

Próba wygaszania niespecyficznego świecenia w preparatach odciskowych mózgowia zwierząt podejrzanych o wściekliznę

Zakład Higieny Weterynaryjnej, ul. Ściegiennego 6, 38-400 Krosno

Summary

Extinction of non-specific fluorescence in brain impression slides of rabies suspected animals

FITC conjugate Bioveta, Ivanovice, Czech Republic, used in routine rabies diagnosis, gives a non-specific background fluorescence in brain impression slides. The effect may cause some problems in the proper diagnosis when only a small number of specific inclusion bodies are present. The paper presents an attempt to reduce the non-specific background fluorescence in preparations of brain impressions labelled with Bioveta antirabies conjugate adsorbed with the suspension of normal mouse brain or counterstained with Evans Blue. The background fluorescence has been markedly reduced and the increased number of inclusion bodies were also observed in impressions labelled by Bioveta conjugate with Evans Blue or adsorbed with normal mouse brain tissue in comparison to brain impressions labelled with Bioveta conjugate without these modifications. FA conjugate by diagnostics Pasteur was used as a reference because slides stained with this conjugate have not had any background fluorescence.

Odczyn immunofluorescencji (IF) obok próby biologicznej na białych myszkach oraz badania histopatologicznego w kierunku ciała Babesa-Negriego jest uznana metodą w rutynowej diagnostyce wścieklizny. Według opinii Komitetu Ekspertów WHO oraz Instytutu Pasteura w Paryżu stał się on podstawową metodą w rutynowej diagnostyce wścieklizny. Również w Polsce odczyn IF jest jedną z urzędowych metod badania w kierunku tej groźnej i niebezpiecznej choroby (1, 2). Odczyn immunofluorescencji jest metodą szybką, stosunkowo tanią i bardziej dokładną niż badanie histopatologiczne. Jego czułość jest porównywalna z próbą biologiczną. Nad próbą biologiczną ma tę przewagę, że wynik otrzymuje się już po kilku godzinach od momentu dostarczenia materiału do laboratorium (4). Szczególnego znaczenia nabiera więc ograniczenie lub wyeliminowanie fałszywie ujemnych wyników, a co za tym idzie, zwiększenie wiarygodności tego odczynu. Można to uzyskać poprzez zmniejszenie niespecyficznego świecenia tkanki mózgowej w preparatach. Zmniejszenie świecenia tła można uzyskać stosując adsorbowane koniugaty jak np. koniugat firmy Diagnostics Pasteur, Francja, jak również poprzez barwienie kontrastowe za pomocą błękitu Evansa, np. koniugat monoklonalny CEN-

TOCOR FITC, USA oraz koniugat Diagnostics Pasteur, Francja (2, 5).

Koniugat Bioveta omawiany w niniejszej pracy jest używany obecnie przez ZHW na terenie całego kraju. Przy jego użyciu uzyskuje się niekiedy podbarwienie tła, które utrudnia interpretację wyniku. Nieoczyszczony koniugat zawiera ponadto strąty, ze względu na co nie cieszy się on dobrą opinią (2). Powyższe mankamenty w znacznej mierze utrudniają postawienie prawidłowego rozpoznania, zwłaszcza w przypadku występowania bardzo nielicznych, drobnych ciałek wtęto-tych. Niniejsza praca opisuje próbę wyeliminowania tych niekorzystnych cech, z uwagi na to, że prawdopodobnie wiele ZHW będzie nadal korzystało z tego odczynnika, ze względu na jego stosunkowo niską cenę.

Materiał i metody

W badaniach posłużono się tkanką mózgową 2 psów i 3 lisów z rozpoznaną w odczynie IF wścieklizną oraz tkanką mózgową białych myszek padłych przy dodatnim wyniku próby biologicznej. Z mózgowia (kora mózgowa, rogi Ammona, mózdzek, rdzeń przedłużony) wykonywano preparaty odciskowe, zaś ze ślinianki podżuchwowej – preparaty mazane (4) według ogólnie przyjętych zasad. Wszystkie preparaty utrwalano w ciągu 20 minut w acetonie schłodzonym do temp. -20°C (koniugat francuski – 30 minut). Po wysuszeniu umieszczano je w komorze wilgotnej i znakowano równolegle:

– koniugatem Bioveta adsorbowanym homogenatem tkanki mózgowej niezakażonych myszek,

– koniugatem Bioveta z dodatkiem błękitu Evansa,

– koniugatem Bioveta bez powyższych modyfikacji,

– koniugatem referencyjnym Diagnostics Pasteur, Francja.

Preparaty inkubowano przez 30 minut w temp. 37°C , płukano według zaleceń producentów (5, 6), suszono i montowano pod szkiełko nakrywkowe przy użyciu mieszaniny glicerolu i buforu fosforanowego, pH 8,2, w stosunku objętościowym 9:1. Przeglądano je przy użyciu mikroskopu Axioskop firmy Opton z palnikiem HBO 50. Zdjęcia wykonywano przystawką fotograficzną MC 100 z automatycznie ustawianym czasem ekspozycji. Oceniano stopień wygaszania fluorescencji tkanki mózgowej, morfologię i liczbę swoistych świeceń oraz obecność artefaktów (strątów). Preparaty oglądano przy powiększeniach $200\times$ i $400\times$.

Zastosowano 2 sposoby modyfikacji koniugatu Bioveta.

A. Koniugat Bioveta adsorbowany tkanką mózgową zdrowych myszek (w modyfikacji własnej). Odważoną ilość tkanki mózgowej myszek rozcierano z koniugatem rozcieńczonym w stosunku 1:8 i odwirowanym dwukrotnie przy $3000 \times g$ (koniugat dostarczany jest w postaci zliofilizowanej) tak, aby uzyskać 20% zawiesinę wag/obj. Mieszaninę tę następnie inkubowano w temp. 37°C przez 90 minut, kilkakrotnie w tym czasie mieszając, następnie oczyszczano, wirując dwukrotnie

przez 20 minut przy $3000 \times g$. Klarowny supernatant rozlewało po 1 ml do probówek Eppendorfa i przechowywano w temp. -20°C . Tak przygotowany koniugat przed użyciem rozmrażano, mieszano i wirowano 10 minut przy $3000 \times g$.

B. Koniugat Bioveta zmodyfikowany dodatkiem błękitu Evansa. W doświadczeniu użyto 0,25% roztworu błękitu Evansa. Odczynnik ten dodawano w końcowym stężeniu 1:2000 do koniugatu rozcieńczonego w stosunku 1:8. Koniugat przed użyciem wirowano 10 minut przy $3000 \times g$.

C. Niczym nie traktowany koniugat Bioveta, w rozcieńczeniu 1:8, stosownie do zaleceń producenta, po dwukrotnym odwirowaniu przy $3000 \times g$ przez 10 minut.

D. Zrekonstruowany koniugat Diagnostics Pasteur, Francja, po odwirowaniu przy $3000 \times g$ przez 10 minut.

Jako kontroli świecenia tła użyto preparatów odciskowych mózgowia nieznakowanych, zatopionych w zbuforowanej glicerynie i przykrytych szkiełkiem nakrywkowym.

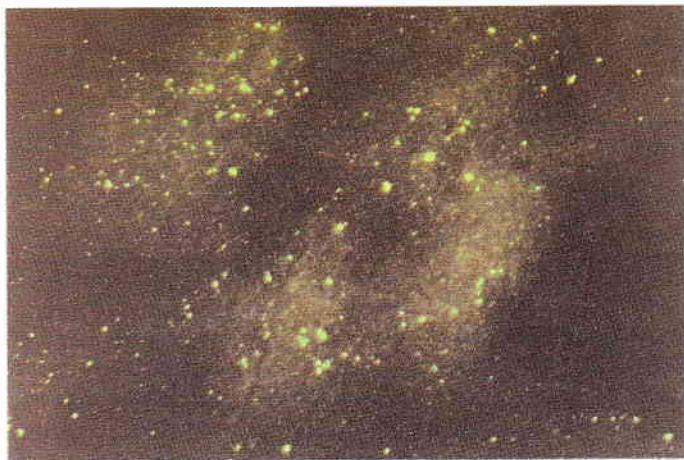
Wyniki i omówienie

W preparatach znakowanych natywnym, niczym nie traktowanym, koniugatem Bioveta w rozcieńczeniu 1:8 (ryc. 3), tkanka mózgowa (tło) świeciła intensywnie zieloną barwą. W preparatach znakowanych koniugatem francuskim (ryc. 4) tło pozostawało ciemne. Porównanie świecenia tła w preparatach znakowanych koniugatem francuskim oraz w preparatach nieznakowanych, zatopionych w zbuforowanym glicerolu, wykazało brak świecenia tła w obu przypadkach. Użycie koniugatu adsorbowanego (koniugat A; ryc. 1) dało znaczny spadek fluorescencji tła (tkanki mózgowej) w badanych preparatach

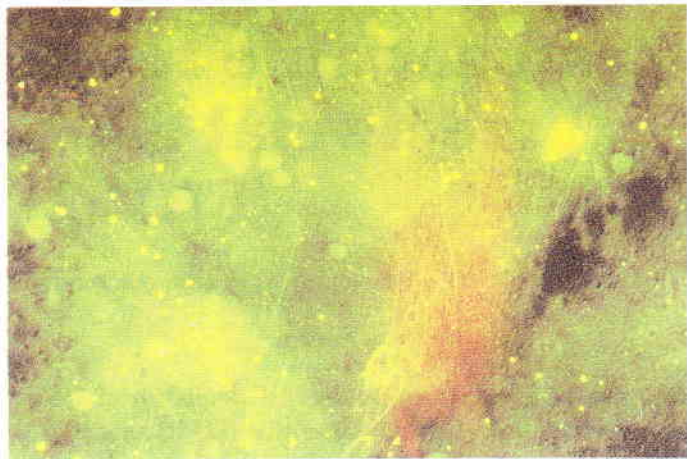
w porównaniu z koniugatem Bioveta bez modyfikacji. W przypadku użycia błękitu Evansa (modyfikacja B; ryc. 2), tło wykazywało barwę od ciemnobrunatnej w najcieńszych miejscach preparatów do czerwonej w miejscach grubszych. Dało to efektywny, kontrastowy obraz jabłkowozielono świecących ciałek na czerwono-brunatnym tle. W miejscach najcieńszych nastąpiło całkowite wygaszenie świecenia tła.

Największą liczbę swoistych świeceń wykrywał koniugat francuski. Licznie występujące, jasne punkty w postaci rozproszanego pyłu świeciły wyraźnie. W preparatach znakowanych koniugatem Bioveta bez modyfikacji ciała największe oraz średniej wielkości świeciły jasno i wyraźnie, natomiast najdrobniejsze, punkcikowate, były nierozpoznawalne. Nieliczne spośród nich bardzo słabo wyróżniały się na tle intensywnie świecącej zieloną barwą tkanki mózgowej (efekt maskujący).

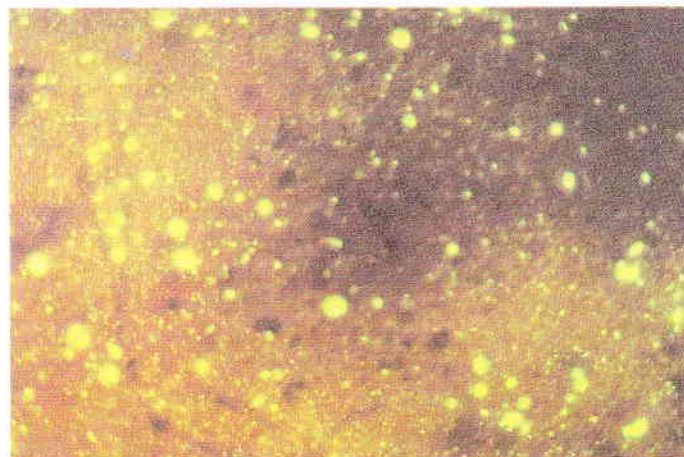
Dla zobrazowania wpływu nieswoistego świecenia tła w preparatach znakowanych niezmodyfikowanym koniugatem Bioveta, warto przytoczyć przykład psa z porażenną postacią wścieklizny, który został skierowany do badania w ZHW w Krośnie. W preparatach z rogów Ammona i ślinianek, w których należałoby spodziewać się największych ilości antygeny wirusa wścieklizny, a także z kory mózgowej i mózdzku, odczyn IF dał wynik ujemny. Odczyn ten, w preparatach znakowanych koniugatem Bioveta w obu modyfikacjach oraz koniugatem francuskim, dał wynik dodatni. Wycinki kory mózgowej, rogów Ammona i mózdzku po wykonaniu preparatów użyto do inokulacji myszek w próbie biologicznej. Po



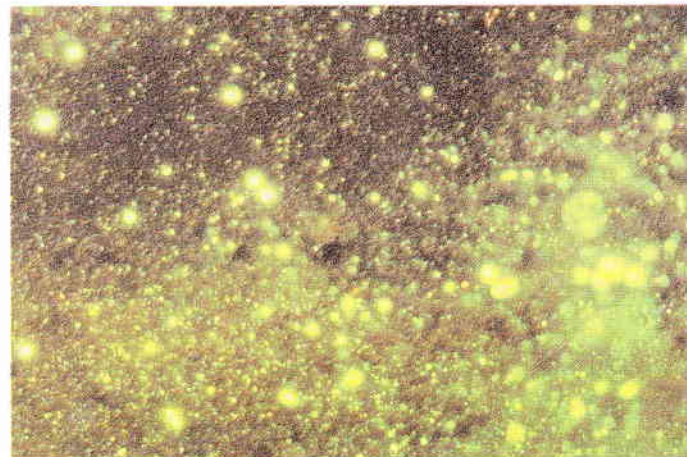
Ryc. 1. Preparat odciskowy rogów Ammona u lisa. Koniugat Bioveta 1:8, adsorbowany, powiększenie 200x



Ryc. 3. Preparat odciskowy rogów Ammona u lisa. Koniugat Bioveta 1:8, natywny, powiększenie 200x



Ryc. 2. Preparat odciskowy rogów Ammona u lisa. Koniugat Bioveta 1:8, z dodatkiem błękitu Evansa, powiększenie 400x



Ryc. 4. Preparat odciskowy rogów Ammona u lisa. Koniugat Diagnostics Pasteur, powiększenie 400x

otrzymaniu dodatniego wyniku próby biologicznej, potwierdzonego odczynem IF (myszki padały kolejno w 16, 17, 20 i 30 dniu), odczyn IF dla mózgu psa powtórzono i otrzymano identyczne wyniki. Bardzo drobne świecenia nie mogły być wykryte koniugatem natywnym ze względu na maskujący wpływ jasnozielonego tła. Zastosowanie koniugatu z tej samej serii w modyfikacji A i B dało całkowite wygaszenie tła i ujawniło świecenia specyficzne. Swoiście świecące ciała wtretowe były wyraźnie widoczne. Użycie koniugatu Bioveta w tradycyjny sposób, może zatem w niektórych przypadkach sprawiać trudności w podjęciu prawidłowego rozpoznania z powodu maskującego świecenia tła. Trudności te mogą zaistnieć w przypadku występowania w badanym materiale znikomej ilości antygeny wirusa wścieklizny. Fałszywie ujemne wyniki stanowią zagrożenie dla osób poszkodowanych ze względu na opóźnione rozpoznanie, bowiem dodatni wynik próby biologicznej otrzymuje się po ok. 5-16 dniach. W wyniku pokąsania człowieka, wirus namnaża się w miejscu wniknięcia i rozpoczyna wędrówkę w kierunku mózgu. Wskutek opóźnionego rozpoznania choroby, osoba poszkodowana jest narażona na zbyt późne poddanie się szczepieniom interwencyjnym. Reasumując, można stwierdzić, że użycie zmodyfikowanego opisanymi metodami koniugatu Bioveta, obecnie szeroko stosowanego w

diagnostyce wścieklizny na terenie całego kraju, powinno przyczynić się do wyeliminowania lub ograniczenia fałszywie ujemnych wyników w odczynie IF. Obniżenie nieswoistego świecenia tkanki mózgowej w preparatach powinno przyczynić się do polepszenia komfortu pracy pracowników diagnozujących wściekliznę i wzrostu wiarygodności omawianej metody.

Wygaszenie niespecyficznego świecenia tła i udoskonalenie laboratoryjnego rozpoznawania wścieklizny zwierząt można uzyskać przez adsorpcję koniugatu Bioveta homogenatem tkanki mózgowej zdrowych myszek lub dodatek błękitu Evansa.

Piśmiennictwo

1. Sacramento D., Bourhy H., Tordo N.: *Molecular Cellular Probes* 5, 229, 1991.
2. Żmudziński J. F., Smreczak M., Skulmowska D., Rola J.: *Medycyna Wet.* 49, 19, 1993.
3. Baczyński Z., Gładysz A., Larski Z., Łosieczka K., Seroka D., Wachnik Z.: *Wścieklizna*. PWRiL, Warszawa, 1987.
4. Instrukcja Nr 27 Min. Rol. Dep. Wet. z dnia 16.04.1973 (Wet-L-040/1/730).
5. Instrukcja użycia koniugatu FITC – Diagnostics Pasteur, Francja.
6. Instrukcja użycia koniugatu FITC – Bioveta Ivanovice, Czechy.

Adres autora: lek. wet. Emilian Skrzynecki, ul. Grodzka 63/6, 38-400 Krosno

JACEK WÓJCIK

Zastosowanie testu IMPA do wykrywania przeciwciał dla herpeswirusa kotów (FHV-1) w Polsce

Zakład Chorób Zwierząt Mięsożernych i Futerkowych Państwowego Instytutu Weterynaryjnego, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Summary

The use of IMPA for serological detection of feline herpesvirus type 1 (FHV-1) antibodies in cats in Poland

Serological examinations with the use of IMPA of 335 cats not vaccinated against infectious feline rhinotracheitis (FRT) showed a prevalence of feline herpesvirus type 1 (FHV-1) in 61.5% of Polish cats. Most of the seropositive cats had high (16-64) or very high (128-512) FHV-1 antibody titre. The seropositive cats were mainly detected in large towns or animal shelters (82% seropositive animals). Most seropositive cats were more than 12 months old. The lowest percentage of FHV-1 seropositive animals was noted in cats less than 3 months old. IMPA can be used for the routine serological diagnosis of herpesvirus infections in cats.

fekcje herpeswirusowe rozpoznawane są u kotów najczęściej jako tzw. zakaźne zapalenie nosa i tchawicy (2, 3, 11). W odróżnieniu od zakażeń FCV w przebiegu zakaźnego zapalenia nosa i tchawicy notuje się znacznie wyższy odsetek śmiertelności (30%) jak również możliwość występowania innych objawów chorobowych w tym zaburzeń w rozrodcie (zamieranie płodów i padnięcia osesków) czy zaburzeń w funkcjonowaniu centralnego układu nerwowego. Obserwowane u kotów nawrotowe i przewlekłe zapalenie zatok lub błon śluzowych w obrębie głowy jest również, często wynikiem zakażenia latentnego wirusem FHV-1 (1, 6, 11). Dodatkowo, działanie immunosupresyjne herpeswirusa, sprzyja rozwojowi infekcji oportunistycznych (chlamydiami, bakteriami lub grzybami chorobotwórczymi) co powoduje, że przebieg zakażenia bywa niejednokrotnie bardzo ciężki. Stąd też FHV-1 wymieniony jest wśród najbardziej patogennych czynników zakaźnych kotów (8).

Obserwacje kliniczne wskazują na częste występowanie przypadków URTD w Polsce. Jednak jak dotąd badania nad udziałem wirusowych czynników zakaźnych (FCV, FHV-1) w wywoływaniu tego syndromu ograniczają się do jednej pracy omawiającej izolację wirusa FCV (12). W związku z tym uznano za celowe przedstawienie wyników badań serologicznych w kierunku FHV-1, przeprowadzonych z zastosowaniem testu IMPA (immunoperoxidase monolayer assay).

Schorzenia zakaźne górnych dróg oddechowych kotów (URTD – upper respiratory infection diseases) wywoływane są najczęściej przez herpeswirus typ-1 (FHV-1) i kaliciwirusy kotów (FCV). Objawy URTD obserwuje się głównie u młodych kotów, zwykle późną jesienią lub wczesną wiosną (11). In-