

Wykrywanie wirusa krwotocznej choroby królików u chorych zwierząt

ANDRZEJ FITZNER, ANDRZEJ KĘSY, WIESŁAW NIEDBALSKI, GRAŻYNA PAPROCKA

Zakład Pryszczycy PIWet., ul. Wodna 7, 98-220 Zduńska Wola

Fitzner A., Kęsy A., Niedbalski W., Paprocka G.

Detection of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) in sick animals

Summary

Rabbit haemorrhagic disease (RHD) is a highly contagious viral disease of both domestic and wild rabbits. The infection is rapid and in a very short time leads to the injury of some of internal organs and as a consequence to the death of animals.

The aim of this study was to detect RHDV in the blood and organs of infected rabbits by different diagnostic methods. The rabbits were experimentally infected by subcutaneous inoculation. Using haemagglutination (HA) and ELISA tests the RHDV antigen was detected in organs at 26-38 hours post infection (h.p.i.). The application of RT-PCR and n-PCR resulted in the identification of viral genome as early as at 7-9 h.p.i. By using ELISA assay it was possible to detect RHDV in blood from the 20 h.p.i., 5-7 hours before the death of the animals.

The obtained results confirmed the usefulness of the applied diagnostic techniques for the detection of RHDV in clinical samples.

Keywords: Rabbit haemorrhagic disease (RHD), diagnostic methods, blood, organs, virus detection.

Wirusowa krwotoczna choroba królików – rabbit haemorrhagic disease (RHD) jest zakaźną chorobą królików z gatunku *Oryctolagus cuniculus*. Po raz pierwszy rozpoznano ją w Chinach w 1984 r., a niedługo potem swym zasięgiem objęła kraje Azji, Europy, Afryki, Ameryki Środkowej (10, 17, 18). W Australii, kontynencie wolnym od tej choroby, wirus krwotocznej choroby królików (RHDV) został wprowadzony do środowiska naturalnego pod kontrolą, w celu zwalczania populacji dzikich królików (13).

Wirus RHD należy do rodziny *Caliciviridae*. Szczepki wirusa izolowane z różnych obszarów geograficznych w pierwszych latach występowania choroby charakteryzowały się zdolnością do aglutynowania erytrocytów człowieka grupy 0 i były zakaźne dla królików około dwumiesięcznych i starszych (5, 17-19). W okresie późniejszym opisano również występowanie patogennych izolatów – pozbawionych właściwości hemaglutynujących, a także blisko spokrewnionego z wirusem RHD króliczego calicivirusa – RCV, który u królików nie wywołuje choroby ale powoduje serokonwersję (3, 4, 16). Zakażenie RHDV przybiera najczęściej postać ostrą, jest procesem bardzo dynamicznym, charakteryzującym się bardzo krótkim okresem inkubacji i prowadzi do masowych padnięć zwie-

rząt. Śmierć występuje nagle, w ciągu 24-27 godzin od zakażenia. W badaniach procesu patogenezy wykazano, że wirus atakuje wątrobę wywołując stan ostrego, martwicowego zapalenia i stąd rozprowadzany jest po całym organizmie, prowadząc do ciężkich uszkodzeń narządów mięsaszowych. Izoluje się go z płuc, śledziony, grasicy, nerek i serca. Do diagnostyki laboratoryjnej RHD stosuje się odczyn hemaglutynacji (HA), test ELISA, immunofluorescencji (IF) oraz techniki mikroskopii elektronowej (1, 2, 8-10, 14, 18). Dotychczasowe badania przebiegu zakażenia opierały się głównie na obserwacjach histopatologicznych i przy pomocy mikroskopu elektronowego. Niedawno przedstawiono wyniki dotyczące wykrywania wirusa RHD w narządach wewnętrznych królików we wczesnych fazach zakażenia z wykorzystaniem łańcuchowej reakcji polimerazy – PCR (12).

Celem badań było wykrywanie wirusa RHD w narządach wewnętrznych i krwi królików w trakcie trwania infekcji.

Materiał i metody

Zwierzęta. 71 królików w wieku 3 miesięcy, o wadze ok. 3,0 kg, wolnych od przeciwciał RHD, od których pobierano krew z żyły brzeżnej ucha, do jałowych strzyka-

wek (S-monovette LH – Sarstedt) zawierających heparynę i wirowano przy 2000 obr./min. Do dalszych badań użyto osocze.

Przebieg doświadczenia. Zwierzęta podzielono na dwie grupy. Grupa I – 31 królików, została podzielona na 3 podgrupy po 11, 11 i 9 zwierząt, od których pobrano krew w godz. 0 i zakażono wirusem. Począwszy od 7 godziny po zakażeniu (h.p.i.) od wszystkich zwierząt tej grupy pobierano krew i wykrwawiano zgodnie z przyjętym schematem wg tab. 1. Następnie pobierano narządy wewnętrzne – wątrobę, płuca, śledzionę, nerki, grasycę i sporządzano z nich 20% homogenaty, które oczyszczono przez chloroformowanie i wirowanie, a dalej badano w testach HA, ELISA, RT-PCR i n-PCR. Grupę II – stanowiło 36 królików zakażonych jak w gr. I, które obserwowano do 120 godzin. Krew pobierano w 20, 25, 32, 43, 50, 55, 66, 75, 94 godz. doświadczenia i badano testem ELISA w kierunku wirusa RHD. Kontrolę stanowiły dwa króliki nie zakażone, przechowywane w oddzielnym pomieszczeniu, poddane tylko obserwacji.

Wirus. Do badań użyto laboratoryjny szczep KGM o właściwościach zakaźnych, w postaci 20% zawiesiny wątroby w PBS, oczyszczony chloroformem i zakonserwowany glicerolem, o mianie w odczynie hemaglutynacji (HA) – 10240. Króliki zakażono podskórnie, dawką o objętości 1,5 ml.

Izolacja wirusowego RNA. Z prób homogenatów i osocza krwi RNA izolowano za pomocą zestawu do izolacji – Rneasy kit (Qiagen) zgodnie z metodyką zalecaną przez producenta.

Odczyn hemaglutynacji (HA). Wykonywano w mikropłytkach, stosując 0,75% zawiesinę erytrocytów ludzkich grupy 0. Wynik podano jako miano hemaglutynacyjne wirusa (HA) (5).

Test ELISA. Wykorzystano zestaw do testu sandwich ELISA w kierunku wirusa i przeciwciał RHD (6). Koncentrację wirusa RHD wyrażono jako wartość absorpcji przy dł. fali 490 nm (OD) w badaniu punktowym w rozcieńczeniu 1:5.

Startery oligonukleotydowe. Sekwencje starterów opracowano wg Guittre i wsp. (11). Użyto 2 par swoistych starterów oznaczonych jako P1 (5'gagctcgagcgaacagc) i P2 antysense (5'caaacactgacccggcaac) oraz P3 (5'accagttcagtggttacagc) i P4 antysense (5'ctatgaagcgaactgcatgcc) z regionu genomu wirusa kodującego białko strukturalne (VP60).

Reakcja RT-PCR. Reakcję odwrotnej transkrypcji prowadzono przy użyciu antysensownego startera P5 (7071), mieszaniny dNTPs i enzymu odwrotnej transkryptazy-AMV (7). Amplifikowano odcinek P1, P2 o wielkości 510 pz. z N-końcowej części regionu kodującego białko kapsydu.

Reakcja n-PCR. Powielano odcinek wewnętrzny genomu w stosunku do fragmentu P1, P2 kodowany przez parę starterów P3 (5206-5226), P4 (5671-5650) o wielkości 465 pz. Matrycę cDNA stanowiły produkty reakcji PCR.

Analiza produktów amplifikacji. Produkty reakcji enzymatycznej amplifikacji (RT-PCR i n-PCR) rozdzielano w 1,5% żelu agarozowym, inkubowano w roztworze bromku etydyny i dokumentowano w systemie Image Store 5000 (UVP).

Wyniki i omówienie

Spośród królików z grupy I, 20 zwierząt wykrwawiono, w tym 2 osobniki po wystąpieniu klinicznych objawów choroby. Pozostałe 11 padło po 24 godz. Dwa, nie zakażone króliki kontrolne przeżyły okres obserwacji. Badania makroskopowe zwierząt padłych wykazały zmiany degeneracyjne mięszu wątroby, silne przekrwienie oraz obrzęk wątroby, śledziony, nerek, obrzęk i zapalenie płuc i nie różniły się od wcześniej opisanych w badaniach własnych i przez innych autorów (5, 9, 18, 20). W narządach wewnętrznych większości zwierząt wykrwawionych do 33 h.p.i., badanych testem HA i ELISA, wirusa RHD nie wykrywano (króliki nr 1, 2, 3, 4, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 23, 24, 25, 26 i 27). Był on natomiast obecny w próbach od królików padłych nr 9, 21, 30 i nr 5 oraz 10 skrwawionych w agonii. Najwyższe miana HA i ELISA stwierdzono w wątrobie i śledzionie, a następnie w grasicy i w płucach. Obecność wirusa potwierdzono w wątrobie, śledzionie i płucach u wszystkich królików skrwawionych w agonii lub padłych spontanicznie powyżej 27 godz. od zakażenia. W nerkach i grasicy pobranych od królików nr 5, 10, 18, 20, 21 wyniki dotyczące miana i występowania wirusa były zróżnicowane (tab. 1).

Badanie narządów wewnętrznych metodą PCR wykazało obecność produktów amplifikacji RNA w wątrobie i grasicy królików nr 1 i 12 między 7-9 h.p.i. Wyniki dodatnie stwierdzano także w płucach, śledzionie i nerkach tych zwierząt. U królika nr 11 (7 h.p.i.)

1 2* 3 4* 5 6* M 7 8* 9 10* 11 12 13 14*



Ryc. 1. Elektroforeza produktów amplifikacji RNA wirusa RHD metodą PCR i n-PCR, izolowanego z różnych narządów wewnętrznych pobranych w trakcie zakażenia

Objaśnienia: * produkt reakcji n-PCR; od lewej: ścieżka 1 i 2* – wątroba królika nr 1 (7 h.p.i.), ścieżka 3 i 4* – grasica królika nr 2 (16 h.p.i.), ścieżka 5 i 6* – wątroba królika nr 5 (26 h.p.i.), M – marker 1000, 750, 500, 300, 150, 50 pz. (Promega), ścieżka 7 i 8* – śledziona królika nr 23 (9 h.p.i.), ścieżka 9 i 10* – wątroba królika nr 24 (14 h.p.i.), ścieżka 11 i 12 – płuca i nerki królika nr 26 (24 h.p.i.), ścieżka nr 13 i 14* – śledziona królika nr 13 (13 h.p.i.).

Tab. 1. Wykrywanie wirusa RHD w narządach wewnętrznych zakażonych królików metodami HA, ELISA, RT-PCR, n-PCR (grupa I)

| Czas (h.p.i.) | Królik | Wątroba | | | | Płuca | | | | Nerki | | | | Śledziona | | | | Grasica | | | |
|---------------|--------|---------|-------|-----|-------|-------|-------|-----|-------|-------|-------|-----|-------|-----------|-------|-----|-------|---------|-------|-----|-------|
| | | HA | ELISA | PCR | n-PCR | HA | ELISA | PCR | n-PCR | HA | ELISA | PCR | n-PCR | HA | ELISA | PCR | n-PCR | HA | ELISA | PCR | n-PCR |
| 7 | 1s | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | + | + |
| | 11s | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 9 | 12s | - | - | + | | - | - | + | | - | - | + | | - | - | + | | - | - | + | |
| | 23s | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | - | - | - | + | - | - | + | |
| 13 | 13s | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | + | | - | - | - | + | - | - | - | + |
| | 24s | - | - | + | + | - | - | + | | - | - | + | | - | - | + | | - | - | + | |
| 16 | 2s | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | + | - | - | - | + |
| | 3s | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - | | - | - | + | | - | - | + | + |
| 20 | 14s | - | - | + | + | - | - | + | | - | - | - | + | - | - | + | | - | - | - | + |
| | 25s | - | - | + | | - | - | - | - | - | - | + | | - | - | + | | - | - | - | |
| 24 | 15s | - | ± | + | | - | - | + | + | - | - | + | | - | - | + | | - | - | + | |
| | 26s | - | - | + | | - | - | + | | - | - | + | | - | - | + | | - | - | + | |
| 26 | 5s* | +++ | + | + | + | ++ | + | + | | - | + | + | | +++ | + | | | + | + | | |
| | 27s | - | ± | + | | - | - | - | - | - | - | + | | - | - | + | | - | - | + | |
| 27 | 30p | +++ | + | + | | +++ | + | + | | +++ | + | + | | +++ | + | + | | ++ | + | - | - |
| | 28 | 9p | +++ | + | | +++ | + | + | | + | + | | | +++ | + | | | +++ | + | | |
| 30 | 21p | +++ | + | + | | + | + | + | | - | ± | + | | + | + | + | | ++ | + | + | |
| 31 | 16s | - | ± | + | | - | - | | | - | - | | | - | - | + | | - | - | + | |
| 33 | 4s | - | - | - | + | - | - | | | - | - | | | - | - | | | - | - | | |
| | 10s* | +++ | + | + | | + | + | + | | - | - | + | | +++ | + | + | | - | - | + | |
| 34 | 17p | +++ | + | + | | ++ | + | | | ++ | + | | | +++ | + | | | ++ | + | | |
| | 28p | +++ | + | + | | +++ | + | | | +++ | + | | | +++ | + | | | +++ | + | | |
| 36 | 8p | +++ | + | | | +++ | + | | | ++ | + | | | +++ | + | | | +++ | + | | |
| | 20p | +++ | + | | | ++ | + | | | + | + | | | +++ | + | | | + | ± | | |
| 38 | 18s | +++ | + | + | + | + | + | | | +++ | + | | | +++ | + | + | | + | ± | + | |
| | 19p | +++ | + | | | +++ | + | | | + | + | | | +++ | + | | | +++ | + | | |
| 39 | 22p | +++ | + | | | +++ | + | | | +++ | + | | | +++ | + | | | +++ | + | | |
| | 40 | 6p | +++ | + | + | | ++ | + | + | | ++ | + | | | +++ | + | | - | + | | |
| 45 | 7s | +++ | + | + | + | ++ | + | | | ++ | + | + | | +++ | + | + | | | | | |
| | 29s | +++ | + | + | | - | ± | | | - | ± | | | - | ± | + | | - | ± | | |
| 53 | 31p | +++ | + | + | | +++ | + | | | ++ | + | | | +++ | + | | | ++ | + | | |

Objaśnienia: s – skrwawienie doświadczalne; s* – skrwawienie w agonii; p – padnięcie naturalne; Miano HA: (+++) > 1280, (++) 160-640, (+) 20-80; ELISA OD_{490 nm}: (+) > 0,3, (±) 0,1-0,3, (-) ≤ 0,1; RT-PCR, n-PCR: (+) wynik dodatni, (-) wynik ujemny.

nie stwierdzono wirusowego RNA w żadnym z narządów. Dodatnie wyniki reakcji PCR uzyskiwano w większości narządów królików skrwawionych powyżej 20 godz. po zakażeniu. Poczawszy od 26 h.p.i. badane narządy – dodatnie w odczynie HA i ELISA – były również dodatnie w reakcji PCR. Miara amplifikacji była też intensywność prążków – z reguły znacz-

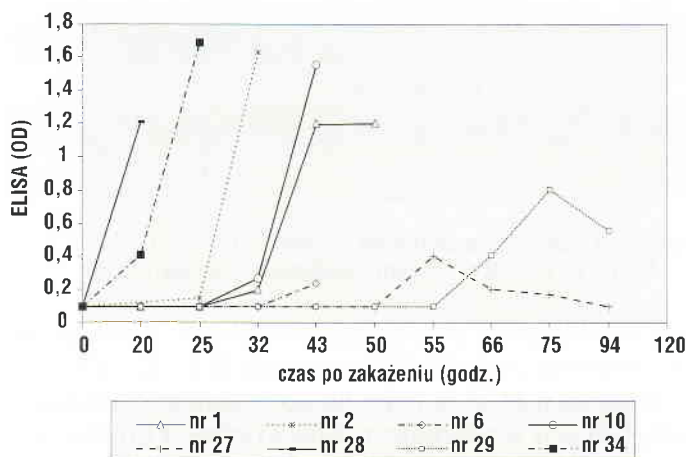
nie silniejsza w przypadku produktów z narządów wewnętrznych dodatnich w testach HA i ELISA.

Metodą n-PCR potwierdzono obecność produktów amplifikacji w wątrobie, nerkach i grasicy królika nr 1 oraz w śledzionie i nerkach królika nr 23, skrwawionych między 7-9 h.p.i. Nie wykryto produktów reakcji n-PCR w narządach królika nr 11, natomiast u króli-

ków nr 2, 13 i 24 skrwawionych między 13-16 h.p.i. potwierdzono obecność produktów amplifikacji, pomimo reakcji ujemnej w metodzie PCR (tab. 1). Liczbę prób narządów wewnętrznych badanych metodą RT-PCR i n-PCR ograniczono do prób pobranych w pierwszej dobie zakażenia, w celu potwierdzenia lub wykluczenia wyników wątpliwych i ujemnych otrzymanych metodami HA i ELISA. Obraz elektroforetyczny wybranych produktów amplifikacji wirusowego RNA przedstawia ryc. 1.

We krwi zwierząt grupy I wirus diagnozowano na 4 do 7 godzin przed padnięciem. Najwyższe wartości OD występowały u zwierząt w fazie agonii lub w końcowym stadium rozwoju choroby (między 24-45 h.p.i.). W tabeli nr 2 przedstawiono wyniki badania krwi od królików nr 23-31. Produkty amplifikacji wirusowego RNA wykazano u osobników nr 28, 30, 31 skrwawionych lub padłych powyżej 24 h.p.i. Nie wykryto produktów wirusowego RNA w próbkach krwi królików nr 27, 28, 29, w których OD ELISA była bliska 0,5.

W grupie II, spośród 36 zwierząt, padło 31. OD₄₉₀ ELISA osiągała wartość maksymalną (w przedziale 1,2-1,7) na kilka godzin przed padnięciem lub w okresie agonii. Ryc. 2 przedstawia dynamikę pojawiania się wirusa RHD we krwi, dla wybranych 8 królików. Siedem zwierząt padło w czasie od 25 do 120 h.p.i., a jedno przeżyło zakażenie. Najwcześniej wirusa wykryto w 20 h.p.i. (króliki nr 28 i 34), natomiast najczęściej



Ryc. 2. Występowanie wirusa RHD we krwi królików w trakcie infekcji (grupa II)

Tab. 2. Wykrywanie wirusa RHD we krwi zakażonych królików (grupa I)

| Królik | | Czas h.p.i. | | | | | | | | | |
|--------|-------|-------------|-----|-----|-----|-------|---------|---------|---------|-------|------|
| nr | | „0” | 9 | 13 | 20 | 24 | 27 | 34 | 45 | 52 | > 52 |
| 23 | ELISA | - | - s | | | | | | | | |
| | PCR | - | | | | | | | | | |
| 24 | ELISA | - | - | - s | | | | | | | |
| 25 | ELISA | - | - | - | - s | | | | | | |
| 26 | ELISA | - | - | - | - | - s | | | | | |
| | PCR | | | | | - | | | | | |
| 27 | ELISA | - | - | - | - | - | ± s | | | | |
| | PCR | | | | | | - | | | | |
| | n-PCR | | | | | | - | | | | |
| 28 | ELISA | - | - | - | - | - | ± | +1,83 p | | | |
| | PCR | | | | | | - | + | | | |
| | n-PCR | | | | | | | + | | | |
| 29 | ELISA | - | - | - | - | - | - | - | +0,53 s | | |
| | PCR | | | | | | | | - | | |
| | n-PCR | | | | | | | | + | | |
| 30 | ELISA | - | - | - | ± | +1,54 | +1,84 p | | | | |
| | PCR | | | | - | + | + | | | | |
| | n-PCR | | | | - | + | + | | | | |
| 31 | ELISA | - | - | - | - | - | - | - | ± | +0,48 | p |
| | PCR | | | | | | | | + | | |
| | n-PCR | | | | | | | | + | | |

Objaśnienia: s – skrwawienie doświadczalne; p – padnięcie naturalne; ELISA OD_{490 nm}: (+) > 0,3, (±) > 0,1 ≤ 0,3, (-) ≤ 0,1.

wykrywano go na 5-7 godz. przed zejściem śmiertelnym. Na 12 godzin przed padnięciem wykryto wirusa RHD tylko u królika nr 34 (OD = 0,4), ale maksymalną wartość (OD = 1,69) zanotowano u niego na ok. 7 godzin przed śmiercią, która miała miejsce w 32 godzinie po zakażeniu. Wirus wykryto także w krwi królików, które przeżyły zakażenie, jednakże wartość absorpcji nie przekraczała 0,5 (krzywa dla królika nr 27 z ryc. 2). Po upływie trzeciej doby po zakażeniu wartość OD u tych zwierząt była bliska wartości początkowej.

Wieloletnie, liczne badania i obserwacje przypadków terenowych RHD wskazują, że w obrazie choroby nie występują uchwytne zmiany kliniczne i anatomiczne. Potwierdza to tezę o dużej stabilności wirusa, chociaż w ostatnim czasie pojawiają się doniesienia świadczące o występowaniu niepatogennych szczepów wirusa, bądź jego różniących się molekularnie wariantów (2, 3). Dominuje ostra postać

choroby ze zmianami klinicznymi manifestującymi się dopiero w końcowej jej fazie. Proces zakażenia wirusem RHD jest niezwykle dynamiczny, a wywoływana skaza krwotoczna w dalszym ciągu budzi duże zainteresowanie ze względu na mechanizmy procesu patogenezy jak i badanie zjawisk odpornościowych zachodzących w zakażonym organizmie (15, 21). Wcześniej-
sze obserwacje procesu zakażenia opierały się na badaniach klinicznych, anatomopatologicznych i histopatologicznych. Obecność wirusa badano w mikroskopie elektronowym, w odczynie HA lub testem ELISA (8, 9, 14, 18, 20), a także metodą RT-PCR (12). Stwierdzano wzrost miana HA w płucach, wątrobie, sercu, nerkach i śledzionie między 18 a 30 godziną po zakażeniu, a w preparatach histopatologicznych po 6 godzinach wybroczyny, a po 12 h.p.i. przekrwienie i obrzęk płuc. Zmiany wsteczne w wątrobie, śledzionie i nerkach odnotowywano między 12-18 godziną (20). W badaniach klinicznych, histopatologicznych i histochemicznych ustalono również, że wirus replikuje się niezwykle szybko i silnie interferuje z metabolizmem docelowych komórek i narządów wewnętrznych, prowadząc do masywnego uszkodzenia wątroby i wielogniskowych krwotoków. Wykazano też, że jednym z najsilniej uszkodzonych układów był system immunologiczny. W śledzionie, węzłach chłonnych obserwowano fagocytujące makrofagi. W szóstej godzinie po zakażeniu obserwowano mikrozakrzepy w nerkach, płucach, sercu, w tkance nadnerczy. W wątrobie wirus był stwierdzany już po 2 godz. od zakażenia, a po dalszych 2 godzinach w jądrach komórkowych różnych tkanek (wątroba, śledziona, płuca, nerki). W mikroskopie elektronowym oraz metodami barwienia immunohistologicznego stwierdzono, że wirus w jądrach komórek pojawiał się między 8-16 godziną zakażenia, a w cytoplazmie ok. 24 h.p.i. Nagła śmierć jako wynik zaburzeń funkcji wielu organów, w tym głównie wątroby, nerek, kory nadnerczy może występować już od 12 godziny (8, 14, 18). W najnowszych badaniach dotyczących wczesnych stadiów zakażenia wykazano natomiast ścisłą korelację wyników ELISA, HA i PCR przy wykrywaniu wirusa w wątrobie. Histopatologiczne zmiany nekrotyczne mięszu wątroby notowano od 30 godz. zakażenia, w teście ELISA i HA wirus diagnozowano od 36 godziny, a od 18 h.p.i. metodą PCR. W innych narządach metodą RT-PCR wirus wykrywano między 18-36 h.p.i. (12).

W badaniach własnych wykazano, że w warunkach zakażenia doświadczalnego drogą iniekcji podskórnej uzyskane wyniki są zbieżne z wcześniejszymi rezultatami innych autorów, dodatkowo uzupełniając obraz choroby o dynamikę zakażenia we krwi obwodowej. We wszystkich przypadkach skrwawień doświadczalnych, wykonanych do ok. 38 h.p.i., królików nie wykazujących żadnych klinicznych oznak choroby uzyskano wyniki ujemne w testach HA i ELISA (króliki 1, 2, 3, 4, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 23, 24, 25, 26, 27). Jedynie u królików będących w stanie agonalnym

wykrywano wirus w narządach między 26-33 h.p.i. Natomiast metodami PCR, bądź n-PCR, produkty amplifikacji wirusowego RNA diagnozowano w wątrobie, grasicy, śledzionie, płucach i nerkach już między 7-9 h.p.i. W kolejnych godzinach (między 13-20 h.p.i.) produkty amplifikacji diagnozowano regularnie w większości narządów. Test n-PCR okazał się bardzo czułą i pewną metodą badawczą, dzięki której wykazano lub potwierdzono obecność produktów amplifikacji w narządach wewnętrznych, w których zarówno tradycyjnymi technikami jak i metodą PCR stwierdzano wyniki wątpliwe lub ujemne. W stosunku do badań Guittré i wsp. obserwuje się przesunięcie w czasie wykrywania wirusa RHD za pomocą użytych metod, w tym głównie produktów reakcji PCR. Wirusa RHD w narządach wewnętrznych wykrywano wcześniej, tzn. począwszy od 7-9 h.p.i. Testem ELISA i w odczynie HA, wykrywano go po 26 godz. w narządach wewnętrznych zwierząt skrwawionych w fazie agonii i ok. 38 godz. u klinicznie zdrowych. Najwyższe miana HA i ELISA stwierdzano w wątrobie i śledzionie. Wydaje się jednak, że istotny wpływ na przebieg zakażenia miała zastosowana przez nas droga zakażenia jak i osobniczy jego przebieg odpowiadający procesowi nadostremu lub ostremu wg klasyfikacji Marcato i wsp. (18).

Interesujące spostrzeżenia dotyczą wykrywania wirusa RHD w krwi obwodowej. Testem ELISA stwierdzano go na kilka do kilkunastu godzin przed padnięciem, (od 5-12 godz.), a najwcześniej ok. 20 godziny zakażenia (tab. 2, ryc. 2). Nieoczekiwanie wyniki w reakcji PCR były w większości ujemne. Produkty reakcji PCR lub n-PCR w krwi wykrywano tylko w próbkach pobranych w szczytowej fazie infekcji, gdy wartość OD ELISA osiągała swoje maksimum. W krwi pobranej do 20 godziny zakażenia, jak też powyżej 48 godziny, w której wartość OD ELISA była bliska 0,5, najczęściej nie stwierdzano produktów reakcji PCR bądź n-PCR.

Otrzymane rezultaty potwierdzają, że wirus RHD w ciągu kilku do kilkunastu godzin po zakażeniu osiąga wysoką koncentrację w wątrobie, a następnie w innych narządach trzewnych i w krótkim czasie doprowadza do rozległych uszkodzeń oraz zaburzeń ich funkcji. Uzyskane wyniki świadczą też o dużej przydatności i komplementarności zastosowanych metod diagnostycznych do wykrywania wirusa RHD w próbach klinicznych.

Piśmiennictwo

1. Capucci L., Fusi P., Lavazza A., Pacciarini L. M., Rossi C.: J. Virol. 70, 8614, 1996.
2. Capucci L., Nardin A., Lavazza A.: Vet. Rec. 21, 647, 1997.
3. Capucci L., Fallacara Fr., Grazioli S., Lavazza A., Pacciarini M. L., Brocchi E.: Virus Res. 58, 115, 1998.
4. Chasey D., Lucas M. H., Westcott D. G., Sharp G., Kitching A., Hughes S. K.: Vet. Rec. 137, 158, 1995.
5. Fitzner A.: Wirus krwotocznej choroby królików (VHD) i jego właściwości immunogenne. Praca dokt., PIWet., Puławy 1994.
6. Fitzner A., Niedbalski W.: Bull. vet. Ins. Puławy, 40, 69, 1996.

7. *Fitzner A., Kęsy A., Niedbalski W., Paprocka G.*: Medycyna Wet. 55, 120, 1999.
8. *Gong X. M., Ji Ch-Yi.*: Rev. sci. tech. Off. int. Epiz. 10, 199, 1991.
9. *Górski J., Mizak B., Mizak Z., Komorowski A.*: Życie Wet. 9, 266, 1988.
10. *Gregg D. A., House C., Meyer R., Berninger M.*: Rev. sci. tech. Off. int. Epiz. 10, 435, 1991.
11. *Guitré C., Baginski I., Gall le G., Prave M., Trepo C., Cova L.*: Res. Vet. Science, 58, 128, 1995.
12. *Guitré C., Ruoven-Clouet N., Baraud L., Cherel Y., Baginski I., Prave M., Ganiere J. P., Trepo C., Cova L.*: J. Vet. Med. 43, 109, 1996.
13. *Holden C.*: Science 270, 1123, 1995.
14. *Huang Hai-Bo.*: Rev. sci. tech. Off. int. Epiz. 10, 481, 1991.
15. *Kęsy A., Fitzner A., Niedbalski W., Paprocka G., Walkowiak B.*: Mat. IX Zjazdu PTIDiK, Warszawa 1998, s. 247.
16. *Kęsy A., Fitzner A., Niedbalski W., Paprocka G., Walkowiak B.*: Rev. sci. tech. Off. int. Epiz. 15, 1029, 1996.
17. *Liu S. J., Xue H. P., Pu B. Q., Qian N. H.*: Anim. Husb. Vet. Med. 16, 253, 1984.
18. *Marcato P. S., Benazzi C., Vecchi G., Galeotti M., Della Salda L., Sarli G., Lucidi P.*: Rev. sci. tech. Off. int. Epiz. 10, 371, 1991.
19. *Meyers G., Wirblich Ch., Thiel H-J.*: Virology 184, 664, 1991.
20. *Mizak B., Górski J., Kozaczyński W.*: Bull. Vet. Inst. Pulawy 34, 37, 1991.
21. *Tokarz-Deptuła B.*: Mat. IX Zjazdu PTIDiK, Warszawa 1998, s. 246.

Adres autora: dr Andrzej Fitzner, ul. Wodna 22/3, 98-220 Zduńska Wola

STAN ZAKAŻNYCH CHOROÓB ZWIERZĄT W POLSCE, według danych Głównego Inspektoratu Weterynarii w październiku 1999 r.*)

- 1) **Wścieklizna zwierząt domowych** – wystąpiła w 6 województwach, a mianowicie: kujawsko-pomorskim (4-10), mazowieckim (2-2), podkarpackim (2-2), podlaskim (3-5), warmińsko-mazurskim (6-14), wielkopolskim (1-1). Wściekliznę stwierdzono u 1 psa, 5 kotów i 28 szt. bydła.
- 2) **Wścieklizna zwierząt dzikich** – wystąpiła w 9 województwach: kujawsko-pomorskim (6-10), lubelskim (7-8), małopolskim (3-3), mazowieckim (16-23), podkarpackim (5-10), podlaskim (6-12), świętokrzyskim (6-10), warmińsko-mazurskim (12-22), wielkopolskim (1-1). Zanotowano ją u 78 lisów, 18 jenotów, 2 kun.
- 3) **Otręt bydła (IBR/IPV)** – wystąpił w województwie łódzkim (1-1).
- 4) **Choroba Aujeszkyego u świń** – wystąpiła w województwie wielkopolskim (1-1).
- 5) **Salmoneloza świń** – wystąpiła w województwie kujawsko-pomorskim (1-1).
- 6) **Leptospiroza świń** – wystąpiła w województwie podkarpackim (1-1).
- 7) **Salmoneloza drobiu** – wystąpiła w 14 województwach: dolnośląskim (2-3), kujawsko-pomorskim (2-3), lubuskim (6-8), łódzkim (3-5), małopolskim (3-5), mazowieckim (3-3), podkarpackim (3-6), podlaskim (1-1), pomorskim (2-2), śląskim (4-6), świętokrzyskim (2-4), warmińsko-mazurskim (1-3), wielkopolskim (9-34), zachodnio-pomorskim (6-6).
- 8) **Myksomatoza królików** – wystąpiła w 7 województwach: dolnośląskim (2-2), kujawsko-pomorskim (1-1), mazowieckim (2-2), opolskim (1-1), podlaskim (1-2), pomorskim (1-1), świętokrzyskim (1-2).
- 9) **Wirusowa posocznica krwiotoczna ryb łososiowatych VHS** – wystąpiła w województwie warmińsko-mazurskim (1-1).
- 10) **Zgnilec amerykański** – wystąpił w 3 województwach: opolskim (1-1) podlaskim (1-2), wielkopolskim (2-2).

*1) w nawiasach podano liczbę powiatów i miejscowości, w których choroba została stwierdzona w okresie sprawozdawczym.