

Zórawski C., Karpiński T., Nikiel J. — **Investigations on the diagnosis of sheep tuberculosis.**

One thousand sheep were tested by the intradermal tuberculin comparative test carried out both on the ear and on the internal side of the thigh. All the animals originated from areas free from tuberculosis of cattle. The results of the tuberculin test obtained on the internal side of the thigh were more

marked and easier for interpretation than those on the ear. Out of 122 reacting sheep, 8 animals showed a specific reaction to mammalian tuberculin and remaining ones were recognized as infected by avian type of tubercle bacilli. Totaly, 28 strains of acid fast bacilli were isolated from slaughtered sheep. Three of them were classified as *M. bovis* and 24 as *M. avium*. One strain virulent for the guinea pig, rabbit and hen was defined as the mixed strain.

JERZY WIŚNIEWSKI, JANINA JANKOWSKA, TADEUSZ KOBUSIEWICZ,
STEFAN SZKILNIK, CZESŁAW BARANOWSKI

Określenie stopnia odporności u bydła na podstawie przeciwciał neutralizujących po zastosowaniu szczepionki przeciwpryszczycowej typu C wg Frenkla

Zakład Badania Pryszczycy Instytutu Weterynarii w Zduńskiej Woli
Kierownik: prof. dr T. KOBUSIEWICZ

Ocena właściwości uodporniających szczepionek pryszczycowych produkowanych przez Zakład Badania Pryszczycy w Zduńskiej Woli przeprowadzana jest na podstawie próby doświadczalnego zakażenia bydła oraz wyników odczynu seroneutralizacji.

O przydatności odczynu zobojętniającego w kontroli szczepionek przeciwpryszczycowych donosiło wielu autorów (1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 13, 15, 18, 19, 20, 21). Ostatnio Ruting i wsp. (17) wprowadzili ten odczyn do państwowej kontroli aktywności szczepionki dla bydła w NRD.

W przedstawionej pracy podajemy wyniki badania trwałości odporności dla wirusa typu C po zastosowaniu u bydła trójwalentnej szczepionki przeciwpryszczycowej przygotowanej z wirusa namnożonego w hodowli Frenkla

Materiał i metody

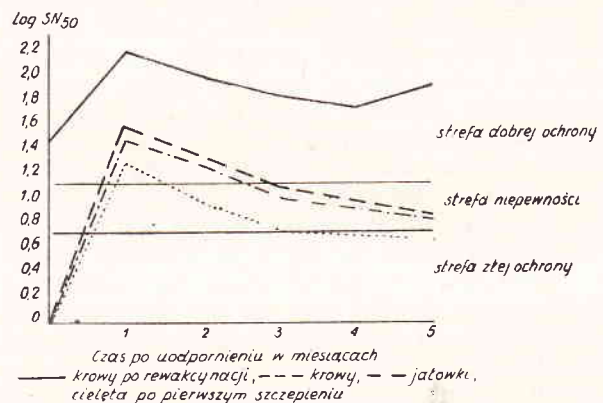
Zwierzęta. Uodpornienie bydła przeprowadzono w terenie. Grupa szczepionych zwierząt rasy ncb obejmowała 24 krowy, 20 jałówek 1—2-letnich oraz 8 cieląt w wieku 9—110 dni.

Szczepionka. Ze względu na kontakt z Zakładem zwierzęta uodporniono szczepionką trójwalentną ACO. Odporność kontrolowano tylko dla wirusa typu C. Szczepionka zawierała 6% ekstraktu wirusa z nabłonka języków z hodowli Frenkla o mianie $10^{7,15}/\text{ml}$, adsorbowanego na wodorotlenku glinu, z dodatkiem saponiny i formolu. Dawka monowalentna szczepionki wynosiła 5 ml.

Surowice. Próbkę krwi pobrano przed szczepieniem bydła oraz w 1, 2, 3, 4, i 5 miesięcy po uodpornieniu. Surowice po odwirowaniu przechowywano w stanie zamrożonym i inaktywowano przed odczynem w temperaturze 56°C przez 1/2 godziny. Rozcieńczenia wykonywano w płynie odżywczym Earla przy współczynniku 2.

Kontrola odporności. Odczyn zobojętniający wykonywano wg metody stosowanej przez Lucama i wsp. ze stałą dawką wirusa ($500 \text{ HKID}_{50}/\text{ml}$) i zmienną ilością surowicy. Z indywidualnych wartości mian obliczono średnią dla krow, jałowizny i cieląt przedstawiając je graficznie w postaci krzywej (ryc. 1). Kontrolę trwałości odporności prze-

Ryc. 1. Krzywa miana SN u szczepionego bydła



prowadzono po 4 i 5 miesiącach od uodpornienia, zakażając po 5 zwierząt uodpornionych i 2 kontrolne dawką $10\,000 \text{ IDB}_{50}$ hemologicznego wirusa. Po 7-dniowej obserwacji przeprowadzono ubój zwierząt, porównując stopień odporności na doświadczalne zakażenie z poziomem przeciwciał zobojętniających. Szczegółowe wyniki zmian chorobowych podano w tab. 2.

Wyniki

Odczyn seroneutralizacji wykonany z surowicami pobranymi przed szczepieniem wykazał całkowity brak przeciwciał zobojętniających u 49 zwierząt, co świadczy o ich pełnej wrażliwości na zakażenie wirusem pryszczycy. W przeciwieństwie do tych wyników u krow nr 9 i 14 stwierdzono wysoki poziom przeciwciał zobojętniających wynoszący $\geq 1,5$ i $1,4 \text{ log}$. W wywiadzie ustalono, że krowy te zostały kupione przed 43 miesiącami w innym gospodarstwie, w którym były poddane kilkakrotnie szczepieniu. Ponadto u cielęcia nr 9, pochodzącego od uodpornionej matki, miano SN wynosiło $0,37 \text{ log}$.

W próbkach krwi badanych w 1, 2, 3, 4 i 5 miesięcy po szczepieniu najwyższą zawar-

tość przeciwciał stwierdzono po upływie 1 miesiąca, w następnych stopniowy spadek mian. Średnia mian surowicy krów w poszczególnych miesiącach wynosiła kolejno: 1,55; 1,35; 1,06; 0,94; 0,84 log., jałówek 1,45; 1,36; 1,0; 0,93; 0,81 log. Szczegółowe wyniki badania odporności cieląt z uwzględnieniem wieku przedstawia tab. 1. Ilość przeciwciał w surowicy cieląt była mniejsza jak u bydła dorosłego. Obecność ich stwierdzono jeszcze po upływie 5 miesięcy. Jedynie u cielęcia nr 9 szczepionego w wieku 88 dni przeciwciała bardzo szybko zanikały i po raz ostatni stwierdzone były po 2 miesiącach.

przeciwciał zobojętniających wynoszące 0,65 i 0,80 log. Szczegółowe wyniki doświadczalnego zakażenia przedstawia tab. 2.

Omówienie

Na podstawie ilości przeciwciał stwierdzonych w odczynie seroneutralizacji można wnioskować, że odporność u dorosłego bydła wynosiła około 3 miesięcy. Lucam i wsp. (8) ustalili na podstawie piśmiennictwa, że odporność u bydła szczepionego pierwszy raz trwa najczęściej 3, 4 lub 6 miesięcy, rzadko 5, 8, 9 lub 12 miesięcy, wyjątkowo dłużej. Badana

Tab. 1. Miana przeciwciał zobojętniających w surowicy szczepionych cieląt

Nr kółczyka	Wiek cieląt (dni)	Przed szczepieniem	Log SN ₅₀				
			Ilość miesięcy po uodpornieniu				
			1.	2.	3.	4.	5.
16	110	0	1,24	0,99	1,09	1,01	1,01
14	101	0	2,10	1,65	1,25	1,05	1,01
9	88	0,37	1,02	0,23	0	0	0
6	52	0	1,25	1,10	0,90	0,71	0,71
13	49	0	1,01	0,75	0,55	0,75	0,71
18	39	0	1,09	1,10	0,66	0,90	0,75
12	28	0	1,20	0,82	0,63	0,75	0,75
4	9	0	1,31	0,90	0,69	0,30	0,75

U krów szczepionych przed 43 miesiącami i ponownie rewakcyonowanych miana wzrosły do wartości 2,29 i 2,05 log i utrzymywały się przez 5 miesięcy na wysokim poziomie. Na podstawie średnich wartości SN obliczonych dla krów, jałówek i cieląt w poszczególnych miesiącach, wykreślono krzywą poziomu przeciwciał zobojętniających, z zaznaczeniem 3 stref: dobrej ochrony, niepewności i złej ochrony.

Badanie długości odporności wytworzonej przez szczepionkę przeprowadzone przy użyciu doświadczalnego zakażenia, po 4 i 5 miesiącach po uodpornieniu wykazało przełamanie odporności u 20% badanych jałówek. Zwierzęta te u których stwierdzono uogólniony proces chorobowy wykazały najniższe miano

przez nas szczepionka Frenkla ochroniła 80% zwierząt przed uogólnionym procesem chorobowym 4 i 5 miesięcy po szczepieniu.

Na uwagę zasługuje reakcja immunologiczna u szczepionych cieląt. Wszystkie cielęta odpowiedziały wytworzeniem swoistych przeciwciał zobojętniających, stwierdzonych jeszcze po 5 miesiącach. Wyjątek stanowiło cielę nr 9 zaszczepione w stanie odporności biernej pochodzenia matczynego, które zareagowało na szczepionkę znacznie słabiej w porównaniu do cieląt wrażliwych. Van Bekkum stwierdził, że nawet przy niskim poziomie odporności biernej cieląt nabytej z siarą, może dojść do zahamowania reakcji serologicznej w następstwie zneutralizowania wstrzykniętej szczepionki (1). Reakcja 9-dniowego cielęcia na

Tab. 2. Porównanie wyników doświadczalnego zakażenia z mianem przeciwciał zobojętniających

Nr zwierz.	Przed szczepieniem	Log SN ₅₀					Wyniki dośw. zakażenia
		Ilość miesięcy po uodpornieniu					
		1.	2.	3.	4.	5.	
1	0	1,54	0,90	0,83	0,85		+0000
2	0	1,0	1,43	0,90	0,70		+0000
3	0	1,54	1,43	1,43	1,20		00000
4	0	1,72	—	0,98	0,75		+0000
5	0	1,39	0,98	0,98	0,65		+++++
6	0	—	—	—	—	0,85	+0000
7	0	1,80	1,80	1,01	1,10	1,01	+0000
8	0	1,27	—	1,02	1,05	1,00	+0000
9	0	1,12	—	1,09	0,97	0,80	+++++
10	0	1,59	—	1,01	0,80	0,85	00000

Objaśnienie: 0 — brak zmian chorobowych, + — obecność zmian; pierwszy znak + przedstawia zmiany chorobowe na błonie śluzowej języka, następne objawy chorobowe na poszczególnych kończynach.

szczepionkę była tak silna jak cieląt 1—2 miesięcznych, co wyrażało się zarówno wysokością stwierdzonego miana jak i jego trwałością. Z wartości mian można sądzić, że cielęta były odporne około 1—2 miesięcy. Spostrzeżenie to jest zbieżne z obserwacjami wielu autorów, którzy stwierdzili słabszą zdolność uodparniania cieląt w porównaniu ze zwierzętami dorosłymi (1, 10, 16, 22). Muntiu (14) wykazał, że u cieląt 3—6 miesięcznych szczepionka przeciwpryszczycowa działa 10 razy słabiej jak u bydła dorosłego.

Stwierdzenie wysokiego miana serologicznego u 2 krów zakupionych przed 43 miesiącami w gospodarstwie w którym przeprowadzano corocznie szczepienie bydła przeciw pryszczycy potwierdza nasze przypuszczenie (24), że odporność u krów rewakcynowanych utrzymuje się znacznie dłużej niż 1 rok.

Porównując właściwości uodparniające badanej szczepionki ze szczepionką monowalentną Frenkla typu C kontrolowaną przed dwoma latami (23), która po 3,5 miesiącach ochroniła 100% uodpornionych zwierząt przed doświadczalnym zakażeniem przy wysokim mianie $SN > 1,51 \log$, stwierdza się, że obecnie badana szczepionka wykazała słabsze właściwości uodparniające. Można przypuszczać, że przyczyną krótszego okresu uodpornienia było poliwalentne szczepienie. Willems i Leunen (22), Geiger; Willems; Geiger i Beck (cyt. wg 16) oraz Röhrer (16) podają, że czas trwania odporności po szczepieniu bi- i trójwalentnym jest krótszy jak po szczepieniu monowalentnym. Stellman i wsp. (19) stwierdzili również niższe miano przeciwciał zobojętniających w surowicach bydła uodpornionego szczepionkami trójwalentnymi w porównaniu z mianem surowic zwierząt szczepionych monowalentnie. Nie jest też wykluczone, że słabsze właściwości uodparniające wynikały z różnic immunogennych badanej szczepionki.

Wnio ski

1. Trójwalentna szczepionka przeciwpryszczycowa ACO przygotowana z wirusa namnożonego w hodowli Frenkla, zastosowana w dawce po 5 ml na wartościowość, uodparniała dorosłe bydło przeciw wirusowi typu C na okres około 3 miesięcy.

2. W próbie doświadczalnego zakażenia wykonanej po 4 i 5 miesiącach po uodpornieniu, uogólniony proces chorobowy stwierdzono u 20% jałówek, które wykazały najniższe miano przeciwciał zobojętniających.

3. Niskie miano serologiczne stwierdzone w surowicy cieląt świadczy o słabszej reakcji immunologicznej młodego bydła na podaną szczepionkę.

4. Nawet w bardzo wczesnym okresie życia (9 dni) cielęta reagują na szczepionkę wytworzeniem przeciwciał odpornościowych.

5. Wysokie miano przeciwciał zobojętniających stwierdzone u krów szczepionych kilkakrotnie przed 43 miesiącami świadczy o trwałej, kilkuletniej odporności zwierząt.

Piśmiennictwo

1. Van Bekkum J.: Bull. Off. int. Epizoot. 54, 372, 1960.
2. Bercan A., Muntiu N., Dohotaru V., Tomescu A.: Bull. Off. int. Epizoot. 71, 381, 1969.
3. Boyadjev S., Anchev V., Cholakova R.: VetMed. Nauki, Sofia 8, 14, 1964.
4. Boyadjev S., Georgov P.: Science Vet., Sofia 7, 71, 1970.
5. Glusko B.: Veterinarija, Moskwa 11, 30, 1963.
6. Kobusiewicz T., Wiśniewski J., Szkilnik S., Baranowski C., Jankowska J., Łabecka W.: Medycyna Wet. 24, 339, 1968.
7. Lucam F., Fedida M., Dannacher G.: Rapport de la réunion du groupe de recherche du Comité Technique Permanent tenu à l'IFFA 28 septembre — 1 octobre 1965.
8. Lucam F., Fedida M., Dannacher G., Perraud J.: Bull. Off. int. Epizoot. 71, 463, 1969.
9. Maćkowiak C., Lang R., Fontaine J., Petermann H.: Ann. Inst. Pasteur 97, 571, 1959.
10. Maćkowiak C., Fontaine J., Lang R., Camand R., Petermann H.: Bull. Off. int. Epizoot. 57, 937, 1962.
11. Maćkowiak C., Lang R., Fontaine J., Camand R., Petermann H.: Rapport sur le Controle du vaccin anti-aphteux IFFA Lyon.
12. Maćkowiak C., Lang R., Fontaine J., Camand R., Petermann H.: Bull. Off. int. Epizoot. 53, 781, 1960.
13. Maupas Ph., Perraud J.: Bull. Off. int. Epizoot. 71, 509, 1969.
14. Muntiu N.: Referat wygłoszony na Międzynarodowych Obradach na temat walki z pryszczycą i pomorem świń. Bukareszt 9—15 grudnia 1968.
15. Pilz W., Beck W.: Monats. Tierheil. 14, 91, 1962.
16. Röhrer H.: Handbuch der Virusinfektionen bei Tieren, VEB Gustav Fischer Verlag Jena 1963.
17. Rütting E., Seils H., Weyhe D., Benndorf J.: Arch. exp. VetMed. 23, 827, 1969.
18. Santucci J., Amighi M., Gilbert H., Hessami M., Soulebot J., Monston M., Chafyi A.: Bull. Off. int. Epizoot. 63, 477, 1965.
19. Stellmann C., Bornarel P., Lang R., Terre J.: Recl. Md. vét. 144, 325, 1968.
20. Strobbe R., Leunen J., Mammerickx M.: Bull. Off. int. Epizoot. 65, 361, 1966.
21. Ubertini B., Nardelli L., Dal Prato A., Panina G., Santero G.: Bull. Off. int. Epizoot. 53, 1307, 1960.
22. Willems R., Leunen J.: Bull. Off. int. Epizoot. 49, 71, 1958.
23. Wiśniewski J., Jankowska J., Szkilnik S., Kobusiewicz T.: Medycyna Wet. 25, 152, 1969.
24. Wiśniewski J., Jankowska J., Baranowski C.: Medycyna Wet. 26, 151, 1970.

Adres autora: dr Jerzy Wiśniewski, Zduńska Wola, ul. Wodna 7.

Ви́сьневски Е., Янковска Я., Кобусевич Е., Шкильнич С., Барановски Ч. — **Определение на основани урoвня нейтрализирующих прoтивoтел в сыворoтке напряженности иммунитета у крупного рогатого скoта после вакцинации прoтив афтозной вакциной.**

Исследовали иммуногенные свойства вакцины серотипа С по Франкльо применяемой у крупного рогатого скота в качестве компонента трехвалентной противафтозной вакцины. Длительность иммунитета определяли на основании результатов экспериментального заражения животных и серо-нейтрализационного титра (С.Н.) на культуре клеток почек. Средний титр С.Н. в 1 месяц после вакцинации равнялся у коров 1,55, у телок 1,45 и у телят 1,27 лог.; в 3 месяца: 1,06, 1,01, и 0,72, а в 5 месяцев соответственно: 0,84, 0,81 и 0,71 лог. На основании урoвня прoтивoтел авторы считают что взрослый скот сохраняет иммунитет ок. 3 месяцев а телята — 1—2 месяца. После экспериментального заражения осуществленного в 4 и 5 месяцев после вакцинации утрату иммунитета установили у 20% исследованных животных (с титром С.Н. сыворoтки — 0,65 и 0,80 лог.). У телят вакцина вызвала появление прoтивoтел в очень ранний период жизни т.е. уже при прививке на 9 день после рождения.

Wiśniewski J., Jankowska J., Kobusiewicz T., Szkilnik S., Baranowski Cz. — **Determination of immunity in cattle after application of FMD vaccine type C acc. to Frenkl on the strenght of neutralization antibodies.**

There were examined immunogenic properties of FMD vaccine type C prepared acc. to Frenkl applied in cattle during trivalent vaccination. The duration of immunity was assayed on the basis of challenge and on the results of seroneutralization test in vitro. Mean values of SN after 1 month since vaccination we-

re in cattle, heifers and calves 1.55; 1.45 and 1.27 log; after 3 months 1.06; 1.01; 0.72 log; after 5 months 0.84 and 0.71 log, respectively. Taking into account the titres of antibodies one can think that adult cattle was immune about 3 months and calves from 1—2 months. After the challenge carried out after 4—5 months since vaccination there was found the breakdown of immunity in 20.0% of animals under study, whose serological titres were 0.65 and 0.80 log. In calves, even at the age of 9 days antibodies were formed after the application of the vaccine.

ANDRZEJ SKOCZEK, JERZY MIERZEJEWSKI

Puławy

Zastosowanie w diagnostyce mikrobiologicznej, sprzężonej z fluoresceiną, koziej immunosurowicy przeciw króliczym IgG do pośredniego odczynu immunofluorescencji (IF)

W dotychczasowej praktyce laboratoryjnej nie opracowano jednolitej metodyki nastawiania odczynu if. W tym celu, do wykrywania drobnoustrojów chorobotwórczych w mięsie i produktach spożywczych stosowano zarówno odczyn if pośredni (1, 2, 6), jak i bezpośredni (5, 7).

Bezpośredni odczyn if jest łatwiejszy w wykonaniu, a technika barwienia w porównaniu z pośrednim odczynem, krótsza. Jego ujemną cechą jest konieczność posiadania dla każdej grupy bakterii poliwalentnej lub monowalentnej surowicy do produkcji konjugat. Stanowi to podstawową trudność na drodze do wprowadzenia w praktyce laboratoryjnej bezpośredniego odczynu if.

Pośredni odczyn if jest trudniejszy w wykonaniu. Składa się on z dwóch etapów. Pierwszy etap polega na wiązaniu homologicznego, nieznakowanego przeciwciała z antygenem. Aby uzyskany kompleks antygen-przeciwciała można było wykazać, preparat poddaje się barwieniu czynnikiem gatunkowo swoistym dla przeciwciała związanego w kompleksie. W pośrednim odczynie if nieznakowane przeciwciała odgrywają więc podwójną rolę, występując w pierwszym etapie jako przeciwciała, w drugim jako antygen.

Wychodząc naprzeciw potrzebom laboratoriów rozpoznawczych Warszawska Wytwórnia Surowic i Szczepionek (WWSS) wyprodukowała preparat pod nazwą handlową: „Sprzężona z fluoresceiną kozia immunosurowica przeciw króliczym IgG”.

Według informacji WWSS sprzężona z fluoresceiną kozia immunosurowica przeciw króliczym IgG jest przydatna w pracach laboratoryjnych do wykrywania i identyfikacji antygenowej komponenty króliczych IgG przy pomocy pośredniego odczynu if. WWSS przewiduje możliwość stosowania preparatu do wykrywania w ogóle dowolnego antygeny reagującego z króliczą immunosurowicą przy pomocy pośredniego odczynu if.

Znajdujący się w handlu preparat zawiera po 1 ml sprzężonej z fluoresceiną zliofilizowanej immu-

nosurowicy. 1 mg białka związany jest z 5×10^{-3} mg fluoresceiny, 1 mg immunosurowicy reaguje z 0,5 mg antygeny (królicze IgG).

Okres ważności preparatu przy przechowywaniu w temp. 4°C wynosi 3 lata.

Celem sprawdzenia przydatności tego preparatu do diagnostyki mikrobiologicznej, nastawiono z jego użyciem pośredni odczyn if przy wykrywaniu następujących bakterii:

Salmonella typhimurium nr szczepu 675 (I. Wet. — Puławy)

Escherichia coli O111 nr szczepu 663 (I. Wet. — Puławy)

Proteus vulgaris OX₁₉ nr szczepu 281 (I. Wet. — Puławy)

Clostridium botulinum B nr szczepu 1162 (PZH — Warszawa).

Dobór antygenów bakteryjnych do badania oparto na tym, że z jednej strony mają one duże znaczenie w higienie produktów spożywczych, a z drugiej istnieją dla nich surowice diagnostyczne produkowane na królikach, ogólnie dostępne w handlu.

Jako materiału wyjściowego do badań użyto 24 godz. hodowli bulionowej tych bakterii.

Odczyn if nastawiono według ogólnie przyjętej metodyki (3, 5, 7). W pierwszym etapie odczynu preparaty traktowano swoistymi surowicami diagnostycznymi w mianie 1:10, produkcji Krakowskiej Wytwórni Surowic i Szczepionek:

surowicą aglutynującą dla antygeny *Salmonella* HM,

surowicą aglutynującą dla antygeny *E. coli* OK wieloważną, O111, O55, O26,

surowicą aglutynującą dla antygeny *Proteus vulgaris* OX₁₉,

surowicą aglutynującą dla antygeny *Clostridium botulinum* BO.

W drugim etapie nastawiania odczynu preparat traktowano sprzężoną z fluoresceiną, znakowaną kozią immunosurowicą przeciw króliczym IgG w mianie 1:4.

Jednocześnie wykonano preparat kontrolny, nakładając bezpośrednio na rozmaz znakowaną immunosurowicę z pominięciem pierwszego etapu odczynu.

Z przygotowanych w ten sposób preparatów wykonano zdjęcia mikroskopowe, wykorzystując w tym