

KRZYSZTOF WOJCIECHOWSKI, BARBARA TRIPPENBACH

## Źródła błędów w immunofluorescencyjnej diagnostyce wścieklizny ulicznej

Zakład Higieny Weterynaryjnej w Warszawie  
Kierownik: dr habil. S. SAMOL

Aktualny stan epizootyczny wścieklizny w kraju, a szczególnie znaczna liczba przypadków tej choroby u zwierząt wolno żyjących stwarza duże zagrożenie ludności. Corocznie znaczna liczba osób zmuszona jest do poddania się szczepieniom profilaktycznym ze względu na kontakt ze zwierzęciem chorym lub podejrzanym o zakażenie (15, 16).

Wprowadzenie metody immunofluorescencji (immfl.) do rutynowej laboratoryjnej diagnostyki wścieklizny w ZHW-Warszawa (1968) umożliwiło ocenę materiałów ze zwierząt podejrzanych o tę chorobę. Metoda przeciwciał fluorescencyjnych przyspieszyła stawianie rozpoznania, co jest szczególnie istotne jeżeli miała miejsce ekspozycja człowieka. Aspekty epidemiologiczny i epizootologiczny zadecydowały o zastosowaniu immunofluorescencji do diagnostyki w zespole metod: badania w kierunku ciałek Babes-Negriego (BN), próby biologicznej oraz w pewnych przypadkach: próby neutralizacji i próby mikroimmunodyfuzji w żelu agarowym.

Celem doniesienia jest ocena metody immfl. w aspekcie możliwości błędu w jej stosowaniu do rutynowych badań rozpoznawczych w kierunku wścieklizny ulicznej. Analizę oparto na wynikach uzyskanych w latach 1968—1969.

### Materiały i metody

Materiał do prób stanowiły mózgi zwierząt nadesłane do badania w kierunku wścieklizny. Badanie na ciałka BN — prowadzono metodami Sellers'a i Gerlach'a z preparatów mazano-odciskowych.

Immunofluorescencja — stosowano bezpośrednią metodę z użyciem konjugat p-w wścieklicznie „Bio-veta” (Ivanovice) w układach opisanych uprzednio (18). Używano zestawów do luminescencji HBO-50 (Mikroskop C. Zeiss) i MŁ-50 — produkcji ZSRR z lampą DRSZ 250. W podobny sposób przeprowadzano testy kontrolne oraz mianowanie konjugat. Preparaty odciskowe dla każdego materiału mózgowego wykonywano z kory mózgowej, rogu Ammona, rdzenia przedłużonego (po 2—3 preparatów). U kotów dodatkowo oceniano mózdzek. W wymienionych częściach mózgu na podstawie szeregu danych (7, 11, 12, 14) spodziewano się największej koncentracji antygeny wirusa. Próby biologiczne prowadzono na myszach Porton pochodzących z chowu własnego. Waga zwierząt 13—15 g. Sposób przeprowadzenia próby był zgodny ze wskazaniami WHO (9).

W celu dodatkowych identyfikacji wirusa wykonywano próbę neutralizacji z surowicą końską p-w wścieklicznie prod. Instytut Pasteura (Paryż) w rozcieńczeniu 1:10. Próby mikroimmunodyfuzji w żelu agarowym prowadzono wg Serokowej i Wojciechowskiego (14).

Metodą immunofluorescencji z równoległe prowadzonymi badaniami w kierunku ciałek BN i próbami

biologicznymi przebadano w latach 1968—1969 łącznie 389 materiałów od 18 gatunków zwierząt. Kompleksowa analiza prób miała dać orientację co do przydatności metody immfl. do szybkiej diagnostyki w przyjętych warunkach i jej obiektywności.

Wyniki badań podzielono na 7 grup (I—VII) i zestawiono w tab. 1 i 2. Nomenklatura grup jest oparta na publikacji własnej z r. 1968 (18). Grupy I i II wykazały całkowitą zgodność wyników. W grupie III w 8 przypadkach nie wykazano ciałek BN przy dodatnich, lub wątpliwych wynikach prób immfl. Wiąże się to z możliwością występowania nienegri-gennych szczepów wirusa ulicznego. Przypadek z grupy IV opisany w poprzednim doniesieniu a dotyczący mózgu lisa w którym początkowo wykazano nietypowe wtręty przypominające ciała B-N, zweryfikowano jako nienegri-geny. Przypadki z grup: V, VI, VII traktowano jako niezgodności diagnostyczne i analizowano w tab. 3 i ryc. 1. Przypadki „choroby poszczepiennej” opisano w oddzielnym opracowaniu (19). Próba neutralizacji służyła w pewnych przypadkach do wykazania swoistości próby immunofluorescencji w badanym materiale. W podobnym celu stosowano próbę mikroimmunodyfuzji w żelu agarowym. Duża nieswoistość ostatniego z odczytów związana z używaną surowicą nie pozwoliła na włączenie jego jako metody pomocniczej przy interpretacji wyników.

Ryc. 1. Przypadki niezgodności w okresie adaptacji metody immunofluorescencji do rutynowej diagnostyki wścieklizny



Niezgodności diagnostyczne występowały przede wszystkim w początkowym okresie adaptacji metody. Dotyczy to głównie grupy V wyników. Nie notowano ich w ostatnim okresie pracy. W przypadku tej grupy wiązać się one mogą z obecnością rozproszanego materiału antygenowego (najczęściej u psów szczepionych p-w wścieklicznie), z nierównomiernym rozmieszczeniem antygeny w mózgu, stanem nadesłanego materiału mózgowego. Pojęcie „materiał względnie świeży” używane w tab. 3 jest mało precyzyjne, gdyż obejmuje różne stadia początkowej autolizy i rozkładu tkanki nerwowej. Materiał z reguły pochodził ze zwłok zwierzęcych dostarczonych do badań w kilka dni po zejściu śmiertelnym oraz przechowy-

wanym w różnych, często trudnych do ustalenia warunkach.

Tab. 1. Sumaryczne wyniki badań materiałów zwierzęcych w kierunku wścieklizny (lata 1968—1969)

Grupa wyników	Immuno-fluorescencja (met. bezpośrodkowa konj. Bioveta)	Ciała BN w rogu Ammona (met. Sellera i Gerlacha)	Próba biologiczna (wg WHO)	Ogólna liczba przypadków
I	—	—	—	276
II	+	+	+	73
III	+ (±)	—	+	8
V	—	—	+	11
VI	+	—	—	3 (16)
VII	—	+	—	2

+ wynik dodatni  
— wynik ujemny  
± wynik wątpliwy ( )

Stan materiału rzutu mający na morfologię i czytelność preparatów mikroskopowych mógł wpłynąć na wyniki grupy V. Potwierdzają to dane Wachendörfera (17). Pozornie ujemne wyniki próby immfl. mogą być spowodowane nierównomiernym rozproszeniem wirusa w mózgu. Możliwość występowania stref awirulentnych w mózgu zwierząt zakażonych wirusem wścieklizny opisali Remlinger i Bailly (11). Granica wykrywalności wirusa w metodzie immfl. została oceniona doświadczalnie przy zakażeniu wirusem ulicznym na  $10^{1,3}$ — $10^{1,4}$  LD<sub>50</sub>/0,03 ml. W mózgu psa zakażonego w sposób naturalny wynosiła  $10^{2,4}$  (5). Dane Liebke i Schneidera określają progową ilość wykrywalnego antygeny na 10—100 LD<sub>50</sub>/0,03 ml. (10), Serokowej i wsp. na > 100 LD<sub>50</sub> (13). Pozornie ujemne wyniki mogą być spowodowane ograniczoną zdolnością rozdzielczą mikroskopu optycznego wynoszącą ok. 200 mμ. Występowanie ujemnych wyników próby immfl. przy równoczesnym stosowaniu próby biologicznej na myszkach jako diagnozy potwierdzającej Wachendörfer (17) ocenia na ≈ 1,5% — sumując dane 11 autorów zajmujących się diagnostyką wścieklizny (12 tysięcy badań). Kołomakin i wsp. (8) w prowadzonej kompleksowo na terenie Kazachstanu rutynowej diagnostyce uzyskali odmienne rezultaty. Przy 378 przypadkach u 32% stwierdzono wściekliznę histologicznie (C-BN), immfl. w 72,8%, przy czym próba

biologiczna stanowiła 100%. Dane te można wiązać ze specyfiką i słabą negrigennością szczepów wścieklizny występujących w tym rejonie, gdzie głównym źródłem zakażenia są lisy i lisy korsaki.

Grupa VI — jest związana ze zjawiskiem nieswoistej fluorescencji. Dane na jej temat zawarte są w pracach Jentzsch'a i wsp. (4, 6). Nieswoista fluorescencja związana z konjugatą może być spowodowana adsorbacją niektórych jej składników przez materiał biologiczny. Daje ona podobne zabarwienie do fluorescencji swoistej. Zmniejszenie jej osiąga się adsorbacją proszkami tkankowymi. Nieswoistość wynika z wiązania się konjugat z białkami tkankowymi, może być również rezultatem wiązania się znakowanych przeciwciał surowicy z antygenami preparatu. Fluoryzujące bakterie np. w przypadku mikrokoków mogą wykazywać podobieństwo do małych skupisk wirusa.

Pierwsza z przyczyn możliwa jest do usunięcia przez adsorbację homologicznymi proszkami tkankowymi, druga wymagałaby przygotowania surowicy służącej do produkcji konjugatu na materiałach „germs free”. Leukocyty, komórki plazmatyczne, ziarnistości eozynofili mogą powodować silną nieswoistą fluorescencję o natężeniu równym swoistej. Kryterium rozstrzygającym byłaby morfologia świeców oraz zastosowanie odpowiednich kontroli. Dotyczy to głównie antygenów i przeciwciał bakteryjnych. Tzw. „ciałka kocie” nie dają reakcji z konjugatą wściekliznową. Nieswoiste zjawiska fluorescencyjne związane z autofluorescencją spotyka się w leukocytach, komórkach plazmatycznych, eozynofiliach (ziarnistości), włóknach nerwowych rdzenia przedłużonego, komórkach zwojowych mózgu różnych gatunków zwierząt (jądra kom.). Często występują żółto-pomarańczowe cząstki inkrustujące preparat będące prawdopodobnie glikolipoidem względnie substancją podobną do lipofuscyny. Za lipofuscyną przemawia fakt większej częstotliwości występowania barwnika u zwierząt starszych. Drobne straty izotiocyanianu fluoresceiny w konjugacie mogą przy pewnych układach sugerować fluoresceinę rozsianą. Przy zatapianiu preparatów w glicerynie i pokrywaniu szkiełkiem nakrywkowym mogą występować małe pecherzyki powietrza dające świecenia regularnego, kulistego formatu. Nie wykazano korelacji między stanem materiału a stopniem autofluorescencji. Istnieje teoretyczna możliwość występowania w preparatach antygeny inaktywowanego w ilościach podprogowych, których nie wykaże próba biologiczna. Mogłoby to mieć miejsce u psów szczepionych. Przytoczone w tabeli przypadki świadczą o obecności w materiale kulistych i owalnych świeców wielkości i formatu ciałek B-N, ale w innym odcieniu (jasno zielonkawym). Ponieważ nie wykazano histologicznie rzeczy-

Tab. 2. Wyniki oceny laboratoryjnej mózgow różnych gatunków zwierząt w kierunku wścieklizny (woj. warszawskie lata 1968—1969)

Wyniki badań laboratoryjnych (grupy)	Psy	Koty	Konie	Krowy	Świnie	Owce	Lisy	Borsuki	Jenoty	Łosie	Jelenie	Sarny	Dziki	Zające	Wiewiórki	Wydry	Chomiki	Szczury
I	156	54	2	2	1	—	17	2	—	5	2	14	1	1	11	1	4	3
II	5	4	—	1	—	1	53	6	1	1	—	—	—	—	—	—	—	—
III	3	1	—	—	—	—	4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
V	4	2	—	—	—	—	3	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
VI	3(9)	(1)	—	—	—	—	(2)	—	—	—	—	2	—	(1)	(1)	—	—	—
VII	—	—	—	—	—	—	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Ogólna liczba przypadków	180	62	2	3	1	1	81	10	1	6	2	16	1	2	12	1	4	3

Dane w nawiasie wyniki ±

wistych ciałek w preparatach barwionych metodami Sellers'a i Gerlach'a, wydaje się, że świecenia zostały spowodowane przez materiał nieswoisty (prawdopodobnie — elementy morfotyczne krwi). O możliwości występowania nieswoistej, punktowej fluorescencji świadczy przypadek z rejonu rdzenia przedłużonego 217/69 oraz dane Serokowej i wsp. (13). Kryterium rozstrzygającym we wszystkich przypadkach jest morfologia świeceń i zastosowanie odpowiednich kontroli.

Grupa VII. Opisano nietypowe ciała wtrętowe w barwionych konwencjonalnie preparatach z rogu Ammona przypominające C-BN, ujemne w próbie immunofluorescencji. Przypadki takie nie przedstawiają niebezpieczeństwa pomyłki ponieważ ciała B-N z reguły bardzo swoiście wybarwiają się konjugata.

Częstą przyczyną nieprawidłowej diagnostyki immunofluorescencyjnej może być złe przygotowanie i ustawienie aparatury oraz wady palnika emitującego promienie UV. Instrukcje na ten temat zawarte są w dokumentacji dołączonej przy zestawach do luminescencji.

Do jednej z najważniejszych czynności wykonywanych przed każdym uruchomieniem układu należy sprawdzenie tzw. „centrowania” lampy oraz stosowanie dobrych palników. Palniki w zestawach do fluorescencji mają ograniczony okres eksploatacji. Zużywanie się palnika powoduje jego zaciemnienie i słabszą emisję.

Termiczny sposób utrwalania preparatów przewyższa w rutynowym stosowaniu utrwalanie acetonem. Preparaty w ten sposób przygotowywane są niezakaźne, a tym samym bezpieczne w obróbce dzięki inaktywacji wirusa na szkieleku (3). Możliwe jest stosowanie tego typu utrwalania przy preparatach z materiałów będących w stanie rozkładu gnilnego. Nie stwierdzono ujemnego wpływu utrwalania termicznego na wykazywanie w materiale ciałek B-N i antygeny wirusa.

Tab. 3. Analiza wyników z grupy V, VI i VII

Grupa wyników	Gatunek	Numer badania /rok	Stan materiału	Badanie immunofluorescencyjne			Próba biologiczna (dni padnięć myszy na wściekliznę)	Uwagi
				kora	róg Ammona	rdzeń przedłużony		
V	Psy	48/68	względnie świeży	—	—	—	7, 9, 9, 10	padł z objawami niedowładów i porażenia
		50/68	„	—	—	—	6, 6, 7, 7, 7	brak danych
		69/68	„	—	—	—	6, 6, 6, 6, 6, 6	padł 14 dni po szczepieniu przeciw wściekliznie
		111/68	„	—	±	±	14	brak danych
	Koty	49/68	„	—	—	—	9, 9	tzw. ciała kocie
		76/69	rozkład gnilny	—	...	...	25	brak danych
	Lisy	57/68	względnie świeży	—	—	—	14, 17, 17, 18, 27	brak danych
		58/68	„	—	—	—	6, 7, 7, 7	brak danych
		70/68	„	—	—	—	8, 8, 9, 9	brak danych
	Borsuki	59/68	„	—	—	—	6, 7, 7, 7	brak danych
297/68		„	—	—	—	14	brak danych	
VI	Psy	171/69	„	—	±	±	ujemna	
		208/69	„	+	±	±	„	ciałka kuliste i owalne wielkości ciałek BN w w odcieniu jasno-zielonkawym
		217/69	„	—	—	±	„	kuliste świecenia w prep. z rdzenia przedł.
VII	Lisy	42/68	„	—	—	—	„	nietyp. wtręty przyp. ciała BN
		43/68	„	—	—	—	„	„

... nie badano

Zmniejszenie się liczby wyników z grup V, VI, VII, czyli niezgodności diagnostycznych występowało w miarę upływu czasu w okresie adaptacji metody (ryc. 1). Wg Dean'a (1) typ wyników opisany w grupie V występował często w laboratoriach amerykańskich wprowadzających technikę znakowanych przeciwciał do diagnostyki wścieklizny. Zadawalającą korelację między wynikami próby biol. a immfl. osiągnano tam w okresie  $\approx 3$  lat stosowania ostatniej z metod. Dopiero po tym terminie możliwe było zupełne zrezygnowanie z próby biologicznej i całkowite oparcie diagnostyki rabiologicznej na immunofluorescencji.

### Wnioski

1. Prawidłowa ocena wyników próby immunofluorescencji (immfl.) w rutynowej diagnostyce wścieklizny ulicznej ma zasadnicze znaczenie dla dalszego postępowania, szczególnie w przypadkach kiedy miała miejsce ekspozycja człowieka.

2. Swoistość wyników w tej próbie zależy od: obecności swoistego antygenu w badanym materiale, świeżości materiału, jakości użytej konjugaty, sprzętu luminescencyjnego, właściwej techniki wykonania odczynu, zastosowania odpowiednich kontroli, jak i wprawy osób oceniających preparaty.

3. W okresie adaptacji metody immfl. do rutynowej diagnostyki niezbędne jest równoległe przeprowadzanie prób biologicznych.

4. Korelację między wynikami próby biologicznej i bezpośrednią metodą immfl. osiągnięto po dwóch latach przeprowadzania prób.

5. Celowym wydaje się znowelizowanie obowiązującej instrukcji badania materiałów podejrzanym o wściekliznę (2) i wprowadzenie do niej danych na temat możliwości diagnostyki metodą immunofluorescencji.

6. Każda pracownia wykonująca rutynowe badania immfl. po wstępnym okresie adaptacji metody powinna przeprowadzić szczegółową analizę uzyskanych wyników i źródeł błędów przed zupełnym wyeliminowaniem próby biologicznej i całkowitym zastąpieniem jej metodą immunofluorescencji.

### Piśmiennictwo

1. Dean D. J.: The fluorescent antibody test w „Laboratory techniques in rabies”, WHO—Genewa, 59, 1969.
2. Instrukcja Tymczasowa n. 13, Min. Rol. Dep. Weterynarii (z dn. 3.03.1964) „W sprawie zasad przeprowadzania laboratoryjnych badań materiału na wściekliznę”.
3. Jentzsch K. D.: Mh. Vet.-Med., 13, 550, 1965.
4. Jentzsch K. D., Pitzschke H.: Mh. Vet.-Med. 1, 17, 1965.
5. Jentzsch K. D.: Zentbl. Bakt. Parasit Kde I, 202, 307 1967.
6. Jentzsch K. D., Mickwitz C. V.: Mh. Vet.-Med. 5, 188, 1966.
7. Koch J.: Zentbl. Bakt. Parasit Kde I 113, 276, 1929.
8. Kotomakln G. A., Barinova T. D., Smirnova M. M., Timonina M. S.: Vop. Virus. 4, 470, 1968.
9. Koprowski H.: Mouse inoculation test, w „Laboratory techniques in rabies”, WHO Genewa 69, 1966.

10. Liebke H., Schneider L. G.: Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 79, 251, 1966.
  11. Remlinger P., Batilly: Annl. Inst. Pasteur Paryż 47, 608, 1931.
  12. Schaaf J., Schaaf E.: Dt. tierärztl. Wschr. 13, 315, 1968.
  13. Serokowa D., Krawczyński K., Brzosko W.: Med. dośw. 2, 189, 1967.
  14. Serokowa D., Wojciechowski K.: Epidem. Rev. 3—4, 135, 1965.
  15. Serokowa D.: Prz. epid. 2, 247, 1968.
  16. Serokowa D.: Prz. epid. 1, 31, 1970.
  17. Wachendörfer G.: Wien. tierärztl. Mschr. 7, 54, 451, 1967.
  18. Wojciechowski K., Samól S., Trippenbach B.: Medycyna Wet. 24, 718, 1968.
  19. Wojciechowski K., Trippenbach B.: Medycyna Wet. 26, 170, 1970.
- Adres autora: dr Krzysztof Wojciechowski, Warszawa, ul. Lechicka 21, ZHW.

### Войцеховски К., Триппенбах Б. — Источники ошибок в иммунофлуоресцентной диагностике бешенства (virus de rue).

Правильная оценка реакции иммунофлуоресценции (ИФ) в диагностике бешенства, особенно в случаях экспозиции человека, имеет основное значение. Авторы проанализировали возможности ошибок при ИФ на основании результатов полученных в рутинной диагностике в годах 1968—1969. Исследовали 389 мозгов 18 видов животных подозреваемых о заражение уличным вирусом бешенства. Применяли исследование на тельца Бабеш-Негри, биологическую пробу и непосредственное исследование методом ИФ в отпечатках фиксированных теплом. Для проверки антигенной специфичности материалов добавочно провели пробу нейтрализации. Авторы подчеркивают что во втором году применения реакции ИФ получали полное соответствие результатов реакции ИФ результатами биологической пробы.

### Wojciechowski K., Trippenbach B. — The sources of the errors at the immunofluorescence (FAT) diagnosis of street rabies.

The interpretation of the findings in case of rabies obtained on the basis of immunofluorescence test (FAT) is of considerable importance, especially when man is taken into account. The authors analysed the sources of different errors made in the routine FAT tests carried out in 1968—1969. Over 389 brains from 18 species were tested by means of various methods: Babes-Negri bodies, biological test in mice, direct FAT, serum antibody test. Two year studies revealed the perfect correlation between FAT and biological test in mice.

### CARSON C. A., ADAMS L. G., TODOROVIC R. A.: Porównanie właściwości antygenowych i serologicznych dwóch szczepów zjadliwych i jednego atenuowanego szczepu *Anaplasma marginale*. (An antigenic and serologic comparison of two virulent strains and an attenuated strain of *Anaplasma marginale*). Am. J. vet. Res., 31, 1071—1078, 1970 (6).

W oparciu o odczyn precypitacji dyfuzyjnej w żelu agarowym i odczyn immunoelektroforezy porównano antygeny rozpuszczalne trzech szczepów *Anaplasma marginale* (2 szczepy zjadliwe, jeden szczep atenuowany). Białka surowicy otrzymane na cielętach uodpornionych *A. marginale* po rozdziale elektroforetycznym badano w stosunku do surowicy odpornościowej dla surowicy cieląt otrzymanej na królikach. Nie stwierdzono występowania różnic pomiędzy antygenami rozpuszczalnymi 3 badanych szczepów *A. marginale*. W surowicy cieląt uodpornionych pojawiał się w odczynie immunoelektroforezy łuk beta globulin nie występujący w surowicy cieląt zdrowych, zaś łuk odpowiadający gamma globulinie był znacznie wydłużony.

Z. G.