

STEFAN SAMÓL

Niektóre problemy związane z immunofluorescencyjną diagnostyką pomoru świń

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

Wprowadzona w ostatnich latach do badań laboratoryjnych metoda wykrywania wirusa pomoru świń przy użyciu znakowanych przeciwciał, zarówno w tkankach zakażonych zwierząt, ma niewątpliwą przewagę nad wszystkimi dotychczas znanymi metodami stosowanymi w laboratoryjnej diagnostyce pomoru świń (9, 11, 13). W tkankach zwierząt zakażonych doświadczalnie wirusem pomoru świń, wykazanie antygeny metodą immunofluorescencji (immfl.) jest możliwe w każdym przypadku, niezależnie od stosowanej techniki (2, 9, 10). W przypadkach zakażeń naturalnych wyniki przeprowadzonych badań zależne są od wielu czynników: w tym od techniki przygotowania preparatów, świeżości materiału, rodzaju narządów użytych do badań, a także przebiegu choroby.

Celem niniejszego doniesienia jest przedstawienie możliwie najprostszyc diagnostycznych układów z uwzględnieniem warunków niezbędnych dla uzyskania miarodajnych wyników.

Materiał i metody

Materiał stanowiły próbki narządów od 639 świń podejrzanych o zakażenie naturalne pomorem.

Konjugaty. 1) Konjugat własny ZHW Warszawa sporządzony z surowicy p.pomorowej produkcji Biowet Puławy ser. 41266, 2) gamma-globuliny p.pomorowej produkcji bułgarskiej, 3) konjugat prof. G. Kubina, Bundesanstalt für Viruseuchenbekämpfung bei Haustieren, Wiedeń, 4) konjugat Dr Aynaud Jean-Marie, Institut National de la Recherche Agronomique, Thiverval, Francja.

Kultury tkankowe. 1) Hodowla ciągła nerki świni (PK), pochodząca z pracowni prof. Blaskowica z Bratysławy (CSRS). Linję otrzymano z Zakładu Wirusologii PZH Warszawa. 2) Linia PK-15 — otrzymano z Laboratoire Central de Recherches Veterinaires, Alfort, Francja.

Przygotowanie preparatów.

Zakażenie linii tkankowych i sporządzanie preparatów wykonano wg metody the fluorescent antibody — cell culture test (FACCT) opracowanej przez Mengelinga i wsp. (5, 6, 8).

Preparaty bezpośrednio z tkanek przygotowano wg techniki odciskowej z narządów mięsowych i węzłów chłonnych oraz skrawków mrożonych z migdałków podniebiennych, zgodnie z metodyką podaną uprzednio (9).

Ocena preparatów. Preparaty oceniano w fazowo-kontrastowym mikroskopie immunofluorescencyjnym z palnikiem HBO-200, produkcji C. Zeiss NRD. Filtry wzbudzające BG 12/2 i BG 3/4, ochronne GG-9 i OG-1. Układ optyczny 20 (apochromat) × 8. Każdy materiał poddawany był jednocześnie badaniom bakteriologicznym.

Wyniki

Badaniami immunofluorescencyjnymi objęto materiał nadsyłany z terenu do badań w kierunku

ku pomoru świń, oraz próbki, w których zmiany anat.-pat. mogły nasuwać podejrzenie pomoru. Analizie poddawano również materiał, w którym nie stwierdzano żadnych zmian anat.-pat., lecz pochodził od zwierząt wykazujących objawy kliniczne pomoru. Badaniom poddawano również prosięta martwo urodzone, względnie padłe w różnym okresie po urodzeniu, jeśli przyczyn tych upadków nie było można ustalić na innej drodze. W oparciu o poprzednie doświadczenia (9) do badań używano nerkę, śledzionę, węzły chłonne i migdałek podniebienny, względnie niektóre z tych narządów w zależności od tego jakimi dysponowano. Węzłów chłonnych nie identyfikowano (najczęściej były to krezkowe).

Tab. 1 przedstawia wyniki prób zestawione w 4 grupy w zależności od narządów jakie użyto do badań.

Tab. 1. Wyniki badań immunofluorescencyjnych narządów świń dotkniętych pomorem

Grupa	Zwierząt zakażonych sztuk	Rodzaj narządów	Immunofluorescencja w %		
			+	±	—
I	61	nerka	49,2	13,1	38,7
		śledzioną	86,9	11,5	1,6
		węzły chłonne	75,4	16,4	8,2
II	46	nerka	50,0	15,2	34,8
		śledzioną	76,1	17,4	6,5
		węzły chłonne migdałek	52,2 95,6	15,2 2,2	32,6 2,2
III	93	śledzioną	80,6	6,4	13,0
		migdałek	95,7	4,3	0
IV	219	migdałek	93,2	4,5	2,3

Na przebadanych łącznie 639 świń podejrzanych, pomór stwierdzono u 419 sztuk. Przypadki wątpliwe wyjaśniono początkowo na drodze badań kolejnych sztuk w danej zagrodzie, a później metodą FACCT. Z 214 sztuk, u których zmiany anat.-pat. określono jako typowe dla pomoru — pomór świń stwierdzono u 202 sztuk. Z 392 sztuk, u których zmiany nasuwały podejrzenie pomoru — pomór stwierdzono u 188 sztuk. Z 33 sztuk, u których nie stwierdzono zmian wskazujących na pomór — pomór świń stwierdzono u 29 sztuk.

Dane te oraz wyniki badań bakteriologicznych ilustruje tab. 2.

Tab. 2. Liczby stwierdzonych przypadków pomoru świń z uwzględnieniem zmian anat.-pat. wskazujących na pomór świń i wyników badań bakteriologicznych

Przebadano			Bakteriologicznie stwierdzono											
Łącznie sztuk	stwierdzono zmiany anat.-pat.*	Z tego stwierdzono pomór świń %	<i>Erysipel. insidiosus</i> pomór		<i>Pasteurella multocida</i> pomór		<i>Salmonella</i> pomór		<i>E. coli</i> pomór		<i>E. coli haemolyt.</i> pomór		Inne bakterie pomór	
			+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
639	+214	94,39	1	—	2	—	1	—	13	2	2	2	—	—
	±392	47,95	2	37	3	6	2	4	27	39	4	19	—	3
	-33	74,35	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—

* + = zmiany typowe dla pomoru świń, co najmniej w trzech narządach; ± = zmiany nasuwające podejrzenie pomoru świń w jednym lub dwóch narządach; — = brak zmian wska zujących na pomór świń.

Spośród wyników dodatnich 18 przypadków dotyczyło osesków padłych między 1 a 14 dniem po urodzeniu.

Badania immfl. 12 sztuk płodów pobranych od maciory zabitej z powodu pomoru w ostatnim dniu przed mającym nastąpić porodem dały wynik ujemny. Badano preparaty przygotowywane wg techniki skrawkowej z migdałka, śledziony, grasicy, trzustki, węzłów chłonnych śródpiersiowych, nerki i serca. W migdałku matki stwierdzono specyficzne świecenie o średnim natężeniu jedynie w komórkach nabłonka niektórych krypt.

Spośród 27 sztuk padłych do 14-go dnia po szczepieniu szczepionką lapinizowaną (szczep chiński) dodatni wynik próby immfl. otrzymano w 7-miu przypadkach tylko z migdałka u sztuk padłych w 5—7 dniu po przeprowadzonym szczepieniu. U 39 sztuk pochodzących z zagród wolnych od pomoru, a padłych lub zabitych z innych przyczyn do 14-go dnia po szczepieniu CVV — badania immfl. dały wynik ujemny.

Omówienie i dyskusja

Wyniki próby immfl. wykonanej bezpośrednio z tkanek zależne są, jak się wydaje, od zjadliwości i koncentracji wirusa w badanym materiale z jednej, a wartością przeciwciał znakowanych (konjugatów) z drugiej strony. W zależności od formy (przebiegu) pomoru świń w badanym materiale należy się spodziewać bardziej lub mniej zjadliwych szczepów wirusa, większej lub mniejszej jego koncentracji w poszczególnych tkankach. Zjadliwość wirusa wg Korna wzrasta m. in. wraz z nasilaniem się choroby. W ślad za ustępowaniem objawów chorobowych następuje spadek wirulencji wirusa (3, 4). Znajduje to odzwierciedlenie w natężeniu reakcji przy ocenie preparatów. Wymowne są w tym przypadku wyniki badań zwierząt z jednej zagrody likwidowanej w związku z pomorem. W materiale (migdałki) od zwierząt, u których przed ubojem wystąpiły wyraźnie zaznaczone objawy kliniczne i podwyższona temperatura, zarówno natężenie jak i pole świecenia było większe, natomiast od sztuk o słabo zaznaczo-

nych objawach klinicznych z temperaturą poniżej 40°C — pole świecenia jak i jego natężenie było mniejsze niezależnie od zmian anat.-pat. Tak więc prawidłowość wyników, pomijając takie czynniki jak odpowiedni sprzęt, wysokiej jakości konjugaty i stosowanie odpowiedniej techniki, zależna jest w dużym stopniu od rodzaju użytych do badań tkanek. W początkowym okresie do badań używano narządów jakie normalnie znajdują się wśród prób nadsyłanych do laboratorium. Próby te znajdowały się w różnym stanie, a czasem były dotknięte rozkładem. W miarę uzyskiwanego doświadczenia warunkiem przeprowadzenia badań w kierunku pomoru było nadesłanie migdałka podniebiennego. W materiale od sztuk uznanych ostatecznie za dotknięte pomorem — z nerki otrzymano wyniki dodatnie w ok. 50%, z węzłów chłonnych (najczęściej bliżej nie określonych) od 52—75%, z śledziony 76—86%, z migdałków od 93—95%.

Niski procent wykrywalności pomoru świń z nerki wynika, jak się wydaje głównie z dwóch przyczyn. Wirus może być wykazany w nerce stosunkowo późno po zakażeniu, a poza tym w zależności od przebiegu choroby wykrywalny jest w różnych warstwach. Zauważono, że w formie nadostrej specyficzna fluorescencja jest ograniczona do okołonaczyniowych histiocytołów, natomiast u świń padłych na chroniczną formę pomoru fluorescencja jest wyraźniejsza w kanalikach zbiorczych. Przebadanie kilku preparatów z różnych warstw nerki mogłoby zatem wpłynąć na zwiększenie wykrywalności wirusa pomoru świń w tym narządzie.

Stosunkowo niski procent wyników dodatnich uzyskiwany z węzłów chłonnych ma, jak się wydaje, związek z używaniem do badań różnych węzłów. W przypadkach, gdy sekcja była przeprowadzana na miejscu w laboratorium i do badań pobrano między chłonne śródpiersiowe uzyskiwano tylko nieznacznie mniejszy procent wyników dodatnich w porównaniu z migdałkami. Sporządzenie więc preparatów z różnych węzłów chłonnych wpływać może na wzrost wykrywalności wirusa pomoru u zakażonego

zwierzęcia. W węzłach chłonnych spotyka się jednak dość często niespecyficzne, granulowane świecenia. Stosunkowo wysoki procent wykrywalności wirusa przypada na śledzionę. Narząd ten w porównaniu np. z migdałkiem ulega szybszemu rozkładowi, a ponadto autoimmunofluorescencją makrofagów i eozynofilów nastęrcza trudności w ocenie niektórych preparatów. Największy procent wykrywalności wirusa uzyskano z migdałka, z którego preparaty przygotowywano wg techniki skrawków mrożonych. Związane to jest z jednej strony z możliwością różnicowania poszczególnych rodzajów komórek, co wydaje się szczególnie ważne w ocenie preparatów w przypadku chronicznego pomoru świń, z drugiej natomiast migdałek jest tym narządem, w którym wirus pomoru pojawia się z reguły najwcześniej po zakażeniu i utrzymuje się najdłużej. Spostrzeżenia powyższe zostały w międzyczasie potwierdzone przez Mengelinga i wsp. (11) na świnich zakażonych doświadczalnie różnymi szczepami wirusa pomoru. Główne trudności w diagnostyce pomoru świń metodą immfl. występują w przypadkach zakażenia szczepami małożydliwymi, oraz w chronicznym jego przebiegu. Problem ten jest przedmiotem dalszych badań.

W tab. 2 zestawiono liczby stwierdzonych przypadków pomoru w porównaniu ze zmianami anat.-pat., oraz wyniki badań bakteriologicznych. Na 214 sztuk, u których zmiany anat.-pat. określono jako typowe, pomorem dotkniętych było 202 sztuki. U sztuk, u których pomór wykluczono obserwowane zmiany były wynikiem poważnych zaburzeń w krążeniu (*endocard. verrucosa*) względnie na tle zakażenia ogólnego (uszkodzenie jelita, macicy itp.). W drugiej grupie, gdzie zmiany anat.-pat. nasuwały podejrzenie pomoru na 392 badane sztuki pomór stwierdzono u 188 sztuk, co stanowi ok. 48%. U sztuk, u których wykluczono pomór zmiany nasuwające podejrzenie pomoru wywoływane były najczęściej zaburzeniami w krążeniu na tle przebytej różycy świń. W tych przypadkach włoskowiec różycy stwierdzano najczęściej metodą hodowlaną, a niekiedy jedynie bakterioskopowo w materiale pobranym ze zmienionych zastawek. W większości pozostałych przypadków stwierdzano *E. coli* i *E. coli* hem. Wybaczynowość w poszczególnych narządach mogącą nasuwać podejrzenie pomoru obserwowano również u sztuk zabitych z konieczności, względnie padłych w transporcie w szczególności w okresie letnim.

W grupie trzeciej u zwierząt, które nie miały zmian anat.-pat. pomór stwierdzono w 29 przypadkach na 33 badane sztuki. We wszystkich tych przypadkach uzyskano zdecydowanie wyraźne wyniki próby immunofluorescencyjnej, co zdaje się wskazywać na wysoką zjadliwość wirusa.

Spośród 18 badanych osesków — 4 padły przed upływem 48 godzin po urodzeniu. Obraz immfl. był bardzo wyraźny (dwa lub trzy plu-

sy w skali trzyplusowej), co wydaje się wskazywać, że zakażenie nastąpiło w łonie matki (1). Z drugiej jednak strony w narządach 12 płodów od maciory zabitej tuż przed mającym nastąpić porodem, metodą immfl. bezpośredniej nie zdołano wykryć wirusa pomoru świń, mimo, że wirus został wykazany w migdałkach matki. Wydaje się, że zjawisko takie jest możliwe w chronicznym przebiegu pomoru świń. Istotną z punktu widzenia praktycznego, wydaje się również obserwacja, że wirus atenuowany zawarty w szczepionce Lapest udaje się wykryć metodą immfl. bezpośredniej z narządów jedynie 6—7 dnia po przeprowadzonych szczepieniach, natomiast wirus inaktywowany (CVV) nie jest tą metodą wykrywalny. Obserwacje te są zgodne z doświadczeniami Mengelinga i Packera (7), a także Torlone i wsp. (12), którzy szczepy atenuowane metodą immfl. bezpośredniej wykrywali w 5 i 6 dniu, natomiast metodą FACCT od 3—8 dnia po szczepieniu.

Piśmiennictwo

1. Done J. T.: Br. vet. J., 125, 343, 1969.
2. Engler E.: Mh. Vet.-Med. 26, 181, 1971.
3. Korn G.: Zentbl. Vet.-Med. 12(RB), 117, 1965.
4. Korn G.: Zentbl. Vet.-Med. 12(RB), 220, 1966.
5. Mengeling W. L., Pirtle E. C., Torrey J. P.: Canad. J. comp. Med. 27, 249, 1963.
6. Mengeling W. L.: Am. J. vet. Res., 28, 1653, 1967.
7. Mengeling W. L., Packer R. A.: Am. J. vet. Res., 30, 409, 1969.
8. Mengeling W. L., Drake L.: Am. J. vet. Res., 30, 1817, 1969.
9. Samól S.: Medycyna Wet. 26, 69, 1970.
10. Teebken D. L., Aiken J. M., Twichaus M. J.: J. Am. vet. med. Ass. 150, 53, 1967.
11. Torlone V., di Antonio E., Titoli F., Gialletti L., Castro Portugal F. L.: Vet. ital., 18, 619, 1967.
12. Torlone V., Titoli F., Gialletti L., Skyrianos G.: Atti Soc. ital. Sci. vet. 23, 965, 1970.
13. Zimmermann T.: Dt. tierärztl. Wschr. 74, 250, 1967.

Adres autora: dr habil. Stefan Samól, Warszawa 21, ul. Lechicka 21.

Самуль С. — Некоторые проблемы связанные с иммунофлуоресцентной диагностикой чумы свиней.

Исследованиям подвергли 639 свиней подозрительных по заболеванию чумой причем чуму установили у 419 шт. Методом непосредственной иммунофлуоресценции тканей больных чумой свиней вирус чумы обнаружили: в миндалях — в 93—95%, в селезенке — в 76—86%, в лимфатических узлах — в 52—75%, в почках — в ок. 50%. В случаях исследования миндалин (срезы получали методом замораживания) только 3—7% материалов требовало дополнительного исследования другого животного из того же двора или применения метода FACCT (the fluorescent antibody — cell culture test). У свиней привитых профилактически аттенуированными вирусом (штамм Китай) вирус чумы устанавливали в миндалях на 5—7 день после вакцинации. У животных привитых кристалливиолет вакциной вакцинного вируса не удалось найти. Автор обсуждает полученные данные сопоставляя их с наблюдаемыми анатомопатологическими изменениями и результатами бактериологического исследования.

Samól S. — Some problems regarding with the fluorescent antibody technique in the diagnosis of hog cholera.

Hog cholera was diagnosed in 419 out of 639 pigs suspected of natural infection. By the use of the immunofluorescence test the virus of hog cholera was detected in the following tissues: tonsils, spleen, lymph nodes (non identified) and kidneys in 93—95%

76—86%, 52—75% and about 50% of cases, respectively. When tonsils were used (frozen slices technique), only 3—7% of the investigated tonsils gave doubtful results. In this case either the second pig from the same farm ought to be investigated, or the fluorescent antibody-cell culture test must be performed. In pigs protectively vaccinated by the use of the attenuated strain of hog cholera virus (china

strain) the virus was revealed only in tonsils 5—7 days since the time of vaccination. The virus was not detected in pigs protectively vaccinated by means of CVV. There were also discussed the findings of the investigations in relation to the observed anatomopathological lesions and the results of bacteriological examinations.

ZDZISŁAW GLIŃSKI

Badania nad właściwościami i budową antygenową *Streptococcus pluton*. V. Analiza immunochemiczna

Instytut Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych Wydziału Weterynarii WSR w Lublinie
Dyrektor: doc. dr S. WOŁOSZYN

Najdokładniej poznanym fizyko-chemicznie kompleksem antygenowym paciorkowców są struktury powierzchni komórki, głównie ściana komórkowa. Wiąże się to z łatwością izolowania serologicznie aktywnych składników ściany komórkowej prostymi metodami fizyko-chemicznymi oraz z faktem, że u większości paciorkowców ściana komórkowa i jej struktury powierzchniowe są siedliskiem antygenów grupowo i typowo specyficznych (26). W przypadku paciorkowców z grupy D antygen grupowo swoisty zbudowany z kompleksu kwasu glicerynoteichowego (33, 34) występuje we frakcji błony cytoplazmatycznej komórki (11). Swoistość serologiczną tego antygeny determinują węglowodany łańcucha bocznego kompleksu, który w przypadku *Str. faecalis* jest zbudowany z koibjozy, a w przypadku *Str. faecium* z koitrijozy (34). Antygeny typowo specyficzne paciorkowców z tej grupy, w większości o naturze węglowodanowej, stanowią integralny składnik ściany komórkowej (6, 35).

Pewne światło na skład jakościowy węglowodanów i aminokwasów paciorkowców z grupy D rzuciły badania Cummins'a i Harris'a (5), Jones i Shattock (11), Saltona (26), Coleman i Williams'a (4) oraz Ikawa (10).

Jednakże dopiero Kane i Karakawa (12) wyjaśnili rolę poszczególnych cukrów prostych w determinowaniu swoistości serologicznej antygenów polisacharydowych ściany komórkowej. Autorzy ci w oparciu o odczyn zahamowania precypitacji ilościowej i wyniki analizy chromatograficznej hydrolizatów ściany komórkowej wykazali, że N-acetylglukozamina odgrywa zasadniczą rolę w determinowaniu swoistości serologicznej *Str. bovis*.

Badania nad składem jakościowym antygenów typowo specyficznych o naturze węglowodanowej paciorkowców z grupy D miały również na celu określenie determinant ich swoistości serologicznej. Na szczególną uwagę zasługują badania Elliott (6), Bleiweis i Krause (3) oraz Willers i Michel (35). Elliott (6) określił skład jakościowy antygeny typowo swoistego

Str. faecalis i *Str. faecalis var. durans*, Bleiweis i Krause (3) w oparciu o odczyn zahamowania precypitacji ilościowej stwierdzili, że alfa-d-glucoza względnie alfa-d-N-acetylglukozamina determinują swoistość antygeny typowo specyficznych *Str. faecalis*, zaś Willers i Michel (35) wykazali, że w przypadku 4 antygenów typowo specyficznych *Str. faecalis* N-acetylglukozamina, N-acetylgalaktozamina oraz odpowiadające im heksozy są głównymi inhibitorami zahamowania odczynu precypitacji ilościowej.

W związku z występowaniem wspólnych komponent antygenowych u *Str. pluton*, *Str. faecalis* i *Str. bovis* (8) oraz brakiem w dostępnym piśmiennictwie prac odnośnie składu chemicznego ściany komórkowej, antygenów grupowo i typowo specyficznych *Str. pluton* postanowiono:

1. Określić skład jakościowy aminokwasów i cukrów ściany komórkowej oraz cukrów zawartych w wyciągach wg Lancefield i Fullera *Str. pluton* i porównać go ze składem analogicznych preparatów otrzymanych ze szczepów *Str. faecalis* i *Str. bovis*.

2. Potwierdzić immunochemiczną podstawę swoistości antygeny grupowo swoistego paciorkowców z grupy D i określić determinanty swoistości serologicznej antygeny typowo swoistego *Str. pluton* o naturze węglowodanowej.

3. Przeprowadzić analizę absorpcyjną w podczerwieni preparatów ściany komórkowej oraz serologicznie aktywnych wyciągów polisacharydowych badanych drobnoustrojów w celu określenia ewentualnych podobieństw lub różnic. Zdaniem niektórych badaczy analiza w podczerwieni (22, 24, 27) umożliwi określenie poszczególnych rodzajów, gatunków a nawet typów drobnoustrojów.

Materiał i metody

Do badań użyto 6 szczepów *Str. pluton* (1, 10, 18, M, S, Z), 2 szczepy *Str. faecalis* (I, M) i *Str. bovis* 503. Źródła pochodzenia szczepów i metody namnażania podano w poprzedniej części pracy (8). Wyciągi wielocukrowe F sporządzono wg metody Krause i McCarty (15) i oczyszczono wg Homma i Suzuki (9) Hapteny wg Lancefield otrzymano wg oryginalnej metody (16), oczyszczono przez wytrącanie acetonem