

HENRYK BALBIERZ, MARIA NIKOŁAJCZUK, WOJCIECH NOWACKI,  
JERZY MOLENDĄ, LEON KLINIK

## Uodpornianie cieląt przeciw infekcji *Haemophilus somnus* szczepionką „Somnuvac” \*, \*\*)

Katedra Fizjopatologii Wydziału Weterynaryjnego AR, ul. C. Norwida 31, 50-375 Wrocław

Infekcja powodowana przez *Haemophilus somnus* może przebiegać z tak różnym obrazem klinicznym, że zaproponowano ogólną jej nazwę „*Haemophilus somnus complex*” (3). U cieląt drobnoustroj tej najczęściej atakuje układ oddechowy. Układ ten staje się bramą wejścia, a także miejscem namnażania i rozsiewania drobnoustroju oraz punktem wyjścia systemowej inwazji tego drobnoustroju. Ważną rolę w jego rozsiewaniu w środowisku odgrywa nosicielstwo, któremu sprzyja niski stan odporności (8, 14) cieląt po transportach i kompletowaniu grup w obiektach chowu, stłoczenie zwierząt, niewłaściwe obchodzenie się z nimi. Znaczne straty materialne powodowane infekcją tym drobnoustrojem skłoniły do podjęcia w Stanach Zjednoczonych próby opracowania swoistej szczepionki. Od 1977 r. ukazują się w amerykańskim piśmiennictwie wzmianki o stosowaniu w terenie szczepionki Somnugen, Bio-Ceutic Lab., z dobrym skutkiem (6, 13, 15).

Celem pracy jest przedstawienie wyników realizacji programu immunologicznego zabezpieczenia cieląt przed kliniczną infekcją *H. somnus* preparatami własnej produkcji, a to: allogeniczną surowicą anti-*H. somnus* (2) oraz szczepionką z namnożonego i scharakteryzowanego szczepu *H. somnus*, wyizolowanego z płuc padłego cielęcia (10), zwaną tymczasowo „Somnuvac”.

### Materiał i metody

Badania wykonano w fermie UO 500-Z w woj. opolskim, istniejącej od trzech lat. Pierwotny wsad stanowiły przede wszystkim jałowice cielne własnego chowu wybrane z kilku gospodarstw Kombinatu, a także zakupione w obiektach sąsiednich. Roczna wymiana zwierząt w stadzie matczynym była zgodna z założeniami technologii. Ze względu na liczną obsadę zwierząt warunki sanitarno-higieniczne na fermie były trudne. Wychów cieląt był zorganizowany pod kątem przygotowania własnego materiału zwierzęcego do przyszłego remontu stada i dzielił się na trzy okresy: w profilaktorium, rozmieszczonym w obrębie porodówki uwięziowej i ściółkowej, cielęta przebywały do 7–10 dnia życia. W wypajalni cielęta przebywały do ok. 3 mies., a w wychowalni pozostawały do ok. 6 mies. życia. Obydwa cielętniki były położone w obrębie fermy, w sąsiedztwie hal produkcyjnych i porodówki. W wieku około 6 mies. jałowki przeznaczone do hodowli przeprowadzano do jałownika położonego w sąsiednim gospodarstwie, a pozostałe jałowki oraz byczki przeznaczone były na opas. W tak zorganizowanym obiekcie były dogodne wa-

runki do wykonania doświadczalnej immunizacji cieląt, które wracałyby na fermę jako własny reemontowy materiał hodowlany.

Cielęta uodporniano wg następującego planu:

1. uodpornienie bierne wszystkich cieląt w wieku paru tygodni, dawką 100 ml swoistej surowicy allogenicznej o mianie nie niższym niż 1:256, podskórnie i domięśniowo, bezpośrednio po urodzeniu,
2. uodpornienie czynne wszystkich cieląt w wieku paru tygodni, dwukrotną dawką po 2 ml preparatu „Somnuvac”. Jest to zawiesina w buforowanym płynie fizjologicznym szczepu *H. somnus* 223 (10), zabitego formaliną. Szczep hodowano na podłożu agarowym (Cistine Heart Agar-Difco) wzbogaconym dodatkami 10% odwłóknionej krwi bydlęcej oraz 0,5% wyciągu drożdżowego (Yeast Extract-Difco). Hodowla trwała 48 godz. w temp. 37°C, w atmosferze 10% CO<sub>2</sub>. Następnie bakterie zmywano fizjologicznym roztworem NaCl i po jednorazowym przemyciu zawieszano w PBS z dodatkiem 0,5% formaliny. Po 2 godz. inkubacji w temp. 37°C bakterie przemyto płynem fizjologicznym i doprowadzono ich koncentrację do gęstości odpowiadającej wartości ekstynkcji 0,650 przy długości fali 650 nm (fotokolorymetr Spekol).

Zawiesiny tej używano jako szczepionki.

Do systematycznej kontroli miana przeciwciał wybrano 46 cieląt. W celu sprawdzenia okresu, w którym cielęta bierne uodpornione w dniu urodzenia wykazują istotny wzrost miana aglutynin tak dobrano grupy cieląt, by różnice wieku nie przekraczały tygodnia.

Zawartość przeciwciał w surowicach cieląt wyrażono jako log 50% miana aglutynacji. Statystyczną ocenę istotności różnic między porównywanymi grupami cieląt wykonano wg kryterium t Studenta.

### Wyniki i omówienie

Wyniki uzyskane w przebiegu doświadczenia podają tab. 1 i 2. W tab. 1 zebrano dane o efektywności odchowu cieląt na fermie w okresie 3 i pół roku, z czego dwa i pół roku przypada na okres stosowania immunoprofilaktyki przeciw *H. somnus*. Tabela ta zestawia: średnią liczebność cieląt w roku, ilość zachorowań, padnięć oraz procent spadku kosztów leczenia w kolejnych latach, w porównaniu z przyjętymi za 100% kosztami w roku poprzedzającym wprowadzenie immunoprofilaktyki. Z danych tabeli wynika, że w kolejnych latach realizacji programu immunizacji bardzo wyraźnie zmniejszyła się częstość zachorowań, przy prawie nie zmieniającej się obsadzie cielętnika. Wpływało to bezpośrednio na obniżanie kosztów leków, bardzo wyraźne już po pierwszym roku realizacji programu. Uwagę zwraca też zmniejszenie się częstości tzw. martwych urodzeń, widoczne w drugim i trzecim roku obserwacji. Ten fakt wiąże się z podniesieniem swoistej odporności cieląt, ponieważ w stadzie nie były

\* Praca wykonana w ramach problemu MR II-10-3C-3.

\*\* Nazwa zastrzeżona do użytku tymczasowego.

Tab. 1. Padnięcia i zachorowania cieląt oraz koszty leków wyrażone w procentach w stosunku do kosztów w roku poprzedzającym — przyjętych za 100%

Analizowany okres	Liczba cieląt						Średni stan cieleńnika (n)	Koszty leków
	urodzonych (n)	w tym martwiczkorających		padłych				
		n	%	n	%			
Rok przed immunizacją	587	35	5,9	1658	110	18,7	268	100
Pierwszy rok immunizacji	533	37	6,9	743	135	24,9	255	(42)
Drugi rok immunizacji	425	18	4,2	530	51	12,0	224	(22)
Trzeci rok immunizacji i potrocie	217	6	2,7	215	17	7,8	245	(17)*

Objaśnienie: \*) w okresie tym nastąpił wyraźny wzrost cen leków.

wprowadzane na większą skalę inne zasadnicze zmiany. Można więc uważać, że systematyczne zwiększanie swoistej odporności cieląt ograniczyło — po upływie miesięcy — nosicielstwo zarazka i zmniejszyło jego rolę epizootyczną w środowisku fermy. Takie oczekiwanie znajduje potwierdzenie w wynikach badań nad udziałem *H. somnus* w patologii bydła (1, 3, 4, 5, 7, 9, 12—15).

Tab. 2 obrazuje zachowanie się miana aglutynin anti-*H. somnus* u cieląt uodpornionych czynnie. Cielęta otrzymujące pierwszą dawkę antygeny w wieku 3 tyg. i nieco młodsze nie wykazywały istotnej zmiany miana swoistych przeciwciał. Wynikało to zapewne z niezdolności układu immunologicznego zwierząt w tym wieku do pełnej i efektywnej odpowiedzi odpornościowej. Hamujący wpływ na uruchomienie czynnej odpowiedzi mogły ponadto wywierać swoiste przeciwciała utrzymujące się jeszcze z okresu biernej osłony zastosowanej w okresie neonatalnym. Ich obecnością można tłumaczyć wysokie wyjściowe miana aglutynin u cieląt w tym okresie badań. Związanie części przeciwciał przez antygen podany w szczepionce, spowodowało prawdopodobnie obniżenie się miana po pierwszej dawce u cieląt dwu- i trzytygodniowych. Zjawiska tego nie obserwowano u cieląt starszych (4—6 tyg.), u których różnice miana po pierwszej i drugiej

dawce są istotne, w stosunku do miana przed immunizacją. U cieląt tych istotna różnica ( $p=0,001$ ) wystąpiła także między poziomem przeciwciał po pierwszej i drugiej immunizacji (tab. 2).

Można więc wnioskować, że cielęta w wieku 4—6 tyg. mogą już odpowiedzieć na czynną immunizację przeciw *H. somnus* istotnym zwiększeniem miana swoistych przeciwciał. Uodpornianie wcześniejsze daje odpowiedź słabszą, zwłaszcza gdy jest poprzedzone podaniem surowicy odpornościowej.

Wnioski

1. Swoista immunoprofilaktyka przeciw infekcji *H. somnus* w znacznym stopniu zmniejsza straty w odchowcie cieląt, dzięki zmniejszeniu częstości zachorowań i obniżaniu kosztów leków.

2. Zwiększenie odporności cieląt wobec *H. somnus* wydaje się korzystnie wpływać pośrednio na higienę narządu rozrodczego krów w stadzie matczynym. Jest to istotne w przypadkach terytorialnej i organizacyjnej łączności między oborą wydojową a cieleńnikami i powinno być brane pod uwagę przy dociekaniu przyczyn niepowodzenia w wychowie cieląt i jednocześnie obserwowanej, niezadowolającej płodności krów.

Piśmiennictwo

Tab. 2. Zachowanie się i zmiany poziomu przeciwciał anti-*H. somnus* w surowicach cieląt przed i po podaniu kolejnych dawek szczepionki

Wiek cieląt w tyg.	Liczba cieląt	Miano aglutynin anti- <i>H. somnus</i> (log 50%)			Ocena statystyczna kryterium t
		a	b	c	
2	9	1,73	1,54	1,70	a:b 1,42
					a:c 0,30
					a:c 1,48
3	8	1,80	1,51	1,83	a:b 2,25
					a:c 0,21
					b:c 1,58
4	10	1,51	1,67	2,02	a:b 0,52
					a:c 4,06*
					b:c 3,39*
5	11	1,54	1,66	2,08	a:b 0,92
					a:c 5,27*
					b:c 4,08*
6	8	1,85	1,84	2,13	a:b 0,14
					a:c 4,20*
					b:c 3,84*

Objaśnienia: a — wysokość miana przed uodpornieniem, b — wysokość miana w 30 dni po I dawce szczepionki, c — wysokość miana w 30 dni po II dawce szczepionki, \*) — różnica istotna przy  $p \leq 0,001$ .

- Baillie E. W., Anthony H. D., Weide K. D.: J.A.V.M.A. 143, 162, 1965.
- Balbierz H., Nowacki W., Nikolaiczuk M., Molenda J.: Uzyskiwanie surowicy odpornościowej anti-*H. somnus*. Przygotowane do druku.
- Brown L. N., Dillman R. C., Dierks R. E.: Proc. 74th Ann. Meet. US Anim. Health Ass. 1970.
- Crandel R. A., Smith A. R., Kissil M.: Am. J. vet. Res. 38, 1749, 1977.
- Dreumel van A. A., Curtis R. A., Ruhnke H. L.: Can. vet. J. 11, 125, 1970.
- Hall R. F., Williams J. M., Smith G. L.: Veterinary Medicine/Small Animal Clinician. 72, 1368, 1977.
- MacDonald D. W., Christian R. G., Chalmers G. A.: Can. vet. J. 14, 57, 1973.
- Molenda J., Kozyrzack J.: Medycyna Wet. 36, 209, 1980.
- Pritchard D. G., Macleod N. S. M.: Vet. Res. 100, 126, 1977.
- Pritchard D. G., Shreeve J., Bradley R.: Res. Vet. Sci. 26, 7, 1979.
- Sanfançon D., Higgins R., Mittal K. R., L'Archevêque G.: Can. J. Comp. Med. 47, 304, 1983.
- Sanders J. R., Janzen E. D.: Can. vet. J. 21, 219, 1980.
- Stephens L. R., Little P. B., Humphrey J. D., Wilkie B. N., Barnum D. A.: Am. J. vet. Res. 43, 1339, 1982.
- Waldhalm D. G., Hall R. F., Meinershagen W. A., Card C. S., Frank F. W.: Am. J. vet. Res. 35, 1401, 1974.
- Williams J. M., Smith G. L., Murdock F. M.: Am. J. vet. Res. 39, 1756, 1978.

Adres autora: prof. dr hab. Henryk Balbierz, ul. Jana Stan-ki 7/2, 52-423 Wrocław

Бальбеж Г., Николайчук М., Новацкий В., Моленда Е., Клиник Л. — Иммунизация телят против инфекции *Haemophilus somnus* вакциной „Somnuvac”

Balbierz H., Nikolajczuk M., Nowacki W., Molenda J., Klinik L. — Immunization of calves against *Haemophilus somnus* infection using a vaccine „Somnuvac”

Cель работы состояла в реализации программы специфической иммунопрофилактики анти-*H. somnus* у телят. Все телята, рождавшиеся в коровнике (ок. 500 в год), получали в день рождения 100 мл специфической аллогенной иммуносыворотки анти-*H. somnus*. Через 3—6 недель иммунизировали их вакциной „Somnuvac” (собственного производства) объемом 2 мл в дозе. Вакцинацию повторили через 30 дней. Отметили отчетливое уменьшение частоты заболеваний, числа падежа и стоимости средств.

Установили, что если в день рождения вводится специфическая иммуносыворотка, так активная вакцинация не должна последовать раньше 4 недели жизни телят. 2-кратный ввод вакцины „Somnuvac” в интервале 30 дней эффективно предохраняет телят от инфекции *Haemophilus somnus*.

The purpose of the work was to accomplish the programme of specific immunoprophylaxy against *H. somnus* in calves. All calves born in a cowshed (about 500 a year) were given at the day of birth 100 ml of specific allogenic antiserum against *H. somnus*. After 3—6 weeks they were immunized with „Somnuvac” (vaccine of own production) in a dose of 2 ml. The vaccination was repeated after 30 days. A significant decrease of infections, number of deaths and costs of treatment were noted. It was found that in case of antiserum administration at the day of birth of calves the vaccination should not be performed earlier than at the fourth week of their life. Two injections of the vaccine at the interval of 30 days prevented the animals from *H. somnus* infection.

STANISŁAW WOŁOSZYN, MAREK UMIŃSKI

## Aktywność serologiczna i alergiczna trychofityn oczyszczonych oraz natywnych

Klinika Chorób Zakaźnych Zwierząt Wydziału Weterynaryjnego AR, Al. PKWN 30, 20-612 Lublin

W przebiegu grzybic skórnych zwierząt dochodzi do pojawiania się stanu swoistej nadwrażliwości, którą wykrywać można, między innymi, testem skórnym za pomocą trychofityny. Występowanie i nasilenie tej alergii zależne jest od postaci klinicznej, zjadliwości i właściwości alergogennych dermatofita, jak również cech osobniczych zwierzęcia. Dodatnie testy skórne przy trychofitozie bydła opisali Jaksch (11), Łapiński (17), Sarkisow (21) oraz Wołoszyn (26). Lepper (13, 14) wykazał, iż alergia u bydła zakażonego w warunkach doświadczalnych *Trichophyton verrucosum* pojawia się po 14 dniach. Wykrycie stanu alergii testem skórnym zależne jest w dużej mierze od aktywności trychofityny. Zagadnienie to stanowiło przedmiot wielu prac, z tym, że dotyczyły one przede wszystkim trychofityny uzyskiwanej z *T. mentagrophytes* (1, 2, 4, 5, 7, 12, 16, 19, 24). Wydawało się zatem celowe podjęcie badań nad trychofityną przygotowaną na bazie *T. verrucosum*. Celem pracy było uzyskanie trychofityn oczyszczonych z dwóch najczęściej od zwierząt izolowanych dermatofitów, tj. *T. verrucosum* i *T. mentagrophytes* i porównanie ich aktywności serologicznej, a także alergicznej w odniesieniu do trychofityn natywnych.

### Materiał i metody

Do przygotowania trychofityn użyto wytypowanych uprzednio szczepów *Trichophyton verrucosum* i *T. mentagrophytes*. Zagęszczone filtryaty tych szczepów dawały dobre wyniki w leczeniu trychofitoz bydła (17,

26) i lisów hodowlanych (27). Szczepy te namnażano przez 3 miesiące na podłożu płynnym Sabourauda (pH — 6,5) z dodatkiem tiaminy (100 mg/l) oraz penicyliny (40.000 j.m/l) i streptomycyny (400 mg/l). Hodowlę prowadzono metodą napowietrzaną w kolbach ssawkowych o pojemności 10 l, w temperaturze 25°C. Po ukończeniu namnażania kontrolowano czystość hodowli posiewając pobrane z każdej kolby próbki na podłoża do hodowli grzybów, a także bakterii.

Następnie usuwano grzybnię przez sączenie na leżku Büchnera i 30-minutowe wirowanie przesącza przy 1000×G. Uzyskany filtrat 10-krotnie zagęszczano w wyparce próżniowej (Rotavapor) w temperaturze 35°C przy pomocy pompy wodnej i poddawano 48-godzinnej dializie w temperaturze 4°C w węzłach celofanowych typu Wisking wobec kilkakrotnie zmienianej wody destylowanej. Następnie filtrat frakcjonowano techniką chromatografii sitowej przy użyciu żelu Sephadex G-75. Do wyważania suchego sfaledeksu używano wody dejonizowanej z dodatkiem 0,02% azydru sodowego. Proces pęcznienia zachodził w temperaturze pokojowej w ciągu 24 godzin. Napęczniały żel kilkakrotnie przemywano usuwając przez dekantację nie sedymentujące cząsteczki i odgazowywano w kolbie ssawkowej podłączonej do pompy wodnej. Tak przygotowanym nośnikiem upakowywano kolumnę K 26/100 z termostatowym płaszczem wodnym produkcji Pharmacia do wysokości 72 cm słupa żelu. Do wyznaczenia objętości wolnej kolumny używano 2 ml 0,5% błękitu dekstranowego o masie cząsteczkowej  $2 \times 10^6 D$ , zaś objętość fazy stacjonarnej określano 0,1% roztworem wodnym dwuchromianu potasowego.

Na powierzchnię żelu zabezpieczoną adaptorem nanoszono przygotowany filtrat o objętości 5 ml. Rozdział przeprowadzono w temperaturze 4°C na kompletnym urządzeniu produkcji LKB Ultro Rac 7000 w Centralnym Laboratorium Aparaturowym AR w Lublinie. Przesuw taśmy rejestrującej krzywe elucyjne wynosił 20 mm/godzinę. W próbkach kolektora zbierano eluat, którego objętość wynosiła 5 ml. Krzy-