

11. Rempel W. E., Dettmers A. E.: Swine in Biomedical Research 781—787, 1985.
12. Schwark H. J., Seng W., Doring W.: Tierzucht 7, 256, 1970.
13. Wajda S.: Roczn. Inst. Przem. Mięs. 3, 3, 1971.
14. Zebrowski Z.: Roczn. Nauk rol. B 79, 65, 1962.

15. Zebrowski Z., Blicharski T., Zielińska K.: Przegl. Hod. 13, 15, 1986.
16. Zebrowski Z., Kossakowski J.: Roczn. Nauk rol. B 82, 751, 1993.

Adres autora: prof. dr hab. Zbigniew Zebrowski, ul. Rozbrat 10/14 m. 24, 00-451 Warszawa

ANDRZEJ SALWA, GRZEGORZ WĘGRZYN *

Izolacja wirusa maedi owiec w Polsce

Zakład Higieny Weterynaryjnej, ul. Kaprów 10, 80-316 Gdańsk
* Katedra Biologii Molekularnej Uniwersytetu Gdańskiego, ul. Kładki 24, 80-822 Gdańsk

Summary

Isolating of the Maedi Virus from Sheep in Poland

Maedi virus has been isolated from sheep and serological tests, cytopathological data and biochemical examinations confirmed that the isolated virus was the maedi one. Viral particles were visible under an electron microscope in negatively stained samples prepared from the supernatant of infected cell cultures. The size of the particles corresponded to an average size of the maedi virus. The findings confirmed previous clinical, epizootic and serological data with regard to the existence of maedi disease in Poland.

Choroba maedi, zwana także postępowym zapaleniem płuc (ovine progressive pneumonia), wywoływana jest przez wirus powolny należący do rodziny *Retroviridae*, podrodziny *Lentivirinae* (9, 10, 19). Schorzenie cechuje się zaburzeniami w oddychaniu oraz stopniowo postępującym wyniszczeniem organizmu, prowadzącym do zejścia śmiertelnego. Często u owiec zakażonych stwierdza się zapalenie gruczołu mlekowego i stawów (8, 11).

Występowanie choroby maedi opisano w wielu krajach (6, 12, 18, 22, 24). W Polsce pierwsze przypadki choroby maedi opisali Zadura i wsp. w 1975 r. (31). Badania kliniczne, anatomopatologiczne i serologiczne wykazały występowanie choroby na terenie Wybrzeża Gdańskiego, Wielkopolski oraz w województwach północno-wschodnich (4, 5, 14, 24). Dotychczas brak jest w Polsce doniesień o wyosobnieniu wirusa z przypadków choroby maedi u owiec. Z tego względu uznano za celowe podjęcie próby izolacji wirusa maedi.

Materiał i metody

Materiał do badań wirusologicznych i serologicznych stanowiły chore owce z fermy E, w której od kilku lat obserwowano liczne przypadki chorób układu oddechowego (duszność, kaszel) oraz wychudzenie. Obserwacje te potwierdzono badaniami anatomopatologicznymi i histologicznymi. U 22,6% owiec ze stada stwierdzono występowanie przeciwciał dla wirusa maedi (4, 5, 14). Do badań użyto wycinków płuc i krwi pełnej od pięciu chorych owiec, u których stwierdzono w odczynie precypitacji w żelu przeciwciała anty-maedi. Wycinki płuc krojono drobno i zawieszano w płynie Eagle'a z antybiotykami (penicylina 1000 j.m./ml, streptomycyna 1000 mg/ml, fungizon 2,5 mg/ml). Zawiesinę umieszczano w temperaturze 4°C na godzinę, a następnie wirowano 600 g przez 20 minut w temperaturze 4°C. Uzyskany supernatant był używany do izolacji wirusa. W celu uzyskania leukocytów pełną krew wirowano w gradiencie fikolu i uropoliny (2), 1600 g przez 40 minut w temperaturze 4°C. Zebrane komórki z granicy dwóch faz płukano w płynie Eagle'a i doprowadzano do gęstości 10⁶ komórek/ml.

Do próby izolacji wirusa stosowano hodowle komórkowe eksplantatów tkankowych: spłotu naczyńowego mózgu lub błony śluzowej torebki stawu kolanowego zdrowych owiec

w wieku od 6 do 12 miesięcy (1, 23, 28). Po wzroście, komórki trypsynowano (15, 16) i zakładano jednowarstwowe hodowle w butelkach plastikowych (Costar, Nuclon). Jako płynu wzrostowego używano płynu Eagle'a z dodatkiem 10% surowicy płodowej bydlęcej, L-glutaminy (29 mg/ml), penicyliny (100 j.m./ml) i streptomycyny (100 mg/ml). Hodowle inkubowano w termostacie ze stałym przepływem CO₂ (3—5%) w temperaturze 37°C. W celu utrzymania ciągłości hodowli komórki pasażowano 6—12 razy.

Zakażanie komórek wykonywano dwoma sposobami (A i B).

A. 48—72-godzinne hodowle zakażano drogą adsorpcji wirusa przez inkubację materiału z płuc lub krwi chorych owiec przez 2 godziny w temperaturze 37°C. Następnie dodawano płynu Eagle'a z dodatkiem 2% płodowej surowicy bydlęcej z antybiotykami w ilości równej objętości płynu wzrostowego.

B. 48—72-godzinne hodowle komórkowe trypsynowano i przygotowywano zawiesinę komórek (10⁶/ml) i leukocytów krwi lub supernatantu tkanki płucnej badanych owiec. Mieszanie tę rozlewano do kilku butelek plastikowych.

Zakażone hodowle inkubowano w temperaturze 37°C przez okres 7—10 dni. Po tym czasie jedną z zakażonych hodowli, po usunięciu płynu, oglądano w mikroskopie świetlnym. W przypadku pojawienia się charakterystycznych syncytiów (komórek rzekomo olbrzymich) zakażone hodowle w pozostałych butelkach jednokrotnie zamrażano i rozmrażano. Otrzymaną zawiesinę wirowano 600 g przez 20 minut w temperaturze 4°C. Uzyskany supernatant stanowił materiał do badań w kierunku identyfikacji wirusa. W przypadku braku syncytiów wykonywano kolejne pasáže zakażonej hodowli w celu potwierdzenia ujemnego efektu cytopatycznego. Izolowane szczepy wirusa badano przy pomocy metod serologicznych, fizyko-chemicznych oraz biochemicznych.

Zastosowano odczyn seroneutralizacji (SN-a) i odczyn precypitacji w żelu agarozowym (7, 21, 29). Odczyn precypitacji wykonywano według metody Cutlipa (7) w oparciu o antygen przygotowany z izolowanego szczepu wirusa w laboratorium. Swoistość odczynów serologicznych, wysokości miana surowic anty-maedi oraz właściwości wyizolowanych szczepów wirusa w warunkach doświadczalnych sprawdzano wobec referencyjnej surowicy odpornościowej i standardowego szczepu wirusa maedi K₁₅₁₄ otrzymanego z laboratorium INRA-ENV, Lyon, Francja.

Preparaty z supernatantu znad hodowli komórkowej zakażonej wirusem przeznaczone do mikroskopii elektronowej były barwione negatywowo w 2% roztworze PTA i przygotowywane według Heine i wsp. (13).

Materiał genetyczny otrzymanego szczepu wirusa był izolowany poprzez trzykrotną ekstrakcję oczyszczonego lizatu równą objętością fenolu nasyconego buforem 0,1M Tris-HCl pH = 8,0 oraz dwukrotną ekstrakcję równą objętością chloroformu. Po każdej ekstrakcji próbki były wirowane 4000 g przez 10 minut, faza wodna była zbierana i przenoszona do nowej próbki. Po ostatniej ekstrakcji chloroformem do fazy wodnej dodawany był 3M roztwór octanu sodu do stężenia 0,3M oraz glikogen do stężenia 0,2%. Precypitacja była przeprowadzana przez noc w temperaturze -20°C po dodaniu dwóch objętości 96% etanolu. Po wirowaniu 5000 g przez 30 minut w temperaturze 4°C osad był przemylany 70% etanolem, suszony pod próżnią, a następnie rozpuszczany w buforze TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH = 8,0). Trawienie nukleazami było prze-

prorowadzane w 5 mM roztworze $MgSO_4$ przez 15 minut w temperaturze 37°C wykorzystując RN-azę A wolną od DN-az (Sigma) oraz DN-azę I wolną od RN-az (Boehringer). Elektroforeza agarozowa w buforze TAE była przeprowadzana według Sambrook i wsp. (25) z wykorzystaniem czerni eriochromowej T jako barwnika wskaźnikowego (20). Żel agarozowy był barwiony przez 30 minut w roztworze bromku etydyny o stężeniu 0,5 µg/ml, a następnie fotografowany przy pomocy kamery UVP w świetle ultrafioletowym transiluminatora przy długości fali 312 nm. Izolacja DNA bakteriofaga λ była przeprowadzana według Sambrook i wsp. (25).

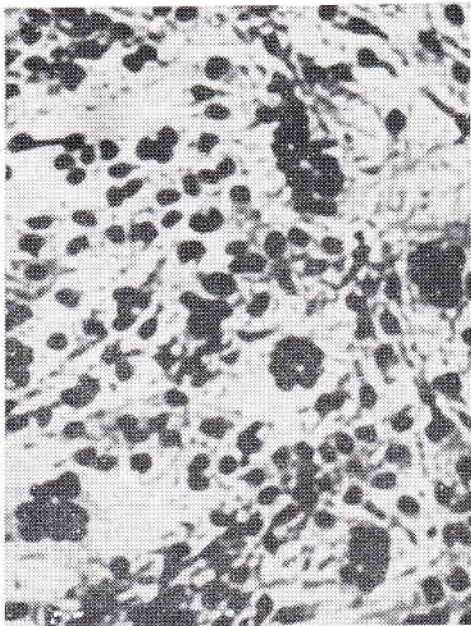
Wrażliwość wirusa na czynniki chemiczne sprawdzano stosując: 20% eter, 10% chloroform (15). Wrażliwość na trypsynę, pH i temperaturę badano technikami podanymi przez Asso (1, 2).

Wyniki i omówienie

Wyniki izolacji wirusa maedi przedstawiono w tab. 1. Ogółem wyizolowano trzy szczepy wirusa maedi, w tym



Ryc. 1. Hodowla komórkowa fibroblastów spłotu naczyniowego mózgu owcy, nie zakażona



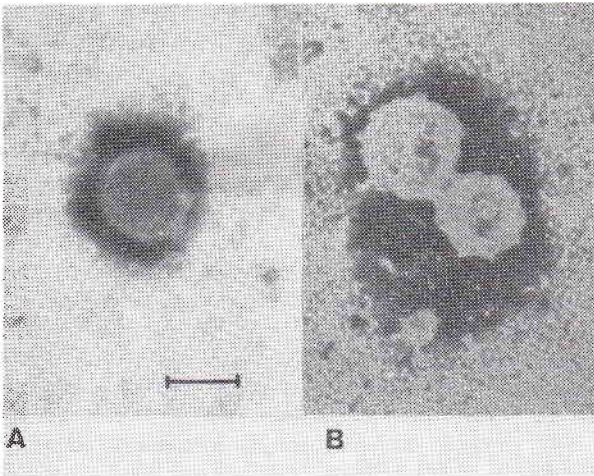
Ryc. 2. Hodowla komórkowa fibroblastów spłotu naczyniowego mózgu owcy, zakażona wyizolowanym wirusem, po siedmiu dniach od zakażenia

dwa szczepy wyosobniono z leukocytów krwi (owca nr 1 i 3) oraz jeden szczep z płuc (owca nr 3). Szczepy oznaczono literą M. Zmiany cytopatyczne w tych trzech przypadkach pojawiły się w drugim pasażu w 6—7 dniu po zakażeniu (ryc. 1 i 2). Stwierdzono, że miana TCID₅₀ wyizolowanych szczepów obliczone według Reeda i Muencha (15) wynosiły od 10^{-6,6} do 10^{-7,1} na 0,1 ml. Na uwagę zasługują pozytywne wyniki izolacji wirusa przy użyciu techniki zakażania przez dodanie materiału zakaźnego z płuc lub leukocytów do świeżo trypsynowanej hodowli komórek (ang: coculture). Jak wynika z prac innych autorów stosowanie tej metody daje dobre efekty (3, 4). Sposób ten pozwala na lepszy kontakt komórek z materiałem zakaźnym, co ma szczególne znaczenie dla wirusów niezaadaptowanych i trudnych do izolacji. Jedną z cech charakterystycznych dla *Lentivirinae* jest tworzenie syncytiów, a w dalszym etapie rozpad komórek (26). Zjawisko to związane jest z replikacją wirusa maedi. Do pojawienia się fazy efektu cytopatycznego konieczna jest ekspresja genów wirusa, co prowadzi do zaburzeń czynnościowych komórki (7, 19). Przeprowadzona identyfikacja serologiczna za pomocą testu seroneutralizacji i testu precypitacji w żelu agarozowym potwierdziła, że wyizolowane szczepy są wirusami maedi. Stopień zubożenia wirusa przez standardową surowicę (indeks seroneutralizacji) dla poszczególnych szczepów wyniósł od 10^{3,2} do 10^{-4,8}. Świadczy to, że reakcja identyfikacji wirusa była dodatnia. Różnice pomiędzy wartościami indeksu korelują z wysokością

Tab. 1. Wyniki badań wirusologicznych i serologicznych owiec

Nr owcy	Wyniki izolacji wirusa		TCID ₅₀ szczepów maedi w II pasażu hodowli komórkowej	Indeks seroneutralizacji	Odczyn precypitacji w żelu
	z płuc	z krwi			
1	(+)	(+)	10 ^{-7,1} /10 ^{-6,2}	10 ^{4,8} /10 ^{3,2}	dodatni
2	(-)	(-)	—	—	dodatni
3	(-)	(+)	10 ^{-6,6}	10 ^{3,2}	dodatni
4	(-)	(-)	—	—	dodatni
5	(-)	(-)	—	—	dodatni

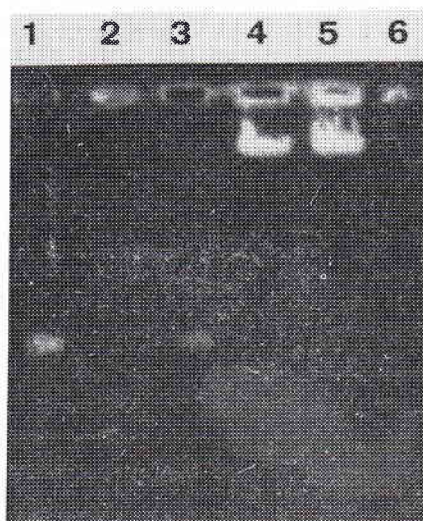
Objaśnienia: (+) izolacja wirusa, (-) brak izolacji wirusa.



Ryc. 3 A i B. Cząstki wirusa maedi widoczne w mikroskopie elektronowym w preparacie z supernatantu znad hodowli komórkowej zakażonej wyizolowanym wirusem, barwione negatywnie. Zaznaczony odcinek odpowiada długości 100 nm

Tab. 2. Wpływ czynników fizycznych i chemicznych na wyizolowanego wirusa maedi

Warunki	Czas działania czynnika w min.	Ilość wirusa w TCID ₅₀ /0,1 ml
kontrola	—	10 ^{-3,4}
10% CHCl ₃	10	<10 ^{-0,975}
20% eter	60	<10 ^{-0,975}
temp. 45°C	60	10 ^{-3,2}
temp. 56°C	60	<10 ^{-0,975}
trypsyna 0,25%	30	10 ^{-3,3}
trypsyna 2,5%	30	10 ^{-3,3}
pH = 4	60	10 ^{-4,1}
pH = 5	60	10 ^{-3,2}
pH = 10	60	10 ^{-3,4}



Ryc. 4. Elektroforeza w 1% żelu agarozowym materiału genetycznego z wyizolowanego wirusa (ścieżki: 1, 2, 3) oraz bakteriofaga (ścieżki: 4, 5, 6); form natywnych (ścieżki 1 i 4), trawionych RN-azą wolną od DN-az (ścieżki 2 i 5), trawionych DN-azą wolną od RN-az (ścieżki 3 i 6)

miana TCID₅₀ wyizolowanych szczepów. Wyższe miano stwierdzono przy izolacji wirusa z płuc.

W barwionych negatywnie preparatach z supernatantu z hodowli komórkowej zakażonej wirusem widoczne są w mikroskopie elektronowym cząstki wirusowe wielkości od około 100 do 140 nm (ryc. 3), co odpowiada wielkości wirusa maedi (17, 27, 39).

Szybkość migracji kwasu nukleinowego, jak i wrażliwość na RN-azę przy niewrażliwości na DN-azę świadczą, że materiałem genetycznym znajdującym się w kapsydzie wyizolowanego wirusa jest, tak jak u wszystkich retrowirusów, RNA (ryc. 4).

Przeprowadzone badania wytrzymałości wyizolowanych wirusów na działanie rozpuszczalników organicznych, tj. chloroformu i eteru wykazały, że ulegały one inaktywacji pod wpływem obu tych czynników (tab. 2). Wyizolowane szczepy wirusów zbadano pod względem zdolności przeżywania w różnych temperaturach, w roztworach trypsyny oraz wytrzymałości na różny odczyn środowiska (tab. 2). Wyniki potwierdziły rezultaty innych autorów (2, 6, 19, 30). Wykazano, że wirus jest wrażliwy na wysoką temperaturę (56°C), trypsynę w stężeniu 2,5% oraz częściowo wrażliwy na niskie pH (pH = 4) przy niewrażliwości na zasadowy odczyn środowiska (pH = 10).

Identyfikacja serologiczna, cytomorfologiczna, fizyko-chemiczna i biochemiczna wyizolowanych szczepów dowodzi, że są one szczepami wirusa maedi. Potwierdza to wcześniejsze wyniki badań klinicznych, epizootycznych

i serologicznych o występowaniu choroby maedi u owiec w Polsce.

Piśmiennictwo

1. Asso J., Fontaine M.: Sci. Vet. Med. Comp. 90, 63, 1988.
2. Asso J.: Lentivirus des petits ruminants Maedi — CAEV, INRA, Vielleurbanne, 3, 1992.
3. Asso J.: Dane nieopublikowane.
4. Baczyński Z., Matusiewicz J.: Bull. Vet. Inst. Puławy, 30, 5, 1937—1938.
5. Baczyński Z., Skulimowska-Kryszkowska D., Roszkowski J., Salwa A.: Życie Wet. 62, 33, 1987.
6. Carporale V. P., Lello R., Rutilli D.: Vet. Res. Comm. 9, 115, 1985.
7. Cutlip R. C., Jackson T. A., Laird G. A.: Am. J. Vet. Res. 38, 1681, 1977.
8. Cutlip R. C., Lehmkuhl H. D., Brogden K. A., Boiin S. R.: Am. J. Vet. Res. 46, 327, 1985.
9. Cutlip R. C., Lehmkuhl H. D., Shmerr M. F., Brogden K. A.: Vet. Microbiol. 17, 237, 1988.
10. Dawson M.: J. Comp. Path. 99, 401, 1988.
11. Evermann J. F.: Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis. 13, 127, 1990.
12. Harter D., Coward J. E.: Texas Rep. Biol. Med. 32, 649, 1974.
13. Heine U. I., Margulies I., Demsey A. E., Suskind R. G.: J. Gen. Virol. 45, 631, 1979.
14. Kopczewski A., Salwa A., Baczyński Z.: Medycyna Wet. 41, 70, 1984.
15. Larski Z.: Diagnostyka wirusologiczna chorób zwierząt, PWRiL, Warszawa, 1977.
16. Lepine P.: Techniques de laboratoire en virologie humaine, Masson et Cie, Paris, 1984.
17. Lin F. H., Thormar H.: J. Virol. 6, 162, 1970.
18. Molitor T. W.: Immunologic aspects of ovine progressive pneumonia, Praca dokt. North Dakota State University, 1978.
19. Narayan O., Clements J. E.: J. Gen. Virol. 70, 1617, 1989.
20. Obuchowski M., Węgrzyn G.: Acta Biochim. Pol. 38, 177, 1991.
21. Remond M., Russo C., Giauffret A., Larenaudie B.: Bull. Lab. Vet. 1, 35, 1980.
22. Russo P., Giauffret A., Laserre M., Sarrazin C.: Bull. Acad. France 53, 287, 1980.
23. Russo P., Vitu C.: Maladies a virus lents des ovins et des caprins, Soc. Francaise Buiatrie, E.N.V., Toulouse, 37, 1987.
24. Salwa A.: Mat. IX Kongresu PTNW, Olsztyn, 2, 435, 1992.
25. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T.: Molecular cloning. A laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989.
26. Sigurdsson B., Thormar H., Palsson P. A.: Arch. Ges. Virusforsch. 10, 24, 1960.
27. Takemoto K. K., Aoki C., Garon C., Sturm M. M.: J. Natl. Cancer Inst. 53, 543, 1973.
28. Thiongane Y.: Isolement du virus artherite — encephalite de la chevre et analyse des proteines. Praca dokt. Univ. Lyon — Ecole Nat. Vet. Lyon, 1988.
29. Thormar H.: J. Immunology 90, 2, 185, 1963.
30. Thormar H.: Physical chemical and biological properties of maedi-visna and its relationship to other animal viruses, w: Gajdusek D. C., Gibbs C. J., Alpers M.: Monograph No. 2 in Nat. Inst. Neurol. Dis. Blind. Washington, 335, 1965.
31. Zadura I., Czakala S., Roszkowski J.: Medycyna Wet. 31, 474, 1975.

Adres autora: dr Andrzej Salwa, ul. Chalubińskiego 6/32, 83-807 Gdansk

MOHRI S., FARQUHAR C. F., SOMERVILLE R. A., JEFFREY M., FOSTER J., HOPE J.: Wykrywanie przy pomocy metod immunologicznych specyficznej frakcji PrP u owiec ze scrapie i u bydła z BSE. (Immunodetection of a disease specific PrP fraction in scrapie-infected sheep and BSE-affected cattle). Vet. Rec. 131, 537, 1992 (23)

Scrapie owiec i gąbczasta encefalopatia bydła (BSE) wywołuje czynnik zakaźny, którego replikacja jest pod kontrolą genomu gospodarza. Obydwie choroby cechują się długim okresem wylegania, krótkim okresem objawów klinicznych i zejściem, którym jest śmierć zwierzęcia chorego. Dotychczas brak metod przyżyciowego rozpoznawania choroby. Wiadomo jednak, że włókna występujące w scrapie (SAF) zawierają białko PrP. Występuje ono w mózgu i narządach wewnętrznych zakażonych zwierząt. Agregaty PrP, tzw. PrPd, można odróżnić od PrP na podstawie sedimentacji po uprzednim działaniu detergentu oraz na podstawie częściowej niepodatności na działanie enzymów hydrolitycznych (proteinaza K). Stosując metodę immunobloting do badania mózgu, węzłów chłonnych i śledziony na obecność PrPd wykazano obecność tego białka zarówno w mózgu owiec ze scrapie, jak i bydła z BSE. PrPd występuje też w przedłopatkowych i pachwinowych węzłach chłonnych i w wyciągach śledziony owiec zakażonych scrapie. Wydaje się, że udoskonalenie metody umożliwi przyżyciowe wykrywanie PrPd w oparciu o węzły chłonne.