenia zarodka kurzego konieczne jest przeprowadzenie dodatkowych 2 ÷ 3 ślepych pasażów. Do następnego pasażu wirusa użyć do zakażenia błonę kosmówkowo-omoczniową, zawieszoną w płynie omoczniowym, oraz cały zarodek. Na powierzchni błony kosmówkowo-omoczniowej zarodków, które zamarły w 3 ÷ 5 dniu po

zakażeniu, stwierdza się swoiste zmiany, zmętnienie, zgrubienie błony kosmówkowo-omoczniowej, a na niej małe (wielkości główki od szpilki lub większe o średnicy 5 ÷ 7 mm) ogniska koloru od szarego do żółto-białawego, o różnym kształcie — okrągłe, płaskie lub bezkształtne.

5.4.2. Identyfikacja wyizolowanego wirusa. Wyizolowanie wirusa powinno być potwierdzone wykazaniem wewnątrzkomórkowych ciałek wtrętowych (ciałka Seifrieda), odczynem neutralizacji, reakcją precypitacji dyfuzyjnej w żelu agarowym lub próbą biologiczną. Identyfikacji wirusa można dokonać za pomocą odczynu immunofluorescencji i mikroskopii elektronowej.

5.4.3. Namnażanie wirusa. Wirus zakaźnego zapalenia krtani i tchawicy należy namnażać w hodowli komórkowej nerek zarodków kurzych i kurcząt. Efekt cytopatyczny występuje w 4 ÷ 6 dnia po zakażeniu. Obserwuje się obecność licznych wielojądrowych komórek (polikariocytów). Pod mikroskopem można w nich stwierdzić wewnątrzkomórkowe ciała wtrętowe. Swoistość tych zmian należy potwierdzić za pomocą odczynu immunofluorescencji lub odczynu seroneutralizacji ze swoistymi surowicami.

6. METODA NASTAWIANIA PRÓBY BIOLOGICZNEJ

6.1. Zasada metody. Metoda polega na wywołaniu zakaźnego zapalenia krtani i tchawicy u wrażliwych młodych kurcząt; pozwala ona na określenie zjadliwości szczepu oraz odróżnienie go od wirusów, wywołujących podobne zmiany na błonie kosmówkowo-omoczniowej u zakażonych zarodków kurzych.

6.2. Materiały

- a) Pipety pasteurowskie.
- b) Strzykawki.
- c) Igły do strzykawek.

6.3. Przeprowadzenie badania. Do próby biologicznej należy używać młode, wrażliwe kurczęta w wieku 1 ÷ 2,5 miesięcy. Ptaki zakażać przez wprowadzanie materiału zawierającego wirus, dotchawicowo i przez wcieranie go w błonę śluzową kloaki. Zakażone ptaki obserwować przez 10 ÷ 14 dni.

6.4. Ocena wyników badania

6.4.1. Badanie kliniczne. O zakaźnym zapaleniu krtani i tchawicy świadczą następujące objawy kliniczne: kaszel, charczenie, porażenie krtani, katar występuje u kurcząt w 3 ÷ 7 dni lecz nie później niż 12 dni po zakażeniu. Stan zapalny błony śluzowej stwierdza się u ptaków zakażonych do kloaki. Niektóre bardziej łagodne szczepy, nawet i w dużych dawkach, wywołują tylko charczenie i wyciek z nozdrzy.

6.4.2. Wykluczenie wirusa ospy kur. W celu wykluczenia wirusa ospy kur, który wywołuje ogniska na błonie kosmówkowo-omoczniowej, podobne do wirusa zakaźnego zapalenia krtani i tchawicy, należy zakażać wrażliwe kurczęta w wieku 30 ÷ 60 dni, wcierając im materiał zawierający wirus do skaryfikowanych brodawek piór na udzie, do grzebienia oraz podając go do krtani. Reakcja na wirus ospy występuje u ptaków w 6 ÷ 8 dni po zakażeniu w postaci obrzęku i przekrwienia brodawek piór oraz tworzenia się dyfterytycznych

nalotów w jamie dzioba. Przy badaniu metodą wg Morozowa w rozmazach z obrzękłych brodawek zwykle stwierdza się elementarne ciała wirusa ospy.

7. METODA SEROLOGICZNA

7.1. Zasada metody. Metoda polega na wykrywaniu u ptaków swoistych przeciwciał za pomocą odczynu seroneutralizacji oraz reakcji precypitacji dyfuzyjnej w żelu agarowym.

7.2. Aparatura

- a) Łaźnia wodna.
- b) Termostat.
- c) Mikroskop.
- d) Wirówka.
- e) Lodówka z zamrażalnikiem.
- f) Statywy.
- g) Palnik gazowy.
- h) Probówki bakteriologiczne.
- i) Korki gumowe.
- j) Pipety pomiarowe pojemności 1, 2, 5, 10 i 100 cm³,
- k) Homogenizator do rozdrabniania tkanek.
- l) Pehametr.
- ł) Płyty Petriego.
- m) Szkiełka podstawowe.

7.3. Odczynniki, roztwory, podłoża i materiały

- a) Penicylina.
- b) Streptomycyna.
- c) Agar oczyszczony.
- d) Chlorek sodowy.
- e) Weronal (*Acidum diaethyl barbituricum*).
- f) Medinal (*Barbital, Natrium*).
- g) Woda destylowana.
- h) Zarodki kurze 9 ÷ 12-dniowe.
- i) Hodowla komórek nerki zarodków kurzych lub kurcząt.
- j) Podłoża do hodowli komórkowych.

7.4. Przygotowanie do badania

7.4.1. Przygotowanie roztworu buforu weronalowego o pH 7.2. Odważyć 1,84 g weronalu, rozpuścić w 100 cm³ gorącej wody destylowanej, doprowadzić do wrzenia, a następnie po ostudzeniu objętość uzupełnić wodą destylowaną do 1000 cm³. W tym roztworze rozpuścić 10,3 g medinalu (*Barbital Natrium*). Roztwór przechowywać w temperaturze nie wyższej niż +4 °C.

7.4.2. Przygotowanie agaru 1,5 %. Odważyć 1,5 g suchego agaru, dodać 100 cm³ buforu weronalowego i 8 g chlorku sodowego, następnie podgrzewać w łaźni wodnej o temperaturze 80 °C do pełnego rozpuszczenia i rozlać do płytek Petriego lub na szkiełka podstawowe, tak aby grubość warstwy była nie mniejsza niż 6 mm. Po zastygnięciu w agarze wyciąć baseniki o średnicy 4 mm (odległość między basenkami 8 ÷ 10 mm), rozmieszczając je w rogach kwadratu lub sześciokąta i jeden basenik w centrum.

7.4.3. Przygotowanie antygeny. Antygen do odczynu neutralizacji i reakcji precypitacji dyfuzyjnej w żelu agarowym przygotować z błon kosmówkowo-omocznionych zarodków kurzych, wykazujących zmiany charakterystyczne dla danego wirusa. Błony kosmówkowo-omocznione homogenizować z równą ilością izotonicznego roztworu buforowego o pH 7,2 ÷ 7,4, do którego dodano antybiotyki (w przeliczeniu po 100 jednostek penicyliny i streptomycyny na 1 cm³ roztworu). Zawiesinę wirować w ciągu 20 min przy 3000 obr/min. Płyn z nad osadu zlać i wykorzystywać jako antygen, jeśli zawiera on nie mniej niż 10⁵EID₅₀/1 cm³. Do chwili użycia antygen przechowywać w zatonionych ampułkach w stanie zamrożenia.

7.4.4. Przygotowanie surowic. Surowice (ptaków chorych lub rekonwalescentów, kontrolne dodatnie i ujemne kurze) inaktywować w łaźni wodnej w temperaturze 56 °C w ciągu 30 min i do rozpoczęcia badań przechowywać również w stanie zamrożenia.

7.5. Przeprowadzenie badania

7.5.1. Odczyn seroneutralizacji przeprowadzić na zarodkach kurzych lub hodowlach komórkowych, używając stałej ilości surowicy i wzrastających dziesięciokrotnych rozcieńczeń wirusa — antygeny. Odczyn seroneutralizacji przeprowadzać wg schematu przedstawionego w tablicy.

Do statywu wstawić kilka rzędów jałowych probówek. Liczba rzędów odpowiada liczbie surowic badanych, a liczba probówek w rzędzie — liczbie rozcieńczeń antygeny wirusowego. Do wszystkich probówek w rzędzie wlać po 0,5 cm³ odpowiedniej surowicy. Równolegle nastawić badanie kontrolne z surowicą normalną (znaną ujemną) i odpornościową (znaną dodatnią) przeciwko zakaźnemu zapaleniu krtani i tchawicy w tych samych dawkach. Następnie do wszystkich probówek z surowicami badanymi i kontrolnymi dodać

Nr rzędu	Numery probówek	Surowica normalna cm ³	Surowica odpornościowa cm ³	Rozcieńczenia wirusa				
				10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
1	1	0,5	—	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
	2	0,5	—					
	3	0,5	—					
	4	0,5	—					
	5	0,5	—					
2	1	—	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
	2	—	0,5					
	3	—	0,5					
	4	—	0,5					
	5	—	0,5					

tę samą ilość ($0,5 \text{ cm}^3$) odpowiednich dziesięciokrotnych rozcieńczeń antygenu wirusowego. Antygen można rozlewać tą samą pipetą, jeśli zaczyna się od najwyższego rozcieńczenia. Probówki energicznie wstrząsnąć i pozostawić w temperaturze pokojowej na 1 h. Każdym rozcieńczeniem zakazić po $4 \div 5$ zarodków (lub $4 \div 5$ probówek hodowli komórkowej), wprowadzając materiał na błonę kosmówkowo-omoczniową w ilości po $0,2 \text{ cm}^3$. Jaja inkubować w temperaturze 37°C w ciągu 6 dni, przeprowadzając prześwietlenie raz na dobę. Zamarłe w ciągu pierwszych 24 h zarodki wyrzucić, a pozostałe poddać schłodzeniu 6 dnia i otworzyć jaja w celu stwierdzenia obecności swoistych zmian na błonie kosmówkowo-omoczniowej zarodków.

W odczynie seroneutralizacji należy używać surowice nierozcieńczone, ponieważ mogą wystąpić pewne niepożądane różnice pomiędzy indeksem neutralizacyjnym z tą samą surowicą, jeśli używa się ją w stanie rozcieńczonym i nierozcieńczonym. Mimo to, gdy ilość surowicy jest niewystarczająca, rozcieńczyć ją do niezbędnego minimum (1 : 2, 1 : 3 itd.). W tym przypadku do wyliczonego indeksu neutralizacji dodać odpowiedni współczynnik rozcieńczenia ($\log 2$, $\log 3$ itd.).

7.5.2. Reakcja precypitacji dyfuzyjnej w żelu agarowym. Do centralnie położonego basenika wlać antygen, a do pozostałych — surowice (lub odwrotnie) w ilości po około $0,2 \text{ cm}^3$. Do każdej serii badanej dołączyć kontrolny antygen i kontrolną surowicę. Próby pozostawić w komorze wilgotnej w ciągu 3 dni w temperaturze pokojowej lub przez $14 \div 18$ h w temperaturze termostatu 37°C .

7.6. Ocena wyników badania

7.6.1. Obliczenie indeksu neutralizacji. Na podstawie uzyskanych wyników odczynu seroneutralizacji obliczyć wg Reeda i Muencha infekcyjną dawkę dla 50 % zarodków (EID_{50}) lub infekcyjną dawkę dla 50 % hodowli komórkowej — TCID_{50} dla mieszaniny wirusa z każdą surowicą oddzielnie.

Indeks neutralizacji jest to różnica między logarytmami EID_{50} mieszaniny wirusa z surowicą ujemną i dodatnią. Odpowiednia liczba znaleziona w tabeli antylogarytmów będzie indeksem neutralizacji.

7.6.2. Ocena wirusa badanej surowicy. Izolat wirusowy, który surowica dodatnia przeciwko zakaźnemu zapaleniu krtani i tchawicy zubożyła z indeksem wyższym niż 10, identyfikować jako wirus zakaźnego zapalenia krtani i tchawicy. Surowicę o indeksie neutralizacji równym 10 lub mniejszym (w odczynie seroneutralizacji z odpowiednim szczepem wirusa zakaźnego zapalenia krtani i tchawicy) uważać za ujemną, a surowicę o indeksie wyższym niż 10 — za dodatnią.

7.6.3. Ocena reakcji precypitacji dyfuzyjnej w żelu agarowym. Za dodatnie uważać surowice, które dają bardzo wyraźne linie precypitacyjne, rozmieszczone mniej więcej w środku między antygenem i surowicą.

Za pomocą tego testu można wykryć $25 \div 50 \%$ ptaków, które przechorowały zakaźne zapalenie krtani i tchawicy.

8. METODA IMMUNOFLUORESCENCJI

8.1. Zasada metody. Metoda polega na wykrywaniu antygeny wirusowego za pomocą swoistej surowicy odpornościowej, znakowanej fluoresceiną, w rozmazach z błony śluzowej tchawicy lub spojówki ptaków we wczesnej, ostrej postaci choroby lub w błonie kosmówkowo-omoczniowej zarodków, albo w zakażonych hodowlach komórkowych.

8.2. Aparatura

- Mikroskop luminescencyjny.
- Termostat.
- Szkiełka podstawowe.
- Kuwety metalowe.

8.3. Odczynniki, roztwory, materiały

- Chlorek sodowy, 0,85-procentowy.
- Aceton.
- Bufor fosforanowy 0,01M o pH $7,2 \div 7,4$ zawierający 0,85 % chlorku sodowego.
- Olejek immersyjny (niefluoryzujący).
- Surowice znakowane fluoresceiną.

8.4. Przeprowadzenie badania. Preparaty odciskowe, przygotowane na szkiełku podstawowym ze zmienionej błony kosmówkowo-omoczniowej zarodka kurzego, błony śluzowej tchawicy, spojówki chorego ptaka lub hodowli komórkowej (hodowla na szkiełku typu „lamelle”) podsuszyć na powietrzu, spłukać płynem fizjologicznym i włożyć do acetonu o temperaturze $+4^\circ \text{C}$ na 10 min. Następnie preparaty ułożyć na zwilżonym dnie kuwety i na każdy preparat nanieść po $0,5 \text{ cm}^3$ roboczego rozcieńczenia koniugatu. Dla kontroli, na część preparatów odciskowych nanieść po $0,5 \text{ cm}^3$ normalnej (ujemnej) surowicy znakowanej fluoresceiną. Kuwety przykryć i przetrzymać przez 30 min w termostacie w temperaturze 37°C . Zabarwione preparaty płukać przez 2 h pod bieżącą wodą.

8.5. Ocena wyników badania. Wysuszone preparaty przeglądać w mikroskopie fluorescencyjnym przy użyciu obiektywu immersyjnego. Wynik ocenia się w zależności od nasilenia fluorescencji i liczby komórek świecących. Przy metodzie pośredniej, w preparatach od ptaków chorych, świecenie obserwuje się w okresie ostrego przebiegu choroby, kiedy stwierdza się wewnątrzkomórkowe ciała wrętowe i można wyizolować wirus na zarodkach kurzych.

8.6. Protokół

- powinien zawierać następujące dane:
- numer normy,
 - wyniki badań,
 - opis postępowania, warunków lub nieprzewidzianych normą szczegółów, które mogły mieć wpływ na wyniki badań.

K O N I E C

INFORMACJE DODATKOWE

1. Instytucja adaptująca normę — Instytut Weterynarii, Zakład Badania Chorób Drobni, Puławy

2. Normy międzynarodowe
СТ СЭВ 1743-79 Птица сельскохозяйственная. Ме-

тоды лабора — торной диагностики инфекционного ларинго — трахеита — норма zgodna.

3. Autor projektu normy — doc. dr hab. Anna Cąkala — Instytut Weterynarii, Puławy.