

otrzymaniu dodatniego wyniku próby biologicznej, potwierdzonego odczynem IF (myszki padały kolejno w 16, 17, 20 i 30 dniu), odczyn IF dla mózgu psa powtórzono i otrzymano identyczne wyniki. Bardzo drobne świecenia nie mogły być wykryte koniugatem natywnym ze względu na maskujący wpływ jasnozielonego tła. Zastosowanie koniugatu z tej samej serii w modyfikacji A i B dało całkowite wygaszenie tła i ujawniło świecenia specyficzne. Swoiście świecące ciała wtretowe były wyraźnie widoczne. Użycie koniugatu Bioveta w tradycyjny sposób, może zatem w niektórych przypadkach sprawiać trudności w podjęciu prawidłowego rozpoznania z powodu maskującego świecenia tła. Trudności te mogą zaistnieć w przypadku występowania w badanym materiale znikomej ilości antygeny wirusa wścieklizny. Fałszywie ujemne wyniki stanowią zagrożenie dla osób poszkodowanych ze względu na opóźnione rozpoznanie, bowiem dodatni wynik próby biologicznej otrzymuje się po ok. 5-16 dniach. W wyniku pokąsania człowieka, wirus namnaża się w miejscu wniknięcia i rozpoczyna wędrówkę w kierunku mózgu. Wskutek opóźnionego rozpoznania choroby, osoba poszkodowana jest narażona na zbyt późne poddanie się szczepieniom interwencyjnym. Reasumując, można stwierdzić, że użycie zmodyfikowanego opisanymi metodami koniugatu Bioveta, obecnie szeroko stosowanego w

diagnostyce wścieklizny na terenie całego kraju, powinno przyczynić się do wyeliminowania lub ograniczenia fałszywie ujemnych wyników w odczynie IF. Obniżenie nieswoistego świecenia tkanki mózgowej w preparatach powinno przyczynić się do polepszenia komfortu pracy pracowników diagnozujących wściekliznę i wzrostu wiarygodności omawianej metody.

Wygaszenie niespecyficznego świecenia tła i udoskonalenie laboratoryjnego rozpoznawania wścieklizny zwierząt można uzyskać przez adsorpcję koniugatu Bioveta homogenatem tkanki mózgowej zdrowych myszek lub dodatek błękitu Evansa.

Piśmiennictwo

1. Sacramento D., Bourhy H., Tordo N.: *Molecular Cellular Probes* 5, 229, 1991.
2. Żmudziński J. F., Smreczak M., Skulmowska D., Rola J.: *Medycyna Wet.* 49, 19, 1993.
3. Baczyński Z., Gładysz A., Larski Z., Łosieczka K., Seroka D., Wachnik Z.: *Wścieklizna*. PWRiL, Warszawa, 1987.
4. Instrukcja Nr 27 Min. Rol. Dep. Wet. z dnia 16.04.1973 (Wet-L-040/1/730).
5. Instrukcja użycia koniugatu FITC – Diagnostics Pasteur, Francja.
6. Instrukcja użycia koniugatu FITC – Bioveta Ivanovice, Czechy.

Adres autora: lek. wet. Emilian Skrzynecki, ul. Grodzka 63/6, 38-400 Krosno

JACEK WÓJCIK

Zastosowanie testu IMPA do wykrywania przeciwciał dla herpeswirusa kotów (FHV-1) w Polsce

Zakład Chorób Zwierząt Mięsożernych i Futerkowych Państwowego Instytutu Weterynaryjnego, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Summary

The use of IMPA for serological detection of feline herpesvirus type 1 (FHV-1) antibodies in cats in Poland

Serological examinations with the use of IMPA of 335 cats not vaccinated against infectious feline rhinotracheitis (FRT) showed a prevalence of feline herpesvirus type 1 (FHV-1) in 61.5% of Polish cats. Most of the seropositive cats had high (16-64) or very high (128-512) FHV-1 antibody titre. The seropositive cats were mainly detected in large towns or animal shelters (82% seropositive animals). Most seropositive cats were more than 12 months old. The lowest percentage of FHV-1 seropositive animals was noted in cats less than 3 months old. IMPA can be used for the routine serological diagnosis of herpesvirus infections in cats.

Schorzenia zakaźne górnych dróg oddechowych kotów (URTD – upper respiratory infection diseases) wywoływane są najczęściej przez herpeswirus typ-1 (FHV-1) i kaliciwirusy kotów (FCV). Objawy URTD obserwuje się głównie u młodych kotów, zwykle późną jesienią lub wczesną wiosną (11). In-

fekcje herpeswirusowe rozpoznawane są u kotów najczęściej jako tzw. zakaźne zapalenie nosa i tchawicy (2, 3, 11). W odróżnieniu od zakażeń FCV w przebiegu zakaźnego zapalenia nosa i tchawicy notuje się znacznie wyższy odsetek śmiertelności (30%) jak również możliwość występowania innych objawów chorobowych w tym zaburzeń w rozrodzie (zamiernie płodów i padnięcia osesków) czy zaburzeń w funkcjonowaniu centralnego układu nerwowego. Obserwowane u kotów nawrotowe i przewlekłe zapalenie zatok lub błon śluzowych w obrębie głowy jest również, często wynikiem zakażenia latentnego wirusem FHV-1 (1, 6, 11). Dodatkowo, działanie immunosupresyjne herpeswirusa, sprzyja rozwojowi infekcji oportunistycznych (chlamydiami, bakteriami lub grzybami chorobotwórczymi) co powoduje, że przebieg zakażenia bywa niejednokrotnie bardzo ciężki. Stąd też FHV-1 wymieniony jest wśród najbardziej patogennych czynników zakaźnych kotów (8).

Obserwacje kliniczne wskazują na częste występowanie przypadków URTD w Polsce. Jednak jak dotąd badania nad udziałem wirusowych czynników zakaźnych (FCV, FHV-1) w wywoływaniu tego syndromu ograniczają się do jednej pracy omawiającej izolację wirusa FCV (12). W związku z tym uznano za celowe przedstawienie wyników badań serologicznych w kierunku FHV-1, przeprowadzonych z zastosowaniem testu IMPA (immunoperoxidase monolayer assay).

Materiał i metody

Hodowla komórkowa. Do badań użyto linii ciągłej komórek nerki kota CrFK (Crandell Feline kidney). Komórki namnażano w płynie wzrostowym DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium – Sigma) zawierającym 5-10% bydlęcej surowicy płodowej (F.C.S. Sera-Tech GmbH), 200 mM L-Glutaminy (Sigma) oraz 50 µg/ml gentamycyny (Gibco BRL).

Wirus. Wykorzystywano atenuowany szczep G2620A herpeswirusa kotów (FHV-1). Wirus, namnażany wg ogólnie przyjętych zasad (10) w komórkach linii CrFK, osiągał miano 10^6 TCID₅₀.

Antygen „fazy stałej” testu IMPA. Dla przygotowania fazy stałej jako antygeny używano supernatantu uzyskanego z hodowli CrFK zakażanej wirusem FHV-1. Supernatant oczyszczano wstępnie z pozostałości komórkowych poprzez wirowanie (4 tys. rpm.) a następnie sączone przez sączonek membranowy 220 nm. (Millipore). Oczyszczony antygen przechowywano w temp. -80°C.

Surowice. Zbadano 335 surowic kotów, nie szczepionych przeciwko zakaźnemu zapaleniu nosa i tchawicy, pochodzących z Warszawy, Lublina, Wrocławia, Poznania, Bielska Białej i Puław. Kolekcjonowane surowice przechowywano w temp. -20°C. Jako kontrole dodatnie i ujemne, testu IMPA, w badaniach wykorzystywano surowice dodatnie uzyskane od kotów hiperimmunizowanych wirusem FHV-1 oraz znane surowice ujemne (12).

Test IMPA. Test wykonano wg zasad opracowanych przez Jensen (9) dla testów NPLA i PLA, uwzględniając jednak odmienne parametry uzyskania fazy stałej, wynikające z właściwości cytopatycznych wirusa FHV-1 oraz rodzaju użytej hodowli komórkowej.

Przygotowanie fazy stałej. Hodowlę komórkową zakładano w płaskodennych mikropłytkach Nunclon TM, wprowadzając do każdego basenika 5×10^4 komórek o żywotności nie mniejszej niż 95%. Po 24-36 godzinach inkubacji w temp. 37°C, w atmosferze 4% CO₂, komórki zakażano dawką 100-300 TCID₅₀ po czym inkubowano przez kolejne 36-48 godzin. Po pojawieniu się pierwszych zmian cytopatycznych hodowlę utrwalano 40% roztworem acetonu w PBS (bez soli Ca i Mg) przez 20 min. Po wysuszeniu w temp. pokojowej, utrwalone mikropłytki przechowywano w stanie zamrożenia w temp. -20°C.

Wykonanie testu. Surowice badano w rozcieńczeniach 1/2 – 1/512. Do poszczególnych baseników mikropłytki wprowadzano po 50 µl odpowiednio rozcieńczonej surowicy i inkubowano w temp. 30-37°C przez 30 min. po czym płukano 3-krotnie w buforze do płukania PBST (PBS bez soli Ca i Mg, 2% Tween 20). Następnie wprowadzano po 50 µl koniugatu peroksydazowego (anti-cat IgG H+L – The Binding Site) w rozcieńczeniu 1/200 i ponownie inkubowano w takich samych warunkach. Reakcję barwną, po uprzednim 3-krotnym wypłukaniu mikropłytki, wywoływano substratem (3 amino- 9 ethylcarbazole – Sigma) przygotowanym wg metody podanej przez Jensen (9).

Wynik testu odczytywano w mikroskopie świetlnym Jenaval FA (Carl Zeiss Jena) przy powiększeniu 100×.

Wyniki i omówienie

W prezentowanej pracy do badań serologicznych zastosowano test IMPA zamiast powszechnie dotychczas stosowanego odczynu seroneutralizacji (SN). Test ten umożliwia badanie mian surowic wobec wirusów namnażających się w hodowli komórek *in vitro* bez wywoływania w nich zmian cytopatycznych i stosowany jest między innymi, w serologicznej diagnostyce różnicowej zakażeń pestiwirusowych u świń (9). Zasadą testu jest reakcja przeciwciał zawartych w badanej surowicy z antygenami wirusowymi znajdującymi swą ekspresję na błonach komórkowych lub w cytoplazmie zakażonych komórek. W ostatnich latach, ze względu na szereg zalet tego testu jest on wykorzystywany w badaniach serologicznych coraz częściej zamiast klasycznego odczynu SN. Stosowanie testu IMPA, w odróżnieniu od SN, nie wymaga ciągłego i kosztownego utrzymywania hodowli komórkowych oraz każdorazowego badania miana antygeny wirusowego. Przede wszystkim jednak nie wymagane jest zachowywanie bezwzględnych warunków jałowości w trakcie badania surowic oraz nie występują problemy związane z toksycznym oddziaływaniem surowic na żywe komórki. Dodatkowo test IMPA pozwala na szybszą i prostszą interpretację wyniku.

Zastosowanie IMPA do omawianych badań, poprzedzono opracowaniem warunków jego wykonywania w stosunku do antygeny FHV-1 (m.in. określenie optymalnej dawki wirusa, czasu jego inkubacji czyli parametrów warunkujących ekspresję większości immunogennych białek wirusa rozpoznawanych przez przeciwciała FHV-1). W następnej kolejności oceniano wyniki uzyskane przy badaniu 8 surowic (w tym ujemnych, słabo i wysoko dodatnich) w odczynie SN i teście IMPA. Uzyskane wyniki (wysokości mian badanych surowic) były porównywalne co przemawiało za możliwością zastosowania testu IMPA do serologicznych badań przeglądowych w kierunku zakażeń herpeswirusowych u kotów.

Ogółem zbadano 335 kotów pochodzących z miast i ośrodków podmiejskich (tab. 1). Z tej liczby 206 kotów, tj. 61,5% posiadało miana przeciwciał >2. Brak reakcji z antygenem FHV-1 w teście IMPA stwierdzono w 129 przypadkach, co stanowi 38,5% badanych zwierząt. Największy odsetek kotów wykazujących dodatnie miana przeciwciał stwierdzono w dużych aglomeracjach miejskich (Warszawa, Poznań, Wrocław, Lublin) przy czym na uwagę zasługuje fakt, że w tej grupie zwierząt większość posiadała wysokie (16-64) lub bardzo wysokie (128-512) miana przeciwciał FHV-1. Dalsza analiza uzyskanych wyników wykazała, że większość seroreagentów

Tab. 1. Występowanie przeciwciał dla herpeswirusa FHV-1 u kotów w Polsce

Miejsce pochodzenia kotów	Liczba badanych kotów	Miano surowicy w teście IMPA								Ogółem o mianie > 2	
		< 2		2-8		16-64		128- > 512			
		liczba	%	liczba	%	liczba	%	liczba	%	liczba	%
Lublin	119	49	41	14	11,7	30	25	26	21,8	70	58,8
Puławy	61	34	55,7	12	19,6	11	18	4	6,5	27	44,3
Wrocław	52	14	26,9	2	3,8	34	65,4	2	3,8	38	73,1
Warszawa	13	2	15,4	5	38,5	5	38,5	1	7,7	11	84,6
Poznań	74	27	36,4	17	22,9	23	31	7	9,4	47	63,5
Inne	16	3	18,7	6	37,5	7	43,7	0	0	13	81,3
Ogółem	335	129	38,5	56	16,7	110	32,8	40	11,9	206	61,5

stanowiły koty w wieku powyżej 12 miesięcy. W grupie wiekowej 6-12 miesięcy jedynie 12,6% posiadało dodatnie miana przeciwciał podczas gdy w grupie zwierząt starszych (powyżej 1 roku) odsetek seroreagentów dodatnich wynosił 34,9%. Najniższy odsetek kotów posiadających przeciwciała dla wirusa FHV-1 zanotowano w grupie wiekowej do 3 miesięcy. W przeprowadzonych badaniach nie stwierdzono występowania zależności rasowej w stosunku do częstości zakażeń herpeswirusowych u kotów.

Przy analizie przedstawionych wyników należy uwzględnić, istotny z epizootycznego punktu widzenia fakt, że wszystkie badane koty nie były uprzednio szczepione przeciwko zakażnemu zapaleniu nosa i tchawicy. Stwierdzenie więc, tak dużej liczby seroreagentów dodatnich wśród nie szczepionych zwierząt świadczy o znacznym rozprzestrzenieniu zakażeń herpeswirusowych kotów w Polsce. Ponadto, wysokie miana przeciwciał u większości dodatnio reagujących kotów przemawiają za istnieniem dużej grupy zwierząt mogących stanowić potencjalne źródło wirusa (4, 5). Wykazano bowiem, że częstość izolacji wirusa FHV-1 była największa wśród kotów posiadających wysokie miana przeciwciał (2, 3, 4, 5, 6, 7). Zdaniem większości autorów, wysoki poziom przeciwciał FHV-1 u kotów nie szczepionych, często również nie wykazujących klinicznych objawów URTD, świadczy o przetrwałej infekcji lub o ustaleniu się nosicielstwa wirusa (4, 5). Stwierdzony wysoki odsetek seroreagentów dodatnich wśród kotów pochodzących z dużych ośrodków miejskich wskazuje, że częstość występowania zakażeń herpeswirusowych związana jest z warunkami bytowania zwierząt. Z danych piśmiennictwa wynika, że najwięcej przypadków URTD notowanych jest w dużych, zagęszczonych populacjach kotów (7, 11). Potwierdzeniem tego są wyniki badań przeprowadzonych wśród

kotów pochodzących ze schroniska dla zwierząt, w którym nie prowadzono szczepień ochronnych. Odsetek seroreagentów dodatnich w tej grupie wynosił 82% przy czym 61,4% zwierząt posiadało bardzo wysokie (>64) miana przeciwciał FHV-1. Powyższy wynik świadczy również o aktywnie przebiegającej i stale utrzymującej się infekcji herpeswirusowej w omawianej populacji kotów. Można przypuszczać, że podobna sytuacja panuje w większości polskich schronisk dla zwierząt.

Przedstawione wyniki wskazujące na częste występowanie zakażeń herpeswirusowych u kotów w Polsce przemawiają za celowością podjęcia swoistej profilaktyki. Należy jednak zaznaczyć, że jak wynika z obserwacji poczynionych w krajach, w których immunoprofilaktyka zakażeń FHV-1 prowadzona jest od ponad 10 lat, szczepienia kotów nie eliminują w 100% problemu infekcji herpeswirusowych. Stosowanie szczepień ochronnych łagodzi jednak kliniczny przebieg choroby.

Piśmiennictwo

1. Bittle J. L., Peckham J. C.: J. Am. Vet. Med. Ass. 158, 927, 1971.
2. Ellis T. M.: Aust. Vet. J. 57, 115, 1981.
3. Ellis T. M.: Res. Vet. Sci. 33, 270, 1982.
4. Gaskell R. M., Povey R. C.: Vet. Rec. 93, 204, 1973.
5. Gaskell R. M., Povey R. C.: Vet. Rec. 100, 128, 1977.
6. Gaskell R. M., Povey R. C.: Res. Vet. Sci. 27, 167, 1979.
7. Gaskell R. M., Povey R. C.: Vet. Rec. 111, 359, 1982.
8. Górski J., Wójcik J.: Życie wet. 68, 226, 1993.
9. Jensen M. H.: Acta vet. scand. 22, 85, 1981.
10. Larski Z.: Diagnostyka wirusologiczna chorób zwierząt. PWRiL, Warszawa 1992.
11. Pedersen N. C.: Feline Herpesvirus Type 1 w: Virus Infection of Carnivores, Elsevier Sci. Publ. B. V., Amsterdam 1987.
12. Wójcik J.: Bull. vet. inst. Puławy 38, 77, 1994.

Adres autora: dr Jacek Wójcik, ul. Kościuszki 12/23, 24-100 Puławy

JERZY ROLA, JAN ŻMUDZIŃSKI

Analiza restrykcyjna DNA szczepów wirusa BHV 1 izolowanych z nasienia buhajów

Zakład Wirusologii Państwowego Instytutu Weterynaryjnego, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Summary

Restriction enzyme analysis of BHV1 strains isolated from bovine semen

Field strains of BHV1 isolated from bovine semen at different periods in Poland have been studied by the restriction enzyme analysis of DNA. It has been shown that the *Aguille* strain isolated in 1976 belongs to the subtype BHV 1.2 which comprises IPV strains. But strains III/2, III/3 and 6/42 isolated in 1981 belong to the subtype BHV 1.1 which comprises IBR strains.

Zakażenie wirusem BHV 1 może przybierać różne formy kliniczne, spośród których zakażne zapalenie nosa i tchawicy (IBR) oraz otręt bydła (IPV) są najbardziej znanymi i najważniejszymi z ekonomicznego i epizootologicznego punktu widzenia (1, 2, 3, 8, 9). Próby różnicowania szczepów wirusa BHV 1 metodami serologicznymi, na podstawie markerów biologicznych, namnażania się w hodowlach komórkowych, wielkości łysinek okazały się nieskuteczne (6, 10, 11, 12, 15, 16). Jedyną metodą pozwalającą pewnie różnicować szczepy IBR od szczepów IPV jest analiza restrykcyjna ich DNA.

Celem pracy było określenie, przy pomocy analizy restrykcyjnej DNA, czy szczepy wirusa BHV 1 wyizolowane z na-