

ляли в 120°C 10—15 минут после опрыскивания плиток цериевым реактивом. Спектрофотометрический анализ провели на спектрофотометре UV-VIS-Specord в области 275—350 nm. На основе микробиологического метода и метода тонкослойной хроматографии не показали наличия холиновой соли N-глюкозилполифунгина в товарном меде из первого отбора меда после лечения и в запасах меда в засеянных сотах, расположенных вблизи сот с лечимым расплодом из семейств антибиотик в которых применяли однократно, двух- или четырехкратно в дозе 100 мг (200 000) на 250 мл сахарного сиропа (50%) в виде опрыскивания большого расплода на сотах.

Gliński Z., Chmielewski M. — **Studies on the detection of choline salt of N-glucosylpolifungine residues in honey.**

The authors compared the usefulness of three methods: microbiological method, thin layer chroma-

tography and spectrophotometry for the detection of choline salt of N-glucosylpolifungine (a tetraene antibiotic of nystatin type) in honey from chalk brood infected families cured with the antibiotic. In the microbiological method (agar cup plate method) with the use of Sabouraud's agar (pH 6.5) *Saccharomyces cerevisiae* (MIC = 1.0 iu per one ml) was used as a reference strain. Thin layer chromatography was performed on silica gel in chloroform:metanol:water (30:18:4). Chromatograms were revealed at 120°C for 10—15 min after spraying with a cerium reagent. Spectrophotometric analyses was done on UV-VIS-Specord spectrophotometer at 275—350 nm. On the basis of microbiological and TCL determinations no residues of choline salt of N-glucosylpolifungine were found in honey from the first supering after treatment and honey storages in combs when the antibiotic was used one-four times at 5 days intervals at a dose of 100 mg (200 000 iu) per 250 ml of sucrose solution (50%) sprayed over sick brood on combs.

## CHOROBY ZAKAŻNE I INWAZYJNE

KONRAD MALICKI, ELŻBIETA MALICKA, MARCIN WAWRZYNIAC BAŃBURA

### Zastosowanie mikroskopii elektronowej w rozpoznawaniu rotawirusowych biegunek prosiąt i cieląt

Zakład Wirusologii i Zakład Patologii Instytutu Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych  
Wydziału Weterynaryjnego SGGW-AR, ul. Grochowska 272, 03-849 Warszawa

Opracowanie szybkich metod oczyszczania i zagęszczania wirusowych zawiesin i wprowadzenie technik umożliwiających szybką identyfikację wirusa, spowodowało szersze zastosowanie mikroskopii elektronowej w wirusologicznej diagnostyce (8, 12, 36, 43). W latach siedemdziesiątych, w kompleksowych badaniach etiologii biegunek zastosowano — obok innych metod — również mikroskopię elektronową (14). W kale lub w treści jelit noworodków i osesków, chorujących z objawami gwałtownej biegunki spontanicznej lub doświadczalnej (10, 15, 16, 23, 33), lub w błonie śluzowej jelit takich zwierząt (5, 6, 26, 27, 34) wykryto nowe enteropatogenne czynniki etiologiczne wirusowej natury. A mianowicie: rotawirusy ludzi (1, 7, 14), cieląt (2, 24), prosiąt (20, 25, 29, 41) i innych gatunków ssaków i ptaków, astrowirusy ludzi (18, 22), bydła (cyt. 13) i owiec (35), parwowirusy cieląt (38) i psów (40), uzupełniając listę znanych już enteropatogennych wirusów, takich jak: koronawirusy, enterowirusy, adenowirusy, togavirus, kaliciwirus i inne.

W ostatnich latach rozwinięto w wielu krajach intensywne badania nad rotawirusami. W Polsce brak do tej pory badań nad rozpoznaniem rotawirusów u ludzi i zwierząt. Celem przedstawionych badań było:

1. Opanowanie laboratoryjnych metod niezbędnych do prowadzenia diagnostyki i rozwinięcia eksperymentalnych prac nad rotawirusowymi zakażeniami u zwierząt.

2. Przeprowadzenie wstępnych obserwacji nad występowaniem rotawirusów u zwierząt gospodarskich w naszym kraju.

#### Materiał i metody

Zwierzęta. Badano chore lub padłe kilkudniowe prosięta i cielęta wykazujące objawy biegunki, nadstawiane do Instytutu w celach rozpoznawczych. Prosięta pochodziły z: fermy N. M. — 15 szt. (nr P1 — P9, P15 — P20); PGR S. — 5 szt. (nr P25 — P29); PGR N. — 5 szt. (nr P30 — P34). Cielęta pochodziły z: PGR P. — 3 szt. (C1 — C3); RZD B. — 5 szt. (nr C4 — C8).

Technika pobierania materiału. Treść jelita cienkiego uśpionych lub padłych zwierząt pobierano strzykawką z igłą, wielokrotnie przepłukując jałowym buforowym roztworem fizjologicznym (PBS), podwiązane odcinki jelita cienkiego. Część materiału przekazywano do badania bakteriologicznego, a resztę przetrzymywano w zamrożeniu (temperatura — 18°C), do czasu obróbki. Odmrożone próbki o objętości 5—10 ml przygotowywano do badania w mikroskopie elektronowym.

Oczyszczanie i zagęszczanie wirusa. Postępowanie wzorowano na metodzie Englanda, Freye'a i Enrighta (10). Polegało ono na wstępnym oczyszczeniu materiału przez wirowanie z szybkością 3000 obr/min. przez 15 min., a następnie wirowaniu supernatantu w ultrawirówce VAC—601 (25 000 g przez 15 min., rotor kątowy 8X35). Supernatant wykorzystywano ponownie do końcowego ultrawirowania w VAC-601 (100 000 g przez 1 h, rotor kątowy 8X11). Po usunięciu supernatantu osad zawieszano w 0,2 ml wody podwójnie destylowanej. Dodawano równą objętość 4% roztworu soli sodowej kwasu fosforo-wolframowego (PTA-Na), o pH 6,3 i materiał nanoszono na siatki pokryte błoną formwarową i nasyłane węglem. Część materiału od prosiąt z PGR N. i od prosiąt z fermy N. M. poddawano eterowej ekstrakcji. Pole-

gala ona na dodaniu równej objętości eteru etylowego do popłuczyn jelita i wytrząsaniu przez 30 min. na wytrząsarce. Po rozdzieleniu warstw w temperaturze pokojowej, wodną fazę przeznaczano do wstępnego wirowania i wykonania dalszych opisanych etapów obróbki. Obserwacje wykonano w transmisyjnym mikroskopie elektronowym firmy Jeol, typ 100 C. Dokumentację fotograficzną sporządzono przy powiększeniu 33 000 $\times$  i 50 000 $\times$ , wykonując pozytywowe klisze oraz negatywowe i pozytywowe odbitki wirionów.

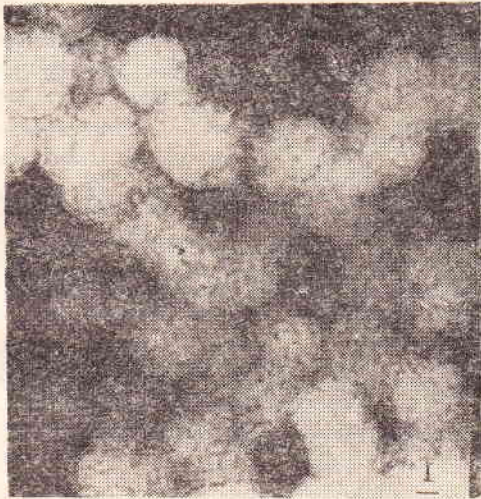
#### Wyniki i omówienie

W części badanych materiałów pochodzących od prosiąt i cieląt stwierdzono obecność wirusów, które na podstawie cech morfologicznych wirionu rozpoznawano jako rotawirusy i koronawirusy. Niejednokrotnie obserwowano jednocześnie inne, niezidentyfikowane twory (przypuszczalnie wirusowej natury), o mniejszych niż wymienione wirusy wymiarach i mniej czytelnej strukturze wirionu. Z 15 badanych chorych prosiąt, pochodzących z fermi N. M. u 11 stwierdzono rotawirusy, (ryc. 1), co stanowi 73%; u 1 prosięcia (nr P-9) stwierdzono koronawirusy (ryc. 2), a u 3 prosiąt badaniem w mikroskopie elektronowym wirusów

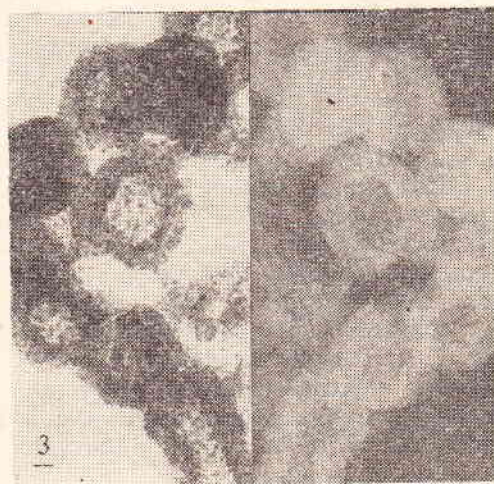
nie stwierdzono. Z 5 badanych chorych prosiąt, pochodzących z PGR S. u 3 wykazano obecność rotawirusów, co stanowi 60%; u 2 prosiąt wirusów nie stwierdzono. Na 5 badanych, chorych prosiąt z PGR N. u 4 stwierdzono rotawirusy — 80% (ryc. 3 i 4), a u jednego prosięcia koronawirusy. Także u wszystkich 3 chorych, badanych cieląt z PGR P. wykazano w treści przewodu pokarmowego obecność rotawirusów. Badanie dalszych materiałów jest w toku.

Uzyskane wyniki wskazują, że zastosowana technika przygotowywania materiału pobranego z treści jelit dała dość dobre wyniki diagnostyczne, zwłaszcza po nabraniu wprawy, tj. po wykonaniu kilku wstępnych badań. Zastosowana modyfikacja metody, polegająca na ekstrakcji eterem popłuczyn jelitowych, bardzo ułatwiała oczyszczenie materiału i wykrywanie wirusa.

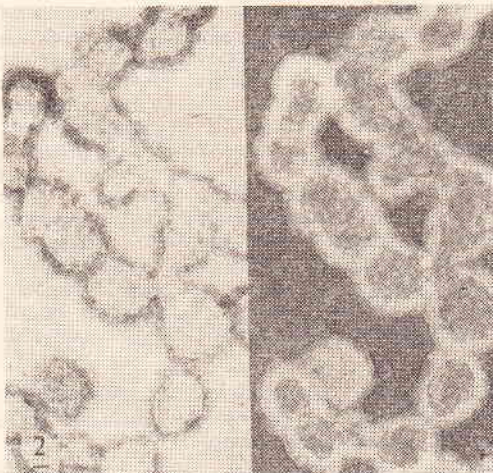
Rotawirusy są zbliżone morfologicznie do reowirusów (stąd ich pierwotna nazwa — reovirus—like—agent) i podobnie jak reowirusy



Ryc. 1. Rotawirusy prosiąt z PGR N. M. Pow. ok. 200 000 $\times$



Ryc. 3. Rotawirusy prosiąt z PGR S. Pow. ok. 250 000 $\times$



Ryc. 2. Koronawirusy prosiaka nr P-9 z PGR N. M. Pow. ok. 125 000 $\times$



Ryc. 4. Rotawirusy prosiąt z PGR N. Pow. ok. 200 000 $\times$

i orbivirusy mają podwójny kapsyd. Niezależnie od gatunku naturalnego gospodarza mają zbliżone rozmiary, ok. 65—75 nm i wykazują pokrewieństwo antygenowe (42). Istnieją różne poglądy odnośnie ukształtowania zewnętrznego kapsydu rotawirusów (21, 32, 37). Wykonane ostatnio: analiza fotogramów metodą foto-rotacyjną (19) i badania techniką liofilizacji (30), pozwoliły na opracowanie prawdopodobnego modelu struktury wirionu rotawirusów.

Obserwacje dotyczące morfologii natywnych rotawirusów występujących w treści jelita (3, 11) pokrywają się tylko częściowo z morfologią rotawirusów obserwowanych w komórkach nabłonka jelit zwierząt chorujących spontanicznie lub doświadczalnie zakażonych (5, 6, 26, 27, 39). Jednakże obraz w mikroskopie elektronowym wirionu rotawirusów pochodzących z treści jelita lub z biegunkowych wypróżnień jest na tyle charakterystyczny, że nie stwarza większych trudności w rozpoznawaniu rotawirusów w prawidłowo wykonanych preparatach. Dalszym sposobem potwierdzenia wyniku elektronowo-mikroskopowego rozpoznania rotawirusów jest wykonanie próby immunoagregacji wirionów (2, 31), zastosowanie jednej z prób immunoenzymatycznych, np. testu immunoperoxydazowego (IPT) lub enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), względnie techniki fluoryzujących przeciwciał (FAT), choć nie dają one w pełni pokrywających się wyników (4, 9, 28). Bardzo czułą metodą jest także immunoelektroosmoforeza (IEOP), wykonywana w różnych modyfikacjach (17). Przytoczone metody wymagają jednak dysponowania swoistą surowicą, a w przypadku FAT także innego sposobu pobrania i przygotowania próbki.

Materiał, w którym stwierdzono wirusy w mikroskopie elektronowym wykorzystano do prób izolacji i namnażania rotawirusów w hodowli komórek. Wyniki tych badań zostaną podane w oddzielnej publikacji.

### Wnioski

1. W terenowych przypadkach gwałtownej biegunki u kilkudniowych prosiąt i cieląt, wykazano w mikroskopie elektronowym obecność rotawirusów w treści jelita cienkiego u znacznej części chorych lub padłych zwierząt.

2. Wstępna ekstrakcja eterem etylowym próbki popłuczyn jelitowych przed wirowaniem i ultrawiroowaniem, ułatwia oczyszczanie i wykazanie obecności rotawirusów u chorych zwierząt.

3. Uzyskane wyniki zachęcają do podjęcia badań diagnostycznych i eksperymentalnych nad rotawirusowymi zakażeniami u zwierząt gospodarskich.

### Piśmiennictwo

1. Bishop R., Davidson G., Holmes J., Ruck B.: Lancet 1, 149, 1974.
2. Bridger J., Woode G.: Brit. vet. J. 131, 528, 1975.
3. Bridger J., Woode G.: J. gen. Virol. 31, 245, 1976.
4. Birch C., Lehman N., Hawker A., Marshall J., Gust I.: J. clin. Path. 32, 700, 1979.

5. Chasey D.: J. gen. Virol. 37, 443, 1977.
6. Chasey D., Lucas M.: Res. vet. Sci. 22, 124, 1977.
7. Davidson G., Townley R., Bishop R., Holmes J.: Lancet 1, 242, 1975.
8. Doane F., Anderson N., Zbitnew A., Rhoades A.: Can. Med. Ass. J. 100, 1043, 1969.
9. Ellis D., de Leeuw P., Straver P., van Balken J.: Med. Microbiol. Immunol. 166, 157, 1978.
10. England J., Frye C., Enright E.: Cornell Vet. 66, 172, 1976.
11. Espejo R.: J. Infect. Dis. 139, 474, 1979.
12. McFerran J., Clarke J., Curran W.: Res. vet. Sci. 12, 253, 1971.
13. Flewett T.: J. Am. vet. med. Ass. 173, 538, 1978.
14. Flewett T., Bryden A., Davies H.: Lancet 2, 1497, 1973.
15. Flewett T., Bryden A., Davies H.: J. clin. Pathol. 27, 603, 1974.
16. Flewett T., Davies H., Bryden A., Robertson M.: J. clin. Pathol. 27, 608, 1974.
17. Grauballe P., Gerner J., Meyling A., Hornsteth A.: J. gen. Virol. 35, 203, 1977.
18. Kapikian A., Wyatt R., Dolin R., Thornhill T., Kalica A., Chanock R.: J. Virol. 10, 195, 1972.
19. Kogasa K., Akihara M., Horino K., Chiba S., Nakao T.: Arch. Virol. 61, 41, 1979.
20. Lecce J., King M., Mock R.: Infect. Immunity 14, 816, 1976.
21. Liebermann H., Dietz G., Holl U., Heinrich H., Solisch P., Liebermann H.: Arch. exp. Vet. Med. 33, 367, 1979.
22. Madeley C., Cosgrove B.: Lancet 2, 451, 1975.
23. Mathan M., Mathan V., Swaminathan S.: Lancet 1, 1068, 1975.
24. Mebus C., Underdahl N., Rhodes M., Twiehaus H.: Bull. Neb. Agric. Exp. Stat. 233, 1, 1969.
25. McNulty M., Pearson G., McNulty J., Collins D., Allan G.: Vet. Microbiol. 1, 55, 1976.
26. Pearson G., McNulty M.: Arch. Virol. 59, 127, 1979.
27. Pearson G., McNulty M.: J. comp. Path. 87, 363, 1977.
28. Rhoades M.: Can. J. comp. Med. 43, 84, 1979.
29. Rotger S., Craven J., Williams I.: Austr. Vet. J. 51, 536, 1975.
30. Roseto A., Escaig J., Delain E., Cohen J., Scherrer R.: Virology 98, 471, 1979.
31. Saif L., Bohl E., Kohler E., Huyhes J.: Am. J. vet. Res. 38, 13, 1977.
32. Scherrer R., Cohen J.: Anns Med. vet. 122, 323, 1978.
33. Scherrer R., Cohen J., P'Haridon R., Feynerd C., Fayet J.: Ann. Rech. vet. 7, 25, 1976.
34. Snodgrass D., Angus K., Gray E., Menzies J., Paul G.: Arch. Virol. 60, 217, 1979.
35. Snodgrass D., Gray E.: Arch. Virol. 55, 287, 1977.
36. Solisch P.: Arch. exp. Vet. Med. 32, 465, 1978.
37. Stannard L., Schoub B.: J. gen. Virol. 37, 435, 1977.
38. Storz J., Leary J., Carlson J., Bates R.: J. Am. vet. med. Ass. 173, 624, 1978.
39. Theil K., Bohl E., Cross R., Kohler E., Agnes A.: Am. J. vet. Res. 39, 213, 1978.
40. Thompson H., McCandlish I., Cornwell H., Wright N., Rogerson P.: Vet. Rec. 104, 107, 1979.
41. Woode G., Bridger J., Hall G., Jones J., Jackson G.: J. med. Microbiol. 9, 203, 1976.
42. Woode G., Bridger J., Jones J., Flewett T., Bryden A., Davies H., White G.: Infect. Immunity 14, 804, 1978.
43. Zebrowski L., Wijaszka T., Surowiecki K., Matusiewicz J., Niedzielski S.: Bull. Vet. Inst., Puławy 17, 88, 1973.

Adres autora: prof. dr habil. Konrad Malicki, ul. Grochowska 272, 03-849 Warszawa.

Малицкий К., Малицкая Э., Баньбура М. В. — Применение электронной микроскопии для распознавания ротавирусных поносов поросят и телят.

В препаратах, контрастируемых негативно 4% раствором натриевой соли фосфорно-вольфрамовой кислоты (РТА Na) с рН 6,3, исследовали в электронный микроскоп присутствие ротавирусов в промывных водах тонкой кишки падишки или усыпленных поросят и телят в возрасте нескольких дней, с симптомами острого поноса. Наличие ротавирусов отметили у 60%, 63% или 80% больных поросят, в зависимости от места происхождения животных. В двух случаях констатировали коронавирусы. У всех больных телят, происходящих из одного очага болезни, обнаружили присутствие ротавирусов. Вступительная экстракция этиловым эфиром промывных вод кишки больных животных облегчала очистку материала и обнаружение ротавирусов.

Malicki K., Malicka E., Bańbura M. W. — The use of electron microscopy in the diagnosis of rotaviral diarrhoea in piglets and calves.

Faecal samples were taken from euthanized or killed piglets and calves suffering from acute diarrhoea. The samples were purified, stained negatively

with a 4% PTA, pH=6.3 and examined by ME. Rotaviruses were detected in 60%, 63% or 80% of sick piglets in dependence on the origin of animals. In two cases coronaviruses were found, too. Rota-

viruses were also present in the all faecal samples from calves. The purification and detection of the viruses were easier if the samples had been previously treated with aethyl aether.

JERZY WIŚNIEWSKI, ANNA KŁOSSOWSKA

## Leczenie mastitis u krów cefacetrilem

Zakład Higieny Zwierząt Instytutu Weterynarii w Puławach, Oddział w Bydgoszczy,  
ul. Powstańców Wlkp. 10, 85-090 Bydgoszcz

Cefacetril jest półsyntetycznym antybiotykiem z grupy cefalosporin i zaliczany jest razem z penicyliną do antybiotyków klasy beta-laktam. Kradolfer i wsp. (6) przypisują tej klasie szczególnie korzystne właściwości, gdyż antybiotyki te działają tylko na bakterie nie uszkadzając komórek organizmu. Ziw i Nouws (9), jak i Gedek (1) wykazali, że cefalosporiny mają szeroki zakres działania na gramdodatnie i gramujemne bakterie patogenne.

W terapii mastitis po raz pierwszy zastosowano niektóre półsyntetyczne antybiotyki tej grupy w 1974 r. Hayes (cyt. 1) badał działanie cefalosporin; Christie i Strom oraz Harris i wsp. (cyt. 9) stosowali sól sodową cefapiryny względnie cefalosporiny. Ziw (cyt. 9) określał *in vitro* aktywność cefalorodiny, cefaleksyny i cefapiryny w stosunku do różnych bakterii patogennych. Isenberg i wsp. (4) opracowali dla cefacetrilu kryteria oceny antybiotykowrażliwości (*in vitro*) w tekście krążkowym. Badali różne bakterie patogenne dla ludzi. Cefacetril w krążku bibułowym zawarty był w ilości 30 mcg. Autorzy ci przyjęli następujące średnice zahamowania wzrostu: szczep oporny — 13 mm lub mniej; średnio wrażliwy — 14—16 mm; wrażliwy — 17 mm lub więcej.

### Material i metody

W badaniach dysponowano preparatem firmy CIBA-GEIGY (Szwajcaria) Cefacetril *ad us. vet.* (przewidziana nazwa handlowa Vetimast). Preparat w tubie dostosowanej do infuzji dowymieniowej — zawiera w dawce o masie 10 g 250 mg soli sodowej cefacetrilu zawieszono w kwasach stearynowych i ole-

ju arachidowym. Lek nadaje się do terapii w okresie laktacji, a okres karencji mleka wynosi 4 dni.

Poddano leczeniu 223 ćwiartki wymienia u 178 krów rasy ncb przebywających w 9 typowych oborach produkcyjnych ppgr (tab. 1). W higienie doju stosowano Inkozan W (2). Krowy badano w kierunku mastitis okresowo, między innymi mleko ćwiartkowe płynem Mastirapid (8). Wyniki tych badań były podstawą wyboru zwierząt do leczenia. Przeprowadzono je w listopadzie, maju i od września do grudnia. Poddano leczeniu różne przypadki mastitis (tab. 2).

Metody postępowania leczniczego, kontroli skuteczności i badań laboratoryjnych uzgodniono z producentem leku. Kierując się przesłankami ekonomicznymi (zmniejszenie kosztów leku, skrócenie okresu nieprzydatności mleka, usprawnienia pracy lekarza wet.) uwzględniono także jednokrotną dawkę leku w terapii. W przypadkach stosowania preparatu dwu- lub trzykrotnego przerwa wynosiła 24 godziny. Wybór wariantu terapeutycznego był losowy, tzn. niezależny od nasilenia objawów klinicznych, ani od rodzaju zakażenia bakteryjnego. Ponieważ leczenie przeprowadzono w oborach produkcyjnych, nie można było wyodrębnić grupy kontrolnej (placebo). Za kryterium skuteczności działania preparatu uznano wyniki bakteriologicznego badania mleka ćwiartkowego. Badania te wykonywano zgodnie z obowiązującymi przepisami (3), pobierając zawsze po dwie próby mleka z danej ćwiartki wymienia. Mleko badano bezpośrednio przed leczeniem, następnie po leczeniu między 9 a 11 dniem (I kontrola) i 16 a 18 dniem (II kontrola). Kontrolę III przeprowadzano między 23 a 25 dniem po leczeniu tylko wówczas, gdy wyniki kontroli I i II były niezgodne. Za zakażoną uznawano tę ćwiartkę wymienia, z której mleko zawierało w obu próbkach ten sam gatunek i rodzaj bakterii (badań na grzyby i mykoplazmy nie wykonywano). Leczenie uznano za skuteczne kierując się następującym schematem: przypadek „bakteriologicznie wyleczony” — gdy negatywne wyniki badania bakteriologicznego dotyczyły prób 4/4, 4/6 względnie 3/6. Jednakże obie próby mleka musiały dawać wynik ujemny w ostatniej kontroli.

Tab. 1. Ogólna charakterystyka populacji krów i obór

Obora	Liczba krów	Liczba badanych		W mleku stwierdzono na podstawie badania płynem Mastirapid patologicznie zwiększoną liczbę komórek somatycznych				Średnia roczna wydajność mleka (L) od krowy
		krów	ćwiartek	u krów		w ćwiartkach		
				liczba	%	liczba	%	
1	460	357	1421	80	22,4	137	9,6	4000
2	111	92	363	19	20,6	29	7,6	2500
3	81	50	199	22	44,0	29	14,6	2600
4	178	142	576	54	38,0	105	18,7	3300
5	108	80	311	54	67,5	126	40,5	2600
6	218	190	741	60	31,6	95	12,8	2700
7	114	99	391	49	49,5	91	23,3	2600
8	490	412	1584	164	39,8	243	15,3	2700
9	480	400	1570	125	31,2	212	13,5	3800

Objaśnienia: 1—9 obory stanowiskowe, krowy wiązane; 1,4—9 chów bezpastwiskowy; 2 i 3 chów pastwiskowy.