

Wandurski A. — **Aeromonas in the ichthyopathological casuistry in the Poznań region in 1967—1970.**

The examinations were carried out in 1967—1970. The subjects of the investigations were: normal and sick fishes sent to the Poznań Veterinary Diagnostic Laboratory and those under the control in the field in the period of Spring and Autumn. Out of 201 batches of fish with the signs of infectious dropsy *Aeromonas* bacteria were isolated in 14—23% batches

compared with 8.1—29.4% in the group of 596 batches of fish without any signs of the disease. *Aeromonas punctata*, the causative agent of infectious dropsy of carps was found out also in normal fishes. In the diagnosis of infectious dropsy of carps bacteriological examinations play a second role. The basic role plays anatomopathological lesions, the zoosanitary situation in the region and the analysis of the course of the disease in fish.

STANISŁAWA WOYCIECHOWSKA, JERZY KITA

## Influenza koni w Polsce w 1969 r. I. Izolacja wirusa

Instytut Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych Wydziału Weterynarii SGGW w Warszawie  
Dyrektor: prof. dr A. STRYSZAK

Jesienią 1969 roku stwierdzono masowe schorzenia dróg oddechowych koni w Polsce. Początkowo określano je jako „zakaźny nieżyt górnych dróg oddechowych”. Pierwsze większe ognisko zachorowań koni zanotowano we wrześniu 1969 r. w woj. lubelskim, następnie w woj. warszawskim. Schorzenie rozprzestrzeniło się również stopniowo i na inne województwa. Choroba szerzyła się bardzo szybko w zakażonym ośrodku koni, jak również przenosiła się do innych drogą bezpośredniego i pośredniego kontaktu. Wszystkie konie w danym ośrodku zachorowały w ciągu 1—3 dni po pojawieniu się objawów chorobowych. W większych ośrodkach koni, trzymanych w kilku lub kilkunastu pomieszczeniach okres ten przedłużał się do 6—7 dni. U koni sportowych, wyścigowych i hodowlanych stwierdzano zmiany chorobowe górnych dróg oddechowych, gwałtowny wzrost ciepłoty wew. ciała, który u większości koni wahał się w granicach od 39—41°C., ponadto wystąpiło posmutnienie, częściowy lub całkowity brak apetytu, surowiczy wypływ z nosa, przechodzący w śluzowaty lub śluzowo-ropny, kaszel suchy i głęboki częściej występujący na początku choroby. U kilkunastu koni stwierdzono obrzęki kończyn, podbrzusza, wypływ surowicy z worka spojówkowego, miernego stopnia. Zmiany chorobowe w płucach stwierdzano nie u wszystkich badanych koni.

Przebieg schorzenia nasuwał podejrzenie grypy koni. W celu potwierdzenia rozpoznania klinicznego podjęto próbę izolacji i identyfikacji czynnika etiologicznego, który wywołał schorzenie układu oddechowego koni w kraju w 1969 r. Ponadto przeprowadzono badania serologiczne próbek krwi pobranych od chorych koni w okresie ostrym choroby i w okresie rekonwalescencji.

### Izolacja wirusa

Materiał od chorych koni z 3 badanych ośrodków (L., Ł., S.) pobierano jak najwcześniej po wystąpieniu objawów chorobowych. Jako materiał do badań użyto wymazy z błony śluzowej

wej jamy nosowej koni. Waciki z pobranym materiałem wkładano do probówek z płynem Hanksa i przewożono do laboratorium w termosach w niskiej temperaturze. Pobranym materiałem zakażano do worka omocznioowego 10-dniowe zarodki kury. Po 3-dniowej inkubacji płyn badano w odczynie hemaglutynacji. Płyny omocznioowe pobrane z zarodków kury, zakażonych 10 różnymi materiałami pobranymi od koni, w 7 przypadkach w odczynie hemaglutynacji (HA) dały już w pierwszym pasażu wynik pozytywny. Miano wynosiło 1:4 do 1:8. W dalszych pasażach miano wzrosło od 1:16 do 1:32 (pasaż 5—6).

Płyny omocznioowe, które hemaglutynowały, zbadano pod mikroskopem elektronowym (16). Powiększenie wynosiło od 10 000 do 30 000. Stwierdzono obecność wirionów w postaci filamentarnej, dochodzących do 700 nm długości i  $\pm$  100 nm szerokości. Oprócz tych form w dalszych pasażach stwierdzono formy okrągłe lub owalne przeciętnej wielkości 70—130 nm.

Wyizolowane szczepy identyfikowano również metodą serologiczną, przy pomocy surowic testowych A(equi-1) Cambridge 63 i A(equi-2) England, otrzymanych z Cambridge Dep. of Animal Pathology, School of Vet. Med. od dr M. Rose. Ponadto użyto surowicy testowej krajowej A<sub>2</sub>(Hong-Kong)68. Uzyskane wyniki sugerowały, że wyizolowane szczepy należą do podtypu A(equi-2) (tab. 1).

W celu potwierdzenia uzyskanych wyników wyizolowane szczepy przesłano do „World Influenza Centre” w Londynie, w którym stwierdzono przynależność wymienionych szczepów do podtypu A(equi-2). Wyizolowane szczepy wykazują ścisłe pokrewieństwo antygenowe ze szczepem prototypowym A(equi-2) Miami/1/63. Również laboratorium w Cambridge potwierdziło przynależność wyizolowanych szczepów do A(equi-2).

Szczepy te zostały przez nas nazwane: A(equi-2) Warszawa/1/69 do A(equi-2) Warszawa/9/69. W „World Influenza Centre” szczepy te figurują pod nazwą A(equi-2) Warszawa 5/69, 6/69, 9/69.

## Badania serologiczne

W badaniach serologicznych użyto około 200 próbek krwi koni, które pobrano od koni w ostrym stanie choroby i w okresie rekonwalescencji. Typowo swoisty antygen „S” określono w OWD (odczyn wiązania dopełniacza). Antygen „V” swoisty dla szczepów określano przy pomocy odczynu zahamowania hemaglutynacji (OZHA).

OZHA jest zwykle stosowany w badaniach epizootologicznych dlatego, że przeciwciała wykrywane w tej metodzie są specyficzne i pozostają przez długi okres czasu. Odczyn ten pozwala na prześledzenie epidemii względnie epizootii, które następowały kolejno w danej populacji, lub stosując tę metodę można badać w jednym osobniku kolejno przebyte zakażenia. OZHA wykonano stosując jako antygen płyn omocznioowy zarodka kury, zakażonego różnymi szczepami *Myxovirus influenzae*.

Inhibitory w surowicach niszczone, stosując metodę opracowaną przez WHO (KJO<sub>4</sub>), metodę kaolinową i metodę Jensena (5).

Badania serologiczne surowic koni z antygenami A(equi-1)Praga/56/, A(equi-2)Miami 63, A<sub>2</sub>(Hong-Kong)1/68, A<sub>2</sub>(Hong-Kong)7/68, A<sub>2</sub>(Hong-Kong)9/68, A<sub>2</sub>(Sing)57 wykazały, że wszystkie badane surowice dały pozytywne miana ze szczepami A<sub>2</sub>(Hong-Kong), natomiast żadna ze surowic nie reagowała pozytywnie ze szczepem A<sub>2</sub>(Sing)57. Ze szczepem A(equi-1) zareagowało kilka surowic z 2 ośrodków, ze szczepem A(equi-2) reagowało pozytywnie wiele surowic, ale wysokie miana stwierdzono w stosunkowo małej liczbie surowic. Szczegółowe wyniki badań serologicznych zostaną opublikowane w oddzielnym doniesieniu.

Interpretacja wyników badań serologicznych jest trudna i wymaga głębokiej znajomości zagadnienia. Musi się w niej uwzględnić zarówno budowę antygenową wirusa jak i pokrewieństwo antygenowe wirusów, jak również odpowiedź immunologiczną zakażonych koni.

Problem pokrewieństwa antygenowego szczepów wirusów grypy koni podtypu A(equi-1) z A(equi-2) oraz podobieństwo ich ze szczepami *Myxovirus* ludzi typu A, zwłaszcza zaś podtypu A<sub>2</sub> jest jednym z bardzo dyskusyjnych problemów w serologii grypy koni.

U koni naturalnie zakażonych podtypem A(equi-2) Paccaud (12) stwierdził najpierw znaczny wzrost miana przeciwciał przeciw podtypowi A(equi-1), a następnie przeciwciała przeciw podtypowi A(equi-2). Nie stwierdził natomiast antygenowego pokrewieństwa antygenów hemaglutyniny i neuraminidazy u szczepów wirusów podtypów A(equi-1) i A(equi-2), przy pomocy surowic przygotowanych na zwierzętach laboratoryjnych. Wiele nowych spostrzeżeń i faktów nad pokrewieństwem antygenowym szczepów *Myxovirus influenzae* wniosły badania Blaskovica i wsp. (2). Autorzy do-

świadczalnie zakażali konie różnymi podtypami wirusów, wprowadzając je różnymi drogami, stosując jedną lub dwie dawki. W niektórych doświadczeniach wprowadzano jeszcze dawkę przypominającą.

Tab. 1. Identyfikacja wyizolowanych szczepów *Myxovirus influenzae equi* w Polsce w OZHA przy użyciu surowic standardowych

Surowica standardowa	Antygen								
	A(equi-1) Praga 56	A(equi-2) Miami 63	W-1/69 *	W-2/69 *	W-3/69 *	W-5/69 *	W-6/69 *	W-7/69 *	W-9/69 *
A(equi-1) Cambridge/63	160	0	0	0	0	0	0	0	0
A(equi-2) England	20	40	40	40	40	80	40	40	20
A <sub>2</sub> (Hong-Kong) Polska/68	0	0	0	0	0	0	0	0	0

\*) W-1 do W-3, W-5 do W-7 i W-9 oznaczono szczepy wyizolowane w Polsce.

Doświadczalnie wykazano, że konie zakażone A(equi-2) często początkowo nie wykazywały specyficznych, homologicznych przeciwciał tylko heterologiczne przeciwciała dla A(equi-1). Przypomina to tzw. „recall phenomenon” (9). Zakażenie koni A(equi-2) odsłoniło poprzednio przebyte zakażenia. Blaskovic kontynuując swe badania, podaje, że dawka przypominająca wirusa A(equi-2) powoduje wytwarzanie się przeciwciał homologicznych i heterologicznych dla szczepu A<sub>2</sub>(Hong-Kong)68. Uzyskany wynik jest niewątpliwie dowodem pokrewieństwa antygenowego między A(equi-2) a wirusem A<sub>2</sub>(Hong-Kong)68.

Pokrewieństwo między szczepami podtypu A<sub>2</sub> a to: A<sub>2</sub>(Hong-Kong)68 z A(equi-2) wykazało wielu autorów (10, 11). McQueen i wsp. (14) potwierdzili pokrewieństwo antygenowe między wirusem A<sub>2</sub>(Hong-Kong) a wirusem A(equi-2). Szczególnie interesujące są wyniki ilustrujące kształtowanie się miana w OZHA surowic, pochodzących od koni zakażonych wirusem A(equi-2)63. Miana dla heterologicznego wirusa A<sub>2</sub>(Hong-Kong) są kilkakrotnie wyższe niż dla wirusa homologicznego.

W naszych badaniach, w Polsce w 1968 r., stwierdzono również wyższe miana dla wirusa heterologicznego A<sub>2</sub>(Hong-Kong) niż dla wirusa homologicznego.

Na marginesie problemu możliwości zakażenia się koni *Myxovirus influenzae* ludzi a w związku z tym możliwością wytworzenia się przeciwciał przeciw wirusowi np. A<sub>2</sub>(Hong-Kong) należy wspomnieć o poglądach niektórych badaczy. Paccaud (12) jest zwolennikiem poglądu, że *Myxovirus influenzae* posiadają

swoistą specyficzność, w stosunku do gatunku gospodarza. Jego zdaniem, w naturalnych warunkach wirusem grypy koni mogą zakazić się tylko konie.

Tab. 2. Odczyn zahamowania hemaglutynacji wykonany z surowicami koni zakażonych wirusem A (equi-2) Warszawa/69 z różnymi szczepami *Myxovirus influenzae*

Surowice	Miano OZHA			
Inaktyw. w 56° przez 30 min. Inhibitory niszczone RDE	Szczepy <i>Myxovirus influenzae</i>			
Cambr./65	A(equi-1) Cambr./65	A(equi-2) Engl./69	A <sub>2</sub> (Hong-Kong) 68	A <sub>2</sub> (Hong-Kong) 68 (I. R.)*
A(equi-2) Cambr./63, surowica kurcząca	240	< 10	< 10	nrb
A(equi-2) Engl./65, surowica kurcząca	< 10	240	< 10	< 10
A <sub>2</sub> (Hong-Kong)68	< 10	120	> 640	> 640
Surowice badanych koni:				
koń 1BL — stan ostry	< 10	< 10	320	< 10
koń 1BI — rekonwalescencja	< 10	240	640	20
koń 1J/L — stan ostry	30	< 10	160	< 10
koń 1J/L — rekonwalescencja	30	480	480	< 10
koń 11C/L — rekonwalescencja	40	80	240	< 10
koń H/L	30	< 10	320	nrb
koń D/Lt	60	120	640	nrb
koń O/S	< 10	< 10	> 640	< 10
koń D/S	< 10	< 10	480	< 10
koń R/Lt	< 10	< 10	640	nrb
koń H/Lt	< 10	< 10	> 640	nrb

Objaśnienia: nrb — odczynu nie robiono; I. R. — szczep oporny na inhibitor zawarty w surowicy konia. Interpretacja wyników OZHA: konie 1BL i koń 1J/L przebyły nie dawno zakażenie wirusem A (equi-2). Na podstawie badania tylko raz pobranej próbki krwi koni: 11/CL i D/Lt można twierdzić, że konie te posiadają przeciwciała przeciw wirusowi A (equi-1) i A (equi-2), natomiast surowice koni O/S, D/S, R/Lt i H/Lt wykazują odczyn ujemny w stosunku do A (equi-1) i A (equi-2). Odczyn OZHA dodatni z wirusem A<sub>2</sub> (Hong-Kong, jako wirusom antygenowo spokrewnionym z wirusem koni A (equi-2) nie ma znaczenia diagnostycznego.

Doświadczalnie zakażano dużą dawką wirusą A(equi-2) ludzi, jak również wirusem grypy ludzi A<sub>2</sub>(Hong-Kong) — konie, wywołując zarówno u ludzi jak też u koni objawy choroby (7, 8, 15).

Blaskovic (1) bez wątpliwości stwierdził możliwość doświadczalnego zakażenia koni wirusem A<sub>2</sub>(Hong-Kong), wykazując nie tylko odpowiadając immunologiczną ale też namnażanie się wirusa w nabłonku błony śluzowej jamy nosowej koni.

Nie ma jednak jak dotąd dowodów, aby drogą naturalną mogły zakazić się konie szczepami grypy ludzi (1, 13). Nie ma również dowodów świadczących o zakażeniu się ludzi drogą naturalną w następstwie kontaktu z końmi, stanowiącymi źródło zakażenia dla innych koni (13, 15).

W świetle przedstawionych poglądów i wyników naszych badań doświadczalnych, określenie czynnika etiologicznego wywołującego epizootię grypy koni w danym okresie, tylko na podstawie badań serologicznych (OZHA), jest niewystarczające. Mogą one stanowić tylko wstępne rozeznanie sytuacji epizootologicznej. Pogląd ten znalazł uzasadnienie również w badaniach przeprowadzonych nad grypą koni w kraju w 1969 r. w naszym Instytucie. W tab. 2 na przykładzie kilku surowic podajemy interpretację wyników serologicznych, uzyskanych z różnymi szczepami *Myxovirus influenzae*. Interpretacja wyników OZHA uwzględniająca przebieg wytwarzania się przeciwciał u koni, zakażonych drogą naturalną *Myxovirus influenzae*, okazała się w naszych badaniach zgodną z wynikiem badań nad określeniem izolowanego czynnika etiologicznego grypy koni w Polsce w 1969 r.

W wyniku naszych badań stwierdzono, że wyizolowane po raz pierwszy w kraju w czasie epizootii w 1969 r. z przypadków grypy koni, szczepy wirusa należą do podtypu A(equi-2).

W celu podkreślenia pochodzenia wyizolowanych szczepów w Polsce i odróżnienia ich od szczepów podtypu A(equi-2) wyizolowanych w innych krajach, szczepy te nazwano A(equi-2) Warszawa 69.

Badania nasze wykazały więc, na podstawie przeprowadzonych badań, że ostatnia epizootia grypy koni w Polsce w 1969 r. została wywołana przez wirus A(equi-2) Warszawa 69.

Autorzy dziękują Pani M. Rose z Cambridge, za niezwykle uprzejmą i szybką pomoc w potwierdzeniu naszych badań nad identyfikacją krajowych szczepów grypy koni, wyizolowanych w czasie epizootii grypy koni w Polsce w 1969 r.

#### Piśmiennictwo

- Beveridge W. I. B., Mahafey L. W., Rose M. A.: Vet. Rec. 77, 57, 1965.
- Blaskovic D., Kapitancik B., Sabo A., Styk B., Vrtiak O., Kaktan M.: Acta Virol. 19, 499, 1969.
- Bürki F.: Separatum, V. Intern. Kongress f. Infekth. Wien, 31.VIII-5.IX.1970.
- Cateigne G.: Proc. 2-nd Cong. Equine Infectious Diseases 94, 1969.
- Harris R. J. C.: Techniques in Experimental Virology. Acad. Press, 1964.
- Kasel J. A., Fulk R. V., Couch R. B.: J. Immunol. Baltimore, 2, 530, 1969.
- Kasel J. A., Byrne R. J., Harvey E. W., Shillinger R.: Nature 219, 968, 1968.
- Knight C. A.: J. Exp. Med. 83, 281, 1964.
- Lief F. S., Cohen D.: Amer. J. Epid. 82, 225, 1965.
- Marois P., Pavilanis V., Boudreault A., Di Franco: Canad. J. Comp. Med. a Vet. Sci. 27, 257, 1963.
- Masurel N., Mulder J.: Bull. Wild. Rith. Org. 34, 885, 1966.
- Paccaud M. F.: Proc. 2-nd Intern. Conf. Equine Infectious Diseases, 81, 1969.
- Paccaud M. F., Bürki F., Gerber H.: Ztrblt. f. Vetmed. 13, 417, 1966.
- Mc Queen J. L., Kaye H. S., Coleman M., Dowdle W.: J. A. V. M. A. 155, 265, 1969.
- Waddel G. H., Teigland M. B., Sigel M.: J. A. V. M. A. 143, 587, 1963.
- Woyciechowska S., Brzosko W., Kita J.: Mikrob. i Med. Dośw. (w druku).

Adres autora: prof. dr Stanisława Woyciechowska, Warszawa, ul. Bruna 10 m. 30.