

Kętrzyn w 55,9%. W przeciwieństwie do tego, powiaty o niskim średnim procencie zamotyliczenia, jak Biskupiec i Mrągowo są zmeliorowane tylko w 27%.

Powodu takiego usytuowania choroby motyliczej szukać więc przypuszczalnie wypada poza działaniem czynników makro- i mikroklimatu, mianowicie w warunkach glebowych, jej odczynowości, strukturze itp. (*Chowaniec, Drózdź*).

Dopiero łączne działanie tych wszystkich czynników wpływa na dynamikę inwazji motylicy wątrobowej, składając się na odpowiednie lub nieko-

rzystne warunki środowiskowe dla bytowania jej pośredniego żywiciela oraz larw.

Ustalenie szczegółowego rozprzestrzenienia motylicy wątrobowej na terenie województwa, a w skali państwowej w całym kraju, jak również ewentualna możliwość sporządzania prognoz inwazyjologicznych, pozwoli na właściwe przygotowanie sanitarno-inwazyjologiczne terenów przeznaczonych dla hodowli wielkostatnych oraz opracowanie założeń skutecznego zwalczania choroby motyliczej przeżuwaczy.

Adres autora: lek. wet. Agnieszka Szulc, Olsztyn, ul. Warszawska 101/1.

JANUSZ WAWRZKIEWICZ

## Użycie serwatki mleka w hodowli wirusa choroby Aujeszky na komórkach zarodka kurzego

Z Katedry Mikrobiologii Wydziału Wet. WSR w Lublinie  
Kierownik: prof. dr TADEUSZ JASTRZĘBSKI

Choroba Aujeszky (pseudowścieklizna), opisana po raz pierwszy jako odrębna jednostka chorobowa w 1902 r. przez badacza węgierskiego — Aujeszky, występuje obecnie prawie na całym świecie. W Polsce pierwsze przypadki tej choroby u lisów opisał *Ugor-ski* (1958), a u świń *Janowski* (1959) i *Bartosz* (1962). Ostatnio serologicznie, za pomocą odczynu seroneutralizacyjnego wykazał jej występowanie na terenie dużej tuczarni w woj. zielonogórskim — *Wawrzkie-wicz* (1965). U bydła, kotów i psów oraz u zwierząt futerkowych wirus choroby Aujeszky wywołuje charakterystyczny świąd, a proces chorobowy kończy się zawsze zejściem śmiertelnym. U świń — typowego świądu nie obserwuje się, obraz chorobowy jest bardzo różnorodny, a przebieg jest zwykle łagodny. Niekiedy objawy ogólne są tak słabo zaznaczone, że dają się zauważyć dopiero przy dokładnej obserwacji. Odnosi się to szczególnie do sztuk starszych, u których ilość przypadków śmiertelnych nie przekracza 1—3%. Straty jednak ekonomiczne, szczególnie w hodowlach wielkostatnych oraz u osesków bywają bardzo znaczne.

Rozpoznanie choroby Aujeszky u trzody chlewnej, ze względu na nietypowe zazwyczaj objawy, opiera się głównie na badaniu laboratoryjnym, tj. na próbie biologicznej (5, 7, 15, 18, 19), lub na izolacji wirusa z badanego materiału przy użyciu hodowli komórkowej (2, 8, 10, 11, 12, 13, 22). Hodowie komórek, a szczególnie fibroblastów kurzych nadają się nie tylko do przeprowadzenia izolacji wirusa Aujeszky z badanego materiału, lecz również do wykonania odczynu seroneutralizacyjnego (6, 12, 13, 21). Szczególne znaczenie ma tutaj odczyn seroneutralizacyjny, który może być z pełnym powodzeniem stosowany nie tylko w celu identyfikacji wyizolowanego wirusa, ale przede wszystkim w wykrywaniu ognisk choroby Aujeszky wśród trzody chlewnej. Używane jednak płyny utrzymujące hodowle komórek są stosunkowo drogie, a do przygotowania ich są potrzebne odczynniki niejednokrotnie trudno dostępne na rynku krajowym. Odnosi się to szczególnie do używanego zazwyczaj płynu Parkera (13, 14, 22).

Celem pracy było sprawdzenie możliwości zastąpienia kosztownego płynu Parkera przygotowaną we własnym zakresie serwatką. Serwatkę wzięto pod uwagę ze względu na wyniki prób *Barona* i *Low* (1958) oraz *Szurmana* (1961). *Baron* i *Low* (1958) zastąpili z powodzeniem mlekiem odtłuszczonym surowicę bydłą w pożywce utrzymującej HK przy hodowli wirusów polio, Coxsackie i krowianki. Stwierdzili oni jednocześnie, że nie

zawiera ono inhibitorów przeciwko tym wirusom.

*Szurman* (1961) w doświadczeniach swych wykazał, że wprowadzenie tzw. „plazmy mleka”, jako jednego ze składników PU nie wpłynęło w widoczny sposób na obniżenie miana wyhodowanego wirusa choroby cieszyńskiej.

### Materiał i metody

1. *Otrzymywanie serwatki.* Zbiorcze mleko krowie niepasteryzowane, otrzymane z zakładu mleczarskiego i podgrzane do temp. 37° poddawano enzymatycznemu działaniu podpuszczki użytej w nadmiarze (ok. 0,1 g/l litr mleka), tak że ścięcie mleka można było zaobserwować już po 10 minutach od momentu dodania preparatu. Mleko mieszano przez cały czas i przez dalsze 30 minut podgrzewano powoli do temp. 56°. Wytrącony parakazeinian wapnia usuwano przez filtrowanie przez watę. Otrzymałą serwatkę poddawano tyndalizacji w temp. 100° przez 3 kolejne dni i sączone przez filtr klarujący; pH ustalono na 7,3. Uzyskaną serwatkę przechowywano w temp. 4° przez szereg tygodni.

2. *Hodowla komórkowa (HK).* Jako HK używano 2—4-dniowe stacjonarne, jednowarstwowe, pierwotne hodowle komórek 9—10-dniowego zarodka kurczego (12, 22). Jako pożywkę wzrostową (PW) używano płynu Hanksa z 0,5% hydrolizatu laktalbuminy z dodatkiem 2% inaktywowanej surowicy cielęcej oraz penicyliny (100 j.m. na 1 ml) i streptomycyny (0,1 mg/ml).

Pożywka utrzymująca (PU) składała się podłoża wzrostowego oraz 50% lub 40% serwatki i 2% płynu owodniowego bydłęcego. Kontrolne podłoże utrzymujące składało się z równej ilości PW i płynu Parkera oraz 2% płynu owodniowego bydłęcego.

3. *Wirus.* Badania przeprowadzono przy użyciu wyściowego szczepu wirusa Aujeszky, oznaczonego symbolem AT 73/5, tj. szczepu dobrze zaadaptowanego do hodowli komórek zarodka kurczego (o mianie ok. 10<sup>7</sup> TCID<sub>50</sub>/ml).

### Wyniki i omówienie

Do wstępnych doświadczeń użyto jako PU podłoża o składzie: 50% serwatki oraz 50% PW i 2% płynu owodniowego bydłęcego. Okazało się jednak, że przy użyciu PU o w/w składzie, komórki ulegają lekkiej degeneracji i już po 2—4 dniach zaczynają odklejać się od szkła. Wobec tego zmieniono ilość serwatki w PU z 50% na

40%. Stwierdzono wówczas, że trypsynowane komórki zarodka kurzego utrzymywały się w tym płynie przez 6 dni bez widocznych zmian morfologicznych. Okres ten jest zupełnie wystarczający do namnożenia się wirusa choroby Aujeszki, jego mianowania, jak również do przeprowadzenia odczynu seroneutralizacyjnego.

W celu ilościowego określenia stopnia namnożenia się wirusa na podłożu utrzymującym z serwatką w stosunku do podłoża kontrolnego, przeprowadzono oznaczanie miana wirusa pasażowanego 3-krotnie na obu badanych podłożach i obliczono TCID<sub>50</sub> wirusa. Otrzymane wyniki nie wykazały jakiegokolwiek istotnej różnicy w mianie wirusa namnażanego na podłożu z serwatką w stosunku do podłoża kontrolnego i to zarówno po I, II jak i III pasażu wirusa.

TCID<sub>50</sub> po I pasażu przez badane podłoże wyniosło bowiem 10<sup>-6,5</sup> a po II i III — 10<sup>-6,2</sup>. Analogicznie miano wirusa wyrażone w TCID<sub>50</sub> na podłożu kontrolnym wynosiło 10<sup>-6,2</sup> po I i II pasażu oraz 10<sup>-6</sup> po III pasażu. Wskazuje to na brak w serwatce inhibitorów przeciwko wirusowi Aujeszki. Wykazano więc, że podłoże to może być stosowane zarówno do namnażania wirusa choroby Aujeszki, jak również do odczynu seroneutralizacji. Stwierdzono jednocześnie, że aktywny składnik mleka jest termostabilny, nie ulega on bowiem zniszczeniu w procesie tyndalizacji w temp. 100°.

#### Piśmiennictwo

1. Aujeszky A.: Zbl. f. Bakt. Parasit. u. Infekt. 32, 353, 1902.
2. Balldelli B., Tortone V.: Atti Soc. Ital. Sci. vet. 12, 571, 1958.
3. Baron S., Low R. J.: Science 128, 89, 1958.
4. Bartosz B.: Medycyna Wet. XVIII, 393, 1962.
5. Backer C. H.: Mh. Vet. Med. 17, 88, 1961.
6. Brauner J., Skoda R.: Arch. f. Exp. Vet. Med., 15, 285, 1961.
7. Dunne H. W.: Diseases of Swine, Iowa 1959.
8. Gagliardi G., Borghi G., Giroto V.: Atti Soc. Ital. Sci. vet. 14, 703, 1960.
9. Janowski H.: Med. Wet. XV, 741, 1959.
10. Kretzschmar C.: Monatshefte f. Vet. med., 7, 248, 1964.
11. Popescu A.: Lucr. Stiint. Inst. Ser. Vaccin. Pasteur. VII, 35, 1963.
12. Russeff C., Matewa V.: Arch. f. Vet. med., XVI, 1, 137, 1962a. XVI, 2, 225, 1962b.
13. Skoda R., Zuffa A.: Arch. f. Exp. Vet. med., XVI, 3, 491, 1962.
14. Skoda R., Sadecky E., Molnar J.: Arch. exp. Veterinar. med. XVII, 6, 1963.
15. Solomkin P. S.: Selchoziz, Moskwa 1953.
16. Szent-Ivanyi T.: Mag. Allatorv. Lap., 15, 259, 1960.
17. Szurman J.: Medycyna Wet. XVII, 24, 1961.
18. Tepper I.: Vet. Cas., 6, 35, 1957.
19. Toneva V.: Zemizdat, Sofia 1958.
20. Ugorski L.: Med. Wet. XIV, 10, 1958.
21. Wawrzkievicz J.: Med. Wet. XXI, 18, 1965.
22. Zuffa A., Skoda R.: Vet. Cas., IX, 1, 65, 1960.

Adres autora: dr Janusz Wawrzkievicz, Lublin, ul. Akademicka 11.

Вавжкєвич Я. — Применение молочной сыворотки при культивировании вируса болезни Ауески на клетках куриного зародыша.

Поставлено лабораторные опыты для замещения сравнительно дорогого субстрата Паркера в поддерживающей жизни культуры клеток куриного эмбриона среде — молочной сывороткой. Установлено, что в среде содержащей 60 частей выращиваемого субстрата (0,5% гидролизата лактальбумина, 2% инактивированной телячьей сыворотки, 100 м.е./мл пеницилина, 0,1 мг/мл стрептомицина — все в растворе Hanksa), 40 частей мо-

лочной сыворотки и две части амниотической жидкости теленка — трипсинированные клетки куриного эмбриона проживают 6 суток без видимых морфологических изменений.

Титр вируса Ауески после 3-кратного пассажа через клетки культивированные на вышеописанной среде остался также высоким как после пассажа на контрольных средах. Среда может быть использована для серонейтрализации, для размножения и титрации вируса Ауески. Стоимость описанной среды многократно ниже стоимости среды с субстратом Паркера.

Wawrzkievicz J. — The use of milk whey in the culture of the virus of Aujesky's disease on cells of chicken embryo.

Investigations were carried out on the possibility of replacing the relatively expensive Parker's fluid in the medium used for the culture of cells of chicken embryo, by milk whey. It was found that in a medium composed of: 60% growth fluid (i.e. Hank's fluid, 0,05% hydrolysate of lactalbumin, 2% inactivated calf serum and penicillin — 100 i. u./1 ml and streptomycin — 0,1 mg/1 ml), 40% whey and 2% cattle amniotic fluid the trypsinated cells of chicken embryo remained alive for six days without visible morphological changes.

Investigations on the height of the titre of Aujesky's virus, passaged three times through the above-mentioned medium, showed no fall in the titre as compared with the titre of the virus passaged through the control medium. The medium with the whey may be used not only to carry out the seroneutralisation reaction, but also to grow Aujesky's virus and perform a titre. The cost of preparation of the above-mentioned medium is several times lower than the cost of the medium with Parker's fluid.

Wawrzkievicz J. — L'emploi du petit-lait pour la culture du virus de la maladie d'Aujesky sur les cellules de l'embryon d'oeuf de poule.

L'auteur essaya de remplacer le liquide de Parker, relativement cher, par le petit-lait dans la milieu, entretenant les cultures des cellules de l'embryon d'oeuf de poule. On constata que les cellules tripsinées de l'embryon d'oeuf de poule ne subissaient pas de changements morphologiques visibles pendant 6 jours dans un milieu contenant 60% de liquide de la croissance (c'est à dire du liquide de Hanks; 0,5%, de hydrolysat de lactalbumine, 2% de sérum de veau inactivé, 100 u.m/1 ml de péniciline et 0,1 mg/1 ml de streptomycine), 40% de petit-lait et 2% de liquide amniotique bovin.

Les investigations concernant le titre du virus d'Aujesky, passé à trois reprises par le milieu mentionné ne démontrèrent pas de baisse en comparaison avec le titre du virus passé par le milieu de contrôle.

Le milieu au petit-lait peut être employé pour la réaction de séroneutralisation de même que pour la propagation du virus d'Aujesky et son titrage. Le cout du milieu au petit-lait est beaucoup moins élevé que celui du milieu entretenant, contenant le liquide de Parker.

Wawrzkievicz J. — Molke als Nährboden des Virus der Aujeszkykrankheit auf Zellen des Hühnerembryos.

Es wurden Untersuchungen durchgeführt über die Ersatzmöglichkeit der verhältnismässig teuren Parker-Flüssigkeit im Nährboden für Zellen des Hühnerembryos mittels des Molke. So wurde festgestellt, dass im Nährboden von Zusammensetzung: 60% der Wachstumflüssigkeit (d.h. Hankssche Flüssigkeit, 0,5% Laktalbuminhydrolysat, 2% inaktiviertes Kälberserum sowie Penicillin — 100 E/1 ml und Streptomycin — 0,1 mg/1 ml) — 40% der Molke und 2% der Rinderallantoisflüssigkeit — sechs Tage hindurch tripsinierte Zellen des Hühnerembryos haben

sich ohne sichtbare morphologische Veränderungen aufrecht erhalten.

Untersuchungen über Titerhöhe dreimal durch obigen Nährboden passagierten Aujeszkivirus haben seine Erniedrigung im Vergleich zum durch Kontrollboden passagierten Virus nicht erwiesen.

Der Molkennährboden kann nicht bloss zur Sero-neutralisation benützt werden doch auch zur Anreicherung und Titrierung des Aujeszkivirus. Kosten der Vorbereitung des Molkenährbodens sind bedeutend kleiner als der Nährboden aus der Parkerflüssigkeit.

JÓZEF DZIEKOŃSKI, WITOLD DROŹDŹYŃSKI, WANDA POZNAŃSKA

## Schorzenie jagniąt wywołane przez *Pasteurella haemolytica*

Z Wojewódzkiego Zakładu Higieny Weterynaryjnej w Bydgoszczy  
p. o. Kierownika: lek. wet. J. BOROWIECKI

W styczniu 1965 r. nadesłano z dwóch owczarni do tutejszego Zakładu padłe jagnięta rasy merynos polski w celu stwierdzenia przyczyny upadku. Upadki w tych owczarniach (leżących w dwóch przeciwległych krańcach województwa) występowały dość często, jednak nie miały one charakteru masowego. Jak wynikało z pism przewodnich terenowych lekarzy wet. chorowały jagnięta w wieku 6—12 tygodni życia i to przeważnie w dobrej kondycji. Wstępne badanie bakteriologiczne wykazało w narządach mięsnych jagniąt obecność pał. *Pasteurella haemolytica*.

W literaturze niewiele jest doniesień o schorzeniu owiec wywołanym przez ten gatunek pastereli, między innymi stwierdzili go w Anglii *Montgomeri* i współpr. (1938) w sporadycznych i enzootycznych postaciach zapalenia płuc owiec, *Kasprzak* (1950) w schorzeniach płuc u jagniąt i owcy, *Dąbrowski, Wołoszyn, Paroszkiewicz* i *Koślak* (1954) w enzootii u owiec, *Stamp, Watt* i *Thornlinson* (1955) w jednym przypadku zachorowania owiec. *Pasteurella haemolytica* poza owcami stosunkowo najczęściej występuje u cieląt, rzadziej u bydła dorosłego i prosiąt. Znane wypadki schorzenia owiec na tym tle charakteryzują się przebiegiem posocznicy w oseszków oraz przebiegiem podostym, a nawet przewlekłym u jagniąt i owiec dorosłych. Zmiany chorobowe umiejscawiają się przede wszystkim w narządzie oddechowym. W przypadkach nadostrych stwierdza się jedynie wybroczyny pod błonami surowiczymi i w błonach śluzowych oraz nieznaczny obrzęk węzłów chłonnych. Postać ostra choroby charakteryzuje się zwykle galaretowatymi naciekami tkanki podskórnej przedniej części ciała, przekrwieniem i obrzękiem błony śluzowej tchawicy i oskrzeli, mniej lub bardziej rozległymi zmianami zapalnymi w płucach o charakterze nieżyłowym, rzadziej krupowym, ostrym obrzękiem węzłów chłonnych śródpiersiowych i okołoskrzelowych, wysiękiem surowiczym w worku osierdziowym i jamie opłucnowej, niekiedy obserwuje się drobne wybroczyny pod torebką surowiczą nerek, watrobę i śledzionę, obrzęk błony śluzowej trawienia i jelit. W rzadziej występującej postaci przewlekłej płuca wykazują rozległe zmiany zwątrobień w różnych okresach rozwoju, w zmienionej tkance płucnej często obserwuje się ogniska ropne, częściowo otorbione tkanką łączną, opłucna nad zmienionymi częściami płuc jest zgrubiała, pokryta nalotami włóknika. W daleko posuniętych przypadkach choroby stwierdza się ogólne wyniszczenie i niedokrwiłość.

Wywołująca chorobę *P. haemolytica*, obok *P. pestis*, *P. multocida* i *P. pseudotuberculosis* jest jednym z gatunków rodzaju *Pasteurella*. *Montgomeri* i współpr. na podstawie badań serologicznych szczepów hemolitycznych pastereli wyizolowanych z bydła i owiec, podzielili je na trzy typy: do typu I zaliczyli szczepy bydłecze i owcze, do typu II szczepy wyłącznie owcze, do typu III — szczepy nie aglutynowane przez surowice I i II, a pochodzące od bydła. Zarazek wyizolo-

wany przez *Jorgensona* z błony śluzowej jamy nosa zdrowej krowy, który okazał się zjadliwy dla wołu i zwierząt laboratoryjnych, zaliczono do typu IV. *P. haemolytica* jest to gramoujemna ziarniako-pałeczka. W preparatach mikroskopowych oprócz typowych ziarniako-pałeczek, spotyka się pałeczki długie nie wykazujące tendencji do barwienia biegunowego, oraz formy nitkowate, dochodzące do 10  $\mu$  dł. Barwiąc metodą negatywną stwierdza się otoczki. Na agarze zwykłym drobnoustrój ten tworzy kolonie lśniące, wilgotne, niebieskawo przeświecające. Na agarze z krwią kolonie są większe (2—3 mm) z wąską strefą hemolizy nieznacznie przekraczającą brzeg kolonii. Na bulionie występuje początkowo zmętnienie, a po kilku dniach na dnie probówki tworzy się grudkowaty osad, mniej spisty i śluzowaty w porównaniu z osadem wytworzonym przez *P. multocida*. Ze względu na małą wytrzymałość zarazka, wymaga on częstych przesiewów.

Wg. *Bergeya* *P. haemolytica* zakwasza bez wytworzenia gazu — glukozę, fruktozę, galaktozę, glicerol, dekstryne, inozytol, laktozę, maltozę, mannitol, rafinozę, sorbitol, sacharozę i ksylozę. Nie fermentuje arabinozy, dulecytolu, inuliny, mannozy, ramnozy i salicyny. Indolu nie wytwarza. Większość autorów uważa, że *P. haemolytica* jest niechorobotwórcza dla zwierząt doświadczalnych i tylko myszki mogą padać po zakażeniu dootrzewnowym zwiększonymi dawkami zarazka.

Ponieważ schorzenie owiec wywołane przez *P. haemolytica* nie jest często notowane, skłoniło to nas do zainteresowania się owczarniami „N” i „P”, z których nadesłano padłe jagnięta.

### Badania własne

W badaniach uwzględniono wywiad epizootologiczny, objawy kliniczne, zmiany anatomo-patologiczne i badanie bakteriologiczne.

Wywiad epizootologiczny i obraz kliniczny. Owczarnia w PGR „P” o charakterze użytkowym posiadała w chwili badania 764 dorosłych owiec oraz 529 jagniąt rozmieszczonych w 2 budynkach. Jeden budynek (dawna chlewnia) o betonowej podłodze został zaadaptowany na owczarnię bez żadnych inwestycji, z tym że wstawiono do niego paśniki. Drugi budynek to dawna obora. Powierzchnia przypadająca na 1 owcę wynosiła 1,40 m<sup>2</sup>. W obu pomieszczeniach ściółka była mokra. W celu stwierdzenia wilgotności oraz temperatury, pozostawiono w jednej owczarni na okres tygodnia hygrotermometr. Jak wykazał wykres, wilgotność względna w tej owczarni utrzymywała się stale w granicach 100%, a opadała codziennie jedynie w porze obiadowej (od 14—16 godz.), w czasie gdy dowożono pasze, co łączyło się z otwieraniem drzwi i wietrzeniem mimowolnym owczarni. Temperatura wahała się w granicach 13—14°, a w chwili dowozu pasz spadała do 6—7°. Jak z tego wynika wahania zarówno wilgotności, jak i temperatury były znaczne, przy czym stała wilgotność względna tego pomieszczenia była zbyt wysoka. Kondycja jagniąt była dobra, matek i jarlic dostateczna. Żywnienie owiec, biorąc pod uwagę porę roku i środowisko, dostateczne. Stan zdrowia dorosłych owiec