

JANUSZ PAWĘSKA

Badanie właściwości chorobotwórczych, immunogennych oraz siewstwa modyfikowanego szczepu Wrocław-2 wirusa zapalenia tętnic koni *)

Katedra Mikrobiologii Weterynaryjnej Wydziału Weterynaryjnego AR,
ul. Norwida 31, 50-375 Wrocław

Summary

Studies of pathological and immunogenic properties and shedding of a modified Wrocław-2 strain of Equine arteritis virus

The purpose of the study was a preliminary evaluation of the usefulness of Wrocław-2 EAV strain modified in cell culture lines as a live-virus vaccine used in prophylaxis against EVA. In four one year old horses vaccinated intravenously with Wrocław-2 strain was observed apathy lasting for several days, a moderate ocular conjunctiva congestion, and in 1 out of 4 horses postvaccination fever occurred on the day 5th. The virus was reisolated only from conjunctival swabs in 2 horses on the 2nd day after immunization. The peak titre of virus neutralizing antibodies — from 1/512 to 1/1024 — was noted after 2—3 weeks since the vaccination. After exposure of vaccinated horses to a virulent Bucyrus EAV strain clinical signs of disease were not observed, virus was not recovered from any of swabs and the secondary humoral immune response was characterized by a very sharp and rapid increase of titres of neutralizing antibodies. However in the unvaccinated control horse, acute arteritis occurred and viral shedding was intensive and longlasting. The virus was reisolated from conjunctival, nasal, oral, rectal and preputial swabs.

Wirusowe zapalenie tętnic koni (Equine Viral Arteritis — EVA) jest przyczyną znacznych strat w hodowli koni. Powodowane są one głównie ronieniami płodów, których odsetek może wynosić 40—50% (5, 10). Skutkiem szeroko rozpowszechnionych zakażeń bezobjawowych wirusem zapalenia tętnic koni (Equine Arteritis Virus — EAV) jest często zmniejszenie wydajności koni podczas zwiększonego wysiłku (14), co ma szczególne znaczenie w użytkowaniu koni sportowych. Pierwsze badania nad immunoprofilaktyką EVA podjęto w latach sześćdziesiątych (6, 17). Eksperymentalnej żywej szczepionki przeciw EVA użyto w terenie w 1984 r., a handlowej szczepionki „Arvac” (Fort Dodge Laboratories) w 1985 r. w Stanach Zjednoczonych (23).

Dotychczasowe badania nad EVA w Polsce wykazały, że zakażenie wirusem EA występuje w kraju powszechnie (9), powodując zarówno poronienia płodów przez ciężarne klacze, jak i przypadki śmiertelne u źrebiąt (11, 12).

Celem pracy była wstępna ocena przydatności modyfikowanego szczepu Wrocław-2 EAV jako żywej szczepionki w profilaktyce zakażeń wirusem EA.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na 5 nierazowych koniach, w wieku około 1 roku, wolnych od przeciwciał anti-EAV. W pierwszym etapie doświadczenia konie oznaczone nr 1—4 zakażono modyfikowanym szczepem Wrocław-2. Przez okres 5 tyg. po zakażeniu prowadzono codzienne badania kliniczne oraz pobierano materiały do badań wirusologicznych i serologicznych w odstępach 2-dniowych przez pierw-

sze 2 tyg. a następnie co 4—5 dni. W drugim etapie (w 39 dniu po wprowadzeniu szczepu Wrocław-2) konie 1 i 4 (oznaczone teraz jako 1' i 4') oraz konia nr 5 zakażono kontrolnie chorobotwórczym szczepem Bucyrus EAV. U wszystkich koni prowadzono jak poprzednio badania kliniczne oraz pobierano materiały do badań wirusologicznych i serologicznych co 2—3 dni. Konie 1, (1') 2, 3, 4, (4') trzymano przez cały okres doświadczenia na uwięzi w ścisłym kontakcie. Koń nr 5 przebywał w tej samej stajni, nie miał on jednak bezpośredniego kontaktu z pozostałymi zwierzętami.

Wirus. Szczep Wrocław-2 EAV zmodyfikowany przez seryjne pasażę (p.) w hodowli RK-13 (126 p.) i hodowli Vero (10 p.) otrzymano od doc. dr hab. W. Golnika w Katedrze Mikrobiologii Weterynaryjnej AR Wrocław, a szczep Bucyrus EAV od prof. dr F. Bürkiego z Instytutu Wirusologii Uniwersytetu Medycyny Weterynaryjnej w Wiedniu.

Droga zakażenia. Wirus wprowadzono do żyły jarzmowej w ilości 10 cm³ nierozcieńczonego płynu z nadzakażonej hodowli komórkowej. Miano szczepu Wrocław-2 p. 136 wynosiło 10^{8,5} TCID₅₀/cm³, a szczepu Bucyrus p. 16 (w RK-13) 10^{5,5} TCID₅₀/cm³.

Badanie wirusologiczne. Materiały do prób reizolacji stanowiły leukocyty krwi obwodowej, wymazy z worka spojówkowego, jam nosowych, jamy ustnej, pochwy lub napletka oraz odbytnicy. Izolację leukocytów z krwi wykonano wg McCollum i wsp. (21). Wymazy pobierano za pomocą wacików, które umieszczano w próbkach z płynem Hanksa, następnie wyciskano je o ściany probówek, a płyn sączono przez filtry membranowe o średnicy porów 0,2 um. Próby reizolacji wirusa prowadzono w hodowli RK-13 wg Fukunaga i wsp. (7). Środowiskiem wzrostowym był Eagle MEM z dodatkiem 10% surowicy płodu bydła (Flow Laboratories) i antybiotyków (penicylina 200 j.m./cm³, streptomycyna 200 ug/ml). Płynem utrzymującym był Eagle MEM z 2% dodatkiem surowicy płodu bydła i antybiotyków (penicylina i streptomycyna w ilościach j.w., fungizon 10 ug/cm³). Wirus reizolowany z badanych materiałów identyfikowano w pośrednim odczynie immunofluorescencji (IS) wykonanym wg Inoue i wsp. (15). Surowica anti-EAV użyta w IF o mianie przeciwciał zubożających 1/256 pochodziła od konia nr 5 zakażonego szczepem Bucyrus. Koniuat (firmy Nordic Immunological Laboratories, Holandia) stanowiły immunoglobuliny IgG królika anti IgG konia znakowane izotiocyanianem fluoresceiny.

Badanie serologiczne. Dynamikę narastania mian przeciwciał zubożających anti-EAV w surowicach koni badano z użyciem odczynu seroneutralizacji (SN) wykonanym wg Moraillon i Moraillon (22). Antygenem stosowanym w SN był wzorcowy szczep Bucyrus EAV p. 20 w RK-13. Podłoże stanowiła hodowla RK-13. W badaniach kontrolnych użyto odpornościowej surowicy konia zakażonego szczepem Bucyrus EAV, otrzymanej od dr M. Lukas z Central Veterinary Laboratory, Weybridge, Wielka Brytania oraz normalnej surowicy konia.

Wyniki i omówienie

W około 12 godz. po zakażeniu koni modyfikowanym szczepem Wrocław-2 obserwowano osowienie, które utrzymywało się 4—5 dni. W 4 dniu po infekcji wystąpiło umiarkowane przekrwienie spojówek, zaostrenie szmeru pęcherzykowego oraz niekiedy zwiększenie liczby oddechów do 30/min. Wewnętrzna ciepłota ciała (w.c.c.) była w większości przypadków w normie. Wyraźny wzrost w.c.c. zanotowano tylko u konia nr 4 w 5 dniu po zakażeniu (39,4°C). W 12 dniu przekrwienie spojówek ustąpiło i w dalszym okresie badań nie obserwowano jakichkolwiek zmian w ogól-

*) Praca wykonana w ramach CPBP nr 0506.

nym stanie zdrowia i zachowania się koni. U koni 1' i 4' zakażonych kontrolnie szczepem Bucyrus, poza nieznaczną apatią i lekkim spadkiem apetytu w 2—4 dniu po challenge'u nie stwierdzano żadnych innych objawów klinicznych. Natomiast u pełowrażliwego konia nr 5 zakażonego szczepem Bucyrus już po kilku godz. zaobserwowano osowienie, utratę apetytu oraz nasilające się z dnia na dzień ogólne osłabienie. W 5 dniu choroby koń leżał i przy próbach wstawiania przewracał się. W 2 dniu pojawiła się gorączka (39,4°C), której szczyt notowano w 4—7 dniu (40,3°C, 40,2°C, 40,2°C, 40,1°C). W 5—8 dniu po zakażeniu wystąpiła biegunka. W 8 dniu w.c.c. powróciła do normy, a w 12 dniu odnotowano jej spadek (37,4°C). Przed zakończeniem doświadczenia w 12—14 dniu, poza trwającym jeszcze osłabieniem i znacznym wychudzeniem nie stwierdzano innych objawów klinicznych.

W przebiegu EVA występuje często zapalenie spojówek z silnym różowo-czerwonym zabarwieniem błon śluzowych oka. Zapaleniu spojówek towarzyszy obrzęk powiek, wyraźny łzotok, światłowstręt oraz zapalenie rogówki zarówno po naturalnym, jak i doświadczalnym zakażeniu koni (2, 4, 5, 7, 16). Biegunkę obserwowano w 13,4% przypadków naturalnie zakażonych zwierząt (2), a u zakażonych eksperymentalnie w ponad 50% przypadków (4). Jednym ze stałych i istotnych objawów EVA jest występowanie gorączki. Czas jej trwania u naturalnie zakażonych koni wynosi 5—10 dni. Szczyt gorączki utrzymuje się przez 2—5 dni, a jej wysokość waha się od 38,9°C do powyżej 41,0°C (2). Bryans i wsp. (1) badając wzrost w.c.c. u koni w wieku 6—12 m-cy zakażonych dożylnie zjadliwym szczepem Bucyrus stwierdzili jej pierwszy wzrost 12—48 godz. po infekcji. Szczyt gorączki w granicach 40,1°C—41,3°C wystąpił w 4—6 dniu. Łagodne reakcje poszczepienne, którym towarzyszy krótkotrwała gorączka, występują także u koni uodpornianych domięśniowo szczepionką „Arvac” (23). U koni immunizowanych tą szczepionką i zakażonych donosowo w 8 tyg. po szczepieniu chorobotwórczym szczepem Bucyrus, gorączkę notowano w 1—4 dniu po challenge'u, a jej szczyt wynosił 40,2°C (13).

Wyniki badań wirusologicznych przedstawiono w tab. 1.

W grupie koni zakażonych modyfikowanym szczepem Wrocław-2 wirus wykazano tylko w wydzielinie worka spojówkowego konia nr 1 i 2 w drugim dniu po infekcji. U koni 1' i 4' wszystkie próby reizolacji

wirusa z wymazów pobranych w okresie 13 dni po challenge'u chorobotwórczym szczepem Bucyrus były negatywne. U pełnowrażliwego konia nr 5 zakażonego szczepem Bucyrus siewstwo wirusa było bardzo intensywne i długotrwałe. Obecność wirusa wykazano w wymazach z worka spojówkowego, jam nosowych, jamy ustnej, napletka i odbytnicy. Na podstawie wyników prób reizolacji wirusa z leukocytów krwi obwodowej stwierdzono, że wiremia trwała u konia nr 3 — 12 dni, u koni 1 i 4 — 18 dni, u konia nr 2 — 22 dni, u konia 1' — 7 dni, u konia 4' — 10 dni, u konia nr 5 utrzymywała się do końca doświadczenia. Swoistość zmian cytopatycznych potwierdzano w IF uzyskując każdorazowo charakterystyczne świecenia immunofluorescencyjne w strefie okołojądrowej cytoplazmy i w cytoplazmie komórek RK-13 zakażonych reizolowanym wirusem.

Wirus EA może być wydalany z organizmu zakażonych koni z wydzieliną błon śluzowych nosogardzieli (2, 7, 16, 20), worka spojówkowego (2, 6, 16), w ślinie (20), moczu (7, 21), nasieniu (24) i kale (7). W leukocytach krwi obwodowej wykazano obecność zjadliwego szczepu Bucyrus jeszcze w 36 dniu po zakażeniu donosowym (7), a u koni uodpornianych żywą szczepionką EVA w 4—14 dniu po szczepieniu. Ponadto stwierdzono, że wirus szczepionkowy jest wydalany sporadycznie z wydzieliną błon śluzowych nosa oraz z kałem (8). U koni szczepionych i reinfekowanych donosowo chorobotwórczym szczepem Bucyrus w 8 tyg. po uodpornieniu, wirus izolowano z wymazów z jam nosowych przez pierwsze 6 dni, a z leukocytów krwi obwodowej w 3—8 dniu po challenge'u (13).

Dłuższy okres wirerii u koni zakażonych modyfikowanym szczepem Wrocław-2 w porównaniu do okresu jej trwania u koni szczepionych atenuowanym szczepem Bucyrus EAV mógł być spowodowany m.in. różnymi drogami wprowadzania wirusów do organizmu koni. W badaniach nad stopniem atenuacji szczepu Bucyrus autorzy amerykańscy (13) i japońscy (8) podawali wirus domięśniowo, w badaniach własnych konie zakażono dożylnie wysoką dawką wirusa.

Wartości mian przeciwciał zubożających po zakażeniu modyfikowanym szczepem Wrocław-2 oraz po zakażeniu kontrolnym chorobotwórczym szczepem Bucyrus przedstawiono w tab. 2.

Pierwotna odpowiedź humoralna na antygeny zmodyfikowanego szczepu Wrocław-2 narastała stopniowo i równomiernie. Wykrywalne koncentracje przeciwciał anti-EAV wykazano po raz pierwszy w 6—8 dniu,

Tab. 1. Wyniki prób reizolacji wirusa EA z leukocytów krwi obwodowej oraz z wymazów pobranych od koni zakażonych modyfikowanym szczepem Wrocław-2 i koni zakażonych kontrolnie chorobotwórczym szczepem Bucyrus

Nr konia	Dzień po zakażeniu modyfikowanym szczepem Wrocław-2										
	2	4	6	8	10	12	14	18	22	26—39*	41—52
1	+(1, a)	+(1)	—	+(1)	+(1)	+(1)	+(1)	+(1)	—	—	—
2	+(1, a)	+(1)	+(1)	+(1)	—	+(1)	+(1)	+(1)	+(1)	—	—
3	+(1)	+(1)	+(1)	+(1)	+(1)	+(1)	—	—	—	—	—
4	+(1)	+(1)	+(1)	—	+(1)	+(1)	+(1)	+(1)	—	—	—
Nr konia	Dzień po zakażeniu kontrolnym chorobotwórczym szczepem Bucyrus										
	2	5	7	10	13						
1'	+(1)	+(1)	+(1)	—	—						
4'	+(1)	+(1)	—	+(1)	—						
5	+(1, b)	+(1, a, b, c, d)	+(1, a, b, d, e)	+(1, a, b)	+(1, b)						

Objaśnienia: + — dodatni wynik reizolacji wirusa w hodowli RK-13 z leukocytów krwi obwodowej (1), z worka spojówkowego (a), z jam nosowych (b), z jamy ustnej (c), napletka (d), z odbytnicy (e), — — ujemny wynik reizolacji wirusa w hodowli RK-13, * — konie nr 1 i 4 zakażono kontrolnie chorobotwórczym szczepem Bucyrus w 39 dniu po uodpornieniu modyfikowanym szczepem Wrocław-2.

Tab. 2. Wartości mian przeciwciał zobojętniających anty-EAV w surowicach koni zakażonych modyfikowanym szczepem Wrocław-2 i koni zakażonych kontrolnie chorobotwórczym szczepem Bucyrus

Nr konia	Dzień po zakażeniu					
	2	4	6	8	10	12
1	—	—	1/4	1/8	1/64	1/256
2	—	—	1/2	1/8	1/128	1/256
3	—	—	1/2	1/8	1/128	1/512
4	—	—	—	1/4	1/64	1/128

Nr konia	Dzień po zakażeniu					
	14	18	22	26	31	35
1	1/512	1/512	1/256	1/256	1/128	1/256
2	1/256	1/512	1/256	1/256	1/256	1/128
3	1/256	1/512	1/256	1/128	1/256	1/128
4	1/256	1/1024	1/128	1/128	1/64	1/128

Nr konia	Dzień po zakażeniu					
	39*	41	44	46	49	52
1	1/256	—	—	—	—	—
2	1/128	1/64	1/128	1/128	1/128	1/64
3	1/128	1/64	1/128	1/128	1/128	1/128
4	1/128	—	—	—	—	—

Nr konia	Dzień po zakażeniu kontrolnym					
	2	5	7	10	13	
1'	—	1/256	1/2048	1/8192	1/32768	1/65536
4'	—	1/128	1/4096	1/16384	1/65536	1/65536
5	—	—	1/32	1/512	1/4096	1/1024

Objaśnienia: — — brak wykrywalnych koncentracji przeciwciał w odczynie SN, * — w 39 dniu po uodpornieniu modyfikowanym szczepem Wrocław-2 konie nr 1 i 4 zakażono kontrolnie chorobotwórczym szczepem Bucyrus EAV.

a ich najwyższy poziom w 14—22 dniu po uodpornieniu. Wtórna odpowiedź humoralna była wykrywalna wcześniej niż odpowiedź pierwotna i charakteryzowała się bardzo wysokim wzrostem mian przeciwciał zobojętniających.

Dynamika narastania humoralnej odpowiedzi immunologicznej oraz wartości mian przeciwciał zobojętniających w surowicach koni immunizowanych zmodyfikowanym szczepem Wrocław-2, są zbliżone do wyników uzyskanych przez innych autorów (3, 8, 13, 18, 19).

Brak wzrostu mian przeciwciał u koni 2 i 3 będących w bezpośrednim kontakcie z końmi 1' i 4' w okresie 2 tyg. po zakażeniu pełnozjadliwym wirusem EA sugeruje, że uodpornienie koni atenuowanym szczepem Wrocław-2 eliminuje wydalanie wirusa użytego do challenge'u nie tylko w ilościach wykrywalnych metodami laboratoryjnymi, lecz również w ilościach wykrywalnych *in vivo*.

Podsumowując wyniki przeprowadzonych badań można stwierdzić, że ograniczona chorobotwórczość, nieznaczne siewstwo oraz silne właściwości immunogenne modyfikowanego szczepu Wrocław-2 EAV, upoważniają do wstępnego uznania przydatności tego szczepu do profilaktyki wirusowego zapalenia tętnic koni.

Piśmiennictwo

- Bryans J. T., Doll E. R., Crowe M. E. W., McCollum W. H.: Cornell Vet. 47, 42, 1957.
- Bürki F., Gerber H.: Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 20, 391, 1966.
- Crawford T. B., Henson J. B.: Proc. III Int. Conf. Equine Infectious Diseases, Paris 1972, s. 282.
- Doll E. R., Bryans J. T., McCollum W. H., Crowe M. E. W.: Cornell Vet. 47, 3, 1957.
- Doll E. R., Knappenberger R. E., Bryans J. T.: Cornell Vet. 47, 69, 1957.
- Doll E. R., Bryans J. T., Wilson J. C., McCollum W. H.: Cornell Vet. 58, 497, 1968.

- Fukunaga Y., Wada R., Tabucki E., Akiyama Y.: Bull. Equine Res. Inst. 18, 110, 1981.
- Fukunaga Y., Wada R., Hirasawa K., Kamada M., Kumano-mido T., Akiyama Y.: Bull. Equine Res. Inst. 21, 56, 1982.
- Golnik W.: Katedra Mikrobiologii Weterynaryjnej Wydziału Weterynaryjnego, AR Wrocław 1989, dane niepubl.
- Golnik W., Michalak T.: Medycyna Wet. 10, 605, 1978.
- Golnik W., Michalska Z., Michalak T.: Schweizer Arch. Tierheilk. 123, 523, 1981.
- Golnik W., Morailon A., Golnik J.: J. vet. Med. B. 33, 413, 1985.
- Harry T. O., McCollum W. H.: Am. J. vet. Res. 42, 1501, 1981.
- Herbst W., Schliesser Th.: J. vet. Med. B. 34, 283, 1987.
- Inoue T., Yanagawa R., Shinagawa M., Akiyama Y.: Jap. J. vet. Sci. 37, 569, 1975.
- Jaksch W., Sibalin M., Taussin E., Pichler L., Bürki F.: Dt. tierärztl. Wschr. 80, 374, 1973.
- McCollum W. H.: J. Am. vet. med. Ass. 155, 318, 1969.
- McCollum W. H.: Proc. II Int. Conf. Equine Infectious Diseases, Paris 1969, s. 143.
- McCollum W. H.: Am. J. vet. Res. 47, 1931, 1986.
- McCollum W. H., Doll E. R., Wilson J. C.: Am. J. vet. Res. 23, 465, 1961.
- McCollum W. H., Prickett M. E., Bryans J. T.: Res. vet. Sci. 2, 459, 1971.
- Morailon R., Morailon A.: Recl. Méd. vét. 150, 1015, 1974.
- Timoney P. J., McCollum W. H.: Equine vet. Sci. 8, 54, 1988.
- Timoney P. J., McCollum W. H., Roberts A. W.: Proc. Am. Ass. equine Practns 32, 57, 1986.

Adres autora: dr Janusz Pawęska, ul. Wróblewskiego 25, H. A. T-18, 51-627 Wrocław

CRANWELL M. P.: Skuteczność oksytetracykliny o przedłużonym działaniu w zapobieganiu gorączce kleszczowej u cieląt. (Efficacy of long-lasting oxytetracycline for the prevention of tick-born fever in calves. Vet. Rec. 126, 334—336, 1990 (14))

Gorączka kleszczowa wywołana przez *Cytoecetes phagocytophila* przebiega bądź w formie przejściowego podwyższenia temperatury ciała i obniżonej mleczności, bądź pod postacią ciężkiego schorzenia, w przebiegu którego występują ronienia, spadek mleczności i przyrostów masy ciała. Badaniem objęto 26 cieląt w wieku 4—8 miesięcy przebywających na pastwisku, na którym urodzono pasły się cielęta chore na gorączkę kleszczową. Jedna grupa cieląt otrzymywała oksytetracyklinę o przedłużonym działaniu (terramycin LA) 7, 14, 21 i 28 dnia w dawce 20 mg/kg masy ciała im. druga grupa nie otrzymywała antybiotyku. Masa ciała zwierząt otrzymujących antybiotyk była średnio o 16 kg większa od masy ciała cieląt nie otrzymujących oksytetracykliny. W surowicach 10 z 13 cieląt (77%) z grupy nie otrzymującej antybiotyku pojawiły się przeciwciała dla *C. phagocytophila*, podczas gdy w grupie cieląt otrzymujących antybiotyk przeciwciała dla *C. phagocytophila* stwierdzono tylko u jednego (8%) cielęcia. Nie zaobserwowano różnic między obdwoma grupami w odpowiedzi immunologicznej na *B. divergens*.

G.

BOOSMAN R., MUTSAERS C. W. A. A. M., DIELMAN S. J.: Wpływ endotoksemii na układ sympatyczno-nadnerczowy bydła. (Sympatico-adrenal effects of endotoxaemia in cattle). Vet. Rec. 127, 11—14, 1990 (1))

Śródskórna iniekcja 46 µg endotoksyny *Escherichia coli* O111 B4 4 krowom w wieku 2 lata 10 miesięcy—5 lat nie wpływa na poziom kortyzolu i noradrenaliny w płazmie. Średni poziom noradrenaliny wynosił 233 ± 94 pg/ml, kortyzolu 8,3 ± 2,1 ng/ml. Natomiast po dożylniej iniekcji 75 µg endotoksyny *E. coli* następnego dnia silnie wzrosło stężenie kortyzolu, które utrzymywało się przez 7 godzin. Średnie maksymalne stężenie wynosiło 85,0 ng/ml. Stężenie noradrenaliny po iniekcji dożylniej endotoksyny wzrosło w okresie 3—15 minut osiągając średnią maksymalną wartość 1184 pg/ml. Było ono więc 12-krotnie wyższe od średniego stężenia tego hormonu w płazmie po iniekcji śródskórnej endotoksyny *E. coli*. Zwiększenie poziomu kortyzolu i noradrenaliny pod wpływem endotoksyny *E. coli* powoduje zwięźenie naczyń obwodowych, które utrzymując się przez dłuższy okres czasu może spowodować uszkodzenie tkanek kończyn w efekcie ich niedotlenienia.

G.