

36. Tzipori S., Chandler D., Makin T., Smith M.: Aust. vet. J. 56, 279, 1980.  
 37. Tzipori S., Makin T., Smith M., Chandler D.: Proc. 6th Congress Intern. Pig Vet. Soc., Copenhagen, Denmark 1980, s. 128.  
 38. Utrera V., Mazzali de Ilia R., Gorziglia M., Esparza J.: Res. vet. Sci. 36, 310, 1984.  
 39. Welter M. W., Fitzgerald G. R., Welter C. J.: Agri-Pract. 7, 59, 1986.  
 40. Westercamp D.: Mod. Vet. Pract. 67, 17, 1986.  
 41. Winiarczyk S.: Zastosowanie metod biologii molekularnej w diagnostyce zakażeń rotawirusowych u świń. Praca hab. AR Lublina, 1995.  
 42. Wood G., Crouch C.: Am. J. Med. Ass. 173, 522, 1978.  
 43. Wood G.: Porcine rotavirus infection, w: Diseases of swine. Leman A., Straw B., Glock R., Mengeling W., Penny R., Scholl E, Iowa State Univ. Press, Ames, Iowa 1986. s. 368.  
 44. Żmudziński J., Baczyński Z., Majewska H.: Sprawozd. z działaln. nauk-bad. za rok 1981. Instytut Weterynarii, Puławy, 1982, s. 53.

Adres autora: prof. dr hab. Zygmunt Pejsak, ul. Kościuszki 12/9, 24-100 Puławy

ANDRZEJ FITZNER, ANDRZEJ KEŚY, WIESŁAW NIEDBALSKI,  
 GRAŻYNA PAPROCKA, BOGDAN WALKOWIAK\*

# Identyfikacja dominującego polipeptydu VP60 krajowych izolatów wirusa pomoru królików (VHD)

Zakład Pryszczycy Państwowego Instytutu Weterynaryjnego, ul. Wodna 7, 98-220 Zduńska Wola

\*Zakład Biofizyki Akademii Medycznej, ul. Lindleya 3, 90-131 Łódź

## Summary

Identification of the major structural polypeptide VP60 of the Polish isolates of viral haemorrhagic disease virus (VHDV) of rabbits

The causative agent of viral haemorrhagic disease (VHD) was purified by CsCl and sucrose density gradient from the liver homogenates of rabbits infected with a strain isolated in Poland. Using SDS-PAGE and a western immunoblotting analysis we characterized domestic isolates of VHDV called the BLA and MAL strains and the laboratory isolates KGM and SGM. Our results indicated the presence of the prominent structural protein of 60 kD and other minor proteins, and they corresponded with the description made by other authors. The specific cross reaction between purified VHD isolates and different antisera was observed. The density of the viron was estimated as 1.31 to 1.34 g/cm. Due to the applied immunochemical techniques it was possible to identify the VHDV antigen and to give proof of identical immunological properties of different strains isolated in Poland in 1988-1994.

Krwotoczną chorobę królików (Viral Haemorrhagic Disease – VHD) rozpoznano w Chinach w 1984 r. (11). W Polsce VHD po raz pierwszy zdiagnozowano i opisano w 1988 r. (7). Przeprowadzone badania potwierdziły wirusową etiologię choroby. Wirus charakteryzował się zdolnością do aglutynowania erytrocytów ludzkich, był oporny na działanie chloroformu, a po doświadczalnym zakażeniu powodował zachorowania i śmierć królików w ciągu 48-72 godzin. Wyizolowane wówczas szczepy SGM i KGM posiadały dobre właściwości immunogenne. Rozpoznanie zostało potwierdzone badaniem w mikroskopie elektronowym i w odczynie hemaglutynacji, a

później także testem ELISA (6). Kliniczny obraz choroby wywołanej przez wirus VHD, wyosobniony na terenie kraju, odpowiadał opisowi choroby rozpoznanej w Chinach. W kolejnych latach ogniska choroby, przebiegającej z objawami klinicznymi typowymi dla VHD, odnotowywano w wielu hodowlach na terenie kraju.

Czynnikiem etiologicznym VHD jest wirus RNA, o budowie regularnego dwudziestościanu, średnicy 28-40 nm, gęstości 1,310-1,365 g/cm<sup>3</sup>, posiadający właściwości aglutynacji erytrocytów ludzkich grupy 0. Genom wirusa zbudowany jest z 7437 nukleotydów zawartych w bezotoczowym kapsydie. Na podstawie obserwacji morfologicznych oraz badań charakteryzujących strukturę białkową sklasyfikowano go ostatecznie w rodzinie *Caliciviridae*. Zarówno elektroforetyczna analiza oczyszczonego wirusa jak i western immunoblotting wykazały jeden dominujący polipeptyd o wielkości ok. 60 kD (VP60) oraz kilka mniejszych podjednostek, prawdopodobnie produktów jego degradacji, o wielkości 52, 40-38, 36 i 32 kD (2, 3, 4, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16). Polipeptyd VP60 stanowi charakterystyczną właściwość rodziny *Caliciviridae* nie występującą u innych wirusów kręgowców (cyt. 12, 15).

Celem pracy była identyfikacja głównego polipeptydu VP 60 szczepów laboratoryjnych KGM i SGM oraz dwóch szczepów terenowych MAL i BLA wirusa pomoru królików wyizolowanych w kraju w 1994 r.

## Materiał i metody

Szczep MAL wyizolowano z ogniska VHD w fermie wielkotowarowej (12 000 królików). W czasie enzootii padło 20% populacji. Zastosowane szczepienia interwencyjne 3 dnia enzootii ograniczyły straty i zahamowały rozwój choroby. Szczep BLA wyizolowano z ogniska w niewielkiej hodowli gospodarskiej (do 100 królików). W ciągu 5 dni enzootii padło 100% zwierząt. Porównanie przebiegu enzootii, obrazu klinicznego choroby oraz obrazu anatomopatologicznego wskazywało

jednoznacznie, że czynnikiem zakaźnym w obu przypadkach jest wirus VHD. W badaniach diagnostycznych wykonywano testy hemaglutynacji (HA) i ELISA.

Dla scharakteryzowania czynnika zakaźnego oczyszczano wirus VHD wyekstrahowany z próbek wątrób pobranych w czasie trwania enzootii w obu hodowlach. Wykonano elektroforetyczny rozdział białek w żelu poliakrylamidowym z SDS, a następnie ich identyfikację w reakcji western immunoblotting ze swoistą surowicą królika immunizowanego przeciw VHDV. Szczepy terenowe MAL i BLA porównano ze szczepami laboratoryjnymi SGM i KGM. Identyfikację procedurę oczyszczania wykonano ze sporządzonym homogenatem wątroby zdrowego królika.

#### Wirus VHD

Szczepy laboratoryjne wirusa SGM i KGM namnażano na wrażliwych królikach, zakażając je podskórnie wirusem liofilizowanym, bądź przechowywanym w stanie zamrożenia. Do badań wykorzystano szczep SGM z 4 pasażu a KGM z 5 pasażu.

Szczepy terenowe MAL i BLA izolowano z wątrób królików będących w okresie wirerii oraz padłych w trakcie enzootii. Zjadliwość szczepów zbadano w próbie biologicznej na królikach, wykonując podskórne zakażenie wyizolowanymi wirusami.

Kontrola VHDV (-). Ekstrakt wątroby zdrowego królika. Wirus oczyszczano wstępnie poprzez wirowanie przy 3000 obr./min. oraz chloroformowanie (10% v/v) przez 1 godz. i ponowne odwirowanie. Określano miano HA i ELISA sporządzonych homogenatów.

Surowice odpornościowe. Do badań użyto następujące surowice:

- surowica 2/10/94, uzyskana od królika immunizowanego szczepionką Cunivac oraz po wykonaniu zakażenia wirusem zjadliwym (KGM). Miano surowicy oznaczane testami HI i ELISA wynosiło 5120,

- surowice królików ozdrowieńców (miano HI/ELISA 5120) otrzymane od zwierząt, które przeżyły w ognisku VHD w fermie wielkotowarowej MAL; krew pobierano po upływie 17 i 31 dni od zanotowania pierwszych padnięć królików,

- referencyjna surowica odpornościowa królika (Sla 8) przeciw wirusowi VHD, otrzymana z laboratorium CNEVA z Ploufragan (Francja), dzięki uprzejmości dr G. Le Gall,

- surowica ujemna pobrana od zdrowych królików.

Koniugat. (KIGG+HRP) opracowany w Laboratorium Badawczo-Wdrożeniowym Diagnostyki (Wrocław) na podstawie surowicy ozdrowieńców z ogniska VHD w fermie MAL (oczyszczona frakcja IgG o koncentracji 7,5 mg/ml związana z peroksydazą chrzanową).

Odczyn hemaglutynacji. Odczyn wykonywano stosując erytrocyty ludzkie grupy 0, zgodnie z metodą opisaną wcześniej (5).

Test ELISA. Test immunoenzymatyczny wykonano na płytkach Maxi Sorb (Nunc), stosując koniugat zawierający mieszaninę przeciwciał monoklonalnych przeciwko VHDV związanych z peroksydazą chrzanową (CR+HRP). Reakcję barwną wynikającą z degradacji substratu (OPD) odczytywano przy użyciu czytnika do mikropłytek Dynatech MR 5000, przy długo. fali 490 nm. Test wykonywano wg metody opracowanej w Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia (Brescia), używając komercyjnego zestawu do diagnostyki wirusa VHD (1, 2).

#### Oczyszczanie wirusa

Szczep KGM – oczyszczoną wstępnie zawiesinę wirusa zagęszczono w 17% roztworze sacharozy (Sigma) przy 25 000 obr./min. przez 150 minut stosując ultrawirówkę UP 65 z rotorem poziomym 86 (Janetzki). Supernatant odrzucono a osad, po wysuszeniu w temperaturze 4°C, zawieszono w 5 ml PBS. Po 30-minutowej inkubacji w temp. 4°C preparat odwirowano przy 3000 obr./min. w czasie 10 min. i do 5 ml zawie-

siny dodano 2 g CsCl. Po dokładnym rozpuszczeniu zawiesinę wirowano przez 44 godz. przy 40 000 obr./min. w temp. 4°C (wirówka UP 65, rotor horyzontalny 86). Zbierano 0,5 ml frakcje, i analizowano je określając indeks refrakcji (IR), gęstość p, miano HA oraz wartość absorbancji światła o długości fali 490 nm w teście ELISA w rozcieńczeniu 1:5.

Szczep SGM – oczyszczoną wstępnie przez chloroformowanie 20% zawiesinę wirusa o mianie HA 10 240 poddano zagęszczeniu na glikolu polietylenowym (PEG 6000; Sigma). Do 100 ml zawiesiny dodano 16,5 ml 50% roztworu PEG. Mieszano przez 2 godz. w chłodni (4°C). Następnie wirowano przez 30 minut przy 3000 obr./min. Supernatant odrzucono, a osad zawieszono w 1/20 objętości wyjściowej w buforze Tris-NaCl, pH 7,5. Eluat dokładnie wymieszano i inkubowano przez 30 minut w temperaturze 4°C, po czym wirowano przez 15 min. przy 3000 obr./min. Supernatant zebrano a osad ponownie zawieszono w 5 ml buforu Tris-NaCl. Po ekstrakcji i odwirowaniu połączono supernatanty 1 i 2, które stanowiły koncentrat wirusa. Wirus mianowano w odczynie HA przed i po zagęszczeniu. Następnie do zagęszczonej zawiesiny wirusa dodawano 0,5% detergent Triton X-100 i poddano trzykrotnemu działaniu ultradźwięków w przedziałach dziesięciosiekundowych w łaźni lodowej. Zawiesinę odwirowano przez 15 min. przy 3000 obr./min. i zbierano koncentrat wirusa, który wirowano na ultrawirówce (UP 65, rotor horyzontalny typ 86) przy 30 000 obr./min. przez 2 godz. w temp. 10°C. Supernatant odrzucono, a osad zawieszono w 1 ml zawiesiny (4,95 ml PBS + 50 µl Triton X-100). Po dokładnym rozbiciu osadu zawiesinę ekstrahowano przez 24 godz. w temp. 4°C. Koncentrat wirusa oczyszczano w 15-30% gradiencie sacharozy. Gradient sacharozy sporządzono przez nawarstwianie do próbki sacharozy w czterech stężeniach: 15, 20, 25 i 30% po 1,2 ml. Na szczyt gradientu nałożono 0,3 ml roztworu wirusa i poddano ultrawirowaniu przy 27 000 obr./min. w temp. 4°C przez 2 godziny (wirówka i rotor jak wyżej). W uzyskanych frakcjach mianowano wirus przy pomocy testów HA i ELISA oraz zmierzono absorbencję światła przy długości fali 259 nm.

Szczepy MAL, BLA i negatywny ekstrakt wątroby oczyszczano identycznie jak szczep SGM.

Analiza elektroforetyczna. Analizę białek wirusa VHD przeprowadzono elektroforetycznie w żelu poliakrylamidowym z SDS. Użyto 12% żel rozdzielający i 4% żel zagęszczający w systemie buforów opisanych przez Laemmliego (8). Próbki denaturowano przez 5 min. w temp. 95°C w buforze redukującym zawierającym β-mercaptoethanol. Jako markera mas cząsteczkowych użyto standard LMW (Pharmacia LKB). Elektroforezę prowadzono stosując początkowo napięcie 100 V (żel zagęszczający) a następnie 180 V (żel rozdzielający). Po skończonym rozdziale żel wybarwiano w Coomassie Blue.

Metoda western immunoblotting. Białka uzyskane po rozdziale elektroforetycznym transferowano elektroforetycznie na membranę PVDF immobilon (Millipore) przez 60 min. (100V/4°C) w buforze 25mM Trisk, 190 mM Glicyna. Membranę barwiono barwnikiem Ponceau S i zaznaczono położenie wzorców masowych, po czym płukano w wodzie destylowanej do chwili odbarwienia i inkubowano w roztworze PBS z dodatkiem 3% albuminy bydlęcej i 2% surowicy końskiej przez 2 godz. w temperaturze pokojowej. W zależności od potrzeb, membranę cięto na fragmenty i inkubowano: bądź z właściwą surowicą króliczą (3 godz. w temp. pokojowej), a po przemyciu w PBS z komercyjnym koniugatem (surowica kozia przeciw IgG królika związana z peroksydazą chrzanową – Dako) w reakcji pośredniej (3 godz. temp. pok.) lub z koniugatami CR+HRP (Brescia) i KIGG+HRP (reakcja bezpośrednia). Membranę po transferze z żelu różnych szczepów wirusa inkubowano z surowicą 2/10/94 a następnie z komercyjnym koniugatem. Dalszy sposób postępowania był jak poprzednio. Membranę wybarwiano stosując substrat (4-chloro-1-naphtol-Sigma). Po ok. 20 minutach reakcję hamowano płuczając membranę w wodzie destylowanej.



Komputerowa analiza obrazu rozdziału elektroforetycznego oraz reakcji western immunoblotting. Żele poliakrylamidowe i membrany PVDF archiwizowano i analizowano przy pomocy systemu ImageStore 5000. System pozwala na szybką i dokładną analizę masy cząsteczkowej i ilości materiału białkowego zawartego w poszczególnych prążkach.

### Wyniki i omówienie

Szczepy laboratoryjne SGM i KGM wirusa VHD oraz szczepy terenowe MAL i BLA, były patogenne dla królików, wywołując chorobę i zejścia śmiertelne doświadczalnych zwierząt w ciągu 48 godzin od zakażenia.

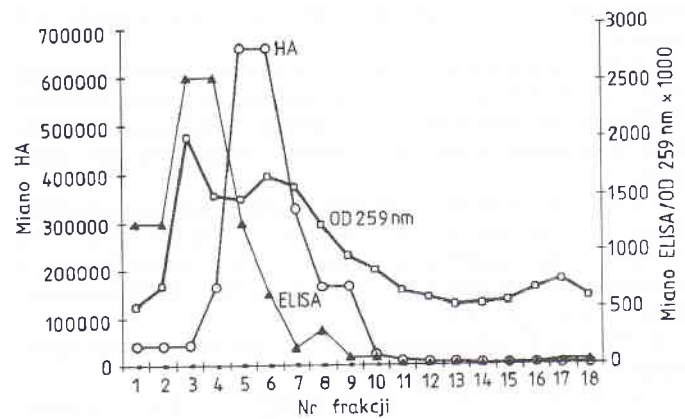
Badane szczepy wirusa VHD oczyszczane były alternatywnie metodą wirowania w chlorku cezu lub w gradiencie sacharozy. Poszczególne frakcje analizowano w teście hemaglutynacyjnym, immunoenzymatycznym teście ELISA, określano wartość absorbancji w świetle o długości fali 259 nm, oraz oznaczano gęstość frakcji. Na ryc. 1 przedstawiono wyniki uzyskane podczas oczyszczania szczepu KGM w gradiencie gęstości chlorku cezu. Najwyższe miano HA stwierdzono we frakcjach 8-9, a najwyższa absorbancja w teście ELISA wystąpiła we frakcjach 8-10. Frakcjom tym odpowiada gęstość wirusa 1,31-1,34 g/cm<sup>3</sup>. Szczep SGM oczyszczany był w gradiencie gęstości sacharozy. Profil sedymentacji przedstawiono na ryc. 2. Najwyższe wartości mian w testach HA i ELISA oraz maksymalna absorbancja światła przypadają na frakcje 3-7. Testy ELISA i aglutynacji wykazywały przesunięcie maksymalnych mian, przy czym położenia tych pików odpowiadały maksymalnym wartościom absorbancji światła o długości fali 259 nm.

Pozostałe szczepy wirusa BLA i MAL oczyszczane tą drogą wykazywały podobną charakterystykę. Materiał uzyskany z kontrolnej wątroby króliczej pozbawiony był omawianych cech, tzn. był ujemny w testach HA i ELISA.

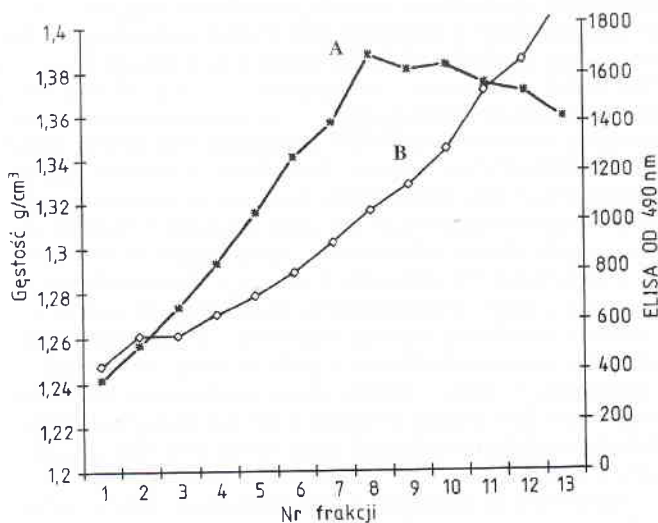
Przykładowa analiza elektroforetyczna materiału zawartego we frakcjach gradientu sacharozy przedstawiona jest na ryc. 3. Na fotografii żelu w poszczególnych frakcjach wyraźnie widać prążek odpowiadający dominującemu białku wirusa. Należy zwrócić uwagę na zmieniającą się ilość białka wirusowego

w analizowanych frakcjach. Najwięcej białka wirusowego znajduje się we frakcji 5, co jest w dobrej korelacji z wynikami testów HA i ELISA. Na podstawie komputerowej analizy obrazu żelu wyznaczono masę cząsteczkową białka jako 60 kD.

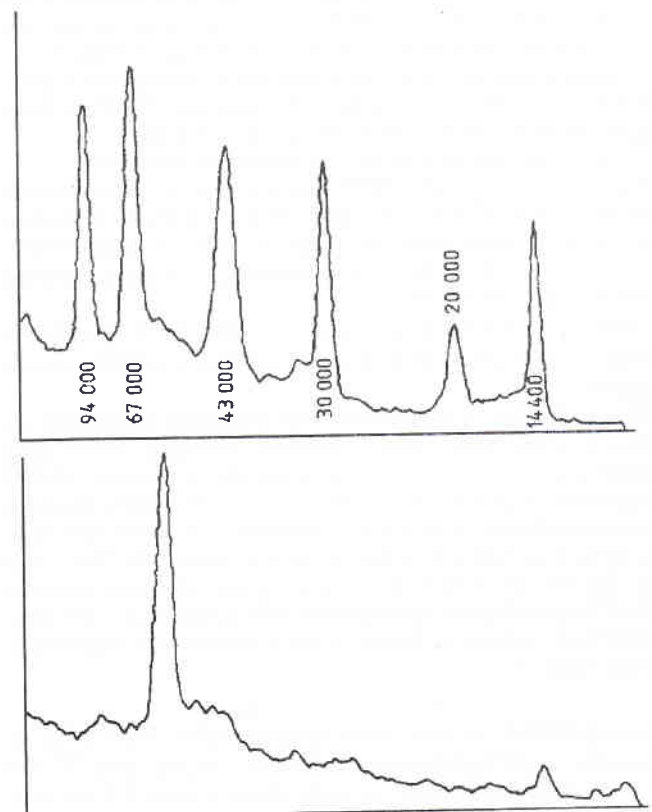
Oczyszczone preparaty badanych szczepów analizowane były metodą western immunoblotting przy użyciu króliczej surowicy odpornościowej 2/10/94. Uzyskane wyniki przedstawione są na ryc. 4. Jak wynika z przedstawionej analizy, wszystkie badane szczepy posiadają dominujące białko wirusowe o masie około 60 kD. Ujemna próba referencyjna nie dawała żadnej reakcji z użytą surowicą. Wstępnie oczyszczony i nie zagęszczony wirus szczepu KGM dawał bardzo słabo widoczną reakcję.



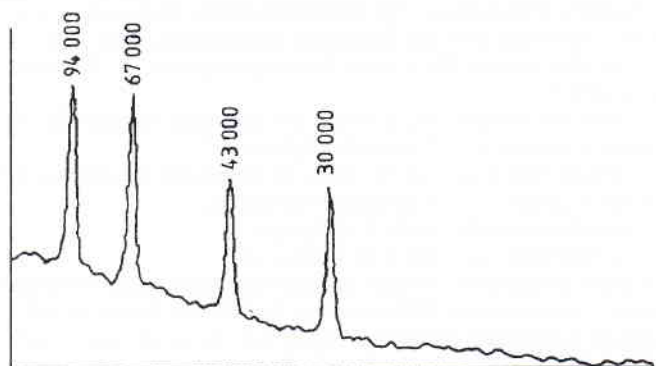
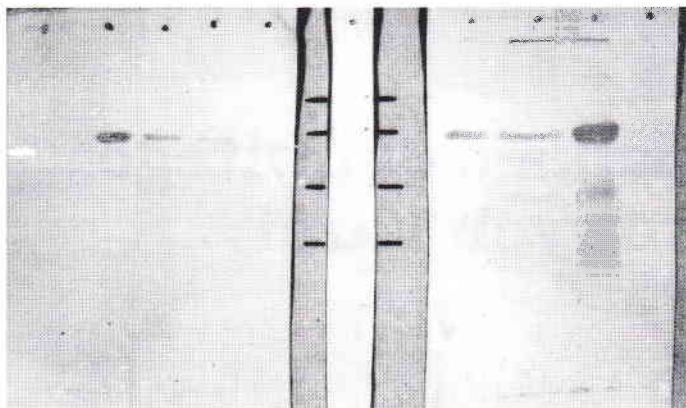
Ryc. 2. Profil sedymentacji wirusa VHD/szczep SGM w gradiencie gęstości sacharozy. Zawartość wirusa oceniana w teście HA, ELISA i absorbancji światła w 259 nm



Ryc. 1. Profil sedymentacji wirusa VHD/szczep KGM w gradiencie gęstości chlorku cezu. Zawartość wirusa w analizowanych frakcjach oceniana na podstawie testu ELISA (A). Gęstość frakcji oznaczano refraktometrycznie (B)



Ryc. 3. Densytogramy standardów i frakcji 5 wirusa VHD szczepu SGM wykonane na podstawie elektroforetycznej analizy frakcji z gradientu sacharozy



Ryc. 4. Analiza badanych szczepów przy pomocy metody western immunoblottingu. Na ścieżkach (od prawej) rozdzielane były: próba ujemna, SGM, KGM, MAL, standardy (94 kD, 67 kD, 43 kD, 30 kD), KGM wstępnie oczyszczony i nie zagęszczony, trzy różne frakcje BLA, próba ujemna. Poniżej obrazu membrany przedstawione są densytogramy standardów i szczepu SGM

Kolejnym etapem prowadzonych badań było sprawdzenie immunoreaktywności oczyszczonego w naszym laboratorium antygenu względem przeciwciał pochodzących z różnych źródeł. Analiza dokonana metodą western immunoblotting dla szczepu SGM wykazała, że kontrolna negatywna surowica królicza nie reagowała z antygenem, natomiast pozostałe surowice i koniugaty swoiście reagowały z zastosowanym antygenem.

Stosując opisane nowoczesne metody immunologiczne, scharakteryzowano nowe szczepy wirusa VHD nazwane BLA i MAL oraz rozszerzono charakterystykę znanych szczepów laboratoryjnych VHD: KGM i SGM. Przeprowadzone badania potwierdziły obecność głównego polipeptydu VP60 we wszystkich charakteryzowanych szczepach oraz taką samą gęstość wirusa w przedziale 1,31-1,34 g/cm<sup>3</sup>. Podobnie jak inni autorzy (2, 3, 4, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16) zaobserwowaliśmy obecność kilku mniejszych podjednostek polipeptydowych białka wirusowego.

Zastosowane metody immunochemiczne okazały się wystarczająco czułymi i swoistymi, pozwalając jednoznacznie zidentyfikować antygen. Dzięki temu wykazano identyczność

immunologiczną badanych szczepów izolowanych w okresie od 1988-1994 r.

#### Piśmiennictwo

1. Capucci L., Scicluna M. T., Lavazza A., Brocchi E.: Selez. Vet. 31, 301, 1990.
2. Capucci L., Scicluna M. T., Lavazza A.: Rev. sci. tech. Off. int. Epiz. 10, 347, 1991.
3. Chasey D., Lucas M., Westcott C., Williams M.: Arch. Virol. 124, 363, 1992.
4. Du N.: Rev. sci. tech. Off. int. Epiz. 10, 325, 1991.
5. Fitzner A., Kęsy A., Chrobocińska M.: Medycyna Wet. 48, 89, 1992.
6. Fitzner A.: Wirus krwotocznej choroby królików (VHD) i jego właściwości immunogenne. Praca dokt. PIW, Puławy 1994.
7. Górski J., Mizak B., Mizak Z., Komorowski A.: Życie wet. 63, 266, 1988.
8. Laemmler U. K.: Nature 227, 680, 1970.
9. Le Gall G., Boilletot E., Morisse J. P.: Ann. Rech. Vet. 23, 381, 1992.
10. Liebermann H. T., Bergmann H., Lange E., Schirmeier H., Solisch P.: J. Vet. Med. B 39, 317, 1992.
11. Liu S. J., Xue H. P., Pu B. Q., Quian N. H.: Anim. Husb. Vet. Med. 16, 253, 1984.
12. Ohlinger V. F., Haas B., Meyers G., Weiland F., Thiel H.-J.: J. Virol. 64, 3331, 1990.
13. Ohlinger V. F., Thiel H.-J.: Rev. sci. tech. Off. int. Epiz. 10, 311, 1991.
14. Park, Kida H., Ueda K., Ochiai K., Goryo M., Itakura C.: J. Vet. Med. B 38, 749, 1991.
15. Parra F., Prieto M.: J. Virol. 64, 4013, 1990.
16. Rodak L., Granatova M., Valicek L., Smid B., Vesely T., Nevorankova Z.: J. Virol. 71, 2593, 1990.

Adres autora: dr Andrzej Fitzner, ul. Wodna 22/3, 98-220 Zduńska Wola

**BRAUN U., PUSTERLA N., WILD K: Wyniki badania ultrasonograficznego 11 krów z ropniami wątroby. (Ultrasonographic findings in 11 cows with a hepatic abscesses).** Vet. Rec. 137, 284-290, 1995 (12)

Przebadano metodą ultrasonograficzną wątrobę 11 krów, u których występowały ropnie. Obecność ropni wykryto badaniem w jednej przestrzeni międzyżebrowej u 3 krów, w dwóch przestrzeniach u 5 krów, w trzech przestrzeniach międzyżebrowych u 2 oraz w czterech przestrzeniach międzyżebrowych u 1 krowy. U 3 sztuk ropnie były usytuowane w grzebieniowo-tylnym odcinku wątroby pomiędzy 11 i 12 przestrzenią międzyżebrową, podczas gdy u 5 zwierząt ropnie były zlokalizowane w centralnej części wątroby w 9 i 10 przestrzeni międzyżebrowej. U 3 krów ropnie znajdowały się w przednio-dolnym odcinku wątroby pomiędzy 6-8 przestrzenią międzyżebrową. Średnica ropnia wynosiła u 4 krów 5-10 cm, u 4 krów 11-15 cm i u 3 ponad 15 cm. W każdym przypadku rozpoznanie ultrasonograficzne potwierdzono punkcją.

G.

**VAN DUJKEREN E., SLOET VAN ALDRUITEN-BORGH-OOSTERBAAN M. M., VULTO A. G., KESSELS B. G. F., VAN MIERT A. S. J. P. A. M., BREUKINK H. J.: Farmakokinetyka i potencjał terapeutyczny powtarzanych dawek trimetoprimu i sulfachloropiridazyny stosowanej u koni per os. (Pharmacokinetics and therapeutic potential for repeated oral doses of trimethoprim-sulphachloropyridazine in horses).** Vet. Rec. 137, 483-486, 1995 (19)

Określono parametry farmakokinetyczne mieszaniny trimetoprimu i sulfachloropiridazyny w postaci pylistej na 8 koniach. Preparat zawierający 5 mg trimetoprimu/kg i 25 mg sulfachloropiridazyny/kg stosowano per os w odstępach 12-godzinnych przez 5 kolejnych dni. Wysoki poziom obydwu składników w plazmie krwi, przewyższający wartość MIC dla *Streptococcus zooepidemicus*, *S. equi*, *Actinobacillus equuli* i *Rhodococcus equi*, można było osiągnąć stosując badaną mieszaninę w odstępach 12-godzinnych.

G.