

JAN BUCZEK, TADEUSZ JASTRZĘBSKI, KRYSZYNA ŻBIKOWSKA

Wirusy cytopatogenne u bydła w Polsce. IV. Izolacja wirusa PI-3 w woj. lubelskim

Z Instytutu Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych Wydziału Weterynarii AR w Lublinie

Zagadnienie występowania wirusów cytopatogennych u bydła w Polsce było od kilku lat przedmiotem naszych zainteresowań. W wyniku przeprowadzonych badań udało nam się izolować kilka nie wyosobnionych dotychczas w kraju zarazków jak enterowirusy i wirusy z grupy *Pox*, oraz wykazać serologicznie możliwość występowania u bydła w Polsce wirusów: parainfluenzy bydła-3, biegunki i choroby błon śluzowych oraz adenowirusów (1, 2, 3, 4, 5, 6).

Wirusy parainfluenzy bydła-3 (PI-3) pierwszy wyizolował od cieląt w Polsce na terenie woj. warszawskiego Kita (9), potwierdzając tym nasze badanie serologiczne. Własne badania wirusologiczne prowadzone w woj. lubelskim doprowadziły również do izolacji wirusów z grupy PI-3. Przeprowadzone jednocześnie badania serologiczne, wskazują na udział izolowanych przez nas zarazków w obserwowanych schorzeniach. Wyniki badań przedstawiono w niniejszej pracy.

Materiał i metody

Materiał do badań stanowiły krew i wymazy z nosa pobierane przyżyciowo od chorych cieląt, oraz wycinki narządów wewnętrznych cieląt poddanych ubojowi diagnostycznemu (tab. 1). Materiał pobierano wyłącznie od zwierząt chorych z klinicznymi objawami zapalenia narządu oddechowego. Wymazy z nosa natychmiast po pobraniu przenoszono do płynu Hanksa i zamrażano w CO₂. Wycinki narządów wewnętrznych przewożono do laboratorium i zamrażano. Pobrany materiał przygotowywano do badań wg metody omówionej w pracy poprzedniej i wysiewano na hodowle komórek nerek cieląt (HKNC) (3).

Zakażone hodowle obserwowano pod małym powiększeniem mikroskopowym (80x) w ciągu 8—9 dni. Hodowle komórek zakażone badanym materiałem, nie wykazujące zmian cytopatycznych nasuwających podejrzenie obecności wirusa, dzielono na dwie grupy. Jedną grupę zamrażano i wysiewano w tzw. ślepych pasażu a z drugą wykonywano odczyn hemadsorbcji Vogela Shelokowa (11). Do odczynu hemadsorbcji używano czerwonych ciałek krwi świnek morskich. Wyniki badania uznawano za negatywne jeśli w 3 kolejnych ślepych pasażach nie stwierdzono ani zmian cytopatogennych (CP) ani hemadsorbcji. Płyn z HKNC w którym zaobserwowano zmiany CP i hemadsorbcję poddawano trzykrotnemu zamrożeniu i odmrożeniu po czym pasażowano dalej na HKNC oraz badano metodą hemaglutynacji (HA). Po trzech kolejnych pasażach izolowane czynniki CP namnażano w większej ilości na HKNC. Zebrany materiał używano do badań fizyko-chemicznych i serologicznych w celu identyfikowania izolowanych czynników CP. Badaniami fizyko-

chemicznymi określono: rodzaj kwasu nukleinowego — przy pomocy inhibitora syntezy DNA 5-jodo-2-de-soksyrydyny (IUDR); obecność lipidów — przy pomocy eteru i chloroformu; wrażliwość na kwaśne pH — pH=3; wpływ jonów Mg na inaktywację cieplną; wielkość metodą filtracji. Metodyka badań — jak w pracach poprzednich (3). Otrzymane wyniki obliczono statystycznie metodą Reeda i Muencha (10) i podano jako ID/50 0,1 ml.

Badania serologiczne przeprowadzono metodą hamowania hemaglutynacji (HI). Odczyn wykonywano wg ogólnie przyjętych zasad. Jako antygen użyto wzorcowy szczep wirusa PI3 SF4 oraz jeden z izolowanych szczepów własnych oznaczony symbolem PI-3 Lublin 71/1. Wszystkie surowice poddawano uprzednio inaktywacji cieplnej (56° — 30 min). Do wykonania odczynu używano czerwonych ciałek krwi świnek morskich, wyniki odczytywano po 24 godz. przetrzymywania mieszaniny wirus-surowica krwinki w temp. 4°. Wyniki przedstawiono jako indeks HI.

Wyniki

Badania wirusologiczne. Ogółem przebadano na HKNC materiał od 87 chorych cieląt w tym 22 próbki pobrane z narządów oddechowych 11 cieląt poddanych ubojowi diagnostycznemu (tab. 1). Wyizolowano 2 czynniki cytopatogenne dla HKNC z wymazów z nosa 2 cieląt chorych. Z pozostałych próbek pomimo trzykrotnych pasażu na HKNC czynników CP nie izolowano.

Tab. 1. Wyniki badań wirusologicznych próbek od cieląt wykazujących objawy zapalenia narządu oddechowego.

Gospodarstwo nr	Liczba zbadanych cieląt	Badane materiały				Ilość izolowanych szczepów
		wymazy z nosa	błona śl. nosa	błona śl. chawicy	ptuca	
1	20	20	—	—	—	0
2	12	12	—	—	—	2
3	18	18	—	—	—	0
4	11	0	9	2	11	0
5	26	26	—	—	—	0
Razem	87	76	9	2	11	2

Pierwsze zmiany CP w HKNC wystąpiły w pierwszym posiewie na 4 i 10 dzień po zakażeniu hodowli. Zaobserwowano najpierw pojedyncze komórki owalne a następnie twory o charakterze syncytialnym. Jednocześnie stwierdzono dodatni odczyn hemadsorbcji. Zmiany CP i odczyn hemadsorbcji z czasem nasilały się; w drugim pasażu zmiany CP i odczyn hemadsorbcji można było zaobserwować już po 2 dniach od zakażenia hodowli. W trzecim pasażu miano izolowanych czynników CP wyniosło 10⁻⁵ TCID₅₀ 0,1 ml a miano HA 1/256. Miano przeciwciał w surowicach cieląt, od których izolowano zarazki wynosiło w dniu pobrania materiału 1/5 a po 40 dniach 1/640.

Jeden z izolowanych czynników CP poddano dokładniejszym badaniom fizyko-chemicznym; wyniki przedstawia tab. 2. Z tabeli wynika, że badany czynnik CP

Tab. 2. Charakterystyka fizyko-chemiczna szczepu PI-3 Lublin 71/1 (TCID 50/0,1 w log).

Wpływ IUDR	Eter CHCl ₃	Wielkość met. filtracji			pH 70	pH 3,0	H ₂ O 56°30'	MgCl ₂ 56°30'	Kontrola
		450mμ	220mμ	30mμ					
6,0	0	5,3	3,4	0	5,3	0	0	5,5	

okazał się niewrażliwy na IUDR, wrażliwy na działanie eteru i chloroformu oraz pH 3; w temp. 56° zarażek ginie w czasie do 30 min; Mg nie posiada w stosunku do niego właściwości stabilizujących. Izolowany CP przechodzi całkowicie przez filtry Millipore o średnicy por 450 nm, częściowo przez filtry o porach 220 nm, nie przechodzi przez filtry o średnicy por 50 nm. Jak już wspomniano izolowany CP posiada silne właściwości hemadsorbcyjne i hemaglutynacyjne w stosunku do czerwonych ciałek krwi świnek morskich.

Tab. 3. Miano HI surowic cieląt chorych z gospodarstwa nr 2 z grupy A (zwierzęta wprowadzone dawno).

Lp	Wirusy użyte do próby HI					
	PJ-3 SF			PJ-3 Lublin 71/1		
	Miano HI „PAR” surowic po upływie dni:					
	0	10	17	0	10	17
1	5	10	20	5	10	40
2	10	80	80	10	40	80
3	10	20	20	5	20	20
4	10	20	80	10	20	80
5	40	80	320	40	80	320
6	320	640	640	320	640	640
7	320	320	640	320	640	640
8	40	40	-	40	80	-
9	40	-	40	40	-	40

Tab. 4. Miano HI surowic cieląt chorych z gospodarstwa nr 2 z grupy B (zwierzęta świeżo zakupione).

Czas pobrania surowicy	Liczba badanych zwierząt	Miano HI „PAR” surowic dla szczepu PJ-3 Lublin 71/1							Wyniki w %	
		rozcieńczenie surowicy 1:							dodatnie	ujemne
		≤5	10	40	80	160	320	640		
1 pobranie w dniu badań wirusologicznych	14	12	1	1	0	0	0	0	7	93
40 dni po 1 pobraniu	14	1	0	0	0	0	1	11	93	7

Badania serologiczne. Badania przeprowadzono przy pomocy odczynu HI. W tab. 3 i 4 zestawiono wyniki badań surowic cieląt z gospodarstwa Nr 2, w którym wyosobniono 2 szczepu PI-3. Surowice do badań pobierano od cieląt chorych zakupionych dawniej w odstępach 0 (grupa A); 10, 17 dni; a od cieląt nowo-wprowadzonych (grupa B) w pierwszym dniu choroby (0) i po 40 dniach. Jak wynikało z wywiadu cielęta grupy B pochodziły z gospodarstw indywidualnych i w dniu wprowadzenia do stada nie wykazywały klinicznych objawów choroby, jednak w dniu pobierania materiału do badań wirusologicznych i serologicznych to jest w czwartym dniu przezywania cieląt w wychowalni u zwierząt tych obserwowano enzootyczne zapalenie narządu oddechowego; jako antygenu użyto

szczepu PI-3 Lublin 71/1.

Tab. 5. Wyniki badań serologicznych surowic cieląt wykazujących objawy zapalenia narządu oddechowego (odczyn HI wirus PI-3 Lublin 71/1).

Gospodarstwo	Liczba badanych surowic	Liczba zbadanych surowic - miano HI 1:								Wyniki w %	
		≤5	10	20	40	80	160	320	640	ujemne	dodatnie
A	15	5	1	3	2	2	1	1	0	40	60
B	10	1	2	1	3	0	0	2	1	30	70
C	9	0	1	3	1	2	0	1	1	11	89
D	8	0	0	2	1	2	0	1	2	0	100
E	21	0	0	0	4	8	4	1	4	0	100
Razem	63	6	4	9	11	14	5	6	8	15	85

Omówienie wyników

Na terenie woj. lubelskiego w wychowalniach cieląt obserwowane są co pewien czas schorzenia dróg oddechowych i przewodu pokarmowego o niezbyt wysokiej śmiertelności, jednak powodujące duże straty ekonomiczne na skutek zahamowania przyrostów ciężaru ciała. W niniejszej pracy przedstawiono wyniki badań wirusologicznych i serologicznych cieląt wykazujących objawy schorzeń dróg oddechowych z 5 różnych gospodarstwach (razem 87 sztuk) w tym materiały sekcyjne od 11 cieląt poddanych ubojowi diagnostycznemu.

Badania te doprowadziły do izolacji na HKNC 2 CP. Czynniki izolowano wyłącznie z wymazów nosa 14 cieląt pochodzących z gospodarstw indywidualnych a wprowadzonych do wspólnej wychowalni, w której już przedtem występowało enzootyczne zapalenie narządu oddechowego. Cielęta te zakupione jako zdrowe zaczęły wykazywać pierwsze objawy schorzenia na 4 dzień po wprowadzeniu. W dniu tym pobrano od nich materiał do badań wirusologicznych oraz krew do badań serologicznych. Badania fizyko-chemiczne wykazały, że izolowane czynniki CP są to wirusy. Dokładniej przebadany prototyp PI-3 Lublin 71/1 posiada kwas nukleinowy typu RNA, wielkość wirionu w granicach 220 nm, jest wrażliwy na eter i chloroform i kwaśne pH, nie podlega stabilizacji w obecności Mg, posiada silne właściwości hemadsorbcyjne i hemaglutynacyjne. Dane te wskazują, że izolowany przez nas zarażek jest wirusem. Odpowiada on kryterium grupy paramyxowirusów, do której zostały zaklasyfikowane m. in. wirusy parainfluenzy bydła-3.

Od cieląt wyhodowanych w danych gospodarstwach lub przebywających tam przez dłuższy okres czasu żadnego czynnika CP nie wyosobniono.

Badania porównawcze w odczynie HI przeprowadzone pomiędzy szczepem prototypowym wirusa PI-3—SF4 a szczepem PI-3 Lublin 71/1, przy użyciu surowic cieląt z naturalnych przypadków enzootycznego zapalenia narządu oddechowego (tab. 3) wykazują niemal całkowitą zgodność mian badanych surowic w stosunku do obydwu szczepów. Badanie porównawcze w odczynie krzyżowym z surowicami specyficznymi, wskazuje na bardzo wysoką zgodność mian surowic pochodzących od zwierząt

uodpornionych izolowanym szczepem PI-3 Lublin 71/1, a surowicami otrzymanymi dla szczepu prototypowego PI-3 — SF 4. Dalsze badania serologiczne pozwolą na dokładne porównanie wszystkich trzech szczepów.

Jak wynika z tab. 3 większość badanych „par” surowic z gospodarstwa 2 neutralizowała badane szczepy już w pierwszym pobraniu (surowica 0). Po upływie 10 i 17 dni u większości badanych zwierząt nastąpił wzrost miana w stosunku do obydwu badanych szczepów. Wyniki te zdają się wskazywać, że obserwowany w tych wychowalniach proces chorobowy był stosunkowo świeży jednak już prawdopodobnie zbyt późny dla wyizolowania wirusa. Obserwowane w tym czasie objawy kliniczne wskazywały na zapalenie narządu oddechowego o różnym nasileniu.

Na specjalną uwagę zasługują wyniki badań serologicznych zestawione w tab. 4. Odnoszą się one do 14 badanych surowic gospodarstwa 2 grupa B pobranych od cieląt zakupionych w gospodarstwach indywidualnych. W 4 dni po wprowadzeniu ich do zakażonego stada aż 12 z nich nie posiadało właściwości HI w stosunku do badanego szczepu PI-3 Lublin 71/1, wyizolowanego od cielęcia z tej grupy. Próbkę surowic tych samych zwierząt pobrane po upływie 40 dni wykazały, że posiadają już one wysokie miano HI. Jak wynika z tab. 4 aż 93% surowic hamowało właściwości hemaglutynacyjne szczepu PI-3 Lublin 71/1 w rozcieńczeniu 1/320, 1/640. Wyniki te zdają się wskazywać, iż izolowane przez nas zarazki odegrały istotną rolę w obserwowanym schorzeniu.

Przedstawione wyniki badań wirusologicznych i serologicznych wskazują, że izolacja wirusów PI-3 od zwierząt chorych jest możliwa wówczas, jeśli materiał do badań pobiera się w pierwszych dniach po zakażeniu. Nasilenie objawów klinicznych może być w tym okresie bardzo nieznaczne. Najczęściej obserwuje się wyciek surowiczno-śluzowy z nosa i oczu, kaszel, przejściowy wzrost temperatury. Ten stan kliniczny zwierząt u większości hodowców nie wzbudza niepokoju, często jest po prostu niezauważony. Zakażenie wirusowe osłabia jednak organizm zwierzęcia, następuje wtórne zakażenie florą bakteryjną często saprofityczną, która wika pierwotny proces chorobowy. Objawy kliniczne nasilają się prowadząc do ciężkich zaburzeń. Próby izolacji wirusa z tych przypadków, jak wynika z naszych własnych kilkuletnich doświadczeń, kończą się niepowodzeniem — chociaż objawy kliniczne, zmiany anatomo-patologiczne, enzootyczny przebieg choroby i mało przekonujące badania bakteriologiczne zachęcają do podejmowania badań wirusologicznych. Badania serologiczne surowic wykazują w tych przypadkach wysoki

poziom przeciwciał dla wirusa PI-3 lub wzrost ich miana — stanowią one jedyny dowód obecności wirusa.

Badania serologiczne przeprowadzone w 5 gospodarstwach wskazują, że właściwości hamowania hemaglutynacji izolowanego przez nas szczepu PI-3 Lublin 71/1 posiadało średnio 85% badanych surowic. W niektórych przypadkach ilość ta wynosiła nawet 100%. Powyższe wyniki wskazują na dużą inwazyjność izolowanego szczepu. Badania te są zgodne z wynikami badań Hamroucha i Buczka (8), którzy u bydła dorosłego wykazali przeciwciała dla szczepu PI-3 Lublin 71/1 niemal u 100% badanych zwierząt. Badania Deli i Jasińskiego (7) wskazują również, że surowice różnych gatunków zwierząt i człowieka posiadają właściwości hamowania hemaglutynacji wirusa PI-3 Lublin 71/1, co może wskazywać na jego szerokie rozprzestrzenienie. Jaka jest istotna rola izolowanych zarazków w obserwowanych przez nas schorzeniach? Na to pytanie będzie można odpowiedzieć po przeprowadzeniu odpowiednich badań.

Piśmiennictwo

1. Buczek J.: *Medycyna Wet.* 25, 470, 1969.
2. Buczek J.: *Polskie Arch. Wet.* 13, 303, 1970.
3. Buczek J.: *Polskie Arch. Wet.* 13, 317, 1970.
4. Buczek J., Jastrzębski T.: *Medycyna Wet.* 21, 725, 1965.
5. Buczek J., Wrzosek G., Ziółkowska G.: *Medycyna Wet.* 29, 1973.
6. Buczek J., Krzyżanowski J., Majer B., Malinowski E.: *Medycyna Wet.* 29, 277, 1973.
7. Dela W., Jasiński Z.: *Medycyna Wet.* 29, 85, 1973.
8. Hamrouch A., Buczek J.: *Medycyna Wet.* 29, 398, 1973.
9. Kita J.: *Polskie Arch. Wet.* 14, 11, 1971.
10. Reed L. J., Muench H.: *Am. J. Hyg.* 27, 493, 1938.
11. Vogel J., Shelokow A.: *Science* 126, 358, 1957.

Adres autora: doc. dr Jan Buczek, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin.

Бучек Я., Ястшембски Т., Жбиковска К. — Цитопатогенные вирусы у крупного рогатого скота в Польше. IV. Выделение вируса параинфлюэнцы-3 (PI-3) в Люблинском воеводстве.

Исследовали вирусологически и серологически 87 телят проявляющих симптомы воспаления дыхательного аппарата. Вирусологические посевы производили на культурах клеток почек телят; материалом для посевов были прижизненно взятые мазки из носа 76 телят и образцы легких 11 телят подвергнутых диагностическому убою. Два цитопатогенные факторы (ЦПФ) выделили из носовых мазков 14 телят введенных здоровыми в общий телятник, в котором уже раньше у телят наблюдали энзоотическое воспаление дыхательного аппарата. В день взятия мазков для вирусологических исследований у телят вступали уже первые симптомы заболевания (темп. 39,5°, истечения из носа и глаз). Оба ЦПФ оказались вирусами. Более подробно исследованный штамм — PI-3 Lublin/71/1 отвечает критериям для парамыксовирусов и серологически сходен с прототипом PI-3/SF4.

У больных телят установили методом торможения гемагглютинации (HI) повышение титра сывороток для штамма PI-3 Lublin/71/1. Серологические исследования в 5 разных фермах обнаружили антитела HI у 60—100% исследованных животных, что указывает на широкое распространение вируса PI-3 в этих хозяйствах.

Buczek J., Jastrzębski T., Żbikowska K. — **Cytopathic viruses of cattle in Poland.**

There were performed virologic and serologic examinations of calves suffering from the signs of inflammation of the respiratory system. The virologic studies were carried out on kidney cells of calves. The swabs for examinations were taken from the nose (from 76 animals) and from the respiratory system of eleven calves killed for diagnostic purposes. There were isolated two cytopathic agents from the swabs from the nose of calves which were considered as healthy and were kept together with other calves with enzootic inflammation of the respiratory system. In the

calves examined there appeared the first signs of the disease at the day when the material was being taken (discharge from eyes and nose, temperature — 39,5°C). The investigations revealed that the isolated agents were viruses. The more carefully examined the prototype PI-3 Lublin 71/1 corresponded to paramyxoviruses. Serological studies showed its antigenic similarity to PI-3 SF4. The examinations carried out by HI test revealed an increase of antibodies against PI-3 Lublin 71/1 in sick animals. The serological examinations done in 5 farms showed that HI antibodies were found in 60—100% of animals under study that indicate that the virus is wide-spread.

ZOFIA KAPP-BURZYŃSKA, EDWARD NOLEWAJKA, KRYSZYNA PAWLAK
JERZY SZAFLARSKI, JADWIGA TRZECIAK

Przydatność wybranych odczynów serologicznych w diagnostyce fasciozy u bydła. III. Porównanie wartości odczynu wiązania dopełniacza z odczynem precypitacji w żelu agarowym i próbą jodową*)

Z Zakładu Mikrobiologii Instytutu Biologiczno-Fizjologicznego Śląskiej AM w Katowicach

Z Zakładu Higieny Weterynaryjnej w Katowicach

Możliwość wykrycia przeciwciał przeciwko *F. hepatica* przed pojawieniem się jej pasożyta w kale (14) sprawia, że zainteresowanie immunodiagnostyką fasciozy nie słabnie. Dotąd nie osiągnięto jednak jednomyślności co do przydatności poszczególnych odczynów serologicznych w diagnostyce tego schorzenia. W poprzednich naszych pracach przedstawiło ocenę przydatności odczynu precypitacji w żelu agarowym i próby jodowej w diagnostyce fasciozy u bydła (5, 6). W niniejszym doniesieniu porównano przydatność odczynu wiązania dopełniacza (OWD) z odczynem precypitacji w żelu i próbą jodową w immunodiagnostyce tego schorzenia u bydła.

Dotychczas OWD stosowano, z użyciem różnych antygenów i w różnych modyfikacjach, dla wykrywania przeciwciał w surowicach immunizowanych zwierząt doświadczalnych (7, 9, 11), w doświadczalnej fasciozie królików (4, 9) oraz w celach diagnostycznych (1—3, 13).

Materiał i metody

Przedmiotem badań było 295 surowic bydła rzeźnego, w tym 226 z poubojowo stwierdzoną fasciozą. Kontrolną grupę stanowiło 69 surowic zwierząt nie wykazujących ani obecności pasożytów, ani zmian w wątrobie.

*) Praca finansowana przez Komitet Parazytologiczny PAN.

Przygotowanie antygeny. Wstępne badania surowic bydła zarażonego *F. hepatica* w OWD wykazały nieprzydatność poprzednio (5, 6) opisanego antygeny. W związku z tym zastosowano inną metodykę. Po wielokrotnym przepłukaniu pasożyta najpierw wodą wodociągową, a potem destylowaną, mieszano masę pasożyta w stosunku 1:1 z płynem fizjologicznym. Następnie taką mieszaninę homogenizowano 10 × po 3 min. przy użyciu robota laboratoryjnego 309. Zhomogenizowany materiał zamrażano i rozmrażano w mieszaninie suchy lód-alkohol 20 ×. Tak uzyskany homogenat dializowano wobec płynu fizjologicznego przez 3 kolejne dni. Po dializie materiał wirowano. Płyn z nad osadu traktowano jako antygen i przechowywano w temp. —20°C. Otrzymany antygen badano używając króliczych surowic odpornościowych i stwierdzono jego aktywność w precypitacji w żelu agarowym i OWD. Przygotowany antygen zawierający ok. 0,7 g % białka stosowano w OWD i odczynie precypitacji w żelu agarowym.

Odczyn precypitacji w żelu agarowym wykonywano wg Ouchterlony'ego (10), a próbę jodową wg Mallena (cyt. za 8).

Odczyn wiązania dopełniacza. Badane surowice bydła inaktywowano w 59°C przez 30 min. W przypadku przetrzymywania przez kilka dni surowice ponownie inaktywowano przez 10 min. Stosowano kolejne rozcieńczenia surowicy od 1/10, 1/20, 1/40 itd. Kontrolę surowicy wykonywano z surowicą rozcieńczoną 1/10. Opisany antygen używano w rozcieńczeniu 1/80. W próbie właściwej do 0,25 ml odpowiednio rozcieńczonej surowicy dodawano 0,25 ml antygeny i 0,5 ml dopełniacza rozcieńczonego zgodnie z wynikiem miareczkowania. Tak zmieszane składniki wstawiano na 18 godz. do chłodni o temp. ok. +4°C. Następnie dodawano po 0,5 ml 1% krwinek baranich uczulonych amboceptorem. Tak przygotowane próbki wstawiano do łaźni wodnej o temp. +37°C. Wyniki odczytywano po wystąpieniu pełnej hemolizy w kontrolach.