

WANDA BORZEMSKA, KRZYSZTOF WOJCIECHOWSKI

Zastosowanie metody immunofluorescencji (FA) do szybkiej diagnostyki choroby Newcastle

Instytut Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych
Wydziału Weterynarii SGGW w Warszawie
Dyrektor: prof. dr A. STRYSZAK

Zakład Higieny Weterynaryjnej w Warszawie
Kierownik: doc. dr S. SAMÓL

Metody immunofluorescencyjne wprowadzone przez Coons'a i wsp. (3) znalazły szerokie zastosowanie w pracach nad różnymi modelami wirusów zwierzęcych. Diagnostyka pomoru rzekomego ptaków w kraju, na podstawie obrazu anatomo-patologicznego, natrafia na coraz większe trudności. Wiąże się to z powszechnym stosowaniem szczepień ochronnych, które znacznie zniekształcają obraz przyżyciowy i pośmiertny choroby. W każdym podejrzanym przypadku rozpoznanie pomoru rzekomego musi się opierać o laboratoria diagnostyczne. Podstawowym testem diagnostycznym jest izolacja wirusa na zarodkach kurzych. Wprowadzenie do badań wirusa ND metody przeciwciał fluorescencyjnych pozwoliło na znaczne skrócenie czasu badania co wydaje się mieć duże znaczenie praktyczne.

Maestrone i Coffin (7, 8) zastosowali metodę FA do rozpoznawania antygeny wirusa ND w nabłonku górnych dróg oddechowych kurcząt. Corstvet i Sadler (4), Braune i Gentry (2), Kono i wsp. (11), Beard i Easterday (1), Rossi i Caporale (16) stosowali metodę immunofluorescencji do interpretacji różnych aspektów patogenyzy i immunogenyzy badając narządy wewnętrzne. Ponadto badania metodą FA przy pomocy rzekomych ptaków obejmują wykrywanie antygeny wirusa w narządach embrionalnych (9, 17, 23) i szeregu kultur tkankowych (5, 6, 10, 12, 13, 15, 17, 18, 19, 20, 22).

Celem pracy było przedstawienie prób ustalenia kryteriów diagnostycznych dla NDV przy użyciu metody bezpośredniej immunofluorescencji w badaniach pośmiertnych ptaków zakażonych krajowymi szczepami z zastosowaniem homologicznych surowic znakowanych. Pracę traktuje się jako doniesienie wstępne o charakterze metodycznym.

Materiał i metody

1. Zwierzęta doświadczalne: a) kury rasy Sussex w wieku 6 miesięcy, nieuodparniane, pochodzące od matek nieszczepionych, w pełni wrażliwe na wirus rzekomego pomoru ptaków. b) zarodki kurze 10-cio dniowe przeznaczone do kontroli i izolacji wirusa.

2. Wirusy: standardowy szczep wirusa rzekomego pomoru ptaków (NDV) Radom o mianie HA 640, ID₅₀ 10^{-6,8}.

3. Surowice: a) surowice odpornościowe p-w NDV: I—IV. b) surowice normalne od kur nieuodpornionych, c) surowice znakowane p-w NDV (koniugaty), d) surowice znakowane kontrolne: heterologiczne surowice znakowane FITC — p-w wściekliznie i p-w leptospirozie produkcji Bioveta CSRS.

4. Narządy: a) narządy kur zakażonych doświadczalnie szczepem Radom wirusa ND, b) narządy kur padłych, u których rutynowym badaniem diagnostycz-

nym potwierdzono pomór rzekomy, c) analogiczne narządy ptaków zdrowych nieuodpornionych do badań kontrolnych.

Przygotowanie surowic odpornościowych p-w NDV: Surowice otrzymano przez hiperimmunizację kur wrażliwych szczepem Radom ND. Schemat uodpornienia: sześciokrotnie zakażono domięśniowo grupę ptaków (16 sztuk) zawieszoną wirusa w PBS. Ptaki wykrwawiono po 21 dniach. Miana HI surowic wynosiły 320—2560. Surowice od poszczególnych ptaków podzielono na cztery grupy zależnie od mian: I — 320, II — 640, III — 1280, IV — 2560. Przygotowanie surowic znakowanych przeciw NDV: Do sporządzenia surowic znakowanych użyto zlewek surowic z grup II i III — koniugat A, III i IV — koniugat B i IV — koniugat C. Koniugaty wykonano wg Rindenkechta (14)*.

Zawartość białka w surowicach znakowanych A i B \approx 0,95%, stosunek F/P=1,6; dla surowicy znakowanej C wartości te wynosiły 1,68% i 0,45. Uzyskane surowice adsorbowano proszkiem acetonowym z narządów zdrowych kur: wątroby, śledziony, płuc, nerek i mózgu (100 mg proszku na 1 ml surowicy znakowanej). Badania immunofluorescencyjne: pobrane od ptaków narządy mięsne wypłukiwano w PBS, żołądek i jelita w miejscach przeznaczonych do badań mechanicznie oczyszczano z treści. Ze świeżych przekrojów narządów wykonywano preparaty odciskowe na szkiełkach podstawowych nie posiadających własnej fluorescencji (po 3 preparaty z różnych miejsc badanego narządu). Ustalając metodykę stosowano utrwalanie w schłodzonym acetonie (-30°C), metanolu absolutnym oraz utrwalanie termiczne w płomieniu palnika. Preparaty po pokryciu znakowaną surowicą w optymalnym rozcieńczeniu inkubowano przez 45 min. w temp. 20°C . Stosowano płukania: (po 10 min.) bufor fosforanowy o pH 7,6, PBS i woda destylowana. Na wysuszone w temperaturze pokojowej preparaty nakraplano gliceryną buforowaną o pH 7,8 i pokrywano szkiełkiem nakrywkowym. Brzegi szkiełek zatapiało parafiną.

Wymieniony schemat przygotowania preparatów był uprzednio stosowany w badaniach rabiologicznych (21). Surowice znakowane mianowano wobec preparatów dodatnich zawierających antygen NDV. Stosowano rozcieńczenia od 1:2 do 1:64.

Badania kontrolne przeprowadzano w następujących układach:

1) materiał dodatni + znakowana surowica kontrolna,

2) materiał ujemny (preparaty z kur zdrowych) + surowica znakowana p-w NDV (adekwatna do stosowanej w próbie właściwej),

3) odczyn hamowania immunofluorescencji z materiałem dodatnim i koniugatem przeciw NDV z zastosowaniem surowicy dodatniej o mianie HI 2560,

4) preparaty odciskowe z narządów dodatnich i ujemnych barwione hematoksyliną i eozyną.

Kontrolę do odczynu prowadzono z surowicą od kur nieuodpornionych. Ocena preparatów była przeprowadzana w mikroskopie MA-2-67, przy oświetleniu górnym. Filtry: kuweta wodna, filtry CBC 7-2, ϕ C 1-4, powiększenie 40 \times 12. Próby serologiczne SN i HI alfa wykonywano wg ogólnie przyjętej metody zakażeń materiału do jamy owodniowo-

*) Autorzy pragną serdecznie podziękować doc. dr habil. S. Gryśowi z ZHW w Warszawie za przygotowanie surowicy znakowanej C.

-omoczniowej zarodków kurzych. Ocena surowic znakowanych: Surowice znakowane A, B i C oceniano na około 150 preparatach z wątroby i śledziony ptaków, u których sekcynie i metodą izolacji na embrionach kurzych stwierdzono pomór rzekomy. Równolegle prowadzono badania kontrolne.

Badania doświadczalne. Wrażliwe kury zakażono domięśniowo NDV szczepem Radom dawką 1000 LD₅₀ na sztukę.

Ptaki wykrwawiono 5—8 dnia po zakażeniu w okresie rozpoczynających się pierwszych objawów klinicznych. Do oceny immunofluorescencyjnej użyto preparatów odciskowych z mózgu, rdzenia kręgowego, tchawicy, płuc, wątroby, śledziony, żołądka gruczołowego, nerek i jelita ślepego. Preparaty wykonano bezpośrednio po pobraniu narządów z ptaków zakażonych.

Analogiczne badania kontrolne prowadzono na materiale z ptaków nieuodpornionych.

Wyniki i omówienie

Najlepsze wyniki uzyskano przy stosowaniu utrwalania preparatów odciskowych w chłodzonym acetonie i termicznie. Do badań terenowych i doświadczalnych stosowano optymalne rozcieńczenia surowic znakowanych (tab. 1).

W badaniu wątroby i śledziony kur padłych na pomór rzekomy, metodą FA najlepsze wyniki uzyskano z surowicą znakowaną C (tab. 2). Wymienionej surowicy używano również do badań doświadczalnych. Wyniki zestawiono w tab. 3. Kryteria oceny preparatów dodatnich w metodzie FA razem z oceną poszczególnych narządów umieszczono w tab. 4. W badaniach kontrolnych z materiałem ujemnym nie obserwowano charakterystycznych świeceń antygenu wirusa ND. W odczynie hamowania immunofluorescencji z surowicą p-w NDV obserwowano jedynie częściowe stłumienie świeceń. Wydaje się, że obserwowana w preparatach z narządów kur zakażonych szczepem Radom ND fluorescencja elementów morfotycznych krwi może być interpretowana jako swoista jedynie w odniesieniu do części elementów układu białokrwinkowego. Zdaniem Maestrone i Coffin (8) świecenia elementów krwinkowych występują w części patogenezy ND.

Tab. 2 Ocena porównawcza surowic znakowanych na dodatnim materiale terenowym (wyniki sumaryczne)

Surowica znakowana	Narządy ND		Narządy kontrolne	
	Wątroba	Śledziona	Wątroba	Śledziona
A	+	+	0	0
B	++	+	0	0
C	+++	+++	0	0

Prowadzone badania wydają się wskazywać na możliwość zastosowania prób immunofluorescencji jako jednej z metod oceny zakażenia wirusem ND. Analogicznie do innych jednostek wirusowych rozpoznanie antygeny ND w metodzie FA wymaga stosowania całego zestawu testów kontrolnych. Istotnym momentem jest wybór narządów, które mogą być modelem w immunofluorescencyjnych badaniach diagnostycznych.

Tab. 3. Występowanie wirusa lub antygeny NDV u kur zakażonych wirusem pomoru rzekomego ptaków w okresie rozpoczynających się objawów klinicznych (surowica znakowana C)

Narząd	Materiał zakażony		Materiał kontrolny	
	Izolacja	FA	Izolacja	FA
Mózg	+	+	—	—S
Rdzeń kręgowy	+	+++	—	—S
Tchawica	+	+	—	—S
Płuca	+	+	—	—S
Wątroba	+	+	—	—S
Śledziona	+	++	—	—S
Nerka	+	+	—	—
Żołądek gruczołowy	+	+	—	—
Jelito ślepe	+	+	—	—

S — wyniki swoiste

Tab. 1. Mianowanie surowic znakowanych w preparatach ze śledziony kur padłych na pomór rzekomy ptaków (materiał terenowy) i kontrolnych

Surowica znakowana	Materiał	Rozcieńczenia surowic						
		N	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
A	ND	+++	+++	+++	++	+-	0	0
	Kontrola	+-	+-	+-	0	0	0	0
B	ND	++	++	0	0	0	0	0
	Kontrola	0	0	0	0	0	0	0
C	ND	+++	++	++	+	+-	0	0
	Kontrola	+-	+-	0	0	0	0	0

(Rozcieńczenie optymalne w ramkach).

Świecenia te nakładają się na naturalną autofluorescencję tych komórek, widoczną w preparatach kontrolnych.

Uzyskane wyniki wskazują na możliwość zastosowania do badań rozpoznawczych preparatów z następujących narządów: mózgu rdze-

Tab. 4. Wyniki badań immunofluorescencyjnych narządów wewnętrznych kur

Narząd	Miejsca, z których przygotowano preparaty odciskowe	Kryteria oceny preparatów dodatnich	Uwagi
Mózg	Płaszczyzna przekroju poprzecznego na wysokości zgrubień grzbietowych półkul	Fluorescencja cytoplazmy komórek zwojowych i poza komórkowo zlokalizowane ziarna antygeny	Fl. elementów morfotycznych krwi i złogów lipofuscyny
Rdzeń kręgowy	Przekrój poprzeczny części początkowych	Fluorescencja cytoplazmy komórek zwojowych. Świecenia typu punktowego na przekrojach włókien rdz.	—
Tchawica	Powierzchnia błony śluzowej ze środkowego odcinka narządu	Fluorescencja cytoplazmy komórek nabłonkowych	Fl. elementów naciekowych (układ białokrwinkowy)
Płuca	Przekrój poprzeczny płuca prawego i lewego	Fluorescencja typu punktowego, rozlanego w ścianach pęcherzyków płucnych	Fl. elementów morfotycznych krwi
Wątroba	Przekroje poprzeczne płatów	Fluorescencja cytoplazmy komórek mięszu wątrobowego	"
Śledziona	Przekrój poprzeczny	Fluorescencja rozlana w obrębie komórek siateczki i szereg świeceń punktowych	Silna fl. elementów ukl. białokrwinkowego mięszu
Nerka	Przekrój poprzeczny części środkowej	Fluorescencja komórek nabłonka nerkowego	Fl. elementów morfotycznych krwi
Żołądek gruczołowy	Powierzchnia błony śluzowej żołądka gruczołowego	Fluorescencja cytoplazmy komórek gruczołowych	Fl. resztek pokarmu
Jelito ślepe	Powierzchnia błony śluzowej środkowej części narządu	Fluorescencja komórek nabłonka jelitowego	Fl. elementów bakteryjnych i niezidentyfikowanych elementów komórkowych

nia kręgowego, tchawicy, żołądka gruczołowego i jelita ślepego. Rezultaty badań na materiale terenowym wskazywały również na dobre wyniki uzyskane z preparatami ze śledziony i wątroby. Zdania różnych autorów na ten temat są podzielone. Wynika to z prowadzenia badań nad NDV na wyrwykowym i często nie kontrolowanym materiale z użyciem różnych surowic znakowanych. Różnorodność uzyskanych wyników wiązać można z modyfikacjami metod badania patogenyzy, zależnie od użytych szczepów i dróg podania wirusa.

Maestrone i Coffin (7, 8) wykazywali antygen już 3 godz. po infekcji w nabłonku górnych dróg oddechowych. Corstvet i Sadler (4) wykazują antygen również w przewodzie pokarmowym. Proponują żołądek gruczołowy i tchawicę jako najdogodniejsze narządy do badań diagnostycznych metodą immunofluorescencji. Braune i Gentry (2) starają się ujednoczyć metodykę FA do badań nad wykrywaniem chorób wirusowych układu oddechowego ptaków (ND, IB, ILT) i proponują wymazy z tchawicy jako podstawowy materiał do prób. Przytoczone piśmiennictwo związane z badaniem tkanek ptaków w patogenyzy ND i pośmiertnie metodą FA, zawiera stosunkowo ma-

ło danych uzyskanych z różnych szczepów wirusowych i z zastosowaniem różnych surowic znakowanych. W masowym stosowaniu do profilaktyki szczepionek produkowanych ze szczepów żywych, istnieje możliwość wykazania antygeny szczepionkowego w narządach ptaków. Rossi i Caporale (6) badając immunofluorescencyjnie narządy ptaków uodparnianych żywymi szczepionkami handlowymi stosowanymi we Włoszech stwierdzili antygen NDV w śledzionie i wątrobie, mózgu, mięśniu sercowym i płucach do 7 dnia a w steku do 10 dnia po szczepieniu. W związku z tym proponują 10 dniowy próg ostrożności dla metody FA, jeżeli ptaki były uodparniane szczepami żywymi.

Wydaje się, że zalecenie testu FA do praktyki diagnostycznej powinno być poparte ustaleniem zależności między wirulentnością materiałów badanych a fluorescencją, sprawdzeniem heterologicznych i homologicznych surowic znakowanych oraz opracowaniem progu ostrożności dla krajowych szczepów szczepionkowych.

Piśmiennictwo

1. Beard C., Easterday B.: *J. infect. Dis.* 117, 66, 1967.
2. Braune M., Gentry R.: *Avian Dis.* 4, 535, 1965.
3. Coons A., Creech H., Jones R.: *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 47, 200, 1941.

4. Corstvet R., Sadler W.: *Poult. Sci.* 43, 1280, 1964.
 5. Jerushalmiy Z., Kohn A., Vriec A.: *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 114, 687, 1963.
 6. Johnson C., Scott A.: *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 115, 281, 1964.
 7. Maestroni G., Coffin D.: *Archo vet. ital.* 12, 193, 1961.
 8. Maestroni G., Coffin D.: *Am. J. vet. Res.* 25, 217, 1964.
 9. Karasek E., Müller H.: *Arch. exp. Vet. Med.* 21, 3, 1967.
 10. Karasek E., Müller H.: *Arch. exp. Vet. Med.* 23, 195, 1969.
 11. Kono R., Akao Y., Sasagawa A., Nomura Y.: *Jap. J. exp. Med.* 22, 235, 1969.
 12. Prince A., Ginsberg H.: *J. exp. Med.* 105, 177, 1957.
 13. Reda J., Rott R., Schafer W.: *Virology* 22, 422, 1964.
 14. Rindenknecht H.: *Nature* 193, 167, 1962.
 15. Rodrigueus J., Henle W.: *J. exp. Med.* 119, 895, 1964.
 16. Rossi G., Caporale V.: *Atti Soc. ital. Sci. vet.* 22, 891, 1968.
 17. Szántó J., Albrecht P., Vilček J.: *Acta virol., Praga* 7, 297, 1963.
 18. Szántó J.: *Acta virol., Praga* 9, 47, 1965.
 19. Tanaka N., Yamaguchi H., Kobayashi M.: *Jap. J. Microbiol.* 3, 345, 1959.
 20. Wheelock E., Tamm J.: *J. exp. Med.* 113, 301, 1961.
 21. Wojciechowski K., Samól S., Trippenbach B.: *Medycyna wet.* 24, 718, 1968.
 22. Wertz R., Adams W.: *Jale J. Biol. Med.* 36, 234, 1963.
 23. Williamson A., Blatner R.: *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 118, 576, 1965.
- Adres autora: doc. dr Wanda Borzemska, Warszawa, ul. Grochowska 272.

Boжемска В., Войцеховски К. — **Применение метода иммунофлуоресценции для ускоренной диагностики азиатской чумы птиц.**

Целью работы было определение критериев для иммунофлуоресцентного (ИФ) диагноза азиатской чумы птиц (АЧП). Исследования вели применения отпечатки органов, непосредственный метод ИФ и гомологические меченные флуорохромами сыворотки. В экспериментальной части исследовали инфекционный титр и результаты ИФ разных органов кур зараженных интрамускулярно вологе-

нических штаммом АЧП в 5 сутки после инфекции. Самые лучшие результаты получили исследуя отпечатки мозга, спинного мозга, трахен, легких, железистой части желудка и слепой кишки. В исследованиях пат-материала в котором АЧП была установлена (на основании результатов вскрытия и выделения вируса путем заражения эмбрионов кур) самые лучшие результаты получили применяя препараты из селезенки и печени. Успешные результаты метода ИФ в рутинной диагностике АЧП зависят от установления условий специфичности теста для каждой отдельной серии меченной сыворотки.

Borzemska W., Wojciechowski K. — **The application of the fluorescent antibodies test (FAT) to the rapid diagnosis of Newcastle disease.**

Attempts were carried out to establish the value of FAT in case of Newcastle disease (ND). The technique of tissue smears and direct FAT with homologous conjugates were used. On the 5 day after infection there were evaluated internal organs of hens infected intramuscularly with velogenic strain of NDV. There were compared the infectivity and usefulness of internal organs for FAT. The best results were reached with the smears made of the brain, spinal cord, trachea, lung, glandular part of stomach and coecum. In post mortem examinations the disease was confirmed on the strength of anatomico-pathological lesions and by means of virus isolation in embryonated eggs. Then the best findings were obtained by the examination of spleen and liver smears. The successful application of FAT for routine diagnosis of ND depends on the specificity of each conjugate used.

ANNA CAKAŁA

Ostra forma choroby Mareka u kur

Zakład Badania Chorób Drobiu Instytutu Weterynarii w Puławach
p. o. kierownika: dr W. KARCZEWSKI

Choroba Mareka jest zaraźliwą, wirusową chorobą kur, rzadziej innych ptaków, która występować może w dwóch formach:

1) klasycznej — charakteryzującej się jedno- lub obustronnym niedowładem lub porażeniem nóg, skrzydeł, rzadziej ogona (tzw. postać nerwowa), jedno- lub obustronnie zmienionym zabarwieniem tęczówki, a szczególnie deformacją kształtu źrenicy (tzw. postać oczna),

2) ostrej — dla której charakterystyczne są zmiany nowotworowe w narządach wewnętrznych, szczególnie w gonadach, nerkach, śledzionie, wątrobie, żołądku gruczołowym, płucach i in. (tzw. postać trzewna).

Notuje się również występowanie mieszanych postaci obu form choroby.

Choroba Mareka, rozprzestrzeniona obecnie na całym świecie, coraz bardziej przybiera na znaczeniu we wszystkich krajach posiadających rozwinięty przemysł drobiarski. Jej ostra, nowotworowa forma (nazwa zaproponowana przez Biggsa — 4), dawniej znana pod nazwą limfomatozy trzewiowej lub ostrej białaczki ptaków, stwierdzona została w wielu krajach i obecnie wydaje się być problemem ekonomicznie znacznie poważniejszym niż białaczki (10, 11, 17, 20,

22). Obserwacje prowadzone w Zakładzie Badania Chorób Drobiu Inst. Wet. od 1962 r., tj. od pierwszego stwierdzenia ostrej formy tej choroby u broilerów (7) wskazują również na znacznie częstsze jej występowanie niż białaczek.

Ostra forma choroby Mareka bywa często w praktyce terenowej rozpoznawana jako białaczka limfatyczna, ponieważ stwierdzane na sekcji zmiany nowotworowe są przy obu chorobach bardzo podobne.

Wyniki prowadzonych od kilku lat na całym świecie intensywnych badań wykazały jednak, że obie jednostki chorobowe winny być traktowane zupełnie oddzielnie. Wydawało się zatem celowe podanie niektórych nowych wiadomości dotyczących ostrej formy choroby Mareka, z równoczesnym wykazaniem najistotniejszych cech różniących ją od białaczki limfatycznej.

Chorobę Mareka wywołuje wirus należący do grupy wirusów Herpes B (10 14, 15, 24, 25). Genom wirusa zawiera kwas dezoksyrybonukleinowy. Wirus charakteryzuje się silnym związaniem z komórką, w której występuje w formie cząstki niekompletnej pozbawionej otoczki. W takiej postaci wirus może być zakaźny jedynie wtedy, gdy znajduje się w żywej, nieuszkod-