

CHOROBY ZAKAŻNE I INWAZYJNE

STEFAN SAMÓŁ, JERZY GÓRSKI

Badania nad wykrywaniem zakażeń wirusem nosówki metodą przeciwciał fluoryzujących u tchórzofretek

Z Zakładu Higieny Weterynaryjnej w Warszawie

Z Puławskich Zakładów Przemysłu Bioweterynaryjnego w Puławach

Wśród wielu problemów związanych ze zwalczaniem nosówki u zwierząt futerkowych i psów, prawidłowe rozpoznanie choroby wydaje się mieć podstawowe znaczenie. Rozpoznanie kliniczne nosówki nie zawsze jest możliwe, zwłaszcza we wczesnym okresie choroby względnie w nietypowym jej przebiegu. Przebieg nietypowy wywołany jest najczęściej wczesną terapią, w wyniku której mogą nie występować charakterystyczne dla nosówki objawy, przypisywane wtórnym procesom bakteryjnym. W tych m. in. przypadkach badania laboratoryjne są niezbędne.

W diagnostyce laboratoryjnej nosówki rozwinęto szereg metod, które można sklasyfikować w dwóch grupach jako: bezpośrednie i pośrednie. Do metod bezpośrednich zaliczyć należy: izolację wirusa, próbę biologiczną (fretki, psy) lub wykazanie ciałek wtretowych w komórkach. Izolacja wirusa i próba biologiczna jest technicznie trudna do przeprowadzenia, względnie kosztowna i czasochłonna i dlatego rzadko stosowana w diagnostyce rutynowej. Wykrycie typowych ciałek wtretowych jest możliwe w całym szeregu tkanek, w tym także w leukocytach. Ciała wtretowe mogą być wykazane przy pomocy prostych, szybkich i tanich metod histochemicznych i można je wykryć w ponad 50% wczesnych przypadków klinicznych nosówki (7). Należy mieć jednak na względzie, że reowirusy mogą również produkować ciała wtretowe, które znajdują się w tych samych komórkach tkanek i nie można ich odróżnić od tych, jakie wywołuje wirus nosówki.

Do pośrednich metod diagnostycznych nosówki zalicza się różne metody serologiczne. Do najszerszej stosowanych należy odczyn seroneutralizacji (1, 9, 10) oraz odczyn wiązania dopełniacza (4, 13, 14). O infekcji można wnioskować na podstawie dwóch kolejnych badań, gdzie obserwuje się wzrost poziomu przeciwciał, świadczący pośrednio o uprzednim zakażeniu. Powyższe dotyczy również próby immunodyszufacji w żelu agarowym (12, 15).

Stosowana szeroko w ostatnich latach w diagnostyce laboratoryjnej mikroskopia immunofluorescencyjna, znajduje również zastosowanie w wykrywaniu zakażeń wirusem nosówki (4, 5, 6, 8, 11).

W Polsce, jeśli nam dobrze wiadomo, temat ten nie został dotychczas podjęty. Przedstawione badania własne mają na celu określenie lokalizacji wirusa w różnych narządach i ustalenie możliwości jego wykrywania w kolejnych fazach choroby.

Materiał i metody

Do doświadczeń użyto 12 tchórzofretek w wieku od 3–6 m-cy. Sześć zwierząt (nr nr DO1–DO6) zakażono dootrzewnowo 1 ml szczepu LL-68 wirusa nosówki o mianie zakaźnym 10^8 DLM₅₀, 5 dalszych (nr nr PK7–PK11) przez kontakt z chorymi, jedno (nr K12) stanowiło kontrolę. Dwa zakażone dootrzewnowo zwierzęta (DO2, DO3) uśpiono 4 dnia, następne dwa (DO3, DO4) 6 dnia po zakażeniu. Pozostałe zwierzęta padły w 10–16 dni od zakażenia.

Od zwierząt zakażonych przez kontakt pobierano krew (spod pazura) w dniu ekspozycji i co 24 godziny, po uprzednim odnotowaniu temperatury ciała. Rozmazy sporządzano z dużych kropli krwi na 3 szkiełkach podstawowych. Zwierzęta padłe poddawano sekcji. Do badań immunofluorescencyjnych i histochemicznych pobierano centralny układ nerwowy (CUN), różne węzły chłonne, ślinianki, migdałki, tchawicę, płuco, śledzionę, wątrobę, trzustkę, wycinki jelit, nerkę i pęcherz moczowy. Identyczny materiał pobierano od sztuki kontrolnej.

Surowice i immunoglobuliny znakowane:

1. Surowica odpornościowa psa otrzymana z „Biowet” Puławy.
2. Gammaglobulina psa „Caniglobin FHL” (ser. 10775), produkcji „Biowet” Puławy.
3. Gammaglobulina psa „Staglobin” (K. nr 368), produkcji Behringwerke AG.
4. Konjugat z surowicy odpornościowej psa, IgG — FITC *).
5. Konjugat „Gamakon CDV” produkcji „Bioweta” Czechosłowacja.

Przygotowanie preparatów.

Skrawki mrożone 4 do 6 μ grubości nanoszono na szkiełka podstawowe ze szkła nie dającego fluorescencji własnej, utrwalano w acetonie schłodzonym do -20°C przez 10 min. Z CUN sporządzano preparaty odciskowe. Preparaty wysuszono na powietrzu, nanoszono konjugat, inkubowano w komorze wilgotnej w temp. 37°C przez 30 min., płukano 2 $\times$ po 10 min. w 0,15 M buforze fosforanowym o pH 7,6, a następnie zanurzano w wodzie destylowanej, suszono na powietrzu i zatapiano pod szkiełkiem nakrywkowym w glicerynie buforowanej o pH 7,6. W analogiczny sposób przygotowano preparaty z materiału kontrolnego.

Preparaty z krwi sporządzano przez rozprowadzenie dużych kropli krwi na szkiełku podstawowym (średnica rozmazu 1 cm). Dalsze postępowanie jak przy skrawkach mrożonych.

*) Konjugat został sporządzony w pracowni biochemicznej tutejszego Zakładu pod kierunkiem prof. dr Stanisława Grysa.

Preparaty odciskowe z CUN oraz skrawki mrożone z pozostałych tkanek barwiono wg metody Sellera dla wykazania ciałek wtretowych. Wynik immunofluorescencji uznano za swoisty w przypadku gdy:

- preparat z tkanek zwierzęcia niezakażonego wirusem nosówki, przygotowany jak od zwierzęcia zakażonego, dał wynik ujemny,
- wynik ujemny uzyskano po naniesieniu na 30 min. homologicznej nieznakowanej surowicy odpornościowej, przed nałożeniem konjugatu (inhibicja fluorescencji),
- uzyskano wynik ujemny przy zostawianiu heterologicznych (np. wściekliznowych) przeciwciał znakowanych.

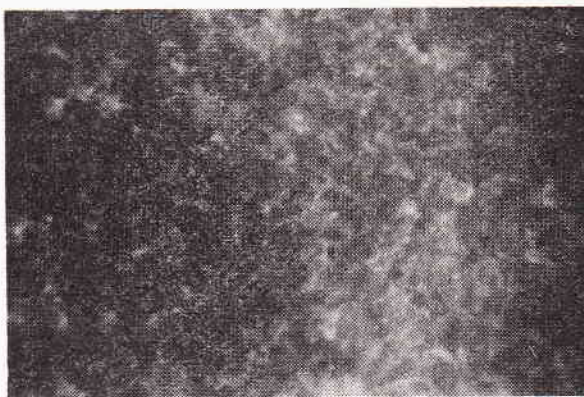
Wyniki

U zwierząt zakażonych dootrzewnowo wirusem nosówki rozwinęły się typowe objawy choroby prowadzącej do zejścia śmiertelnego w 10—12 dni od daty zakażenia. Wycinki narządów do badań pobierano w czasie 24 godzin od padnięcia za wyjątkiem 2 sztuk (DO1 i DO2) padłych 10 i 11 dnia po zakażeniu dootrzewnowym, a które od chwili badań przetrzymano w temp. -20°C przez okres 28 dni. Przetrzymanie zwłok tchórzofretek w zamrożeniu nie wpłynęło w uchwytyny sposób na otrzymane wyniki badań.

W próbie immunofluorescencji bezpośredniej w tkankach zwierząt uśpionych 4 dnia po zakażeniu obserwowano antygen w postaci drobnych fluoryzujących ziarnistości w cytoplazmie komórek. W materiale od zwierząt zgładzonych 6 dnia po zakażeniu, obserwowano ponadto duże owalne obiekty o zielono-żółtej fluorescencji zarówno w cytoplazmie, jak i w jądrach komórek, odpowiadające wielkością i kształtem eozynofilnym ciałkom wtretowym. Z upływem czasu liczba i wielkość dużych obiektów fluoryzujących

wzrastała, co można było stwierdzić w materiale ze zwierząt padłych. Występowanie i rozmieszczenie antygeny w różnym czasie i w poszczególnych tkankach przedstawiono w tab. 1.

Najwcześniej antygen stwierdzono w znacznej liczbie retikulocytów badanych węzłów chłonnych. W skrawkach węzłów chłonnych pochodzących od zwierząt uśpionych 6 dnia po zakażeniu, wszystkie komórki zawierały antygen. Nagromadzone w ich cytoplazmie masy wirusa układały się najczęściej w formie pierścienia lub półksiężyca, nadając całemu skrawkowi charakterystyczny wygląd (ryc. 1). Zaobserwowano, że w tym samym czasie antygen występuje również w limfocytach mięszu białego, retikulocytach mięszu czerwonego śledziony, w limfocytach i nabłonku migdałka oraz prawie we wszystkich badanych narządach.



Ryc. 1. Węzeł chłonny podżuchwowy tchórzofretki (DO5) 6 dnia po zakażeniu dootrzewnowym. Masy antygeny głównie w kształcie pierścienia i półksiężyca widoczne w cytoplazmie wszystkich komórek skrawka (pow. ok. 1200 $\times$)

Tab. 1. Rozmieszczenie antygeny nosówki u tchórzofretek zakażonych dootrzewnowo (DO) i przez kontakt (PK) — w różnych tkankach i czasie — wykrywanego próbą immunofluorescencji (IF)

Dzień po zakażeniu	4	6	10-11	10-16	Kontrola
Liczba zwierząt (oznaczenia nr)	2 (DO3, DO4)	2 (DO5, DO6)	2 (**)	5 (PK7, PK11)	1 (K)
Tkanki	IF	IF	IF	IF	IF
centralny układ nerwowy	—	+	+	+	—
mózg	—	+	+	+	—
kora mózgowa	—	+	+	+	—
rdzeń przedłużony	—	+	+	+	—
węzły chłonne					
podżuchwowe	++	++	++	++	—
szylne	++	++	++	++	—
środpierścione	++	++	++	++	—
krętkowe	+	++	++	++	—
migdałek	+	++	++	++	—
ślinianka	—	+	++	++	—
tchawica	—	+	++	++	—
pluco	—	+	++	++	—
śledziona	+	++	++	++	—
wątroba	—	+	++	++	—
trzuska	—	+	++	++	—
międniczka nerkowa	—	—	++	++	—
pecherz moczowy	—	—	++	++	—
dno żołądka	—	+	++	++	—
dwunastnica	—	+	++	++	—
jelito kręte	—	—	++	++	—
jelito grube	—	—	++	++	—

Objaśnienia: *) = ujemny; + = mało; ++ = średnio; +++ = dużo — antygeny; **) = materiał przetrzymany 28 dni w -20°C .

U zwierząt padłych zarówno po zakażeniu dootrzewnowym, jak też zakażonych przez kontakt z chorymi, antygen występował w dużych ilościach we wszystkich badanych narządach. Stosunkowo najmniej wirusa stwierdzono u tchórzofretek w centralnym układzie nerwowym



Ryc. 2. Skrawki z mózgu tchórzofretki (PK10) padłej 12 dnia po ekspozycji. Swoista fluorescencja antygeny nosówki widoczna na przekroju poprzecznym naczynia krwionośnego (pow. ok. 1200 $\times$)

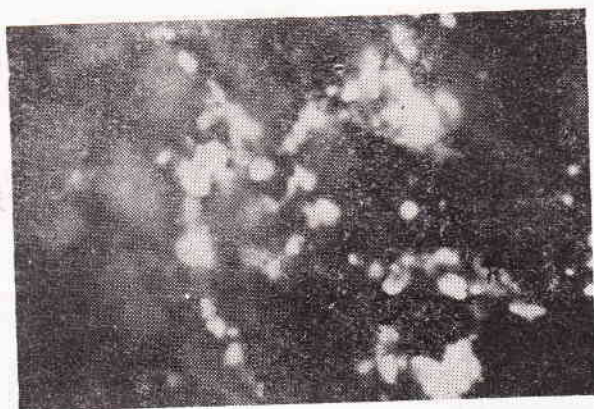
i trzustce. W CUN we wszystkich jego częściach antygen stwierdzono jedynie w komórkach ścian naczyń krwionośnych (ryc. 2), w trzustce natomiast w postaci drobnych cząstek fluoryzujących w komórkach trzustkowych i nabłonku kanalików wyprowadzających.

W wątrobie antygen występuje najczęściej w postaci drobnych, równomiernie rozsiianych cząsteczek w cytoplazmie komórek Kupfera, oraz drobnych ziarnistości w nabłonku przewodów żółciowych.

W drogach oddechowych antygen obserwowano w postaci drobnych kuleczek do dużych owalnych aglomeratów w komórkach tchawicy i oskrzeli a także w komórkach przegrody pęcherzykowej i tkanki okołoskrzelowej.

W przewodzie pokarmowym antygen nosówki wykrywano najpierw w limfocytach warstwy właściwej błony śluzowej żołądka, dwunastnicy i jelicie grubym. U wszystkich sztuk padłych po zakażeniu obserwowano swoistą fluorescencję również w cytoplazmie komórek gruczołów żołądkowych i błony śluzowej jelita grubego.

W drogach moczowych antygen wykrywano w komórkach nabłonka (zwykle w cytoplazmie) w postaci drobnych i dużych owalnych obiektów fluoryzujących. W nerce swoista fluorescencja występuje w nabłonku miedniczki nerkowej (ryc. 3), natomiast kłębuszki i kanalik nerkowe nie zawierają antygeny. W pęcherzu moczowym antygen wirusa zlokalizowany jest w znacznych ilościach w komórkach nabłonka przejęściowego.



Ryc. 3. Skrawek miedniczki nerkowej tchórzofretki (PK8) 10 dnia po ekspozycji. Widoczne duże najczęściej owalne złoże antygeny w komórkach nabłonka (pow. ok. 1200 X)

Krew. Od pięciu tchórzofrettek (PK7 do PK11) zakażonych na drodze kontaktu ze zwierzętami chorymi pobierano krew w odstępach 24 godz. do badań immunofluorescencyjnych z jednoczesnym mierzaniem temperatury ciała (tab. 2).

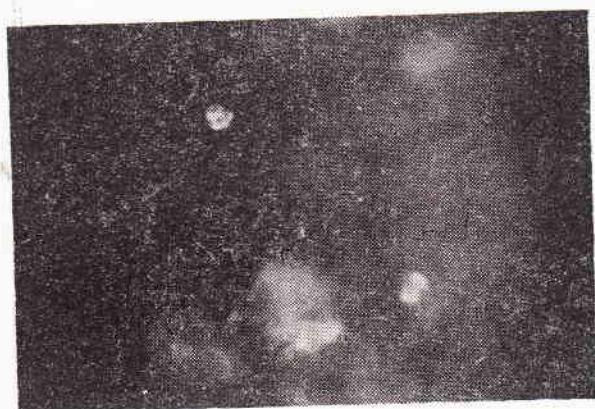
Zwierzęta, które w dniu kontaktu z chorymi miały temperaturę w granicach 37 do 38,9°C, w 2 do 5 dni wykazywały stopniowy jej wzrost do około 40,5°C. Wysoka temperatura utrzymywała się przez kilka dni, a po tym czasie następował szybki jej spadek i śmierć zwierzęcia.

Tab. 2. Występowanie antygeny w rozmazach krwi obwodowej u tchórzofrettek zakażonych przez kontakt

Dni po ekspozycji	Oznaczenie zwierząt									
	PK-7		PK-8		PK-9		PK-10		PK-11	
	temp °C	IF	temp °C	IF	temp °C	IF	temp °C	IF	temp °C	IF
0	37,7	—	37,0	—	38,0	—	37,9	—	38,9	—
1	37,6	—	37,1	—	38,1	—	37,6	—	38,9	—
2	36,3	—	37,0	—	38,0	—	37,6	—	38,9	—
3	39,3	+	37,2	—	38,1	—	38,7	+	38,8	+
4	39,4	+	37,8	—	39,4	+	39,3	+	38,9	+
5	39,4	+	38,3	+	39,4	+	39,3	+	39,4	+
6	39,5	+	39,4	+	39,3	+	39,9	+	40,0	+
7	39,3	+	39,4	+	40,1	+	39,4	+	39,4	+
8	40,3	+	39,3	+	40,1	+	40,3	+	39,4	+
9	40,4	+	39,6	+	39,6	+	40,3	+	40,1	+
10	40,4	+	40,1	+	40,1	+	40,3	+	39,9	+
11	39,4	+	40,3	+	39,5	+	40,3	+	37,2	+
12	38,3	+	40,3	+	38,1	+	39,1	+		
13	35,6	n.b.	40,3	+	37,2	+	37,9	+		
14			39,1	+			35,7			
15			38,0	+						
16			36,2	n.b.						

Objaśnienia: *) IF = immunofluorescencja; — = ujemna; + = mało; ++ = więcej — komórki jednojądrzaste z antygenem; **) n.b. = nie badano.

W preparatach z krwi tych zwierząt wykrywano antygen wirusa nosówki z chwilą wzrostu temperatury ciała, a tylko u jednego (PK11) na dwa dni przed zwyżką temperatury. Wyniki dodatnie z krwi otrzymywano przez cały okres choroby zwierząt. Antygen znajdowano najczęściej w cytoplazmie komórek limfatycznych krwi obwodowej, w formie ziarenek względnie aglomeratu zajmującego dużą część cytoplazmy (ryc. 4).



Ryc. 4. Rozmaz krwi obwodowej tchórzofretki (PK7) 6 dnia po ekspozycji. Specyficzna fluorescencja widoczna najlepiej w cytoplazmie w komórkach jednojądrzastych (pow. ok. 1200 X)

Ciała wtrętowe. W tkankach, w których uprzednio metodą przeciwciał znakowanych stwierdzono liczne, duże owalne obiekty fluoryzujące — można było z reguły metodami histochemicznymi stwierdzić ciała wtrętowe. Zagadnienie to zostanie bardziej szczegółowo przedstawione w drugiej części doniesienia. Z użytych do badań surowic odpornościowych i gammaglobulin w celu potwierdzenia swo-

istości fluorescencji na drodze jej inhibicji — zadowolające wyniki uzyskano jedynie z „Caniglobin FHW”.

Omówienie wyników

Zakażone przez kontakt z chorymi tchórzofretki, reagują w krótkim czasie na zakażenie podwyższoną temperaturą ciała. Rozmazy krwi obwodowej badane w tym okresie metodą przeciwciał znakowanych, pozwalają z reguły na wykazanie w nich antygeny nosówki. Dowodzi to, że u tchórzofretki, a jak wynika z niepublikowanych badań na norkach — również u tych zwierząt, zakażenie wirusem nosówki może być rozpoznane na kilka dni przed wystąpieniem innych objawów choroby.

W badaniach własnych nie starano się wykazać antygeny u tchórzofretki w wymazach z błony śluzowej spojówki oka, pochwy, względnie napletka. Zabieg pobierania takiego materiału jest o wiele bardziej utrudniony aniżeli krwi. Wydaje się również, że wyniki badań krwi są bardziej wiarogodne aniżeli z błon śluzowych. Fairchild i wsp. (6) przeprowadzając badania na 7 eksperymentalnie zakażonych psach, otrzymali wynik dodatni ze spojówki u 1 psa na 5 dzień, a u dwóch dalszych ze spojówki i pochwy na 8 dzień po zakażeniu.

W materiale sekcyjnym najwcześniej antygen znajdowano w węzłach chłonnych, co jest zgodne z wynikami Liu i Coffina (11).

W różnych innych narządach wirus wykrywany jest w miarę rozwoju choroby i w coraz większych ilościach (tab. 1). Wykrycie antygeny nosówki metodą przeciwciał znakowanych w różnych tkankach zwierząt jest możliwe w każdej fazie choroby o przebiegu ostrym, a otrzymywane wyniki są swoiste.

Z dotychczasowych doniesień wynika, że niespecyficzność próby byłaby możliwa w przypadku zakażeń wirusem pomoru bydła względnie wirusem odry, gdyż jak twierdzi Breese i Boer (3) wirus nosówki psów, wirus pomoru bydła i wirus odry — są antygenowo i morfologicznie podobne.

Piśmiennictwo

1. Appel M., Robson D. S.: Am. J. vet. Res. 34, 1459, 1973.
2. Baker G. A., Gorham J. R., Leader R. W.: Am. J. vet. Res. 15, 102, 1954.
3. Breese S. S., Boer C. J.: J. gen. Virol. 20, 121, 1973.
4. Cello R. M., Boulton J. E., Forland S.: Cornell Vet. 49, 127, 1959.
5. Coffin D. W., Liu C.: Virology 3, 132, 1957.
6. Fairchild G. A., Wyman M., Donovan E. F.: Am. J. vet. Res. 28, 761, 1967.
7. Fairchild G.: The Pennsylvania Vet. 14, 1967.
8. Fairchild G. A., Steinberg S. A., Cohen D.: Cornell Vet. 61, 214, 1971.
9. Gillespie J. H., Baker J. A., Burgher J., Robson D. S., Gilman B.: Cornell Vet. 49, 103, 1958.
10. Karzon D. T., Gillespie J. H., Bussel R. H.: Am. J. vet. Res. 22, 1069, 1961.
11. Liu C., Coffin D. W.: Virology 3, 115, 1957.
12. Mansi W.: J. Comp. Path. Ther. 67, 297, 1957.
13. Morris J. A., Auliso C. D., Mc Cown J. M.: Cornell Vet. 45, 182, 1955.
14. Ojrzanowska J.: Pol. Arch. Wet. 9, 1, 1965.
15. Ojrzanowska J.: Medycyna Wet. 23, 3, 1967.

Adres autora: doc. dr habil. Stefan Samół, ul. Marszałkowska 111 A m. 416, 00-102 Warszawa.

Самуль С., Гурский Е. — Исследования по обнаруживанию инфекций вирусом чумы собак методом флуоресцентных противотел у гибридов лесного и белого африканского хорьков.

Методом непосредственной иммуофлуоресценции исследовали различные ткани и мазки из крови гибридов лесного и белого африканского хорьков, зараженных экспериментально вирусом чумы собак.

Прижизненными исследованиями мазков из периферической крови антиген чумы собак обнаруживали несколько дней после инфекции, как правило, в момент роста температуры тела.

В тканях убитых животных, убитых на 4 и 6 день и павивших в результате инфекции, антиген отмечали сперва в лимфатических узлах, а затем в остальных исследуемых органах.

Samół S., Górski J. — Studies on the detection of distemper virus infection in polecat-ferrets by the method of fluorescent antibodies.

There were studied by the method of direct fluorescent antibodies, tissues and blood smears of polecat-ferrets experimentally infected with the virus of distemper. Viral antigen was detected in blood smears after a few days since the infection, generally when a rise of body temperature appeared.

In tissues of the animals slaughtered after 4–6 days and these of dead animals, viral antigen was detected first in lymph nodes, then in other organs studied.

ROSSI C. R., KIESEL G. K., HUBBERT W. T.: Poziom immunoglobulin i stężenie inhibitorów enterowirusów była w wodach płodowych. (Immunoglobulin concentrations and bovine enterovirus inhibitors in fetal bovine fluids). Cornell Vet. 66, 381–386, 1976 (3).

Poziom immunoglobulin i inhibitorów enterowirusów (PI3, IBR, andenowirus typ 1, RSV-long, BVD) określono w surowicy krwi oraz płynie owodniowym i omoczniovym 53 płodów w wieku 24–90 dni, oraz w surowicy ciężarnych krów. Immunoglobuliny klasy IgG i IgM nie występowały w płynie owodniowym. Tylko w 2 przypadkach stwierdzono ich obecność w płynie omoczniovym. Hamowanie wirusów przez surowice i wody płodowe zachodzi pod wpływem nieswoistych inhibitorów.

G.

SCHULTZ R. D., MENDEL H., SCOTT F. W.: Wpływ zakażenia wirusem panleukopenii kotów na rozwój odporności humoralnej i komórkowej. (Effect of feline panleukopenia virus infection on development of humoral and cellular immunity). Cornell Vet. 66, 324–332, 1976 (3).

Panleukopenia (zapalenie jelit kotów) jest jedną z najpoważniejszych chorób wirusowych kotów. Procent śmiertelności przy zakażeniach naturalnych jest bardzo wysoki. Jest on następstwem zakażeń wtórnych ponieważ wirus panleukopenii powoduje uszkodzenie układu limfatycznego, szpiku kostnego, śledziony, obwodowej tkanki limfatycznej, węzłów chłonnych i tkanki limfatycznej przewodu pokarmowego. W celu przesłedzenia wpływu wirusa na odporność swoistą ciężarne kocięta, kocięta w wieku 2 tygodnie—2 miesiące i dorosłe koty po zakażeniu wirusem uodporniano krwinkami czerwonymi królika oraz określano czas odrzucania allografów i autografów skóry. U kotów zakażonych „in utero” 35 i 45 dnia życia występowało opóźnienie w odrzucaniu allografów skóry. Zakażenie wirusem panleukopenii nie wpływało na pierwotną i wtórną odpowiedź immunologiczną w stosunku do czerwonych krwinek królika. Wydaje się, że wirus wywiera pierwotne działanie immunosupresyjne na komórki T.

G.