

MARIA MONCIK, WOJCIECH KARCZEWSKI

Zależność pomiędzy mianem HI a odpornością u kurcząt szczepionych szczepionką L

Z Zakładu Higieny Weterynaryjnej w Kielcach

Z Zakładu Badania Chorób Drobiu Instytutu Weterynarii w Puławach

Ocenę odporności poszczepiennej w przypadku rzekomego pomoru drobiu (ND) przeprowadzać można zarówno bezpośrednio — metodą zakażenia kontrolnego zjadliwym wirusem ND (challenge), jak i pośrednio — metodami serologicznymi, określając poziom specyficznych przeciwciał (odczyn seroneutralizacji — SN, oraz odczyn hamowania hemaglutynacji — HI).

Chociaż zakażenie kontrolne najlepiej charakteryzuje stan odporności, to jednak wyniki jego zależą w znacznym stopniu od użytego szczepu zjadliwego, jego dawki i drogi wprowadzenia. Ocenę wyników tego zakażenia komplikuje również konieczność wyboru najwłaściwszego kryterium odporności. Najdawniej i najpowszechniej stosowane kryterium przeżywalności wydaje się być niewstarczające, ponieważ zakażenie zjadliwym wirusem ND ptaków słabo uodpornionych, mimo braku upadków czy nawet wyraźnych objawów chorobowych, może spowodować straty gospodarcze na skutek gorszych przyrostów czy spadku nieśności. Ważnym również problemem jest występowanie u takich ptaków okresowego nosicielstwa (i najczęściej również siewstwa) czynnika zakaźnego (4, 5). Inne stosowne głównie w pracach badawczych kryteria takie jak brak wirerii, odporność nabłonka dróg oddechowych na zakażenie, odporność poszczególnych narządów, czy wreszcie brak spadku nieśności mogą nie wykazywać korelacji (2).

Z metod serologicznych, odczyn SN wydaje się lepiej charakteryzować rzeczywistą odporność ptaków na zakażenie niż odczyn HI (1), jest jednak pracochłonny i kosztowny i z tego względu mało nadaje się do prób rutynowych. Ocena stopnia odporności ptaków w oparciu o odczyn HI, szczególnie po zastosowaniu szczepionek sporządzonych ze szczepów lentogenicznych, nie zawsze jest łatwa, ponieważ w licznych przypadkach ptaki, które po szczepieniu nie wytworzyły przeciwciał typu HI, mogą być odporne na zakażenie zjadliwym zarazkiem ND. Crowther (3) tłumaczy to zjawisko tym, że różne szczepy wirusa ND, niezależnie od ich wartości immunogennych, posiadają niejednakową zdolność stymulacji przeciwciał typu HI.

Z drugiej strony, odczyn HI jako prosty, szybki i tani, bywa jednak najczęściej stosowany do oceny stopnia odporności szczepionych ptaków. W naszych warunkach przyjmuje się

najczęściej miano 1:20 jako wyraz odporności specyficznej, natomiast obowiązująca dotąd instrukcja przewiduje miano 1:80 jako minimalne, gwarantujące brak wirusa ND po uboju w tuszkach.

Celem niniejszej pracy była próba porównania poziomu przeciwciał typu HI wytworzonych po zastosowaniu szczepionki „L” z odpornością na zakażenie kontrolne ocenianą w oparciu o różne kryteria.

Materiał i metody

Kurczęta — kurczęta krzyżówki Cornish × White Rock chowane były w fermie i żywione w ogólnie przyjęty dla brojlerów sposób. Wszystkie kurczęta, z wyjątkiem kontrolnych, zostały zaszczone szczepionką „L” w wieku 10 dni, w sposób podany w instrukcji szczepienia.

Zakażenie kontrolne — do zakażenia kontrolnego (challenge) używano zjadliwego szczepu „Radom” wirusa ND. Zakażenie przeprowadzano dotchawicowo, za pomocą strzykawki z cienkim wężykiem, w dawce 0,1 ml rozcieńczenia 10^{-8} (około $10^{2,7}$ EID₅₀).

Hamowanie hemaglutynacji — odczyn HI przeprowadzano wg metody „beta” używając 4 jednostek hemaglutynacyjnych antygeny.

Reizolacja wirusa — krew do reizolacji wirusa pobierano z żyły skrzydłowej w ilości 0,5 ml, mieszano z 3,8% roztworem cytrynianu sodu i pozostawiano na noc w chłodni. Po odłaniu osocza do pozostałych krwinek dodawano taką samą ilość płynu fizjologicznego. Tak przygotowana zawiesina krwinek stanowiła materiał do zakażenia zarodków.

Wymaz z tchawicy wykonywano przy pomocy wacika, który następnie wkładano do próbki zawierającej 1,0 ml płynu fizjologicznego i wstrząsano. Tak przygotowana zawiesina stanowiła materiał do zakażenia zarodków.

Każdym materiałem, po dodaniu antybiotyków w ilości 1000 jedn. penicyliny i 0,5 mg streptomycyny na 1 ml zawiesiny, zakażano po 3 dziewięciodniowe zarodki kurze w dawce po 0,2 ml. Zarodki zakażano do worka omocznowego wg ogólnie przyjętej metody. Czas obserwacji zarodków wynosił 4 dni. Obecność wirusa w płynie omocznowym wykrywano metodą aglutynacji szkieikowej.

Przebieg doświadczeń i wyniki

Doświadczenie przeprowadzono w pięciu etapach, z których każdy objął jedną grupę kurcząt.

grupa I — kurczęta w 16 dni po szczepieniu	— 25 sztuk
grupa II — kurczęta w 30 dni po szczepieniu	— 25 sztuk
grupa III — kurczęta w 44 dni po szczepieniu	— 25 sztuk
grupa IV — kurczęta w 60 dni po szczepieniu	— 25 sztuk
grupa V — kurczęta kontrolne nie szczepione	— 8 sztuk

Dla przeprowadzenia poszczególnych etapów doświadczenia kurczęta były w odpowiednim czasie

przywożone z fermy do laboratorium. Po przeprowadzeniu odczynu HI ptaki o jednakowych mianach umieszczano w oddzielnych klatkach, a następnie poddawano zakażeniu kontrolnemu. Dla oceny wyników zakażenia przyjęto następujące kryteria:

1. Upadki
2. Objawy kliniczne ze strony układu oddechowego
3. Obecność wirusa we krwi (wiremia)
4. Obecność wirusa w tchawicy
5. Miano HI wytworzone po zakażeniu wirusem zjadliwym.

Ptaki po zakażeniu obserwowano przez 10 dni. W 96 godzin po zakażeniu pobierano do badania wirusologicznego krew i wymazy z tchawicy. W 10 dni po zakażeniu przeprowadzano ponownie odczyn HI.

W I grupie kurcząt (16 dni po szczepieniu) log średniej geometrycznej mian HI przed zakażeniem wynosił -1,8. Po zakażeniu kontrolnym ptaki nie wykazywały żadnych klinicznych objawów chorobowych. W materiałach (wymaz z tchawicy oraz krew) pobranych w 96 godz. po zakażeniu nie udało się wykazać obecności wirusa ND. W 10 dni po zakażeniu log średniej geom. mian HI wynosił -2,0.

W II grupie kurcząt (30 dni po szczepieniu) log średniej geom. mian HI przed zakażeniem wynosił -1,1. Po zakażeniu kontrolnym 3 kurczęta wykazywały nieznaczną duszność, która ustąpiła dość szybko. W materiałach pobranych w 96 godz. po zakażeniu u 4 kurcząt stwierdzono obecność wirusa ND. W 10 dni po zakażeniu log średniej geom. mian HI wynosił -1,6.

W czasie pobierania z fermy kurcząt do III grupy (44 dni po szczepieniu) ptaki w stadzie wykazywały objawy hipowitaminozy D (niedowład kończyn, rozmiękczenie dziobów, wykrzywienie palców). Również kurczęta pobrane do badań laboratoryjnych wykazywały podobne objawy. W grupie tej log średniej geom. mian HI przed zakażeniem wynosił -1,0. Po zakażeniu kontrolnym 7 kurcząt wykazywało silną duszność, która jednak po paru dniach ustąpiła. W materiałach pobranych w 96 godz. po zakażeniu u 16 kurcząt stwierdzono obecność wirusa ND. W 10 dni po zakażeniu log średniej geom. mian HI wynosił -3,0.

Jednocześnie z pobraniem kurcząt do grupy III, pozostałe w fermie ptaki poddano leczeniu preparatami witaminowo-mineralnymi. Leczenie było w pełni skuteczne, tak że w czasie pobierania kurcząt do grupy IV (60 dni po szczepieniu) były one już w dobrej kondycji. W grupie tej log średniej geom. mian HI wynosił -0,8. Po zakażeniu kontrolnym objawy kliniczne nie wystąpiły. W materiałach pobranych w 96 godz. po zakażeniu u 10 kurcząt stwierdzono obecność wirusa ND. W 10 dni po zakażeniu log średniej geom. mian HI wynosił -3,0.

W V grupie kurcząt (kontrolne — nie szczepione) przeprowadzony odczyn HI dał wynik ujemny. W okresie 6 dni po zakażeniu kontrolnym padło 7 kurcząt. Jeden ptak przechorował. We krwi i wymazie z tchawicy tych kurcząt w 96 godz. po zakażeniu, jak również w narządach wewnętrznych kurcząt padłych, stwierdzono obecność wirusa ND.

Omówienie wyników

Doświadczenie przeprowadzono w taki sposób, aby warunki były jak najbardziej zbliżone do terenowych. Szczepienie przeprowadzono w fermie, a kurczęta były w tejże fermie odchowywane do chwili przeprowadzenia prób na odporność. Kurczęta zakażano zjadliwym szczepem wirusa ND dotchawicowo, ponieważ jest to droga, jaką najczęściej dochodzi do zakażenia w terenie.

Wyniki doświadczenia zebrano w tab. 1. Jak z niej wynika poszczepienne miana HI były najwyższe w grupie I (16 dni po szczepieniu), następnie spadały dość szybko w ciągu następujących dwóch tygodni. Dalszy spadek był znacznie powolniejszy i dość równomierny (ryc. 1). Jednakże miana HI pojedynczych ptaków w poszczególnych grupach różniły się znacznie i wahały się od ilości niewykrywalnych (poniżej 1:5) do 1:160.

Wyniki zakażenia kontrolnego kształtowały się rozmaicie w zależności od przyjętego kryterium. I tak żadne z badanych kurcząt szczepionych nie padło, mimo że u 8% nie stwierdzono przeciwciał typu HI (miana niższe niż 1:5), a 20% wykazywało miana jedynie 1:5. Natomiast z 8 kurcząt kontrolnych (nie szczepionych), u których nie stwierdzono przeciwciał typu HI (miana niższe od 1:5), siedem padło z wyraźnymi objawami ND.

Objawów ze strony układu oddechowego nie obserwowano u ptaków grupy I, nieznaczne objawy wystąpiły u ptaków grupy II, natomiast nasilone u ptaków grupy III, u których stwierdzono hipowitaminozę D. U ptaków ostatniej grupy nie stwierdzono objawów chorobowych.

Wiremii nie stwierdzono u żadnego z ptaków, których poszczepienne miano HI wynosiło 1:20

Tab. 1.

Grupa	Dni po szczepieniu	Poszczepienne miana HI																								Objawy kliniczne	Log średniej geometrycznej poszczepiennych mian HI											
		poniżej 1:5					1:5					1:10					1:20					1:40						1:80					1:160					
		a	b	c	d	e	a	b	c	d	e	a	b	c	d	e	a	b	c	d	e	a	b	c	d			e	a	b	c	d	e	a	b	c	d	e
I	16	0	—	—	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	(-)	1,8			
II	30	1	0	1/100	1/100	2	1	7	0	1/14	2/28	0	0	0	0	1/16	0	1/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	(+)	1,1			
III*	44	0	—	—	7	0	5/71	6/85	22	9	0	1/11	5/55	22	7	0	0	4/59	1,8	2	0	0	1/50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	(##)	1,0				
IV	60	7	0	3/13	4/59	27	5	0	1/20	3/60	23	6	0	0	2/33	1,9	5	0	0	1/20	1,7	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	(-)	0,8					
V	nie szczepione	8	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	(###)	(-)					

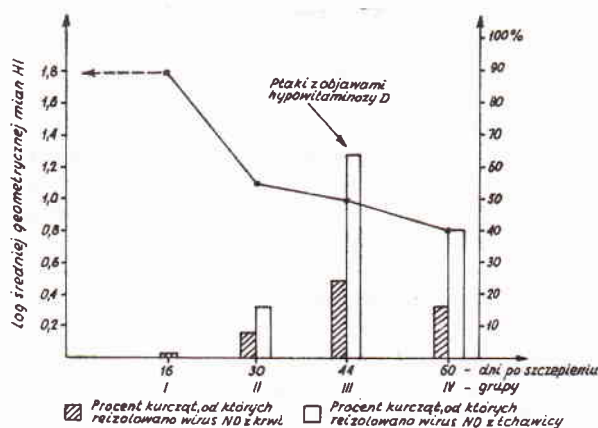
Objaśnienia: a = ilość ptaków w grupie o danym mianie HI; b = ilość ptaków padłych po zakażeniu; c =

$$c = \frac{\text{ilość ptaków od których reizolowano wirusa ND z krwi}}{\text{procent}}$$

$$d = \frac{\text{ilość ptaków od których reizolowano wirusa ND z tchawicy}}{\text{procent}}$$

e = różnica log średniej geometrycznej mian HI po i przed zakażeniem; *) = ptaki z objawami hipowitaminozy D.

lub wyżej. Jednakże u ptaków o niższych mianach wirus nie występowała regularnie. I tak np. wśród ptaków o mianie poszczepiennym 1:5 w grupie I nie stwierdzono wirusii, w grupie II wirusii wystąpiła u 14% kurcząt, w grupie III — aż u 71%, natomiast w grupie IV — znów tylko u 20%.



Ryc. 1.

Obecność wirusa ND w tchawicy stwierdzono znacznie częściej niż wirusii. Wirusa w tchawicy nie stwierdzono u żadnego kurczęcia o poszczepiennym mianie HI wynoszącym 1:80 lub więcej. Natomiast u ptaków o mianach niższych, podobnie jak w przypadku wirusii, wirus w tchawicy występował nieregularnie. I tak np. wśród ptaków o mianie poszczepiennym 1:20 w grupie I i II nie udało się reizolować z tchawicy zjadliwego wirusa, w grupie III reizolowano wirus u 59% ptaków, a w grupie IV u 20%.

Zwraca uwagę fakt najczęstszego występowania wirusa we krwi i tchawicy u kurcząt grupy III. Być może ma to związek z hipowitaminozą D, jaką stwierdzono u tych ptaków.

Miania HI w 10 dni po zakażeniu z reguły były wyższe u tych ptaków, od których reizolowano zjadliwy wirus z krwi lub tchawicy. Zależność ta występowała jeszcze wyraźniej, jeśli się weźmie pod uwagę różnicę pomiędzy mianem stwierdzonym w 10 dni po zakażeniu, a mianem poszczepiennym (przed zakażeniem). Różnica logarytmów średnich geometrycznych mian po i przed zakażeniem wśród podgrup ptaków, od których nie udało się reizolować wirusa w ogóle, nie przekroczyła w żadnym przypadku 1,0. Natomiast wśród podgrup, z których reizolowano wirus, różnica ta wahała się z reguły od 1,7 do 2,7. Jedynie w 3 podgrupach (grupa II — kurczęta o mianach 1:5 i 1:10, oraz grupa III — kurczęta o mianach 1:40) różnica ta była mniejsza niż 1,0. Jednakże we wszystkich tych trzech przypadkach różnice te wśród poszczególnych kurcząt, od których nie reizolowano wirusa były poniżej 1,0 (0,1; 0,5

i 0,6), natomiast wśród kurcząt — nosicieli zarazka, powyżej 1,0 (2,1; 1,5 i 1,2).

Reasumując, przeprowadzone badania nie wykazały wyraźnej zależności pomiędzy poziomem przeciwciał poszczepiennych typu HI, a odpornością na zakażenie. Wprawdzie ptaki posiadające miana HI 1:80 lub wyższe okazały się odporne na zakażenie kontrolne, nawet przy przyjęciu najostrzejszego kryterium (nosicielstwo wirusa zjadliwego w tchawicy) i w tym zakresie potwierdził się wymóg wspomnianej we wstępie instrukcji, jednakże wiele ptaków o znacznie niższych mianach wykazało również pełną odporność na zakażenie kontrolne, bez względu na przyjęte kryterium.

Analiza uzyskanych wyników zdaje się wskazywać, że odporność zależy również w znacznej mierze od stanu zdrowia ptaków. W przedstawionym doświadczeniu wirus reizolowano najczęściej z krwi i tchawicy (odpowiednio: 24% i 64%) od kurcząt grupy III, które chorowały z objawami hipowitaminozy D. Natomiast procent reizolacji wirusa z ptaków grupy IV, nie wykazujących już objawów hipowitaminozy był znacznie mniejszy (odpowiednio: 16% i 40%), mimo że średnia geom. mian HI w tej grupie była nawet nieznacznie niższa (ryc. 1).

Jak wynika z przedstawionego doświadczenia ocena stopnia odporności w oparciu o poziom przeciwciał poszczepiennych typu HI, szczególnie w wypadku niskich mian (poniżej 1:80) wydaje się być niewystarczająca. Zakażenie kontrolne, przy przyjęciu za kryterium jedynie samych upadków, jest próbą zbyt mało czułą. Nie wyklucza ona możliwości przechorowań (nawet bez wyraźnych objawów klinicznych), a co najważniejsze nie wyklucza okresowego nosicielstwa, a więc i siewstwa.

Kryterium wirusii lub obecności wirusa w tchawicy wydaje się znacznie dokładniej określać stan odporności ptaków, jednakże wykonanie prób reizolacji wirusa jest dość kłopotliwe, wymaga odpowiednich pracowni i zajmuje dużo czasu.

Znacznie prostsze byłoby porównanie mian HI przed i po zakażeniu kurcząt wirusem zjadliwym. Wyniki uzyskane w przedstawionym doświadczeniu wskazują na taką możliwość, jednakże szersze zastosowanie tej metody wymaga jeszcze dalszych badań.

W n i o s k i

1. Poziom przeciwciał typu HI po szczepieniu szczepionką „L”, szczególnie w przypadku niskich mian (poniżej 1:80), nie jest wystarczającym kryterium odporności kurcząt przeciwko ND.

2. Odporność przeciwko ND kurcząt o takich samych mianach HI zależy prawdopodobnie również od ich kondycji (np. poziomu witamin).

3. Wydaje się, że dobrą ocenę odporności kurczątków na zakażenie wirusem ND można uzyskać z różnicy mian HI po i przed zakażeniem kontrolnym.

Piśmiennictwo

1. Atanasiu P., Gareau G.: *Annls Inst. Pasteur* 80, 674, 1951.
2. Bankowski R. A., Corstvet R., Fabricant J.: *Avian Dis.* 2, 466, 1958.
3. Marek K., Borzemska W.: *Medycyna Wet.* 23, 266, 1967.
4. Marek K., Borzemska W., Gołnik W.: *Medycyna Wet.* 23, 351, 1967.

Adres autora: lek. wet. Maria Moncik, 26-025 Dyminy 160, pow. Kielce.

Мончик М., Карчевски В. — Взаимосвязь между титром реакции задержки гемоглютинации и иммунитетом у цыплят привитых вакциной L.

Цыплята привитые вакциной L в возрасте 10 дней исследовали на 16, 30, 44 и 60 день после вакцинации определяя уровень титра HI и заражая их интратрахеально вирулентным штаммом вируса ND. У зараженных птиц отмечали падеж, клинические симптомы, присутствие вируса в крови и в трахеи в 96 часов после заражения, а также уровень титра HI в 10 дней после заражения. Ни одно из исследованных цыплят не пало после контрольного заражения. У цыплят у которых по-

сле вакцинальные титры HI равнялись 1:80 или выше не наблюдали клинических симптомов заболевания и не удалось изолировать вирус из крови и из трахеи. У цыплят с меньшим титром не установили корреляции между уровнем титра HI а появлением клинических симптомов заболевания или реизоляцией вируса. Установили корреляцию между разницей титров HI до и после контрольного заражения а реизоляцией вируса: чем выше была эта разница тем чаще удавалось реизолировать вирус из цыплят.

Moncik W., Karczewski W. — The correlation between the level of HI and immunity in chickens vaccinated with L vaccine.

The chickens vaccinated with „L” vaccine at the age of 10 days were examined after 16, 30, 44 and 60 days. The chicks after HI determination were challenged intratracheally. In the infected birds there were noticed deaths, clinical symptoms, the presence of virus in the blood and trachea after 96 hours since infection, and the level of antibodies after 10 days post infection. None of the chickens died following the challenge. In the chickens with titer of 1:80 or higher there were observed neither clinical symptoms nor the presence of virus. But there was found the correlation between HI titer and reisolation of virus (the lower titer the more frequent reisolation of virus was positive).

BOLESŁAW PAWLIK

Występowanie przeciwciał anti-*Aspergillus fumigatus* w surowicach zwierzęcych

Z Zakładu Mykologii Instytutu Mikrobiologii AM w Krakowie

Poznanie zjawisk immunologicznych towarzyszących zakażeniu grzybami z rodzaju *Aspergillus*, szczególnie wykrywanie obecności swoistych przeciwciał odczynami serologicznymi zyskuje ostatnio coraz większe znaczenie w rozpoznawaniu różnych postaci grzybiczy kropidłakowej.

W zakresie badań serologicznych podejmowane były próby przystosowania różnych odczynów do wykrywania przeciwciał anti-*Aspergillus* (1, 2, 5, 7, 8, 11, 13, 14, 16). Z ważniejszych, które znalazły zastosowanie praktyczne w diagnostyce wymienić należy; odczyn precypitacji w żelu (4, 11) oraz odczyn flokulacji (5, 6).

Odczyny serologiczne jak do tej pory nie znalazły zbyt szerokiego zastosowania w weterynarii. Niemniej jednak badania Thurstona i wsp. (15) wskazują na pewną przydatność wykrywania precypityn anti-*Aspergillus* w rozpoznawaniu przyczyn ronienia u owiec.

W pracy postanowiono przy zastosowaniu odczynu flokulacyjnego określić częstość występowania oraz poziom przeciwciał anti-*Aspergillus* w surowicach niektórych gatunków zwierząt.

Badania te miały na celu wyjaśnienie zagadnień dotyczących odpowiedzi immunologicznej organizmu zdrowych zwierząt na działanie grzybów z rodzaju *Aspergillus* szeroko rozpowszechnionych w przyrodzie.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na materiale obejmującym surowice zwierzęce:

- I grupa — 166 surowic od bydła,
- II grupa — 62 surowice od koni,
- III grupa — 100 surowic od ptaków — kury.

Wszystkie zwierzęta objęte badaniami były zdrowe i pochodziły z terenu województwa krakowskiego. Surowice bydłowe i końskie zostały udostępnione do badań przez Zakład Higieny Weterynaryjnej w Krakowie*), natomiast surowice ptaków przez Zakład Drobiarski w N.

Częstość występowania oraz poziom przeciwciał anti-*Aspergillus* wykrywano przy pomocy dwóch odczynów serologicznych: odczynu flokulacyjnego z antygenem *A. fumigatus* (OF-*A. fumigatus*) oraz odczynu precypitacji w żelu agarowym z antygenem *A. fumigatus* (OPŻ-*A. fumigatus*).

*) Za udostępnienie materiału dziękuję dr N. Notopulosowi z ZHW w Krakowie.