

EWA KARPIŃSKA, WANDA BORZEMSKA, ELŻBIETA SAMOREK-SALAMONOWICZ *,
PIOTR SZELESZCZUK, GRAŻYNA KOSOWSKA

Dynamika namnażania wirusa CELO w zarodkach kurzych zakażonych eksperymentalnie *)

Zakład Chorób Drobiu Katedry Epizootiologii Wydziału Weterynaryjnego SGGW-AR,
ul. Grochowska 272, 03-849 Warszawa

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

Summary

Dynamics of CELO virus propagation in embryonated chick eggs infected experimentally

Experiments revealed a high degree of sensitivity of chick tissues to infection with CELO virus. A FAV-1 virus strain administered to 5 days old SPF chick embryos in the sublethal doses propagated in the chorioallantoic membrane, amnion-allantois liquid, liver and alimentary tract. The highest titre, i.e. $10^{3.54}$ TCID₅₀ was found in the chorioallantoic liquid at day 11 post infection, i.e. at day 16 of embryos life. It was stated that the chorioallantois was the primary site of CELO virus propagation.

Wyniki badań serologicznych kurcząt rzeźnych i kur niosek przeprowadzone w kraju w latach ubiegłych wykazały szerokie rozprzestrzenienie adenowirusów ptasich (1, 10, 11). Przy naturalnym zakażeniu ptaków najczęściej z narządów wewnętrznych oraz z wymazów z kloaki izolowano szczep CELO należący do serotypu pierwszego — FAV-1 (12, 13). Przenosi się on drogą pionową z zakażonej nioski do jaja uszkadzając zarodek w czasie embriogenezy. O jego teratogennym wpływie i stratach w lęgach pisało wielu autorów (1, 2, 3, 5, 14, 15, 17). Natomiast — jak dotąd — nie udało się ustalić, co dzieje się, kiedy zarodek ulega zakażeniu subletalnymi dawkami wirusa CELO, w jakich narządach następuje replikacja wirusa i jakie jest zejście tego procesu w obrębie embriogenezy. Brak tych informacji w piśmiennictwie skłonił autorów do podjęcia badań nad odtworzeniem przebiegu naturalnego zakażenia wirusem CELO w warunkach laboratoryjnych.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na 106 zarodkach kurzych SPF (Phylaxia, WRL), które inkubowano w inkubatorze laboratoryjnym (W-200).

Do zakażenia użyto standardowego szczepu Phelps wirusa CELO serotyp FAV-1 o mianie $10^{7.5}$ EID₅₀ w 0,1 ml. W 5 dniu inkubacji zarodki podzielono na trzy grupy doświadczalne. Pierwszą grupę zarodków zakażono doowod-

niowo dawką $10^{1.5}$ EID₅₀ wirusa CELO, drugą grupę w tym samym dniu dawką $10^{0.5}$ EID₅₀. Zarodkom trzeciej grupy podano 0,1 ml PBS-u. Od 7 dnia po iniekcji przez 10 kolejnych dni pobierano od zarodków grupy pierwszej i trzeciej oraz przez 7 dni od embrionów grupy drugiej płyn owodniowo-omocznioowy, błony płodowe, wątrobę i przewód pokarmowy do badań wirusologicznych. Pobrany materiał z zarodków padłych lub schłodzonych po rutynowej obróbce traktowano jako antygen wirusowy. Badano go wobec rozcieńczeń standardowej, precypitującej surowicy anti-CELO w odczynie AGP metodą mikro podaną przez Yatesa i wsp. (18). Używano do testu surowicę nierozcieńczoną oraz w rozcieńczeniu 1:2 i 1:4. Równoległe określano w badanym materiale koncentrację wirusa CELO mianując go w hodowli komórek nerki zarodka kurzego (CEK) na płytkach Cooka mikrometodą podaną przez Grimesa i wsp. (6).

Wyniki i omówienie

Do 9 dnia po iniekcji (p.i.) padały zarodki jedynie z grupy pierwszej. Od 10 dnia p.i. w żadnej grupie doświadczalnej obumierania zarodków nie notowano. U zamarych zarodków grupy pierwszej, zakażonych dawką $10^{1.5}$ EID₅₀, obserwowano nieznaczne zmniejszenie masy ciała, przekrwienie narządów wewnętrznych oraz marmurkowatość wątroby. Były to charakterystyczne zmiany dla zakażeń adenowirusowych (3, 5, 7, 15).

Wyniki dynamiki namnażania się wirusa CELO w materiale pobranym z zarodków grupy pierwszej i drugiej przedstawiono w tab. 1 i 2. Zarodki zakażone dawką $10^{0.5}$ EID₅₀ (tab. 2) — ze względu na niski poziom replikacji wirusa — badano jedynie do 13 dnia p.i. czyli do 18 dnia embriogenezy. W pierwszym dniu badania tzn. 7 dnia p.i. najwyższe miano — $10^{4.18}$ TCID₅₀ stwierdzono w błonach płodowych, w których namnażany wirus utrzymywał się w podobnej koncentracji do 10 dnia p.i. W omawianym okresie wzrosło również miano wirusa w płynach płodowych i 11 dnia po zakażeniu w 16 dniu życia zarodków wynosiło $10^{4.88}$ TCID₅₀.

Natomiast u zarodków grupy pierwszej (tab. 1), zakażonych dawką $10^{1.5}$ EID₅₀ obserwowano znacznie wyższe miano wirusa we wszystkich badanych tkankach. Analogicznie jak w przypadku grupy drugiej, najwyż-

Tab. 1. Dynamika namnażania wirusa CELO u zarodków zakażonych dawką $10^{1.5}$ EID₅₀ (log TCID₅₀)

Badany materiał	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
	Dni po zakażeniu									
Płyny płodowe	6,15	7,12	7,01	8,21	8,54	8,10	8,0	7,52	7,20	7,20
Błony płodowe	8,23	8,05	8,14	8,26	7,32	7,82	7,75	7,40	7,20	7,20
Wątroba	2,05	2,51	5,48	6,51	7,51	6,10	5,58	5,52	5,39	5,20
Przewód pokarmowy					5,80	5,50	5,48	5,42	5,35	5,35
Wiek zarodków	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21

*) Badania finansowane w ramach programu RR-II-24.

Tab. 2. Dynamika namnażania wirusa CELO u zarodków zakażonych dawką $10^{6,5}EID_{50}$ (log $TCID_{50}$)

Dni po zakażeniu	7	8	9	10	11	12	13
Badany materiał							
Płyn płodowy	2,51	3,82	3,14	4,81	4,83	4,02	3,15
Błony płodowe	4,13	4,27	3,91	4,25	3,73	3,82	2,51
Wątroba	2,17	2,54	2,81	3,51	3,52	3,74	3,76
Wiek zarodków	12	13	14	15	16	17	18

Tab. 3. Wykrywanie wirusa CELO w zarodku kurzym metodą AGP

Dawka infekcyjna	Badany materiał	Dni po zakażeniu									
		7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
$10^{4,5}EID_{50}$	płyn płodowy	+	++++	++	++++	++++	++	++	++	++	++
	błony płodowe	++++	++++	++++	++++	++	++	++	++	++	++
	wątroba	—	—	—	+	++	++	—	—	—	—
	przewód pokarmowy					—	—	—	—	—	—
	Wiek zarodka	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21

Objaśnienia: + — surowica nierozcieńczona, ++ — surowica rozcieńczona 1:2, ++++ — surowica rozcieńczona 1:4.

sze miano w pierwszym dniu badania odnotowano w błonach płodowych $10^{8,23} TCID_{50}$. Jasty i wsp. (8) zakażając doomocznio 13-dniowe zarodki wirusem CELO już w 24 h p.i. stwierdził metodą I. F. obecność antygeny wirusowego w błonie kosmówkowo-omoczniowej. Można więc przypuszczać, że błony płodowe są pierwotnym miejscem replikacji wirusa CELO w rozwijającym się zarodku. Najwyższą koncentrację wirusa w badanych tkankach stwierdzono w 10—11 dniu p.i. tzn. 15—16 dnia życia zarodka. Przy naturalnym zakażeniu zarodków wirusem CELO jest to dzień największej zamieralności embrionów (1, 2). Wysokie miano badanego wirusa w płynach i błonach płodowych zarodków żywych utrzymywało się do ostatniego dnia inkubacji, a więc do momentu klucia się piskląt. Jordan i wsp. zakażając doomocznio wirusem CELO 17-dniowe kurze zarodki SPF, reizolował wirus z narządów wewnętrznych kurcząt do 3 tygodnia ich życia (9). Fakty te mogą tłumaczyć mechanizm rozprzestrzeniania się wirusa i bezobjawowego nosicielstwa u ptaków.

W tab. 3 przedstawiono wyniki wykrywania wirusa CELO w zarodku kurzym metodą AGP. Najczęściej jeśli miano $TCID_{50}$ badanej próbki było powyżej 6 log — reakcję pozytywną uzyskiwano jedynie z surowicą nierozcieńczoną. Przy mianie powyżej 7 log — dodatnia precypitacja obserwowana była z surowicą rozcieńczoną 1:2, natomiast przy mianie powyżej 8 log wynik dodatni uzyskiwano przy rozcieńczeniu surowicy 1:4. Test AGP okazał się mało czułą próbą diagnostyczną. Jednak w praktyce laboratoryjnej może on znaleźć zastosowanie do wstępnej oceny materiału wirusowego, co potwierdziły wyniki badań innych autorów (6, 12).

Przeprowadzone badania własne wykazały wysoki

stopień wrażliwości tkanek zarodka kurzego na zakażenie wirusem CELO. Wprowadzony w dawkach subletalnych 5-dniowym kurzym zarodkom SPF replikował się w błonie kosmówkowo-omoczniowej, w płynie owodniowo-omoczniowym, w wątrobie i przewodzie pokarmowym. O podobnych wynikach badań donoszą Cowen (4) i Yamada i wsp. (16), którzy uzyskiwali wysoką koncentrację wirusa w płynie owodniowo-omoczniowym zakażonych zarodków, ale używana przez nich dawka infekcyjna i wiek zarodków był znacznie wyższy. Według Yadav i wsp. (15) oraz Cowena (4) wpływ na efekt zakażenia zarodków ma droga wprowadzenia wirusa, natomiast w badaniach własnych wykazano również, że

wiek zakażonych zarodków jest istotnym czynnikiem wpływającym na replikację wirusa CELO. Duża wrażliwość tkanek zarodka kurzego na zakażenie wirusem CELO oraz wysoki % zakażenia stad reprodukcyjnych powinien zdecydować o jak najszybszym uruchomieniu ferm SPF w kraju. Zakażenie adenowirusami zarodków i hodowli komórkowych stanowi poważne niebezpieczeństwo zafałszowania wyników badań naukowych prowadzonych na zarodkach, a także może być przyczyną zanieczyszczenia antygenów i szczepionek produkowanych na embrionach kurzych.

Piśmiennictwo

- Borzemska W., Karpińska E., Samorek-Salamonowicz E., Kossowska G., Szeleszczuk P.: *Medycyna Wet.* 44, 279, 1988.
- Borzemska W., Szeleszczuk P., Jamiatkowska G.: *Medycyna Wet.* 39, 654, 1983.
- Cook J. K. A.: *Vet. Rec.* 82, 294, 1968.
- Cowen B. S.: *Avian Dis.* 32, 347, 1988.
- Gallina A. M., Winterfield R. W., Fadly A. M.: *Avian Dis.* 17, 343, 1973.
- Grimes T. M., King D. J., Kleven S. H.: *Avian Dis.* 20, 299, 1976.
- Hofstad M. S.: *Diseases of Poultry.* 1984.
- Jasty V., Chang P. W., Miller L. T., Yates V. J.: *Avian Dis.* 13, 519, 1969.
- Jordan F. T. W., Nassar T. J.: *Res. vet. Sci.* 16, 47, 1974.
- Karczewski W., Czakata A.: *Biul. III Zjazdu PTNW*, 278, 1966.
- Karczewski W., Karpińska E., Minta Z., Czekał A.: *Mat. VII Kongresu PTNW* Lublin, 665, 1983.
- Samorek-Salamonowicz E.: Właściwości krajowych szczepów adenowirusów ptasich z uwzględnieniem ich wpływu na replikację indyjskiego herpeswirusa. *Praca hab. Inst. Wet. Puławy*, 1986.
- Samorek-Salamonowicz E., Borzemska W., Karpińska E., Kossowska G.: *Bull. vet. Inst. Puławy* (w druku).
- Winterfield R. W., Fadly A. M., Gallina A. M.: *Avian Dis.* 17, 334, 1973.
- Yadav M. P., Parihar N. S., Kumar S.: *Indian J. Anim. Sci.* 45, 474, 1975.
- Yamada S., Matsuo K., Fukuda T.: *Jap. J. Vet. Sci.* 41, 391, 1979.
- Yates V. J., Fry D. E.: *Am. J. vet. Res.* 18, 657, 1957.
- Yates V. J., Rhee Y. O., Fry D. E., El-Mishad A. M., McCornick K. J.: *Avian Dis.* 20, 146, 1976.

Adres autora: dr Ewa Karpińska, ul. Dedala 6 m. 43, 03-982 Warszawa