

24. Parsons I. M., Egerton J. R., Roberts D. S.: J. comp. Path. 77, 309, 1967.  
 25. Roberts D. S.: Br. J. exp. Path. 48, 663, 1967.  
 26. Roberts D. S.: Br. J. exp. Path. 48, 674, 1967.  
 27. Roberts D. S.: J. infect. Dis. 120, 720, 1969.  
 28. Roberts D. S., Egerton J. R.: J. comp. Path. 79, 217, 1969.  
 29. Ross J. G., Graham N. P.: J. Counc. Sci. Ind. Res. Aust. 6, 91, 1932.  
 30. Sambrook P. M. E.: Vet. Rec. 67, 74, 1955.  
 31. Stewart D. F.: Aust. vet. J. 30, 200, 1954.  
 32. Stewart D. F.: Aust. Vet. J. 30, 380, 1954.  
 33. Thomas J. H.: Aust. vet. J. 33, 263, 1957.  
 34. Thomas J. H.: Aust. vet. J. 38, 159, 1962.  
 35. Thomas J. H.: Aust. J. agric. Res. 15, 1001, 1964.  
 36. Tunnickliff E. A.: J. infect. Dis. 63, 113, 1938.  
 37. Turner I. H.: Am. J. vet. Res. 20, 102, 1959.

Adres autora: prof. dr Tadeusz Jastrzębski, 20-109 Lublin, ul. Dąbrowskiego 6/1.

TADEUSZ WIJASZKA, STANISŁAW TERESZCZUK

## Badania nad laboratoryjnym rozpoznawaniem zakaźnego wirusowego zapalenia żołądka i jelit świń (TGE). I. Izolacja oraz próba identyfikacji wirusa

Z Zakładu Badania Chorób Świń Instytutu Weterynarii w Puławach

Zakaźne zapalenie żołądka i jelit świń (TGE = *transmissible gastroenteritis*) urasta w wielu krajach, a także w Polsce, do rangi poważnego problemu epizootologicznego i ekonomicznego (3, 4, 8, 10, 11, 12). Choroba ta jest szczególnie groźna dla trzody chlewnej w gospodarstwach wielkostatdnych. Powoduje ona ostre, wyniszczające biegunki u prawie całego pogłowia świń oraz prowadzi najczęściej do 100% śmiertelności wśród prosiąt do 10—14 dnia życia. W powyższej sytuacji zrozumiałe jest duże zainteresowanie zagadnieniem TGE ze strony wielu badaczy. Znaczna część prac z tego zakresu dotyczy diagnostyki, a przede wszystkim diagnostyki laboratoryjnej (1, 2, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 16). W Polsce, za wyjątkiem doniesienia Sobiecha i wsp. (10), brak jest dotychczas publikacji z zakresu laboratoryjnego rozpoznawania TGE. Z tego względu wydawało się celowe podjęcie wielokierunkowych badań nad diagnostyką wymienionej jednostki chorobowej (14, 16, 17). Pierwsza ich część, której celem było wyizolowanie krajowego szczepu wirusa TGE, stanowi przedmiot niniejszego doniesienia.

### Materiał i metody

Do badań użyto:

1. trzy pięciodniowe podejrzane o TGE prosięta (żywe), dostarczone do badań rozpoznawczych z dużego gospodarstwa PGR, w którym wybuchła szybko szerząca się choroba biegunkowa (w ciągu tygodnia padło ok. 400 kilkudniowych prosiąt);
2. hodowle komórek nerki świni (HKNS) oraz tarczycy świni (HKTS) przygotowywane wg Whittle i Easterday (16). Jako płyny wzrostowe stosowano różne porcje płynów Hanksa i Earle'a z dodatkiem 0,5% hydrolizatu laktoalbuminy, 10% surowicy cielęcej oraz antybiotyków (100 j. penicyliny kryst., 100 µg streptomycyny i 100 µg nystatyny na 1 ml);
3. cytopatyczny szczep wirusa TGE oznakowany symbolem N-17, adaptowany do HKNS o mianie  $10^{6,5}$  TCID<sub>50</sub>, który otrzymano z Instytutu Weterynarii w Brnie (Czechosłowacja);

4. surowicę świni hiperimmunizowanej szczepami wirusa TGE o mianie neutralizującym 1:512, otrzymaną z Instytutu Weterynarii w Brnie;

5. miot dwudniowych klinicznie zdrowych prosiąt-osesków (8 sztuk) wraz z maciorą, pochodzącą z gospodarstwa wolnego od TGE.

Otrzymane do badania chore prosięta usypiano, przeprowadzono sekcję i pobierano wycinki jelit cienkich (czcze i biodrowe), śledziony, wycinki płuc oraz pakiety węzłów chłonnych krezkowych. Następnie, oddzielnie z wycinków pochodzących z poszczególnych narządów, wykonywano posiewy na ogólnie stosowane podłoża bakteriologiczne, oraz przygotowano rozciery w PBS, który zawierał w 1 ml 500 j. penicyliny kryst., 500 µg streptomycyny i 200 µg nystatyny. Rozciery wirowano przez 30 min. przy 5000 obr./min., supernatant zbierano do próbek i zamrażano w temp. —30°C. Przechowywane w tej postaci rozciery były następnie używane — po szybkim odmrożeniu — do zakażenia hodowli komórek (0,2 ml na 1 próbkę lub 0,5 ml na 1 buteleczkę Legroux).

Dla celów porównawczych zakażono równolegle po kilka próbek i butelek Legroux znanym szczepem TGE N-17, a także pozostawiono hodowlę kontrolne — niezakażone.

Próbie identyfikacji wyosobnionego z hodowli komórek czynnika cytopatycznego przeprowadzano w odczynie seroneutralizacji (sn), wykonywanym przy użyciu znanej w.w. surowicy o wysokim mianie przeciwciał neutralizujących wirus TGE, wg zasad opisanych w innej pracy (14). Równolegle wykonywano też sn ze szczepem N-17.

Na miocie zdrowych prosiąt i maciorze wykonano próbę biologiczną, podając trzem prosiątom *per os*  $2 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>, a maciorze  $20 \times 10^5$  wyosobnionego czynnika cytopatycznego. Trzy prosięta pozostawiono przy maciorze dla zakażenia kontaktowego, a dwa zabito przed nastawieniem próby dla celów porównawczo-kontrolnych. Część zakażonych prosiąt usypiano 24—48 godz., a część padła z powodu choroby.

### Wyniki

1. Wywiad epizootyczny, objawy kliniczne oraz zmiany sekcyjne u nadesłanych prosiąt.

Choroba pojawiła się w jednej chlewni u 6 miotów kilkudniowych prosiąt. Pierwszymi objawami było posmutnienie zwierząt, niechęć do ssania oraz nieznaczna zwyżka wewnętrznej ciepłoty ciała. W kilka

godzin później wystąpiły wymioty i ostra biegunka koloru szaro-żółtego. W następnym dniu choroba objęła całą chlewnię, a wkrótce pojawiła się też w czterech dalszych. Chorowały wszystkie świnię z objawami wodnistej biegunki o różnym nasileniu, a u mator stwierdzono bezmleczność.

W poszczególnych miotach prosiąt do 3-tygodni życia śmiertelność wynosiła 80—100%, natomiast u starszych prosiąt i warchlaków upadki występowały tylko w pojedynczych przypadkach.

Badaniem sekcyjnym u nadesłanych chorych prosiąt stwierdzono: rozpułchnienie, niezbyt i mierne przekrwienie błony śluzowej żołądka, jelita czczego, jelita biodrowego oraz jelit grubych; przekrwienie i zwyrodnienie miąższowe wątroby, zwyrodnienie warstwy korowej oraz przekrwienie warstwy rdzennej nerek; nastrzykanie naczyń krezki oraz przekrwienie jej węzłów chłonnych, nieliczne wybroczyny pod opłucną płucną; żołądek wypełniony ścietym mlekiem, jelita cienkie rozdęte, a ich ściana zcieńczała i w znacznym stopniu przejrzysta; zanik kosmków i błony śluzowej w jelicie czczym i biodrowym.

#### 2. Badanie bakteriologiczne.

W posiewach z narządów wewnętrznych brak było wzrostu drobnoustrojów, z wyjątkiem posiewów z jelit cienkich, w których stwierdzono pojedyncze kolonie niehemolitycznych pałeczek *E. coli*.

3. Izolacja czynnika cytopatycznego w hodowli komórek.

Przygotowane do badań HKNS uzyskiwały 90—95% pokrycia po 6—7 dniach od zakażenia, wykazując najobfitszy wzrost w płynie odżywczym o składzie 45% płynu Hankasa, 45% płynu Earle'a, z 0,5% dodatkiem hydrolizatu laktoalbuminy, 10% surowicy cielejcej i antybiotyków jak podano uprzednio HKTS uzyskiwały takie pokrycie 7—11 dni po założeniu w płynach o identycznym składzie.

Rezultaty zakażenia HKNS i HKTS rozcierami narządów wewnętrznych prosiąt podejrzanych i TGE przedstawia tab. 1.

okien". Po 5—6 dniach na dnie buteleczek pozostawało jedynie ok. 20% zmienionych komórek. Podobny efekt stwierdzono w HKNS zakażonej szczepem N-17. Natomiast w hodowlach komórek nerki świni zakażonych rozcierem śledziony i płuc, oraz w hodowlach kontrolnych — niezakażonych brak było jakichkolwiek zmian.

W HKTS efekt cytopatyczny, zbliżony do opisanego wyżej, stwierdzono we wszystkich przypadkach, a więc również w hodowlach zakażonych rozcierem płuc i śledziony. Należy również zaznaczyć, że pierwsze zmiany w komórkach (zakręglenie) pojawiały się tu co najmniej o 24 godz. wcześniej niż w HKNS.

4. Próba identyfikacji wyosobnionego czynnika cytopatycznego w odczynie seroneutralizacji.

Próbę seroneutralizacji wykonywano przy użyciu czynnika cytopatycznego uzyskanego z piątego pasażu w HKNS i HKTS. Wyniki są przedstawione w tab. 2.

Dane przedstawione w tab. 2 wykazały, że wyizolowany w obu rodzajach hodowli komórek czynnik cytopatyczny w surowicy anty-TGE uzyskał takie same miano TCID<sub>50</sub> jak znany szczep N-17. Należy przeto sądzić, że był to wirus TGE.

#### 5. Próba biologiczna na świniach.

Wyniki zebrane w tab. 3 wskazują, że prosięta zakażone doustnie, jak również na drodze mleczno-kontaktowej, już po 24—36 godz. od zakażenia reagowały utratą apetytu, posmutnieniem, wymiotami oraz charakterystyczną biegunką koloru żółtka jaja kurzego. U matori obserwowano jedynie znaczne zmniejszenie apetytu i kilkudniową utratę mleka.

U wszystkich dobitych bądź padłych prosiąt stwierdzono zmiany anatomopatologiczne bardzo zbliżone do opisanych poprzednio łącznie z charakterystycznym zanikiem kosmków w jelicie czczym i biodrowym. Zmiany te powstawały już po 24 godzinach.

Z jelit cienkich zakażonych prosiąt reizolowano w HKNS wirus TGE. Wyizolowany cytopatyczny szczep

Tab. 1. Izolacja czynnika cytopatycznego w HKNS i HKTS z narządów prosiąt podejrzanych o zakaźne wirusowe zapalenie żołądka i jelit świń

Hodowla komórek	Narządy prosiąt				Szczep N-17
	j. cienkie	w. chłonne krezkowe	śledzioną	płuca	
Nerki świni	+	+	-	-	+
Tarczycy świni	+	+	+	+	+

Objaśnienia: + = efekt cytopatyczny; - = brak zmian.

Dane zebrane w tab. 1 wskazują że w badanych narządach obecny był czynnik cytopatyczny, powodujący zmiany w hodowlach komórek nerki i tarczycy świni.

W HKNS zmiany te pojawiały się 3—4 dnia, ale tylko w hodowlach zakażonych rozcierem jelit cienkich i węzłów chłonnych krezkowych. Początkowo stwierdzono zakręglenie komórek i obecność w ich cytoplazmie drobnych ziarnistości. Następnie dochodziło do powstania w hodowli nieregularnych „pustych

wirusa zakaźnego zapalenia żołądka i jelit oznaczono symbolem C-71.

### Omówienie wyników

Wyizolowany w badaniach własnych czynnik zakaźny, wywołujący zmiany cytopatyczne w hodowli komórek nerki i tarczycy świni, moż-

Tab. 2. Miano czynnika cytopatycznego (I i V pasaż) w hodowlach komórek oraz wyniki próby sn piątego pasażu ze znaną dodatnią surowicą anty-TGE

Hodowla komórek	Miano czynnika cytopatycznego		Miano sn surowicy anty TGE z wyizolowanym czynnikiem cytopatycznym	Miano wirusa N-17	Miano sn surowicy anty TGE z wirusem N-17
	I pas.	V pas.			
Nerki świni	10 <sup>4,0</sup>	10 <sup>5,5</sup>	1 : 256	10 <sup>6,0</sup>	1 : 256
Tarczycy świni	10 <sup>4,5</sup>	10 <sup>6,0</sup>	1 : 256	10 <sup>6,5</sup>	1 : 256

Tab. 3. Wyniki zakażenia prosiąt wyizolowanym szczepem wirusa TGE

Nr	Droga zakażenia	Objawy kliniczne	Czas uśpienia/padnięcia prosiąt od chwili zakażenia (w godz.)	Zmiany histol.	Reizolacja wirusa
Prosię 1	doustna	pub *)	24/	+	+
Prosię 2	doustna	pub	48/	+	+
Prosię 3	doustna	pub	/72	+	+
Prosię 4	kontaktowa	pub	48/	+	+
Prosię 5	kontaktowa	pub	/48	+	+
Prosię 6	kontaktowa	pub	/96	+	+
Prosię 7	kontrolne	—	—	—	—
Prosię 8	kontrolne	—	—	—	—

Objaśnienia: \*) p = posmutnienie; u = utrata apetytu; b = biegunka.

na, wydaje się, uznać za wirus TGE. Za powyższym przemawiają następujące fakty:

a) użyty do badania materiał patologiczny pochodził z kilkudniowych prosiąt dostarczonych z gospodarstwa, w którym wszystkie świnię, niezależnie od wieku chorowały wśród objawów typowych dla TGE;

b) w hodowlach komórek nerki i tarczycy świni, zakażonych rozcierem jelit badanych prosiąt stwierdzono efekt cytopatyczny, identyczny z tym, jaki uzyskano przy równoległym zakażeniu w.w. hodowli znanym szczepem TGE N-17;

c) zdrowe prosięta sztucznie zakażone *per os* namnożonym na w.w. hodowli komórek czynnikiem cytopatologicznym zachorowały wśród objawów klinicznych i zmian anatomo-patologicznych charakterystycznych dla TGE (13);

d) w hodowlach komórek nerki i tarczycy świni zakażonych rozcierem jelit uśpionych prosiąt doświadczalnych, stwierdzono identyczne zmiany cytopatologiczne, jak w hodowlach zakażonych materiałem patologicznym, pobranym od podejrzanych o TGE prosiąt dostarczonych z terenu, oraz w hodowlach HKTS i HKNS zakażonych znanym szczepem N-17;

e) dodatnia surowica anty-TGE dodana do hodowli komórek zakażonych wyosobnionym szczepem hamowała powstawanie efektu cytopatycznego (neutralizowała wirus) w takim samym rozcieńczeniu, jak w przypadku hodowli komórek zakażonych szczepem N-17.

Uzyskane wyniki po raz pierwszy w naszym kraju pozwoliły na rozpoznanie TGE w oparciu o klasyczną triadę Kocha. Są one zgodne z doniesieniami szeregu badaczy, dotyczącymi zdolności wirusa TGE do namnażania się w hodowlach komórek i tarczycy świni (1, 2, 5, 6, 7, 9, 16). Pierwsze dane na ten temat opublikował Lee (9) a następnie Eto i wsp. (5). Wymienieni autorzy dokonali 28 pasażów wirusa TGE w HKNS nie uzyskując efektu cytopatycznego. O wyizolowaniu z jelit cienkich chorych prosiąt cytopatycznego szczepu TGE Shizuka jako pierwsi donieśli Harada i wsp.

(7). Jednakże efekt cytopatyczny w HKNS uzyskali oni dopiero w trzecim pasażu. Wkrótce po tym, Cartwright i wsp. (1) wyizolowali 4 szczepy TGE, które już w pierwszym pasażu wywoływały widoczne zmiany w HKNS, powodując jednakże tylko zaokrąglenie komórek, o właściwy efekt z „pustymi oknami” pojawił się dopiero w dalszych pasażach.

O wyizolowaniu cytopatycznych szczepów wirusa TGE donieśli następnie m. in. Bohl i Kumagi (cyt. za 3), Mc Clurkin i Norman (2), Whitte i Easterday (16). Ci ostatni wykazali prócz tego, że wirus TGE namnaża się bardzo dobrze w hodowli komórek tarczycy i ślinianki świni, dając przy tym szybszy i wyraźniejszy efekt cytopatyczny niż w HKNS. Potwierdziły to następnie badania innych autorów tak, że obecnie hodowle komórek tarczycy świni są ogólnie stosowane. Również z pracy własnej wynika, że HKTS jest bardziej przydatna do izolacji wirusa TGE niż HKNS. Stosując bowiem do zakażenia rozciery śledziony i płuc chorych na TGE prosiąt efekt cytopatyczny uzyskano w HKTS a nie uzyskiwano go w HKNS. Można to tłumaczyć najprawdopodobniej większą wrażliwością na TGE (podatnością na zakażenie) komórek tarczycy niż komórek nerki świni. Sprawa powyższa nie jest może zbyt istotną przy stosowaniu rozcierów z bogatej w wirus śluzówki jelit cienkich; nabiera natomiast znaczenia wówczas, kiedy staramy się wykazać obecność zarazka w innych narządach. Za wyższością HKTS nad HKNS przemawia również fakt uzyskiwania w pracy własnej wyższych mian wirusa w pierwszej z wymienionych hodowli.

Reasumując, wydaje się możliwe stwierdzić, że wyizolowanie po raz pierwszy w Polsce cytopatycznego szczepu wirusa TGE i wykazanie jego zjadliwości dla świń (prosiąt), które po sztucznym zakażeniu chorowały wśród typowych dla tej choroby objawów, pozwala na autorytatywne potwierdzenie istnienia TGE w naszym kraju.

## Piśmiennictwo

1. Cartwright S. F., Harris A. M., Blandford T. B., Fincham J., Gitter M.: J. comp. Path. 75, 387, 1965.
2. Clurkin A. W., Norman J. D.: Canad. J. comp. Med. 30, 199, 1966.
3. Cottercau Ph.: „La Gastro-Enterite Transmissible du Porc” — L'expansion Scientifique Francaise, Paris, 1971.
4. Doyle L. P., Hutchings L. M.: J. Am. vet. med. Ass. 108, 257, 1946.
5. Eto M., Ichihara T., Tsunoda T., Watanabe S.: J. Japan. vet. med. Ass. 15, 16, 1962.
6. Harada K., Kumagai T., Sasahara J.: J. Nat. Inst. Anim. Hlth. At. Tokyo, 3, 166, 1693.
7. Harada K., Kumagai T., Sasachara J.: J. Nat. Inst. Anim. Hlth. At. 7, 127, 1967.
8. Janowski H., Golaszewski H.: Medycyna Wet. 16, 781, 1961.
9. Lee K. M.: Ann. N. Y. Acad. Sci. 66, 191, 1956.
10. Sobiech T., Bohdalek R., Łosieczka K.: Medycyna Wet. 28, 328, 1972.
11. Stepanek J., Mesaros E., Pospisil Z.: Virova gastroenterita prasat (VGP), Studijn informace, Praga, 1969.
12. Tereszczuk S.: Biul. Inf. Instytutu Wet. w Puławach 23, 18, 1972.
13. Tereszczuk S., Wijaszka T.: Życie wet. 48, 295, 1973.
14. Tereszczuk S., Wijaszka T.: Badania nad laboratoryjnym rozpoznawaniem TGE. IV. Próba seroneutralizacji. Medycyna Wet. (w druku).
15. White K. H., Easterday B. C.: Arch. ges. Virusforschung 20, 3, 327, 1967.
16. Wijaszka T., Tereszczuk S.: Medycyna Wet. 30, 27, 1974.
17. Zadura J., Roszkowski J., Tereszczuk S., Wijaszka T.: Medycyna Wet. 30, 145, 1974.

Adres autora: dr Tadeusz Wijaszka, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy.

ALEKSANDRA HARTWIG

## Ujednoczona metoda badania próbek pszczół w kierunku choroby zarodnikowcowej

Z Instytutu Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych Wydziału Weterynaryjnego AR w Warszawie

Choroba zarodnikowcowa pszczół wywoływana przez pierwotniaka *Nosema apis* Zander powoduje corocznie duże straty w pasiekach. Choroba ta często przebiega w stadium utajonym i trudnym do wykrycia przy badaniu rodziny pszczelej. Dlatego w celu ustalenia stanu zdrowia pasieki, zaleca się coroczne pobieranie do badania pszczół z tzw. osypu zimowego i przesylanie ich do Pracowni Rozpoznawczej Chorób Pszczół ZHW.

Wysyłana z jednego pnia próbka winna liczyć według instrukcji Nr 2 Min. Rol. z dnia 15.IX. 1966 r. od 30—50 szt. pszczół. Dotychczas badania wykonywane są metodą podaną przez Kirkora, według której odwołki badanych pszczół miażdży się w mózdzierzu po dodaniu kilku kropel wody, następnie sporządza się preparat wodny i ogląda pod mikroskopem przy powiększeniu 400—600 razy. W przypadku potrzeby dokładnego ustalenia procentu zakażenia, każdą pszczołę bada się indywidualnie. Badanie każdej pszczoły w próbce liczącej 30—50 osobników jest ogromnie pracochłonne. Odczuwa się brak opracowań jednolitej techniki przygotowania do badań nadsyłanego materiału. Ilość nadsyłanych pszczół w każdej próbce jest inna, a określenie „kilka kropel” wody bywa różnie interpretowane. Metoda Kirkora pozostawia dość dużą dowolność w przygotowaniu materiału, co sprawia, że w poszczególnych pracowniach rozpoznawczych materiał jest w różny sposób przygotowany do badań.

Na łamach prasy pszczelarskiej hodowcy często donoszą, że próbki pszczół z tego samego pnia, wysyłane do różnych pracowni wykazują rozbieżne wyniki.

Wykonana praca ma na celu zaproponowanie jednolitego, szybkiego systemu badań, który pozwoliłby na jednoczesną ocenę stopnia zakażenia badanych pszczół.

### Materiał i metody

Materiał do badań stanowiły próby pszczół pobrane z osypu zimowego w 4 pasiekach z terenu woj. warszawskiego. W pracy pasieki oznaczono literami A, B, C, D. Pobieranie materiału wykonano dwukrotnie w okresach: 26.I—10.II. i 20—24.III.1973 r. Otrzymane pszczoły w poszczególnych próbkach preparowano przez odcięcie odwłoków. Następnie określano w cylindrze miarowym objętość badanych odwłoków i przenoszono je do mózdzierzy, dodawano taką samą ilość wody, jaką zajmowały odwołki i przygotowywano z nich rozcier. Do badań mikroskopowych pobierano jedną kroplę rozcier, przygotowywano z niej preparat i oglądano przy powiększeniu około 600 razy.

Prowadzono wzrokową ocenę stopnia zakażenia wg Roberta:

- I — pojedyncze zarodniki w polu widzenia (+);
- II — zarodniki widoczne w każdym polu widzenia nie stykające się (++);
- III — bardzo liczne zarodniki stykające się (+++).

### Wyniki

W badaniu pierwszym wykonanym 26.I—10.II.1973 r. przygotowano 144 próbki, z których 102 wykazywały zakażenie chorobą zarodnikowcową. Z tego 13 próbek wykazywało zakażenie I stopnia, 18 próbek zakażenie II stopnia i 71 próbek zakażenie III stopnia.

W badaniu drugim wykonanym 20—24.III.1973 r. przeprowadzonym po pierwszym oblocie, przebadano pasieki oznaczone literami B i D, w których było 116 pni pszczelich. W 93 próbkach stwierdzono chorobę. Z tego 7 próbek