Badane drobnoustroje, namnażane w podłożu Eagle'a bez dodatku antybiotyków, niszczyły komórki linii CC81 po 48 godz. Nie rozcieńczone przesącze hodowli bulionowej pozbawione bakterii przez wirowanie i sączenie przez filtr Millipore 0,45 µm były również toksyczne dla jednowarstwowej hodowli komórek linii CC 81. Po 72 godz. następowała całkowita destrukcja hodowli komórkowej, co dowodziło obecności w hodowli substancji toksycznej, nie związanej ze ścianą komórkową listerii (ryc. 1, 2). Komórki linii Vero, przetrzymywane w takich samych warunkach, okazały się oporne na zakażenie i nie wykazywały zmian degeneracyjnych (ryc. 3). Kontrolne hodowle komórek badanych linii, po inokulacji wyizolowanymi szczepami i przetrzymywane w środowisku z antybiotykami (penicylina 100 j, streptomycyna 100 µg/ml) nie wykazywały zmian zwyrodnieniowych. U świnek, którym podano dospojówkowo zawiesinę hodowli komórek listerii stwierdzono ostry stan zapalny spojówek (ryc. 4, 5), a w wysięku ropnym obserwowano monocyty i pałeczki gram-dodatnie. Myszki białe zakażone podskórnie lub dootrzewnowo zawiesiną tkanki śledzionowej od padłych lisiąt ginęły po 2-4 dniach po infekcji. Badaniem na antybiotykooporność – *in vitro* – stwierdzono, że szczepy te były wrażliwe na penicylinę (+++), ampicylinę (+++), erytromycynę (+++), karbenicylinę (+++), rymfapicynę (+++), cefalotynę (+++), oksytetracyklinę (++), gentamycynę (++) oraz w nieznacznym stopniu na neomycynę (+).

Na podstawie przeprowadzonych badań laboratoryjnych należy przyjąć, że przyczyną niepłodności samic oraz padnięć u nowo narodzonych lisiąt było zakażenie szczepem *L. monocytogenes*. Różnił się on od szczepów typowych brakiem wytwarzania alfa mannozydazy oraz indukowaniem szerokiej strefy hemolizy typu beta. Kliniczny przebieg choroby był podobny do procesu obserwowanego u trzody chlewnej (11, 12) i bydła (1).

Należy zaznaczyć, że oprócz *L. monocytogenes* również *L. ivanovii* może wywoływać ronienia u zwierząt. Alexander i wsp. (1), wykonując badania u 243 poronionych płodów bydlęcych, wyizolowali jeden szczep *L. monocytogenes*, a 4 szczepy *L. ivanovii*. Fakt ten świadczy, że przy diagnozowaniu ronień na tle listeriozy należy również uwzględniać jako możliwy czynnik choroby *L. ivanovii*. Pozostałe gatunki tego rodzaju są zwykle apatogenne, mogą jednak sporadycznie także wywoływać schorzenia u ludzi i zwierząt (3, 9).

Piśmiennictwo

1. *Alexander A. V., Walker R. L., Johnson B. F., Charlton B. R., Woods L. W.*: J. Am. vet. med. Ass. 200, 711, 1992.
2. *Burn C. G.*: Proc. Soc. exp. Biol., N.Y. 31, 1095, 1935; L. Bact. 30, 573, 1935.
3. *Busch L. A.*: J. Infect. Dis. 123, 328, 1971.
4. *Dennis S. M.*: Aust. vet. J. 51, 75, 1975.
5. *Elischerova K., Capkova E., Urgeova E., Lysy J., Sesevickova A.*: Ceskoslov. Epidem. Mikrob. Immunol. 39, 228, 1990.
6. *Gill D. A.*: Vet. J. 89, 258, 1933; Aust. vet. J. 13, 46, 1937.
7. *Gibson H. J.*: J. Path. Bact. 41, 239, 1935.
8. *Gray M. L., Killinger A. H.*: Bacteriol. Rev. 30, 309, 1966.
9. *Ivanov J., Massalaski N.*: Problems of listeriosis Wyd. Ivanov I., National Agroindustrial Union, Sofia, 1979, s. 245-263.
10. *Jones F. S., Little R. B.*: Arch. Path. 18, 580, 1934.
11. *Lopez A., Bildfell R.*: Canad. Vet. J. 30, 10, 828, 1989.
12. *Lopez A., Bildfell R., Long R.*: Canad. Vet. J. 30, 350, 1989.
13. *Louria D. B. i in.*: Ann. Intern. Med. 67, 261, 1967.
14. *Nieman R. E., Lorber B.*: Rev. Infect. Dis. 2, 207, 1980.
15. *Paterson J. S.*: Vet. Rec. 51, 873, 1939.
16. *Seeliger H. P. R.*: Z. Hyg. Infekt. Kr. 139, 389, 1954.
17. *Seeliger H. P. R., Emmerling P., Emmerling H.*: Dt. med. Wschr. 93, 2037, 1968.
18. *Topley and Wilson's*: Principles of Bacteriology, Virology and Immunity. 2, 1718, 1975, 6 wyd. E. Arnold (GB).

Adres autora: prof. dr hab. Janusz Wawrzkiewicz, ul. B. Chrobrego 1/19, 20-611 Lublin

WITOLD GOLNIK, JAROSŁAW CIERPISZ

Próby użytkowania ogierów czołowych zakażonych spontanicznie wirusem zapalenia tętnic koni

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

Summary

Attempts of using stallions naturally infected with Equine arteritis virus in reproduction

The objective of the studies was to check both in vitro and vivo the use in reproduction of convalescent stallions of semen free from the Equine arteritis virus (EAV). The examinations were done on 92 stallions from the stud K in which sera of 83.2% of animals were free from antibodies to EAV. Three stallions used for mating in 1993 were seropositive. Attempts to isolate the EAV from semen were performed on RK-13 and Vero cell cultures. From the semen of one stallion a virus identified as AEV by the direct immunofluorescence test was isolated. As for the two remaining convalescent stallions with negative results of the laboratory test for EAV, semen was examined for the EAV transfer on four fully susceptible mares. Convalescent stallions non-disseminating the virus were used for mating 53 serum negative mares. During a mating period mares were healthy and became free of neutralizing anti-AEV antibodies. A prerequisite to the use of seronegative EAV stallions for covering should be laboratory examinations of their semen and confirmation of negative results of semen examinations by a biological test.

Największe straty w przebiegu wirusowego zapalenia tętnic koni (Equine Viral Arteritis-EVA) powodowane są ronieniami oraz resorpcją płodów przez ciężarne klacze (1, 6). W infekcjach naturalnych wirusem zapalenia tętnic koni (Equine Arteritis Virus-EAV) odsetek poronień może dotyczyć 40--50% zakażonych klaczy (1, 4). Wyniki badań serologicznych wskazują na powszechne występowanie zakażeń wirusem EA u koni w wielu krajach na wszystkich kontynentach (1, 2,

10). Oprócz poronień płodów, choroba wywołuje znaczne straty wśród nowo narodzonych źrebiąt, a niekiedy także wśród źrebiąt starszych (3). Zakażenie wirusem EA następuje tak przez układ oddechowy, jak i kontakt płciowy (5, 9, 11, 12, 13). Największe znaczenie w utrzymywaniu się wirusa w populacji koni oraz w rozprzestrzenianiu się choroby odgrywają ogiery-ozdrowieńcy będące często bezobjawowymi nosicielami i siewcami EAV z nasieniem. Stan ten może trwać u ogierów od kilku tygodni do kilku lat po zakażeniu, a w pewnych przypadkach do końca życia konia (10). Stwierdzono również, że po zakażeniu naturalnym EAV 30-35% ogierów-ozdrowieńców pozostaje długotrwałymi siewcami wirusa z nasieniem, a jego transmisja podczas krycia klaczy pełnowrażliwych dochodzi do 100% (13). Ponieważ nie wszystkie ogiery-ozdrowieńcy pozostają siewcami wirusa, celem badań było opracowanie metod pozwalających na ewentualne wykluczenie siewstwa wirusa EA z nasieniem.

Materiał i metody

Badania przeprowadzone w stadninie koni K., zlokalizowanej w południowo-wschodniej części kraju. W stadninie tej znajdowały się 92 konie, w tym 3 ogiery czołowe przeznaczone do rozpłodu w 1993 r. Ogiery te oznaczono jako D, F i G.

W styczniu 1993 r. przeprowadzono pierwszy etap badań, których celem było określenie odsetka zakażeń wirusem EA u koni. Wykonano badanie serologiczne na obecność przeciwciał zobojętniających w surowicy krwi, stosując mikrometodę wg Moraillon i Moraillon (8). Antygenem użytym w odczynie zobojętniania wirusa (Virus Neutralization-VN test) był wzorcowy szczep amerykański Bucyrus, pasażowany 20-krotnie w hodowli komórek nerki królika (RK-13). Wiązanie antygenu z przeciwciałem prowadzono w obecności 5% dopełniacza świnki morskiej, a wynik próby odczytywano w hodowlach komórek RK-13. Za miano dodatnie przyjmowano rozcieńczenie surowicy 1:4 lub powyżej, hamujące działanie cytopatyczne wirusa w dawce 100 $TCID_{50}$ w 25 mikrolitrach. Badanie każdej surowicy powtarzano dwukrotnie w obecności układu kontrolnego.

Drugi etap badań polegał na próbie izolacji wirusa EA z nasienia ogierów, u których stwierdzono w surowicy przeciwciała anty-EAV. Wykonano go w hodowlach komórkowych nerki królika RK-13 pasaż niski (p. 98) i pasaż wysoki (p. 168) oraz nerki małpy Vero pasaż 179. Hodowle komórkowe prowadzone były w naczyniach polistyrenowych firmy Corning i utrzymywane w płynie MEM Eagle'a z 1% dodatkiem surowicy płodu bydlęcego (BFS firmy Sigma) oraz antybiotyków: 200 j.m. penicyliny/ml, 200 µm streptomycyny/ml, 10 µm amfoterycyny B/ml. Do tak przygotowanej hodowli wlewano po 0,2 ml nasienia badanych ogierów, rozcieńczonego w stosunku 1:20 w MEM. Naczynia przetrzymywano w termostacie z dopływem CO_2 w temp. 37°C i codziennie oglądano pod mikroskopem na obecność zmian cytopatycznych (CPE). Badany materiał pasażowano co 5 dni, przenosząc po 0,2 ml płynu znad hodowli do nowych naczyń z hodowlą komórkową. W etapie trzecim przeprowadzono próbę biologiczną mającą na celu kontrolę wyników uzyskanych w laboratorium. Ogiery, od których nie izolowano *in vitro* wirusa z nasienia, kryły pełnowrażliwe klacze. Dla każdego z nich wybrano po dwie klacze wolne od przeciwciał anty-EAV, które zostały pokryte każda 4 razy (dwa razy dziennie przez dwa kolejne dni). Po upływie 3 tygodni od ostatniego krycia, klacze te ponownie przebadano serologicznie na obecność przeciwciał anty-EAV. Ogiera, od którego izolowano w laboratorium wirus EA z jego nasienia, nie używano do krycia.

Wyniki i omówienie

W badaniu serologicznym klaczy przeznaczonych do stanowienia i opisanym jako etap pierwszy wykazano, że 83,2% zwierząt wolnych było od obecności przeciwciał anty-EAV w surowicy krwi. Ogiery D, F i G, które miały być używane do rozpłodu okazały się serologicznie dodatnie. W badaniu ich nasienia *in vitro* w celu izolacji wirusa EA stwierdzono, że po IV pasażu wystąpił CPE w hodowlach inokulowanych nasieniem ogiera F. Zmiany cytopatyczne polegały na zaokrąglaniu się komórek, układaniu się ich w różnej wielkości gronka, po czym następowała liza hodowli i odpadanie jej od dna naczynia. Zmiany te powtarzały się w kolejnych pasażach i dotyczyły tylko hodowli zakażonych nasieniem ogiera F. Izolowany wirus został zidentyfikowany w odczynie immunofluorescencji bezpośredniej jako wirus zapalenia tętnic koni. Przeprowadzona próba biologiczna dała wynik zgodny z uzyskanym w laboratorium. Cztery pełnowrażliwe klacze kryte ogierami D i G zostały ponownie przebadane serologicznie po upływie 3 tygodni od zakończenia krycia i nie wykazano w ich surowicy swoistych przeciwciał anty-EAV. Pozwala to sądzić, że klacze te nie uległy zakażeniu wirusowemu. Ze stanowienia wyłączono ogiera F, używając dalej ogiery D i G. Były one wykorzystywane do rozpłodu przez następne 2 miesiące, w czasie których nie zanotowano ani jednego przypadku mogącego klinicznie sugerować EVA. Po upływie tego czasu sprawdzono serologicznie 53 klacze kryte ogierami D i G i stwierdzono we wszystkich przypadkach wynik ujemny.

Uzyskane dane sugerują, że istnieje możliwość wykorzystania do rozpłodu ogierów EVA-dodatnich w przypadku braku izolacji wirusa EA z ich nasienia. Zdaniem Klingeborna próba izolacji w hodowli komórkowej jest bardzo dobrą metodą wykrywania wirusa EA z nasienia, przewyższającą czułością PCR (7). Ogiery-ozdrowieńcy mogą kryć nie tylko klacze, u których stwierdzono w surowicy przeciwciała zobojętniające anty-EAV. Warunkiem tego jest jednak dokładne przebadanie ich nasienia w laboratorium i potwierdzenie braku siewstwa wirusa zapalenia tętnic koni w próbie biologicznej.

Piśmiennictwo

1. *Doll E. R., Bryans J. T., McCollum W. H., Crowe M. E.*: Cornell Vet. 47, 3, 1957.
2. *Golnik W.*: Katedra Mikrobiologii Wet. Wydz. Med. Wet. AR Wrocław, 1991 (dane niepublikowane).
3. *Golnik W., Michalska Z., Michalak T.*: Schweiz. Arch. Tierheilk. 123, 523, 1981.
4. *Golnik W., Moraillon A., Golnik J.*: J. Vet. Med B 33, 413, 1986.
5. *Golnik W., Pawęska J., Dzik W.*: Medycyna Wet. 47, 459, 1991.
6. *Golnik W., Tischner M., Cierpisz J., Mazur M., Kuchejda M., Kuchejda B.*: Proc. VIIth Internat. Conf. on Equine Infectious Diseases. Tokyo 1994 (w druku).
7. *Klingeborn B., Ballagi-Pordony A., Belak S.*: Proc. 2nd Congress Europ. soc. Vet. Virology, Uppsala, 1991, s. 157.
8. *Moraillon A., Moraillon R.*: Annls Rech. Vet. 9, 43, 1978.
9. *Timoney P. J., Mc Collum W. H.*: Equine Vet. Sci. 8, 54, 1988.
10. *Timoney P. J., Mc Collum W. H., Murphy T. W., Roberts A. W., Willard J., Carswell G. D.*: J. Reprod. Fert. Suppl. 35, 95, 1987.
11. *Timoney P. J., Mc Collum W. H., Roberts A. W., Mc Donald M. J.*: Vet. Rec. 120, 282, 1987.
12. *Timoney P. J., Mc Collum W. H., Roberts A. W., Mc Donald M. J.*: J. Am. vet. med. Ass. 191, 36, 191.
13. *Timoney P. J., Mc Collum W. H., Roberts A. W.*: Proc. Am. Ass. Eq. Pract. 32, 57, 1986.

Adres autora: prof. dr hab. Witold Golnik, ul. I Dywizji 23, 51-627 Wrocław