

Z Katedry Mikrobiologii Wydziału Weterynaryjnego WSR w Lublinie
Kierownik: prof. dr Tadeusz Jastrzębski

Jan BUCZEK

**Badania nad wirusami typu Orphan występującymi u świń w Polsce.
VII — Wpływ wirusa Orphan L1 na wirus pomoru świń w hodowli
komórek nerek świń**

Investigations on the Viruses of the Orphan Type Occurring in Pigs in Poland.
VII. Influence of the Orphan Virus L1 on the Virus of Hog Cholera in Swine
Kidney Cell Cultures

Badania prowadzone w celu uzyskania pewnej i szybkiej laboratoryjnej metody rozpoznania pomoru świń, jak dotychczas nie zostały uwieńczone powodzeniem. Metoda precypitacji w żelu agarowym, zaproponowana przez Molnara (1954), została wprawdzie pozytywnie oceniona przez niektórych badaczy (Mansi, 1957; Zeljko i Forssek, 1958 i inni), jednak niektóre badania, szczególnie autorów polskich (Janowski, Truszczyński, 1959; Wawrzekiewicz, 1962) zakwestionowały jej swoistość.

Bardzo obiecujące doniesienia takich autorów jak Gustafson, Pomerat (1956), Gillespie, Sheffy, Baker (1960), Mayer i Mahnel (1965), Terjukhanov (1954) o wyosobnieniu z przypadków pomoru świń szczepów powodujących przy zakażeniu pomór, a posiadających własności cytopatyczne, w świetle ostatnich doniesień Bodona (1965) zdają się polegać na pomyłce. Bodon stwierdził, że wszystkie dostępne mu tzw. cytopatogenne szczepy pomoru zawierały (oprócz niecytopatogennego wirusa pomoru świń) cytopatogenne wirusy z grup adeno lub IBR.

Ostatnio wysiłki badaczy zajmujących się zagadnieniem diagnostyki pomoru przy użyciu hodowli komórek zmierzają do opracowania takiego układu, który by doprowadził do powstania swoistych zmian do hodowli komórek drogą synergizmu (Kumagai i współprac., 1961), lub do swoistego hamowania przez wirus pomoru zmian wytworzonych w hodowli komórek przez inne wirusy cytopatogenne (Janowska, 1963).

Obydwie metody wg tych autorów dały pomyślne wyniki, jednak wymagają dalszego opracowania i nie wyszły dotychczas poza obręb prób laboratoryjnych.

Badania własne miały na celu wyjaśnienie ewentualnej możliwości użycia wirusa cytopatogenicznego L1 do wykrywania wirusa pomoru świń — poprzez zahamowanie działania cytopatogenicznego wirusa L1 drogą uprzedniego wysiewu wirusa pomoru świń na hodowlę komórek nerek świni.

MATERIAŁ I METODY

Hodowle komórek. Badania wykonano na jednowarstwowych, pierwotnych hodowlach komórek nerek świń (HKNS) przygotowanych według metody Youngnera (1954). Podłoże wzrostowe (PW) stanowił płyn Hanksa z dodatkiem 0,25% hydrolizatu laktalbuminy, 10% surowicy cielęcej oraz antybiotyków (penicylina — 100 j. w ml, streptomycyna — 100 mg/ml). Podłoże utrzymujące (PU) różniło się zmniejszoną do 2% ilością surowicy. Do przygotowania płynu i prowadzenia hodowli używano szkła i odczynników produkowanych w kraju (Buczek, 1965).

Szczepcy wirusów. Wirus L1 (Jastrzębski, Buczek, 1962) namnożony na HKNS. Jako wirus pomoru świń użyto jałowo pobraną odwłóknioną krew świń zakażonych szczepem wirusa pomoru świń "Washington" i skrwawianych na szczycie gorączki*.

W charakterze kontroli użyto jałowo pobraną i odwłóknioną krew świń zdrowych (każdorazowo od 5 zwierząt) wagi około 80 kg, poddawanych ubojowi w Lubelskich Zakładach Mięsnych.

Wpływ wirusa pomoru świń na wirus L1 przebadano w temperaturze 37° po 1 i 24 godz. W tym celu krew świń pomorowych rozcieńczano płynem Hanksa w stosunku 1:10 i wprowadzano do probówek z HKNS w ilości po 0,1 ml. Po 1 i 24 godzinach część zakażonych wirusem pomoru probówek HKNS zasiewano wirusem L1 oznaczając jego miano. Analogicznie postępowano z krwią zwierząt zdrowych, która służyła jako kontrola. Poza tym kontrole stanowiły probówki z hodowlą komórek nerek świń zawierające tylko podłoże utrzymujące, oraz hodowle komórek, do których wprowadzano tylko krew świń zakażonych wirusem pomoru lub krew zwierząt zdrowych.

W drugiej części doświadczenia postępowano analogicznie, z tym tylko, że probówki do których wprowadzano krew świń zakażonych wirusem pomoru oraz krew świń zdrowych, przepłukiwano 2—3 razy płynem utrzymującym w celu usunięcia krwi oraz ewentualnie obecnych przeciwciał anti-L1, a następnie zakażano wirusem L1, oznaczając jego miano. Zakażone probówki obserwowano codziennie pod mikroskopem (pow. 80×) przez 6—8 dni.

Miano wirusa w ID₅₀/ml obliczono statystycznie metodą Reed-Muencha (1938).

* Wirus otrzymano z PZPB w Michałowie — za co składamy Dyrekcji serdeczne podziękowania.

WYNIKI I OMÓWIENIE

Wyniki przedstawiono w tab. 1. Na jej podstawie można twierdzić, że krew świń, zarówno zakażonych wirusem pomoru świń jak i nie zakażonych, w przeprowadzonych doświadczeniach wykazała zdolność hamowania działania cytopatogenicznego wirusa L1. Stopień hamowania wykazywał duże różnice w poszczególnych doświadczeniach. Usunięcie krwi

Tab. 1. Wpływ krwi zawierającej wirus pomoru świń na cytopatogenność wirusa L1 w HKNS

Influence of blood containing the hog cholera virus on the cytopathogenicity of virus L1 in swine kidney cell cultures

Lp.	Miano L1	Krew świń pomorowych		Krew świń zdrowych		Krew świń pomorowych		Krew świń zdrowych	
		po 1 godz. L1	po 24 godz. L1	po 1 godz. L1	po 24 godz. L1	z przepłuki- waniem HK		z przepłuki- waniem HK	
						po 1 godz. L1	po 24 godz. L1	po 1 godz. L1	po 24 godz. L1
1	4,32	1,38	1,15	3,49	3,23	3,49	3,00	4,32	4,49
2	4,32	3,49	3,32	2,23	2,08	4,49	3,32	4,14	3,32
3	4,14	3,00	3,49	1,39	1,39	4,49	3,32	4,14	3,95

Miano w log ID₅₀ ml
titre in log ID₅₀ ml.

i przepłukanie hodowli komórek wykonane w 1 lub 24 godziny po wprowadzeniu krwi zmniejszało działanie hamujące wprowadzanej krwi, ale nie usuwało go całkowicie i to zarówno przy użyciu krwi pobranej od świń zakażonych wirusem pomoru jak i od zdrowych.

Obserwowana zdolność krwi świńskiej wirusowej i „normalnej” do hamowania efektu cytopatogenicznego wirusa L1 wiąże się prawdopodobnie z szerokim rozpowszechnieniem u świń swoistych inhibitorów dla wirusa L1, gdyż w świetle badań Jastrzębskiego (1964) inhibitory dla wirusa R3, identycznego serologicznie z L1, są szeroko rozpowszechnione wśród świń.

Z przeprowadzonych badań należy wyciągnąć wniosek, że wirus L1 nie nadaje się jako ewentualny wskaźnik działania wirusa pomoru na hodowlę komórek. Dalsze badania winny być wykonane z wirusami, które w warunkach naturalnych u świń nie występują.

PIŚMIENICTWO

1. Bodon L.: Contamination of Various Hog Cholera Virus Strains with Adenoviruses or Virus Diarrhoea Virus. *Acta Vet. Hung.*, 1965, 15, 471.
2. Buczek J.: Uwagi nad zastosowaniem aparatury, szkła i odczynników chemicznych produkcji krajowej do prowadzenia hodowli komórek. *Biuletyn Informacyjny Biowet*, 1965, 1 (10), 11.
3. Gillespie J. H., Sheffy B. E., Baker J. A.: Propagation of Hog Cholera virus in Tissue Culture. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1960, 105, 679.
4. Gustafson D. P., Pomerat C. M.: Cytopathic Changes in Tissue Cultures Derived from Pig Infected with Hog Cholera. *Am. J. Vet. Res.*, 1956, 17, 165.
5. Janowska I.: Wzajemne oddziaływanie wirusa pomoru świń i wirusa grypy ludzkiej w hodowli tkankowej (praca doktorska), 1962.
6. Janowski H., Truszczyński M.: Serological Studies on Swine Fever. *Biuletyn Inst. Wet.*, Puławy 1959, 1—2, 6.
7. Jastrzębski T.: Inhibitory ciepłostale wirusów jelitowych świń R3 i R16 w surowicach ludzi i zwierząt. *Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, sectio DD*, vol. XVII (1962), 9, Lublin 1964.
8. Jastrzębski T., Buczek J.: Pierwsze wyosobnienie wirusów jelitowych od zdrowych świń w Polsce. *Med. Wet.*, 1962, 17, 342.
9. Kumagai T., Shimizu T., Ikeda S., Matumoto M.: A New in vitro Method (END) for Detection and Measurement of Hog Cholera Virus and Its Antibody by Means of Effect of H C Virus on Newcastle Disease Virus in Swine Tissue Culture. I. Establishment of Standard Procedure. *J. Immunol.*, 1961, 87, 245.
10. Mansi W.: The Study of some Viruses by the Plate Gel Diffusion. *J. Comp. Path. Therap.*, 1957, 67, 297.
11. Mayer A., Mahnel H.: Züchtung von Schweinepestvirus in Schweinenieren—Kulturen mit cytopatogenen Effekt. *Zbl. Bakt. Orig.*, 1965, 195, 157.
12. Molnar J.: Precipitation Experiments with Swine Fever Virus—Containing Material. *Acta Vet. Hung.*, 1954, 4, 247.
13. Reed L. J., Muench H.: A Simple Method of Estimating Fifty Per cent Endpoints. *Am. J. Hyg.*, 1938, 27, 493.
14. Terjukhanow A. B.: Izmienienije svojstw wirusa czumy swiniey w kulturach tkaniej. *Wietierinarija*, 1964, 9, 21.
15. Wawrzkievicz J.: Badania nad rozpoznawaniem pomoru świń przy pomocy niektórych odczynów serologicznych (praca doktorska), Lublin 1962.
16. Youngner J. S.: Monolayer Tissue Cultures. I. Preparation and Standarization of Suspension of Tripsin Dispersed Monkey Kidney Cells. *Proc. Soc. Exp. Biol.*, 1954, 85, 202.
17. Zeljko M., Forsek Z.: Primjena gel-difuzjone precipitacije u dokorivanja virusa svinjske Kuge. *Veterinarsky Glasnik*, 1958, 11, 867.

Исследования вирусов типа Orphan у свиней в Польше.

VII. Влияние вируса Orphan L1 на вирус чумы свиней
в культуре клеток почек свиней

Резюме

Исследовано влияние присутствия вируса чумы на процесс цитопатических изменений в HKNS, вызванных выделенным от здоровых свиней вирусом L1.

Установлено, что из-за частого присутствия в крови свиней ингибиторов вируса L1, последний не может быть использован в качестве эвентуального показателя действия вируса чумы на культуру клеток почек свиней.

Investigations on the Viruses of the Orphan Type Occurring in Pigs in Poland. VII. Influence of the Orphan Virus L1 on the Virus of Hog Cholera in Swine Kidney Cell Cultures

Summary

The author studied the influence of the presence of the hog cholera virus on the course of cytopathic changes in swine kidney cell cultures produced by virus L1 isolated from healthy pigs.

It was found that because of frequent occurrence of inhibitors for virus L1 in the blood of pigs infected with hog cholera the virus L1 could not be used as a possible indicator of the action of the hog cholera virus on cell cultures.