

# Badania serologiczne dzików w kierunku leptospirozy

MIROŚLAW KRAWCZYK

Zakład Higieny Weterynaryjnej w Bydgoszczy Oddział w Toruniu, ul. Antczaka 39/41, 87-100 Toruń

Krawczyk M.

## Serological studies on leptospirosis in wild boar

### Summary

In order to evaluate seroprevalence of leptospiral infection in the population of the European wild boar (*Sus scrofa* L.), 107 sera obtained from this species after hunting were tested. All sera were examined by microagglutination test (MAT) and passive hemagglutination test (PHT). The latter test detects only IgM antibodies and allows a differentiation between recent and past infections. A panel of 18 serovars (icterohaemorrhagiae, grippotyphosa, sejroe, tarassovi, pomona, canicola, australis, ballum, hebdomadis, patoc, poi, calledoni, zanoni, cynopteri, autumnalis, bataviae, hardjo, bratislava) from 16 serogroups was used in MAT. The screening dilution of sera was 1 in 100. A result of at least 50% agglutination of leptospire at 1:100 dilution or greater was considered positive. PHT was prepared from the strain of Perepelicin belonging to the Tarassovi serogroup. Altogether 25.2% positive results were obtained. 23 sera reacted in MAT. 12 serovars were recorded. The most prevalent was sejroe (6 positive results), then grippotyphosa and poi (4 positive results). Most of the positive sera reacted in MAT in a dilution of 1:100 (19 cases), in 6 cases in a dilution of 1:200, in 4 at 1:400 and 1 had an end point titre of 1:800. By using a passive hemagglutination test, positive reactions were recorded in 7 cases. In one case a doubtful result was obtained. 4 sera reacted only in PHT. The results indicate the wild boar as a potential source of pathogenic leptospire.

**Keywords:** leptospirosis, wild boar.

Badania serologiczne zwierząt i ludzi w kierunku leptospirozy posiadają ogromną wartość diagnostyczną. Mimo pewnych ograniczeń, w dalszym ciągu uważa się je za podstawowe metody służące do rozpoznawania tej choroby. Potwierdzają one kontakt organizmu z zarazkami z grupy *Leptospira* nawet wtedy, gdy badania kliniczne nie wykazują żadnych odchyśleń od normy. Postęp nauki i rozwój nowoczesnych metod diagnostycznych jaki dokonał się w ostatnich latach sprawił, że do diagnostyki zakażeń leptospirowych wprowadzono bardzo czułe i swoiste testy serologiczne. Jednak odczyn aglutynacji mikroskopowej (OAM) uznawany jest nadal jako odczyn podstawowy, a w naszym kraju jest odczynem obowiązującym (8). Śledząc dynamikę narastania przeciwciał w pewnych odstępach czasowych za pomocą OAM możliwe jest ustalenie, oprócz samego faktu zakażenia, jego charakter. Natomiast, aby wyeliminować niedogodność związaną z powtarzaniem badań i uzyskać informacje co do charakteru zakażenia (wczesne lub przetrwałe) w szybkim czasie i na podstawie jednej tylko próby wykorzystuje się równolegle odpowiednio dobrane testy serologiczne. Dobiera się je w ten sposób, aby każdy z nich wykrywał inne klasy immunoglobulin (IgG lub IgM). W tym przypadku nie jest konieczne powtarzanie pobierania prób do badań. Dla klinicystów możliwość

uzyskania miarodajnego wyniku w krótkim czasie ma bardzo duże znaczenie praktyczne. Przykładem takiego wzajemnego uzupełniania się metod diagnostycznych może być zastosowanie testu IgG-Elisa (wykrywającego jedynie immunoglobuliny klasy G) i IgM-Elisa (dla immunoglobulin klasy M), a także OAM i IgM-ELISA lub OAM i odczynu biernej hemaglutynacji (OHB).

Badanie dzików w kierunku obecności przeciwciał antyleptospirowych było tematem prac badawczych kilku ośrodków naukowych na świecie. Przyczyną coraz większego zainteresowania się tym żyjącym na wolności gatunkiem zwierzęcia jest stosunkowo duży odsetek dodatnich seroreagentów wykazywanych w pracach różnych autorów (3, 13, 15). Wysuwane są przypuszczenia (9), że dziki mogą być nie tylko gospodarzami przypadkowymi, ale także mogą stanowić rezerwuuar leptospir. W tym drugim przypadku poprzez wydalanie ich przez dłuższy czas wraz z moczem do środowiska doprowadzają do jego kontaminacji, stanowiąc przez to zagrożenie dla innych zwierząt, w tym gospodarskich korzystających np. z tych samych pastwisk, wodopojów itd., a także i człowieka.

W piśmiennictwie polskim brak jest dokładniejszego opracowania dotyczącego leptospirozy dzików. Anusz i wsp. (1) jako jedyni podają wyniki uzyskane

po przebadaniu, oprócz zwierząt gospodarskich, 23 sztuk dużych zwierząt łownych (saren, dzików, jeleni – bez podania liczby każdego z gatunków), co ze względu na szczupłość materiału badawczego, umniejsza wartość uzyskanych rezultatów.

Celem badań było określenie częstości dodatnich wyników serologicznych w kierunku leptospirozy w populacji dzika europejskiego (*Sus scrofa L.*) zamieszkującego teren woj. kujawsko-pomorskiego oraz ustalenie najczęściej występujących serowariantów.

### Material i metody

Materiał do badań stanowiła krew pobierana z serca lub jamy opłucnej bezpośrednio po odstrzale dzików z terenu województwa kujawsko-pomorskiego. Krew od dzików otrzymano częściowo za pośrednictwem lekarzy powiatowych jako próby do badań monitoringowych w kierunku pomoru klasycznego lub z pracowni wirusologicznej Zakładu Higieny Weterynaryjnej w Bydgoszczy. Ogółem otrzymano w latach 1998-2000 107 próbek krwi, w tym 69 od dzików z terenu dawnego województwa toruńskiego, 11 – z wrocławskiego, a 27 – z bydgoskiego. Po odwirowaniu surowice badane były następnego dnia, lub jeśli nie było to możliwe zamrażano je i przechowywano w temp. -20°C do czasu badania.

Badanie serologiczne wykonano odczynem aglutynacji mikroskopowej (OAM) oraz odczynem biernej hemaglutynacji (OHB). OAM ze względu na wysoką czułość i swoistość jest testem serologicznym powszechnie wykorzystywanym na całym świecie w diagnostyce leptospirozy (2, 5, 18). Wykrywa on przeciwciała zarówno klasy IgM jak i IgG, przy czym większa część immunoglobulin reagujących w tym odczynie i charakterystycznych dla wczesnej fazy infekcji należy do klasy M (4, 6). Immunoglobuliny klasy IgG początkowo (do 1-2 tygodni) nieobecne w surowicy, już po 3 miesiącach od zakażenia leptospirami stanowią 80% wszystkich przeciwciał wykrywanych przy użyciu OAM (16). Do badań surowic odczynem aglutynacji mikroskopowej użyto żywych 8-10 dniowych hodowli leptospir, które namnożono w temp. 28°C. Takie hodowle wykazują w tym okresie wzrostu najlepszą aktywność aglutynacyjną (17). Płynne podłoże wzrostowe zostało wyprodukowane przez firmę Difco Laboratories (Bacto-Leptospira Medium Base EMJH+Bacto Leptospira Enrichment EMJH). Do badań wybrano następujące serowarianty reprezentujące 16 grup serologicznych:

- *icterohaemorrhagiae* (szczip RGA, serogrupa *Icterohaemorrhagiae*),
- *grippotyphosa* (szczip Moskva V, serogrupa *Grippotyphosa*),
- *sejroe* (szczip M 84, serogrupa *Sejroe*),
- *tarassovi* (szczip *Perepelicin*, serogrupa *Tarassovi*),
- *pomona* (szczip *Pomona*, serogrupa *Pomona*),
- *canicola* (szczip *Hond Utrecht IV*, serogrupa *Canicola*),
- *australis* (szczip *Balico*, serogrupa *Australis*),
- *ballum* (szczip *Mus 127*, serogrupa *Ballum*),
- *hebdomadis* (szczip *Hebdomadis*, serogrupa *Hebdomadis*),
- *poi* (szczip *Poi*, serogrupa *Javanica*),

- *calledoni* (szczip *Calledoni*, serogrupa *Calledoni*),
- *zanoni* (szczip *Zanoni*, serogrupa *Pyrogenes*),
- *cynopteri* (szczip 3522 C, serogrupa *Cynopteri*),
- *autumnalis* (szczip *Akiyami A*, serogrupa *Autumnalis*),
- *bataviae* (szczip *Van Tienen*, serogrupa *Bataviae*),
- *hardjo* (szczip *Hardjoprajitno*, serogrupa *Sejroe*),
- *bratislava* (szczip *Jež-bratislava*, serogrupa *Australis*),
- *patoc* (szczip *Patoc I*, serogrupa *Semarang*).

Wszystkie serowarianty, oprócz *patoc* należącego do saprofitycznego gatunku *Leptospira biflexa*, reprezentują patogenny gatunek *Leptospira interrogans*. Każdy szczip użyty do badań musiał spełniać warunki podane w poprzedniej pracy (12). Za wynik dodatni, świadczący o kontakcie organizmu z zarazkiem przyjęto aglutynację przynajmniej 50% leptospir w rozcieńczeniu końcowym surowicy 1:100. W przypadku reakcji dodatniej z surowicą w rozcieńczeniu 1:100 wykonywano szereg dwukrotnych rozcieńczeń i badano powtórnie, aż do uzyskania wyniku ujemnego.

W celu odróżnienia zakażeń wczesnych od starych, zamiast badania par surowic odczynem mikroaglutynacji zastosowano odczyn hemaglutynacji biernej, wykrywający jedynie immunoglobuliny klasy M (11), będące dobrym wskaźnikiem wczesnego zakażenia leptospirami (4). Badania wszystkich surowic dodatnio reagujących w odczynie aglutynacji mikroskopowej przeprowadzono przy użyciu gotowego zestawu przygotowanego przez ZHW Gdańsk, wykorzystującego jako antygen wyciąg dezoksyholanowy z dziesięciodniowej hodowli szczepu *Perepelicin* należącego do serowariantu *tarassovi* (7). Odczyn hemaglutynacji biernej wykonano wg metodyki podanej przez Michalską (14). Rozcieńczenie badanej surowicy wynosiło 1:20. Za wynik dodatni uznawano rozłożenie krwinek w postaci jednolitej warstwy na dnie dołka. Luźny, szeroki pierścień na dnie dołka złożony z krwinek stanowił reakcję wątpliwą. Natomiast jako wynik ujemny uznano utworzenie przez krwinki zwarte pierścienia lub guziczka na dnie dołka. Reakcja dodatnia, powodowała konieczność wykonania szeregu kolejnych, dwukrotnych rozcieńczeń. Za miano surowicy przyjęto jej najwyższe rozcieńczenie, w którym odczyn hemaglutynacji biernej wypadał pozytywnie.

### Wyniki i omówienie

Ogólna liczba dodatnich reakcji serologicznych w próbkach krwi dzików stwierdzonych przy pomocy odczynu aglutynacji mikroskopowej lub odczynu biernej hemaglutynacji wyniosła 27, co stanowi 25,2% łącznej liczby badanych zwierząt. Analizując przypadki dodatnich reakcji serologicznych w OAM stwierdzono reakcje z 12 serowariantami, przy czym najczęściej z *sejroe* (6 dodatnich reakcji), następnie z *grippotyphosa* oraz *poi* (po 4). Wyniki badań OAM zebrane zostały w tab. 1.

Na 30 dodatnich reakcji z różnymi serowariantami w trzech przypadkach stwierdzono współaglutynację z dwoma (dwukrotnie była to reakcja surowicy z *sejroe* oraz *hardjo*, jednokrotnie zaobserwowano reakcję z serowariantami *grippotyphosa* i *autumnalis*), a w dwóch z trzema serowariantami: *grippotyphosa*, *sejroe*, *hardjo* oraz *sejroe*, *hebdomadis* i *hardjo*. Na pod-

Tab. 1. Częstość występowania u dzików dodatnich reakcji serologicznych w odczynie aglutynacji mikroskopowej

Serowariant	Liczba surowic ujemnych	Liczba surowic dodatnich*	Odwrotność mian (zakres)	Częstość (%)
<i>Icterohaemorrhagiae</i>	107	0	-	-
<i>Grippotyphosa</i>	103	4	100-200	3,7
<i>Sejroe</i>	101	6	100-800	5,6
<i>Tarassovi</i>	107	0	-	-
<i>Pomona</i>	106	1	100	0,93
<i>Canicola</i>	105	2	100	1,86
<i>Australis</i>	107	0	-	-
<i>Ballum</i>	105	2	100	1,86
<i>Hebdomadis</i>	106	1	100	0,93
<i>Patoc</i>	107	0	-	-
<i>Poi</i>	103	4	100-400	3,7
<i>Calledoni</i>	107	0	-	-
<i>Zanoni</i>	107	0	-	-
<i>Cynopteri</i>	106	1	100	0,93
<i>Autumnalis</i>	106	1	400	0,93
<i>Bataviae</i>	104	3	100	2,80
<i>Hardjo</i>	104	3	200	2,80
<i>Bratislava</i>	105	2	100	1,86

Objaśnienie: \* uwzględniono reakcje współaglutynacji z dwoma lub większą liczbą serowariantów, jakie wystąpiły przy badaniu niektórych surowic.

Tab. 2. Wyniki badań serologicznych dzików w kierunku leptospirozy przy użyciu OAM i OHB

Liczba surowic	Surowice pochodzące z terenu byłego województwa			Razem
	toruńskiego n = 69	bydgoskiego n = 27	włocławskiego n = 11	
Dodatnich w OAM lub OHB	21	5	1	27
Dodatnich w OAM	19	3	1	23
Dodatnich w OAM i potwierdzona w OHB	3*	0	1	4
Reagujących tylko w OHB	1	2	0	3
Wątpliwych w OHB	1	0	0	1

Objaśnienie: \* nie uwzględniono wyniku wątpliwego w OHB.

stawie samych tylko badań serologicznych ustalenie czy ma się do czynienia z równoczesną infekcją dwóch lub więcej serowariantów, czy tylko z reakcjami krzy-

żowymi nie jest możliwe. Wiadomo jednak, że takie serowarianty jak: *sejroe*, *hebdomadis* oraz *hardjo* wykazują bliskie pokrewieństwo antygenowe i bardzo często przy zakażeniu jednym z nich obserwuje się reakcje dodatnie z pozostałymi dwoma, zwłaszcza jeśli ma się do czynienia z wczesnym stadium zakażenia. Dlatego też w dawniejszych klasyfikacjach wszystkie trzy wymienione serowarianty znajdowały się w jednej grupie serologicznej. W chwili obecnej *sejroe* oraz *hardjo* należą do tej samej grupy *Sejroe*, natomiast serowariant *hebdomadis* należy do serogrupy *Hebdomadis*.

Większość reakcji serologicznych w OAM zachodziła z surowicą w rozcieńczeniu 1:100 (w 19 przypadkach) sześciokrotnie stwierdzono dodatni wynik z surowicą w rozcieńczeniu 1:200, czterokrotnie w rozcieńczeniu 1:400 (z serowariantami: *sejroe*, *poi*, dwukrotnie z *autumnalis*), a jednokrotnie 1:800 (z *sejroe*).

Badając surowice odczynem biernej hemaglutynacji otrzymano 7 wyników dodatnich oraz 1 wynik wątpliwy. Najwięcej pozytywnych reakcji zanotowano z surowicą w rozcieńczeniu 1:20 (4 przypadki), a w 3 w rozcieńczeniu 1:80. Wyniki badań porównawczych surowic dzików OAM i OHB zebrane zostały w tab. 2.

Jak wynika z danych tab. 2 na 23 dodatnich w OAM surowic 4 z nich reagowały również w OHB. Świadczy to o obecności przeciwciał zarówno IgG jak i IgM, czyli że w momencie odstrzału dziki znajdowały się we wczesnym stadium zakażenia. W jednym przypadku zaobserwowano reakcję dodatnią surowicy w odczynie aglutynacji mikroskopowej w rozcieńczeniu 1:200, a w OHB otrzymano wynik wątpliwy. Prawdopodobnym wyjaśnieniem tego zjawiska jest przejście wczesnego zakażenia w stadium przewlekłe, co związane jest ze stopniowym zanikaniem IgM i obecnością jedynie przeciwciał IgG. W 3 surowicach stwierdzono reakcję tylko w OHB, natomiast nie udało się wykazać przeciwciał w OAM. Jak

wykazała Kocik (10) badając odczynem hemaglutynacji biernej doświadczalnie zakażone leptospirami świnię, testem tym wykrywano dodatnie serologicznie osob-

niki już na trzeci dzień po wprowadzeniu zarazka, podczas gdy w OAM surowice reagowały dodatnio dopiero po 6 dniach. W przypadku wym. 4 surowic dzików dodatnich tylko w OHB można mieć do czynienia właśnie z takim, bardzo wczesnym stadium infekcji.

Analizując częstość zakażeń w 3 badanych województwach stwierdza się największy odsetek dodatnich seroreagentów na terenie byłego województwa toruńskiego 30,43%, następnie bydgoskiego 18,5% oraz wrocławskiego 9,09%. Wyniki badań przedstawione w niniejszej pracy dowodzą obecności przeciwciał w surowicy przeciwko aż 12 serowariantom, co świadczyć może o dużej wrażliwości tego gatunku zwierząt na zakażenie leptospirami. Wskazują także one na dziki jako możliwe źródło patogennych leptospir. Badania serologiczne przeprowadzone na tych zwierzętach na terenie województwa kujawsko-pomorskiego dowodzą znaczącej i nie do końca poznanej roli jaką odgrywa ten gatunek w transmisji zarazków na inne zwierzęta i ludzi. W celu dokonania dokładniejszej analizy epizootycznej należałoby przebadać także zwierzęta gospodarskie oraz ewentualnie ludzi zamieszkujących ten sam obszar. Poprzez porównanie dodatnich reakcji u dzików oraz innych gatunków możliwe byłoby ustalenie stopnia korelacji zakażeń poszczególnymi serowariantami. Anusz i wsp. (1) przeprowadzili takie przeglądowe badania serologiczne różnych gatunków zwierząt (w tym i dzików) zamieszkujących obszar jednego województwa. Wykazały one, na 23 sztuki dużych zwierząt łownych (jeleni, saren i dzików) obecność przeciwciał w 20 przypadkach, przy czym dodatnie reakcje serologiczne notowano najczęściej z serowariantami *poi* oraz *autumnalis*. Autorzy ci nie podają jednak dokładniejszych wyników dotyczących samych dzików, chociaż wskazują na zagrożenie epizootyczne z ich strony. Badania serologiczne przeprowadzone w kierunku leptospirozy dzików w innych krajach europejskich dowodzą częściej obecności dodatnich seroreagentów u tego gatunku. Tremł i Nesnalova (19), badając dziki z terenu Czech, wykazali obecność pozytywnych reakcji w surowicach 13,9% zwierząt, ale tylko z serowariantem *grippotyphosa*. W północnej Chorwacji badania m.in. nad leptospirozą dzików wykonali Borčić i wsp. (3). Na 112 przebadanych zwierząt dodatnie reakcje serologiczne zaobserwowano u 13, co stanowi 11,6% badanej populacji. W Australii Mason i wsp. (13) próbowali ustalić wpływ opadów atmosferycznych oraz płci na częstość wystąpienia reakcji dodatnich. Dwie grupy zwierząt podzielono, w zależności od miejsca odstrzału, na tereny o niewielkich rocznych opadach atmosferycznych (200-500 mm) oraz o wysokich (pow. 500 mm). Autorom nie udało się ustalić korelacji między częstością dodatnich reakcji serologicznych i sumą opadów ani wykazać istotnych różnic między płciami. Stwierdzili natomiast duży stopień zakażenia sięgający 20%. Serowariant *pomona* okazał się odpowiedzialny za większość (62,8%) dodatnich reakcji serologicznych.

Otrzymane wyniki badań własnych wskazują na konieczność kontynuacji badań serologicznych dzików i innych zwierząt łownych w kierunku leptospirozy. Duża liczba dodatnich seroreagentów niesie ze sobą zwiększone ryzyko zakażenia się innych zwierząt, także gospodarskich, zwłaszcza tych, które przebywają w tych samych co dziki miejscach i korzystają z tych samych terenów pastwiskowych oraz wodopojów. Człowiek jest w nie mniejszym niż zwierzęta stopniu narażony na zakażenie tymi drobnoustrojami. Szczególnie dotyczy to tych osób, które mają bezpośredni kontakt z tkankami lub narządami, a więc myśliwych, leśników oraz ludzi zajmujących się rozbiorem i przerobem mięsa dzików. Wskazane byłoby też przeprowadzenie badań okresowych w kierunku leptospirozy w tych grupach zawodowych.

### Piśmiennictwo

1. Anusz Z., Kocik T., Siemionek J., Ciecierski H., Stryszak A., Lewicki P.: Badania nad leptospirozą bydła, psów, zwierząt futerkowych i łownych w województwie olsztyńskim w latach 1994-1995. Mat. X Kongresu PTNW, Wrocław 1996, 2, 250.
2. Arimitsu Y., Kmety E., Ananyina Y., Baranton G., Ferguson I. R., Smythe L., Terpstra W. J.: Evaluation of the one-point microcapsule agglutination test for the diagnosis of leptospirosis. Bull. WHO 1994, 72, 395-399.
3. Borčić B., Raos B., Sebek Z., Kranzelić D., Eldan J. A., Filipović V.: Protutijela za leptospire u velikih divljih životinja (divljaci) Sjeverne Hrvatske. Vet. Arhiv 1989, 59, 117-123.
4. Cousins D. V., Robertson G. M., Parkinson J., Richards R. B.: Use of enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) to detect the IgM and IgG antibody response to *Leptospira interrogans* serovar hardjo in pregnant ewes. Zbl. Bkt. 1991, 275, 335-342.
5. Cousins D. V., Robertson G. M.: Use of enzyme immunoassay in a serological survey of leptospirosis in sheep. Aust. Vet. J. 1986, 63, 36.
6. Faine S.: Guidelines for the control of leptospirosis. WHO Offset Publication No 67, Geneva 1982, s. 29.
7. Imamura S., Matsui H., Ashizawa Y.: Studies on indirect hemagglutination test for leptospirosis. Jap. J. Exp. Med. 1972, 42, 563.
8. Instrukcja Nr 1. Min. Rol. i Gosp. Żywn. Dep. Wet. z dnia 11.02.1985 r. w sprawie postępowania przy leptospirozie zwierząt.
9. Keast J. C., Littlejohns I. R., Rowan L. C., Wannan J. S.: The role of the feral pig as a disease reservoir. Aust. Vet. J. 1963, 39, 99.
10. Kocik T.: Poziom przeciwciał mierzonych odczynem hemaglutynacji biernej i odczynem aglutynacji mikroskopowej w przebiegu odpowiedzi immunologicznej świń na zakażenie *L. pomona* w warunkach doświadczalnych. Mat. IX Kongresu PTNW, Olsztyn, 1992, 1, 235.
11. Kocik T., Arent Z., Anusz Z., Zdun E.: Odczyn hemaglutynacji biernej w diagnostyce leptospirozy ludzi i zwierząt. Życie wet. 1998, 73, 434-438.
12. Krawczyk M.: Leptospiroza owiec na podstawie badań serologicznych. Medycyna Wet. 1999, 55, 397-399.
13. Mason R. J., Fleming P. J. S., Smythe L. D., Dohnt M. F., Norris M. A., Symonds M. L.: *Leptospira interrogans* antibodies in feral pigs from New South Wales. J. Wildl. Dis. 1998, 34, 738-743.
14. Michalska E.: Metoda przygotowania odczynników do TPHA. Przegł. Derm. 1980, 67, 63-68.
15. New J. C., Delozier K., Barton C. E., Morris P. J., Potgieter L. N. D.: A serologic survey of selected viral bacterial diseases of European wild hogs, Great Smoky Mountains National Park, USA. J. Wildl. Dis. 1994, 30, 103-106.
16. Smith C. R., Ketterer P. J., McGowan M. R., Corney B. G.: A review of laboratory techniques and their use in the diagnosis of *Leptospira interrogans* serovar hardjo infection in cattle. Aust. Vet. J. 1994, 71, 290-294.
17. Srivastava S. K.: Factors affecting anti-leptospira agglutinin titres in sera of animals and man. Indian J. Anim. Sci. 1988, 58, 632-634.
18. Staak C., Mekaprateep M., Kämpe U., Schönberg A.: Serological reactions of leptospirosis-positive (MAR and CFT) bovine sera in ELISA. J. Vet. Med. B 1990, 37, 581-586.
19. Tremł F., Nesnalova E.: Vyskyt protitalek proti leptospiram v krevních se-rech lovné zvěře. Vet. Med. Praha 1993, 38, 123-127.