

ANNA BRONICKA, ZYGMUNT DEMBIŃSKI

Właściwości immunogenne szczepionki przeciwko kamylobakteriozie owiec

Zakład Profilaktyki Niepłodności Państwowego Instytutu Weterynaryjnego, ul. Poznańska 35, 62-020 Swarzędz

Bronicka A., Dembiński Z.

Immunogenic properties of the vaccine against sheep campylobacteriosis

Summary

The vaccine, prepared with *Campylobacter fetus* subst. *fetus* 10/95, was used in aborting flocks, during natural outbreaks of acute campylobacteriosis. The experimental group comprised 60 pregnant sheep which were given 3 ml of vaccine twice. Control group comprised 10 pregnant sheep, not vaccinated. It was found that vaccination elicited a twenty times higher level of specific antibodies in the fifth week after the first vaccination and an above forty times higher one, after the second injection. Such rising of antibody titers totally protected the vaccinated sheep against preterm partus, in spite of abortions in the flock.

Kamylobakterioza owiec jest schorzeniem powodującym w hodowli tych zwierząt znaczne straty ekonomiczne i hodowlane, w następstwie ronicia martwych płodów lub rodzenia słabych, nie dających się odchowac jagniąt. Ronicia obejmują początkowo 15-20% ciężarnych samic. W następnym roku po zakażeniu odsetek roniczeń obniża się wskutek nabycia odporności naturalnej, a choroba przybiera postać poronną, której towarzyszy bezobjawowe siewstwo zarazka, mogące utrzymywać się nawet do trzech lat (6, 10). Niska wykrywalność choroby oraz brak efektywnych działań zapobiegawczych sprawiają, że częstotliwość jej występowania w stadach owiec jest większa, aniżeli rejestrowana w praktyce (1, 4, 11). Czynnikiem etiologicznym kamylobakteriozy owiec jest *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*, a źródłem zarazka mogą być zwierzęta gospodarskie i dzikie (2, 14, 19), szczególnie często ptaki (20, 24), które wydalają bakterie z kałem, zakażając ściółkę, wodę i paszę. *C. fetus* wydalany jest przez zakażone zwierzęta z wodami płodowymi, resztkami błon płodowych oraz poronionymi, martwymi płodami. W warunkach naturalnych do zakażenia owiec dochodzi drogą enteralną (3). Tryki mogą być siewcami bakterii, ale do zakażenia samic nie dochodzi w czasie krycia, ponieważ *C. fetus* subsp. *fetus* nie występuje w nasieniu. Clark i wsp. wykazali obecność tych drobnoustrojów w przewodzie pokarmowym oraz w pęcherzyku żółciowym 3% badanych tryków (9).

W Polsce brak jest szczepionki przeciwko kamylobakteriozie owiec. W praktyce okazuje się, że koszty ponoszone na leczenie nie zawsze przynoszą oczekiwane rezultaty. Stąd podstawowe i pierw-

szorzędne znaczenie w zwalczaniu choroby ma postępowanie profilaktyczne, w którym obok właściwego programu sanitarno-weterynaryjnego, najbardziej efektywnym sposobem ograniczenia strat wydaje się być profilaktyka swoista (17, 18, 21, 23).

Celem pracy była ocena właściwości immunogennej szczepionki własnej, zastosowanej w ognisku choroby, do przygotowania której użyto wytypowanego szczepu o dobrych i stabilnych właściwościach immunogennych.

Materiał i metody

Szczepionkę zastosowano w stadzie, w którym na podstawie badania bakteriologicznego stwierdzono ostrą postać kamylobakteriozy. Z narządów wewnętrznych poronionych płodów owczych wyizolowano *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*. Grupę doświadczalną stanowiło 60 owiec ciężarnych, którym dwukrotnie w odstępie 6-tygodniowym podano dootrzewnowo szczepionkę w ilości 3 ml (5). Grupę kontrolną utworzono z 10 owiec ciężarnych nie szczepionych, pozostających w kontakcie z pozostałymi zwierzętami. Wszystkie owce objęte doświadczeniem były poddane obserwacjom klinicznym, ze szczególnym uwzględnieniem przebiegu choroby w stadzie oraz występowania roniczeń. U 20 owiec grupy doświadczalnej oraz wszystkich zwierząt w grupie kontrolnej, na początku doświadczenia przeprowadzono wstępne badanie bakteriologiczne wymazów z błony śluzowej odbytu. Kontrolę wzrostu poziomu przeciwciał anty-*Campylobacter* prowadzono przez okres 19 tygodni, pobierając krew do badań serologicznych 5-krotnie, zawsze w tych samych warunkach.

Szczepionkę przygotowano we własnym zakresie ze szczepu *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* 10/95, serotyp B, wyizolowanego z poronionego płodu owczego i prze-

Tab. 1. Wysokość mian przeciwciał anti-*Campylobacter* owiec szczepionych*

Nr owcy	Badanie krwi w poszczególnych tygodniach				
	0	5	9	12	19
1	80	2560	5120	5120	320
2	80	1280	2560	5120	160
3	40	2560	5120	5120	640
4	40	1280	2560	5120	320
5	80	2560	5120	5120	160
6	40	2560	2560	5120	640
7	80	5120	5120	5120	640
8	160	1280	2560	5120	640
9	80	5120	5120	5120	320
10	80	2560	5120	5120	-
11	160	2560	2560	5120	1280
12	320	1280	2560	5120	640
13	160	2560	5120	5120	320
14	40	5120	5120	5120	640
15	80	2560	2560	5120	320
16	160	2560	2560	5120	160
17	160	2560	5120	5120	640
18	80	5120	5120	5120	320
19	160	2560	5120	5120	1280
20	40	1280	2560	5120	-
\bar{x}	106,00	2752,00	3968,00	5120,00	512,44

Objaśnienie: * badanie bakteriologiczne owiec w kierunku obecności *C. fetus* dało we wszystkich przypadkach wynik ujemny.

chowowanego w ciekłym azocie. Czystą hodowlę wyjściową posiewano na płynne podłoże namnażające w składzie: Brucella-Broth 28,0 g, $MgCl_2 \times 6 H_2O$ 1,0 g, $FeSO_4 \times 7 H_2O$ 0,05 g, tioglikolan sodu 0,025 g, H_2O destylowana 1000 ml, a następnie inkubowano 48 godzin w temperaturze 37°C, w warunkach mikroaerofilnych (10% CO_2 , 85% N_2 , 5% O_2) (15). Po uzyskaniu wzrostu przeprowadzono kontrolę czystości szczepu i następnie, celem inaktywacji, dodano formalinę w ilości 8,4 ml/l hodowli. Po 24 godzinach zawiesinę inaktywowanych bakterii poddawano 3-krotnemu przemywaniu i wirowaniu i następnie rozcieńczano tak, aby wraz z dodatkiem adiuwantu olejowego Emulsigen (Nebraska, NVP Lab.

Inc.), w ilości 25% objętości, stężenie końcowe szczepionki wynosiło $0,2 \times 10^{11}$ bakterii w 1 cm³. Zawartość końcowa formaliny nie przekroczyła 0,4%. Szczepionkę przygotowano według metodyki Rosłanowskiego (16), w modyfikacji własnej (5).

Poziom przeciwciał anti-*Campylobacter* oznaczano metodą Wilkoszowej (25), z zastosowaniem odczynu aglutynacji probówkowej, przy użyciu antygenu pełnokomórkowego, w zakresie rozcieńczeń od 20 do 5120.

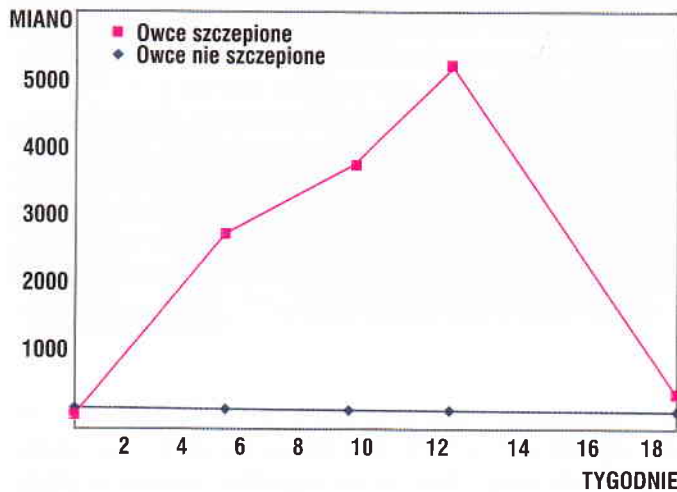
Wyniki i omówienie

Wysokość mian przeciwciał anti-*Campylobacter* w surowicy owiec pochodzących z ogniska choroby przedstawiono w tabelach 1 i 2. Wstępne badanie serologiczne 20 owiec grupy doświadczalnej przed szczepieniem wykazało, że miano przeciwciał anti-*Campylobacter* mieściło się w przedziale od 40 do 320 ($\bar{x} = 106,0$). Już w 5 tygodniu po iniekcji miano aglutynacyjne u tych zwierząt wzrosło średnio 25-krotnie i wynosiło od 1280 do 5120 ($\bar{x} = 2752,0$). W kolejnych badaniach jego wartość wykazywała stałą tendencję wzrostową, osiągając średnio 5120 w 12 tygodniu doświadczenia. Był to około 50-krotny wzrost miana, w odniesieniu do badania wstępnego. Przeprowadzone po 19 tygodniach badanie kontrolne surowicy wykazało obecność swoistych przeciwciał na poziomie od 160 do 1280 ($\bar{x} = 524,44$). W grupie kontrolnej miano przeciwciał anti-*Campylobacter* u dwóch owiec pozostawało przez cały okres obserwacji w granicach od 160 do 320, u pozostałych zwierząt mieściło się w przedziale od 40 do 160. Średnie wartości mian grupy doświadczalnej oraz kontrolnej przedstawiono w formie wykresu (ryc. 1). Wstępne badanie bakteriologiczne wymazów błony śluzowej odbytu wykazało obecność pałeczek *Campylobacter fetus subsp. fetus* u 3 owiec grupy kontrolnej.

Po podaniu szczepionki u owiec grupy doświadczalnej nie stwierdzono ronień, w przeciwieństwie do grupy kontrolnej, w której poroniły 3 owce. Łącznie w stadzie liczącym 300 matek, poroniło 15% owiec. W okresie 35 dni, kiedy ostra postać kampylobakteriozy wystąpiła w największym nasileniu, spośród 54 poronionych przeżyło 11 jagniąt. Przeprowadzone badanie bakteriologiczne i sekcyjne poronionych płodów oraz serologiczne surowic pochodzących od chorych matek potwierdziły, że czynnikiem etiologicznym występujących ronień był *Campylobacter fetus subsp. fetus*. Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, że podanie szczepionki owcom przebywającym w stadzie, w którym wystąpiła ostra postać kampylobakteriozy, przyniosło pożądany efekt immunologiczny, potwierdzający jej właściwości ochronne. Uzyskane miana w pełni zabezpieczyły owce przed rozwojem choroby. Interesującym wydaje się uzyskanie wysokiego poziomu przeciwciał już po pierwszej iniekcji szczepionki. Wytlumaczeniem tego zjawiska

Tab. 2. Wysokość mian przeciwciał anti-Campylobacter owiec nie szczepionych

Nr owcy	Ronienie	Badania bakt.	Badanie krwi w poszczególnych tygodniach				
			0	5	9	12	19
1	-	ujemne	40	40	80	80	40
2	+	<i>C. fetus</i>	80	160	160	80	160
3	-	ujemne	160	160	160	160	160
4	-	ujemne	40	40	40	40	40
5	-	ujemne	80	80	40	40	40
6	+	<i>C. fetus</i>	160	320	320	320	160
7	+	<i>C. fetus</i>	320	320	320	160	160
8	-	ujemne	160	160	160	80	160
9	-	ujemne	40	80	40	40	80
10	-	ujemne	40	40	40	80	40
\bar{x}			112,00	140,00	136,00	108,00	94,00



Ryc. 1. Średnie wartości mian anti-Campylobacter u owiec w ognisku choroby

może być mechanizm wtórnej odpowiedzi anamnestycznej. Pierwsza iniekcja była niewątpliwie powtórny zetknięciem się organizmu z tym samym antygenem, czego potwierdzeniem było wstępne badanie serologiczne.

Przedstawione wyniki dotyczące oceny właściwości immunogennych inaktywowanej szczepionki potwierdziły, że może być ona wykorzystana w uodpornianiu owiec. Szczepionka uzyskana na bazie szczepu *Campylobacter fetus subsp. fetus* 10/95 charakteryzuje się dobrymi właściwościami uodporniającymi i ochronnymi, na które dodatkowo korzystny wpływ wywierał zastosowany adiuwant, pozwalający na zmniejszenie o połowę ilości antygeny niezbędnego do wzbudzenia reakcji odpornościowych.

Uzyskane wyniki potwierdzają zasadność wprowadzenia szczepień ochronnych, jako skutecznej metody postępowania profilaktycznego (7, 8, 12). W proponowanym programie zwalczania kampylobakteriozy winno być uwzględnione dwukrotne szczepienie, w odstępie 4-6 tygodni, zarówno przed sezonem krycia, jak też w pierwszej połowie ciąży. Nabyta odporność zmniejsza ryzyko zachorowania, eliminując tym samym straty wśród potomstwa. Uzasadnionym wydaje się również szczepienie interwencyjne owiec w stadzie, w którym stwierdzono kliniczną postać kampylobakteriozy.

Ponieważ dostatecznie wysoki poziom przeciwciał owce uzyskują po 10-14 dniach, o powodzeniu decyduje wczesna i właściwa diagnoza (13, 22). Bez względu na szczepienie winny być poddane wszystkie zwierzęta przeznaczone do obrotu oraz do odnawiania stada, gdyż jako potencjalni nosiciele mogą stawać się głównym źródłem zakażenia.

Piśmiennictwo

- Bird M. M. E., Stephens D. J., Wall E. P., de Lisle G. W.: N. Z. vet. J. 32, 14, 1984.
- Blaser M. J., Taylor D. N., Feldman R. A.: Epidem. Rev. 5, 157, 1983.
- Bronicka A., Dembiński Z.: Medycyna Wet. 48, 202, 1992.
- Bronicka A., Dembiński Z.: Bull. vet. Inst. Puławy 37, 21, 1993.
- Bronicka A.: Właściwości immunogenne krajowych szczepów *Campylobacter* wysoobnionych od owiec. Praca dokt. PIWet. Puławy 1997.
- Bryner J. H., Frank A. H., O'Berry P. A.: Am. J. vet. Res. 1, 32, 1962.
- Bryner J. H., Foley J. W., Thompson K.: Am. J. vet. Res. 40, 433, 1979.
- Bryner J. H., Firehammer B. D., Wesley I. V.: Am. J. vet. Res. 49, 449, 1988.
- Clark B. L., Dufty J. H., Monsborough M. J., Parsonson I. M.: Aust. vet. J. 51, 531, 1975.
- Garcia M. M., Eaglesome D. M., Rigby C.: Bull. vet. 53, 793, 1983.
- Gumbrell R. C., Saville D. J., Graham C. F.: N. Z. vet. J. 2, 44, 1996.
- Hansen D., Hedstrom O., Sonn R., Snyder S.: J. Am. vet. med. Ass. 196, 5, 731, 1990.
- Hum S.: Aust. vet. J. 64, 319, 1987.
- Manser P. A., Calziel R. W.: J. Hyg. 95, 15, 1985.
- Pellerin J. L.: Revue Méd. vét. 132, 717, 1981.
- Roslanowski K., Szpryngiel I., Wyszwanowski J.: Bull. vet. Inst. Puławy 24, 1, 1980.
- Roslanowski K., Wyszwanowski J.: Medycyna Wet. 39, 593, 1983.
- Roslanowski K., Szpryngiel I., Wyszwanowski J.: Zesz. Probl. Post. Nauk rol. 263, 539, 1986.
- Skirrow M. B., Benjamin J.: J. Hyg. Camb. 85, 427, 1980.
- Smbert R. M.: Am. J. vet. Res. 30, 1437, 1969.
- Truszczynski M.: Medycyna Wet. 50, 424, 1994.
- Varga J., Fodor L., Fazekas B., Rady M., Hajtos I.: Acta vet. hung. 34, 55, 1986.
- Wawrzkiwicz J.: Medycyna Wet. 2, 67, 1983.
- Wieliczko A.: Medycyna Wet. 51, 150, 1995.
- Wilkoż A.: Medycyna Wet. 32, 171, 1976.

Adres autora: dr Anna Bronicka, ul. Mścibora 70/12, 61-062 Poznań