

ZYGMUNT CYGAN, KRYSZYNA WAWRZKIEWICZ

## Identyfikacja beztlenowców zarodnikujących wyosobnionych z przewodu pokarmowego padłego drobiu

Z Wojewódzkiego Zakładu Higieny Weterynaryjnej  
w Lublinie  
Kierownik: dr TADEUSZ DĄBROWSKI

Z Katedry Mikrobiologii Wydziału Wet. WSR w Lublinie  
Kierownik: prof. dr TADEUSZ JASTRZĘBSKI

Problem schorzeń beztlenowcowych ludzi i zwierząt nabiera w opinii światowej coraz większego znaczenia. Świadczy o tym Międzynarodowe Sympozjum w 1963 r. w sprawie schorzeń wywoływanych przez beztlenowce, oraz 34 doroczna konferencja Tow. Mikrobiologii Stosowanej w Aberystwyth w Anglii w 1964 r., poświęcona w przeważającej swej części sprawom beztlenowców, jak również XXXII Sesja Międzynarodowego Biura Epizootycznego w 1964 r., na której między innymi podkreślano wagę drobnoustrojów beztlenowych w patologii zwierząt.

W świetle literatury światowej, szczególne znaczenie posiadają beztlenowcowe schorzenia przewodu pokarmowego (1, 2, 4, 8, 10, 15, 20, 21). Nasilenie beztlenowcowych zatruc pokarmowych wydaje się być w pewnym stopniu związane z rozwinięciem na wielką skalę przemysłu konserwowego, jak również masowego stosowania odżywek mineralnych, jako dodatku do pasz dla zwierząt (13).

Ostatnio Panish (20, 21) opisuje u kur schorzenie wywołane przez *Clostridium perfringens* przebiegające w postaci enteritis necroticans. Drobnoustroj wyizolowany z tego przypadku posiadał wszelkie cechy *Clostridium perfringens* typu F, opisywanego przez takich badaczy, jak: Zeissler i Rassfeld-Sternberg (27), Hain (9), Dieckmann (5), Egerton i Walker (6), Oakley (19) z przypadków enteritis necroticans człowieka. W medycynie ludzkiej poważny problem stanowią zatrucia pokarmowe wywołane przez termooporne szczepy *Cl. perfringens* typu A (12). Dyskusyjną sprawą jest rola tego typu zarazka w etiologii zatruc pokarmowych i stanów zapalnych jelit zwierząt. Brak w literaturze krajowej doniesień dotyczących roli beztlenowców w schorzeniach przewodu pokarmowego ptaków, jak również izolacji i typowania tych zarazków, skłonił autorów do podjęcia badań w tym kierunku.

### BADANIA WŁASNE

#### Materiał i metody

1. *Izolacja szczepów.* Badaniom poddano szczepy *Clostridium* wyizolowane z przewodu pokarmowego dwóch padłych kur. Zmiany sekcyjne badanych ptaków przejawiały się w postaci martwicowego zapalenia błony śluzowej dwunastnicy i jelit cienkich oraz zwyrodnienia wątroby. Dokładnym badaniem bakteriologicznym nie stwierdzono u nich patogennych drobnoustrojów tlenowych. Również badania parazytologiczne dały wynik negatywny. Badania na obecność drobnoustrojów beztlenowych pozwoliły na wyizolowanie w obu przypadkach z treści jelit laseczek Gram-dodatnich, określonych później jako *Cl. perfringens*. Zawartość przewodu pokarmowego wysiewano na podłoże Wrzosek-Tarozzi, a po 5 i 16 godz. inkubacji dokonywano przesiewów na podłoże agarowe z dodatkiem 5% krwi baraniej. Hodowlę prowadzono metodą pyrogalolową (14,22).

2. *Identyfikacja szczepów.* W celu identyfikacji gatunkowej wyizolowanych szczepów wykonano badania morfologiczne wyosobnionych drobnoustrojów (barwienie metodą Grama, Ellnera i Burri-Ginsa) oraz ich kolonii (posiewy na podłoża agarowe z dodatkiem 5% krwi baraniej, koziej, końskiej i króliczej). Badania właściwości biochemicznych obejmowały fermentację węglowodanów: glikozy, laktozy, sacharozy, maltozy, mannitu i salicyny, rozkład glikozydu eskuliny, rozpuszczanie żelatyny, oraz ścięcie mleka. Podłoża do badań biochemicznych wykonano wg Meisla (17). Próby biologiczne przeprowadzano na świnkach morskich szczepionych domięśniowo dawką 0,5 ml 24-godzinnej hodowli z podłoża Wrzosek-Tarozzi. Właściwości letalne szczepów określano przez dożylną wprowadzenie myszkom białym 0,4 ml supernatantu odwirowanej, 24-godzinnej hodowli bulionowej. Poza tym w celu określenia typu zarazka przeprowadzono szczepienia dożylną myszek mieszaniną toksyn, ze swoistymi surowicami antytoksycznymi.

W toku dalszej pracy przeprowadzono analizę antygenów toksycznych głównych i pobocznych. Z głównych, letalnie działających toksyn, przebadano toksynę alfa, beta i epsilon.

Toksynę alfa oznaczano in vitro jako lecytynazę przy pomocy odczynu owolecytinowego wg Van Heinyngena (11) oraz próby Naglera (18, 25) wykonanej metodą płytkową i próbówkową. Odczyn tę hamowano swoistymi surowcami antytoksycznymi typu A i D *Cl. perfringens* \*). Obecność lecytynazy w badanych szczepach stwierdzano również na podstawie badań na śwince morskiej zakażonej domięśniowo dawką 0,5 ml 24-godz. hodowli bulionowej. Właściwości hemolityczne toksyny alfa określano wg metodyki podawanej przez Meisla (16) i Van Heinyngena (11), a jej właściwości nekrotyzujące badano na świnkach morskich albinosach. Świnkom tym wstrzykiwano śródskórnie po 0,5 ml odwirowanego filtratu 24-godz. hodowli bulionowej.

Obecność toksyny beta w filtratach badanych szczepów próbowano wykryć testem na świnkach morskich albinosach (19).

Toksynę epsilon oznaczano w filtratach 4-dniowych hodowli bulionowych wg metodyki podanej w pracy Barnes i Moon (1) używając trypsyny firmy Difco. Trypsynowane hodowle każdego szczepu wstrzykiwano dootrzewnowo trzem białym myszkom.

Z antygenów toksycznych pobocznych przebadano toksynę teta; toksynę kappa (prokollagenaza); dezoksyrybonukleazę i hialuronidazę.

Obecność toksyny teta wykrywano testami wg Meisla (16) i Van Heinyngena (11). Przeprowadzono zarówno oddzielanie toksyny teta od toksyny alfa metodą Van Heinyngena, jak również stosowano próbę uaktywniania toksyny teta jonami fosforanowymi przy równoczesnej inaktywacji toksyny alfa.

Toksynę kappa określano in vitro testem z papierem kolagenowym przygotowanym z kolagenu A ogonów szczurzych metodą Nageotte-Guoyon (cyt. wg Meisla). In vivo toksynę tę wykrywano próbą biologiczną na śwince morskiej.

Dezoksyrybonukleazę określano metodą leukocytową. Rozmazy przygotowywano z leukocyto-

\*) Za otrzymanie w/w surowic autorzy składają serdeczne podziękowanie dr Danucie Rymkiewicz i dr Józefowi Kochańskiemu.

wej warstwy krwi króliczej z heparyną. Odwirowaną toksynę rozcieńczano w 0,025 M buforze weronałowym o pH = 7,5 i mieszało a. a. z 0,25% żelatyną (stabilizator) oraz 0,075 M MgSO<sub>4</sub> (aktywator). Przygotowane rozmazy umieszczano w 37° na okres 24 godz. w takim roztworze. Każdorazowo nastawiano kontrolę preparatu w mieszaniu bez toksyny. Preparaty barwiono metodą Pappenheima. Odczyn dodatni cechowała obecność w preparacie leukocytów o zniszczonych jądrach.

Hialuronidazę oznaczano metodą biologiczną na królikach wg techniki podanej przez Meisla (17).

3. *Termorezystencja wyizolowanych szczepów.* Badanie wytrzymałości na temperaturę badanych szczepów wykonano z 6-dniowymi hodowlami na podłożu Ellnera (7) sprawdzonymi uprzednio na obecność zarodników. Ogrzewanie prowadzono w temperaturze 100° przez 1, 1,5, 2,0, 2,5 i 3,0 godziny. Każdą próbkę gwałtownie ochładzano i w ilości 6 ml posiewano na podłoże Wrzosek-Tarozzi z dodatkiem 1,5 ml 10% NaHCO<sub>3</sub> oraz 10% świeżej, odwióknionej krwi baraniej. Podłoże to znajdowało się w specjalnych próbkach o wymiarach 400 × 25 mm. Posiewy inkubowano w 37° przez okres 3 tygodni. W przypadku pojawienia się wzrostu wykonywano preparaty mikroskopowe i posiewy na agar z krwią w warunkach tlenowych i beztlenowych.

Wyniki i omówienie

1. *Isolacja szczepów.* Naprzemienne, kolejne przesiewy na podłoża płynne i stałe pozwoliły na uzyskanie czystych kultur dwóch szczepów laseczek beztlenowych, które oznaczono nr 9478 i nr 9516.

2. *Identyfikacja szczepów.* Wstępne badania miały na celu określenie przynależności gatunkowej wyizolowanych szczepów. Mikroskopowo stwierdzono obecność laseczek cylindrycznych, gramododatnich, posiadających otoczki, a w pewnych warunkach (podłoże wg Ellnera — 7) produkujących zarodniki. Badania hodowlane przeprowadzono na podłożach agarowych z dodatkiem 5% krwi różnych zwierząt. Otrzymane wyniki zestawiono w tabeli 1.

Tab. 1. Zachowanie się wyizolowanych szczepów laseczek beztlenowych na podłożach z krwią

Szczep	Wygląd kolonii i rodzaj hemolizy na agarze z krwią:			
	baranią	kozią	króliczą	końską
9478	szorstkie hemoliza beta i alfa *)	szorstkie hemoliza beta słaba hemoliza alfa	szorstkie słaba hemoliza beta	szorstkie hemoliza beta
9516	szorstkie słaba hemoliza alfa	brak hemolizy	słaba hemoliza alfa	brak hemolizy

\*) — wokół kolonii obecne dwie strefy hemolizy, bliżej kolonii hemoliza zupełna, na obwodzie hemoliza typu alfa.

Otrzymane wyniki wskazują, że badane szczepy laseczek beztlenowych dysponują różnymi hemolizynami w stosunku do krwi rozmaitych gatunków zwierząt. Najpełniejszy obraz hemolizy uzyskuje się zasadniczo na pożywce z krwią baranią. Poza tym stwierdzono,

że wyosobnione szczepy różnią się między sobą ilością i jakością hemolizyn.

Pod względem biochemicznym badane szczepy posiadały cechy charakterystyczne dla gatunku *Clostridium perfringens*. Zestawienie przebadanych właściwości podaje tabela 2.

Tab. 2. Biochemiczne właściwości badanych szczepów

Szczep	Glikoza	Leufaza	Sacharaza	Maltaza	Manif	Stalicyna	Eskulina	Żelatyna	Mleko *
9478	+	+	+	+	+	-	-	+	##
9516	+	+	+	+	+	-	-	+	##

\* ## - szybkie ścięcie mleka i kurczenie skrzepu

Jak wynika z tabeli szczepy nr 9478 i nr 9516 nie różniły się między sobą właściwościami biochemicznymi. Na uwagę zasługuje próba z eskuliną, która odgrywa dużą rolę w określaniu czystości szczepu. Szczepy zanieczyszczone paciorkowcami kałowymi dają bowiem z reguły wynik dodatni próby.

Orientacyjne znaczenie dla określania przynależności gatunkowej jak i typowej laseczek beztlenowych, posiada próba biologiczna na śwince morskiej. Pozwala ona na stwierdzenie obecności lecytynazy, hemolizyn i toksyny kappa. W próbie tej badane szczepy zachowywały się różnie. Szczep nr 9478 powodował śmierć świnek morskich w ciągu 16 godzin z wytworzeniem zmian anatomo-patologicznych, charakterystycznych dla szczepów zgorzeli gazowej typu A *Cl. perfringens*. Obserwowano obecność pęcherza „odklejonej” skóry ze znaczną depilacją i martwicą w miejscu iniekcji. Po przecięciu skóry stwierdzano bardzo znaczne ilości zhemolizowanego wysięku oraz kwasów tłuszczowych, będących następstwem działania lecytynazy. Mięśnie posiadały zmienioną konsystencję i kolor, co świadczyło o obecności toksyny kappa. W narządach wewnętrznych — zmian anat.-pat. nie zaobserwowano. Szczep nr 9516 nie powodował śmierci szczepionych świnek morskich w ciągu 4-dniowej obserwacji. W miejscu iniekcji powstawał jedynie mierny obrzęk gazowy, powoli zanikający. U zwierząt uśpionych na 4-ty dzień po zakażeniu na sekcji stwierdzano nieznaczny ilość krwistego, zhemolizowanego wysięku i kuleczek kwasów tłuszczowych. Efektu działania toksyny kappa nie obserwowano. Także na myszkach szczepy nr 9478 i 9516 zachowywały się różnie. Myszki zakażone hodowlą szczepu nr 9478 padały zawsze do dwóch godzin, podczas gdy surowica antytoksyczna anty A chroniła je od śmierci. Tego rodzaju wynik świadczy o przynależności badanego szczepu do typu A. Szczep nr 9516 nie powodował śmierci zakażonych myszek. Dokładne określenie przynależności typowej badanych szczepów przeprowadzono w oparciu o analizę antygenów toksycznych, a uzyskane wyniki zebrano w tabeli 3.

Tab. 3. Antygeny toksyczne i termorezystencja badanych szczepów (w porównaniu z danymi z literatury dla typów A i C Cl. perfringens).

Typ	Szczep	Rodzaj antygenu toksycznego									Termorezystencja	
		Toksyna α	β	ε	η	κ	θ	ι	λ	μ	1 godz.	2,5 godz.
	9478	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-
	9516	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+
A	szczepy zgorzeli gazowej	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
	szczepy zatruc pokarmowych	+	-	-	-	(+)	+	+	+	+	+	+
C*	szczepy niemieckie	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+

\* Sterne i Warrack (24) zaszeregowują szczepów danego typu F do podtypu typu C.  
 Obyaśnienia: + większość szczepów wytwarza  
 + lub - pewne szczepów wytwarzają  
 (+) nieliczne szczepów wytwarzają  
 - żaden szczep nie wytwarza

Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono różnice jakościowe w kompleksie antygenów toksycznych pomiędzy szczepem nr 9478 i nr 9516. Szczep nr 9516 zespołem posiadanych antygenów toksycznych, wybitną termorezystencją oraz słabą zjadliwością dla świnek morskich odpowiada najbardziej szczepom zatruc pokarmowych typu A. Pewne jednak właściwości, takie jak: brak wytwarzania toksyny kappa, toksyny teta i wybitna wytrzymałość na ogrzewanie, zbliżają ten szczep do szczepów typu F. Od szczepów typu F różni się on zasadniczo tylko brakiem toksyny beta. Brooks i wsp. (2) donoszą jednak, że wśród szczepów typu F znajdowano pewien odsetek (ok. 15%) szczepów nie produkujących tej toksyny. Drugi z badanych szczepów, na podstawie próby biologicznej na świnkach morskich i myszkach, jak i kompletu posiadanych antygenów toksycznych, zaszeregowano bez trudu do typu A grupy zgorzeli gazowej.

Jak wynika z pracy, izolacja drobnoustrojów z grupy Clostridium perfringens, a szczególnie szczepów termorezystentnych, zdaje się nie przedstawiać większych trudności przy zastosowaniu metodyki używanej przez autorów. Określanie natomiast przynależności typowej wyizolowanych szczepów Cl. perfringens stanowi bardzo znaczne trudności, szczególnie w przypadkach badania szczepów o zdegradowanych właściwościach. Wydaje się, że brak doniesień w literaturze krajowej na temat schorzeń beztlenowcowych przewodu pokarmowego zwierząt należy tłumaczyć nieprzygotowaniem laboratoriów weterynaryjnych do tego rodzaju badań, oraz trudnościami związanymi z izolacją i typowaniem zarazków beztlenowych z grupy Cl. perfringens.

Piśmiennictwo

1. Barnes D., Moon H.: Journ. Am. Vet. Med. Ass. 144, 1391 (1964).
2. Boulay P., Boulay G.: Rec. Med. Vet., 139, 223, (1963).
3. Brooks M.E., Sterne M., Warrack G.: Journ. Path. Bact., 74, 185, (1957).
4. Bullen J. J., Batty J.: Vet. Rec. 69, 1268, (1957).
5. Dieckmann C.: Brith. Med. Journ. 12, 270, (1949).

6. Egerton J. R., Walker P. D.: Jour. Path. Bact. 88, 275, (1964).
7. Ellner P. D.: Journ. Bact. 71, 495, (1956).
8. Griner L. A., Bracken F. K.: J. Amer. Vet. Med. Ass. 122, 99, (1953).
9. Hain E.: Brith. Med. Journ. 12, 271, (1949).
10. Hepple I.: Vet. Rec. 43, (1952).
11. Heinyngen Van W. E.: Bioch. Journ. 35, 1257, (1941).
12. Hoobs B. C. i współprac.: Journ. Hyg., 51, 75, (1953).
13. Jansen B. C.: Bull. Off. int. Epiz. 59, 1333, (1963).
14. Koch F. E.: Zbl. Bakt. Abt. I. Orig. 132, 358, (1934).
15. Lenkov V. I., i współprac.: Wietierinaria, 1, 15, (1965).
16. Meisel H., Albrycht H.: Med. dośw. i mikrob. VII, 27, (1955).
17. Meisel H.: Mikrobiologia lekarska VII, 64, (1951).
18. Nagler F. P.: Brit. Journ. Exp. Path., 20, 473, (1939).
19. Oakley C. L.: Brit. Med. Journ. 12, 269, (1949).
20. Parish W. E.: Journ. Comp. Path. 71, 394, (1961).
21. Parish W. E.: Journ. Comp. Path. 71, 337, (1961).
22. Pestl L.: Mag. allator. Lapja 18, 314, (1963).
23. Rafyi A., Ardahali M.: Bull. Off. int. Epiz. 59, 1283, (1963).
24. Sterne M., Warrack H.: Journ. Path. Bact. 88, 279, (1964).
25. Warrack G. H.: Bull. Off. int. Epiz. 59, 1393, (1963).
26. Willis A. T., Gowland G.: Journ. Path. Bact. 83, 219, (1962).
27. Zeissler J., Rassfeld-Sternberg L.: Brit. Med. Journ. 12, 267, (1949).

Adres autora: lek. wet. Zygmunt Cygan, Lublin, ul. Męczenników Majdanka 42a.

Цыган З., Вавжкевич К. — Идентификация споровых анаэробов изолированных из кишечника падших кур.

Авторы изолировали из кишечника падших кур терморезистентные штаммы Clostridium perfringens. По результатам подробного анализа токсических антигенов идентифицировано один штамм как Cl. perfringens тип А группы газовой гангрены. Другой штамм по некоторым признакам (комплекс токсических антигенов, большая терморезистенция, слабая вируленция для морских свинок) оказался больше всего похож на Cl. perfringens тип А группа энтеротоксемии. Но некоторые свойства (отсутствие токсин „каппа” и „тета”, высокая терморезистенция) делают это похожим на Cl. perfringens тип F, от которого резко отличается только отсутствием токсина „beta”. Надо однако сказать, что в литературе известны штаммы типа F, у которых не установлено этого токсина.

Авторы приходят к выводу, что при применяемой ими технике изолирование бактерий Cl. perfringens (особенно терморезистентных штаммов) не представляется трудным. Зато идентификация полученных штаммов Cl. perfringens, особенно при деградации некоторых их свойств, бывает связана с большими трудностями.

Cygan Z., Wawrzkievicz K. — The identification of anaerobic spores isolated from the alimentary tract of dead poultry.

The authors isolated, from the alimentary tract of dead chickens, heat-resistant strains of Clostridium perfringens. On the basis of detailed analysis of toxic antigens of the strains isolated, one was identified as belonging to type A of the group gaseous gangrene. A second strain, a group of the toxic antigens with extreme thermoresistance and weak toxicity on guinea-pigs, was most similar to the variant of food poisoning type A. Certain properties, however, such as: absence of formation of Kapp's toxin, theta toxin, and extreme heat-resistance, made the strain similar to strain F. It was essentially different to strains of type F only in the absence of beta toxin. From the literature, it can be seen, however, that among strains of type F there is a certain proportion of strains where this toxin has not been found. As is shown in these investigations, the isolation of microorganism of the group Clostridium perfringens and especially the thermoresistant strains, appears to present no great difficulties when the authors' method is used. The determination of the types of the strains isolated of Clostridium perfringens is, however, very difficult, especially if the investigations concern strains with degraded properties.

Cygan Z., Wawrzkiwicz K. — **L'identification d'anaérobies sporulantes éliminées des voies digestives des volailles péries.**

Les auteurs éliminèrent des souches de *Clostridium perfringens* thermorésistantes des voies digestives de poules péries. L'analyse détaillée des antigènes toxiques des souches isolées démontra une souche du type A de l'œdème gazeux. Une deuxième souche répondait par l'ensemble des antigènes toxiques, la thermorésistance importante et la faible virulence envers les cobayes à la variante des intoxications alimentaires du type A, mais certaines particularités, comme le manque de la production de la toxine

alpha? (de Kapp?), beta et la résistance très marquée au chauffage rapprochait cette souche au type F. Elle se distinguait pourtant de ces souches par le manque de la toxine beta. La littérature démontre, qu'il existe un pourcent de souches du type F, chez lesquelles cette toxine n'a pas été constatée.

Les recherches démontrèrent que l'isolation de microorganismes du groupe *Clostridium perfringens*, et surtout des souches thermorésistantes ne semble pas présenter de grandes difficultés si on emploie la méthode appliquée par les auteurs. La typisation des souches isolées de *Clostridium perfringens* est cependant difficile, surtout quand on examine les souches aux particularités dégradée.

JERZY WIŚNIEWSKI\*

## Badania nad wzrostem przeciwciał zobojętniających po uodpornianiu bydła różnymi dawkami trójwalentnej szczepionki p/pryszczycowej

Z Laboratorium Wirusologii Zwierzęcej w Lonie  
Dyrektor: prof. dr FELIKS LUCAM

Odpowiedzią ustroju na wprowadzenie szczepionki p/pryszczycowej jest pojawienie się w surowicy przeciwciał zobojętniających. Ilościową ich ocenę określa się różnymi metodami w seroneutralizacji, a mianowicie: na świnkach morskich, na oseskach mysich (cyt. wg 11), na bydło (3), na hodowli nabłonka językowego (1, 4) na hodowli komórek nerkowych w teście barwnym (15, 16) oraz, od czasu wprowadzenia hodowli tkankowej, w jednowarstwowych hodowlach komórek nerkowych (6, 7, 8, 12, 13, 14, 18, 19).

Celem niniejszej pracy było ustalenie momentu pojawiania się przeciwciał zobojętniających w surowicy zwierząt uodpornionych oraz ilościowe określenie ich miana dla trzech typów wirusa, w okresie trzech tygodni od uodpornienia bydła przeciwpyszczycową szczepionką trójwalentną produkcji fancuskiej.

### Materiał i metody

**Zwierzęta.** Do doświadczenia użyto 18 sztuk bydła pochodzącego z departamentu Finistère, wolnego od pryszczycy, gdzie nie przeprowadza się szczepień przeciwpyszczycowych.

**Szczepionki.** Zwierzęta uodporniono trójwalentną przeciwpyszczycową szczepionką saponinową, pochodzącą z dwóch zakładów produkcyjnych. 10 ml dawka uodporniająca dla bydła zawierała po 0,3 g wirusa każdego typu, adsorbowanego na wodorotlenku glinu. Każdą serią szczepionki uodporniono 9 sztuk bydła, szczepiąc po 3 krowy dawkami 13, 4, i 1,2 ml szczepionki.

**Surowica.** Surowice pochodzące od zwierząt uodpornionych szczepionką Nr 1 badano 5-krotnie: pierwszy raz przed szczepieniem, a następnie w 3, 7, 14 i 21 dniu po szczepieniu. Surowice zwierząt uodpornionych szczepionką nr 2 ze względów technicznych badano 1 raz w 21 dni po podaniu szczepionki. Surowica po odwirowaniu była zamrożona, przed badaniem inaktywowana w 56° przez 30 minut, a następnie rozcieńczana w płynie odżywczym przy współczynniku rozcieńczenia 2.

\* Lek. wet. Jerzy Wiśniewski adiunkt Zakładu Pryszczycy Instytutu Weterynarii w Zduńskiej Woli przebywał na 6-miesięcznym stażu naukowym we Francji.

**Wirus.** Do odczynu seroneutralizacji użyto 3 typów wirusa pryszczycy O, A i C namnożonych w hodowli komórek nerkowych i przechowywanych w ampulkach w temp. 70°.

**Hodowla tkankowa.** Do badań użyto hodowli komórek nerki cielęcia, 4-7-dniowych, przygotowanych wg ogólnie przyjętych zasad. Płyn odżywczy stanowił hydrolizat kazeiny i roztwór Hanksa z dodatkiem 5-10% surowicy cielęcej i antybiotyków.

**Seroneutralizacja.** Mieszaniny wirus-surowica przygotowywano przez zmieszanie 1 ml badanych rozcieńczeń surowicy z równą objętością wirusa zawierającego ca 500 TCID<sub>50</sub>/ml. Mieszaniny te przetrzymywano 1 godz. w cieplarni w 37°, a następnie dawką 0,2 ml inokulowano hodowle używając po 5 probówek na każde rozcieńczenie. Wyniki odczytywano po 48-godz. przebywaniu probówek w aparacie rotacyjnym w cieplarni. Miana surowic obliczono przy użyciu metody 50% dawki neutralizującej wg wzoru Reeda i Muencha.

### Wyniki

#### Szczepionka nr 1.

1. Poziom przeciwciał w surowicy bydła przed szczepieniem.

Spośród badanych 9 surowic, u 3 zwierząt stwierdzono nieznaczną moc seroneutralizacji dla jednego z 3 typów wirusa nie przekraczającą 0,3 log. DN<sub>50</sub>. W pozostałych surowicach nie stwierdzono obecności przeciwciał zobojętniających, bądź jedynie ich ślady. Tak więc wszystkie zwierzęta okazały się w pełni wrażliwe na wirus pryszczycy.

2. Poziom przeciwciał w surowicy uodpornionego bydła w 3 dni po szczepieniu.

Już w 3 dni po szczepieniu w surowicy 5 zwierząt stwierdzono wzrost miana przeciwciał zobojętniających osiągający najwyższą wartość 0,64-0,66 log. DN<sub>50</sub> dla wirusa typu O. Należy zauważyć, że większość zwierząt wykazująca wzrost miana seroneutralizacji posiadała ślady przeciwciał już przed szczepieniem.

3. Poziom przeciwciał w surowicy uodpornionego bydła w 7 dni po szczepieniu.

W 7 dni po szczepieniu stwierdzono obecność przeciwciał dla 3 typów wirusa u wszystkich uodpornionych zwierząt. Jedynie w 1 surowicy pochodzącej od krowy uodpornionej najmniejszą dawką szczepionki brak było jeszcze przeciwciał dla wirusa typu A. Największe miana seroneutralizacji przekraczające niekiedy wartość 1 log. stwierdzano u zwierząt uod-