

WETERYNARIA	N O R M A B R A N Ż O W A	BN-81
	Drób	9102-19
	Metody laboratoryjnego rozpoznawania zakaźnego zapalenia oskrzeli kur	Grupa katalogowa 1578

## 1. WSTĘP

**1.1. Przedmiot normy.** Przedmiotem normy są metody laboratoryjnego rozpoznawania zakaźnego zapalenia oskrzeli kur (*Infectiosis bronchitis* = IB). Norma obejmuje tylko kurczęta i kury młode.

**1.2. Zakres stosowania normy.** Normę należy stosować w przypadkach oceny zdrowości 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 oskrzeli zaliczany jest do grupy koronawirusów, zawiera kwas nukleinowy (RNA), a jego wielkość waha się od 100 do 135 nm.

**2.2. Rozpoznawanie choroby.** Zakaźne zapalenie oskrzeli rozpoznaje się na podstawie objawów klinicznych, zmian anatomo-patologicznych, danych epizootologicznych, wyosobnienia i identyfikacji wirusa oraz badań serologicznych. Ze względu na to, że w większości krajów choroba ma przebieg utajony, można sądzić o rozprzestrzenianiu się jej przede wszystkim na podstawie wykrywania przeciwciał w surowicy krwi ptaków, które ją przebyły.

## 3. POBIERANIE PRÓBEK DO BADAŃ

Do badań wirusologicznych pobrać wypluczyny z błon śluzowych tchawicy, jamy nosowej i zatok okołonosowych oraz płuc ptaków poddanych ubojowi lub świeżo padłych, a od ptaków dorosłych — nerki i jajowody.

Próbki należy przechowywać w temperaturze  $-20^{\circ}\text{C}$ , nierozcieńczone lub w postaci 10 % zawiesiny.

Krew do badań serologicznych pobrać 14 i 28 dnia od chwili zachorowania, od nie mniej niż 5 ptaków, po 5  $\text{cm}^3$  od każdego ptaka.

Oddzielić surowicę i do chwili przeprowadzenia badań przechować (nie dodając środków konserwujących) w stanie zamrożenia w temperaturze  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## 4. BADANIA WIRUSOLOGICZNE

**4.1. Zasada badania.** Badanie polega na wyizolowaniu i identyfikacji na zarodkach kurzych lub w hodowli drobnoustroju, wywołującego chorobę.

### 4.2. Aparatura, materiały, odczynniki

- Termostat.
- Inkubator.
- Moździerz porcelanowe.
- Wirówka.
- Probówki.
- Strzykawki i igły.
- Zarodki kurze w wieku  $9 \div 11$  dni.
- Hodowla komórek nerki lub fibroblastów zarodka kurzego.
- Płyn Hanksa.

**4.3. Przygotowanie materiału do badań.** Materiał pobrany zgodnie z rozdz. 3 rozetrzeć w jałowym moździerzu, w buforowym roztworze izotonicznym, w stosunku 1:10. Zawiesinę wirować przy 2000 do 3000 obr/min przez 15 min. Do płynu nad osadu dodać 2000  $\text{j.m./cm}^3$  penicyliny i 1  $\text{mg/cm}^3$  streptomycyny.

### 4.4. Opis badań

**4.4.1. Zakażenie zarodków kurzych.** Materiałem z każdej próbki przygotowanym wg 4.3 zakażać do worka omocznioowego po 6 zarodków kurzych w wieku  $9 \div 11$  dni do jamy omoczniowej w dawce po 0,1  $\text{cm}^3$ . Zakażone zarodki inkubować w temperaturze  $37,5^{\circ}\text{C}$  i wilgotności względnej  $60 \div 70\%$ , prześwietlając jeden raz dziennie. Zarodków zamartwych przed upływem 24 h po zakażeniu nie należy brać pod uwagę.

Jeśli zarodki żyją  $72 \div 120$  h, dwa z nich należy schłodzić w temperaturze  $4^{\circ}\text{C}$ , a resztę schłodzić po upływie  $168 \div 192$  h. Z pierwszych dwóch zarodków pobrać płyn omoczniowy i błonę kosmówkowo-omoczniową do następnego pasażu. Pozostałe zarodki badać na obecność zmian makroskopowych.

Wirus zakaźnego zapalenia oskrzeli hamuje rozwój zarodków, aż do karłowatości włącznie (8  $\div$  4 g zamiast 35 g): sam zarodek jest skręcony, zwinięty w kulkę, zmarszczony, objętość płynu owodniowego jest zmniejszona, błony są obrzęknięte i mocno przylegają do zarodka.

Zgłoszona przez Instytut Weterynarii  
Ustanowiona przez Ministra Rolnictwa dnia 7 sierpnia 1981 r.  
jako norma obowiązująca od dnia 1 stycznia 1982 r.  
(Dz. Norm. i Miar nr 19/1981 poz. 77)

Zazwyczaj pierwszy pasaż wirusa nie powoduje śmierci lub zmian zarodków i dlatego niezbędne jest wykonanie czterech kolejnych pasażów w celu jego adaptacji.

**4.4.2. Identyfikacja wirusa** na 9 ÷ 11 dniowych zarodkach należy przeprowadzić za pomocą odczynu seroneutralizacji ze znaną surowicą swoistą, której indeks seroneutralizacji powinien być większy niż 3. Wirus uważa się za zidentyfikowany, jeśli zarodki zakażane mieszaniną badanego wirusa ze swoistą surowicą odpornościową pozostają żywe i rozwijają się normalnie, a zarodki zakażone samym wirusem zamierają lub obserwuje się u nich zmiany opisane jak w 4.4.1.

Wirus można identyfikować również za pomocą odczynu seroneutralizacji w hodowli komórek nerki lub fibroblastów zarodka kurzego. Swoista surowica odpornościowa hamuje efekt cytopatyczny wywołany wirusem zakaźnego zapalenia oskrzeli. Ponieważ adaptacja wirusa do hodowli komórkowej nie udaje się w pierwszym pasażu, niezbędne jest przeprowadzenie kilku wstępnych pasażów.

W celu określenia izolatu do odpowiedniego serotypu niezbędne jest posiadanie typowo swoistych surowic odpornościowych (przynajmniej dwóch podstawowych serotypów Massachusetts i Connecticut).

W przypadku wystąpienia charakterystycznych zmian u zarodków, przy ujemnym odczynie seroneutralizacji ze swoistą surowicą odpornościową, konieczne jest nastawienie odczynu precypitacji w żelu agarowym.

Odczyn ten nie jest specyficzny dla poszczególnych serotypów i można przy jego pomocy identyfikować wszystkie szczepy wirusa IB, używając dowolnej precypitującej surowicy anty-IB.

## 5. BADANIE SEROLOGICZNE

**5.1. Zasada badania.** Badanie polega na wykrywaniu u ptaków, które przechorowały, swoistych przeciwciał odczynem seroneutralizacji (SN) i odczynem precypitacji w żelu agarowym (AGP).

### 5.2. Aparatura i szkło

- Łaźnia wodna.
- Termostat.
- Wirówka.
- Probówki.
- Pipety pomiarowe pojemności 1, 2, 5 i 10 cm<sup>3</sup>.
- Płytki Petriego.

### 5.3. Odczynniki, roztwory, podłoża i materiały

- Penicylina.
- Streptomycyna.
- Agar oczyszczony.
- Chlorek sodu.
- Woda destylowana.
- Zarodki kurze 9 ÷ 11 dniowe.
- Hodowla komórek nerki zarodka kurzego.
- Podłoża do hodowli komórkowych.

**5.4. Przygotowanie do badań.** Próbkę krwi ptaków, które przechorowały, pobrać w sposób podany w rozdz. 3. Surowice inaktywować przez podgrzewanie w temperaturze 56 °C w ciągu 30 min i wykorzystać

bezpośrednio do badań lub przechowywać w stanie zamrożonym. Jeśli surowica jest zanieczyszczona, należy ją przesączyć przez filtry bakteryjne.

## 5.5. Opis badań

### 5.5.1. Odczyn seroneutralizacji na zarodkach kurzych.

Dla nastawienia tego odczynu niezbędny jest wzorcowy, adaptowany do zarodków kurzych, szczep wirusowy (np. szczep *Beaudette* serotypu *Massachusetts*) dodatnia swoista surowica odpornościowa i surowica badana. W przypadku występowania w terenie innych typów antygenowych wirusa IB, niezbędne jest posiadanie szczepów wzorcowych odpowiednich serotypów oraz swoistych surowic odpornościowych. Do odczynu używać wirusa w postaci świeżo otrzymanego płynu omochniowego, którego miano jest nie niższe niż 10<sup>7</sup> ELD (*Embriolethal Dosis*) 50/1 cm<sup>3</sup>. Z płynu tego przygotować seryjne 10-krotne rozcieńczenia od 10<sup>-5</sup> do 10<sup>-8</sup>.

Następnie mieszać równe ilości rozcieńczonego wirusa i surowic badanych oraz surowicy kontrolnej. Mieszaninę pozostawić na 3 min w temperaturze pokojowej, a następnie każdym rozcieńczeniem wirusa oraz mieszaniny wirusa z surowicą zakażić worek omochniowy 5 dziewięciodniowych zarodków kurzych w dawce po 0,1 cm<sup>3</sup>. Zakażone zarodki prześwietlać codziennie przez 3 ÷ 8 dni (w zależności od szczepu). Zarodków zamaryłych w ciągu pierwszych 24 h nie należy brać pod uwagę.

**5.5.2. Ocena wyników badań.** Po upływie terminów podanych w 5.5.1 określić liczbę zarodków w każdej grupie, które uległy zakażeniu, a następnie obliczyć ELD<sub>50</sub>. Różnica między logarytmem miana samego wirusa i miana mieszaniny wirusa z surowicą badaną stanowi indeks neutralizacji (NI).

**5.5.3. Odczyn seroneutralizacji w hodowli komórkowej (SN).** Zawiesinę komórkową zawierającą 10<sup>6</sup> komórek w 1 cm<sup>3</sup> podłoża wzrostowego (zawierającego 10 % surowicy cielęcej) inkubować w probówkach w ilości po 1 cm<sup>3</sup>. Po utworzeniu kompletnej warstwy komórek (w ciągu 48 h w temperaturze 37 °C) hodowlę zakażać, a podłożo wzrostowe zastąpić podłożem utrzymującym (zawierającym 2 ÷ 5 % surowicy cielęcej).

Do zakażenia używać wirusa IB, adoptowanego do hodowli komórek nerki zarodka kurzego. W tym celu stosować adoptowane na zarodkach kurzych szczepy, które w ciągu kilku pasażów (5 ÷ 10 ÷ 15) przystosowały się do hodowli komórkowej. Do odczynu używać wirusa w postaci świeżo uzyskanego płynu z hodowli komórkowej (przechowywanego nie dłużej niż przez tydzień), który należy zebrać w ciągu 24 ÷ 72 h po zakażeniu, gdy efekt cytopatyczny jest wyraźny, lecz jeszcze nie wystąpiło pełne zniszczenie warstwy komórek. Logarytm TCID<sub>50</sub> (*Tissueculture Infections Dosis*) szczepów dobrze adaptowanych do hodowli komórek nerki zarodka kurzego wynosi zwykle 5 ÷ 5,5 na 1 cm<sup>3</sup>.

Z płynu tego przygotować seryjne 10-krotne rozcieńczenia od 10<sup>-5</sup> do 10<sup>-8</sup>, następnie mieszać równe ilości rozcieńczonego wirusa i surowic badanych oraz surowicy kontrolnej. Mieszaninę pozostawić na 3 min w temperaturze pokojowej, a następnie każdym rozcieńczeniem wirusa oraz mieszaniny wirusa z surowicą

zakażać po 4 probówki hodowlę komórkową, dodając po 0,1 cm<sup>3</sup> inokulum na każdą probówkę.

Następnie hodowlę pozostawić w temperaturze 37 °C przez 30 min w celu absorpcji wirusa. Po tym czasie podłoża zlać i zastąpić podłożami utrzymującymi. Do każdego badania należy nastawić nie zakażone hodowle jako kontrolę.

Obserwacje przeprowadzać codziennie w ciągu 6 dni lub tak długo, aż w hodowli kontrolnej nie wystąpią zmiany.

Efekt cytopatyczny uwidacznia się w postaci ziarnistości i licznych wakuoli w cytoplazmie, następuje przerwanie ciągłości warstwy komórek oraz ich degeneracja i rozpad. Ocenę wyników przeprowadzić zgodnie z 5.5.2.

W przypadku używania do odczynu króliczych surowic kontrolnych (dodatnią i ujemną), należy je rozcieńczyć 10<sup>-1</sup>, ponieważ surowice nierozcieńczone wywołują powstawanie nieswoistych ziarnistości w cytoplazmie komórki. W takich przypadkach rozcieńczenie należy koniecznie uwzględnić przy obliczeniach.

**5.5.4. Ocena wyników badań.** Przy indeksie neutralizacji (NI) równym od 0,0 do 1,0 — badana surowica jest ujemna; przy NI równym od 1,1 do 1,9 — badana surowica jest wątpliwa; przy NI równym 2,0 lub większym — badana surowica jest dodatnia.

Jeśli dla 20 % lub więcej surowic uzyska się wynik wątpliwy, badania należy powtórzyć za pomocą odczynu precypitacji w żelu agarowym.

Przy uzyskaniu wyników wątpliwych również w tym odczynie należy przeprowadzić ponowne badania tej samej grupy ptaków po 14 ÷ 21 dniach.

Przeciwciała zobojętniające wirus tworzą się w ciągu 2 ÷ 3 tygodni po wystąpieniu choroby i utrzymują się mniej więcej przez 5 ÷ 6 miesięcy, a przeciwciała precypitujące od 2 do 7 tygodni od chwili zakażenia.

### 5.6. Odczyn precypitacji w żelu agarowym (AGP)

**5.6.1. Przeprowadzenie badań.** Agar oczyszczony od 1,1 do 1,5 % zawierający 8 % NaCl, którego pH wynosi 7,6 ÷ 7,8 rozlać do płytek Petriego.

Następnie wyciąć baseniki o średnicy 4 mm lub 6 mm w odstępach co 4 mm. Na dno każdego basenika wprowadzić kroplę płynnego agaru.

Antygen uzyskuje się z homogenizowanych błon kosmówkowo-omoczniovych zarodków kurzych zamarych po zakażeniu adaptowanym szczepem wirusa IB. Wybierać tylko te błony kosmówkowo-omoczniove, które wykazują wyraźny i silny odczyn z precypitacją swoistą surowicą odpornościową. Surowice kontrolne (dodatnia i ujemna) i badane powinny być rozcieńczone i nieinaktywowane.

Oprócz kontrolnej dodatniej i ujemnej surowicy w odczynie precypitacji w żelu agarowym nastawić również kontrolny antygen przygotowany z homogenizatu z błon kosmówkowo-omoczniovych nie zakażonych zarodków kurzych w tym samym wieku.

Po napełnieniu baseników, płytki Petriego przetrzymywać w komorze wilgotnej, w temperaturze 37 °C lub w temperaturze pokojowej.

**5.6.2. Ocena wyników.** Przy uzyskaniu odczynu dodatniego występują po 24 ÷ 72 h linie precypitacyjne między antygenem i surowicami.

W przypadku gdy zakażenie ptaków miało miejsce wcześniej niż na 2 ÷ 7 tygodni przed badaniem, odczynem precypitacji w żelu agarowym uzyskuje się zwykle mały odsetek dodatnich wyników. Jeśli stwierdza się duży odsetek surowic precypitujących, stado kur uważa się za zakażone wirusem IB.

## 6. PROTOKÓŁ

Protokół powinien zawierać co najmniej następujące dane:

- a) numer normy,
- b) wyniki badań,
- c) opis postępowania, warunków lub nieprzewidzianych normą szczegółów, które mogłyby mieć wpływ na wyniki badań.

K O N I E C

### INFORMACJE DODATKOWE

1. Instytucja autoryzująca normę RWPG — Instytut Weterynarii, Zakład Badania Chorób Drobii, Puławy.

2. Normy międzynarodowe

RWPG СТ СЭВ 1744-79. Птица сельскохозяйственная. Методы лабораторной диагностики инфекционного бронхита — норма равноважна.