

Odpowiedź immunologiczna w immunoterapii trychofityzy lisów

KRZYSZTOF KOSTRO, DOROTA LUFT-DEPTUŁA, MARIUSZ PLISZCZYŃSKI

Katedra Epizootologii i Klinika Chorób Zakaźnych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, ul. Głęboka 30, 20-612 Lublin

Kostro K., Luft-Deptuła D., Pliszczyński M.

Immunological response to the immunotherapy of trichophytosis in breeding foxes

Summary

The immunological response of foxes under immunotherapy for *Trichophyton mentagrophytes* infection was evaluated. The development of clinical symptoms of trichophytosis affected the dynamic of the immune response. A significant suppression of the reactivity of T lymphocytes was noted at a symptomatic course of trichophytosis. Vaccination of foxes with Tm-4 vaccine stimulated cellular immune response, which increased the indices of the nonspecific and specific proliferation of lymphocytes and leukocyte migration inhibition. Vaccination eliminated the infection of *T. mentagrophytes* in naturally infected foxes.

Keywords: *Trichophyton mentagrophytes*, immune response, vaccination, foxes

Trychofityza lisów jest przyczyną znacznych strat ekonomicznych spowodowanych obniżeniem przyrostów masy ciała i zahamowaniem rozwoju, koniecznością izolacji i ograniczeniem obrotu zwierzętami oraz zmniejszeniem wartości użytkowej lub dyskwalifikacją skór pochodzących od zwierząt chorych i ozdrowieńców. Leczenie i zwalczanie grzybiczy skórnej lisów za pomocą chemioterapeutyków jest mało skuteczne ze względu na pracochłonność zabiegów i wysokie koszty, dużą toksyczność i małą skuteczność leków stosowanych miejscowo oraz działanie supresyjne, toksyczne i teratogenne niektórych leków systemowych (25, 26). W profilaktyce i terapii trychofityzy lisów największe znaczenie odgrywiają szczepionki. Ich stosowanie przynosi najlepsze efekty (4, 6, 15, 21, 24). Wprowadzenie do terapii trychofityzy u lisów szczepionek stwarza potrzebę dokładniejszej znajomości procesów immunologicznych zachodzących w organizmie zakażonym grzybicą po zastosowaniu swoistej immunoterapii.

Celem badań było prześledzenie odpowiedzi immunologicznej u lisów zakażonych *Trichophyton mentagrophytes* w warunkach naturalnych, u których zastosowano wakcynoterapię.

Materiał i metody

Zwierzęta doświadczalne. Badania przeprowadzono na 14 lisach polarnych w wieku 4-5 miesięcy poddanych leczeniu po 2-3 tygodniach od momentu zauważenia pierwszych objawów chorobowych. Lisy pochodziły z fermy, w której po raz pierwszy wystąpiła grzybica skórna wywołana przez *Trichophyton mentagrophytes*. Typowe ogniska grzybicze w postaci owalnych wyłysień, pokrytych abze-

stowymi, silnie zespolonymi ze skórą strupami występowały w różnym nasileniu u poszczególnych zwierząt. Spośród wybranych 14 lisów u 6 zmiany grzybicze w postaci pojedynczych ognisk zlokalizowane były na głowie i dolnych odcinkach kończyn, natomiast u pozostałych 8 na głowie, kończynach, tułowiu i ogonie. Z zeskrubin włosów i naskórka pobranych od wszystkich zwierząt doświadczalnych przed podaniem szczepionki wyizolowano czystą hodowlę *T. mentagrophytes* var. *granulosum*. Siedmiu lisom grupy doświadczalnej (grupa I) podano domięśniowo szczepionkę inaktywowaną Tm-4 w dawce 3 ml dwukrotnie w odstępach 14 dni. Grupę kontrolną (K) stanowiło 7 lisów nieszczepionych z grzybicą naturalną. Zwierzęta obserwowano przez 70 dni. W ocenie efektów leczniczych uwzględniono czas ustępowania zmian grzybiczych i przeżywalność spor *T. mentagrophytes*. Przeżywalność spor określano posiewając zeskrobinę pobraną ze zmian chorobowych na stałe podłoże Sabourauda z dodatkiem aktydionu, które inkubowano w 27°C przez 14 dni. Zeskrobinę pobierano oraz wskaźniki odpowiedzi immunologicznej oceniano przed podaniem szczepionki (0 dzień) oraz w 14., 21., 28., 42., 56. i 70. dniu po podaniu I dawki szczepionki. Odpowiedź immunologiczną u lisów immunizowanych i kontrolnych określano za pomocą testu transformacji blastycznej limfocytów (LTT) i testu hamowania migracji leukocytów (LMIF).

Szczepionka. W badaniach użyto szczepionki inaktywowanej przygotowanej ze szczepu *T. mentagrophytes* (Tm-4), wyizolowanego od lisów z grzybicą naturalną. Badania laboratoryjne wykazały, że szczep Tm-4 stymuluje odporność komórkową (14), natomiast badania terenowe potwierdziły jego skuteczność w zapobieganiu i leczeniu trychofityzy lisów (15). Szczep Tm-4 namnażano na wzbogaconym przez dodatek 0,2% wyciągu drożdżowego podłożu

płynnym Sabourauda w hodowli rotacyjnej (10 dni, 28°C) i przygotowano inaktywowaną formaliną (0,3%) zawiesinę o gęstości około 6×10^6 jtk/ml. Szczepionkę inaktywowaną kontrolowano na jałowość przez posiewy na podłożach używanych do hodowli bakterii i grzybów oraz nieszkodliwość na białych myszkach, świnkach morskich i lisach (26).

Antygen do testów immunologicznych. W testach LTT i LMIF użyto „antygeny plazmatycznego” otrzymanego ze szczepu *T. mentagrophytes* (Tm-7) w następujący sposób: do wilgotnej masy grzybni uzyskanej w hodowli rotacyjnej (10 dni, 28°C) dodawano korund i PBS w proporcji 1 : 3 : 1. Uzyskaną mieszaninę schładzano do 4°C i ucierano w moździerzu porcelanowym przez 40 minut. Korund i nierozpuszczalne resztki grzybni odwirowywano trzykrotnie (45 min. przy 40 000 rpm). Następnie supernatant filtrowano przez sączek membranowy o średnicy porów 0,45 µm (Milipore Corporation, Bedford, USA), ampułkowano i do chwili użycia przechowywano w -20°C. Otrzymany antygen standaryzowano w stosunku do ilości białka, którego stężenie oznaczano metodą Lowry (19).

Test transformacji blastycznej limfocytów (LTT). Krew od lisów w ilości 5 ml pobierano z żyły dostopowej do jałowych strzykawek z dodatkiem heparyny (20 j/ml) wolnej od środków konserwujących (Heparin, Sigma, USA) oraz gentamycyny (10 µg/ml) (Gentamicin, Gibco, USA). Izolacji komórek jednojądrzastych dokonywano poprzez wirowanie nierozcieńczonej krwi nałożonej na jednostopniowy gradient fikolu z uropoliną o gęstości 1,095 g/cm³ i osmolarności 400 mmOs/kg według metody Ferrante i Thong (7) w modyfikacji własnej (12). Żywotność komórek kontrolowana za pomocą barwienia błękitem trypanu wynosiła powyżej 95%.

Test LTT wykonano według metody opisanej przez Kostro i Wiktorowicza (13). W przypadku stymulacji limfocytów mitogenem mikrohodowle o objętości 0,2 ml prowadzono w plastikowych mikropłytkach o okrągłym dnie (Sterilin, England). Jako mitogenu używano konkanawaliny A (ConA) w stężeniu 5 µg/ml. Mikrohodowle limfocytów stymulowane antygenem prowadzono w płytkach o płaskim dnie. Do stymulacji komórek uczulonych używano antygeny plazmatycznego, którego końcowe stężenie wynosiło 40 µg białka/ml. Próbę kontrolną w obu przypadkach stanowiła hodowla limfocytów w podłożu Eagle'a z dodatkiem 10% surowicy płodowej (FCS, Serwa). Mikropłytki inkubowano w temperaturze 39°C przez 48 godzin w przypadku stymulacji mitogenem i 5 dni po stymulacji antygenem w powietrzu wilgotnym zawierającym 5% CO₂. Na 6 godzin przed zakończeniem inkubacji do każdego mikrodołka dodawano 1 µCi (37kBq) 3H-tymidyny (3H-Thd, UVVVR, CSSR). Następnie komórki hodowli zbierano na filtrach z włókna szklanego, wypłukując każdy mikrodołek 3-krotnie wodą destylowaną. Radioaktywność określano w liczniku scyntylacyjnym Beckmana (LS 5000 TD, Beckman). Wyniki przedstawiono w postaci bezwzględnej ilości inkorporowanej tymidyny wyrażonej w cpm oraz indeksu stymulacji (SI) obliczonego według wzoru: SI = bezwzględna ilość tymidyny w hodowli z mitogenem (antygenem)/bezwzględna ilość tymidyny w hodowli bez mitogenu (antygeny).

Test hamowania migracji leukocytów (LMIF). Test wykonano metodą kapilarową według Bendixena i Soborga (1). Leukocyty izolowano poprzez wirowanie nierozcieńczonej krwi w gradiencie jednostopniowym przygotowanym według metody Ferrante i Thong (7) w modyfikacji własnej (12). Otrzymaną zawiesiną leukocytów o gęstości 5×10^7 /ml napełniano jałowe, silikonowe kapilary, które następnie wirowano przez 5 minut przy 600 rpm. Fragmenty kapilar z osadzoną warstwą leukocytów około 2 mm przyklejano w pozycji horyzontalnej do dna komory Davisa za pomocą pasty silikonowej firmy Bayer. Komory zamykano szkiełkami nakrywkowymi przyklejając je roztopioną parafiną. Jeden pojemnik komory wypełniano płynem Eagle'a z dodatkiem antygeny plazmatycznego, którego końcowe stężenie wynosiło 40 µg/ml, natomiast drugi, wypełniony podłożem bez antygeny, stanowił kontrolę. Komory inkubowano w 39°C przez 42 godziny. Następnie przy pomocy czytnika do mikrofilmów obrysowywano na bibule filtracyjnej wielkość stref migracji. Po wycięciu obrysowanych krążków i ich zważeniu obliczano procent hamowania według wzoru: średnia masa obszarów migracji w środowisku z antygenem/średnia masa obszarów migracji w środowisku bez antygeny × 100. Wartości hamowania powyżej 20% uznawano za swoiste.

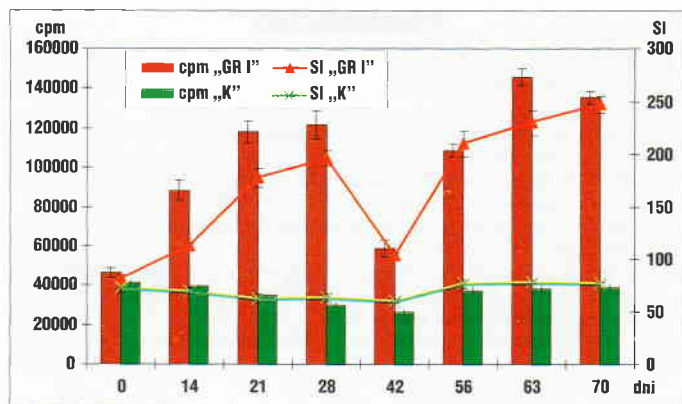
Uzyskane wyniki badań poddano analizie statystycznej. Obliczenia wykonano przy pomocy testu t-Studenta.

Wyniki i omówienie

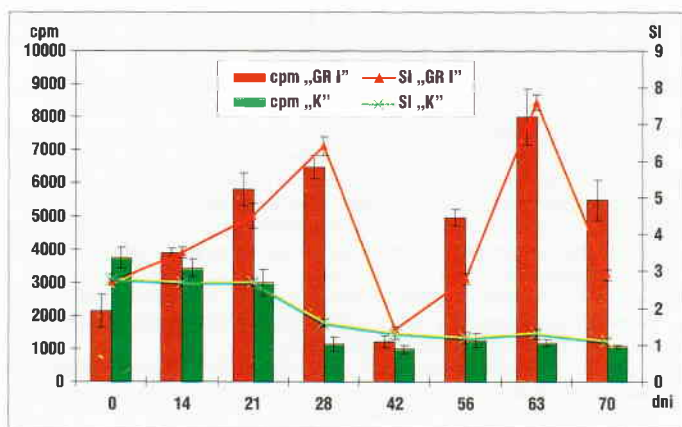
Czas ustępowania objawów chorobowych po wakcynoterapii zależał od intensywności zmian grzybiczych. U lisów, u których występowały jedynie pojedyncze ogniska grzybicze umieszczone głównie na głowie i dolnych odcinkach kończyn, całkowite wyleczenie następowało już po czterech tygodniach po wakcynoterapii. U lisów, u których zmiany chorobowe były bardziej nasilone, ogniska grzybicze zanikały między 42. a 56. dniem po drugiej dawce szczepionki. W ostatnim dniu (70. dzień) obserwacji u wszystkich lisów grupy I uzyskano całkowite wyleczenie potwierdzone ujemnym wynikiem badania mikologicznego. W grupie kontrolnej zachorowalność utrzymywała się mniej więcej na tym samym poziomie przez cały okres obserwacji. U lisów nieleczonych wraz z odpadaniem strupów pojawiały się nowe ogniska grzybicze na skórze grzbietu, ogonie, łapach i małżowinach usznych, które utrzymywały się do końca obserwacji. Ponadto u tych lisów obserwowano zahamowanie wzrostu i charłactwo, zaś badanie mikologiczne zeszkrobiny dało wynik dodatni.

W dniu rozpoczęcia badań (0 dzień) średnie wskaźniki proliferacji limfocytów stymulowanych konkanawaliną A (ConA) w grupie I i K były zbliżone (ryc. 1). W 14. dniu po pierwszej dawce szczepionki u lisów z grupy I wystąpił statystycznie istotny wzrost indeksów stymulacji i bezwzględnej wartości inkorporacji tymidyny w stosunku do wartości wyjściowych i do wartości u zwierząt grupy K. W toku kolejnych oznaczeń wskaźniki te u zwierząt grupy I uległy dalszemu wzrostowi i w 28. dniu po I dawce szczepionki osią-

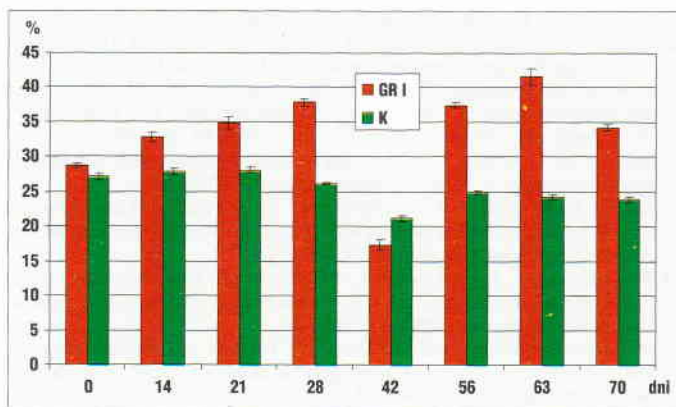
gały najwyższe średnie wartości. Po tym czasie notowano stopniowy spadek reaktywności limfocytów i w 42. dniu stwierdzono najniższe wartości testu. Ponowny wzrost wskaźników proliferacji limfocytów stymulowanych ConA u lisów doświadczalnych wystąpił w 56. dniu oznaczeń. Następnie stopniowo wzrastały one osiągając w 63. dniu badań najwyższe wartości w to-



Ryc. 1. Kinetyka odpowiedzi immunologicznej lisów z naturalną trychofitozą poddanych swoistej immunoterapii. Wyniki testu proliferacji limfocytów stymulowanych ConA (średnie wartości cpm i SI)



Ryc. 2. Kinetyka odpowiedzi immunologicznej lisów z naturalną trychofitozą poddanych swoistej immunoterapii. Wyniki testu proliferacji limfocytów stymulowanych antygenem grzybiczym (średnie wartości cpm i SI)



Ryc. 3. Kinetyka odpowiedzi immunologicznej lisów z naturalną trychofitozą poddanych swoistej immunoterapii. Wyniki testu zahamowania migracji leukocytów krwi obwodowej (wartości średnie)

ku całego doświadczenia. Natomiast u zwierząt kontrolnych wskaźniki testu LTT utrzymywały się na istotnie niższym do wyjściowego poziomie przez cały okres prowadzonej obserwacji.

Wyniki proliferacji limfocytów stymulowanych antygenem grzybiczym przedstawiono na ryc. 2. U wszystkich lisów doświadczalnych przed podaniem szczepionki zanotowano dodatnie wartości indeksów stymulacji (SI), z tym że w porównaniu z ich wartością po jej aplikacji były istotnie niższe. Od 14. dnia po pierwszej dawce szczepionki obserwowano stopniowy wzrost wskaźników swoistej proliferacji limfocytów, które w 28. dniu po pierwszej dawce szczepionki osiągały wartości najwyższe. W 42. dniu badań wartości indeksów stymulacji były ujemne u wszystkich poddanych wakcynoterapii lisów. W 63. dniu ponownie odnotowano dodatnie wartości testu LTT i były one najwyższe w toku całego doświadczenia. W grupie kontrolnej dodatnie wartości testu LTT uzyskano w 0., 14. i 21. dniu, natomiast w toku dalszych oznaczeń test ten był ujemny.

W teście hamowania migracji leukocytów (LMIF) dodatnie wskaźniki notowano u wszystkich lisów z grzybicą naturalną, przy czym skrajne wartości wahały się od 24,3% do 29,8% niezależnie od intensywności zmian grzybiczych (ryc. 3). W grupie doświadczalnej wzrost średnich wartości testu LMIF w stosunku do wyjściowych notowano już w 14. dniu po podaniu pierwszej dawki szczepionki. W kolejnych terminach oznaczeń wskaźniki swoistego hamowania migracji leukocytów ulegały dalszemu istotnemu wzrostowi osiągając w 56. i 70. dniu wartości najwyższe w toku całego doświadczenia. W grupie kontrolnej stopień hamowania migracji ulegał obniżeniu już w pierwszych trzech terminach oznaczeń i w 42. dniu osiągał on wartość graniczną. W ostatnich trzech terminach badań ponownie odnotowano dodatnie wartości testu LMIF, z tym że były one bliskie wartości granicznej.

W likwidacji zakażeń grzybiczych główną rolę odgrywa odporność komórkowa. Swoista przeciwgrzybicza odporność komórkowa jest uwarunkowana przez limfocyty Th (T-helper). Oprócz limfocytów Th, istotną rolę w odpowiedzi immunologicznej przeciwko dermatofitom odgrywają komórki prezentujące antygen oraz IL-2, IL-4, IL-10, IL-12 i IFN γ . Rola cytokin polega zarówno na wzmocnieniu prezentacji antygenów grzybiczych (IFN γ i IL-12), jak i na stymulacji określonej subpopulacji limfocytów T. IFN γ uwalniany przez limfocyty Th1 hamuje proliferację i czynność limfocytów Th2, podczas gdy IL-4 i IL-10 wytwarzane przez komórki Th2 hamują produkcję cytokin przez limfocyty Th1. Subpopulacja limfocytów Th2 produkująca cytokiny stymulujące proliferację limfocytów B, syntezę i sekrecję przeciwciał przyczynia się do rozwoju przewlekłej postaci grzybicy skórnej przez hamowanie protekcyjnej odporności komórkowej (2, 5, 14, 17).

W badaniach własnych kinetyka kształtowania się odpowiedzi immunologicznej była związana z obecnością klinicznych objawów choroby. Statystycznie istotny spadek aktywności proliferacyjnej limfocytów stymulowanych ConA u lisów przed podaniem szczepionki świadczy o nieswoistej supresji reaktywności limfocytów prawdopodobnie spowodowanej wzrostem subpopulacji limfocytów T supresyjnych, odpowiedzialnych za immunoregulację funkcji efektorowych komórek immunologicznie kompetentnych w przebiegu zakażenia (2, 3, 8, 9). Pomimo wyraźnej nieswoistej supresji blastogenezy limfocytów, w tym czasie występowała odpowiedź na swoisty antygen grzybiczy w teście LTT i LMIF, co wskazuje, że pojawienie się swoistej komórkowej odpowiedzi immunologicznej związane jest z zaistniałym zakażeniem i rozwojem klinicznych objawów choroby (14, 16). Ponieważ uzyskane w tym czasie dodatnie wartości indeksów stymulacji były wyraźnie niższe niż po zastosowaniu wakcynoterapii, można domniemywać, że w przebiegu naturalnej trychofitozy dochodzi u lisów również do swoistej supresji limfocytów wywołanej obecnością grzyba w chorobowo zmienionej skórze (14, 16). Zastosowana w terapii trychofitozy lisów szczepionka Tm-4 posiadała więc wystarczająco silne właściwości immunogenne i stymulowała swoistą odporność typu komórkowego określaną testem transformacji blastycznej i hamowania migracji leukocytów. Efektem jej stymulującego działania na układ immunologiczny był istotny wzrost wskaźników nieswoistej i swoistej proliferacji limfocytów oraz hamowania migracji leukocytów u lisów. Wzrost wskaźników odporności komórkowej następował już w trakcie stosowania wakcynoterapii, z tym, że uzyskane w tym czasie wartości testu LTT i LMIF były istotnie niższe niż w okresie zdrowienia i w pierwszych tygodniach po wyleczeniu trychofitozy. Można sądzić, że aplikacja szczepionki zawierającej wysoce immunogeny szczep Tm-4 spowodowała zniesienie stanu immunosupresji u lisów z trychofitozą w wyniku aktywacji limfocytów Th1 warunkujących rozwój protekcyjnej odporności przeciwgrzybiczej. Smith i Griffin (22) wyrażają pogląd, że dla rozwoju protekcyjnej odporności przeciwgrzybiczej konieczna jest aktywacja subpopulacji limfocytów Th1, którą warunkuje rodzaj, a nawet szczep zakażającego grzyba. W momencie zanikania klinicznych objawów choroby oraz całkowitego wyleczenia średnie wartości wskaźników proliferacji limfocytów stymulowanych antygenem grzybiczym oraz swoistego hamowania migracji osiągały najwyższe wartości przez cały okres prowadzonej obserwacji. Wykonane w tym czasie badania mikologiczne dały wynik negatywny, co świadczy o eliminacji grzyba z ognisk chorobowych. Uzyskane wyniki wskazują, że w przewlekłym zakażeniu naturalnym *T. mentagrophytes* dochodzi u lisów do hiporeaktywności układu immunologicznego. Szczepionka zawierająca szczep Tm-4 przez indukcję mechanizmów obronnych typu komór-

kowego eliminuje naturalne zakażenie grzybicze u lisów wywołane *T. mentagrophytes*.

Wnioski

Szczepionka zawierająca szczep Tm-4 może być wykorzystana do leczenia grzybic skórnych lisów wywołanych przez *T. mentagrophytes*.

Piśmiennictwo

1. Bendixen G., Soborg H.: A leukocyte migration technique for *in vitro* detection of cellular (delayed type) hypersensitivity in man. *Danish Med. Bull.* 1969, 16, 1-8.
2. Calderon R. A.: Immunoregulation of dermatophytosis. *Critical Rev. Microbiol.* 1989, 16, 339-368.
3. Dahl M. V.: Suppression of immunity and inflammation by products produced by dermatophytes. *J. Am. Acad. Dermatol.* 1993, 28, 19-23.
4. Deepe G. S. Jr.: Prospects for the development of fungal vaccines. *Clin. Microbiol. Rev.* 1997, 10, 585-596.
5. Del Sero G., Mencacci A., d'Ostiani C. F., Montagnoli C., Bacci A., Mosci P., Kopf M., Romani L.: Antifungal type I responses are unregulated in IL-10-deficient mice. *Microbes Infect.* 1999, 1, 1169-1180.
6. Englund L., Mattson R., Berndtson I. T.: Possible effect of vaccination against Trichophyton mentagrophytes infection in a Swedish fox farm. *Acta vet. Scand.* 1990, 31, 121-123.
7. Ferrante A., Thong Y. H.: A rapid one-step procedure for purification of mononuclear and polymorphonuclear leukocytes from human blood using a modification of the Hypaque-Ficoll technique. *J. Immunol. Methods* 1980, 34, 279-288.
8. Green F., Balish E.: Suppression of *in vitro* lymphocyte transformation during an experimental dermatophyte infection. *Infect. Immun.* 1979, 26, 554-562.
9. Grando S. A., Herron M. J., Dahl M. V.: Binding and uptake of Trichophyton rubrum mannan by human epidermal keratinocytes: a time course study. *Acta Dermatol. Venerol.* 1992, 72, 273-276.
10. Hay R., Sheman G.: Chronic dermatophyte infections. II. Antibody and cell-mediated immune responses. *Br. J. Dermatol.* 1982, 106, 191-198.
11. Kostro K.: Hypersensitivity to trichophytin in small animals experimentally infected with Trichophyton equinum. *J. Med. Vet. Mycol.* 1989, 27, 353-361.
12. Kostro K.: Wpływ smolarności gradientu na izolację limfocytów z krwi obwodowej lisów hodowlanych. *Annales UMCS, Sectio DD.* 1989, 44, 117-120.
13. Kostro K., Wiktorowicz K.: Optimal conditions for *in vitro* mitogen-induced proliferation of peripheral blood lymphocytes in breeding foxes. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1991, 29, 183-188.
14. Kostro K.: Dynamika zjawisk immunologicznych u lisów z naturalną i doświadczalną trychofitozą oraz u zwierząt immunizowanych przeciwko tej chorobie. *Praca habilitacyjna*, Lublin 1998.
15. Kostro K., Wojcicka-Lorenowicz K., Kutrzuba J., Siemionek J.: Skuteczność szczepionki inaktywowanej w leczeniu i zapobieganiu trychofitozy lisów hodowlanych. *Przegl. Hod.* 1999, 42, 195-201.
16. Kostro K., Gliński Z.: The kinetics of the immune response to natural trichophytosis in arctic foxes. *Folia Vet.* 2000, 44, 106-111.
17. Kostro K., Gliński Z., Wojcicka-Lorenowicz K.: Odczyn immunologiczny w grzybicach skórnych zwierząt. *Medycyna Wet.* 2001, 57, 709-714.
18. Kristensen F., Kristensen B., Lazary S.: The lymphocyte stimulation test in veterinary immunology. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1982, 3, 203-277.
19. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. I.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951, 193, 265-275.
20. Philips T. R., Jensen J. L., Rubino M. J., Yang W. C., Schultz R. D.: Effects of vaccines on the canine immune system. *Can. J. Vet. Res.* 1989, 53, 154-160.
21. Rybnikar A., Chumela J., Wrzal V., Krýs F., Janouskovicova H.: Prophylactic and therapeutic use of a vaccine against trichophytosis in a large herd of silver foxes and arctic foxes. *Acta Vet. Brno* 1991, 60, 285-288.
22. Smith J. M. B., Griffin J. F. T.: Strategies for the development of a vaccine against ringworm. *J. Med. Vet. Mycol.* 1995, 33, 87-91.
23. Walters B. A., Chick J. E. D., Halliday W. J.: Cell-mediated immunity and serum blocking factors in patients with chronic dermatophyte infections. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 1974, 46, 849-857.
24. Wawrzekiewicz J., Wawrzekiewicz K., Sadzikowski Z.: Monowalentna i skojarzona szczepionka inaktywowana w profilaktyce trychofitozy lisów hodowlanych. *Medycyna Wet.* 1991, 47, 317-320.
25. Wołoszyn S., Andrychiewicz J., Kostro K.: Badania nad przydatnością trychofityny w leczeniu i zwalczaniu grzybic skórnych lisów hodowlanych. *Medycyna Wet.* 1976, 32, 392-398.
26. Wołoszyn S., Andrychiewicz J., Kostro K., Gradziński Z.: Badania nad występowaniem oraz swoistym zapobieganiem trychofitozie lisów hodowlanych. *Medycyna Wet.* 1983, 39, 387-391.

Adres autora: dr hab. Krzysztof Kostro, prof. nadzw. AR, ul. Sikorskiego 3/81, 20-814 Lublin