

ANTONI SCHOLLENBERGER

Dowymieniowe uodpornianie krów chorobotwórczymi dla cieląt szczepami *Escherichia coli*

Z Instytutu Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych Wydziału Weterynaryjnego SGGW-AR w Warszawie

Wykazana przed pięćdziesięciu laty możliwość pobudzenia miejscowego wytwarzania przeciwciał w gruczole mlecznym krowy (11), nasunęła myśl o wykorzystaniu tego zjawiska dla łatwego otrzymywania dużych ilości specyficznych przeciwciał (12). Doustne podawanie cielętom lub prosiętom mleka uodpornionych dowymieniowo krów może działać zapobiegawczo oraz leczniczo w przebiegu infekcji jelitowych. Szczególna wartość tego rodzaju postępowania ma polegać na tym, że mleko takie zawiera znaczne ilości przeciwciał należących do wydzielniczych IgA. Immunoglobuliny tej klasy, dzięki swej oporności na enzymy trawienne, wykazują dłuższą niż inne immunoglobuliny aktywność w przewodzie pokarmowym (10). Celem podjętej pracy była ocena immunogenności wybranych chorobotwórczych dla cieląt serotypów *E. coli* oraz określenie mian i dynamiki tworzenia przeciwciał siary i mleka przy dostrzykowej drodze uodporniania.

Material i metody

Badania przeprowadzono na 10 krowach rasy nizinnej czarnobiałej w wieku od 2 do 5 lat. Do uodporniania użyto wyizolowanych od cieląt szczepów *E. coli*: 08:K87, K88; 09:K9:H12 oraz 078:K80, otrzymanych ze Specjalistycznego Ośrodka Kolekcji Drobnoustrojów Zakładu Mikrobiologii Instytutu Weterynarii w Puławach. Ze szczepów tych sporządzono formolizowane szczepionki według opisu podanego przez Wilsona i Svendsena (13). Uodpornianie przeprowadzono dwukrotnie: na dwa tygodnie i na tydzień przed spodziewanym porodem, podając dostrzykowo za pierwszym razem 5 ml a za drugim 10 ml szczepionki. U wszystkich krów prawą przednią ćwiartkę wymienia uodporniano szczepem 08, lewą przednią szczepem 09 a prawą tylną szczepem 078. Do lewej tylnej ćwiartki wymienia nie podawano żadnej szczepionki.

W czasie pierwszych 24 godzin po porodzie pobierano z każdej ćwiartki wymienia siarę a następnie po trzech dniach, tygodniu i co tydzień do czwartego tygodnia mleko. Siarę i mleko odwirowywano przy 3000 g a następnie usuwano kazeinę wirowaniem przy 44 000 g w temperaturze 4°C przez 2 godziny (Ultra-centrifuge Vac 601, H. Janetzki, NRD), (2). Próby do badań serologicznych przechowywano w temperaturze -20°C. Po rozmrożeniu próby inaktywowano w temperaturze 56°C w ciągu 30 minut, a następnie wysycano naturalnie występujące w mleku hemolizyny. W tym celu do 2 ml siary lub mleka dodawano 0,1 ml przemytych krwinek czerwonych barana, mieszano i pozostawiano na 3 godziny w temperaturze pokojowej. Po odwirowaniu dodawano 0,2 ml krwinek, które odwirowywano po 18 godzinach inkubacji w temperaturze 4°C.

Poziom przeciwciał w siarze i mleku oznaczano metodą hemaglutynacji biernej. Antygeny somatyczne użyte do oplaszczania krwinek czerwonych barana otrzymywano przez ogrzewanie zawiesiny bakterii w temperaturze 100°C w ciągu jednej godziny. Oplaszczanie uprzednio formolizowanych krwinek przeprowadzano według metody opisanej przez Herberta (3). Hemaglutynację wykonywano na płytach pleksiglasowych, rozcieńczając próby w objętości 0,025 ml przy pomocy ez Takatsy'ego (Takatsy microtitrator, Labor, Węgry). W każdej próbie określano poziom przeciwciał w stosunku do wszystkich użytych do uodporniania szczepów bakteryjnych.

Wyniki

Uzyskane wyniki przedstawiono w tab. 1 i 2. Najwyższy poziom przeciwciał w stosunku do poszczególnych szczepów *E. coli* stwierdzano w siarze, pochodzącej z ćwiartek wymienia uodpornionych tymi szczepami w okresie zasuszania. Miano przeciwciał przeciwko homologicznemu szczepowi było dwu lub czterokrotnie wyższe od miana przeciwciał przeciwko pozostałym serotypom. W siarze pochodzącej z nieuodpornianej ćwiartki wymienia stwierdzano wysokie miana przeciwciał prze-

Tab. 1. Miano przeciwciał w siarze i mleku 10 krów uodpornionych dowymieniowo (wartość modalna oraz wartość najniższa i najwyższa)

Ćwiartka wymienia/ szczep, którym uodporniano	Dzień po porodzie			3 dni po porodzie			Tydzień po porodzie		
	Miano hemaglutynacyjne z krwinkami oplaszczonymi antygenem								
	08	09	078	08	09	078	08	09	078
Prawa przednia/08	1:1024 (1:512- 1:1024)	1:256 (1:64- 1:256)	1:256 (1:64- 1:512)	1:256 (1:256- 1:512)	1:32 (1:32- 1:64)	1:128 (1:64- 1:128)	1:128 (1:32- 1:128)	1:16 (1:8- 1:64)	1:32 (1:16- 1:64)
Lewa przednia/09	1:256 (1:64- 1:256)	1:2048 (1:1024- 1:2048)	1:512 (1:64- 1:512)	1:64 (1:32- 1:64)	1:256 (1:128- 1:512)	1:64 (1:32- 1:128)	1:16 (1:16- 1:64)	1:256 (1:164- 1:512)	1:64 (1:16- 1:64)
Prawa tylna/078	1:512 (1:256- 1:1024)	1:256 (1:64- 1:256)	1:2048 (1:512- 1:2048)	1:128 (1:64- 1:256)	1:64 (1:32- 1:128)	1:256 (1:256- 1:512)	1:8 (1:8- 1:32)	1:32 (1:8- 1:64)	1:128 (1:64- 1:256)
Lewa tylna- nieuodporniona	1:512 (1:128- 1:512)	1:512 (1:128- 1:512)	1:512 (1:256- 1:1024)	1:64 (1:16- 1:64)	1:32 (1:16- 1:32)	1:64 (1:16- 1:128)	1:32 (1:8- 1:32)	1:16 (1:8- 1:32)	1:16 (1:8- 1:32)

ciwko wszystkim użytym do uodporniania serotypom. Poziom tych przeciwciał był jednak w każdym przypadku niższy niż stwierdzany w uodpornianych ćwiartkach. W tydzień po porodzie poziom przeciwciał w mleku uodpornianych ćwiartek był 5—8 krotnie wyższy niż w mleku ćwiartki nieuodpornianej. W trzecim tygodniu po porodzie miano przeciwciał w mleku z nieuodpornianej ćwiartki było 30 krotnie mniejsze niż w siarze z tej samej ćwiartki. Spadek miana w uodpornianych ćwiartkach wymienia był różny w stosunku do poszczególnych szczepów. W przypadku szczepu 08 był około 10 krotny a w stosunku do szczepów 09 i 078 około 30 krotny.

Obecność przeciwciał w siarze i mleku nieuodpornianej ćwiartki wskazuje jednak na to, że pobudzenie antygenowe nie ograniczało się jedynie do stymulacji miejscowej. Dowymieniowe podanie szczepionki wywołuje bowiem również pojawienie się, przewyższających zwykle poziom przeciwciał w mleku, wysokich mian w surowicy (7). Wskazuje to na przedostawanie się antygenów szczepionkowych do innych poza gruczołem mlecznym miejsc wytwarzania przeciwciał, bądź na migrację pobudzonych komórek limfoidalnych. We wstępie, na podstawie wyników uzyskanych przez Portera (8), podkreślono szczególną wartość wydzielniczych IgA w odporności jelito-

Tab. 2. Miano przeciwciał w siarze i mleku 10 krów uodpornionych dowymieniowo (wartość modalna oraz wartość najniższa i najwyższa)

Ćwiartka wymienia/ szczep, którym uodporniano	2 tygodnie po porodzie			3 tygodnie po porodzie			4 tygodnie po porodzie		
	Miano hemaglutynacyjne z krwinkami opłaszczonymi antygenem								
	08	09	078	08	09	078	08	09	078
Prawa przednia /08	1:128 (1:64- 1:512)	1:16 (1:4- 1:64)	1:16 (1:4- 1:64)	1:128 (1:32- 1:128)	1:32 (1:8- 1:64)	1:16 (1:8- 1:64)	1:128 (1:64- 1:256)	1:32 (1:16- 1:64)	1:16 (1:8- 1:32)
Lewa przednia /09	1:16 (1:16- 1:64)	1:64 (1:32- 1:128)	1:32 (1:8- 1:32)	1:16 (1:8- 1:32)	1:64 (1:32- 1:128)	1:16 (1:8- 1:32)	1:16 (1:8- 1:32)	1:64 (1:16- 1:64)	1:8 (1:8- 1:16)
Prawa tylna /078	1:32 (1:16- 1:32)	1:16 (1:16- 1:32)	1:128 (1:64- 1:128)	1:32 (1:16- 1:32)	1:16 (1:16- 1:32)	1:64 (1:32- 1:128)	1:32 (1:16- 1:32)	1:4 (1:4- 1:16)	1:64 (1:8- 1:64)
Lewa tylna nieuodporniona	1:32 (1:8- 1:32)	1:16 (1:4- 1:16)	1:16 (1:4- 1:16)	1:16 (1:8- 1:32)	1:32 (1:8- 1:32)	1:16 (1:8- 1:16)	1:16 (1:4- 1:16)	1:16 (1:8- 1:16)	1:16 (1:8- 1:32)

Omówienie wyników

Odmienne niż u innych gatunków zwierząt, w siarze krów wydzielnicze IgA stanowią tylko 2% wszystkich immunoglobulin (1). Ponadto w ciągu trzech pierwszych dni laktacji spada poziom immunoglobulin wszystkich klas w siarze, wskutek czego mleko zawiera niewielką ilość globulin odpornościowych. Uważa się, że niski poziom immunoglobulin wydzielniczych w mleku sprawia, iż nie może ono odgrywać roli w miejscowej odporności jelit cielęcia (8). Z prac Wilsona i wsp. (12, 14) wynika jednak, że dowymieniowe podanie w okresie zasuszania formolizowanej zawiesiny *E. coli* nie wpływając wprawdzie na poziom IgA w siarze, znaczenie zwiększa ich ilość w mleku. Podwyższony poziom immunoglobulin w mleku uodpornionych ćwiartek utrzymuje się jeszcze do 28 dnia po porodzie.

Wyniki naszych doświadczeń również zdają się przemawiać za miejscową syntezą części przeciwciał stwierdzanych w siarze i mleku. Najwyższy poziom przeciwciał w stosunku do każdego użytego szczepu stwierdzano bowiem w siarze i mleku, pochodzącym z ćwiartki wymienia uodpornianej tym szczepem. Źródłem tych przeciwciał są prawdopodobnie komórki limfoidalne, pojawiające się w okresie zasuszenia w tkance gruczołowej wymienia (5).

wej u cieląt. Z przeprowadzonych przez niego badań wynika bowiem, że znaczna część przeciwciał siary przeciwko *E. coli* jest reprezentowana przez globuliny tej klasy.

Odmienne poglądy przedstawili ostatnio Logan i wsp. (6), którym nie udało się wykazać aktywności siarowych IgA w stosunku *E. coli*. Nie podważa to jednak idei uodporniania dowymieniowego, ponieważ stymuluje ono miejscowe wytwarzanie przeciwciał w obrębie wszystkich klas immunoglobulin. Wykazywane przez nas w odczynie hemaglutynacji biernej przeciwciała przeciwko *E. coli* należą do klasy IgG i IgM, gdyż immunoglobuliny klasy A nie powodują aglutynacji. W piśmiennictwie spotyka się rozbieżne poglądy na temat wpływu dowymieniowego uodporniania krów na częstość występowania infekcji jelitowych u cieląt. Kurek w swej obszernej pracy na temat odporności diatelicznej u krów (4) podaje, że dzięki zastosowaniu takiej szczepionki uzyskano spadek śmiertelności cieląt z powodu kolibakteriozy z 24,48% do 1,15%. Z drugiej jednak strony inni autorzy (9) nie stwierdzali korzystniejszych efektów po dostrzykowym podaniu szczepionki niż po uodpornianiu podskórnym. Pewną wadą dowymieniowej drogi uodporniania jest łatwość zakażenia gruczołu mlecznego w czasie podawania szczepionki. W naszym doświadczeniu, mimo zachowania

koniecznej ostrożności na 10 uodpornianych krów w trzech przypadkach wystąpiły stany zapalne pojedynczych ćwiartek wymienia. Nie zaobserwowano natomiast ujemnego wpływu uodporniania na ilość mleka wydzielanego z uodpornianych ćwiartek.

Piśmiennictwo

1. Butler J. E.: J. Am. vet. med. Ass. 163, 795, 1973.
2. Bohren H. W., Henner J. R.: J. Dairy Sci. 54, 1315, 1961.
3. Herbert W. J.: Handbook of Experimental Immunochimistry, vol. 1, edit. Weir D. M., Blackwell Scientific Publications, 1974.
4. Kurek Cz.: Medycyna wet. 27, 613, 1971.
5. Lee C. S., Lascelles A. K.: Aust. J. exp. Biol. med. Sci. 48, 525, 1970.
6. Logan E. F., Stenhouse eA., Ormrod D. J., Penhale H. J.: Res. vet. Sci. 17, 290, 1974.
7. McDowell G. M., Watson D. L.: Aust. vet. J. 50, 533, 1974.
8. Porter P.: Immunology 33, 225, 1972.
9. Richou R., Quinchon Cl.: Recl. Med. vet. 137, 933, 1961.
10. Schollenberger A.: Medycyna Wet. 28, 591, 1972.
11. Smith T., Orgutt M. L., Little R. B.: J. exp. Med. 37, 153, 1923 cyt. za 12.
12. Wilson M. R.: Immunology 23, 947, 1972.
13. Wilson M. R., Svendsen J.: Am. J. vet. Res. 32, 891, 1971.
14. Wilson M. R., Duncan J. R., Heistand F., Brown P.: Immunology 23, 313, 1972.

Adres autora: dr Antoni Schollenberger, ul. Grochowska 272, 03-849 Warszawa.

Шолленбэргэр А. — Внутрицистернальная иммунизация коров патогенными для телят серотипами *Escherichia coli*.

Три четверти вымени иммунизировали живыми формализированными культурами *Escherichia coli*.

Каждую четверть иммунизировали иным серотипом. Методом пассивной гемагглютинации установили разницы в активности протитовел в молозиве и в молоке из разных четвертей. В течение 4 недель после родов самый высокий титр протитовел установливали в молозиве и в молоке четвертей вымени иммунизированных гомологическим штаммом *E. coli*. Титр молозива и молока из неиммунизированных четвертей был значительно ниже. Обсудили значение внутрицистернальной иммунизации коров при иммунопрофилактике заболеваний телят.

Schollenberger A. — **Intramammary vaccination of cows with *Escherichia coli* serotypes pathogenic for calves.**

Cows were vaccinated in three quarters of the mammary gland with live, formalin treated *Escherichia coli* vaccine. Each quarter was immunized with different *E. coli* serotypes. There were found differences in indirect hemagglutinating antibody activity in mammary secretions among the immunized quarters. It was also noted that during four weeks after calving the highest antibody activity appeared in the colostrum and milk from quarters immunized with homologous strain of *E. coli*. Colostrum and milk from non-vaccinated quarter had significantly lower titres of antibodies to the all used serotypes. The value of intramammary vaccination of cows in the immune protection of calves was discussed.

ZDZISŁAW ŚWIĄTEK

Próby identyfikacji *Salmonella dublin* i *Corynebacterium pyogenes* za pomocą OIF

Z Pracowni Badania Chorób Młodych Zwierząt Instytutu Weterynarii w Puławach

Zagadnienie szybkiego rozpoznania bakteriologicznego drobnoustrojów chorobotwórczych, będących czynnikiem etiologicznym w enzootycznym zapaleniu płuc u cieląt jest ciągle problemem otwartym. Usprawnienie rozpoznawania drobnoustrojów z rodzajów *Salmonella* i *Corynebacterium* ma duże znaczenie w selekcji zwierząt dla hodowli wielkostadnej, a także dla celów profilaktycznych i terapeutycznych.

Niewielu autorów doniosło o próbach zastosowania odczynu immunofluorescencji do badań naukowych i diagnostyki laboratoryjnej *Salmonella*. Uzyskane przez nich wyniki są ciągle niezadowolające a poglądy różne, często nawet sprzeczne (1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10). Natomiast na podstawie dostępnego piśmiennictwa, nie próbowano zastosowania tego odczynu do identyfikowania *Corynebacterium pyogenes*. Zatem celem pracy było sprawdzenie przydatności odczynu immunofluorescencji do wykrywania drobnoustrojów z rodzajów *Salmonella* i *Corynebacterium*.

Materiał i metody

Do badań użyto szczepów: *Salmonella dublin* nr 496 i *Corynebacterium pyogenes* nr 518. Szczepy te otrzymano z Zakładu Mikrobiologii Instytutu Weterynarii w Puławach. Za pomocą tych szczepów wyprodukowano królicze surowice aglutynacyjne dla wymienionych drobnoustrojów. W tym celu króliki wagi około 3 kg, zdrowe i w dobrej kondycji, szczepiono dożylnie czterokrotnie co pięć dni 24-godzinną bulionową hodowlą *Salmonella dublin*, odwirowaną i zawieszoną w płynie fizjologicznym z dodatkiem 0,6% formaliny. Gęstość zawiesiny ustalano według skali Mc Farlanda nr 3. Zwierzęta szczepiono następującymi dawkami: 0,5 ml; 2 ml; 3 ml i 3 ml. W ten sposób otrzymano surowicę aglutynującą *Salmonella dublin* w rozcieńczeniu 1:1600. Surowicę aglutynującą *Corynebacterium pyogenes* wyprodukowano w następujący sposób. Króliki wagi około 3 kg, zdrowe i w dobrej kondycji, szczepiono czterokrotnie co pięć dni dożylnie zawiesiną *Corynebacterium pyogenes* w płynie fizjologicznym z dodatkiem 0,6% formaliny. Gęstość zawiesiny ustalano według skali Mc Farlanda nr 2. Zwierzęta szczepiono dawkami w objętości: 0,5 ml; 1 ml; 2 ml i 2 ml. Po immunizacji zwierząt zawiesiną *Corynebacterium pyogenes* z dodatkiem formaliny stwierdzono, że w ten sposób sporządzona zawiesina nie jest immunogenna. Zastosowano dodatkowe jedno szczepienie zawiesiną bakteryjną żywą bez formaliny w objętości 3 ml. Po 48 godzinach