

ANDRZEJ LIPOWSKI, MARIA MIERZEJEWSKA, STANISŁAW KARPIŃSKI

Porównawcza ocena praktycznej przydatności niektórych metodycznych odmian odczynu immunofluorescencji w rozpoznawaniu klasycznego pomoru świń

Zakład Badania Chorób Świń Instytutu Weterynarii, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Odczyn immunofluorescencji (if) został użyty do diagnostyki klasycznego pomoru świń (k.p.s.) po raz pierwszy przez Solorzano w 1962 r. (cyt. 37). Jego wyższość nad innymi metodami wykazano już dość dawno (23, 40, 41) i obecnie prawie we wszystkich pracowniach rozpoznawczych przeprowadza się diagnostykę k.p.s. za pomocą odczynu if, stosowanego w kilku modyfikacjach. Najbardziej rozpowszechnione jest bezpośrednie lub pośrednie wykrywanie antygeny wirusa klasycznego pomoru świń w tkankach zwierząt zakażonych (1, 2, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 18, 19, 21, 22, 23, 26, 28, 29, 33, 34, 35, 37, 38, 39, 40, 41). Stosowana jest również metoda wykazywania obecności wirusa wymienionej choroby w hodowlach tkankowych, które uprzednio zakażono homogenizatem narządów pochodzących od zwierząt chorych lub podejrzanych o k.p.s. (12, 24, 25, 29, 36, 42). Niektórzy autorzy proponują, aby przy rutynowych badaniach wykonywać odczyn if jednocześnie w skrawkach narządów zwierząt badanych i w hodowlach komórkowych (33), względnie w przyżyciowo pobranych wycinkach węzłów chłonnych (20) lub migdałków (31). Dużym utrudnieniem interpretacji uzyskanych wyników jest m.in. występowanie nieswoistej fluorescencji, jaka pojawia się w obrazie mikroskopowym po wybarwieniu preparatów koniugatą sporządzoną ze swoistej surowicy przeciwpomorowej. Zjawisko to wraz z próbami jego wyjaśnienia, opisywali liczni autorzy (2, 3, 8, 10, 13, 14, 15, 16, 17, 24, 25, 26, 27, 36, 40, 42). Fluorescencja nieswoista bywa na tyle intensywne, że trudno ją niejednokrotnie odróżnić od „świecenia” specyficznego (10, 17). W celu wyeliminowania tej wady stosowano m.in. maksymalne oczyszczenie surowic diagnostycznych z nieswoistych przeciwciał (24 cyt. 37), a koniugat z wolnego barwnika (27, 28). Próbowano też łączyć swoistą koniugatę z różnymi barwnikami kontrastowymi (13, 32). Efekty tych prac nie były jednak w pełni zadowalające. Dopiero w 1970 r. Engler i wsp. (9) wprowadzili do rozpoznawania k.p.s. dość obiecującą technikę kontrastowego barwienia preparatów w odczynie if. Wymienieni autorzy oparli się na doświadczeniach Cotran i wsp. (4) i zastosowali jako barwnik kontrastowy błękit Evansa. Dzięki niemu eliminuje się w znacznej mierze nieswoiste reakcje, występujące głównie przy bezpośrednim badaniu materiału pobranego od zwierząt.

Wszelkie struktury tkankowe barwią się przy tej technice na różne odcienie koloru czerwono-pomarańczowego, natomiast skupiska antygeny w cytoplazmie komórek zakażonych wybarwiają się swoistą koniugatą na kolor jasnozielony.

Mając na uwadze przedstawione dane podjęto pracę, której celem było porównanie metodycznych odmian odczynu if pod względem ich praktycznej przydatności do rozpoznawania klasycznego pomoru świń.

Materiał i metody

Do badań użyto:

- 30 świń o masie ciała ok. 30 kg zakażonych podskórnie zjadliwym wirusem świń (szcep Washington);
- 8 świń chorych, zakażonych przez kontakt w warunkach laboratoryjnych zjadliwym wirusem pomoru świń;
- 14 świń zdrowych, nie szczepionych przeciwko pomorowi;
- swoistą koniugatę przeciwpomorową VMO — Gammakon produkcji Bioveta — Nitra (Czechosłowacja);
- znakowaną antyglobulinę świńską (FA Porcine Globulin antiglobulin rabbit) produkcji DIFCO — Bacto (U.S.A.);
- gammaglobulinę odpornościową, tzw. Seropest, sporządzoną z surowicy przeciwpomorowej w Zakładzie Badania Chorób Świń IWet. Puławy.

Świnie zakażone podskórnie zjadliwym wirusem pomoru świń poddano ubojowi po 5 — 7 dniach, gdy wystąpiły już nasilone kliniczne objawy choroby, natomiast zwierzęta zakażone przez kontakt ubijano między 10 a 12 dniem — w klinicznie szczytowym stadium k.p.s.

Materiał do badań od świń zdrowych pobierano podczas uboju w rzeźni.

Na cienkie szkiełko podstawowe, dokładnie odtłuszczone, nakładano skrawki kriostatowe migdałków, śledzion i nerek pobranych od badanych świń i poddawano je następującym zabiegom: suszono w temp. pokojowej 1 godz., utrwalano acetonem w -20°C przez 5 min., suszono, 3-krotnie płukano PBS i ponownie suszono. Wysuszone preparaty barwiono 4 metodami:

- metodą bezpośrednią wg metodyki przyjętej w Zakładach Higieny Weterynaryjnej (11);
- metodą bezpośrednią z barwieniem kontrastowym błękitem Evansa wg metody Englera i wsp. (18) polegającej na tym, że przygotowane w powyższy sposób preparaty barwiono mieszaniną koniugaty z błękitem Evansa przez 1 godz. w 37°C w wilgotnej komorze, po czym odbarwiano je gorącym ($60 - 70^{\circ}\text{C}$) 20% roztworem glikolu trójetylowego, a następnie 3-krotnie płukano w PBS i 1-krotnie w wodzie destylowanej;
- metodą pośrednią (seropest + znakowana antygammaglobulina);
- metodą pośrednią j.w. z barwieniem kontrastowym błękitem Evansa.

Wybarwione preparaty oglądano w mikroskopie fluorescencyjnym typu Fluoval (produkcji VEB Carl Zeiss-Jena, NRD) z palnikiem HBO 202 w układzie optycznym: okular PK 6,3 x, obiektyw apochromatyczny 40/0,95, filtry U 204 g, U 205 g, G 247 dla preparatów barwionych bez błękitu Evansa oraz U 204 g, G 247 lub G 249 — dla preparatów barwionych kontrastowo błękitem Evansa.

Wyniki i omówienie

Wyniki badań przedstawiono w tab. 1. Stwierdzono, że najbardziej przydatna do diagnostyki k.p.s. jest metoda immunofluorescencji pośredniej, uzupełniona barwieniem kontrastowym błękitem Evansa. Preparaty przygotowane wg tej modyfikacji odczynu if są bowiem dobrze czytelne, a struktura tkankowa wyraźnie zaznaczona. Wprowadzenie barwnika kontrastowego dawało zabarwienie tkanki nie zakażonej na kolor od żółtego do czerwonego. Na tym tle wyraźnie widoczne były komórki zakażone, których cytoplazma wykazywała silną „świecącą” jasnozieloną fluorescencję z wyraźnie widocznym ciemnym jądrem. Fluorescencję tego typu stwierdzono zarówno w migdałkach jak i nerkach oraz w śledzionach świń zakażonych doświadczalnie zjadliwym szczepem wirusa klasycznego pomoru świń.

Tab. 1. Przydatność poszczególnych narządów oraz modyfikacji barwienia do diagnostyki k.p.s. metodą if

Metoda	Narządy			Ocena metody
	migdalki	nerki	śledziona	
pośrednia + błękit Evansa	+++	+++	+	wysoce specyficzna
bezpośrednia + błękit Evansa	++	-	-	specyficzna (zalecana do rutynowego stosowania w ZHW)
pośrednia	+	-	-	przydatna (z wyboru)
bezpośrednia	+	-	-	przydatna (z wyboru)

Objaśnienia: +++ — jasnozielone, specyficzne „świecenie” dużych grup komórek; ++ — j.w. małych grup komórek; + — j.w. pojedynczych komórek (po 2-6); „-” — brak komórek specyficznie fluoryzujących, mogących stanowić podstawę do postawienia rozpoznania.

W przypadkach zastosowania bezpośrednio metody if oraz kontrastowego barwienia j.w., ocena preparatów narażała wielokrotnie trudności. Polegały one na tym, że w skrawkach sporządzonych zarówno z narządów zwierząt chorych na pomór, a przede wszystkim z ich nerek i śledzion, jak i ze wszystkich trzech użytych do badań narządów zwierząt nie zakażonych-kontrolnych, widoczne było jasnozielone zabarwienie znacznej liczby komórek, przypominające swoistą fluorescencję. To niekorzystne zjawisko występowało w najmniejszym stopniu w preparatach z migdałków. Z powyższego względu wydaje się, że w krajowych laboratoriach, które opierają rozpoznanie k.p.s. na omawianej metodycznej modyfikacji pró-

by if, niezbędne do tego celu preparaty histologiczne winny być przygotowane przede wszystkim właśnie z migdałków podniebiennych świń podejrzaných o pomór. A oprócz tego, w celu uniknięcia diagnostycznych nieścisłości, ostatecznej oceny preparatów, decydującej o wyniku rozpoznania winien dokonywać pracownik mający odpowiednie kwalifikacje i doświadczenie w tym zakresie.

W przypadku barwienia preparatów metodą bezpośrednią (stosowaną dotychczas w ZHW) i pośrednią bez użycia błękitu Evansa, rozpoznania k.p.s. można było dokonać jedynie na podstawie obrazu mikroskopowego skrawków przygotowanych z migdałków zwierząt zakażonych doświadczalnie zjadliwym szczepem wirusa k.p.s. W ocenianych preparatach widoczne były, na ciemnym tle tkanki nie zakażonej, pojedyncze komórki (po 2 — 6) wykazujące fluorescencję cytoplazmy. Należy zaznaczyć, że prawidłowość rozpoznania, w przypadku stosowania obu tych metod, jest jeszcze bardziej uzależniona od doświadczenia osoby przeprowadzającej badanie, niż to ma miejsce przy diagnozowaniu k.p.s. omówionymi modyfikacjami if.

Przy wykonywaniu niniejszej pracy skrawki kriostatowe, jak podano już uprzednio, sporządzone były z migdałków, nerek i śledzion. W wyniku przeprowadzonych badań okazało się, że najbardziej odpowiednim narządem do wykrywania antygeny wirusa k.p.s. są migdałki, i to zarówno przy bezpośredniej, jak i pośredniej metodzie if oraz niezależnie od tego, czy stosowano błękit Evansa, czy też nie. Jest to zgodne z wynikami prac Meylinga i wsp. (26), Teebken i wsp. (39), Samóla (35) oraz Ressanga (29). Ostatni z wymienionych autorów wykazywał obecność wirusa k.p.s. w skrawkach kriostatowych z migdałków w 48 godzin od momentu zakażenia. W tym czasie obserwował on specyficznie fluoryzujące komórki w nabłonku powierzchniowym oraz w warstwie podstawowej nabłonka krypt migdałkowych (30). Wcześniej, bo już 24 godz. po zakażeniu, swoiście „świecące” komórki obserwował Engler (6). Stwierdza on, że w ciągu następnych 24 godz. wirus jest niewykrywalny, po czym od 3 do 12 dnia po zakażeniu ponownie widoczne są w obrazie mikroskopu fluoryzujące komórki, zawierające wirus k.p.s., zlokalizowane w nabłonku powierzchniowym i w warstwie podstawowej nabłonka krypt migdałkowych.

W trakcie wykonywania niniejszych badań uznano, że przy stosowaniu pośredniej if i błękitu Evansa, kriostatowe skrawki z nerek nie ustępują pod względem ilości, jak i jakości fluoryzujących specyficznie komórek, preparatom przygotowanym z migdałków. W obrazie mikroskopowym obserwowano przy tym „świecenie” śródłonka komórek kłębuszków nerkowych, a rzadko natomiast fluorescencję

nabłonka kanalików krętych oraz komórek interstitialnych. Podobne wyniki, stosując jednak metodę bezpośrednią z błękitem Evansa, otrzymał Engler (6). Barwiąc preparaty z nerek w powyższy sposób, obserwował on swoistą fluorescencję śródbłonka komórek kłębuszków nerkowych oraz, rzadziej, „świecenie” komórek nabłonka kanalików nerkowych, które pojawiało się dopiero 8 — 9 dnia po zakażeniu wrażliwych zwierząt zjadliwym szczepem wirusa k.p.s. Wspomniany autor zaznacza jednak, że podczas badania skrawków kriostatowych z nerek barwionych omawianą metodą if, rozpoznanie należy opierać przede wszystkim właśnie na obecności lub braku specyficznej fluorescencji cytoplazmy komórek nabłonka kanalików nerkowych oraz komórek interstitialnych, szczególnie tych zlokalizowanych w pobliżu naczyń krwionośnych (8, 9). Narząd ten został uznany przez Englera (7) za najmniej przydatny do diagnostyki k.p.s. odczynem if bezpośredniej z barwieniem kontrastowym błękitem Evansa (7). De Simone i Civardi (5), stosując metodę bezpośrednią bez wspomnianego barwnika stwierdzili, że w preparatach z nerek tylko w 12% przypadków można było wykryć obecność wirusa k.p.s. Również Samól (35) uważa nerki za mało przydatne do diagnostyki klasycznego pomoru świń metodą immunofluorescencji bezpośredniej bez błękitu Evansa.

Natomiast zgodne z wynikami niniejszej pracy dane przedstawił Ressay (30), który już 5 dnia po zakażeniu świń wirusem k.p.s. obserwował, posługując się metodą if bezpośredniej bez błękitu Evansa, specyficzną fluorescencję wyłącznie komórek śródbłonkowych w kłębuszkach nerkowych. Dopiero 6 — 7 dnia, od momentu podania wrażliwym zwierzętom zjadliwego szczepu wirusa pomoru, obserwował on swoiste „świecenie” komórek interstitialnych oraz nabłonków kanalików nerkowych.

Jeśli chodzi o skrawki kriostatowe ze śledziony świń pomorowych, to jedynie w preparatach barwionych kontrastowo metodą pośrednią widoczne były nieliczne, specyficznie fluoryzujące komórki. Nastręczało to dużych trudności w odszukaniu ich. Ponadto w omawianych skrawkach struktura tkanki nie zakażonej była zamazana i znacznie mniej czytelna w porównaniu z preparatami z migdałków, czy nerek. Biorąc powyższe dane pod uwagę można wyrazić pogląd, że śledziona jest najmniej odpowiednim narządem do diagnostyki fluorescencyjnej klasycznego pomoru świń. Odmienne zdania są Engler i wsp. (18). Według tych autorów właśnie śledziona ma być najbardziej przydatna do rozpoznawania k.p.s. Bowiemy już od 3 dnia po zakażeniu stwierdzili oni w preparatach z tego narządu swoiście fluoryzujące komórki (6). Pogląd ten podzielają również inni badacze (5, 21, 40, 41).

W badaniach własnych obserwowano niekiedy, w skrawkach z różnych narządów, jasnozieloną fluorescencję, która nie występowała w cytoplazmie komórek. Tego rodzaju „świecenie”, dotyczące tkanki martwej lub detritusu komórkowego, oceniano jako nieswoiste.

Podsumowując wyniki niniejszej pracy możliwe wydaje się wyrażenie opinii, że najbardziej przydatna do diagnostyki klasycznego pomoru świń jest metoda immunofluorescencji pośredniej z barwieniem kontrastowym błękitem Evansa. Pozwala ona bowiem na zmniejszenie do minimum fluorescencji nieswoistej, a uzyskany obraz mikroskopowy jest dobrze czytelny. Zasadniczymi narządami, z których należy sporządzić preparaty do badań metodą if w wymienionej modyfikacji są migdałki i nerki. Śledziona jest mało przydatna do powyższego celu.

Godną polecenia, szczególnie do rutynowego wykonywania w ZHW, jest również metoda immunofluorescencji bezpośredniej z barwieniem kontrastowym błękitem Evansa. Charakteryzuje się ona dość znaczną specyficznością i prostotą wykonania przy wykorzystaniu dostępnych w kraju odczynników. Istnieje bowiem możliwość zakupu gotowego, wytwarzanego w NRD zestawu do barwienia preparatów omawianą metodą. Oryginalna nazwa tego zestawu brzmi: „Testpackung zum Nachweis von Schweinepestvirus”. Zawiera ona liofilizaty koniugat — dodatniej i ujemnej (kontrolnej) oraz błękitu Evansa. Producentem jest Staatliches Institut für Immunpräparate und Nährmedien, 112 Berlin, NRD.

Jednak w przypadku braku odpowiednich odczynników trzeba naturalnie stosować w laboratoryjnej diagnostyce k.p.s. dotychczasową metodę if, to znaczy metodę bezpośrednią bez błękitu Evansa.

Oczywistą rzeczą musi być również i to, że niezależnie od użytej modyfikacji if uzyskane przy tej metodzie wyniki diagnostyczne winny być skonfrontowane z sytuacją zdrowotną gospodarstwa, z którego nadesłano próby do badania. Chodzi bowiem o to, że — jak wynika m.in. z badań Gołębiowskiego i Orłowskiego (10) oraz Korna i Matthaeusa (17), mimo stosowania nawet bardzo dobrych metod niekiedy ma miejsce fluorescencja nieswoista, co — przy braku danych klinicznych i epizootycznych może niekiedy prowadzić do brzemniennych w skutki mylnych rozpoznań.

Piśmiennictwo

1. Aiken J. M.: J. Am. vet. med. Ass. 144, 135, 1964.
2. Aiken J. M., Hoopes K. H., Rhodes M. B., Tutenhause M. J.: J. Am. vet. med. Ass. 150, 59, 1967.
3. Chisiu N. St., Papa M. N.: Archiva vet. 7, 21, 1970.
4. Cotran R. S., Vivaldi E., Zangwill D. P., Kass E. H.: Am. J. Path. 43, 1, 1963.
5. De Simone F., Civardi A.: Vet. Ital. 24, 223, 1973.
6. Engler E.: Mh. Vet.-Med. 26, 181, 1971.
7. Engler E., Ludwig Ch., Fritsch W., Pulst H., Ulbrich F.: Arch. exp. VetMed. 28, 661, 1972.
8. Engler E., Urbaneck D., Olechnowitz A.-F.: Arch. exp. VetMed. 24, 481, 1970.

