

нинов на 7-14 день после заражения. Самый высокий титр (до 1/32) наблюдали между 2 и 4 недель после заражения. Потом наступало постепенное понижение титра. Клинические симптомы в виде носовых истечений и отека суборбитальных синусов появились только у части цыплят за одну неделю после заражения. Анатомопатологические изменения наблюдали ещё в 6 недель после заражения. Реизоляция палочек *H. gallinarum* из зараженных птиц удавалась еще в 5 недель после заражения.

Różańska M., Karczewski W. — **Agglutination test in chickens infected with *Haemophilus gallinarum*.**

The level of specific antibodies was examined in chickens infected artificially with three strains of

H. gallinarum. As an antigen there was used the suspension of *H. gallinarum* (strain CCM-50515) inactivated with formalin. In most infected chickens, examined every week, there was found an increase of antibodies within 7—14 days since infection. The highest levels (up to 1:32) were observed between 2—4 week after infection, and then there was noted a slow decrease of antibodies. Clinical symptoms in the form of oedema of the infraorbital sinuses and the outflow from the nose appeared only in some chickens within a week after infection, but anatomopathological changes were stated still in the sixth week. *H. gallinarum* was being isolated up to 5th week after infection.

WITOLD GOLNIK, JOANNA GOLNIK

Występowanie swoistych antygenów wirusowych w skórze kurcząt zakażonych wirusem choroby Mareka

Z Instytutu Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych Wydziału Weterynaryjnego AR we Wrocławiu

Wyizolowanie wirusa grupy *Herpes B* w hodowlach komórkowych zakażonych homogenatami guzów nowotworowych lub krwią pobraną od kurcząt zakażonych naturalnie, udokumentowało sugerowaną od dawna, wirusową etiologię choroby Mareka (3, 7).

W większości tkanek zakażonego organizmu ptaka oraz w hodowlach komórkowych wirus syntetyzowany jest w postaci cząstek niekompletnych, pozbawionych osłonki zewnętrznej, ściśle związanych z żywymi komórkami gospodarza. Bardziej szczegółowe badania lokalizacji wirusa w tkankach zakażonych kurcząt wykazały, że miejscem pełnej replikacji wirusa choroby Mareka jest nabłonek brodawek piór, w którym syntetyzowane są kompletne wiriony, posiadające osłonkę zewnętrzną, odznaczające się znaczną przeżywalnością w środowisku zewnętrznym (1).

W komórkach zakażonych wirusem choroby Mareka stwierdza się swoiste antygeny, wykrywane między innymi w odczynie immunofluorescencji lub precypitacji w żelu agarowym. Najwyższe koncentracje tych antygenów występują w nabłonku brodawek piór oraz w dudkach piórowych (1, 5, 6, 8).

Celem naszej pracy było określenie częstotliwości występowania antygenów immunofluorescencyjnych w skórze oraz antygenów immunofluorescencyjnych i precypitujących w dudkach piór kurcząt zakażonych doświadczalnie szczepem WA-1 wirusa choroby Mareka.

Materiał i metody

Pisklęta kury — do badań użyto 47 piskląt jednolitych (White Rock x Cornish) zakupionych w zakładzie wylęgowym. Grupę doświadczalną stanowiły 24 pisklęta zakażone wirusem choroby Mareka wg poprzednio podanej metody (4), grupę kontrolną —

23 szt. niezakażone. Ptaki obu grup przetrzymywano w pomieszczeniach ściśle izolowanych, odkażanych okresowo promieniami UV. Po 8 tygodniach od infekcji kurczęta skrwawiano i pobierano od nich wycinki skóry oraz dudek piórowych z pasów udowych (*pterylae femorales*) i pasów podudowych (*pterylae crurales*) do badań immunofluorescencyjnych i precypitacji w żelu agarowym oraz tkanek nerkową do prób izolacji wirusa choroby Mareka w bezpośrednich hodowlach komórkowych.

Szczep wirusa — do zakażenia piskląt użyto szczepu WA-1 wirusa choroby Mareka, namnożonego w jednowarstwowych hodowlach komórek nerki kury (4).

Surowice odpornościowe i normalne — w badaniach zastosowano:

a. surowicę odpornościową kurcząt zakażonych wirusem choroby Mareka

b. normalną surowicę kury

c. surowicę odpornościową kury wyprodukowaną z użyciem szczepu 1209 wirusa zakaźnego zapalenia krtań i tchawicy kur, otrzymanego z Central Veterinary Laboratory Weybridge, Wielka Brytania.

Przed badaniem wszystkie surowice inaktywowano w temp. 56°C przez 30 min., następnie przechowywano je w temp. -25°C.

Antygeny wirusa choroby Mareka — do identyfikacji i prób kontrolnych w metodzie precypitacji w żelu agarowym zastosowano antygen A wirusa choroby Mareka, produkcji firmy Behringwerke, seria 2U/73.

Odczyn immunofluorescencji bezpośredniej — próbę wykonano wg poprzednio podanej metody (8), stosując nieznaczne modyfikacje własne. Odpornościową surowicę kury, zawierającą przeciwciała precypitujące skierowane przeciw wirusowi choroby Mareka, znakowano izotiocjanianem fluoresceiny, rozcieńczano w zbuforowanym roztworze fizjologicznym NaCl o pH 7,3 (PBS) i absorbowano pudrem acetonowym z wątroby mysich.

Zamrożone wycinki skóry i dudek piórowych krojono w kryostatcie na skrawki o grubości 5 mikronów i utrwalano w acetonie. Na preparaty nakraplano znakowaną surowicę rozcieńczoną w PBS w stosunku 1:32 i oglądano je w ciemnym polu mikroskopu immunofluorescencyjnego Reichert Zetopan, zaopatrzonego w lampę rtęciową HBO-200.

W próbach kontrolnych zastosowano: a) absorpcję znakowanej surowicy odpornościowej pudrem acetonowym z piór kurcząt zakażonych wirusem choroby Mareka, b) absorpcję znakowanej surowicy pudrem acetonowym z piór kurcząt niezakażonych wirusem choroby Mareka, c) blokowanie immunofluorescencji nieznakowaną surowicą kury, zawierającą przeciwciała skierowane przeciw wirusowi choroby Mareka, normalną surowicą kury oraz PBS.

Odczyn precypitacji w żelu agarowym — badanie wykonano wg poprzednio podanej metody (2), wprowadzając nieznaczne modyfikacje. Zastosowano środowisko żelowe o składzie: agar Difco Special Noble — 1,5%, NaCl — 8% i woda destylowana. Antygen badany stanowiły 10% rozciery dudek piórowych w PBS pobranych od kurcząt zakażonych wirusem choroby Mareka, reagujące wobec odpornościowej surowicy kury, zawierającej przeciwciała precypitujące, skierowane przeciw wirusowi choroby Mareka.

W próbach kontrolnych zastosowano rozciery dudek piórowych kurcząt niezakażonych wirusem choroby Mareka, rozciery piór kurcząt zakażonych wirusem zakaźnego zapalenia krtani i tchawicy kury oraz normalną surowicę kury i surowicę odpornościową kury, zawierającą przeciwciała precypitujące przeciw wirusowi zakaźnego zapalenia krtani i tchawicy kur.

Próba izolacji wirusa choroby Mareka — z nerek pobranych od wszystkich kurcząt grup doświadczalnej i kontrolnej przygotowano jednowarstwowe hodowle komórkowe jak poprzednio (4). Zawieszinę komórek w środowisku wzrostowym wlewano do butelek Le-groux i probówek Leighton, zawierających szkiełka nakrywkowe i zamykano korkami gumowymi. Hodowle inkubowano przez 14 dni w temp. 37°C. Obecność wirusa w hodowlach komórkowych określano na podstawie stwierdzanych zmian cytopatycznych oraz występowania antygenów wirusowych wykrywanych metodą immunofluorescencji.



Ryc. 1. Barwienia immunofluorescencyjne w powierzchniowej warstwie dudki pióra kurczęcia zakażonego wirusem choroby Mareka

Wyniki

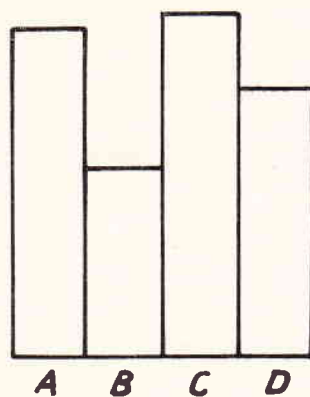
Immunofluorescencja — intensywne świecenia jasnozielone obserwowano w komórkach powierzchniowych warstw naskórka brodawek piór oraz w zewnętrznej zrogowaciałej warstwie dolnych odcinków dudek piórowych. W preparatach skóry były to świecenia w postaci złożeń ziarnistych rozłożonych ogniskowo w nabłonku brodawek piór. Świecenia stwierdzano w 12 z 24 przebadanych wycinków skóry. Od każdego kurczęcia pobierano ponadto 5—6 dudek piórowych, które zatapiano w żelatynie

tak, by w skrawkach uzyskać ich przekroje poprzeczne. W 22 z 24 preparatów obserwowano intensywne świecenia w postaci złożeń ziarnistych o układzie liniowym w powierzchownych, zrogowaciałych warstwach dudki pióra.

Hamowanie reakcji immunofluorescencji obserwowano po nawarstwieniu na preparaty skóry i piór surowicy nieznakowanej, zawierającej przeciwciała przeciw wirusowi choroby Mareka. Barwienie wstępne surowicą normalną kury i PBS nie dawało reakcji blokowania.

Intensywne świecenia jasnozielone w piórach kurcząt zakażonych wirusem choroby Mareka nie wygasły po absorpcji odczynnika znakowanego pudrem acetonowym z piór kurcząt niezakażonych. Odczynnik absorbowany pudrem z piór kurcząt zakażonych wirusem choroby Mareka nawarstwiony na znane preparaty dodatnie, zawierające antygen wirusowy, nie wywoływał świecenia immunofluorescencyjnych.

W przypadku kurcząt grupy kontrolnej nie stwierdzano żadnych barwień immunofluorescencyjnych w badanych wycinkach skóry i dudedk piórowych.



Ryc. 2. Porównanie wyników wykrywalności wirusa choroby Mareka lub jego antygenów w wybranych tkankach kurcząt

Objaśnienia: A = izolacja wirusa w bezpośrednich hodowlach komórek nerki (87,5%); B = antygen IF w skórze (50%); C = antygen IF w dudedkach piórowych (90,1%); D = antygen precypitujący w dudedkach piórowych (70,5%).

Precypitacja w żelu agarowym — między antygenem, który stanowiły homogenaty dudedk piórowych kurcząt zakażonych wirusem choroby Mareka a odpornościową surowicą kury, zawierającą swoiste przeciwciała precypitujące, tworzyła się po 24 — 72 godz. od wykonania badania jedna linia precypitacyjna, zlokalizowana zazwyczaj w pobliżu basenu z antygenem. Dodatnie wyniki immunodyszfuzji w żelu agarowym uzyskano w przypadku 18 z 24 badanych homogenatów piór kurcząt zakażonych. Wysoki odsetek reakcji pozytywnych obserwowano już po 24 godz. od wykonania próby, w miarę dalszej inkubacji płytek agarowych z badanymi materiałami odsetek wyników dodatnich wzrastał nieznacznie. Te same antygeny nie precypitowały z normalną surowicą kury oraz surowicą odpornościową przeciw wirusowi zakaźnego zapalenia krtani i tchawicy kur.

Antygeny kontrolne — rozciery piór kurcząt niezakażonych wirusem choroby Mareka, homogenaty piór kurcząt zakażonych wirusem zakaźnego zapalenia krtani i tchawicy kur oraz PBS nie miały właściwości precypitujących wobec wszystkich zastosowanych surowic. Rozciery piór kurcząt grupy kontrolnej — niezakażonych wirusem choroby Mareka — nie wykazywały obecności antygenów precypitujących wobec użytych surowic.

Precypitaty utworzone między homogenatami piór kurcząt zakażonych jak i antygen A wirusa choroby Mareka a odpornościową surowicą kury, zawiera-

jąca precypityny skierowane przeciw wirusowi choroby Mareka, były identyczne, a końce łuków precypitacyjnych połączyły się ze sobą. W powyższym badaniu zastosowano antygeny i surowice kontrolne jak poprzednio.

Izolacja wirusa choroby Mareka — w bezpośrednich hodowlach komórek nerki kurcząt zakażonych wirusem choroby Mareka, po 4—9 dniach wzrostu kultury, obserwowano ogniska komórek okrągłych, silnie załamujących światło. Hodowle komórkowe, wykazujące zmiany cytopatyczne, badane z zastosowaniem odczynu immunofluorescencji bezpośredniej, wykazywały swoiste dla zakażenia wirusem choroby Mareka barwienia immunofluorescencyjne, zlokalizowane w zmienionych komórkach. W 14-dniowych hodowlach komórek nerki, które nie wykazywały zmian cytopatycznych nie stwierdzano barwień immunofluorescencyjnych. Dodatkowo wyniki izolacji wirusa uzyskano w przypadku 21 z 24 hodowli komórkowych przygotowanych z nerek kurcząt zakażonych wirusem choroby Mareka. W bezpośrednich hodowlach komórek nerki kurcząt grupy kontrolnej nie stwierdzano zmian cytopatycznych w ciągu 14-dniowego okresu obserwacji ani też barwień immunofluorescencyjnych.

O mówienie wyników

W brodawkach piór, pobranych w okolicy udowej i podudowej skóry kurcząt zakażonych wirusem choroby Mareka, obserwowano w 50% badanych preparatów jasnozielone świecenia immunofluorescencyjne, zlokalizowane w komórkach powierzchniowych warstw naskórka. Barwienia te były hamowane przez nieznakowaną surowicę kury, zawierającą przeciwciała skierowane przeciw wirusowi choroby Mareka, podczas gdy traktowanie preparatów tkankowych normalną surowicą kury nie dawało reakcji blokowania immunofluorescencji. Na podstawie powyższych wyników, potwierdzonych negatywnym wynikiem badania wycinków skóry kurcząt niezakażonych, można sądzić, że jasnozielone barwienia immunofluorescencyjne, stwierdzone w powierzchniowych warstwach naskórka okrywającego brodawki piór są swoiste dla zakażenia wirusem choroby Mareka, stanowiąc tym samym potwierdzenie wyników uzyskanych przez innych autorów (1, 8).

Badając dolne odcinki dudek piórowych, pobranych od kurcząt zakażonych wirusem choroby Mareka, wykazano obecność antygenów immunofluorescencyjnych, zlokalizowanych w powierzchniowych warstwach dudki. Negatywne wyniki badań kontrolnych pozwalają przypuszczać, że jasnozielone barwienia immunofluorescencyjne, stwierdzone w dudkach piór kurcząt zakażonych wirusem choroby Mareka są swoiste dla zakażenia.

Wyniki uzyskane przy zastosowaniu metody immunofluorescencji potwierdzono metodą precypitacji w żelu agarowym, uzyskując 70,5% swoistych precypitatów, utworzonych między homogenatami dudek piórowych kurcząt zakażonych wirusem choroby Mareka a odpowiednią surowicą odpornościową. Jako że linii precypitacyjnych nie obserwowano w przypadku antygenów i surowic kontrolnych oraz badając homogenaty piór kurcząt niezakażonych wirusem choroby Mareka, uzyskane w badaniu wyniki

dotądnie można uznać za specyficzne. Ponieważ linie precypitacyjne uformowane między antygenem zawartym w dudkach piórowych a antygenem A wirusa choroby Mareka były podobne a końce łuków precypitacyjnych połączyły się ze sobą, pozwala to sądzić o tożsamości antygeny występującego w dudkach piórowych z antygenem A, uzyskiwanym z hodowli komórkowych, zakażonych patogennymi szczepami wirusa choroby Mareka.

Porównując wyniki badania wycinków piór metodą immunofluorescencji z odsetkiem wyników dodatnich, uzyskanych w odczynie precypitacji w żelu agarowym, stwierdza się wysoką wykrywalność antygenów wirusa choroby Mareka w obu wyżej wymienionych próbach. Swoiste barwienia immunofluorescencyjne stwierdzano w 90,1% preparatów, dodatnie wyniki precypitacji uzyskano w 70,5% przypadków.

O wyższej czułości metody immunofluorescencji decyduje możliwość wykrywania z jej pomocą nawet pojedynczych komórek zakażonych wirusem, podczas gdy jednym z warunków uzyskania dodatnich wyników w odczynie precypitacji w żelu agarowym jest stosowanie znacznych koncentracji antygenów i przeciwciał oraz ich odpowiedni stosunek ekwiwalentny.

Wysoki odsetek prób dodatnich (87,5%) uzyskano stosując metodę izolacji wirusa choroby Mareka w bezpośrednich hodowlach komórek nerki kurcząt, jednak z uwagi na trudności techniczne oraz konieczność potwierdzania swoistości efektu cytopatycznego z użyciem np. metody immunofluorescencji, próba ta nie znajduje prawdopodobnie szerszego zastosowania praktycznego. Natomiast biorąc pod uwagę łatwość w uzyskiwaniu materiału oraz wysoką swoistość prób, wykrywanie antygenów wirusa choroby Mareka w dudkach piórowych z zastosowaniem odczynu immunofluorescencji lub precypitacji w żelu agarowym, może stanowić, naszym zdaniem, przydatną metodę rozpoznawania zakażeń wirusem choroby Mareka u kurcząt i kur.

Piśmiennictwo

1. Calnek H. W., Adldinger H. G., Kahn D. A.: Avian Dis. 14, 219, 1970.
2. Cunningham C. H.: Burgess Publ. Comp., Minneapolis, Minn. 1966.
3. Churchill A. E., Biggs P. M.: Nature, London, 215, 528, 1967.
4. Golnik W.: Medycyna Wet. 29, 20, 1973.
5. Haider S. A., Lapen R. F., Kenzy S. G.: Poultry Sci. 49, 1654, 1970.
6. Marquardt W. W.: Appl. Microbiol. 23, 942, 1972.
7. Nazerian K., Solomon J. J., Witter R. L., Burmester B. R.: Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 127, 177, 1968.
8. Purchase H. G.: Cancer Res. 30, 1898, 1970.

Adres autora: dr Witold Golnik, pl. Grunwaldzki 45, 50-366 Wrocław.

Гольник В., Гольник И.О. — Появление специфических вирусных антигенов в коже цыплят зараженных вирусом болезни Mareka.

У цыплят зараженных искусственно в первый день жизни штаммов Wa-1 вируса болезни Mareka

исследовали появление иммунофлуоресцентных (ИФ) антигенов в коже а ИФ и преципитирующих антигенов в очинах перьев. В 8 недель после заражения наблюдали специфическую ИФ окраску в коже в 50%, а в очинах перьев в 90,1% случаев а преципитирующий антиген установили в 70,5% исследованных перьевых гомогенатов. Выделение вируса в непосредственных культурах клеток почек получили в 87,5% исследованных культур клеток.

Авторы считают, что обнаружение иммунофлуоресцентных и преципитирующих антигенов в очинах перьев может представлять собой хороший метод диагноза инфекции цыплят и кур вирусом болезни Марека.

Golnik W., Golnik J. — **The incidence of live antigens in the skin of chickens infected with Marek's disease virus.**

The incidence of immunofluorescent and precipitating antigens in the skin and feather tips was studied in chickens at the age of one day infected with the strain of Marek's disease herpesvirus WA-1. Eight weeks after the infection immunofluorescent antigens were revealed in feather follicle epithelium (50%) and feather tips (90.1%). The precipitating antigens in feather tips were detected in 70.5% of feather homogenates. The reisolation of Marek's disease herpesvirus in cell culture was positive in 87.5%. The examinations of feather tips toward the immunofluorescent and precipitating antigens seems to be a useful diagnostic method of Marek's disease infection in chickens.

JAN KOŁACZ

Badania nad skutecznością wybranych insektycydów fosforoorganicznych w zwalczaniu hypodermatozy bydlę

Z Instytutu Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych Wydziału Weterynaryjnego AR w Warszawie

Poznanie biologii gza bydlęcego (*Hypoderma* sp.), a przede wszystkim wykazanie, że praktycznie jedynym żywicielem ostatecznym, w którym może odbyć się cały cykl rozwoju larwalnego, jest bydlę oraz stwierdzenie faktu bardzo ograniczonego zasięgu lotu owada — stworzyło podstawy do twierdzenia, że istnieje realna szansa całkowitej likwidacji tego pasożyta w określonych rejonach. Podstawowe wyniki badań na biologią rodzaju *Hypoderma* sp. zostały zebrane przez Bishopp'a i wsp. (4), Scharff'a (41), Beesley'a (2, 3), Breyev'a (5), a w Polsce przez Marańskiego (21, 23).

Znaczne rozprzestrzenienie gza bydlęcego w kraju (14, 18, 21, 42, 45) i wynikające z tego straty gospodarcze (21) stwarzały potrzebę podjęcia skutecznej z nim walki. W Polsce próby takie podejmowane w latach 1948—1958, lecz jak się okazało bez spodziewanych efektów. Zastanawiając się nad przyczynami nieskuteczności prowadzonej od szeregu lat akcji Marański (21) doszedł do wniosku, że wynika ona z konieczności wielokrotnego powtarzania zabiegów — w miarę podchodzenia larw pod skórę bydlę. Wymagała tego zalecana wówczas metoda zwalczania gza bydlęcego, a to dlatego, że dostępne leki działały wyłącznie w tym stadium rozwoju pasożyta. W przeprowadzonym w latach 1955—1957 eksperymencie autor ten wykazał, że skrupulatne wykonywanie zabiegów niszczenia larw gza bydlęcego — pięciokrotnie w odstępach miesięcznych — doprowadziło do całkowitej likwidacji tego pasożyta w centrum rejonu doświadczalnego, a w rejonach peryferyjnych nasilenie inwazji znacznie się obniżyło. Wyniki badań Marańskiego z jednej strony potwierdziły

możliwość pełnej dewastacji gza bydlęcego z określonych rejonów, z drugiej jednak strony wykazały niepraktyczność w masowym stosowaniu zalecanych metod zwalczania tego pasażera.

Wydaje się, że przełomowym momentem w walce z hypodermatozą bydlę był opracowanie środków chemicznych niszczących larwy pasożyta niezależnie od okresu i miejsca ich przebywania w organizmie zwierzęcia, a więc takich, których działanie miało charakter systemowy. Publikowane na ten temat prace początkowo dotyczyły chlorowanych węglowodórów (13, 37), ale gdy po raz pierwszy wykazano, że trichlorfen, preparat z grupy estrów organicznych kwasu fosforowego, jest wysoce skuteczny na larwy gza bydlęcego (25), na tę grupę związków chemicznych zwrócono szczególną uwagę. Historia wprowadzania insektycydów fosforoorganicznych jako leków o działaniu owadobójczym została szczegółowo zebrana w pracach Mc Gregor'a i Bushland'a (26), Lindquist'a i Knipling'a (17), Drummond'a (9), Bushland'a i wsp. (6) oraz Drummond'a i Graham'a (11). Preparaty tej grupy mają zdecydowaną przewagę nad poprzednio stosowanymi środkami przede wszystkim dlatego, że niszczą larwy gza bydlęcego niezależnie od miejsca ich przebywania w organizmie zwierzęcia (larwy wędrujące). Zastosowane w początkowym okresie inwazji pozwalają na uniknięcie strat powstałych w wyniku wielomiesięcznego przebywania pasożyta w zwierzęciu. Poza tym preparaty te, nawet po jednokrotnym zastosowaniu, wykazują bardzo wysoką skuteczność.