

MEDYCyna WETERYNARYJNA

ORGAN POLSKIEGO TOWARZYSTWA NAUK WETERYNARYJNYCH

CZASOPISMO POSWIĘCONE NAUCE I PRAKTYCE WETERYNARYJNEJ
ZALCZONE W 1945 R. PRZEZ WYDZIAŁ WETERYNARYJNY W LUBLINIE

REDAKCJA

Redaktor naczelny: prof. dr Edmund PROST

Członkowie Komitetu Redakcyjnego: prof. dr Ryszard BADURA, prof. dr Jerzy MAZURCZAK,
prof. dr Abdon STRYSZAK, doc. dr Stanisław WOŁOSZYN,

Sekretarz naukowy: dr Ryszard SŁUŻEWSKI.

RADA PROGRAMOWA

Dr Anatol BACHAREWICZ, prof. dr. Henryk BALBIERZ, prof. dr Władysław BIELAŃSKI, prof. dr Stanisław CĄKAŁA, prof. dr Zygmunt EWY, prof. dr Roman HOPPE, prof. dr Tadeusz JASTRZĘBSKI, prof. dr Lech JAŚKOWSKI, pik. doc. dr Stefan KOSSAKOWSKI, prof. dr Zdzisław LARSKI, dyr. dr Henryk LIS, dr Władysław LUTYŃSKI, prof. dr Wincenty PEZACKI, prof. dr Wiktor STEFANIAK, prof. dr Marian TRUSZCZYŃSKI, prof. dr Janusz WELENTO, prof. dr Aleksander ZAKRZEWSKI, prof. dr Eugeniusz ŻARŃOWSKI.

CHOROBY ZAKAŻNE I INWAZYJNE

ZDZISŁAW GLIŃSKI
Lublin

Znaczenie wirusów w patologii pszczół

Występowanie chorób wirusowych owadów oraz udział owadów w przenoszeniu niektórych chorób człowieka i zwierząt był znany od dawna. Niemniej jednak dopiero w ciągu ostatnich 20 lat postęp w technice badań wirusologicznych (mikroskopia elektronowa, wprowadzenie metod serologicznych do badań wirusologicznych, metody ultrawirowania) umożliwił izolację i pełną identyfikację większości wirusów patogennych dla owadów. Stało się możliwe ustalenie różnic, a często identyczności wirusa, który wywoływał choroby różnych gatunków owadów, a nawet tego samego gatunku, ale o różnym obrazie klinicznym. Wyjaśniono etiologię niektórych chorób i wyodrębniono nowe jednostki chorobowe z grupy schorzeń przebiegających wśród podobnych objawów.

Wirusy izolowane od pszczół należą do nielicznej grupy wirusów owadów, które nie wytwarzają kryształo-podobnych wtęretów (inkluzji) typu polihedrów lub granul w zakażonych komórkach. Do niedawna uważano, że wszystkie grupy wirusów owadów, nie licząc kilku odosobnionych przypadków infekcji poczwerek, powodują zakażenia wyłącznie u stadiów larwalnych (34). W przypadku wirusów pszczół przedstawiono przekonujące dowody na występowanie zakażeń tym samym wirusem zarówno u czerwiu, jak i pszczół dorosłych (6, 45) oraz na istnienie wirusów, które powodują zakażenia wyłącznie u osobników dorosłych (13).

Wirusy pszczół charakteryzują się bardzo daleko posuniętą swoistością gatunkową. Spośród wszystkich znanych wirusów izolowanych od pszczół, tylko wirus ostrego paraliżu wyosobniono z niektórych gatunków trzmieli z rodzaju *Bombus* (12). Wirus ten najprawdopodobniej stale przebywa w organizmie tych owadów. Jest to więc jedyny dotychczas znany wirus patogenny dla pszczół, który ma alternatywnego żywiciela (8).

Prawie wszystkie wirusy pszczół mogą wywoływać zakażenia latentne. Spośród wirusów nie wytwarzających inkluzji zakażenia tego typu występują u *Pieris brassicae* w przypadku TIV (*Tipula iridescent virus*), *Galleria mellonella* zakażonej wirusem SIV (*Sericesthis iridescent virus*) oraz u jedwabników w przebiegu polihedrów jądrowych i cytoplazmatycznych (34).

Dotychczas nie poznano w pełni czynników indukujących te zakażenia. Dużą rolę w indukcji zakażeń latentnych przypisuje się czynnikom dziedzicznym i warunkom środowiskowym. Wykazano np. że na paraliż chorują jedynie osobniki o wrodzonej podatności (4). Istnienie różnic genetycznych jest najprawdopodobniej również przyczyną występowania dwóch syndromów chorobowych u pszczół zakażonych wirusem chronicznego paraliżu (8). Istnieją dane wskazujące na istnienie ścisłej zależności między rasą a nawet szczepem pszczół.

Zaobserwowano również, że zmiana matki w rodzinach chorych na ostry paraliż prowadzi często do likwidacji choroby (7). Z czynników biotycznych ważną rolę w zwiększaniu podatności na zakażenie, a także w indukcji zakażeń latentnych odgrywa rodzaj pokarmu i temperatura otoczenia (10).

Wirusy izolowane od pszczoł, zarówno w ciałkach wtrętowych, jak i w cytoplazmie, nie są otoczone białkową „matrix”, co je odróżnia od wirusów polihebroz i granuloz innych owadów. Wszystkie wirusy izolowane dotychczas od pszczoł zawierały w cząsteczce kwas nukleinowy typu RNA. Wyjątek stanowi niepatogenny wirus o izometrycznym kształcie i średnicy cząsteczek około 160 nm o cechach wirusa „tęczowego” izolowany z *Apis cerana*, który zawiera DNA. Jak wykazały badania Bailey'a (8) wirus ten posiada zdolność replikacji w organizmie pszczoł po zakażeniu doświadczalnym.

Na podstawie badań nad wirusem paraliżu powolnego wysunięto hipotezę udziału mieszanich zakażeń wirusowych w etiologii różnych chorób pszczoł. Istnieją przy tym sugestie, że występowanie określonych objawów chorobowych zależy od stosunków ilościowych między wirusami współzakażającymi. Stwierdzono (15), że pszczoły zakażone wirusem paraliżu powolnego i wirusem x padają szybko po zakażeniu. Natomiast zakażenie jednym z tych wirusów nie prowadzi do rozwoju choroby. Wydaje się również, że zakażenie wirusem o średnicy cząsteczki 35 nm przyczynia się do zaostrzenia objawów ostrego paraliżu. Natomiast współudział wirusów satelitarnych w etiologii chorób pszczoł, a szczególnie ostrego paraliżu, nie został w pełni wyjaśniony (9).

Klasyfikacja wirusów izolowanych od pszczoł pozostaje nadal sprawą otwartą. Krieg (27) w swoim wszechstronnym opracowaniu dotyczącym systematyki wirusów owadów uwzględnił jedynie wirus choroby woreczkowej czerwiu, zaś Wildy (46) w monografii poświęconej klasyfikacji i systematyce wirusów omawia tylko wirus ostrego paraliżu pszczoł, proponując włączenie go do rodziny *Picornaviridae*, rodzaj *enterovirus*. Larski natomiast omawia w swoim podręczniku wirusy choroby woreczkowej, ostrego i chronicznego paraliżu w grupie wirusów o nieustalonej systematyce (30).

Ze względów praktycznych jak również poznawczych ważną rolę w patologii pszczoł odgrywają: wirus choroby woreczkowej czerwiu, ostrego oraz chronicznego paraliżu pszczoł, wirus x, Arkansas, paraliżu Ohio i wirus powolnego paraliżu pszczoł.

Wirus choroby woreczkowej czerwiu

Choroba woreczkowa czerwiu została opisana jako odrębna jednostka w 1913 r. przez White'a (44). Steinhaus (41) wykazał obecność wirusa w wyciągach z chorych larw, zaś Break i wsp. (17), Lee i Furgala (32) przebadali dok-

ładnie jego właściwości i określili lokalizację w tkankach chorych larw.

Czynnik etiologiczny choroby woreczkowej czerwiu — *Moratorvirus aetulae* (wg Kriega — 27) ma kształt dwudziestościanu o symetrii osiowej 5:3:2, średnicy 28 nm i stałej sedimentacji 160 (17). Wirion składa się z 42 podjednostek i zawiera kwas nukleinowy typu RNA (16).

W tkankach chorego czerwiu występują trzy rodzaje cząsteczek wirusa: cząsteczki o wyraźnym nukleoidzie (średnica 19—23 nm), cząsteczki wybarwione równomiernie i puste cząsteczki o grubości ściany 3,6 nm (32). Dotychczas wyizolowane szczepy wirusa są serologicznie identyczne i nie wykazują pokrewieństwa antygenowego z innymi wirusami izolowanymi od pszczoł (17).

Wirus choroby woreczkowej jest typowym przedstawicielem wirusów cytoplazmatycznych. Występuje on w cytoplazmie komórek ciała tłuszczowego, komórkach płomykowych i mięśniach prążkowanych chorych larw. Wtręty wirusowe wyraźnie odgraniczone od cytoplazmy nie wykazują związku z organellami komórkowymi. Niekiedy wirusy tworzą we wtrętach parakrystaliczną siatkę (33).

Wirus zawarty w organizmie larw w temperaturze 58°C traci zdolność zakażenia po 10 minutach, w temperaturze 80°C natychmiast. W miodzie ulega on inaktywacji w temperaturze 70—73°C po 10 minutach (25). W temperaturze pokojowej w stanie wysuszenia ginie po 21 dniach. W temperaturze gniazda zakaźność wirusa w miodzie i pyłku utrzymuje się przez okres 6 miesięcy, zaś w organizmie padłej larwy do 1 miesiąca (32).

Smirnova uzyskała namnażanie wirusa choroby woreczkowej na zarodkach kurzych po zakażeniu domocznym, a także w hodowli fibroblastów zarodka kurzego (39) i fibroblastów pszczoły (40). W hodowli fibroblastów pszczoły działanie cytopatyczne wirusa występuje między 3 i 4 dniem po zakażeniu i polega na powiększeniu i zaokrągleniu komórek, tworzeniu konglomeratów komórkowych i łysinek.

Na zakażenie doświadczalne podatne są najbardziej larwy w wieku 12—36 godzin, u których objawy chorobowe występują po 24 godz. po doustnym zakażeniu wirusem. DL_{50} dla dwudniowej larwy pszczoły wynosi 10^5 — 10^6 cząsteczek wirusa (14). Larwy padają po 72 godz. po zakażeniu. Do zakażenia stosowano wirus wyekstrahowany z homogenatów tkanek larw oczyszczony na drodze różnicowego wirowania lub w gradiencie sacharozy (13).

Choroba woreczkowa czerwiu występuje powszechnie na terenie Europy, Ameryki, Nowej Zelandii, Australii i na Hawajach. Badania przeprowadzone na terenie Wielkiej Brytanii w oparciu o testy serologiczne wykazały, że ponad 80% czerwiu chorego, wolnego od zgnilizki i kiślicy, choruje na tę chorobę oraz, że w około 30% zdrowych rodzin zamierały pewne ilości czerwiu zakażonego. Do 6% larw w rodzinach uważanych za zdrowe zamierało na skutek choroby woreczkowej w okresie czerwca—lipca tj. wtedy, kiedy jest ona zwykle niezauważalna (14). W Polsce choroba woreczkowa występuje w poszczególnych rodzinach, niekiedy w całych pasiekach. Usposabiająco wpływa obniżenie temperatury, brak pokarmu i duże ubytki pszczoł lotnych.

Coroczne występowanie choroby woreczkowej w tych samych rodzinach oraz fakt, że wirus dość szybko ginie na sprzętach i narzę-

dziach pasiecznych wiąże się z występowaniem zakażeń latentnych, a tym samym i nosicielstwa wirusa przez robotnice i trutnie (6, 45). Najbardziej podatne na zakażenie są młode robotnice, które zakażają się w trakcie oczyszczania plastrów z chorego czerwiu. Już po 24 godz. po zakażeniu wirus występuje w dużych ilościach w komórkach gruczołów produkujących mleczko. Zakażone pszczoły, które później pełnią funkcję karmicielek, zakażają czerw w trakcie karmienia mleczkiem oraz papką miodowo-pyłkową, zanieczyszczoną wirusem (8).

Duży odsetek robotnic zakażonych spontanicznie zaprzestaje odżywiać się pyłkiem, co pociąga za sobą ustanie produkcji mleczka i karmienia czerwiu. Do zakażenia pyłku dochodzi za pośrednictwem zakażonych zbieraczek. Zakażone robotnice i trutnie nie żywione pyłkiem nie chorują, zaś u robotnic karmionych pyłkiem ogólny metabolizm ulega zwolnieniu, długość życia skróceniu, zwiększa się ich podatność na obniżenie temperatury, szczególnie w okresie zimowli (10).

W 1947 r. Morganthaler (35) zwrócił uwagę na możliwość transowarialnego przenoszenia wirusa przez zakażone matki. Wyniki tych badań nie zostały w pełni potwierdzone.

Choroba atakuje larwy w wieku 8—9 dni życia, przy czym czerw zamiera po zasklepieniu komórki w stadium przedpoczwarki. Jedynie w przypadku dużego nasilenia choroby choruje i zamiera czerw młody, nawet w stadium larwy zwinętej. Między oskórkiem, który nie uległ wylince i ciałem larwy gromadzi się ekdyzjalny płyn, kutikula ulega zgrubieniu zachowując wyraźną segmentację, zaznaczoną wyjątkowo silnie w okolicy głowy. Tkanki wewnętrzne ulegają całkowitej dezintegracji, w efekcie czego ciało larwy przypomina swoim wyglądem woreczek, którego ścianę stanowi zgrubiały naskórek, wypełniony zniszczonymi tkankami o półpłynnej konsystencji kaszowatej. Zabarwienie ciała, początkowo perlowo-białe, ciemnieje. W kilka dni po zamarceniu ciała larwy barwy ciemno-brązowej wysycha i wyglądem przypomina łożeczkę, która bardzo łatwo daje się usunąć z komórek plastra. Jednym z pierwszych objawów choroby w rodzinie jest obecność czerwiu rozstrzelonego.

Zahamowanie wylinki i zciemnienie kutykuli obserwowane u czerwiu chorego na chorobę woreczkową wskazuje na uszkodzające działanie wirusa na układ wydzielania wewnętrznej larwy. Podobne zmiany obserwuje się u czerwiu w przypadku zahamowania wydzielania hormonu juvenilnego i hormonu kierującego wylinką (20, 21).

Choroba woreczkowa występuje często w rodzinach chorych na inne choroby. Wirus tej choroby izolowano z czerwiu chorego na kiśćlicę (24, 42, 43). Jednakże w tym przypadku obecność wirusa jest przypadkowa i nie pozostaje w żadnym związku przyczynowym z etiologią kiśćlicy (11).

Rozpoznanie choroby nie następuje większych trudności przy jej typowym przebiegu. Przy łagodnym przebiegu choroba staje się często niezauważalna. W tych przypadkach duże usługi oddaje próba biologiczna (zakażenie 2—3-dniowego czerwiu wyciągiem z materiału patologicznego).

Wirus chronicznego paraliżu pszczoł

Choroby pszczoł przebiegające wśród objawów porażenia opisywano od ponad 100 lat. W 1936 r. Morrison (36) wysunął hipotezę etiologii wirusowej przynajmniej niektórych posta-

ci paraliżu, zaś Burnside (18) wywołał chorobę po napyleniu zdrowych pszczoł wyciągiem bezbakteryjnym z pszczoł chorych na paraliż. Wirus chronicznego paraliżu pszczoł wyizolowano po raz pierwszy w 1963 r. (13).

Wirus chronicznego paraliżu ma kształt elioidalny. Wyróżniono przy tym cztery rodzaje cząsteczek o jednakowej średnicy 22 nm i długości 30, 40, 55 i 65 nm (8). Reinganum (37) obserwował ponadto w tkankach chorych pszczoł cząsteczki o długości 150 a nawet 650 nm o kształcie pojedynczych lub podwójnych pierścieni lub rozgałęzionych pałeczek. Obserwowany polimorfizm wirusa może być następstwem „molecular sickness”. Kwas nukleinowy typu RNA stanowi od 10 do 20% cząsteczki zakaźnej.

Cząsteczki wirusa występują wolno lub w ciałkach wtępowych w cytoplazmie zwójów nerwowych tułowia i odwłoku. Brak ich w komórkach ciała tłuszczowego i w tkance mięśniowej (31).

Wirus replikuje się w hodowlach tkanek pszczoł, gdzie po silnym zakażeniu zmiany cytopatyczne występują po 7—8 godz., zaś po 8 godz. dochodzi do zupełnego zniszczenia komórek (26).

Wirus ulega inaktywacji w organizmie pszczoł przetrzymywanych w 50% roztworze gliceryny w temperaturze 4°C po tygodniu. W temp. — 70°C nie ulega inaktywacji przez okres do 6 miesięcy (26). Zakaźność wirusa w wyschniętym kale chorych pszczoł w temperaturze pokojowej po miesiącu stanowiła 1% zakaźności wyjściowej; w zawieszynie wysuszonej lub w wyciągach z tkanek chorych osobników traci 90% zakaźności w temperaturze 4°C po 2 miesiącach, zaś w wodzie lub w buforze fosforanowym w tej samej temperaturze prawie 100% spadek zakaźności występuje dopiero po 5 miesiącach. Wirus nie traci zakaźności w zliżowanych wyciągach z treści jelita środkowego i prostnicy (2).

Na zakażenia naturalne i sztuczne są podatne jedynie pszczoły. Zakażenia sztuczne rozwijają się najczęściej po iniekcjach zawiesiny wirusa bezpośrednio do hemolimfy, rzadziej po napyleniu pszczoł lub po zakażeniu doustnym. Jednakże i w tym ostatnim przypadku obserwowano wzrost stężenia wirusa w różnych tkankach (2). DL_{50} dla pszczoły wynosi 10^2 cząsteczek. U pszczoł zakażonych doświadczalnie inkubowanych w temperaturze 30°C po 5—6 dniowym okresie inkubacji obserwowano osłabienie, trudności w poruszaniu, wysunięcie języczka, rozpostarcie skrzydełek, nadmierne przepelnienie wola miodnego przy utrzymującej się przez cały czas zdolności pobierania pokarmu. Pszczoły padały po kilku dniach wśród objawów porażenia. W temperaturze 35°C padanie było opóźnione o 1—2 dni. Próba biologiczna jest często wykorzystywana jako test diagnostyczny. Stwierdzono przy tym, że (w przeliczeniu na 1 g wilgotnej masy) w głowie występuje 1×10^8 , w tułowiu i odwłoku bez przewodu pokarmowego 2×10^8 , w jelitach 1×10^6 i w kale 1×10^6 cząsteczek wirusa (2).

Łącznie z wirusem chronicznego paraliżu izolowane są stale cząsteczki sferyczne o średnicy 17 nm. Cząsteczki te nie replikują się w organizmie pszczoł zakażonych na drodze iniekcji i różnią się serologicznie od wirusa chronicznego paraliżu. Przypuszcza się, że są to wirusy satelitarne (9). Ich udział w przebiegu chronicznego paraliżu nie został wyjaśniony.

W warunkach naturalnych rozwijają się zakażenia latentne, które występują znacznie częściej niż choroba. Na terenie Wielkiej Brytanii wirus chronicznego paraliżu izolowano z 70% pszczoł chorych (4) oraz z 27% padłych robotnic i 4% zamaryłych trutni w rodzinach zdrowych. Istnieje sugestia, że wszystkie rodziny na terenie Wielkiej Brytanii są zakażone tym wirusem. W oparciu o testy serologiczne wirus chronicznego paraliżu wykryto w Austra-

lii, Chinach, Meksyku, USA, Szwajcarii i krajach leżących w basenie Morza Śródziemnego. Cząsteczki serologicznie identyczne z wirusem chronicznego paraliżu izolowano z chorych pszczół z objawami paraliżu na Ukrainie, we Francji, Kanadzie (3, 7), Norwegii i Hong-Kongu.

W rozprzestrzenieniu wirusa chronicznego paraliżu w rodzinie zasadniczą rolę odgrywają zakażone robotnice, zanieczyszczony wirusem pyłek oraz kał. Wole miodne chorych pszczół zawiera 10^{11} cząsteczek wirusa tj. ilość wystarczająca do zakażenia robotnic w trakcie przemieszczania treści wola. Duże ilości wirusa występują również w pyłku zbieranym przez zakażone robotnice (8).

W przebiegu paraliżu wyróżniono dwa syndromy. W syndromie pierwszym występuje drżenie skrzydełek i odwłoków oraz utrata zdolności lotnych. Chore osobniki zbijają się w grupki, liczące niekiedy po kilkadziesiąt osobników, na ziemi i żdźbłach traw. Często dochodzi do rozdzicia odwłoków w następstwie wypełnienia wola miodnego płynną treścią oraz biegunką.

W syndromie drugim, w którym pszczoły określane mianem „czarny rabuś”, pszczoły przed wystąpieniem objawów paraliżu tracą owłosienie (wygląd czarny, połyskujący) i są atakowane przez zdrowe osobniki z tej samej rodziny. Po kilku dniach występują objawy porażenia i padanie. Często obydwa syndromy występują równocześnie w rodzinie, lub jeden przeważa nad drugim.

W cytoplazmie komórek nabłonka jelita tylnego chorych pszczół występują bazofilne ciała wtrętowe (ciała Morrisona) o średnicy 1–8 μ . Ciałka o największych rozmiarach występują w nabłonku jelit w okolicy ujścia cewek Malpighiego (2). Brak ich u pszczół zdrowych oraz u pszczół chorych na ostry paraliż. W świetle jelita środkowego gromadzą się bazofilne złoże wyraźnie oddzielone od powierzchni nabłonka. Bailey (5) uważa, że ciała wtrętowe stwierdzone przez Giauffret i wsp. (22) w cytoplazmie komórek zwojów nerwowych tułowia są również specyficzne dla chronicznego paraliżu.

Występowanie syndromu pierwszego lub drugiego zależy od różnic genetycznych między poszczególnymi osobnikami (8). W pełni udowodniono przy tym (4), że zdolność wirusa ostrego paraliżu do replikacji w organizmie pszczół zależy od cech dziedzicznych. Zaobserwowano przy tym, że często po wymianie matki choroba ustępuje (7).

Bardzo pomocny w rozpoznawaniu choroby okazał się odczyn seroneutralizacji. Odczyn wykonuje się na pszczołach zakażonych do hemolimfy odpowiednimi rozcieńczeniami zawiesiny wirusa i surowicy odpornościowej (2).

Wirus ostrego paraliżu pszczół

W trakcie badań nad chronicznym paraliżem wyizolowano z pszczół z objawami porażenia, a później również od zdrowych pszczół, na terenie Wielkiej Brytanii (13) i Australii (38) wirus różniący się morfologicznie i serologicznie od wirusa paraliżu chronicznego. Bailey i wsp. (13) zidentyfikowali wyizolowany wirus z czynnikiem etiologicznym ostrego paraliżu, który opisał w 1945 r. Burnside (18).

Wirus ostrego paraliżu o wirionie kulistego kształtu, średnicy 25 nm zawiera w cząsteczce jednostrandowy

RNA o ciężarze cząsteczkowym 2 mil. Stanowi on 25% cząsteczki zakaźnej. Na podstawie właściwości biologicznych, wirus ostrego paraliżu pszczół zaliczono do rodziny *Picornaviridae*, rodzaju *enterovirus* (46).

W hodowlach tkanek pszczoły efekt cytopatyczny występuje po 5–6 godz. po zakażeniu, przy czym po 8 godz. następuje całkowita destrukcja tkanek. W hodowlach zakażonych wyciągiem tkanek z chorych pszczół w rozcieńczeniu 10^{-8} zmiany cytopatyczne pojawiają się po 40–48 godz. po zakażeniu (26).

Wirus nie ulega inaktywacji w środowisku o pH 3,0. W materiale patologicznym w temperaturze -70°C oraz w tkankach w 50% roztworze gliceryny w temperaturze 4°C nie traci żywotności przez okres około 6 miesięcy (26).

Wirus ostrego paraliżu jest wirusem pantropowym. Jego replikacja odbywa się w cytoplazmie komórek, gdzie często występuje on w formie siateczki parakrystalicznej. Największe ilości wirusa występują w gruczołach ślinowych głowy, zaś ilość wirusa w móżdgu jest taka sama jak w innych częściach ciała (19).

Pszczoły po zakażeniu sztucznym przez napylenie zawiesiną wirusa, podanie doustne (24 godzinne karmienie syropem cukrowym zanieczyszczonym wirusem) lub bezpośrednio do hemolimfy (iniekcje przez grzbietową lub brzuszną błonę międzysegmentalną) i inkubacji w 30°C zaprzestają pobierania pokarmu i padają w ciągu 1–2 dni wśród objawów porażenia. Niekiedy padanie występuje bez uprzednich porażenia. Natomiast po inkubacji w 35°C znaczne ilości pszczół nie wykazują żadnych objawów chorobowych, mimo że ilość wirusa w nich jest taka sama jak u zakażonych owadów, które inkubowane w 30°C giną w 100%. Dawka zakaźna wirusa wynosi 10^2 cząsteczek/pszczołę. Po zakażeniu do hemolimfy 10^2 cząsteczek z padłego owada izolowano 10^{11} – 10^{12} cząsteczek wirusa (9).

Do izolacji wirusa nadają się najlepiej homogenaty tkanek (woda+25% czterochlorku węgla) poddane sedymentacji i ultrawirowaniu (13). Wirus ostrego paraliżu pszczół powoduje zakażenia u pszczół i trzmieleli z rodzaju *Bombus* (*Bombus agrorum* Fabr., *B. hortorum* L., *B. lucorum* L., *B. ruderaris* Muller i *B. terrestris* L.) (12). W ogromnej ilości przypadków rozwijają się zakażenia latentne, przy czym z tkanek chorych owadów izoluje się niewielkie ilości wirusa. Przypuszcza się, że zakażenia latentne występują w większości pasiek na terenie Wielkiej Brytanii, Kanady, Italii (38) i Francji (23).

Do zakażeń naturalnych dochodzi za pośrednictwem wydzieliny gruczołów ślinowych zawierającej wirus oraz za pośrednictwem zanieczyszczonego pokarmu, głównie pyłku. Wyciągi z gruczołów ślinowych odcinka tułowiowego zbieraczek oraz z pyłku zawierają dostateczne ilości wirusa, którego obecność można wykazać w testach zakaźności. W warunkach naturalnych wirus nie występuje w pyłkach roślin oblatywanych przez pszczoły i trzmiele (7).

Choroba (wg danych z terenu Wielkiej Brytanii) występuje pod koniec zimy i wczesną wiosną. Na czoło objawów klinicznych (co wiąże się niewątpliwie z zaatakowaniem tkanki nerwowej i przewodu pokarmowego przez wirus) wysuwa się utrata zdolności lotnych, drżenie skrzydełek i nówek, biegunka i często utrata włosów pokrywających ciało. Pszczoły o ciemnym wyglądzie wydzielają nieprzyjemny zapach i dlatego są często traktowane przez zdrowe osobniki z tej samej rodziny jak pszczoły rabujące (2).

W preparatach histologicznych wybarwionych hematoksyliną żelazistą wg Heidenheima stwierdzono występowanie licznych bazoofilnych wtrętów w *carpora pedunculata* mózgu oraz złoży bezpostaciowej substancji w jelicie środkowym. Złogi te były ściśle związane z nabłonkiem jelitowym.

Rozpoznanie choroby opiera się na wynikach próby biologicznej i identyfikacji wirusa na drodze seroneutralizacji lub precypitacji dyfuzyjnej w żelu. Na podstawie samych objawów klinicznych postawienie prawidłowego rozpoznania nie jest możliwe, ponieważ podobne objawy mogą występować pod wpływem innych czynników (zakażenie wirusem paraliżu chronicznego, zatrucie HCH, nektarem, spadzią, syndrom czerniawki) (2).

Godnym uwagi jest fakt, że z pszczoł zakażonych wirusem ostrego paraliżu izolowano często niewielkie ilości wirusa paraliżu chronicznego (13). Występowanie zakażeń mieszanym było przyczyną częstego występowania reakcji krzyżowych w odczynach seroneutralizacji w układzie: surowica dla wirusa ostrego paraliżu — wirus chronicznego paraliżu i *vice versa*. Przy użyciu oczyszczonych jednorodnych preparatów wirusa i jednoważnych surowic odpornościowych odczyny krzyżowe seroneutralizacji wypadają zawsze ujemnie (2).

Dotychczas nie opracowano metod zapobiegania i zwalczania ostrego i chronicznego paraliżu. Ze względu na powszechność występowania zakażeń latentnych należy dążyć do eliminacji czynników indukujących przejście zakażenia latentnego w zakażenie jawne. Przy braku dokładnej znajomości tych czynników zapobieganie chorobie ogranicza się do przestrzegania zasad prawidłowej hodowli, wzmocnienia rodzin i zapewnienia stałego dopływu pokarmu do rodziny.

Wirus Arkansas

Zakażenie tym wirusem opisano na terenie USA (15) i Wielkiej Brytanii (9). Wirus wyizolowany po raz pierwszy w Arkansas z pyłku zebranego przez pszczoły robotnice, ma cząsteczki izometrycznego kształtu o średnicy około 30 nm. Różni się on serologicznie od wirusa choroby woreczkowej i paraliżów pszczoł (15). Pszczoły zakażone bezpośrednio do hemolimfy zawiesiną wirusa padają po 15—25 dniach. Z pasiek na terenie Wielkiej Brytanii izolowano niekiedy wirus Arkansas równocześnie z wirusami ostrego lub chronicznego paraliżu pszczoł.

Wirus x

Wirus x stwierdzono w tkankach odwłoka, głównie jelit, zbieraczek wczesną jesienią (29), oraz w tkankach zimujących pszczoł w Australii (38), USA (42), Francji i Wielkiej Brytanii (15). Wirus o cząsteczkach izometrycznych, średnicy około 35 nm namnaża się po zakażeniu doustnym w organizmie świeżo „wygryzionych” pszczoł inkubowanych w 35°C. Po wprowadzeniu bezpośrednim do hemolimfy namnaża się słabo. Średni okres życia pszczoł zakażonych ulega skróceniu o miesiąc. Takie skrócenie długości życia prowadzi do zamierania zimujących rodzin (8).

Wirus paraliżu powolnego

Wirus paraliżu powolnego o cząsteczkach izometrycznych, średnicy około 30 nm różni się serologicznie od znanych wirusów izolowanych od pszczoł. W warunkach naturalnych powoduje on zakażenia latentne (15). Zakażone do hemolimfy pszczoły padają po 12 dniach wśród objawów porażenia dwóch przednich par nóg. Dotychczas wyosobniono go na terenie Wielkiej Brytanii (8).

Wirusy Ohio

Wirusy wyizolowane w Ohio od chorych pszczoł z objawami przypominającymi paraliż różnią się kształtem i wymiarami cząsteczek i wywołują dwa syndromy chorobowe o zbliżonych objawach (28).

Z pszczoł z objawami rozděcia odwłoka, drżenia skrzydełek i utraty owłosienia (pszczoły czarne, polyskujące), które były atakowane przez zdrowe osobniki, wyizolowano cztery rodzaje cząsteczek wirusa: cząsteczki sferyczne o średnicy 40, 50—70 i 100 nm oraz cząsteczki pałeczkowate, niekiedy o rozdętym końcu o wymiarach 80—400×40 nm. U pszczoł indukowano chorobę o podobnych objawach po zakażeniu wolnymi od bakterii przesączami chorych pszczoł. Dotychczas nie ustalono, który rodzaj cząsteczek posiada właściwości patogenne (28).

Dwa rodzaje cząsteczek wyizolowano natomiast z pszczoł pełzających z objawami częściowych porażen, u których nie obserwowano utraty włosków pokrywających ciało i atakowania przez inne osobniki z tej samej rodziny. Około 80% cząsteczek wirusa ma kształt dwudziestościennej o średnicy 18,5 nm. W zdjęciach z mikroskopu elektronowego można wyróżnić kapsomery. Cząsteczki drugiego rodzaju miały kształt nieregularny, elipsowaty lub nawet trójkątny i wymiary 12,5—23,6×44,8—250 nm (29).

Pszczoły zakażone do hemolimfy i inkubowane w 35°C chorowały po 24 godz. po zakażeniu wśród objawów drżenia skrzydełek i paraliżu i padały po 3—4 dniach. Natomiast u pszczoł inkubowanych w 30°C objawy paraliżu występowały po 4 dniach, padanie między 5 i 6 dniem.

W przedstawionym przeglądzie zwrócono uwagę na te wirusy, których udział w etiologii chorób pszczoł został w pełni lub w dużym stopniu udowodniony. Pominięto zaś celowo omawianie wirusów izolowanych w „syndromie czerniawki”, ponieważ ich odrębność i udział w etiologii tego syndromu budzi nadal kontrowersje. Omówienie tego syndromu będzie tematem odrębnego artykułu.

Piśmiennictwo

1. Bailey L.: Infectious diseases of the honey bee. Land Books, London, 1963.
2. Bailey L.: J. Invertebr. Pathol. 7, 132, 1965.
3. Bailey L.: J. Invertebr. Pathol. 7, 167, 1965.
4. Bailey L.: Ann. appl. Biol. 60, 43, 1967.
5. Bailey L.: Bull. Apicole 10, 121, 1967.
6. Bailey L.: Ann. appl. Biol. 63, 483, 1969.
7. Bailey L.: Rep. Rothamsted. exp. Stn. 2, 171, 1971.
8. Bailey L.: Bee World 56, 55, 1975.
9. Bailey L.: Adv. Virus Res. 1975.
10. Bailey L., Fernando E. F. W.: Ann. appl. Biol. 72, 27, 1972.
11. Bailey L., Fernando E. F. W., Stanley B. H.: J. Invertebr. Pathol. 22, 450, 1973.
12. Bailey L., Gibbs A. J.: Invertebr. Pathol. 6, 395, 1964.
13. Bailey L., Gibbs A. J., Woods R. D.: Virology 21, 390, 1963.
14. Bailey L., Gibbs A. J., Woods R. D.: Virology 23, 425, 1964.
15. Bailey L., Woods R. D.: J. gen. Virol. 25, 175, 1974.
16. Break J., Kralik O.: J. Invertebr. Pathol. 7, 110, 1965.
17. Break J., Svoboda J., Kralik D.: J. Insect Pathol. 5, 335, 1963.

18. Burnside C. E.: Amer Bee J. 85, 354, 1945.
19. Furgala B., Lee P. E.: Virology 29, 346, 1966.
20. Fyg W.: Sweiz. Bienenztg. 81, 147, 1953.
21. Fyg W.: Sweiz. Bienenztg. 81, 387, 1953.
22. Giauffret A., Duthoit J. L., Caucat M. J.: Bull. Apicole 9, 222, 1966.
23. Giauffret A., Duthoit J. L., Poutiers F., Tostain-Caucat M. J.: Bull. Apicole 12, 13, 1969.
24. Giauffret A., Vago C., Rousseau M., Duthoit J. L.: Bull. Apicole 9, 123, 1966.
25. Giordani G., Vecchi M. A.: Nozioni pratiche sulle malattie delle api. L'Apicoltore Italia, Roma, 1973.
26. Grabor O. F., Ziuman B. T., Kerimbaev A. G.: XXIV Int. Beekeeping Congr. 1972, Moskwa, 567.
27. Krieg A.: Grundlagen der Insektpathologie, Darmstadt 1961.
28. Kulincevic J. M., Stairs G. R., Rothenbuhler W. C.: J. Invertebr. Pathol. 14, 13, 1969.
29. Kulincevic J. M., Stairs G. R., Rothenbuhler W. C.: J. Invertebr. Pathol. 16, 423, 1970.
30. Larski Z.: Wirusologia weterynaryjna PWRiL, Warszawa, 1975.
31. Lee P., Furgala B.: J. Invertebr. Pathol. 7, 170, 1965.
32. Lee P., Furgala B.: J. Invertebr. Pathol. 7, 502, 1965.
33. Lee P., Furgala B.: J. Invertebr. Pathol. 9, 178, 1967.
34. Lipa J. L.: Zarys patologii owadów. PWRiL, Warszawa, 1967.
35. Morganthaler O.: Sweiz. Bienenztg. 70, 148, 1947.
36. Morrison G. D.: Rothamsted Conf. 22, 17, 1936.
37. Reinganum C.: J. Invertebr. Pathol. 12, 471, 1968.
38. Reinganum C.: Victorian Plant Res. Inst. 5, 28, 1969.
39. Smirnova N. J.: Apicultura 2, 45, 1965.
40. Smirnova N. J.: XXIV Int. Beekeeping Congr, Moskwa 1972, 985.
41. Steinhilber E. A.: Bact. Rev. 13, 209, 1949.
42. Vago C.: Bull. Apicole 7, 111, 1964.
43. Vago C.: Adv. Virus Res. 13, 247, 1968.
44. White G. F.: Circ. Bur. Ent. USDA 169, 1913.
45. White G. F.: Bull. USDA 431, 1917.
46. Wildy P.: Classification and nomenclature of viruses. Monographs in Virology, Skager, Basel--München--Paris--London--NY--Sydney, 1971.

Adres autora: doc. dr habil. Zdzisław Gliński, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin.

ZYGMUNT CYGAN, TADEUSZ JASTRZEBSKI, REGINA CYGAN

Pierwszy przypadek wyosobnienia *Cl. oedematiens* B jako przyczyny bradсотu owiec w Polsce

Z Zakładu Higieny Weterynaryjnej w Lublinie

Choroby beztlenowcowe stanowią u owiec najważniejszą grupę schorzeń zakaźnych. Wywoływane są one przede wszystkim przez *Cl. perfringens*, *Cl. septicum* i *Cl. oedematiens*. Beztlenowce *Cl. perfringens* są czynnikiem etiologicznym tzw. enterotoksemii (typ C — enteroksemia jagniąt — enterotoxaemia of very young lambs, enterotoksemia owiec — enterotoxaemia of sheep tzw. „struck”; typ D — enterotoksemia owiec — enterotoxaemia of sheep of all ages; 2, 3, 4, 8, 12) i dysenterii (typ B dysenterii jagniąt — lamb desyntery; 16, 17), *Cl. septicum* tzw. „braxy”, dawniej „bradсот północny” (6, 7), a *Cl. oedematiens* — bradсотu tj. „black disease of sheep”, „hepatitis infectiosa necrotica” (1, 9, 10, 11, 15, 20, 21, 23, 24, 25). Spośród tych chorób w Polsce dotychczas stwierdzono enterotoksemię wywołaną przez *Cl. perfringens* D (2) i „braxy” na tle *Cl. septicum* (6, 7). Odnosnie bradсотu owiec dokładniejszych badań etiologicznych dotychczas w Polsce nie przeprowadzono. Wprawdzie Stępkowski i Wołoszyn (20) opisali przypadek tej choroby i wyosobnili *Cl. oedematiens*, jednak nie przebadali tkanek padłych zwierząt na obecność swoistych toksyn i nie ustalili typu wyizolowanego zarazka. Podobnie przedstawia się sprawa w przypadku opisanym ostatnio przez Uziębłę (22). Należy tu podkreślić, że wykazanie toksyny w padłym zwierzęciu i ustalenie typu toksycznego zarazka jest nie zbędnym warunkiem prawidłowej diagnozy, gdyż według Jamiesona (9) nosicielstwo *Cl. oedematiens* B występuje bardzo często u owiec zdrowych, dochodząc nawet do 29%.

Celem niniejszych badań własnych było przeprowadzenie pełnej identyfikacji gwałtownie

przebiegającego w miejscowości „G” schorzenia owiec z objawami beztlenowcowej intoksykacji. W związku z tym badania ukierunkowano na wykazanie w tkankach padłej owcy swoistych toksyn oraz poznanie niektórych właściwości biologicznych, głównie toksycznych, wyosobnionego zarazka.

Materiał i metody

1. Opis choroby. W położonej w miejscowości „G” owczarni, liczącej 60 owiec, w wieku 1—5 lat, rasy krajowej długowłosej, wystąpiły w kilkudniowych odstępach nagle zejścia śmiertelne 8 zwierząt. Badaniu rozpoznawczemu poddano 1 padłą owcę. Na sekcji zwłoki zwierzęcia wykazywały silne wzdęcie i pienisto-krwawy wyciek z naturalnych otworów ciała. W tkance podskórnej okolicy przedpiersia i podbrzusza występowały galaretowato-krwiste nacieczenia, zawierające pecherzyki gazu. Z narządów wewnętrznych najsilniejsze zmiany chorobowe stwierdzono w wątrobie, która wykazywała cechy zwyrodnienia i zawierała pojedyncze szaro-żółte ogniska martwicze wielkości, 0,5—2 cm. Ponadto obserwowano zwyrodnienie mięśnia sercowego z nielicznymi wybroczonymi w nasierdziu, zwiększoną ilością żółtawo-krwistego płynu w worku osierdziowym oraz niezbyt trawieńca i wypełnienie gazem pętle jeli cienkich.

Do badań laboratoryjnych użyto pobrane bezpośrednio po śmierci zwierzęcia próbki wątroby, nerki oraz treści jelit cienkich.

2. Badanie na obecność toksyny. Z pobranych narządów mięsnych i treści jelit sporządzono 50% ekstrakty w płynie fizjologicznym i wirovano przy 4000 obr./min. przez 45 minut. Otrzymane płyny znad osadu rozcieńczano i wprowadzano do otrzewnowo białym myszkom w ilości 0,5 ml w postaci: a) natywnej i b) natywnej ogrzanej 15 min. w 100°C. W ten sam sposób poszukiwano toksyny w płynie nadosadowym z 24 godz. hodowli zarazka (podłoże VF z 0,5% glukozy). Czas obserwacji zakażonych myszy wynosił 2—3 dni.