

TADEUSZ WIJASZKA, STANISŁAW TERESZCZUK

Badania nad laboratoryjnym rozpoznawaniem zakaźnego wirusowego zapalenia żołądka i jelit świń (TGE). IV. Próba seroneutralizacji

Z Zakładu Badania Chorób Świń Instytutu Weterynarii w Puławach

W poprzednich pracach własnych nad laboratoryjnym rozpoznawaniem TGE przedstawiono zasady izolacji wirusa z padłych i dobitych z powodu tej choroby prosiąt (3), zasady diagnostyki opartej na badaniach histopatologicznych (17) oraz na próbie immunofluorescencji bezpośredniej (14). Wymienione metody pozwalają na rozpoznanie typowe przebiegającej choroby, która pojawiła się w wolnym dotychczas od niej stadzie, powodując silne biegunki u większości zwierząt i upadki w grupie prosiąt osesków. Metody te są natomiast mało przydatne do diagnozowania TGE w stadach, w których omawiana jednostka chorobowa występuje stacjonarnie i w związku z tym przebiega łagodnie w atypowej postaci, atakując od czasu do czasu jedynie część zwierząt — przeważnie nowo odsadzone prosięta oraz sztuki świeżo nabyte, a upadki zdarzają się sporadycznie, czy też nie notuje się ich wcale. W takich przypadkach, a szczególnie wówczas, kiedy ma miejsce zakażenie bezobjawowe (6), znaczne usługi diagnostyczne może oddać próba seroneutralizacji (3, 6, 8), wykonywana *in vitro* w oparciu o hodowlę komórek nerki świni (2, 4, 5, 15) lub tarczycy świni (7, 15) oraz cytopatyczny szczep wirusa TGE.

Mając powyższe na uwadze podjęto niniejszą pracę, której głównym celem było zaadaptowanie próby sn do rutynowej diagnostyki TGE w naszym kraju.

Materiał i metody

Do badań użyto:

1. 6 młodych świń o ciężarze ciała ok. 60 kg, pochodzących z hodowli własnej IWet.
2. 102 surowice krwi pobieranej od warchlaków w 3 gospodarstwach uspołecznionych po upływie ok. 10—14 dni, 1, 2 i 4 miesięcy od daty klinicznego rozpoznania TGE, które zostało potwierdzone również w IWet badaniem histopatologicznym i próbą immunofluorescencji bezpośredniej.
3. 600 surowic krwi pobranej od świń różnego wieku — głównie zaś od warchlaków w 35 gospodarstwach uspołecznionych w celu potwierdzenia podejrzenia o TGE przebyte przed 2—5 miesiącami (w większości przebieg łagodny — tylko przejściowe biegunki, brak rozpoznania laboratoryjnego w czasie trwania choroby) lub też uznania tych gospodarstw za wolne od omawianej choroby.

4. Cytopatyczne szczepy wirusa TGE: a) Purdue, adaptowany do hodowli nerki świni, (HNKS) —

otrzymany z Instytutu Wet. w Brnie, b) N-17 adaptowany do HNKS oraz hodowli komórek tarczycy świni (HKTS) — również otrzymany z Brna, c) krajowy szczep C-71 wyizolowany we własnym zakresie z błony śluzowej jelit cienkich padłego na TGE prosięcia.

5. Jednorazowe hodowle komórek nerki świni oraz tarczycy świni przygotowane według ogólnie znanych zasad. Stałą linię hodowli nerki świni PK15 przygotowaną przez trypsynowanie hodowli macierzystej w ciągu 40 min. w temperaturze 37°C. Osad odklejonych komórek zawieszano w płynie Eagle'a (MEM — 1959) z dodatkiem 10% surowicy cielęcej oraz antybiotyków. Z jednej buteleczki Legroux uzyskiwano 45 ml zawiesiny komórek, z której przygotowywano bądź 3 butelki Legroux (à 15 ml na buteleczkę), bądź 30 probówek bakteriologicznych (à 1,5 ml hodowli).

Doświadczalne świnię, po uprzednim stwierdzeniu, że w surowicy krwi nie posiadają przeciwciał neutralizujących wirus TGE, podzielono na 2 grupy, z których pierwszą zakażono donosowo i *per os* dużą dawką wirusa N-17 (20×10^6 TCID₅₀), a drugą w ten sam sposób szczepem C-71. Od wszystkich doświadczalnych zwierząt pobierano krew w 5, 10, 15 i 20 dniu po zakażeniu. Uzyskaną surowicę inaktywowano w temp. +56°C przez 1/2 godz. i przechowywano w temp. —30°C.

Przed wykonaniem odczynu seroneutralizacji celem dokonania wyboru najbardziej wrażliwej hodowli komórek oznaczono miano wzorcowego szczepu „Purdue” w HKNS, HKTS i PK15 wg ogólnie przyjętych zasad. Średnie miana obliczano wg metody Reeda Muencha. TCID₅₀ wymienionego szczepu we wszystkich trzech rodzajach hodowli komórek były zbliżone ($10^{6,15}$ — $10^{6,47}$). W związku z powyższym w pracy używano — w zależności od aktualnych warunków technicznych — jedną z tych hodowli.

Odczyn seroneutralizacji z surowicami pochodzącymi od świń doświadczalnych oraz nadesłanymi z terenu wykonano, stosując rozcieńczenia surowic w postępie geometrycznym i dodając stałą dawkę wirusa 100 TCID₅₀/0,1 ml. Mieszankę wirus — surowica inkubowano w łaźni wodnej w temp. +37°C przez 1 godz., a następnie każdym rozcieńczeniem zakażano 3—5 probówek z 24—48 godz. hodowlą komórek HKNS, HKTS lub PK15 do 9 pasażu. Po półgodzinnej inkubacji w temp. 37°C dodawano płyn utrzymujący, składający się z 98% płynu Eagle'a, 2% surowicy cielęcej oraz antybiotyków w ogólnie przyjętych dawkach. Obecność przeciwciał stwierdzono na podstawie braku efektu cytopatycznego w zakażonych hodowlach komórek po 3, 4 i 5 dniach po zakażeniu. Efekt zobojętniający wirusa TCID₅₀ obliczano wg metody Reeda Muencha. Do odczynu nastawiono kontrolę płynu utrzymującego, właściwej dawki wirusa, braku czynnika cytopatycznego w badanych surowicach, oraz kontrolę ze znaną surowicą dodatnią.

Tab. 1. Dynamika powstawania swoistych przeciwciał sn u świń zakażonych doświadczalnie dwoma szczepami wirusa TGE

Grupa	Nr świń	Szczep TGE użyty do zakażenia	Miano sn				
			przed zakażeniem	po zakażeniu			
				5 dni	10 dni	15 dni	20 dni
I	409	C — 71	0	0	0	1:2	1:4
	426		0	0	0	0	1:2
	427		0	0	0	0	1:2
II	428	N — 17	0	0	1:2	1:4	1:8
	429		0	0	1:2	1:4	1:16
	430		0	0	1:2	1:4	1:16

Wyniki i omówienie

Wyniki pracy przedstawiono w tab. 1, 2 i 3.

Dane zawarte w tab. 1 wskazują na to, że oba szczepy wirusa TGE pobudziły organizm świń doświadczalnych do swoistej odpowiedzi immunologicznej. Jeśli jednak chodzi o szybkość uzyskania tej odpowiedzi to należy stwierdzić, że w grupie świń zakażonych szczepem C-71 (gr. I) była ona o połowę mniejsza, niż w grupie, której podano szczep N-17 (gr. II). W pierwszej z wymienionych grup przeciwciała sn pojawiły się bowiem — praktycznie rzecz biorąc — dopiero po upływie 20 dni od daty zakażenia, podczas gdy w grupie drugiej wykazano ich obecność o 10 dni wcześniej. Powyższe różnice można prawdopodobnie łączyć z różnym stopniem zjadliwości użytych szczepów. Kliniczna obserwacja zakażonych zwierząt pozwoliła bowiem stwierdzić u wszystkich świń gr. I tylko posmutnienie, zmniejszony apetyt, oraz u jednej z nich miernie nasiloną jednodniową biegunkę. U zwierząt gr. II wystąpiła natomiast wyraźna apatia i brak łaknienia, a u dwu świń również silna biegunka, która trwała bez przerwy przez okres 3 dni.

Wyniki przedstawione w tab. 2 wskazują na to, że do ok. 10 dni po pojawieniu się TGE w stadzie świń, nie udało się stwierdzić swoistych dla omawianej choroby przeciwciał sn. Było to natomiast w pełni możliwe po upływie 1, 2 i 4 mies. od wystąpienia objawów TGE. Przeciwciała pojawiły się w surowicy zdecydowanej większości zwierząt. Wysokość miana kształtowała się różnie u różnych osobników, przy czym do 4 miesięcy od czasu wybuchu TGE miano sn nie wykazywało tendencji spadkowej.

Jak wykazują dane przedstawione w tab. 3, na 600 surowic uzyskanych z krwi pobranej od świń różnego wieku w 35 podejrzanych o przechorowanie TGE gospodarstwach (chlewniach) przeciwciała sn wykazano w sumie u 123 zwierząt. Należy jednak wyjaśnić, że zwierzęta te pochodziły tylko z 7 gospodarstw, stanowiąc w poszczególnych z nich 60—100% przysłanych do badania próbek krwi. W pozostałych 28 chlewniach (gospodarstwach) nie stwierdzono natomiast swoistych dla TGE przeciwciał sn. W związku z powyższym wydaje się możliwe stwierdzenie, że podejrzenie o przebyte TGE było słuszne jedynie w stosunku do pierwszych

Tab. 2. Wyniki badania surowic świń na obecność przeciwciał neutralizujących wirus TGE w różnym czasie po wybuchu choroby w stadzie

Okres pobrania krwi	Liczba zbadanych świń	Miano sn							
		0	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
ok. 10 dni po wybuchu choroby w stadzie	27	27	—	—	—	—	—	—	—
ok. 1 mies. j.w.	25	2	1	15	6	1	—	—	—
ok. 2 mies. j.w.	45	1	1	14	16	4	6	3	—
ok. 4 mies. j.w.	5	—	—	—	—	1	2	2	—

7 serologicznie dodatnich gospodarstw. W stosunku do reszty z nich podjęto podejrzenie zbyt pochopnie, opierając się jedynie na wystąpieniu u świń biegunek, które — jak wiadomo — mogą być następstwem całego szeregu przyczyn, nie mających nic wspólnego z zakaźnym wirusowym zapaleniem żołądka i jelit świń.

bardziej odległej przeszłości — uległy one zakażeniu wirusem TGE, w wyniku czego wytworzył się u nich określony poziom odporności typu humoralnego. Odporność ta jest zwykle w stanie zapewnić ozdrowieńcom, przez okres kilku lub kilkunastu nawet miesięcy, niewrażliwość na zachorowanie przy powtórnym zetknię-

Tab. 3. Wyniki badania surowicy świń podejrzanych o przechorowanie TGE przed 2—5 miesiącami

Liczba zbadanych świń	Miano sn							
	0	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
600	477	2	63	32	14	10	2	—

Wyniki całości niniejszej pracy wskazują na to, że przy pomocy próby seroneutralizacji można wykrywać stada świń, które przed 2—3 tyg. lub też wcześniej zostały zakażone wirusem TGE. Miana przeciwciał sn w badaniach własnych wahały się w granicach 0—1:64, a długość okresu utrzymywania się przeciwciał w surowicy krwi świń wynosiła co najmniej 4 miesiące (dłużej nie badano).

Jeśli chodzi o dane z piśmiennictwa, to należy stwierdzić, że czas pojawiania się u świń ozdrowieńców po TGE swoistych przeciwciał, długość ich utrzymywania się w surowicy krwi oraz znaczenie dla diagnostyki i zwalczania omawianej choroby są oceniane różnie przez różnych autorów. Większość badaczy wyraża pogląd, że przeciwciała te pojawiają się we krwi między 8 a 21 dniem po zakażeniu świń wirusem TGE (1, 3, 6, 9, 10, 14). U części zwierząt (do 30%), szczególnie w gospodarstwach wielkotowarowych, mimo ostrego przebiegu choroby w stadzie wynik próby sn bywa ujemny (9). Wysokość miana sn może wahać się w dość szerokich granicach, co — niezależnie od stopnia zjadliwości szczepu — wydaje się pozostawać w związku z indywidualnymi właściwościami organizmu poszczególnych zwierząt, jak również z ich wiekiem. Przemawiają za tym m. in. wyniki badań Moczari i wsp. (10), a także Bachmanna i wsp. (1). Pierwsi z wymienionych autorów wykazali w surowicy krwi loch prośnych i karmiących, po upływie 14 dni od daty ich zachorowania na TGE, miano sn w granicach 0—1:64. W siarze tych samych zwierząt indywidualne różnice wysokości miana były jeszcze wyższe (0—1:256). Drugi zespół autorski, badając w kilku stadach surowice krwi świń między 14—21 dniem po wybuchu TGE, stwierdził u prośnych macior miano sn w granicach 1:8—1:160, u macior karmiących 1:48—1:112, u 4—6 miesięcznych tuczników 1:5—1:40, a u 2—3 mies. warchlaków tylko 1:4—1:12. Powyższe dane są jak widać w zasadzie zbieżne z wynikami pracy własnej i to zarówno odnośnie czasu pojawiania się przeciwciał jak i wysokości miana.

Obecność swoistych przeciwciał sn w surowicy krwi świń dowodzi, że — w mniej lub

ciusiej z wirusem TGE. Maciory posiadające w surowicy miano sn co najmniej 1:30 gwarantują ochronę przed TGE karmionym przez nie prosiętom na cały okres ssania (9, 11). Należy jednak zaznaczyć, że świni ozdrowieńcy — i to nawet te z nich, które posiadają przeciwciała anty-TGE — mogą pozostawać przez okres ok. 8 tygodni, a w niektórych przypadkach nawet znacznie dłużej, nosicielami i siewcami wydzielanego głównie z kałem zarazka omawianej choroby (6, 12). Dzieje się tak m. in. dlatego, że krążące we krwi swoiste przeciwciała mają trudny dostęp do komórek nabłonka jelitowego, który — jak wiadomo — jest głównym miejscem namnażania się wirusa TGE (8). Szczególnie długotrwałymi siewcami wymienionego zarazka mają być zwierzęta, które po przebyciu TGE wykazują gorszy apetyt, zahamowanie w rozwoju i inne odchylenia od normy w ogólnym stanie zdrowia. Mając powyższe na uwadze można wyrazić pogląd, że wykrycie przy jednorazowym badaniu w gospodarstwie (chlewni) — od dłuższego nawet czasu wolnym od TGE w sensie klinicznym — pewnej liczby świń, posiadających swoiste dla omawianej choroby przeciwciała sn, nie upoważnia wprawdzie do twierdzenia, że są w tym gospodarstwie siewcy czy nosiciele zarazka, daje jednak podstawę do podejrzenia obecności takich właśnie epizootiologicznie niebezpiecznych zwierząt. Powzięte podejrzenie można — do pewnego stopnia — wyjaśnić drogą powtórnej wykonania próby sn po upływie co najmniej 4 tygodni od daty pierwszego badania (3, 8). Pojawienie się w drugim badaniu nowych zwierząt serologicznie dodatnich, jak również wzrost miana sn — szczególnie u 6—10 tygodniowych prosiąt nie poddanych szczepieniu czynnemu — świadczy o obecności i krążeniu w stadzie potencjalnie chorobotwórczego wirusa TGE. Stada takie, zgodnie z zaleceniami opracowanymi na konferencji szefów służb weterynaryjnych krajów — członków RWPG (Lipsk 1974), nie powinny dostarczać materiału hodowlanego do przemysłowych ferm trzody chlewnej.

Reasumując wyniki badań własnych oraz przedstawione dane z piśmiennictwa należy stwierdzić, że seroneutralizacja, umożliwiająca

wykrywanie u świń swoistych p-ciał w okresie od kilku dni do kilkunastu nawet miesięcy po zakażeniu tych zwierząt wirusem TGE, jest stadną próbą z wyboru w diagnostyce wymiennej choroby szczególnie tam, gdzie nie ma warunków na wcześniejsze jej rozpoznanie innymi metodami. W związku z powyższym bardzo celowe wydaje się stworzenie w Zakładach Higieny Weterynaryjnej warunków dla rutynowego wykonywania próby sn, będącej jednym z istotnych elementów w zespole metod rozpoznawania a w rezultacie też zwalczania TGE w naszym kraju.

Piśmiennictwo

1. Bachmann P. A., Hänichen T., Danner K., Bibrack B.: Zentbl. VetMed. 19, 166, 1972.
2. Cartwright S. F., Harris A. M., Blandford T. B., Fincham J., Gitter M.: Vet. Rec. 76, 1332, 1964.
3. Cotterau Ph.: La Gastro-Enterite Transmissible du Porc. L'expension Scientifique Française, Paris 1971.
4. Eto M., Ichihara T., Tsunoda T., Watanabe S.: J. Japan vet. med. Ass. 15, 16, 1962.

5. Harada K., Kumagai T., Sasahara J.: J. Nat. Inst. Anim. Hlth. 3, 166, 1963.
6. Kretschmar Ch.: Mh. Vet.-Med. 26, 51, 1971.
7. Liebermann H.: Arch. exp. VetMed. 23, 811, 1969.
8. Liebermann H., Leopoldt D., Zagrodnik G., Beyer J.: Mh. Vet.-Med. 26, 46, 1971.
9. Mesik J.: Priloženije k projektu kompleksnych mieroprijatij po profilaktike i borbie s zaraznym gastroenteritom swiniej. Materiały konferencji służb weterynaryjnych krajów RWPG, Lipsk 1974.
10. Moczari E., Beneda J., Gajdacz D.: Immunobiologiczeskije isledowanija wieusnogo gastroenterita swiniej — Materiały konferencji Instytutów Wet. Krajów RWPG, Budapeszt 1973.
11. Stiepanek J., Mensik J., Roskoszny W.: Razwitiye pasivnogo i aktywnogo immunitetow protiv wirusnogo gastroenterita swiniej. Materiały konferencji Instytutów Wet. Krajów RWPG, Budapeszt 1973.
12. Tereszczuk S., Wijaszka T.: Zycie wet. 48, 295, 1973.
13. Wijaszka T., Tereszczuk S.: Medycyna Wet. 30, 71, 1974.
14. Wijaszka T., Tereszczuk S., Mierzejewska M., Zadura J., Roszkowski J.: Medycyna Wet. 30, 217, 1974.
15. Witte K. H., Easterday B. C.: Am. J. vet. Res. 29, 1409, 1968.
16. Witte K. H., Easterday B. C.: Arch. ges. Virusforsch. 20, 327, 1967.
17. Zadura J., Roszkowski J., Tereszczuk S., Wijaszka T.: Medycyna Wet. 30, 145, 1974.

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

KONRAD WASIŃSKI

Badania właściwości biologicznych atenuowanych szczepów włoskowca różycy, używanych do produkcji szczepionek

Z Zakładu Badania Chorób Świń Instytutu Weterynarii w Puławach

Z analizy piśmiennictwa i dostępnych danych statystycznych wynika, że różycy świń, będąca jedną z najwcześniejszych i stosunkowo dobrze poznanych chorób zakaźnych, stanowi nadal aktualny problem gospodarczy i naukowy w Polsce a także w innych krajach (7, 8, 9). W ocenach krajowej sytuacji epizootycznej (4, 13) zwraca się uwagę na częste występowanie zjadliwych włoskowców w otoczeniu i organizmach świń oraz stosunkowo liczne zachorowania (w niektórych rejonach do 20%) wśród świń nieszczepionych. Przyczyny tego stanu, a także i możliwości wyeliminowania różycy świń w przyszłości trafnie wydaje się precyzować konkluzja, którą Shuman i Wood kończą obszernie opracowanie tej jednostki chorobowej (11). Autorzy ci stwierdzają mianowicie, że „jeżeli weźmie się pod uwagę szerokie rozprzestrzenienie włoskowca różycy i jego liczne powiązania z różnymi gatunkami zwierząt (ssaków i ptaków), jego oczywistą zdolność do przeżywania w pozornie niesprzyjających warunkach i brak godnych zaufania metod wykrywania, to eradykacja różycy wydaje się być bardzo odległa”.

W zespole metod zapobiegania różycy, obok stosowania niewątpliwie skutecznych zabiegów

profilaktyki ogólnej (12), bardzo ważną rolę odgrywają szczepienia profilaktyczne. Wynika stąd potrzeba stałej dbałości zarówno o właściwą organizację tych szczepień jak i o jakość stosowanych preparatów. Wartość uodporniająca żywej szczepionki przeciw różycy jest w znacznym stopniu uzależniona od właściwości szczepu włoskowca użytego do jej wytwarzania (3).

Powyższe względy stanowiły uzasadnienie dla podjęcia badań nad istotnymi dla profilaktyki cechami atenuowanych szczepów włoskowca różycy, które umożliwiłyby wskazanie jednego lub kilku szczepów, najbardziej przydatnych do immunoprofilaktyki tej choroby w Polsce. W badaniach nad zjadliwością resztkową szczepów atenuowanych posłużono się nie stosowaną dotąd w tym celu metodą immunodepresji.

W niniejszej publikacji przedstawione zostaną pokrótce wybrane fragmenty tych badań. Dalsza ich część, dotycząca rewersji zjadliwości u atenuowanych szczepów włoskowca różycy oraz możliwości jej ilościowego określenia, będą przedmiotem oddzielnego opracowania.