

# Przypadki choroby krwotocznej zajęcy w hodowli kwaterowej – próby profilaktyki

BARBARA MAJER-DZIEDZIC, JAN BUCZEK\*, ROMAN DZIEDZIC\*\*, JERZY ZIĘTEK

Zakład Mikrobiologii Weterynaryjnej Instytutu Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

\*Zakład Mikrobiologii Uniwersytetu w Białymstoku, ul. Świerkowa 20, 15-950 Białystok

\*\*Katedra Ekologii i Hodowli Zwierząt Łownych Wydziału Biologii i Hodowli Zwierząt AR, ul. Akademicka 13, 20-950 Lublin

Majer-Dziedzic B., Buczek J., Dziedzic R., Ziętek J.

## Viral hemorrhage disease in hares (European Brown Hare Syndrome) in breeding farms – prophylactic measures

### Summary

The viral etiology of the disease was established on the basis of virological, anatomopathological, and bacteriological examinations. The isolated aetiological agent of the European Brown Hare Syndrome virus (EBHS; Caliciviridae, Logovirus) was used to produce its own vaccine against EBHS. The vaccine was used to immunize 82 hares and eliminated the mortality rate of EBHS infected hares under controlled conditions. The study confirmed the minor pathogenicity of the EBHS virus for rabbits and indicated the presence of cross-immune reactions between the EBHS and RHD viruses.

**Keywords:** EBHS virus, hares, vaccination

Występujące od 1980 r. w wielu krajach Europy przypadki masowych padnięć zajęcia szaraka rozpoznano w następnych latach jako zakażenie wirusowe, analogiczne do zdiagnozowanej wcześniej u królików wirusowej choroby krwotocznej RHD (Rabbit Haemorrhagic Disease) (3, 10, 12). Czynnikiem etiologicznym obserwowanych przypadków okazał się pokrewny antygenowo wirus z rodziny *Caliciviridae* rodzaju *Lagovirus* (1, 7, 15, 22, 24). Chorobotwórczy dla zajęcia szaraka zarazek, znany w piśmiennictwie jako wirus EBHS (European Brown Hare Syndrome – wirus choroby krwotocznej zajęcy), podobnie jak wirus RHD, posiada jednołańcuchowy RNA (ssRNA) oraz nagi kapsyd wielkości około 30-38 nm zbudowany z 32 kapsomerów. Zarazek jest replikowany w cytoplazmie i uwalnia się z komórek drogą lizy (2, 19).

Wirus EBHS jest patogenny dla zajęcy z gatunku *Lepus europeus* i *Lepus timidus*. Do zakażenia dochodzi drogą alimentarną, kropelkową przez układ oddechowy i spojówki oraz przez uszkodzoną skórę. Choroba charakteryzuje się nadoстрыm i ostrym przebiegiem oraz gwałtownymi padnięciami (do 24 godzin), które obejmują od 90% do 100% zakażonych zwierząt (3, 23). Klinicznie postać ostra cechuje się gorączką (powyżej 41°C), trudnościami w oddychaniu, drgawkami oraz niedowładem kończyn tylnych. Do charakterystycznych zmian anatomopatologicznych

należą: duża wybroczynowość w narządach wewnętrznych, obrzęk śledziony, nerek, a także zwyrodnienie wątroby (9, 12, 17).

Brak odpowiedniego systemu komórkowego *in vitro* do izolacji wirusów EBHS i RHD utrudnia (szczególnie w stosunku do wirusa EBHS) szybki postęp badań dotyczących zarazka i opracowanie skutecznych metod profilaktyki. W diagnostyce laboratoryjnej testy HA, ELISA i PCR znalazły zastosowanie w identyfikacji antygenów wirusowych w wątrobie, śledzionie i nerkach. Duża koncentracja antygenów wirusa RHD w wątrobie pozwoliła na przygotowanie dla królików skutecznej szczepionki (6).

Problem ten nie został dotychczas rozwiązany w stosunku do zakażeń wirusem EBHS. Spadek populacji zajęcia szaraka, także na skutek tych zakażeń, zaobserwowany w Europie w końcu lat 70. trwa do chwili obecnej. W Polsce z 3 milionów zajęcy w latach siedemdziesiątych do 2001 r. zostało około 450 tysięcy sztuk (5). W 2004 r. pojawiły się wnioski o objęcie zajęcia szaraka ochroną gatunkową, a jednym ze sposobów na odnowę stad są hodowle zamknięte, w tym kwaterowa.

Celem badań było rozpoznanie przyczyny padnięć zajęcy z hodowli kwaterowej oraz próba profilaktyki poprzez immunizację stada szczepionką własną, przygotowaną we własnym zakresie z pozyskanego do badań materiału.



Ryc. 1. Zające padłe w wyniku zakażenia wirusem EBHS

### Materiał i metody

Materiał do badań pochodził z fermy kwaterowej prowadzonej na 20 ha ogrodzonego terenu. Stado podstawowe w liczbie 60 zróżnicowanych wiekowo zajęcy o strukturze płci 1 : 1,7 (samce–samice) pozyskano z odłowów styczniowych. Pierwsze gwałtowne zejścia śmiertelne bez widocznych uprzednio objawów chorobowych miały miejsce w miesiącach wczesnowiosennych (marzec–kwiecień). Dotyczyły one zarówno zwierząt dorosłych, jak i przychowku (ryc. 1).

**Badanie anatomopatologiczne.** Sekcje kilkunastu zajęcy przeprowadzono według powszechnie przyjętych zasad, dokumentując obserwowane zmiany zapisem fotograficznym (ryc. 2-4). Jednocześnie pobrano materiał (wy-

cinki płuc, wątroby, śledziony, nerek) do badań laboratoryjnych.

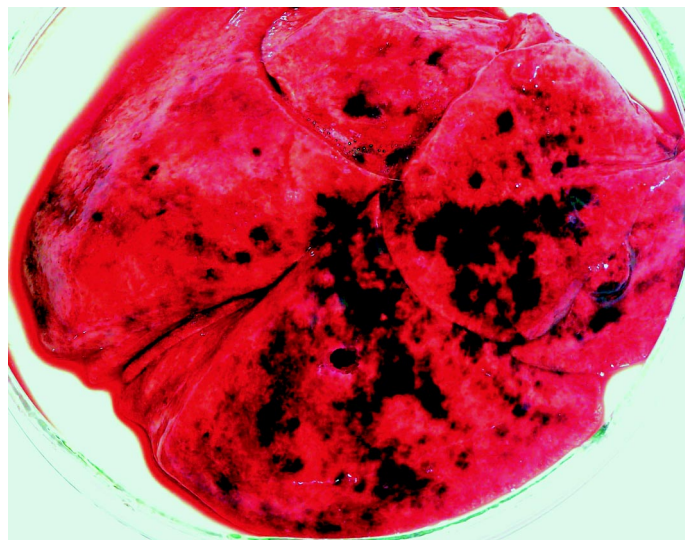
**Badanie bakteriologiczne.** Wszystkie próbki pobranych narządów wysiano na agar z krwią, podłoże McConkeya, podłoże Sabourauda i inkubowano w temp. 37°C, w warunkach tlenowych 24-48 godzin.

**Badanie wirusologiczne.** Próbki narządów mięszo- wych (wątroba, śledziona, płuca) przebadano w mikroskopie elektronowym Tesla BS-500. Utrwalony czterotlenkiem osmu materiał barwiono negatywnie octanem uranylu wg rutynowej techniki badań.

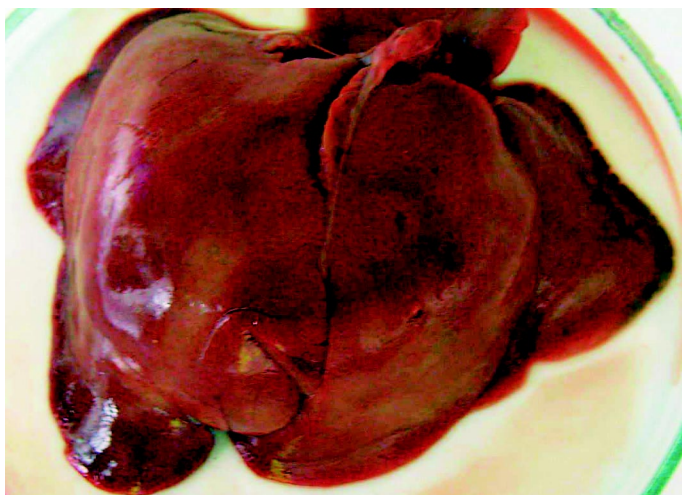
**Odczyn hemaglutynacji (HA).** Odczyn wykonywano zgodnie z procedurą opisaną dla wirusa RHD, stosując krwinki ludzkie grupy 0. Do badań przygotowano 10% homogenizaty w PBS z wątroby, płuc, śledziony oraz nerek wszystkich poddanych sekcji zajęcy (8).

**Odczyn hamowania hemaglutynacji (HI).** Badanie miana przeciwciał w surowicach królików wykonywano standardowym odczynem HI podanym w podręczniku Larskiego (14).

**Próba biologiczna.** Cztery króliki rasy mieszanej w wieku około 2 miesięcy zakażano 10% homogenizatem wątro-



Ryc. 2. Wybroczyny w płucach zająca zakażonego wirusem EBHS



Ryc. 3. Wątroba zająca zakażonego wirusem EBHS



Ryc. 4. Śledziona zająca zakażonego wirusem EBHS

by padłych zajęcy (miano HA wirusa 256) 1 ml podskórnice (2 zwierzęta) i 1 ml domięśniowo (2 zwierzęta). Po 14 dniach zwierzętom podano podskórnice 1 ml wirusa RHD (miano HA 5120). Po kolejnych 7 dniach pobierano krew i zbadano miano przeciwciał hamujących hemaglutynację (HI) w stosunku do wirusa RHD i EBHS.

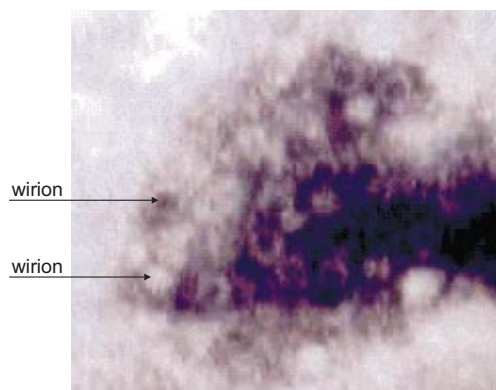
**Przygotowanie szczepionki produkcji własnej.** Szczepionkę przygotowano z wątroby padłych zajęcy według metody podanej przez Fitznera dla szczepionki RHD (6). 10% homogenizaty z wątroby, reagujące dodatnio w odczynie HA, inaktywowano formaliną i przetrzymywano w 37°C przez 24 h, często mieszając. Po sprawdzeniu na jałowość (posiewy na podłoża bakteriologiczne, inkubacja w 37°C w warunkach tlenowych i beztlenowych) oraz toksyczność (próba na myszach), szczepionkę przekazano do stosowania.

**Immunizacja królików.** Do badań użyto 10 królików 2-miesięcznych o masie ciała ok. 2 kg, którym podano podskórnice (5 zwierząt) i domięśniowo (5 zwierząt) po 1 ml przygotowanego preparatu. Po 7, 14 i 21 dniach pobierano krew z żyły brzeżnej ucha, oddzielano surowicę i badano je na obecność przeciwciał HI w stosunku do wirusa EBHS.

**Badanie odporności krzyżowej wirusów RHD-EBHS.** W celu zbadania skuteczności ochronnej szczepionki w odniesieniu do wirusa RHD, 3 króliki immunizowano podskórnice. W 14. dniu po podaniu preparatu zwierzęta zakażano podskórnice 1 ml wirusa RHD o mianie HA 5120. Po 7 dniach pobierano krew i w surowicach określono poziom przeciwciał odczynem HI.

### Wyniki i omówienie

U wszystkich sekcjonowanych zajęcy stwierdzono charakterystyczne zmiany w narządach mięsnych. Występował obrzęk, wybroczynowość i drobne ogniska martwicowe, szczególnie w wątrobie (ryc. 3). Stan ten wskazywał na nadostry przebieg zakażenia, co potwierdzały gwałtowne padnięcia zwierząt (do 24 godzin). Podobny typ zmian opisano jako charakterystyczny dla krwotocznej choroby zajęcy (EBHS) (9, 12, 17). Zbliżone symptomy kliniczne oraz zmiany anatomopatologiczne towarzyszą chorobie krwotocznej królików (RHD). Autorzy tłumaczą to ścisłym pokrewieństwem antygenowym między wirusami wywołującymi



Ryc. 5. Obraz elektronomikroskopowy wątroby zajęcy zakażonej wirusem EBHS – widoczne wiriony – powiększenie około 100 000

jącymi wymienione jednostki kliniczne (1, 3, 15, 22, 24). Potwierdzenie wirusowego procesu chorobowego w badanych przypadkach uzyskano także na podstawie negatywnego wyniku badań bakteriologicznych i mikologicznych. Jednocześnie badania w mikroskopie elektronowym wykazały obecność nieosłoniętych sferycznych wirionów średnicy ok. 35 nm, charakterystycznych dla wirusów rodziny *Caliciviridae* z rodzaju *Lagovirus* (ryc. 5) (2, 19). Próba biologiczna wykonana na królikach zakażonych homogenizatem wątroby padłych zajęcy spowodowała wystąpienie (po 48 godz. od zakażenia) objawów ogólnych (osowiałość, brak apetytu, wzmożone pragnienie). Symptomy te ustąpiły samoistnie po 2 dniach. Po wykonaniu próby challenge wirusem RHD zwierzęta nie wykazywały żadnych objawów chorobowych, a w ich surowicach miano przeciwciał HI w odniesieniu do wirusa EBHS wynosiło 160, a w odniesieniu do wirusa RHD 1260 (tab. 1). Zakażone jednocześnie wirusem RHD króliki kontrolne padły po 48 godz. wśród typowych objawów posocznicy krwotocznej. Króliki immunizowane szczepionką własną i zakażone wirusem RHD również nie zachorowały, uzyskując w surowicy podobny poziom przeciwciał (tab. 2). Wielu autorów (1, 11, 13) podaje, że doświadczalne próby krzyżowego zakażenia królików i zajęcy heterogennym wirusem nie wywoływały choroby. Badania własne potwierdzają małą patogenność wirusa EBHS dla królików, ale jednocześnie wskazują na występowanie odporności krzyżowej między tymi zarazkami (tab. 1, 2). Spostrzeżenia te zgodne są z wynikami badań Morrise (18), Di Modugno (4) czy Nardellego (20). Z kolei inni autorzy (1, 3, 16, 21) uważają, że wirusy EBHS i RHD nie wykazują krzyżowej ochrony po immunizacji zwierząt. Przypuszczać można, że te rozbieżne wyniki badań mogą być spowodowane różnicami w immunogenności izolowanych zarazków. W odczynie hema-

Tab. 1. Miano przeciwciał HI w surowicy królików zakażonych homogenizatem z wątroby padłych zajęcy, po dawce challenge wirusem RHD

Wariant zakażenia	Czas w dniach		
	0	14	14 dni po challenge
Podskórne	< 5	80	160* 1260**
Domięśniowe	< 5	80	160* 1260**

Objaśnienia: \* wartości średnie w odniesieniu do wirusa EBHS; \*\* wartości średnie w odniesieniu do wirusa RHD

Tab. 2. Miano przeciwciał HI w surowicy królików szczepionych, po dawce challenge wirusem RHD

Króliki	Czas w dniach		
	0	14	7 dni po challenge
3	< 5	160*	160* 1260**

Objaśnienia: \* jak w tab. 1.

**Tab. 3. Miano HA wirusa w homogenizatach narządów padłych zajęcy**

Liczba zajęcy	Miano HA wirusa w 10% homogenizacie narządu			
	wątroba	płuca	śledziona	nerki
3	256	32	128	128
2	128	32	64	64
5	256	64	128	64
4	128	32	64	64

**Tab. 4. Miano przeciwciał HI w surowicy szczepionych królików**

Wariant immunizacji	Miano HI w dniach po szczepieniu			
	0***	7	14	21
1*	< 5	40	160	160
2**	< 5	40	160	160

Objaśnienie: \* podano średnie wartości uzyskane od 5 królików po szczepieniu podskórnym; \*\* podano średnie wartości uzyskane od 5 królików po szczepieniu domięśniowym; \*\*\* próba zero-wa wykonana przed szczepieniem

glutynacji z homogenizatami narządów mięsnych poszczególnych zajęcy najwyższe miano HA obserwowano w materiale z wątroby (miano 256), a następnie ze śledziony, nerek (miano 128) oraz płuc (miano 64) (tab. 3). Najwyższa koncentracja wirusa w wątrobie pozwoliła na użycie tego materiału do przygotowania inaktywowanej szczepionki przygotowanej we własnym zakresie. Immunogenność preparatu sprawdzano na królikach, określając miano przeciwciał HI. Droga podania szczepionki (podskórna lub domięśniowa) nie wywierała wpływu na wysokość miana badanych przeciwciał, a ich wartości nie przekraczały 160 (tab. 4).

Przygotowaną szczepionkę, jako preparat własny, podano w formie iniekcji podskórnej (dawka 1 ml) 82 zajęcom. Zabieg ten, jak się wydaje, można ocenić pozytywnie, gdyż wyeliminował padnięcia spowodowane przez wirus EBHS w kontrolowanej przez autorów hodowli. Badań serologicznych nie przeprowadzono ze względu na trudności z uzyskaniem krwi od immunizowanych zwierząt. Zaprezentowane wyniki wskazują na zasadność i konieczność kontynuacji badań zmierzających do opracowania szczepionki przeciw chorobie krwotocznej zajęcy. Szczepionka taka mogłaby znaleźć zastosowanie w hodowlach kwaterowych lub fermowych zajęcy. Opracowanie naukowe programu profilaktyki dla tego gatunku może umożliwić rekonstrukcję populacji.

## Piśmiennictwo

1. *Capucci L., Scicluna M., Lavazza A.*: Diagnosis of viral haemorrhagic disease of rabbits and the European brown hare syndrome. *Rev. Sci. Off. Int. Epiz.* 1991, 10, 347-370.
2. *Chasey D., Duff P.*: European brown hare syndrome and associated virus particles in the UK. *Vet. Rec.* 1990, 126, 623-624.

3. *Chasey D., Lucas M., Westcott D., Williams M.*: European brown hare syndrome in the UK; a calicivirus related to but distinct from that of viral haemorrhagic disease in rabbits. *Arch. Virol.* 1992, 124, 363-370.
4. *Di Modugno G., Nasti R.*: Viral haemorrhagic disease in Puglia. Experimental contribution. *Riv. Coniglicol.* 1990, 1, 25-32.
5. *Dziedzic R.*: Przyczyny spadku populacji zajęcia szaraka w Polsce. Monografia. Ministerstwo Środowiska, Warszawa 2000.
6. *Fitzner A.*: Wirus krwotocznej choroby królików (VHD) i jego właściwości immunogenne. Praca doktorska, Zduńska Wola 1994.
7. *Fitzner A.*: Kaliciwirusy patogeny zwierząt i ludzi. *Medycyna Wet.* 2002, 59, 905-908.
8. *Fitzner A., Kęsy A., Chrobocińska M.*: Porównanie zdolności aglutynowania erytrocytów człowieka grupy O, A, B, AB przez wirus krwotocznej bronchopneumonii królików (RHDV) *Medycyna Wet.* 1992, 48, 89-90.
9. *Fuchs A., Weissenbock H.*: Comparative histopathological study of rabbit haemorrhagic disease (RHD) and European brown hare syndrome (EBHS). *Comp. Path.* 1992, 107, 103-113.
10. *Gavier-Widen D., Morner T.*: Epidemiology and diagnosis of the European brown hare syndrome in Scandinavian countries: a review. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 1991, 10, 453-458.
11. *Gavier-Widen D., Morner T.*: Descriptive epizootiological study of European brown hare syndrome in Sweden. *J. Wild. Dis.* 1993, 29, 15-20.
12. *Gustafsson K., Svensson T., Uggla A.*: Studies on an idiopathic syndrome in the brown hare (*Lepus europaeus*) and mountain hare (*Lepus timidus*) in Sweden, with special reference to hepatic lesions. *J. Vet. Med. A* 1989, 36, 631-637.
13. *Jurcik R., Lencuchova L., Salaj J.*: Susceptibility of hares for the infectious haemorrhagic disease of rabbits (RVHD) under experimental conditions. *Zschr. Jagden.* 1992, 38, 34-41.
14. *Larski Z.*: Diagnostyka wirusologiczna chorób zwierząt. PWRiL, Warszawa 1992.
15. *Laurent S., Vautherot J., Le Gall G.*: Structural antigenic and immunogenic relationship between European brown hare syndrome virus and rabbit haemorrhagic disease virus. *J. Gen. Virol.* 1997, 78, 2803-2811.
16. *Lavazza A., Scicluna M., Capucci L.*: Susceptibility of hares and rabbits to the European brown hare syndrome virus (EBHSV) and rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) under experimental conditions. *J. Vet. Med. B* 1996, 43, 401-410.
17. *Marcato P., Benazzi G., Vecchi M.*: Clinical and pathological features of viral haemorrhagic disease of rabbits and European brown hare syndrome. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 1991, 10, 371-392.
18. *Morisse J. P., Picault J. P., Boilletot E., Morin M.*: Etiological relationship between the European brown hare syndrome (EBHS) and the viral haemorrhagic disease in rabbits (VHD). *Rev. Med. Vet.* 1990, 141, 463-467.
19. *Murphy F., Gibbs E. P., Horzinek M., Studdert M.*: *Veterinary Virology*. Academic Press USA 1999.
20. *Nardelli S., Agnoletti F., Costantini F., Parpajola R.*: Diagnosis of rabbit haemorrhagic disease (RHD) and European brown hare syndrome (EBHS) by indirect sandwich polyclonal ELISA. *J. Vet. Med. B* 1996, 43, 393-400.
21. *Nauwynck H., Callebaut P., Peeters J., Ducatelle R., Uytendaele E.*: Susceptibility of hares and rabbits to a Belgian isolate of European brown hare syndrome virus. *J. Wild. Dis.* 1993, 29, 203-208.
22. *Nowotny N., Ros Bascunana C., Ballagi A., Gavier-Widen D., Belak S.*: Phylogenetic analysis of rabbit haemorrhagic disease and European brown hare syndrome viruses by comparison of sequenss from the capsid protein gene. *Arch. Virol.* 1997, 142, 657-673.
23. *Nowotny N., Steineck T., Tataruch F., Schilcher F., Weissenbock H.*: European brown hare syndrome (EBHS) – experimentelle Untersuchungen. *Wien. Tierärztl. Mnschr.* 1991, 78, 370-378.
24. *Wirblich C., Meyers G., Ohlinger V. F., Capucci L., Eskens U., Haas B., Thiel H.*: European brown hare syndrome virus: Relationship to rabbit haemorrhagic disease virus and other caliciviruses. *J. Virol.* 1994, 68, 5164-5173.

Adres autora: dr hab. Barbara Majer-Dziedzic, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin