

HENRYK JANOWSKI, TADEUSZ WIJASZKA

Próby zastosowania immunofluorescencji (if) do rutynowego wykrywania wirusa pomoru świń w materiale patologicznym

Zakład Badania Chorób Świń Instytutu Weterynarii w Puławach
Kierownik: prof. dr H. JANOWSKI*)

Duże znaczenie gospodarcze pomoru świń oraz brak pewnej metody laboratoryjnego rozpoznawania tej choroby sprawiają, że w ostatnich latach zaczęto w coraz większym zakresie używać do tego celu metody if. Antygen wirusowy można przy jej użyciu wykazywać bądź bezpośrednio w preparatach odciskowych narządów wewnętrznych zwierząt zakażonych (5), bądź pośrednio — po namnożeniu go w hodowli komórek nerki świni — uwzględniając iż wirus ten nie wywołuje w zasadzie efektu cytopatycznego (1).

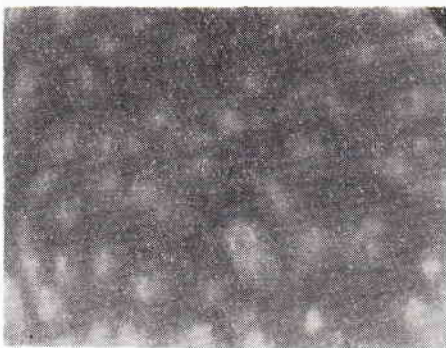
Celem niniejszej pracy było: 1) zbadanie przydatności metody if do wykrywania wirusa pomoru w materiale patologicznym pochodzącym z terenu od świń chorych na pomór względnie podejrzanych o tę chorobę, 2) zbadanie zakresu skuteczności tej metody do wykrywania tego samego wirusa w hodowli komórek zakażonych laboratoryjnie, 3) porównanie niektórych dodatnich i ujemnych wyników uzyskanych metodą if, z wynikami prób uzyskanymi przez wstrzykiwanie świniom zdrowym materiału badanego (próby biologiczne).

Materiał i metody

Do badań użyto:

1. Swoistą surowicę odpornościową uzyskaną przez hyperimmunizację królików szczepami lapinizowanymi R, H, C wirusa pomoru świń; globulinę wytrącano z surowicy przy pomocy siarczanu amonu, oczyszczano ją przez dializę i znakowano izotiocyjanianem fluoresceiny (Koch Light Lab.) wg metody Coonsa i Kaplana w modyfikacji Rigsa i Marshalla (4). Następnie oczyszczano ją przez dializę na kolumnie chromatograficznej wypełnionej Sephadexem G-50.

2. Stałą linię komórek nerki świni PK-15, otrzymano z Zakładu Chorób Drobni I Wet. Hodowle tych komórek przygotowywano na szkiełkach nakrywkowych w butelkach Legroux. Płyn wzrostowy składał się z Płynu Parkera z 0,5% dodatkiem hydrolizatu laktoalbuminy i 10% dodatkiem surowicy

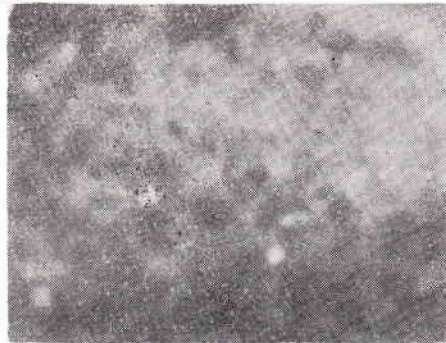


Ryc. 1. Hodowla komórek nerki świni PK-15 zakażona wirusem pomoru i barwiona p/pomorową znakowaną surowicą króliczą. (Pow. 360 ×).

cięższej. Po 2—3 dniach inkubacji i uzyskaniu 100% pokrycia, zakażano hodowlę laboratoryjnym wirusem pomoru świń, względnie rozcierem badanych narządów. Szkiełka z butelek wyjmowano w różnym czasie po zakażeniu, utrwalano w acetonie i barwiono surowicą znakowaną.

3. Wycinki śledziony oraz węzłów chłonnych podszczękowych, śródpiersiowych i kregzkowych — pochodzące od 210 świń podejrzanych o zakażenie pomorem w warunkach terenowych, wycinki tych samych narządów pochodzące od 120 świń zakażonych laboratoryjnie zjadliwym wirusem pomoru oraz od świń klinicznie zdrowych.

4. Świnie, do prób biologicznych o ciężarze ciała ok. 30 kg, pochodzące z zagród wolnych od pomoru świń.



Ryc. 2. Preparat odciskowy śledziony świni zakażonej zjadliwym wirusem pomoru, barwiony p/pomorową znakowaną surowicą króliczą. (Pow. 360 ×).

Przygotowywanie preparatów

Badane wycinki narządów przecinano skalpelem, a następnie do powierzchni przekroju przyciskano lekko podgrzane szkiełka podstawowe. Uzyskane w ten sposób preparaty odciskowe suszono w temperaturze pokojowej i utrwalano w acetonie w temperaturze -20°C przez 10 minut. Po wysuszeniu dodawano kroplę znakowanej surowicy, po czym szkiełka umieszczano w wilgotnej komorze o temperaturze 37°C na 20 min. Po tym czasie zlewano surowicę i spłukiwano preparaty zbuforowanym płynem fizjologicznym o pH 7,4—7,6, płukano je w tym płynie przez 5 min, a następnie w wodzie destylowanej — również przez 5 min. Po wysuszeniu w temperaturze pokojowej preparaty oglądano w mikroskopie luminescencyjnym MŁ-2 o palniku rtęciowym DRSZ-250, przy filtrach ultrafioletowych UFS 6—3, UFS 6—5 oraz filtrach barierowych ŻS 3. Dokumentację fotograficzną czarno-białą wykonywano na filmach ORWO NP 27; czas ekspozycji wynosił 15 minut. Preparaty które stanowiły kontrolę, wysycano najpierw surowicą p/pomorową przez $\frac{1}{2}$ godz., a następnie barwiono surowicą znakowaną. W przypadku preparatów z hodowli komórek, kontrolą były hodowle niezakażone.

Próby biologiczne nastawiano w ten sposób, że rozcier badanego materiału wstrzykiwano 2 świniom, z których jedna była wcześniej uodporniana p/pomorowi szczepionką lapinizowaną w osobnym izolowanym pomieszczeniu. Okres obserwacji wynosił 21 dni.

W przypadku obecności wirusa w rozcięciu świnia nieuodporniona reagowała (6—9 dni) podwyższeniem wewnętrznej ciepłoty ciała do ok. 41°C, a po dalszych 1—2 dniach występowały typowe dla pomoru objawy kliniczne. Potwierdzeniem rozpoznania były zmiany sekcyjne. Świnia kontrolna uodporniona była zdrowa.

Wyniki

Wyniki badania preparatów odciskowych narządów wewnętrznych świń zakażonych wirusem pomoru zebrano w tab. 1.

Tab. 1. Wyniki badania metodą IF wycinków narządów wewnętrznych świń zakażonych wirusem pomoru

Narządy	Ogółem zbadano	Wyniki	
		dodatnie	ujemne
Śledziona	120	120	0
W. chł. podszczękowe	120	118	2
W. chł. śródpiersiowe	120	115	5
W. chł. krezkowe	120	113	7

Z tabeli tej wynika, że we wszystkich preparatach odciskowych śledzion pochodzących od świń zakażonych wirusem pomoru stwierdzono typowe świecenie plazmy komórek, świadczących o obecności wirusa. W węzłach chłonnych podszczękowych od tych samych 120 świń, obecność wirusa stwierdzono u 118, u 2 zaś wyniki były ujemne. W węzłach chłonnych śródpiersiowych wirus stwierdzono u 115 sztuk na 120 badanych. Natomiast w węzłach chłonnych krezkowych wyników dodatnich było 113, ujemnych — 7.

Wyniki badania metodą if wycinków narządów wewnętrznych 50 świń klinicznie zdrowych przedstawia tab. 2.

Tab. 2. Wyniki badania metodą IF wycinków narządów wewnętrznych świń klinicznie zdrowych

Narządy	Ogółem zbadano	Wyniki	
		dodatnie	ujemne
Śledziona	50	0	50
W. chł. podszczękowe	50	0	50
W. chł. śródpiersiowe	50	0	50
W. chł. krezkowe	50	0	50

Z danych przedstawionych w tabeli wynika, że nie stwierdzono typowego dla wirusa pomoru świecenia plazmy komórek rozmazu we wszystkich preparatach ze śledziony i węzłów chłonnych pochodzących od świń klinicznie zdrowych.

Porównanie wyników rozpoznawania pomoru świń metodą if, próbą biologiczną na świniach oraz badaniem anatomo-patologicznym materiału patologicznego nadsyłałego z terenowych przypadków podejrzeń o pomór, przedstawia tab. 3.

Jak wynika z danych przedstawionych w tab. 3 na 48 świń podejrzanych o pomór, stwierdzono obecność wirusa metodą if w 37 przypadkach, w 11 zaś wyniki były ujemne. Identyczne wyniki badania tych samych 48 świń uzyskano w próbach biologicznych: obecność zjadliwego wirusa pomoru stwierdzono u tych samych 37 sztuk, 11 zaś prób było ujemnych.

Interesująco przedstawia się obraz zmian anatomo-patologicznych: typowe zmiany anatomo-patologiczne

Tab. 3. Porównanie wyników rozpoznawania pomoru świń metodą if, próbą biologiczną oraz badaniem sekcyjnym

Liczba zbadanych świń	IF		Próby biol.		Anatomopat	
	+	-	+	-	+	-
48	37	11	37	11	30 -7	+3 -8
185	167	17	—	—	+152 -11	+4 -13
ogółem 233	204	28				

dla pomoru świń stwierdzono jedynie u 31, spośród 37 sztuk, u których metodą if rozpoznano pomór świń. U 11 świń, u których nie stwierdzono wirusa pomoru świń — 4 świni miały zmiany typowe dla pomoru.

Dodatkowo w tab. 3 przedstawiono wyniki zastosowania metody if w diagnostyce rutynowej oraz porównanie tej metody z wynikami badania anatomo-patologicznego na podstawie zmian stwierdzanych w nadsyłałym materiale. I tak: na 185 świń badanych metodą if stwierdzono wirus pomoru u 167 sztuk, u 17 zaś badanie było ujemne. Anatomopatologicznie pomór można było podejrzewać jedynie u 152 świń.

Omówienie

Z przedstawionych wyników na szczególną uwagę zasługuje uzyskanie w preparatach odciskowych śledzion pochodzących od świń zakażonych zjadliwym wirusem pomoru, 100% wyników dodatnich, podczas gdy % wyników dodatnich z węzłów chłonnych był niższy.

Ważnym stwierdzeniem wydaje się być również uzyskanie identycznych wyników rozpoznawania pomoru przy użyciu metody if i próby biologicznej. Świadczy to o swoistości i dużej przydatności metody if.

Charakterystyczna jest także różnica między wynikami dodatnimi uzyskanymi metodą if oraz dodatnimi wynikami stwierdzonymi na podstawie zmian anatomo-patologicznych. Wydaje się, że w tych ostatnich przypadkach dużą rolę odgrywa czas potrzebny do rozwoju zmian anatomo-patologicznych, podczas gdy metodą if można stwierdzić wirus już w 6 godzin po zakażeniu.

Wyniki wykrywania wirusa pomoru świń w zakażonych hodowlach komórek nerki świń są również bardzo obiecujące, lecz trudności z prowadzeniem hodowli komórek ograniczają użycie tej metody do rutynowego rozpoznawania pomoru — szczególnie w warunkach terenowych.

Podobne wyniki, a mianowicie 100% prób dodatnich u świń zakażonych wirusem pomoru w rozmazach ze śledziony uzyskali Maess i Liess (5). W węzłach chłonnych ilość wyników dodatnich była u tych autorów jeszcze mniejsza niż wykazano to w pracy niniejszej. Ci sami autorzy wykazali również większą liczbę wyników dodatnich uzyskanych metodą if w porównaniu z rozpoznawaniem na podstawie zmian anatomo-patologicznych.

Natomiast dalszych badań wymaga sprawa pokrewieństwa antygenowego pomiędzy wirusem pomoru świń a wirusem biegunki bydła, który może powodować uzyskanie fałszywych wyników w odczynie if (2) przy rozpoznawaniu pomoru świń.

Wnioski

1. Stwierdzono swoistość i przydatność metody if do wykazywania wirusa pomoru świń w preparatach odciskowych śledziony i węzłów chłonnych u świń zakażonych tym wirusem w warunkach naturalnych oraz zakażonych laboratoryjnie.

2. Potwierdzono możliwość wykazywania metodą if wirusa pomoru świń w tkankach patologicznych, po wtórnym namnożeniu go

w hodowlach komórek nerki świni — linii PK-15.

3. Wykazano zgodność metody if i próby biologicznej w rozpoznawaniu pomoru świń.

4. Stwierdzono wyższy % wyników dodatnich w rozpoznawaniu pomoru świń przy badaniu śledziony, mniejszy zaś — przy badaniu węzłów chłonnych.

Piśmiennictwo

1. Aiken J. M. i wsp. J. Amer. vet. Med. Ass. 144, 1395, 1964.
2. Boulanger P. i wsp.: Can. J. Comp. Vet. 31, 16, 1967.
3. Karaszon D., Bodon L.: Acta Microb. Acad. Sci. Hun. 10, 287, 1963.
4. Marshall J., Eveland W., Smith S. W.: Proc. Soc. exp. Biol. 98, 898, 1958.
5. Meass J., Liess B.: Zentbl. VetMed.: 13, 660, 1966.
6. Meneling W. i wsp.: Can. J. Comp. Vet. Med. 27, 249, 1963.
7. Samól S.: Życie wet. 44, 361, 1969.

*) Adres autora: prof. dr Henryk Janowski, Olsztyn-Kortowo, Instytut Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych.

ZBIGNIEW KRAWIEC

Badania radiologiczne w przebiegu zakaźnego zanikowego zapalenia nosa u świń

Katedra Chirurgii Wydziału Weterynarii WSR we Wrocławiu
Kierownik: prof. dr R. BADURA

Względy natury gospodarczej i epizootiologicznej wysuwają zakaźne zanikowe zapalenie nosa u świń (określane w dalszej części pracy skrótowo z.z.z.n. lub chorobą ryjową) na czoło aktualnych problemów w hodowli trzody chlewnej. Choroba ta w ostatnich latach rozprzestrzenia się szczególnie w hodowlach wielkostadnych. Brak skutecznych metod leczniczych i profilaktycznych czyni zwykle zapowietrzoną hodowlę deficytową wskutek obniżenia lub nawet zahamowania przyrostów wagowych.

Poglądy na etiologię i patogenezę choroby są jeszcze dość rozbieżne mimo licznych badań. Zwolennicy teorii o zakaźnym tle schorzenia uważają, że przyczyną choroby ryjowej są takie bakterie jak: *Pasteurella multocida*, *Bordetella bronchiseptica*, *Pseudomonas aeruginosa*, drobnoustrojowe z rodzaju *Mycoplasma*. Nie brak również twierdzeń o wirusowej przyczynie schorzenia:

Janowski i wsp. doszli do wniosku, że braki żywieniowe, witaminowe i soli mineralnych w połączeniu z nieodpowiednim środowiskiem mają decydujący wpływ na powstawanie choroby. Kaszubkiewicz i wsp. biorą pod uwagę predyspozycję genetyczną jako ważne ogniwo w powstawaniu zmian chorobowych. Brown, Krook i Pond uważają, że z.z.z.n. jest schorzeniem niezakaźnym, związanym z zaburzeniem przemiany materii, a szczególnie gospodarki fosforowo-wapniowej.

Rozpoznanie schorzenia opiera się w zasadzie na badaniach klinicznych. Nie sprawia ono większych trudności i jest pewne u sztuk z

ewidentnymi objawami choroby ryjowej. Natomiast u prosiąt i starszych świń, u których brak objawów klinicznych schorzenia, rozpoznanie napotyka na trudności.

Podjęta praca miała na celu ustalić:

— przebieg kliniczny choroby w porównaniu z objawami radiologicznymi

— przydatność badań radiologicznych w rozpoznawaniu różnych okresów choroby

— czy istnieje możliwość wczesnego radiologicznego rozpoznania zakaźnego zanikowego zapalenia nosa u prosiąt

— stosunek zmian zanikowych w małżowinach nosowych do zaburzeń w układzie kostnym szczęki.

Badanie przeprowadzono na świniami rasy wielkiej białej polskiej w chlewniach wielkostadnych powiatu gostyńskiego. Materiał objęty badaniami podzielono na dwie zasadnicze grupy: Kontrolną — świnię z hodowli wolnych od choroby ryjowej i doświadczalną — świnię z hodowli gdzie stacjonarnie stwierdzano z.z.z.n. Każdą z tych grup w zależności od wieku podzielono na trzy podgrupy: pierwszą stanowiły prosięta do 3 miesięcy życia, drugą świnię od 3—7 miesięcy życia, trzecią świnię powyżej 7 miesięcy życia.

Obserwacjami i badaniami klinicznymi objęto 1800 prosiąt do 3 miesięcy życia. W grupie tej wykonano 193 badania radiologiczne. W podgrupie drugiej przeprowadzono badania u 1200 świń, z tego badaniami radiologicznymi objęto 121 zwierząt. Badania kliniczne świń liczących powyżej 7 miesięcy życia objęły 1000 zwierząt, z czego badania radiologiczne wykonano u 133 sztuk.

W czasie prowadzenia doświadczeń przeprowadzono 250 badań sekcyjnych i wymacerowano 75 czaszek świń w różnym wieku.

Przyjęto następujący układ badań:

- badania kliniczne
- badania radiologiczne
- badania sekcyjne.