

**ZESZYTY NAUKOWE
UNIwersYTETU
PRZYRODNICZEGO
WE WROCŁAWIU**

NR 556

ROZPRAWY CCXLVIII

KRZYSZTOF RYPUŁA

**DEVELOPMENT OF SELECTED HAEMATOLOGICAL
AND IMMUNOLOGICAL BLOOD INDICATORS
IN COURSE OF EXPERIMENTAL INFECTION
OF SWINE WITH VARIOUS STRAINS
OF THE VIRUS BVD TYPE 1**

**DEPARTMENT OF EPIZOOTIOLOGY AND VETERINARY
ADMINISTRATION WITH CLINIC**



WROCŁAW 2007

KRZYSZTOF RYPUŁA

**KSZTAŁTOWANIE SIĘ WYBRANYCH
WSKAŹNIKÓW HEMATOLOGICZNYCH
I IMMUNOLOGICZNYCH KRWI W PRZEBIEGU
EKSPERYMENTALNEGO ZAKAŻENIA ŚWIŃ
RÓŻNYMI SZCZEPAMI WIRUSA BVD TYP 1**

**KATEDRA EPIZOOTIOLOGII I ADMINISTRACJI
WETERYNARYJNEJ Z KLINIKĄ**



WROCŁAW 2007

Opiniodawca

prof. dr hab. Wojciech Szweda

Redaktor merytoryczny

prof. dr hab. Wojciech Zawadzki

Opracowanie redakcyjne i korekta

mgr Elżbieta Winiarska-Grabosz

Łamanie

Teresa Alicja Chmura

Projekt okładki

Grażyna Kwiatkowska

© Copyright by Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu,
Wrocław 2007

Utwór w całości ani we fragmentach nie może być powielany ani rozpowszechniany
za pomocą urządzeń elektronicznych, nagrywających i innych
bez pisemnej zgody posiadacza praw autorskich

ISSN 1897–208X

ISSN 1897–4732

WYDAWNICTWO UNIwersytetu PRZYRODniczego WE WROCLAWIU

Redaktor naczelny – prof. dr hab. Andrzej Kotecki

ul. Sopocka 23, 50–344 Wrocław, tel./fax (071) 328–12–77

e-mail: wyd@ozi.ar.wroc.pl

Nakład: 100 + 16 egz. Ark. druk. 6,0

Druk i oprawa: F.P.H. ELMA

SPIS TREŚCI

Wykaz skrótów wykorzystanych w tekście	7
1. Wstęp	11
1.1. Charakterystyka wirusa BVD.....	11
1.1.1. Taksonomia.....	11
1.1.2. Morfologia	12
1.1.2.1. Biotypy i genotypy wirusa.....	12
1.1.2.2. Struktura genomu i białek wirusa	13
1.2. Zakażenie wirusem BVD u świń.....	14
1.2.1. Obraz kliniczny zakażenia wirusem BVD	14
1.2.2. Zmiany anatomopatologiczne w przebiegu zakażenia wirusem BVD	15
1.3. Wykrywanie zakażeń wirusem BVD u świń.....	16
1.3.1. Występowanie przeciwciał neutralizujących dla wirusa BVD u świń	16
2. Cel pracy	18
3. Badania własne	19
3.1. Część I. Zachowanie się wskaźników hematologicznych i immunologicznych u świń zakażonych eksperymentalnie różnymi szczepami wirusa BVD typ 1 ...	19
3.1.2. Materiał i metody	19
3.1.2.1. Zwierzęta.....	19
3.1.2.2. Szczepy wirusa BVD typ 1 użyte do badań.....	20
3.1.2.3. Zakażenie eksperymentalne.....	20
3.1.2.4. Pobieranie prób do badań	20
3.1.2.5. Badania kliniczne.....	20
3.1.2.6. Badania hematologiczne	21
3.1.2.7. Subpopulacje limfocytów krwi obwodowej określane przy użyciu cytometrii przepływowej	21
3.1.2.8. Dynamika narastania mian przeciwciał przeciwko wirusowi BVD typ 1 w surowicy świń	29
3.1.2.9. Analiza statystyczna wyników	29
3.1.3. Wyniki	30
3.1.3.1. Stan kliniczny zwierząt zakażonych różnymi szczepami wirusa BVD typ 1	30
3.1.3.2. Wskaźniki hematologiczne u świń w przebiegu zakażenia szczepami NADL2:NADL8, V725 i 5862/84 wirusa BVD typ 1	31
3.1.3.3. Zmiany w subpopulacjach limfocytów T i B krwi obwodowej świń zakażonych różnymi szczepami wirusa BVD typ 1	44
3.1.3.3.1. Szczep NADL2:NADL8 wirusa BVD	44
3.1.3.3.2. Szczep V725 wirusa BVD	44
3.1.3.3.3. Szczep 5862/84 wirusa BVD	53
3.1.3.4. Dynamika narastania mian przeciwciał u świń zakażonych różnymi szczepami wirusa BVD typ 1	62

3.1.3.4.1. Badanie mian przeciwciał świń zakażonych różnymi szczepami wirusa BVD typ 1 z użyciem szczepu NADL.....	62
3.1.3.4.2. Badanie mian przeciwciał u świń zakażonych różnymi szczepami wirusa BVD typ 1 z użyciem szczepu 1726 98/Salza	62
3.1.4. Omówienie wyników i dyskusja	67
3.1.5. Wnioski.....	71
3.2. Część II. Wykrywanie antygenu pan-pestiwirusowego u świń	71
3.2.1. Materiał i metody.....	71
3.2.1.1. Zwierzęta.....	71
3.2.1.2. Szczepy wirusa BVD użyte do badań.....	72
3.2.1.3. Pobieranie prób do badań.....	72
3.2.1.4. Badania kliniczne.....	72
3.2.1.5. Wykrywanie antygenu pan-pestiwirusowego testem ELISA.....	72
3.2.1.6. Wykrywanie antygenu pan-pestiwirusowego metodą cytometrii przepływowej	73
3.2.2. Wyniki	74
3.2.2.1. Stan kliniczny zwierząt.....	74
3.2.2.2. Wyniki badań krwi świń na obecność wirusa BVD testem ELISA i metodą cytometrii przepływowej	75
3.2.3. Omówienie wyników i dyskusja	81
3.2.4. Wnioski.....	83
4. Piśmiennictwo.....	84

WYKAZ SKRÓTÓW WYKORZYSTANYCH W TEKŚCIE

(w kolejności alfabetycznej)

- BALT – tkanka limfatyczna związana z oskrzelem (*Bronchus Associated Lymphoid Tissue*)
- BDV – wirus choroby granicznej owiec
- BHV-1 – herpeswirus bydłęcy typ 1 (*Bovine Herpesvirus-1*)
- BSA – albumina bydłęca
- BVDV – wirus wirusowej biegunki
- BVDV-1 – wirus wirusowej biegunki bydła typ 1
- BVDV-2 – wirus wirusowej biegunki bydła typ 2
- Ca⁺² – jon wapnia
- CD – kompleks różnicowania (*Cluster of Differentiation*)
- CO₂ – dwutlenek węgla
- cp BVDV – szczep cytopatyczny wirusa BVD
- CSFV – wirus klasycznego pomoru świń
- E – glikoproteina otoczkowa BVDV
- EDTA-K₂ – sól potasowa kwasu etyleno-2-amino-4-octowego
- ELISA – test immunoenzymatyczny (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*)
- FACS – sorter komórek znakowanych fluorescencyjnie (*Fluorescence-Activated Cell Sorter*)
- FCS – surowica płodowa bydłęca (*Fetal Calf Serum*)
- FITC – izotiocyanian fluoresceiny
- fk – fento/litr (10⁻¹⁵·dm⁻³)
- FSC – rozproszenie przednie światła (*Forward Scatter*)
- G/l – giga/litr (10⁹·dm⁻³)
- GALT – tkanka limfatyczna związana z przewodem pokarmowym (*Gut Associated Lymphoid Tissue*)
- HRSV – wirus syncyjalny człowieka (*Human Respiratory Syncytial Virus*)
- FAT – technika immunofluorescencji bezpośredniej (*Fluorescent Antibody Test*)
- IgA – immunoglobuliny klasy A
- IgG – immunoglobuliny klasy G
- IPMA – test immunoperoksydazowy (*Immunoperoxidase Assay*)
- kDa – kilodalton
- m.c. – masa ciała
- MD – postać choroby błon śluzowych w przebiegu wirusowej biegunki bydła (*Mucosal Disease*)

MDBK	– hodowla komórek nerki bydłęcej (<i>Madin-Darby Bovine Kidney</i>)
Mg ⁺²	– jon magnezu
MHC	– główny układ zgodności tkankowej (<i>Major Histocompatibility Complex</i>)
NaCl	– chlorek sodu
ncp BVDV	– szczep niecytotacyjny wirusa BVD
nm	– nanometr (10 ⁻⁹)
N ^{PRO}	– białko strukturalne BVDV
NS	– białka niestrukturalne BVDV
°C	– stopień Celsjusza
OD	– gęstość optyczna (<i>Optical Density</i>)
ORF	– otwarta ramka odczytu (<i>Open Reading Frame</i>)
p.i.	– po zakażeniu
p7	– białko niestrukturalne BVDV
PBS	– zbuforowany roztwór soli fizjologicznej
PCR	– reakcja polimeryzacji łańcuchowej (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PE	– fikoerytryna
PFA	– paraformaldehyd
PI-3	– wirus parainfluenzy typ 3 (<i>Parainfluenza-3 Virus</i>)
PLA	– test immunoperoksydazowy (<i>Peroxidase Labelled Assay</i>)
PRRS	– zespół rozrodzo-oddechowy świń (<i>Porcine Reproductive and Respiratory Syndrom</i>)
RNA	– kwas rybonukleinowy
SNT	– test seroneutralizacji
SSC	– rozproszenie boczne światła (<i>Side Scatter</i>)
T/l	– tera/litr (10 ¹² ·dm ⁻³)
TCID50	– dawka powodująca zakażenie 50% komórek w hodowli komórkowej (<i>Tissue Culture Infectious Dose 50%</i>)
TCRγδ	– receptor limfocytów T typu γδ
UTR	– region niekodujący
w.c.c.	– wewnętrzna ciepłota ciała

Wykaz publikacji wykorzystanych w rozprawie habilitacyjnej

1. Rypuła K., Matusiewicz K., Chmielewski R., Klimentowski S. (2001). Use of flow cytometry for diagnosis of bosine diarrhoea virus infection. *Pol. J. Vet. Sci.* 4, 45–48.
2. Rypuła K. (2003). The effects of experimental infection with bosine diarrhoea virus (BVDV) on lymphocyte subpopulations in the peripheral blood of pigs. *Pol. J. Vet. Sci.* 6, 189–193.

1. WSTĘP

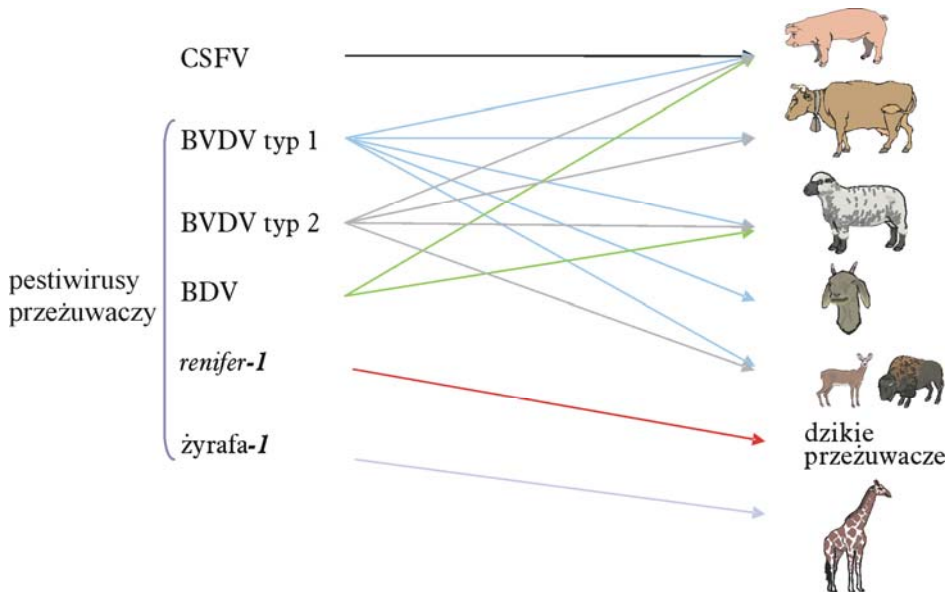
Wirusy zaliczane do rodzaju *Pestivirus* uważane są za jedne z najważniejszych patogenów bydła, owiec i świń. Wpływają one w sposób bezpośredni i pośredni na zdrowotność zwierząt oraz rentowność produkcji. Skutki zakażenia zwierząt mogą być różnorodne i objawiać się jako: zaburzenia w rozrodzie czy masowe zachorowania wśród młodych lub/i dorosłych osobników, głównie wskutek obniżenia funkcji odpornościowych organizmu. U samic ciężarnych zakażenie to uwidacznia się w formie ronień, fetopatii oraz rodzenia się potomstwa trwale zakażonego. Drugim, istotnym aspektem zakażeń wirusami z rodzaju *Pestivirus* jest ich zdolność do zakażenia innych gatunków, co przy mało specyficznym przebiegu choroby może utrudniać rozpoznawanie tych zakażeń (Baker, 1987; Thiel i wsp., 1996; Houe, 1999).

1.1. Charakterystyka wirusa BVD

1.1.1. Taksonomia

Do rodzaju *Pestivirus* w rodzinie *Flaviviridae* zaliczane są cztery gatunki wirusów izolowanych od zwierząt gospodarskich: wirus wirusowej biegunki bydła typ 1 – *Bovine Viral Diarrhea Virus-1* (BVDV-1), wirus wirusowej biegunki bydła typ 2 – *Bovine Viral Diarrhea Virus-2* (BVDV-2), wirus klasycznego pomoru świń – *Classical Swine Fever Virus* (CSFV), wirus choroby granicznej owiec – *Border Disease Virus* (BDV) oraz gatunki wirusów izolowanych od żyraf i reniferów (rys. 1) (Avalos-Ramirez i wsp., 2001; Becher i wsp., 1999; Becher i Thiel, 2002; Heinz i wsp., 2000). Do rodziny *Flaviviridae* zalicza się także wirus żółtej febry i wiosennego zapalenia mózgu ludzi, wirus Louping ill i choroby wesselbrońskiej owiec oraz wirus zapalenia mózgu i rdzenia kaczek (Wengler, 1991).

Nazewnictwo pestiwirusów uwzględnia gatunki wrażliwych na nie zwierząt oraz obraz kliniczny choroby. Jednakże zakażenia BVDV-1, BVDV-2 i BDV dotyczą nie tylko bydła, ale również innych gatunków w obrębie parzystokopytnych (*Artiodactyla*) (Becher i wsp., 1999; Becher i wsp., 1997; Doyle i Heuschele, 1983; Hamblin i Hedger, 1979; Nettleton, 1990). Zakażenia wirusem BVD zarówno typu 1, jak i 2 dotyczą przede wszystkim bydła, ale i owiec, kóz, jeleni oraz trzody chlewnej. Spektrum zakażeń wirusa BD obejmuje swym zasięgiem owce, kozy i trzodę chlewną. Natomiast zakażenia wirusem CSF w warunkach naturalnych wykazano tylko u trzody chlewnej i dzików (Hurtado i wsp., 2003).



Rys. 1. Spektrum zakaźne wirusów z rodzaju *Pestivirus* (Rosales, 2004a)

Fig. 1. Infectious spectrum of the viruses of the kind *Pestivirus* (Rosales, 2004a)

1.1.2. Morfologia

Pestiwirusy są wirusami otoczkowymi o średnicy 40 do 60 nm. Wewnątrz wirionu znajduje się kubicznego kształtu nukleokapsyd o średnicy od 20 do 29 nm. (Horzinek i wsp. 1967; Wengler, 1991).

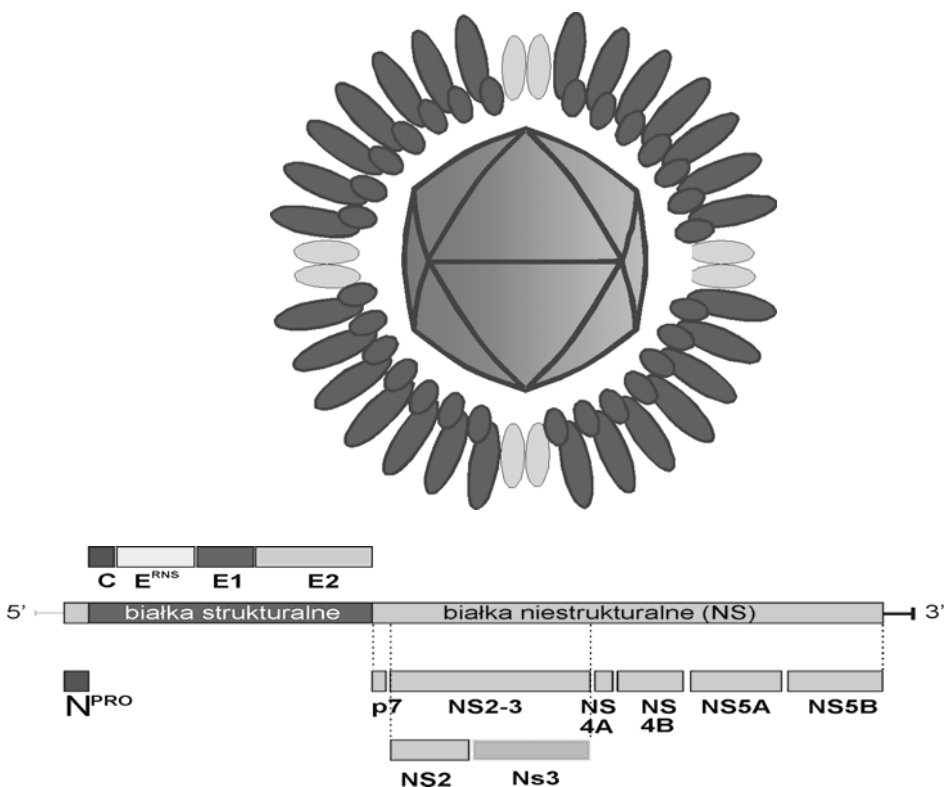
1.1.2.1. Biotypy i genotypy wirusa

Podstawą podziału wirusa BVD na biotypy jest jego zachowanie się w hodowli komórkowej. Wirus BVD, który w hodowli nie powoduje zmian makro- i mikroskopowych, zaliczany jest do biotypu niecytopatycznego, natomiast wirus zaliczany do biotypu cytopatycznego powoduje powstanie wewnątrzplazmatycznych wakuoli i wydłużenie komórki (wrzecionowaty kształt) (Baker, 1954). W dalszym etapie prowadzi do pyknozy jądra komórkowego, wakuolizacji cytoplazmy, zaokrąglenia obwodu komórki oraz odrywania się jej od podłoża i zamierania (Underdahl, 1957; Gillespie, 1960; Liess, 1967).

Z kolei podział wirusa BVD na genotypy 1 i 2 oparty został o różnice w sekwencji regionu niekodującego 5' UTR (Brock, 1996). Do genotypu 1 wirusa BVD należą szczepy wirusa wykorzystywane do produkcji szczepionek, testów diagnostycznych oraz badań naukowych. Natomiast do genotypu 2 zaliczane są szczepy wirusa izolowane od zwierząt z ostrą postacią choroby, zespołem krwotocznym, jak też zwierząt zakażonych śródmacicznie (Liebler, 1995; Ridpath, 1996; Brock, 1996).

1.1.2.2. Struktura genomu i białek wirusa

Materiał genetyczny wirusa BVD, podobnie jak i pozostałych wirusów należących do rodzaju *Pestivirus*, stanowi dodatnio spolaryzowana, niepoliadenylowana nić RNA zwykle o długości 12.3 kD (Avalos-Ramirez i wsp., 2001; Collett i wsp., 1988; Meyers i wsp., 1989; Ridpath i Bolin, 1995). Między końcami 5' i 3' UTR genomu wirusa znajduje się ORF kodująca w układzie od końca N w kierunku końca C: niestrukturalną autoproteazę NPRO, białko strukturalne rdzenia C, trzy glikoproteiny otoczkowe ERNS, E1, E2. Dalsza część ORF koduje białka niestrukturalne: NS2-3 (NS2, NS3), NS4A, NS4B, NS5A, NS5B (Thiel i wsp., 1996). Obok białka NS2-3 w zakażonych komórkach gospodarza można wykryć produkty jego rozpadu w postaci białka NS2 i NS3 (Becher i wsp., 1998; Thiel i wsp., 1991) (rys. 2).



Rys. 2. Schemat wirionu i genomu pestiwirusów (Meyers i Thiel, 1996)•

Fig. 2. Scheme of virion and genome of pestiviruses (Meyers and Thiel, 1996)

N^{PRO} jest białkiem strukturalnym o silnych właściwościach autoproteolitycznych (Wiskerchen i wsp., 1991; Rümenapf i wsp., 1993).

Glikoproteina E^{RNS} obecna w otoczkę wirusa indukuje wiązanie przeciwciał neutralizujących (Rümenapf i wsp., 1993; Weiland i wsp., 1992). Posiada ona aktywność rybonukleazy (Hulst, 1994) oraz odgrywa główną rolę w replikacji wirusa (Windisch i wsp., 1996). Glikoproteina E1 posiada jeden region hydrofobowy nie indukujący powstawania przeciwciał neutralizujących (Rümenapf, 1993). Natomiast glikoproteina E2 posiada około 40 regionów hydrofobowych składających się z około 370 aminokwasów (Rümenapf i wsp., 1993). Powstałe po zakażeniu zwierzęcia przeciwciała neutralizujące skierowane są przeciwko tej glikoproteinie, co wykorzystywane jest w diagnostyce serologicznej BVD (Bolin i wsp., 1988; Donis i wsp., 1988).

Między czterema białkami niestrukturalnymi licząc od końca C znajduje się białko p7 niebędące białkiem strukturalnym, a kodującym 2/3 genomu wirusa. Jego funkcja nie jest dokładnie znana (Elbers i wsp., 1996).

Fragment genu kodującego białko NS2-3 o masie 125 kD znajduje się we wszystkich komórkach zakażonych wirusem BVD. Oprócz tego białka, w komórkach zakażonych wirusem zaliczanym tylko do biotypu cytopatycznego, znajdują się produkty rozpadu białka NS2-3 o masie 80 kD, które odpowiadają masie białka NS3. Natomiast w komórkach zakażonych wirusem zaliczanym do biotypu niecytopatycznego nie stwierdza się obecności tego białka (Purchio i wsp., 1984; Donis i Dubovi, 1987; Pocock i wsp., 1987). W dalszej kolejności wyróżnia się białka niestrukturalne: NS4A, NS4B, NS5A, NS5B o nieznanym do dziś funkcjach (rys. 2). Jedyne rola białka NS5A, charakteryzującego się krótkim okresem półtrwania, prawdopodobnie sprowadza się do opóźniania czasu replikacji wirusa (Collet i wsp., 1991, 1998). Istotny jest także jego udział w procesach fosforylacji kinaz wirusa BVD, jak i innych wirusów należących do rodzaju *Pestivirus* (Reed i wsp., 1998).

1.2. Zakażenie wirusem BVD u świń

1.2.1. Obraz kliniczny zakażenia wirusem BVD

Przebieg kliniczny zakażenia wirusem BVD opisano po raz pierwszy u bydła w latach 40. ubiegłego wieku na terenie zachodniej Kanady. Wykazane zmiany chorobowe określono mianem „X disease”. W tym samym czasie w Cornell University potwierdzono zakaźny charakter tej choroby (Olafson i wsp., 1946).

W latach 50. notowano u cieląt zachorowania, w przebiegu których oprócz zmian charakterystycznych dla wirusowej biegunki bydła – *Bovine Viral Diarrhea* (postać BVD) notowano nadżerki na błonie śluzowej nosa pokryte śluzowo-ropną wydzieliną, gorączkę oraz biegunkę z postępującym odwodnieniem. Postać tę nazwano chorobą błon śluzowych – *Mucosal Disease* (postać MD) (Gillespie i wsp., 1961, Thomson i Savan, 1963).

Pierwsze terenowe przypadki zakażenia świń wirusem BVD opisano w Australii w 1964 roku. Wirus po raz pierwszy został wyizolowany w 1973 r. z leukocytów krwi i macicy świni pochodzącej z fermi, gdzie utrzymywano je wraz z bydłem (Fernelius i wsp. 1973; Flynn i Jones, 1964; Stewart i wsp. 1971).

Bydło będące naturalnym gospodarzem wirusa BVD stanowi zarazem jego główny rezerwuuar dla innych gatunków zwierząt, w tym trzody chlewnej. Sporadycznie zakażeniu ulegają świny nie mające bezpośredniego kontaktu z zakażonym bydłem, natomiast mleko lub poubojowe odpady bydłecze mogą być przyczyną zakażenia. Również obecność zanieczyszczonej ściółki czy gnojowicy umożliwia szerzenie się zakażenia wirusem BVD w stadzie i przeniesienie się zakażenia nie tylko na młode prosięta, ale również na ciężarne maciory (Vannier i wsp., 1988).

Do zakażenia wirusem BVD może dochodzić drogą pionową (śródmacicznie), jak i poziomą (donosowo, doustnie) (Fernelius i wsp., 1973; Stewart i wsp., 1980; Kulcsar i wsp., 2001). W piśmiennictwie opisywano przypadki zakażenia macior poddanych uodparnianiu czynnemu przeciwko chorobie Aujeszky'ego, koronawirusowemu zapaleniu żołądka i jelit oraz pomorowi klasycznemu świń szczepionkami zanieczyszczonymi bydłeczym pestiwirusem (Terpstra i Wenvoort, 1988; Vannier i Leforban, 1992; Woods i wsp., 1999). Mimo różnorodności dróg zakażenia obraz kliniczny przypomina przewlekłą lub atypową postać pomoru klasycznego świń. U naturalnie zakażonych prosiąt obserwuje się spadek masy ciała, anemię, zapalenie spojówek, biegunkę, zapalenie stawów (Matshullat i wsp., 1994). U macior zakażenia wirusem BVD, szczególnie w pierwszym trymestrze ciąży, mogą być przyczyną mumifikacji płodów, przedwczesnych porodów lub rodzenia się martwych prosiąt. Po urodzeniu u prosiąt mogą wystąpić obrzęki powiek, zaburzenia ruchu, sporadycznie biegunka i zapalenie stawów. Śmiertelność zwierząt może sięgać nawet kilkudziesięciu procent (Carberey i wsp., 1976).

Przebieg zakażenia u ciężarnych loch i płodów zależy od momentu zakażenia ciężarnej samicy. Jeżeli zakażenie ma miejsce w pierwszym lub drugim trymestrze ciąży, u prosiąt po urodzeniu dochodzi do okresowego siewstwa wirusa. Upadki wśród tych zwierząt są wynikiem głównie nadkażeń drobnoustrojami warunkowo chorobotwórczymi. Z kolei zakażenie lochy ciężarnej w trzecim trymestrze nie powoduje wystąpienia objawów klinicznych u prosiąt, a pobudza jedynie odpowiedź immunologiczną organizmu (Vannier i wsp., 1988). Kulcsar i wsp. (2001) w przebiegu zakażenia loch prośnych szczepem Oregon C24V wirusa BVD stosowanym do immunizacji bydła obserwowali brak objawów klinicznych u loch, natomiast 57% prosiąt padło do 60 dnia życia.

1.2.2. Zmiany anatomopatologiczne w przebiegu zakażenia wirusem BVD

Zmiany anatomopatologiczne u padłych lub poddanych ubojowi diagnostycznemu zwierząt notuje się głównie w obrębie przewodu pokarmowego. Charakteryzują się one stanem zapalnym począwszy od zapalenia nieżytowego, poprzez nadżerki w błonie śluzowej żołądka, jelita ślepego i okrężnicy z charakterystycznymi dla pomoru klasycznego świń butonami włącznie. U prosiąt w migdałkach widoczne są ogniska nekrotyczne, grasicca ulega zanikowi, a węzły chłonne pokryte są wybroczynami. U nielicznych zwierząt obserwuje się także żółtaczkę, kulawizny skutek zmian zapalnych stawów oraz płyn w jamach ciała. U płodów, od których izolowano wirus BVD z mózgu, badaniem histopatologicznym stwierdzano zcieńczenie opon mózgowych, splotu naczyńkowoego oraz naciek komórek limfocytarnych i histiocytarnych w błonie śluzowej nabłonka naczyń włosowatych i przedwłosowatych (Matshullat i wsp., 1994; Stewart i wsp., 1980; Terpstra i Wenvoort, 1988).

1.3. Wykrywanie zakażeń wirusem BVD u świń

Pomimo wielu lat, jakie upłynęły od potwierdzenia występowania zakażenia świń wirusem BVD, ich diagnostyka jest jeszcze ciągle trudna. Z jednej strony mają na to wpływ nietypowe postacie pomoru klasycznego świń wywołane przez średnio i słabo zjadliwe szczepy CSFV oraz zdolność pestiwirusów do przekraczania barier gatunkowych, przy wysokim podobieństwie sekwencji nukleotydowych (van Oirschot, 1994; Wensvoort i wsp., 1986). Zastosowanie do diagnostyki zakażeń BVD konwencjonalnych metod diagnostycznych, jak techniki immunofluorescencji pośredniej i bezpośredniej oraz testu PLA, wymagało często zastosowania próby biologicznej jako badania rozstrzygającego (Carberey, 1988). Dopiero rozwój technik biologii molekularnej oraz opracowanie metod diagnostycznych z użyciem przeciwciał monoklonalnych i PCR pozwoliły na określenie antygenowej odrębności CSFV, BVDV i BDV (Brocchi i wsp., 1993; Stadejek i Pejsak, 1998; Vilček i wsp. 1994; Wensvoort i wsp., 1986).

1.3.1. Występowanie przeciwciał neutralizujących dla wirusa BVD u świń

Przynależność opisanych w punkcie 1.1 wirusów należących do jednego rodzaju *Pestivirus* związana jest z ich podobieństwem w sekwencji nukleotydów oraz syntetyzowanych aminokwasów. Podobieństwo to może wynosić nawet 85% dla CSFV szczep Alfort i wirusa BVD szczep NADL lub 70% dla CSFV szczep Brescia i wirusa BVD szczep Osloss (de Moerloze i wsp., 1992; Meyers i wsp., 1989; Moormann i wsp., 1990, Xu i wsp., 2006). Epitopy wspólne dla wszystkich wirusów z rodzaju *Pestivirus* występują na białku niestrukturalnym NS2-3 oraz białku strukturalnym E2 (Edwards, 1996; Greiser-Wilke i wsp., 1990; van Rijn i wsp., 1997).

Badania monitoringowe przeprowadzano w krajach wolnych od wirusa pomoru klasycznego świń oraz tam, gdzie klasyczny pomór świń jest wciąż notowany. Występowanie przeciwciał przeciwko wirusowi BVD u świń waha się od 1,6% do 43,5% badanego pogłowia zwierząt w danym kraju (Paton, 1992; Pejsak, 1995). Potwierdzeniem tej sytuacji były badania przeglądowe świń eksportowanych z Danii do Niemiec, gdzie na 3000 badanych zwierząt uzyskano 6,4% wyników dodatnich, przy czym nie wykazano przeciwciał neutralizujących dla wirusa pomoru klasycznego świń (Holm Jensen, 1985). Brüske (1980) oraz Plateau i wsp. (1978) badając testem seroneutralizacji surowice świń podejrzanych o zakażenie wirusem BVD uzyskali odpowiednio 9,2% i 4,4% wyników dodatnich. Przypuszcza się, iż w latach 90. około 20% macior w Holandii posiadało przeciwciała przeciwko wirusowi BVD (Pejsak, 1995). W roku 2004 na terenie Holandii przeprowadzono badania obejmujące swoim zasięgiem 602 stada reprodukcyjne świń i 189 tuczarni. Próby z każdego stada badano testem pan-pesti ELISA i SNT w stosunku do dwóch szczepów wirusa BVD - Osloss i NADL oraz dwóch szczepów wirusa BD - Frijters i Moredun. W stadach reprodukcyjnych odsetek zwierząt posiadających przeciwciała przeciwko wirusowi BVD wynosił 2.5%. Z kolei odsetek stad, w których wykazano obecność przeciwciał przeciwko BDV, sięgał 11.3%. W tuczarniach wartości te wynosiły odpowiednio 0.4 i 3.2% (Loeffen i wsp., 2005). W Polsce badania nad występowaniem przeciwciał przeciwko wirusowi BVD u trzody chlewnej prowadzono w latach 80. na

obszarze 31 województw, a odsetek zwierząt dodatnich wynosił 0.4% (Pejsak i Kołacz, 1991). Podobne badania przeprowadzone u trzody chlewnej na terenie Polski w latach 90. wykazały jedynie 0.7% dodatnich seroreagentów (Rypuła i wsp., 2001).

Przystąpienie Polski do Unii Europejskiej nakłada na służbę weterynaryjną obowiązek przeprowadzania badań przeglądowych wśród dzików i świń w kierunku zakażeń wirusem CSF. W praktyce, badania tego typu zakażeń mogą być utrudnione, gdyż stosowane często konwencjonalne metody diagnostyczne nie zawsze pozwalają na różnicowanie szczepów wirusów BVD, BD i CSF (Carberey, 1988; Edwards, 1996; Liess i Moenig, 1990, Pejsak, 2006).

2. CEL PRACY

Całość badań realizowano w dwóch etapach. Celem pierwszego etapu była ocena wpływu zakażenia różnymi szczepami wirusa BVD typ 1 na wskaźniki hematologiczne krwi obwodowej świń, odsetek limfocytów krwi obwodowej wykazujących ekspresję antygenów powierzchniowych: CD2, CD4, CD8, CD21, CD45, wCD45, TCR $\gamma\delta$ oraz ocena dynamiki narastania mian przeciwciał przeciwko wirusowi BVD po zakażeniu donosowym i kontaktowym świń. Z kolei, w drugim etapie badań, wykorzystano test ELISA i technikę cytometrii przepływowej do wykrywania zakażeń pan-pestiwirusowych u świń zakażonych eksperymentalnie poprzez donosową inokulację wirusa BVD typ 1.

3. BADANIA WŁASNE

3.1. Część I. Zachowanie się wskaźników hematologicznych i immunologicznych u świń zakażonych eksperymentalnie różnymi szczepami wirusa BVD typ 1

W doświadczeniu pierwszym grupę 1 stanowiło 6 prosiąt zakażonych donosowo mieszaniną szczepów NADL2:NADL8 wirusa BVD typ 1, natomiast grupę 2 stanowiły prosięta włączone do grupy 1 po 48 godzinach od momentu zakażenia (grupa prosiąt zakażonych kontaktowo). Grupę 3 - kontrolną stanowiło 6 niezakażonych prosiąt. Identyfikacyjny podział zwierząt zastosowano w doświadczeniu drugim i trzecim, gdzie użyto szczepu V725 wirusa BVD (doświadczenie 2) oraz szczepu 5862/84 wirusa BVD (doświadczenie 3).

3.1.2. Materiał i metody

3.1.2.1. Zwierzęta

Zwierzęta do badań pochodziły od macior wolnych i nieszczepionych przeciwko pomorowi klasycznemu świń. Lochy, od których prosięta miały być przeznaczone do eksperymentu prosiły się w porodówkach, gdzie przebywały wraz z prosiętami do momentu odsadzenia. Prosiętom podawano czwartego dnia 2 ml preparatu zawierającego żelazo (Ferrovet, Vetoquinol Biowet) oraz nie wykonywano u nich żadnych szczepień ochronnych i zabiegów zootechnicznych. W dniu odsadzenia, tj. 28 dnia oddzielono do izolatora 54 prosięta, które przydzielano losowo, po 6 sztuk do każdej z trzech grup eksperymentalnych i trzech grup kontrolnych. W pomieszczeniu tym zwierzęta pozostawały do zakończenia obserwacji.

Żywnienie zwierząt od momentu odsadzenia do uzyskania masy ciała 12 kg oparte było na mieszance pełnoporcjowej Prestarter super POLLEAN (Cargill, Krzemieniewo). W dalszym okresie odchowu stosowano mieszankę Starter super POLLEAN (Cargill, Krzemieniewo). Dawki mieszanki paszowej ustalone były odpowiednio do wieku prosiąt. Wodę podawano im do woli z poideł smoczkowych.

Przed rozpoczęciem eksperymentu zwierzęta badane były w kierunku obecności antygeny i przeciwciał pestiwirusowych przy użyciu testu ELISA (CHEKIT-BVD-virus i CHEKIT-BVD-sero, Dr Bommeli AG, Szwajcaria).

3.1.2.2. Szczepy wirusa BVD typ 1 użyte do badań

Do zakażenia zwierząt użyto trzech szczepów wirusa BVD:

- mieszaninę dwóch izolatów laboratoryjnych: NADL2 i NADL8 wirusa BVD; dawka zakaźna wynosiła $TCID_{50} = 10^{4.5} \text{ ml}^{-1}$;
- szczep niecytotacyjny wirusa BVD - V725 izolowany od prosiąt zakażonych naturalnie wirusem BVD; dawka zakaźna wynosiła $TCID_{50} = 10^{6.5} \text{ TCID}_{50} \text{ ml}^{-1}$;
- szczep niecytotacyjny wirusa BVD - 5862/84 izolowany od cieląt naturalnie zakażonych; dawka zakaźna wynosiła $TCID_{50} = 10^{5.8} \text{ ml}^{-1}$.

Szczepy wirusa BVD - V725 i 5862/84 otrzymano z Instytutu Wirusologii Wyższej Szkoły Weterynaryjnej w Hanowerze, a mieszaninę szczepów NADL2:NADL8 z Zakładu Wirusologii PIW-PIB w Puławach.

Dawki każdego ze szczepów wirusa BVD użytego do zakażenia zwierząt w grupach doświadczalnych ustalono na podstawie danych literaturowych (Dale i wsp., 1993; Fernelius i wsp., 1973; Ficken i wsp., 1995; Lieber i wsp., 1995; Silflow i wsp., 2005; Susa i wsp., 1992; Walz i wsp., 1999).

3.1.2.3. Zakażenie eksperymentalne

Aplikację, w każdym z trzech doświadczeń, wirusa BVD zwierzętom w grupie 1 dokonywano w wieku 35 dni, tj. w 7 dni po odsadzeniu i aklimatyzacji przy użyciu strzykawek o pojemności 2 ml zakończonych atomizerem. Każdorazowo do zakażenia nowego zwierzęcia używano nowego zestawu strzykawek.

W każdym doświadczeniu grupę 1 stanowiły prosięta ($n=6$) zakażone donosowo, grupę 2 ($n=6$) stanowiły prosięta połączone ze zwierzętami w grupie 1 w 48 godzinie od momentu zakażenia prosiąt w grupie 1 (grupa prosiąt zakażonych kontaktowo). Trzecia grupa prosiąt ($n=6$) była grupą kontrolną, która otrzymała donosowo wodę do iniekcji (placebo).

3.1.2.4. Pobieranie prób do badań

Materiał do badań stanowiła krew pobierana z *vena cava cranialis* od zwierząt zakażonych i niezakażonych do probówek S-Monovette EDTA- K_2 (krew pełna) i S-Monovette SERUM (krew na surowicę) o pojemności 4.9 ml (Sarstedt, Niemcy).

3.1.2.5. Badania kliniczne

Badania obejmowały ocenę stanów klinicznych zwierząt w dniach pobierania krwi do badań laboratoryjnych, tj. w 24 godz. przed zakażeniem oraz 24 i 48 godz. p.i., a następnie w 4, 7, 14, 21, 28 i 35 dniu. W tym też czasie mierzono w.c.c. oraz przyrosty masy ciała. Natomiast codziennie prowadzono oględziny zwierząt. W przypadku odstępstwa od normy w postaci kaszlu, wypływu z nosa oraz wymiotów i biegunki rejestrowano ten fakt w karcie zwierzęcia. Postępowanie to odnosiło się zarówno do zwierząt w grupach eksperymentalnych – grupa 1 i grupa 2, jak i do grupy kontrolnej – grupa 3, w każdym z trzech doświadczeń.

3.1.2.6. Badania hematologiczne

Liczbę erytrocytów i leukocytów określano na siatce Thoma-Zeissa w 1 mm³.

Stężenie hemoglobiny oznaczano metodą fotometryczną we krwi pełnej, określając gęstość optyczną przy długości fali 540 nm względem wzorca (odczynnik Drabkina), a następnie wyliczano ze wzoru:

$$\text{Hb (mmol/l)} = \frac{\text{OD próby badanej}}{\text{OD wzorca}} \times \text{współczynnik wzorca}$$

Wartość hematokrytu obliczano w całkowitej masie krwi według wzoru:

$$\text{Ht (\%)} = \frac{L_k \times 100}{L},$$

gdzie: L_k – wysokość słupa erytrocytów w mm

L – całkowita wysokość słupa krwinek w mm

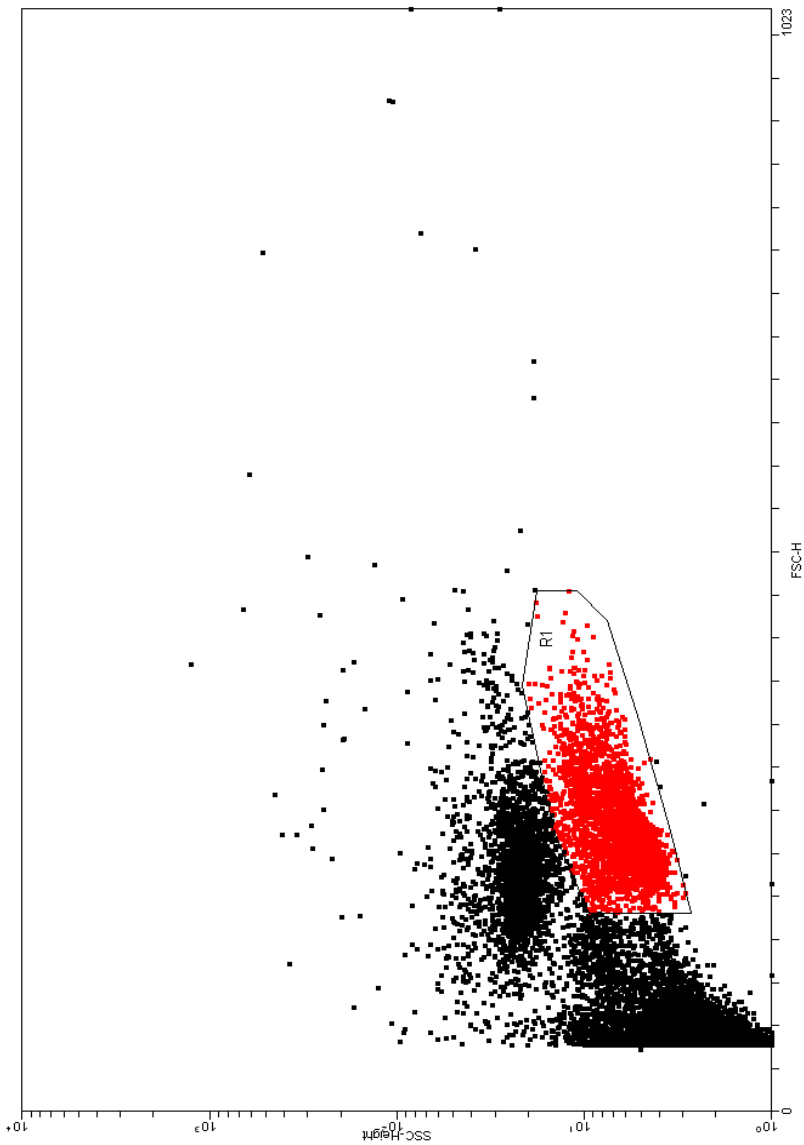
3.1.2.7. Subpopulacje limfocytów krwi obwodowej określane przy użyciu cytometrii przepływowej

Dla identyfikacji subpopulacji limfocytów użyto zestawu przeciwciał monoklonalnych skierowanych przeciwko grupowym antygenom różnicującym u świń: PG168A/IgG₃ (anty-CD2), PT90A/IgG_{2a} (anty-CD4), PT81B/IgG_{2b} (anty-CD8), BB6-11C9 (anty-CD21), 74-9-3A1 (anty-CD45), PG96A (anty-wCD45), 86D (anty-TCRγδ), przygotowanych w VMRD Pullman Inc. (Pullman, USA). Jako drugich przeciwciał użyto izotypy kozich anty-mysich przeciwciał IgG (IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b} i IgG₃) znakowanych FITC i PE (SouthernBiotech, USA).

Pobrane próbki krwi poddawano lizie z użyciem roztworu FACSLysing Solution (Becton Dickinson, USA). Uzyskane leukocyty zawieszano w 150 μl tego samego buforu, a każda z próbek zawierała nie mniej niż 1×10⁶ leukocytów. Do tak przygotowanych prób dodawano następujące pary przeciwciał o stężeniu 1 μg na 10⁶ badanych komórek: CD2/CD4, CD2/CD8, CD2/CD21, wCD45/CD45, CD4/CD8 i CD2/TCRγδ. Po 30-minutowej inkubacji w komorze wilgotnej próbki trzykrotnie płukano używając buforu fosforanowego bez Ca⁺²/Mg⁺² z 1% dodatkiem 1% BSA i wirowano przez 7 min przy 700×g w temperaturze pokojowej. Warstwę płynną usuwano, po czym dodawano przeciwciała znakowane FITC lub PE w ilości 1 μg na 10⁶ komórek. Następną inkubację prowadzono była przez 30 min w temperaturze pokojowej. Po jej zakończeniu próbki ponownie płukano i zawieszano w 0,4 ml PBS bez Ca⁺²/Mg⁺² z 1% dodatkiem 1% BSA.

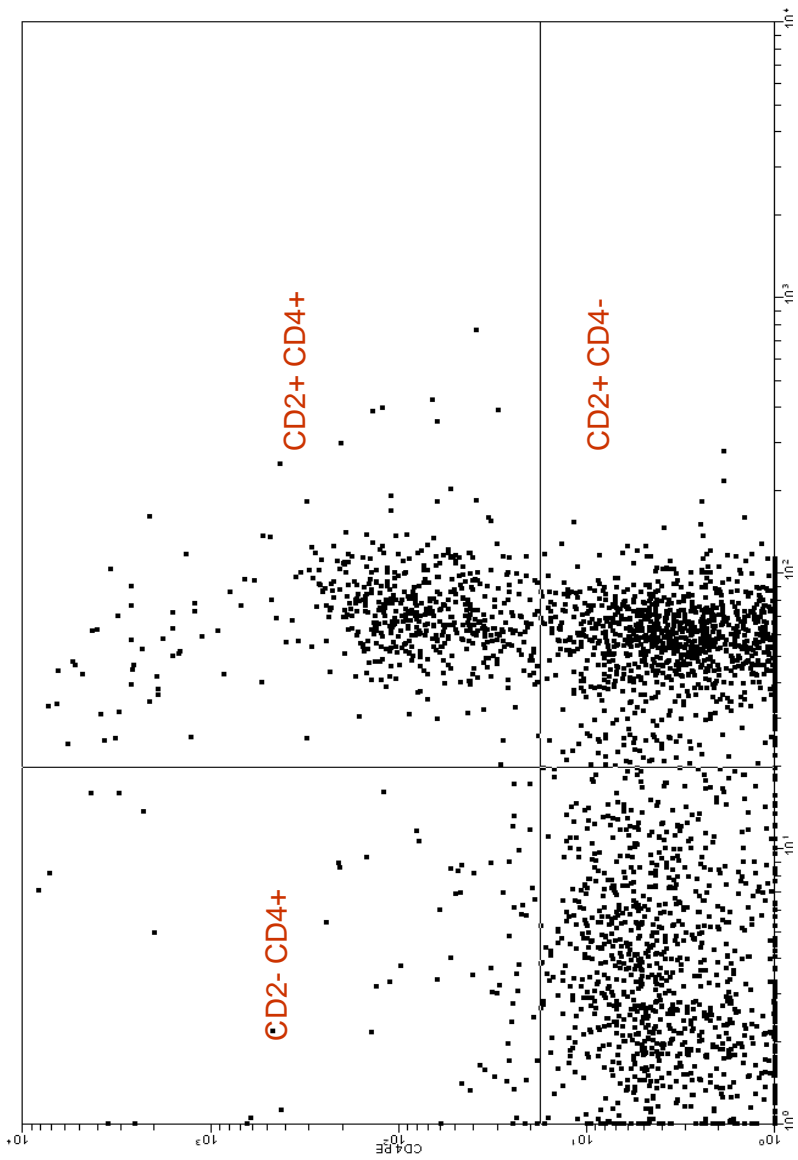
Tak przygotowane próbki badano przy użyciu cytometru przepływowego FACS Calibur (Becton Dickinson, USA) i analizowano stosując program CellQuestTM (wersja 3.1). Rejestrację wykonano dla pierwszych 10000 komórek.

Rozkład wielkości i granularności limfocytów oraz przykładowe cytogramy rozkładu limfocytów krwi obwodowej świń po zakażeniu wirusem BVD typ 1 przedstawiono na rysunkach 3–9.

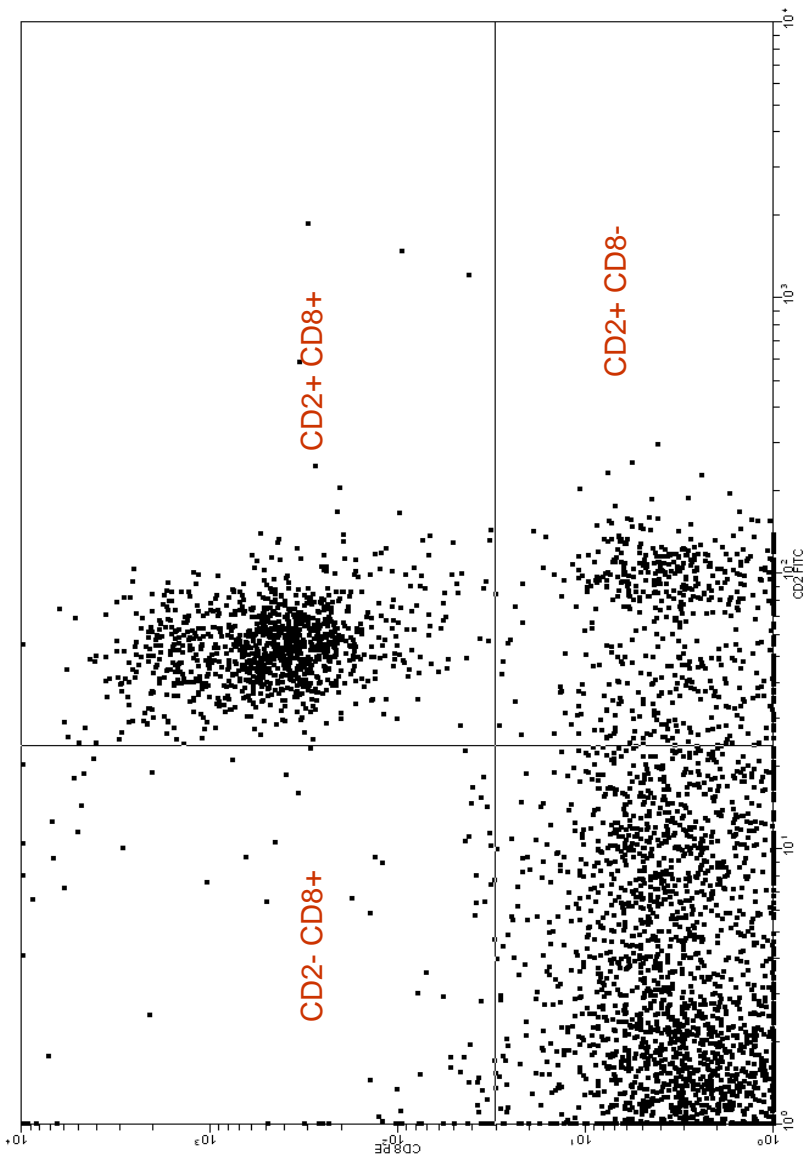


Explain:
R1 – gate of lymphocytes

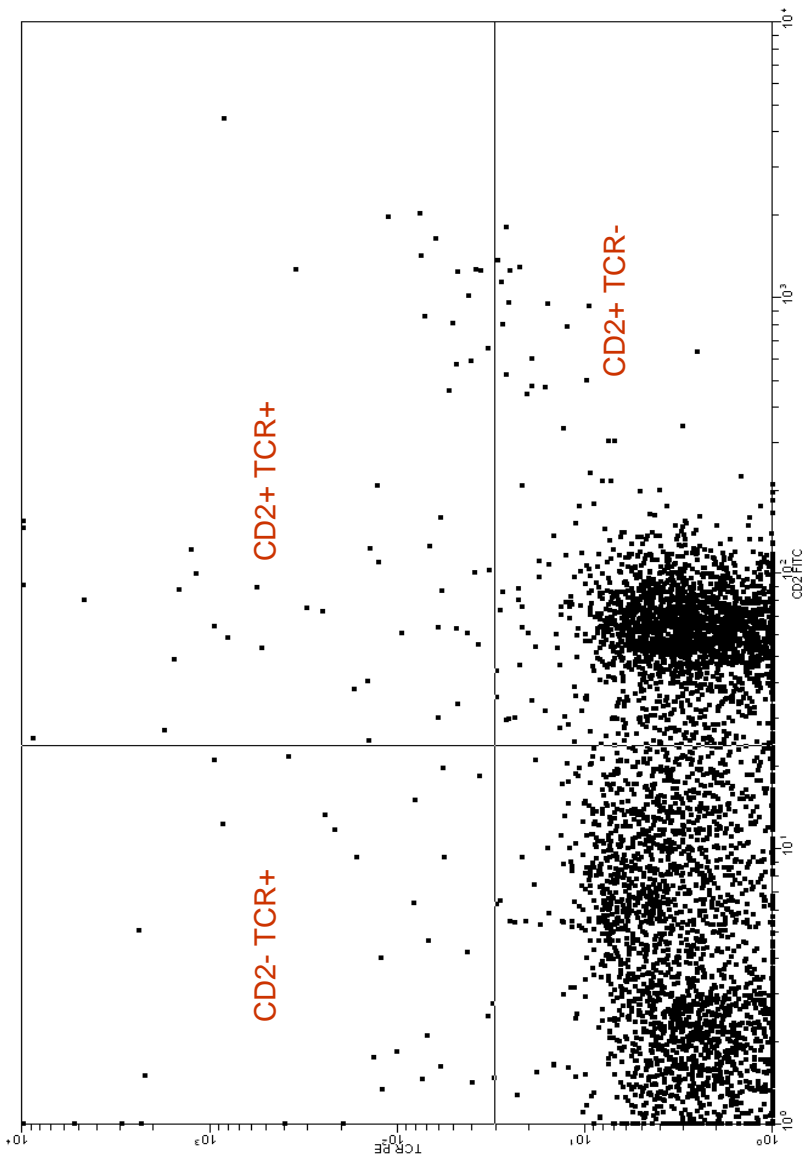
Rys. 3. Rozkład wielkości (FSC) i granularności (SSC) leukocytów krwi obwodowej świni uzyskany po lizie erytrocytów
Fig. 3. Split of size (FSC) and granularity (SSC) of leucocytes of peripheral blood in swine obtained after the lysis of erythrocytes



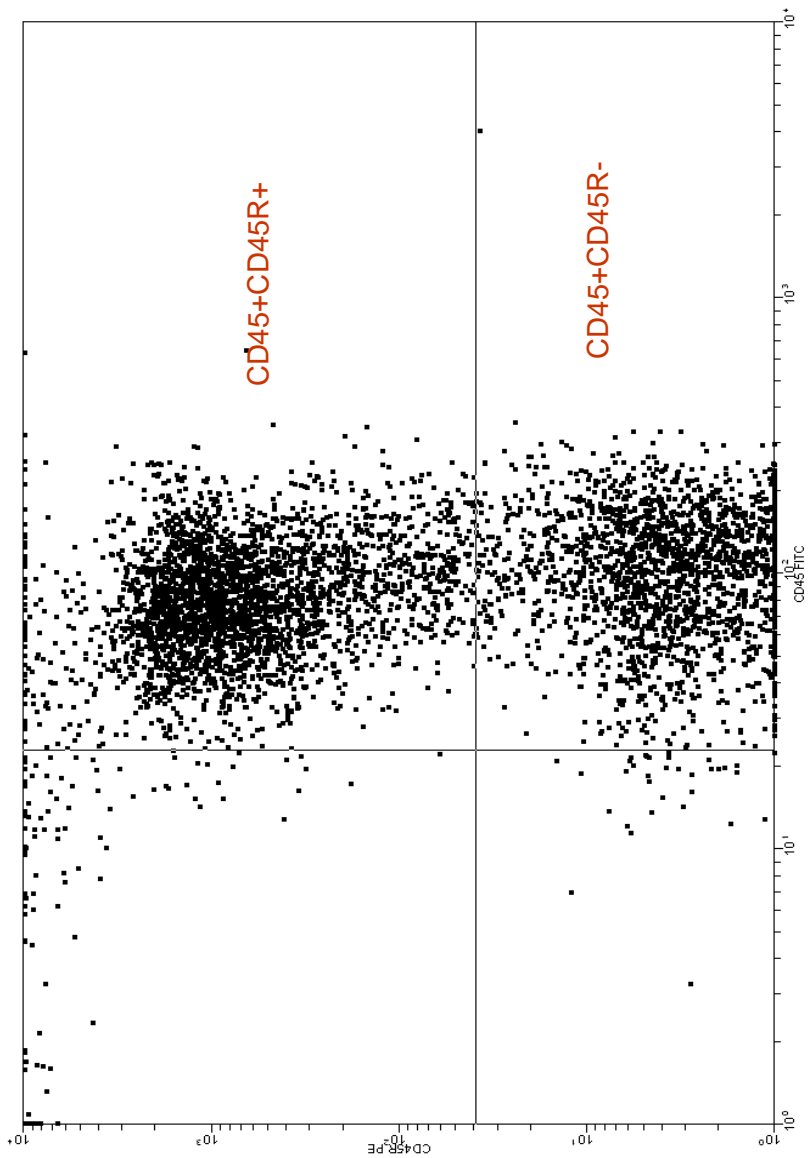
Rys. 4. Przykładowy cytogram subpopulacji limfocytów krwi obwodowej przy użyciu przeciwciał monoklonalnych – CD2/CD4
 Fig. 4. Example cytograms of the subpopulation of lymphocytes of peripheral blood with use of monoclonal antibodies – CD2/CD4



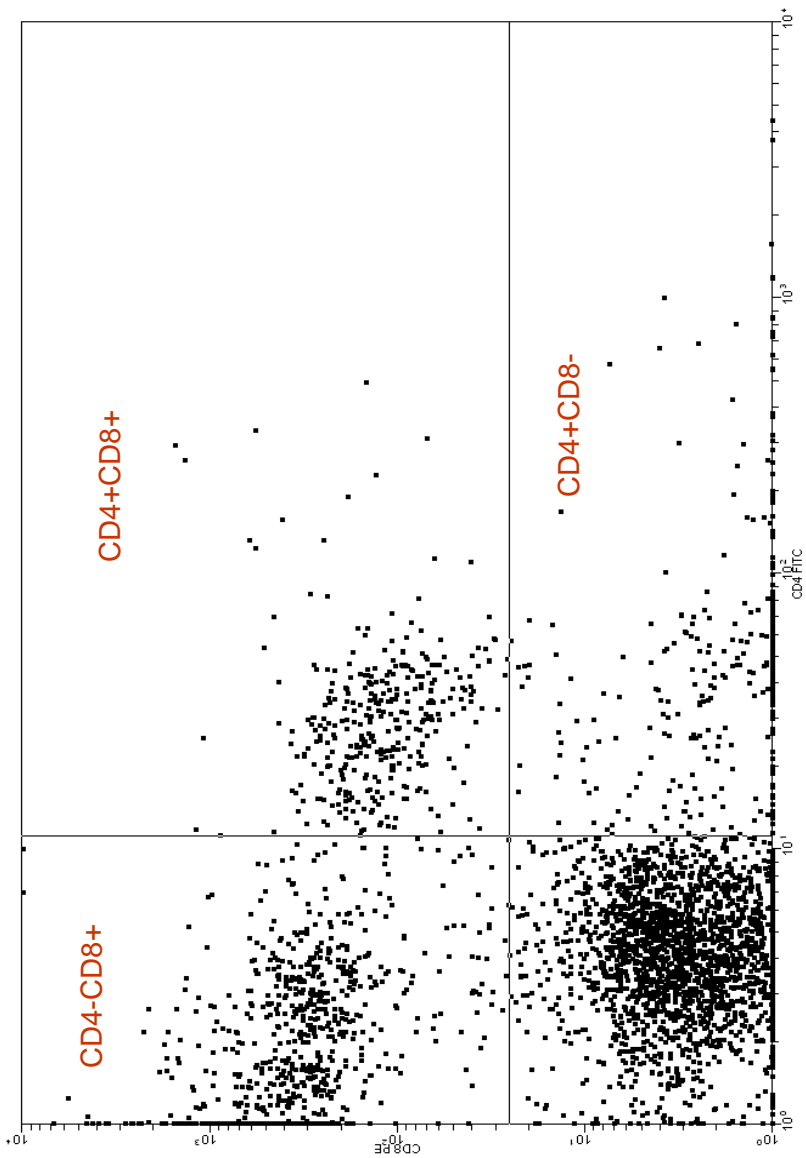
Rys. 5. Przykładowy cytogram subpopulacji limfocytów krwi obwodowej przy użyciu przeciwciał monoklonalnych – CD2/CD8
 Fig. 5. Example cytograms of the subpopulation of lymphocytes of peripheral blood with use of monoclonal antibodies – CD2/CD8



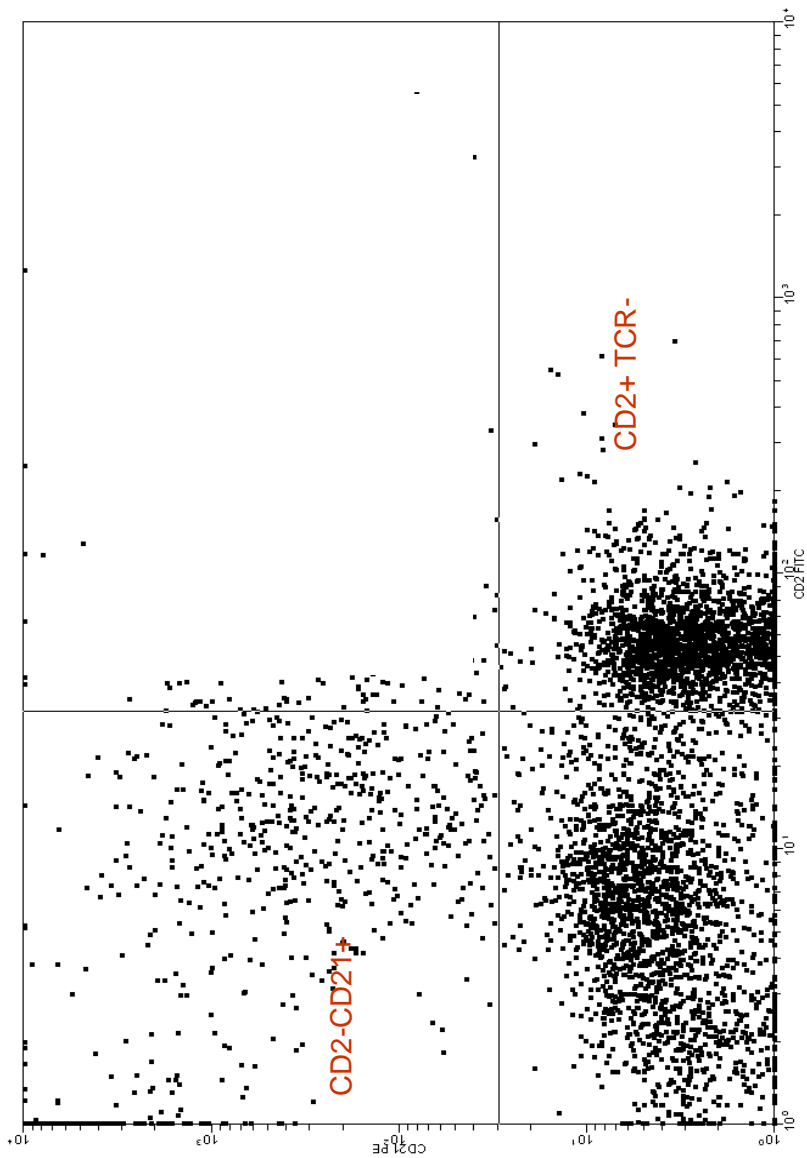
Rys. 6. Przykładowy cytogram subpopulacji limfocytów krwi obwodowej przy użyciu przeciwciał monoklonalnych – CD2/TCR gamma delta
 Fig. 6. Example cytograms of the subpopulation of lymphocytes of peripheral blood with use of monoclonal antibodies – CD2/TCR gamma delta



Rys. 7. Przykładowy cytogram subpopulacji limfocytów krwi obwodowej przy użyciu przeciwciał monoklonalnych – CD45/CD45R
 Fig. 7. Example cytograms of the subpopulation of lymphocytes of peripheral blood with use of monoclonal antibodies – CD45/CD45R



Rys. 8. Przykładowy cytogram subpopulacji limfocytów krwi obwodowej przy użyciu przeciwciał monoklonalnych – CD4/CD8
 Fig. 8. Example cytograms of the subpopulation of lymphocytes of peripheral blood with use of monoclonal antibodies – CD4/CD8



Rys. 9 Przykładowy cytogram subpopulacji limfocytów krwi obwodowej przy użyciu przeciwciał monoklonalnych – CD2/CD21
 Fig. 9. Example cytograms of the subpopulation of lymphocytes of peripheral blood with use of monoclonal antibodies – CD2/CD21

3.1.2.8. Dynamika narastania mian przeciwciał przeciwko wirusowi BVD typ 1 w surowicy świń

Do oceny dynamiki powstawania przeciwciał przeciwko wirusowi BVD wykorzystano SNT, będący jakościowym i ilościowym potwierdzeniem obecności wirusa BVD w pozyskanych próbach.

Krew do badań pozyskiwano od zwierząt w podanych powyżej terminach. Surowicę przed wykonaniem SNT inaktywowano w temperaturze 56° C przez 30 minut. Rozcieńczenia badanej surowicy wykonywano w basenikach 96-dółkowej U-dennej mikropłytki poczynając od rozcieńczenia 1:5, a kończąc na rozcieńczeniu 1:640. Każdorazowo badaną surowicę rozcieńczano w płynie Eagle'a z dodatkiem 10% FCS wolnej od BVDV i mykoplazm (CLV Weybridge, W. Brytania). W ten sam sposób przygotowywano rozcieńczenia surowic kontrolnych.

Do oceny miana przeciwciał użyto wzorcowe (testowe) szczepy: szczep NADL wirusa BVD i szczep 1726 98/Salza wirusa BVD. W obu przypadkach dawka wirusa wynosiła 2000 TCID₅₀·ml⁻¹.

Do każdego rozcieńczenia badanej próby znajdującego się na płytce oraz kontroli dodatniej i ujemnej dodawano po 50 µl zawiesiny wirusa uzyskując końcową koncentrację 100 TCID₅₀·ml⁻¹. W celu kontroli ilości dodanego wirusa do baseników mikropłytek wykonywano rozcieńczenia odwrotne, rozpoczynając od 10⁰ do 10⁻⁴, przenosząc objętość 100 µl do kolejnych baseników. Tak przygotowaną płytkę inkubowano w komorze wilgotnej w temperaturze 37 °C, po czym dodawano zawiesinę komórek MDBK w objętości 50 µl na każdy basenik, co odpowiadało ilości 15000 komórek na basenik. Mikropłytkę inkubowano przez 72 godz. w komorze wilgotnej w temperaturze 37° C z dodatkiem 5% CO₂. Po zakończonej inkubacji do każdego basenika dodawano PBS, wstrząsano i zawartość dołków usuwano poprzez odwrócenie płytki. Pozostałe na dnie basenika komórki utrwalano pozostawiając płytkę przez okres 3 godz. w temperaturze 80 °C.

Zmiany w kolejnych rozcieńczeniach badanych surowic oceniano przy użyciu mikroskopu odwróconego.

Za wynik dodatni przyjmowano rozcieńczenie, w którym choć jedna komórka została wybarwiona. Wartość miana przeciwciał wyliczano na podstawie wzoru:

$$\log SD_{50} = L_{1.0} - L_{\text{int}} \times (S-0.5)$$

gdzie:

SD₅₀ – rozcieńczenie surowicy,

L_{1.0} – logarytm najwyższego rozcieńczenia, przy którym zachodzi reakcja,

L_{int} – logarytm przerwy rozcieńczeń,

S – suma ilości reakcji, rozpoczynając od ostatniej reakcji,

0.5 – wartość stała.

3.1.2.9. Analiza statystyczna wyników

Analizę statystyczną uzyskanych wyników wykonano testem t-Studenta dla prób niezależnych (p<0.05).

3.1.3. Wyniki

3.1.3.1. Stan kliniczny zwierząt zakażonych różnymi szczepami wirusa BVD typ 1

Podczas prowadzonej codziennie obserwacji zwierząt w grupach eksperymentalnych i kontrolnej nie odnotowano zmian w stanie klinicznym zwierząt.

W grupach eksperymentalnych po zakażeniu mieszaniną szczepów NADL2:NADL8 BVDV typ 1 w.c.c. wahała się od 37,0 °C do 38,0 °C, przy czym nie zaobserwowano jej wzrostu w kolejnych dniach po zakażeniu. Podobnie było w grupach po zakażeniu szczepami V725 i 5862/84 wirusa BVD typ 1. W grupach kontrolnych w.c.c. w poszczególnych terminach wahała się od 36,8 °C do 38,5 °C.

Wyniki pomiaru w.c.c. przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1

Table 1

Dynamika w.c.c. świń zakażonych różnymi szczepami wirusa BVD typ 1

The dynamics of internal body temperature of swine infected with various strains of the virus BVD type 1

Dni po zakażeniu Days after infection	Średnia wewnętrzna ciepłota ciała świń (°C) Average internal temperature of swine body (in °C)			
	Szczepy NADL2:NADL8 Stranis NADL2:NADL8	Szczep V725 Strain V725	Szczep 5268/94 Strain 5268/94	Grupy kontrolna Control group
1	37,6	37,6	38,0	37,6
2	37,2	37,5	37,6	37,8
4	37,9	37,6	37,9	37,2
7	38,0	38,0	38,0	37,9
14	37,6	37,2	37,9	37,6
21	37,9	37,8	38,0	37,2
28	37,6	38,0	37,8	37,8
35	38,0	37,6	37,2	37,8

Średnia masa ciała zwierząt w dniu rozpoczęcia doświadczenia w poszczególnych grupach eksperymentalnych wynosiła od 8,6 kg w grupie zakażonej mieszaniną szczepów NADL2:NADL8 do 9,4 kg w grupie zakażonej szczepem V725 oraz 9,3 kg w grupie zakażonej szczepem 5862/94. W grupach kontrolnych średnia masa ciała zwierząt wynosiła od 9,0 kg do 9,8 kg. W dniu zakończenia obserwacji średnia masa ciała w grupach eksperymentalnych wynosiła 25,1 kg (grupa zakażona mieszaniną szczepów NADL2:NADL8), 27,2 kg (grupa zakażona szczepem V725) oraz 25,4 kg (grupa zakażona szczepem 5862/94). Średni dzienny przyrost masy ciała w grupach eksperymentalnych podczas obserwacji wyniósł odpowiednio 470 g, 448 g i 460 g. W grupach kontrolnych średnia masa ciała wyniosła od 25,1 kg do 27,1 kg, a średni dzienny przyrost masy ciała od 460 g.

Wyniki pomiaru masy ciała przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 2
Table 2

Masa ciała świń zakażonych różnymi szczepami wirusa BVD typ 1
Body mass of swine infected with various strains of the virus BVD type 1

Dni po zakażeniu Days after infection	Masa ciała świń (kg) Body mass of swine (kg)			
	Szczepy NADL2:NADL8 Stranis NADL2:NADL8	Szczep V725 Strain V725	Szczep 5268/94 Strain 5268/94	Grupy kontrolna Control group
1	8,6	9,4	9,3	9,4 – 9,8
2	8,6	9,4	9,4	9,4 – 9,8
4	9,6	10,0	9,9	10,5 – 11,0
7	12,1	10,8	11,9	11,8 – 12,4
14	15,3	15,6	16,0	15,1 – 16,2
21	18,7	19,4	19,6	18,9 – 20,6
28	21,8	23,2	22,3	20,9 – 23,3
35	25,1	27,2	25,4	25,1 – 27,1

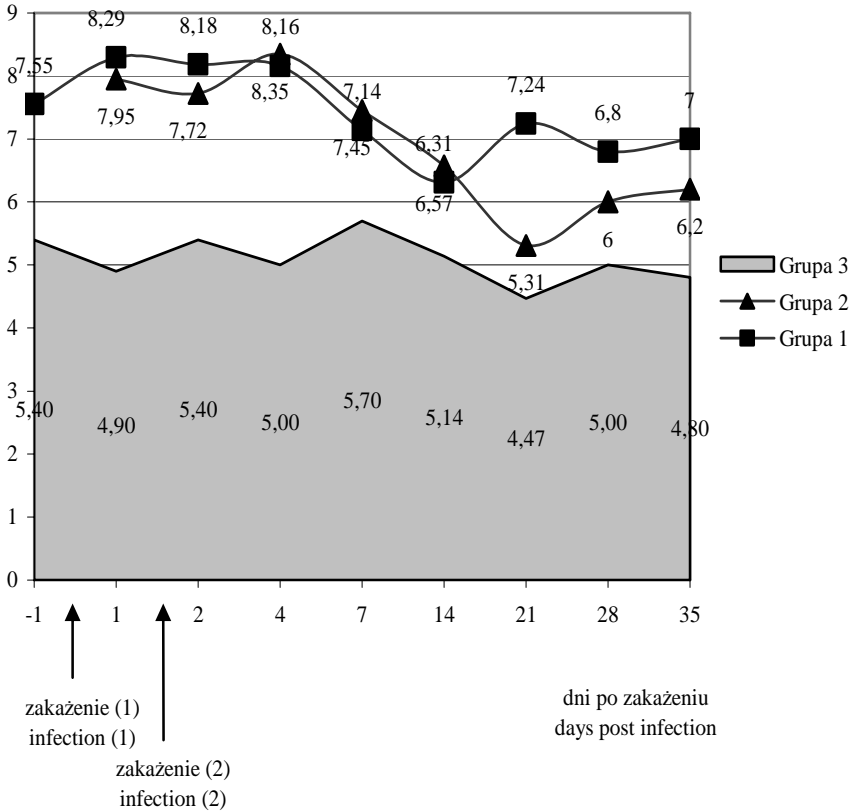
3.1.3.2. Wskaźniki hematologiczne u świń w przebiegu zakażenia szczepami NADL2:NADL8, V725 i 5862/84 wirusa BVD typ 1

W przebiegu zakażenia świń mieszaną szczepów NADL2:NADL8 wirusa BVD nie wykazano statystycznie istotnych różnic w zakresie liczby erytrocytów ($p=0,93$), stężenia hemoglobiny ($p=0,42$) i wartości hematokrytu ($p=0,24$). Natomiast spadek liczby leukocytów odnotowano w grupie 1 z wartości 17,0 G/l w dniu poprzedzającym zakażenie do wartości 12,5 G/l w dniu zakończenia obserwacji ($p=0,01$). U zwierząt w grupie 2 również wykazano spadek liczby leukocytów z 15,8 G/l w dniu połączenia ze zwierzętami z grupy 1 do 10,0 G/l w dniu jej zakończenia ($p=0,007$) (rys. 10–13).

U świń zakażonych szczepem V725 wirusa BVD odnotowano zmiany w liczbie erytrocytów, które w dniu rozpoczęcia obserwacji wynosiły 10,5 T/l, a w dniu zakończenia 8,3 T/l ($p=0,94$). Z kolei istotnym zmianom nie uległy stężenie hemoglobiny ($p=0,74$) i wartości hematokrytu ($p=0,72$). Podobne zmiany wykazano w liczbie leukocytów, w grupie pierwszej wzrosła ona z 12,3 G/l do 19,5 G/l, w czternastym dniu obserwacji, po czym uległa obniżeniu do 12,8 G/l w dniu zakończenia obserwacji ($p=0,01$). W grupie 2 liczba leukocytów wzrastała do 7 dnia po zakażeniu z 13,7 G/l do 17,4 G/l i następnie spadała do 35 dnia obserwacji ($p=0,33$) (rys. 14–17).

Podobnie u świń zakażonych szczepem 5862/84 wirusa BVD nie odnotowano statystycznie istotnych różnic w liczbie erytrocytów ($p=0,93$), stężeniu hemoglobiny ($p=0,42$) oraz wartości hematokrytu ($p=0,55$). Liczba leukocytów w obu grupach doświadczalnych ulegała obniżeniu podczas kolejnych pomiarów, jednakże różnice w uzyskanych wartościach nie były statystycznie istotne ($p=0,23$) (rys. 18–21).

T/l



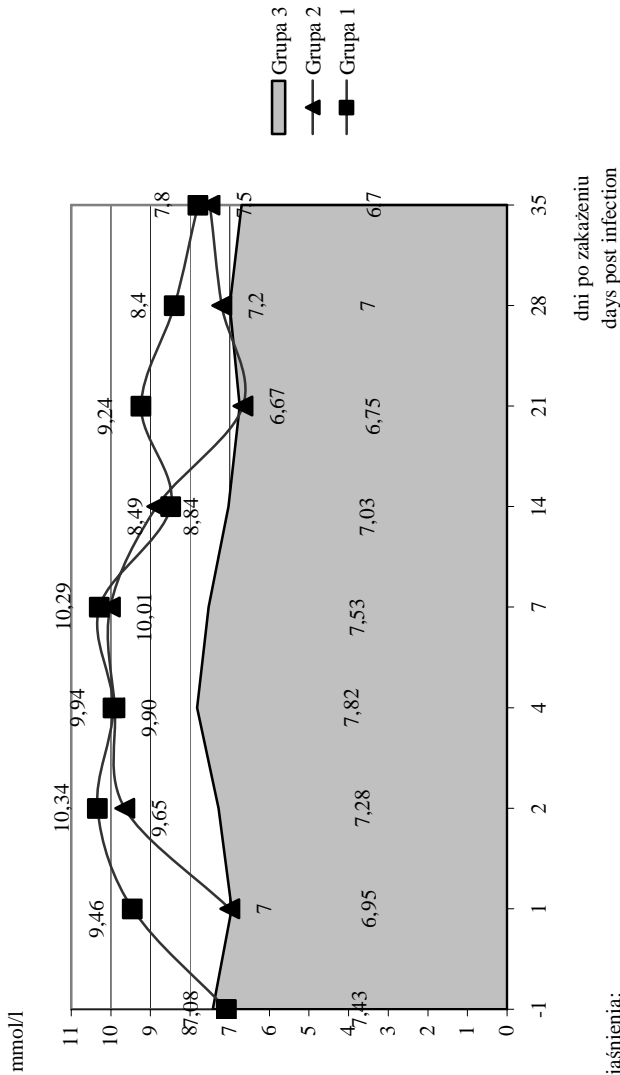
Objaśnienia:

Explain:

- (1) zakażenie zwierząt w grupie I
- (1) infected animal in group 1
- (2) zakażenie zwierząt w grupie 2
- (2) infected animal in group 2

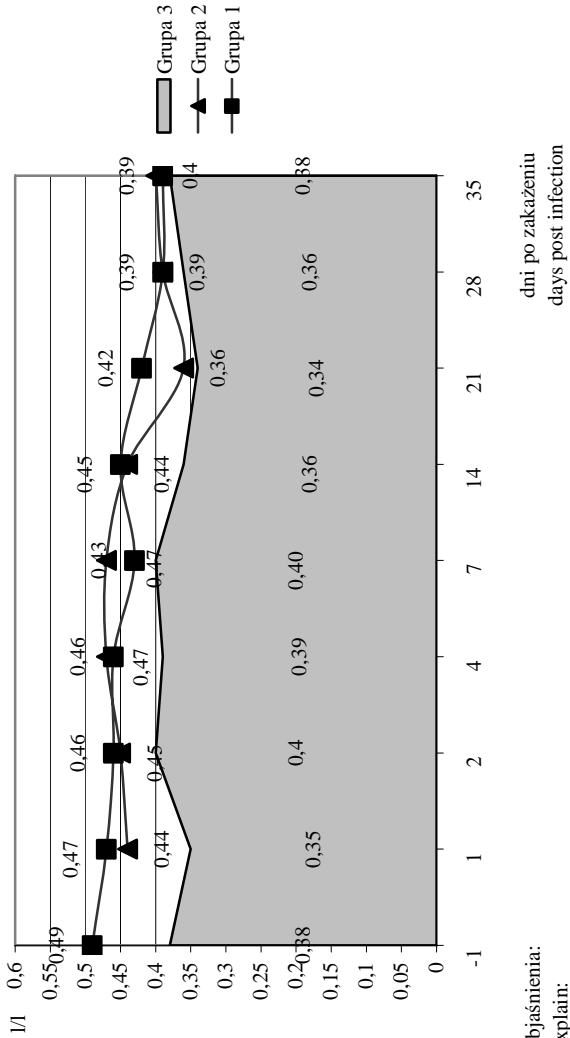
Rys. 10. Liczba krwinek czerwonych (T/l) we krwi obwodowej świń zakażonych mieszaniną szczepów NADL2 i NADL8 wirusa BVD typ 1

Fig. 10. A number of erythrocytes (T/l) in peripheral blood of swine infected with the mixture of strains NADL2 and NADL8 of the virus BVD type 1



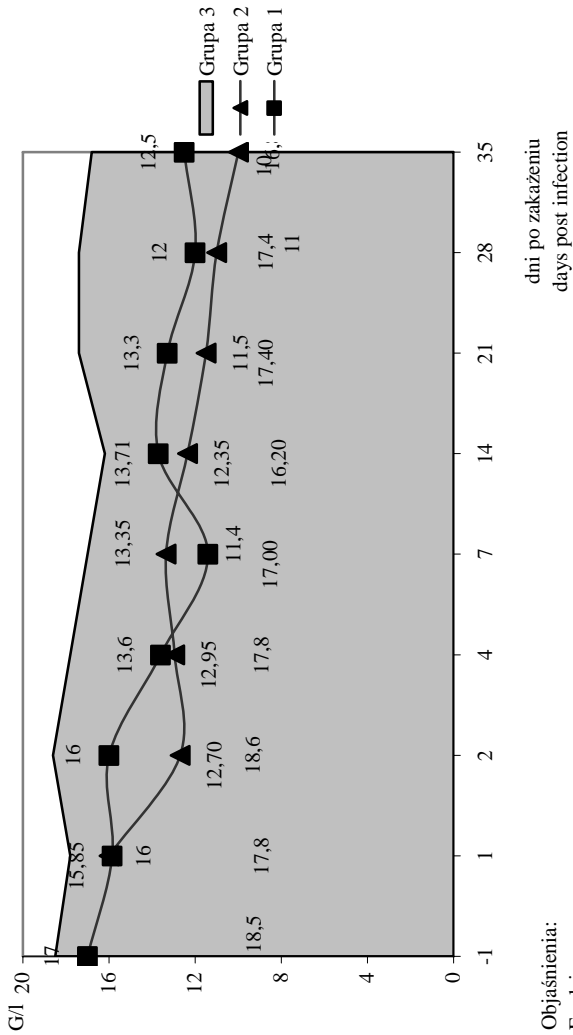
Objaśnienia:
 Explain:
 patrz rysunek 10
 see figure 10

Rys. 11. Poziom hemoglobiny (mmol/l) u świń zakażonych mieszaną szczepów NADL2 i NADL8 wirusa BVD typ 1
 Fig. 11. Level of haemoglobin (mmol/l) in swine infected with the mixture of strains NADL2 and NADL8 of the virus BVD type 1



Objaśnienia:
 Explain:
 patrz rysunek 10
 see figure 10

Rys. 12. Wartości hematocrytu (l/l) u świń zakażonych mieszaną szczepów NADL2 i NADL8 wirusa BVD typ 1
 Fig. 12. Value of hematocrit (l/l) in swine infected with the mixture of strains NADL2 and NADL8 of the virus BVD type 1



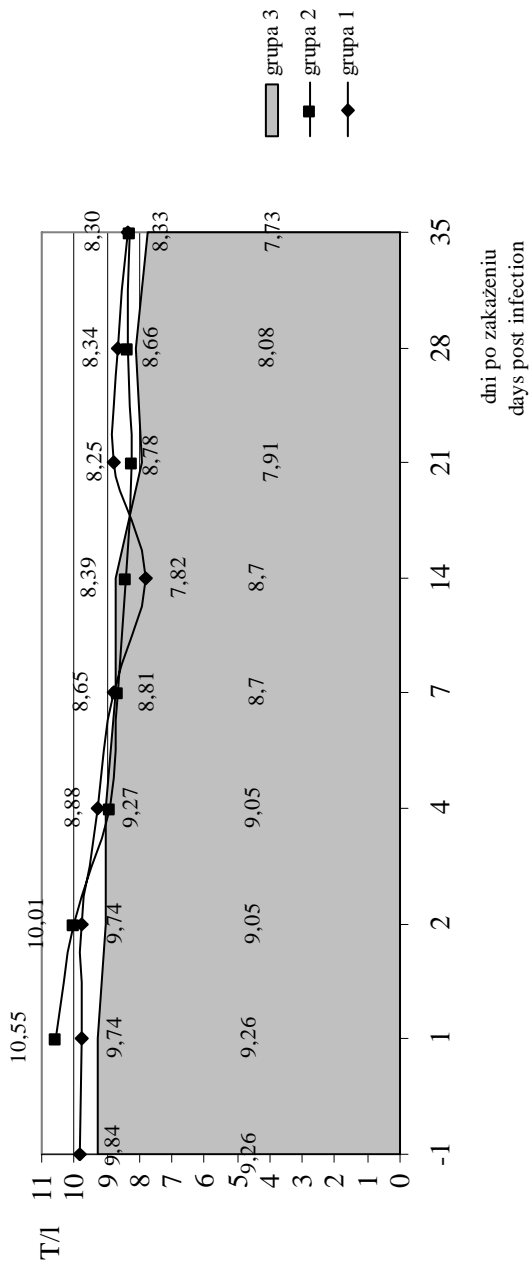
Objaśnienia:

Explain:

patrz rysunek 10

see figure 10

Rys. 13. Liczba krwinek białych (G/l) we krwi obwodowej świń zakażonych mieszaniną szczepów NADL2 i NADL8 wirusa BVD typ 1
 Fig. 13. A number of leucocytes (G/l) in peripheral blood in swine infected with the mixture of strains NADL2 and NADL8 of the virus BVD type 1



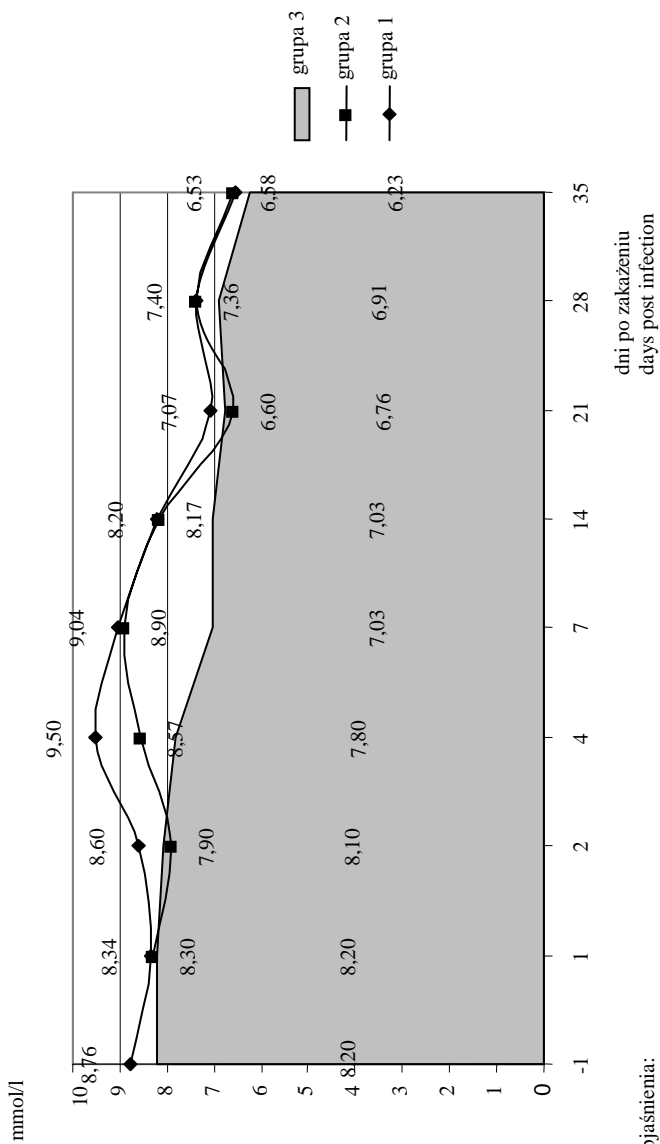
Objaśnienia:

Explanation:

patrz rysunek 10

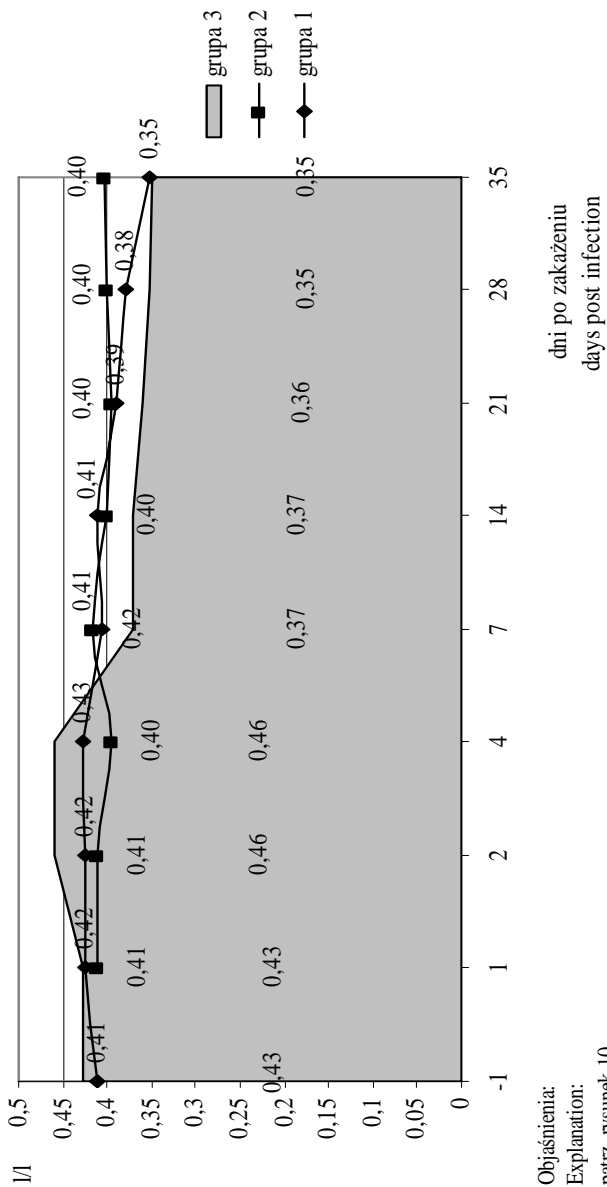
see figure 10

Rys. 14. Liczba krwinek czerwonych (T/I) we krwi obwodowej u świń zakażonych szczepem V725 wirusa BVD
 Fig. 14. A number of erythrocytes (T/I) in peripheral blood in swine infected with the strain V725 of the virus BVD



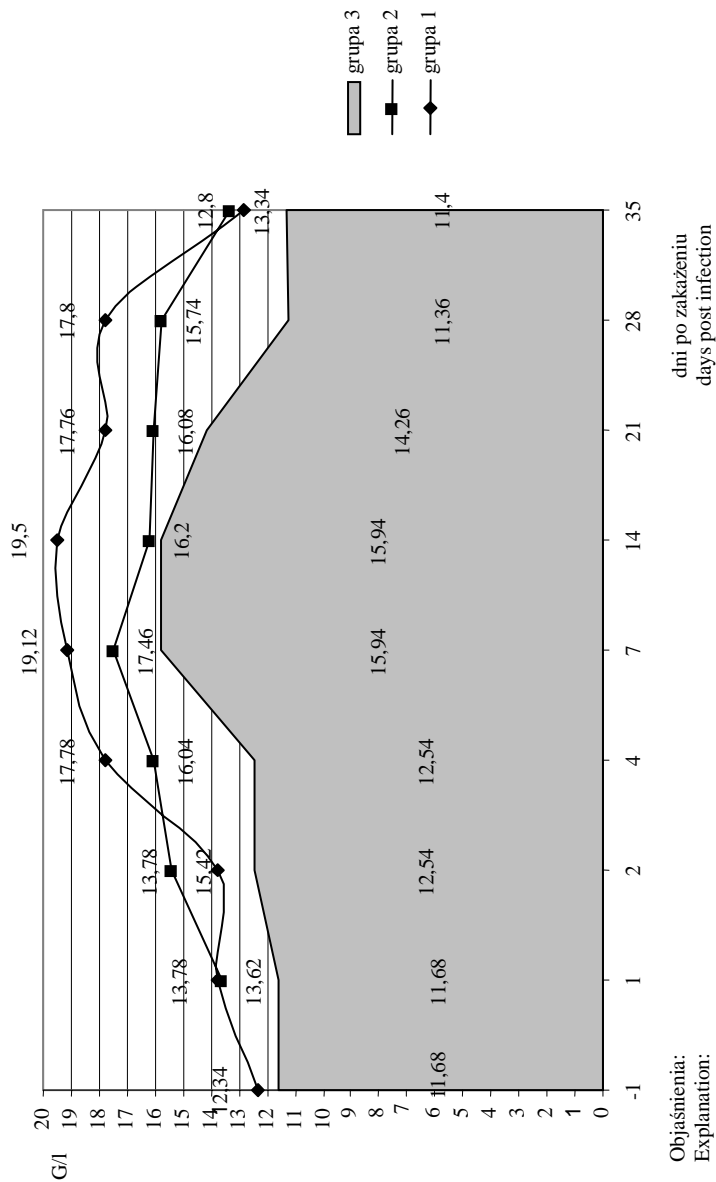
Objaśnienia:
 Explanation:
 patrz rysunek 10
 see figure 10

Rys. 15. Poziom hemoglobiny (mmol/l) u świń zakażonych szczepem V725 wirusa BVD typ 1
 Fig. 15. Level of haemoglobin (mmol/l) in swine infected with the strain V725 of the virus BVD type 1



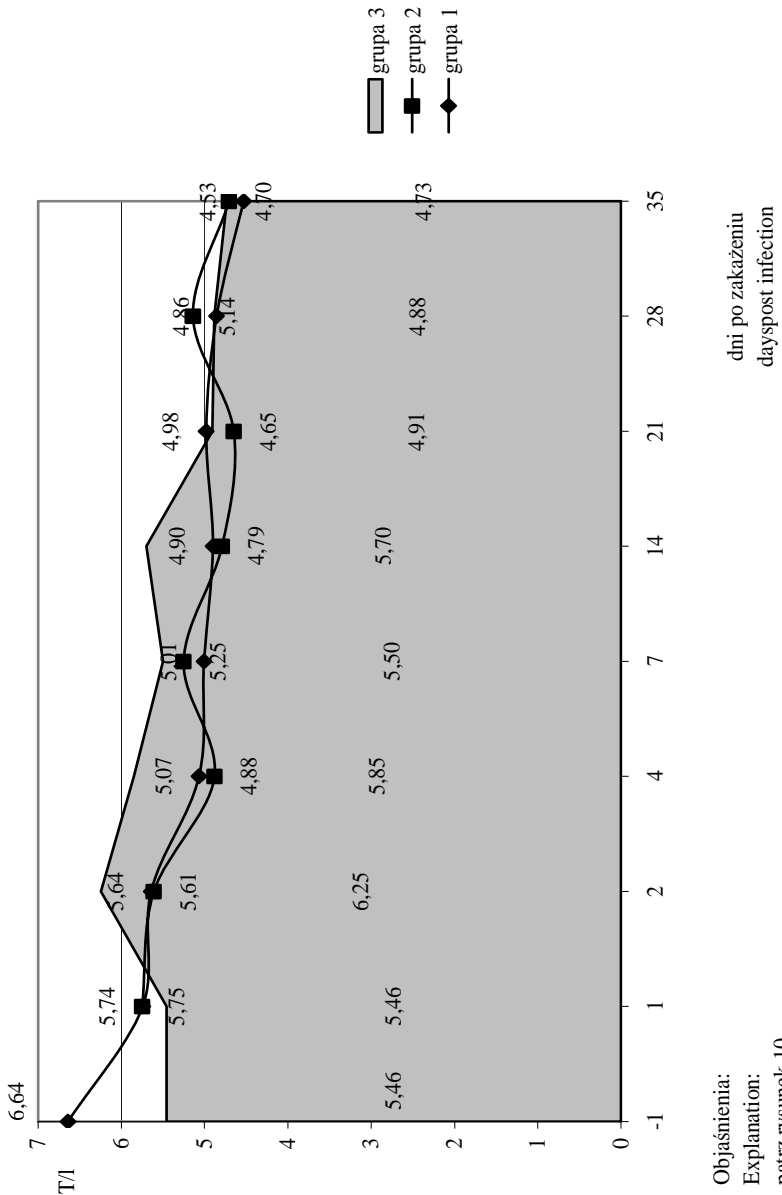
Objasnenia:
 Explanation:
 patrz: rysunek 10
 see figure 10

Rys. 16. Wartości hematokrytu (I/I) u świń zakażonych szczepem V725 wirusa BVD typ 1
 Fig. 16. Value of hematocrit (I/I) in swine infected with the strain V725 of the virus BVD type 1



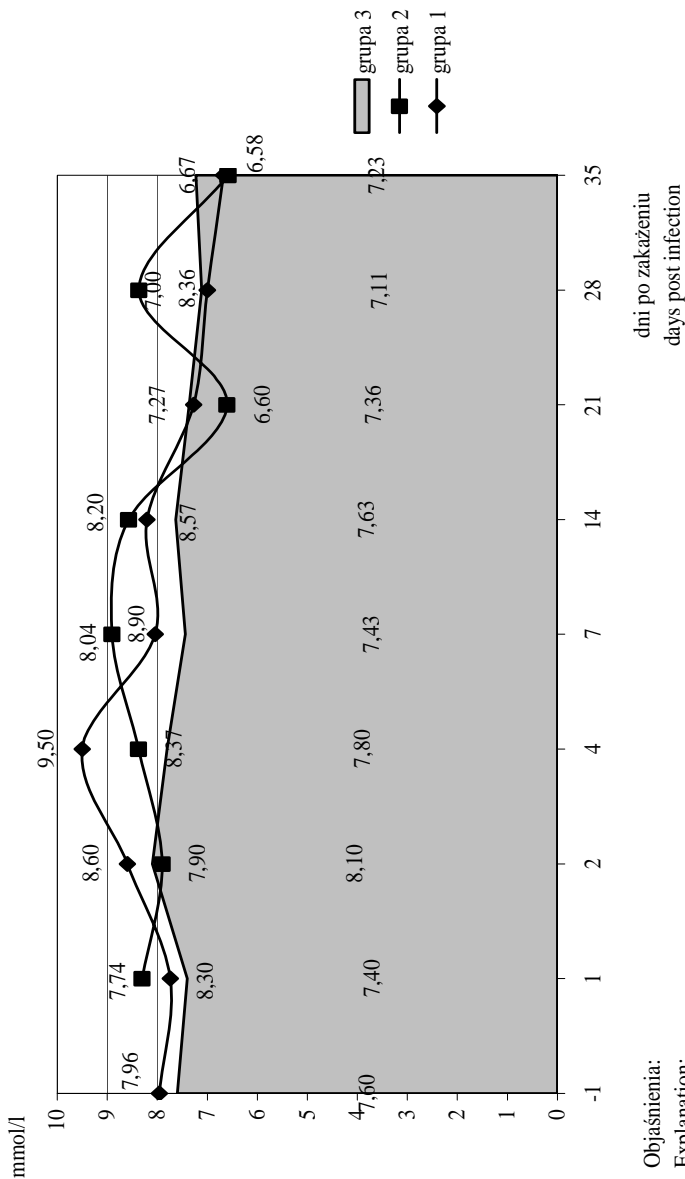
Objaśnienia:
 Explanation:
 Patrz rysunek 10
 See figure 10

Rys. 17. Liczba leukocytów (G/l) we krwi obwodowej u świń zakażonych szczepem V725 wirusa BVD typ 1
 Fig. 17. A number of leucocytes (G/l) in peripheral blood in swine infected with the strain V725 of the virus BVD type 1



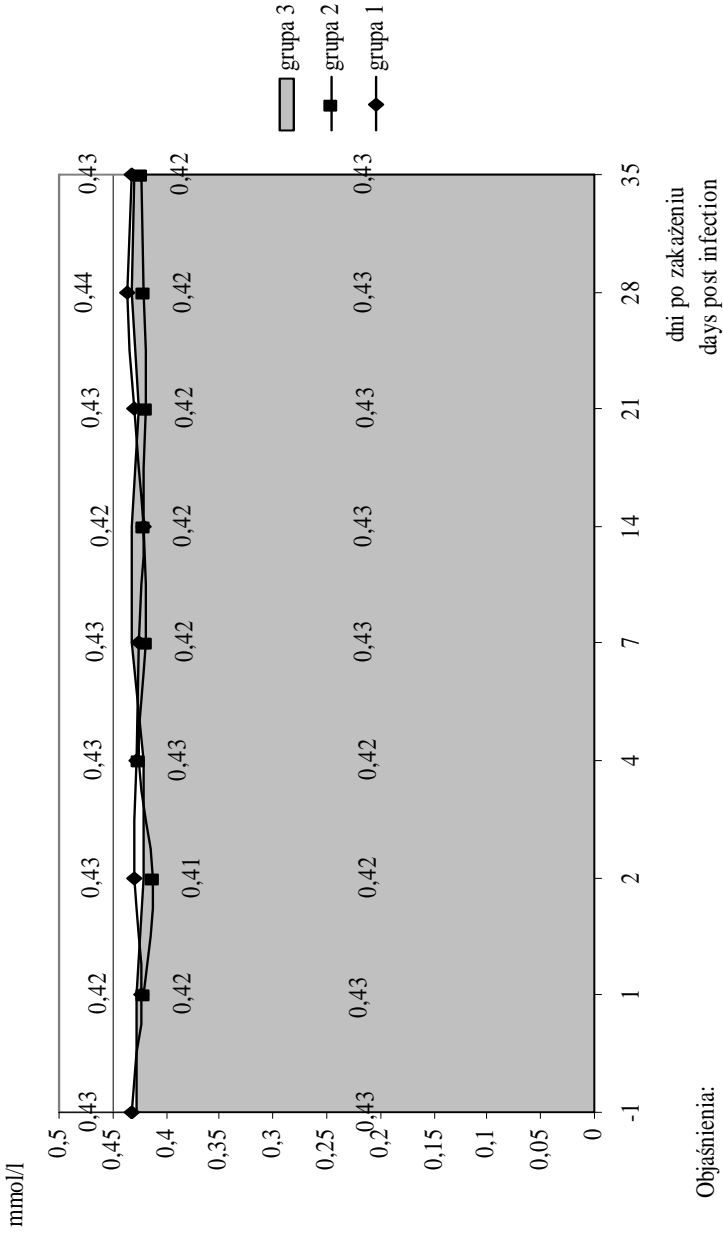
Objasnienia:
 Explanation:
 patrz rysunek 10
 see figure 10

Rys. 18. Liczba krwinek czerwonych (T/I) w krwi obwodowej u świń zakazanych szczepem 5862/84 wirusa BVD typ 1
 Fig. 18. A number of erythrocytes (T/I) in peripheral blood in swine infected with the strain 5862/84 of the virus BVD type 1



Objaśnienia:
 Explanation:
 patrz rysunek 10
 see figure 10

Rys. 19. Poziom hemoglobiny (mmol/l) u świń zakażonych szczepem 5862/84 wirusa BVD typ 1
 Fig. 19. Level of haemoglobin (mmol/l) in swine infected with the strain 5862/84 of the virus BVD type 1



Objasnienia:

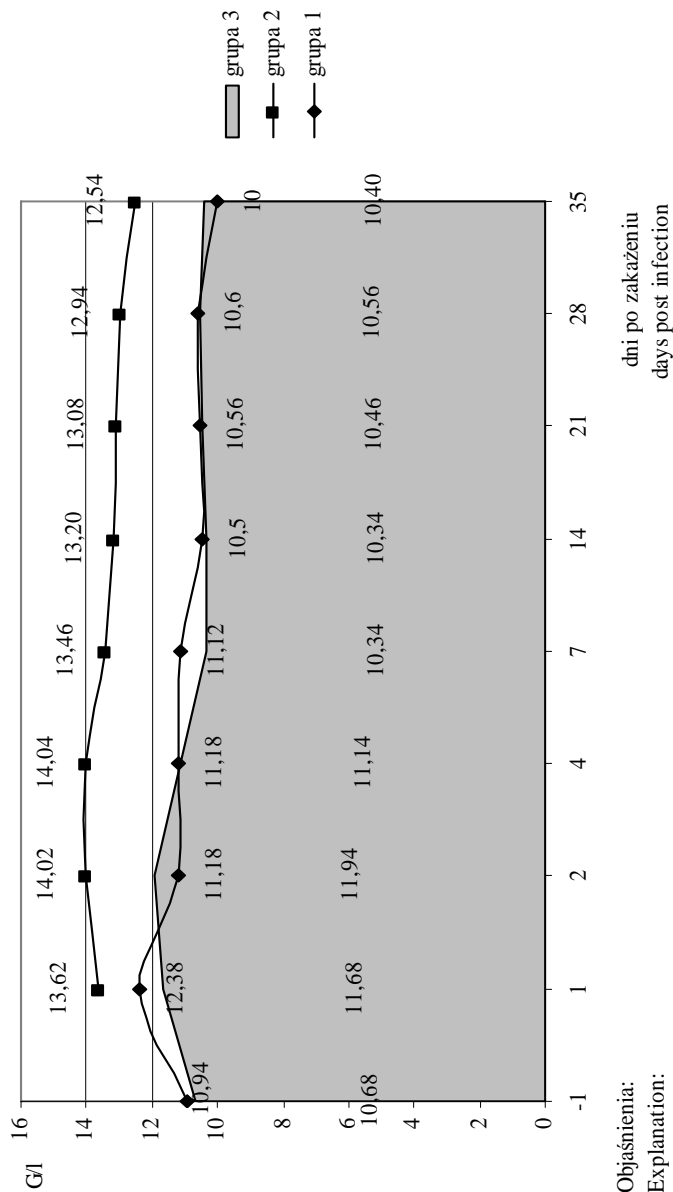
Explanation:

patrz rysunek 10

see figure 10

Rys. 20. Wartości hematokrytu u świń zakażonych szczepem 5862/84 wirusa BVD typ 1

Fig. 20. Value of hematocrit in swine infected with the strain 5862/84 of the virus BVD type 1



Objaśnienia:

Explanation:

patrz rysunek 10

see figure 10

Rys. 21. Liczba krwinek białych (G/l) we krwi obwodowej świń zakażonych szczepem 5862/84 wirusa BVD typ 1
 Fig. 21. A number of leucocytes (G/l) in peripheral blood in swine infected with the strain 5862/84 of the virus BVD type 1

3.1.3.3. Zmiany w subpopulacjach limfocytów T i B krwi obwodowej świń zakażonych różnymi szczepami wirusa BVD typ 1

3.1.3.3.1. Szczep NADL2:NADL8 wirusa BVD

Na rysunkach 22–26 przedstawiono odsetek subpopulacji limfocytów T krwi obwodowej w przebiegu zakażenia mieszaniną szczepów NADL2:NADL8 wirusa BVD. Odsetek limfocytów T CD2 obniżył się w przebiegu doświadczenia zarówno w grupie 1, jak i 2. W grupie 1 nastąpił spadek z wartości początkowej 36,2% do 26,4% w dniu ostatniego pomiaru, jednakże po zakażeniu zwierząt odnotowano wzrost odsetka limfocytów T CD2 do czwartego dnia, po czym dopiero następował stopniowy spadek. Z kolei w grupie 2 wartości te kształtowały się odpowiednio na poziomie 41% i 33,6%. Analizując dynamikę zmian odsetka limfocytów T CD2 odnotowano spadek ich liczby u zwierząt w grupie 2 o 20% ($p=0,003$), zaś u zwierząt w grupie 1 o 25% ($p=0,01$).

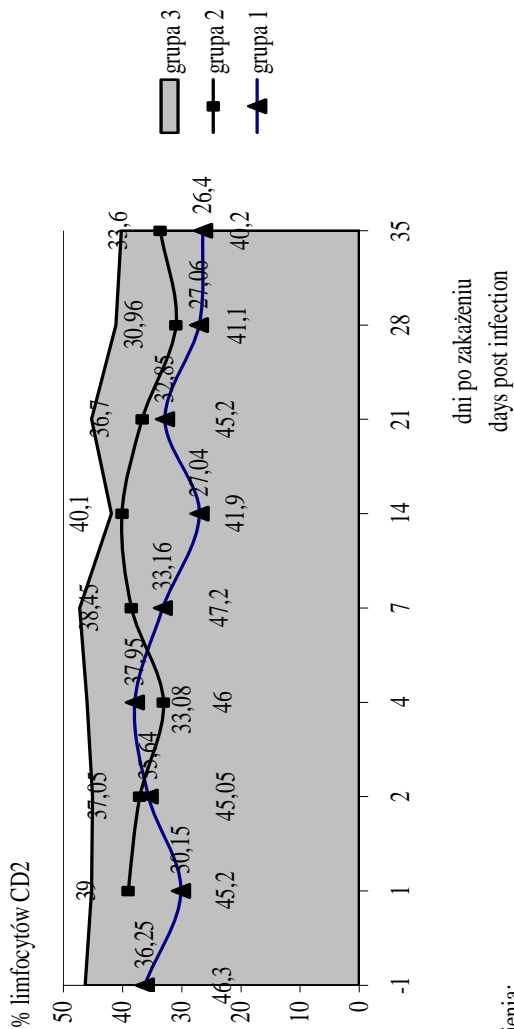
Subpopulacja limfocytów T CD4 podlegała także wahaniom w przebiegu obserwacji. Spadek z 13,2% do 9,1% odnotowano w grupie 1 ($p=0,01$) oraz z 15,0% do 8,2% w grupie 2 ($p=0,02$). Znacznie silniejszy spadek odsetka limfocytów T CD8 obserwowano u świń w grupie 2, tj. z wartości 23,3% w dniu pierwszego badania do 7,4% w 28 dniu obserwacji ($p=0,04$). Z kolei stosunek CD4:CD8 w grupie 2 wynosił na początku obserwacji 3:5, a w dniu zakończenia badań 1:1. W grupie 1 stosunek CD4:CD8 wynosił 1:2 w dniu rozpoczęcia obserwacji oraz 1:3 w dniu jej zakończenia. Nie odnotowano także istotnych zmian w grupie komórek wykazujących ekspresję receptora TCR $\gamma\delta$. Odsetek tych komórek wzrósł nieznacznie w pierwszych godzinach po zakażeniu w obu grupach, po czym podlegał niewielkim wahaniom do zakończenia obserwacji w grupie 1 ($p=0,91$) i grupie 2 ($p=0,62$). Podobnie nie uległa statystycznie istotnym zmianom subpopulacja limfocytów T wykazujących ekspresję receptora wCD45 zarówno w grupie 1 ($p=0,81$), jak i 2 ($p=0,72$).

Odsetek limfocytów B z receptorem CD21 podczas obserwacji w grupie 1 uległ obniżeniu z wartości 15,3% w dniu pierwszego pomiaru do 9,3% w 35 dniu obserwacji ($p=0,12$). W grupie drugiej w tym samym okresie czasu odsetek limfocytów B CD21 wynosił odpowiednio 15,7% i 12% ($p=0,54$) (rys. 27).

3.1.3.3.2. Szczep V725 wirusa BVD

Na rysunku 28 przedstawiono odsetek limfocytów T subpopulacji CD2 krwi obwodowej po zakażeniu szczepem V725 wirusa BVD. Odsetek limfocytów z receptorem CD2 wynosił pierwszego dnia w grupie 1 – 50,44%, po czym wzrósł do 62,6% w 21 dniu, a następnie obniżył się do 41,9% w 35 dniu obserwacji ($p=0,56$). W grupie 2 wartości te mieściły się na poziomie odpowiednio 49,5%, 57,9% i 44,9%. Obniżenie odsetka limfocytów T z receptorem CD2 w przebiegu eksperymentu wynosiło 5,9% w grupie 1 i 7,5% u świń w grupie 2 ($p=0,06$).

Odsetek limfocytów T z receptorem CD4 podlegał również wahaniom w przebiegu obserwacji. U zwierząt w grupie 1 rejestrowano od drugiej doby po zakażeniu wzrost odsetka komórek CD4 z 13,1% do 17,3% ($p=0,82$), z kolei w grupie 2 od 14 dnia po zakażeniu z 10,1% do 15,3% ($p=0,04$) (rys. 29).



Objaśnienia:

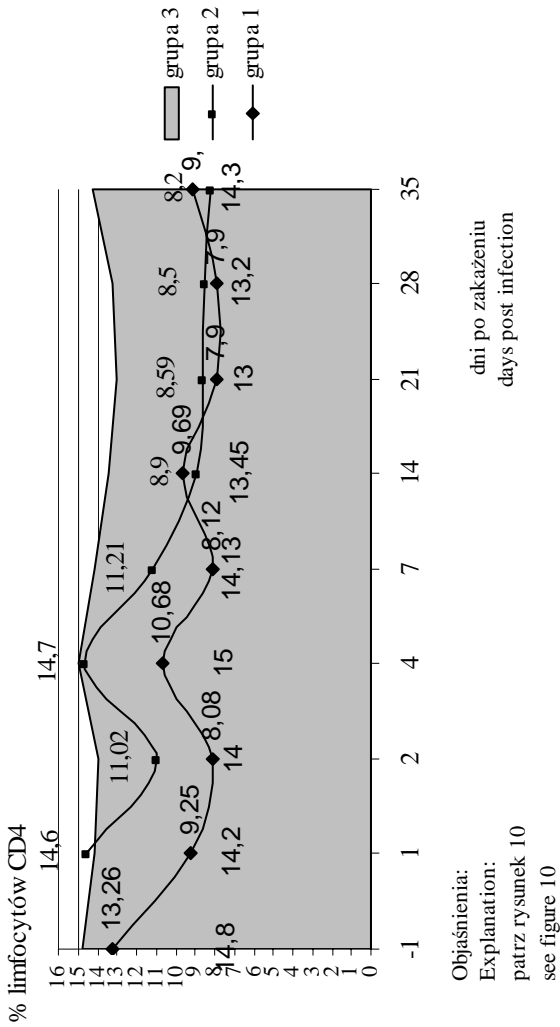
Explain:

patrz rysunek 10

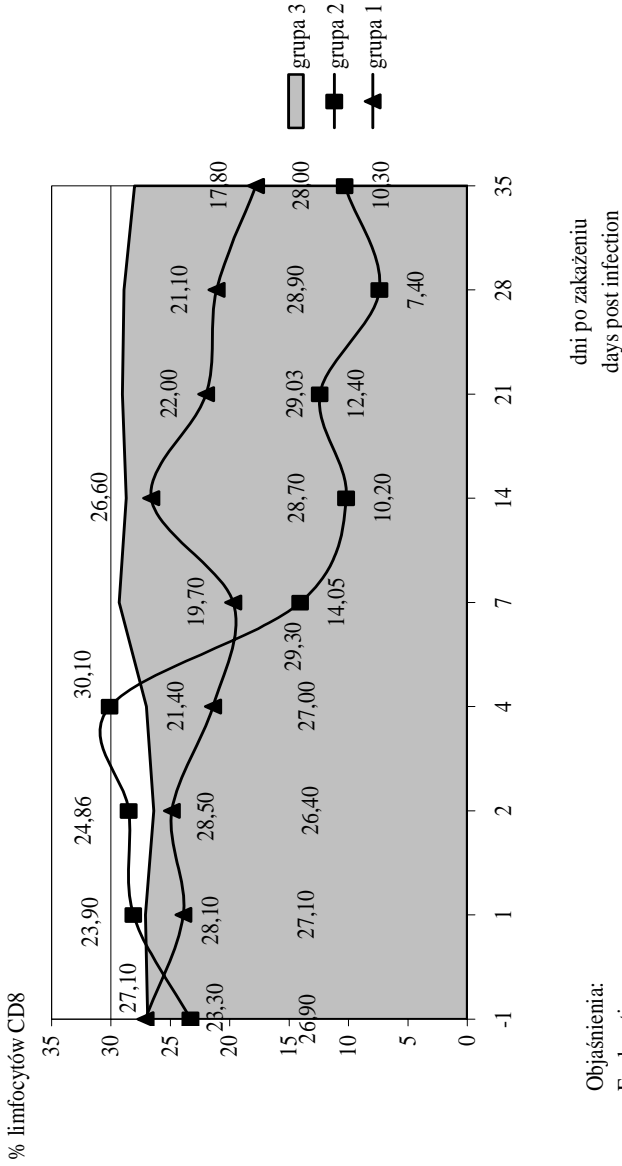
see figure 10

Rys. 22. Odsetek limfocytów T subpopulacji CD2 we krwi obwodowej świń zakażonych mieszaniną szczepów NADL2:NADL8 wirusa BVD typ 1

Fig. 22. Percentage of lymphocytes T of the subpopulation CD2 in peripheral blood in swine infected with the mixture of strains NADL2:NADL8 of the virus BVD type 1



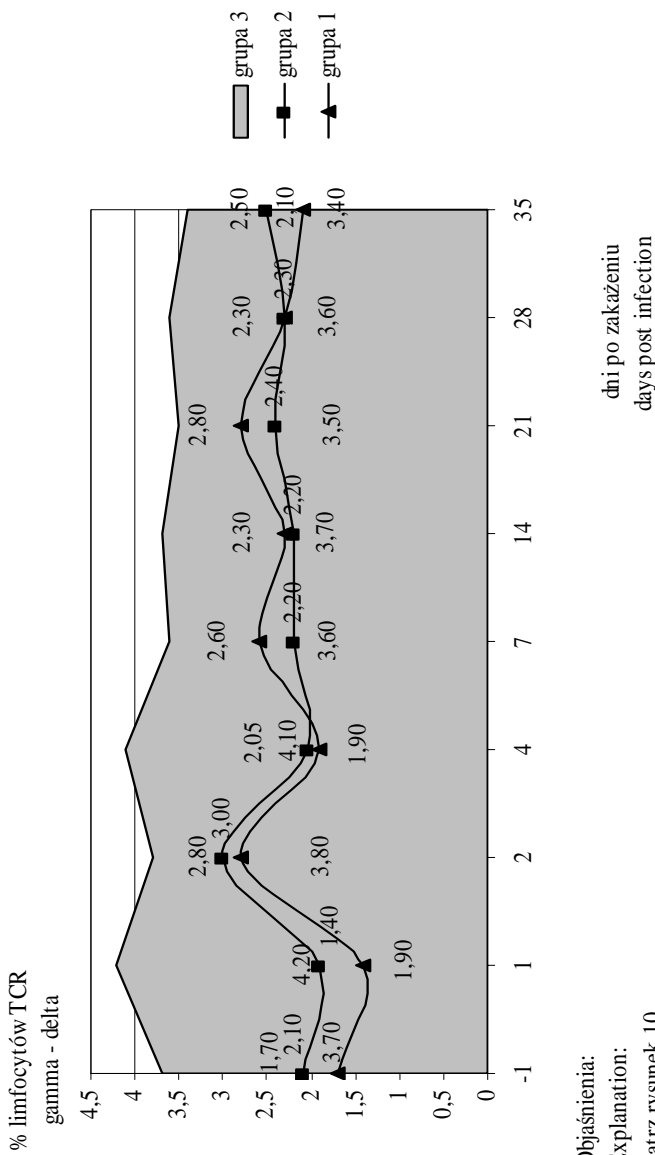
Rys. 23. Odsetek limfocytów T subpopulacji CD4 we krwi obwodowej świń zakażonych szczepem NADL2:NADL8 wirusa BVD typ 1
 Fig. 23. Percentage of lymphocytes T of the subpopulation CD4 in peripheral blood in swine infected with the strain NADL2:NADL8 of the virus BVD type 1



Objaśnienia:
 Explanation:
 patrz rysunek 10
 see figure 10

Rys. 24. Odsetek limfocytów T subpopulacji CD8 we krwi obwodowej świń zakażonych mieszaną szczepów NADL2:NADL8 wirusa BVD typ 1

Fig. 24. Percentage of lymphocytes T of the subpopulation CD8 in peripheral blood in swine infected with the strain NADL2:NADL8 of the virus BVD type 1



Objaśnienia:

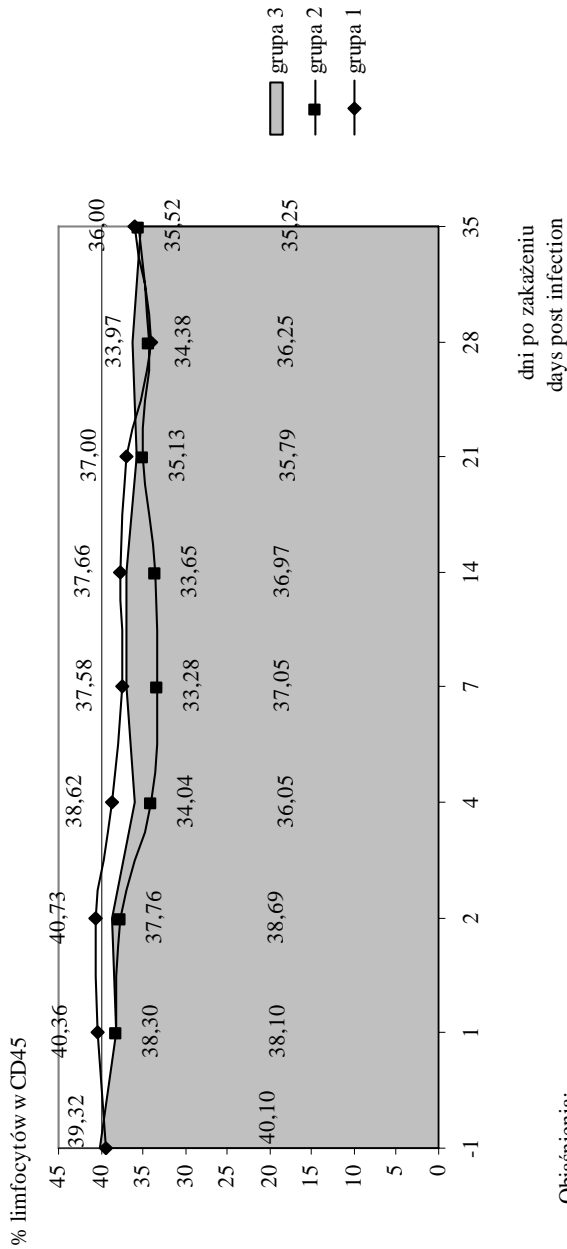
Explanation:

patrz rysunek 10

see figure 10

Rys. 25. Odsetek limfocytów T subpopulacji z receptorem TCR gamma-delta we krwi obwodowej świń zakażonych mieszaniną szczepów NADL2:NADL8 wirusa BVD typ 1

Fig. 25. Percentage of lymphocytes T of the subpopulation with the receptor TCR gamma-delta in peripheral blood in swine infected with the mixture of strains NADL2:NADL8 of the virus BVD type 1



Objaśnienia:

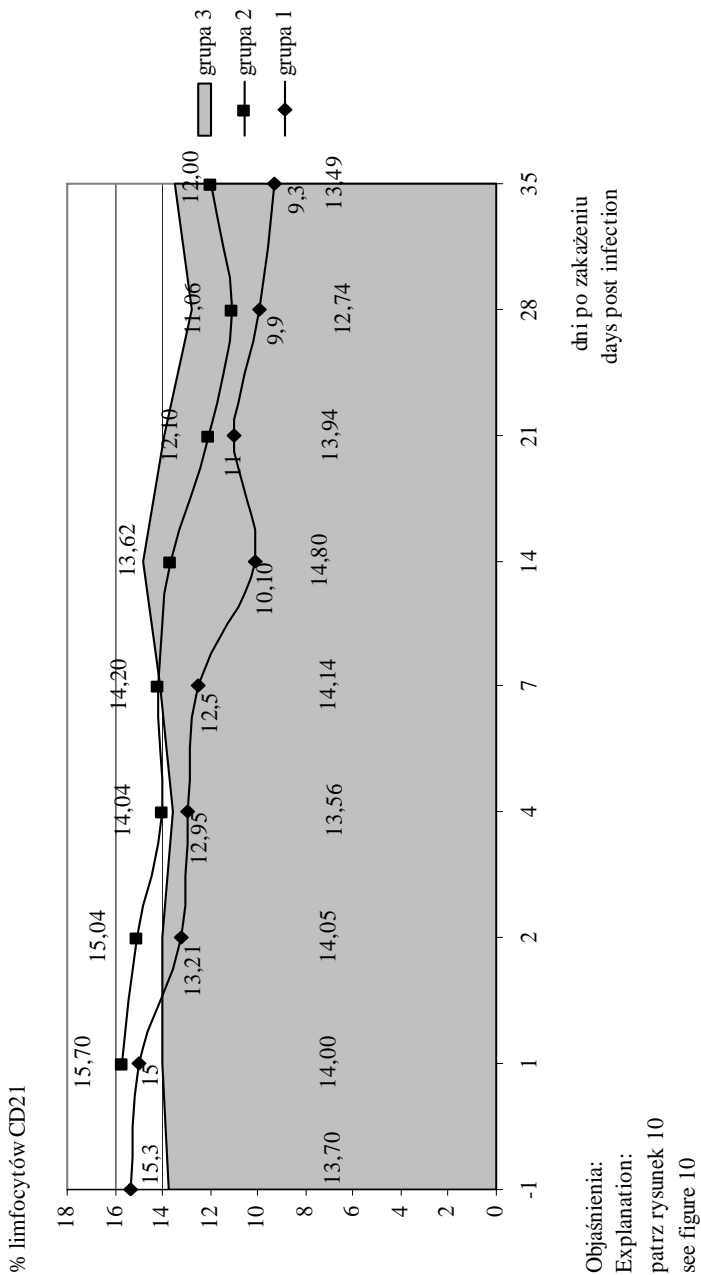
Explanation:

patrz rysunek 10

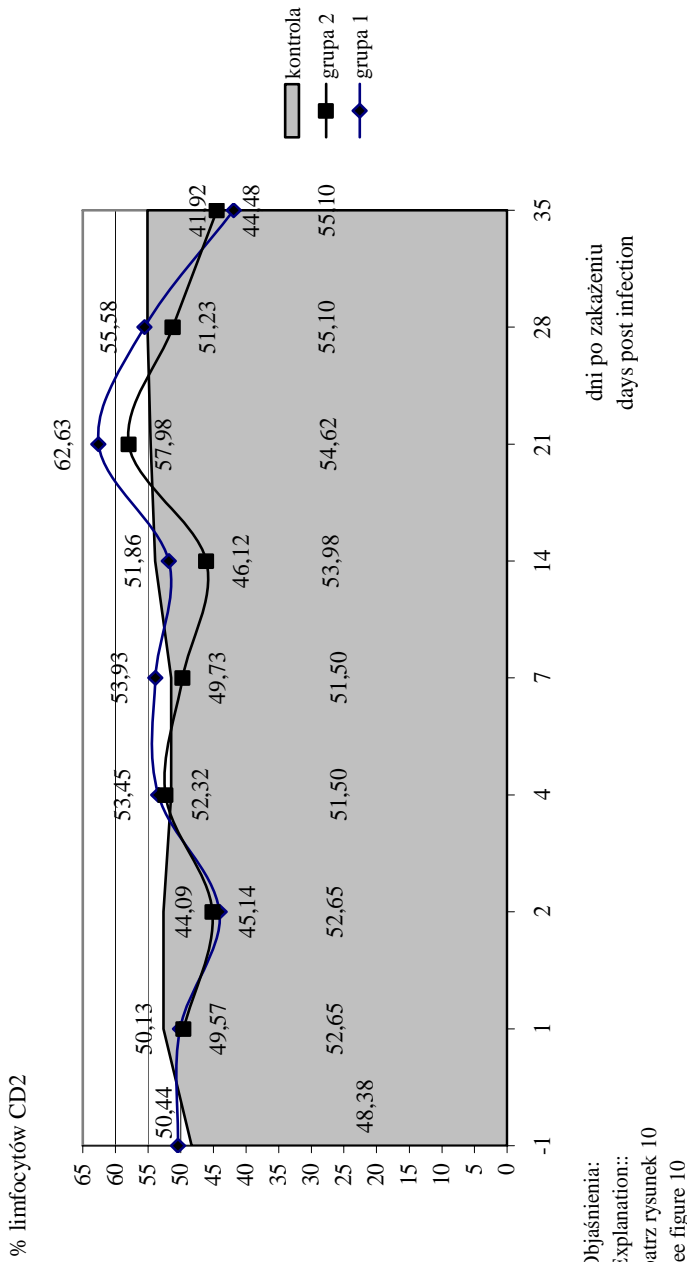
see figure 10

Rys. 26. Odsetek limfocytów T subpopulacji wCD45 we krwi obwodowej świń zakażonych mieszaniną szczepów NADL2:NADL8 wirusa BVD typ 1

Fig. 26. Percentage of lymphocytes T of the subpopulation wCD45 in peripheral blood in swine infected with the mixture of strains NADL2:NADL8 of the virus BVD type 1

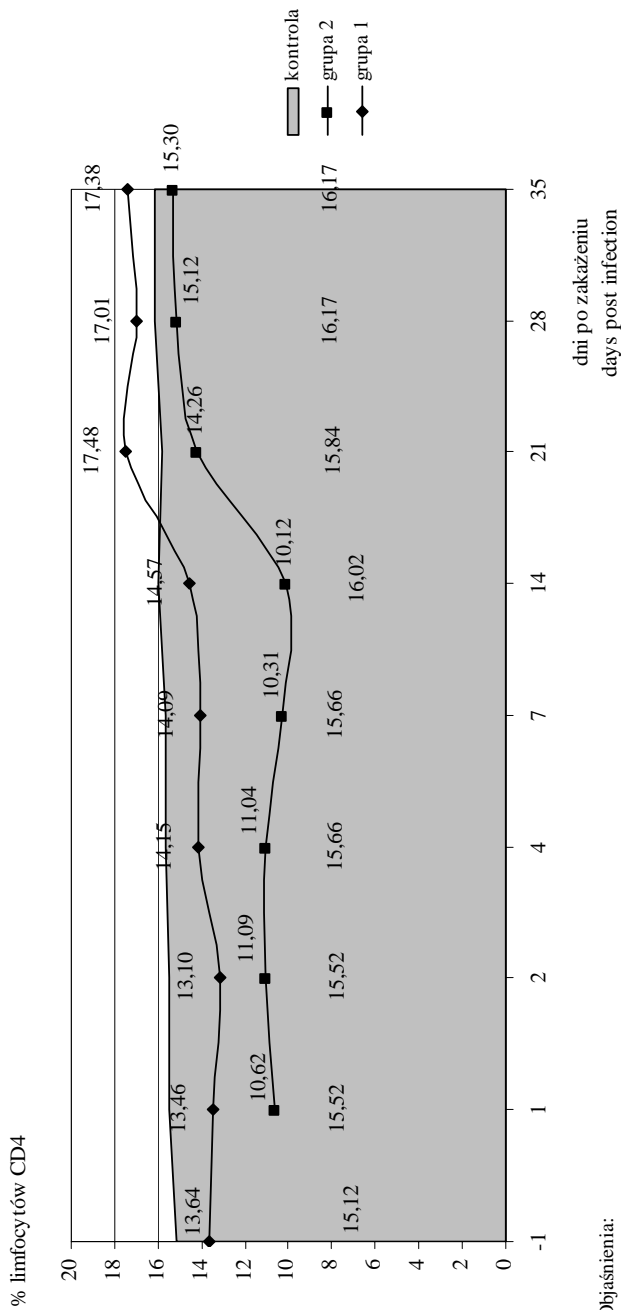


Rys. 27. Odsetek limfocytów B subpopulacji CD21 we krwi obwodowej świń po zakażeniu mieszaniną szczepów NADL2:NADL8 wirusa BVD typ 1
 Fig. 27. Percentage of lymphocytes B of the subpopulation CD21 in peripheral blood in swine after infecting with the mixture of strains NADL2:NADL8 of the virus BVD type 1



Objaśnienia:
 Explanation::
 patrz rysunek 10
 see figure 10

Rys. 28. Odsetek limfocytów T subpopulacji CD2 we krwi obwodowej świń zakażonych szczepem V725 wirusa BVD typ 1
 Fig. 28. Percentage of lymphocytes T of the subpopulation CD2 in peripheral blood in swine infected with the strain V725 of the virus BVD type 1



Objaśnienia:

Explanation:

patrz rysunek 10

see figure 10

Rys. 29. Odsetek limfocytów Tsubpopulacji CD4 we krwi obwodowej świń zakażonych szepcem V725 wirusa BVD
 Fig. 29. Percentage of lymphocytes T of the subpopulation CD4 in peripheral blood in swine infected with the strain V725 of the virus BVD type 1

Odsetek limfocytów T CD8 u zwierząt w grupie 1 wzrósł z 20,2% do 22,9% w drugiej dobie po zakażeniu, po czym stopniowo spadał uzyskując w ostatnim dniu obserwacji wartość 14,8% ($p=0,01$). Spadek odsetka tej populacji komórek odnotowano również u zwierząt w grupie 2, u których odsetek ten wynosił odpowiednio 28,1% i 7,2% ($p=0,04$) (rys. 30). Stosunek CD4:CD8 w grupie 1 wynosił w pierwszej dobie po zakażeniu 1:2, natomiast w dniu zakończenia obserwacji 1:1. W grupie 2 stosunek ten podlegał również zmianom z 1:2 w dniu rozpoczęcia obserwacji do 1:1,5 w dniu jej zakończenia. Z kolei odsetek limfocytów T z receptorem TCR $\gamma\delta$ uległ wzrostowi do 7 doby po zakażeniu, po czym podlegał niewielkim, nieistotnym statystycznie wahaniom do zakończenia eksperymentu zarówno w grupie 1 ($p=0,38$), jak i grupie 2 ($p=0,6$) (rys. 31).

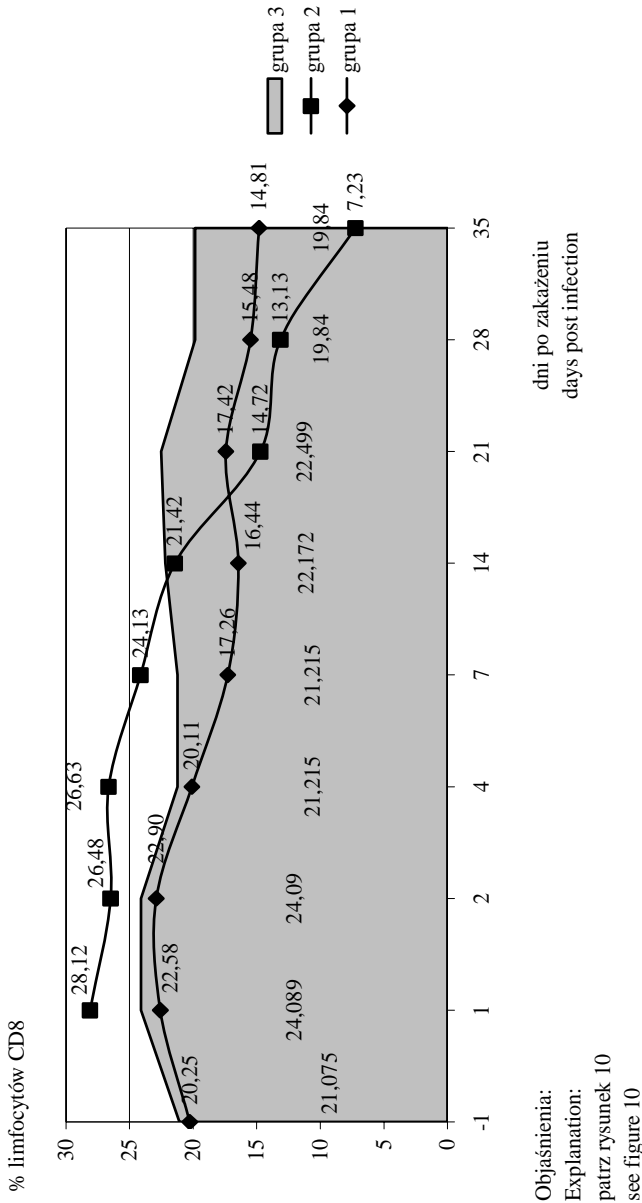
Różnica w odsetku limfocytów T z receptorem wCD45 nie podlegała statystycznie istotnym zmianom u zwierząt w grupie 1 ($p=0,06$). Wartości te w przebiegu obserwacji uległy obniżeniu z 41,3% w pierwszej dobie po zakażeniu do 36,6% w ostatnim dniu obserwacji. Podobnie spadkowi ulegał odsetek limfocytów T wCD45 w grupie 2 z 37,3% do 30,5% ($p=0,02$) (rys. 32). Również odsetek limfocytów B z receptorem CD21 podczas obserwacji w grupie 1 i 2 obniżył się z wartości 16,4% w pierwszym dniu po zakażeniu do 13,9% w 35 dniu obserwacji w grupie 1 ($p=0,6$) oraz z 16,3% do 14,6% w grupie 2 ($p=0,96$) (rys. 33).

3.1.3.3.3. Szczep 5862/84 wirusa BVD

Po zakażeniu świń szczepem 5862/84 wirusa BVD odsetek limfocytów T CD2 w krwi obwodowej w przebiegu zakażenia u zwierząt w grupie 1 wzrastał do 7 dnia od zakażenia z 56,5% do 64,5%, po czym ulegał powolnemu obniżeniu do 56,5% w dniu zakończenia eksperymentu. Odnotowane zmiany nie były statystycznie istotne ($p=0,32$). W grupie 2 obserwowane zmiany w odsetku limfocytów T CD2 w okresie od 1 do 21 dnia doświadczenia miały tendencję spadkową, osiągając w 35 dniu 58% wartości początkowej ($p=0,02$) (rys. 34).

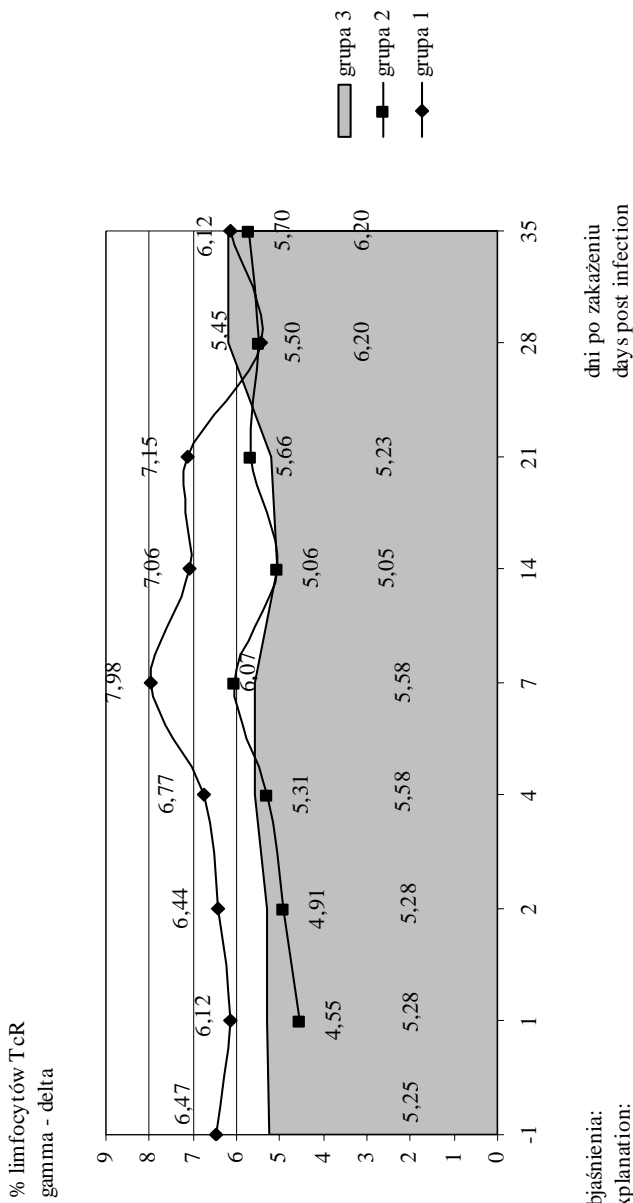
Odsetek limfocytów T CD4 w grupie 1 do 7 dnia po zakażeniu obniżał się z 9,03% do 5,88%, po czym wzrastał w kolejnych tygodniach do 14,23% w dniu zakończenia eksperymentu. Powyższe zmiany były statystycznie istotne ($p=0,01$). W grupie 2 dynamika zmian nie była statystycznie istotna. Porównując wyniki pomiaru z grupy 2 do wyników uzyskanych u zwierząt w grupie kontrolnej zmiany te były statystycznie istotne ($p=0,02$) (rys. 35).

Odsetek limfocytów T CD8 u zwierząt w grupie 1 wzrastał z 32,4% do 52,0% do 7 dnia od momentu zakażenia, po czym spadał do wartości 36,9% w dniu zakończenia obserwacji ($p=0,02$). Także u zwierząt w grupie 2 w tym samym okresie odnotowano wzrost odsetka limfocytów T CD8 z 47,6% do 55,8% w 7 dniu i następnie spadek do 42,0% ($p=0,01$) (rys. 36). Stosunek limfocytów T CD4:CD8 w grupie 1 wynosił w pierwszym dniu obserwacji 1:4, a w dniu jej zakończenia 1:2. W grupie 2 stosunek ten wynosił 1:5 i nie uległ zmianie do zakończenia eksperymentu. Odsetek limfocytów T z receptorem TCR $\gamma\delta$ obniżył się w grupie 1 z 3,5% do 2,2%, a następnie osiągnął wartość 2% w 35 dniu eksperymentu ($p=0,01$). Odsetek tej populacji komórek w grupie 2 nie zmienił się do 14 dnia, po czym uległ obniżeniu do 3,1% w 35 dniu. Zmiany te nie były statystycznie istotne ($p=0,1$) (rys. 37).



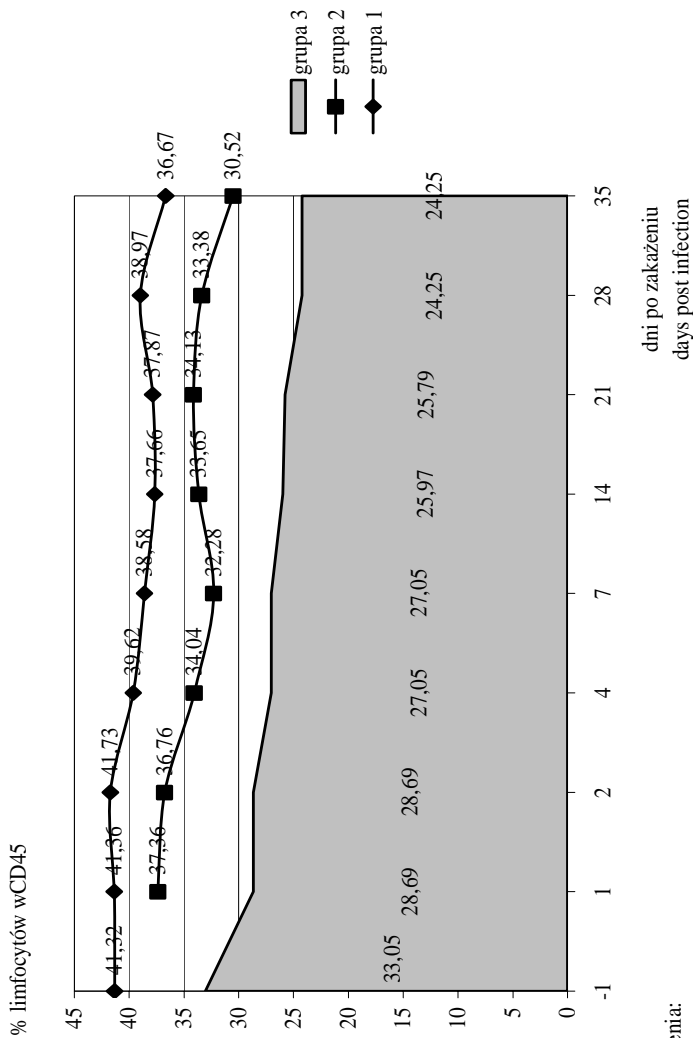
Objaśnienia:
 Explanation:
 patrz rysunek 10
 see figure 10

Rys. 30. Odsetek limfocytów T subpopulacji CD8 we krwi obwodowej świń zakażonych szczepem V725 wirusa BVD typ 1
 Fig. 30. Percentage of lymphocytes T of the subpopulation CD8 in peripheral blood in swine infected with the strain V725 of the virus BVD type 1



Objaśnienia:
 Explanation:
 patrz rysunek 10
 see figure 10

Rys. 31. Odsetek limfocytów T subpopulacji TCR gamma delta we krwi obwodowej świń zakażonych szczepem V725 wirusa BVD typ 1
 Fig. 31. Percentage of lymphocytes T of the subpopulation TCR gamma delta in peripheral blood in swine infected with the strain V725 of the virus BVD type 1



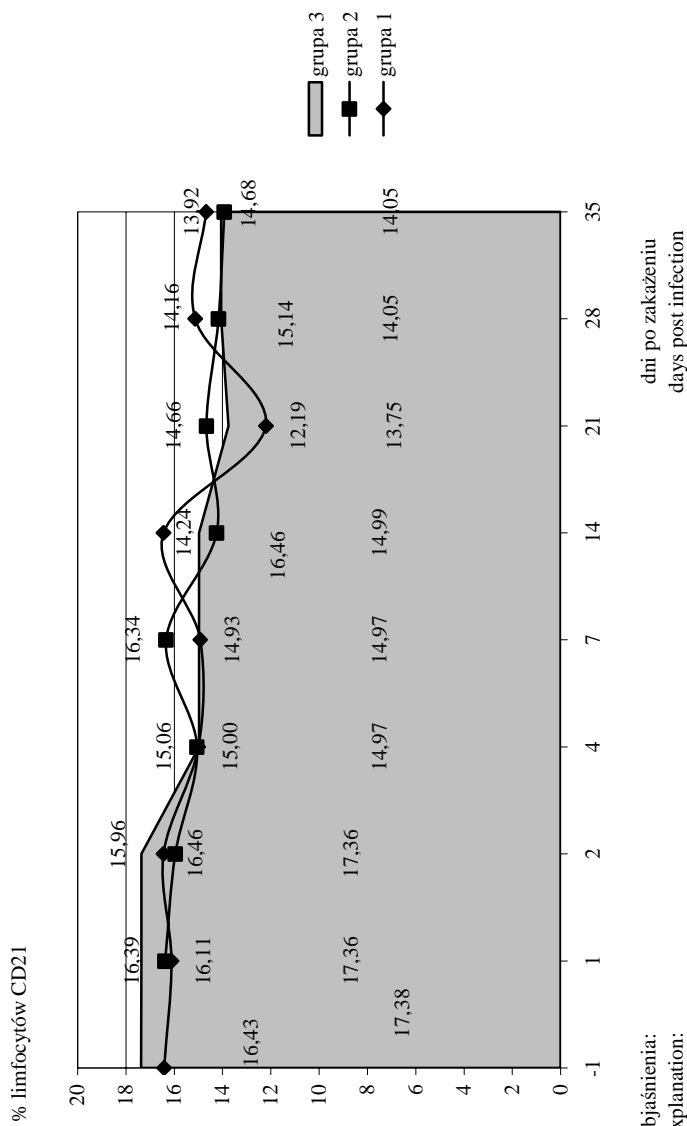
Objaśnienia:

Explanation:

patrz rysunek 10

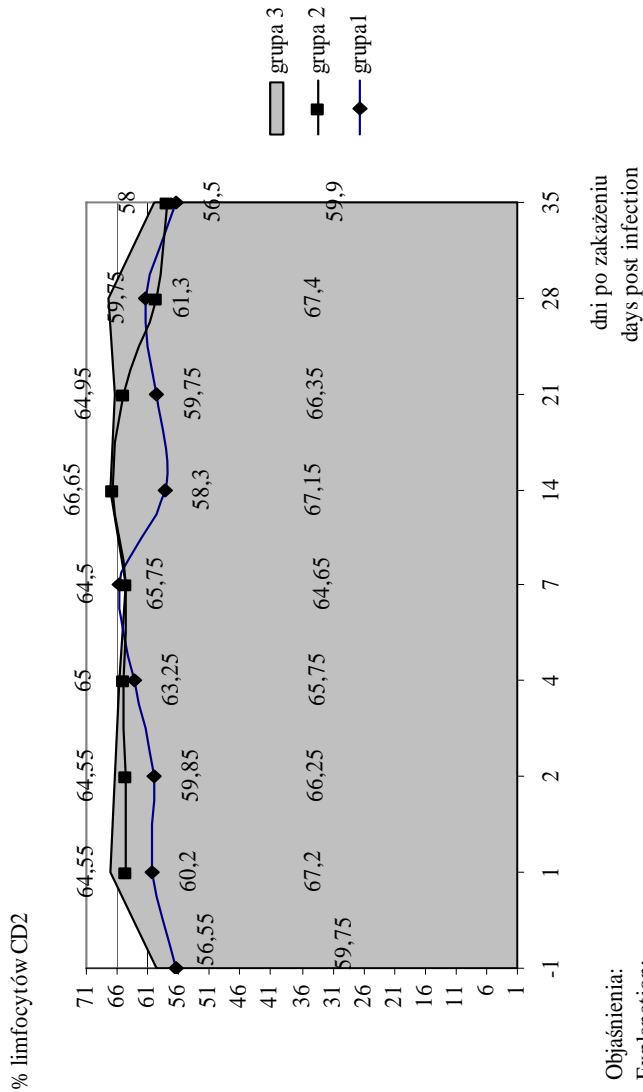
see figure 10

Rys. 32. Odsetek limfocytów T subpopulacji wCD45 we krwi obwodowej świń zakażonych szczepem V725 wirusa BVD typ 1
 Fig. 32. Percentage of lymphocytes T of the subpopulation wCD45 in peripheral blood in swine infected with the strain V725 of the virus BVD type 1



Objaśnienia:
 Explanation:
 patrz rysunek 10
 see figure 10

Rys. 33. Odsetek limfocytów B subpopulacji CD21 we krwi obwodowej świń zakażonych szczepem V725 wirusa BVD typ 1
 Fig. 33. Percentage of lymphocytes B of the subpopulation CD21 in peripheral blood in swine infected with the strain V725 of the virus BVD type 1



Objaśnienia:

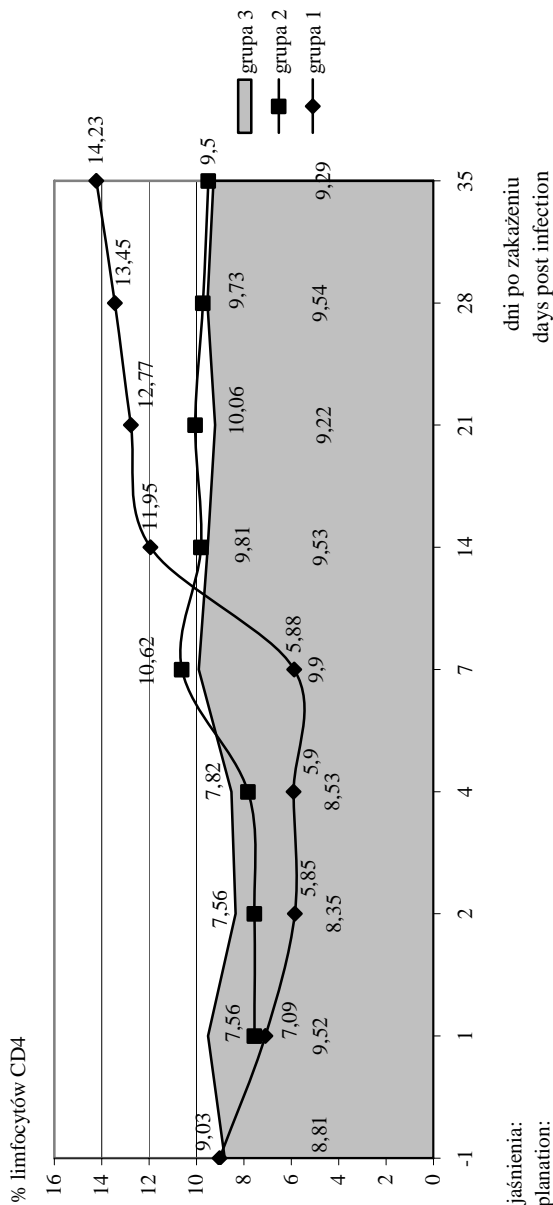
Explanation:

patrz rysunek 10

see figure 10

Rys. 34. Odsetek limfocytów T subpopulacji CD2 we krwi obwodowej świń zakażonych szczepem 5862/84 wirusa BVD typ 1

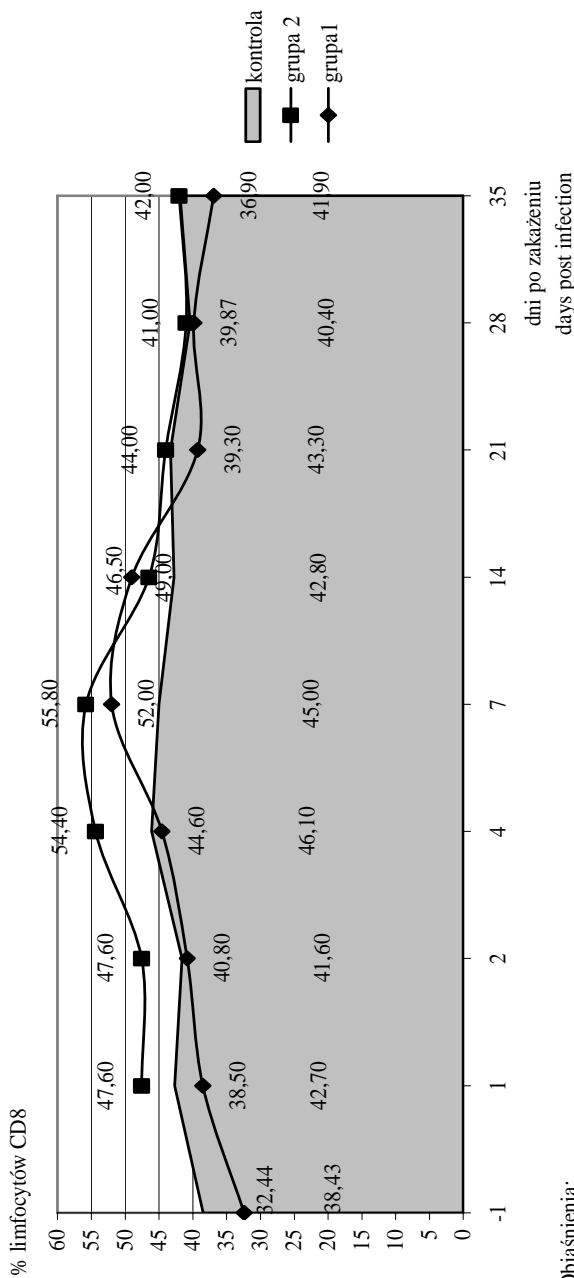
Fig. 34. Percentage of lymphocytes T of the subpopulation CD2 in peripheral blood in swine infected with the strain 5862/84 of the virus BVD type 1



Objaśnienia:

Explanation:
patrz rysunek 10
see figure 10

Rys. 35. Odsetek limfocytów T subpopulacji CD4 we krwi obwodowej świń zakażonych szczepem 5862/84 wirusa BVD typ 1
Fig. 35. Percentage of lymphocytes T of the subpopulation CD4 in peripheral blood in swine infected with the strain 5862/84 of the virus BVD type 1



Objaśnienia:

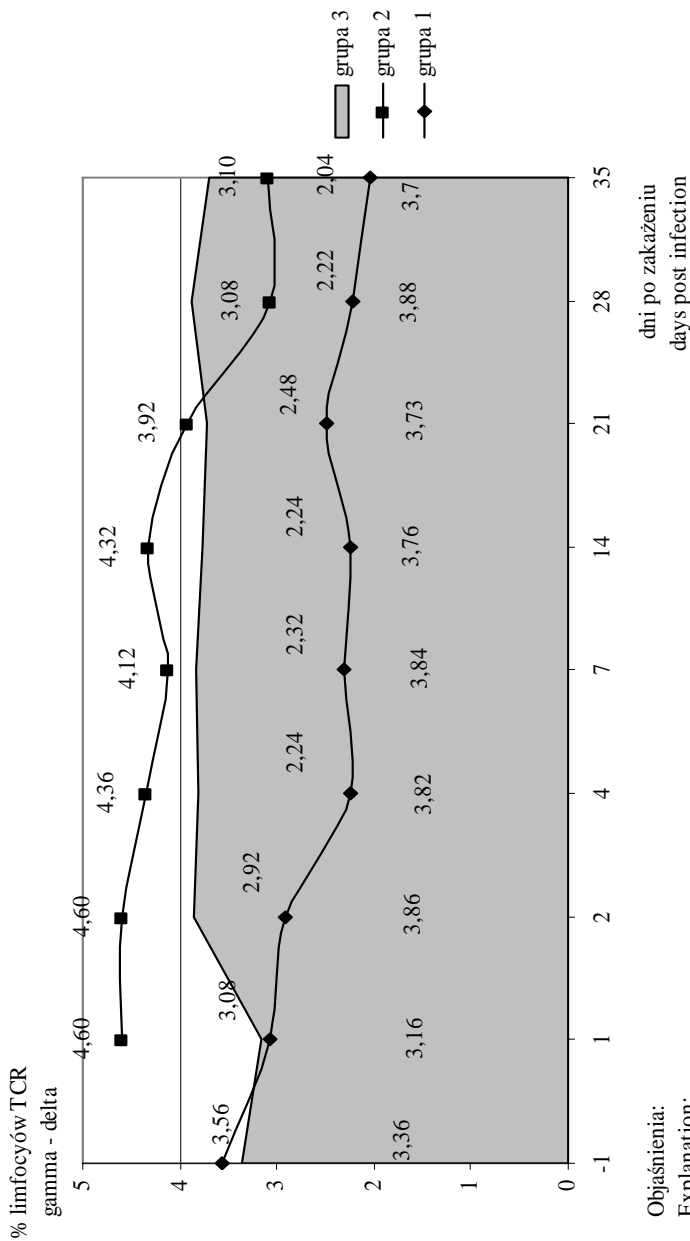
Explanation:

patrz rysunek 10

see figure 10

Rys. 36. Odsetek limfocytów T subpopulacji CD8 we krwi obwodowej świń zakażonych szepcem 5862/84 wirusa BVD typ 1

Fig. 36. Percentage of lymphocytes T of the subpopulation CD8 in peripheral blood in swine infected with the strain 5862/84 of the virus BVD type 1



Objasnienia:
 Explanation:
 patrz rysunek 10
 see figure 10

Rys. 37. Odsetek limfocytów T subpopulacji TCR gamma delta we krwi obwodowej świń zakażonych szczepem 5862/84 wirusa BVDtyp 1
 Fig. 37. Percentage of lymphocytes T of the subpopulation TCR gamma delta in peripheral blood in swine infected with the strain 5862/84 of the virus BVD type 1

Odsetek limfocytów T wCD45 nie uległ statystycznie istotnym zmianom podczas obserwacji zarówno w grupie 1 ($p=0,15$), jak i w grupie 2 ($p=0,4$) (rys. 38).

Odsetek aktywnych limfocytów B z receptorem CD21 podczas obserwacji w grupie 1 obniżył się do 12,1% w 4 dobie po zakażeniu i do 10,3% w 35 dniu obserwacji ($p=0,05$). Także u zwierząt w grupie 2 obniżył się z 14,3% do 12,2% w siódmej dobie p.i. W okresie od 14 do 35 dnia p.i. odsetek limfocytów B kształtował się na poziomie około 10% ($p=0,18$) (rys. 39).

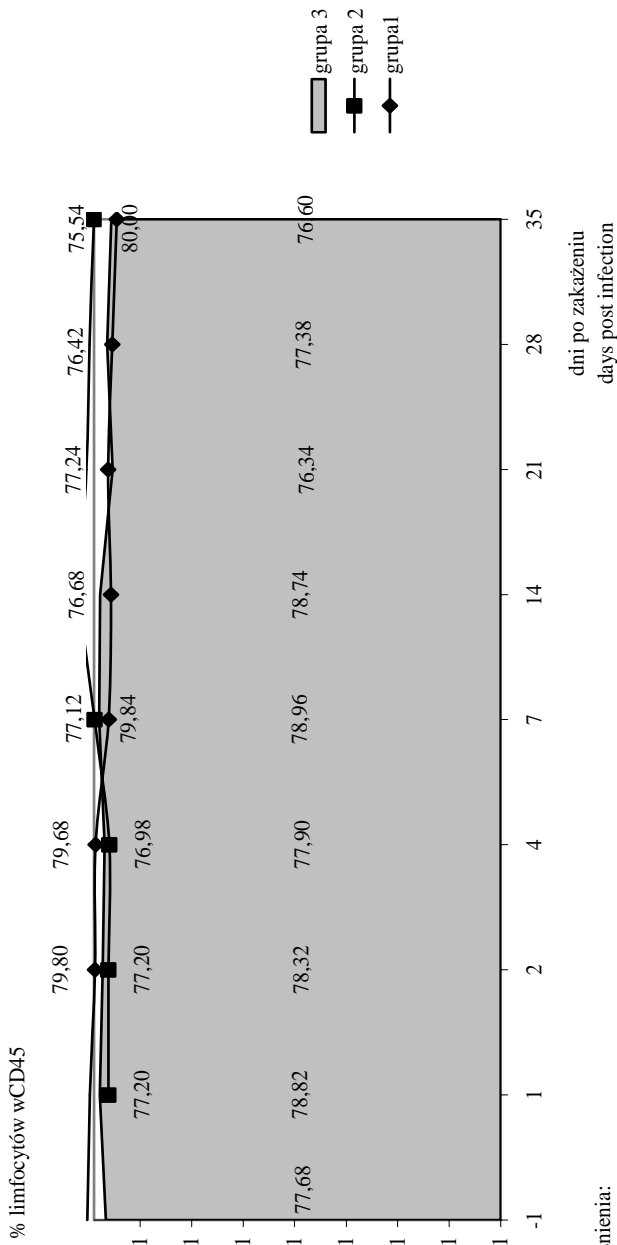
3.1.3.4. Dynamika narastania mian przeciwciał u świń zakażonych różnymi szczepami wirusa BVD typ 1

3.1.3.4.1. Badanie mian przeciwciał świń zakażonych różnymi szczepami wirusa BVD typ 1 z użyciem szczepu NADL

W grupie prosiąt zakażonych mieszaniną szczepów NADL 2 i NADL8 wirusa BVD przeciwciała przeciwko BVDV o mianie 1:7,5 wykazano u dwóch zwierząt siódmego dnia po zakażeniu. Natomiast w 28 dniu po zakażeniu miano 1:5 wykazano u wszystkich zwierząt ($n=6$), po czym w 35 dniu miano to utrzymywało się na tym samym poziomie również u wszystkich zwierząt. Zakażenie szczepem V725 wirusa BVD powodowało wzrost miana przeciwciał przeciwko BVDV do 1:5 w czwartym dniu u jednego zwierzęcia. Natomiast w 28 dniu po zakażeniu miano u tego samego zwierzęcia wynosiło 1:40. U pięciu zwierząt w 28 i 35 dniu eksperymentu miano przeciwciał nie przekraczało 1:5. Z kolei miano przeciwciał po zakażeniu szczepem 5862/94 wirusa BVD u jednego zwierzęcia wynosiło 1:30 w 7 dniu po zakażeniu, a w 28 dniu u wszystkich zwierząt – 1:15. Miano przeciwciał przeciwko BVDV wynosiło 1:5 w 35 dniu obserwacji (tab. 3).

3.1.3.4.2. Badanie mian przeciwciał u świń zakażonych różnymi szczepami wirusa BVD typ 1 z użyciem szczepu 1726 98/Salza

Badanie z użyciem testowego szczepu 1726 98/Salza wirusa BVD w surowicach zwierząt zakażonych mieszaniną szczepów NADL2 i NADL8 wirusa BVD wykazało obecność przeciwciał przeciwko szczepowi 1726 98/Salza wirusa BVD już w 7 dniu po zakażeniu (1:7,5), po czym miano ich ulegało obniżeniu do wartości 1:5 w kolejnych etapach badań. W grupie zakażonej szczepem V725 wirusa BVD miano przeciwciał przeciwko szczepowi V725 wirusa BVD na poziomie 1:5 odnotowano dopiero 21 dnia po zakażeniu, zaś po zakażeniu szczepem 5862/94 wirusa BVD miano przeciwciał przeciwko szczepowi 5862/94 wirusa BVD - 1:5 stwierdzono w 28 dniu po zakażeniu (tab. 4).



Objaśnienia:

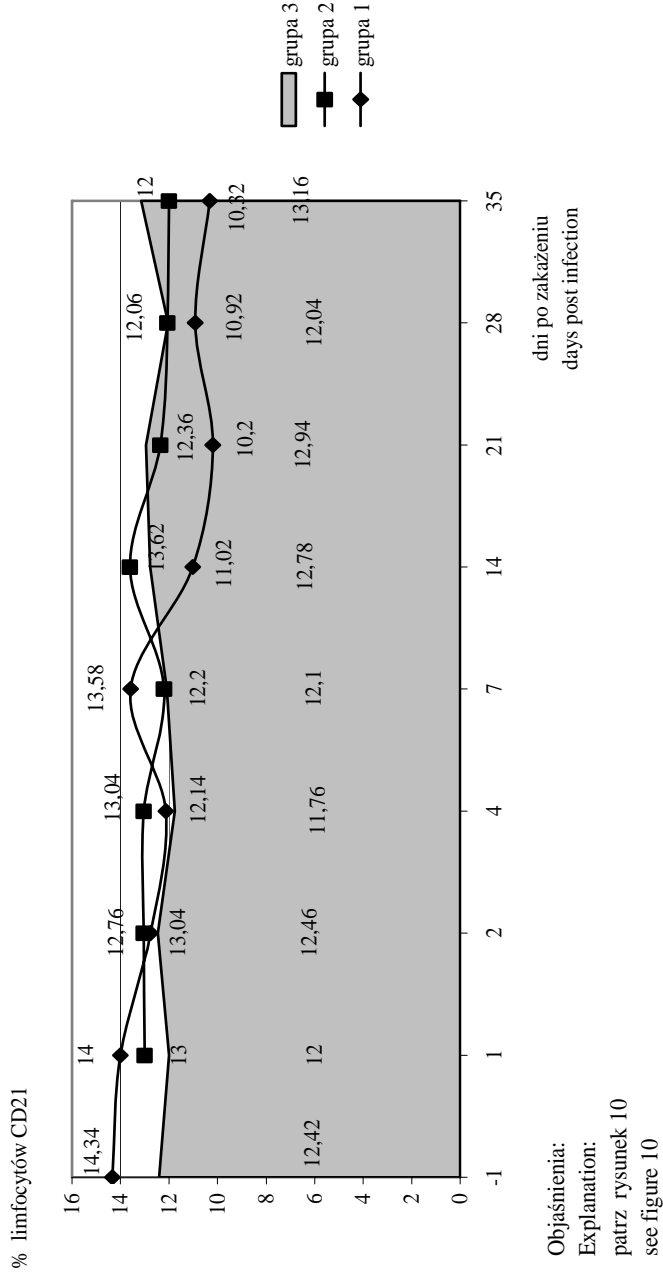
Explanation:

patrz rysunek 10

see figure 10

Rys. 38. Odsetek limfocytów T subpopulacji wCD45 we krwi obwodowej świń zakazanych szczepem 5862/84 wirusa BVD typ 1

Fig. 38. Percentage of lymphocytes T of the subpopulation wCD45 in peripheral blood in swine infected with the strain 5862/84 of the virus BVD type 1



Rys. 39. Odsetek limfocytów T subpopulacji CD21 we krwi obwodowej świń zakażonych szczepem 5862/84 wirusa BVD typ 1
 Fig. 39. Percentage of lymphocytes T of the subpopulation CD21 in peripheral blood in swine infected with the strain 5862/84 of the virus BVD type 1

Tabela 3
Table 3

Dynamika narastania przeciwciał u świń zakażonych różnymi szczepami wirusa BVD typ 1 z użyciem szczepu testowego NADL
The dynamics of accumulation of antibodies in swine infected with various strains of the virus BVD type 1 with use of the test strain NADL

Dni po zakażeniu Days after infection	Miano przeciwciał (liczba zwierząt z mianem przeciwciał/liczba zwierząt badanych) Titre of antibodies (a number of animals with a titre of antibodies/a number of tested animals)									
	Grupa doświadczalna Experimental group									
	Szczepy NADL2:NADL8 Strains NADL2:NADL8		Szczep V725 Strain V725		Szczep 5268/94 Strain 5268/94		Grupa kontrolna Control group			
	Liczba zwierząt A number of animals	Miano Titre	Liczba zwierząt A number of animals	Miano Titre	Liczba zwierząt A number of animals	Miano Titre	Liczba zwierząt A number of animals	Miano Titre	Liczba zwierząt A number of animals	Miano Titre
1	0 ¹⁾ /6 ²⁾	–	0/6	–	0/6	–	0/6	–	0/6	–
2	0/6	–	0/6	–	0/6	–	0/6	–	0/6	–
4	0/6	–	1/6	1:5	0/6	–	0/6	–	0/6	–
7	2/6	1:7,5	0/6	–	1/6	1:30	0/6	–	0/6	–
14	0/6	–	0/6	–	3/6	–	0/6	–	0/6	–
21	0/6	–	0/3	–	6/6	–	0/6	–	0/6	–
28	6/6	1:5	5/6	1:5	4/6	1:15	2/6	0/6	0/6	–
			1/6	1:40	2/6	1:30				
35	6/6	1:5	5/6	1:5		1:5	0/6		0/6	

Objaśnienia:

Explanation:

¹⁾ – liczba zwierząt, u których stwierdzono obecność przeciwciał
¹⁾ – a number of animals in which presence of antibodies was stated

²⁾ – liczba zwierząt w grupie

²⁾ – a number of animals in the group

Tabela 4
Table 4

Dynamika narastania przeciwciał u świń zakażonych różnymi szczepami wirusa BVD typ 1 użyciem szczepu testowego 1726 98/Salza
The dynamics of accumulation of antibodies in swine infected with various strains of the virus BVD type 1 with use of the test strain 1726 98/Salza

Dni po zakażeniu Days after infection	Miano przeciwciał (liczba zwierząt z mianem przeciwciał/liczba zwierząt badanych) Titre of antibodies (a number of animals with a titre of antibodies/a number of tested animals)													
	Grupa doświadczalna Experimental group					Grupa kontrolna Control group								
	Szczepy NADL2:NADL8 Strainis NADL2:NADL8		Szczep V725 Strain V725		Szczep 5268/94 Strain 5268/94		Liczba zwierząt A number of animals		Miano Titr		Liczba zwierząt A number of animals		Miano Titr	
1	Liczba zwierząt animals	Miano Titr	Liczba zwierząt animals	Miano Titr	Liczba zwierząt animals	Miano Titr	Liczba zwierząt animals	Miano Titr	Liczba zwierząt animals	Miano Titr	Liczba zwierząt animals	Miano Titr	Liczba zwierząt animals	Miano Titr
2	0 ^{1)/6²⁾}	-	0/6	-	0/6	-	0/6	-	0/6	-	0/6	-	0/6	-
4	0/6	-	0/6	-	0/6	-	0/6	-	0/6	-	0/6	-	0/6	-
7	2/6	1:7,5	0/6	-	0/6	-	0/6	-	0/6	-	0/6	-	0/6	-
14	2/6	1:5	0/6	-	0/6	-	0/6	-	0/6	-	0/6	-	0/6	-
21	2/6	1:5	2/6	1:5	6/6	1:5	6/6	1:5	6/6	1:5	6/6	1:5	6/6	1:5
28	2/6	1:5	2/6	1:5	6/6	1:5	6/6	1:5	6/6	1:5	6/6	1:5	6/6	1:5
35	2/6	1:5	2/6	1:5	2/6	1:5	2/6	1:5	2/6	1:5	2/6	1:5	2/6	1:5

Objaśnienia:

Explanation:

jak w tab. 3

As in the table 3

3.1.4. Omówienie wyników i dyskusja

Technikę immunofluorescencji zaczęto stosować w latach 70. ubiegłego wieku. Zastosowanie jej pozwoliło na wykazanie obecności komórek posiadających na swojej powierzchni receptory odpowiedzialne za przebieg reakcji odpornościowych. Spośród różnorodnych receptorów obecnych na powierzchni komórek szczególne znaczenie mają receptory subpopulacji limfocytów T. Ich ekspresja jest związana z regulującymi procesami proliferacji i różnicowania komórek (Jakóbiśiak, 1998b; Luney i Prescovitz, 1988; Rosenthal i wsp., 1987).

Nabywanie swoistych funkcji przez limfocyty T poprzedzone jest procesem dojrzewania i różnicowania komórek prekursorowych Lin⁻ (lineage negative). Efektem tego jest powstanie z multipotencjalnej komórki macierzystej potomnych komórek o określonych cechach fenotypowych z ekspresją obecnych na ich powierzchniach receptorów. Dalszy proces dojrzewania limfocytów T można podzielić na dwie fazy, z których pierwsza związana jest z ukierunkowanym rozwojem wczesnych tymocytów, rearanżacją genów TCR (γ , α , β) oraz podjęciem decyzji rozwojowej w kierunku linii $\alpha\beta$ i $\gamma\delta$. Limfocyty T $\alpha\beta$ stanowią najliczniejszą pulę limfocytów po urodzeniu, jednak limfocyty T $\gamma\delta$ są niezbędne do tworzenia efektywnych barier immunologicznych i traktowane są jako komórki o cechach pośrednich między limfocytami T i komórkami NK. We krwi obwodowej odsetek ich u człowieka stanowić może od 0,5% do 2–3%, a u świni do około 10% wszystkich limfocytów. Natomiast po zakończeniu drugiej fazy dojrzewania limfocyty T z receptorem CD4 i CD8 stanowią blisko 95% populacji dojrzałych limfocytów T (Bianchi i wsp., 1992; Binns i wsp., 1992, Davis i wsp., 1996; Jakóbiśiak, 1998a, Markowska-Daniel, 1999a; Sallmüller i wsp., 1989 i 1998).

Dynamika zmian w subpopulacji limfocytów T z receptorem CD4 i CD8 u ludzi i zwierząt opisywana jest w odniesieniu do zachowania się stosunku limfocytów T CD4:CD8 w organizmie zdrowym i chorym. U zdrowych świń limfocyty T CD4 stanowią około 25%, a CD8 – 40% populacji limfocytów, zatem stosunek limfocytów T CD4:CD8 wynosi 0,6. Z kolei u zdrowych ludzi stosunek ten wynosi 1,5–2,0 i może wahać się od 0,5 do 7,0.

Zmiany aktywności limfocytów T po zakażeniu różnymi szczepami wirusa BVD prezentowano w wielu pracach doświadczalnych, a dotyczyły one w całości jednego gatunku – bydła. Zmiany w aktywności limfocytów u pięciomiesięcznych cieląt trwale zakażonych i nadkażonych szczepem ncp BVDV przedstawili Lieber i wsp. (1995). Autorzy ci wykazali zmiany u zwierząt z formą MD BVDV, które odnosiły się do spadku średniej liczby limfocytów B w kępkach Peyera oraz obniżenie poziomu IgM, IgA i średniej liczby limfocytów T subpopulacji CD4 i CD8 w 1 mm² tkanki limfatycznej kępek Peyera jelita grubego u cieląt z postacią MD. Znacznej redukcji uległy te parametry także w kępkach Peyera jelita biodrowego. Podobnie zmianie uległa średnia liczba limfocytów T na powierzchni kępek, co ujawniało się wzrostem bezwzględnej liczby subpopulacji limfocytów T CD4 i brakiem zmian w odsetku subpopulacji limfocytów T CD8 w odniesieniu do grupy kontrolnej. Tym samym nie jest prawdziwa hipoteza, że wzrost limfocytów T subpopulacji CD4 i CD8 jest powodem uszkodzenia komórek. Natomiast

destrukcja GALT prowadzi nie tylko do zniszczenia bariery ochronnej jelita, ale także do redukcji aktywności komórek efektorowych na błonie śluzowej.

Zakażenie donosowe dziewięciomiesięcznych cieląt szczepem ncp NY-1 wirusa BVD prowadziło do spadku ogólnej liczby krążących limfocytów, w tym także limfocytów T CD4 i CD8 oraz limfocytów B i neutrofilów. Nie obserwowano natomiast zmian w odsetku limfocytów nie-T i nie-B oraz monocytów. Z kolei równoczesne podanie donosowe inaktywowanego szczepu BVDV i szczepienie domięśniowe przeciwko wirusowi BVD nie powodowało zmian w odsetku krążących limfocytów. Jedynie odnotowano zmiany w stosunku limfocytów T CD4:CD8 i wzroście odsetka komórek z MHC klasy II (Ellis i wsp., 1988). Również wzrost ekspresji komórek z MHC klasy II obserwowano po zakażeniu jednodniowych cieląt szczepami ncp 7937 i 126 BVDV. Zmiany te odnotowano w 3 dniu u cieląt zakażonych szczepem ncp 7937 BVDV i w 10 dniu po zakażeniu szczepem 126 BVDV. Po zakażeniu szczepem 126 wirusa BVDV odnotowano spadek odsetka limfocytów T CD2, co wskazuje na tropizm BVDV do tych komórek i działanie immunosupresyjne, a także predyspozycję do innych zakażeń (Marshall i wsp. 1994). Welsh i wsp. (1994) po zakażeniu donosowym szczepem cp BVDV izolowanym od cieląt w przebiegu pneumonii na tle zakażenia BVDV obserwowali nieznaczny wzrost aktywności makrofagów płucnych do 2 dnia p.i., a następnie spadek od 4 dnia p.i. Jednakże redukcja aktywności fagocytarnej makrofagów płucnych była różna u każdego z zakażonych zwierząt i utrzymywała się u nielicznych zwierząt do 21 dnia p.i. Powyższe badania oraz badania Lopez i wsp. (1986) wskazują na brak istotnych zmian w stosunku granulocyty:makrofagi płucne po zakażeniu wirusem BVD. Natomiast w przebiegu zakażenia HRSV, BHV-1 i PI-3 obserwowane były zamiany w stosunku granulocyty obojętnochłonne:makrofagi (Brown i Ananaba, 1988; Krilov i wsp., 1987).

Po zakażeniu dooskrzelowym cieląt szczepem cp Singer 1 BVDV obserwowano do 10 dnia p.i. ponad 200-krotny wzrost odsetka limfocytów T z receptorem CD4 i CD8 oraz ponad 70-krotny ich wzrost od wartości wyjściowej w obszarze BALT, w ciągu 4 dni od ponownego zakażenia BVDV, tj. po 35 dniach od pierwszego kontaktu limfocytów z wirusem. Odsetek limfocytów T z receptorem $\gamma\delta$ wzrósł ponad 100-krotnie w ciągu 7 dni p.i. i pozostawał na 10-krotnie wyższym poziomie niż przed zakażeniem do zakończenia obserwacji. Odsetek limfocytów wykazujących ekspresję antygenów CD4 i CD8 wzrósł odpowiednio 300- i 150-krotnie do 10 dnia p.i. oraz 100- i 50-krotnie do 4 dnia p.i. Z kolei profil limfocytów T CD45RO⁺/CD45R⁻ charakteryzował się brakiem istotnych zmian (Silflow i wsp., 2005).

Zmiany w obrazie krwi obwodowej i ekspresji receptorów powierzchniowych limfocytów T obserwowano także u cieląt po zakażeniu niecytotatycznym szczepem 24515 BVDV. U wszystkich zwierząt zakażonych wykazano zmiany statystycznie istotne wśród leukocytów krwi obwodowej ($p < 0.05$ dla neutrofilów, $p < 0.01$ dla limfocytów oraz $p < 0.001$ dla monocytów) od 3–5 dnia p.i. i utrzymujących się do 12 dnia p.i. (Archambau i wsp., 2000). Także Ellis i wsp. (1988) po zakażeniu cieląt wirusem BVD wykazali leukopenię i spadek odsetka subpopulacji limfocytów T CD4 i CD8 oraz limfocytów B i neutrofilów. Stosunek limfocytów T CD4:CD8 w przebiegu obserwacji wahał się od 2:3 do 5:4 w dniu jej zakończenia. Podobne zmiany w odsetku limfocytów T CD8 obserwował Summerfield i wsp. (1998b). Pauly i wsp. (1998) wykazał zbliżone zmiany w populacji limfocytów T po zakażeniu wirusem CSF, jednakże występowały one

z około 2-tygodniowym opóźnieniem. Z danych przedstawionych przez Corthier (1978), Pauly i wsp. (1998) i Markowską-Daniel (1999b) wynika, że po zakażeniu wirusem CSF dochodzi do deplecji podwójnie ujemnych limfocytów T CD4-CD8- i zaburzeń dojrzewania limfocytów T w grasicy. Tym samym zachwiana zostaje migracja tych komórek do tkanek i w dalszej konsekwencji brak odpowiedzi humoralnej. Największe zmiany odnotowano po zakażeniu drogą donosową, zbliżoną do naturalnej, a obserwowane zmiany wydają się być zależne od zjadliwości szczepu CSFV użytego do zakażenia. Sytuację taką obserwowano określając odsetek limfocytów T z receptorem CD2, który jest uważany za główny marker na powierzchni limfocytów u świń, obecny na powierzchni około 65–70% wszystkich limfocytów T. W prezentowanych badaniach, po 72 godzinach od zakażenia CSFV odsetek tej populacji limfocytów T spadł o około 40% i nie powrócił do wartości wyjściowej do zakończenia obserwacji. Natomiast po zakażeniu szczepami zjadliwymi notowano spadek odsetka limfocytów z markerem powierzchniowym CD2. Także odsetek limfocytów B z receptorem CD19 ulegał zmniejszeniu od 9 godz. po zakażeniu do końca obserwacji. Natomiast po zakażeniu szczepem szczepionkowym następował wzrost odsetka limfocytów B. Zbliżone wyniki uzyskali Susa i wsp. (1992), gdzie po zakażeniu szczepem Alfort CSFV wykazano leukopenię oraz deplecję limfocytów B we krwi obwodowej oraz tkance limfatycznej. Natomiast po zakażeniu świń atenuowanym szczepem Alfort-187 CSFV odnotowano wzrost liczby leukocytów od 24 godz. p.i., zaś po zakażeniu szczepem Washington CSFV od 48 godz. po zakażeniu notowano leukopenię, która pogłębiała się do 11 dnia. Średnia liczba leukocytów uległa obniżeniu blisko o 50%. Opisana dynamika zmian uważana jest za typową dla zakażenia CSFV i związana jest z bezpośrednim działaniem wirusa na tkankę limfatyczną, gdzie zakażeniu ulegają limfocyty B, limfocyty T subpopulacji CD4 i CD8 oraz monocyty (Bruschke i wsp., 1997; Narita i wsp., 1996; Summerfield i wsp., 1998a).

Różnice w pobudzeniu układu immunologicznego zwierząt zakażonych swoistymi i nieswoistymi patogenami związane są ze wzrostem lub spadkiem aktywności limfocytów. Badania limfocytów izolowanych od świń zakażonych wirusem CSF wykazywały znaczący spadek aktywności zarówno limfocytów B, jak i T. Ten brak odpowiedzi obserwowano w ciągu pierwszych 3–5 dni p.i., a w dalszym czasie notowano tylko różnice fenotypowe w subpopulacjach limfocytów T (Rouse i Horohov, 1986). Zakażenie loch wirusem PRRS w 98 dniu ciąży prowadziło w ciągu pierwszych 7 dni życia prosiąt do spadku odsetka limfocytów T z 60% całkowitej liczby leukocytów w dniu urodzenia do 42% w 7 dniu p.i. Spadkowi limfocytów towarzyszył wzrost odsetka limfocytów T CD4 z 41% do 46%. Dynamika ta utrzymywała się do zakończenia obserwacji. W grupie kontrolnej odnotowano spadek tej subpopulacji z 41% do 29%. Natomiast swoiste limfocyty T CD8 pojawiły się u zakażonych prosiąt dopiero w 7 dniu po urodzeniu, a wzrost ich utrzymywał się do zakończenia obserwacji. Efektem powstałych zmian była zmiana stosunku limfocytów T z receptorem CD4 i CD8 u zwierząt zakażonych wirusem PRRS z 2,2:1 do 1,5:1 i 1,4:1 odpowiednio w dniu urodzenia oraz w 7 i 14 dniu życia. Stosunek ten u zwierząt zdrowych w tym samym czasie wynosił odpowiednio 0,5, 0,4 i 0,1.

Śródmaciczne zakażenie prosiąt powoduje zanik grasicy i deplecję tymocytów (Wen-hai i wsp., 2002). Shimzu i wsp. (1996) po zakażeniu doświadczalnym świń wirusem PRRS wykazali limfopenię, spadek odsetka limfocytów T, w tym subpopulacji limfocytów T o funkcji indukująco-wspomagającej (CD4) do 14 dnia p.i. Natomiast po

zakażeniu naturalnym odnotowali wzrost odsetka limfocytów T supresorowych (CD8) i spadek odsetka limfocytów T pomocniczych (CD4).

Z kolei mieszane zakażenie wirusem BVD i *Mannheimia haemolytica* powoduje u zwierząt zakażonych znaczący spadek liczby leukocytów i limfocytów, osiągając najniższy poziom wśród wszystkich badanych grup. Także odsetek limfocytów T z receptorami CD4, CD8 i wCD1 uzyskał najniższy poziom wśród grup objętych obserwacją. W grupie zwierząt zakażonych wirusem BVD obserwowano spadek ogólnej liczby leukocytów, odsetka neutrofilii i limfocytów. Natomiast w grupie zwierząt zakażonych *Mannheimia haemolytica* odnotowano wzrost liczby leukocytów i odsetka neutrofilów (Ganheim i wsp., 2005).

Rozpoznanie zakażenia wirusem BVD metodami serologicznymi może być utrudnione ze względu na dużą zmienność szczepów tego wirusa. Sytuację taką odnotowali Pellerin i wsp. (1994) określając miano przeciwciał przeciwko BVDV, wykorzystując test seroneutralizacji z użyciem genotypowo swoistych przeciwciał, gdzie uzyskał on od 5 do 65 razy niższe miano przeciwciał dla szczepów heterologicznych w porównaniu do szczepów homologicznych tego wirusa. Na ten fakt zwracają uwagę Depner i wsp. (1994) oraz Lipowski (1999c), wskazując na trudności w wykryciu zakażenia świń wirusem CSF, u których poziom przeciwciał odpornościowych jest niski. Tym samym diagnostyka zakażenia świń CSFV ze względu na niskie poziomy przeciwciał w surowicy krwi i krótkotrwałe, często nieswoiste objawy kliniczne wymaga użycia testu o wysokiej czułości, jak SNT, przewyższającego pod względem czułości test ELISA. Także w odniesieniu do wczesnego wykrycia zakażenia wirusem CSF w stadzie diagnostyka serologiczna jest zwykle utrudniona w pierwszych dwóch tygodniach po zakażeniu. Zwykle użycie czułych metod diagnostycznych jest zarazem czasochłonne, jak: izolacja wirusa, IFA, IPMA ograniczają szybkość rozpoznania zakażenia. Również zastosowanie powszechnie wykorzystywanych technik diagnostycznych w przypadku zakażeń świń słabo wirulentnymi szczepami wirusa, dającymi obraz zakażeń atypowych, stwarza trudności w rozpoznaniu (Kaaften i wsp., 1997).

Istotna jest również dawka wirusa, po podaniu której następuje reakcja organizmu na podany antygen. Walz i wsp. (1999) określili dawkę dla prosiąt w wieku 2 m-cy, powodującą skuteczne zakażenie zarówno typem I, jak i II wirusa BVD. Brak objawów klinicznych oraz wzrost w.c.c. obserwowano po podaniu dawki 10^5 TCID₅₀·ml⁻¹ dla genotypu I i 10^7 TCID₅₀·ml⁻¹ dla genotypu II. Natomiast wiremię i wysoki stężenie swoistych przeciwciał obserwowano u cieląt przy zakażeniu dawką 10^6 TCID₅₀·ml⁻¹ zarówno dla genotypu I, jak i II. Z kolei zdecydowanie niższe dawki wirusa powodowały wiremię i zakażenie płodu u ciężarnych krów – 10^2 TCID₅₀·ml⁻¹ dla genotypu I i 10^1 TCID₅₀·ml⁻¹ dla genotypu II. Cielęta z wysokim stężeniem przeciwciał nie wykazywały objawów klinicznych po zakażeniu wirusem BVD między 2–5 tygodniem życia (Ficken i wsp., 1995). Po zakażeniu donosowym wirusem BVD odpowiedź immunologiczna charakteryzowała się wzrostem poziomu przeciwciał swoistych przeciwko BVDV w wypłuczynach pęcherzykowo-oskrzelowych płuc. Natomiast ponowne zakażenie po 35 dniach od pierwszego kontaktu z antygenem powodowało silny wzrost IgA, IgG już po 4 dniach p.i. w płynie pozyskanym z oskrzeli. Reakcja komórek układu odpornościowego wskazuje na aktywny proces oczyszczania układu z wirusa i aktywowanie produkcji swoistych

przeciwciał oraz limfocytów T, połączonych z szybkim usunięciem wirusa po ponownym kontakcie (Silflow i wsp., 2005).

3.1.5. Wnioski

1. Zakażenie donosowe i kontaktowe świń szczepami NADL2:NADL8, V725 i 5862/84 wirusa BVD typ 1 nie prowadziło do wystąpienia objawów chorobowych zarówno u zwierząt zakażonych donosowo, jak i w wyniku kontaktu.
2. Efektem zakażenia donosowego i kontaktowego świń trzema szczepami wirusa BVD typ 1 był spadek odsetka leukocytów krwi obwodowej. Statystycznie istotne zmiany wystąpiły u zwierząt zakażonych szczepami NADL2:NADL8 i V725 wirusa BVD.
3. U świń zakażonych donosowo i kontaktowo szczepami NADL2:NADL8 i V725 wirusa BVD typ 1 następował spadek odsetka limfocytów T z receptorem CD4 i CD8, zaś u zwierząt zakażonych szczepem 5862/84 wirusa BVD typ 1 odnotowano wzrost odsetka limfocytów T z receptorem CD4 i spadek odsetka limfocytów T z receptorem CD8.
4. Miana swoistych przeciwciał przeciwko BVDV po zakażeniu szczepami NADL2:NADL8, V725 i 5862/84 wirusa BVD typ 1 były zróżnicowane osobniczo w kolejnych terminach badań i wynosiły od 1:5 do 1:7,5 dla szczepu NADL2:NADL8 i od 1:5 do 1:40 dla szczepu V725 oraz 1:15 - 1:30 dla szczepu 5862/84 wirusa BVD typ 1.

3.2. Część II. Wykrywanie antygenu pan-pestiwirusowego u świń

3.2.1. Materiał i metody

3.2.1.1. Zwierzęta

Do badań użyto prosięta, które pochodziły od macior wolnych i nieszczepionych przeciwko CSF. Lochy, od których prosięta miały być przeznaczone do eksperymentu, prosiły się w porodówkach, gdzie przebywały wraz z prosiętami do momentu odsadzenia. W dniu odsadzenia 9 prosiąt oddzielono od matki i podzielono je na dwie grupy. Grupę doświadczalną stanowiło 6 sztuk, a grupę kontrolną 3 sztuki. Dalsze postępowanie z prosiętami, żywienie oraz pojenie zwierząt było identyczne jak w pierwszym etapie badań.

Przed rozpoczęciem eksperymentu zwierzęta badane były w kierunku obecności antygenu i przeciwciał pestiwirusowych przy użyciu testu ELISA (CHEKIT-BVD-virus i CHEKIT-BVD-sero) (Dr Bommeli AG, Szwajcaria).

3.2.1.2. Szczepy wirusa BVD użyte do badań

Do zakażenia wykorzystano mieszaninę dwóch szczepów laboratoryjnych NAD-L2 i NADL8 wirusa BVD, które otrzymano z Zakładu Wirusologii PIW-PIB w Puławach. Do utrzymania hodowli wirusa wykorzystano ustaloną linię MDBK zawieszoną w płynie Eagle'a (IiITD, Wrocław) z dodatkiem gentamycyny ($50 \mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$) i 10% FCS wolnej od BVDV i mykoplazm (CLV Weybridge, W. Brytania). Hodowlę utrzymywano w standardowych warunkach (temperatura 37°C i 5% dodatek CO_2). Po uzyskaniu efektu cytopatycznego powyżej 90%, co następowało po 72 godz., hodowlę trypsynizowano i wirus zbierano wraz z komórkami, a następnie wykonywano mianowanie metodą Reeda-Muencha (Larski, 1992).

Mieszaninę szczepów w dawce $104,5 \text{ TCID}_{50}\cdot\text{ml}^{-1}$ wirusa BVD podawano prosiętom w wieku 12 tygodni donosowo w ilości 2 ml, po 1 ml zawiesiny do każdego otworu nosowego – grupa doświadczalna ($n=6$), po wcześniejszej aklimatyzacji w nowych warunkach. Grupa kontrolna licząca 3 zwierzęta w wieku 12 tygodni otrzymywała również donosowo *placebo* (0.7% NaCl), w sposób identyczny jak zwierzęta w grupie eksperymentalnej. Dawkę wirusa BVD użytą do zakażenia zwierząt ustalono na podstawie danych literaturowych podobnie jak w części pierwszej badań.

Do aplikacji wirusa BVD użyto strzykawek o pojemności 2 ml zakończonych atomizerem. Każdorazowo do zakażenia nowego zwierzęcia używano nowego zestawu.

3.2.1.3. Pobieranie prób do badań

Materiał do badań stanowiła krew pełna pobierana z *vena cava cranialis* od zwierząt zakażonych i niezakażonych do probówek S-Monovette EDTA- K_2 o pojemności 4.9 ml (Sarstedt, Niemcy) według harmonogramu: 24 godz. przed zakażeniem oraz po 24 i 48 godz. p.i., a następnie w 4, 7, 14, 21, 28 i 35 dniu p.i.

3.2.1.4. Badania kliniczne

Badania kliniczne w obu grupach zwierząt obejmowały rejestrację w.c.c. oraz masy ciała w dniach pobierania krwi do badań laboratoryjnych, tj. w 24 godz. przed zakażeniem oraz w 24 i 48 godz. p.i., a następnie w 4, 7, 14, 21, 28 i 35 dniu p.i.. Codziennie prowadzono oględziny zwierząt zwracając uwagę na wszelkie odlegające od normy reakcje zwierząt, tj.: kaszel, wypływ z nosa oraz wymioty i biegunkę.

3.2.1.5. Wykrywanie antygeny pan-pestiwirusowego testem ELISA

Dla wykazania obecności antygeny BVD wykorzystano technikę warstwową testu ELISA w zestawie CHEKIT-BVD-Virus (Dr Bommeli AG, Szwajcaria), w którym 96-basenikowa mikropłytką opłaszczona była swoistymi przeciwciałami „catching” dla białka NS2-3 wirusa BVD. Pomiar OD dokonywany był przy użyciu spektrofotometru Spectra II (SLT, Austria) przy długości fali 405 nm.

Wynik badania próby każdorazowo określano względem kontroli dodatniej, według wzoru:

$$\text{wartość próby (\%)} = \times 100\% \frac{\text{OD}_{\text{próby}} - \text{D}_{\text{kontrolni ujemnej}}}{\text{OD}_{\text{kontrolni dodatniej}} - \text{OD}_{\text{kontrolni ujemnej}}}$$

Wszystkie próby o wartościach poniżej 20% kontroli dodatniej uznawano za ujemne. Próby o wartościach powyżej 30% kontroli dodatniej uznawano za dodatnie. Natomiast próby o wartościach od 20 do 30% kontroli dodatniej uznawano za wątpliwe i były one powtarzane po 2–3 tygodniach od pierwszego badania.

3.2.1.6. Wykrywanie antygeny pan-pestiwirusowego metodą cytometrii przepływowej

W badaniach wykorzystano mysie przeciwciała monoklonalne WB 103/105 (CLV Weybridge, W. Brytania) przeciwko białku NS2-3.

Pobraną pełną krew poddawano lizie przy użyciu FACSLysing Solution (Becton Dickinson, USA). Uzyskany osad komórek płukano trzykrotnie w PBS z 1% dodatkiem 1% BSA. Natomiast kontrolę dodatnią stanowiła ustalona hodowla MDBK zakażona mieszaniną szczepów NADL2:NADL8 wirusa BVD o mianie $\text{TCID}_{50} = 10^{4.5} \text{ ml}^{-1}$, zaś kontrolą ujemną była niezakażona hodowla MDBK.

Badanie rozpoczynano od uzyskania $10^5/\mu\text{l}$ komórek w próbach badanych i próbach kontrolnych. Do próbki o objętości 150 μl , w której znajdowało się 10^5 leukocytów zawieszonych w PBS z 1% dodatkiem 1% BSA, dodawano 50 μl 40% roztworu PFA (Sigma, Niemcy). Po inkubacji przez 10 min w temperaturze 4 °C próbki odwirowywano przy 700 \times g przez 7 min w temperaturze pokojowej. Po inkubacji usuwano supernatant i próby ponownie inkubowano przez 5 min w temperaturze pokojowej z dodatkiem 100 μl 0,0025% roztworu digitoniny. Następnie dodawano 100 μl PBS bez $\text{Ca}^{+2}/\text{Mg}^{+2}$ z 1% BSA, po czym próbę ponownie wirowano i część płynną usuwano. Do tak przygotowanej próby dodawano 50 μl przeciwciała WB103/105 i inkubowano przez 30 min w komorze wilgotnej, po czym dwukrotnie płukano w PBS bez $\text{Ca}^{+2}/\text{Mg}^{+2}$ z 1% dodatkiem 1% BSA. W kolejnym etapie dodawano 50 μl kozich-anty-mysich IgG znakowanych FITC (Alexa^{TM488} Molecular Probes, Niemcy) i inkubowano przez 30 min w komorze wilgotnej bez dostępu światła. Dla uniknięcia możliwych reakcji krzyżowych drugie przeciwciała adsorbowano 10% FCS wolną od antygeny BVD (Bioclear, Niemcy). Po zakończeniu inkubacji z drugim przeciwciałem badane próby dwukrotnie płukano w PBS bez $\text{Ca}^{+2}/\text{Mg}^{+2}$ z 1% dodatkiem 1% BSA i zawieszano w 200 μl 2% PFA (Sigma, Niemcy). Na 10 minut przed zbieraniem komórek dodawano 50 μl jodku propidyny (Sigma, Niemcy) o koncentracji 0,1 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Analizę wykonano przy użyciu cytometru przepływowego FACS Calibur (Becton Dickinson, USA) i programu CellQuestTM (wersja 3.1) z szybkością odczytu 400 komórek/s. Rejestrację wykonano dla pierwszych 10000 komórek, którą przedstawiono w postaci histogramu we wzmacnieniu logarytmicznym. Swoisty sygnał obecności antygeny pestiwirusowego widoczny był w postaci fluorescencji w kanale 1 (FL1).

3.2.2. Wyniki

3.2.2.1. Stan kliniczny zwierząt

Podczas prowadzonej codziennej obserwacji zwierząt w grupie eksperymentalnej i grupie kontrolnej nie odnotowano zmian chorobowych.

W.c.c. prosiąt zakażonych wahała się od 37.0 °C do 38.2 °C, przy czym nie odnotowano jej wzrostu w kolejnych dniach po zakażeniu. Podobnie w grupie kontrolnej w.c.c. w kolejnych terminach obserwacji wynosiła od 37.0 °C do 38.5 °C (tab. 5).

Średnia masa ciała zwierząt w grupie eksperymentalnej określana w 24 godz. przed zakażeniem wynosiła 9.6 kg, a w grupie kontrolnej 9.3 kg. W dniu zakończenia obserwacji średnia masa ciała świń w grupie eksperymentalnej i kontrolnej wynosiła odpowiednio 24,3 kg i 25 kg. Średni dzienny przyrost masy ciała w grupie eksperymentalnej wynosił 420 g, a w grupie kontrolnej 450 g (tab. 6).

Tabela 5

Table 5

W.c.c. świń zakażonych szczepem NADL wirusa BVD typ 1

Internal body temperature of swine infected with the strain NADL of the virus BVD type 1 (add)

Dni po zakażeniu Days after infection	Średnia wewnętrzna ciepłota ciała świń (°C) Average internal warmth of swine body (in °C)	
	Szczepy NADL2:NADL8 Strains NADL2:NADL8	Grupa kontrolna Control group
1	37,8	38,1
2	37,7	37,9
4	38,2	38,4
7	38,2	37,9
14	37,9	37,6
21	37,0	37,2
28	37,6	37,0
35	38,1	38,5

Masa ciała świń zakażonych szczepem NADL wirusa BVD typ 1
Body mass of swine infected with the strain NADL of the virus BVD type 1

Dni po zakażeniu Days after infection	Masa ciała świń (kg) Body mass of swine (kg)	
	Szczepy NADL2:NADL8 Strains NADL2:NADL8	Grupa kontrolna Control group
1	9,6	9,3
2	9,6	9,4
4	10,5	10,8
7	12,8	11,4
14	15,3	15,1
21	18,3	19,8
28	22,3	23,0
35	24,3	25,0

3.2.2.2. Wyniki badań krwi świń na obecność wirusa BVD testem ELISA i metodą cytometrii przepływowej

Wyniki badań uzyskanych przy zastosowaniu testu ELISA i cytometru przepływowego przedstawiono w tabeli 7.

Wartość OD kontroli dodatniej w teście ELISA wynosiła 0,596, a kontroli ujemnej 0,225, zatem na podstawie wyliczenia ze wzoru przedstawionego w punkcie 3.2.1.5. Uzyskane wartości OD, które były powyżej 0,340, kwalifikowano jako wynik dodatni, wartości OD od 0,297 do 0,340 oceniano jako wynik wątpliwy, zaś próby poniżej OD 0,297 uznawano za ujemne.

Ocena stopnia fluorescencji badanych prób z zastosowaniem cytometrii przepływowej w kolejnych punktach poboru była zawsze wykonywana w odniesieniu do kontroli dodatniej i kontroli ujemnej. Średnia wartość intensywności fluorescencji dla 10000 leukocytów wynosiła w przypadku kontroli dodatniej 39,4%, natomiast średnia wartość fluorescencji kontroli ujemnej liczona dla tej samej liczby komórek mieściła się w przedziale od 2,8 do 2,9%.

Średni odsetek komórek krwi wykazujących fluorescencję uzyskanych od zwierząt zakażonych BVDV liczony w populacji leukocytów wynosił po 24 godzinach od zakażenia – 61,1%, w 48 godzinie – 66,3%, a następnie w 4 dniu – 67,0%, 7 dniu – 64,9%, 14 dniu – 64,4%, 21 dniu – 63,6%, 28 dniu – 56,2% i w 35 dniu 35 – 60,3% (tab. 8).

Rozkład wielkości (FSC) i ziarnistości (SSC) leukocytów krwi obwodowej świń uzyskany po lizie erytrocytów w próbach badanych i kontrolnych przedstawiono na rysunkach 40–42.

Porównanie wyników testu ELISA i analizy cytometrycznej w badaniu krwi świni zakażonych wirusem BVD typ 1
Comparison of the results of ELISA test and cytometric analysis in the blood test of swine infected with the virus BVD type 1

Dni po zakażeniu Days after infection	Technika diagnostyczna Diagnostic technique					
	Test ELISA ELISA test			Cytometr przepływowy Flow cytometer		
	Grupa doświadczalna Experimental group	Grupa kontrolna Control group	Grupa doświadczalna Experimental group	Grupa doświadczalna Experimental group	Grupa kontrolna Control group	Grupa kontrolna Control group
1	1/3/6 ¹⁾	0/0/3 ¹⁾	6/6 ²⁾	6/6 ²⁾	0/3 ²⁾	0/3 ²⁾
2	2/3/6	0/0/3	6/6 ²⁾	6/6 ²⁾	0/3	0/3
4	4/0/6	0/0/3	6/6 ²⁾	6/6 ²⁾	0/3	0/3
7	2/3/6	0/0/3	6/6 ²⁾	6/6 ²⁾	0/3	0/3
14	1/2/6	0/0/3	6/6 ²⁾	6/6 ²⁾	0/3	0/3
21	2/1/6	0/0/3	6/6 ²⁾	6/6 ²⁾	0/3	0/3
28	3/0/6	0/0/3	6/6 ²⁾	6/6 ²⁾	0/3	0/3
35	2/1/6	0/0/3	6/6 ²⁾	6/6 ²⁾	0/3	0/3

Objaśnienia:

Explanation:

1) – test ELISA, wynik dodatni/wątpliwy/liczba badanych prób

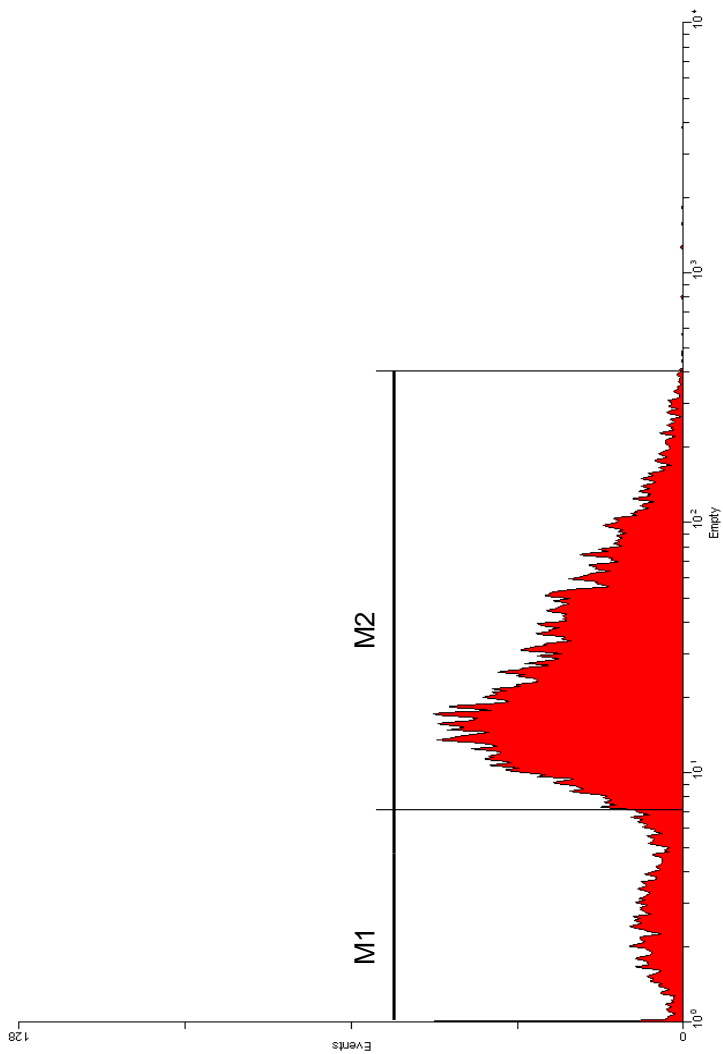
1) – ELISA test, positive result /questionable result/a number of tested samples

2) – cytometr przepływowy, wynik dodatni / liczba badanych prób

2) – flow cytometer, positive result / a number of tested samples

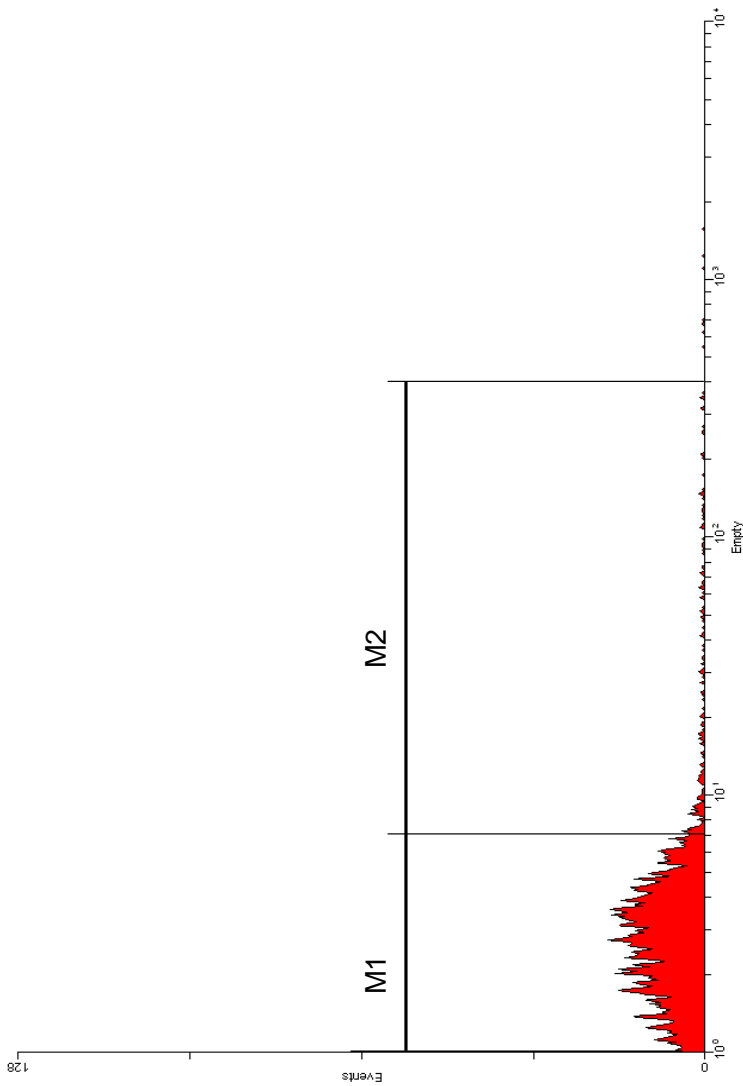
Odsetek komórek wykazujących świecenie – liczonych w całej populacji leukocytów krwi obwodowej świń po zakażeniu wirusem BVD typ 1
 Percentage of cells demonstrating luminescence – calculated in the whole population of leucocytes of peripheral blood of swine after infection with the virus BVD type 1

Dni po zakażeniu Days after infection	Odsetek komórek wykazujących świecenie (%) Percentage of cells demonstrating luminescence (%)		
	Grupa doświadczalna Experimental group	Grupa kontrolna – dodatnia Control group – positive	Grupa kontrolna – ujemna Control group – negative
1	59.2 – 63.5 (61.1)	39.4	2.88 – 2.93
2	60.4 – 72.7 (66.3)		
4	60.3 – 73.2 (67.0)		
7	62.1 – 67.0 (64.9)		
14	62.5 – 66.1 (64.4)		
21	58.6 – 73.2 (63.6)		
28	49.8 – 60.3 (56.2)		
35	59.4 – 64.1 (60.3)		



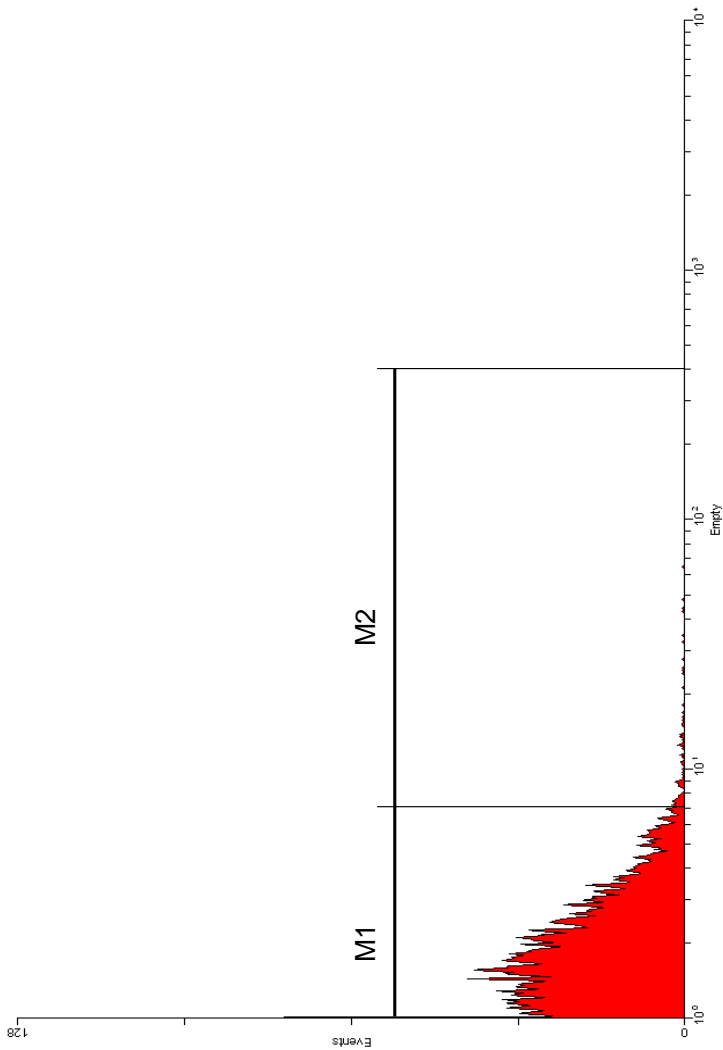
Objaśnienia:
 M1 – autofluorescencja
 M2 – fluorescencja wzbudzona

Rys. 40. Wykres przykładowej intensywności fluorescencji antygenu BVD w leukocytach krwi obwodowej świń zakażonych mieszaniną szczepów NADL2 i NADL8 wirusa BVD typ 1
 Fig. 40. Diagram of example intensity of fluorescence of the antigen BVD in leucocytes of peripheral blood in swine infected with the mixture of strains NADL2 and NADL8 of the virus BVD type 1



Objaśnienia:
patrz rys. 40

Rys. 41. Wykres przykładowej intensywności fluorescencji w leukocytach krwi obwodowej świń nie zakażonych mieszaną szczepów NADL2 i NADL8 wirusa BVD typ 1
 Fig. 41. Diagram of example intensity of fluorescence in leucocytes of peripheral blood in swine not infected with the mixture of strains NADL2 and NADL8 of the virus BVD type 1



Objaśnienia:
patrz rys. 40

Rys. 42. Wykres przykładowej autofluorescencji w leukocytach krwi obwodowej świń nie zakażonych mieszaną szczepów NADL2 i NADL8 wirusa BVD typ 1
Fig. 42. Diagram of example auto-fluorescence in leucocytes of peripheral blood in swine not infected with the mixture of strains NADL2 and NADL8 of the virus BVD type 1

3.2.3. Omówienie wyników i dyskusja

W przeprowadzonych badaniach własnych nie wykazano u świń objawów chorobowych w przebiegu zakażenia wirusem BVD. Objawy kliniczne będące wynikiem zakażenia wirusem BVD są niejednokrotnie trudne do wykazania, gdyż czas ich trwania i brak cech charakterystycznych zwykle nie stanowią podstawy do postawienia rozpoznania choroby. Obserwowane zmiany chorobowe są zwykle kojarzone z warunkami środowiskowymi i nagłą zmianą żywienia (Liess, 1967; Trepstra, 1987). W epizootologii tych zakażeń szczególnie istotna jest obecność bezobjawowych nosicieli wirusa BVD w populacji trzody chlewnej, co jest problemem diagnostycznym (Pejsak, 1995; Terpstra, 1988b). Również przynależność gatunkowa oraz wysoki stopień podobieństwa sekwencji nukleotydydowych i aminokwasów sięgający 65%, a nawet 85% oraz obecność wspólnych epitopów dla tej grupy wirusów w białku NS2-3 oraz białku E2 powodują trudności w ich diagnozowaniu (van Oirschot, 1994; Westergaard, 1996).

Pierwszy test do przyżyciowego wykrywania obecności wirusa BVD u zakażonego bydła przedstawili Shannon i wsp. (1991). Materiał do badań stanowiła krew obwodowa, a zastosowaną techniką diagnostyczną był test ELISA. Także prace Crevat i wsp. (1994) oraz Thilbaut i Crevat (1994) miały na celu przystosowanie testu ELISA do rutynowych badań w kierunku obecności antygeny BVDV.

Zwykle materiałem diagnostycznym, w którym poszukiwano antygeny wirusowego, była pełna krew lub leukocyty. Lipowski (1999b) dla wykazania obecności CSFV wykorzystał mrożoną krew pełną i skrzep krwi. Zastosowanie powyższych materiałów do badań diagnostycznych przy wykorzystaniu dostępnych technik badawczych pozwalało na wykrycie we krwi zwierząt zakażonych donosowo lub domięśniowo antygeny CSFV od 2 do 9 dnia p.i. (Depner, 1996; Shannon, 1993). Natomiast u warchlaków zakażonych przez kontakt wykazano obecność CSFV między 4 a 16 dniem p.i. Podobnie Lipowski (1999a) oraz Koenen i Lefebvre (1995) wykazali obecność CSFV między 2 a 16 dniem p.i. Dahle i wsp. (1993) po zakażeniu donosowym pięciu grup świń (po odsadzeniu) szczepem OSLOSS/2482 BVDV, a następnie nadkażeniu szczepem Alfort 187 CSFV wykazali obecność BVDV w 20 dniu p.i. w węzłach chłonnych, migdałkach i śledzionie. Natomiast nie wykazano obecności wirusa w nerce. Wykonane w tym samym czasie badanie FAT w kierunku obecności CSFV wykazało jego obecność w tych samych narządach co wirusa BVD. Wcześniej CSFV izolowano z leukocytów krwi obwodowej między 4 a 6 dniem p.i. Przy tym różne techniki diagnostyczne pozwalały na wykrycie antygeny wirusowego o 1 do 4 dni później niż metodą uznaną za złoty standard - hodowlą komórkową (De Mia, 1994; Depner 1995, Shannon, 1993). Należy jednak podkreślić, że test ELISA wykrywający przyżyciowo antygen w pełnej krwi czy leukocytach pozwolił na skrócenie czasu badania oraz uproszczenie procedury postępowania. Stąd też test ELISA znajduje nadal powszechne zastosowanie w rozpoznawaniu zakażeń pestiwirusowych, w tym także zakażeń wirusem CSF u trzody chlewnej i BVD u bydła (Shannon i wsp., 1993; Thibault i Crevat, 1994).

Prezentowane wyniki możliwości wykazania CSFV u chorych zwierząt wykazują duże rozbieżności, co jest wynikiem korelacji między okresem gorączkowym a wiremiami i obecnością wirusa we krwi (Smith i wsp., 1997; Pinychon i wsp., 1994) lub różnicami w

procedurach prowadzenia badań (Depner i wsp., 1995). Niezależnie jednak od tych rozbieżności materiałem diagnostycznym o najwyższej przydatności zarówno u bydła, jak i trzody chlewnej są leukocyty krwi (De Mia, 1994; Depner, 1995; Shannon, 1993).

Do diagnostyki zakażeń BVDV metodę cytometrii przepływowej wykorzystali Quist i wsp. (1990, 1991). Cytowani autorzy wykorzystali do tych badań krew obwodową zakażonych cieląt oraz przystosowali tę technikę do rutynowej diagnostyki trwałych zakażeń wirusem BVD. W badaniach tych wykorzystywano biotynylowane immunoglobuliny świńskie skierowane przeciwko wirusowi BVD, a obecność wirusa w komórkach krwi obwodowej trwale zakażonych zwierząt stwierdzano w 3-21% leukocytów na podstawie charakterystycznego wzbudzenia fluorescencji, której nie obserwowano w próbach kontrolnych. Podsumowaniem powyższych badań było stwierdzenie, iż technika cytometrii przepływowej jest bardziej czułą metodą rozpoznawania zwierząt trwale zakażonych niż izolacja wirusa w hodowli komórkowej.

Hübert i wsp. (1999) stosując różne techniki wykazania obecności CSFV (m.in. hodowla komórkowa) po eksperymentalnym zakażeniu świń szczepem ALFORT 187 CSFV wykazali jego obecność w drugiej dobie p.i. u 6 z 8 zakażonych zwierząt. Test ELISA i metoda cytometrii przepływowej pozwalały na wykazanie obecności wirusa u wszystkich zwierząt dopiero od 6 dnia p.i. Z kolei po zakażeniu świń szczepem KOSLOV CSFV wykazano jego obecność w 5 dniu, wykorzystując metodę izolacji w hodowli komórkowej i cytometrii przepływowej. W kolejnych dniach wirus izolowano od pojedynczych osobników. Wcześniejsze badania Kaadena i wsp. (1998) wykazały przydatność do przyżyciowych badań jedynie „kożuska leukocytów” oraz wysoką efektywność techniki RT-PCR w rozpoznawaniu zakażenia wirusem CSF. Równocześnie wskazali na bardzo rozbieżne wyniki badań z zastosowaniem izolacji wirusa w hodowli komórkowej, testu ELISA i cytometrii przepływowej z użyciem przeciwciała monoklonalnego 24/10 dla CSFV. Prezentowane wyniki zależne były od wirulencji badanego izolatu wirusa i okresu po zakażeniu.

Prezentowane przez wielu autorów wyniki badań wskazują, iż materiałem o najwyższej przydatności niezależnie od tego, czy pobierany jest on przyżyciowo, czy pośmiertnie jest kożuszek leukocytów. Natomiast najsprawniejszą techniką diagnostyczną, dzięki której możemy w krótkim czasie wykazać obecność antygeny wirusowego, jest technika RT-PCR lub cytometrii przepływowej. Jednakże w przypadku techniki RT-PCR ważne jest zastosowanie specyficznej pary starterów, a w cytometrii przepływowej – przeciwciał monoklonalnych (Quist i wsp., 1990; Wolfmeyer i wsp. 1997; Kaden i wsp., 1998; Stadejek i Pejśak, 1998; Hübert i wsp., 1999; Beer i wsp.; 2002; 2006; Rosales, 2004b; Hoffmann i wsp., 2005; Depner i wsp., 2006).

3.2.4. Wnioski

1. Zakażenie donosowe świń mieszaniną szczepów NADL2:NADL8 BVDV typ 1, podobnie jak w pierwszym etapie badań, nie wywoływało u zakażonych świń objawów chorobowych.
2. U świń zakażonych BVDV typ 1 (mieszanina szczepów NADL2:NADL8) wynik dodatni testem ELISA w kolejnych terminach badań uzyskiwano w przedziale od 16,6 do 66,6% badanych prób. Stwierdzony wysoki odsetek wyników wątpliwych (16,6–50%) wymagał potwierdzenia ich dodatkowym badaniem (np. izolacja wirusa w hodowli komórkowej).
3. Zastosowanie jednobarwnej analizy cytometrycznej pozwalało na wykrycie obecności wirusa BVD w leukocytach świń zakażonych donosowo już po 24 godz. od momentu zakażenia, a uzyskany wynik nie wymagał weryfikacji.

4. PIŚMIENNICTWO

- Archambault D., Beliveau C., Couture Y., Carman S.: 2000. Clinical response and immunomodulation following experimental challenge of calves with type 2 noncytopathogenic bovine viral diarrhea virus. *Vet. Res.*, nr 31, 215–227.
- Avalos-Ramirez R., Orlich M., Thiel H.J., Becher P.: 2001. Evidence for the presence of two novel pestivirus species. *Virology*, nr 286, 456–465.
- Baker J.C.: 1987. Bovine viral diarrhea virus: A review. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 190, 1449–1458.
- Beaker J.A., York C.J., Gillespie J.H., Mitchel G.B.: 1954. Virus diarrhea in cattle. *Am. J. Vet. Res.*, nr 15, 525–531.
- Becher P., Orlich M., Kosmidou A., König M., Baroth M., Thiel H.J.: 1999. Genetic diversity of pestiviruses: identification of novel groups and implications for classification. *Virology*, nr 262, 64–71.
- Becher P., Orlich M., Shannon A.D., Horner G., König, M., Thiel H.J.: 1997. Phylogenetic analysis of pestiviruses from domestic and wild ruminants. *J. Gen. Virol.*, nr 78, 1357–1366.
- Becher P., Orlich M., Thiel H.J.: 1998. Complete genomic sequence of border disease virus, a pestivirus from sheep. *J. Virol.*, nr 72, 5165–5173.
- Becher P., Thiel H.J.: 2002. Genus *Pestivirus* (*Flaviviridae*). W: *The Springer Index of Viruses*. Ed.: Springer Verlag, Heidelberg, Germany, 327–331.
- Beer M., Poll G., Wolf G., Kaaden O.R.: 2006. A versatile flow cytometry-based immunofluorescence inhibition assay for the detection of bovine viral diarrhea virus-specific antibodies. *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.*, nr 113, 142–146.
- Beer M., Wolf G., Kaaden O.R.: 2002. Phylogenetic analysis of the 5'-untranslated region of german BVDV type II isolates. *J. Vet. Med. B*, nr 49, 43–47.
- Bianchi A.T.J., Zwart R.J., Jeurissen S.H.M., Moonen-Leusen H.W.M.: 1992. Development of the B- and T-cell compartments in porcine lymphoid organs from birth to adult life: an immunohistological approach. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, nr 33, 201–223.
- Binns R.M., Duncan I.A., Powis S.J., Hutchings A., Butcher G.W.: 1992. Subset of null and $\gamma\delta$ T cell report positive T lymphocytes in the blood of young pigs identified by monoclonal antibodies. *Immunology*, nr 77, 219–227.
- Bolin S., Moennig V., Kelso-Gourelly N.E., Ridpath J.: 1988. Monoclonal antibodies with neutralizing activity segregate isolates of bovine viral diarrhea virus into groups. *Brief reports. Arch. Virol.*, nr 99, 117–123.

- Brocchi E., Cordioli P., Berlinzani A., Gamba D., Deismone F.: 1993. Development of a panel of anti-Pestivirus monoclonal antibodies useful for virus identification and antibody assessment. W: *Procc. 2nd Symposium on Pestiviruses of the European Society for Veterinary Virology*. Annency, France, 215–218.
- Brock K.V.: 1996. Type II bovine viral diarrhoea virus in the United States. W: *Procc. 3th Symposium of Pestiviruses*. Leystad, Netherland, s. 20.
- Brown T.T., Ananaba G.: 1988. Effect of respiratory infection caused by bovine herpesvirus-1 or parainfluenza-3 virus on bovine alveolar macrophage functions. *Am. J. Vet. Res.*, nr 49, 1447–1451.
- Bruschke C.J., Hulst M.M., Moormann R.J., van Rijn P.A., van Oirschot J.T.: 1997. Glycoprotein Erns of pestiviruses induces apoptosis in lymphocytes of several species. *J. Virol.*, nr 71, 6692–6696.
- Brüske R.: 1980. Vergleichende serologische Untersuchungen zum Nachweis neutralisierender Antikörper gegen das Virus der Europäischen Schweinepest (ESP) und gegen das Virus der Bovinen Virusdiarrhoe (BVD) in Blutseren von Schweinen aus ferkelerzeugenden Betrieben Niedersachsens. *Diss. Hanower, Germany*. 45–80.
- Carberey E.A.: 1988. *Diagnostics procedures*. W: *Classical swine fever and related viral infections*. Ed.: Martinus Nijhoff Publishing, Boston, Dordrecht, Lancaster. 99–115.
- Carberey E.A., Stewart W.C., Kresse J.I., Snyder M.L.: 1976. Natural infection of pigs with bovine viral diarrhoea virus and its differential diagnosis from hog cholera. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, nr 169, 1217–1219.
- Collet M.S., Wiskerchen M.A., Welniak E., Belzer S.K.: 1991. Bovine viral diarrhoea virus genomic organization. W: *Ruminant pestivirus infection. Virology, pathogenesis u. perspectives of prophylaxis*. Ed.: Springer Verlag, Wien, New York, *Arch. Virol.*, nr 3, 19–27.
- Collett M.S., Larson R., Gold C., Strick D., Anderson D.K., Purchio A.F.: 1988. Molecular cloning and nucleotide sequence of the pestivirus bovine viral diarrhoea virus. *Virology*, nr 165, 191–199.
- Corthier G.: 1978. Cellular and humoral response in pigs given vaccinal and chronic hog cholera viruses. *Am. J. Vet. Res.*, nr 39, 1841–1844.
- Crevat D., Koenen F., Thibault J.C.: 1994. Use and performance of new diagnostic tools for hog cholera virus infection in a context of a classical swine fever outbreak. W: *Proc. 7th Symp. Vet. Lab. Diagn.*, Buenos Aires, Argentina, s. 167.
- Dahle J., Schagemann G., Moennig V., Liess B.: 1993. Clinical, virological and serological findings after intranasal inoculation of pigs with bovine viral diarrhoea virus and subsequent intranasal challenge with hog cholera virus. *J. Vet. Med. B*, nr 40, 46–54.
- Davis W.C.: 1996. Analysis of monoclonal antibodies specific for the $\gamma\delta$ TcR. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, nr 60, 305–317.
- de Mía G.M., Marasca C., Rutili D.: 1994. An ELISA for detecting swine fever antigens in blood and tissues of infected animals. W: *Report of Meeting of the National Swine Fever Laboratories*, Brussels, Belgium, 20–22.

- de Moerloze L., Lecomte C., Renard A., Vandergergh D., Vanderheijden N., Mortial J.A.: 1992. Nucleotide sequence of the bovine viral diarrhoea virus Osloss strain comparison with related viruses and identification of specific DNA probes in the 5' untranslated region. *Proc. J. Gen. Virol.*, nr 74, 1433–1438.
- Depner K., Bunzenthall C., Heun-Munch B., Strebelow G., Hoffmann B., Beer M.: 2006. Diagnostic evaluation of a real-time RT-PCR assay for routine diagnosis of classical swine fever in wild boar. *J. Vet. Med. B*, nr 53, 317–320.
- Depner K.R.: 1998. CSF diagnostics tests, advantages and disadvantages for epidemiological investigations. W: *Proc. FAO/EU Workshop „Emergency preparedness and contingency planning for FMD, CSF and other exotics diseases*. Puławy, Polska, s. 56.
- Depner K.R., Greiser-Wilke I., Erol N., Soos P., Liess B., Moennig V.: 1996. Sensitivity of different diagnostic methods used in the diagnosis of CSF. W: *Raport Annual Meeting of National Swine Fever Laboratories*. Alghero, Italy, 31–33.
- Depner K.R., Gruber A., Liess B.: 1994. Experimental infection of weaner pigs with field isolate of hog cholera/classical swine fever virus derived from a recent outbreak in Lower Saxony. I: Clinical, virological and serological findings. *Wien. Tierärztl. Mschr.*, nr 81, 370–373.
- Depner K.R., Paton D.J., Criucere C., De Mia G.M., Müller A., Koenen F., Stark R., Liess B.: 1995. Evaluation of the enzyme-linked immunosorbent assay for the rapid screening and detection of classical swine fever virus antigens in the blood of pigs. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, nr 14, 677–689.
- Donis R.O., Corapi W., Dubovi E.J.: 1988. Neutralizing monoclonal antibodies to bovine viral diarrhoea virus bind to 56K to 58K glycoprotein. *J. Gen. Virol.*, nr 69, 77–86.
- Donis R.O., Dubovi E.J.: 1987. Characterization of bovine viral diarrhoea-mucosal disease virus-specific proteins in bovine cells. *J. Gen. Virol.*, nr 68, 1597–1605.
- Doyle L.G., Heuschele W.P.: 1983. Bovine viral diarrhoea virus infection in captive exotic ruminants. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, nr 183, 1257–1259.
- Edwards S.: 1996. International Conference Diagnostic procedures and measures to control classical swine fever in domestic pigs and the European wild boar. W: *Proc. The differential diagnosis of classical swine fever from other pestivirus infections in pigs*. Puławy, Poland, 25–33.
- Elbers K., Tautz N., Becher P., Stoll D., Rümnapf, T., Thiel H.J.: 1996. Processing in the virus E2-NS2 Region: Identification of proteins p7 and E2p7. *J. Virol.*, nr 70, 4131–4135.
- Ellis J.A., Davis W.C., Belden E.L., Pratt D.L.: 1988. Flow cytometric analysis of lymphocyte subset alterations in cattle infected with Bovine Viral Diarrhoea Virus. *Vet. Pathol.*, nr 25, 231–236.
- Fernelius A.L., Amtower W.C., Lambert G., Mc Clurkin A.W., Matthews P.J.: 1973. BVD Virus in swine: Characteristics of virus recovered from naturally and experimentally infected swine. *Can. J. Comp. Med.* nr 37, 13–20.
- Flynn D.M., Jones T.E.: 1964. The position regarding swine fever in Victoria. *Aust. Vet. J.*, nr 40, 131–137.

- Ganheim C., Johannisson A., Ohagen P., Persson W.K.: 2005. Changes in peripheral blood leukocyte counts and subpopulations after experimental infection with BVDV and/or Mannheimia haemolytica. *J. Vet. Med. B*, nr 52, 380–385.
- Gillespie J.H., Baker J.A., McEntee K.: 1960. A cytopathogenic strain of virus diarrhea virus. *Cornell Vet.*, nr 50, 73–79.
- Gillespie J.H., Coggins L., Thompson J., Baker J.A.: 1961. Comparison by neutralization tests of strain of virus isolated from virus diarrhea and mucosal disease. *Cornell Vet.*, nr 51, 155–159.
- Greiser-Wilke I., Moening V., Coulibaly C.O.Z., Dahle J., Leder L., Liess B.: 1990. Identification of conserved epitopes on a hog cholera virus protein. *Arch. Virol.*, nr 111, 213–225.
- Hamblin C., Hedger R.S.: 1979. The prevalence of antibodies to bovine viral diarrhoea/mucosal disease virus in African wildlife. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, nr 2, 295–303.
- Heinz F.X., Collett M.S., Purcell R.H., Gould E.A., Howard C.R., Houghton M., Moormann R.J.M., Rice C.M., Thiel H.J.: 2000. Family Flaviviridae. W: *Virus Taxonomy: 7th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Ed.: Academic Press, San Diego, CA, 859–878.
- Hoffmann B., Beer M., Schelp C., Schirmer H., Depner K.: 2005. Validation of a real-time RT-PCR assay for sensitive and specific detection of classical swine fever. *J Virol Met.*, nr 130, 36–44.
- Holm Jensen M.: 1985. Screening for neutralizing antibodies against Hog Cholera and/or BVD Virus in Danish pigs. *Acta Vet. Scand.*, nr 26, 72–80.
- Horzinek M.C., Reczko E., Petzold K.: 1967. On the morphology of hog cholera virus. *Arch. Ges. Virusforsch.*, nr 21, 475–478.
- Houe H.: 1999. Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infections. *Vet Microbiol.*, nr 64, 89–107.
- Hübner P., Steinhagen P., Kaaden V.: 1999. Untersuchungen zur Eignung der Durchflusszytometrie für den Nachweis von Infektionen mit dem Virus der Klassischen Schweinepest (KSPV). *Tierärztl. Umschau*, nr 54, 326–331.
- Hulst M.M., Himes G., Newbigin E., Moormann R.J.M.: 1994. Glycoprotein E2 of classical swine fever virus: expression in insect cells and identification as a ribonuclease. *Virology*, nr 200, 558–565.
- Hurtado A., Gracia-Perez A.L., Aduriz G., Juste R.A.: 2003. Genetic diversity of ruminant pestiviruses from Spain. *Virus Res.*, nr 92, 67–73.
- Jakóbsiak M.: 1998a. Dojrzwianie limfocytów. W: *Immunologia*, PWN, Warszawa, 121–153.
- Jakóbsiak M.: 1998b. Populacje i subpopulacje limfocytów. W: *Immunologia*, PWN, Warszawa, 141–151.
- Kaaden V., Hübner P., Strebelow G., Lange E., Steyer H., Steinhagen P.: 1999. Vergleich labordiagnostischer Methoden zum Nachweis einer Infektion mit dem Virus der Klassischen Schweinepest (KSPV) in der früher Infektionsphase: Experimentelle Studie. *Berl. Münch. Tierärztl.*, nr 112, 52–57.
- Kaaden V., Lange E., Schurig U., Strebelow G.: 1997. Problematik der diagnostik von schwachvirulentem KSP-virus – Experimentale Studie Jahrestagung der Fach-

- gruppe Schweinekrankheiten. Leitthema: Organisation der Bekämpfung von Schweineseuchen (Klassische Schweinepest, Aujeszkysche Krankheit, Maul- und Klauenseuche). Hannover, Germany, 22–28.
- Koenen F., Lefebvre J.: 1995. Kinetics of an experimental infection with a classical swine fever (CSF) field isolate. W: Proc. 3rd ESVV Congr. „Immunology of viral infections”. Interlaken, Swiss, Foundation Marcel Mérieux, Lyon, France, 322–326.
- Krilov L.R., Hendry R.M., Godfrey E., McIntosh K.: 1987. Respiratory virus infection of periferial blood monocytes. Correlation with ageing of cells and interferon production in vitro. *J. Gen. Virol.*, nr 68, 1749–1753.
- Kulcsar G, Soos P, Kucsera L, Glavits R, Palfi V.: 2001. Pathogenicity of a bovine viral diarrhoea virus strain in pregnant sows. Short communication. *Acta Vet. Hung.*, nr 49, 117–120.
- Larski Z.: 1992. Ilościowe badania izolowanego wirusa. W: Diagnostyka wirusologiczna chorób zwierząt, PWRiL, Warszawa, 159–190.
- Liebler E.M., Johannsen U., Pohlenz J.: 1995. Die hämorrhagische Verlaufsform der akuten bovinen Virusdiarrhoe.: Literaturübersicht und Fallbericht. *Tierärztl. Prax.*, nr 23, 18–25.
- Liess B.: 1967. Die ätiologische Abgrenzung selbständiger Virusinfektionen, insbesondere der Virusdiarrhöe – Mucosal Disease, in sog. „MD-complex“ bei Rindern. *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.*, nr 74, 46–49.
- Liess B., Moennig V.: 1990. Ruminant pestivirus infection in pigs. *Res. Vet. Sci.*, nr. 9, 151–161.
- Lipowski A.: 1999a. Możliwości wykrywania wirusa pomoru klasycznego w zależności od momentu zakażenia lub padnięcia świń. Praca habilitacyjna, Puławy, Poland, s. 49.
- Lipowski A.: 1999b. Możliwości wykrywania wirusa pomoru klasycznego świń w zależności od momentu zakażenia lub padnięcia świń. Praca habilitacyjna, Puławy, Poland, 33–35.
- Lipowski A.: 1999c. Możliwości wykrywania wirusa pomoru klasycznego w zależności od momentu zakażenia lub padnięcia świń. Praca habilitacyjna, Puławy, Poland, s. 55.
- Loeffen W., van Beuningen A., Quak S., Elbers A.: 2005. Prevalence and risk-factors of non-CSF pestiviruses in the Netherlands. W: Proc. 6th ESVV Pestivirus Symposium, Thun, Swiss, s. 109.
- Lopez A., Maxie M.G., Ruhnke L., Savan M., Thomson R.G.: 1986. Cellular inflammatory response in the lungs of calves exposed to bovine viral diarrhoea virus. *Am. J. Vet. Res.*, nr 47, 1283–1286.
- Lowings P., Paton D.J., Sands J.J., Ibat G.: 1996. Detection of classical swine fever in blod: a comparsion between virus isolation, antigen ELISA and RT-PCR. W: Proc. 3rd ESVV Symposium on Pestivirus Infection. Leystad, Netherlands, 130–134.
- Lunney J.K., Prescovitz M.D.: 1984. Diferentiation antigens in lymphohemopoietic tissues. *Miyaska i Trnka*, New York, 421–454.

- Markowska-Daniel I.: 1999a. Zastosowanie przeciwciał monoklonalnych i cytometrii przepływowej w diagnostyce oraz w badaniach nad patogenezą pomoru świń wywołanego przez szczepy o różnej zjadliwości. Praca habilitacyjna, Puławy, Poland, s. 95.
- Markowska-Daniel I.: 1999b. Zastosowanie przeciwciał monoklonalnych i cytometrii przepływowej w diagnostyce oraz w badaniach nad patogenezą pomoru świń wywołanego przez szczepy o różnej zjadliwości. Praca habilitacyjna, Puławy, Poland, s. 101.
- Markowska-Daniel I., Winnicka A., Kluciński K., Pejsak Z.: 1999. Zastosowanie cytometrii przepływowej w badaniach nad patogenezą pomoru świń wywołanego przez szczepy o różnej zjadliwości. *Medycyna wet.*, nr 54, 258–264.
- Marshall D.J., Perry G.A., Kuszyński C.A., Eskridge K.M., Kelling C.L.: 1994. Flow cytometric analyses of lymphocyte subsets in peripheral blood and lymphoid tissues of gnotobiotic calves during primary acute postnatal infections of bovine viral diarrhoea virus. *Viral Immunol.*, nr 7, 141–149.
- Matshullat G., Dahle J., Roder B., Moennig V., Liess B.: 1994. Feldinfektion mit BVD-Virus beim Schwein. *Epidemiologie und Diagnostik. Dtsch. tierärztl. Wschr.*, nr 101, 22–26.
- Meyers G., Rumenapf T., Thiel H.J. (1989). Molecular cloning and nucleotide sequence of the genome of hog cholera virus. *Virology*, nr 171, 555–567.
- Meyers, G., Thiel, H.J.: 1996. Molecular characterization of pestiviruses. *Adv. Virus Res.*, nr 4 47, 53–118.
- Moormann R.J.M., Warmerdam P.A.M., van der Meer B., Schaaper W.M.M., Wensvoort G., Hulst M.M.: 1990. Molecular cloning and nucleotide sequence of hog cholera virus strain Brescia and mapping of the genomic region encoding envelope protein E1. *Virology*, nr 177, 184–198.
- Narita M., Kawashima K., Shimizu M.: 1996. Viral antigen and B and T lymphocytes in lymphoid tissues of gnotobiotic piglets infected with hog cholera virus. *J. Comp. Pathol.*, nr 114, 257–263.
- Nettleton P.F.: 1990. Pestivirus infections in ruminants other than cattle. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epizoot.*, nr 9, 131–150.
- Olafson P., MacCallun A.D., Fox A.D.: 1946. An apparently new transmissible disease of cattle. *Cornell Vet.*, nr 36, 205–213.
- Paton D.J., Simpson V., Done S.H.: 1992. Infection of pigs with ruminant-type pestiviruses. *Vet. Rec.*, nr 111, 151–163.
- Pauly T., König M., Thiel H.J., Saalmüller A.: 1998. Infection with classical swine fever virus, effect on phenotype and immune responsiveness of porcine T lymphocytes. *J. Gen. Virol.*, nr 79, 31–40.
- Pauly, T., König M., Thiel H.J., Saalmüller A.: 1998. Infection with classical swine fever virus; effect on phenotype and immune responsiveness of porcine T lymphocytes. *J. Gen. Virol.*, nr 79, 31–40.
- Pejsak Z.: 1995. Nowe dane nt. sytuacji epizootycznej w Europie oraz zasad zwalczania pomoru świń. *Medycyna wet.*, nr 4, 191–193.
- Pejsak Z.: 2002. Zakażenia świń wirusami wirusowej biegunki bydła oraz choroby granicznej owiec. W: *Choroby świń*. PWR, Poznań, 68–69.

- Pejsak Z., Kołacz J.: 1991. Zastosowanie metody ELISA w badaniach przeglądowych w kierunku pomoru klasycznego świń. *Medycyna wet.*, nr 47, 400–401.
- Pellerin C., van der Hurk J., Lecomte J., Tijssen P.: 1994. Identification of new group of bovine viral diarrhoea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. *Virology*, nr 203, 260–268.
- Pinyochon W., Chanprasert B., Parchariyanon S., Patchimasiri T., Tantasawasdi U.: 1994. Virulence and persistence of swine fever viruses in experimental piglets. W: *Proc. 13th IPVS Congr. Bangkok, Thailand*, s. 78.
- Plateau E., Remond M., Ursache R., Larenandie B.: 1978. Contribution a l'étude des incidentes serologiques de la maladie des muqueuses chez le porc en France. *Rev. de Med. Vet.*, nr 129, 1693–1703.
- Pocock D.H., Howard C.J., Clarke M.C., Brownlie J.: 1987. Variation in the intracellular polypeptide profiles from different isolates of bovine viral diarrhoea virus. *Arch. Virol.*, nr 94, 43–53.
- Purchio A.F., Larson R., Collett M.S.: 1984. Characterization of bovine viral diarrhoea virus proteins. *J. Virol.*, nr 50, 666–669.
- Quist P., Hue H., Aasted B., Meylin A.: 1991. Comparison of flow cytometry and virus isolation in cell culture for identification of cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. *J. Clin. Microbiol.*, nr 29, 660–661.
- Qvist P., Aasted B., Bloch B., Meyling A., Ronsholt L., Houe H.: 1990. Flow Cytometric Detection of Bovine Viral Diarrhoea Virus in Peripheral Blood Leukocytes of Persistently Infected Cattle. *Can J. Vet. Res.*, nr 54, 469–472.
- Reed K.E., Gorbalenya A.E., Rice C.M.: 1998. The NS5A/NS5 proteins of viruses from three genera of the family Flaviviridae are phosphorylated by associated serine/threonine kinases. *J. Virol.*, nr 72, 6199–6206.
- Ridpath J.F.: 1996. Sequence diversity and genotyping. W: *Proc. Int. Symp. of BVD-virus. Cornell*. 39–43.
- Ridpath J.F., Bolin S.R.: 1995. The genomic sequence of a virulent bovine viral diarrhoea virus (BVDV) from the type 2 genotype: detection of a large genomic insertion in a noncytopathic BVDV. *Virology*, nr 212, 39–45.
- Rosales S. C.: 2004a. Charakterisierung ruminanter Pestiviren mittels Polymerasekettreaktion und monoklonaler Antikörper. *Diss., Giessen, Germany*, s. 2.
- Rosales S.C.: 2004b. Charakterisierung ruminanter Pestiviren mittels Polymerasekettreaktion und monoklonaler Antikörper. *Diss., Giessen, Germany*, 122–130.
- Rosenthal K.S., Hodnichak M.C., Summers J.M.: 1987. Flow cytometric evaluation of antiherpes drugs. *Cytometry*, nr 8, 392–395.
- Rouse B.T., Horohov D.W.: 1986. Immunosuppression in viral infections. *Rev. Inf. Dis.*, nr 8, 850–873.
- Rümenapf, T., Unger G., Strauss J.H., Thiel H.J.: 1993. Processing of the structural glycoprotein of pestiviruses. *J. Virol.*, nr 67, 3288–3294.
- Rypuła K., Klimentowski S., Stadejek T.: 2001. Epizootiologiczne i ekonomiczne aspekty zakażeń wirusem BVD u trzody chlewnej. Raport końcowy z realizacji projektu badawczego Nr 5 PO 6 K 01614. Puławy, Polska, s. 31.

- Saalmüller A., Hirt W., Reddehase M.J.: 1989. Phenotypic discrimination between thymic and extrathymic CD4-CD8- and CD4+CD8+ porcine T lymphocyte. *Eur. J. Immunol.*, nr 19, 2011–2016.
- Saalmüller A., Pauly T., Lunney J.K., Aasted B., Sachs D.H., Arn S., Bianchi A., Binns R.M., Licence S., Whyte A., Blecha F., Chen Z., Chu R.M., Davis W.C., Denham S., Yang H., Witthall T., Parkhouse R.M., Sopp J.P., Kim Y.B., Lipp J., Mackay C., Magyar A., McCullough K., Arrines A., Summerfield A., Murtaugh M., Nielsen J., Novikov B., Bailey M., Tlaskalova H., Trebiachavsky I., Valpotic I., Walker J., Lee R., Zuckermann F.: 1998. Overview of the second International Workshop to define swine cluster of differentiation (CD) antigens. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, nr 60, 207–229.
- Shannon A.D., Morrissy C., Mackintosh S.G., Westbury H.A.: 1991. Detection of hog cholera virus antigens in experimentally – infected pigs using an antigen-capture ELISA. *Vet. Microbiol.*, nr 34, 233–248.
- Shimzu M., Yamada S., Kawashima K., Ohasi S., Shimzu S., Ogawa T.W.: 1996. Changes of lymphocyte populations in pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS). *Vet. Immunol. Immunopathol.*, nr 50, 19–27.
- Silflow R.M., Degel P.M., Harmsen A.G.: 2005. Bronchoalveolar immune defense in cattle exposed to primary and secondary challenge with bovine viral diarrhea virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, nr 103, 129–139.
- Smit de A.J., Kluijver de E., Petersen-DenBesten A., Terpstra C.: 1997; The evaluation of a classical swine fever virus specific antigen captured assay; samples, strains and sensitivity. W: Proc. 4th Int. Congr. Vet. Virol. Edinburgh, Scotland, s. 186.
- Stadejek T., Pejsak Z.: 1998. Diagnostyka różnicowa pestiwirusowych zakażeń świń przy użyciu amplifikacji DNA *in vitro*. *Medycyna wet.* 54, 466–469.
- Stadejek T., Pejsak Z.: 1998. Diagnostyka różnicowa pestiwirusowych zakażeń świń przy użyciu amplifikacji DNA *in vitro*. *Medycyna Wet.*, nr 54, 466–470.
- Stewart W.C., Carbey E.A., Jenny E.W.: 1971. Bovine viral diarrhea infection in pigs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, nr 159, 1556–1564.
- Stewart W.C., Miller C.D., Kresse J.I., Synder M.L.: 1980. Bovine viral diarrhea infection in pregnant swine. *Am. J. Vet. Res.*, nr 41, 457–462.
- Summerfield A., Hofmann M.A., McCullough K.C.: 1998a. Low density blood granulocytic cells induced during classical swine fever are targets for virus infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, nr 63, 289–301.
- Summerfield A., Knotig S.M., McCullough K.C.: 1998b. Lymphocyte apoptosis during classical swine fever: implication of activation-induced cell death. *J. Virol.*, nr 72, 1853–1861.
- Susa M., König M., Saalmüller A., Reddehase M., Thiel H.: 1992. Pathogenesis of classical swine fever: B-lymphocyte deficiency caused by hog cholera virus. *J. Virol.*, nr 66, 1171–1175.
- Terpstra C., Wenvoort G.: 1988. Natural infection of pigs with bovine viral diarrhea virus associated with signs resembling swine fever. *Res. Vet. Sci.*, nr 45, 137–142.
- Thibault J.C., Crevat D.: 1994. Performances of new diagnostics tools for bovine viral diarrhea/mucosal disease. W: Proc. 7th Symp. Vet. Lab. Diagn., Buenos Aires, Argentina, s. 168.

- Thiel H.J., Plagemann P.G.W., Moening V.: 1996. Pestiviruses. W: Virology, Lippincott-Raven, Philadelphia, 1059–1073.
- Thiel H.J., Stark R., Weiland E., Rünenapf T., Meyers G.: 1991. Hog cholera virus: molecular composition of virions from a pestivirus. *J. Virol.*, nr 65, 4705–4712.
- Thomson R.G., Savan M.: 1963. Studies on virus diarrhea and mucosal disease of cattle. *Can. J. Comp. Med. Vet. Sci.*, nr 27, 207–214.
- Terpstra, C., Wensvort G.: 1987. Influence of vaccination regime on the herd immune response of swine fever. *Vet. Microbiol.*, nr 13, 143–151.
- Underdahl N.R., Grace O.D., Horlein A.B.: 1957. Cultivation in tissue culture of cytopathogenic agents from bovine MD. W: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, nr 94, 795–797.
- van Oirschot J.T.: 1994. Hog cholera virus. W: *Encyclopedia of virology*, Academic Press Harcourt Brace Company Publishers, London, San Diego, New York, Boston, Sydney, Tokyo, Toronto. 649–554.
- van Oirschot J.T.: 1979. Experimental production of congenital persistent swine fever infections. I. Clinical, pathological and virological observations. *Vet. Microbiol.*, nr 4, 117–132.
- van Rijn P.A., van Gennip H.G., Leederste C.H., Brusckke C.J., Paton D.J., Moormann R.J., van Oirschot J.T.: 1997. Subdivision of the pestivirus genus based on envelope glycoprotein E2. *Virology*, nr 237, 337–348.
- Vannier P., Leforban Y.: 1992. *Bovine Viral Diarrhea and Border Disease W: Diseases of swine*, Univ. Press, Iowa State, s. 243.
- Vannier P., Leforban Y., Carnero R., Cariolet R.: 1988. Contamination of a live virus vaccine against pseudorabies, Aujeszky's disease by an ovine pestivirus pathogen for the pig. *Ann. Rech. Vet.*, nr 19, 283–290.
- Vilček Š., Herring J.A., Nettelon P.F., Lowings J.P., Paton D.J.: 1994. Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. *Arch. Virol.*, nr 136, 309–323.
- von Hübner P., Steinhagen P., Kaden V.: 1999. Untersuchungen zur Eignung der Durchflußzytometrie für den Nachweis von Infektionen mit dem Virus der Klassischen Schweinepest (KSPV). *Tierärztl. Umschau*, nr 54, 326–331.
- Walz P.H., Baker J.C., Mullaney T.P., Kaneene J.B., Maes R.K.: 1999. Comparison of Type I and Type II Bovine Viral Diarrhea Virus Infection in Swine. *Can. J. Vet. Res.*, nr 63, 119–123.
- Weiland E., Ahl R., Stark R., Weiland F., Thiel H.J.: 1992. A second envelope glycoprotein mediates neutralization of a pestivirus, hog cholera virus. *J. Virol.*, nr 66, 3677–3682.
- Welsh M.D., Adair B.M., Foster J.C.: 1994. Effect of BVD virus infection on alveolar macrophage functions. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, nr 46, 195–210.
- Wengler G.: 1991. Family: Flaviviridae. W: *Classification and Nomenclature of Viruses*. 5th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch. Virol.*, suppl. 2, 223–233.
- Wen-Hai F., Tompkins M. B., Jin-Sheng X., Brown T.T., Laster S. M., He-Xiao Z., McCaw M.B.: 2002. Thymocyte and peripheral blood T lymphocyte subpopula-

- tion changes in piglets following *in utero* infection with Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *Virology*, nr 302, 363–372.
- Wensvoort G., Terpstra C., Boonstra J., Bloemaraad M., van Zaane D.: 1986. Production of monoclonal antibodies against swine fever virus and their use in laboratory diagnosis. *Vet. Microbiol.*, nr 12, 101–108.
- Westergaard J.M.: 1996. International Conference Diagnostic procedures and measures to control classical swine fever in domestic pigs and the European wild boar. *Materiały „Epidemiology of classical swine fever”* Puławy, Poland, 119–130.
- Windisch J.M., Straver P.J., Kimman T.G., De Leeuw P.W.: 1996. RNase of classical swine fever virus: biochemical characterization and inhibition by virus-neutralizing monoclonal antibodies. *J. Virol.*, nr 70, 352–358.
- Wiskerchen M.A., Belzer S.K., Collett M.S.: 1991. Pestivirus gene expression: the first protein product of the bovine viral diarrhea virus large open reading frame, p20, possesses proteolytic activity. *J. Virol.*, nr 65, 4508–4514.
- Wolfmeyer A., Wolf G., Beer M., Strube W., Hehmen H.R., Schmeer N., Kaaden O.R.: 1997. Genomic (5'UTR) and serological differences among German BVDV field isolates. *Arch. Virol.*, nr 142, 2049–2057.
- Woods R.D., Kunkle R.A., Ridpath J.E., Bolin S.R.: 1999. Bovine viral diarrhea virus isolated from fetal calf serum enhances pathogenicity of attenuated transmissible gastroenteritis virus in neonatal pigs. *J. Vet. Diagnost. Invest.* 11, 400–407.
- Xu X., Zahng Q., Xinglong Y., Long L., Chang X., Hua X., Changchun T.: 2006. Sequencing and comparative analysis of a pig bovine viral diarrhea virus genome. *Virus Res.*, nr 122, 164–170.

DEVELOPMENT OF SELECTED HAEMATOLOGICAL AND IMMUNOLOGICAL BLOOD INDICATORS IN COURSE OF EXPERIMENTAL INFECTION OF SWINE WITH VARIOUS STRAINS OF THE VIRUS BVD TYPE 1

S u m m a r y

Joining the European Union by Poland and a necessity of maintaining the status of a country free of the classical virus of swine fever imposes on the veterinary functions an obligation to carry out a review research among wild boars and swine with regard to these infections. In practice, research of this type of infections may be made difficult as the frequently applied diagnostics methods do not always allow differentiation of the viruses of *Pestivirus* type, which includes four kinds of viruses isolated from farming animals: the virus of viral diarrhoea of cattle type 1 (BVDV-1), the virus of viral diarrhoea of cattle type 2 (BVDV-2), the virus of classical swine fever (CSFV), the virus of border disease of sheep (BDV) and kinds of viruses isolated from wild animals (giraffe and reindeer).

The purpose of this study was to assess impact of infection with various strains of the virus BVD type 1 on haematological indicators of peripheral blood of swine, percentage of lymphocytes of peripheral blood showing expression to (selected) surface antigens and dynamics of accumulation of titres of antibodies against the virus BVD type 1 in experimental conditions.

The research was carried out in two stages:

1. Assessment of impact of infection into a nose and contact infection of swine with various strains of the virus BVD type 1 on haematological indicators of peripheral blood and percentage of lymphocytes showing expression to surface antigens: CD2, CD4, CD8, CD21, CD45, wCD45, TCR $\gamma\delta$ and dynamics of accumulation of titres of antibodies against the virus BVD type 1.
2. Detecting pan-pestivirus infections in swine infected experimentally, into a nose with the virus BVD type 1 using the flow cytometry.

In the first stage the swine were infected with a mixture of laboratory strains NADL2:NADL8 and with field strains V725 and 5826/84 of the virus BVD isolated from farming animals, and percentage of subpopulations of lymphocytes B and T in blood showing the expression of surface antigens was determined. The material for research

was taken in the 24th and the 48th hour p.i., and then in the 4th, 7th, 14th, 21st, 28th and 35th day p.i. After infecting with the above mentioned strains of the virus BVD the swine did not show any pathological changes. With regard to the assessed parameters, a decrease of a number of leucocytes, a decrease of percentage of lymphocytes CD2 and a change of proportion of lymphocytes T CD4:CD8 were observed. No statistically significant dependencies between the assessed parameters of strains of the virus BVD type 1 were observed. On the other hand dynamics of accumulation of antibodies after infecting with the strains of the virus BVD was varied individually and showed a great changeability of titres of antibodies.

In the second stage the swine were infected with a mixture of isolates: NADL2:NADL8 of the virus BVD, and then full blood for testing was taken from infected and uninfected (control) animals in the same periods as in the first stage of the research. The analysis of the results gives the basis for the statement that infecting swine into a nose with a mixture of strains NADL2:NADL8 of the virus BVD does not result in occurrence of pathological changes in animals and that the test ELISA, despite its advantages, at present requires confirmation of the result with another available diagnostic method.