

# Przypadek zakażenia zająca wirusem krwotocznej choroby zającej

MARTA CHROBOCIŃSKA, WOJCIECH KOZACZYŃSKI\*, ZBIGNIEW MIZAK\*\*, BEATA MIZAK

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

\*\*Wojskowy Instytut Higieny i Epidemiologii, Ośrodek Badań Weterynaryjnych, ul. Lubelska 2, 24-100 Puławy

Chrobocińska M., Kozaczyński W., Mizak Z., Mizak B.

## The case of infection of hare with European brown hare syndrome virus

### Summary

The results of studies on a dead hare are presented. The anatomopathological lesions suggested infection with European brown hare syndrome (EBHS) virus. The ELISA and electron microscopy studies demonstrated the presence of viral antigen and particles morphologically similar to calicivirus.

**Keywords:** EBHS, virus, anatomo- and histopathological lesions, ELISA.

Krwotoczna choroba zającej, nazywana też syndromem zająca szaraka (EBHS – European brown hare syndrome), pojawiła się w krajach europejskich pod koniec lat 80-tych (1, 3, 6-12). W 1989 r. badaniem elektronomikroskopowym, w wątrobie padłego zająca, stwierdzono obecność cząstek wirusowych podobnych do wirusa pomoru królików (krwotoczna choroba królików, RHD – Rabbit haemorrhagic disease) (8). Obydwa wirusy wywołują chorobę o podobnym przebiegu klinicznym i zmianach anatomopatologicznych. Szczegółowe badania nad tymi wirusami pozwoliły na zaklasyfikowanie ich do rodziny *Caliciviridae*.

W Polsce badania nad zakażeniami zającej wirusem EBHS są prowadzone w Państwowym Instytucie Weterynaryjnym od 1990 r., a w 1992 r. wykazano jego obecność w narządach wewnętrznych padłego zająca (2). Również badania przeprowadzone w latach 1993//94 przez Frölicha i wsp. (4) wykazały obecność przeciwciał w surowicach i wirusa w narządach wewnętrznych u zającej w Polsce. Badania serologiczne wykonane w okresie zimowych odłowów zającej, potwierdziły szerokie rozprzestrzenienie zakażeń wirusem EBHS w populacji tych zwierząt w kraju. Dostępność świeżego materiału do badań, w kierunku obecności antygeny wirusowego, jest jednakże ograniczona. W niniejszej pracy przedstawiono wyniki badań zająca padłego w listopadzie 1998 r. na terenie woj. lubelskiego.

### Materiał i metody

**Materiał.** Narządy wewnętrzne (wątroba, śledziona, płuca, nerka), pobrane w czasie sekcji, stanowiły materiał do badań. Z wycinków narządów, przemrożonych w  $-70^{\circ}\text{C}$ , przygotowano 20% homogenizaty w buforze fosforanowym o pH 7,0. Do supernatantów po odwirowaniu dodawano

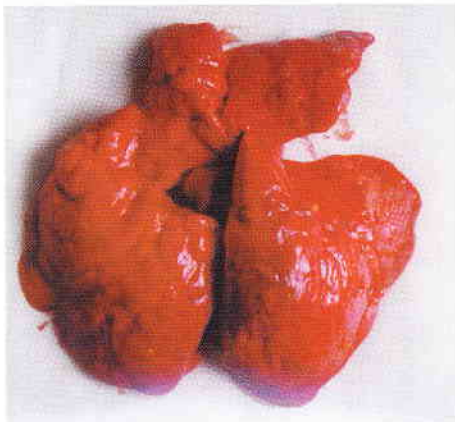
10% chloroformu i po kolejnym wirowaniu płyn nad osadu badano w odczynie hemaglutynacji (HA) i ELISA. Tak przygotowany materiał z wątroby poddano oczyszczaniu i zagęszczaniu poprzez ultrawirowanie przy 28 000 obr./min. przez 2h, z zastosowaniem 30% sacharozy, w wirówce Beckmann (rotor 70 Ti).

**Badanie histopatologiczne.** Pobrane podczas sekcji wycinki narządów wewnętrznych utrwalono w 10% zbuforowanej formalinie. Następnie sporządzono z nich skrawki parafinowe, które barwiono hematoksyliną i eozyną. Dodatkowo wykonano badanie w kierunku obecności tłuszczów. W tym celu utrwalone wycinki wątroby cięto na mikrotomie mroźniowym, a skrawki barwiono sudanem III.

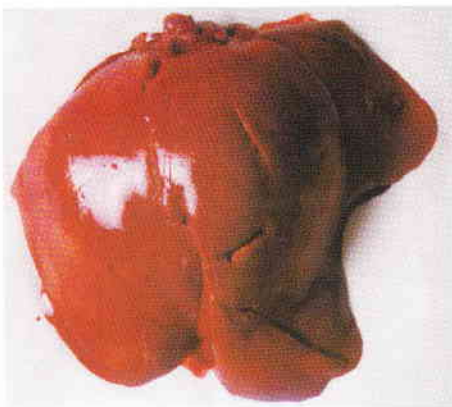
**Badanie elektronomikroskopowe.** Do badania użyto zawiesinę wirusa w buforze fosforanowym, przygotowaną po ultrawiroowaniu. Zastosowano barwienie negatywowe 2% roztworem molibdenianu amonu. Preparaty oglądano w mikroskopie elektronowym Tesla BS 500 przy powiększeniu 24 000-32 000 $\times$ .

**Odczyn hemaglutynacji.** Badanie wykonano mikrometodą w płytkach 96-basenikowych „U”. Badane próbki rozcieńczano 2-krotnie, od 1/5 do 1/10 240 w buforze fosforanowym o pH 6,5, bezpośrednio w basenikach. Następnie dodawano równą objętość 0,75% erytrocytów ludzkich grupy „0” i mieszaninę inkubowano w temperaturze  $4^{\circ}\text{C}$ .

**ELISA.** Badanie obecności antygeny wirusowego, w próbkach narządów, wykonywano równolegle na płytkach 96-basenikowych (Nunc Maxisorp), opłaszczonych surowicą dodatnią i ujemną (2). Próby rozcieńczano 2-krotnie od 1/5 do 1/2560, stosując jednocześnie antygeny kontrolne dodatni i ujemny. Po 1 h inkubacji w  $37^{\circ}\text{C}$ , płytki płukano i w takich samych warunkach, prowadzono kolejną inkubację z przeciwciałami (IgG oczyszczone z surowicy dodatniej) znakowanymi peroksydazą chrzanową. Substrat stanowiło OPD, a reakcję barwną zatrzymywano 1M kwa-



Ryc. 1. Przekrwione płuca



Ryc. 3. Wątroba – barwy gliniasto-czerwonej, krucha



Ryc. 4. Nerki – przekrwienie części korowej i rdzennej



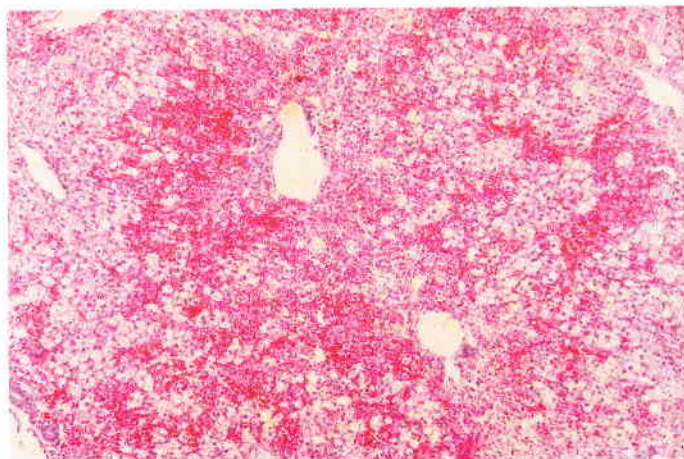
Ryc. 2. Śledziona – przekrwienie i obrzęk (wyraźnie zaokrąglone brzegi)

sem siarkowym. Wartość OD odczytywano w czytniku MRX (Dynex) przy długości fali 490 nm. Miano antygeny badanego stanowiła odwrotność tego rozcieńczenia, przy którym wartość odczytu OD wynosiła  $\geq 0,6$ , przy wartości odczytu dla antygeny kontrolnego dodatniego  $> 1,5$  i ujemnego  $< 0,2$ .

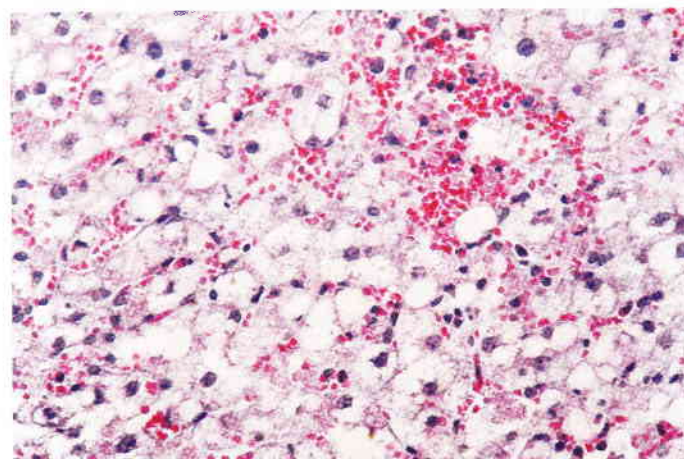
### Wyniki i omówienie

Badaniem anatomopatologicznym stwierdzono u zajęca przekrwienie płuc (ryc. 1) i błony śluzowej tchawicy oraz obecność w tchawicy krwistego płynu. Śledziona o zaokrąglonych brzegach była również przekrwiona (ryc. 2). Wątroba barwy gliniasto-czerwonej, wykazywała wyraźną budowę zrazikową (ryc. 3), zaś w nerkach stwierdzono przekrwienie części korowej i rdzennej (ryc. 4). Ponadto obserwowano ogniskowe przekrwienia błony śluzowej jelit i obecność płynu barwy bursztynowo-czerwonej w jamie otrzewnej. Obrzęki i przekrwienia narządów wewnętrznych mogą być wywoływane przez różne czynniki. Obserwuje się je także często w przebiegu zakażenia wirusem EBHS (1, 6-8).

Badanie histopatologiczne wątroby wykazało zatarcie prawidłowej struktury narządu, wyrażające się przekrwieniem mięszu, połączonym z wydostawaniem się krwi poza naczynia krwionośne (ryc. 5) oraz gąbczastą strukturą tkanki wątrobowej. Gąbczasty charakter mięszu był następstwem zwyrodnienia tłuszczowego i wodniczkowego komórek wątrobowych. W tak zmienionym chorobowo obszarze tkanki albo widoczne były hepatocyty o ledwie zaznaczonej cytoplazmie, albo też regularne, puste przestrzenie, będące pozostałością po wypłukanym tłuszczu, wypełniały całą komórkę wątro-

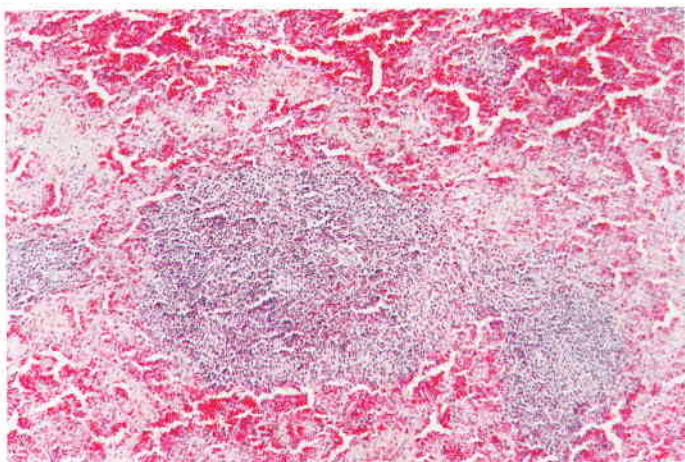


Ryc. 5. Przekrwienie i wynacznienie krwi w wątrobie, H-E, pow. 100×

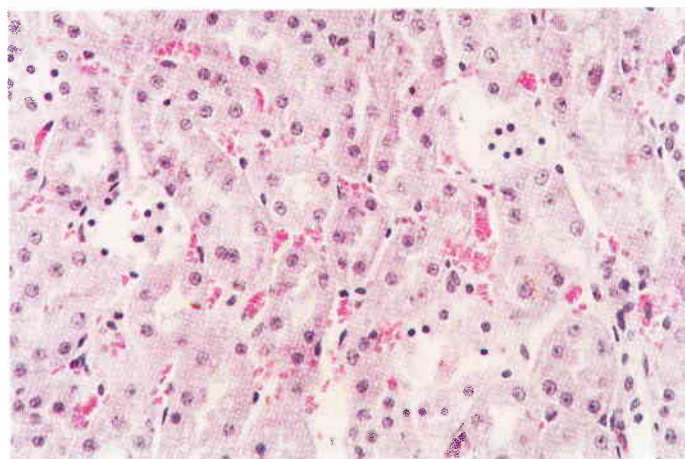


Ryc. 6. Wątroba – gąbczasta struktura tkanki, H-E, pow. 400×

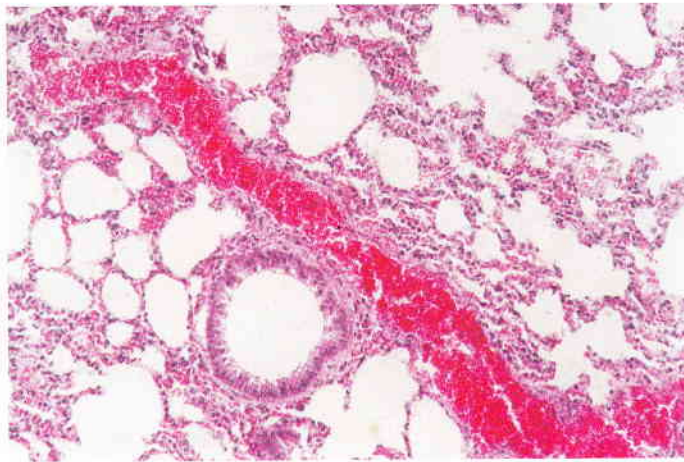
bową. Zepchnięte na obrzeże jądro komórkowe ulegało spłaszczeniu. W niektórych hepatocytach dochodziło także do całkowitego zaniku jąder, a komórkę reprezentowała jedynie błona komórkowa (ryc. 6). Kolejnymi narządami, w których obserwowano zmiany związane z zaburzeniami krążenia były śledziona, nerki i płuca. W śledzionie (ryc. 7), oprócz przekrwienia mięszu czerwonej, dochodziło do wyraźnej proliferacji tkanki limfoidalnej, natomiast w umiarkowanie przekrwionym mięszu nerek, obserwowano lokalną martwicę



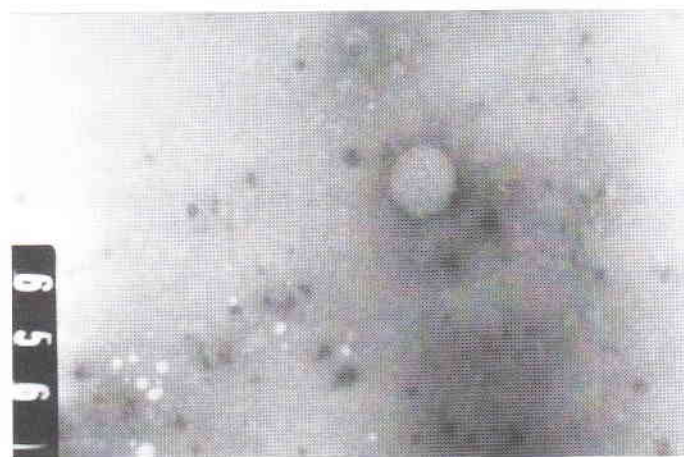
Ryc. 7. Przekrwienie mięszu i rozrost miazgi białej śledziony, H-E, pow. 100×



Ryc. 8. Nerka – umiarkowanego stopnia przekrwienie tkanki i złuszczenie się zmartwiałego nabłonka kanalików nerkowych, H-E, pow. 400×



Ryc. 9. Płuca – wynaczynienie krwi w pobliżu oskrzelika i miejscowe poszerzenia przegród międzypęcherzykowych, H-E, pow. 200×



Ryc. 10. Cząstka wirusowa – obraz elektronomikroskopowy, barwienie negatywowe

komórek nabłonka, który złuszczał się do światła kanalików nerkowych (ryc. 8). W tkance płucnej sporadycznym wynaczynieniem krwi towarzyszyły miejscowe poszerzenia przegród między pęcherzykami płucnymi (ryc. 9). Przedstawione zmiany histopatologiczne korelowały ze zmianami morfologicznymi obserwowanymi przez innych badaczy przy zakażeniu wirusem EBHS (3, 5-8, 10).

Badanie homogenizatów narządów wewnętrznych w odczynie hemaglutynacji dało wynik negatywny. Natomiast w ELISA stwierdzono obecność antygenu wirusowego w mianie: w wątrobie – 640, śledzionie – 320, płucach – 40 i nerkach – 10. Największą koncentrację antygenu wykazano, podobnie jak w przypadku zakażeń wirusem RHD, w wątrobie i śledzionie.

Badaniem elektronomikroskopowym wykazano obecność bezotoczkowych cząstek wirusowych, o średnicy ok. 30-32 nm i symetrii kubicznej (ryc. 10). Podobnie morfologicznie cząstki wirusowe opisywali inni badacze w przypadku zakażeń wirusem EBHS u zajęcy (1, 4, 8, 9, 12).

Przedstawione wyniki świadczą o zakażeniu badanego zajęcia wirusem EBHS. Obserwowane przez my-

śliwych liczne padnięcia zajęcy na terenach łowieckich, mogą być również spowodowane zakażeniem tym wirusem. Uzyskanie pozytywnego wyniku w badaniach wirusologicznych jest jednakże uwarunkowane otrzymaniem świeżego materiału do badań, co w przypadku zwierząt wolno żyjących jest trudne.

### Piśmiennictwo

1. Chasey D., Duff P.: Vet. Rec. 126, 623, 1990.
2. Chrobocińska M., Górski J.: Bull. vet. Inst. Pulawy 39, 17, 1995.
3. Eskens U., Volmer K.: Dt. tierärztl. Wschr. 96, 433, 1989.
4. Frölich K., Meyer H. H. D., Pielowski Z., Ronsholt L., Seck-Lanzendorf S., Stolte M.: J. Wildlife Dis. 32, 280, 1996.
5. Fuchs A., Weissenböck H.: J. Comp. Path. 107, 103, 1992.
6. Gustafsson K., Svensson T., Uggla A.: J. Vet. Med. A 36, 631, 1989.
7. Henriksen P., Gavier D., Elling F.: Vet. Rec. 125, 486, 1989.
8. Lavazza A., Vecchi G.: Estratto selez. Vet. 30, 461, 1989.
9. Morisse J. P., Picault J. P., Boilletot E., Morin M.: Rev. Méd. Vét. 141, 463, 1990.
10. Okerman L., Van de Kerckhove P., Osaer S., Devriese L., Uyttebroek E.: Vlaams Diergeneesk. Tijdschr. 58, 44, 1989.
11. Steineck Th., Nowotny N.: Tierärztl. Umschau 48, 225, 1993.
12. Valicek L., Smid B., Rodak L., Sevcik J.: Veterinarstvi 42, 6, 1992.

Adres autora: dr Marta Chrobocińska, ul. Kaniowczyków 6/15, 24-100 Pulawy; e-mail: mchrob@esterka.piwet.pulawy.pl