

ALINA WIELICZKO

Rola *Campylobacter* w patologii ptaków. IV. Diagnostyka serologiczna zakażeń drobiu wywołanych przez *Campylobacter**)

Katedra Epizootologii i Klinika Chorób Zakaźnych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, Pl. Grunwaldzki 45, 50-366 Wrocław

Summary

The role of *Campylobacter* sp. in the pathology of poultry. IV. Serological diagnosis of *Campylobacter* infections in poultry

The results of serological examinations of chickens after their experimental immunization with inactivated *Campylobacter jejuni* vaccine given subcutaneously (two groups aged from 10-18 days and 21-28 days) or infected orally on day 3 or broilers and laying hens infected under field conditions have been presented.

The level of specific antibodies in sera of immunized chickens (OD ELISA mean values in chickens aged between 10-18 days were 0.316 and aged between 21-28 days (0.475) did not protect them from experimental infection carried out in week two after the second dose of the vaccine. However, two or three day delays in *Campylobacter* colonization were observed following infection with *C. jejuni* (strain Lio 1). Maternal antibodies (OD ELISA – 0.480) in chickens aged 3 days infected *per os* did not protect them from the infection. The analysis of OD ELISA values obtained from hens infected under field conditions demonstrated the relationship between these values and the age and clinical status of poultry. In older and clinically sick birds the values were significantly higher (0.837-1.351 in hens and 0.461-1.532 in chickens) than those in clinically healthy birds (0.417-0.863 and 0.264-0.490, respectively). The serological tests applied (ELISA and AGP) proved to be useful to detect antibodies against *Campylobacter* infections. Precipitating antibodies were found more often in poultry infected parenterally in field conditions, and in sick birds.

W ostatnim dziesięcioleciu Światowa Organizacja Zdrowia zwraca szczególną uwagę na wzrost zakażeń ludzi drobnoustrojami z rodzaju *Campylobacter* (8, 43, 53), podkreślając istotną rolę drobiu i przetworów drobiarskich w szerzeniu się tego typu zakażeń (19, 20, 26, 47). Diagnostyka zakażeń drobiu wywołanych przez *Campylobacter jejuni/coli* opiera się głównie na badaniach bakteriologicznych, zaś w mniejszym zakresie na badaniach serologicznych. Procedura badań bakteriologicznych polegająca na izolacji zarazka jest jednak pracochłonna i długotrwała (3-5 dni), nastęrcza wiele trudności z powodu konieczności używania specjalistycznych podłoży do hodowli i mikroaerofilnych warunków do inkubacji. Poza tym testy sto-

sowane do serotypizacji wyizolowanych już szczepów, ze względu na odmiennosc antygenów bakteryjnych nie zawsze dają jednoznaczne wyniki (29, 41). Z tych też powodów wzrasta zainteresowanie badaniami serologicznymi, które pozwalają na wykrycie swoistych przeciwciał anti-*Campylobacter*. W serologicznej diagnostyce zakażeń wywołanych przez *Campylobacter* znalazły zastosowanie: odczyn aglutynacji (51, 52), hemaglutynacja bierna (24), wiązanie dopełniacza (22), immunofluorescencja (6), a ostatnio testy immunoenzymatyczne – Elisa (7, 8, 25, 28, 33, 37, 42, 49).

W niniejszym opracowaniu przedstawiono wyniki badań serologicznych przy użyciu testu Elisa i odczynu precypitacji w żelu agarowym (OPŻ) surowicy krwi kurcząt uodpornianych i zakażanych eksperymentalnie oraz surowicy kurcząt i kur niosek zakażonych przez *Campylobacter* w warunkach chowu fermowego.

Materiał i metody

Całość badań przeprowadzono w 3 etapach, z których pierwszy obejmował przygotowanie antygenu do testu Elisa oraz odczynu precypitacji w żelu agarowym; etap drugi badania serologiczne surowic kurcząt uodpornianych oraz zakażanych eksperymentalnie przez *Campylobacter*, a etap trzeci określanie poziomu przeciwciał anti-*Campylobacter* w surowicy kurcząt oraz kur niosek zakażonych w warunkach fermowych.

SZCZEPY *CAMPYLOBACTER JEJUNI* UŻYTE DO BADAŃ

Do badań użyto szczepu *Campylobacter jejuni* Lio 1 oraz Lio 6, które po rozmrożeniu z temperatury -70°C przesiewano na podłoże agarowe z dodatkiem odwłóknionej krwi baraniej, inkubowano przez 48 godzin w warunkach mikroaerofilnych, w temp. 42°C , a następnie hodowlę tę używano do przygotowania antygenów lub do zakażeń.

PRZYGOTOWANIE ANTYGENÓW DO TESTÓW SEROLOGICZNYCH

Odczyn precypitacji w żelu agarowym. Bakterie *C. jejuni* Lio 6 po 48 godzinnej inkubacji na podłożu agarowym z krwią splukano sterylnym PBS, przemyto 3-krotnie, wirując każdorazowo przez 15 min. przy $10\,000\times\text{g}$ w temp. 4°C . Przemyty osad rozpuszczano w 3 mM TRIS buforze (pH 7,0) i wirowano kolejne 2 razy, a następnie ścianę komórki bakteryjnej rozbiłano ultradźwiękami, przy 2 kHz przez 1 minutę w łaźni z lodem. Otrzymany sonifikat oczyszczano poprzez wirowanie przy $40\,000\times\text{g}$ przez 30 min. Stężenie białka w supernatancie oznaczano wg metody opisanej przez Lowry i wsp. (31). Do momentu użycia antygen przetrzymywano w temp. -20°C .

Test OPŻ wykonano mikrometodą, na 1,5% agarze, używając po 10 μl surowicy oraz antygenu (stężenie białka 10 mg białka/ml). W teście uwzględniono kontrolne surowice dodatnie (otrzymane po immunizacji kurcząt SPF zabitym oraz dodatkowo żywym szczepem *C. jejuni*) oraz surowice ujemne (surowice kurcząt SPF wolne od *Campylobacter*, otrzymane z firmy Lohmann, Niemcy). Pojawiające się linie precypitacyjne odczytywano po 24 i 48 godzinach inkubacji w temp. 24°C .

*) Praca finansowana przez KBN. Projekt Badawczy Nr 559159203

Przygotowanie antygeny do testu ELISA. Antygen do testu Elisa przygotowany ze szczepów *C. jejuni* Lio 1 oraz *C. jejuni* Lio 6. Każdy ze szczepów posiewano na około 100 płytek Columbia Agar Base (Oxoid) z dodatkiem 7% odwiłknionej krwi baraniej. Po 48 godzinnej inkubacji w warunkach mikroaerofilnych bakterie spfukowano z pożywki i 3-krotnie przemywano w roztworze buforu fosforanowego (PBS) wirując każdorazowo przez 20 minut przy 6700×g. Supernatant odrzucano a osad bakteryjny pozostawiano w temp. 4°C przez 12 godzin w buforze węglanowo-dwuwęglanowym (pH 9,6). Po tym czasie komórki bakteryjne rozbijano ultradźwiękami, stosując 3 impulsy o natężeniu 20 kHz przez 30 sekund każdy, w odstępie 1 minuty (Ultrasonifikator, FA, MSE). Uzyskany sonifikat oczyszczano poprzez ponowne wirowanie przez 30 minut przy 40 000×g w 4°C (Superspeed RC2-B), a następnie klarowny już antygen porcjowano po 2 ml i zamrażano w temp. -70°C do momentu użycia w teście Elisa. Stężenie białka ogólnego w antygenie określano metodą BCA-mikro wg Smith i wsp. (45).

Odczyn immunoenzymatyczny ELISA wykonano wg metody opisanej przez Franz i wsp. (15) w modyfikacji własnej, na płytkach polistyrenowych (Nunc, F96). Płytki opłaszczano nanosząc do każdego baseniku 100 µl antygeny (antygen rozcieńczano w buforze węglanowo-dwuwęglanowym do koncentracji białka 1 µg/ml) i pozostawiano przykrytą płytkę na delikatnej wytrząsarce w temp. 37°C przez 1 godzinę. Następnie po 3-krotnym przepłukaniu płytek roztworem PBS zawierającym 0,05% Tween 20 (PBST) przy pomocy automatycznej płuczki, do dołek nanoszono po 100 µl badanych surowic, rozcieńczonych w PBST (1:100). Każdą próbę wykonano w 3 kolejnych powtórzeniach. Płytki z naniesionymi surowicami inkubowano przez 15 minut w temp. 37°C i łagodnie kołysano na wytrząsarce, a następnie powtórzono 3-krotne płukanie roztworem PBST. Jako pierwsze przeciwciała zastosowano skoniugowane z biotyną królicze przeciwciała anti-kurzym IgG (100 µl na dołek), a po 15 minutach inkubacji w 37°C dodawano po 100 µl drugiego koniugatu – sprzężonego ze streptawidyną peroksydazy (oba koniugaty rozcieńczone w PBST 1:40 000, firmy Fa. DIANOVA, Niemcy). Po 15 minutach inkubacji i kolejnym 3-krotnym płukaniu nanoszono do każdego dołka po 100 µl świeżo przygotowanego zbuforowanego roztworu substratu (użyto ATBS (2,2'-Azino-Di-3 Ethyl-Benzthiazolin-Sulphonat) rozcieńczonego w 0,2 M buforze cytrynianowym o pH 4,0 z dodatkiem 20 µl/ml 1% H₂O₂). Po kolejnych 15 minutach reakcję blokowano za pomocą 50% metanolu.

Test wykonano z kontrolą negatywną (surowica 10 tyg. kurcząt SPF, Lohmann), kontrolą pozytywną (surowica 10 tyg. kurcząt, zakażonych w 5 tyg. życia *per os* dawką $6,0 \times 10^8$ cfu/ml, a następnie podskórnie dawką $3,6 \times 10^6$ cfu/ml szczepem *C. jejuni* Lio 6) oraz ze ślepą próbą. Odczytu płytki dokonano w czytniku Multiskan-Plus MK 2 firmy Nunc, przy długości fali 405 nm. Wyniki podano w wartościach absorbancji (OD Elisa).

EKSPERYMENTALNA IMMUNIZACJA KURCZĄT RZEŹNYCH

Badanie wykonano na 2 grupach kurcząt rzeźnych (razem 400 sztuk), które do 10 dnia życia odchowywano we wspólnym pomieszczeniu w klatkach (żywienie *ad libitum* standardową mieszanką DKA-Starter). W 10 dniu odchovu ptaki podzielono na 2 grupy liczące po 200 ptaków każda i poddano szczepieniu według poniższego schematu.

Ptaki grupy pierwszej (50%) zaszczepiono w 10, a następnie 18 dniu życia, podając podskórnie w okolice podstawy szyi 0,2 ml szczepionki inaktywowanej formaliną (0,5% końcowej objętości) z dodatkiem (50/50) kompletnego adiuwantu Freund, sporządzonej ze szczepu standardowego *C. jejuni* Lio 1, o gęstości 10^{11} cfu/ml. Następnie 50% ptaków tej grupy stanowiło kontrolę nie szczepioną. W 32 dniu życia tj. 2 tyg. po drugiej dawce zakażano kontrolnie po 50% ptaków z każdej grupy (szczepionej i nie szczepionej) szczepem homologicznym – *C. jejuni* Lio 1 zaś pozostałe 50% ptaków szczepem heterologicznym – *C. jejuni* Lio 6 (zakażenie *per os*, dawka każdego

ze szczepów 1×10^5 cfu/ml). Krew do badań serologicznych pobierano w 3 (20 losowo wybranych kurcząt), a następnie w 10, 18, 32, 39 i 46 dniu, pobierając każdorazowo po 10 prób z każdej grupy ptaków. Przez pierwsze kolejne 5 dni po zakażeniu, a następnie w 7 i 14 dniu po zakażeniu pobierano wymazy kałowe w celu określenia stopnia kolonizacji jelit przez *Campylobacter*.

Ptaki grupy drugiej zaszczepiono w terminie późniejszym tj. w 21 i 28 dniu życia (50%), a pozostałe 50% stanowiło kontrolę nie szczepioną. Challenge wykonano 2 tygodnie po drugim podaniu szczepionki tj. w 42 dniu życia szczepem homo- i heterologicznym. Krew do badań pobierano w 3, 21, 28, 42, 49 i 56 dniu życia, a wymazy kałowe w 1, 2, 3, 4, 5, 7 i 14 dniu po zakażeniu kontrolnym. Oddzielną grupę (dla każdego z dwu poprzednich doświadczeń), odchowywaną w izolowanym pomieszczeniu stanowiła kontrolna grupa kurcząt nie szczepionych i nie zakażonych.

BADANIA SEROLOGICZNE KURCZĄT ZAKAŻONYCH EKSPERYMENTALNIE *CAMPYLOBACTER*

Badania wykonano na 2 grupach kurcząt rzeźnych liczących po 30 ptaków każda. Jedną z nich zakażano w 3 dniu życia, *per os*, żywym szczepem *C. jejuni* Lio 6, dawką 0,5 ml, o gęstości 10^7 cfu/ml. Natomiast druga grupa stanowiła kontrolę doświadczenia.

Krew do badań serologicznych (10 prób z każdej grupy) pobrano w 3 dniu życia ptaków, celem określenia przeciwciał matczynych, a następnie w 3, 7, 14, 21, 28, 35 i 42 dniu po zakażeniu. W tych samych terminach pobierano wymazy kałowe od wszystkich ptaków w celu kontroli stopnia zakażenia jelit przez *Campylobacter*.

BADANIA SEROLOGICZNE SUROWIC PTAKÓW ZAKAŻONYCH NATURALNIE W WARUNKACH FERMOWYCH

Do badań serologicznych wykorzystano:

- 210 surowic pobranych z 16 stad kur niosek, od ptaków będących w różnym okresie produkcji (od 2 dniowych piskląt typu nieśnego aż do 60 tyg. niosek), pochodzących z różnych ferm zlokalizowanych na terenie Dolnego Śląska,
- 120 surowic pobranych z 10 różnych ferm kurcząt rzeźnych w wieku od 3 dnia życia do 9 tyg.

Badane serologicznie stada kurcząt rzeźnych oraz kur niosek kontrolowano równocześnie na obecność *Campylobacter* w jelitach (badanie bakteriologiczne 20 wymazów kałowych z każdego stada).

W badaniach surowic terenowych oraz u kurcząt po eksperymentalnym zakażeniu używano w teście Elisa antygen sporządzony w oparciu o szczep *C. jejuni* Lio 6, natomiast w badaniu surowic po eksperymentalnej immunizacji olejową szczepionką dodatkowo antygen *C. jejuni* Lio 1. Wszystkie surowice pobierane w trakcie doświadczeń przetrzymywano do momentu wykonania testów serologicznych w temperaturze -70°C.

Wyniki i omówienie

Wyniki przeprowadzonych badań serologicznych zestawiono w tab. 1 oraz na ryc. 1-8.

U kurcząt immunizowanych w 10 i 18 dniu życia nie zanotowano wzrostu poziomu przeciwciał anti-*Campylobacter* w 8 dniu po pierwszym szczepieniu (średnie wartości OD Elisa 0,184 w grupie szczepionej przy 0,121 dla grupy kontrolnej) (ryc. 1-4). Wzrost ten zaobserwowano w 14 dniu po drugiej dawce, a wartości OD Elisa wynosiły odpowiednio 0,316 dla grupy szczepionej i 0,153 w grupie kontrolnej. Po zakażeniu kontrolnym (challenge szczepem *C. jejuni* Lio 1 oraz Lio 6), stwierdzono dalszy wzrost poziomu przeciwciał w grupach immunizowanych. W 14 dniu po zakażeniu kontrolnym wartości OD Elisa były wyższe po zakażeniu szczepem

Lio 6 dla obu użytych w teście antygenów (0,497 dla antygeny heterologicznego Lio 1 oraz 0,662 dla antygeny homologicznego Lio 6), w porównaniu do wartości uzyskanych po zakażeniu szczepem Lio 1 (dla antygeny homologicznego Lio 1

średnia wartość OD wynosiła 0,357 i dla antygeny heterologicznego Lio 6 – 0,486). Zakażenie kontrolne w grupach ptaków nie szczepionych spowodowało wzrost wartości OD Elisa, nie był on jednak tak znaczny, jak w grupach uodpornianych (ryc. 1-2).

Wyraźnie wyższe wartości OD Elisa uzyskano jednak po szczepieniu kurcząt w 21 i 28 dniu życia (ryc. 3-4). W 7 dniu po pierwszej dawce antygeny stwierdzono wyraźny wzrost poziomu przeciwciał (wartość OD Elisa 0,475 dla ptaków szczepionych, przy 0,118 dla nie szczepionych). Powtórna dawka po 2 tygodniach nie spowodowała tak silnej odpowiedzi immunologicznej, jak u ptaków młodych. Zakażenie kontrolne spowodowało, podobnie jak w grupach ptaków immunizowanych w 10 i 18 dniu życia dalszy wzrost tych wartości (0,634 i 0,540 dla antygeny Lio 1 i odpowiednio 0,610 i 0,690 dla antygeny Lio 6). Wykazano również, że kurczęta szczepione w późniejszym okresie życia (21 i 28 dzień) wykazywały 2 tygodnie po zakażeniu kontrolnym wyższe wartości OD Elisa z obu użytych w teście antygenami w porównaniu do uodpornianych w 10 i 18 dniu.

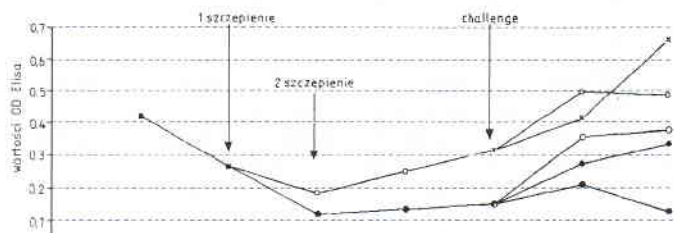
Przeciwciała precypitujące u kurcząt immunizowanych w 10 i 18 dniu życia wykryto testem OPŻ dopiero 14 dnia po drugiej dawce (10% prób dodatnich), a następnie w 46 dniu (20,0%). Z kolei u kurcząt uodpornianych w 21 i 28 dniu pierwsze przeciwciała wykazano w 7 dniu po pierwszym szczepieniu (20,0% badanych prób), a następnie w kolejnych terminach badań tj. w 2 tyg. i 4 tyg. po drugim szczepieniu (odpowiednio 30,0% i 20,0%) (ryc. 1-4).

Jednak immunizacja ptaków olejową szczepionką, podaną podskórnie ptakom w różnym wieku, nie zabezpieczała ich przed zakażeniem kontrolnym *C. jejuni* Lio 1 i Lio 6. W 7 dniu po zakażeniu wykazano wysoki stopień zakażenia jelit ptaków przez *Campylobacter*, zarówno w grupach szczepionych jak i nie szczepionych (88,8% dla grup szczepionych i 91,1% dla nie szczepionych). Wysoki stopień kolonizacji jelit utrzymywał się we wszystkich grupach doświadczalnych do końca eksperymentu. Na uwagę zasługuje jednak fakt opóźnienia czasu kolonizacji o 2-3 dni w grupach ptaków szczepionych i zakażonych homologicznym szczepem (*C. jejuni* Lio 1). W 5 dniu po zakażeniu tym szczepem stopień kolonizacji jelit wynosił tylko 22,2%, podczas gdy w grupie kontrolnej 93,3%.

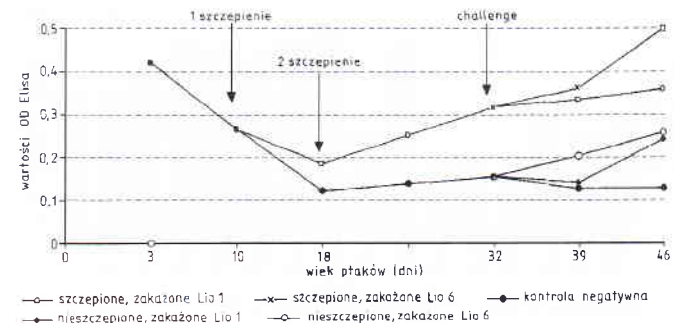
Wyniki badań serologicznych po zakażeniu eksperymentalnym jelit ptaków przez *Campylobacter jejuni* Lio 6 przedstawiono w tab. 1. U badanych ptaków wykazano wysoki poziom przeciwciał matczynych – średnia wartość OD Elisa w 2 dniu życia wynosiła 0,480. W 3 dniu po zakażeniu, przy obecności u 90% badanych ptaków obecności *Campylobacter* w jelitach stwierdzono spadek wartości OD Elisa do poziomu 0,118. Począwszy od 7 dnia po zakażeniu obserwowano stopniowy ich wzrost (od 0,248 w 7 dniu do 0,526 w 42 dniu po zakażeniu). W grupie kontrolnej średnie wartości OD Elisa były niskie i wynosiły odpowiednio od 0,194 do 0,154.

Przeciwciała precypitujące wykazano u ptaków zakażonych *per os* przez *Campylobacter* w niewielkim odsetku badanych surowic w 35 i 42 dniu po zakażeniu (odpowiednio 6,7% i 3,3%). W tym czasie, począwszy od 3 dnia po zakażeniu *Campylobacter* izolowano od 90-100% ptaków. W grupie kontrolnej ptaków nie notowano wzrostu poziomu przeciwciał po spadku poziomu przeciwciał matczynych, a w jelitach nie wykazano obecności *Campylobacter*.

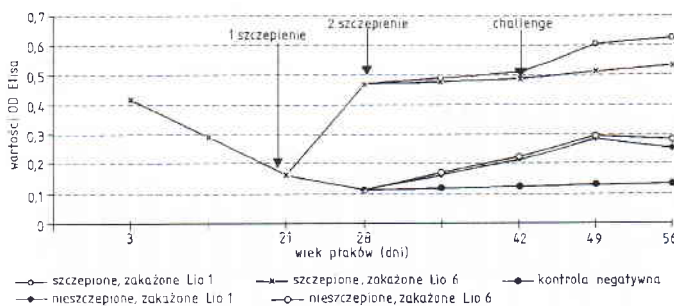
Analiza wyników badań serologicznych surowic kurcząt rzeźnych zakażonych w warunkach naturalnych przez *Cam-*



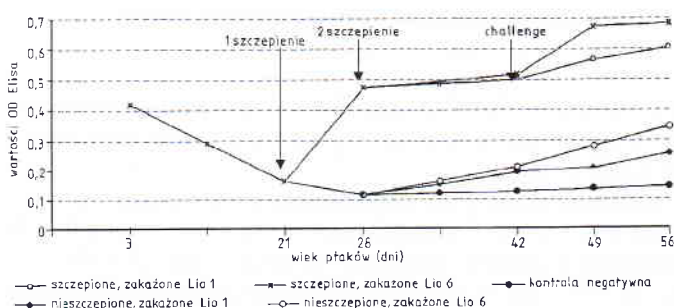
Ryc. 1. Poziom przeciwciał anti-*Campylobacter* w surowicy kurcząt szczepionych w 10 i 18 dniu życia (antygen Lio 6)



Ryc. 2. Poziom przeciwciał anti-*Campylobacter* w surowicy kurcząt szczepionych w 10 i 18 dniu życia (antygen Lio 1)



Ryc. 3. Poziom przeciwciał anti-*Campylobacter* w surowicy kurcząt szczepionych w 21 i 28 dniu życia (antygen Lio 1)

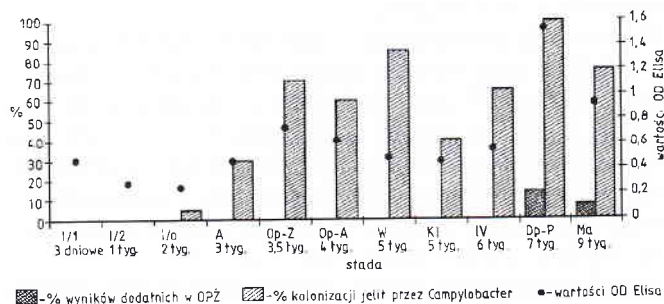


Ryc. 4. Poziom przeciwciał anti-*Campylobacter* w surowicy kurcząt szczepionych w 21 i 28 dniu życia (antygen Lio 6)

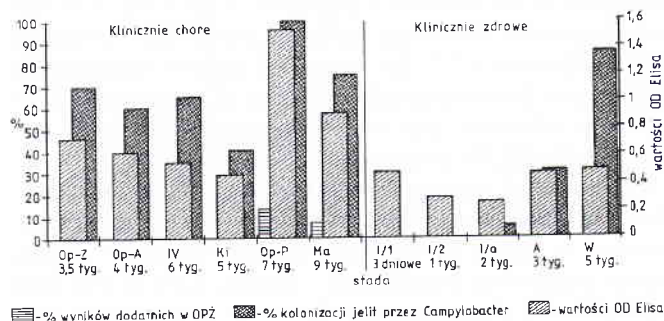
Tab. 1. Poziom przeciwciał anti-*Campylobacter* w surowicy kurcząt zakażonych *per os* *Campylobacter*

Grupa ptaków	Analizowane wskaźniki	2 dzień życia	Dni po zakażeniu						
			3	7	14	21	28	35	42
Ptaki zakażone	wartość OD ELISA*	0,480	0,118	0,248	0,356	0,320	0,510	0,480	0,526
	% prób dodatnich w OPZ*	0	0	0	0	0	0	6,7	3,3
	% zakażonych ptaków**	0	90,0	100,0	93,3	90,0	96,7	96,7	96,0
Ptaki kontrolne	wartość OD ELISA	0,480	0,124	0,194	0,091	0,120	0,126	0,121	0,154
	% prób dodatnich w OPZ	0	0	0	0	0	0	0	0
	% zakażonych ptaków	0	0	0	0	0	0	0	0

Objaśnienia: * – każdorazowo po 15 surowic, ** – każdorazowo 30 wymazów.

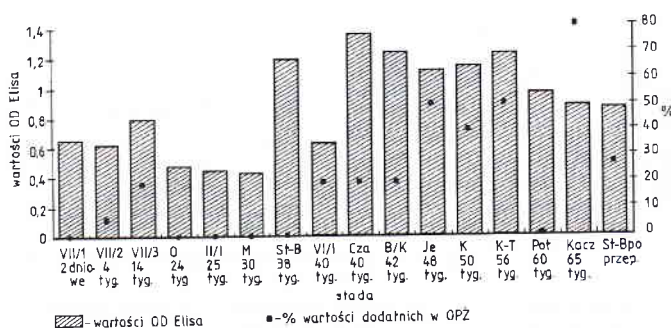


Ryc. 5. Poziom przeciwciał anti-*Campylobacter* w surowicy kurcząt rzeźnych zakażonych w warunkach naturalnych (fermy uszeregowano wg wieku ptaków)

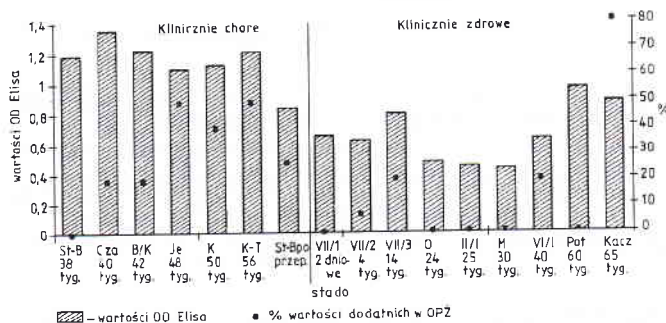


Ryc. 6. Poziom przeciwciał anti-*Campylobacter* w surowicy kurcząt rzeźnych zakażonych w warunkach naturalnych (fermy uszeregowano wg stanu klinicznego ptaków)

pylobacter wykazała zależność istniejącą pomiędzy określonymi wartościami OD ELISA, a wiekiem ptaków oraz ich stanem zdrowotnym (ryc. 5-6). Poziom przeciwciał matczynych obniżał się stopniowo do 2 tyg. życia kurcząt (z wartości OD -0,486 w 3 dniu życia do 0,264 u kurcząt 2 tygodniowych), a następnie notowano stopniowy wzrost, po zakażeniu naturalnym (średnia wartość u 9 tyg. kurcząt – 0,920 – ryc. 5). W stadach kurcząt, w których nie zanotowano objawów klinicznych choroby ze strony przewodu pokarmowego (głównie biegunek), wartości OD ELISA kształtowały się w granicach



Ryc. 7. Poziom przeciwciał anti-*Campylobacter* w surowicy kur niosek zakażonych w warunkach naturalnych (fermy uszeregowano wg wieku ptaków)



Ryc. 8. Poziom przeciwciał anti-*Campylobacter* w surowicy kur niosek zakażonych w warunkach naturalnych (fermy uszeregowano wg stanu klinicznego ptaków)

0,264 (2 tyg.) do 0,490 (5 tyg.). Natomiast w stadach klinicznie chorych wartości te były wyższe i wynosiły od 0,461 (5 tyg.) do 1,532 (7 tyg.).

Obecność przeciwciał precypitujących u kurcząt rzeźnych zakażonych przez *Campylobacter* w warunkach naturalnych wykazano u ptaków klinicznie chorych 7 tyg. (13,3%) i 9 tyg. (6,7%) – ryc. 6. Stopień naturalnego zakażenia jelit przez *Campylobacter* kontrolowany w trakcie badań serologicznych wahał się od 5,0% u ptaków 1 tygodniowych do 100,0% u 7 tygodniowych (ryc. 5).

Badania serologiczne surowic kur niosek zakażonych w warunkach naturalnych przez *Campylobacter*, nie wykazały tak znacznego jak u kurcząt rzeźnych wpływu wieku badanych ptaków na poziom przeciwciał anti-*Campylobacter* (ryc. 7-8). Wartości OD Elisa stwierdzone u 4 tygodniowych kurek były podobne jak u 40 tygodniowych ptaków (odpowiednio 0,617 i 0,615). Wykazano natomiast bardzo istotny wpływ klinicznego stanu ptaków na wartości OD Elisa, które w stadach kur klinicznie chorych były zdecydowanie wyższe i wahały się od 0,837 do 1,351. Ponadto odnotowano w tych stadach wyższy % wyników dodatnich w teście OPŻ, w porównaniu z zakażonymi w warunkach fermowych kurczętami. Przeciwciała precypitujące stwierdzono w niewielkim odsetku już u 4 tygodniowych, naturalnie zakażonych kurek (6,7%), zaś w dużym procencie u ptaków starszych (20 do 80 %). Częściej jednak precypityny wykrywano w stadach kur klinicznie chorych (85,7% i odpowiednio w mniejszym nasileniu klinicznie zdrowych – 44,4%).

Na uwagę zasługują wyniki testu Elisa oraz OPŻ uzyskane u kur pochodzących ze stada, w którym potwierdzono kliniczną postać kampylobakteriozy (drobnoustrój wyizolowano ze zmienionych chorobowo wątrób, a ptaki leczono preparatami furanowymi). Wykazany u tych ptaków poziom przeciwciał anti-*Campylobacter* był wysoki przez cały okres obserwacji stada. Po rozpoznaniu zakażenia (stado było wówczas w 38 tyg. życia) wartość OD Elisa wynosiła 1,185, a następnie 1,222 w 4 tyg. po zakończonym leczeniu i 0,837 w 60 tyg. życia.

W piśmiennictwie weterynaryjnym brak jest publikacji dotyczących kształtowania się swoistej odpowiedzi immunologicznej u ptaków zakażonych *Campylobacter*. Również słabo udokumentowany jest wpływ obecności przeciwciał matczynych oraz przeciwciał wytwarzanych po stymulacji antygenowej na stopień kolonizacji jelit przez *Campylobacter*. W przebiegu zakażeń ptaków *Campylobacter* dochodzi do stymulacji odpowiedzi immunologicznej wyrażającej się produkcją swoistych przeciwciał klasy IgG, IgM i sIgA. Przeciwciała te pojawiają się w surowicy klinicznie chorych ludzi w 6 dniu po wystąpieniu pierwszych objawów choroby (21, 25), po czym najszybciej znikają przeciwciała klasy IgM o aktywności bakteriobójczej. Ochronna rola swoistych przeciwciał anti-*Campylobacter* poznana została na przykładzie łagodnego przebiegu zakażenia u dzieci w Bangladeszu (5). Również w krajach rozwijających się, gdzie zakażenia *Campylobacter* są szeroko rozprzestrzenione, wczesna stymulacja układu immunologicznego prowadzi do podwyższenia poziomu przeciwciał anti-*Campylobacter* w surowicy i w efekcie łagodniejszego przebiegu zakażenia u ludzi w tych regionach. Również regularne spożywanie nie pasteryzowanego mleka, zakażonego przez *Campylobacter* stymuluje naturalną odporność na zakażenie (9).

Badania wykonane na ciężarnych myszach przez Dolby i Newell (12), szczepionych dootrzewnowo przed wykotem zabitym szczepem *C. jejuni* wykazały, że następuje przekazywanie przeciwciał na potomstwo, przy czym uzyskany poziom przeciwciał matczynych zabezpiecza oseski mysie przed zakażeniem heterologicznym szczepem *C. jejuni*. Z kolei Abimiku i Dolby (1, 2) oraz Dolby (11) wykazali, że oseski mysie karmione mlekiem matek immunizowanych dootrzewnowo żywym szczepem *C. jejuni*, były bardziej odporne na zakażenie kontrolne i kolonizację jelit tym szczepem.

Zastosowanie w badaniach własnych szczepionki olejowej, przygotowanej ze szczepu *C. jejuni* Lio 1 nie dało oczekiwanych rezultatów zabezpieczenia ptaków przed infekcją *Campylobacter*. Wykazany wzrost poziomu przeciwciał anti-*Campylobacter* u ptaków szczepionych nie zabezpieczał ich przed zakażeniem kontrolnym. Uzyskano wprawdzie opóźnienie czasu kolonizacji jelit o 2-3 dni po kontrolnym zakażeniu szczepem homologicznym (*C. jejuni* Lio 1), jednak stopień zakażenia ptaków w późniejszym okresie doświadczenia był zbliżony jak w grupie nie uodpornionej.

Słabsza reakcja ptaków młodych na wprowadzony antygen może być wytłumaczona obecnością przeciwciał matczynych w momencie podania szczepionki oraz słabym funkcjonowaniem, nie w pełni jeszcze rozwiniętego systemu immunologicznego. Dlatego też po szczepieniu ptaków zbyt młodych wyższy poziom przeciwciał uzyskano po drugim podaniu antygeny (booster effect). Gerlach i Gylstorff (16) wykazali od 14 dnia po zakażeniu obecność przeciwciał aglutynujących u części eksperymentalnie zakażonych 1 dniowych kurcząt. Podobne wyniki badań serologicznych podają Myszewski i Stern (37) u kurcząt poddanych kolonizacji jelit w 1 dniu życia. Wykazali oni wysoki poziom przeciwciał IgG w surowicy krwi w 1 dniu, który następnie obniżał się w ciągu dwóch tygodni, osiągając w 14 dniu najniższą wartość. Po tym czasie notowano powolny wzrost odczytów OD Elisa, do wartości dwukrotnie wyższych niż w kontrolnej grupie ptaków. Zdaniem autorów, ten wysoki poziom IgG w surowicy nie wpłynął na redukcję zakażenia ptaków przez *Campylobacter*. Natomiast określany równoległe poziom sIgA w żółci był niski tuż po wylęgu, następnie w grupie ptaków po kolonizacji jelit stopniowo wzrastał i w 28 dniu życia osiągnął wyższą wartość niż w grupie kontrolnej. Niektórzy autorzy uważają, że przeciwciała sekrecyjne IgA odgrywają dużą rolę w zapobieganiu kolonizacji jelit przez *Campylobacter* (35, 46), podobnie jak sIgA zapobiegają kolonizacji nabłonka jelit przez *Vibrio cholerae* (14)), czy enterotoksyczą *E. coli* (34).

Wysoki poziom matczynych przeciwciał anti-*Campylobacter* u piskląt wydaje się zabezpieczać je przed wczesną, naturalną kolonizacją jelit przez ten drobnoustrój. W warunkach naturalnych *Campylobacter* nie jest stwierdzany u ptaków młodszych niż 10-14 dniowe (3, 13, 38). Poglądów tych nie podzielają Wasenaar i wsp. (50), którzy w swoich najnowszych badaniach wykazali, że wysoki poziom przeciwciał matczynych nie zabezpiecza ptaków młodych przed zasiedlaniem jelit przez *Campylobacter*. Natomiast znacznie niższą kolonizację jelit przez *Campylobacter* uzyskał Khoury i Meinersmann (27) po zastosowaniu aktywnej immunizacji ptaków termolabilną toksyną *E. coli* oraz antygenem rzęskowym (flagellina) *Campylobacter jejuni*.

Zastosowane w badaniach własnych testy Elisa oraz OPŻ okazały się przydatne do wykrywania zakażeń kur wywołanych przez *Campylobacter*. Testem Elisa wykazano wyższe wartości OD Elisa u ptaków w stadach klinicznie chorych, co sugeruje, że może być on zastosowany do wykrywania klinicznej kampylobakteriozy. To spostrzeżenie wydaje się szczególnie istotne, ponieważ badania innych autorów nie wykazały w teście Elisa reakcji krzyżowych pomiędzy strukturami antygenowymi *Campylobacter* a bakteriami z rodzaju *Enterobacteriaceae* (39, 44). Stwierdzenie we własnych badaniach wysokich wartości OD Elisa zarówno po zastosowaniu antygeny homologicznej (Lio 1), jak też heterologicznej

(Lio 6), u kurcząt eksperymentalnie immunizowanych stwarza możliwości wyboru do testu jednego z tych antygenów.

Zastosowany w teście Elisa koniugat, w tzw. systemie sprzężenia z biotyną i streptawidyną stanowi bardzo czułą i wysoce specyficzną formę oznaczania poziomu przeciwciał. System ten został opisany przez Guesdon i wsp. (17), a w diagnostyce chorób drobiu wykorzystywano go do określania przeciwciał IgA anty-*Mycoplasma gallisepticum* (4), przeciwciał anty-różycowych (15) oraz anty-*Campylobacter* (18). Ponadto Cummins i wsp. (10) wykazali wyższą czułość tego testu Elisa w porównaniu z hemaglutynacją bierną. Z kolei test precypitacji w żelu agarowym używany jest również bardzo często jako metoda diagnostyczna wielu zakażeń wirusowych u drobiu (23, 32, 48) oraz metoda wykrywania przeciwciał anty-*Mycoplasma* (40). Użyty w badaniach własnych antygen okazał się pomocny do wykrywania przeciwciał anty-*Campylobacter* u drobiu. Przeciwciała precypitujące wykazano nie tylko po eksperymentalnej immunizacji, ale również w surowicy ptaków zakażonych w warunkach naturalnych. Ponadto badania Logan i Trust (30) wykazały, że dla określenia przeciwciał precypitujących anty-*Campylobacter* można użyć jako antygeny dowolnie wybrany szczep, lub serotyp *Campylobacter*, ponieważ w teście OPŻ zachodzą reakcje krzyżowe pomiędzy poliklonalnymi przeciwciałami a białkiem rzeszkowym *Campylobacter*. Reakcje te wyeliminowane są dopiero po absorpcji surowicy homologicznym szczepem. Również badania białek głównych błony zewnętrznej (major outer membrane proteins) różnych szczepów *Campylobacter* wykazały pokrewieństwo antygenowe między nimi (7, 30, 36, 54).

Wnioski

Wyniki badań serologicznych drobiu uodpornianego i zakażonego przez *Campylobacter*, pozwalają na wyciągnięcie następujących wniosków:

1. Podanie olejowej, inaktywowanej szczepionki (szczep *C. jejuni* Lio 1) kurczętom w różnym wieku nie zabezpiecza ich przed zakażeniem kontrolnym *per os* szczepem homo- i heterologicznym *C. jejuni*.
2. Obecność przeciwciał matczynych anty-*Campylobacter* w surowicy piskląt nie chroni je przed zakażeniem kontrolnym (*per os*) *C. jejuni*.
3. Poziom przeciwciał anty-*Campylobacter* w surowicy kur i kurcząt zakażonych *Campylobacter sp.* w warunkach fermowych uzależniony był od wieku ptaków oraz ich stanu klinicznego.
4. Testy serologiczne – Elisa i OPŻ są przydatne w diagnostyce zakażeń drobiu przez *Campylobacter*.

Piśmiennictwo

1. Abimiku A. G., Dolby J. M.: J. Medical. Microbiol. 23, 339, 1987.
2. Abinuku A. G., Dolby J. M., Borriello S. P.: Epidemiol. Infect. 102, 272, 1989.
3. Annah-Prah A., Janc M.: J. Vet. Med. B 35, 11, 1988.
4. Barbour E. K., Newman J. A., Sivanandan V., Sasipreeyajan J.: Avian Dis. 32, 416, 1988.
5. Blaser M. J., Black R. E., Duncan D. J., Amer J.: J. Clin. Microbiol. 21, 164, 1985.
6. Blaser M. J., Duncan D. J., Osterholm M., Istre G. R., Wang W. L. L.: J. Infect. Dis. 147, 820, 1983.
7. Blaser M. J., Duncan D. J.: Infect. Immun. 44, 292, 1984.
8. Blaser M. J., Taylor D. N., Echeverria P.: J. Infect. Dis. 153, 249, 1986.
9. Blaser M. J., Sasie E., Williams L. P.: J. Am. Med. Ass., 257, 43, 1987.
10. Cummins D. R., Reynolds D. L., Rhoades K. R.: Avian Dis. 34, 36, 1990.
11. Dolby J. M.: J. Hyg. Camb. 96, 143, 1986.
12. Dolby J. M., Newell D. G.: J. Hyg. Camb. 96, 143, 1986.
13. Evans S. J.: Vet. Rec. 131, 574, 1992.
14. Fabura E. S., Freter R.: J. Immunol. 111, 395, 1973.
15. Franz B., Warlich B., Oltrogge A.: Immunobiol., Suppl. 4, 133, 1989.
16. Gerlach H., Gylstorff I.: Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 80, 153, 1967.
17. Guesdon J. L., Ternynck T., Avrameas S.: J. Histochem. Cytochem. 27, 1131, 1979.
18. Haas B.: Praca dokt., Tierärztl. Hochschule Hannover 1994.
19. Harris N. V., Weiss N. S., Nolan C. M.: Am. J. Public Health 76, 407, 1986.
20. Humphrey T. J.: Proc. WHO Consultation on Epidemiology and Control of Campylobacteriosis in Humans and Animals. Nat. Inst. Public Health Environ. Prot. Bilthoven, Netherlands, 25-27 April, 1994, s. 153.
21. Jones D. M., Eldrige J., Dale B.: J. Clin. Pathol. 33, 767, 1980.
22. Jones D. M., Robinson D. A., Eldrige J.: J. Hyg. 87, 163, 1981.
23. Jordan F. T., Chubb R.: Res. Vet. Sci. 3, 245, 1962.
24. Johns D. M.: w J-P. Butzler: Campylobacter Infection in Man and Animals. CRP Press, Boca Raton, Florida, 1994, s. 97.
25. Kaldor J., Pritchard H., Serpell A., Metcalf W.: J. Clin. Microbiol. 18, 1, 1983.
26. Kapperud G., Skjerve E., Bean N. H., Ostroff S. M., Lassen J.: J. Clin. Microbiol. 30, 3117, 1992.
27. Khoury C. A., Meinersmann R. J.: Abstract at the ASM annual meeting, 1993.
28. Kohno A., Terao K., Takasaka M., Honjo S.: Lab. Anim. Sci., 38, 715, 1988.
29. Lior H., Woodward D. L., Edgar J. A., Laroche L. J., Gill P.: J. Clin. Microbiol. 15, 761, 1982.
30. Logan S. M., Trust T. J.: J. Bacteriol. 168, 1986.
31. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.: J. Clin. Chem. 193, 265, 1952.
32. Lukert P. D., Davis R. B.: Avian Dis. 15, 935, 1971.
33. Martin P. M. V., Mathiot J., Ipero J., Georges A. J., Georges-Courbot M. C.: J. Clin. Microbiol. 26, 1421, 1988.
34. McNabb P. C., Tomasi T. B.: Ann. Rev. Microbiol. 35, 477, 1981.
35. McSweeney E., Burr D. H., Walker R. J.: Infect. Immunol. 55, 1431, 1987.
36. Mills S. D., Wayne C. B., Penner J. L.: J. Clin. Microbiol. 24, 69, 1986.
37. Myszewski M. A., Stern N. J.: Avian Dis. 34, 588, 1990.
38. Neill S. D., Campbell J. N., O'Brien J. J.: Avian Pathol. 13, 777, 1984.
39. Newell D. G.: J. Hyg. Camb. 96, 377, 1986.
40. Nonomura I., Yoder H. W.: Avian Dis. 21, 370, 1977.
41. Penner J. L., Hennessy J. N.: J. Clin. Microbiol. 12, 732, 1980.
42. Przondo-Mordarska A., Gościński G., Sobieszkańska B., Dzierżanowska D., Mauff G.: Med. Dośw. 41, 160, 1989.
43. Rapport Nr 148612 002, 1990; Rapport Nr 149101 001, 1992., Bilthoven, Niederlande.
44. Schwartz D., Melamed I., Cohen D., Konforti N., Goldhar J.: Isr. J. Med. Sci. 26, 319, 1990.
45. Smith P. K., Krohn R. J., Hermanson G. T., Gartner F. H., Goeke N. M., Olson B. J., Klenk U. D. C.: Anal. Biochem. 150, 76, 1985.
46. Stern N. J., Meinersmann R. J., Dickerson H. W.: Avian Dis. 34, 595, 1990.
47. Stern N. J., Russel R. B.: Proc. WHO Consultation on Epidemiology and Control of Campylobacteriosis in Humans and Animals. Nat. Inst. Publ. Health Environ. Prot., Bilthoven, Netherlands, 25-27 April, 1994, s. 121.
48. Stone H. A., Holly A. E.: Avian Dis. 15, 939, 1971.
49. Svedhem A., Gunnarsson H., Kajiser B.: J. Infect. Dis. 148, 82, 1983.
50. Wassenaar T. M., Newell D. G., van der Zeijst B. A. M.: w: Fris Jensen., Hinton M.H., Mulder R.W.A.W. (wyd.), Probiotics and Pathogenicity. Spelderholt Centre, Beekbergen, 1993, s. 85.
51. Watson K. C., Kerr E. J. C., McFadzean S. M.: J. Infect. 1, 151, 1979.
52. Watson K. C., Kerr E. J. C.: J. Hyg. 88, 165, 1982.
53. WHO Proceeding, Bilthoven, Netherlands, 25-27.04, 1994, s. 35.
54. Wieliczko A., Stefaniak T.: Medycyna Wet. 51, 741, 1995.

Adres autora: dr Alina Wieliczko, ul. Handelsmana 6, 51-605 Wrocław