

WITOLD GOLNIK, JANUSZ PAWĘSKA, WIESŁAW DZIK

# Ogier potencjalnym źródłem zakażenia wirusem zapalenia tętnic koni

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

## Summary

**A stallion — a potential source of infection with infectious arteritis virus of horses**

The purpose of the work was to determine the percentage of infections with arteritis virus and the analysis of epizootiological state in the stud of horses in the Upper Silesia. In the first period of studies the percentage of mares with specific antibodies was 53.3 per cent and after 6 months it increased by 79 per cent. It was lowest in young mares aged 3—4 years. The SN titres against EAV ranged between 4—512. In most cases they fluctuated between 32—256. The titre in one stallion was 128—256 while in another one no antibodies were found at all. Sera of mares without antibodies at day of mating showed the presence of the antibodies after three weeks following mating by a stallion serologically positive; that was not observed in case of mating by a stallion serologically negative. The findings indicated that in the horses under study equine arteritis virus was transmitted through the genital system during mating and the stallion's semen was the source of infection.

Czynnik etiologiczny wirusowego zapalenia tętnic koni wyizolowano po raz pierwszy z tkanek płodu poronionego w czasie enzootii choroby w jednej ze stadnin koni rasowych okręgu Bucyrus, stan Ohio, w Stanach Zjednoczonych A. P. w 1953 r. (3). Na podstawie swoistych zmian wstecznych w warstwie środkowej tętniczek typu mięśniowego, obserwowanych u koni zakażonych doświadczalnie nowo izolowanym wirusem, przyjęto nazwę choroby — wirusowe zapalenie tętnic koni (Equine Viral Arteritis — EVA) oraz nazwę wirusa — wirus zapalenia tętnic koni (Equine Arteritis Virus — EAV) (13). Główne straty w przebiegu EVA powodowane są ronieniami płodów przez ciężarne klacze, a odsetek poronień może wynosić 40—50% (4, 8). Opisano także przypadki śmiertelne choroby u źrebiąt zakażonych naturalnie (7) oraz u koni dorosłych zakażonych eksperymentalnie (3). Badania serologiczne wykazały obecność przeciwciał przeciw wirusowi EA u koni pochodzących z wielu krajów świata (1, 2, 9, 14, 16, 21). Szerokie rozpowszechnienie zakażeń oraz nieliczne przypadki ostro przebiegających enzootii choroby sugeruje, że większość infekcji wirusem EA ma przebieg subkliniczny (11). Skutki zakażeń bezobjawowych EAV są mało poznane, m.in. powodują one osłabienie kondycji sportowej koni (10). Enzoootia ronień płodów przez ciężarne klacze zakażone naturalnie EAV była rozpoznana w Polsce po raz pierwszy w 1978 r. (6). Dotychczasowe badania EVA wykazały, że zakażenie wirusem występuje powszechnie w populacji koni rasowych w kraju (5), powodując niekiedy poronienia płodów przez ciężarne klacze (8) oraz przypadki śmiertelne u źrebiąt (7).

Jeszcze do niedawna uważano, że głównymi wrotami zakażenia wirusem EA jest układ oddechowy, a źródło wirusa stanowią aerozole zakaźne błon śluzowych nosa (17, 18). Analiza enzootii choroby, która wystąpiła w Stanach Zjednoczonych A. P. w 1984 r. oraz późniejsze badania epizootiologiczne wykazały, że infekcja wirusem EA zachodzi również poprzez kontakt płciowy (25, 27, 28). Według Timoney i wsp. (26) największe znaczenie

w rozprzestrzenianiu i utrzymaniu się wirusa w populacji koni mają ogiery — bezobjawowi siewcy wirusa z nasieniem. Okres bezobjawowego nosicielstwa i siewstwa EAV u ogierów może wahać się od kilku tygodni do kilku lat, a w niektórych przypadkach trwa do końca życia zwierząt (29). Po zakażeniu naturalnym EAV około 30—35% ogierów sieje wirus z nasieniem przez długi okres czasu (26).

Celem badań było określenie odsetka zakażeń wirusem EA u koni oraz analiza sytuacji epizootiologicznej w izolowanym, zamkniętym środowisku stadniny koni „K”.

## Materiał i metody

Badania i obserwacje przeprowadzono w trzech etapach w stadninie koni „K” zlokalizowanej na terenie Dolnego Śląska. Objęto nimi 121 koni, w tym 119 klaczy oraz 2 ogiery. Klacze, głównie rasy śląskiej oraz półkrwi angielskiej i angloarabskiej użytkowano w stadninie w celu uzyskania surowicy do produkcji gonadotropiny. Klacze podzielono na 9 grup w zależności od wieku: I — obejmowała 9 klaczy 3-letnich, II — 13 klaczy 4 l., III — 17 klaczy 5 l., IV — 13 klaczy 6 l., V — 24 klacze 7 l., VI — 17 klaczy 8 l., VII — 11 klaczy 9 l., VIII — 7 klaczy 10 l., IX — 8 klaczy 11 l. Ogiery oznaczono jako B i O. Ogier B półkrwi angloarabskiej był w wieku 19 l., a ogier O pełnej krwi angielskiej, w wieku 15 l.

W pierwszym etapie badań pobrano od klinicznie zdrowych koni surowicę w celu określenia odsetka zakażeń wirusem EA. Wykazanie u znacznego odsetka klaczy oraz jednego z ogierów (O) obecności przeciwciał zobojętniających anti-EAV nasuwało podejrzenia, że ogier ten może być źródłem zakażenia wirusem w badanej populacji koni. W drugim etapie pobierano surowicę od wszystkich klaczy krytych ogierem B i O oraz prowadzono okresową kontrolę serologiczną obu ogierów. Surowicę od klaczy pobierano trzykrotnie — w dniu stanówki, a następnie w 3 i 6 tygodniu po kryciu, natomiast od ogierów co dwa miesiące. W trzecim etapie, po upływie 12 miesięcy, pobrano próbki surowicy od wszystkich koni.

Badania serologiczne na obecność przeciwciał zobojętniających anti-EAV wykonano z użyciem odczynu seroneutralizacji (SN) według Moraillon i Moraillon (20). Antygenem stosowanym w odczynie był wzorcowy szczep Bucyrus EAV pasaż 20 w hodowli komórek nerki królika (RK-13). Podłoże to stosowano także do odczytywania wyników próby. Za miano dodatnie przyjmowano jego wartość  $\geq 4$  (12). W badaniach kontrolnych użyto odpornościowej surowicy konia zakażonego doświadczalnie szczepem Bucyrus EAV (22) oraz normalnej surowicy końskiej.

## Wyniki i omówienie

W pierwszym etapie badań odsetek klaczy wykazujących obecność przeciwciał anti-EAV wynosił ogółem 56,3% (tab. 1), a po roku wzrósł do wartości 79% (tab. 2). Był on najniższy w grupie I i II, które stanowiły klacze młode, trzy- i czteroletnie. Wartości mian przeciwciał wahały się w granicach 1:4 —  $\geq 1:512$ . W większości wypadków mieściły się one w przedziale 1:32 — 1:256. U części klaczy serologicznie dodatnich, badanych powtórnie po upływie jednego roku, notowano wzrost mian przeciwciał zobojętniających anti-EAV. W surowicy ogiera O miano przeciwciał wahało się w zakresie 1:128 — 1:256, podczas gdy u ogiera B nie wykazano obecności przeciwciał anti-EAV przez cały okres trwania doświadczeń. Wzrost liczby pozytywnych

Tab. 1. Wyniki pierwszego badania surowic klaczy stadniny koni „K” na obecność przeciwciał anti-EAV

Grupa klaczy	Wiek w latach	Liczba klaczy	Liczba surowic o mianie								Liczba klaczy serologicznie dodatnich	
			4	8	16	32	64	128	256	≥ 512		
I	3	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
II	4	13	0	0	0	1	1	2	1	0	0	5
III	5	17	1	1	1	1	4	2	3	1	1	14
IV	6	13	0	0	0	1	1	3	0	1	1	6
V	7	24	0	1	1	1	4	4	4	2	2	17
VI	8	17	1	1	0	1	2	2	1	1	1	9
VII	9	11	0	0	0	2	2	1	1	0	0	6
VIII	10	7	0	0	0	0	3	1	0	0	0	4
IX	11	8	0	1	0	0	1	3	1	0	0	6
Razem:		119	2	4	2	7	18	18	11	5		67

Tab. 2. Wyniki drugiego badania surowic klaczy stadniny koni „K” na obecność przeciwciał anti-EAV po upływie 12 miesięcy

Grupa klaczy	Wiek w latach	Liczba klaczy	Liczba surowic o mianie								Liczba klaczy serologicznie dodatnich	
			4	8	16	32	64	128	256	≥ 512		
I	4	9	0	0	0	1	0	0	1	0	0	2
II	5	13	0	0	1	3	1	2	1	1	1	9
III	6	17	0	0	1	1	4	4	5	0	0	15
IV	7	13	0	1	0	2	4	3	1	0	0	11
V	8	24	0	1	1	4	6	5	1	2	2	20
VI	9	17	0	0	0	3	2	4	2	3	3	14
VII	10	11	0	0	2	3	4	0	0	0	0	9
VIII	11	7	0	0	0	2	3	1	1	0	0	7
IX	12	8	0	0	1	2	2	0	1	1	1	7
Razem:		119	0	2	6	21	26	19	13	7		94

seroreagentów oraz wzrost mian przeciwciał u klaczy dodatnich już w pierwszym badaniu wykazuje, że w stadninie dochodziło do świeżych zakażeń lub reinfekcji wirusem. W surowicach klaczy serologicznie ujemnych w dniu stanówki po 3 tygodniach stwierdzano obecność przeciwciał anti-EAV po kryciu ogierem O (tab. 3), czego nie notowano w przypadku klaczy krytych ogierem B. Wartości mian SN 3 tygodnie po kryciu ogierem O wahały się w granicach 1:16 — 1:128, a w 6 tygodniu 1:32 — 1:512. Podobne wysokości mian przeciwciał wykazały McCollum i wsp. (19) u klaczy inseminowanych sztucznie nasieniem ogierów zakaźnym EAV. Pojawienie się przeciwciał anti-EAV w surowicach klaczy ujemnych lub wzrost ich poziomu w surowicach klaczy dodatnich w okresie 14—28 dni po kryciu, uważane jest za potwierdzenie stanu nosicielstwa i siewstwa wirusa z nasieniem u ogierów (26). W wypadku dwóch klaczy serologicznie dodatnich wykazano bardzo wyraźny wzrost mian przeciwciał po kryciu ogierem O. Może to świadczyć o tym, że naturalnie nabyta odporność nie zawsze chroni klacze przed ponownym zakażeniem wirusem obecnym w nasieniu ogiera. Przemawiają za tym także wyniki badań uzyskane w warunkach doświadczalnych (19). Brak swoistych przeciwciał w surowicy ogiera B kryjącego klacze zakażone wirusem EA sugeruje, że u klaczy nie występuje długotrwałe nosicielstwo wirusa, co potwierdzają badania innych autorów (23).

Analiza wyników zestawionych w tab. 1, 2, 3 wskazuje, że wzrost liczby klaczy zakażonych wirusem EA w 81,5% przypadków nastąpiło po kryciu ogierem O. Zdaniem autorów amerykańskich (29) u ogierów sięjących długotrwałe wirus z nasieniem, nie stwierdza się wirusa w wydzielinie układu oddechowego, w moczu oraz w krwi, co wyklucza możliwość zakażeń poziomych podczas stanówki. Rozprzestrzenianie wirusa poprzez kontakt z zakażoną odzieżą obsługi, dudki, podda, środki transportu koni, nie ma większego praktycznego zna-

Tab. 3. Wyniki badań serologicznych klaczy krytych ogierem O

Wiek w latach	Liczba klaczy	Miano SN anti-EAV		
		w dniu krycia	3 tyg. po kryciu	6 tyg. po kryciu
3	2	—	32	64—128
4	2	—	32—128	128—256
5	1	—	16	64
6	4	—	16—32	64—128
7	3	—	32—64	64—256
8	4	—	32—128	128—512
9	2	—	32	64—128
10	3	—	16—64	64—256
11	1	—	32	128
5	1	16	64	64
6	2	32—128	128	n.b.
7	1	256	512	512
8	2	64—256	64—512	128—256
11	1	128	128	n.b.

Objaśnienia: — brak wykrywalnych koncentracji przeciwciał zobojętniających anti-EAV w odczynie SN, n.b. — nie badano.

czenia (15, 23). Można sądzić, że ze względu na długi okres wirerii w przebiegu EVA (14, 22) pewną rolę w mechanicznym przenoszeniu wirusa mogą mieć lekarzkie zabiegi krwawe. Dane na temat transmisji poziomej wirusa EA wśród koni na torach wyścigowych, w stajniach i na pastwiskach są niekiedy sprzeczne. Znane są bowiem epizootie choroby, w których wykazano szerokie poziome rozprzestrzenianie się wirusa oraz takie przypadki, w których — jak można sądzić — nie miało ono większego znaczenia (25).

Według dotychczasowych obserwacji (24) u pełnowrażliwych klaczy krytych naturalnie ogierami sięjącymi wirus z nasieniem dochodzi do zakażeń bezobjawowych lub rozwija się EVA o łagodnym przebiegu. Również w badaniach własnych zarówno u klaczy krytych ogierem O, jak i u pozostałych klaczy w stadninie

nie notowano objawów klinicznych charakterystycznych dla wirusowego zapalenia tętnic koni.

Uzyskane wyniki badań pozwalają sądzić, że w badanej populacji klaczy transmisja wirusa zapalenia tętnic koni zachodziła głównie poprzez układ płciowy w czasie krycia, a źródłem zakażenia było nasienie ogiera.

#### Piśmiennictwo

1. Akashi H., Konishi S., Ogata M.: Jap. Vet. Sci. 38, 71, 1976.
2. Ceccarelli A., Agrimi P., Piragino S.: Zooprofilassi 27, 245, 1972.
3. Doll E. R., Bryans J. T., McCollum W. H., Crowe M. E.: Cornell Vet. 47, 3, 1957.
4. Doll E. R., Knappenberger R. E., Bryans J. T.: Cornell Vet. 47, 69, 1957.
5. Gólnik W.: Katedra Mikrobiologii Weterynaryjnej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej, AR Wrocław 1991, dane niepubl.
6. Gólnik W., Michalak T.: Medycyna Wet. 10, 605, 1978.
7. Gólnik W., Michalska Z., Michalak T.: Schweiz. Arch. Tierheilk. 123, 523, 1981.
8. Gólnik W., Moraillon A., Gólnik J.: J. Vet. Med. B 33, 413, 1986.
9. Herbst W., Danner K.: Dt. tierärztl. Wschr. 92, 449, 1985.
10. Herbst W., Schliesser Th.: J. Vet. Med. B 34, 283, 1987.
11. Horzinek M. C.: Non-arthropod Togaviruses. Academic Press, London 1981.
12. Hyltseth B., Peterson U.: Arch. ges. Virusforsch. 32, 337, 1970.
13. Jones T. C., Doll E. R., Bryans J. T.: Cornell Vet. 47, 52, 1957.
14. Liebermann H.: Arch. exp. Vet. Med. 42, 205, 1988.
15. Liebermann H., Kuller J., Selbitz H. J.: Mh. Vet. Med. 43, 236, 1988.
16. McCollum W. H., Bryans J. T.: Proc. 3rd Int. Equine Infectious Diseases, Paris 1972, s. 252.
17. McCollum W. H., Prickett M. E., Bryans J. T.: Res. vet. Sci. 2, 459, 1971.
18. McCollum W. H., Swerczek T. W.: J. Equine Med. Surg. 2, 293, 1978.
19. McCollum W. H., Timoney P. J., Roberts A. W., Willard J. E., Carswell G. D.: Proc. 5th Int. Equine Infectious Diseases, Lexington, Ky. 1987, s. 13.
20. Moraillon A., Moraillon R.: Anns Rech. Vét. 9, 43, 1978.
21. Noseto E. O., Etcheverrigary M. E., Oliva G. A., Gonzalez E. T., Samus S. A.: Zbl. Vet. Med. B 31, 526, 1984.
22. Paweńska J.: Badanie właściwości chorobotwórczych, immunogennych oraz siewstwa modyfikowanego szczepu Wrocław-2 wirusa zapalenia tętnic koni. Praca dokt., AR Wrocław, 1989.
23. Timoney P. J., McCollum W. H.: Proc. Am. Ass. Eq. Pract. 31, 545, 1985.
24. Timoney P. J., McCollum W. H.: Can Vet. J. 28, 693, 1987.
25. Timoney P. J., McCollum W. H.: Equine Vet. Sci. 3, 54, 1988.
26. Timoney P. J., McCollum W. H., Roberts A. W.: Proc. Am. Ass. Eq. Pract. 32, 57, 1986.
27. Timoney P. J., McCollum W. H., Roberts A. W., McDonald M. J.: J. Am. vet. med. Ass. 191, 36, 1987.
28. Timoney P. J., McCollum W. H., Roberts A. W., McDonald M. J.: Vet. Rec. 120, 282, 1987.
29. Timoney P. J., McCollum W. H., Murphy T. W., Roberts A. W., Willard J. G., Carswell G. D.: J. Reprod. Fert. Suppl. 35, 95, 1987.

Adres autora: doc. dr hab. Witold Gólnik, ul. 1 Dywizji, 51-627 Wrocław

ZYGMUNT PEJSAK, ANDRZEJ LIPOWSKI, IWONA MARKOWSKA,  
ADAM DZIERŻAWSKI, ANNA MOKRZYCKA

## Immunogenność i skuteczność atenuowanej szczepionki Cellpest przeciw pomorowi klasycznemu świń

Zakład Badania Chorób Świń Instytutu Weterynarii, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

### Summary

**Immunogenicity and safety of the new attenuated Cellpest vaccine against classical swine fever**

The attenuated classical swine fever virus (CSFV) strain has been chosen for adaptation of CSFV to tissue culture. The PK-15A line of pig kidney cell culture was used for multiplication of the vaccine virus. The cell line was cultivated according to generally accepted methods with addition of 5% calf serum absolutely free from antibodies to BVDV. The titre of noncytopathic vaccine CSFV was determined by the Peroxidase Linked Antibody Assay (PLA) and it amounted to  $10^{4.5}$  TCID<sub>50</sub>. The best parameters for multiplication of the chosen virus strain were determined with relation to the stationary and roller cultures. The highest titre of vaccine virus  $10^{8.00}$  TCID<sub>50</sub> was obtained by infection of freshly trypsinized cells in Legroux flask with a dose of  $10^5$  TCID<sub>50</sub> and their incubation at 37°C for 96 hours. Infection of the roller culture of PK-15A cell line with the same virus dose resulted in a titre of TCID<sub>50</sub> =  $10^{8.75}$ . Taking into consideration these results, 6 batches of attenuated tissue vaccine against CSF were prepared in the roller culture of PK-15A cell line. It has been shown that new attenuated „Cellpest” vaccine against CSF, produced in roller culture of PK-15A cell line, has the same properties of safety and immunogenicity as lapinized vaccine.

Od ponad trzydziestu lat w profilaktyce klasycznego pomoru świń (CSF) wykorzystuje się w Polsce z bardzo dobrymi efektami szczepionkę Lapest, opartą na lapinizowanym chińskim szczepie wirusa tej choroby (9, 12). Źródłem antygenu szczepionkowego są w tym preparacie śledziony oraz krew królików zakażonych wymienionym szczepem wirusa.

Wystąpienie krwotocznej bronchopneumonii królików (viral hemorrhagic disease FHD) w Polsce w 1988 roku

oraz szybkie jej rozprzestrzenienie (5), a także utrzymywanie się enzoptycznych ognisk myksomatozy (7) ograniczyło, a w niektórych okresach wręcz paraliżowało rytmiczną produkcję szczepionki Lapest. W tej sytuacji zaistniała konieczność zintensyfikowania badań nad opracowaniem nowej szczepionki przeciw pomorowi świń, do wytwarzania której nie są potrzebne króliki. Biopreparaty tego typu są produkowane i z powodzeniem stosowane w wielu krajach (1, 2, 3, 14). Celem prezentowanej pracy było przygotowanie atenuowanej szczepionki przeciw pomorowi świń oraz ocena jej nieszkodliwości i właściwości immunogennych w badaniach laboratoryjnych i terenowych.

### Material i metody

**Szczep wirusowy.** Do sporządzenia szczepionki, dla której przyjęto nazwę Cellpest, użyto atenuowanego szczepu wirusa pomoru (CSFV) wyizolowanego z komercyjnie produkowanej w Europie żywej szczepionki przeciw CSF. Atenuacji szczepu dokonano (1) poprzez 161 pasażów amerykańskiego zjadliwego szczepu wirusa pomoru PAV-1 w hodowli komórek linii ciągłej nerki świni PK-15. Dla potrzeb własnych uzyskany szczep oznaczono jako KPS-87.

**Hodowla komórkowa.** Do namnażania wirusa szczepionkowego użyto linii ciągłej komórek nerki świni PK-15A kultywowanej wg ogólnie przyjętych zasad. Jako płynu wzrostowego używano podłoża Eagle'a z dodatkiem 5% surowicy cielęcej wolnej od przeciwciał dla wirusa biegunki i choroby błon śluzowych bydła (BVDV).

Przygotowanie szczepionki. Po określeniu przy pomocy testu PLA — peroxidase linked antigen assay (8) miana TCID<sub>50</sub> ożywionego szczepu KPS-87, zakażono nim świeżo odtrypsynowane komórki PK-15A w ilości 1 TCID<sub>50</sub>/1 komórkę. Butelki Legroux z zakażoną hodowlą inkubowano w 37°C przez 96 h; po tym czasie hodowlę 3-krotnie zamrażano i rozmrażano. Doświadczalne serie szczepionki Cellpest produkowano, infekując namnożone w warunkach hodowli rotacyjnej — w butelkach typ NBS a 250 ml — komórki linii PK-15A. Inokulum dla jednej butelki NBS