

MEDYCYNĄ WETERYNARYJNA

ORGAN POLSKIEGO TOWARZYSTWA NAUK WETERYNARYJNYCH

CZASOPISMO POSWIĘCONE NAUCIE I PRAKTYCE WETERYNARYJNEJ
 ZAŁOŻONE W 1945 R. PRZEZ WYDZIAŁ WETERYNARYJNY W LUBLINIE

REDAKCJA

Redaktor naczelny: prof. dr Edmund PROST

Członkowie Komitetu Redakcyjnego: prof. dr Ryszard BADURA, doc. dr Jerzy MAZURCZAK,
prof. dr Abdon STRYSZAK, doc. dr Stanisław WOŁOSZYN — sekretarz naukowy.

RADA PROGRAMOWA

Prof. dr Władysław BIELAŃSKI, prof. dr Mieczysław CENA, prof. dr Bronisław GANCARZ, dr Kazimierz GOLISZEWSKI, prof. dr Jan HAY, prof. dr Roman HOPPE, prof. dr Tadeusz JASTRZĘBSKI, prof. dr Lech JAŚKOWSKI, doc. dr Adam KĄDZIOLKA, ppłk dr Stefan KOSSAKOWSKI, prof. dr Stanisław KRAUSS, prof. dr Józef KULCZYCKI, doc. dr Zdzisław LARSKI, doc. dr Jerzy LIPANOWICZ, płk dr Konrad MILLAK, dyr. dr Henryk OBERFELD, prof. dr Wincenty PEZACKI, doc. dr Wiktor STEFANIAK, prof. dr Alfred TRAWIŃSKI, doc. dr Marian TRUSZCZYŃSKI, prof. dr Aleksander ZAKRZEWSKI, prof. dr Eugeniusz ŻARNOWSKI

CHOROBY ZAKAŻNE I INWAZYJNE

ZDZISŁAW LARSKI

Olsztyn

Diagnostyka wirusologiczna w praktyce weterynaryjnej

Uderzającą jest wyraźna dysproporcja między olbrzymimi światowymi osiągnięciami w teoretycznych badaniach wirusologicznych a tym, co zyskuje z tego doraźnie w sensie diagnostycznym praktyka weterynaryjna. Celem niniejszego artykułu jest między innymi wytłumaczenie jakie są tego powody.

Trzeba przede wszystkim zdać sobie sprawę z tego, że wspomniane wspaniałe wyniki osiągnięto głównie w szczególnego rodzaju pracach badawczych. Wirusy były w nich rozpatrywane nie tyle jako czynniki chorobotwórcze ile jako doskonałe modele biologiczne, pozwalające rozwiązywać fundamentalne problemy biologii — zjawiska istoty życia, mechanizmy zjawisk genetycznych, rolę wirusów w nowotworowej transformacji komórek itd. Te precyzyjne prace prowadzone w najnowocześniejszych laboratoriach świata przy olbrzymich nakładach finansowych, wymagały użycia dokładnie oznaczonych laboratoryjnych szczepów wirusowych, a stosowane i wprowadzane nowe metody, nieraz bardzo czułe, posiadały wartość tylko w pewnych ściśle określonych i ustalonych warunkach. Metody te oczywiście często mogą nie mieć żadnej wartości w diagnostycznych badaniach narządów, płynów ustrojowych, wydaliny i wydzieliny na obecność wirusów. Tu przecież nie operuje się czystym laboratoryjnym szczepem wirusa, a zawieszoną tkanki, w której zarazek stanowi znikomą część; co więcej, pozawirusowe składniki zawierają mogą szereg substancji „maskujących” jego obecność, a ponadto na skutek inaktywacji (późne pobranie próbek, dłuższy transport)

ilość wirusa może zmniejszyć się bardzo znacznie.

Oczywiście metody rutynowych badań diagnostycznych są także opracowywane w ostatnich latach w wielu zagranicznych, a również w małym stopniu w naszych krajowych laboratoriach wirusologicznych. Wdrażanie ich jednak postępuje powoli i jak już wspomniano, lekarz wet. pracujący w terenie nie otrzymuje zadowalającej odpowiedzi z ZHW, jeżeli w przesłanych próbkach nie udaje się wykazać chorobotwórczych bakterii i może się on tylko domyślać, że dane schorzenie noszące cechy zakaźności jest prawdopodobnie wywołane przez wirusy.

Dlaczego tak się dzieje? Otóż najważniejszym powodem jest to, że diagnostyczne metody wirusologiczne nie zostały dotąd tak dobrze opracowane jak na przykład w bakteriologii. Wirusologia jest nauką młodszą i nie zebrano tutaj jeszcze wielu doświadczeń. Poza tym, o ile bakterie wykrywa się metodami bezpośrednimi dzięki ich dużym rozmiarom i łatwości namnażania na sztucznych podłożach, to obecność wirusów w badanym materiale stwierdza się zwykle metodami pośrednimi, a więc wykazując reakcję wrażliwych obiektów biologicznych (zwierząt doświadczalnych, zarodków, hodowli komórek) na zakażenie badanym materiałem. Wydaje się celowe zapoznanie lekarzy wet. terenowych z typowym przykładem postępowania diagnostycznego. Mimo, że zasady są proste (schemat 1) wykonanie badania jest często trudne, drogie i wymaga dłuższego czasu.

Już pierwsze stadium (izolacja) nastroczać może trudności w przypadku badania na obecność tych wirusów, które wykazują zakaźność jedynie dla dużych i drogich zwierząt (np. konie, bydło, świny, lisy itp.). Bardzo przydatne i stosunkowo tanie są metody przy użyciu zarodków kurzych, ale te ostatnie wykazują wrażliwość na niewiele wirusów.

Najtańsze podłoże do namnażania wirusa stanowią hodowle tkanek i komórek *in vitro* i z tą metodą łączy się największe nadzieje, także przy usprawnianiu diagnostyki wirusologicznej. Tu jednak są momenty, które hamują ten optymizm. Przede wszystkim sporządzanie hodowli komórek *in vitro*, mimo, że również w zasadzie proste, wymaga zachowania szczególnej czystości bakteriologicznej i czystości chemicznej dla zapewnienia warunków wzrostu poza organizmem. Umiejętność ciągłego prowadzenia hodowli jest dowodem sprawności organizacyjnej oraz dobrego wyszkolenia całego personelu. Obecnie zaledwie tylko 4—5 placówek weterynaryjnych w Polsce prowadzi stale hodowle tkankowe i to tylko niektóre, potrzebne do bieżących prac naukowych. Dla celów diagnostycznych pracownie rozpoznawcze musiałyby mieć pełny asortyment hodowli do izolowania wszystkich wirusów występujących w kraju. Tu znowu na marginesie bardzo ważna sprawa — nie wiemy dobrze jakie wirusy i w jak znacznym stopniu są u nas rozprzestrzenione; brak danych, gdyż brak badań diagnostycznych — błędne koło.

Komórki hodowane *in vitro* wrażliwe są na większość wirusów, ale w pewnych przypadkach (np. po zakażeniu wirusem pomoru świń) namnażaniu się wirusa nie towarzyszy widoczne uszkodzenie komórek i wtedy metoda ta nie ma żadnej wartości diagnostycznej, gdyż wykazanie obecności wirusa wymaga zakażenia zwierząt doświadczalnych (w podanym przykładzie świń). Znaczny kłopot sprawia też zbyt duża wrażliwość hodowli komórek na wirusy. Brzmi to pozornie paradoksalnie, gdyż przecież dąży się do tego, aby metoda była jak najczulsza. A jednak niekiedy jest to wadą, gdyż komórki hodowli reagować mogą na cały szereg wirusów niechorobotwórczych dla zwierząt. Obecny okres w wirusologii charakteryzuje dobrze zdanie Burneta, że „w tej chwili trudności polegają nie tyle na izolowaniu czynników odpowiedzialnych za znane choroby wirusowe, ile na znalezieniu chorób, które można by przypisać już wyizolowanym wirusom”. Wirusy o nieznanym roli chorobotwórczej noszą nazwę wirusów „sierocych”. Te „saprofityczne”, dość rozpowszechnione czynniki mogą wywołać różne uszkodzenia hodowli często zawodzi ich identyfikacja serologiczna i znowu trzeba stosować dodatkowe próby biologiczne na zwierzętach.

Mimo wymienionych trudności wprowadzenia metody hodowli tkanek do rutynowej diag-

nostyki i właściwej interpretacji wyników, metoda ta staje się najbardziej cenną metodą rozpoznawczą.

Dalsze stadium postępowania diagnostycznego to identyfikacja wirusa (p. schemat 1). Reakcja bowiem obiektów biologicznych na zakażenie (objawy chorobowe, śmierć, uszkodzenie komórek hodowli) świadczy jedynie o tym, że w nadesłanym do badania materiale był wirus zjadliwy. Nie zawsze bowiem charakter reakcji pozwala określić izolowany wirus.

I. Izolacja wirusa (po wykluczeniu czynników bakteryjnych)		
Zakażenie wrażliwych obiektów biologicznych	zawiesina badanego materiału	reakcja + = izolowano wirus x
II. Identyfikacja izolowanego wirusa		
		Reakcja
	wirusem x z surowicą anty-A	+
Zakażenie wrażliwych obiektów biologicznych	wirusem x z surowicą anty-B	+
	wirusem x z surowicą anty-C	—
	wirusem x z surowicą anty-D	+

W podanym przykładzie izolowany wirus zidentyfikowano jako wirus choroby „C”, gdyż surowica przeciw tej chorobie zobojętniła jego chorobotwórczość.

Zasada prosta, ale wykonanie często trudne, gdyż wymaga posiadania przez laboratorium rozpoznawcze bardzo dużej ilości surowic diagnostycznych (także przeciw niektórym wirusom „sierocym” — które liczy się już na setki); konieczny jest jak najszybszy zakup tych komponentów (także antygenów kontrolnych) za granicą.

Dodatkową trudność diagnostyczną stwarza masowe uodparnianie szczepionkami zawierającymi żywy wirus; ten ostatni namnaża się i utrzymuje w organizmie przez pewien czas, a w przypadku śmierci z całkiem innego powodu może być wykazany w badanym materiale, co wskazuje „fałszywy ślad”.

Oprócz podanego wyżej postępowania diagnostycznego coraz powszechniej wprowadza się szczególnie dwie cenne metody rozpoznawcze.

Pierwsza to precypitacja w warstwie agaru. W otworze centralnie położonym umieszcza się badany materiał (np. wycinki nadesłanych prób lub ich zawiesinę), a w kilku otworach położonych promieniście umieszcza się surowice przeciw poszczególnym chlorobom wirusowym. Wszystkie użyte komponenty dyfundują w agarze. Jeżeli naprzeciw otworu z którym surowicą wytworzy się widoczna linia precypitacji oznacza to że badany materiał zawie-

rał wirus tej choroby przeciw której ta surowica jest skierowana.

Druga metoda — immunofluorescencji polega na wykazaniu wirusa w badanym materiale (najczęściej w rozmazach) przez podziałanie na niego odpowiednio przygotowanymi surowicami odpornościowymi. Zawarte w nich przeciwciała są połączone z barwnikami fluoryzującymi i dzięki temu można mikroskopowo wykazać „świecenie” tych miejsc, gdzie uległy one związaniu z wirusem. Dla przykładu rozmaz tkanki mózgu zwierzęcia chorego na wściekliznę, poddany działaniu „fluoryzującej” surowicy przeciwwściekliznowej wykaże obecność świecących ognisk, które powstały na skutek reakcji wirusa wścieklizny z przeciwciałami. Jeżeli badany materiał nie zawiera wirusa, przeciwciała fluoryzujące nie ulegają związaniu i „świecenia” preparatu nie stwierdza się.

Obie przedstawione metody mają tę dużą zaletę, że pozwalają otrzymać szybkie rozpoznanie (nawet w ciągu kilku godzin), gdyż równocześnie uzyskuje się identyfikację wirusa. Jednakże i tu, chociaż zasada ich jest bardzo prosta, interpretacja nastrocza czasem sporo kłopotów, gdyż, jak w każdej reakcji opartej na zasadach serologicznych, dużo trudności stwarza wykluczenie reakcji nieswoistych.

Wspomnieć jeszcze należy o metodzie badania pary (nazwa pochodzi od 2 prób = para) surowic w przypadkach schorzeń bardziej przewlekłych. Jednorazowe badanie serologiczne pozwala wykazać obecność przeciwciał, lecz nie mówi nam, czy są one następstwem toczącego się aktualnie procesu zakaźnego, czy też powstały w następstwie przebiegu tej choroby w przeszłości (również w formie bezobjawowej) czy nawet w następstwie uodparniania. Dopiero badanie drugie tego samego osobnika po około 2 tygodniach wykazujące wyraźny wzrost ilości przeciwciał świadczy, że stanowią one reakcję na aktualne zakażenie. Ta metoda badania pary surowic oddać może cenne usługi, jednak pod warunkiem, że pierwsze pobranie krwi nastąpi bardzo wcześnie, na samym początku schorzenia. Jeżeli lekarz wet. przeoczy ten moment i pobierze krew 1—2 dni później, wówczas poziom przeciwciał może się już podnieść i wtedy w porównaniu do niego drugie badanie krwi pobranej po około 2 tygodniach nie wykaże diagnostycznie ważnego wzrostu.

Przedstawione dane wskazują jak skomplikowane są często metody diagnostyki wirusologicznej. To oczywiście nie usprawiedliwia opóźnień ich wprowadzenia do rutynowych badań. Wręcz przeciwnie — trzeba jak najszybciej stworzyć w ZHW pracownie, w których personel laboratoryjny mógłby podejmować coraz trudniejsze zadania w miarę nabywania doświadczenia. Do tego jednak potrzebni są ludzie zaznajomieni z podstawowymi metodami wirusologicznymi.

Najważniejsza jest więc sprawa kadr, a te niestety, są bardzo nieliczne w porównaniu z najbardziej pokrewną dyscypliną jaką jest bakteriologia. W tej ostatniej olbrzymią rezerwę ludzi znających metodykę prac bakteriologicznych stanowią pracownicy naukowcy katedr mikrobiologii i higieny produktów zwierzęcych 4 wydziałów weterynaryjnych, pracownicy 17 ZHW i ponad 60 laboratoriów Weterynaryjnej Inspekcji Sanitarnej (w każdym 2 bakteriologów) oraz pewną ilość lekarzy wet. pracujących w Akademii Medycznych, San-Epidach i innych placówkach służby zdrowia. Z tych dużych rezerw można bez trudu tworzyć i uzupełniać placówki bakteriologiczne. Ciągłość wzrostu ilości i jakości kadry zapewniona jest w bakteriologii przez stale organizowane kursy zarówno w Instytucie Wet. jak i na Uczelniach i w placówkach naukowych innych zawodów.

Natomiast wirusologią weterynaryjną zajmuje się w Polsce tylko kilkanaście osób i nic nie wskazuje na to, że liczba ta może się radykalnie powiększyć w najbliższym czasie gdyż: a) ilość osób pracujących w wirusologii weterynaryjnej wzrosła bardzo nieznacznie w ciągu ostatnich 10 lat, b) nie prowadzi się stałego szkolenia wirusologicznego pracowników z placówek terenowych (Instytut Weterynarii będący największą w kraju placówką szkolenia podyplomowego urządził tylko jeden kurs), c) katedry mikrobiologii uczelni weterynaryjnych obciążone są dydaktyką i tylko część czasu poświęcić mogą tematyce wirusologicznej, d) prawie wszyscy nasi wirusolodzy weterynaryjni zdobyli pewną ilość umiejętności dzięki samouctwu, a na zagraniczne staże szkolniowe wyjeżdżali uczyć się metodyki w wieku, w którym powinni byli wyjeżdżać dla zapoznania się z problematyką wirusologiczną, e) kadra wirusologiczna jest w większości stara wiekiem i część jej wycofa się z aktywnej pracy naukowej wcześniej niż uda się wyszkolić nowych pracowników, tak, aby można ich było nazwać wirusologami — a trwać to musi około 5—6 lat (włączając szkolenie w ośrodku zagranicznym).

Warto podać, że w zagranicznych weterynaryjnych placówkach wirusologicznych pracuje po kilkunastu pracowników naukowych. W ZSRR powołano Katedrę Wirusologii w Moskiewskiej Akademii Weterynaryjnej, a poczynając od roku akademickiego 1967/1968 wirusologia wykładana jest na wszystkich wydziałach weterynaryjnych jako oddzielny przedmiot w wymiarze 72 godzin zajęć (24 godziny wykładów i 48 godzin ćwiczeń); szkolenie podyplomowe lekarzy wet. dla podwyższenia kwalifikacji w zakresie wirusologii obejmuje corocznie 50 osób. W NRF utworzono oddzielne Katedry Wirusologii Wet.

Wirusologia jest dyscypliną wymagającą dość znacznych nakładów finansowych, nawet

jeżeli dana placówka ograniczy się do badań diagnostycznych. Ważna jest sprawa posiadania kilku oddzielnych pomieszczeń do badań, wiadomo bowiem, że operując kilkoma wirusami, a nawet kilkoma szczepami tego samego wirusa, bardzo łatwo o ich wzajemne zanieczyszczenie, przy czym nie zawsze można to w porę stwierdzić, co często prowadzi do pomyłek diagnostycznych. Konieczne jest też posiadanie dobrze izolowanych pomieszczeń na zwierzęta doświadczalne. Ważna jest również jakość tych ostatnich. Zwierzęta zakupywane dorywczo stanowią materiał niewyrównany, o którego przeszłości środowiskowej i immunologicznej nic się nie wie. Powoduje to konieczność używania większej ilości i w efekcie kosztuje więcej, dając wyniki o problematycznej nieraz wartości. O tym jak ważne jest użycie właściwych zwierząt, odpowiednio żywionych szczególnie w wirusologii, świadczy pozornie paradoksalny fakt, że zwierzęta niedożywione wykazują większą oporność na zakażenie pewnymi wirusami. Do pewnych badań wirusologicznych konieczne jest posiadanie czystych linii małych zwierząt laboratoryjnych.

Jak już wspomniano większość badań wykonuje się przy użyciu hodowli komórek. Kłopot polega na tym, że każda pracownia wirusologiczna musi sama sobie sporządzać te żywe podłoża, w odróżnieniu od pracowni bakteriologicznych, które dostają gotowe pożywki, mogą je gromadzić na zapas i używać w dowolnym czasie. Przygotowanie podłoży (żyjących komórek) dla wirusów na określony dzień jest nieporównanie trudniejsze; nie można ich przy tym gromadzić, gdyż toczą się w nich procesy życiowe, podłoża zmieniają się i stają się nieprzydatne. Stworzenie w przyszłości pracowni hodowli tkankowych w dobrze zorganizowanych zakładach usprawni pracę w tym samym stopniu w jakim osiągnięto to w bakteriologii po wydzieleniu pracowni pożywek.

Ostatnio sprawą rozwoju wirusologii w Pols-

ce zajęła się Komisja Wirusologiczna PAN, która dokonała analizy stanu tej dyscypliny w kraju. Stwierdzono niedostateczne wyposażenie w aparaturę, brak odczynników, surowic i antygenów diagnostycznych, brak dostatecznej ilości średniego personelu oraz niedostateczne finansowanie badań w dziedzinie wirusologii. W badaniach podstawowych jesteśmy w Polsce znacznie opóźnieni w porównaniu z krajami sąsiadującymi z nami. Komitet Mikrobiologiczny i Komisja Wirusologiczna PAN przesłały do odpowiednich resortów wnioski. A oto niektóre dotyczące wirusologii weterynaryjnej (skierowane do Ministerstwa Oświaty i Szkolnictwa Wyższego oraz do Ministerstwa Rolnictwa):

1. Szkolenie studentów w zakresie wirusologii w Katedrach Mikrobiologii Weterynaryjnej — co najmniej 24 godziny wykładów i 30 godzin ćwiczeń.

2. Utworzenie Zakładów Wirusologii przy niektórych Katedrach Mikrobiologii Wydziałów Weterynaryjnych WSR i SGGW (Warszawa, Lublin, Olsztyn) oraz uruchomienie przy Zakładach Higieny Weterynaryjnej Pracowni Wirusologicznych.

3. Wyposażenie placówek w aparaturę, etaty i przyznanie odpowiednich nakładów finansowych na rozwój badań podstawowych.

4. Poszerzenie zakresu szkolenia wirusologów w kraju, studia podyplomowe i zwiększenie liczby stypendiów dla szkolenia wirusologów w ośrodkach zagranicznych.

5. Opracowanie programu popularyzacji zagadnień wirusologicznych.

Poczuje się realizację wniosków w okresie najbliższych 2—4 lat i jeżeli uda się to zrobić, chociażby tylko w zakresie szkolenia kadr, to perspektywy wprowadzenia rutynowego wirusologicznego badania prób nadsyłanych przez weterynaryjną służbę terenową staną się całkiem realne i bliskie.

Adres autora: doc. dr Zdzisław Larski, Olsztyn-Kortowo.

TADEUSZ JASTRZĘBSKI, ZYGMUNT CYGAN, JULIAN NOWAK

Badania nad wyosabnianiem i identyfikacją *Cl. oedematiens* z próbek ziemi

Katedra Mikrobiologii Wydziału Weterynarii WSR w Lublinie
Kierownik: prof. dr T. JASTRZĘBSKI

Wojewódzki Zakład Higieny Weterynaryjnej w Lublinie
Kierownik: dr T. DĄBROWSKI

W ostatnich latach zainteresowanie badaczy drobnoustrojami z grupy *Cl. oedematiens* stale wzrasta. Wiąże się to z występowaniem w obrębie tego gatunku szeregu typów chorobotwórczych. Zaproponowany przez Oakleya i wsp. (22, 24) nowy system taksonomii przyjmuje obecność czterech odrębnych typów (A, B, C i D) różniących się wytwarzaniem odmiennych antygenów toksycznych. W związku z częstym występowaniem *Cl. oedematiens* A

w ziemi (2, 21, 40) uważany jest on za główny, poza *Cl. perfringens*, czynnik etiologiczny zgorzeli gazowej (10, 14, 15, 16, 28, 32, 34). Duże zainteresowanie badaczy *Cl. oedematiens* B wiąże się z coraz częściej wykrywanymi przypadkami zakaźnego martwiczego zapalenia wątroby u owiec (*hepatitis infectiosa necrotica*, black disease of sheep, bradsot niemiec-ki — 1, 7, 9, 25, 33, 36, 37, 41), u świń (black disease of pigs — 3, 39) oraz u bydła (black