

JANUSZ NOWAKOWSKI

Bierna odporność psów i chomików na doświadczalne zakażenie *Leptospira interrogans* serotyp *icterohaemorrhagiae*

Z Zakładu Technologiczno-Badawczego Puławskich Zakładów Przemysłu Bioweterynaryjnego w Puławach

Zwierzęta chore na leptospirozy wywoływane przez różne serotypy zarazka, w tym przez *L. interrogans* serotyp *icterohaemorrhagiae*, stanowią znaczne zagrożenie dla ludzi. Szczególnie niebezpiecznym źródłem infekcji jest pies, żyjący w najbliższym otoczeniu człowieka. Z tego względu preparaty stosowane do czynnego i biernego uodporniania psów przeciwko leptospirozie, powinny posiadać szczególnie wysoką wartość immunogenną i chronić zwierzęta nie tylko przed kliniczną leptospirozą, lecz również przed zakażeniem nerek, a w następstwie tego przed siewstwem. W USA i Wielkiej Brytanii szczepionki i surowice przeciw-leptospirowe podlegają ocenie za pomocą testów ochronnych na chomikach (1, 5).

Brak danych w piśmiennictwie krajowym na temat powyższych zagadnień zdecydował o podjęciu badań, których celem było określenie stopnia ochrony biernej uodpornianych psów na kontrolne zakażenie *L. interrogans* serotyp *icterohaemorrhagiae*, oraz ustalenie zależności między wynikiem oceny wartości ochronnej surowic uzyskanych bezpośrednio na psach i za pomocą testu ochronnego na chomikach.

Materiał i metody

Zwierzęta.

Psy. Do doświadczeń użyto 15 psów rasy mieszanej, w wieku 8 tygodni. Psy pochodziły z dwóch miotów liczących po 9 i 6 zwierząt, których waga wahała się od 1,1 kg do 1,7 kg. W surowicach (w rozcieńczeniu 1:10) pobranych przed rozpoczęciem doświadczeń, nie stwierdzono aglutynin przeciwko serotypom *icterohaemorrhagiae* i *canicola*. Ciężota wewnętrzna, mierzona w ciągu kilku dni poprzedzających właściwe badania, nie odbiegała od normy. Psy podzielono na dwie grupy zasadnicze liczące 6 i 5 psów oraz grupę kontrolną liczącą 4 psy. Zwierzęta z obu miotów rozdzielono proporcjonalnie na grupy.

Chomiki. Badania przeprowadzono na 60 chomikach sryjskich, samcach, w wieku 3 tygodni. Zwierzęta pochodziły z hodowli wolnej od leptospirozy. W trakcie wcześniejszych badań, prowadzonych na chomikach pochodzących z tej hodowli, nie notowano również innych przypadków chorobowych.

Badane preparaty.

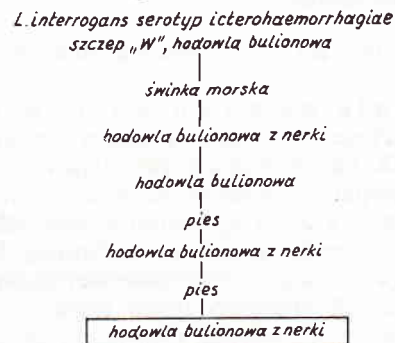
Badaniom poddano dwa skojarzone preparaty globulinowe, zawierające przeciwciała przeciwko wirusom nosówki i choroby Rubartha oraz przeciwko leptospirom.

-Stagloban SHL firmy Behringwerke AG, seria 234, komponent leptospirowy zawiera przeciwciała przeciwko serotypom *icterohaemorrhagiae* i *canicola*. Wg wskazań producenta dawka profilaktyczna wynosi 0,2 ml/kg c.c., dawka lecznicza 0,4 ml/kg c.c.

-Preparat doświadczalny *) produkcji „Biowet” Puław, oznaczony jako C.3., komponent leptospirowy zawiera przeciwciała przeciwko serotypom *icterohaemorrhagiae* i *canicola*. Zalecana dawka profilaktyczna 0,4 ml/kg c.c., dawka lecznicza 0,8 ml/kg c.c.

Szczep do challenge'u.

Do zakażenia psów i chomików używano patogenego szczepu „W” serotypu *icterohaemorrhagiae*, o ustalonej zjadliwości. Szczep do kontrolnego zakażenia psów pasażowano przez zwierzęta w sposób podany na ryc. 1. Miano hodowli leptospir z nerki psa, określone metodą hodowlaną, wynosiło 10^8 leptospir/ml.



Ryc. 1. Schemat przygotowania materiału zakaźnego do challenge'u psów

Do zakażenia chomików użyto 14 dniowej hodowli leptospir izolowanych z nerki chomika, padłego po zakażeniu szczepem zjadliwym. Miano kultury, określone metodą hodowlaną, wynosiło 10^7 leptospir/ml.

Izolacja leptospir z nerek zakażonych zwierząt.

Do wyosobnienia leptospir z nerek psów i chomików używano płynnego podłoża Korthof'a. W celu zmniejszenia litycznego działania na leptospiiry lipidów, uwalnianych podczas homogenizowania tkanek w moździerzu, (7) jałowo pobrany materiał (całą nerkę chomika lub wycinek nerki psa wielkości 1/4 cm³), umieszczano w jałowej plastikowej strzykawce jednorazowego użytku (Polfa Lublin) i przeciskano do 9 ml bulionu. Po opadnięciu grubszych cząstek tkanki wykonywano $10 \times$ rozcieńczenia materiału w bulionie do 10^{-8} . Posiewy inkubowano w temperaturze 30°C w ciągu 28 dni. Kontrolę na obecność leptospir przeprowadzano w odstępach tygodniowych, używając mikroskopu z kondensorem ciemnego pola — pow. 140x.

*) Dr J. Nikłowi i lek. wet. E. Zdun autor wyraża podziękowanie za przekazanie preparatu do badań.

Uodpornianie i zakażenie kontrolne zwierząt.

Chomiki. Liofilizaty obu preparatów rozpuszczano do zalecanej przez producentów objętości w dołączonych rozpuszczalnikach, a następnie za pomocą płynu fizjologicznego wykonywano rozcieńczenia 1:2, 1:4, i 1:8. Każdym rozcieńczeniem zaszczepiono s.c. 6 chomików. Otrzymały one Stagloban w ilości 0,1 ml/szt., preparat C.3 w ilości 0,2 ml/szt., tj. 50% dawek defilaktycznych przewidzianych na 1 kg c.c. psa. Chomikom kontrolnym podano zamiast preparatów przeciwciał płyn fizjologiczny. Po 24 godzinach wszystkie chomiki zakażono dootrzewnowo po 0,5 ml hodowli bulionowej szczepu zjadliwego. W ciągu 14 dni prowadzono obserwację zwierząt uodpornianych i kontrolnych. Po tym okresie pozostałe przy życiu chomiki usypiano chloroformem, a nerki badano na obecność leptospir.

Psy. Oba preparaty rozpuszczano w rozpuszczalnikach do wymaganej objętości. Stagloban SHL podano pięciu psom: dawkę 0,5 ml/szt. otrzymały 3 psy, dawkę 1,0 ml/szt. 2 psy. Preparatem doświadczalnym C.3. w dawkach 1,0 ml i 2,0 ml uodporniono po trzy psy. Cztery psy kontrolne otrzymały s.c. po 1,0 ml płynu fizjologicznego. Po 24 godzinach wszystkie psy podano zakażeniu kontrolnemu, podając im i.p. po 4,0 ml hodowli bulionowej szczepu zjadliwego. W okresie 14 dni po zakażeniu prowadzono obserwację stanu klinicznego zwierząt. Codziennie mierzono ciepłotę wewnętrzną, przyjmując temperaturę powyżej 39,4°C za stan gorączkowy. Odnotowywano wystąpienie żółtaczki błon śluzowych naturalnych otworów ciała i powłok brzusznych, pojawienie się krwi w kale oraz zmiany w stanie ogólnym zdrowia. Po 14 dniach psy usypiono i pobrano nerki do badania na obecność leptospir. W surowicach psów uodpornianych i kontrolnych oznaczono miano aglutynin.

Wyniki i omówienie

Badanie na chomikach. Wyniki badania wartości ochronnej preparatów Stagloban SHL i C.3. na chomikach przedstawiono w tab. 1. Oba preparaty nierozcieńczone oraz w rozcieńczeniach 1:2 i 1:4, chroniły wszystkie uodporniane chomiki przed co najmniej 10 LD₁₀₀ zjadliwego szczepu *icterohaemorrhagiae*. Rozcieńczenie 1:8 chroniło tylko część chomików. Tab. 1. ilustruje również rezultaty izolacji leptospir z nerek chomików, które przeżyły zakażenie kontrolne. Nie izolowano leptospir z nerek chomików szczepionych preparatami nierozcieńczonymi oraz z nerek chomików, które otrzymały Stagloban SHL rozcieńczony 1:2. U pozostałych szczepionych chomików i u wszystkich zwierząt kontrolnych stwierdzono w nerkach leptospiry.

Jak widać z uzyskanych wyników, pełne właściwości ochronne wykazały oba preparaty nierozcieńczone oraz w rozcieńczeniach 1:2 i 1:4. Częściową ochronę dawało rozcieńczenie 1:8, przy czym nieco lepsze wyniki uzyskano po stosowaniu preparatu Stagloban SHL. Badanie bakteriologiczne nerek chomików, które przeżyły challenge ujawniło, że odporność na śmiertelną dawkę szczepu zjadliwego nie jest jednoznaczna z odpornością na infekcję nerek. Leptospir nie izolowano jedynie z nerek chomików uodpornianych oboma preparatami nierozcieńczonymi i preparatem Stagloban SHL rozcieńczonym 1:2. W pozostałych przypadkach stwierdzono zakażenie nerek. W piśmiennictwie światowym nieliczne są doniesienia dotyczące oceny wartości surowic przeciw-leptospirowych na chomikach. British Veterinary Codex (1) zaleca, aby wartość surowic określać za pomocą testu ochronnego na chomikach, w stosunku do standardu, o skuteczności sprawdzonej w warunkach terenowych. Przepisy Ministerstwa Rolnictwa USA cyt. przez Huhn'a (5) wymagają, aby chomiki zaszczepione 60% minimalnej dawki na 0,454 kg wagi ciała psa, przeżyły w 80% zakażenie co najmniej 1 LD₈₀ szczepu zjadliwego.

W badaniach własnych, chomiki zaszczepione 50% minimalnej dawki w przeliczeniu na ok. 0,5 kg wagi ciała psa (tab. 1., rozcieńczenie 1:2), przeżyły w 100% challenge co najmniej 10 LD₁₀₀ zjadliwego szczepu *icterohaemorrhagiae*. Zakażenie przeżyły również chomiki, które otrzymały 25% minimalnej dawki (rozcieńczenie 1:4). Należy zatem sądzić, że zarówno Stagloban SHL jak i preparat doświadczalny C.3. odpowiadają cytowanemu wyżej wymogom, co znalazło potwierdzenie w badaniach przeprowadzonych na psach.

Badanie na psach. Wyniki doświadczenia na psach przedstawiono w tab. 2. W ciągu 14 dniowego okresu obserwacji u psów uodporniających preparatem Stagloban SHL i preparatem doświadczalnym C.3., nie stwierdzono klinicznych objawów leptospirozy. Stan ogólny zwierząt, apetyt i ciepłota wewnętrzna pozostały bez zmian. U czterech psów kontrolnych na 3—4 dzień po zakażeniu stwierdzono podwyższenie temperatury ciała w granicach

Tab. 1. Wartość ochronna komponentu anty-*icterohaemorrhagiae* w preparacie Stagloban SHL i w preparacie doświadczalnym C.3. Badanie na chomikach

Rozcieńczenie preparatu	Dawka szczepu zjadliwego — ilość leptospir/szt.	Obserwacja chomików przeżyło/zakażonych		Wynik izolacji lept. z nerek wyosobniono/badano	
		Stagloban SHL	C.3.	Stagloban SHL	C.3.
Nierozcieńczony		6/6	6/6	0/6	0/6
1:2	5 × 10 ⁶	6/6	6/6	0/6	4/6
1:4		6/6	6/6	4/5	3/5
1:8		4/6	2/6	3/4	2/2
Kontrola				0/6	3/3
	5 × 10 ⁵		0/6	3/3	

38,8—40,0°C. Począwszy od piątego dnia po zakażeniu, obserwowano nasilającą się żółtaczkę spojówek i śluzówki jamy ustnej. U dwóch psów stwierdzono w kale ślady krwi. Jeden pies padł 6 dnia po zakażeniu, na sekcji stwierdzono żółtaczkę powłok zewnętrznych, tkanki podskórnej, otrzewnej oraz chrząstek żebrowych i mostka. Na powierzchni nerek stwierdzono punkcikowate wynaczynienia, w płucach wybroczyny i zawały. Podobne zmiany sekcyjne lecz o mniejszym nasileniu występowały u pozostałych psów kontrolnych, uspijonych 15 dnia po zakażeniu. Spośród psów uodpornianych zmiany sekcyjne, w postaci wybroczyn w płucach, stwierdzono tylko u jednego psa, który otrzymał Stagloban SHL w ilości 0,5 ml. Izolacji leptospir dokonano z nerek 3 psów szczepionych preparatem doświadczalnym C.3. w dawce 1,0 ml/sz., z nerki jednego psa uodpornianego preparatem Stagloban SHL w dawce 0,5 ml/szt., oraz od wszystkich psów kontrolnych. Nie izolowano leptospir od psów, które otrzymały dwukrotnie zwiększone dawki preparatów.

Miana aglutynin po challenge'u w surowicach poszczególnych psów przedstawiono w tab. 2.

gu 14 dniowego okresu obserwacji po zakażeniu, nie stwierdzono podwyższenia ciepłoty ciała, żółtaczki i zmian w ogólnym stanie zdrowia. Natomiast spośród czterech psów kontrolnych jeden padł z objawami uogólnionej żółtaczki, a u pozostałych stwierdzono gorączkę, krew w kale oraz żółtaczkę spojówek i śluzówki j. ustnej.

W badaniu zastosowano lecznicze oraz dwukrotnie wyższe dawki globulin. Mimo tego u psów, które otrzymały dawki lecznicze, przy braku klinicznych objawów choroby, stwierdzono w nerkach leptospiry. Drobnoustroje izolowano częściej od psów uodpornianych preparatem doświadczalnym C.3., niż preparatem Stagloban SHL. Leptospir nie izolowano z nerek psów, które otrzymały preparaty w dawkach dwukrotnie wyższych od leczniczych.

W patogenezie leptospirozy istotną rolę odgrywa faza leptospiremii. Jeśli po wniknięciu do krwiobiegu leptospiry nie napotykają dostatecznej ilości przeciwciał, dochodzi do namnożenia zarazków i choroby z towarzyszącymi objawami klinicznymi. Najczęściej przy tym ulegają zakażeniu nerki i w przypadku ozdrowienia zwie-

Tab. 2. Wartość ochronna komponentu *anti-icterohaemorrhagiae* w preparacie Stagloban SHL i w preparacie doświadczalnym C.3. Badanie na psach

Numer psa	Preparat	Dawka preparatu	Dawka szczepu zjadliwego — ilość leptospir/szt.	Objawy kliniczne choroby	Izolacja leptospir z nerek	Miano aglutynin 2 tygodnie po challenge'u
1.	Stagloban SHL	0,5 ml	4×10 ⁸	—	—	1:10240
2.		0,5 ml		—	—	1:10240
3.		0,5 ml		—	+	1:2560
4.		1,0 ml		—	—	1:2560
5.		1,0 ml		—	—	1:1280
6.	C.3.	1,0 ml	4×10 ⁸	—	+	1:2560
7.		1,0 ml		—	+	1:5120
8.		1,0 ml		—	+	1:5120
9.		2,0 ml		—	—	1:1280
10.		2,0 ml		—	—	1:320
11.		2,0 ml		—	—	1:1280
12.	Kontrola	—	4×10 ⁸	+	+	1:10240
13.		—		+	+	1:20480
14.		—		+	+	1:20480
15.		—		padł	+	nb

Objaśnienia: — = brak objawów klinicznych; negatywny wynik izolacji, + = objawy kliniczne; pozytywny wynik izolacji; nb = nie badano.

Najwyższe miana stwierdzono u psów kontrolnych — od 1:10 240 do 1:20 480. Psy, które otrzymały globuliny wykazywały miana o 1—4 rozcieńczenia niższe, przy czym u zwierząt uodpornianych zwiększonymi dawkami stwierdzano niższy poziom aglutynin.

Wyniki badań przeprowadzonych na psach wskazują, że jednokrotne podanie preparatów przeciwciał, w zastosowanych dawkach, skutecznie zabezpiecza psy przed kliniczną postacią leptospirozy. U psów uodpornianych, w cią-

rzę pozostaje siewcą. W wielu przypadkach poziom przeciwciał może być wystarczający, aby zapobiec chorobie z objawami klinicznymi, jest jednakże za niski, aby nie dopuścić do infekcji nerek. Czas trwania i nasilenie leptospiremii znajduje swoje odbicie w poziomie aglutynin w surowicach zakażonych zwierząt (2, 6, 8). W badaniach własnych nie określano wprawdzie czasu trwania leptospiremii, jednakże uzyskane wyniki potwierdzają powyższy pogląd. U psów kontrolnych (tab. 2) rozmnażające się bez prze-

szkód leptospiry dłużej stymulowały powstawanie aglutynin, wskutek czego miana przeciwciał były wysokie 1:10 240 — 1:20 480. U zwierząt uodpornionych, przeciwciała ograniczały rozmnażanie się leptospor, dlatego też miana te były niższe 1:1280 — 1:10 240, szczególnie u psów, które otrzymały większe dawki preparatów.

Ważny problem epizootyczny stanowi stan siewstwa u psów, nie wykazujących klinicznych objawów choroby. Bierne zabezpieczenie młodych psów przed zakażeniem, a także leczenie zwierząt chorych surowicami o małej wartości (lub stosowanie za małych dawek), może bowiem chronić zwierzęta przed kliniczną postacią choroby, nie chroniąc ich przed infekcją nerek. Stwarza to niebezpieczeństwo siewstwa i zakażenia poprzez moczu otoczenia, w tym również człowieka.

W przedstawionych badaniach dopiero dwukrotna dawka lecznicza globulin zapewniła psom pełną ochronę, zarówno przed kliniczną postacią choroby, jak i przed zakażeniem nerek. Należy jednak mieć na uwadze fakt, że leczenie zwierząt z klinicznymi objawami leptospirozy, nawet dużymi dawkami surowicy, nie daje pewności ochrony przed zakażeniem nerek, ponieważ do infekcji mogło dojść przed rozpoczęciem leczenia. W takich przypadkach do zlikwidowania zakażenia nerek i siewstwa konieczne jest zastosowanie streptomycyny.

Zależność między wynikami testu na chomikach a rezultatem kontrolnego zakażenia psów

Celem niniejszej pracy, poza określeniem wartości ochronnej komponentu leptospirowego badanych preparatów, było ustalenie, czy ocena globulin za pomocą biernego testu ochronnego na chomikach, odpowiada ich wartości określonej bezpośrednio na psach, poddanych zakażeniu kontrolnemu. Z porównania wyników obu testów wynika, że 1/16 dawki preparatów (na 1 kg wagi ciała) chroniącej psy przed kliniczną postacią leptospirozy, zabezpieczała chomiki przed śmiercią, 1/32 dawki dawała chomikom tylko częściową ochronę. W badaniu na psach nie zastosowano minimalnych dawek profilaktycznych, lecz wyniki testu na chomikach wydają się wskazywać, że również one chroniłyby psy przed kliniczną leptospirozą. Przeprowadzone badania potwierdziły możliwość oceny wartości surowic za pomocą testu ochronnego na chomikach oraz stosowania do tego celu omawianych kryteriów, używanych przez innych badaczy (5).

Niektórzy autorzy (3, 4, 5, 6) wyrażają pogląd, że preparaty przeciwko leptospirozom powinny chronić uodporniane zwierzęta również przed nerkową formą leptospirozy. Wydaje się, że jest to szczególnie zasadne w przypadku szczepionek i surowic przeznaczonych dla psów. Huhn (5) w badaniach analogicznych do niniejszych stwierdził, że na podstawie badania przeżywal-

ności chomików nie można wnioskować o odporności psów na zakażenie nerek. W badaniach własnych poza przeżywalnością określono również zakażenie nerek u chomików i stwierdzono, że 1/8 dawki (na 1 kg c.c.) zabezpieczającej psy przed zakażeniem nerek, chroniła również chomiki przed podobną infekcją. Ustalenie dokładnych zależności między wynikami na psach i chomikach, pod kątem ochrony przed zakażeniem nerek, wymaga badań na szerszym materiale.

Wnioski

1. Preparaty globulinowe — Stagloban SHL oraz preparat doświadczalny C.3., zastosowane w dawkach leczniczych, chroniły psy przed kliniczną postacią leptospirozy, po doświadczalnym zakażeniu *L. interrogans serotyp icterohaemorrhagiae*.

2. Dawki lecznicze obu preparatów nie zabezpieczały psów przed zakażeniem nerek. Ochronę przed infekcją nerek zapewniły dopiero dawki dwukrotnie wyższe.

3. Potwierdzono przydatność biernego testu ochronnego na chomikach do oceny surowic anty-leptospirowych i ustalono zależność między wynikami tego testu a wynikami kontrolnego zakażenia psów. Stwierdzono, że 1/16 dawki (na 1 kg c.c.) chroniącej psy przed kliniczną leptospirozą, zabezpieczała chomiki przed 10 LD₁₀₀.

4. Stwierdzono, że badane preparaty odpowiadały wymogom stawianym tego typu preparatom za granicą: 50% minimalnej dawki profilaktycznej na 0,5 kg c. c. psa, chroniło 100% chomików przed 10 LD₁₀₀.

5. W surowicach psów odpornych na zakażenie, miana aglutynin po dokonanych challenge'u były niższe niż u psów kontrolnych.

Piśmiennictwo

1. British Vet. Codex 1965, suppl. 1970, 149.
2. Gillespie R. W. H., Kenzy S. G.: Vet. Med. 54, 12, 1959.
3. Huhn R. G.: J. Am. vet. med. Ass. 160, 634, 1972.
4. Huhn R. G., Hanson L. E., Killinger A. H., Cardella M. A.: Am. J. vet. Res. 36, 59, 1975.
5. Huhn R. G., Kokjohn J. L., Cardella M. A.: Am. J. vet. Res. 36, 67, 1975.
6. Morsi H. M., Shibley G. P., Strother H. L.: Am. J. vet. Res. 34, 175, 1973.
7. Stalheim O. H. W.: J. Bact. 89, 545, 1965.
8. Tripathy D. N., Hanson L. E., Mansfield M. E.: Am. J. vet. Res. 37, 51, 1976.

Adres autora: dr Janusz Nowakowski, ul. Woj. Pol. 17/18, 24-100 Puławy.

Новаковский Я. — Пассивный иммунитет собак и хомьяков против экспериментальной инфекции *Leptospira interrogans* серотип *icterohaemorrhagiae*.

Была определена защитная стоимость лептоспирного компонента в сопряженном глобулиновом препарате Stagloban SHL и в аналогичном вирусного штамма серотипа *icterohaemorrhagiae*. Оба исследуемых препарата, примененные в лечебных дозах, предохраняли собак от клинической формы лептоспироза. Вышеупомянутые дозы не защищали собак от инфекции почек. Защиту от инфекции почек несли лишь дозы в два раза больше. Была установлена корреляция между защитной стоимостью сывороток, определенной непосредственно на собаках, поддер-

гнутых контрольной инфекции, и при помощи пассивного охранного теста на хомьяках. Было обнаружено, что 1/16 дозы (на 1 кг в.т.), защищающей собак от клинического лептоспироза, предохраняла хомьяков от 10 LD₁₀₀ вирулентного штамма серотипа icterohaemorrhagiae. В сыворотках собак, невосприимчивых к инфекции, титры агглютининов после challenge-а были ниже чем в сыворотках контрольных собак.

Nowakowski J. — **Passive immunity of dogs and hamsters in case of experimental infection with *Leptospira interrogans*, serotype icterohaemorrhagiae.**

The value of the protective component of *Leptospira* in the globulin preparation Stagloban SHL and in

the experimental product C.3 against a virulent strain of *Leptospira icterohaemorrhagiae* was examined. The both drugs given at curative doses protected dogs against clinical form of leptospirosis. But the above doses of the drugs did not protect the dogs against infection of kidneys; only twice higher doses proved to be effective. The correlation was estimated between the protective value of sera, determined directly on dogs experimentally infected and the data obtained by means of protective test on hamsters. It was found that the 1/16 dose per 1 kg of body weight protecting dogs against clinical form of leptospirosis was effective against 10 LD₁₀₀ of a virulent strain of *Leptospira icterohaemorrhagiae* for hamsters. The level of agglutinins in the sera of dogs after challenge was lower than that in control animals.

MIROSLAWA ROŻAŃSKA, FIODOR KIRŻAJEW

Przydatność odczynu precypitacji w żelu agarowym do wykrywania kur zakażonych zarazkami *S. pullorum*

Z Zakładu Badania Chorób Drobiu Instytutu Weterynarii w Puławach

Z Zakładu Mikrobiologii Wszeczwiązkowego Naukowo-Badawczego Instytutu Chorób Ptaków w Leningradzie

W zwalczaniu pulorozy zasadnicze znaczenie mają badania serologiczne, polegające na wykrywaniu swoistych przeciwciał w surowicy krwi kur zakażonych zarazkami *S. pullorum*. Powszechnie stosowaną metodą przyżyciowego wykrywania nosicieli zarazków białej biegunki piskląt jest odczyn zlepty ze świeżą kroplą krwi. Jednak odczyn ten jak wskazują doniesienia szeregu autorów (2, 3, 4, 5), daje niekiedy reakcje nieswoiste (tzw. „non-pullorum”), nie zawsze możliwe do odróżnienia, na podstawie charakteru zleptów, od aglutynacji swoistej. Aoki i wsp. (1) do wykrywania swoistych przeciwciał anty — *S. pullorum* w surowicy ptaków zakażonych, zastosowali odczyn precypitacji w żelu agarowym. Autorzy ci wykazali, że test precypitacji pozwala na wyeliminowanie ptaków wykazujących reakcje „non-pullorum” w odczynie aglutynacji płytowej z pełną krwią.

Założeniem niniejszej pracy było opracowanie antygeny do odczynu precypitacji w żelu agarowym, przebadanie czułości tego testu na ptakach sztucznie zakażonych oraz prześledzenie jego korelacji z odczynem zlepty.

Materiał i metody

Szczep *S. pullorum*. Do badań użyto szczepu Sp₁₁ *S. pullorum*, otrzymanego z Central Veterinary Laboratory, Weybridge, Anglia.

Surowice. Surowice dodatnie uzyskano na drodze uodporniania 3 miesięcznych kurcząt zawiesiną szczepu *S. pullorum* otrzymaną z 18-to godzinnej hodowli na agarze zwykłym. Gęstość zawiesiny odpowiadała 3 próbce skali McFarlanda. Wykonano 4 iniekcje domięśniowe, w dawkach wzrastających od 0,2 do 1 ml, w odstępach 3 dniowych, a następnie po 7 dniach cykl iniekcji dożylnych stosując dawki 0,2; 0,5; 1,0 i 1,0 ml,

również w odstępach 3 dniowych. Po tygodniu od ostatniej iniekcji ptaki skrawiono. Miana aglutynacyjnie uzyskanych surowic wynosiły od 1:640 do 1:1280.

Surowice ujemne uzyskano od ptaków zdrowych wykazujących ujemną reakcję aglutynacji, z których, po skrawieniu, nie izolowano *S. pullorum*.

Antygeny do odczynu aglutynacji.

Do aglutynacji płytowej z pełną krwią używano antygeny „Pullognost” produkcji Puławskich Zakładów Przemysłu Bioweterynaryjnego (Biowet).

Do aglutynacji próbkowej używano zawiesiny bakteryjnej przygotowanej w sposób następujący: hodowlę *S. pullorum* na agarze zwykłym splukano płynem fizjologicznym, zawiesinę odwirowano, masę bakteryjną zawieszono w płynie fizjologicznym z dodatkiem 0,5% fenolu, przyjmując około 50 mg wilgotnej masy bakteryjnej na 1 ml płynu. Uzyskaną w ten sposób zawiesinę rozcieńczano 1:10.

Wyciągi bakteryjne.

Przygotowano dwa rodzaje wyciągów:

— wyciąg wodny wg metody Whiteside i Bakera (6), która polega na dwukrotnym ekstrahowaniu, przez 24 godziny w temp. +4°C., wodą destylowaną bakterii *S. pullorum* wysuszonych acetonem. Uzyskany po odwirowaniu płyn z nad osadu z 1 i 2 ekstrakcji dializowano w wodzie destylowanej i liofilizowano. Preparat otrzymany w ten sposób oznaczono symbolem WW.

— wyciąg fenolowy otrzymano metodą Westphala i wsp. (7) stosując do ekstrakcji wysuszonych acetonem bakterii mieszaninę fenolu z wodą o temp. 63—65°C. Z fazy wodnej, po dializie i cześciowym zagęszczeniu, wytrącano zimnym (+4°C) 96% etanolem i lipowielocukier zawierający kwasy nukleinowe. Preparat ten określono symbolem WF.

Ptaki doświadczalne.

Doświadczenie II przeprowadzono na 24 kurczętach w wieku 6 tyg. rasy ogólnoużytkowej. Kurczęta przed zakażeniem poddano wstępnym badaniom serologicznym przy użyciu ww. antygenów. Ptaki te nie wykazywały obecności przeciwciał anty — *S. pullorum*.