

16. Matthaeus W., Straub O. C.: Zbl. Bakt. Hyg. I Abt. Orig. A 240, 152, 1978.
17. Osburn B. J., Johnson R. T., Silverstein A. M., Prendergast R. A., Jochim M. M., Levy S. E.: Lab. Invest. 25, 203, 1971.
18. Osburn B. J., Stabenfeldt G. H., Ardans A. A., Trese C., Sawyer M.: J. Am. vet. med. Ass. 164, 295, 1974.
19. Pierce K. R., Young M. F., McArthur N. H., Williams J. D., Am. J. Vet. Res. 36, 771, 1977.
20. Ressang A. A., Rumawas W., Rondhuis R. P., Haagsma I., Bercofich Z.: Zbl. Vet. Med. B 27, 576, 1980.
21. Ristau E., Wittmann W.: Mh. Vet. Med. 43, 548, 1985.
22. Sawyer M., Osburn B. J., Knigh H. D., Kendrick J. W.: Am. J. Vet. Res. 34, 1281, 1973.
23. Schultz R. D.: Cornell Vet 63, 107, 1973.
24. Schultz R. D., Duncan J. R.: Proc 5th Int. Symp. on Bovine Leukosis Commission of the European Communities, Tübingen 1984, s. 213.
25. Sobiech E.: Immunoglobuliny klasy G i M u bydla dotkniętego białaczką limfatyczną. Praca dokt. AR Wrocław 1979.
26. Swift B. L., Kennedy P. C.: Am. J. Vet. Res. 33, 57, 1972.
27. Trainin Z., Klopfer U.: Bibl. Haemat. 38, 500, 1970.
28. Trainin Z., Klopfer U.: Cancer Res. 31, 1968, 1971.
29. Trainin Z., Ungar-Waron H., Meiron R., Barnea A., Sela M.: J. Comp. Path. 83, 171, 1976.
30. Trainin Z., Nobel T. A., Klopfer U., Neumann F.: Refuah vet. 25, 187, 1983.
31. Ungar-Waron H., Arraham R., Glueckmann A., Trainin Z.: Ann. Rech. Vet. 9, 315, 1978.
32. Zemen G. O., Cohen G., Budrus M., Williams G., Javer H.: J. Allergy Clin. Immunol. 49, 10, 1972.

Adres autora: dr hab. Stanisław Klimontowski, ul. Pierwiosn-kowa 6, 53-225 Wrocław

ZOFIA ROTKIEWICZ, ZDZISŁAW LARSKI

Wpływ kwasu 2-/4-/2-(4-chlorbenzamido)etylo/fenoksy/ 2,2 metylopropionowego na namnażanie się w hodowlach komórek wirusa Herpes simplex typ 1 szczepu TK 900 wirusa choroby Aujeszkyego szczepu Roakin wirusa choroby Newcastle

Katedra Mikrobiologii Weterynaryjnej Wydziału Weterynaryjnego AR-T,
ul. Czajkowskiego 13 bl. 105, 10-557 Olsztyn

Summary

The influence of 2-/4-/2-(4-chlorbenzamido) ethyl/phenoxyl-2-methyl-propionic acid on the multiplication in cell cultures of herpes simplex virus, type 1, TK900 strain of pseudorabies virus, and Roakin strain of Newcastle disease virus

2-/4-/2-(4-chlorbenzamido) ethyl/phenoxyl-2-methyl-propionic acid (CBMP) reduced the intensity of cytopathic effect, delayed the time of its appearance for 24—48 hours and finally caused a significant lowering of TCID₅₀ titer of herpes simplex in monkey kidney cell cultures and of pseudorabies virus in chick embryo cell cultures. On the other hand CBMP did not exert any effect on the multiplication of Roakin strain of NDV in chick embryo cell cultures. The preparation did not inactivate directly the viruses being examined and did not influence their adsorption. It is suggested that antiviral effect of CBMP is due to disordering the lipid metabolism in cells what causes the disturbances of virus envelope synthesis.

Materiał i metody

Wirus *Herpes simplex* typ 1 otrzymano z Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu; miano tego wirusa w hodowli komórek nerki małpy wynosiło około $10^{-7.6}/0,15$ ml. Wirus choroby Aujeszkyego szczep TK 900 wykazywał miano TCID₅₀ około $10^{-7.2}/0,15$ ml w hodowlach komórek zarodka kurzego, a wirus choroby Newcastle (ND) szczep Roakin, miano TCID₅₀ $10^{-9.5}/0,15$ ml w hodowli komórek zarodka kurzego.

Miano TCID₅₀ oznaczono metodą Reeda-Muencha, a statystyczną znamienność ich różnicy według tablicy Lorenza (6); przy stosowanych w badaniach własnych co najmniej trzykrotnych powtórzeniach mianowania wirusa, różnica 0,7 log jest statystycznie znamienna. Jednowarstwowe hodowle komórek zarodka kurzego (HKZK) sporządzono w sposób powszechnie stosowany, zaś hodowlę komórek nerki małpy (HKNM), płynny odżywczy hodowli, PBS, surowicę oraz roztwór trypsyny otrzymano z Wytwórni Surowic i Szczepionek w Lublinie.

Badany preparat przeciwlipemiczny, kwas 2-/4-/2-(4 chlorbenzamido) etylo/fenoksy/ 2,2 metylopropionowy (CBMP) stanowił Bezafibrat produkcji firmy Boehringer — Mannheim otrzymany od jej przedstawiciela w Warszawie.

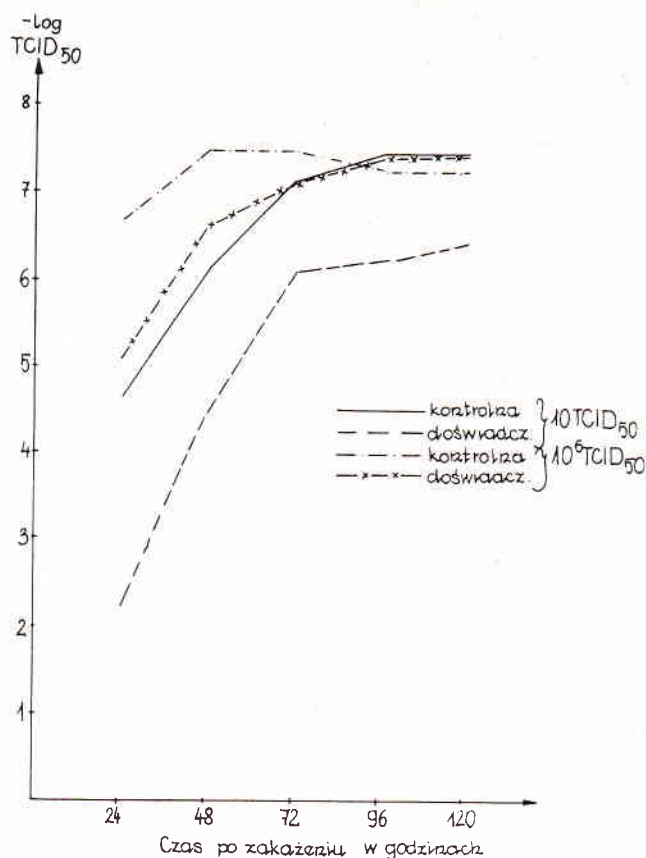
Wyniki i omówienie

Badanie toksyczności CBMP dla hodowli komórek nerki małpy i hodowli komórek zarodka kurzego. Preparat rozpuszczono w płynie Parkera alkalizowanym n/10 NaOH do pH około 7,8 i wprowadzono do hodowli w ilościach dających końcowe stężenie 200, 400, 800 mcg/ml płynu odżywczego. Kontrolę stanowiły hodowle, do których dodawano odpowiednią ilość płynu stanowiącego rozpuszczalnik leku. Czas obserwacji wynosił 5 dni. Maksymalnie tolerowaną dawką było stężenie 400 mcg/ml i takiego używano w doświadczeniach.

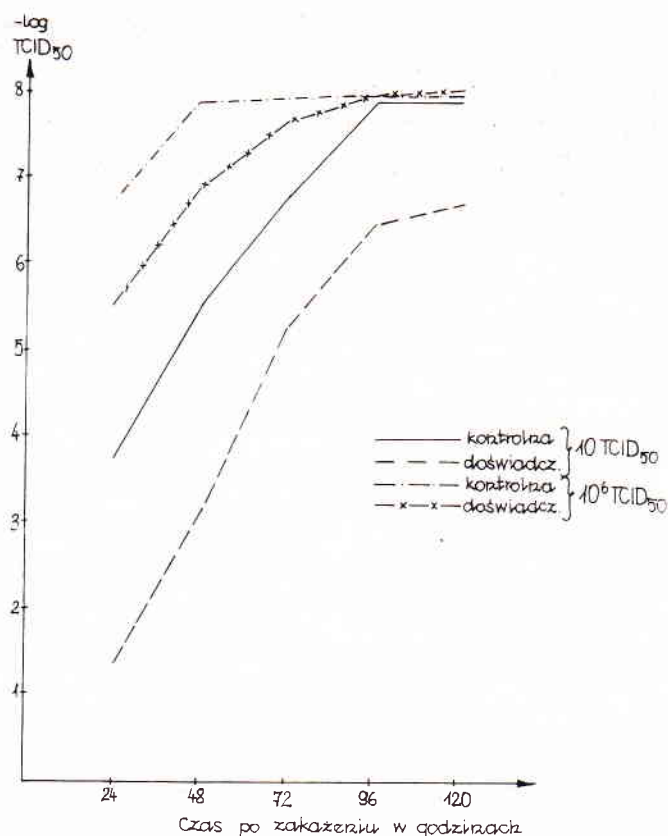
Redukcja miana TCID₅₀ wirusa *Herpes simplex* w hodowlach komórek nerki małpy oraz wirusa choroby Aujeszkyego i choroby Newcastle w hodowli komórek zarodka kurzego. Hodowle doświadczalne zawierające CBMP w płynie odżywczym utrzymującym i kontrolne zakażono 10-krotnie wzrastającymi rozcieńczeniami wirusa i obserwowano przez 5 dni inkubowania w 37°C. Preparat zmniejszał natężenie efektu cytopatycznego oraz opóźniał czas jego występowania o 24—48 godzin,

Badania Grossberga (2) i Steinharta (10) wskazały na możliwość hamowania w hodowlach komórek syntezy niektórych wirusów otoczkowych: West Nile, kalifornijskiego zapalenia mózgu i *Herpes simplex* przez ester etylowy kwasu 2/4-chlorofenoksy-/izomasłowego (CPIB). Zakładano przy tym, że przeciwwirusowe działanie tego preparatu jest następstwem dezorganizacji syntezy lipidowego komponentu otoczki. Następnie wykazano w hodowlach komórek hamowanie przez ten lek syntezy wirusów choroby Newcastle (8, 9) i choroby Aujeszkyego (3), przy czym dodatkowe badania (7) wykonane z tym ostatnim wirusem wskazują na słusność zakładanego mechanizmu działania. Stwierdzono również lecznicze działanie tego leku w doświadczalnej opryszczce rogówki u królików (4) oraz w leczeniu pacjentów z tym schorzeniem (5). Podobne działanie w hodowli komórek oraz w leczeniu doświadczalnej opryszczki wykazał kwas 2-/4-/2-(4-chlorbenzamido) etylo/fenoksy/-2,2 metylopropionowy (CBMP) (1).

Celem niniejszej pracy było określenie wpływu CBMP na namnażanie się w hodowlach komórek kilku wirusów otoczkowych.



Ryc. 1. Dynamika wzrostu szczepu TK₉₀₀ wirusa choroby Aujeszkiego w HKZK zakażonej różnymi dawkami wirusa w obecności CBMP



Ryc. 2. Dynamika wzrostu szczepu *Herpes simplex* typ 1 w HKNM zakażonej różnymi dawkami wirusa w obecności CBMP

a w efekcie końcowym obniżał miano wirusów *Herpes simplex* i choroby Aujeszkiego o około 1 log, natomiast nie wywierał żadnego wpływu na namnażanie się wirusa choroby Newcastle.

Badanie bezpośredniego wpływu preparatu na użyte szczepy wirusów. Do płynu zawierającego 10⁶ TCID₅₀ wirusów choroby Aujeszkiego lub *Herpes simplex* dodano CBMP w ilości zapewniającej końcowe stężenie 400 mcg/ml i 800 mcg/ml. Próby kontrolne zawierały taką samą dawkę wirusa bez preparatu. Po 6 i 24 godzinach inkubowania w temperaturze 37°C oznaczono miano wirusa w hodowlach. CBMP w dawce maksymalnie tolerowanej tj. 400 mcg/ml, a nawet 800 mcg/ml nie wywierał inaktywującego wpływu na oba wirusy.

Badanie wpływu CBMP na adsorpcję wirusa choroby Aujeszkiego w HKZK i wirusa *Herpes simplex* w HKNM. Do hodowli wprowadzano równocześnie z wirusem w ilości 1 m.o.i. maksymalnie tolerowaną dawkę preparatu i pozostawiono w temperaturze 37°C na jedną godzinę. Następnie płyn zlewano, hodowlę płukano i wprowadzono płyn utrzymujący. Po 24 godzinach mianowano płyn z tych hodowli, jak i z hodowli kontrolnych. Nie stwierdzono wpływu preparatu na adsorpcję wirusa.

Dynamika namnażania się badanych wirusów w obecności CBMP. Hodowle zakażono dawką 10 lub 10⁶ TCID₅₀ wirusa wprowadzając równocześnie z zakażeniem preparat. W 24, 48 i 72 h oraz w 4 i 5 dni po zakażeniu określano miana wirusów. Krzywą wzrostu przedstawiają ryciny 1 i 2. Największe hamowanie syntezy wirusa choroby Aujeszkiego (ryc. 1), wyrażające się obniżeniem miana o około 2,5 log, stwierdzono

w 24 i 48 godzin po zakażeniu dawką 10 TCID₅₀, a różnica miana o około 0,7 log utrzymywała się do końca obserwacji. Po zakażeniu dawką 10⁶ TCID₅₀ wirusa istotną różnicę miana około 1,5 log stwierdzono tylko w 24, a 0,8 log w 48 godzin po zakażeniu.

W przypadku wirusa *Herpes simplex* (ryc. 2) użytego w dawce 10 TCID₅₀ największe obniżenie miana o około 2,25 log stwierdzono w 24–48 godzin po zakażeniu, przy czym jeszcze po 72 godzinach różnica ta wynosiła około 1,5 log, a po 96 i 120 godzinach około 1 log. Po zakażeniu hodowli dawką 10⁶ TCID₅₀ wirusa różnicę miana wynoszącą około 1,2 log i 1,0 log stwierdzono tylko w 24 i 48 godzin po zakażeniu.

Na podstawie przeprowadzonych badań można wnosić, że CBMP nie wpływa na etap adsorpcji wirusa, a prawdopodobnie zaburza metabolizm substancji tłuszczowych w komórce, w następstwie czego zostaje zakłócona synteza otoczki wirusa, przez co otrzymuje się jego mniejszy zbiór. Taką interpretację sugerują wyniki innych naszych badań (7); stwierdzono w nich, że w następstwie 30 pasażów szczepu TK₉₀₀ wirusa choroby Aujeszkiego w hodowli komórek w obecności CPIB, podobnego w działaniu klinicznym preparatu antylipemicznego, nastąpiły zmiany chemiczne i fizyczne dotyczące otoczki wirusa.

Piśmiennictwo

1. Forfowa G., Lenkiewicz E., Rotkiewiczowa Z., Larski Z., Feren-cowa A.: Klinika oczna 92, 94, 1990.
2. Grossberg S. F., Roch L. A., Frerman F. E.: Progr. Immunobiol. Stand. 5, 289, 1972.
3. Larski Z., Spohr de Faundez I.: Med. Dośw. Mikrobiol. 32, 305, 1980.

4. Lenkiewicz E., Larski Z., Ferencowa A., Piotrowski A.: Klinika oczna 37, 297, 1985.
5. Lenkiewicz E., Antonowicz A.: Klinika oczna 87, 300, 1985.
6. Lorenz R. J.: Arch. Ges. Virusforsch. 10, 560, 1960.
7. Rotkiewicz Z., Larski Z., Wiśniewski J.: J. Vet. Med. 33, 758, 1983.
8. Szohr de Faundez I.: Hamowanie syntezy wirusa rzekomego pomoru drobiu przez ester etylowy kwasu 2-/4-chlorofenoksy/-

- izomasłowego (CPIB). Praca dokt. Wydział Wet. ART Olsztyn, 1979.
9. Szohr de Faundez I.: Med. Dośw. 32, 365, 1980.
10. Steinhart W. L., Hagemann C. S., Powanda C.: Virology 70, 241, 1975.

Adres autora: dr Zofia Rotkiewicz, ul. Gotowca 41/4, 10-687 Olsztyn

ALEKSANDER W. DEMIASZKIEWICZ, JACEK LACHOWICZ

Występowanie onchocerkozy bydła w Polsce

Instytut Parazytologii im. W. Stefańskiego PAN, ul. Pasteura 3, s.p. 153, 00-973 Warszawa

Summary

Cattle onchocercosis in Poland

The examinations were carried out on the presence of onchocercosis in villages of the Puszcza Białowieńska, Puszcza Kampinoska, Bory Dolnośląskie and in the Słupsk, Skierniewice, Włocławek, Zamość and Przemyśl provinces. The samples of the skin from the ear and umbilical regions were taken from 297 cattle killed in slaughter-houses. The skin samples were cut in 1—2 mm pieces, incubated in a physiological solution at 25°C for 24 hours and then examined for the presence of microfilariae. Microfilariae of *Onchocerca lienalis* and *Onchocerca gutturosa* were found in animals from the Puszcza Białowieńska, Puszcza Kampinoska, Bory Dolnośląskie and the Przemyśl district. Extensiveness of cattle invasion by nematode *O. lienalis* was from 6% to 80%, and by *O. gutturosa* from 3% to 30%. Nematodes of *Onchocerca* spp were not found in the Słupsk, Skierniewice, Włocławek and Zamość districts. Focal occurrence of onchocercosis was associated with cattle pasturage near the forest biotops with streams where there could hatch intermediate hosts of *Onchocerca*-blood sucking insects.

Onchocerkozę bydła wywołują na terenie Europy dwa gatunki nicieni należące do nadrodziny *Filarioidea* Weinland, 1858 i rodziny *Onchocercidae* (Leiper, 1911): *Onchocerca gutturosa* Neumann, 1910 lokalizujące się w węzłach karkowym i *Onchocerca lienalis* (Stiles, 1892) umiejscowiona w węzłach żołądkowo-śledzionowym i pod torebką śledziony (10, 17, 24, 25). Wielu autorów uznawało oba te gatunki za synonimy (9, 25, 26, 30). Jednak wyniki szczegółowych badań morfologicznych przeprowadzonych przez Bain i wsp. (1, 2, 3) oraz Eberharda (8) ostatecznie wykazały odrębność tych gatunków.

Dojrzałe samice onchocerk w miejscu pasożytowania rodzą liczne larwy I stadium zwane mikroonchocerkami, migrujące do skóry zwierząt (16, 17). Mikroonchocerkę stwierdzano w skórze małżowin usznych, okolicy czołowej, podstawy rogów, szyi i grzbietu (2, 34). Maksymalną koncentrację tych larw obserwowano w skórze dolnej części ściany brzucha — w okolicy okołopępkowej (10). Żywicielami pośrednimi onchocerk są liczne gatunki owadów krwiopijnych należących do rodzin *Simuliidae* i *Ceratopogonidae* (16, 23, 24, 29, 30). Owady żerując pobierają krew zarażonych zwierząt wraz ze znajdującymi się w niej mikroonchocerkami. Larwy te z jelita owadów przenikają do jamy ciała, a następnie do mięśni lub innych narządów, gdzie rosną i linieją dwukrotnie. Inwazyjne larwy III stadium wędrują do głowy stawonogów koncentrując się w narządach gębowych. Podczas kolejnego żerowania owadów na bydle larwy inwazyjne dostają się do skóry żywicieli, a na-

stępnie migrują do właściwej im tkanki, gdzie osiągają dojrzałość płciową (16).

Dojrzałe onchocerkę obu gatunków w tkance łącznej więzadeł wywołują lokalne procesy zapalne. Według Tret'jakowej (33) w sąsiedztwie nicieni obserwuje się obrzęk tkanki łącznej, surowiczogalaretowaty naciek, a także intensywne naczyniowe zmiany. Kivako i Lobanov (18) w węzłach śledzionowych zarażonych zwierząt stwierdzili przewlekły nekrotyzujący stan zapalny, a Scholtens i wsp. (27) obserwowali towarzyszącą inwazji onchocerk miejscowy *limfadenitis*.

Natomiast larwy I stadium — mikroonchocerkę umiejscawiają się w warstwie siateczkowej skóry głównie w pobliżu gruczołów potowych i łojowych, naczyń krwionośnych korzeni włosów i włókien nerwowych. Jak stwierdził Bałmysev (4) larwy onchocerk powodują powstawanie drobnych, bolesnych, krwawiących pęknięć na strzykach. Bolesność strzyków krów zarażonych onchocerką jest przyczyną odruchowego zatrzymywania mleka podczas doju. W następstwie systematycznego niedodajania rozwijają się stany zapalne wymienia, prowadzące do wybrakowania chorych zwierząt.

Mikroonchocerkę migrującą w skórze uszkodzają tkankę łączną, powodując powstawanie drobnych ognisk martwiczych, które w procesie obróbki przemysłowej skór ujawniają się w postaci guzków i otworków zmniejszających wartość użytkową skór lub ich wybrakowanie (12, 13, 17, 20).

Na terenie Polski stwierdzono dotychczas onchocerkozę u bydła i żubrów w Białowieży (7). Obecność w Puszczy Białowieńskiej tej nieznanej dotąd w kraju pasożytozy oraz możliwość powodowania przez nią strat ekonomicznych były przyczyną podjęcia badań nad występowaniem onchocerkozy bydła w Polsce.

Materiał i metody

Badania prowadzono w latach 1986—1991 we wsiach śródlęsnych Puszczy Białowieńskiej, okolicach Puszczy Kampinoskiej, Bory Dolnośląskich, a także w województwach: słupskim, skierniewickim, włocławskim, zamojskim i przemyskim. Próbkę skóry z małżowiny usznej i okolicy pępka pobierano od bydła ubijanego w rzeźniach. Próbkę o powierzchni 1 cm² rozdrabniano na pasemka o szerokości 1—2 mm, które następnie umieszczano w roztworze fizjologicznym w płytkach Petriego i inkubowano w temperaturze 25°C w ciągu 24 godzin. Po inkubacji usuwano fragmenty skóry, a pozostały płyn i osad badano przy użyciu mikroskopu stereoskopowego. Zaobserwowane mikrofilarie przenoszono na szkiełko podstawowe i oznaczano przynależność gatunkową pod powiększeniem 400×.