

Wpływ oksytetracykliny stosowanej per os na wybrane parametry odporności komórkowej u indyków

BARTŁOMIEJ TYKAŁOWSKI, TOMASZ STENZEL, MARCIN ŚMIAŁEK,
DARIA PESTKA, DARIUSZ CHOSZCZ*, ANDRZEJ KONCICKI

Katedra Chorób Ptaków, Wydział Medycyny Weterynaryjnej,
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, ul. Oczapowskiego 13, 10-718 Olsztyn
*Katedra Maszyn Roboczych i Metodologii Badań, Wydział Nauk Technicznych,
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, ul. Oczapowskiego 11, 10-719 Olsztyn

Tykałowski B., Stenzel T., Śmiałek M., Pestka D., Choszcz D., Koncicki A.

Influence of the oral administration of oxytetracycline on selected parameters of cellular immunity in turkeys

Summary

The aim of this study was to determine the influence of oxytetracycline given per os at a dose of 0.5 g/L in drinking water for 5 days on selected parameters of the cell-mediated immunity of 5-week-old turkeys. The research was carried out on forty turkeys divided into two groups (20 birds per group). The percentage of CD3+CD4+ and CD3+CD8+ T lymphocytes as well as IgM+ B lymphocytes were determined by flow cytometry in the blood and spleens of turkeys in the control and in the experimental group after 5 days of oxytetracycline administration and 6 days later.

The results of this study show that oxytetracycline given per os (0.5 g/L) as outlined above, has no effect on the percentage of the CD3+CD4+ T lymphocyte subpopulation in the blood of turkeys. On the other hand, we were able to determine that it caused a statistically significant decrease in the percentage of CD3+CD8+ T and IgM+ B lymphocyte subpopulations in blood. The results show that six days after the administration of the antibiotic, there was a statistically significant decrease in the percentage of the CD3+CD8+ T lymphocyte subpopulation among the mononuclear cells of the spleen. A significant decrease in the CD3+CD4+ T lymphocyte subpopulation percentage and an increase in the IgM+ B lymphocyte subpopulation percentage in the spleen were recorded both after 5 days of oxytetracycline administration and 6 days later in the experimental groups of turkeys.

It can be claimed that oxytetracycline given to turkeys at a dose of 0.5 g/L for five days in drinking water causes the immunosuppression of the cell-mediated mechanisms of their immune system, which can lead to infections by opportunistic pathogens, as well as weakened post-vaccination immunity.

Keywords: turkeys, oxytetracycline, cellular immunity

Oksytetracyklina jest antybiotykiem, który znajduje szerokie zastosowanie w produkcji drobiarskiej, odznacza się ona bowiem szerokim spektrum działania w odniesieniu do drobnoustrojów izolowanych od ptaków, jak: gronkowce (9), paciorkowce i pałeczki *E. coli* (10), *Avibacterium* (dawniej *Haemophilus*) *paragallinarum* (21), *Salmonella* spp. (13), *Klebsiella* i *Pasteurella* (4), mikoplazmy (26, 28), riketsje i chlamydie (5), *Clostridium* spp. (14), *Ornithobacterium rhinotracheale* (1, 27) i *Bordetella avium* (16). W momencie wprowadzenia zakazu stosowania antybiotyków stymulatorów wzrostu, oksytetracyklina podawana z paszą lub wodą u ptaków często pełni rolę

takiego stymulatora (2, 14). Niekorzystnym zjawiskiem jest stosunkowo szybkie i łatwe narastanie oporności u bakterii na tetracykliny (6, 12, 13, 24) oraz oddziaływanie immunosupresyjne u leczonych tym antybiotykiem ptaków (20, 25). Al-Ankari i Hameida (2) wykazali bowiem, że oksytetracyklina stosowana w dawce 0,05 g/kg paszy przez 50 dni powodowała obniżenie liczby leukocytów, zmniejszenie torby Fabrycjusza i grasicy oraz redukowała aktywność fagocytarną makrofagów. Działanie immunosupresyjne tego antybiotyku wykazano także u ludzi (8, 19, 23), co nawet znajduje zastosowanie w terapii niektórych stanów patologicznych (18, 23). Na tej podstawie tetracykliny

są zaliczane do antybiotyków silnie osłabiających odpowiedź obronną ustroju (19, 25).

Jak wynika z przeglądu piśmiennictwa, większość badań nad wpływem antybiotyków na układ odpornościowy prowadzono metodami *in vitro* i dotyczyły one ich działania na granulocyty obojętnochłonne i makrofagi (aktywność fagocytarna, procesy wewnątrzkomórkowego zabijania, chemotaksja) (8, 11, 19, 25). Panigrahy i wsp. (20) wykazali, że tetracykliny stosowane u indyków w dawkach leczniczych hamują transformację blastyczną limfocytów stymulowanych mitogenami.

Celem badań było określenie wpływu oksytetracykliny stosowanej *per os* na wybrane parametry odporności komórkowej u indyków.

Material i metody

Badania przeprowadzono w dwóch grupach 5-tygodniowych indyków typu BIG 7 obu płci, po 20 ptaków w każdej. Ptaki nie wykazywały klinicznych objawów chorobowych. Odchowano je od pierwszego dnia życia zgodnie z obowiązującą technologią w izolowanych wiwariach Katedry Chorób Ptaków i karmiono *ad libitum* pełnoporcjowymi mieszankami paszowymi. Indyki z grupy I stanowiły kontrolę, a z grupy II przez 5 dni otrzymywały z wodą do picia oksytetracyklinę w dawce 0,5 g czystej substancji na 1 litr wody. Bezpośrednio po 5 dobach podawania i następnie po 6 dobach od zakończenia podawania oksytetracykliny pobierano krew od 7 ptaków z obu grup w ilości 2 ml z żyły odłokciowej do jałowych probówek z antykoagulantem EDTA K 1,6 mg/ml (Sarstedt, Niemcy) i dokładnie mieszano za pomocą rolkowego mieszadła hematologicznego w temperaturze pokojowej przez 5 minut.

Izolacja komórek mononuklearnych z krwi obwodowej. Po 1,5 ml krwi uprzednio pobranej od każdego indyka rozcieńczano w stosunku 1 : 1 jałowym PBS z dodatkiem 1% FCS (Sigma-Aldrich, Niemcy). Tak przygotowaną krew nawarstwiano na 3 ml gradientu Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich, Niemcy) i wirowano przy 400 g w temperaturze pokojowej przez 30 minut z wyłączoną funkcją hamowania. Po odwirowaniu delikatnie zbierano powstały kożuszek komórek mononuklearnych do jałowych probówek, płukano 2-krotnie buforem PBS z dodatkiem 1% FCS, a następnie zawieszano w 1 ml PBS i przeznaczano do kolejnych etapów badań.

Izolacja komórek mononuklearnych ze śledziony. Pobrane jałowo od badanych indyków (po uprzedniej eutanazji) wycinki śledziony o masie po około 0,4 g poddawano indywidualnej homogenizacji przy pomocy automatycznego homogenizatora do tkanek (TissueLyser II, Qiagen, Niemcy) w obecności 1 ml medium RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, Niemcy) z dodatkiem 5% FCS. Po uzyskaniu jednorodnej zawiesiny całość przesączało przez sterylny, nylonowy filtr komórkowy o średnicy oczek 70 μm (BD Falcon, USA). Odsączone resztki tkanek odrzucano, natomiast wyizolowane komórki zawieszano w takiej objętości medium RPMI-1640 z dodatkiem 5% FCS, aby liczba komórek w zawieszynie wynosiła 2×10^7 /ml. Następnie nawarstwiano 3 ml takiej zawiesiny na 3 ml jałowego gradientu Histopaque-1077 o temperaturze 25°C, używa-

jąc 15 ml probówek wirowniczych ze stożkowym dnem (BD Falcon, USA). Probki wirowano przy 400 g w temperaturze pokojowej przez 30 minut z wyłączoną funkcją hamowania. Po odwirowaniu zbierano delikatnie powstały kożuszek komórek mononuklearnych do jałowych probówek, płukano 2-krotnie buforem PBS z dodatkiem 5% FCS, a następnie zawieszano w 1 ml PBS, liczone za pomocą automatycznego licznika komórek Vi-Cell (Beckman Coulter, USA) i przeznaczano do kolejnych badań. Wszystkie etapy izolacji wykonywano w warunkach aseptycznych w temperaturze pokojowej.

Oznaczanie odsetka subpopulacji limfocytów T CD3⁺CD4⁺ i CD3⁺CD8⁺ we krwi obwodowej i w śledzionie. Z uzyskanej zawiesiny wyizolowanych komórek mononuklearnych krwi obwodowej i śledziony pobierano 1×10^6 i przenoszono indywidualnie do probówek cytometrycznych (BD, USA). Do każdej z nich dodawano zalecaną przez producenta (AbD Serotec, Anglia) objętość przeciwciał monoklonalnych skierowanych na epitopy domen powierzchniowych receptorów CD4 (Mouse Anti Chicken CD4-FITC, klon 2-35) i CD8 (Mouse Anti Chicken CD8A-PE, klon 11-39) limfocytów T. Probki inkubowano przez 30 minut na lodzie bez dostępu światła. Następnie komórki płukano 2-krotnie w PBS, wirowano przy 250 g przez 7 minut, a powstałe pellety traktowano 100 μl medium utrwalającego (Reagent A, Leucoperm, AbD Serotec, Anglia) i inkubowano przez 15 minut w temperaturze pokojowej. Po inkubacji do każdej probówki dodawano po 3 ml buforu PBS i wirowano przez 5 minut przy 300 g. Supernatant zlewano, a komórki zawieszano w 100 μl medium do permeabilizacji (Reagent B, Leucoperm, AbD Serotec, Anglia) i dodawano po 10 μl przeciwciał monoklonalnych skierowanych na wewnątrzplazmatyczny fragment łańcucha ε (o sekwenencji PPVNPDPYEP) receptora CD3 (Rat Anti Human CD3-APC, klon CD3-12). Probki dokładnie mieszano na vortexie i inkubowano przez 30 minut w temperaturze pokojowej bez dostępu światła. Po inkubacji dodawano do każdej probówki po 3 ml buforu PBS i wirowano przez 5 minut przy 300 g. Supernatant zlewano, a pellety komórek zawieszano w 400 μl PBS i badano za pomocą cytometru przepływowego FACSCanto II (BD, USA).

Oznaczanie odsetka subpopulacji limfocytów B IgM⁺ we krwi obwodowej i w śledzionie. Wyizolowane komórki mononuklearne w liczbie 1×10^6 z krwi obwodowej i śledziony badanych indyków przenoszono indywidualnie do probówek cytometrycznych (BD, USA). Do każdej z probówek dodawano zalecaną przez producenta (AbD Serotec, Anglia) objętość przeciwciał poliklonalnych (Goat Anti Chicken IgM-FITC) celem wyznakowania limfocytów B IgM⁺. Probki inkubowano przez 30 minut na lodzie bez dostępu światła. Następnie komórki płukano 2-krotnie w PBS, wirowano przy 250 g przez 7 minut, a powstałe pellety zawieszano w 400 μl PBS i badano za pomocą cytometru przepływowego FACSCanto II (BD, USA).

Analiza statystyczna wyników. Wyniki doświadczeń opracowano statystycznie w programie Statistica PL, stosując moduły statystyki opisowe oraz test nieparametryczny dla prób niezależnych U Manna-Whitneya. Za statystycznie istotne uznano różnice na poziomie istotności $p \leq 0,1$, a za wysoce istotne przy $p \leq 0,05$.

Tab. 1. Procentowy udział limfocytów T i B w krwi indyków po podaniu oksytetracykliny (n = 7; \bar{x} , s, V%)

Badane limfocyty	Po 5 dniach podawania oksy						Po 6 dniach od zakończenia podawania oksy						Analiza statystyczna między grupami doświadczalnymi
	Grupa kontrolna*			Grupa doświadczalna			Grupa kontrolna			Grupa doświadczalna			
T CD3 ⁺ CD4 ⁺	19,34	7,26	37,56	16,05	5,28	32,88	13,97	4,59	32,84	15,44	3,09	19,98	U = 31; p = 0,9581
	U = 22; p = 0,3184						U = 23; p = 0,3720						
T CD3 ⁺ CD8 ⁺	2,54	0,94	37,06	2,26	1,19	52,56	1,69	0,41	24,11	1,38	0,47	34,18	U = 15; p ≤ 0,1*
	U = 22; p = 0,3184						U = 16; p = 0,1000*						
B IgM ⁺	6,39	0,57	8,87	6,37	2,27	35,64	5,55	1,56	28,13	4,68	1,05	22,34	U = 15; p ≤ 0,1*
	U = 27; p = 0,6365						U = 19; p = 0,1893						

Objaśnienia: U, p – wyniki testowania; * – różnica statystycznie istotna przy p ≤ 0,1

Tab. 2. Procentowy udział limfocytów T i B w śledzeniu indyków po podaniu oksytetracykliny (n = 7; \bar{x} , s, V%)

Badane limfocyty	Po 5 dniach podawania oksy						Po 6 dniach od zakończenia podawania oksy						Analiza statystyczna między grupami doświadczalnymi
	Grupa kontrolna			Grupa doświadczalna			Grupa kontrolna			Grupa doświadczalna			
T CD3 ⁺ CD4 ⁺	42,14	6,56	15,57	41,29	8,57	20,75	28,83	3,54	12,29	31,19	4,61	14,78	U = 10; p ≤ 0,05**
	U = 32; p = 1,0000						U = 20; p = 0,3720						
T CD3 ⁺ CD8 ⁺	30,87	7,98	25,84	27,36	5,96	21,79	35,67	3,59	10,07	24,94	7,28	29,20	U = 25; p = 0,4948
	U = 22; p = 0,3184						U = 8; p ≤ 0,05**						
B IgM ⁺	20,95	3,75	17,91	19,60	5,55	28,29	29,39	5,77	19,63	32,75	3,04	9,28	U = 0; p ≤ 0,05**
	U = 26; p = 0,5796						U = 18; p = 0,1562						

Objaśnienia: U, p – wyniki testowania; ** różnica statystycznie wysoko istotna przy p ≤ 0,05

Wyniki i omówienie

Procentowy udział subpopulacji limfocytów T CD3⁺CD4⁺ i CD3⁺CD8⁺ oraz B IgM⁺ we krwi indyków, które przez 5 dni otrzymywały *per os* oksytetracyklinę w dawce 0,5 g czystej substancji na 1 litr wody przedstawiono w tab. 1. Z danych tej tabeli wynika, że oksytetracyklina stosowana w wymienionej dawce nie miała istotnego wpływu na odsetek subpopulacji limfocytów T CD3⁺CD4⁺ zarówno po 5 dniach jej stosowania, jak i po 6 dniach od zaprzestania stosowania. Natomiast wykazano, że po 6 dniach od zakończenia podawania oksytetracykliny we krwi indyków następuje istotny spadek odsetka subpopulacji limfocytów T CD3⁺CD8⁺. W tym czasie w grupach doświadczalnych zaobserwowano także spadek odsetka subpopulacji limfocytów B IgM⁺.

Procentowy udział badanych subpopulacji limfocytów T i B w śledzeniu indyków, którym przez 5 dni aplikowano z wodą do picia oksytetracyklinę w dawce 0,5 g na 1 litr wody przedstawiono w tab. 2. Jak wynika z danych tej tabeli, w porównaniu z grupą kontrolną wykazano istotny spadek odsetka subpopulacji limfocytów T CD3⁺CD8⁺ po 6 dniach od zakończenia podawania oksytetracykliny.

Spadek odsetka subpopulacji limfocytów T CD3⁺CD8⁺ i to zarówno w krwi, jak i w śledzeniu świadczy o upośledzeniu zjawisk odpornościowych, gdyż główną funkcją tych limfocytów cytotoksycznych jest za-

bijanie komórek zakażonych wirusami i innymi mikroorganizmami oraz nowotworowych. Jest to możliwe dzięki rozpoznawaniu przez limfocyty T CD8⁺ obcych antygenów w połączeniu z MHC klasy I. Te cytotoksyczne limfocyty czasami rozpoznając zakażoną komórkę nie zabijają jej, a jedynie hamują replikację wirusów poprzez wydzielanie specyficznych cytokin, jak np. IFN- γ . Ten z kolei wywiera swój efekt przeciwwirusowy bezpośrednio albo pośrednio przez pobudzenie makrofagów do syntezy TNF, NO i innych czynników (22). Natomiast porównując odsetek subpopulacji limfocytów T CD3⁺CD4⁺ i B IgM⁺ w śledzeniu między grupami doświadczalnymi wykazano istotny spadek badanej subpopulacji limfocytów T i wzrost odsetka limfocytów B w 6 dni po zaprzestaniu podawania oksytetracykliny. Spadek odsetka tej subpopulacji limfocytów T, czyli pomocniczych, w śledzeniu wskazuje na upośledzenie inicjowania i regulacji odpowiedzi immunologicznej, gdyż rozpoznają one antygeny prezentowane w połączeniu z MHC klasy II (3). Limfocyty te wytwarzają głównie IL-4 i IL-13 oraz w mniejszym stopniu IL-3 i GM-CSF (granulocyte-macrophage colony stimulating factor), będące czynnikami wzrostu i różnicowania limfocytów B, i wspomagają szczególnie odpowiedź humoralną podczas zakażeń patogenami zewnątrzkomórkowymi (7, 15). W świetle powyższego należy stwierdzić, że oksytetracyklina stosowana *per os* w dawce 0,5 g na jeden litr wody powoduje poważne zaburze-

nia w funkcjonowaniu układu immunologicznego u indyków. W badaniach własnych oksytetracyklinę stosowano w dawce leczniczej zalecanej przez producenta przez okres 5 dni. Bez wątplenia dłuższy okres stosowania tego antybiotyku, nawet w dawce niższej od zalecanej, mógłby być przyczyną dużo większej immunosupresji (2).

Na podkreślenie zasługuje także fakt, że użyte w badaniach własnych przeciwciała monoklonalne do wyznakowania receptorów CD4 i CD8 limfocytów T przeznaczone dla kurcząt posiadają certyfikat reaktywności krzyżowej z limfocytami indyka. Podobnie sekwencja aminokwasów w domenie wewnątrz plazmatycznej łańcucha ϵ receptorów CD3 limfocytów T jest wysoce konserwatywna i bardzo podobna u wielu gatunków zwierząt i człowieka, stąd możliwe było wykrycie komórek CD3⁺ indyka za pomocą przeciwciał monoklonalnych Rat Anti Human Cd3-APC klon CD3-12. Również zastosowane przeciwciała poliklonalne Goat Anti Chicken IgM-FITC wykazywały reaktywność krzyżową z molekułami IgM⁺ indyka (cyt. 17).

W świetle powyższego należy stwierdzić, że oksytetracyklina stosowana u indyków w dawce leczniczej ma istotny wpływ na odsetek badanych subpopulacji limfocytów T i limfocytów B IgM⁺, co jednoznacznie wskazuje na jej immunosupresyjne oddziaływanie na komórkowe mechanizmy układu odpornościowego, którego konsekwencją może być wystąpienie chorób na tle zakażeń drobnoustrojami oportunistycznymi (np. pałeczkami *E. coli*) i gorsza odporność poszczepienna.

Piśmiennictwo

1. *Abdul-Aziz T. A., Weber L. J.*: Ornithobacterium rhinotracheale infection in a turkey flock in Ontario. *Can. Vet. J.* 1999, 40, 349-350.
2. *Al-Ankari A. S., Homeida A. M.*: Effect of antibacterial growth promoters on the immune system of broiler chicks. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1996, 53, 277-283.
3. *Arstila T. P., Vainio O., Lassila O.*: Central role of CD4⁺ T cells in avian immune response. *Poult. Sci.* 1994, 73, 1019-1026.
4. *Balakrishnan G., Mini M.*: Plasmid profile and antibiotic resistance pattern of *Pasteurella multocida* of avian origin. *Indian Vet. J.* 2001, 78, 783-786.
5. *Bougiouklis P., Papaioannou N., Georgopoulou I., Iordanidis P., Vlemmas I., Lekkas S., Siarkou V.*: Chlamydia-induced bilateral ectropion of the inferior eyelids in pigeons. *Avian Dis.* 2000, 44, 372-378.
6. *Chopra I., Howe T. G. B.*: Bacterial resistance to the tetracyclines. *Microb. Rev.* 1978, 42, 707-724.
7. *Degen W. G., Daal N., Rothwell L., Kaiser P., Schijns V. E.*: Th1/Th2 polarization by viral and helminth infection in birds. *Vet. Microbiol.* 2005, 105, 163-167.
8. *Elferink J. G. R., Deierkauf M.*: Inhibition of polymorphonuclear leukocyte functions by chlortetracycline. *Biochem. Pharmacol.* 1984, 33, 3667-3673.
9. *Geornaras I., von Holy A.*: Antimicrobial susceptibilities of isolates of *Staphylococcus aureus*, *Listeria* species and *Salmonella* serotypes associated with poultry processing. *Int. J. Food Microbiol.* 2001, 70, 29-35.
10. *Gkoumas P., Boutsis-Hatsopoulou E., Iliadis N., Chronis E., Gkiourtsidis K., Sarris K.*: Antibacterial drugs resistance of *E. coli* and *Enterococcus* spp. strains isolated from poultry feces. *Acta Microbiol. Hellen.* 2001, 46, 519-523.
11. *Grondel J. L., Angenent G. C., Egberts E.*: The influence of antibiotics on the immune system. III. Investigations on the cellular functions of chicken leukocytes in vitro. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1985, 10, 307-316.
12. *Hryniewicz W., Meszaros J.*: Antybiotyki w profilaktyce i leczeniu zakażeń. PZWL, Warszawa 2001.

13. *Hui A. K., Das R.*: Studies on isolation, serotyping and antibiotic sensitivity of *Salmonella* isolated from ducks. *Indian Vet. J.* 2001, 78, 1058-1059.
14. *Ibrahim R. S., Ibtihal M. M., Soliman A. M.*: Clostridial infection in chickens "studying the pathogenicity" and evaluation of the effect of some growth promoters on broiler performance. *Aust. Vet. Med. J.* 2001, 45, 252-267.
15. *Kaiser P., Stäheli P.*: Avian cytokines and chemokines, [w:] Davison F., Kaspers B., Schat K. A. (red.): *Avian Immunology*. Academic Press (imprint of Elsevier), UK, 2008, 203-222.
16. *Kelly B. J., Ghazikhanian G. Y., Mayeda B.*: Clinical outbreak of *Bordetella avium* infection in two turkey breeder flocks. *Avian Dis.* 1986, 30, 234-237.
17. *Koncicki A., Tykałowski B., Stenzel T., Śmiatek M., Pestka D.*: Effect of infection of turkeys with haemorrhagic enteritis adenovirus isolate on the selected parameters of cellular immunity and the course of colibacillosis. *Pol. J. Vet. Sci.* 2012, 15, 215-220.
18. *Labro M. T.*: Antibacterial agents-phagocytes: new concepts for old in immunomodulation. *Int. J. Antimicrob. Agents* 1998, 10, 11-21.
19. *Labro M. T., el Benna J.*: Effects of anti-infectious agents on polymorphonuclear neutrophils. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1991, 10, 124-131.
20. *Panigrahy B., Grumbles L. C., Millar D., Naqi S. A., Hall C. F.*: Antibiotic-induced immunosuppression and levamisole-induced immunopotential in turkeys. *Avian Dis.* 1979, 23, 401-408.
21. *Poernomo S., Sutarna S., Raftee M., Blackall P. J.*: Characterisation of isolates of *Haemophilus paragallinarum* from Indonesia. *Aust. Vet. J.* 2000, 78, 759-762.
22. *Schultz U., Magor K. E.*: Comparative immunology of agricultural birds, [w:] Davison F., Kaspers B., Schat K. A. (red.): *Avian Immunology*. Academic Press (imprint of Elsevier), UK 2008, 395-420.
23. *Shapira L., Soskolne W. A., Houry Y., Barak V., Halabi A., Stabholz A.*: Protection against endotoxemic shock and lipopolysaccharide-induced local inflammation by tetracycline: correlation with inhibition of cytokine secretion. *Infect. Immun.* 1996, 64, 825-828.
24. *Sugimoto A., Nakagava H.*: Characteristics of *Salmonella* Typhimurium var. Copenhagen isolated from wild pigeons. *J. Vet. Med. Japan* 2001, 54, 22-26.
25. *Świtła M.*: Wpływ antybiotyków na odporność. *Materiały VII Symp. Drob., Polanica Zdrój* 29.09.-1.10.1993, s. 144-148.
26. *Valks M., Burch D. G. S.*: The use of antimicrobials against avian mycoplasma. *Internat. Poult. Product.* 2001, 9, 17.
27. *Varga J., Fodor L., Makrai L.*: Characterisation of some *Ornithobacterium rhinotracheale* strains and examination of their transmission via eggs. *Acta Vet. Hung.* 2001, 49, 125-130.
28. *Wang J. M., Dan G. Q., Cao T. X.*: Drug sensitivity test of *Mycoplasma synoviae* from chickens. *Chinese J. Vet. Sci. Tech.* 1994, 24, 1-25.

Adres autora: prof. dr hab. Andrzej Koncicki, ul. Baczyńskiego 1, 10-371 Olsztyn; e-mail: koncici@uwm.edu.pl