

## Piśmiennictwo

- Baczyński Z., Dzierżawski A., Skulmowska-Kryszkowska D.: Bull. vet. Inst., Puławy 25, 24, 1982.
- Behrens H.: Lehrbuch der Schafkrankheiten. P. Parey Verlag, Berlin 1971.
- Çakala S.: Choroby owiec. PWRiL, 1981.
- Dungal N.: Am. J. Path. 22, 737, 1946.
- Geisel O.: Zentbl. VetMed. B. 22, 535, 1975.
- Jacob W., Krause H.: Mh. Vet.-Med. 20, 217, 1965.
- Kopczewski A., Twardowski H., Wardziński S., Chyliński G.: Medycyna Wet. 35, 347, 1979.
- Mackay J. M. K.: J. comp. Path. 79, 141, 1969.
- Nobel T. A., Neumann F., Klopfer U.: Zentbl. VetMed. B. 17, 958, 1970.
- Nobel T. A., Klopfer U., Neumann F., Trainin Z.: Zentbl. VetMed. B. 18, 9, 1971.
- Röhner H.: Handbuch der Viruskrankheiten bei Tieren. G. Fischer Verlag, Jena, 1978, VI/2.
- Sedlmeter H., Schiefer B., Jacob H.: Dt. tierärztl. Wschr. 73, 422, 1966.
- Schulz L. Cl., Weiland F.: Zentbl. VetMed. B. 15, 132, 1968.
- Sigurdsson B.: Arch. ges. Virusforsch. 8, 51, 1958.
- Truszczyński M.: Medycyna Wet. 35, 257, 1979.
- Wandera J. G.: Advanc. vet. Sci. 15, 251, 1971.
- Wandera J. G., Krauss H.: Zentbl. VetMed. A. 18, 325, 1971.

Adres autora: prof. dr Zbigniew Baczyński, ul. Kraszewskiego 10, 24-100 Puławy

TOMASZ PERYT

## Zastosowanie odczynu immunofluorescencji w rutynowej diagnostyce choroby Aujeszky

Zakład Higieny Weterynaryjnej, ul. Lechicka 21, 02-156 Warszawa

Dotychczasowa diagnostyka choroby Aujeszky (ch. A.), zgodnie z instrukcją Ministerstwa Rolnictwa (3), opiera się głównie na wynikach próby biologicznej na królikach w wieku do 4 miesięcy lub młodych kotach. W niektórych przypadkach, głównie przy podejrzeniu ch. A. u świń, wspomniana instrukcja przewiduje jednoczesną izolację wirusa na hodowli komórek nerki świni i komórek zarodka kurzego. Wirus ch. A. jest bowiem, jak dotychczas, jedynym wirusem występującym u świń, który wywołuje zmiany cytopatyczne w obu wymienionych hodowlach komórkowych. Z przeglądu piśmiennictwa wynika, że próbę biologiczną można przeprowadzić również na białych myszkach (2, 6), a w przypadku izolacji wirusa w hodowli komórkowej, jego identyfikację — techniką przeciwciał znakowanych (1, 5, 6, 7). Powszechna dostępność przeciwciał znakowanych do wykrywania wirusa ch. A. pod nazwą „Gamakon AV” pozwala, jak się wydaje, na szersze zastosowanie tej metody w rutynowych badaniach laboratoryjnych.

Celem pracy było określenie przydatności odczynu immunofluorescencji bezpośredniej w diagnostyce ch. A. u zakażonych materiałem zawierającym wirus białych myszek lub w hodowli komórkowej.

## Materiał i metody

Materiał stanowiły narządy wewnętrzne (mózgi, śledziony, płuca) od 26 zwierząt (20 lisów, 4 świni, kuny i psa) nadesłane do badań w kierunku ch. A. z 18 gospodarstw w latach 1979—1982. Próbę biologiczną przeprowadzano na królikach w wieku do 4 miesięcy i na białych myszkach o masie ok. 12 g (6 myszek na jedną próbę).

Zakażenie. Z materiału nadesłanego do badania przygotowywano 20% rozcieńczenie w buforze fosforanowym o pH 7,5 z dodatkiem 1000 j. penicyliny i 1000 mcg. streptomycyny na 1 ml. Rozcieńczenie pozostawiano na 30 min. w temperaturze pokojowej, po czym wiorowano go przy 2000 obr./min. Płynem nad osadu zakażano jednocześnie: królika (1 ml. domięśniowo), 6 myszek (po 0,03 ml. domięśniowo) oraz hodowlę pierwotną komórek zarodka kury (0,2 ml. na próbkę). W kontroli w miejsce supernatantu stosowano bufor fosforanowy z antybiotykami.

Preparaty immunofluorescencyjne. Do badania immunofluorescencyjnego przygotowano: a) preparaty odciskowe z mózgow, rdzeni kręgowych, płuc i śledzion od zwierząt nadesłanych do badania, b) preparaty odciskowe z powierzchni kory mózgowej i z przekroju półkul mózgowych myszek padłych oraz uspijonych w 24, 48, 72 godziny po zakażeniu c) preparaty na szkiełkach z próbek Leightona z komórkami w 18 i 24 godziny po zakażeniu, dwukrotnie płukany w buforze fosforanowym. Wszystkie preparaty po dokładnym wysuszeniu utrwalano 15 min. w acetonie w temp. 4°C. Nakładano konjugat „Gamakon AV” (Bioveta, CSRS) w odpowiednim rozcieńczeniu i inkubowano w komorze wilgotnej w 37°C. Po 30 min. preparaty płukano dwukrotnie po 10 min. w buforze fosforanowym o pH 7,3. Po dokładnym wysuszeniu preparaty zatapiano w buforze

Tab. 1. Wykrywalność wirusa ch.A. w materiale biologicznym w zależności od zastosowanej metody (liczba — %)

Zwierzę	n (szt.)	IF z mat. terenowego	Królik pr. biol.	Mysz		n (szt.)	Hodowla komórkowa	
				pr. biol.	IF		CPE	IF
Lis	20	0	10 (50%)	10 (50%)	10 (50%)	16 a)	7 (44%)	7 (44%)
Swinia	4	0	1 (25%)	1 (25%)	1 (25%)	4	1 (25%)	1 (25%)
Kuna	1	0	0	0	0	1	0	0
Pies	1	0	1 (100%)	1 (100%)	1 (100%)	1	1 (100%)	1 (100%)
Razem	26	0	12 (46%)	12 (46%)	12 (46%)	21	9 (43%)	9 (43%)

Objaśnienia: IF — immunofluorescencja bezpośrednia, CPE — efekt cytopatyczny, (0) — wynik ujemny, a) — czterech lisów (trzech dodatnich i jednego ujemnego w próbie biologicznej) nie badano w hodowli komórkowej.

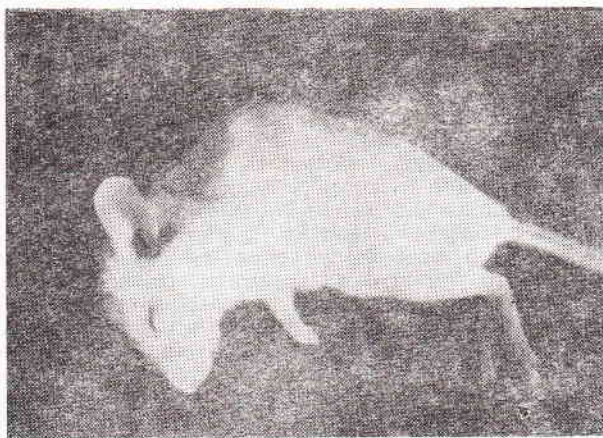


wanej glicerynie. Oceniano je w mikroskopie fluorescencyjnym „Fluoval 2” z palnikiem HBO 202, filtrami wzbudzającymi 2 × KP — 490 (filtry interferencyjne), B-228g, B-229g oraz filtrami barierowymi G-245 i G-249. Stosowano oświetlenie górne i apochromatyczne obiektywy.

### Wyniki i omówienie

Przeprowadzone badania materiału pochodzącego od 26 zwierząt podejrzanych o ch. A. wykazały w 12 przypadkach obecność wirusa ch. A. u zwierząt pochodzących z 6 gospodarstw (1 świnia, 1 pies, 10 lisów) (tab. 1).

Próba biologiczna. Zakażenie myszek materiałem zawierającym wirus ch. A. zawsze prowadziło do zejścia śmiertelnego między 4 a 9 dniem po zakażeniu. Większość myszek padała 4 dnia, a następne w ciągu kolejnych 5 dni. Czasami śmierć pierwszych myszek poprzedzały objawy nerwowe. Zwykle jednak nie wykazujące żadnych objawów chorobowych myszki znajdowano martwe 4 dnia rano, a u pozostałych stwierdzano objawy nerwowe. Objawy te były rozmaite i mało charakterystyczne. Niektóre myszki wykazywały silne pobudzenie, biegały po klatce bez celu, silnie reagowały na hałas. Inne kręciły się w kółko, parły na przeszkody. Jeszcze inne pozostawały bez ruchu, w pozycji siedzącej na reagując na żadne bodźce, w tym próby zmuszenia ich do ruchu. Martwe myszki znajdowano często wkliniowane pyszczkiem w oczka siatki lub leżące jedna na drugiej w naczyniu z wodą. Charakterystycznym i wspólnym dla myszek padłych w wyniku zakażenia wirusem ch. A. objawem było ułożenie pośmiertne zwłok z silnym, przypominającym garb zgięciem kręgosłupa (ryc. 1). Przy następnych pasażach wirusa ch. A. na myszkach czas między zakażeniem a padnięciem wynosił trzy dni.

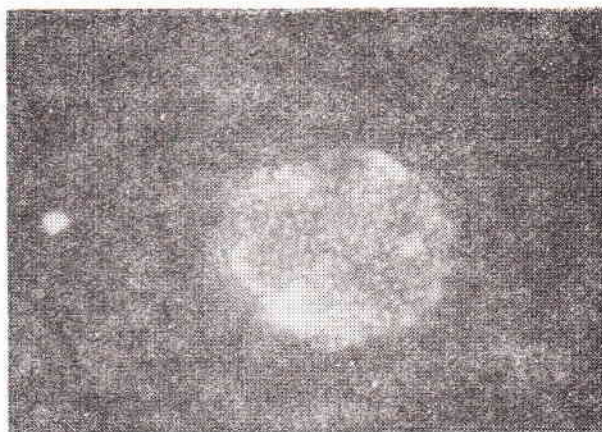


Ryc. 1. Charakterystyczny układ ciała myszki padłej w wyniku domózgowego zakażenia wirusem choroby Aujeszzy

U zakażonych królików w miejscu wstrzyknięcia wirusa występował świąd i w ostatecznym efekcie śmierć zwierzęcia. W hodowli pierwotnej komórek zarodka kury występowa-



Ryc. 2. Preparat odciskowy z mózgu myszy zakażonej materiałem pochodzącym od chorej świni. Widoczna swoista fluorescencja w licznych komórkach (pow. ok. 250X)

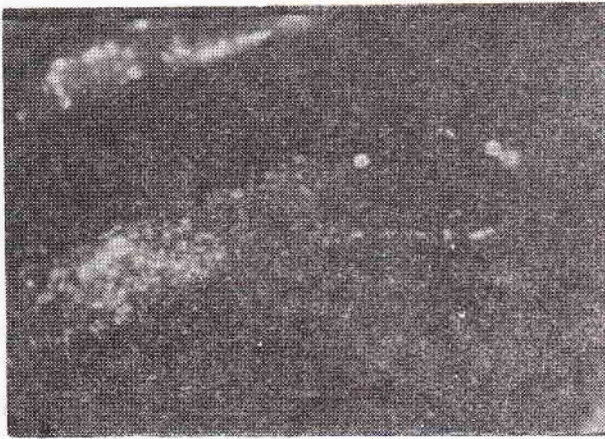


Ryc. 3. Preparat odciskowy z mózgu myszy. Komórka z charakterystycznym utkaniem drobnych świeceń (pow. ok. 625X)

ło zaokrąglenie komórek, ziarnistości w cytoplazmie i liza komórek. Zmiany te odpowiadały opisom przedstawionym w innych pracach (3, 4, 5, 6).

Immunofluorescencja. W preparatach przygotowanych z materiału terenowego w żadnym przypadku nie stwierdzono obecności wirusa ch. A. (tab. 1). W preparatach z mózgow padłych myszek przy powiększaniu ok. 250X widoczne były liczne świecące komórki (ryc. 2). Przy powiększeniu ok. 625X widoczna była dokładna struktura świeceń w postaci drobnych punktów, leżących ciasno jeden obok drugiego i wypełniających całą cytoplazmę komórki (ryc. 3). Metodą immunofluorescencji można było wykryć wirus ch. A. w komórkach mózgowych zakażonych myszek już z chwilą wystąpienia objawów nerwowych. W preparatach z hodowli komórkowej wykonanych następnego dnia po zakażeniu, widoczne były liczne komórki zawierające świecące zaokrąglone grudki. Świecenia występowały w cytoplazmie w okolicy jądra komórkowego widocznego w postaci ciemnej plamy (ryc. 4).





Ryc. 4. Liczne świecące grudki w cytoplazmie komórki zarodka kury (pow. ok. 625×)

Zgodność wyników próby biologicznej przeprowadzonej na myszkach z wynikami takiej próby przeprowadzonej na króliku (tab. 1) wskazuje na możliwość zastąpienia królików myszkami. Uzyskanie królika odpowiadającego wymaganiom próby biologicznej w diagnostyce ch. A. jest obecnie dość kłopotliwe, natomiast myszki używane do wielu innych prób biologicznych są zazwyczaj dostępne w laboratorium. Są one ponadto znacznie tańsze.

Wystąpienie objawów nerwowych u myszek po odpowiednim okresie czasu od zakażenia, a następnie śmierć (6) i charakterystyczne pośmiertne ułożenie zwłok (2) są podstawą oceny wyniku próby biologicznej. Próba immunofluorescencyjna ostatecznie potwierdza rozpoznanie choroby. Laboratoria dysponujące możliwością prowadzenia hodowli komórkowej mogą znacznie skrócić czas potrzebny do postawienia diagnozy. W zakażonej hodowli komórkowej już następnego dnia, przy pomocy techniki przeciwciał znakowanych, można stwierdzić lub wykluczyć obecność wirusa ch. A. w badanym materiale. Badanie immunofluorescencyjne materiału pochodzącego bezpośrednio od zwierząt gospodarskich w praktyce nie ma istotnego znaczenia (1). Wyniki takiego badania (tab. 1) były w każdym przypadku ujemne, niezależnie od tego czy w materiale był wirus, czy go nie było.

### Wnioski

1. W próbie biologicznej stosowanej w diagnostyce laboratoryjnej ch. A. można używać białych myszek zamiast królików; śmierć myszek w 4 do 9 dni od zakażenia oraz charakterystyczne pośmiertne ułożenie zwłok świadczą o obecności wirusa.

2. Badanie immunofluorescencyjne mózgow myszek padłych lub uszpionych w okresie występowania objawów nerwowych stanowi potwierdzenie diagnozy.

3. Najszybszą metodą wykrycia wirusa ch. A. w badanym materiale jest zakażenia ho-

dowli komórkowej zarodka kury i badanie immunofluorescencyjne tej hodowli przeprowadzone następnego dnia.

### Piśmiennictwo

1. Albrecht P., Blaskovic D., Lesso J.: Acta virol. Praga 7, 283, 1963.
2. Carboni A., Zavarella M.: Nuova Vet. 48, 99, 1972.
3. Instrukcja nr 34 Min. Rol. Dep. Wet. z dnia 10.01.1974 r. w sprawie zasad laboratoryjnego rozpoznawania choroby Aujeszky.
4. Majer-Dziedzic B.: Pol. Arch. Wet. 21, 9, 1979.
5. Pette J.: Bull. Off. int. Epizoot. 83, 1835, 1965.
6. Standard RWP (projekt). Temat 2.1.700.03-77. Metoda laboratoryjnej diagnozy choroby Aujeszky 1981 r.
7. Steward W. C., Cabrey E. A., Kresse J. I.: J. Am. vet. med. Ass. 151, 747, 1967.

Adres autora: lek. wet. Tomasz Peryt, ul. Belwederska 19 m. 29, 00-761 Warszawa

### Перыт Т. — Применение реакции иммунофлуоресценции в рутинной диагностике болезни Ауески

Пробы от 26 животных разных видов, подозреваемых в натуральной инфекции вирусом болезни Ауески, подвергли лабораторным исследованиям с применением биологической пробы на молодых кроликах согласно обязывающей инструкции и сравнительно на белых мышках, инфицированных внутримозгово. Вели сверх того изоляцию вируса в первичной культуре клеток зародыша курицы с применением реакции иммунофлуоресценции через 18 и 24 часа после инфекции. Иммунофлуоресцентные препараты изготавляли также из мозгов, спинных мозгов, легких и селезенки, присылаемых для исследования, а также из мозгов павших или усыпленных мышей на 24, 48 и 72 часа после инфекции. Вирус болезни Ауески обнаружили у 12 животных (2 свиня, 1 собака, 10 лисиц), происходящих из 6 хозяйств. Получили полное сходство результатов биологической пробы, проводимой на мышках и кроликах. Исследования реакцией иммунофлуоресценции материала от натурального инфицированных вирусом болезни Ауески животных не имеют практического значения. При применении этой реакции в препаратах из мозгов инфицированных мышей отмечали вирус с моментом появления нервных симптомов, а в культуре клеток зародыша курицы — уже на следующий день после инфекции.

### Peryt T. — The application of immunofluorescence test for routine diagnosis of Aujeszky disease

Samples derived from 26 animals of various species, suspected of natural infection of Aujeszky disease were laboratory examined in biological test on young rabbits according to the instruction. The obtained results were compared with those performed on white mice intracerebrally infected with the suspected material. Furthermore, it was performed after 18 and 24 h since the infection the isolation of the virus on a primary cell culture of chicken embryo with the use of immunofluorescence test. Preparates for the test were also prepared from brains, spinal cords, lungs and spleens of animals sent for diagnostic purposes, and from brains of died and slaughtered mice after 24, 48 and 72 h since the artificial infection. Aujeszky disease virus was found in 12 animals (1 pig, 1 dog, 10 foxes) from 6 farms. It was found a full agreement of the results of biological test performed on rabbits and mice. Examination in the immunofluorescence test the sample from animals naturally infected has not a practical value. Using immunofluorescence test and brain samples of infected mice it is possible to detect Aujeszky disease virus when the signs of neurological disorders appeared. However, in tissue culture of chick embryo the virus is detected next day since the infection.