

HENRYK JANOWSKI, TADEUSZ WIJASZKA

## Właściwości chorobotwórcze i uodparniające dwóch krajowych szczepów choroby Aujeszky'ego (chA) pasażowanych w różnych temperaturach przez hodowle komórek zarodka kurzego

Zakład Badania Chorób Świń Instytutu Weterynarii w Puławach  
Kierownik: prof. dr H. JANOWSKI \*

Wielokrotne pasaży poszczególnych szczepów wirusa chA przez hodowle komórek, zarodki kurze względnie zwierzęta, powodują zmniejszenie względnie utratę zjadliwości tych szczepów dla różnych gatunków zwierząt. Donoszą o tym Bartha (1), Škoda (6), Žuffa (10), Bran (2), Toneva (9) i inni. Uzyskane tą drogą osłabione (atenuowane) względnie niezjadliwe (niechorobotwórcze) szczepy wirusa chA charakteryzują się odmiennymi od wyjściowych właściwościami biologicznymi, a w szczególności: 1) zmniejszeniem wzgl. utratą zjadliwości dla różnych gatunków zwierząt, 2) odmiennymi zmianami cytopatycznymi w różnych hodowlach komórek oraz 3) utratą zdolności wywoływania świądu u królików.

Dalszą charakterystykę niektórych osłabionych szczepów chA, a zwłaszcza badanie cech genetycznych (markerów) przeprowadził Wijaszka (5).

Uzyskane wstępne wyniki wpływu różnej temperatury pasażowania na miano wirusa chA postanowiono wykorzystać do prób ewentualnego szybkiego osłabiania (atenuowania) zjadliwych krajowych szczepów wirusa chA. Ponadto postanowiono sprawdzić stopień zmienności tych szczepów przez badanie markerów genetycznych przed i po kilkudziesięciu pasażach w hodowli komórek oraz zbadać stopień ich zjadliwości i właściwości immunogenne dla świń po wykonaniu pasaży. Powyższe założenia stanowią cel niniejszej pracy.

### Materiał i metody

Do badań użyto:

1. Bardzo zjadliwy szczep „N” wirusa chA wyizolowany (3) z mózgu padłych nerek. Miano TCID<sub>50</sub> tego szczepu dla hodowli komórek zarodka kurzego w 5 pasażu wynosiło 10<sup>-5,5</sup>.

2. Zjadliwy szczep „D” wirusa chA wyizolowany (4) z płuc i śledziony padłej świni. Jego miano TCID<sub>50</sub> w 5 pasażu wynosiło 10<sup>-5,0</sup>. Do zakażeń challenge'owych użyto szczep W<sub>7</sub>, opisany uprzednio (8). Jednodniowe, jednowarstwowe pierwotne hodowle komórek zarodka kurzego przygotowano wg metody podanej uprzednio (3, 4). Sposób wykonania odczynu seroneutralizacji oraz selekcji szczepów metodą łysinek opisano uprzednio (5).

3. Świnie rasy wielkiej białej polskiej w wieku ok. 2—2,5 mies., o ciężarze ok. 20—25 kg \*).

Całość badań podzielono na następujące etapy:

A. Selekcja klonalna szczepów N i D po 5 wstępnych pasażach.

\*) Część pracy dotycząca badania stopnia nieszkodliwości badanych szczepów oraz ich właściwości immunogennych została wykonana w ZTP Dobiegniew.

Autorzy dziękują Dyrektorowi Zakładów, Panu M. Nizińskiemu i Dr B. Bartoszowi za udostępnienie materiału doświadczalnego.

B. Określenie podstawowych markerów genetycznych wybranych szczepów takich jak: t (temperatura), d<sup>+</sup>, d<sup>-</sup> (wpływ różnych stężeń NaHCO<sub>3</sub> w podłożu), wielkość łysinek, wpływ trypsyny, efekt cytopatyczny, zdolność wywoływania świądu (p marker) przed i po 50 pasażach.

C. Przeprowadzenie 50 pasaży obydwu szczepów w hodowli komórek zarodka kurzego. Hodowle prowadzono w próbkach, które po zakażeniu inkubowano kolejno w temperaturze 30, 37 i 40°C. Efekt cytopatyczny zależnie od temperatury inkubacji pojawiał się 2—7 dnia po zakażeniu hodowli komórek.

D. Określenie stopnia zjadliwości obydwu szczepów po 50 pasażach dla świń. Grupie 10 świń wstrzyknięto po 1 ml wirusa „D” wstrzyknięto drugiej grupie świń. Po 21 dniowym okresie obserwacji, określono poziom przeciwciał sn, a następnie obie grupy zakażono podskórnie zjadliwym szczepem W<sub>7</sub> wirusa chA w dawce 2 × 100 000 dawek TCID<sub>50</sub>. Obydwie grupy obserwowano dalej przez następne 21 dni.

### Wyniki

Wyniki badania markerów genetycznych szczepów „N” i „D” wirusa chA przed wykonaniem pasaży i po 50 pasażach przez hodowle komórek zarodka kurzego zebrane są w tab. 1.

Tab 1 Markery genetyczne 2 szczepów wirusa chA przed i po 50 pasażach przez hodowle komórek zarodka kurzego

Szczep	wielkość łysinek	Markery genetyczne							
		t 23°	t 40°	d <sup>-</sup>	d <sup>+</sup>	MgCl <sub>2</sub> 0,1 M	Tryps. +4/24h	p	Efekt cytotop
„N”	przed 1,0	2,0	6,21	5,21	5,30	2,0	4,23	+	typ I *)
	po pas 2-2,5	4,42	6,30	3,87	6,15	4,10	6,24	-	typ II **)
„D”	przed 1-2	2,0	6,0	5,50	5,10	2,0	5,0	+	typ I
	po pas 1-2	3,10	6,0	4,87	6,0	2,0	5,10	+	typ I

Objaśnienia: \*) patrz ryc 1, \*\*) patrz ryc 2.

Z danych przedstawionych w tab. 1 wynika, że w przypadku szczepu „N” stwierdzono znaczne różnice jego właściwości po 50 pasażach w stosunku do właściwości wyjściowych. Różnice te dotyczyły wszystkich badanych markerów genetycznych. Natomiast w przypadku szczepu „D” stwierdzono tylko nieznaczne różnice w markerach t i d.

Porównując cechy genetyczne obydwu badanych szczepów po 50 pasażach, zauważa się wyraźną i daleko idącą zmianę cech szczepu N polegającą na jego atenuacji.

Wyniki badań stopnia zjadliwości oraz właściwości uodporniających dla świń szczepów wirusa chA użytych w badaniu przedstawia tab. 2.

Jak wynika z danych przedstawionych w tab. 2 w czasie 21-dniowej obserwacji zwierząt zakażonych szczepem N nie stwierdzono objawów chorobowych. Wskazują na to zarówno wewnętrzna ciepota ciała jak i brak innych objawów klinicznych zakażenia. Stwierdzono znaczny wzrost (1:10—1:40) poziomu przeciwciał sn w stosunku do poziomu wykazanego przed zakażeniem.

Natomiast w grupie świń zakażonych szczepem „D” stwierdzono podwyższenie wewnętrznej temperatury ciała, które wystąpiło między 4 a 12 dniem po zakażeniu. Wystąpiły również inne objawy kliniczne (kaszel, wyciek z j. ustnej i nosowej, utrudnione

Tab. 2. Badanie właściwości chorobotwórczych i uodporniających dla świń 2 szczepów wirusa chA po 50 pasażach w hodowli komórek

	Świnie zakażone szczepem „N”										Świnie zakażone szczepem „D”									
	1	2	3	5	6	7	8	9	10		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Temperatura min.	38,4	38,2	38,4	38,3	38,7	38,2	38,8	38,3	38,2	38,7	38,6	38,2	38,3	38,6	38,3	38,7	38,4	38,2	38,7	
Temperatura max.	39,6	39,1	39,7	39,5	39,8	39,7	39,5	38,9	39,0	40,8	41,0	41,5	40,9	40,5	40,7	40,9	40,5	41,0	40,9	
Objawy kliniczne sn przed zakażeniem	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
sn 21 dnia po zakaż	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
sn 21 dnia po zakaż	10	10	5	20	10	40	20	10	20	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
<b>challenge</b>																				
Temperatura min.	38,4	38,3	38,6	38,6	38,7	38,3	38,2	38,7	38,1	38,9	38,9	38,4	40,1	39,2	39,4	39,3	38,7	38,9	39,0	
Temperatura max.	39,1	39,4	38,9	39,5	38,9	39,1	38,8	39,4	39,6	40,6	41,4	41,0	41,7*	40,8	40,6	40,8	41,3	41,0	40,8	
Objawy kliniczne sn po challenge'u	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Objawy kliniczne sn po challenge'u	20	40	40	40	40	40	40	40	80	10	20	20	-	10	10	20	20	10	20	

Objasnienie: \* - padała 9 dnia po challenge'u

oddychanie). W końcowym okresie obserwacji zwierzęta zdrowiały. Badanie poziomu przeciwciał sn po 21 dniach wykazało nieznaczne podwyższenie miana do 1:5 tylko u 2 świń.

Zakażenie challenge'owe (kontrolne) nie wywołało żadnej reakcji klinicznej w grupie świń uprzednio zakażonych szczepem „N”. Stwierdzono u nich jedynie dalszy wzrost poziomu przeciwciał sn w surowicy. W drugiej grupie świń (szczep D) zakażenie kontrolne spowodowało zachorowanie 9 świń, z których 1 padła.

**Omówienie**

Z przedstawionych wyników badań na szczególną uwagę zasługuje stwierdzenie istotnych różnic pomiędzy właściwościami badanych szczepów po pasażach, i to zarówno w odniesieniu do markerów genetycznych, jak i stopnia zjadliwości oraz właściwości uodporniających dla świń. Ponadto wykazano, że cechy genetyczne jednego z pasażowanych szczepów okazały się różne od szczepu wyjściowego. Różnice te widać szczególnie wyraźnie w wynikach badania wpływu temperatury pasaży, wpływu NaHCO<sub>3</sub>, tripsyny oraz w zmianie typu efektu cytotopycznego i utracie zdolno-



Ryc. 2. Hodowla komórek zarodka kurzego 96 godz. po zakażeniu szczepem osłabionym (efekt cytotopyczny typ II). Pow. 360 X

Na szczególne podkreślenie zasługuje również fakt wykazania zbieżności wyników badania markerów genetycznych, stopnia zjadliwości oraz właściwości uodporniających obu badanych szczepów. Szczep „N” po pasażach charakteryzował się dobrym wskaźnikiem atenuacji, był niezjadliwy dla świń oraz wywoływał wysoki poziom przeciwciał sn w surowicy. Świnie zakażone tym szczepem były niewrażliwe na zakażenie kontrolne. Natomiast szczep „D” charakteryzował się gorszym wskaźnikiem atenuacji, był chorobotwórczy dla świń i powodował słabą odporność.

Powyższe badania stanowią wstęp do dalszych prac nad uzyskaniem szczepów wirusa chA, które byłyby niechorobotwórcze dla wielu gatunków zwierząt, a jednocześnie posiadały dobre właściwości immunogenne.

**Wnioski**

1. Pasaże zjadliwych szczepów „N” i „D” wirusa chA przeprowadzone w temperaturze 40°C powodowały znacznie szybsze osłabienie ich zjadliwości niż pasażowanie w temperaturze 37°C.

2. Szczep „N” wirusa chA o większym stopniu zjadliwości ulegał szybciej atenuacji niż szczep słabo zjadliwy „D”.

3. Wielokrotne pasaże badanych szczepów w różnej temperaturze okazały się przydatne do uzyskania osłabionego szczepu wirusa chA o dobrych właściwościach uodporniających.

4. Stwierdzono przydatność badania markerów genetycznych do określania stopnia zjadliwości szczepów wirusa chA.



Ryc. 1. Hodowla komórek zarodka kurzego 96 godz. po zakażeniu szczepem zjadliwym (efekt cytotopyczny typ I). Pow. 360 X

ści wywoływania świądu. Przytoczone różnice cech genetycznych świadczą o postępującej pod wpływem pasaży atenuacji szczepu. Podobne wyniki uzyskał Škoda (6, 7), który stwierdził utratę zdolności wywoływania świądu u królików przez szczep BUK po 328 pasażach, oraz Bartha (1), który po 81 pasażach szczepu K opisał zmianę we wrażliwości szczepu na tripsynę i utratę wywoływania świądu po wstrzyknięciu go królikom.

## Piśmiennictwo

1. Bartha A.: Magy. Allatorv. Lap. 16, 42, 1961.
2. Bodon L., Mészáros i wsp.: Acta Vet. Acad. Sci. Hun. 18, 107, 1968.
3. Bran L., Suhaci I., Ursache R.: Luc. Inst. de Cert. Vet. Pasteur, 4, 3, 1965.
4. Janowski H., Janowska I., Wijaszka T.: Medycyna Wet. 21, 158, 1965.
5. Janowski H., Wijaszka T.: Medycyna Wet. 23, 721, 1967.
6. Skoda R. i wsp.: Acta virol. 8, 1, 1964.
7. Skoda R. i wsp.: Acta virol. 8, 123, 1964.
8. Skulmowska-Kryszkowska D., Janowska I., Wijaszka T.: Bull. Inst. Wet. Puławy 12, 45, 1968.
9. Toneva V.: Vet. Med. Nauki, Sofia, 1, 35, 1964.
10. Wijaszka T.: Biul. IV Zjazdu PTNW, Warszawa, 1970.
11. Zuffa A.: Mh. Vet. Med. 19, 801, 1964.
12. Zuffa A., Gricelova K.: Arch. exp. Vet. Med. 20, 127, 1966.

Obecny adres autora: prof. dr Henryk Janowski, Olsztyn—Kortowo, Instytut Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych.

ZYGMUNT CYGAN

## Zagadnienie antygenów „nierozpuszczalnych” w identyfikacji *Cl. botulinum*

Katedra Mikrobiologii Wydziału Weterynarii WSR  
w Lublinie  
Kierownik: prof. dr T. JASTRZĘBSKI

Zakład Higieny Weterynaryjnej w Lublinie  
Kierownik: dr T. DĄBROWSKI

Diagnostyka laseczek *Cl. botulinum* jest zagadnieniem trudnym, złożonym i definitywnie jeszcze nie rozwiązany. Podstawowa metoda identyfikacyjna polega na analizie tzw. „antygenów rozpuszczalnych”, tj. toksyn, przy pomocy seroneutralizacji. Ma ona kolosalne znaczenie praktyczne, niemniej jednak z naukowego punktu widzenia, musi budzić pewne zastrzeżenie, gdyż nie może być użyta w stosunku do wszystkich szczepów, które nie produkują lub zatraciły zdolność wytwarzania toksyny. Toksynogenność szczepów jest procesem dynamicznie zmiennym, często całkowicie zanikającym i dlatego nie nadaje się w pełni, jako podstawa szeroko pomyślanej identyfikacji laseczek *Cl. botulinum*, zwłaszcza typu C, u którego zanik toksynotwórczości występuje szczególnie często. Wykorzystanie właściwości morfologicznych, hodowlanych i biochemicznych, aczkolwiek pomocne, jednak nie daje również dostatecznie pewnych podstaw diagnostycznych ze względu na niestałość powyższych cech. Jednym z głównych testów biochemicznego różnicowania nietoksynotwórczych szczepów *Cl. botulinum*, od podobnych do nich szczepów *Cl. sporogenes*, ma być odczyn na skatol. Jednak jak to wynika z własnych obserwacji, metoda ta zawodzi nawet w tym wąskim zakresie, gdyż wypada ujemnie z wieloma szczepami uznanymi za *Cl. sporogenes*. W związku z powyższym należy sądzić, że przebadanie antygenów „nierozpuszczalnych” — komórkowych jest jak najbardziej aktualne, gdyż stwarza nowe możliwości, dotychczas niewykorzystane.

Dotychczasowe badania nad antygenami komórkowymi laseczek *Clostridium* doprowadziły do ustalenia ich pewnej praktycznej przydatności dla różnicowania nietoksynotwórczych szczepów *Cl. botulinum* od *Cl. sporogenes* (49, 53), *Cl. sordelli* od *Cl. bifementans* (32, 33, 34), *Cl. feseri* od *Cl. septicum* (1, 45), jak również przy identyfikacji szczepów *Cl. oedematiens* (2), typów *Cl. tetani* (23, 25) i szczepów zatruc pokarmowych *Cl. perfringens* A (11).

Prace nad serologicznym usystematyzowaniem ziarniaków rodzaju *Streptococcus* (18), oraz pałeczek *Salmonella* (16) i *Escherichia* (15) wywarły wyraźny wpływ na tok badań nad antygenami komórkowymi laseczek beztlenowych. Badania takie podjęli w latach 1951—1955 Mandia i Bruner (20) oraz Mandia (21, 22, 23, 24), a następnie Moussa (45). Osiągnięte wyniki umożliwiły ułożenie schematu antygenów laseczek *Clostridium* analogicznego w swych głównych założeniach do schematu dla pałeczek *Salmonella*. U proteolitycznych beztlenowców *Clostridium* sp. wyróżniono antygeny somatyczne ciepłostale „O” i ciepłochwienne „L” stanowiące podstawę zaliczenia szczepu do gatunku oraz antygeny rzęskowe „H” określające typy aglutynacyjne. Zaproponowany schemat objął między innymi również proteolityczne szczepy *Cl. botulinum* A i B. Szczepy te wykazywały pokrewieństwa antygenowe ze szczepami *Cl. sporogenes*, *Cl. histolyticum* i *Cl. tetani* (23). Zastosowane w następnych latach w naszym laboratorium odczyny Ouchterlony’ego (4) i immunofluorescencji (13) częściowo potwierdziły obecność tych międzygatunkowych powiązań. Pokrewieństwa antygenowe zaobserwowano pomiędzy *Cl. botulinum* C i D, a *Cl. oedematiens* A, B i D oraz pomiędzy *Cl. botulinum* A i B, a *Cl. sporogenes*. Niewykazanie reakcji międzygatunkowej *Cl. botulinum* z laseczkami innych proteolitycznych gatunków *Clostridium*, mogło wynikać z użycia przez autorów surowic pko antygenom ogrzewanym, u których ograniczenie ilości antygenów podejrzewali Walker i Batty (59). Badania Walkera i Batty (59), Cygana i Jastrzębskiego (4) oraz Jastrzębskiego i Cygana (13) pozwoliły na serologiczny podział szczepów *Cl. botulinum* na 3 serotypy: 1) obejmujący proteolityczne szczepy typów toksycznych A, B i F; 2) sacharolityczne typy C i D; 3) sacharolityczny typ E. Jednocześnie stwierdzono dość znaczne zróżnicowanie szczepów w obrębie poszczególnych serotypów wskazujące na obecność ras serologicznych. Obserwacja ta potwierdza wcześniejsze wyniki