

JAN F. ŻMUDZIŃSKI, ALICJA DĄBROWSKA *, ANDRZEJ SADOWSKI *,
ZOFIA KLIMCZAK **, MARCIN SMRE CZAK

Koniugat CENTOCOR FITC w diagnostyce wścieklizny. II. Badania zwierząt naturalnie zakażonych

Zakład Wirusologii Instytutu Weterynarii, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy
*Zakład Higieny Weterynaryjnej, ul. Wrocławska 170, 45-836 Opole
**Zakład Higieny Weterynaryjnej, ul. Powstańców Wlkp. 10, 85-090 Bydgoszcz

Summary

CENTOCOR FITC — anti-rabies monoclonal globulin in rabies diagnostic. II. Examination of naturally infected animals

There were compared the findings concerning diagnosis of rabies using anti-rabies conjugates, i.e. Czechoslovakian polyclonal Bioveta and American monoclonal CENTOCOR. There were evaluated the impression slides stained with Bioveta and CENTOCOR conjugates obtained from 27 foxes, a racoon dog, a stone marten, 4 cats, 2 dogs and a cow. The animals were suspected for rabies. Out of 36 animals rabies was diagnosed in 32 cases with the Bioveta conjugate (88.9%) and only 18 with CENTOCOR (50%). The samples responding positive with the Bioveta and negative with CENTOCOR were assessed by inoculation of mice. The results suggested that the serotypes of rabies virus which were not diagnosed with CENTOCOR FITC could circulate in nature. Thus the CENTOCOR FITC conjugate is of a limited value for diagnostic purposes of rabies.

Szybka metoda rozpoznawania wścieklizny jest elementem niezwykle istotnym w przypadku ekspozycji człowieka, a także zwierząt domowych. O wyborze metody decyduje aktualna wiedza w zakresie replikacji i struktur antygenowych wirusa wścieklizny oraz wyniki prac nad zastosowaniem przeciwciał monoklonalnych i wirusologii molekularnej w badaniach nad wścieklizną (1). Wysoce wiarygodny okazał się test immunofluorescencji. Zapewnia on dobrą czułość oraz zgodność wyników z próbą biologiczną w 99—100% (2, 3). W komórkach zakażonych wirusem wścieklizny powstają specyficzne ciała wtrętowe zawierające nukleokapsydy. Przeciwciała poliklonalne od zwierząt laboratoryjnych (króliki) immunizowanych oczyszczonymi białkami nukleokapsydów wirusa wścieklizny, po skoniugowaniu z izotiocyjanianem fluoresceiny, wiążą się z ciałkami wtrętowymi powodując fluorescencję pod wpływem oświetlenia promieniami UV. Takim handlowym preparatem diagnostycznym jest koniugat „anty-nukleokapsydowy” do diagnostyki wścieklizny produkowany przez Diagnostic Pasteur, Francja. Do diagnostyki wścieklizny mogą być również wykorzystane mysie przeciwciała monoklonalne dla białek nukleokapsydu wirusa wścieklizny. Przykładem takiego preparatu diagnostycznego jest koniugat CENTOCOR FITC firmy CENTOCOR, USA. Producent tego preparatu deklaruje, że globulina monoklonalna antywściekliznowa wykrywa wszystkie wirusy wścieklizny typu 1 oraz wściekliznopodobne typu 2 (Lagos), typu 3 (Mokola) oraz typu 4 (Duvnhage). Producent nie wypowiada się, czy koniugat CENTOCOR wykrywa niesklasyfikowane szczepy wirusa wścieklizny izolowane w Europie od nietoperzy owadożernych. W Polsce do rutynowej diagnostyki wścieklizny stosowany jest poliklonalny koniugat czechosłowackiej produkcji Bioveta-Ivanovice na Hané.

Celem badań było porównanie wyników w diagnozo-

waniu wścieklizny w warunkach rutynowych z użyciem koniugatu Bioveta i Centocor, na materiale patologicznym nadsyłanym do Zakładów Higieny Weterynaryjnej do badania w kierunku wścieklizny.

Materiał i metody

Preparaty odciskowe przygotowywano z mózgowia lisów (27 zwierząt), jenota (1), kuny (1), kota (4), psa (2), krowy (1). Ogółem do badania w kierunku wścieklizny użyto mózgow 36 zwierząt: 29 od zwierząt wolno żyjących i 7 od zwierząt domowych. Preparaty utrwalano w płomieniu palnika do znakowania koniugatem czechosłowackim Bioveta oraz w acetonie do znakowania koniugatem amerykańskim CENTOCOR. W części przypadków (6 prób) wykonano badania histopatologiczne, barwiąc preparaty odciskowe z przekroju mózgowia metodą Gerlacha (4). W części przypadków wykonano próbę biologiczną (7 prób), zakażając domózgowo dawką 0,03 ml rozciuru mózgowia badanego zwierzęcia po 6 myszek (4). Preparaty traktowane koniugatami przeglądano w mikroskopie UV Jenalumar z lampą HBO 202 przy powiększeniu 200 i 400×. Wynik fluorescencji oceniano w skali 1+ do 4+, biorąc pod uwagę specyficzność, intensywność i jakość świeceń.

Wyniki i omówienie

Ogółem na 36 podejrzanych zwierząt wściekliznę potwierdzono w 32 przypadkach badanych koniugatem Bioveta (88,9%) i tylko w 18 przypadkach badanych koniugatem CENTOCOR (50%). W 12 przypadkach (33,3%) uzyskano wynik negatywny przy znakowaniu koniugatem CENTOCOR (tab. 1 poz. 6, 7, 8, 12, 13, 14, 15, 16; tab. 2 poz. 2, 3, 4, 5), podczas gdy w 11 z nich koniugat Bioveta rozpoznawał wściekliznę na 4+ (lisy) i w jednym na 2+ (kuna). U tego ostatniego zwierzęcia (tab. 1 poz. 16 i 16a) wściekliznę potwierdzono próbą biologiczną na myszkach, przy czym zaskakuje fakt, iż badanie mózgowia myszek porażonych dało wynik pozytywny na 4+ z koniugatem Bioveta i zdecydowanie negatywny z koniugatem CENTOCOR. Badanie histopatologiczne mózgowia wym. myszek wykrywało obecność ciałek Negriego. Jednocześnie należy podkreślić, że koniugat CENTOCOR dał w 3 przypadkach (8,3%) wynik wątpliwy (±), gdy w tych samych przypadkach koniugat Bioveta w subiektywnej ocenie ilości i jasności świeceń diagnozował wściekliznę na 4+ (tab. 1 poz. 3, 9; tab. 2 poz. 1). W przypadku jednego lisa (tab. 1 poz. 9) przy intensywnie dodatniej reakcji z koniugatem Bioveta i wątpliwym wyniku z koniugatem CENTOCOR wściekliznę potwierdzono badaniem histopatologicznym, wykazując obecność ciałek Negriego. Zastanawiający jest przypadek lisa (tab. 1 poz. 12, 12a), u którego zdiagnozowano wściekliznę fluorescencją na 4+ koniugatem Bioveta, a w zasadzie wykluczono wściekliznę koniugatem CENTOCOR i potwierdzono wściekliznę próbą biologiczną na myszkach oraz obecnością ciałek Negriego. Preparaty odciskowe mózgowia z tej próby biologicznej wykazywały fluorescencję na 4+ z koniugatem Bioveta i bardzo słabą, wątpliwą fluorescencję z koniugatem CENTOCOR (tab. 1 poz. 12a). Interesującą jest

Tab. 1. Porównanie wyników diagnostyki wścieklizny przy zastosowaniu koniugatu Bioveta, CENTOCOR oraz badania histopatologicznego i próby biologicznej

Lp.	Zwierzę	Koniugat Bioveta	Koniugat CENTOCOR	Wynik próby biologicz.	Obecność ciała Negriego
1.	lis	++++	++++		
2.	"	++	++		
3.	"	++++	±		
4.	"	—	—		
5.	"	++++	++++		
6.	"	++++	—		
7.	"	++++	—		
8.	"	++++	—		
9.	"	++++	±		+
10.	"	++	++		
11.	"	++++	++++	+	+
11a.	mysz	++++	++++	+	+
12.	lis	++++	—	+	+
12a.	mysz	++++	±	+	+
13.	lis	++++	—		
14.	"	++++	—		
15.	"	++++	—		+
16.	kuna	++	—	+	
16a.	mysz	++++	—	+	+
17.	kot	—	—	—	—
18.	"	++++	++++		
19.	pies	—	—		
20.	"	—	—		

Tab. 2. Wyniki diagnostyki wścieklizny przy użyciu koniugatu Bioveta, CENTOCOR i próby biologicznej

Lp.	Zwierzę	Koniugat Bioveta	Koniugat CENTOCOR	Wynik próby biologicznej
1.	lis	++++	±	
2.	"	++++	—	+
3.	"	++++	—	+
4.	"	++++	—	+
5.	"	++++	—	+
6.	"	++++	++++	
7.	"	++++	++++	
8.	"	++++	++++	
9.	"	++++	++++	
10.	"	++++	++++	
11.	"	++++	++++	
12.	"	++++	++++	
13.	jenot	++++	++++	
14.	kot	++++	++++	
15.	kot	++++	++++	
16.	krowa	++++	++++	

również obserwacja, że 4 lisy, u których potwierdzono wściekliznę koniugatem Bioveta (fluorescencja 4+) i próbą biologiczną, a które reagowały negatywnie z koniugatem CENTOCOR pochodziły z jednego rejonu (biotopu).

Uzyskane wyniki sugerują, iż występują w przyrodzie serotypy wirusa wścieklizny, których nie wykrywa koniugat CENTOCOR. Potwierdza to ostatnie obserwacje Cox i wsp. (5), którzy wykazali, iż istnieją w przyrodzie warianty wirusa wścieklizny, których nie wykrywa monoklonalna globulina antywściekliznowa CENTOCOR FITC. Jak dotychczas brak jest wyjaśnienia dla tego zjawiska. Przedstawione wyniki, uzyskane w warunkach rutynowych, w zasadzie dyskwalifikują koniugat CENTOCOR jako preparat do diagnostyki wścieklizny, pomimo zachęcających wyników uzyskanych w warunkach laboratoryjnych ze szczepem Flury LEP (7). Koniugat ten nie może zatem być zalecony jako preparat

diagnostyczny do urzędowej laboratoryjnej diagnostyki wścieklizny w Polsce.

Według deklaracji producenta monoklonalna globulina antywściekliznowa CENTOCOR FITC powinna wykrywać wszystkie 4 serotypy wirusa wścieklizny 1 (wścieklizna), 2 (Lagos-bat), 3 (Mokola), 4 (Duvenhage). Jednakże w przyrodzie mogą występować serotypy, których koniugat ten nie diagnozuje. Ostatnio autorzy fińscy opisałi przypadek izolacji wirusów wścieklizny od zwierząt na wyspach w pobliżu Estonii. Szczepy te nie reagowały z przeciwciałem monoklonalnym 187.5, podobnie jak szczep SAD_{B19} używany do doustnych szczepień przeciwko wściekliznie u zwierząt wolno żyjących, były 10-krotnie mniej zjadliwe dla myszy osesków przy podaniu domięśniowym niż szczepy izolowane na kontynencie (Finlandia) i nie stymulowały wytwarzania przeciwciał (6). Przypadki takie mogą stwarzać duże trudności w laboratoryjnej diagnostyce wścieklizny.

Piśmiennictwo

- Bourny H., Sureau P.: Methodes de Laboratoire pour le Diagnostic de la Rage. Instytut Pasteur, Rabies Unit, National Reference Centre for Rabies, WHO Collaborating Centre for Rabies, Paris, 1991.
- Kaplan M. M., Koprowski H.: Laboratory Techniques in Rabies, wyd. III, WHO, Geneva, 1973.
- McQueen J. L., Lewis A. L., Schneider N. J.: Am. J. publ. Hlth. 50, 1743, 1960.
- Instrukcja Nr 27 Min. Rol. Dep. Wet. z dn. 16.04.1973 (Wet-L-640/11/73).
- Cox J. H., Schneider L. G., Müller W. W.: WHO Rabies Bulletin Europe 15, 12, 1991.
- Kulonen K., Peil H., Westerling B., Ostrat T., Neuvonen E.: Abstracts — 2nd Congress of the European Society for Veterinary Virology, 83, 1991.
- Zmudziński J. F., Dąbrowska A., Sadowski A., Klimczak Z., Smreczak M.: Medycyna Wet. — w druku.

Adres autora: doc. dr habil. Jan F. Zmudziński, ul. Norwida 27 m. 9, 24-100 Puławy

BASKERVILLE A., HUMPHREY T. J., FITZGERGEE R. B., COOK R. W., CHART H., ROWE B., WHITEHEAD A.: Zakażenie drogą powietrzną niosek *Salmonella enteritidis* typ fagowy 4. (Airborne infection of laying hens with *Salmonella enteritidis* phage type 4). Vet. Rec. 130, 395—398, 1992 (18)

Z chwilą wykazania, że kurczęta zakażone *Salmonella enteritidis* typ fagowy 4 są ważnym źródłem zakażenia tym zarazkiem dla człowieka, podjęto badania nad patogenezą zakażenia niosek. W stadach hodowlanych istotne znaczenie ma peroralna droga zakażenia. W kurnikach mogą występować zakażenia przez drogi oddechowe. Kury w wieku 22—24 tygodni eksponowano na drobnocząsteczkowe aerozole zawierające różne stężenia *S. enteritidis* typ fagowy 4. U niosek rozwinęło się zakażenie układowe, przy czym część z nich wydalala salmonelę z kałem 28 dnia po zakażeniu. U wszystkich kur zakażonych dawką $2,4 \times 10^5$ i u 5 z 15 zakażonych dawką $4,2 \times 10^3$ drugiego dnia po zakażeniu wystąpiła biegunka. U 8 sztuk utrzymywała się ona przez 3 tygodnie. Zmiany sekcyjne lokalizowały się w przewodzie pokarmowym kur, u których wystąpiła biegunka. U jednej sztuki wystąpiło ponadto rozległe zapalenie otrzewnej, obejmujące powierzchnię surowiczej jelit, jajnik i jajowód. *S. enteritidis* wyosobniono z płuc, treści wola ptaków podanych ubojowi bezpośrednio po eksponowaniu na zakażenie. Tylko u 0,6% niosek *S. enteritidis* stwierdzono na skorupce jaj.