

JERZY SŁAWOŃ, LEON SABA,
HANNA BIS-WENCEL, CEZARY WENCEL

Pałeczki *Salmonella* w środowisku ferm mięsożernych zwierząt futerkowych*)

Zakład Badawczy Higieny Chowu Zwierząt Futerkowych, ul. Pereca 13/19 m. 715, 00-849 Warszawa

Summary

Salmonella sp. occurrence on farms of fur-bearing carnivorous animals

The examinations were carried out on two farms containing altogether 25 000 foxes. Ninety different samples, i.e. 14 feed samples, 16 collective excrement samples and 60 soil samples were examined bacteriologically. Lack of microorganism growth was confirmed in only four soil samples. From the remaining samples bacteria classified to *Proteus*, *Escherichia* and *Salmonella* species were isolated. *Salmonella* species were found in 29 samples (*S. dublin* – 7 strains, *S. enteritidis* – 10 strains, *S. typhimurium* – 12 strains), i.e. seven in feed samples, six in excrement and sixteen in soil samples.

Salmonella strains presence in soil material, including the samples from a protected region, points to the bacteria dissemination from animal farms to the natural environment.

Infekcje oraz zatrucia powodowane przez pałeczki *Salmonella* są szeroko rozpowszechnione i dotyczą zarówno człowieka, jak i wszystkich gatunków zwierząt gospodarskich oraz wolno żyjących. Dotąd opisano ponad 200 odmian serologicznych salmoneli (3, 13, 38), z czego w Polsce ponad 100 (10). Niektóre spośród serotypów tych zarazków są zaadaptowane do jednego żywiciela, np. *S. dublin* do bydła, *S. choleraesuis* do trzody chlewnej, *S. gallinarum* do ptaków, a *S. typhi* i *S. paratyphi* do człowieka. Inne, głównie zaś *S. enteritidis* czy *S. typhimurium* izolowane są od różnych zwierząt oraz człowieka (18), one też obecnie decydują o sytuacji epidemiologicznej salmoneloz w skali światowej (5, 18, 29, 33). O ciągle aktualnej roli tych zoonoz w aspekcie epizootologicznym i epidemiologicznym decyduje częste występowanie pałeczek *Salmonella* w środowisku naturalnym (3, 6, 8, 25), szeroko rozpowszechnione bezobjawowe nosicielstwo salmoneli u ludzi i zwierząt (1, 3, 5, 17, 18, 20), a także możliwości przenoszenia tych bakterii za pośrednictwem różnych źródeł i dróg zakażenia (1, 8, 19, 23, 24, 29, 30, 31, 33).

Obecność salmoneli w fermach zwierząt futerkowych stwarza realne niebezpieczeństwo zanieczyszczenia tymi bakteriami środowiska naturalnego. Fakt ten przez gospodarstwa prowadzące wielkotwarowy chów dużych zwierząt gospodarskich i drobiu jest już udowodniony (5, 8, 29, 33), a zagadnienia te w aspekcie ochrony zdrowia publicznego zostały w naszym kraju ujęte stosownymi zarządzeniami sanitarnymi (26, 34).

Polska jest dużym producentem zwierząt futerkowych w skali europejskiej (2). Wbrew zgłoszonej przez służby ekologiczne uciążliwości tych obiektów hodowlanych, zagadnienia ochrony środowiska nie były do tej pory przedmiotem szczególnego zainteresowania badaczy w warunkach krajowych

wych (27, 30). Nie podejmowano też żadnych badań zmierzających do oceny skuteczności tworzonych orientacyjnych stref ochronnych.

Ze względu na niedostatek wiedzy dotyczącej sozologicznych skutków eksploatacji dużych ferm mięsożernych zwierząt futerkowych postanowiono określić częstość występowania pałeczek *Salmonella* w tego rodzaju gospodarstwach hodowlanych.

Materiał i metody.

Badania przeprowadzono w dwu fermach lisów (A i B) położonych w północno-wschodniej Polsce. Ferma A grupowała 10 tys. lisów polarnych, niebieskich i srebrzystych, zaś obsadę w obiekcie B stanowiło 15 tys. lisów tych samych odmian. Zwierzęta były utrzymywane indywidualnie, systemem klatkowym. Ferma A położona jest w strefie leśnej i w odległości 100 m od jeziora, zaś ferma B położona jest wśród pól uprawnych.

Żywnienie lisów było tradycyjne. Otrzymywały one karmę ciastowatą, składającą się z komponentów mięsnych różnych gatunków zwierząt, głównie mięsa drobiowego wraz z odpadkami rzeźnymi z dodatkiem pasz roślinnych oraz preparatów mineralno-witaminowych. Stosowana w żywieniu pasza nie była poddawana obróbce termicznej, ani też chemicznej. Źródło wody pitnej na fermach stanowiła studnia głębinowa.

Panujące w fermach warunki zoohigieniczne można określić jako zadowalające. W ramach profilaktyki prowadzono systematycznie akcje deratyzacyjne przy użyciu preparatów chemicznych oraz metod biologicznych. Ścieki wychodzące z ferm były unieszkodliwiane w odstojnikach (piaskownikach).

Materiał do badań stanowiły próbki karmy i kału oraz gleby, które poddawano ocenie bakteriologicznej. Analizowany materiał pobierano dwukrotnie, tj. na wiosnę przy temperaturze powietrza +3°C i w pełni lata, przy temp. +25°C.

Przeznaczone do badań próbki karmy pobierano po dokładnym rozdrobieniu i wymieszaniu składników pokarmowych, bezpośrednio przed karmieniem, przy czym materiał poddawany analizie tworzony był z wielu prób jednostkowych. W obydwu fermach pobrano próbki paszy 7-krotnie (4 × wiosną oraz 3 × latem).

Próbki kału lisów pobierano z korytarza nawozowego do worków. Do oceny bakteriologicznej przeznaczono łącznie 16 prób zbiorczych kału, po 8 z każdej fermy, a przy ich pobieraniu kierowano się identycznymi zasadami, jak w przypadku paszy.

W celu określenia stopnia zanieczyszczenia gleby materiał do badań pobierano zarówno w centrum fermy (I), jak też w odległości 75 m (II) oraz 150 m (III) poza granicą fermy. Podczas pozyskiwania materiału glebowego przestrzegano zasad gleboznawczych oraz uwzględniano warunki fizjograficzne położenia ferm i kierunki spływu wód. Łącznie z każdego badanego obiektu hodowlanego pobrano po 30 próbek gleby. Masa próbek glebowych wynosiła ca 250 g.

Badania bakteriologiczne przeprowadzono wg obowiązujących norm i instrukcji (1, 3, 10, 11, 21). Wykorzystano następujące podłoża i testy diagnostyczne: podłoże SS, SF, MacConkeya, Kliglera, Christensena, pożywkę z 10% laktozą, test na dezaminację fenyloalaniny, a także mikropróbki Api 20 E firmy bio-Merieux.

*) Praca wykonana w ramach tematu finansowanego przez KBN, nr projektu 6 612391 02

Tab. 1. Wyniki wstępnej analizy bakteriologicznej karmy, kału i gleby w fermie A i B

Materiał	Ferma	Liczba próbek				Wyizolowane bakterie				
		badanych		dodatnich		rodzaj	liczba	rodzaj	liczba	
		wiosna	lato	wiosna	lato	wiosna		lato		
Karma	A	4	3	4	3	<i>Proteus</i> <i>E. coli</i> <i>Salmonella</i>	1 1 2	<i>Proteus + E. coli</i> <i>Salmonella</i>	2 1	
	B	4	3	4	3	<i>Proteus</i> <i>E. coli</i> <i>Salmonella</i>	1 1 2	<i>Proteus</i> <i>Salmonella</i>	1 2	
Kał	A	4	4	4	4	<i>Proteus</i> <i>Salmonella</i>	1 3	<i>Proteus + E. coli</i> <i>Salmonella</i>	3 1	
	B	4	4	4	4	<i>Proteus</i> <i>E. coli</i>	3 1	<i>Proteus</i> <i>Salmonella</i>	2 2	
Gleba	I	A	5	5	5	5	<i>E. coli</i> <i>Salmonella</i>	2 3	<i>Proteus + E. coli</i> <i>Salmonella</i>	3 2
		B	5	5	4	5	<i>Proteus</i> brak wzrostu bakterii	4 1	<i>Proteus + E. coli</i>	5
	II	A	5	5	5	5	<i>Proteus</i> <i>E. coli</i> <i>Salmonella</i>	1 2 2	<i>Proteus + E. coli</i> <i>Salmonella</i>	4 1
		B	5	5	5	5	<i>Proteus</i> <i>E. coli</i> <i>Proteus + E. coli</i>	1 1 3	<i>Proteus</i> <i>Proteus + E. coli</i> <i>Salmonella</i>	1 3 1
	III	A	5	5	4	5	<i>Proteus</i> <i>Salmonella</i> brak wzrostu bakterii	1 3 1	<i>Proteus</i> <i>Proteus + E. coli</i>	3 2
		B	5	5	3	5	<i>E. coli</i> brak wzrostu bakterii	3 2	<i>Proteus + E. coli</i> <i>Salmonella</i>	3 2
Ogółem	A	23	22	22	22	-	-	-	-	
	B	23	22	20	22	-	-	-	-	
	A+B	46	44	42	44	<i>Proteus</i> <i>E. coli</i> <i>Proteus + E. coli</i> <i>Salmonella</i>	13 11 3 15	<i>Proteus</i> <i>E. coli</i> <i>Proteus + E. coli</i> <i>Salmonella</i>	7 0 25 12	

Tab. 2. Wyniki badań karmy, kału i gleby w kierunku pałeczek *Salmonella* w fermie A i B

Materiał	Ferma	Liczba próbek				Wyizolowane bakterie				
		badanych		dodatnich		rodzaj	liczba	rodzaj	liczba	
		wiosna	lato	wiosna	lato	wiosna		lato		
Karma	A	4	3	2	1	<i>dublin</i> <i>enteritidis</i>	1 1	<i>enteritidis</i>	1	
	B	4	3	2	2	<i>dublin</i> <i>enteritidis</i>	1 1	<i>typhimurium</i>	2	
Kał	A	4	4	3	1	<i>enteritidis</i> <i>typhimurium</i>	2 1	<i>typhimurium</i>	1	
	B	4	4	0	2	-	0	<i>enteritidis</i>	2	
Gleba	I	A	5	5	3	2	<i>dublin</i> <i>enteritidis</i>	2 1	<i>typhimurium</i>	2
		B	5	5	0	0	-	0	-	0
	II	A	5	5	2	1	<i>dublin</i> <i>typhimurium</i>	1 1	<i>typhimurium</i>	1
		B	5	5	2	1	<i>dublin</i> <i>typhimurium</i>	1 1	<i>typhimurium</i>	1
	III	A	5	5	3	0	<i>dublin</i> <i>enteritidis</i> <i>typhimurium</i>	1 1 1	-	0
		B	5	5	0	2	-	0	<i>enteritidis</i> <i>typhimurium</i>	1 1
Ogółem	A	23	22	13	5	-	-	-	-	
	B	23	22	4	7	-	-	-	-	
	A+B	46	44	17	12	<i>dublin</i> <i>enteritidis</i> <i>typhimurium</i>	7 6 4	<i>dublin</i> <i>enteritidis</i> <i>typhimurium</i>	0 4 8	

Drobnoustroje wykazujące właściwości biochemiczne odpowiadające pałeczkom *Salmonella* poddawane były następnie analizie serologicznej. Do wstępnej klasyfikacji serologicznej wykorzystano odczyn aglutynacji lateksowej przy użyciu zestawu Lateks Salmonella, firmy Biomek z Krakowa. W celu oznaczenia przynależności salmoneli do serotypu przeprowadzono aglutynację szkiełkową. W badaniach tych posługiwano się wieloważnymi oraz jednoważnymi surowicami diagnostycznymi produkcji Krajowego Ośrodka Salmonella, w oparciu o schemat Kauffmanna-White'a.

Wyniki i omówienie

Szczegółowa analiza mikrobiologiczna badanego materiału wykazała zanieczyszczenie pałeczkami jelitowymi prawie wszystkich rodzajów próbek pochodzących z obu ferm. Całkowity brak wzrostu tych bakterii zaobserwowano jedynie w przypadku 4 próbek gleby pobieranych wiosną, tj. w jednej pochodzącej z fermy A (próbka III) oraz w 3 próbkach pobranych w obiekcie B (jedna w miejscu I oraz dwie w miejscu III) tab. 1. Natomiast we wszystkich pozostałych badanych próbkach stwierdzono obecność pałeczek gram-ujemnych, zaklasyfikowanych do rodzajów *Proteus*, *E. coli* bądź *Salmonella*. Obecność tych drobnoustrojów w badanym materiale, zwłaszcza w karmie, jest niepożądana w świetle obowiązujących w kraju norm (21).

Wyniki analizy bakteriologicznej paszy, kału i gleby w kierunku obecności pałeczek *Salmonella* przedstawiono w tab. 2. Obecność salmoneli wykryto w dużej części badanego materiału (w fermie A w 18 na 45 badanych próbkach oraz w 11 na 45 próbek w fermie B). Bliższa analiza serologiczna wyizolowanych szczepów *Salmonella spp.* wykazała, że wszystkie izolaty (10 szczepów *S. enteritidis*, 7 – *S. dublin* i 12 – *S. typhimurium*) należą do serotypów niebezpiecznych zarówno dla zwierząt, jak i człowieka (1, 5, 10, 18).

Przeprowadzone w fermach badania próbek karmy stosowanej w żywieniu lisów wykazały, że wszystkie one były zanieczyszczone pałeczkami z rodziny *Enterobacteriaceae* (tab. 1 i 2). Jak wynika z tab. 2 salmonele wyizolowano w przypadku fermy A w trzech (na siedem badanych) próbkach paszy oraz w czterech (na 7 badanych) próbkach pobranych w fermie B. Uzyskane wyniki potwierdzają znany powszechnie fakt, że żywność pochodzenia zwierzęcego, nie poddana utylizacji, jest w dużym stopniu zanieczyszczona pałeczkami *Salmonella* (7, 16, 19, 35) oraz stanowi istotne źródło tych zarazków (4, 5, 16, 17, 24, 33).

Badania zbiorczych próbek kału lisów wykazały, że duży odsetek zwierząt wydala salmonele. Jak wynika z tab. 1 we wszystkich analizowanych próbkach stwierdzono obecność drobnoustrojów względnie patogennych, bądź chorobotwórczych. Salmonele wykazano w przypadku fermy A aż w połowie badanych prób. W obiekcie B podczas badania kału w okresie wiosennym nie stwierdzono co prawda ich obecności w ani jednej badanej próbce kału. Jednakże w okresie letnim częstotliwość izolacji tych bakterii była wysoka (dwie próby na cztery badane – dodatnie). Świadczy to o nosicielstwie i siewstwie pałeczek *Salmonella* u badanych lisów. Podobnych danych o okresowym wydalaniu tych bakterii przez lisy hodowlane dostarczyły również badania prowadzone wcześniej przez innych autorów (12, 28, 30, 32).

W celu określenia możliwości zanieczyszczenia środowiska przez fermy lisów zbadano próbki gleby. Analizowany materiał w przeważającej liczbie przypadków był zanieczyszczony pałeczkami jelitowymi, w tym chorobotwórczymi salmonelami.

Brak wzrostu *Salmonella sp.* w przypadku fermy A stwierdzono jedynie podczas badania próbek pobranych w odległości 150 m poza terenem fermy, natomiast badana gleba znajdująca się w rejonie fermy Z była zanieczyszczona salmonelami tylko w pięciu na 30 badanych próbek. Jednakże stwierdzenie obfitego wzrostu pałeczek *Salmonella* w dwóch próbkach (na 5 badanych) w okresie lata i to w miejscu najbardziej oddalonym od fermy, świadczy o przenikaniu tych zarazków w obrębie obszaru określonego jako strefa ochronna oraz sugeruje realną możliwość biologicznego skażenia środowiska za pośrednictwem ferm zwierząt futerkowych. Jest to fakt niepokojący ze względu na stwierdzone niedawno przez Strzałkowskiego i wsp. (30) w badaniach eksperymentalnych bardzo długie przeżywanie w ziemi oraz wodzie serotypów salmoneli wyizolowanych od lisów, przy częściowym zachowaniu właściwości enterotoksycznych i zjadliwości tych bakterii. O możliwości długiego przeżywania salmoneli w gnojowicy, ściekach miejskich i osadach ściekowych w naszym kraju donoszą też inni autorzy (14, 15, 22, 26).

Wnioski

Uzyskane wyniki pozwalają na wyciągnięcie następujących wniosków:

1. Środowisko ferm mięsożernych zwierząt futerkowych wykazuje duży stopień zanieczyszczenia salmonelami badanych prób karmy, kału i gleby.

2. Wydaje się celowe kontynuowanie badań nad zanieczyszczeniami środowiska przez fermy zwierząt futerkowych, a także nad przeciwdziałaniem ich skutkom.

Piśmiennictwo

1. Baird-Parker A. C.: Lancet 336, 1231, 1990.
2. Barabasz B.: Dansk-Pelsdyravl. 55, 148, 1992.
3. D'Aoust J.-Y.: Salmonella W.: Foodborne Bacterial Pathogens red, Doyle M. P., Marcel Dekker, Inc., New York, 1989.
4. Frindt A.: Hod. Drobn. Inwent. 32, 10, 1984.
5. Hartung M.: Bundesgesundhbl. 8, 383, 1992.
6. Henzler D. J., Opitz H. M.: Avian Dis. 36, 625, 1992.
7. James W. O., Williams W. O., Prucha J. C., Johnston R.: JAVMA 200, 57, 1992.
8. Jones F. T.: Feedstuffs 64, 21, 1992.
9. Józwiak E.: Mat. IX Kongresu PTNW, Olsztyn 1, 200, 1992.
10. Kałużewski J.: Różnicowanie pałeczek Enterobacteriaceae. Instrukcja metod. PZH, Warszawa 1983.
11. Kałużewski S., Jagielski M., Zaleska M., Szych J.: Med. Dośw. 42, 26, 1990.
12. Kopczeński A., Chyliński G.: Medycyna Wet. 37, 176, 1981.
13. Kopczeński A., Stryszak M., Chyliński G.: Medycyna Wet. 39, 264, 1983.
14. Kluczek J. P.: Aura 2, 170, 1987.
15. Kłapęć T.: Ocena sanitarna osadów ściekowych przeznaczonych do przyrodniczego lub/i rolniczego wykorzystania. Praca dokt., Inst. Medycyny Wsi, Lublin, 1993.
16. Maciak T., Kubiński T.: Medycyna Wet. 46, 305, 1990.
17. Maciak T., Kubiński T., Mazurek J.: Medycyna Wet. 46, 333, 1990.
18. McIlroy S. G., Neill S. D., Goodall E. A., McLoughlin E. M., McCracken R. M.: SVEPM 24, 1990.
19. Meuszyński S., Terech I.: Medycyna Wet. 34, 142, 1978.
20. Molska I.: Post. Mikrobiol. 30, 33, 1991.
21. Polska Norma PN-76 R-64791 Normy Pasz Sypkich.
22. Prażmo Z., Sikorska M.: Med. Dośw. 39, 130, 1987.
23. Radkowski M.: Medycyna Wet. 46, 331, 1990.
24. Reilly W. J., Oboegbulem S. I., Munro D. S., Forbes G. I.: Epidemiol. Infect. 106, 1, 1991.
25. Renwick S. A., Irwin R. I., Clarke R. C.: Can Vet. J. 33, 449, 1990.
26. Rzedzicki J., Gliński Z., Wernicki A.: Profilaktyka w wielkostatnym chowie zwierząt, PWRiL, Warszawa 1984.
27. Saba L., Stawoń J., Polonis A., Bis-Wencel H.: Medycyna Wet. 49, 365, 1993.

28. Siemionek J.: Hod. Drobn. Inwest. 37, 6, 1989.
 29. Sinell H. J.: Ernährungswiss. 31, 157, 1992.
 30. Strzałkowski I., Kopczewski A.: Życie Wet. 44, 210, 1991.
 31. Strzałkowski I., Kopczewski A.: Medycyna Wet. 49, 534, 1993.
 32. Szpakiewicz W.: Medycyna Wet. 41, 205, 1985.
 33. Tauxe R. V.: Food Prot. 54, 563, 1991.
 34. Ustawa z dnia 31 stycznia 1980 o ochronie i kształtowaniu środowiska.
 35. Wojtoń B.: Życie Wet. 40, 237, 1990.
 36. Zarządzenie Ministra Administracji, Gospodarki Terenowej i Ochrony Środowiska nr 241 z dnia 9 listopada 1982 w sprawie szczegółowych zasad wyznaczania granic i obszarów stref ochronnych oraz orientacyjnych wskaźników ich szerokości.
 37. Zarządzenie Ministra Ochrony Środowiska i Zasobów Naturalnych nr 170 z dnia 7 lipca 1986 w sprawie rolniczego wykorzystania ścieków.
 38. Zdunkiewicz T.: Hod. Drobn. Inwest. 36, 12, 1988.

Adres autora: dr inż. Jerzy Sławoń, ul. Pereca 13/19 m. 715, 00-849 Warszawa

ZYGMUNT CYGAN, JAN BUCZEK*

Aktywność uodporniająca dwukomponentowej autoszczepionki Dipervac przeciwko beztlenowcowej biegunce cieląt*)

Zakład Higieny Weterynaryjnej, ul. Słowicza 2, 20-336 Lublin

*Katedra Mikrobiologii Weterynaryjnej Wydziału Weterynaryjnego AR, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

Summary

Protective immunity of two-component auto vaccine Dipervac against anaerobic calf diarrhea

Effectiveness of the auto vaccine Dipervac prepared by the authors and containing toxoids alpha and beta of *C. perfringens* A and C in protecting calves against a toxic diarrhea was examined. The vaccine was used in pregnant cows at 7 and 2–3 weeks before parturition. The vaccine induced a high level of antitoxic antibodies (4–64 ai/ml for alpha and 8–64 ai/ml for beta toxin) without negative effects on immunized animals. Dipervac used in 375 cows on two farms with endemic toxic anaerobic calf diarrhea decreased losses of calves from 22.3% to 3.1%. Dipervac can be used in prophylaxis of diarrhea in calves induced by alpha and beta toxin of *C. perfringens* A and B.

Beztlenowcowa biegunka cieląt pozostaje wciąż niedoceniana, mimo że coraz częściej występuje w różnych krajach (6, 7, 9, 12, 16, 17), w tym także w Polsce (1, 4). Jej etiologię – znajdującą odbicie w przebiegu enzootii – warunkuje działanie toksyny beta (1, 4, 12), a najprawdopodobniej także alfa *C. perfringens* (serotyp A, C. wg 5, 14, 19). Straty z powodu padnięć cieląt, jakie wywołuje choroba, są poważne i mogą sięgać nawet 26% stanu stada (wg 1, 4). Jednocześnie zwalczanie zachorowań jest uciążliwe ze względu na ostry, w dodatku często uporczywy jej przebieg (1, 4, 5, 9). Kłopotliwość sytuacji zwiększa nadto potrzeba nakładu dużego wysiłku dla likwidacji źródła zakażeń (częste nosicielstwo zarazka, duża jego oporność na środki dezynfekcyjne, nawroty przedłużające czas trwania infekcji, cyt. wg 8). Poza tym ponoszone koszty leczenia są wysokie (1, 4) – zwłaszcza przy stosowaniu metody tradycyjnej antybiotykoterapii – natomiast możliwość uodporniania zagrożonych stad była niedostatecznie poznana (5).

Fakty te inspirowały podjęcie badań nad opracowaniem dwukomponentowej szczepionki swoistej (preparat o proponowanej nazwie Dipervac) – przeciwko toksynom alfa, beta *C. perfrin-*

gens, a oznaczenie jej aktywności immunogennej (poziomu stymulowanych antytoksyn) oraz efektywności profilaktycznej (ograniczenia zachorowań w ogniskach choroby) stanowiło etapowe cele niniejszej pracy.

Materiał i metody

1. **Autoszczepionka.** Preparat przygotowano z hodowli toksynogennych szczepów *C. perfringens* A (izolat A-2) oraz *C. perfringens* C (szczep B-10) wyosobnionych od padłych cieląt w poprzednich badaniach (1, 3). Uzyskane hodowle, po namnożeniu szczepów w pożywce VF z 0,5% glukozy (inkubacja 14-godzinna w 37°C), odwirowano (4000 obr/min.), a następnie sprawdzano na aktywność toksyczną dla myszy (alfa 4 – 8 DLM₅₀/ml, beta 8 DLM₅₀/ml), po czym neutralizowano dodatkiem 0,6% formaliny (w 37°C przez 10 dni) i dodawano adjuwant (objętościowo 10%). Przygotowaną w ten sposób autoszczepionkę Dipervac kontrolowano na jałowość (wysiewy na podłoże Wrzoska i Zeisslera, inkubacja w atmosferze tlenowej oraz beztlenowej metodą GasPak), a także na nieszkodliwość (inokulacja podskórna myszy dawką 0,5 ml, nadto domięśniowa świnki morskiej objętością 1 ml).

2. **Badane próby.** Badaniom poddano ogółem 171 prób obejmujących krew od 57 krów i 57 cieląt, a także siarę 57 krów. Krowy były immunizowane dwukrotnie, tj. w 7–8 i 2–3 tygodniu przed terminem porodu, dawką 10 ml autoszczepionki Dipervac podanej podskórnie (miejsce iniekcji – okolica nad łopatką). Próby od uodpornionych krów, jak również od pochodzących od nich cieląt, pobierano w każdym przypadku jednocześnie (1–4 dni po porodzie, zatem w odniesieniu do narodzonych zwierząt pokrywało się to z wiekiem ich życia).

3. **Oznaczanie antytoksyn.** Badanie przeprowadzono odczynem seroneutralizacji SN (wirowanie krwi przy 3000 obr/min. – 15 min., siary 60 000 obr/min. – 1 godz., źródłem toksyny alfa i beta – odwirowane 14-godzinne hodowle szczepów A-2 i B-10 w pożywce VF z 0,5% glukozy, czas wiązania reagentów – 1 godzina w 37°C). Stopień uodpornienia zwierząt wyrażano liczbą jednostek antytoksynicznych zawartych w 1 ml (1 jedn. antyt. = najwyższe rozcieńczenie surowicy i siary zobojętniające 1 DLM₅₀ toksyny alfa oraz beta).

*) Praca finansowana przez KBN.