

5. Dostrovsky A., Raubitschek F.: *Dermatologia* (Basel) 92, 231, 1947.
6. Emyaniloff R. G., Hashimoto T.: *Can. J. Microbiol.* 25, 362, 1979.
7. Heidenblauth J.: *Arch. Klin. Exp. Dermatol.* 220, 382, 1964.
8. King R., Dillavou C. L., Greenberg H., Jeppsen J. C., Jaeger J. S.: *Can. J. Microbiol.* 22, 1720, 1976.
9. Malten K. E., Thiele F. A. J.: *Br. J. Dermatol.* 89, 565, 1973.
10. Meevootisom V., Niederpruem D. J.: *Sabouraudia* 17, 91, 1979.
11. Nickerson W. J., Jillson O. F.: *Mycopathologia* 4, 279, 1948.
12. Wawrzekiewicz K., Ziolkowska G.: *Medycyna Wet.* 39, 539, 1983.

Adres autora: prof. dr hab. Krystyna Wawrzekiewicz, ul. Chrobrego 1/19, 20-611 Lublin

Вавжекевич К., Верцинский Я., Зюлковская Г. — Ингибиционное действие *Candida pseudotropicalis* на рост *Trichophyton verrucosum*

В исследованиях использовали 4 штамма рода *Trichophyton*, а также 9 штаммов рода *Candida*. Среди исследуемых первично сумчатых грибов рост *T. verrucosum* тормозили штаммы *C. pseudotropicalis* и *C. albicans*, образующие наибольшее количество углекислого газа. Ингибиционный эффект CO_2 обуславливался наглядным образом составом питательной среды, на которой размноживали *T. verrucosum*. В атмосфере CO_2 полное заторможение роста *T. verrucosum* отмечалось только на среде Сабуро с добавкой 4% глюкозы; с понижением содержания сахара в среде наблюдалась интенсификация на-

множения гриба. Лактоза, галактоза, сахароза и глюконовая кислота в этих условиях вызывали частичную ингибицию роста дерматофита, нормальное же развитие гриба отмечалось на средах с мальтозой, маннитом, сорбитом и на среде без сахара.

Wawrzekiewicz K., Wierciński J., Ziolkowska G. — Inhibitory effect of *Candida pseudotropicalis* on the growth of *Trichophyton verrucosum*

The examinations were carried out using four strains of *Trichophyton* sp. and nine of *Candida* sp. Out of the yeasts under study the inhibitory action on the growth of *T. verrucosum* displayed *C. pseudotropicalis* and *C. albicans* producing the highest amounts of CO_2 . The restraining effect of CO_2 was associated with the composition of medium used to multiply *T. verrucosum*. In the atmosphere of CO_2 an entire inhibition of *T. verrucosum* growth took place on Sabouraud's medium with the addition of 4 per cent glucose; along with a decrease of the content of sugar in the medium there was observed the higher intensity of the fungus growth. Lactose, galactose, sucrose, and gluconic acid brought about a partial inhibition of the dermatophyte growth, while a normal growth of the fungus appeared on the media with maltose, mannitol, sorbitol, and on the medium without sugar.

JACEK WÓJCIK, ZYGMUNT PEJSK

Isolacja parwowirusa świń w Polsce

Zakład Badania Chorób Świń Instytutu Weterynarii, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Zakażenia parwowirusowe świń (PPV) uznane zostały powszechnie (9) za jedną z istotnych przyczyn zaburzeń w rozrodzie trzody chlewnej, stanowiąc przy tym poważny problem ekonomiczny i epizootologiczny. Zakażenia PPV są szczególnie niebezpieczne dla dużych stad świń, charakteryzujących się znaczną rotacją loch stada podstawowego. W takich stadach, w przypadku naturalnej infekcji, następuje łatwe szerzenie się wirusa i w krótkim czasie zakażeniu ulega znaczna liczba zwierząt. Największe straty ponosi się wówczas, gdy zakażeniu ulegną samice będące w pierwszym trymestrze ciąży. Liczba prosiąt w miocie urodzonych żywo przez takie samice może zmniejszyć się z 8,1 do 3,6 (5).

W Polsce brak jest dotychczas publikacji dotyczących zakażeń świń PPV. Z tego względu uznano za celowe podjęcie wielokierunkowych badań, zmierzających do ewentualnego stwierdzenia występowania wymienionych zakażeń.

Materiał i metody

Do badań użyto tkanek martwo urodzonych płodów pochodzących od lochy, u której miano przeciwciał w odczynie zahamowania hemaglutynacji (HI) na 2 tyg. przed porodem wynosiło 2048. Użyto nerek i płuc płodu zмумifikowanego (IW₁) oraz płuc płodu obumarłego w końcowym okresie ciąży (IW₂). Sporządzony z tkanek rozcier zawieszano w płynie

Eagle'a w stosunku 1 cm³ tkanki/10 ml płynu uzupełnionego penicyliną (1000 j.m./1 ml), streptomycyną (1000 g/1 ml) oraz fungizolem (2,5 mg/1 ml). Przygotowaną zawiesinę pozostawiono w temperaturze pokojowej na okres 1 h, następnie wirowano z szybkością 3000 obr./min przez 30 min. Uzyskany supernatant używano do dalszych badań.

Do izolacji wirusa użyto pierwotnej hodowli nerki świni PPK (primary porcine kidney) przygotowanej z nerek 3 tyg. prosiąt według ogólnie przyjętych zasad. Jako płynu wzrostowego użyto płynu Hanksa z dodatkiem 15% płodowej surowicy bydlęcej, penicyliny (100 j.m./1 ml) i streptomycyny (100 ug/1 ml). Po 48 godz. inkubacji w 37°C zmieniono płyn Hanksa na Eagle'a (MEM), który uzupełniono surowicą płodową i antybiotykami w proporcjach podanych wyżej. Jednowarstwową hodowlę komórkową (PPK) w butelkach Legroux oraz probówkach Leightona uzyskano po następnych 24 godzinach. Hodowlę komórkową badano w kierunku endogennych zakażeń PPV metodą immunofluorescencji z zastosowaniem referencyjnej koniugaty anty PPV wyprodukowanej w NADL USA. W badaniach stosowano również hodowlę linii ciągłej nerki świni PK-15.

Isolację wirusa wykonano dwoma sposobami (I, II).

I. 72 godzinna hodowla PPK w butelkach Legroux i probówkach Leightona zakażano supernatantem uzyskanym z płuc płodów IW₁ i IW₂ oraz nerki płodu IW₁. Adsorpcję badanego materiału przeprowadzono w temp. 37°C przez 1 godz. Jako płyn utrzymujący stosowano płyn Eagle'a z dodatkiem 1% płodowej surowicy bydlęcej oraz antybiotyków w ogólnie przyjętych ilościach. Do zakażenia hodowli PPK użyto 2 ml supernatantu na butelkę Legroux oraz 0,2 ml na probówkę Leightona. Kontrolę stanowiły nie zakażone hodowle PPK.

II. Wykonano pasaż 72-godzinnej hodowli PPK.

Supernatant dodawano w ilości 2 ml/butelkę Legroux i 0,2 ml/probówkę Leightona bezpośrednio do zawieszonych w płynie wzrostowym (płyn Eagle'a, 15% płodowej surowicy bydlęcej, antybiotyki) komórek. Po 48 h inkubacji w 37°C płyn wzrostowy zmieniono na utrzymujący. Podobnie postępowano z nie zakażoną hodowlą, która stanowiła kontrolę.

Po upływie 4 — 5 dni od zakażenia hodowle komórkowe w próbkach Leightona badano odczynami hemaglutynacji (HA) i zahamowania hemaglutynacji na obecność PPV. W przypadku dodatniego wyniku tych testów zakażone hodowle w butelkach Legroux poddawano trzykrotnemu zamrożeniu i rozmrożeniu. Otrzymaną zawiesinę odwirowano (3000 obr./min przez 20 min) część uzyskanego w ten sposób supernatantu stanowiła materiał do dalszych badań.

Odczyn HA wykonano metodą mikro przy użyciu zestawu firmy Cook w sposób opisany przez Joo (10) i Hierholzera (6) oraz w próbkach metodą makro podaną przez Mengelinga (13). Używano 1% zawiesiny erytrocytów świnki morskiej w roztworze fizjologicznym o pH 7,2. Odczytu dokonano po 1 h (metoda mikro) i po 2 h (metoda makro) inkubacji w temperaturze pokojowej.

Odczyn HI wykonano ze znaną surowicą anty PPV — NADL o mianie 5120 metodami makro i mikro. Adsorpcję surowicy z 4 jednostkami hemaglutynacyjnymi (4 UHA) izolowanych antygenów przeprowadzono w temp. pokojowej przez 30 min. Jako indykatora użyto 1% zawiesiny erytrocytów świnki morskiej. Swoistość odczynu oraz wysokość miana surowicy anty PPV — NADL w warunkach doświadczenia sprawdzono wobec standardowego szczepu PPV — NADL₂.

Obecność antygeny i wstępną jego identyfikację w płucach płodów IW₁ i IW₂ wykonano odczynem immunofluorescencji (IF) na skrawkach grubości 0,4 µ (13).

Dla potwierdzenia izolacji PPV wykonano odczyn IF z wykorzystaniem hodowli PK-15. W tym celu supernatant uzyskany z zakażonej rozcierem hodowli PPK dodawano (w ilości 0,2 ml/probówkę) bezpośrednio do zawieszonych w płynie wzrostowym komórek linii ciągłej nerki świni PK-15. Mieszaninę z umieszczonymi na dnie szkiełkami nakrywkowymi. Po 24 h inkubacji w 37°C zmieniano płyn wzrostowy na utrzymujący. Po 24, 48, 72 i 120 h inkubacji szkiełka nakrywkowe z zakażoną hodowlą PK-15 pokrywano swoistą koniugatą anty PPV i oglądano w mikroskopie immunofluorescencyjnym.

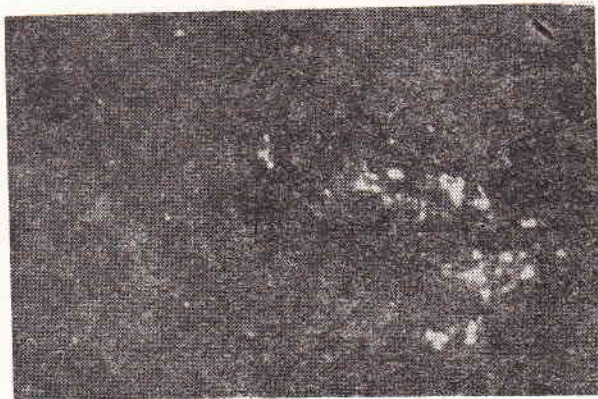
W celu oznaczenia wielkości wyizolowanego z płuc płodu (IW₁) wirusa (szczep IW₁): materiał z zakażonych hodowli PPK sączone przez filtry membranowe Millex HA-0,45 µm i Millex GS-0,22 µm (Millipore Co). Filtry badano odczynami HA i HI oraz metodą IF barwiąc 72-godzinne zakażone hodowle PK-15, oporność szczepu IW₁ na eter określono w

sposób opisany przez Andrewesa (1), natomiast oporność na chloroform badano techniką podaną przez Vannier (15). Poddany działaniu eteru i chloroformu szczep IW₁ badano odczynem HA, HI oraz metodą IF w zakażonych 72-godzinnych hodowlach PK-15. Termooporność szczepu IW₁ określano poddając go działaniu temperatur 36°C przez 1 h, 60°C przez 30 min i 75°C przez 10 min. Następnie wykonywano odczyn HA i wyniki porównywano z kontrolą.

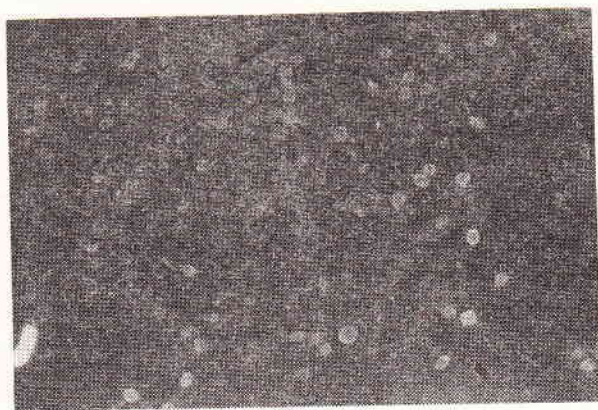
Wyniki i omówienie

Badaniem immunofluorescencyjnym skrawków płuc płodu IW₁ stwierdzono obecność antygeny PPV w postaci dużych skupisk świecących komórek (ryc. 1). Nie stwierdzono natomiast świeceń w preparatach wykonanych z płuc płodu IW₂. W toku dalszych badań po zakażeniu materiałem uzyskanym z tkanki płucnej płodu IW₂ hodowli komórkowej PK-15 i zabarwieniu jej swoistą koniugatą obserwowano typowe dla PPV świecenia. Podobne zjawisko opisała Cartwright (3) podając, że w skrawkach mroźniowych narządów płodów doświadczalnie zakażonych nie stwierdzono świeceń, podczas gdy w hodowlach komórkowych zakażonych rozcierem z tych narządów świecenia występowały. Również Cutlip i Mengeling (4) obserwowali sporadycznie naprzemienne występowanie antygeny wirusowego i wirusa w tkankach doświadczalnie zakażonych płodów.

Wyniki izolacji wirusa w hodowli PPK przedstawia tab. 1. Analizując wyniki odczynu HA należy zaznaczyć, że różnice w wysokości mian między układem I i II mogą być konsekwencją różnego czasu inkubacji (układ I — 4 dni, układ II — 5 dni). W zakażonych hodowlach komórkowych nie obserwowano efektu cytopatycznego (CPE). Jak wynika z prac innych autorów (7, 14) występowanie CPE nie jest symptomatyczne dla PPV, a jego obserwacja, zdaniem Cartwright i wsp. (2), nie może być w żadnym przypadku brana pod uwagę jako metoda diagnostyczna w zakażeniach parwowirusem u świń.



Ryc. 1. Specyficzne dla PPV świecenia widoczne w komórkach tkanki płucnej płodu IW₁



Ryc. 2. Specyficzne świecenia jąder komórkowych, w zakażonej izolowanym szczepem PPV, 72 h hodowli PK-15

Tab. 1. Wyniki izolacji wirusa z narządów wewnętrznych martwo urodzonych prosiąt

Materiał biologiczny użyty do badań	CPE		Test HA		Test HI		Test IF		
	układ I	układ II	układ I	układ II	układ I	układ II	skrawki mrożeniowe	hodowla komórkowa PK15 układ I	układ II
Płuca płodu IW ₁	—	—	256	512	+	+	+	+	+
Płuca płodu IW ₂	—	—	256	512	+	+	—	+	+
Nerka płodu IW ₁	—	—	32	32/64	*	*	*	*	*

Objaśnienie: * — nie wykonywano.

Tab. 2. Biologiczne i fizykochemiczne właściwości parwowirusa świń, szczepu IW₁

Test			Oznaczenie wielkości wirusa filtrami o średnicy		Określenie wrażliwości wirusa				
HA	HI	IF	0,45 μ m	0,22 μ m	eter	chloroform	56°C	60°C	75°C
256	+	+	+	+	—	—	—	—	—

Objaśnienia: * — kontrolowano testem HA, HI, IF; ** — kontrolowano testem HA.

Wyniki odczynu HI wykonanego przy użyciu specyficznej surowicy anty PPV-NADL z 4 jednostkami HA każdego badanego izolatu były zgodne z wynikiem uzyskanym w odczynie przeprowadzonym ze standardowym szczepem PPV-NADL-2.

Testem IF, wykonanym z hodowlami komórkowymi PK-15 zakażonymi antygenem IW₁ i IW₂ wykazano występowanie swoistych dla PPV świeceń. Stwierdzono, że liczba świecących komórek była ściśle związana z czasem inkubacji zakażonych hodowli; w 24-godzinnej hodowli obserwowano świecenia ok. 1% komórek, w 48 h 10 — 15%, a w 72 h. ok. 40 — 60% komórek (ryc. 2). W ciągu pierwszych 3 dni inkubacji obserwowano świecenia jąder komórkowych, a od 4 dnia świecenia stwierdzono również w cytoplazmie. Mengling (12) podaje, że obserwował fluorescencję około 1% komórek już w 7 1/2 h po zakażeniu hodowli komórkowej, a swoiste świecenia 40—60% komórek były widoczne po 24 h. Lucas (11) pierwsze świecenia jąder komórkowych obserwowała po 12 h inkubacji. Należy jednak zaznaczyć, że Mengeling (12) do omawianego testu używał zakażonej hodowli FPK, natomiast w badaniach własnych użyto linii ciągłej PK-15. Na uwagę zasługuje również fakt łatwej, bo uwieńczonej powodzeniem już w pierwszym pasażu adaptacji izolowanych szczepów wirusa do hodowli komórkowej PK-15. Tej samej hodowli komórkowej dla adaptacji szczepu PPV używał m.in. Vannier (15). Stosowane były także inne rodzaje hodowli linii ciągłych narządów wewnętrznych świń (8, 14). Opierając się na wynikach badań własnych oraz prac w/w autorów można wyrazić pogląd, że najbardziej przydatne do namnażania PPV wydają się być hodowle FPK i PPK.

Wybrane biologiczne i fizykochemiczne właściwości izolowanego szczepu PPV — IW₁ przedstawiono w tab. 2. Stwierdzono, że izolowany wirus przechodzi przez filtry 0,45 μ m i 0,22 μ m. Nie obserwowano spadku miana HA w filtracie 0,45 μ m, a jedynie nieznaczne

jego obniżenie w filtracie 0,22 μ m. Wykonane testy HI i IF były zgodne z wynikami kontroli. Należy zaznaczyć, że większość autorów (7, 12, 14, 15) nie stosowała dla określenia wielkości wirusa filtrów o tak małej średnicy (0,22 μ m). Vannier (15) stwierdził, że izolowany przez niego szczep PPV przechodzi przez filtr 0,25 μ m. Morimoto (14) wykazał, że miano HA jednego z wyizolowanych przez niego szczepów PPV (HA — 256) spadło po przepuszczeniu go przez najmniejszy z użytych sączków (0,50 μ m) do 128, nie wykazując przy tym spadku miana TCID₅₀. Mengeling (12) stosując różnej wielkości filtry (450, 220, 100, 50 nm) również nie obserwował istotnej redukcji miana H. Jak wskazują na to dane piśmiennictwa, jedynie Cartwright (12) używając filtrów o małej średnicy stwierdziła, że izolowany przez nią szczep PPV (59e/63) nie przechodził przez filtr 0,21 μ m.

Oceniając metodami HA, HI i IF wpływ eteru i chloroformu na izolowany szczep IW₁, nie stwierdzono spadku miana HA oraz nie odnotowano jakichkolwiek różnic między testami HI i IF przeprowadzonymi z tym samym szczepem nie poddanym działaniu w/w związków.

Badając wpływ różnych temperatur na wyizolowany szczep PPV nie zanotowano w żadnym przypadku spadku miana HA. Powyższe wyniki są zgodne z danymi publikowanymi w pracach innych autorów (2, 7, 12, 14, 15).

Biorąc pod uwagę właściwości izolowanego szczepu IW₁, a mianowicie: zdolność aglutynowania erytrocytów świnki morskiej, oporność na eter, chloroform i temperaturę 75°C, wielkość poniżej 0,22 μ m, możliwość namnażania na linii ciągłej komórek nerki świni, fakt neutralizowania wirusa przez referencyjną surowicę anty-PPV oraz pozytywną reakcję w teście IF ze specyficzną koniugatą można stwierdzić, że wymienione cechy są charakterystyczne dla PPV. Wskazuje to na istnienie zakażeń parwowirusem świń w Polsce.

Autorzy dziękują dr W. L. Mengelingowi z NADL w USA za udostępnienie referencyjnych szczepów PPV oraz swoistej koniugaty i surowicy.

Piśmiennictwo

1. Andrewes C. H., Horstman W. M.: J. Gen. Mikrobiol. 3, 290, 1949.
2. Cartwright S. F., Lucas M., Huck R. A.: J. comp. Path. 79, 371, 1969.
3. Cartwright S. F., Lucas M., Huck R. A.: J. comp. Path. 81, 143, 1971.
4. Cutlip R. C., Mengeling W. L.: Am. J. vet. Res. 36, 1751, 1975.
5. Gillick J. C.: Aust. vet. J. 53, 105, 1977.
6. Hierholzer J. C., Suggs M. T.: Appl. Mikrobiol. 18, 824, 1969.
7. Johnson R. H.: Aust. vet. J. 49, 157, 1973.
8. Joo H. S., Donaldson-Wood C. R., Johnson R. H.: Arch. Virol. 47, 337, 1975.
9. Joo H. S., Johnson R. H.: Vet. Bull. 46, 653, 1976.
10. Joo H. S., Donaldson-Wood C. R., Johnson R. H.: Aust. vet. J. 52, 422, 1976.
11. Lucas M. H., Naphtine P.: J. comp. Path. 81, 111, 1971.
12. Mengeling W. L.: Am. J. vet. Res. 33, 2239, 1972.
13. Mengeling W. L.: Am. Ass. Vet. Lab. Diagn. 20th. Ann. Proc. 1977.
14. Morimoto T., Fujisaki Y., Ito Y., Tanaka Y.: Natn. Inst. Anim. Hlth. Ot. Tokio 12, 137, 1972.
15. Vannier P., Chappuis G., Tillon J. P.: Récl. Méd. vét. 153, 579, 1977.

Adres autora: lek. wet. Jacek Wójcik, ul. Kościuszki 12/23, 24-100 Puławy

Вуйчик Я., Пейсак З. — Изоляция парвовируса свиней в Польше

Цель работы состояла в изолировании естественного штамма парвовируса свиней (PPV). Для исследований применили внутренние органы мумифицированных плодов свиней. Вступительную идентификацию вирусного антигена в срезах легких выполнили тестом IF. Изоляцию вируса провели на первичной культуре свиной почки (PPK). Полученный антиген исследовали реакциями HA, HI и тес-

том IF. Определили некоторые физико-химические свойства: величину, устойчивость к эфиру, хлороформу и температуре изолированного вирусного штамма. Обнаружено, что изолированный вирус агглютинирует эритроциты морской свинки, дает положительную реакцию с референционной сывороткой анти PPV—NADL и специфической конъюгатой, устойчив к эфиру и хлороформу, в темп. 75°C (10 мин.) не утрачивает своих свойств, легко размножается на сплошной линии PK-15. Величина вируса не превышает 0,22 μ m. Упомянутые качества изолированного штамма вируса характерны для парвовирусов свиней.

Wójcik J., Pejsak Z. — Isolation of pig parvovirus in Poland

The examinations were performed using internal organs of mummified pig fetuses. The preliminary identification of the viral antigen in the samples of lungs was carried out by means of immunofluorescent test. Isolation was done on primary pig kidney cell culture. The antigen obtained was examined by HA, HI, and FAT. Some physico-chemical properties, i.e. the size, ether and chloroform resistance, and sensitivity to temperature were determined. It was found that the isolate agglutinated guinea-pigs erythrocytes, gave positive reaction with specific antiserum and conjugate, was resistant to ether, chloroform, and temperature (75°C for 10 min), and replicated well in a continuous cell line (PK-15). The size of the virus was not higher than 0.22 μ m. The above features of the virus are characteristic for pig parvoviruses.

RYSZARD WOZIKOWSKI

Przypadek mieszanego zakażenia bydła *Mycobacterium bovis* i *Mycobacterium aquae*

Zakład Higieny Weterynaryjnej, ul. Powstańców Wielkopolskich 10, 85-090 Bydgoszcz

W ostatnich latach znaczną uwagę poświęca się tzw. prątkom atypowym, sklasyfikowanym przez Runyona w 4 grupach: grupa I — fotochromogeny, II — skotochromogeny, III — niefotochromogeny i grupa IV — szybko rosnące.

Zagadnienie prątków atypowych nabrało szczególnego znaczenia w tych krajach, w których gruźlica została całkowicie opanowana lub jej nasilenie uległo wybitnemu zmniejszeniu. Prątki atypowe mogą występować jako jedyny czynnik wywołujący zmiany chorobowe lub w asocjacji z prątkami gruźlicy. Grupa tych drobnoustrojów może odgrywać pewną rolę w zakażeniu człowieka i zwierząt. Dla bydła na ogół nie są patogenne. Jednak dostając się do organizmu mogą przenikać do węzłów chłonnych, powodując przejściowy stan uczulenia na tuberkulinę (1, 2, 3). U świń są przyczyną zmian gruźliczopodobnych (4). Schliesser (5) wykazuje obecność prątków atypowych w zmienionych węzłach chłonnych u świń, psów i kotów. Diernhofer (3) oraz Joubert i wsp. (4) stwierdzili, że są one powodem

nieswoistej alergii tuberkulinowej u bydła. Przy omawianiu występowania prątków atypowych w różnych środowiskach Beerwerth (1) stwierdził, że wśród prątków atypowych w środowisku bydła hodowanego oraz w środowisku leśnym przeważały prątki skotochromogenne.

Celem niniejszych badań było wyizolowanie prątków gruźlicy *Mycobacterium bovis* z węzłów chłonnych tuberkulinododatnich krów, u których zmiany poubojowe nasuwały podejrzenie zakażenia swoistego.

Materiał i metody

Materiał stanowiło bydło z gospodarstwa uznane-go za wolne od gruźlicy, które podczas okresowego badania alergicznego zareagowało dodatnio na tuberkulinę PPD ssaków. Dwie krowy poddano ubojowi diagnostycznemu i pobrano węzły chłonne do dalszych badań laboratoryjnych. Materiał przygotowany wg obowiązujących zasad (6). Wykonano preparaty barwione metodą Ziehl-Neelsena, posiano na 2 podłoża Loewensteina — Jensena z glicerolem, 2 podłoża Petraganiana i 2 podłoża Stonebrinka oraz wykonano próbę biologiczną na świnkach morskich.