

CEZARIUSZ HUŁAS

## Zastosowanie odczynu immunofluorescencyjnego do identyfikacji parwowirusa psów (CPV 2) izolowanego w hodowli komórek FC

Katedra Epizootiologii Wydziału Weterynaryjnego SGGW-AR,  
ul. Grochowska 272, 03-849 Warszawa

### Summary

#### Immunofluorescent test for the identification of canine parvovirus (CPV-2) propagated in a continuous FC line of cells

The samples of 300 faeces derived from the dogs suspected of canine parvovirus were tested by the haemagglutination and haemagglutination-inhibition tests according to Carmichael. Out of the samples which had a titre of 4096 ten samples were taken at random to propagate CPV-2 in a continuous FC line of cells. After 72 hours the inoculated cells were examined by the direct immunofluorescent test using a labelled antibody against feline panleukopenia virus. A specific immunofluorescence was detected in cells inoculated with these samples. The specificity of the test was confirmed by blocking of the IF test by means of antibodies against CPV-2 virus.

Odczyn immunofluorescencji (IF) stosowano w pracach eksperymentalnych nad patogenezą parwowirusowej choroby psów (pchp). Macartney i wsp. (6) badali obecność parwowirusa psów CPV-2 w grasicy, węzłach chłonnych, nabłonku jelit cienkich i grubych, wątrobie oraz szpiku w różnych okresach po zakażeniu doświadczalnym. Swoiste świecenie występowało po 24 godzinach w grasicy, po 48 w węzłach chłonnych, a po 96 w nabłonku jelit cienkich. Appel i wsp. (1) obserwowali swoistą IF w węzłach chłonnych, śledzionie i dwunastnicy psów padłych z klinicznymi objawami pchp. Stosując koniugat przeciwno wirusowi panleukopenii kotów wymienieni autorzy zidentyfikowali wirus CPV-2 izolowany w hodowli komórek A 72, a Osterhaus i wsp. (9) w hodowli komórek MDCK.

Celem badań było określenie przydatności odczynu IF z koniugatem przeciwno wirusowi panleukopenii kotów do identyfikacji wirusa CPV-2 izolowanego w hodowli komórek FC.

### Materiał i metody

Próbki kału od 300 psów z klinicznym podejrzeniem pchp zbadano metodą hemaglutynacji i zahamowania hemaglutynacji (HA—HI) w modyfikacji Carmichaela (2). Odczyn wykonano mikrometodą w płytkach pleksiglasowych z otworami „V”. Wartość ostatniego rozcieńczenia z występującą hemaglutynacją w odczynie hemaglutynacji uznawano za miano hemaglutynacyjne badanego materiału. Swoistość odczynu hemaglutynacji potwierdzano każdorazowo odczynem zahamowania hemaglutynacji. Spośród 72 prób o mianie hemaglutynacyjnym 1:4096 wybrano losowo 10 do izolacji czynnika etiologicznego w hodowli komórek FC. Hodowlę prowadzono w próbkach Leightona. Zakażone komórki FC inkubowano 72 godziny. Szkiełka z zakażoną hodowlą trzykrotnie płukano w PBS, wyjmowano z próbek, odsączano na bibule i utrwalano w acetonie w temperaturze ok.  $-10^{\circ}\text{C}$  przez 1 godzinę. Aceton zlewano, a utrwalone preparaty suszono w temperaturze pokojowej. Na tak przygotowane preparaty nanoszono koniugat przeciwno panleukopenii kotów, znakowany izotiocyanianem fluoresceiny, o oznaczeniach FITC (markiertest Anti-Panleukopenia-Globulin der Fabr. Nr 1112, prod. Behringwerke) w rozcieńczeniu 1:7 i inkubo-

wano 60 minut w komorze wilgotnej. Następnie odsączano nadmiar koniugatu, preparaty dwukrotnie płukano w OBS i wraz w wodzie destylowanej. Po osuszeniu w temperaturze pokojowej, szkiełka z hodowlą zatapiano w glicerynie na szkiełku podstawowym. Brzegi zalewano parafiną. Ocena prowadzono w mikroskopie fluorescencyjnym FLUOVAL-2 prod. Carl Zeiss Jena, o filtrach  $2 \times \text{KP49}$ , barierowym C<sub>1</sub> 249, lampie HBO 202, w obiektywie 16 i okularze 3,2. Preparaty kontrolne sporządzano w układach:

- znany materiał dodatni (parwowirus testowy FD + koniugat),
- znany materiał ujemny wirus IBR/IPV + koniugat.

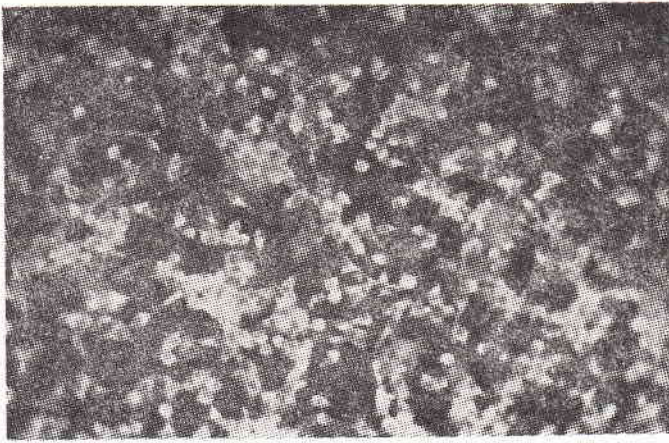
### Wyniki i omówienie

Wyniki badania 300 próbek kału metodą HA-HI wg Carmichaela w kierunku pchp ilustruje tab. 1. We wszystkich 10 próbach izolacji wirusa CPV-2 w hodowli komórek FC oraz kontroli dodatniej w odczynie IF bezpośrednio, obserwowano swoiste, intensywne żywozielone świecenie antygeny w cytoplazmie komórek FC (ryc. 1). Gwiazdkowaty kształt komórek był zachowany. Szare jądra komórkowe miały strzępiasty obwód i nie wykazywały świecenia. Identyczny obraz IF obserwowano w hodowli komórek FC zakażonych wirusem testowym PD.

Otrzymane wyniki różnią się zasadniczo od dotychczas opisywanych swoistych świeceń antygeny parwowirusowego w jądrach zakażonych komórek (3, 4, 5). Wirusy DNA (7), w tym wirus CPV-2, tworzą swój kapsyd w jądrze zakażonej komórki, ale replikują się w cytoplazmie. W związku z powyższym istnieje możliwość swoistego świecenia antygeny w cytoplazmie. Mangeling (8) obserwował swoistą IF w cytoplazmie i jądrach komórek zakażonych parwowirusem świni. Immunofluorescencja w cytoplazmie występowała po raz pierwszy już po 30 minutach od zakażenia hodowli komórek, najprawdopodobniej na skutek fagocytowania agregatów wirusów, syntetyzowania białka wirusowego w cytoplazmie lub dużej koncentracji wirusa w dawce zakażającej. Po 7,5 godzinach obserwowano swoiste świecenie w jądrach, gdzie replikował się wirus. Po 24 godzinach IF występowała w jądrach

Tab. 1. Wartość miana hemaglutynacyjnego wirusa CPV-2 w kale od 300 psów z klinicznym podejrzeniem pchp

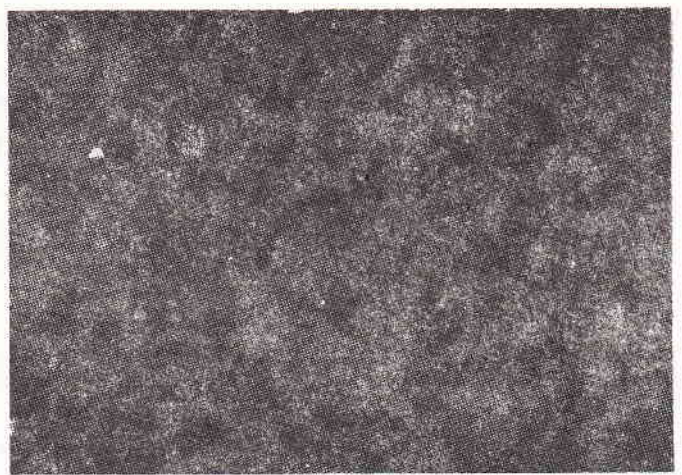
Liczba psów	Wartość miana hemaglutynacyjnego	Procent przypadków
72	1: 4096	24
26	1: 2048	8,66
38	1: 1024	12,66
40	1: 512	13,33
28	1: 256	9,33
30	1: 128	10
15	1: 64	5
6	1: 32	2
2	1: 16	0,66
43	próby negatywne	14,36



Ryc. 1. Dodatni wynik IF — intensywne świecenie antygeny w cytoplazmie

i cytoplazmie zakażonych komórek. Świecenia antygeny w cytoplazmie były bardziej intensywne. W niektórych komórkach obserwowano świecenia antygeny wyłącznie w cytoplazmie. W miarę upływu czasu, od 60 godziny po zakażeniu, świecenia w jądrach komórek słabły i zanikały, a intensywne świecenia w cytoplazmie utrzymywały się. Najprawdopodobniej replikujące się w jądrze cząstki wirusowe uwalniały się z komórki przez cytoplazmę, powodując w niej swoiste świecenia. Ostatecznym potwierdzeniem swoistości odczynu IF było uzyskanie zahamowania immunofluorescencji nieznakowanymi przeciwciałami przeciwko wirusowi CPV-2 oraz koniugatu w rozcieńczeniach 1:7 i 1:14 (ryc. 2). W próbie kontrolnej ujemnej, to jest wirus IBR/IPV z koniugatem przeciwko wirusowi panleukopenii kotów w rozcieńczeniach 1:7 i 1:14, nie stwierdzono swoistych świeceń.

Reasumując należy stwierdzić, że świecenie antygeny parwowirusowego CPV-2 w cytoplazmie komó-



Ryc. 2. Zahamowanie IF nieznakowanym przeciwciałem

rek FC należy uznać za swoisty, dodatni odczyn immunofluorescencyjny.

#### Piśmiennictwo

1. Appel M. J. G., Cooper B. J., Greisen H., Scott F., Carmichael L. E.: *Cornell Vet.* 69, 123, 1979.
2. Carmichael L. E., Joubert J. C., Pollock R. V. H.: *Am. J. vet. Res.* 41, 784, 1980.
3. Eugster A. K., Bendele R. A., Jones L. P.: *J. Am. vet. Ass.* 173, 1340, 1978.
4. Klingeborn B., Moreno-Lopez J.: *Zentbl. VetMed. B.* 27, 483, 1980.
5. Macartney L., McCandlish I. A. P., Thompson H., Cornwell H. J. C.: *Vet. Rec.* 115, 533, 1984.
6. Macartney L., McCandlish I. A. P., Thompson H., Cornwell H. J. C.: *Vet. Rec.* 115, 453, 1984.
7. Malicki K.: Przewodnik do ćwiczeń z mikrobiologii weterynaryjnej. Cz. III. Riketsjologia i wirusologia. Skrypty AR w Warszawie. Warszawa 1975.
8. Mengeling W. L.: *Am. J. vet. Res.* 39, 323, 1978.
9. Osterhaus A. D. M. E., Van Steenis G., De Kreek P.: *Zentbl. Vet. Med. B.* 27, 11, 1980.

Adres autora: dr Cezariusz Hulas, ul. Grochowska 272, 03-849 Warszawa

ZYGMUNT KOSACKI, EWA SITARSKA, KRYSTYNA TOPA, WŁODZIMIERZ KLUCIŃSKI

## Stężenie hydroksyproliny w moczu oraz inne wskaźniki przemian metabolicznych świń po podaniu witaminy D

Katedra Chorób Wewnętrznych z Kliniką Wydziału Weterynaryjnego SGGW-AR, ul. Grochowska 272, 03-849 Warszawa

### Summary

#### The level of hydroxyproline in urine and other metabolic indices in pigs after the administration of vitamin D

The diagnostic value of the level of hydroxyproline in urine, compared with the set of mineral, protein and lipid metabolic indices, was assessed in case of experimental hypervitaminosis D in piglets. During two weeks of the experiment statistically significant changes in the expressed by the hydroxyproline/creatinine coefficient, were found after a single administration of 10 000 IU/kg vitamin D. At the same time a transitory significant increase of the level of total calcium and a decrease of inorganic phosphorus and the activity of alkaline phosphatase in the serum were observed. No differences were found in the concentration of total protein, urea, creatinine and cholesterol in the serum. Out of the parameters determining the bone-mineral balance, the concentration of hydroxyproline in urine was of great importance; this

index was sensitive and displayed smaller standard deviations and longer lasting possibilities to evaluate any changes due to hypervitaminosis D compared with the concentration of total calcium, inorganic phosphorus and the activity of alkaline phosphatase in the serum.

Profilaktyka chorób metabolicznych i częste nieprawidłowości w żywieniu trzody chlewnej w chowie przemysłowym stwarzają konieczność kontrolowania podstawowych przemian metabolicznych. Założeniem badań było opracowanie zestawu parametrów laboratoryjnych do oceny profilu metabolicznego świń. Zestaw wskaźników oznaczanych w surowicy: stężenie wapnia całkowitego, fosforu nieorganicznego, aktywność fosfatazy zasadowej, stężenie białka całkowitego, mocznika, kreatyniny i cholesterolu postanowiono