

## STRUKTURA ANTYGENOWA WIRUSÓW OSPY PTAKÓW (*POX-VIRUS AVIUM*) WYIZOLOWANYCH Z KUR, GOŁĘBI I INDYKÓW — W ŚWIETLE BADAŃ WŁASNYCH

KONRAD MALICKI

Katedra Mikrobiologii Wydziału Weterynaryjnego SGGW  
Kierownik: prof. dr J. Brill

Postęp w badaniach serologicznych nad strukturą antygenową wirusów ospy ptaków jest uwarunkowany wypracowaniem skutecznej metody uzyskiwania swoistej, wysokowartościowej surowicy przeciwwirusowej oraz opracowaniem metod lub modyfikacji metod serologicznych, pozwalających na wykrywanie i analizowanie antygeny wirusowego, z wykluczeniem reakcji niewirusowych. Precypitacja w żelu wg założeń Oudin (14) czy też Ouchterlony (13) okazała się metodą skuteczną przy badaniu antygenów różnych wirusów zwierzęcych, także i wirusów grupy *Poxvirus* (4, 12, 19 i in.).

Istotne trudności w zastosowaniu tej metody do analizy struktury antygenowej wirusów podgrupy *Pox-virus avium* tkwią w uzyskaniu odpowiednio swoistej i wysokowartościowej surowicy przeciwwirusowej. Surowice pobrane od ptaków chorych na ospę w następstwie naturalnego czy sztucznego zakażenia wykazują niski poziom przeciwciał i chociaż reagują w odczynie wiązania dopełniacza (11, 21, 22, 20, 24), to jednak nie dają odpowiednich wyników w odczynie precypitacji w żelu (23, 24).

Hiperimmunizacji ptaków (18, 23), a tym bardziej innych zwierząt, kryje w sobie niebezpieczeństwo pobudzenia organizmu do wytworzenia przeciwciał, skierowanych przeciw antygenowym składnikom pochodzenia tkankowego, stanowiącym naturalne zanieczyszczenie surowego materiału wirusowego. Zastosowanie w badaniach surowic od osobników hiperimmunizowanych wymaga więc albo przeprowadzenia uprzedniej kierunkowej absorpcji surowic precypitujących, albo też użycia innej metody, wykluczającej reakcje precypitacyjne niewirusowe, bez naruszenia zdolności surowic do swoistego precypitowania antygenów wirusowych, jak również bez zmiany lub utraty istotnych składników badanego antygeny wirusowego. W pewnym stopniu odpowiada tym wymogom, a tym samym

daje możliwość zastosowania surowic od zwierząt hiperimmunizowanych do badań w precypitacji w żelu, metoda kierowanego blokowania w żelu niewirusowych reakcji precypitacyjnych, za pomocą odpowiedniej surowicy przeciwtkankowej (8). Referowane badania nad strukturą antygenową wirusów ospy ptaków, przeprowadzone w oparciu o odczyn swoistej precypitacji w żelu i o surowice od zwierząt hiperimmunizowanych, wykonano w latach 1958—1962, nie znając jeszcze wyników prac (19, 25, 12), których pełny tekst otrzymano dopiero w 1962 r.

Krótki przegląd dotychczasowych wiadomości i badań nad strukturą antygenową *Pox-virus avium* przedstawiono w równoległej publikacji (9).

## BADANIA WŁASNE

### C e l b a d a ń

1. Poznanie struktury antygenowej szczepów *Pox-virus avium*, świeżo wyizolowanych z materiału terenowego na błonie kosmówkowo-omoczniowej (CAM) zarodków kury.

2. Wykazanie, czy pomiędzy szczepami *Pox-virus avium*, pochodzącymi z różnych gatunków ptaków (kura, indyk, gołąb), istnieją uchwytnie w badaniu serologicznym różnice w strukturze antygenowej.

3. Porównanie struktury antygenowej różnych szczepów wirusa ospy, pochodzących z tego samego gatunku ptaków, jak również porównanie ich struktury antygenowej ze strukturą antygenową niektórych wirusów ospy, używanych do przygotowania szczepionek dla drobiu.

### M a t e r i a ł i m e t o d y

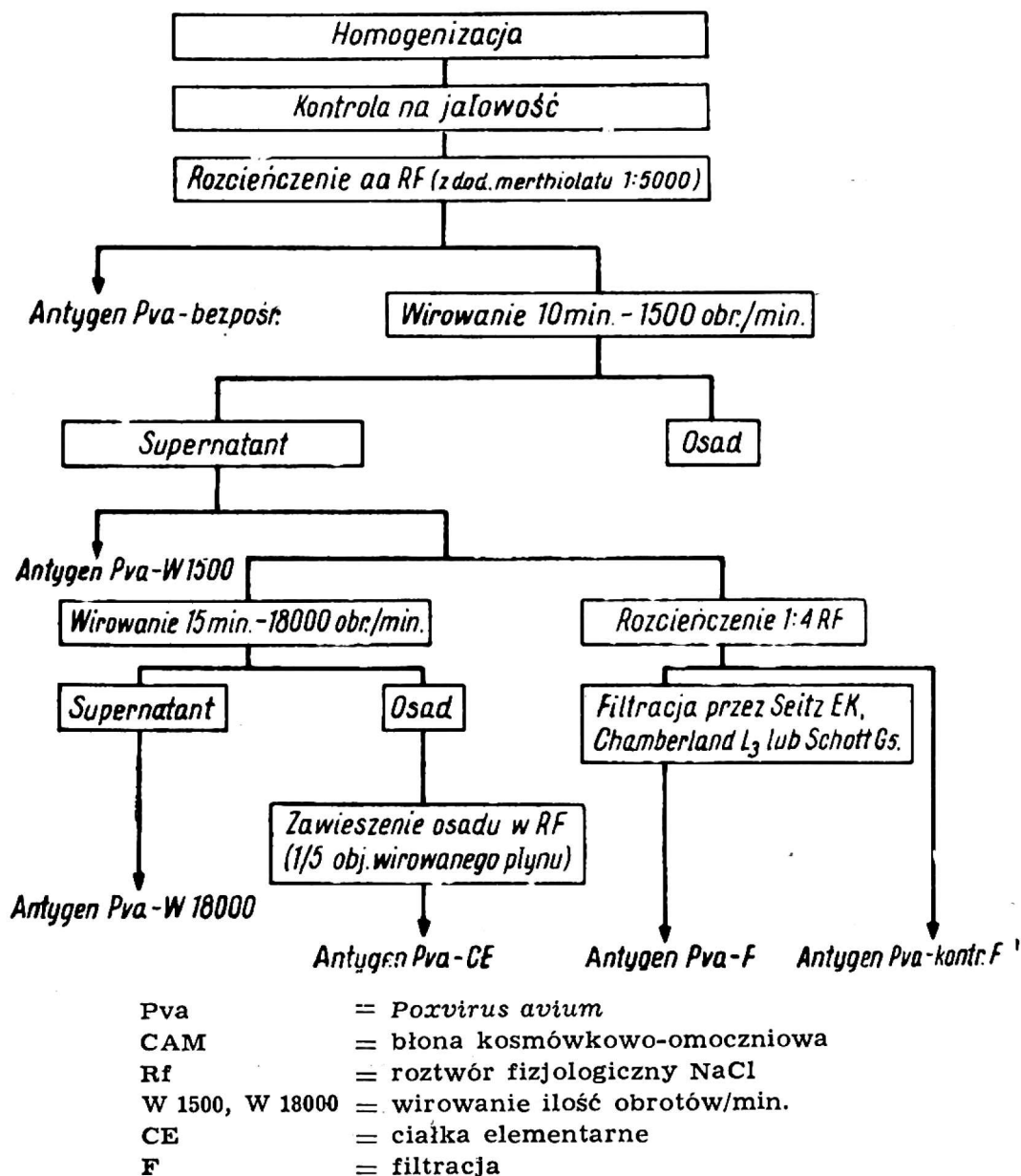
1. Badaniami objęto łącznie 18 szczepów *Pox-virus avium* (Pva), w tym 14 szczepów własnych wyizolowanych w latach 1958—1961 z materiałów nadesłanych z różnych terenów Polski, 3 szczepy wyizolowane z różnych handlowych szczepionek przeciw ospie drobiu i 1 szczep laboratoryjny otrzymany z Niemieckiej Republiki Demokratycznej.

2. Antygeny (A-Pva) przygotowano z 3—6 pasażu wirusa na CAM zarodków kury. Sposób przygotowania i postać badanych antygenów oraz objaśnienia używanych skrótów przedstawia rysunek 1. W badaniach zasadniczych używano wyłącznie antygenów A-Pva-W-1500 i A-Pva-W-18000. Antygeny przechowywano w temperaturze  $-20^{\circ}\text{C}$ .

3. Surowice precypitujące dla badanych szczepów *P. avium* (S-Pva) otrzymano drogą hiperimmunizacji królików. Do hiperimmunizacji używano surowy antygen, otrzymany z 3—6 pasażu wirusa na CAM zarodków kury, przygotowany bez dodatku środków konserwujących i bez dodatku adiuwantów. Tabela 1 przedstawia schemat hiperimmunizacji kró-

lików, wykonywanej dla otrzymania surowic precypitujących. Używając zawiesinę CAM z niezakażonych zarodków kury przygotowano w analogiczny sposób surowice precypitujące przeciwtkankowe (S-CAM), potrzebne do kierowanego blokowania w żelu reakcji precypitacyjnych niewirusowych. Jako surowice kontrolne (S-K) używano surowice pobrane od

*Fragmenty CAM silnie zakażone szczepem Pva*



Rys. 1

królików przed rozpoczęciem hiperimmunizacji oraz surowice od królików kontrolnych — nieszczepionych. Surowice konserwowano dodając merthiolat w ilości 1 : 10000. Część każdej surowicy przechowywano bez dodatku środka konserwującego w temperaturze  $-20^{\circ}\text{C}$ .

4. Ze względów technicznych wykonywano tylko orientacyjne badanie zdolności neutralizujących 17 uzyskanych surowic S-Pva, jak również wykonywano tylko orientacyjne badanie ilości aktywnych cząsteczek wirusa w antygenach używanych do hiperimmunizacji i w różnych anty-

Tabela 1

Schemat hiperimmunizacji królików w celu otrzymania surowic precypitujących

Okres	Ty-dzień	Kolej-ny dzień	Wykonywany zabieg	Dawka	Droga wprowadzenia	
1	2	3	4	5	6	
	0	0	wstępne pobranie krwi na sur. kontrolną	4,0 ml	i. v.	
I	1	1	inj. antygenu supernatant	1,0 ml	i. v.	
			osad	1,0 „	i. p.	
		3	inj. antygenu	supernatant	1,2 ml	i. v.
				osad	1,2 „	i. p.
			5	inj. antygenu	supernatant	1,4 ml
osad	1,4 „	i. p.				
7	inj. antygenu	supernatant	1,6 ml	i. v.		
osad	1,6 „	i. p.				
II	2	14	inj. pełny antygen niewirow.	2,0 ml	i. p.	
	3	18	inj. pełny antygen niewirow.	2,5 ml	i. p.	
	4	22	inj. pełny antygen niewirow.	3,0 ml	i. p.	
		26	inj. pełny antygen niewirow.	3,5 „	i. p.	
	5	33	inj. pełny antygen niewirow.	4,0 ml	i. p.	
6	40	próbne pobranie krwi na surowicę (względnie skrwawienie zwierzęcia)	30—80 ml	z serca		
III	7	41	ponowne zabiegi immunizac.	różne	i. p.	
	10	70	skrwawienie królika dośw.	ok. 80 ml	z serca	

genach, przeznaczonych do testów serologicznych, przygotowanych specjalnie bez dodatku merthiolatu. Badania te wykonywano według ogólnie znanych założeń, na CAM zarodków kury.

5. Absorpcja surowic odpornościowych. W teście precypitacji w żelu używano: surowice precypitujące nieabsorbowane, surowice precypitujące absorbowane zawiesiną jałowego, niezakażonego wirusem CAM (S-Pva + +A-CAM) oraz surowice precypitujące absorbowane antygenem heterologicznego szczepu wirusa ospy ptaków (S-Pva + A-Pva-he). W celu przeprowadzenia absorpcji mieszano w próbówce wirówkowej potrzebną ilość surowicy precypitującej z równą ilością żądanego antygeny — A-Pva względnie A-CAM, po czym pozostawiano przez 1 godz. w temperaturze pokojowej, a następnie przez 24 godz. w temp. +4°C. Po odwirowaniu w ciągu 10 min. przy 1500 obr./min. supernatant przenoszono do osobnej

ampułki. Wynik absorpcji sprawdzano metodą płytkową i probówkową, w odpowiednim układzie kontrolnym, bezpośrednio w poszczególnych doświadczeniach oraz przy ustalaniu optymalnej proporcji precypitacji. Należy podkreślić, że w następstwie wykonywanej absorpcji, absorbowane surowice ulegały rozcieńczeniu w stosunku 1 : 2.

6. W pracy posługiwano się odczynem precypitacji w żelu probówkowym Oudin (14) wg modyfikacji Oakley i Fulthrope (26) — płytkowym wg Ouchterlony (13) lub własną modyfikacją odczynu probówkowego i płytkowego (8). Używano żel agarowy 0,8—1,5—1,6-procentowy przygotowany z Bacto-Agar (Difco) w 0,85-procentowym roztworze NaCl, z dodatkiem merthiolatu 1 : 10000.

Precypitację probówkową wykonywano z surowicami wyabsorbowanymi, wzorując się co do ilości składników na pracy wykonanej przez Gispena (4). Używano probówki 100 × 8 mm. Przy dodawaniu składników probówki, zależnie od potrzeby, umieszczano w łaźni wodnej o temp. +55°C lub w temp. pokojowej. Do probówek dawano kolejno: 0,35 ml surowicy precypitującej lub kontrolnej, 0,15 ml żelu 1,6-procentowego, a po zakrzepnięciu tej warstwy 1 ml żelu 0,8-procentowego. Po zakrzepnięciu żelu umieszczano na powierzchni 0,5 ml antygenu badanego lub kontrolnego. Probówki zamykano korkami z gumy; wynik odczytywano na 7—10—14 dzień przebywania w temp. pokojowej.

Precypitację płytkową wykonywano według ogólnie przyjętej metody wyłącznie z surowicami absorbowanymi. Używano płytki o średnicy 55 mm, na które wylewano po 10 ml 1,5-procentowego żelu agarowego. Baseny wycinano sztancą o średnicy 8 mm; odległość poszczególnych basenów od siebie wynosiła około 5—6 mm. Układ i liczba basenów na płytkach była różna, zależnie od celu poszczególnych doświadczeń. Przedstawiono to w tabeli 3 i 4. Wynik odczytywano na 5—7—10 dzień przetrzymywania w komorze wilgotnej, w temperaturze pokojowej.

Stosowana w badaniach precypitacja w żelu z kierowanym blokowaniem niektórych reakcji precypitacyjnych polegała na wprowadzeniu do zwykłej precypitacji probówkowej czy płytkowej dodatkowej warstwy żelu, zawierającej specjalną surowicę odpornościową przeciw określonym komponentom antygenowym. Technikę tę stosowano przy badaniach z surowicami precypitującymi nieabsorbowanymi jako jeden ze sposobów eliminowania reakcji precypitacyjnych niewirusowych.

Surowicą anty-CAM (S-CAM) blokowano reakcje precypitacyjne, będące następstwem stosowania surowych antygenów A-Pva do hiperimmunizacji królików, jak i do późniejszych reakcji w żelu.

Analogiczną technikę kierowanego blokowania stosowano do badania wzajemnego pokrewieństwa antygenów wirusów ospy ptaków. W tym

przypadku do dodatkowej warstwy żelu dodawano jako surowicę blokującą surowicę precypitującą dla pokrewnego badanego szczepu Pva, a więc surowicę S-Pva-homologiczną (S-Pva-ho) względnie surowicę badanego heterologicznego szczepu Pva, a więc surowicę S-Pva-heterologiczną (S-Pva-he). Surowicę blokującą dawano zawsze w nadmiarze, biorąc po 0,05 ml wyższą dawkę, niż wypadło z miareczkowania danej surowicy. Bliższe szczegóły techniczne o sposobie przygotowania probówek czy płytek do precypitacji w żelu z kierowanym blokowaniem, jak również szczegóły dotyczące miareczkowania surowic do warstwy blokującej przedstawiono w odrębnej publikacji (8).

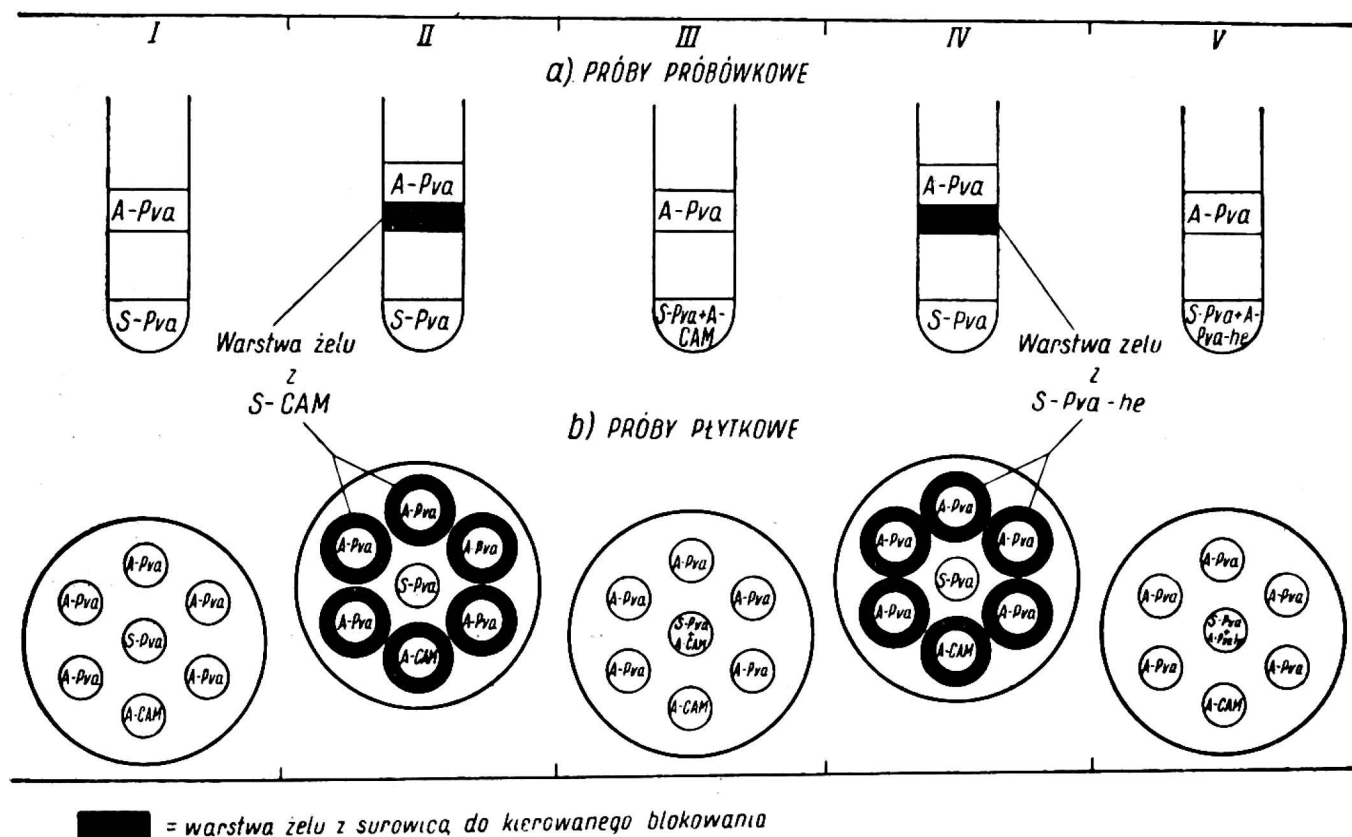
W badaniach niniejszych przy ustalaniu optymalnej precypitacji badano tylko dwukrotne rozcieńczenia surowicy (od  $1/2$  do  $1/32$ ) w stosunku do antygeny nierozcieńczonego. Badanie wykonywano w próbach płytkowych i probówkowych, przy użyciu surowic absorbowanych i nieabsorbowanych.

7. Dokumentacja wyników. Wyniki prób precypitacji w żelu notowano graficznie. Część wyników bardziej interesujących utrwalono również fotograficznie. Dla celów porównawczych wykonywano także dokumentację fotograficzną zmian makroskopowych, wywoływanych w CAM zarodków kury przez poszczególne badane szczepy Pva. Fotografie wykonano pod kierunkiem i przy współudziale inż. B. Gałki z Pracowni Fotograficznej Wydz. Wet. SGGW w Warszawie.

8. Układ badań i schematy doświadczeń. Przy badaniu struktury antygenowej wirusów ospy ptaków metodą precypitacji w żelu doświadczenia wykonywano według układów przedstawionych schematycznie w tabeli 1 i rysunkach 2 i 3.

Badania zasadnicze wykonano według danych uwidocznionych na rysunku 3. Przedstawione na tym rysunku układy II i III stosowano do badania zdolności precypitynogennych antygenów A-Pva (przygotowanych z poszczególnych badanych szczepów Pva) w precypitacji z surowicami precypitującymi S-Pva-izologicznymi (S-Pva-izo) względnie S-Pva-hemologicznymi (S-Pva-ho). Układy IV i V stosowano do badania pokrewieństwa antygenowego wirusów ospy, wyizolowanych z różnych gatunków ptaków, czyli określenia, czy występuje u nich wspólna komponenta antygenowa i czy istnieją odrębności w strukturze antygenowej. Badania w tym kierunku uzupełniono doświadczeniami według układu III, w których wykonywano precypitację krzyżową antygeny A-Pva określonego wirusa ospy ptaków z surowicami precypitującymi S-Pva-A-CAM wirusów ospy różnych gatunków ptaków. Według układu IV i V badano też antygenowe pokrewieństwo poszczególnych szczepów wirusa ospy tego samego gatunku ptaka, obserwując wynik precypitacji antygeny A-Pva określonego szczepu z surowicą S-Pva-izologiczną, w przypadku blokowania reakcji surowicą S-Pva-homologiczną, względnie też w przypadku uprzedniej absorp-

cji surowicy precypitującej S-Pva-izologicznej antygenem A-Pva-homologicznym. Równolegle do doświadczeń prowadzonych w powyższych układach nastawiano szeregi prób kontrolnych, przy czym starano się wykonywać próby kontrolne pozytywne, jak i negatywne.



Legenda:

- |                  |   |   |
|------------------|---|---|
| A-CAM            | = | antygen błony kosmówkowo-omoczniowej  |
| A-Pva            | = | „ „ szczepu <i>Pox-virus avium</i>  |
| S-CAM            | = | surowica precypitująca anty CAM   |
| S-Pva            | = | „ „ „ „ <i>Pox-virus avium</i>  |
| S-Pva-he         | = | „ „ „ „ heterologiczny <i>Pox-virus avium</i>   |
| S-Pva + A-CAM    | = | surowica precypitująca anty Pva, zaabsorbowana antygenem CAM                          |
| S-Pva + A-Pva-he | = | surowica precypitująca anty Pva, zaabsorbowana antygenem heterologicznego szczepu Pva |

Rys. 2

Dalszy cykl badań nad pokrewieństwem antygenowym szczepów *P. avium* był wykonywany według układów I, II, III i IV, przedstawionych na rysunku 4. Używano tutaj wyłącznie testu płytkowego oraz tylko surowic absorbowanych za pomocą antygenów A-Pva różnych wirusów ospy ptaków i antygenów kontrolnych A-CAM. Zależnie od celów doświadczenia stosowano tu różny układ basenów, jak również różne wzajemne usytuowanie badanych antygenów A-Pva i antygenów kontrolnych A-CAM oraz różne usytuowanie surowic S-Pva. Stosowany w tych doświadczeniach układ basenów na płytkach pozwalał w większości przypadków na dwu- lub trzykrotne równoczesne powtarzanie zasadniczego doświadczenia.

## WYNIKI BADAŃ

### Badania wstępne

a) Orientacyjne badanie antygenów A-Pva na obecność aktywnych cząsteczek wirusa ospy ptaków wykazało, że antygeny A-Pva-W-1500 zawierają dużo, natomiast antygeny A-Pva-W-18000 — znacznie mniej aktywnych cząsteczek wirusa ospy ptaków. Najbogatsze w aktywne cząsteczki wirusa ospy ptaków były antygeny A-Pva-CE. Jedenaście różnych badanych filtratów (Seitz E-K, Schott G<sub>5</sub>, Chamberland 5L<sub>3</sub>, Berkefeld) nie wykazywało obecności (wykrywalnych przy stosowanej metodzie sprawdzania) ilości aktywnych cząsteczek wirusa ospy ptaków. Zawiesiny wprowadzane królikom dożylnie odpowiadały co do zawartości aktywnych cząsteczek wirusa antygenom A-Pva-W-1500, natomiast zawiesiny wprowadzane dootrzewnowo były znacznie bogatsze w aktywne cząsteczki wirusa ospy ptaków. Należy wziąć pod uwagę, iż zarówno antygeny przygotowane do precypitacji w żelu, jak i antygeny przygotowane do uodparniania królików, mogły zawierać także bliżej nieznaną ilość cząsteczek nieaktywnych lub produktów częściowego czy zupełnego rozpadu cząsteczek wirusa.

b) Badanie skuteczności stosowanych sposobów eliminowania reakcji niewirusowych przy precypitacji w żelu wykazało, że przy próbie próbówkowej i płytkowej można wykluczyć reakcje niewirusowe, zależne od antygenów CAM, dodając do warstwy blokującej surowicę S-CAM w proporcji 0,1 ml S-CAM na 0,15 ml żelu 1,6-procentowego lub stosując absorpcję surowic S-CAM czy S-Pva antygenem A-CAM-bezpośrednim, dodanym w równej ilości do absorbowanej surowicy.

c) Badanie zdolności precypitynogennych „surowych” antygenów A-Pva, przygotowanych w różny sposób, pozwoliło stwierdzić, że najlepsze zdolności precypitynogenne posiadały supernatanty „surowych” antygenów, a więc antygeny A-Pva-W-1500 i A-Pva-W-18000. Antygeny filtrowane wykazywały albo brak zdolności precypitynogennych, albo też dawały reakcje bardzo słabe. Przypuszczalnie zależało to w znacznej mierze od rozcieńczenia, jakie trzeba było wykonać dla sprawnego przebiegu filtracji. Antygeny „surowe” przygotowane jako zawiesiny ciałek elementarnych nie dawały precypitacji w żelu z surowicami S-Pva. Wynik ten jest zgodny z obserwacjami poczynionymi do tej pory nad *P. avium* (19) oraz z obserwacjami poczynionymi nad *P. officinale* i *P. bovis* (12).

Antygeny „surowe” przygotowane z wykwitów ospowych pobranych ze skóry głów ptaków, nadsyłanych do badania, dawały wyniki słabe. Natomiast antygeny uzyskane z liofilizowanych, wysokoprocentowych, roz-



cierów ze zmianami ospowymi od doświadczalnie zakażonej kury i gołębia dawały silną precypitację z używanymi w doświadczeniach, przygotowanymi na królikach surowicami precypitującymi S-Pva.

Łącznie zbadano 90 antygenów A-Pva (przygotowanych z 18 badanych szczepów Pva, namnożonych na CAM) i kontrolnych A-CAM. Prócz tego zbadano 6 antygenów przygotowanych ze skórnych zmian ospowych, występujących na głowach nadsyłanych do badania, oraz 2 antygeny przygotowane z liofilizowanych rozcierów skórnych tkanki ze zmianami ospowymi.

d) W przeprowadzonych 4 doświadczeniach nad hiperimmunizacją królików uzyskano łącznie: 17 surowic przeciwko wirusom ospy ptaków (S-Pva), 4 surowice przeciwko niezakażonemu CAM (S-CAM) i 23 surowice normalne kontrolne (S-K). Część hiperimmunizowanych królików padła w czasie wykonywania zastrzyków dożylnych. Wstrząs występował zwykle przy zastrzyknięciach dożylnych, wykonywanych po 8 dniu immunizacji, a niekiedy i w 8 dniu immunizacji. Najlepsze surowice precypitujące otrzymywano od zwykłych królików nierasowych. Dla uzyskania surowicy precypitującej trzeba było uodparniać króliki przez okres 40—70 dni.

Surowice precypitujące niekonserwowane, zamrożone w  $-20^{\circ}\text{C}$ , jak również konserwowane merthiolatem i przechowywane w temp.  $+4^{\circ}\text{C}$ , zachowywały dobre właściwości precypitujące przez szereg miesięcy.

#### Określenie zdolności precypitynogennych badanych szczepów Pva

Wykonano 4 cykle doświadczeń nad zdolnościami precypitynogennymi antygenów A-Pva, poszczególnych badanych szczepów Pva, przy precypitacji z surowicami precypitującymi S-Pva-izo- lub S-Pva-homologicznymi. Mianowicie precypitację probówkową i płytkową w żelu z równoczesnym blokowaniem reakcji precypitacyjnych niewirusowych surowicą S-CAM (wg układu II, rysunek 3) oraz precypitację probówkową i płytkową w żelu tych samych składników z tym, że surowice precypitujące zostały uprzednio absorbowane antygenem A-CAM (wg układu III, rysunek 3). Wyników prób wykonywanych wg układu I nie brano pod uwagę ze względu na występowanie reakcji precypitacyjnych niewirusowych. Używano nierozcieńczonych antygenów A-Pva-W-1500 lub A-Pva-W-18000 oraz antygenów kontrolnych A-CAM przygotowanych w analogiczny sposób. Surowice precypitujące nieabsorbowane używano nierozcieńczone, natomiast surowice precypitujące zabsorbowane w następstwie procesu absorpcji ulegały rozcieńczeniu w stosunku 1:2. Zbiorcze zestawienie wyników przedstawiono w tabeli 2. Rubryki 3, 4, 5 i 6 tej tabeli zawierają średni wynik z kilku równolegle wykonywanych prób danego doświadczenia;

Zestawienie zbiorowe wyników uzyskanych w doświadczeniach nad zdolnościami precypitynogennymi antygenów A-Pa przy precypitacji w żelu z surowicami precypitującymi S-Pva-izologicznymi, względnie S-Pva-homologicznymi, wykonywanej według układów II i III rys. 3

Lp.	Antygeny	Doświadczenia według układu II				Doświadczenia według układu III				Ostateczna ocena wyników precypitacji z surowicą S-Pva (rubryki 3, 4, 5, 6)
		precypitacja probówka z blokowaniem surowicą S-CAM		precypitacja płytkowa z blokowaniem surowicą S-CAM		precypitacja probówkowa z surowicami S-Pva wyabsorbowanymi A-CAM		precypitacja płytkowa z surowicami S-Pva wyabsorbowanymi A-CAM		
		surowica	wynik	surowica	wynik	surowica	wynik	surowica	wynik	
1		3		4		5		6		7
1	A-Pvm-1	S-Pvm-1	pPp	S-Pmv-1	Pp	S-Pvm-1+A-CAM	pPp	S-Pvm-1+A-CAM	Pp	pPp
2	A-Pvm-2	S-Pvm-2	pPp	S-Pvg-12	Pp	"	pPp	"	Pp	pPp
3	A-Pvg-1	S-Pvg-12	(p)P(p)	S-Pvg-12	P	nb.	nb.	S-Pvg-12+A-CAM	p	(p)P(p)
4	A-Pvg-2	S-Pvg-2	Pp	"	Pp	S-Pvg-12+A-CAM	pPp	"	Pp	(p)Pp
5	A-Pvg-3	S-Pvg-12	Pp	"	P	nb.	nb.	"	Pp	Pp
6	A-Pvg-4	S-Pvg-4	Pp	"	Ppp	S-Pvg-12+A-CAM	nb.	"	Ppp	Pp
7	A-Pvg-5	S-Pvg-5	P	"	Pp(p)	S-Pvg-12+A-CAM	pPp	"	Ppp	Pp(p)
8	A-Pvg-6	S-Pvg-6	Ppp	"	Pp(p)	nb.	nb.	"	Ppp	Pp(p)
9	A-Pvg-7	S-Pvg-7	Ppp	"	Ppp	nb.	nb.	"	Pp	Ppp
10	A-Pvg-8	S-Pvg-12	Ppp(p)	"	Pp	nb.	nb.	"	Pp	Ppp
11	A-Pvg-9	"	Ppp(p)	"	PPp	nb.	nb.	"	Pp	PPp
12	A-Pvg-10	"	PPpp	"	Ppp	nb.	nb.	"	PP	PPp(p)
13	A-Pvg-11	"	PPpp	"	PPpp	nb.	nb.	"	PP	PPpp
14	A-Pvg-12	"	PPpp	"	PPpp	nb.	nb.	"	PP	PPpp
15	A-Pvg-13	"	PPppp	"	PPpp	S-Pvg-12+A-CAM	PPppp	"	PPp	PPpp(p)
16	A-Pvc-1	S-Pvc-1	P	S-Pvc-3	P	nb.	nb.	"	P	P(p)
17	A-Pvc-2	S-Pvc-3	PP(p)	"	PP	S-Pvc-3+A-CAM	P(p)	S-Pvc-3+A-CAM	P	P(p)P
18	A-Pvc-3	"	PPP	"	PP	nb.	nb.	"	PP	PPP
	kontrolne									
19	A-CAM	S-CAM	O	S-CAM	O	S-CAM+A-CAM	O	S-CAM+A-CAM	O	O
20	A-CAM	S-Pvm-1	O	S-Pvm-1	O	S-Pvm-1+A-CAM	O	S-Pvm-1+A-CAM	O	O
21	A-CAM	S-Pvg-12	(p)	S-Pvg-12	O	S-Pvg-12+A-CAM	(p)	S-Pvg-12+A-CAM	(p)	(p)
22	A-CAM	S-Pvc-3	(p)	S-Pvc-3	O	S-Pvc-3+A-CAM	(p)	S-Pvc-3+A-CAM	O	(p)

Legenda: P = silny prążek precypitacyjny (p) = wynik precypitacji wątpliwy nb. = nie badano  
p = słaby prążek precypitacyjny O = brak precypitacji

rubryka 7 zawiera natomiast ostateczną ocenę zdolności precypitynogen-nych poszczególnych szczepów, przeprowadzoną w oparciu o wyniki 3 względnie 4 doświadczeń. W zestawieniu zbiorczym nie uwzględniono wyników prób wykonywanych według układu I, rysunku 3, a to z uwagi, jak już wspomniano, na występowanie w tych próbach reakcji precypitacyjnych niewirusowych.

Otrzymane wyniki można ująć w następujący sposób: Szczepy *P. avium* wyizolowane z indyków (szczepy Pvm-1 i Pvm-2) przejawiały swoje właściwości antygenowe wywoływaniem 3 prążków precypitacyjnych; jeden z tych prążków był silniejszy, dwa prążki słabsze występowały po obydwóch jego stronach.

Szczepy *P. avium* wyizolowane z gołębi (szczepy Pvc-1 do Pvc-3) — przejawiały swoje właściwości antygenowe tworzeniem przeważnie 2—4 prążków precypitacyjnych, wśród których 1 lub 2 prążki były silniejsze a 1—3 słabsze, umieszczone zazwyczaj poniżej prążków silnych w teście precypitacji probówkowej rys. 2, 5.

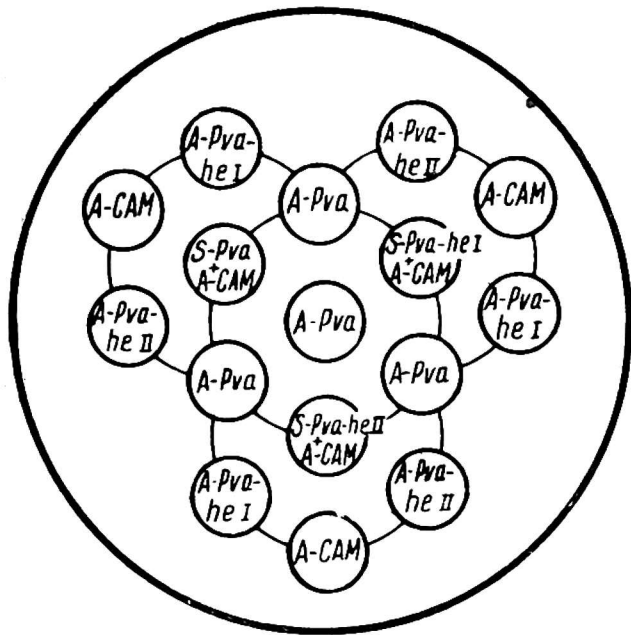
Szczepy *P. avium* wyizolowane z gołębi (szczepy Pvc-1 do Pvc-3) — przejawiały swoje właściwości antygenowe tworzeniem 2—3 grubych prążków precypitacyjnych, mniej więcej o tej samej intensywności (rys. 5).

Zdecydowanie wyraźniejsze wyniki otrzymywano przy stosowaniu metody probówkowej precypitacji w żelu. Zwykle też w próbach probówkowych można było odczytać większą liczbę prążków niż przy reakcji tych samych składników w metodzie płytkowej. Przy obydwóch metodach usuwania reakcji niewirusowych (stosowanie surowicy blokującej S-CAM lub też uprzednie absorbowanie surowic precypitujących antygenem A-CAM) otrzymywano w zasadzie wyniki zgodne, z pewną przewagą na korzyść metody blokowania, przy odczytywaniu słabszych prążków precypitacyjnych. Być może wchodzi tu w grę sprawa rozcieńczenia 1 : 2 surowic precypitujących absorbowanych antygenem A-CAM. W przeprowadzonych doświadczeniach maksymalne wyniki otrzymywano w zasadzie w probówkowej precypitacji w żelu, wykonywanej z blokowaniem reakcji niewirusowych za pomocą surowicy S-CAM.

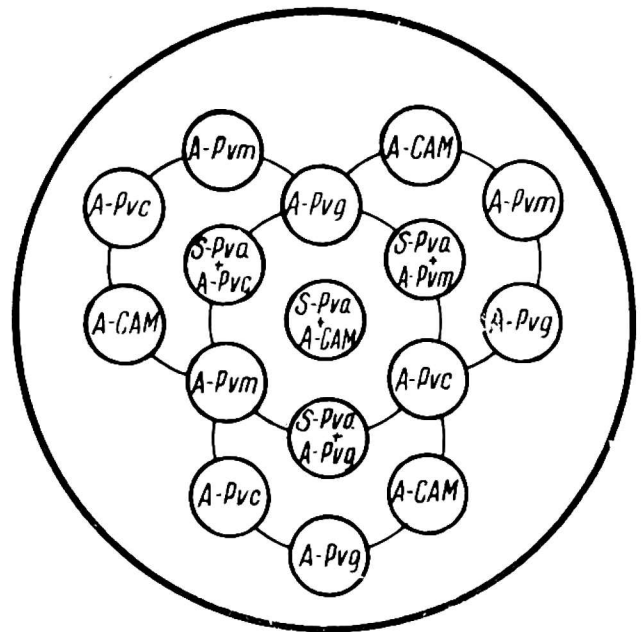
Porównywanie właściwości antygenowych i badanie pokrewieństwa antygenowego szczepów Pva, pochodzących od różnych gatunków ptaków

Badania te miały na celu wykazanie, czy istnieją antygen lub antygeny wspólne dla szczepów Pva, niezależnie od izolowania szczepu z kury, indyka czy gołębia, oraz czy istnieje (względnie — istnieją) antygeny swoiste dla szczepów Pva, występujących u poszczególnych gatunków ptaków. W tym celu wykonywano próby krzyżowe sprawdzając zdolności

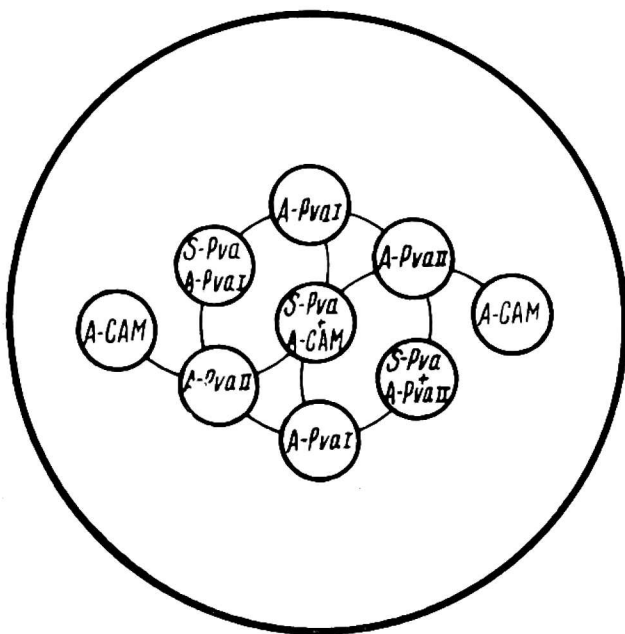
## I. Układ przy poszukiwaniu antygenu podgrupowo swoistego



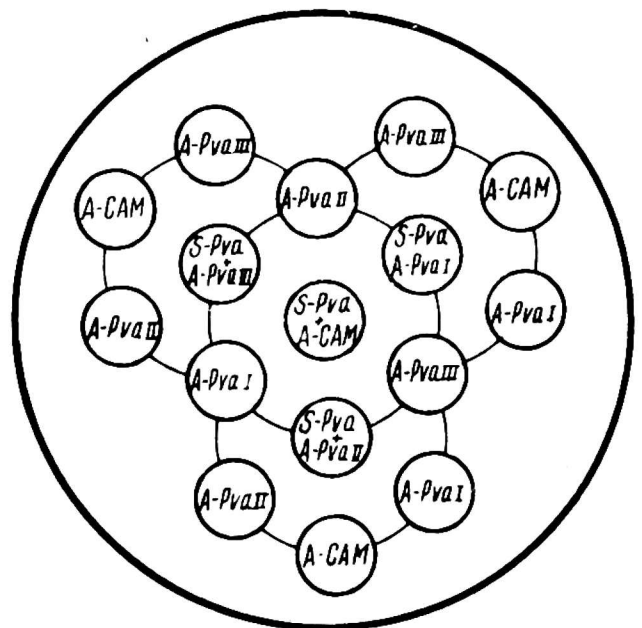
## II. Układ przy poszukiwaniu antygenu gatunkowo-swoistego



## III. Układ przy poszukiwaniu antygenów wspólnych u 2 pokrewnych szczepów



## IV. Układ przy poszukiwaniu antygenów wspólnych u 3 pokrewnych szczepów



## Legenda:

A-CAM	= antygen błony kosmówkowo-omoczniowej
A-Pva	= antygen szczepu <i>Pox-virus avium</i>
A-Pvm	= " " " " <i>meleagridis</i>
A-Pvg	= " " " " <i>galli</i>
A-Pvc	= " " " " <i>columbae</i>
A-Pva-he	= " heterologicznego szczepu Pva
S-CAM	= surowica precypitująca anty CAM
S-Pva	= " " " <i>Pox-virus avium</i>
S-Pva-he	= " " " heterologiczny szczep <i>Pox-virus avium</i>
S-Pva + A-...	= surowica precypitująca zaabsorbowana danym antygenem
I, II, III	= oznaczenie kolejne A-Pva-he, wzgl. S-Pva-he

Rys. 3. Schemat badania pokrewieństwa antygenowego różnych szczepów *Pox-virus avium* metodą precypitacji w żelu agarowym

precypitynogenne wszystkich lub wybranych szczepów Pva w następujących warunkach doświadczalnych:

a) przy zwykłej precypitacji krzyżowej antygenów A-Pva z surowicami precypitującymi S-Pva-heterologicznymi;

b) przy precypitacji antygenów A-Pva z surowicą precypitującą S-Pva-izo względnie S-Pva-homologiczną, wykonywanej z krzyżowym blokowaniem reakcji surowicą precypitującą S-Pva-heterologiczną;

c) przy precypitacji antygenów A-Pva z surowicą precypitującą S-Pva-izo względnie S-Pva-homologiczną, uprzednio krzyżowo absorbowaną antygenem A-Pva-heterologicznym.

Precypitację krzyżową antygenów A-Pva z surowicami precypitującymi S-Pva-heterologicznymi wykonano z surowicami uprzednio absorbowanymi antygenem A-CAM, stosując metodę probówkową i płytkową według układu III rysunek 2, metodę płytkową według układu I rysunek 3. Doświadczenie to wykonano również z surowicami nieabsorbowanymi, stosując metodę płytkową z blokowaniem reakcji precypitacyjnych niewirusowych surowicą S-CAM według układu II b rysunek 2.

Uzyskane wyniki można ogólnie ująć następująco: szczepy Pva izolowane z kur precypitują najlepiej z surowicami precypitującymi dla szczepów kurzych, słabiej z surowicami dla szczepów gołębih; z surowicami dla szczepów indycznych występowała tylko bardzo słaba reakcja. Szczepy Pva izolowane z gołębi precypitują najlepiej z surowicami dla szczepów gołębih, dobrze z surowicami dla szczepów kurzych, z surowicami dla szczepów indycznych występowała bardzo słaba reakcja. Szczepy Pva izolowane z indyków precypitowały słabo z surowicami dla szczepów indycznych, dobrze z surowicami dla szczepów kurzych, słabiej z surowicami dla szczepów gołębih. Warto podkreślić, że badane antygeny A-Pva w precypitacji z surowicą precypitującą S-Pva-heterologiczną dawały zwykle mniejszą liczbę prążków precypitacyjnych (przeważnie 1 lub 2) niż w precypitacji z surowicą precypitującą S-Pva-izo- lub S-Pva-homologiczną (przeważnie 2—3 lub więcej prążków).

Można przypuszczać, że obserwowane wyniki precypitacji krzyżowej w żelu są uwarunkowane obecnością komponenty lub komponent antygenowych, wspólnych u wirusów występujących u różnych gatunków ptaków. Wspólne komponenty (lub wspólna komponenta) antygenowe szczepów Pva mogą bowiem powodować, że przy hiperimmunizacji w surowicy królika pojawiają się przeciwciała zdolne do reagowania z precypitynogenem każdego wirusa ospy ptaków, niezależnie od tego, czy do uodparnienia użyto szczep wirusa ospy izolowany z kury, indyka czy gołębia. Należy mieć jednak na uwadze, iż wyniki prób krzyżowych mogą być w dużej mierze zależne od koncentracji precypitynogenów w poszczególnych antygenach Pva, jak również mogą zależeć od wartości poszczególnych surowic

precypitujących, użytych w doświadczeniu (surowice dla szczepów indyckich były zdecydowanie słabsze).

Na wartość surowic precypitujących może z kolei mieć wpływ ilość antygeny wspólnego, właściwa szczepowi używanemu do hiperimmunizacji, ilość antygeny użytego do uodparniania oraz właściwości osobnicze uodparnianego królika. Jeżeli jednak na podstawie wykonanych kontroli przyjmie się, że stosowane sposoby eliminowania reakcji precypitacyjnych niewirusowych były dostatecznie skuteczne, to należy również przyjmując, że zdolność reagowania precypitynogenów poszczególnych szczepów Pva z surowicami precypitującymi dla szczepów izolowanych z różnych gatunków ptaków przemawia za obecnością komponenty antygenowej, wspólnej dla wirusów ospy ptaków. W niektórych przypadkach wyniki wskazywałyby na możliwość występowania dodatkowej komponenty antygenowej, wspólnej dla wirusów ospy izolowanych z dwóch różnych gatunków ptaków (kura — indyk, kura — gołąb).

Precypitację w żelu antygenów A-Pva z surowicami precypitującymi S-Pva-izo- względnie S-Pva-homologicznymi, z równoczesnym krzyżowym blokowaniem reakcji surowicą precypitującą S-Pva-heterologiczną traktowano jako pewnego rodzaju kontrolę wyników uzyskanych w doświadczeniu poprzednim oraz jako próbę wykazania ewentualnych antygenów gatunkowo swoistych. O ile bowiem w doświadczeniu poprzednim chodziło o uwidocznienie antygeny wspólnego, przez wykazanie u szczepów Pva zdolności precypitowania z każdą surowicą S-Pva, o tyle w tych doświadczeniach chodziło o wyeliminowanie reakcji precypitacyjnych, zależnych od antygeny lub antygenów wspólnych podgrupowo, a wykazanie natomiast u szczepów Pva izolowanych z poszczególnych gatunków ptaków zdolności precypitynogenowych, zależnych od ewentualnie istniejących gatunkowo swoistych komponent antygenowych.

Teoretycznie zakładano, że użycie przy precypitacji w żelu jako surowicy blokującej — surowicy dla szczepu izolowanego z ptaka innego gatunku (oczywiście przy odpowiednim doborze ilościowym surowicy i antygeny) spowoduje zatrzymanie antygenów wspólnych drogą reakcji z korespondującymi przeciwciałami w warstwie blokującej, podczas gdy antygeny swoiste dla wirusów Pva danego gatunku ptaka pozostaną niezwiązane i dopiero z surowicą precypitującą izologiczną względnie homologiczną dadzą czytelny wynik.

Doświadczenia te wykonywano metodą probówkową i płytkową według układu IV rysunek 2. W doświadczeniach używano nierozcieńczonych surowic precypitujących S-Pva i kontrolnych oraz nierozcieńczonych antygenów A-Pva i kontrolnych A-CAM. Do warstwy blokującej, zgodnie z wynikami miareczkowania, dodawano surowice w ilości: surowice S-Pvg, S-Pvc lub kontrolną S-CAM — po 0,1 ml na każde 0,15 ml żelu 1,6-pro-

centowego, natomiast surowice S-Pvm w ilości 0,15 ml na każde 0,1 ml żelu 1,6-procentowego.

W poszczególnych doświadczeniach, dla każdej grupy antygenów wykonywano szereg prób kontrolnych, obejmujących próby pozytywne i negatywne. Stwierdzono, że blokowanie surowicami precypitującymi S-Pva-heterologicznymi (np. S-Pvg-2, S-Pvg-7, S-Pvc-1, S-Pvc-3) precypitacji antygenów szczepów wirusa ospy indyków z surowicą S-Pva-izologiczną nie eliminuje całkowicie zdolności precypitynogennych tych antygenów względem surowicy precypitującej izologicznej. W tym układzie otrzymuje się bowiem wynik precypitacji w postaci jednego słabego prążka precypitacyjnego. Tylko surowica S-Pvg-12, uzyskana za pomocą jednego z najbogatszych w komponenty antygenowe szczepu kurzego, znosiła zupełnie precypitację antygenów szczepów indyckich z surowicą izologiczną.

Blokowanie surowicami precypitującymi S-Pva-heterologicznymi precypitacji antygenów szczepów wirusa ospy kur z surowicami precypitującymi S-Pva-izo- względnie S-Pva-homologicznymi dało następujące wyniki.

Blokowanie precypitacji antygenów wirusów ospy kur, szczepów o niezbyt licznych lub średniolicznych komponentach antygenowych (np. Pvg-7, Pvg-9, Pvg-11) surowicami dla wirusa ospy indyków czy surowicami dla wirusa ospy gołębi eliminuje w znacznym stopniu zdolności precypitynogenne tych antygenów, ale niezupełnie. Z reguły obserwowano zachowanie słabych zdolności precypitynogennych, wyrażających się powstawaniem przeważnie jednego prążka precypitacyjnego, o intensywności oscylującej w granicach między słabym a wątpliwym co do natężenia wynikiem precypitacji, przy równoczesnym prawidłowym wyniku kontroli. Blokowanie precypitacji antygenów wirusów ospy kur, szczepów o licznych komponentach antygenowych (szczep Pvg-12, Pvg-13) surowicami dla wirusów ospy indyków lub gołębi powoduje nieznaczne zmiany w zdolnościach precypitynogennych blokowanych antygenów. Zmiany te dotyczą raczej obniżenia intensywności otrzymywanych prążków niż eliminowania prążków w ogóle.

Wydaje się, że do tego rodzaju badań, przy porównywaniu szczepów o słabych i wybitnych zdolnościach precypitynogennych, należałoby dopasować jeszcze bardziej dokładne stosunki ilościowe, pozwalające na lepsze dobranie ilości przeciwciał w surowicy blokującej, do ilości blokowanego precypitynogeny w badanym antygenie.

Warto podkreślić, że i surowice precypitujące innych szczepów wirusa ospy kurzej (szczepy Pvg-2 i Pvg-6) o słabszych właściwościach precypitynogennych nie były w stanie wyeliminować całkowicie zdolności precypitynogennych antygeny szczepu Pvg-12. Natomiast antygen szczepu Pvg-7 zupełnie nie wykazywał zdolności precypitynogennych w próbach

kontrolnych, w których jego precypitacja z surowicą izologiczną była blokowana surowicami precypitującymi własną i niektórych innych szczepów wirusa ospy kur (S-Pvg-2, S-Pvg-7, S-Pvg-12). Ślad precypitacji pozostawał jednak przy blokowaniu precypitacji surowicą S-Pvg-6.

Blokowanie surowicami precypitującymi S-Pva-heterologicznymi, a więc surowicami dla wirusów ospy kur i indyków, precypitacji antygenów szczepów wirusa ospy gołębi z surowicami precypitującymi S-Pva-izo- względnie S-Pva-homologicznymi nie znosiło całkowicie zdolności precypitynogennych blokowanych antygenów, zwłaszcza szczepu Pvc-3.

Wyniki doświadczeń nad blokowaniem surowicą S-Pva-heterologiczną precypitacji antygenów A-Pva z surowicą S-Pva-izo- względnie S-Pva-homologiczną potwierdziły w zasadzie słuszność założenia roboczego. Potwierdziły one z jednej strony wyniki poprzedniego doświadczenia, wskazujące na istnienie antygeny wspólnego u wirusów ospy różnych gatunków ptaków — następowało bowiem w znacznym stopniu eliminowanie zdolności precypitynogennych blokowanych antygenów, a z drugiej strony — dały podstawę do wysnucia wniosku o istnieniu komponent antygenowych gatunkowo swoistych u wirusów ospy występujących u różnych gatunków ptaków — blokowanie bowiem precypitynogeny surowicą heterologiczną nie znosiło całkowicie jego zdolności precypitowania z surowicą precypitującą izologiczną lub homologiczną. Wydaje się, że trudności, jakie obserwowano przy porównywaniu szczepów Pva o silnych i słabych zdolnościach precypitynogennych nie podważają słuszności tych wniosków, chociaż można by je również interpretować na korzyść przypuszczeń o występowaniu tylko różnic ilościowych w strukturze antygenowej różnych wirusów ospy ptaków. Przez różnice ilościowe należy rozumieć występowanie różnych ilości danej komponenty antygenowej w antygenie rozpuszczalnym różnych szczepów wirusa ospy ptaków.

Precypitację w żelu antygenów A-Pva z surowicami precypitującymi S-Pva-izo, względnie S-Pva-homologicznymi, uprzednio krzyżowo absorbowanymi antygenem A-Pva-heterologicznym, wykonano metodą próbówką i płytkową według układu V rysunek 2 oraz metodą płytkową według układu II rysunek 3. Jako surowice precypitujące wybrano te surowice, które w poprzednich doświadczeniach dawały najlepsze wyniki: S-Pvm-1, S-Pvg-12, S-Pvc-3. Każdą surowicę dzielono na 4 porcje, przewidziane do zabsorbowania odpowiednim antygenem: A-CAM, A-Pva-izologicznym, A-Pva-heterologicznym pierwszym (I) i A-Pva-heterologicznym drugim (II).

Zakładano, że absorpcja surowicy precypitującej antygenem A-Pva-heterologicznym spowoduje wyeliminowanie z surowicy precypitującej przeciwciał, wyprodukowanych w procesie hiperimmunizacji, pod wpływem oddziaływania wspólnego antygeny wirusów ospy ptaków. Równo-



czesnie powinny zostać usunięte z surowicy przeciwciała anty-CAM, drogą reakcji z antygenowymi składnikami CAM, stanowiącymi naturalne zanieczyszczenie antygenu A-Pva, użytego do absorpcji danej surowicy precypitującej. W ten sposób otrzymane surowice w pewnym stopniu monospecyficzne powinny zawierać przeciwciała tylko dla ewentualnych komponent antygenowych gatunkowo względnie szczepowo swoistych i tylko z tymi komponentami powinny reagować w kolejnym odczynie precypitacji w żelu.

Równolegle wykonywano szereg prób kontrolnych, obejmujących próby z antygenami badanymi i kontrolnymi w stosunku do badanych surowic precypitujących nieabsorbowanych i w stosunku do surowic precypitujących absorbowanych antygenem A-Pva-heterologicznym lub antygenem A-Pva-izologicznym. W większości prób uzyskano wyniki zgodne z założeniami teoretycznymi, potwierdzające wyniki poprzednich badań i nie sprawiające większych trudności w interpretacji. Wszystkie wykonane próby kontrolne wypadły w zasadzie prawidłowo.

Wyniki można by uogólnić następująco. Mimo stosowania krzyżowej absorpcji surowicy precypitującej S-Pva antygenem szczepu Pva, wyizolowanego z obcego gatunku ptaka, surowica nie zatracca całkowicie zdolności precypitowania z antygenem własnego szczepu wirusa, dając przeważnie jeden słabszy lub silniejszy prążek precypitacyjny. Właściwości precypitujące tak traktowanej surowicy mogą być zachowane w różnym, mniejszym lub większym, stopniu, zależnie od użytego do absorpcji szczepu Pva i zależnie od użytej surowicy precypitującej S-Pva.

#### Porównanie właściwości antygenowych i badanie pokrewieństwa antygenowego szczepów Pva, pochodzących od ptaków tego samego gatunku

W badaniach tych posługiwano się techniką analogiczną do stosowanej w badaniach omówionych powyżej. Stosowano więc precypitację antygenów A-Pva z surowicami precypitującymi pokrewnych gatunkowo szczepów Pva, blokowanie surowicą S-Pva-homologiczną precypitacji antygenu A-Pva z surowicą S-Pva-izologiczną lub też precypitację antygenów A-Pva z surowicą precypitującą S-Pva-izologiczną, zabsorbowaną uprzednio w danym doświadczeniu antygenem A-Pva-homologicznym. Stwierdzono, że precypitacja z surowicą gatunkowo pokrewnego szczepu Pva, blokowanie precypitacji surowicą takiego szczepu lub absorpcja surowicy precypitującej antygenem gatunkowo pokrewnego szczepu Pva mogą dawać różne wyniki, zależnie od doboru szczepu Pva, użytych do badania. Zwłaszcza szczepy wirusa ospy, izolowane od kur i gołębi, dawały różne wyniki. Nie wyjaśniono, czy zachodzą tu tylko różnice ilościowe czy też

jednocześnie ilościowe i jakościowe. Ogólnie można było wyróżnić szczepy Pva, z których udawało się przygotować antygeny A-Pva o silnych zdolnościach precypitynogennych oraz szczepy Pva, z których przygotowane antygeny A-Pva wykazywały słabe lub średnie zdolności precypitynogene. Obydwa szczepy wirusa ospy indyków nie wykazywały większych różnic w takich badaniach. Warto jednak podkreślić, że badano tylko dwa szczepy wirusa ospy indyków.

### D y s k u s j a

Mimo że wyniki przedstawionych badań w znacznej mierze powtarzały się w kolejnych doświadczeniach, a równoległe wykonywane próby kontrolne wskazywały w zasadzie na swoistość reakcji precypitacyjnych (tym samym świadcząc o skuteczności stosowanych sposobów eliminowania reakcji niewirusowych), na wartość przedstawionych badań rzutuje ujemnie metodyka przygotowywania surowic precypitujących przy użyciu antygenów surowych, używanie antygenów surowych do precypitacji w żelu oraz metodyka badań zbyt niedoskonała pod względem określania ilości. Zmusza to do zachowania ostrożności przy ostatecznej interpretacji wyników.

Niemniej jednak wyniki przeprowadzonych badań wydają się wskazywać na to, że u wszystkich szczepów Pva istnieje wspólna komponenta antygenowa, co byłoby zgodne z obserwacjami T s u b a h a r a i K a t o (19), którzy określili podobną komponentę jako „antygen A”. Zdolności szczepów wirusa ospy kur, indyków i gołębi do precypitacji z surowicami własnymi, mimo uprzedniej absorpcji tej surowicy antygenem wirusa ospy z innego gatunku ptaka, lub mimo blokowania precypitacji surowicą przeciw wirusowi ospy z innego gatunku ptaka, nasuwają przypuszczenie co do możliwości występowania komponenty swoistej dla wirusów ospy poszczególnych gatunków ptaków.

W charakterze hipotezy roboczej, dla dalszych badań, oznaczono tę komponentę u szczepów wirusa ospy indyków jako „m” (*meleagris*), u szczepów wirusa ospy kur jako „g” (*gallus*), a u szczepów wirusa ospy gołębi jako „c” (*columba*). W doświadczeniach uwzględniających absorpcję surowic, blokowanie, precypitację krzyżową, poczyniono obserwacje, wskazujące na możliwość występowania komponenty antygenowej, nieswoistej dla wirusów ospy danego gatunku ptaka, wspólnej dla szczepów indyckich i kurzych (oznaczono ją roboczo symbolem „1”) lub wspólnej dla szczepów kurzych i gołębi (oznaczono ją symbolem „2”). Na to, czy istnieją tego rodzaju powiązania między szczepami wirusa ospy gołębi i indyków, nie znaleziono żadnych dowodów, nie wydaje się to jednak być niemożliwe.

Układ antygenów rozpuszczalnych badanych szczepów Pva, po narzuceniu nomenklatury roboczej, przedstawia rubryka 7 tabeli 2. Należy podkreślić, że w przeprowadzonych badaniach „surowy” antygen NP nie dawał precypitacji (zawiesina z osadu ciałek elementarnych), a w dotychczasowych badaniach nie podjęto prób określenia właściwości precypity-nogennych wyciągów alkalicznych z ciałek elementarnych. W oparciu o wyniki badań innych autorów, jak również o wyniki badań własnych, można odtworzyć przypuszczalną strukturę antygenową wirusów ospy ptaków w sposób przedstawiony w tabeli 3 (rys. 4).


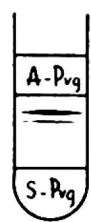

Antygen nierozpuszczalny wspólny dla grupy <i>Pox-virus</i>	Antygeny rozpuszczalne		
	Wspólny dla podgr. <i>Pox-virus avium</i>	Gatunkowo swoisty	Gatunkowo nieswoisty
NP Smadel, Rivers i Ho- agland (1942) Takahashi i współpr. (1959) Woodroofe i Fenner (1962)	A Tsubahara i Kato (1960)	M — ( <i>meleagridis</i> )	(1)
		G — ( <i>gallina</i> )	(1) (2)
		C — ( <i>columba</i> )	(2)
		? wirusy ospy od in- nych gat. ptaków	?

Rys. 4. Hipotetyczna struktura antygenowa wirusów podgrupy *Pox-virus avium* (na podstawie badań własnych i danych z literatury)

Podlega dyskusji to, czy antygen rozpuszczalny wirusa ospy ptaków jest tak dalece zróżnicowany, że można w nim wykazać komponenty: wspólną podgrupowo, gatunkowo swoistą i gatunkowo nieswoistą. Na poziomie dzisiejszych wiadomości o antygenie rozpuszczalnym wirusów sprawa ta nie może być wyjaśniona. W badaniach nie można było wykluczyć, czy obserwowane różnice antygenowe są wynikiem różnic jakościowych czy ilościowych.

Osobne zagadnienie stanowi też sprawa adaptacji wirusów ospy różnych gatunków ptaków do zarodka tylko jednego gatunku ptaka, mianowicie kury i wpływu tej adaptacji na strukturę antygenową. Wydaje się możliwe, że komponenta antygenowa wspólna, oznaczona przez T s u b a h a r a i K a t o, jak i w niniejszych badaniach, symbolem „A” może być wyrazem adaptacji szczepów Pva różnego pochodzenia do zarodka kury. W tym sensie antygen „A” byłby odpowiednikiem antygeny N-K, opisanego przez M a y r a i współpracowników (11).

W przedstawionych badaniach nie zostało wyjaśnione, jaki jest przy uodparnianiu zwierząt wpływ komponent antygenowych wirusa czy też produktów jego rozpadu zawartych w antygenie „surowym” na właściwości antygenowe błony kosmówkowo-omoczniowej zarodków kury. Pozosta-

WIRUS			Surowica precypitacyjna	Zdolności precypit. badanych szczepów (p - słaby próżniak, P - silny próżniak, I - F - białe pakućnie)	Układ prążk. precypitacyjnych (test próbunkowy)	Układ antygenów rozpuszczalnych		
Podgrupa	Wyizolowany z:	Symbol szczepu				grupowo- swoisty	gatunk- swoisty	gatunk- mieszany
1	2	3	4	5	6	7		
POXVIRUS AVIUM - (Pva)	Mekugris - (m)	Pvm 1	S - Pvm 1	p, P <sub>I</sub> , p <sub>II</sub>		A	m	I
		Pvm 2	S - Pvm 2	p, P <sub>I</sub> , p <sub>II</sub>		A	m	I
	Gallina - (g)	Pvg 1	S - Pvg 12	(p), P <sub>I</sub> , (p <sub>II</sub> )		A	(?)	
		Pvg 2	-- --	(p), P <sub>I</sub> , p <sub>II</sub>		A	g	
		Pvg 3	-- --	P <sub>I</sub> , p <sub>II</sub>		A	g	
		Pvg 4	S - Pvg 4	P <sub>I</sub> , p <sub>II</sub>		A	g	
		Pvg 5	S - Pvg 5	P <sub>I</sub> , p <sub>II</sub> , (p <sub>III</sub> )		A	g	(2)
		Pvg 6	S - Pvg 6	P <sub>I</sub> , p <sub>II</sub> , (p <sub>III</sub> )		A	g	(2)
		Pvg 7	S - Pvg 7	P <sub>I</sub> , p <sub>II</sub> , p <sub>III</sub>		A	g	2
		Pvg 8	S - Pvg 8	P <sub>I</sub> , p <sub>II</sub> , p <sub>III</sub>		A	g	2?
		Pvg 9	S - Pvg 12	P <sub>I</sub> , P <sub>II</sub> , p <sub>III</sub>		A	g	2
		Pvg 10	-- --	P <sub>I</sub> , P <sub>II</sub> , p <sub>III</sub> , (p <sub>IV</sub> )		?A	g	(1, 2)
		Pvg 11	-- --	P <sub>I</sub> , P <sub>II</sub> , p <sub>III</sub> , p <sub>IV</sub>		?A	g	1, 2
		Pvg 12	-- --	P <sub>I</sub> , P <sub>II</sub> , p <sub>III</sub> , p <sub>IV</sub> , (p <sub>V</sub> )		A	g	1, 2, (?)
		Pvg 13	-- --	P <sub>I</sub> , P <sub>II</sub> , p <sub>III</sub> , p <sub>IV</sub> , p <sub>V</sub>		?A	g	1, 2, (?)
	Columba (c)	Pvc 1	S - Pvc 1	P <sub>I</sub> , (P <sub>II</sub> )		A	-	(2)
Pvc 2		S - Pvc 3	P <sub>I</sub> , (P <sub>II</sub> ), (P <sub>III</sub> )	A		(c)	(2)	
Pvc 3		-- --	P <sub>I</sub> , P <sub>II</sub> , P <sub>III</sub>	A		c	(2)	

## Legenda:

(p...) = wynik uzyskiwany nieregularnie

? = możliwe dalsze różnice

A-Pv... + antygen przygotowany z danego szczepu wirusa

S-Pv... = surowica precypitująca " " "

Rys. 5. Struktura antygenowa wirusów ospy ptaków wg badań własnych met. precypitacji w żelu

je również otwarta sprawa różnic w strukturze antygenowej błon kosmówkowo-omocznionych, pochodzących z zależonych jaj od różnych kur. W świetle dotychczasowych badań immunobiologicznych, wykonanych nad wirusami ospy pochodzącymi od różnych gatunków ptaków, zróżnicowanie antygenowe wirusów wydaje się zupełnie prawdopodobne. Wnioski takie można by wysnuć między innymi z prac Jacotot i Valle (6), Wittmanna i Mayra (24).

Na możliwość zróżnicowania antygenowego wirusów ospy izolowanych nawet z jednego gatunku ptaków wskazują np. badania nad szczepieniem i rewakcyacją różnymi wirusami ospy, Bengelsdorf (2), badania nad dożylnym i doskórnym zakażaniem piskląt, Mayr (10), Hamann (5), Szakmary (17) i in. Możliwość użycia szczepów gołębi do uodparniania przeciw ospie kur wskazuje na to, że w grę może wchodzić tutaj wspólna komponenta antygenowa, silnie wyrażona w odpowiednich szczepach wirusa ospy gołębi. Podobnie możliwość stosowania wirusa ospy indyków do szczepienia indyków, jak i gołębi i kur (Suhaci, Ursache i Tomescu — 16; Szakmary — 17; Bamberger i Szakmary — 1; Brill — 3) wskazuje na powiązania antygenowe szczepów *Pox-virus avium*.

Warto podkreślić, że zaobserwowanym różnicom w strukturze antygenowej wirusów ospy ptaków odpowiadały w pewnym stopniu różnice w wyglądzie ognisk ospowych, powstających w CAM zarodków kury w następstwie zakażenia. Fot. 4, 5, 6. Obserwacje nad różnym wyglądem ognisk wywoływanych w CAM zarodków kury przez wirusy ospy ptaków powstały poczynione już przez szereg badaczy, a jako jeden z pierwszych zwrócił na to uwagę Burnet (1936). Wygląd ognisk ospowych może w dużej mierze zależeć od zarodków kury, użytych do hodowli wirusa. Zwraca jednak uwagę fakt, że podobnie jak zaobserwowano różnice w strukturze antygenowej wirusów ospy pochodzących od różnych gatunków ptaków, zanotowano też różnice w wyglądzie ognisk wywoływanych w CAM zarodków kury przez wirusy ospy pochodzące z różnych gatunków ptaków. Podobnie jak obserwowano również różnice w zdolnościach precypitynogennych antygenów A-Pva, przygotowanych z różnych szczepów Pva pochodzących z ptaków tego samego gatunku, tak samo obserwowano szereg drobnych, nieraz dość istotnych różnic w morfologii ognisk ospowych, wywoływanych w CAM przez szczepy wirusa ospy, pochodzące z tego samego gatunku ptaków.

Niewątpliwie jest rzeczą bardzo interesującą stosunek antygeny rozpuszczalnego do antygeny związanego w cząsteczce wirusowej, ilość antygeny rozpuszczalnego w cząsteczce, jego umiejscowienie oraz mechanizm uwalniania czy też w ogóle powstawania antygeny rozpuszczalnego wirusa ospy ptaków. Badań w tym kierunku jednak nie prowadzono.

## WNIOSKI

1. W błonach kosmówkowo-omocznionych (CAM) zarodków kury, zakażonych szczepem *Poxvirus avium* (Pva), występuje obok cząsteczek wirusowych antygen rozpuszczalny.

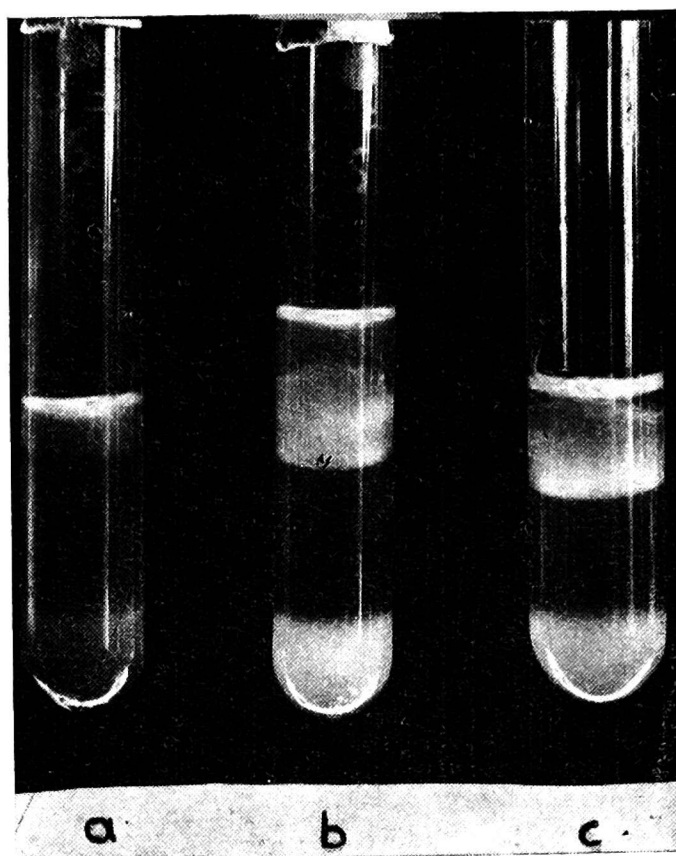
2. Surowy antygen rozpuszczalny wirusów ospy ptaków można wykazać i badać odczynem precypitacji w żelu, natomiast surowy antygen cząsteczkowy (zawiesina cząsteczek wirusowych w roztworze fizjologicznym NaCl) nie daje w żelu precypitacji z surowicą swoistą.

3. W surowym antygenie rozpuszczalnym, przygotowanym z CAM zarodków kury zakażonych szczepem *Poxvirus avium*, można wykazać szereg komponent antygenowych: komponentę wspólną (swoistą) podgrupowo; którą zgodnie z badaniami T s u b a h a r a i K a t o (19) oznaczono jako „A”, komponentę swoistą grupowo, którą zależnie od źródła izolowania szczepu oznaczono jako „m” — w szczepach wirusa ospy indyków, „g” — w szczepach wirusa ospy kur i „c” — w szczepach wirusa ospy gołębi, oraz komponentę nieswoistą gatunkowo, wspólną dla wirusów ospy izolowanych z dwóch różnych gatunków ptaków, oznaczoną jako „1” — u szczepów wirusa ospy kur i indyków oraz „2” u szczepów wirusa ospy kur i gołębi, vide rys. 5.

4. W oparciu o wyniki precypitacji w żelu z surowicami precypitującymi swoistymi, szczepy *Pox-virus avium* izolowane z ptaków tego samego gatunku, można podzielić na szczepy o silnych, średnich i słabych właściwościach antygenowych.

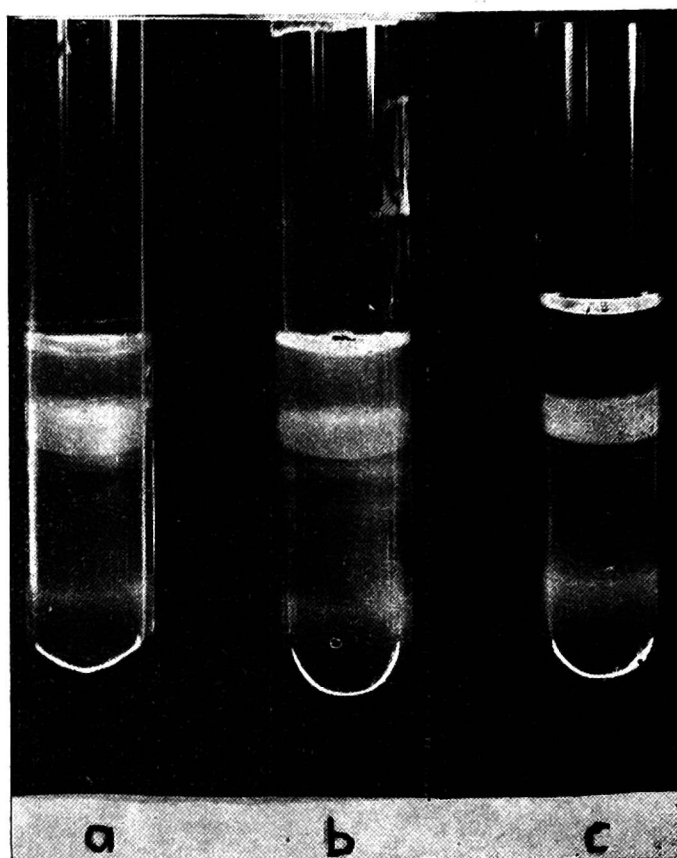
5. Różnicom we właściwościach antygenowych szczepów *Pox-virus avium* odpowiadają w pewnym stopniu różnice w morfologii ognisk ospowych, wywoływanych w CAM zarodków kury.

6. Hiperimmunizacja królików zawiesiną z CAM, zakażonych wirusem ospy ptaków, pozwala otrzymać surowicę precypitującą, która może być zastosowana do reakcji w żelu, pod warunkiem zapewnienia eliminowania reakcji precypitacyjnych niewirusowych, np. drogą odpowiedniej absorpcji surowicy lub przez stosowanie dodatkowej warstwy żelu, zawierającej surowicę blokującą anty-CAM.



Rys. 6. Probówkowa precypitacja w żelu z kierowanym blokowaniem surowicą S-CAM. Próby kontrolne:

oznaczenie	surowica precypit.	surowica blokująca	antygen
a	S-CAM	S-CAM	bez antygeny
b	S-CAM	S-CAM	kontrolny A-CAM 0,5 ml.
c	S-CAM	S-CAM	kontrolny A-CAM 0,25 ml.

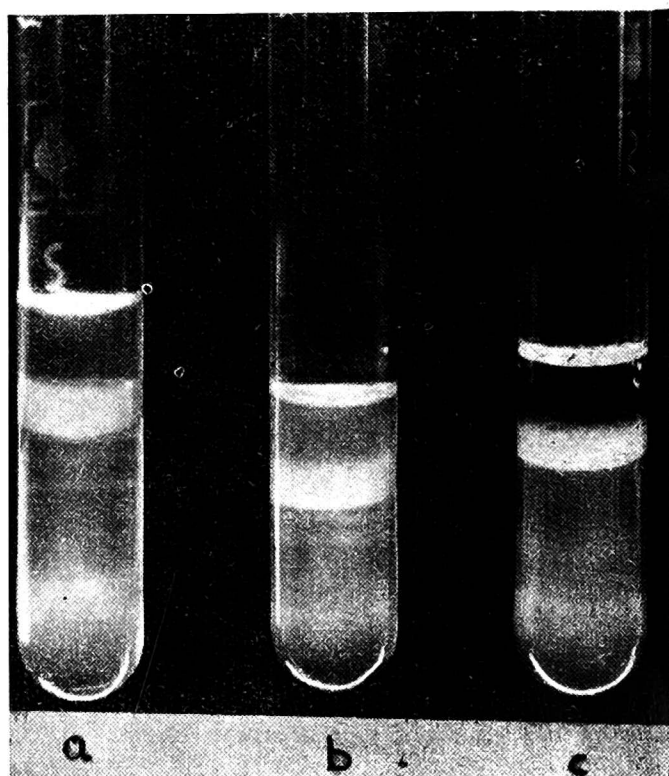


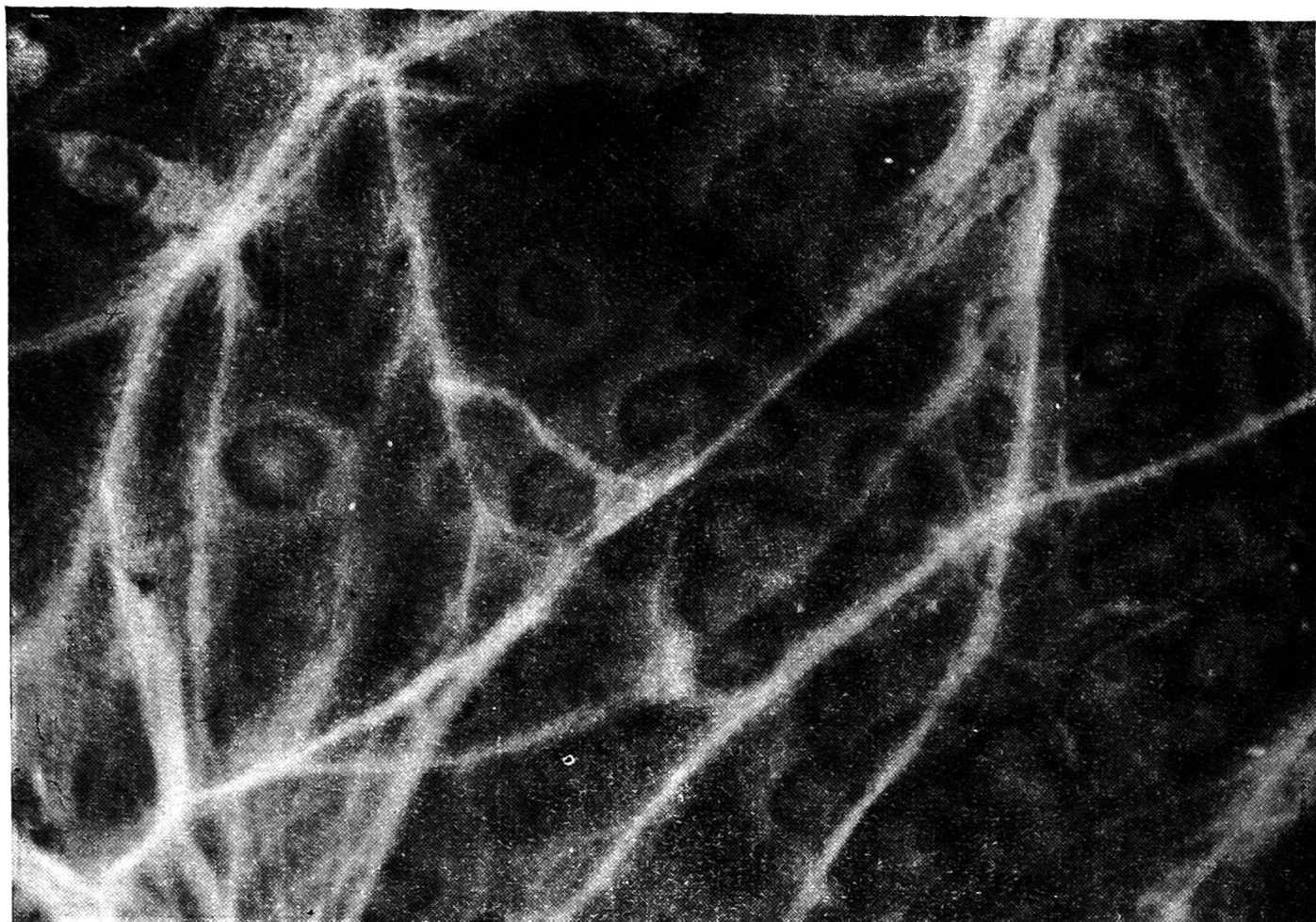
Rys. 7. Probówkowa precypitacja w żelu z kierowanym blokowaniem surowicą S-CAM. Próby z antygenami szczepu Pvg-12:

oznaczenie	surowica precypit.	surowica blokująca	antygen
a	S-Pvg-12	S-CAM	A-Pvg-12-W 1500
b	S-Pvg-12	S-CAM	A-Pvg-12-W 18000
c	S-Pvg-12	S-CAM	A-Pvg-12-Filtr.

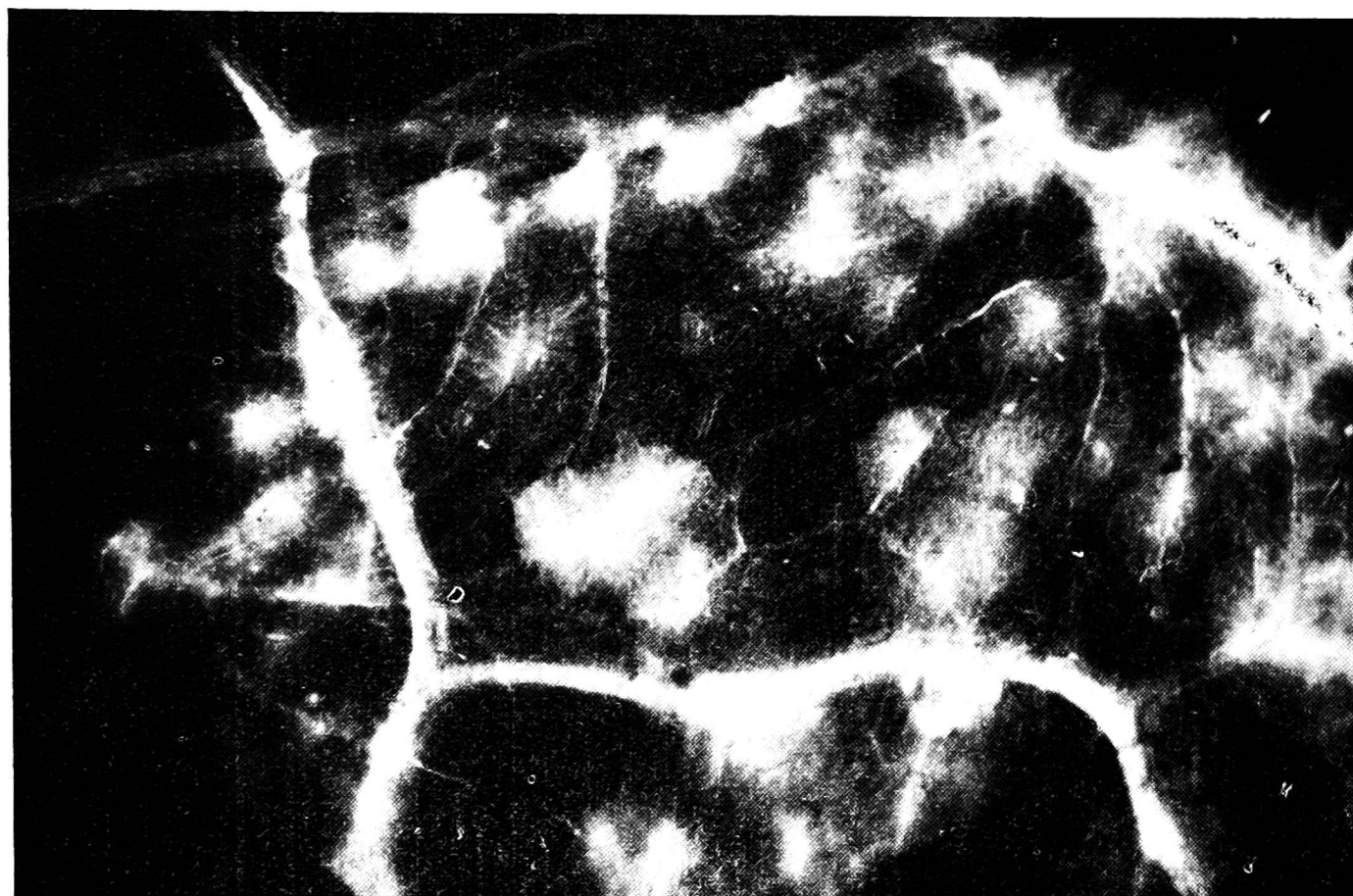
Rys. 8. Probówkowa precypitacja w żelu z kierowanym blokowaniem surowicą S-CAM. Próby z antygenami szczepu Pvc-3:

oznaczenie	surowica precypit.	surowica blokująca	antygen
a	S-Pvc-3	S-CAM	A-Pvc-3-W 1500
b	S-Pvc-3	S-CAM	A-Pvc-3-W 18000
c	S-Pvc-3	S-CAM	A-Pvc-3-Filtr.



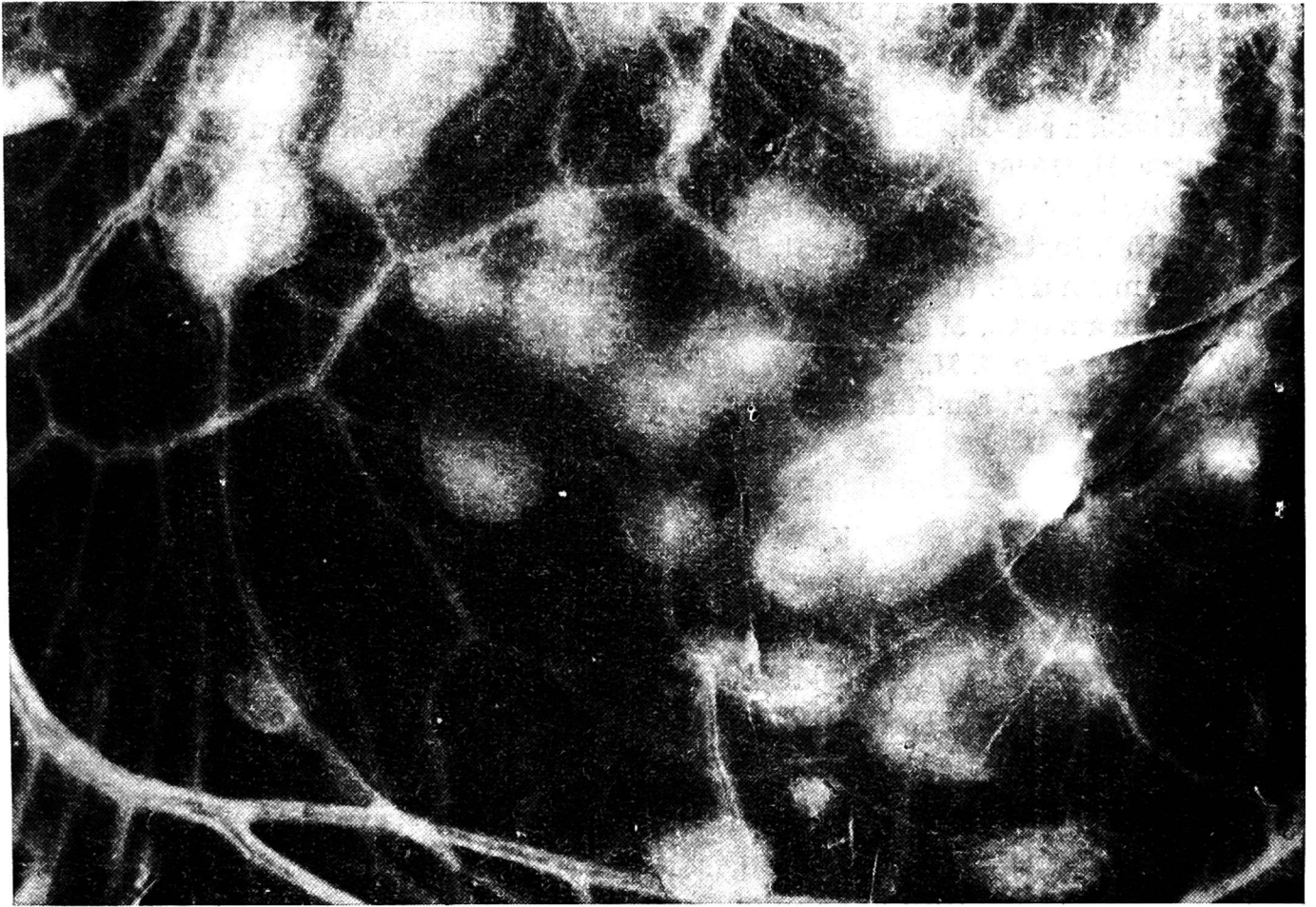


Rys. 9. Zmiany makroskopowe wywoływane w CAM zarodków kury. Szczep Pvm-1 (izolowany z indyka), drugi pasaż, 5 dzień inkubacji p.i. Powiększenie ok. 10 X (Fot. B. Gałka)



Rys. 10. Zmiany makroskopowe wywoływane w CAM zarodków kury. Szczep Pvg-4 (izolowany z kury), czwarty pasaż, 5 dzień inkubacji p.i. Powiększenie ok. 10 X (Fot. B. Gałka)





Rys. 11. Zmiany makroskopowe wywoływane w CAM zarodków kury. Szczep Pvc-1 (izolowany ze szczepionki gołębiej), trzeci pasaż, 5 dzień inkubacji p. i. Powiększenie ok. 10 × (Fot. B. Gałka)

#### PIŚMIENNICTWO

1. Bamberger K., Szakmary G. (1961) — *Mag. allatorv. Lapja* 16, 289.
2. Bengelsdorf H. J. (1961) — *Zbl. Vet. Med.* 8, 498
3. Brill J. (1956) i (1962) — informacje ustne
4. Gispén R. (1955) — *J. Immunol.* 74, 134
5. Hamann J. (1960) — *Berl. Münch. tierärztl. Wschr.* 73, 193
6. Jacotot H., Valle A., Reinie L. (1956) — *Ann. Inst. Pasteur* 90, 28
7. Litwin J. (1957) — *J. infect. Dis.* 101, 100
8. Malicki K. (1964) — *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Roln.* — nr 56
9. Malicki K. (1964) — *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Roln.* — nr 56
10. Mayr A. (1960) — *Zbl. f. Bakt. I Orig.* 179, 2, 149
11. Mayr A., Herrlich A., Mahnel H. (1955) — *Arch. f. Hyg. u. Bakt.* 139, 6, 580
12. Rondle C. J. M., Dumbell K. R. (1962) — *J. Hyg., Camb.* 60, 41
13. Ouchterlony O. (1948) — *Acta path. microbiol. scand.* 25, 186
14. Oudin J. (1946) — *C. R. Acad. d. Science* 222, 115
15. Smadel J. E., Rivers T. M., Hoagland C. L. (1942) — *Arch. Path.* 34, 275
16. Suhaci J., Ursache R., Tomescu V. (1956) — *Stud. Cerc. Inframicrobiol. Parazit.* 7, 403
17. Szakmary G. (1961) — *Mag. allatorv. Lapja* 16, 260
18. Takahashi M., Kameyama S., Kamahora J. (1959) — *Biken's J.* 2, 27. cyt. wg poz. 25

19. Tsubahara H., Kato K. (1960) — Bull. Nat. Inst. Anim. H1th. 41, 43
20. Tsubahara H., Kataoka T., Kato K. (1960) — Bull. Nat. Inst. Anim. H1th. 41, 1
21. Tsubahara H., Sazawa H., Kataoka T., Nakamura T., Kawamura H. (1956) — Bull. Nat. Inst. Anim. H1th. 31, 47
22. Tsubahara H., Sazawa H., Kataoka T., Kawamura H. (1956) — Bull. Nat. Inst. Anim. H1th. 31, 57
23. Wittmann G. (1958) Zbl. Vet. Med. 5, 769
24. Wittmann G., Mayr A. (1960) — Zbl. f. Bact. I Orig. 177, 4, 518
25. Woodroffe G. H., Fenner F. (1962) — Virology 16, 334
26. Oakley C. L., Fulthrope J. (1953) — J. Path. Bact., 65, 40

К. Малицки (Варшава)

### АНТИГЕНОВАЯ СТРУКТУРА ВИРУСОВ ОСПЫ ПТИЦ, (*POX-VIRUS AVIUM*), ИЗОЛИРОВАННЫХ ОТ КУР, ГОЛУБЕЙ И ИНДЕЕК — В СВЕТЕ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

#### Резюме

На основе реакции своеобразной преципитации в желе с сыворотками крови от гипериммунизированных кроликов, исследовалась антигеновая структура 18 штаммов *Pox-virus avium*, изолированных от кур (13), голубей (3) и индеек (2). Установлено, что в сыром растворимом антигене, изготовленным из вируса, выращенного с САМ куриных эмбрионов (3—6 пассажей в САМ), кроме общего подгруппового антигена „А”, появляются антигеновые компоненты: видово своеобразная — „m”, „g” или „c”, а также видово несвоеобразная, общая для вирусов оспы, изолированных от двух различных птиц — „1” или „2”. В таблице 6 приведены результаты анализа антигеновой структуры исследуемых штаммов, в таблице 7 — гипотетическая антигеновая структура штаммов *Pox-virus avium*, воспроизведенная на основе данных из литературы и результатов собственных исследований. Кроме того, установлено, что штаммы *Pox-virus avium*, изолированные от одного вида птицы, могут обладать различными, сильными и слабыми антигеновыми свойствами. Не выяснено, играют ли тут роль количественные или качественные и качественные различия.

K. M a l i c k i (Warszawa)

ANTIGENIC STRUCTURE OF *POX-VIRUS AVIUM* STRAINS  
ISOLATED FROM HENS, PIGEONS, AND TURKEYS — IN THE  
LIGHT OF THE AUTHOR'S OWN INVESTIGATION

S u m m a r y

Antigenic structure of 18 strains of *Pox-virus avium* isolated from hens (13), pigeons (3), and turkeys (2) was studied with agar precipitation test using hyperimmune rabbit sera. It was found that in crude soluble antigen prepared from virus cultivated in chorioallantoic membrane (CAM) of chick embryo (3—6 passages in CAM) besides common subgroup antigen „A” there were following antigenic components: „m”, „g”, or „c” specific for the species and „1” or „2” non-specific for the species and common for pox-viruses isolated from two different avian species. Table 6 presents the results of the analysis of antigenic structure of the strains tested; Table 7 shows the hypothetical antigenic structure of *Pox-virus avium* strains based on data from literature and results of the author's studies. In addition it was found that *Pox-virus avium* strains isolated from the same avian species may possess different, weak or strong antigenic properties. It was not elucidated whether only quantitative or quantitative and qualitative differences played part in it.