

Вальковьяк Э., Стажиньская Я. — Исследование биологического состояния замерших зародышей кур, гусей и уток.

Предпосылкой работы было определение бактериологического состояния замерших зародышей кур, гусей и уток, как и производственных помещений инкубаторных станций. Констатировали высокую степень бактериальной инфекции замерших зародышей, причем эмбрионы гусей и уток были в большей степени инфицированы палочками *Salmonella*, аэробными бациллами и *Proteus vulgaris* чем эмбрионы кур, а в меньшей степени *E. coli* и кокками. Также высокую степень инфекции бактериальной и микозной микрофлорой обнаружили в помещениях инкубаторных станций, что вместе с инфекцией содержимого яиц повлияло на большую замираемость зародышей.

Walkowiak E., Starzyńska J. — Bacteriological examination of hen, goose and duck embryos dead.

The purpose of the work was to determine the bacteriological state of dead embryos and production premisses in hatcheries. A high degree of bacterial infection of dead embryos was found. Goose and duck embryos compared with hen embryos were more often infected with *Salmonella* sp., aerobic bacilli and *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli* and cocci played a minor role in the infection. A high extent of bacterial and mycotic flora was found out also in premisses of hatcheries. This unfavourable state brought about the infiltration of bacterial cells into eggs and their deaths.

STEFAN STĘPKOWSKI, JANUSZ ZARZYCKI, GRAŻYNA WRZOŁEK-ŁOBOCKA

Wartość odczynów podwójnej dyfuzji w żelu oraz jedno- i dwuwymiarowej immunoelektroforezy przy określaniu właściwości seroantygennych *Pasteurella multocida*

Z Zakładu Chorób Drobiu Instytutu Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych
Wydziału Weterynaryjnego AR w Lublinie

Od czasu wprowadzenia jednolitej nazwy gatunkowej *Pasteurella multocida* badania nad serologiczną klasyfikacją izolowanych od różnych gatunków zwierząt szczepów tego zarazka uległy nasileniu. Początkowo klasyfikację tę starano się oprzeć o odczyn adsorpcji aglutynin, aglutynacji próbowkowej, aglutynacji szkiełkowej, precipitacji pierścieniowej (3) oraz o odczyn ochronnego działania swoistej surowicy („serum protection test”) na myszkach (14). W 1955 r. Carter, wykorzystując zdolność adsorbowania przez erytrocyty antygeny otoczkowego *P. multocida* użył do podziału szczepów tego drobnoustroju na grupy serologiczne odczynu hemaglutynacji pośredniej (2).

Wprowadzenie techniki precipitacji dyfuzyjnej w żelu dostarczyło nowych możliwości badania struktury seroantygennowej *P. multocida*. London i Yaw (11) pierwsi zastosowali odczyn pojedynczej dyfuzji w żelu do badań właściwości antygenowych różnych form wzrostowych *P. multocida*. Z kolei Heddleston i Watko (5) wykorzystali odczyn podwójnej dyfuzji w żelu dla określenia immunogenności jedno-, dwu- i trójwartościowych szczepionek *P. multocida*. Następnie Heddleston i wsp. (6) przy pomocy tego odczynu stwierdzili u 2 szczepów ptasich *P. multocida* występowanie zarówno identycznych, jak też odmiennych serologicznie komponent antygenowych. Dalsze badania Heddlestona i wsp. (7) wykazały użyteczność odczynu podwójnej dyfuzji w żelu, przy zastosowaniu ogrzewanych wyciągów antygenowych *P. multocida*, dla serologicznej klasyfikacji tego drobnoustroju. W 1975 r. Heddleston i Rebers (8) donieśli o wyodrębnieniu tym odczynem wśród szczepów *P. multocida*

od różnych gatunków zwierząt przynajmniej 15 serotypów.

Odmianą odczynu podwójnej dyfuzji w żelu jest odczyn immunoelektroforezy, który może być wykonany techniką jednowymiarową wg Grabara i Williamsa (4) lub techniką dwuwymiarową wg Laurella (10). Przydatność tego odczynu w uzupełnieniu rezultatów badań właściwości seroantygennych *P. multocida*, uzyskanych odczynem podwójnej dyfuzji w żelu, stwierdzili Heddleston i wsp. (7).

Badania niniejsze podjęto w celu porównania stopnia użyteczności, przy określaniu struktury antygenowej szczepów *P. multocida*, 3 odczynów: odczynu podwójnej dyfuzji w żelu, odczynu immunoelektroforezy jednowymiarowej oraz immunoelektroforezy dwuwymiarowej.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono ze szczepem własnym *Pasteurella multocida* P1, wyizolowanym z padłej wskutek ostrej pasterelezy kury. Surowicę do odczynów serologicznych uzyskano od królików uodpornionych zmieszaną aa z pełnym adiuwantem Freunda zawieszoną zarazką. Zawiesinę do uodporniania zwierząt sporządzano z 24 godz. hodowli agarowej *P. multocida* P1, splukanej płynem fizjol. Zawiesinę zarazka po 3-krotnym przepłukaniu płynem fizjol. doprowadzano do gęstości 20 mg/ml białka całkowitego. Przed rozpoczęciem uodporniania królików zawiesinę pięciokrotnie zamrażano (-12°C) i odmrażano (20°C).

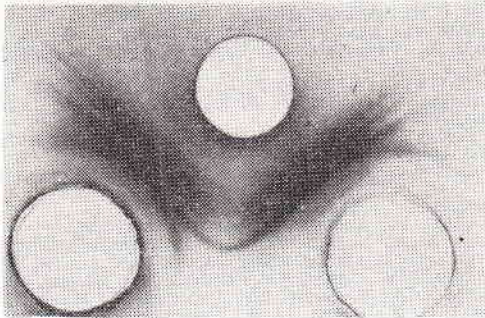
Zmieszaną z pełnym adiuwantem Freunda zawieszoną *P. multocida* P1 wprowadzano królikom podskórnie w odstępach tygodniowych w dawkach: 0,2 ml, 0,4 ml, 0,6 ml, 0,9 ml, 1,2 ml, 1,5 ml. Przy pierwszych 3 iniekcjach stosowano antygen z dodatkiem 0,3% formolu, do dalszych używano antygeny nieformolizowanego. Po upływie 12 dni od ostatniej iniekcji króliki skrawiano i uzyskaną surowicę przecho-

wywano w stanie zamrożenia (-12°C), bez dodatku środka konserwującego.

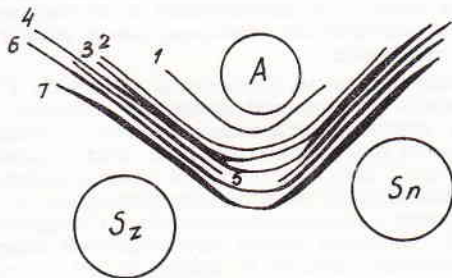
Jako antygen do odczynów używano tej samej zawiesiny *P. multocida* (bez dodatku formolu), jaką stosowano przy hiperimmunizacji królików z tą różnicą, że poddano ją dodatkowo rozbięciu ultradźwiękami (24 Kc/sek. przy 100 W, dwukrotnie przez okres 2 min., przy temperaturze nie przekraczającej 10°C).

Odczyn podwójnej dyfuzji w żelu wykonywano na płytkach szklanych, pokrytych warstwą 2 mm 0,5% agarozы (Schwarz-Mann, Orangeburg, New York), przygotowanej na płynie fizjol. W płytce wycinano 1 studzienkę na antygen ($\phi=7$ mm) oraz w odległości po 8 mm od niej 2 studzienki na surowicę ($\phi=9$ mm). Najpierw wprowadzano do jednej z większych studzienek 0,15 ml surowicy królika uodpornionego niezagęszczonej, do drugiej z tych studzienek tę samą dawkę surowicy dwukrotnie zagęszczonej. Po upływie 15 min, wprowadzano do mniejszej studzienki 0,1 ml antygeny, a jednocześnie uzupełniano większe studzienki dawką 0,05 ml odpowiedniej (niezagęszczonej lub zagęszczonej) surowicy. Po nastawieniu odczynu płytkę umieszczano w komorze wilgotnej i przenoszono ją do cieplarki (37°C) na okres 24 godz., a następnie pozostawiano ją przez dalsze 24 godz. w temp. pokojowej. Wynik odczynu odczytywano w świetle przechodzącym, wykreślając stwierdzone linie precypitacyjne odrębnie na papierze. Ponadto w celach dokumentacyjnych rezultat odczynu przenoszono rzutnikiem na papier fotograficzny.

Ze względu na stwierdzenie w odczynie dyfuzji w żelu większej liczby i wyraźniejszych linii precypitacyjnych z surowicą zagęszczoną w porównaniu do surowicy niezagęszczonej (ryc. 1) do obu odczynów immunoelektroforezy używano jedynie surowicy zagęszczonej.



Ryc. 1. Odczyn podwójnej dyfuzji w żelu
Objaśnienia: A — zawiesina *P. multocida*, S — surowica nie zagęszczona, S_n — surowica zagęszczona.



Odczyn immunoelektroforezy jednowymiarowej wykonywano przy użyciu 0,9% agarozы (Fluka A. G., Buchs S. G.), przygotowanej na buforze weronalowym o $\text{pH}=8,3$ (*Acidum veronalum* 1,0, *Veronalum natrium* 5,0, *Natrium chloratum* 1,0, *Aqua redestil. ad 1000*) z dodatkiem 0,01% mertiolatu. Rozpuszczoną agarozę wlewano, do grubości 2 mm, na płytki szklane i po jej zastygnięciu wycinano basenik na antygen ($\phi=7$ mm)

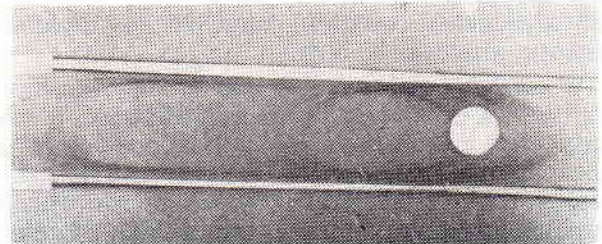
oraz w odległości 3 mm od krawędzi basenika rowek na surowicę szerokości 2 mm. Po wypełnieniu baseniku 0,1 ml antygeny umieszczano płytkę w komorze elektroforetycznej (której kuweta zawierała bufor weronalowy o $\text{pH}=8,3$) i działano prądem elektrycznym o napięciu liniowym 6 V/cm i natężeniu 15–20 mA przez okres 3 godz. Następnie do rowka wprowadzano najpierw 0,35 ml surowicy hiperimmunizowanego królika i po upływie 20 min. dodawano surowicę powtórnie w ilości 0,1 ml. Z kolei umieszczoną w komorze wilgotnej płytkę przenoszono do cieplarki na okres 48 godz., po czym pozostawiano ją w temp. pokojowej przez dalsze 24 godz. Wynik reakcji rejestrowano podobnie jak przy odczynie podwójnej dyfuzji w żelu.

Odczyn immunoelektroforezy dwuwymiarowej wykonywano wg zmodyfikowanej nieco techniki Thirkilla i Kenny'ego (15). Do pierwszej fazy reakcji przygotowywano płytki szklane, pokryte agarozą zmieszaną z normalną surowicą króliczą (7,2 ml ostudzonej do temp. 56°C agarozы+1 ml surowicy). Po zastygnięciu agarozы wycinano blisko lewego, dolnego rogu płytki studzienkę ($\phi=7$ mm), wprowadzano do niej antygen i poddawano go rozdzielowi immunoelektroforetycznemu, podobnie jak w przypadku immunoelektroforezy jednowymiarowej.

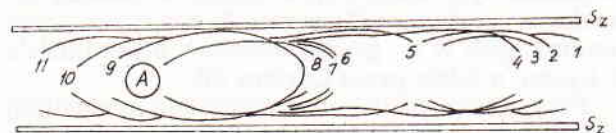
W drugiej fazie reakcji usuwano z płytki znajdującą się nad studzienką część agarozы i na jej miejsce wlewano agarozę, zmieszaną z surowicą królika hiperimmunizowanego szczepem *P. multocida* P1 (5,4 ml agarozы+0,7 ml surowicy). Następnie powtórnie przenoszono płytkę do komory elektroforetycznej, umieszczano ją jednak w pozycji prostopadłej do zajmowanej przez płytkę w pierwszej fazie reakcji. Z kolei działano na płytkę prądem elektrycznym o napięciu liniowym 7,5 V/cm i natężeniu 10 mA przez okres 12 godz. Odczytywanie i utrwalanie wyniku reakcji było podobne jak przy immunoelektroforezie jednowymiarowej.

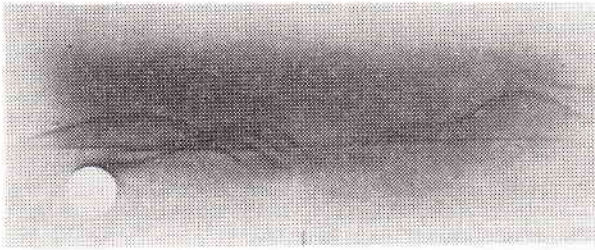
Wyniki i omówienie

Odczynem podwójnej dyfuzji w żelu wykazano w użytym do badań szczepie *P. multocida* P1 występowanie 7 komponent antygenowych (ryc. 1, reakcja z surowicą zagęszczoną). Odczynem immunoelektroforezy jednowymiarowej ujawniono u tego samego szczepu 11 komponent antygenowych (ryc. 2), a odczynem immunoelektroforezy dwuwymiarowej 13 komponent antygenowych (ryc. 3).

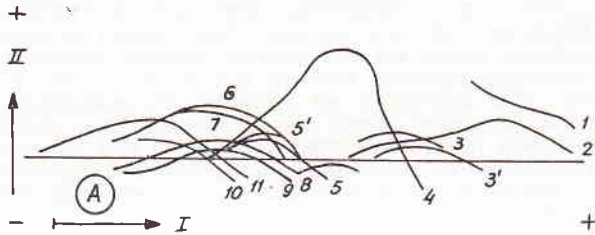


Ryc. 2. Odczyn immunoelektroforezy jednowymiarowej (objaśnienia jak na ryc. 1)





Ryc. 3. Odczyn immunoelektroforezy dwuwymiarowej (objaśnienia jak ryc. 1)



Pierwsze próby określania właściwości seroantygennych różnych szczepów *P. multocida* doprowadziły do opracowania kilku, opartych na znanych wówczas odczynach serologicznych, metod klasyfikacji zarazka. Wśród szczepów, pochodzących od różnych gatunków zwierząt, metodą aglutynacji szkiełkowej udało się wyodrębnić 3 serotypy (Little i Lyon, 1943), metodą „serum protection test” na myszkach 4 serotypy (Roberts, 1947), a odczynem hemaglutynacji pośredniej (Carter, 1955) 5 serotypów *P. multocida* (1, 2, 3).

Jednakże wkrótce przekonano się, że wymienione odczyny serologiczne nie zawsze wykazują odmiennosć szczepów *P. multocida* o różnych właściwościach fermentacyjnych oraz immunologicznych (13) oraz że odczyn hemaglutynacji pośredniej jest nieprzydatny w przypadku szczepów zarazka o niskiej zawartości antygenu otoczkowego (12). Chociaż więc powyższe metody serologicznej klasyfikacji szczepów *P. multocida* znalazły u poszczególnych badaczy uznanie, niemniej zagadnienie dokładnego oznaczenia właściwości seroantygennych tego drobnoustroju pozostało otwarte.

W 1957 r. London i Yaw pierwsi użyli odczynu dyfuzji w żelu do badania właściwości seroantygennych *P. multocida* i przy pomocy tego odczynu stwierdzili u bezotoczkowej i otoczkowej postaci 2 szczepów tego drobnoustroju 6 wspólnych komponent antygennych (11). Szczególną uwagę na przydatność odczynu podwójnej dyfuzji w żelu w klasyfikacji serologicznej *P. multocida* zwrócili Heddleston i wsp., którzy wykazali tym odczynem u szczepów ptasich zarazka 5 serotypów (7) wobec 2 serotypów, wyosobnionych w tej grupie szczepów przez Little'a i Lyona, a także przez Cartera (3).

Przy okazji badań nad odczynem podwójnej dyfuzji w żelu Heddleston i wsp. dodatkowo

stwierdzili użyteczność odczynu immunoelektroforezy przy określaniu struktury seroantygennowej *P. multocida* (7). Z zestawienia rezultatów obserwacji Kenny'ego oraz Thirkilla i Kenny'ego nad mykoplazmami wynika, że odczynem immunoelektroforezy można wykryć znacznie większą liczbę komponent antygennych niż odczynem podwójnej dyfuzji w żelu (9, 15).

Rezultaty własnych obserwacji ze szczepem *P. multocida* P1 w pełni potwierdzają wyniki cytowanych badań nad mykoplazmami. Obydwa odczyny immunoelektroforezy wykazały w tej samej zawieszynie *P. multocida* P1 większą liczbę komponent antygennych od odczynu podwójnej dyfuzji w żelu. Szczególnie dokładny rozdział tych komponent uzyskano w odczynie immunoelektroforezy dwuwymiarowej; gdyby przyjąć liczbę wykrytych tym odczynem komponent antygennych za 100%, wówczas odsetek komponent, ujawnionych odczynem immunoelektroforezy jednowymiarowej wynosiłby 84,6%, a stwierdzonych odczynem podwójnej dyfuzji w żelu zaledwie 53,8%.

Wyniki badań własnych przemawiają za dużo większą przydatnością odczynów immunoelektroforezy jedno-, a zwłaszcza dwuwymiarowej do klasyfikacji serologicznej *P. multocida* niż odczynu podwójnej dyfuzji w żelu.

Piśmiennictwo

1. Carter G. R.: Can. J. Med. Sci. 30, 48, 1952.
2. Carter G. R.: Am. J. vet. Res. 16, 481, 1955.
3. Caretr G. R.: Adv. vet. Sci. 11, 321, 1967.
4. Grabar P., Williams C. A.: Biochim. biophys. Acta 10, 193, 1953.
5. Heddleston K. L., Watko P. L.: Avian Dis. 9, 367, 1965.
6. Heddleston K. L., Rebers P. A., Ritchie A. E.: J. Immun. 96, 124, 1966.
7. Heddleston K. L., Gallagher I. E., Rebers P. A.: Avian Dis. 16, 925, 1972.
8. Heddleston K. L., Rebers P. A.: Am. J. vet. Res. 36, 573, 1975.
9. Kenny G. E.: J. Bact. 98, 1044, 1969.
10. Laurell C. B.: Analyst. Biochem. 10, 358, 1965.
11. London S. A., Yaw K. E.: Can. J. Microbiol. 3, 1021, 1957.
12. Namioka G. R., Murata M.: Cornell Vet. 51, 498, 1961.
13. Namioka G. R., Murata M.: Cornell Vet. 54, 520, 1964.
14. Roberts R. S.: J. comp. Path. Therap. 57, 261, 1947.
15. Thirkill G. E., Kenny G. E.: Infection and Immunity, 10, 624, 1974.

Adres autora: prof. dr Stefan Stępkowski, Langiewicza 3 m. 6, 20-032 Lublin.

Степковский С., Зажицкий Я., Вжолек-Лобоцкая Г. — Ценность реакций двойной диффузии в геле, а также одно- и двухмерного иммуноэлектрофореза при определении сероантисгенных свойств *Pasteurella multocida*.

На модели штамма *Pasteurella multocida* P1, изолированного от павшей вследствие острого пастереллеза курицы, исследовали степень распределения взвести возбудителя болезни после применения каждой из 3 реакций: двойной иммунодиффузии в геле, одномерного иммуноэлектрофореза, а также двухмерного иммуноэлектрофореза. Сыворотку для реакций получили путем многократной иммунизации кроликов взвесью *P. multocida* P1, смешанной с полным адьювантом Фрейнда. В разбитой через замораживание и размораживание, а затем применение ультразвуков, взвеси микроорганизма больше всего, т. е. 13 антигенных компонентов обнаружены реакцией двухмерного иммуноэлектрофореза. Реакция одномерного иммуноэлектрофореза показала 11 (84,6%) компонентов, а реакция двойной диффузии в геле лишь 7 (53,8%) компонентов.

Исследования указывают на большую пригодность обеих реакций иммуноэлектрофореза, а осо-

бенно реакции двухмерного иммуноэлектрофореза, для распределения *P. multocida* на серологические группы чем реакции двойной диффузии в теле.

Stępkowski S., Zarzycki J., Wrzolek-Lobočka G. — **The assay of double immunodiffusion test and immunoelectrophoresis in determining antigenic properties of *Pasteurella multocida*.**

Using the strain of *P. multocida* P1, isolated from the dead hen due to poststreptococcosis, the degree of components separation of the pathogen was evaluated. Three tests were used: a — double diffusion in agar,

b — one-dimension and two-dimension immunoelectrophoresis. The specific antiserum was obtained by immunisation of rabbits with the suspension of *P. multocida* P1 mixed with equal volume of complete Freund's adjuvant. The suspension was destroyed by freezing and thawing and then by ultrasonication. Thirteen antigenic components were found by two-dimension immunoelectrophoresis. One-dimension immunoelectrophoresis revealed 11 components (84.6%) and double diffusion test only 7 (53.8%). The findings indicate that two-dimension immunoelectrophoresis is more useful than the two others to determine serological groups of *P. multocida*.

TERESA MALANOWSKA

Synergiczne działanie trimetoprimu i sulfonamidów na szczepy *Pasteurella multocida* izolowane od różnych gatunków zwierząt

Z Zakładu Higieny Weterynaryjnej w Łodzi

W ostatnich latach przeprowadzono szereg badań nad nową formą leków sulfonamidowych o działaniu wzmocnionym przez dodatek trimetoprimu — związku o działaniu antymetabolicznym wobec kwasu foliowego. Łączne jego zastosowanie z sulfonamidem, który z kolei pełni funkcję antymetabolitu kwasu paraaminobenzoowego, drugiego obok kwasu foliowego czynnika wzrostowego komórki bakteryjnej sprawia, że oba te chemioterapeutyki wzajemnie swe działania potęgują, przez co wpływ ich na mikroorganizmy jest znacznie silniejszy, niż przy stosowaniu poszczególnych składników osobno.

Doniesienia literatury światowej (1, 2, 4, 8), jak również pozytywne rezultaty krajowych doświadczeń (3, 5, 6, 7, 9, 10, 11), polegających na stosowaniu tego rodzaju terapeutyków przy leczeniu różnych chorób bakteryjnych u zwierząt skłoniły do bliższego poznania działania połączonych preparatów na *Pasteurella multocida* — drobnoustroj będący niejednokrotnie przyczyną dużych strat w hodowli zwierzęcej.

Celem niniejszej pracy było określenie działania sulfonamidów kojarzonych w różnych proporcjach z trimetoprimem na szczepy *Pasteurella multocida*.

Materiał i metody

Materiał do badań stanowiło 50 szczepów *Pasteurella multocida* wyizolowanych z narządów padłych zwierząt, w tym: 10 szczepów od bydła, 20 szczepów od świń i 20 szczepów od drobiu. Podłożem do izolacji bakterii był agar f-my Difco o pH 7,4 z dodatkiem 5% zhemolizowanej krwi końskiej, do którego dodawano odpowiednie ilości badanych preparatów. W doświadczeniach użyto sulfadoksynę i trimetoprim produkcji RFN, sulfonamidy produkcji krajowej: mardoxin, sulfatiazol, sulfaguanidyna, sulfametazyna, sulfachinoksalina, amidoxal oraz mieszanki sulfonamidów p.n. enteramid i polisulfamid, ponadto preparat krajowy — trimerazin.

Wymienione terapeutyki przygotowywano do doświadczeń w postaci roztworów podstawowych, z których następnie wykonywano dalsze rozcieńczenia dla

otrzymania odpowiednich koncentracji preparatów w podłożach. Sulfonamidy łączono z trimetoprimem w proporcjach 20:1, 10:1, 5:1.

Na płytki Petriego z przygotowanymi podłożami posiewano metodą kreskową 18-godzinne hodowle bulionowe szczepów *Pasteurella multocida* rozcieńczone płynem fizjologicznym 10^{-8} . Jednocześnie prowadzono kontrolę wzrostu tych samych szczepów bakteryjnych na podłożach bez dodatku terapeutyków. Wyniki badań odczytywano po 18 godzinach inkubacji w temperaturze 37°C. Za najmniejszą dawkę hamującą (MIC) przyjmowano taką ilość preparatu, przy której zahamowanie wzrostu drobnoustrojów wynosiło 90% w stosunku do posiewów kontrolnych.

Wrażliwość badanych drobnoustrojów na biseptol, ampicylinę, chloramfenikol, erytromycynę, gentamycynę, kloksacyklinę, neomycynę, oksytetracyklinę, penicylinę, ryfampicynę, streptomycynę oznaczano na podłożu Mueller-Hintona przy użyciu krążków z antybiotykami produkcji Wytwórni Surowic i Szczepionek w Warszawie. Wyniki interpretowano po 24 godzinach inkubacji, zgodnie z instrukcją producenta. Dodatkowo przeprowadzono badanie wrażliwości szczepów *Pasteurella multocida* na trimerazin nasycając nim krążki bibulowe o średnicy 6 mm — à 25,0 mcg w krążku, analogicznie do nasycenia krążków biseptolem.

Wyniki i omówienie

Przeprowadzone doświadczenia wykazały, że MIC trimetoprimu dla szczepów *Pasteurella multocida* wahały się w granicach od 0,1 do 0,8 mcg/ml, MIC siedmiu różnych sulfonamidów od 2,0 do 32,0 mcg/ml, zaś enteramidu i polisulfamidu od 8,0 do 32,0 mcg/ml. Z użytych sulfonamidów najbardziej aktywną okazała się sulfachinoksalina, która przy koncentracji 8,0 mcg/ml powodowała zahamowanie wzrostu wszystkich badanych szczepów, tylko nieco słabsze działanie wykazały sulfadoksyna i sulfatiazol.

Porównanie działania trimetoprimu i sulfonamidów stosowanych oddzielnie, ze związkami powstałymi z połączenia tych specyfików, wykazało wyraźny synergiczny efekt preparatów skojarzonych, bowiem przy połączeniu obu składników użytych w mniejszych ilościach