

JERZY WIŚNIEWSKI, GRAŻYNA GRABOWSKA, ANNA WASIELEWSKA

Badanie immunosupresyjnego działania szczepu LaSota wirusa choroby Newcastle (NDV) u kurcząt

Zakład Mikrobiologii Weterynaryjnej Instytutu Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych
Wydziału Weterynaryjnego AR-T. 10-957 Olsztyn-Kortowo
Zakład Higieny Weterynaryjnej, ul. Warszawska 109, 10-701 Olsztyn

Szereg badań wskazuje na immunosupresyjne działanie wirusa rzekomego pomoru drobiu (choroby Newcastle, ND). Medzon i Vas (14) już w 1964 r. wykazali, że szczep B₁ tego wirusa hamuje *in vitro* syntezę przeciwciał w komórkach królika uodpornionego albuminą bydłą. Zmniejszenie liczby komórek śledziony produkujących przeciwciała dla erytrocytów barana u chomików stwierdziły Berenci i Belady (4, 5), zaś opóźnienie odrzucania przeszczepów u myszy zakażonych wirusem NDV obserwowali Woodruff i Woodruff (cyt. 9). W doświadczeniach tych badane szczepy hamowały reaktywność immunologiczną w stosunku do antygenów heterologicznych.

Ostatnio pojawiły się prace (1, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 17), wskazujące, że szczep LaSota powodował u kurcząt upośledzenie reaktywności także w stosunku do antygenów homologicznych. Wyrażało się to u ptaków doustnie uodpornionych tym szczepem po rewakcytacji albo brakiem typowej reakcji anamnesticznej, albo po niewielkim wzroście mian następował szybki spadek do poziomów niższych niż u ptaków nie rewakcynowanych. Hamowanie to było niezależne od odstępu czasu między uodpornieniem i rewakcyacją. Przyczyny tego zjawiska nie są znane.

Celem pracy było prześledzenie wpływu doustnego uodpornienia kurcząt szczepem LaSota wirusa ND na ich reaktywność w stosunku do wirusa parainfluenzy-3, pałeczek *Brucella* i krwinek czerwonych barana.

Material i metody

Zwierzęta. Do badań użyto 350 kurcząt obu płci, krzyżówki Leghorn×Rhode Island, zakupionych w pierwszym dniu życia w zakładzie wylęgowym. Ptaki umieszczono w jednym pomieszczeniu i żywiono *ad libitum* mieszką starter z dodatkiem środków kokcydiostatycznych. Przed przystąpieniem do badań skrwawiono 6 losowo wybranych ptaków, a surowice ich zbadano na obecność przeciwciał HI dla wirusa ND (wynik był ujemny).

Antygeny. Wirus rzekomego pomoru drobiu użyty do badań był hodowlanym preparatem szczepu LaSota (Vaccina L), nr serii 110178, o mianie zakaźnym dla zarodków kurzych 10^{-9.7} ml. Szczep SF₄ wirusa parainfluenzy-3 (PI-3), namnożony w hodowli komórek nerki cielęcia, zebrany po powstaniu CPE wykazał miano TCID₅₀ równe 10^{-6.7} ml. Szczep S19 *Brucella abortus*; do badań używano spłuczyny 24-godzinnej hodowli na podłożu agarowym (*Brucella* agar-Difco) o gęstości odpowiadającej 4. próbówce skali Mc Farlanda. Erytrocyty barana używano w postaci 1% zawiesiny w PBS.

Badania serologiczne. Odczyn hamowania hemaglutynacji (HI) wirusa ND wykonywano metodą Beacha

(2), wirusa PI-3 w sposób zalecany przez firmę Rentschler (6), z tym, że odczyn rozpoczynano od rozcieńczenia 1:2. Przeciwciała przeciw antygenom *Brucella* wykrywano przy pomocy odczynu zlepnego, w sposób stosowany w ZHW (z użyciem standaryzowanego antygeny barwnego), zaś odczyn aglutynacji erytrocytów barana według Roszkowskiego i wsp. (15). Wyniki badań serologicznych przedstawiono w postaci średnich geometrycznych mian.

Badania biochemiczne. Oznaczanie ilości białka całkowitego wykonano metodą biuretową, rozdział frakcji metodą elektroforetyczną (napięcie 4,2V/cm długość, napięcie 0,34A/cm szerokość, bufor Michaelisa o pH 8,4, bibuła FN3. Czas trwania elektroforezy ok. 15 godzin. Odczyt densytometryczny).

Wyniki i omówienie

Doświadczenie 1. Wpływ uodpornienia 10-dniowych kurcząt szczepem LaSota na pierwotną i wtórną reakcję immunologiczną na antygeny heterologiczne.

Badanie wpływu uodpornienia na pierwotną odpowiedź immunologiczną przeprowadzono następująco: trzydzieści dziesięciodniowych kurcząt uodporniono doustnie szczepem LaSota (rozcieńczonym w wodzie do picia w stosunku 1:750). W 4 dni potem, czyli w 14 dniu życia, ptaki podzielono losowo na 3 grupy po 10 osobników i wprowadzono im domięśniowo po 0,5 ml odpowiednich antygenów — jednej wirus PI-3 (grupa L₁₀P₁₄), drugiej pałeczki *Brucella* (grupa L₁₀B₁₄) i trzeciej erytrocyty barana (grupa L₁₀E₁₄). Liczby przy symbolach literowych oznaczają dzień wprowadzenia antygenów. Kontrolę stanowiły 72 ptaki, które w 14 dniu życia podzielono na trzy grupy po 24 osobniki i zaszczepiono odpowiednimi antygenami (grupy: P₁₄, B₁₄, E₁₄). W 14 i 28 dniu po podaniu antygenów heterologicznych pobrano krew do badań serologicznych.

Badanie wpływu podania wirusa ND na wtórną odpowiedź immunologiczną przeprowadzono na ptakach kontrolnych z pierwszej części doświadczenia. W tym celu, bezpośrednio po drugim pobraniu krwi, przeniesiono połowę — 12 ptaków każdej grupy kontrolnej (P₁₄, B₁₄, E₁₄) do innego pomieszczenia i uodporniono je szczepem LaSota, a w 4 dni później zaszczepiono je powtórnie tymi samymi antygenami P, B i E. Odpowiednie antygeny wprowadzono także pozostałym ptakom. Powstały więc nowe grupy: doświadczalne P₁₄L₄₂P₄₆, B₁₄L₄₂B₄₆, E₁₄L₄₂E₄₆ oraz kontrolne — P₁₄P₄₆, B₁₄B₄₆, E₁₄E₄₆. W 7 i 14 dniu po tym wykonano badania serologiczne surowic pobranych od około 1/3 losowo wybranych ptaków grupy. Wyniki badania podano w tab. 1, cz. A.

Tab. 1. Średnie geometryczne mian przeciwciał w surowicy kurcząt użytych do badania immunosupresyjnego oddziaływania szczepu LaSota wirusa ND na pierwotną i wtórną odpowiedź immunologiczną

Grupa		Poziom przeciwciał dla antygenów P, B i E				
		28*	42*	53*	60*	
Odpowiedź immunologiczna	pierwotna	L ₁₀ P ₁₄	12	12	n.b.	
		L ₁₀ B ₁₄	5	6		
		L ₁₀ E ₁₄	3	3		
	wtórna	P ₁₄	3	3	n.b.	
		B ₁₄	2	3		
		E ₁₄	3	4		
Część B	pierwotna	P ₁₄ L ₄₂ P ₄₆			11	2
		B ₁₄ L ₄₂ B ₄₆			41	35
		E ₁₄ L ₄₂ E ₄₆			14	5
	wtórna	P ₁₄ P ₄₆	3	4	11	5
		B ₁₄ B ₄₆	2	3	62	40
		E ₁₄ E ₄₆	3	4	18	4
Część B		68*	82*	93*	100*	
Odpowiedź immunologiczna	pierwotna	L ₅₀ P ₅₄	10	5	n.b.	
		L ₅₀ B ₅₄	25	3		
		L ₅₀ E ₅₄	3	3		
	wtórna	P ₅₄	9	2	n.b.	
		B ₅₄	50	21		
		E ₅₄	10	3		
Część B	pierwotna	P ₅₄ L ₈₂ P ₈₆			20	9
		B ₅₄ L ₈₂ B ₈₆			164	63
		E ₅₄ L ₈₂ E ₈₆			50	11
	wtórna	P ₅₄ P ₈₆	9	2	40	12
		B ₅₄ B ₈₆	50	21	316	160
		E ₅₄ E ₈₆	10	3	148	56

Objaśnienia: * = liczby oznaczają dnia życia ptaków, n.b. = nie badano.

Doświadczenie 2. Wpływ uodpornienia 50-dniowych ptaków szczepem LaSota na pierwotną i wtórną reakcję immunologiczną na antygeny heterologiczne.

Do doświadczenia użyto 30 ptaków w wieku 50 dni. Badanie to przeprowadzono w identyczny sposób jak poprzednie, z tą różnicą, że antygeny heterologiczne wprowadzono ptakom dożylnie w dawce 1 ml. Grupy kurcząt użytych do badania wpływu uodpornienia na pierwotną odpowiedź immunologiczną oznaczono: doświadczałne — L₅₀P₅₄, L₅₀B₅₄, L₅₀E₅₄, kontrolne — P₅₄, B₅₄ i E₅₄ a na wtórną odpowiedź P₅₄L₈₂P₈₆, B₅₄L₈₂B₈₆, E₅₄L₈₂E₈₆, (kontrolne: P₅₄P₈₆, B₅₄B₈₆, E₅₄E₈₆). Wyniki przedstawiono w tab. 1, cz. B.

Doświadczenie 3. Wpływ uodpornienia 10-dniowych kurcząt szczepem LaSota na pierwotną reakcję immunologiczną na antygeny heterologiczne podane 40 dni później.

144 dziesięciodniowych kurcząt podzielono na dwie liczbowo równe grupy, z których jedne uodporniono jak w doświadczeniu 1. Oznaczanie mian przeciwciał HI wirusa ND przeprowadzono w 14, 40, 54, 74 i 81 dniu po uodpornieniu. Miana te w grupie doświadczalnej wynosiły odpowiednio — 38, 21, 4, 2 i 0, w grupie nieuodpornionej były ujemne. W 40 dni po uodpornieniu szczepem LaSota ptaki doświadczalne

(L₁₀) i kontrolne podzielono losowo na trzy równe podgrupy i bezpośrednio potem wprowadzono im dożylnie po 1 ml odpowiednich antygenów heterologicznych (powstały więc grupy: L₁₀P₅₀, L₁₀B₅₀, L₁₀E₅₀, oraz kontrolne P₅₀, B₅₀, i E₅₀). W 14 i 34 dniu po dożylnym podaniu antygenów pobierano od 1/3 losowo wybranych ptaków każdej grupy krew do badań serologicznych. W 84 dniu życia, bezpośrednio po drugim pobraniu krwi, wprowadzono powtórnie te same antygeny heterologiczne ptakom poszczególnych podgrup, które oznaczono odpowiednio: L₁₀P₅₀P₈₄, L₁₀B₅₀B₈₄, L₁₀E₅₀E₈₄, kontrolne P₅₀P₈₄, B₅₀B₈₄ i E₅₀E₈₄ i po tygodniu wykonano badania serologiczne i oznaczono frakcje białek w surowicy. W doświadczeniu tym nie wykazano immunosupresyjnego działania szczepu LaSota i nie stwierdzono zmian ilościowych w składzie frakcji białek surowicy.

Jedynie u ptaków szczepionych w wieku 50 dni wykazano immunosupresję w stosunku do antygenów pałeczek *Brucella* i erytrocytów barana. Hamowanie reakcji następowało zarówno w pierwotnej jak i wtórnej odpowiedzi humoralnej, ale tylko w krótkim czasie po podaniu szczepu LaSota. Różnica w zakresie mian przeciwciał była mniejsza wobec pałeczek *Brucella* niż erytrocytów, co może wynikać nie tylko z tego że jeden antygen jest ożywiony, a drugi nie ożywiony, ale także z różnic ich charakterów antygenowych. Krwinki czerwone są bowiem antygenami grasiczo-zależnymi, antygeny *Brucella* antygenami grasiczo-niezależnymi (Toivanen i wsp., cyt. wg 13). Natomiast u ptaków młodszych, szczepionych w wieku 10 dni nie wykazano supresji, zaś miana przeciwciał dla wirusa PI-3 były 4-krotnie wyższe niż u zwierząt kontrolnych. Podobne wyniki uzyskali też inni autorzy (3, 4, 5). Hamowanie, rzadziej pobudzanie reaktywności immunologicznej wykazano, poza wirusem ND, u około 40 innych, przy czym taka zmodyfikowana reaktywność utrzymuje się 2—3 tygodnie i dotyczyć może odporności humoralnej lub komórkowej (16).

Mechanizmy opisywanych zjawisk nie są dostatecznie poznane. Immunosupresja może być wynikiem oddziaływania neuraminidazy wirusa (cyt. wg 5), wpływu interferonu wytworzonego w przebiegu zakażenia wirusowego (4), spadku liczby komórek produkujących przeciwciała (14), zaburzeń funkcji limfocytów T i B, makrofagów i innych komórek hemopoetycznych (cyt. 16). Zjawisko modyfikacji reaktywności immunologicznej powodowane przez wirusy wobec heterologicznych antygenów może mieć praktyczne znaczenie. Powinno się je brać pod uwagę przy układaniu harmonogramów akcji immunoprofilaktycznych (zachowanie odpowiednich odstępów między szczepieniami) i uwzględnianie przy interpretacji niepowodzeń lub uzyskiwania słabszych od spodziewanych efektów szczepień.

Piśmiennictwo

1. Bulla L., Papocsi L., Szurow J., Totn B.: Acta vet. hung. 27, 253, 1979.
2. Beach, J. R.: J. Am. vet. med. Ass. 112, 85, 1948.
3. Belodi J., Pusztal R., Mucsi L., Bakay M., Bajszar G.: Infection, Immunity, 7, 22, 1973.
4. Berencsi K., Ecladi, A. Juhász.: Z. Immunforsch. 147, 411, 1974.
5. Berencsi K., Belodi I.: Acta virol. Praga, 21, 296, 1977.

6. Hemmagglutinations-Hemmungstest (HAK) zum Nachweis hemmagglutinationshemmender Antikörper gegen Mukovirus Parainfluenzae 3. Dr. Rentschler and Co. Bakteriologisches Institut, Laupheim.
7. Ghumann, J. S., Wiggin A. D., Bankowski R. A.: Avian Dis. 20, 1, 1975.
8. Karczewski, W.: Bull. vet. Inst. Puławy 17, 15, 1973.
9. Larski, Z.: Medycyna Wet. 31, 517, 1975.
10. Larski, Z.: Medycyna Wet. 34, 284, 1978.
11. Larski Z., Grabowska G., Spohr-Faundez I.: Medycyna Wet. 33, 153, 1977.
12. Larski Z., Wiśniewski J., Grabowska G.: Medycyna Wet. 32, 399, 1976.
13. McCorkle F., Glück B.: Poult. Sci. 59, 669, 1980.
14. Medzon E. L., Vas S.: Can. J. Microbiol. 10, 535, 1964.
15. Roszkowski J., Zadura J., Skwarek P.: Bull. vet. Inst. Puławy, 20, 85, 1976.
16. Semenov B. F.: Acta virol. Praga. 25, 122, 1981.
17. Spalatin J., Turner H. J., Hanson R. P.: Avian Dis. 20, 361, 1975.

Adres autora: doc. dr hab. Jerzy Wiśniewski, 10-957 Olsztyn-Kortowo, bl. 37.

Висьневский Е., Грабовская Г., Васелевская А. — Исследование иммуносупрессионного действия штамма LaSota вируса белозни Ньюкасл (NDV) у цыплят.

Проследили за влиянием пероральной иммунизации цыплят штаммом LaSota вируса ND на их иммунологическую реактивность по отношению к

гетерологическими антигенам — вирусу PI-3, палочкам Brucella и эритроцитам барана. Иммуносупрессию как в первичном, так и вторичном иммунологическом ответе обнаружили лишь у птиц, иммунизированных штаммом LaSota в возрасте 50 дней относительно введенных на 4 дня позже палочек Brucella и эритроцитов барана. У иммунизированных же 10-дневных птиц отметили 4-кратно большие титры противотел для вируса PI-3 чем у контрольных животных.

Wiśniewski J., Grabowska G., Wasielewska A. — Immunosuppressive action of NDV in chickens.

The influence of vaccination in chickens with LaSota strain of NDV on immunological response in relation to antigens of PI-3 and sheep erythrocytes was examined. Immunosuppression in primary and secondary immunological response was found in poultry aged 50 days immunized with LaSota strain when Brucella spp. and sheep red blood cells were given four days later. While in chickens immunized at the age of 10 days 4 fold higher titers were noticed against PI-3 virus than in control ones not vaccinated with NDV.

ELŻBIETA BOROWIECKA

Choroby grzybicze ryb występujące w Polsce

Instytut Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych Wydziału Weterynaryjnego AR,
Pl. Grunwaldzki 45, 50-366 Wrocław

Zmiany w środowisku wodnym spowodowane rosnącym zanieczyszczeniem wód odbijają się również na jakościowym zróżnicowaniu flory grzybiczej. Niektóre gatunki grzybów, np. *Leptomitius lacteus*, odporne na działanie ścieków, nie znajdując dużej ilości konkurentów, intensywnie namnażają się i powodują spadek zawartości tlenu w wodzie, gromadzenie w niej produktów swej przemiany materii i kumulowanie pewnych substancji, takich jak np. selen (10), przez co sprzyjają obniżeniu odporności ryb i występowaniu chorób. Dlatego też należy liczyć się, że w przyszłości, w zależności od stanu środowiska wodnego, mogą pojawić się nowe jednostki chorobowe o etiologii grzybiczej. Obecnie jednak u ryb hodowanych w Polsce występują „klasyczne choroby grzybicze” rozpoznawane od dawna. Należą do nich: pleśniawka ikry, pleśniawka ryb, grzybicza zgorzel skrzeli oraz mukofiloza i ichtiofanoza, które wywoływane są przez drobnoustroje o niestabilnej jeszcze pozycji taksonicznej, a tradycyjnie zaliczane do mikoz.

Celem opracowania jest przedstawienie aktualnego stanu wiedzy o mikozach ryb w zakresie przydatnym lekarzom weterynarii ze względu na praktyczne znaczenie tych chorób.

Pleśniawka ikry i ryb (*saprolegniosis*, *bisus*)

Grzyby rzędu *Saprolegniales* często osiadają na martwej lub uszkodzonej ikrze wywołując w żywych ziarnach ikry chorobę określaną mianem saprolegniozy lub pleśniawki ikry. W zasadzie tylko *Saprolegnia parasitica* jest paso-

żytem ikry, ryb, skrzeku, kijanek i żab. Inne gatunki tego rodzaju: *S. ferax*, *S. hypogyna* oraz *Carchesium sp.*, *Aphanomyces laevis*, *Leptomitius lacteus*, czy *Allomyces animalis* izolowane z przypadków pleśniawki ikry są wodnymi saprofitami zdolnymi do sporadycznego przechodzenia na pasożytniczy tryb życia. Ta zmiana trybu życia jest możliwa wówczas, gdy wskutek niekorzystnych warunków środowiskowych dochodzi do zmiany turgoru ikry, jej mechanicznych uszkodzeń itp. Delikatne, długie, promieniście ułożone strzępki wym. grzybów obserwuje się najpierw na martwych ziarnach ikry, z których atakują sąsiednie. Otoczona taką „watą” ikra obumiera.

W zakładach wylęgowych obowiązuje cykl zabiegów profilaktycznych skierowanych przeciw rozwojowi pleśniawki na inkubowanej ikrze. Po eliminacji martwych ziaren ikra jest przepłukiwana w bieżącej wodzie zawierającej dodatek pleśniobójczego preparatu. Do zabiegów profilaktycznych i leczniczych używa się w Polsce (7, 21, 22), Danii (11) i Szwecji (25) zieleni malachitowej, w ZSRR — formaliny, w USA (16) — nadmanganianu potasu. Oczywiście nie jest to regułą; przeciwnie, każdy obiekt rybacki powinien mieć lek z wyboru, lek stosowany ze względu na najkorzystniejsze działanie w warunkach wodnych zakładu (4, 12, 23, 27, 28). Jeżeli woda zawiera domieszki cynku, zieleni malachitowa nie może być używana, bowiem wówczas ogromnie zwiększa się jej toksyczność. Do grupy środków pleśniobójczych zalicza się jeszcze: błękit metylenowy (7), siarczan miedzi, sól kuchenna, zieleni krystaliczną,