

PRAKTYKA LABORATORYJNA

MICHAŁ BARTOSZCZE, JACEK ROSZKOWSKI

Puławy

Zastosowanie techniki immunoenzymatycznej do wykrywania wirusów

Technika immunofluorescencyjna należy obecnie do podstawowych i najczęściej stosowanych metod wykrywania antygenów wewnątrzkomórkowych. Jakkolwiek metoda ta jest stosunkowo czuła i pozwala wykrywać nawet małe ilości antygenu, to jednak użycie jej ograniczone jest przez 3 zasadnicze czynniki: przenikanie znakowanych przeciwciał do komórki, techniczna trudność w uwidacznianiu substancji znakującej oraz zmiany właściwości przeciwciała lub substancji znakującej wywołane reakcją sprzęgania tych związków.

Wprowadzenie w latach sześćdziesiątych nowej techniki znakowania przeciwciał, w której jako markerów użyto enzymów, pozwoliło znacznie zmniejszyć, a nawet całkowicie wyeliminować ograniczenia występujące w dotychczas stosowanych metodach.

Spośród szeregu enzymów używanych w omawianej technice, największe zastosowanie znalazła peroksydaza chrzanowa. Enzym ten posiada stosunkowo niski ciężar cząsteczkowy i w związku z tym znakowany kompleks antygenu z przeciwciałem łatwo przenika do komórki. Poza tym peroksydaza chrzanowa dobrze znosi obróbkę histologiczną, nie tracąc nic ze swej aktywności (8).

Jedną z technik najczęściej używanych do znakowania przeciwciał peroksydazą jest metoda z aldehydem glutarowym podana przez Avrameasa (2). Metoda ta jest stosunkowo prosta, a wykonanie jej nie przedstawia większych trudności ze względu na dostępność używanych w niej związków chemicznych. Przygotowany tą metodą preparat, przechowywany w temp. 4°C, zachowuje swoją aktywność katalityczną i immunologiczną przez szereg miesięcy, a w stanie zamrożenia nawet przez parę lat.

Z innych metod stosowanych do znakowania przeciwciał warto wspomnieć o metodzie Nakane i Pierce'a (10) z użyciem sulfonu dwufluorodwunirodwufenylnu (FNPS) i metodzie opracowanej przez Avrameasa i Uriela (cyt. wg 2) z użyciem karbodwuimidu (MCDI).

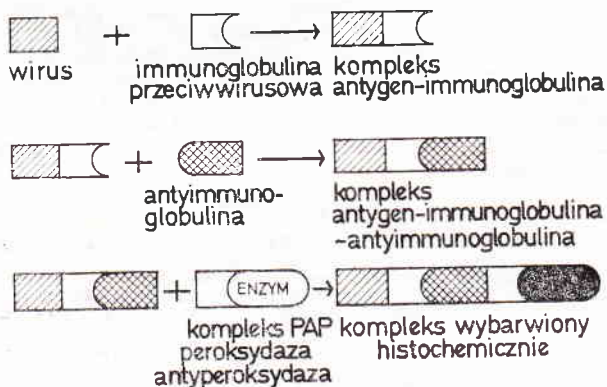
Aktywność peroksydazy można uwidaczniać histochemicznie za pomocą szeregu odczynników, takich jak benzydenu, alfa-naftol, czy mieszanina alfa-naftolu z p-fenylenodwuaminą (odczynnik Nadi) (8). Obecnie najczęściej stosowana jest metoda podana przez Grahama i Karnovsky'ego (7) z użyciem czterochlorowodoru 3,3'-dwuaminobenzydyny. W obecności peroksydazy i nadtlenu wodoru benzydenu zostaje utleniona, w wyniku czego powstaje początkowo niebieski, a później ciemnobrunatny produkt reakcji. Złogi utlenionej benzydyny można obserwować w zwykłym mikroskopie świetlnym, a także ze względu na ich dużą gęstość mogą być wykorzystane w badaniach w mikroskopie elektronowym.

Podobnie jak przy immunofluorescencji, technika immunoenzymatyczna może być stosowana zarówno jako metoda bezpośrednia, jak i pośrednia. W pierwszym wypadku antygen łączymy z przeciwciałami znakowanymi peroksydazą, a powstały kompleks wybarwiamy histochemicznie. Przy metodzie pośredniej antygen wiąże się ze swoistą surowicą, a ta z kolei reaguje z antyimmunoglobulinami znakowanymi peroksydazą. Szczególną odmianą metody pośredniej jest technika peroksydazowo-antyperoksydazowa (PAP). W technice tej przebieg odczynu jest trójfazowy. W pierwszym etapie antygen wiązany jest z immunoglobulinami tworząc kompleks antygen- immunoglobulina. Następnie kompleks ten reaguje z dodanymi w nadmiarze przeciwciałami antyimmunoglobulinowymi i w ten sposób powstaje nowy kompleks antygen-immunoglobulina-antyimmunoglobulina. Nadmiar antyimmunoglobulin powoduje, że część ich chwytników nie zostaje wysycona i przez to możliwe jest połączenie tego kompleksu z kompleksem złożonym z peroksydazy i surowicy antyperoksydazowej, otrzymanej od tego samego gatunku zwierzęcia co immunoglobuliny. Dopiero taki układ wybarwiamy histochemicznie na peroksydazę. Zasady opisanej techniki zostały opracowane przez Sternberga i wsp. (13), a w 2 lata później Doughery i wsp. (6) zastosowali ją do badań wirusologicznych.

Metody immunoenzymatyczne można stosować do wykrywania antygenów w hodowlach komórkowych, rozmazach i skrawkach histologicznych. Preparaty sporządzone tą techniką są stosunkowo trwałe, co niewątpliwie stanowi dużą ich zaletę.

Oceniając wartość metod immunoenzymatycznych należy stwierdzić, że chociaż wyniki uzyskiwane tymi metodami są podobne do rezultatów otrzymywanych przy pomocy immunofluorescencji, to jednak trwałość preparatów, możliwość oglądania ich w zwykłym mikroskopie świetlnym, stosunkowo silna reakcja barwna oraz duża czułość i swoistość metody, szczególnie techniki PAP, stawia metody immunoenzymatyczne przed techniką immunofluorescencyjną.

Te zalety sprawiły, że technika immunoenzymatyczna znajduje coraz szersze zastosowanie, zwłaszcza przy wykrywaniu i lokalizacji antygenów i cząstek wirusowych.



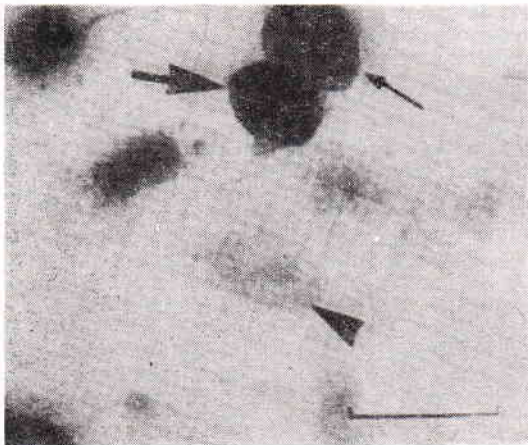
Ryc. 1. Technika peroksydazowo-antyperoksydazowa — schematyczny przebieg reakcji

Siverd i Sharon (12) adaptowali metodę przeciwciał znakowanych peroksydazą do wykrywania wirusa krowianki (szczep WR 204) w hodowlach komórek linii ciągłej L. Po upływie 6 godzin od chwili zakażenia w cytoplazmie komórek obserwowano pojawienie się ciemnobrązowych, odgraniczonych ciałek wtęrotowych. Obraz ten nie ulegał zmianie po 18 godzinach, natomiast po 48 godzinach od chwili infekcji zacierała się granica między ciałkami a cytoplazmą. W hodowlach kontrolnych nie obserwowano reakcji nieswoistych. Równolegle, dla porównania, zakażone hodowle barwiono metodą Giemzy lub oranżem akrydyny. Najwyraźniejszy obraz zmian w zakażonych komórkach obserwowano jednak przy zastosowaniu metody immunoenzymatycznej.

Kurstak i wsp. (9) badali lokalizację wirusa cytomegalii w hodowli komórkowej przy użyciu przeciwciał znakowanych peroksydazą. Autorzy ci obserwowali obecność antygeny wirusowego początkowo w jądrze, a następnie w cytoplazmie.

Badania nad porównaniem bezpośredniej i pośredniej metody immunoperoxydazowej przy wykrywaniu wirusa *Herpes equi* prowadzili Teufel i wsp. (15). Metoda bezpośrednia dawała dokładniejszy obraz lokalizacji antygeny wirusowego w jądrze i cytoplazmie zakażonych komórek niż metoda pośrednia.

Lokalizację wirusa IBR w hodowlach nerki cielęcia przy użyciu techniki peroksydazowej badali Parks i wsp. (11). Przy obserwacji preparatów w mikroskopach świetlnym i elektronowym stwierdzono korelację w lokalizacji antygeny wirusowego i cząstek wirusa. Antygen wykrywano w postaci ciemnobrązowych złogów po 6 godzinach od zakażenia tj. w okresie, kiedy cząstki wirusowe zaczęły się pojawiać w cytoplazmie.



Ryc. 2. Hodowle zakażone wirusem SV₄₀ w 48 godz. po infekcji (wg 17). Reakcję dodatnią (immunoenzymatyczną) oznaczono strzałką, reakcję ujemną oznacza grot strzałki

Wicker i Awrameas (17) zastosowali technikę znakowanych enzymami przeciwciał do wykrywania antygenów adenowirusa 12, SV₄₀ i wirusa K w hodowlach komórkowych. Autorzy ci użyli do badań peroksydazę, alkaliczną fosfatazę oraz oksydazę glikozy. Przy użyciu trzech wymienionych enzymów uzyskano zbliżone do siebie wyniki pod względem lokalizacji antygeny i swoistości odczynu. Uzyskane wyniki pokrywały się w pełni z obserwacjami otrzymanymi przy użyciu metody immunofluorescencyjnej. Ci sami autorzy wykorzystując różnice w reakcjach barwnych, wykazali możliwość jednoczesnego stosowania przeciwciał znakowanych dwoma różnymi enzymami do wykrywania dwóch antygenów w jednym preparacie. Obserwowane reakcje nieswoiste były łatwe do odróżnienia od swoistych skupisk barwnych. Zdaniem autorów reakcje nieswoiste można wyeliminować stosując zamiast odpornościowych surowic globuliny o wysokim mianie.

Benjamin i Ray (3) porównywali w celach diagnostycznych metodę peroksydazową z innymi metodami stosowanymi standardowo przy diagnostyce wirusów grypy, parainfluenzy i wirusa RS. Uzyskano 100% zgodności wyników metodą peroksydazową i odczynem seroneutralizacji. W hodowlach zakażonych wirusem RS, metodą immunoenzymatyczną wykrywano obecność wirusa po 12 godzinach od chwili infekcji, podczas gdy efekt cytopatyczny pojawiał się między 48—72 godziną. Przy mianowaniu wymienionych wirusów w hodowlach komórkowych, najwyższe miana uzyskiwano metodą enzymatyczną.

Boyle i Atherton (5) zaadaptowali odczyn przeciwciał znakowanych peroksydazą do wykrywania wirusa odry. Hodowle komórek wybarwiane 40—50 godzin po infekcji zawierały wielojądrowe komórki obrzynie z brązowymi złogami w cytoplazmie. Uzyskane wyniki pokrywały się z danymi otrzymanymi metodą immunofluorescencji, z tym, że przy użyciu techniki immunoenzymatycznej obserwowano znacznie słabsze reakcje nieswoiste.

Atanasiu i wsp. (1) badali przydatność metody immunoenzymatycznej do wykrywania antygeny wirusa wścieklizny w hodowlach oraz narządach zwierząt zakażonych. W preparatach odciskowych z mózgu zwierząt zakażonych wirusem ustalonym, antygen wirusowy wykrywano w postaci małych i dużych skupisk barwnych. Natomiast w preparatach odciskowych mózgu zwierząt zakażonych wirusem ulicznym stwierdzano tylko duże skupiska. Analogiczne wyniki uzyskano przy użyciu techniki immunofluorescencyjnej. Wymienieni autorzy wskazują na dużą przydatność metody immunoenzymatycznej do diagnostyki wścieklizny oraz do badań nad strukturą antygenową wirusa.

Becker i wsp. (4) wykrywali przy pomocy metody immunoenzymatycznej antygen wirusa TGE w hodowlach komórek tarczycy. Cytoplazma zakażonych komórek przybierała różne odcienie brązu w zależności od ilości zlokalizowanego tam antygeny. Technika immunoenzymatyczną wykrywano barwne złogi leżące w cytoplazmie o rozmiarach około 0,5—2 μm. Prawdopodobnie były to zawierające wirus wakuole, jakie obserwuje się w zakażonych komórkach w mikroskopie elektronowym.

Przy zastosowaniu techniki immunoenzymatycznej, Ubertaini i wsp. (16) wykrywali antygen reowirusa w hodowlach wątroby szympansa. Wewnątrz cytoplazmy zakażonych komórek obserwowano ciemnobrązowe złogi, które pod względem lokalizacji odpowiadały obrazowi otrzymanemu techniką immunofluorescencji.

Sutmoller i Cowan (14) prowadzili badania nad przydatnością trzech metod immunoenzymatycznych do wykrywania wirusa pryszczycy. Każda z metod okazała się przydatna, jednak najsilniejsze reakcje uzyskiwano przy zastosowaniu metody peroksydazowo-antyperoksydazowej (PAP). Wymienieni autorzy wskazują na przydatność metody immunoenzymatycznej dla wykrywania wirusa pryszczycy.

Jak wynika z tego krótkiego przeglądu prac nad zastosowaniem metody znakowania przeciwciał enzymami w badaniach wirusologicznych, technika ta ze względu na swoje zalety zasługuje na bliższe zainteresowanie, gdyż jako jedna z szybkich metod wykrywania wirusów może oddać cenne usługi w diagnostyce i zwalczaniu zakażeń wirusowych ludzi i zwierząt.

Piśmiennictwo

1. Atanasiu P., Drogonas P., Tsiang H., Harbi A.: *Annls Inst. Pasteur, Paryż*, 121, 247, 1971.
2. Avrameas S.: *Immunochemistry* 6, 43, 1969.
3. Benjamin D. R., Ray G.: *Appl. Microbiol.* 28, 47, 1974.
4. Becker W., Teufel P., Mields W.: *Zentbl. Vet. Med. B* 21, 59, 1974.
5. Boyle D. B., Atherton J. G.: *Arch. ges. Virusforsch.* 35, 299, 1971.
6. Dougherthy R. M., Marucci A. A., Distefano H. S.: *J. gen. Virol.* 15, 149, 1972.
7. Graham R. C., Karnovsky M. J.: *J. Histochem. Cytochem.* 14, 291, 1966.
8. Kurstak E.: *Methods in Virology* 5, 433, 1971.

9. Kurstak E., Bellonci S., Onji P. A., Montplaisier S., Martineau B.: Arch. ges. Virusforsch. 38, 67, 1972.
10. Nakane P. K., Pierce G. B.: J. Histochem. Cytochem. 14, 929, 1966.
11. Parks J., Talens L., Zee Y. C.: Bact. Proc. 70, 203, 1970.
12. Siverd N. J., Sharon N.: Proc. Soc. exp. Biol. Med. 131, 939, 1969.
13. Sternberger L., Hardy P. H., Cuculis J. J., Meyer H. G.: J. Histochem. Cytochem. 18, 315, 1970.
14. Suttmoller P., Cowan K. M.: J. gen. Virol. 22, 287, 1974.
15. Teufel P., Miels W., Becker W.: Zentbl. Vet. Med. B 21, 37, 1974.
16. Ubertini T., Wilku B. N., Neronha F.: Appl. Microbiol. 21, 534, 1971.
17. Wicker R., Avrameas S.: J. gen. Virol. 4, 465, 1969.

Adres autora: dr Michał Bartoszcze, ul. Krańcowa 1/19, 24-100 Puławy.

Z HISTORII WETERYNARII

JÓZEF JANISZEWSKI
Zgorzelec

XX-ta rocznica stłumienia nosacizny w Polsce

W 1976 r. minie dwadzieścia lat od stłumienia nosacizny w Polsce. Liczne są nazwy tej choroby. Jedne nawiązują do umiejscowienia procesu w jamach nosowych jak nosatość, nosacizna, smarkatość, smarkacizna, ciekączka, pryskanie, nos; drugie — do zmian powłok ciała — jak robak, tylczak; inne — do sposobu powstawania choroby: wozgrzywość czyli żółć spalona.

Tylko dwa terminy nosacizna i tylczak przeszły do języka współczesnego lecz w zmienionej treści. Tylczak nie jest odrębną jednostką chorobową lecz skórą formą nosacizny. Pochodzi od słowa „tyć”, które kiedyś oznaczało obrzęk.

Lacińska nazwa *malleus* wywodzi się z języka greckiego; *malis* znaczy zły. Już w starożytności wiadano, że nosacizna jest nieuleczalna i przenosi się na ludzi. Poświadczył to Arystoteles. W dalekiej przeszłości często występowały przypadki zachorowań ludzi na nosaciznę. Spożywano koninę, zwłaszcza podczas uroczystości religijnych. Wskazują na to malowidła w grotach po obu stronach Pirenei i znaleziska kostne w dolinach górskich.

Podobnie obrzędy religijne Prasłowian były połączone z konsumpcją mięs bogom koniny. Zakaz jedzenia tego artykułu z chwilą przyjęcia chrześcijaństwa spowodował wstręt, który utrzymywał się prawie do naszych czasów. Przez lata ludność gromadziła się potajemnie w niedostępnych miejscach i tam spożywała koninę, oddając cześć pogańskim bóstwom. Świadczy o tym nie tylko nawrót pogaństwa za Masława, ale i lustracja legatów papieskich w XIII wieku (1).

W miarę postępu chrystianizacji ludność okoliczna piętnowała hipofagów jak dziś kanibalizm, czego śladem są nazwy miejscowości: Konojady, Konecko (skrót Konojectwo), Koneck, Konopad, Konotop, Koniaków, Końskie, Konin itp. Udomowienie konia zacieśniło więź z człowiekiem. Zagęszczenie zwierząt spotykane przede wszystkim w wojsku — sprzyja szerzeniu się nosacizny. Pisarze rzymscy jak Vegetius i przyboczny lekarz koni cesarza Konstantyna Wielkiego — Apsytus przestrzegali przed zaraźliwością nosacizny. Dopiero w średniowieczu zaczęto uważać nosaciznę jako skutek niewłaściwego składu płynów organizmu. Wtedy najwyższym autorytetem w naukach lekarskich był Galen, którego humoralna teoria chorób przetrwała do XVIII wieku.

Reminiscencją tej teorii był pogląd Lafossa, założyciela Szkoły Weterynaryjnej w Alfordzie. Utrzymywał on jeszcze w XIX wieku, że przewlekła nosacizna nie jest zaraźliwa. Natychmiast zaprzeczył temu Bourgelet, założyciel Szkoły Weterynaryjnej w Lyonie. Były to czasy, kiedy Francuz Rayner przeniósł nosaciznę z człowieka na konia. A wcześniej, bo w

końcu XVIII wieku Duńczyk Virborg wykazał doświadczeniowo zaraźliwość nosacizny. Błędne poglądy zachowały się długo. W Europie Wschodniej przetrwały one aż do końca XIX wieku. „Jeszcze przed 50-laty — napisał Gordziałkowski w 1929 r. — niektórzy klinicyści twierdzili, że nosacizna koni może powstawać samorzutnie, pomimo (tu w sensie bez) zarażenia w zależności od rozmaitych szkodliwych czynników jak wycieńczenia, przemęczenia, zaziębienia, że zwykle niezty błon śluzowych nosa mogą przeistaczać się w nosaciznę, że zołży mogą przechodzić w nosaciznę itp.”

Traktowanie nosacizny jako choroby przemiany materii miało zgubne następstwa. Nie przestrzeganie odosobnienia i odkażania umożliwiło swobodne szerzenie się choroby. Straty w pogłowiu końskim były olbrzymie jak stwierdzają to statystyki europejskie.

W latach 1835—1845 w wojsku francuskim wybijało rocznie 5,1% koni, a w całym kraju 1,13%; w latach nieco późniejszych — 1857—1873 — w sąsiedniej Belgii — 12,8%. W początkach XIX stulecia na konie londyńskich Kompanii Omnibusowych przypadło 75% przypadków wykrywanej nosacizny.

W Polsce przedrozbiorowej nosacizna występowała nagminnie wśród koni. Taki wniosek można wysnuć z piśmiennictwa hipologicznego i weterynaryjnego. Piśmiennictwo od Biernatą z Lublina, domniemanego autora pierwszych druków weterynaryjnych w języku polskim, aż do ks. Krzysztofa Kluka, zawiera opisy i sposoby leczenia tej choroby oraz przestrogi przed jej zaraźliwością.

„W domach gościnnych — pisze Dorohostajski w *Hippice* — sieła (dużo) się ludzi i rozmaitych koni przemija, obawiać się trzeba, żeby jaka szkapa nosata... na tym miejscu, gdzie twój stać ma, przed tem nie stała”. I poleca karmić konie w drodze z przenośnych obroczników. Jest to znamienne, ponieważ Dorohostajski zgodnie z panującą teorią humoralną Galena — tłumaczy powstanie nosacizny nieprawidłowym składem płynów organizmu i nosaciznę nazywa żółcią spaloną czyli wozgrzywością.

Przysłowie „Niech będzie srokaty, byle nie nosaty” świadczy jak wielką wadą w potocznym mniemaniu była nosacizna i o jej rozpowszechnieniu.

W czasie zaborów sytuacja epizootyczna kształtowała się różnie.

W Rosji carskiej było najgorzej. Na początku XX wieku rocznie ujawniano przeciętnie 23 tys., a w 1912 r. nawet ponad 31 900 przypadków nosacizny koni. Zdarzały się liczne zakażenia ludzi.

W 1844 r. w Królestwie Kongresowym wydano Ustawę policji weterynaryjnej, zajmującą się zwalczaniem chorób zaraźliwych zwierząt. Na właścicieli spoczywał obowiązek zgłaszania przypadków chorób