

KRZYSZTOF WOJCIECHOWSKI, BARBARA TRIPPENBACH

## Laboratoryjna ocena przypadków choroby wywołanej przez wirus szczepionkowy wścieklizny

Zakład Higieny Weterynaryjnej w Warszawie  
Kierownik: dr S. SAMOL

Potwierdzenie etiologii wirusowej wielu przypadków choroby poszczepiennej u psów uzyskali metodami biologicznymi dla krajowej szczepionki p-w wściekliznie typu Umeno-Doi: Stryszak (7), Kocowicz i wsp. (1). Po szczepionce LEP-Flury wirus wścieklizny wyizolowano ze śmiertelnych przypadków choroby poszczepiennej bydła (da Silva, dos Passos — cyt. wg 8). Dane te upoważniają do używania terminu „wścieklizna poszczepienna”. W przypadku ekspozycji człowieka — stwierdzenie lub wykluczenie wścieklizny poszczepiennej w badaniach laboratoryjnie materiałem zwierzęcym decyduje o dalszym postępowaniu z poszkodowanym.

Celem doniesienia było określenie przydatności metody laboratoryjnego rozpoznawania wścieklizny do oceny przypadków choroby (wścieklizny) poszczepiennej zwierząt. Szczególny nacisk położono na zastosowanie do badań metody immunofluorescencji (immfl.) (10).

### Materiał i metody

Mózgi zwierząt dostarczone do badań rozpoznawczych w kierunku wścieklizny w sezonie szczepionnym — 1969, u których nie wykazano obecności ciałek Babes-Negriego (BN). Badany materiał pochodził od psów, które wg danych z wywiadu chorowały z objawami niedowładów i porażen w krótkim okresie po szczepieniach profilaktycznych przeciw wściekliznie szczepionką typu Umeno-Doi produkcji „Biovet” Puławy. Badano również przypadek podejrzenia wścieklizny u kota, u którego badaniem histopatologicznym nie stwierdzono ciałek BN (tab. 1). Ma-

Tab. 1. Podejrzenie o chorobę (wściekliznę) poszczepienną

Lp.	Płeć	Wiek (mies)	Data szczepienia	Okres inkub (dni)	Choroba (dni)
1	♂	12	7. II	11	2
2	♂	6	10. II	6	3
3	♂	...	2. IV	13	2
4	♀	8	8. V	10	...
5	♂	6	1969 r.	...	6
6	♀	5	28. V	9	3
7	♀	16	1969 r.	...	5
8	♀	10	5. VI	16	2
9	♂	6	15. VI	7	3
10	♂	...	7. II	14	2
11	♂	17	25. V	19	2
kol.	♂	9 lat	...	...	3

... brak danych

teriał do badań dostarczano z dokumentacją objawów klinicznych i sekcyjnych choroby. W dokumentacji powtarzały się opisy choroby z kilku, lub kilkunastodniowym okresem inkubacji. Klinicznie stwierdzano przede wszystkim objawy niedowładów i porażen. Zmiany sekcyjne były różnorodne i niesymptomatyczne.

Zwierzęta laboratoryjne — myszy białe „Porton”, szczep wsobny wagi 11—13 g.

Barwniki — Sellersa i Gerlacha.

Materiał do badań metodą immunofluorescencji (immfl.): surowica p-w wściekliznie znakowana izotocyjanianem fluoresceiny (FITC) — konjugat, produkcji Bioveta Czechosłowacja, ważny do 26.08.71. Konjugat kontrolny produkcji j.w., surowica końska przeciw wściekliznie — serum antirabique purifié prod. Instytutu Pasteur'a w Paryżu (seria 55059). Surowica końska normalna prod. WWSIS z., seria 30768, bufor fosforanowy o pH 7,6, gliceryna buforowana o pH 7,8, roztwór fizjologiczny soli, szczepionki p-w wściekliznie prod. „Biovet” Puławy — serie: 1/170469, 2/140369, 3/150369, stosowane w sezonie szczepionnym 1969.

Tab. 2. Badania laboratoryjne przypadków i podejrzeń o chorobę (wściekliznę) poszczepienną

Lp.	Materiał wyjściowy						Próby biologiczne				Wynik ogólny	
	histopatolog		immunofluorescencja				I pasaż		II pasaż			
	ciątka B-N	Z.N.	kora	rog Ammonia	stwierdzenie ciałek	okres inkub (dni)	ciątka B-N	immfl.	okres inkub (dni)	ciątka B-N		immfl.
1	-	+	+	+	+	6	-	+	5	-	+	+
2	-	+	+	+	+	5-12	-	+	6	-	+	+
3	-	+	+	+	+	5-7	-	+	5-6	-	+	+
4	-	+	-	-	-	6-7	-	+	5-7	-	+	+
5	-	+	-	-	-	8	-	+	6	-	+	+
6	-	+	-	+	+	6-7	-	+	5-6	-	+	+
7	-	+	-	-	-	8-11	-	+	6-7	-	+	+
8	-	+	+	+	+	6	-	+	6-7	-	+	+
9	-	+	+	+	+	6-8	-	+	6-8	-	+	+
10	-	+	+	-	-	-	-	-	nie badano		-	-
11	-	+	-	-	+	-	-	-	nie badano		-	-
kol.	-	±	-	-	-	7-9	-	+	6-9	-	+	+

ZN zwyrodnienie neuronów

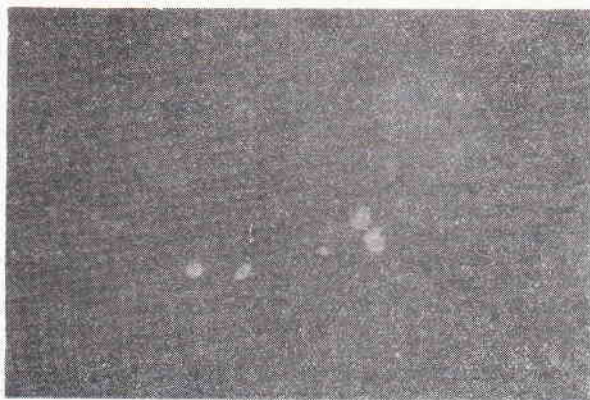
Z każdym materiałem wyjściowym przeprowadzono badania w kierunku ciałek BN, próby biologicznej i badania immfl. W próbach biologicznych prowadzono dwa kolejne pasażę domózgowe na myszach (I i II) z użyciem 6-ciu zwierząt na badanie. Mózgi myszy padłych w próbie biologicznej badano histopatologicznie w kierunku ciałek BN i immfl. Badania immfl. wykonano z preparatami z powierzchni przekrojów mózgowi myszy wzdłuż *fissura longitudinalis cerebri*. Jako pomocniczej metody diagnostycznej używano próby mikroimmunodiffuzji w żelu agarowym z surowicą p-w wściekliznie wg (6). Miana wirusa szczepionkowego oznaczano drogą szczepień domózgowych myszy rozcieńczeniami szczepionek wg zawartej w nich tkanki nerwowej. Używano czterech myszy na jedno rozcieńczenie. Wyniki obliczono metodą Reeda i Muencha (R i M).

Próbę neutralizacji wykonano z homogenizatem mózgu w celu dodatkowego wyjaśnienia swoistości wyizolowanego czynnika chorobotwórczego. Używano surowicy p-w wściekliznie w rozcieńczeniu 1:10. Stosowano stałe rozcieńczenia surowicy i logarytmiczne rozcieńczenia materiału badanego. Kontrolę prowadzono wobec surowicy końskiej normalnej. Surowice przed próbą inaktywowano. Porównawczo mianowano domózgowo na myszach wirus ustalony CVS-66 (WHO). Szczep CVS przechowywano w formie mózgowi mysich konserwowanych gliceryną. Wyniki obli-

czano metodą R i M określając indeks neutralizacji. Badania immunofluorescencyjne wykonano metodą bezpośrednią z konjugatami rozcieńczonymi 1:4. Kontrola: barwienie konjugatem ujemnym, odczyn hamowania z surowicą p-w wścieklicznie. Schemat odczynu hamowania prowadzonego w dwóch etapach I) preparat badany + surowica p-w wścieklicznie 1:2 (inkubacja 45 min. w temp. 37°C) — płukanie. II) preparat + konjugat 1:4 (inkubacja 45 min. w temp. 37°C) — płukanie. Schemat płukania: 1) bufor fosforanowy pH 7,6—10 min., 2) i 3) roztwór fizjologiczny soli po 10 min., 4) H<sub>2</sub>O bidest. 10 min. Ocena preparatów: preparaty oglądano w mikroskopie Nf C-Zeiss, stosując przystawkę HBO-50 ze stabilizatorem. Układ filtrów i koweta z 5% roztworem wodnym CuSO<sub>4</sub>, filtry UG<sub>1,5</sub> i OG<sub>1</sub>/GG<sub>9</sub>. Mikroskop wyposażono we wkładkę do ciemnego pola, kondensator Apl 1,4. Stosowano immersję dolną z gliceryny buforowanej, układ optyczny 5×40. Dokumentację fotograficzną wykonano na panchromatycznym filmie do fluorografii — Ilford HPX (prod. angielskie).

### Wyniki

Przypadki choroby poszczepionej (tab. 1) występowały u psów młodych w wieku 6—16 miesięcy. Okresy inkubacji choroby (od dnia szczepienia) wynosiły u psów 6—16 dni. Choroba trwała 2—5 dni. Wyniki badań laboratoryjnych przedstawiono w tab. 2. Wyniki dotyczące badania mózgu kota ze względu na brak danych z wywiadu dotyczących szczepienia zwierzęcia zostały umieszczone w oddzielnej części tabeli. W preparatach z mózgow zwierząt podejrzanych o chorobę (wściekliczną) poszczepienną barwionych metodami Sellersa i Gerlacha nie stwierdzono ciałek BN zwłaszcza w formie występującej przy wirusie ulicznym. Spotykano występujące przy zakażeniu wirusem ustalonym wściekliczny zmiany degeneracyjne neuronów. Lepine (2) i Nicolau (3) określają ten rodzaj zwyrodnienia jako polichromatyczne. Intensywność zmian była największa w preparatach z okolicy rogów Ammona. Podobne wyniki dała ocena preparatów z mózgow myszy padłych w kolejnych pasażach. W preparatach badanych metodą immfl. i ocenianych jako pozytywne (+) obserwowano intensywną rozsianą fluorescencję drobnych ziaren antygenowych, częściej występująca przy wirusie ustalonym (ryc. 1). Dla porównania załączono zdjęcie z preparatu antygeny



Ryc. 1.

wirusa ulicznego zlokalizowanego częściowo w ciałkach BN (ryc. 2). Próby immfl. z różnymi częściami mózgow dawały różne wyniki co wiąże się z nierównomiernym rozmieszczeniem antygeny wirusa wściekliczny (4) oraz programem jego wykrywalności dla metody immunofluorescencji (5). Ocena rdzenia przedłużonego



Ryc. 2.

sprawiła pewną trudność ze względu na występowanie w nim świeceń nieswoistych co przypomina dane (5) uzyskane dla modelu myszy. Surowica p-w wścieklicznie w odczynie hamowania powodowała znaczne przytłumienie, a niekiedy wygaszenie świeceń materiału antygenowego.

W próbie mikroimmunodyfuzji w żelu agarowym z materiałem mózgowym zawierającym wirus ustalony i surowicę p-w wścieklicznie uzyskiwano linie już po 8—24 godz. Jest to zgodne z wynikami poprzednich badań (6). Wskazana jest duża ostrożność w interpretacji ze względu na możliwość wystąpienia nieswoistych wyników związanych z obecnością w surowicy przeciwciał przeciw tkance mózgowej nie dających się w pełni wysycić proszkami tkankowymi. Nieswoistość ta występuje w różnym stopniu przy poszczególnych surowicach. Wiąże się z tym konieczność równoległego przeprowadzania wszechstronnych kontroli układu precypitującego.

Okresy inkubacji w próbach biologicznych w I pasażu wynosiły 5—12 dni, w II — 5—9 dni. Próba immfl. w każdym przypadku potwierdzała swoistość padnięć myszy.

Ocena mózgu kota wskazywała również na obecność w tym materiale wirusa ustalonego. Próba neutralizacji z zawiesiną mózgu kota i surowicą p-w wścieklicznie dała IN = 4,5, co w pełni potwierdza swoistość poprzedniego wyniku. Miano wirusa (— log LD<sub>50</sub>) wyizolowanego od kota wynosiło 5,5. Równolegle określano miano wirusa CVS pasażowanego na myszach ≈ 5,5.

Próbki trzech serii szczepianki p-w wścieklicznie wzięte losowo z używanych w sezonie szczepiennym — 1969 wykazały miano (—log LD<sub>50</sub>) 1) 3,0 — w 11 tygodniu, 2) 2,5 i 3) 2,6

w 16 tygodniu po wyprodukowaniu preparatu. Ponieważ szczepionki obniżają stopniowo miana zawartego w nich wirusa zależnie od czasu przechowywania wartości te porównywano z uzyskanymi w szczepionce w różnych terminach po wyprodukowaniu (9). Nie wykazano istotnych różnic, które mogłyby świadczyć o wzroście mian wirusa szczepionkowego w bieżącym sezonie szczepiennym.

Wystąpienie wścieklizny poszczepiennej w wyniku masowych akcji szczepień z użyciem preparatów produkowanych z tkanki mózgowej ssaków jest ryzykiem związanym z typem szczepionki (8). Ilość przypadków choroby poszczepiennej o etiologii wirusowej zależy od właściwości wirusa szczepionkowego, stopnia oddziaływania na niego składników szczepionki, metod jej produkcji oraz osobniczej wrażliwości zwierząt otrzymujących preparat.

W okresie szczepiennym wskazana jest szczególna ostrożność w ocenie laboratoryjnej badanego materiału. Przedstawione dane wskazują, że diagnozę wścieklizny poszczepiennej można postawić opierając się na zespole danych obejmujących: szczepienie zwierzęcia, wynik badania w kierunku ciałek B-N i próbę immunofluorescencji z materiałem wyjściowym. Zastosowanie odczynu immunofluorescencji w zespole innych metod laboratoryjnych znacznie rozszerza możliwości szybkiego rozpoznawania „choroby poszczepiennej” o etiologii wirusowej występującej przy masowych szczepieniach psów p-w wścieklicznie. Ma to zasadnicze znaczenie dla szybkiej diagnostyki oraz dla dalszego postępowania jeżeli miała miejsce ekspozycja człowieka.

MARIA SOBOLEWSKA, TADEUSZ GAJDA  
Białystok

## Uwagi o wynikach leczenia telazjozy bydła

Telazjoza jest schorzeniem pasożytniczym oczu występującym u bydła, a zwłaszcza u cieląt i jałowizny. Masowe występowanie telazjozy notowane jest we wszystkich częściach świata z wyjątkiem Australii (1). Jeśli chodzi o Polskę, to z dostępnego nam piśmiennictwa dowiadujemy się o inwazji pasożyta obserwowanej w województwach centralnych kraju (2). Notowano też epizootie obejmujące kilkanaście wsi w powiecie puławskim i gdańskim (3). Telazjozę u bydła wywołają mogą 3 gatunki nicieni: *Thelazia rhodesi*, *Thelazia gulosa* oraz *Thelazia skrjabini*. Pośrednimi żywicielami nicieni jest kilka rodzajów much takich jak: *Musca larvipara*, *M. amica*, *M. convexifrons*. Na ogół choroba przebiega ostrzej u cieląt niż u bydła dorosłego. Autorzy radzieccy stosują przy tym schorzeniu 3-krotne przemywanie worka spojówkowego 2—3% roztworem kwasu bornego z kilkudniową przerwą,

- Piśmiennictwo
1. Kocowicz J., Ratomski A., Wiśniowski J.: *Medycyna Wet.* 14, 665, 1951.
  2. Lepine P.: *Laboratory Techniques in Rabies.* WHO, Genewa, rozdz. 4, s. 42, 1966.
  3. Nicolau St.: *Patogeneza i immunologia wirusnych infekcji.* Medicina, Moskwa, 1965.
  4. Remlinger P., Bailly J.: *Ann. Inst. Past.* 47, 608, 1931.
  5. Serokowa D., Krawczyński K., Brzosko W.: *Med. Dośw. Mikr.*, 2, 189, 1967.
  6. Serokowa D., Wojciechowski K.: *Epidemiol. Rev.* 3—4, 135, 1965.
  7. Stryzak A.: *Medycyna Wet.* 5, 5, 1949.
  8. Turner G. S.: *Brit. Med. Bull.* 2, 136, 1969.
  9. Wojciechowski K.: *Przeg. Epid.* 4, 539, 1968.
  10. Wojciechowski K., Samól S., Trippenbach B.: *Medycyna Wet.* 24, 718, 1968.

Adres autora: dr Krzysztof Wojciechowski, Warszawa, ul. Czerniakowska 201 m. 57.

Войцеховски К., Триппенбах Б. — **Лабораторная оценка случаев болезни вызванной вирусом вакцины против бешенству.**

Исследовали эффективность лабораторных методов диагностики бешенства обращая особое внимание на иммунофлуоресценцию (ИФ). Представили оценку случаев послевакциной болезни наблюдаемой у собак привитых вакциной по Умено-Дои в районе Варшавского воеводства (в 1969 г.). Авторы приходят к выводу что введение непосредственно ИФ метода в исследованиях первичного материала и мозгов вышей павших в биологической пробе значительно ускоряет и улучшает диагност.

Wojciechowski K., Trippenbach B. — **Laboratory evaluation of some cases of the disease after antirabic vaccination.**

The differential diagnosis of rabies after antirabic vaccination has a special importance in medicine. The therapy of the exposed persons depends on the results of the used tests. The usefulness of different laboratory methods in the diagnosis of the disease was examined. The authors carried out the analysis of postvaccinal rabies following a mass antirabic vaccination in dogs (Umeno-Doi's vaccine) in the Warszawa region in 1969. The application of fluorescent antibody test increased the efficiency and specificity of diagnostic procedure.

lub wodnym roztworem jodu (1:2000) (1). Skutecznym okazało się leczenie telazjozy bydła za pomocą methyridiny (4). Kostyra (1958) poleca podawanie do worka spojówkowego 3% wodny roztwór adipinianu piperazyny.

Niniejsze doniesienie omawia występowanie telazjozy bydła na terenie woj. białostockiego. Ma ono na celu ocenę skuteczności badanych leków po zastosowaniu terapii oraz wzięcie pod uwagę czynników sprzyjających występowaniu schorzenia.

Takim niewątpliwie sprzyjającym czynnikiem, było zorganizowanie na tych terenach, na których uprzednio telazjozy nie notowano dużego gospodarstwa do którego dowożono młodzież z różnych stron województwa i kraju. W skład tego gospodarstwa wchodzi: obora wydojowa z ilością 120 szt. krów, obora wolnowybiegowa z ilością 300 szt. krów, obora bezściolowa z ilością 300 szt. krów, cielętnik z ilością 250 stanowisk, izolotka, gdzie w zależności od możliwości zakupu przechodzi kwarantannę od 30—150 szt. cieląt.