

## Osiągnięcia w immunoprofilaktyce żoźów

Instytut Weterynarii, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

### Summary

#### Achievements in immunoprophylaxis of strangles

As a consequence of the negative evaluation of the effect of prophylactic vaccination against strangles (while using intramuscular injection of a bacterin or a vaccine containing the M protein of *Streptococcus equi*), appropriate research was started to achieve a progress in this area. It resulted in the isolation and characterization of the protective antigen, a polypeptide of mw about 41 000. Protective antibodies (IgA and IgG), specific for this antigen, were localized in the nasopharyngeal mucus of immune horses. These antibodies differed in specificity from bactericidal antibodies of the serum. The resistance against the disease appeared to be dependent on the nasopharyngeal antibodies and not the bactericidal serum antibodies. It was recommended to replace the intramuscular injections of the inactivated bacterin by intranasal application of an atomized suspension of a culture of an avirulent strain of *Str. equi* containing the polypeptide of mw 41 000.

Żoźy (*adenitis equorum*) to zaraźliwa choroba koniowatych (*Equidae*), zwłaszcza młodych koni, charakteryzująca się stanami zapalnymi błony śluzowej nosogardzieli, wypływem śluzoworopnym z nozdrzy i tworzeniem się ropni, zwłaszcza w węzłach chłonnych żuchwowych i okołogardzielowych. Głównym źródłem infekcji są konie będące w okresie inkubacji lub wykazujące objawy choroby (19). Okres inkubacji wynosi od 1–21 dni. Najczęściej objawy chorobowe pojawiają się do 13 dni od infekcji (18).

Czynnikiem etiologicznym jest *Streptococcus equi* (*Str. equi*), czyli paciorkowiec żoźowy, zaliczany do grupy C wg Lancefield (23). Szczepów w obrębie gatunku nie udaje się zróżnicować metodami immunologicznymi; nie określono zatem serotypów (12). Substancją o właściwościach immunogennych *Str. equi* jest białko M. Rezultaty otrzymane przy użyciu immunoblotting wskazały na identyczne profile białka M ekstrahowanego z licznych szczepów *Str. equi* (12). Również profile restrykcyjne analizy DNA potwierdziły genetyczną identyczność szczepów tego drobnoustroju (12). Stwierdza się natomiast, zależnie od szczepu, różnice w zjadliwości. Są one związane z obecnością w komórce bakteryjnej białka M i tworzeniem się otoczki zbudowanej z kwasu hialuronowego (9).

Pierwsze przypadki żoźów zostały opisane przez Jordanusa Ruffusa w 1251 r. (cyt. wg 19). Choroba ta od tego czasu stanowi w skali globalnej poważny problem w patologii konia (1, 2, 8, 23–25). W USA i Australii żoźy stanowią najważniejszą chorobę bakteryjną koni (3, 14, 17, 19). W przeciwieństwie do wymienionych krajów, gdzie nie obserwowano przerw w występowaniu żoźów, w Polsce choroba ta występowała często do lat pięćdziesiątych, sporadycznie w sześćdziesiątych, a następnie nie stwierdzano jej przez wiele lat. Ostatnie publikacje polskie na ten temat pochodzą z lat 1952–55 (5–7, 16).

Obecnie żoźy na nowo zaczynają się pojawiać w naszym kraju, co uzasadnia publikację na ten temat w polskim piśmiennictwie. Szczególnym powodem napisania tego artykułu jest zamiar przedstawienia postępu, jaki osiągnięto na świecie w zakresie immunoprofilaktyki żoźów.

#### Ocena szczepień ochronnych

Zapobieganie żoźom poprzez szczepienia ochronne zostało zapoczątkowane na przełomie XIX i XX wieku. Były one jedną z pierwszych chorób bakteryjnych zwierząt, przeciw którym przygotowano i stosowano szczepionki. Uzyskiwane na przestrzeni lat wyniki były oceniane na podstawie danych epizootologicznych na tyle pozytywnie, że szczepionki przez cały czas znajdowały w praktyce zastosowanie. Brakowało jednak ocen ich skuteczności, opartych o badania eksperymentalne. Dopiero w 1981 r. podjął tego rodzaju doświadczenia w USA Subkomitet do spraw Skuteczności Szczepionki Inaktywowanej (bacterin) przeciw Żoźom (cyt. wg 20) stwierdzając, że domięśniowe stosowanie szczepionek inaktywowanych (droga podawania szczepionki dotychczas powszechnie stosowana) nie chroni dużego odsetka koni przed infekcją i zachorowaniem. W badaniach, które były podstawą takiego wniosku, użyto 142 koni jednorocznych (Standardbred). Zwierzęta te zaszczepiono domięśniowo znajdującymi się w handlu inaktywowanymi szczepionkami o nazwach Equibac II lub Strepvac. Po 4 do 6 miesięcy od szczepienia pobrano od nich krew i określono jej bakteriobójcze (bakteriocydne) właściwości w stosunku do *Str. equi* (20). Okazało się, że surowice od 80% koni wykazywały wysoki poziom bakteriocyddii. Pomimo to 20% spośród tych zwierząt zachorowało na żoźy w ciągu następnych 3 miesięcy. Były to konie, których miano bakteriocyddii było podobne do miana bakteriocyddii koni, które nie zachorowały.

W innym eksperymencie wykazano (20), że kuce szczepione domięśniowo przeciw żoźom szczepionką zawierającą białko M *Str. equi* i wykazujące po szczepieniu w surowicy wysokie stężenie przeciwciał bakteriobójczych, zachorowały na żoźy po eksperymentalnym zakażeniu hodowlą *Str. equi*.

Oprócz negatywnej oceny domięśniowego podawania szczepionki, zawierającej inaktywowane komórki *Str. equi* lub jego białko M, wyniki obu eksperymentów wskazały, iż miano aktywności bakteriobójczej surowicy nie jest miarodajnym wskaźnikiem dla określenia poziomu ochrony zwierzęcia przed zachorowaniem na żoźy.

#### Określenie antygeny uodporniającego i przeciwciał istotnych w ochronie przed chorobą

W związku z wynikającą z poprzednich stwierdzeń potrzebą poprawy skuteczności szczepień przeciw żoźom podjęte zostały badania, zmierzające do bliższego określenia antygeny uodporniającego przeciw infekcji i chorobie (22). W tym celu poddano szczegółowej analizie wyciągi kwaśne *Str. equi*, stanowiące wspomniane uprzednio, immunogenne białko M oraz

płyn z nad osadu wymienionej hodowli. Frakcjonowanie tych preparatów przeprowadzono przy pomocy metod chromatograficznych (22). Uzyskane polipeptydy badano testem precypitacji dyfuzyjnej w żelu agarowym, stosując surowice koni po przebytych żoźlach i królików uodpornianych białkiem M. W wyniku przeprowadzonych badań wykazano w białku M i płynie z nad osadu hodowli *Str. equi* szereg frakcji o różnej swoistości serologicznej i masie cząsteczkowej w granicach 24 000–67 000. Niektóre frakcje w obu preparatach były identyczne. Wykazano też kilka wspólnych frakcji w wyciągu kwaśnym *Str. equi* i *Str. zooepidemicus*.

W następnym etapie zbadano (10) posiadane polipeptydy przy użyciu precypitacji dyfuzyjnej w żelu agarowym z przeciwciałami śluzu nosogardzieli koni po przebytych żoźlach. Przeciwciała te stanowiły klasy IgA i IgG. Okazało się, że identyfikowały one polipeptydy białka M o masie cząsteczkowej około 41 000. Nie rozpoznawały one polipeptydów występujących w supernatancie hodowli *Str. equi*, a identyfikowały tylko jeden polipeptyd, o masie cząsteczkowej 62 000, ekstraktu *Str. zooepidemicus*, przeciwnie niż przeciwciała surowicy. W ten sposób udowodniono, iż przeciwciała śluzu nosogardzieli różnią się pod względem swoistości serologicznej od przeciwciał surowicy. Wyniki te dowodzą niezależności odpowiedzi immunologicznej miejscowej (śluz nosogardzieli) i systemowej (surowica) po uodpornieniu koni przeciw żoźlom.

W kolejności wykazano (10), że odporność przeciw żoźlom skorelowana jest z obecnością w wyższych stężeniach przeciwciał w śluzie nosogardzieli, a nie z wysokością miana przeciwciał w surowicy. Wynik ten dał podstawę do stwierdzenia, że przeciwciała śluzu nosogardzieli są przeciwciałami ochronnymi. Jeżeli natomiast wchodził z nimi w reakcję serologiczną polipeptyd białka M, o masie cząsteczkowej 41 000, to on właśnie stanowił antygen uodporniający przeciw infekcji i chorobie.

Pewnym rozszerzeniem i potwierdzeniem dotychczas omawianych wyników były badania dotyczące biernego transferu przeciwciał od karmiących klaczy, które przebyły żoźy, do ssących źrebiąt (11). Prowadzono je w czasie dwóch pierwszych miesięcy życia źrebiąt. W surowicy i śluzie nosowym takich osobników stwierdzono krótko po pierwszym pobraniu siary przeciwciała IgG i IgA. Ich najwyższe miana występowały w drugim dniu życia źrebiąt. Przeciwciała IgG przetrwały w surowicy, a IgA w popłuczynach z nosa. Podane dożołądkowo w pierwszych godzinach życia źrebięcia przeciwciała siary były transportowane drogą krwi do błony śluzowej nosa w ciągu kilku godzin. Przeciwciała siary różniły się pod względem swoistości serologicznej od przeciwciał mleka klaczy. Te zaś okazały się identyczne z wcześniej omówionymi przeciwciałami śluzu nosogardzieli dorosłych koni, które przechorowały żoźy, czyli z przeciwciałami ochronnymi. W konkluzji postulowano (11), że w pierwszym okresie życia źrebięcia ochronę przed infekcją paciorkowcem żoźowym zapewniają przeciwciała siary, a następnie w czasie pobierania przez źrebię mleka matki (do około 3. miesiąca życia) przeciwciała występujące w mleku. Dostają się one w czasie przełykania mleka do śluzu nosogardzieli z zewnątrz (a nie drogą krwi) i w ten sposób chronią źrebię przed zakażeniem paciorkowcem żoźowym. Wiadomo bowiem, iż źrebięta pobierające mleko w ciągu tego okresu nie zachorowują na żoźy.

Reasumując, te oryginalne w piśmiennictwie światowym wyniki określiły przeciwciała ochronne oraz w białku M polipeptyd istotny w wywoływaniu odporności przeciwzakaźnej.

Stały się też podstawą do zmiany poglądu co do miejsca podania szczepionki z iniekcji domięśniowej na rozpylanie jej do nosa.

### **Odpowiedź immunologiczna po donosowym podaniu koniowi szczepionki z niejadliwym szczepem *Str. equi***

Dodatkowo uznano (21), iż skuteczność szczepień przeciw żoźlom koni można zwiększyć, stosując zamiast szczepionki inaktywowanej, szczepionkę zawierającą żywy, atenuowany szczep *Str. equi*, wytwarzający białko o masie 41 000. Wiadomo bowiem, że szczepionki żywe są na ogół bardziej skuteczne niż inaktywowane.

Szczep taki (709–27) uzyskano na drodze mutagenyzy (3, 15). Przy pomocy immunoblotting wykazano, że wyciąg kwaśny tego szczepu zawierał ten sam immunologicznie czynny polipeptyd (m.c.z. 41 000), który reagował z przeciwciałami IgA i IgG, występującymi w nosogardzieli (21).

Kuce wrażliwe na żoźy uodporniono donosowo szczepionką, stanowiącą zawiesinę 18-godzinnej hodowli wymienionego niejadliwego szczepu, w stężeniu  $3 \times 10^9$  CFU, namnożonego w bulionie Todd Hewitta. Drugi raz uodporniono je w ten sam sposób po 29 dniach. Następnie zostały one zakażone, też donosowo, po 30 dniach od drugiego uodpornienia dawką  $5 \times 10^2$  CFU hodowli kilkunastogodzinnej zjadliwego szczepu *Str. equi* przy pomocy donosowego rozpylacza. Kontrole stanowiły kuce nie uodporniane. W wyniku przeprowadzonego doświadczenia okazało się, że donosowo uodporniane kuce nabyły odporność, która chroniła je przed zakażeniem zjadliwym szczepem paciorkowca żoźowego. Konie nie uodporniane (kontrola) zachorowały w następstwie zakażenia doświadczonego na żoźy.

Przedstawione rezultaty stanowią istotny postęp w swoistej profilaktyce koni przeciw żoźlom. Dzięki bowiem zmianie metody uodporniania, z domięśniowego wstrzyknięcia inaktywowanych szczepionek bakteryjnych lub kwaśnych ekstraktów zawierających białko M na donosowe wprowadzenie rozpylanej hodowli szczepu awirulentnego *Str. equi*, wytwarzającego białko o masie cząsteczkowej 41 000, uzyskano istotnie zwiększony efekt immunizacji koni przeciw żoźlom.

Dane te przemawiają zatem za zaniechaniem szczepień domięśniowych przeciw żoźlom. Rekomendują też zastąpienie szczepionek inaktywowanych szczepionką zawierającą żywy, niejadliwy szczep *Str. equi*. Szczepionkę taką należy podawać przy pomocy rozpylacza donosowo. Tego rodzaju postępowanie wyzwała produkcję w nosogardzieli pożądaných przeciwciał ochronnych, klas IgA i IgG, a tym samym zapewnia powstanie odporności przeciw żoźlom.

#### Piśmiennictwo

1. Beer J.: Choroby zakaźne zwierząt domowych. PWRiL, Warszawa 2, 50, 1980.
2. Blood D. C., Henderson J. A., Radostits O. M.: Veterinary Medicine. Bailliere Tindall, Londyn, 1979, s. 406.
3. Carlton B. C., Brown B. J.: W: Manual of Methods for General Bacteriology. Wyd. P. Gerhard, American Society for Microbiology, Washington, D. C., 1981, s. 226.
4. Cakala S.: Wojsk. Przegl. Wet. 24, 14, 1953.
5. Cakala S., Kuprowski M., Chajkowski M.: Wojsk. Przegl. Wet. 23, 285, 1952.
6. Chajkowski M.: Wojsk. Przegl. Wet. 24, 56, 1953.
7. Chajkowski M.: Wojsk. Przegl. Wet. 26, 52, 1955.
8. Colahan P. T., Mayhew I. G., Merritt A. M., Moore J. N.: Equine Medicine and Surgery. A. Vet. Publ., Goleta, 1991, s. 434.
9. Erickson E. D., Norcross N. L.: Can. J. comp. Med. 39, 110, 1975.
10. Galan J. E., Timoney J. F.: Infect. Immun. 47, 623, 1985.

11. Galan J. E., Timoney J. F., Lengemann F. W.: Infect. Immun. 54, 202, 1986.
12. Galan J. E., Timoney J. F.: J. Clin. Microbiol. 26, 1142, 1988.
13. George J. L., Reif J. S., Shideler R. K., Small C. J., Ellis R. P., Synder S. P., McChesney A. E.: Am. vet. med. Ass. 183, 80, 1983.
14. Jorm L. R.: Aust. vet. J. 67, 436, 1990.
15. Nida K., Cleary P. P.: J. Bact. 155, 1156, 1983.
16. Pinkiewicz E.: Medycyna Wet. 8, 509, 1952.
17. Prescott J. F.: J. Am. vet. med. Ass. 180, 293, 1982.
18. Sweeney C. R., Beson C. H., Whitlock R. H., Meirs D. A., Barningham S. O., Whitehead C. S., Cohen D.: J. Am. vet. med. Ass. 194, 1281, 1989.
19. Timoney J. F.: Vet. Clin. North Am. 9, 365, 1993.
20. Timoney J. F., Eggers D.: Equine vet. J. 17, 306, 1985.
21. Timoney J. F., Galan J. E.: The protective response of the horse to an avirulent strain of streptococcus equi, W: Recent advances in streptococcal disease, red. Kimura Y., Kotamis S., Siokowa A., Reedbooks, Bracknell, Berkshire, 1985, s. 294.
22. Timoney J. F., Trachman J.: Infect. Immun. 48, 29, 1985.
23. Truszczyński M.: Bakteriologia weterynaryjna. PWRiL, Warszawa 1984.
24. Wachnik Z.: Zarys chorób zakaźnych zwierząt. PWRiL, Warszawa 1983.
25. Wintzer H. J.: Equine Diseases. Paul Parey, Berlin – Hamburg, 1986, s. 40.

Adres autora: prof. dr hab. Marian Truszczyński, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

ZBIGNIEW SAMBORSKI

artykuł przeglądowy

## Zastosowanie analogów GnRH i prostaglandyny F<sub>2</sub> alfa w leczeniu niepłodności i profilaktyce poporodowych schorzeń narządu rozrodczego krów

Katedra Patologii Rozrodu Zwierząt i Klinika Położnicza Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, Plac Grunwaldzki 49, 50-366 Wrocław

Syntetyczne analogi hormonu podwzgórza (gonadoliberyny), uwalniającego hormon luteinizujący (LH) i dojrzewania pęcherzyków jajnikowych (FSH) z części gruczołowej przysadki oraz naturalna i syntetyczna prostaglandyna F<sub>2</sub> alfa o właściwościach luteolitycznych znajdują coraz szersze zastosowanie w profilaktyce weterynaryjnej i hodowlanej. W odniesieniu do różnych przypadłości występujących u krów w okresie poporodowym i międzyciążowym, są one wykorzystywane w leczeniu cyst jajnikowych, acyklii, usprawnianiu motoryki macicy we wczesnej fazie *puerperium*, skojarzonej terapii różnych postaci *endometritis*, zwłaszcza śluzowo-ropnego zapalenia i ropomacicza w połączeniu z wprowadzanymi miejscowo innymi lekami, a także w przypadkach cichej rui (*anaphrodisia, suboestrus*) u krów zgrupowanych w większych obiektach hodowlanych.

Analogi GnRH wykazują mniej lub więcej korzystne działanie w synchronizacji rui i czasu owulacji a terminem sztucznego uniassenniania, jak również w zapobieganiu powikłaniom poporodowym poprzez wczesne wznowienie cyklicznej aktywności jajników.

W praktyce na ogół przecenia się skuteczność terapii hormonalnej w zaburzeniach rozrodu bydła. Biorąc pod uwagę decydujący wpływ środowiska zewnętrznego na płodność samic, leczenie za pomocą omawianych hormonów ma tylko charakter substytucyjny, którego wynik jest zależny od sposobu żywienia i utrzymania zwierząt oraz szeregu innych czynników, jak: rasy i typu użytkowego, wieku, stanu narządu ruchu, wydajności mlecznej, pory roku, fazy cyklu jajnikowego lub przedziału czasowego *puerperium*, w którym stosowane są analogi GnRH i prostaglandyny F<sub>2</sub> alfa, ich dawek, a nawet indywidualnej reakcji samicy (1, 2, 9, 13, 21, 22).

Leczenie lub postępowanie profilaktyczne winny być poprzedzone dokładnym rozpoznaniem stanu układu rozrodczego krowy, opartym na szczegółowym wywiadzie położniczo-ginekologicznym, badaniu *per rectum* i uzupełniającym *per va-*

*ginam*. Oceny stanu czynnościowego jajników dokonuje się 2-krotnym badaniem rektalnym w odstępie 10–12 dni. W diagnostyce różnicowej cyst teka-pęcherzykowo-luteinowych oraz acyklii stosuje się oznaczanie poziomu progesteronu w płazmie krwi lub mleku w ujęciu dynamicznym (co najmniej 2–3 razy w odstępie 7 dni).

### Cysty jajnikowe

Występują one najczęściej w ciągu 6–7 tygodni po porodzie (p.p.), powodując niepłodność u 10–30% mlecznych krów (1, 2, 9, 36). Ich obecność wskazuje na niekorzystne oddziaływanie wielu czynników naruszających homeostazę ustroju i prowadzących do zaburzeń w poporodowej wydzielniczości gonadotropin i steroidów jajnikowych. Cysty jajnikowe rozwijają się wówczas, kiedy wznowienie czynności gonad p.p. w postaci dojrzewania pęcherzyków i sekrecji estradiolu pojawia się przedwcześnie, przed osiągnięciem stanu gotowości osi podwzgórza-przysadka do „odpowiedzi” charakteryzującej się wyrzutem pulsacyjnym LH (LH – Peaks) do krwiobiegu i efektu owulacji, odbywających się pod wpływem stymulującego działania estradiolu na zasadzie sprzężenia zwrotnego. Bostedt (3) i inni (16, 33) określili taki stan jako chwijną fazę czynności jajników utrzymującą się aż do poporodowej stabilizacji mechanizmów regulujących funkcję gonad. W etiologii ewolucji cyst pęcherzykowych decydującą rolę odgrywa niedostateczne uwalnianie LH, czego następstwem jest brak owulacji, przy czym przetrwałe pęcherzyki Graafa, zawierające obumarły oocyt, przekształcają się w cienkościenne cysty różnej wielkości o wzmożonej sekrecji związków estrogennych.

W leczeniu stosuje się przede wszystkim analogi hormonu podwzgórza (Gonadotrophin Releasing Hormone – GnRH), do których należą m.in. Receptal ad us. vet. (buserelina) Firmy Hoechst, Dirigestran (gonadorelina) i Supergestran (lecirelina)