было сверх 2 раза выше количества привитых в годах 1967—1968. Бешенство диких животных, главным образом лисиц, в годах 1967—1971 составляло 84%. Авторы обращают внимание на растущее среди домашних животных значение эпизоотиологическое кошек, а также на тревожное явление перебрасывания бешенства на новые виды животных: в 1971 г. установили в первый раз после войны в Краковском воеводстве бешенство у косули, оленя и хорька.

Ramisz A., Szańkowska Z., Komorowski A., Koźmińska A., Mychalczuk Z. — **Zoo-sanitary situation of rabies in the Kraków province in 1967—71.**

The authors pay attention ti the rapid deterioration of zoo-sanitary situation of rabies in the Kraków province in the course of last three years. In 1971 there were observed 11 times more cases of rabies than in 1967. In this period also increased the exposition of men to ill and suspected of infection animals. The number of vaccinated persons in 1969—1971 was twice higher than that in 1967—1968. Rabies of sylvatic animals, mainly in foxes, appeared in 84.0% of all cases in 1967—1971. The authors emphasise an increasing role of cats in epizootiological chain of rabies in domestic animals. They also point to an alarming phenomenon of spreading of the disease in the new species of animals. First cases of rabies after the II World War were noted in deers, reo-deers and polecats in the Kraków province in 1971.

WITOLD GOLNIK

Izolacja wirusa z przypadku ostrej formy choroby Mareka u kurcząt

Instytut Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych Wydziału Weterynarii SGGW w Warszawie
Dyrektor: prof. dr A. STRYSZAK

Choroba Mareka zwana dawniej neurolimfomatozą, limfomatozą trzewną lub paraliżem zakaźnym kur charakteryzuje się powstawaniem nacieków komórek limfoidalnych oraz guzów limfo-retikularnych w narządach wewnętrznych i tkankach zakażonego organizmu ptaka. Wirus — czynnik etiologiczny choroby Mareka został wyizolowany po raz pierwszy przez Churchilla i Biggsa w Wielkiej Brytanii (1967) i Nazeriana i wsp. w Stanach Zjednoczonych Ameryki Północnej (17, 22). Badania powyższych autorów, potwierdzone dalszymi doniesieniami, wykazały, że należy on do grupy wirusów Herpes B i odznacza się ścisłym związaniem z komórką gospodarza (15, 17, 20, 21, 23). W zakażonym organizmie ptaka wirus choroby Mareka może występować w postaci genomu, cząstki niekompletnej lub też cząstki kompletnej posiadającej osłonę zewnętrzną (2, 9, 10, 13, 25, 27, 28).

Jedną z metod izolacji wirusa jest wyosabnianie go w hodowlach komórek nerki kurcząt spontanicznie zakażonych lub też zakażanie hodowli komórek ptasich krwią oraz homogenizatami guzów, pobranymi od ptaków chorych. Po 5 — 10 dniach inkubacji hodowli pojawia się w nich charakterystyczny efekt cytopatyczny (12, 16, 17, 19, 25, 26). Inną z metod izolacji i identyfikacji wirusa jest dożółtkowe zakażanie zarodków kury, z tym jednak zastrzeżeniem, że embriony muszą być wolne od swoistych przeciwciał biernych (7, 8). Obecność antygenu wirusowego w zakażonych hodowlach komórkowych lub tkankach organizmu stwierdza się metodami serologicznymi lub przy pomocy mikroskopii elektronowej (21, 22, 23, 27). Jak wykazano w badaniach autorów amerykańskich, hodowle komórek ssaków nie są wrażliwe na zakażenie wirusem choroby Mareka (11). Gospodarzem najbardziej wrażliwym na infekcję, służącym między innymi do izolacji, identyfikacji i pasażowania wirusa są pisklęta kury wolne od przeciwciał biernych skierowanych przeciw wirusowi choroby Mareka, a pochodzące od ptaków genetycznie wrażliwych na tę chorobę (1). W warunkach naturalnych wirus choroby Mareka reprezentowany jest przez szczepy o różnej patogenności, wywołujące chorobę przebiegającą w formie ostrej lub klasycznej oraz przez liczne szczepy niepatogenne (5, 6, 24). Wykazano, że niektóre szczepy chorobotwórcze wirusa pasażowane wielokrotnie w hodowlach komórkowych tracą właściwości onkogenne dla kurcząt (18).

Celem naszej pracy była izolacja i identyfikacja szczepu wirusa choroby Mareka. Stanowi to wstępny etap do dalszych badań w tym kierunku.

Materiał i metody

Źródło izolacji wirusa stanowiły kurczęta 12-tygodniowe pochodzące z naturalnego ogniska zakażenia. U ptaków tych stwierdzono anatomo-patologicznie, a następnie histopatologicznie, zmiany charakterystyczne dla choroby Mareka.

Jaja wylęgowe. Do wszystkich badań używano jaj wylęgowych pochodzących od kur rasy Leghorn Biały. W stadzie tym nie stwierdzano klinicznie i anatomo-patologicznie chorób nowotworowych drobiu. Do badań użyto 25 szt. piskląt jednodniowych typu broiler, zakupionych w zakładzie wylęgowym.

Przygotowanie hodowli komórkowych. Jednowarstwowe hodowle komórek nerki kurcząt przygotowywano wg metody własnej. Tkankę nerkową pobierano od kurcząt skrwawianych przed badaniem, siekano ją nożyczkami i zalewano 0,25% roztworem trypsyny przygotowanym w zbuforowanym roztworze soli fizjologicznej. Po 10-minutowej trypsynizacji zlewano płyn znad osadu i wlewano świeżą trypsynę. Trypsy-

nizację prowadzono przez 30 min. w temp. 37°C wstrząsając tkankę ręcznie w odstępach 5-minutowych. Strypsynizowane komórki sączono przez czterowarstwową gazę, a uzyskany przesącz wirowano przez 10 min. przy 400 obr./min. Osad komórkowy płukano płynem Earle'a i wirowano powtarzając zabieg trzykrotnie. Przemyte komórki nerki zawieszano w stosunku 1:200 w środowisku wzrostowym o składzie: płyn Earle'a z dodatkiem antybiotyków — 90% i surowica cielęca — 10%. Komórki zawieszone w płynie wzrostowym wlewano do butelek Legroux, zamykano korkami gumowymi i inkubowano przez 14 dni w temp. 37°C. Po 3—4 dniach uzyskiwano pełne pokrycie ściany naczynia jedną warstwą komórek. Zmieniano wówczas środowisko wzrostowe na utrzymujące o składzie: płyn Earle'a z dodatkiem antybiotyków — 98% i surowica cielęca 2%.

Zakażanie zarodków kury. Zastosowano metodę von Bülowa (7). Czterodniowe zarodki kury zakażano do woreczka żółtkowego. Materiał zakażający stanowiła zeskrobina hodowli komórek nerki kurcząt, wykazującej minimum 30% zmian cytopatycznych charakterystycznych dla zakażenia wirusem choroby Mareka. Jednorazowo wprowadzano po 0,2 ml zawiesiny, zawiarającej $\pm 10^4$ komórek w 1 ml.

Embriony inkubowano nadal przez 14 dni. Kontrolę próby stanowiły zarodki kury, którym w miejsce badanego materiału wprowadzano zeskrobinę z niezakażonej hodowli komórek nerki kurczęcia. Wykonanie próby jak wyżej.

Reizolacja wirusa z zakażonych zarodków kury. W 18 dniu inkubacji zakażonych jak wyżej zarodków, wyjmowano je na płytki Petriego, skrwawiano i badano anatomo-patologicznie. Do osobnych płytek przenoszono błony kosmówkowo-omoczniowe i poddawano badaniu. Po obejrzeniu wątroby i śledziony, usuwano z jamy ciała przewód pokarmowy wraz z wymienionymi narządami i pobierano tkankę nerkową. Z nerek zarodków przygotowywano jednowarstwowe hodowle komórkowe wg poprzednio podanej metody. Monolayery nerkowe inkubowano przez 14 dni w temp. 37°C prowadząc codzienną kontrole mikroskopową hodowli. Z zarodkami stanowiącymi grupę kontrolną próby postępowano wg powyżej podanego schematu.

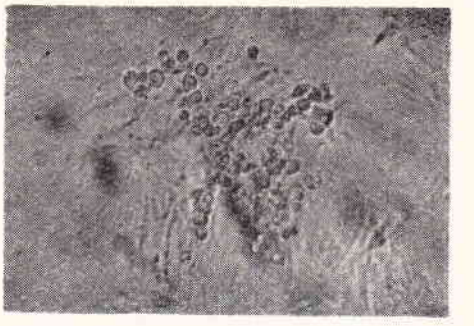
Zakażanie piskląt jednodniowych. Pisklęta zakażano dootrzewnowo. Materiał zakażający stanowiła zeskrobina hodowli nerki kurcząt, wykazującej minimum 30% zmian cytopatycznych charakterystycznych dla zakażenia wirusem choroby Mareka. Jednorazowo wprowadzano po 0,5 ml zawiesiny zawierającej $\pm 10^4$ komórek w 1 ml. Kurczęta obserwowano przez 10 tygodni. Kontrole próby stanowiło 10 szt. piskląt, którym w miejsce badanego materiału wprowadzano zeskrobinę z niezakażonej hodowli komórkowej. Pisklęta kontrolne przetrzymywano w izolatorach poza terenem przeznaczonym dla ptaków doświadczalnych.

Reizolacja wirusa od kurcząt. Po okresie 10 tygodniowej obserwacji kurczęta skrwawiano, badano anatomo i histopatologicznie. Do reizolacji wirusa pobierano tkankę nerkową, z której sporządzano jednowarstwowe hodowle komórkowe wg poprzednio podanej metody. Kurczęta grupy kontrolnej badano w ten sam sposób.

Badanie histopatologiczne. Do badania histopatologicznego pobierano wycinki z następujących narządów: wątroba, nerka, trzustka, żołądek gruczołowy, nerwy kulszowe, odcinek lędzwiowy rdzenia kręgowego oraz mózg. Po utrwaleniu tkanek w zbuforowanym roztworze formaliny, sporządzano skrawki parafinowe i barwiono je hematoksyliną- eozyną.

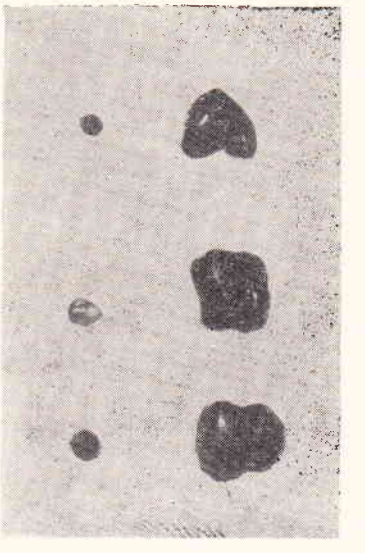
Wyniki

Zmiany cytopatyczne w jednowarstwowych hodowlach komórek nerki. Zarówno w przypadku izolacji oryginalnej od ptaków pochodzących z naturalnego ogniska zakażenia jak i reizolacji wirusa w hodowlach komórek nerki zarodków kury oraz kurcząt zakażonych eksperymentalnie, obserwowano zmiany cytopatyczne tego samego charakteru. Po 5—7 dniach inkubacji pojedyńcze komórki hodowli ulegały powiększeniu i zaokrągleniu, będąc tym samym wyraźnie widoczne na tle wrzecionowatych komórek nabłonka nerkowego. W dalszym etapie inkubacji hodowli tworzyły się skupiska komórek okrągłych — olbrzymich, silnie załamujących światło (ryc. 1).



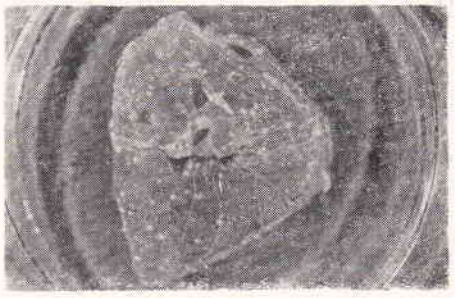
Ryc. 1. Zmiany cytopatyczne w jednowarstwowej hodowli komórek nerki kurcząt pochodzących z naturalnego ogniska zakażenia wirusem choroby Mareka.

Monolayery nerkowe zachowywały zazwyczaj swą ciągłość, tylko w nielicznych przypadkach obserwowaliśmy lizę tkanki i powstawanie ubytków w warstwie komórek hodowli. Najliczniejsze zmiany cytopatyczne stwierdzano w 9 dniu inkubacji hodowli. Mimo dalszego przetrzymywania monolayerów do 21 dni i dłużej, ilość ognisk nie zwiększała się wyraźnie. Powyższych zmian nie obserwowano w jednowarstwowych hodowlach komórek nerki kurcząt i zarodków kury stanowiących grupy kontrolne doświadczenia.



Ryc. 2. Powiększenie wątroby i śledziony oraz białe ogniska w śledzionie zarodków kury zakażonych szczepem WA-1 wirusa choroby Mareka. W górnej części zdjęcia wątroba i śledziona 18-dniowego zarodka kury niezakażonego.

Zarodki kury. Pięć procent zarodków zamarło między 5 a 18 dniem po zakażeniu. Badanie bakteriologiczne tych embrionów dało wynik negatywny. Pozostałe zarodki badane w 18 dniu lęgu były prawidłowo rozwinięte, co stwierdzono, porównując je z zarodkami grupy kontrolnej. Badanie anatomo-patologiczne zakażonych zarodków wykazało powiększenie wątroby i śledziony. W pojedyńczych przypadkach stwierdzano w śledzionie obecność białych guzków wielkości łebka szpilki (ryc. 2). W błonkach kosmówkowo-omoczniowych tych zarodków widoczne były liczne białe ogniska wielkości ziarna maku (ryc. 3). Podobnych zmian w zarodkach i na



Ryc. 3. Białe ogniska wielkości ziarna maku w błonie kosmówkowo-omoczniowej 18-dniowego zarodka kury, powstałe w wyniku zakażenia zarodków szczepem WA-1 wirusa choroby Mareka.

błonach zarodkowych nie obserwowano w przypadku embrionów kontrolnych.

Kurczęta zakażone. W czasie 10-tygodniowej obserwacji kurcząt zakażanych eksperymentalnie, u dwóch ptaków stwierdzono krótkotrwały, kilkudniowy niedowład kończyn dolnych. Dalsze dwie sztuki, wykazujące w 9 tygodniu po zakażeniu objawy ogólne, takie jak: wychudzenie, posmutnienie i utratę apetytu, padły po 6 dniach choroby. W badaniu sekcyjnym tych kurcząt obserwowano 2—3-krotne powiększenie wątroby i śledziony, powiększenie jajnika, kilkakrotne zgrubienie ściany żołądka gruczołowego oraz guzy o charakterze nowotworowym w mięśniu sercowym, płucach, mięśniach piersiowych i udowych. Badanie histopatologiczne kurcząt padłych, jak i skrwawionych w celu reizolacji wirusa, wykazało obecność nacieków komórek limfoidalnych w większości badanych narządów i tkanek. W ocenie zmian histopatologicznych posłużono się skalą wprowadzoną przez Wight'a (29), w odniesieniu do zmian w centralnym układzie nerwowym. Wyniki zestawiono w tab. 1. W grupie kurcząt kontrolnych nie obserwowano żadnych objawów klinicznych choroby, zmian anatomo- i histopatologicznych. W jednym przypadku stwierdzono w badaniu mikroskopowym pojedyńczy okołonaczyniowy naciek limfocytarny w mózgu.

Omówienie wyników

W hodowlach komórek nerki kurcząt pochodzących z ogniska zakażenia naturalnego, wykazano obecność efektu cytopatogennego charakterystycznego dla zakażenia wirusem choroby Mareka. Po 7 dniach inkubacji hodowli obserwowano, na tle wrzecionowatych komórek nabłonka nerki, obecność dużych pojedyńczych komórek okrągłych, silnie załamujących światło. W dalszym okresie inkubacji monolayerów tworzyły się skupiska zmienionych komórek, leżących w bezpośredniej styczności ze sobą, co może świadczyć o rozprzestrzenianiu się zakażenia od komórki do komórki. Jak stwierdzono bowiem w innych badaniach, wirus choroby Mareka nie uwalnia się z komórek do płynu hodowli (12, 16, 17, 19, 22, 25). W celu potwierdzenia wstępnej identyfikacji wirusa materiałem ze zmienionych hodowli komórkowych zakażano zarodki kury, w przypadku których po 14-dniowym okresie inkubacji stwierdzano charakterystyczne zmiany anatomo-patologiczne. Uzyskane przez nas wyniki potwierdzają doniesienia von Bülowa (7, 8) o patogennym działaniu wirusa choroby Mareka na rozwijające się zarodki kury. Przy braku podobnych zmian w zarodkach grupy kontrolnej oraz pozytywnej izolacji wirusa w hodowlach komórek nerki zarodków zakażanych doświadczalnie, należy sądzić, że obserwowane zmiany anatomo-patologiczne były wynikiem swoistego działania wirusa choroby Mareka. Do dalszej próby biologicznej użyto piskląt jednodniowych o nieznanym genotypie. Po 10 tygodniach od zakażenia dwa kurczęta padły i stwierdzono w ich przypadku obraz ana-

Tab. 1. Zmiany histopatologiczne w badanych narządach wewnętrznych i tkankach kurcząt zakażanych szczepem WA-1 wirusa choroby Mareka (podano wyniki 50% badanych kurcząt)

Nr ptaka	Badane narządy i tkanki						
	nerw kulszowy	rdzeń kręgowy	mózg	wątroba	nerka	trzustka	żołądek gruczołowy
1	—	+	+	++	+	+	—
2	—	+	+	++	—	—	—
3	±	++	+	++	+	+	±
4	—	+	—	+	+	—	±
5	+	±	—	+	+	—	+
6	±	±	—	+	+	+	±
7	—	±	+	+	+	+	+
8	+	++	+	++	+	+	+

Oznaczenie: — brak zmian charakterystycznych; ± pojedyńcze nacieki komórek limfoidalnych; + zmiany łagodne; ++ zmiany umiarkowane; +++ zmiany silne.

tomo-patologiczny charakterystyczny dla choroby Mareka. Część kurcząt skrwawionych w tym samym czasie wykazywała również zmiany nowotworowe w narządach wewnętrznych lecz były one słabiej nasilone. U wszystkich kurcząt zakażanych eksperymentalnie stwierdzano w badaniu histopatologicznym obecność nacieków komórek limfoidalnych w większości badanych narządów i tkanek. Reizolacja wirusa w hodowlach komórek nerki kurcząt zakażanych doświadczalnie, obecność zmian anatomo- i histopatologicznych u badanych ptaków potwierdza przypuszczenie, że czynnik cytopatyczny wyosobniony z kurcząt zakażonych naturalnie jest patogennym szczepem wirusa choroby Mareka. Szczep ten określono mianem WA-1 (Warszawa — 1). Dodatkowym potwierdzeniem powyższych spostrzeżeń były ujemne wyniki badań wirusologicznych, anatomo- i histopatologicznych ptaków grupy kontrolnej, skrwawionych w 10 tygodniu życia. Użycie do badań piskląt o nieznanej wrażliwości genetycznej na chorobę Mareka nie miało wyraźnego wpływu na wyniki badań wirusologicznych. Zdaniem Calneka i Hitchnera (10) oraz Spencera (26), konstytucja genetyczna może warunkować proces nowotworowy w organizmie oraz poziom namnażania się wirusa w tkankach. Nie ma ona jednak decydującego wpływu na ochronę ptaka przed zakażeniem wirusem choroby Mareka.

Wnioski

1. Z hodowli komórek nerki kurcząt zakażonych spontanicznie izolowano czynnik cytopatyczny, który jest wirusem choroby Mareka.

2. Nowoizolowany szczep wirusa jest patogenny dla zarodków kury, wywołując zmiany anatomo-patologiczne w narządach wewnętrznych zarodków oraz w błonach kosmówkowo-omoczniowych.

3. Szczep WA-1 wirusa choroby Mareka jest patogenny dla kurcząt typu broiler, u których wywołuje on charakterystyczne objawy kliniczne, zmiany anatomo- i histopatologiczne.

4. Szczep WA-1 jest pierwszym szczepem wirusa choroby Mareka wyizolowanym w kraju.

Piśmiennictwo

1. AAAP Workshop Summary, Avian Dis. 14, 820, 1970.
2. *Ahmed M., Schidlovsky G.:* J. Virol. 2, 1443, 1968.
3. *Biggs P. M.:* Brit. vet. J. 117, 326, 1961.
4. *Biggs P. M.:* Vet. Rec. 81, 583, 1967.
5. *Biggs P. M., Payne L. N.:* Vet. Rec. 75, 177, 1963.
6. *Biggs P. M., Payne L. N.:* J. Nat. Cancer. Inst. 39, 267, 1967.
7. *von Bülow V.:* Ber. Munch. Tierarztl. Wsch. 81, 365, 1968.
8. *von Bülow V., Ei:* Zbl. Vet. Med. B 16. 97, 1969.
9. *Calnek B. W., Adldinger H. K., Kahn D. E.:* Avian Dis. 14, 219, 1970.
10. *Calnek B. W., Hitchner S. B.:* J. Nat. Cancer Inst. 43, 935, 1969.
11. *Calnek B. W., Madin S. H., Kniazeff A. J.:* Am. J. Vet. Res. 30, 1403, 1969.
12. *Calnek B. W., Madin S. H.:* Am. J. Vet. Res. 30, 1389, 1969.
13. *Calnek B. W., Ubertini T., Adldinger H. K.:* J. Nat. Cancer Inst. 45, 341, 1970.
14. *Campbell J. G.:* Brit. vet. J. 117, 316, 1961.
15. *Churchill A. E.:* J. Nat. Cancer Inst. 41, 939, 1968.
16. *Churchill A. E., Biggs P. M.:* J. Nat. Cancer Inst. 41, 951, 1968.
17. *Churchill A. E., Biggs P. M.:* Nature (London) 215, 528, 1967.
18. *Churchill A. E., Chubb R. C., Baxendale W.:* J. Gen. Virol. 4, 557, 1969.
19. *Eidson C. S., Richey D. J., Schmittle S. G.:* Avian Dis. 13, 637, 1969.
20. *Epstein M. A., Achong B. G., Churchill A. E., Biggs P. M.:* J. Nat. Cancer Inst. 41, 805, 1968.
21. *Nazerian K., Burmester B. R.:* Cancer Res. 28, 2454, 1968.
22. *Nazerian K., Solomon J. J., Witter R. L., Burmester B. R.:* Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 127, 177, 1968.
23. *Purchase H. G.:* Cancer Res. 30, 1898, 1970.
24. *Purchase H. G., Biggs P. M.:* Res. Vet. Sci. 8, 440, 1967.
25. *Solomon J. J., Witter R. L., Nazerian K., Burmester B. R.:* Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 127, 173, 1968.
26. *Spencer J. L.:* Avian Dis. 13, 753, 1969.
27. *Spencer J. L., Calnek B. W.:* Am. J. Vet. Res. 31, 345, 1970.
28. *Ubertini T., Calnek B. W.:* J. Nat. Cancer Inst. 45, 507, 1970.
29. *Wight P. A. L. J.:* Comp. Path. Ther. 72, 40, 1962.

Adres autora: dr wet. Witold Golnik, Warszawa, ul. Grochowska 272.

Гольник В. — **Выделение вируса из случая острой формы болезни Марека у цыплят.**

Вирус, вызывающий характерные для вируса Марека цитопатические изменения, выделили в культурах клеток почки цыплят происходящих из очага этого заболевания. Полученный штамм вызывал макроскопические изменения в печени, в селезенке и на хорион-аллантоидных оболочках эмбрионов кур. Он оказался патогенным также для цыплят — бройлеров у которых он вызывал характерные клинические, анатомические и гистопатологические изменения. Изолированный штамм Wa 1 (Warszawa — 1) является первым изолированным в стране штаммом вируса Марека.

Golnik W. — **A virus strain isolated from chickens showing the symptoms of acute Marek's disease.**

In the cultures of kidney cells, derived from naturally infected chickens with symptoms of Marek's disease. an agent showing cytopathic effect has been isolated. The new isolated strain was pathogenic for chicken embryos and chicks and produced changes characteristic of Marek's disease. The strain designated as WA-1 is the first strain of MD virus isolated in Poland.

TESKE R. H., ROLLINS L. D., CARTER G. G.: Stężenie penicyliny i dehydrostreptomycyny w surowicy wołów po jednorazowym lub kilkakrotnym stosowaniu. (Penicillin and dihydrostreptomycin serum concentrations after administration in single or repeated doses to feeder steers). J. Am. vet. med. Ass., 160, 873—878, 1972 (6).

Badania przeprowadzono na 16 wołach o wadze 182—314 kg. 7 wołom z grupy pierwszej podano jednorazowo 33 tys. jm. penicyliny prokainowej G i 41,25 mg dehydrostreptomycyny na kg wagi ciała. Zwierzętom z drugiej grupy podano domięśniowo 6,600 jm penicyliny i 8,25 mg streptomycyny na kg wagi ciała na dzień, przez 4 kolejne dni. Po jednorazowej iniekcji maksymalny poziom penicyliny w surowicy (7,2 jm) uzyskiwano po 1—3 godzinach, po 24 godz. stężenie penicyliny w surowicy wynosiło 0,25 jm, a po 36 godz. 0,05 jm. Przy stosowaniu kilkakrotnym mieszanki penicyliny ze streptomycyną maksymalny poziom penicyliny w surowicy 2,24 jm/ml, uzyskiwano po 1 godz. po iniekcji. Po 12 godz. poziom penicyliny w surowicy wynosił 0,17 jm, a po 24 godz. 0,22 jm/ml. Średnie maksymalne stężenie streptomycyny wynoszące 105 μg/ml surowicy uzyskano po jednorazowym podaniu mieszanki antybiotyków po 1 godzinie. Maksymalne stężenie streptomycyny w surowicy po iniekcji małych dawek mieszaniny antybiotyków wynosił 23,4 μg/ml surowicy. Pozostałość penicyliny stwierdzano w mięśniach w miejscu iniekcji przez okres do 60 dni.

Z.