

IRENA JANOWSKA, ANNA KRASNODEBSKA-DEPTA

Wstępne badania nad nieszkodliwością i właściwościami uodporniającymi nowej szczepionki „Polivac” przeciw chorobom wychowu drobiu

Z Zakładu Chorób Drobiu Instytutu Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych AR-T w Olsztynie

Celem pracy było zbadanie stopnia nieszkodliwości oraz właściwości uodporniających nowej, wieloważnej szczepionki pn. „Polivac”, przeznaczonej do zapobiegania swoistego i nieswoistego najczęściej występującym chorobom wychowu drobiu. Szczepionka została przygotowana przez Gorzowskie Zakłady Przemysłu Bioweterynaryjnego w Gorzowie Wielkopolskim.

Materiał i metody

Do badań użyto: 1. Szczepionkę „Polivac” serii doświadczalnej, zawierającą szczep: *P. multocida*, *Str. zooepidemicus*, *E. coli* oraz *C. pyogenes* — inaktywowane formaliną, konserwowane mertiolatem i adserbowane na wodorotlenku glinu. Szczepionka przeznaczona jest do jednorazowego wstrzykiwania domięśniowego lub podskórnego ptakom zdrowym w dawce 1 ml — dla kur i kaczek, 2 ml — dla gęsi i indyków. 2. Zwierzęta doświadczalne: 30 myszek białych, 232 gęsi, 200 kur w różnym wieku i różnej rasy, 40 kaczek oraz 20 indyków.

Do badań nad nieszkodliwością szczepionki użyto: a) 30 młodych myszek białych, które podzielono na 3 grupy, z których każdej wstrzykiwano podskórnie 0,25 ml, 0,5 ml lub 1 ml szczepionki; b) 20 kurcząt w wieku 8 tyg., którym wstrzyknięto szczepionkę domięśniowo w dawce 4 ml; c) 20 gęsi biłgorajskich, które otrzymywały po 6 ml szczepionki domięśniowo. Zwierzęta obserwowano przez 14 dni.

Badania nad właściwościami uodporniającymi przeprowadzono wstępnie w Zakładzie Chorób Drobiu AR-T, a potem w fermie drobiu RZD AR-T Stary Dwór oraz w gospodarstwie indywidualnym w miejscowości N.

We wstępnych badaniach laboratoryjnych użyto 40 kurcząt w wieku 8 tyg., które zaszczepiono zgodnie z instrukcją, a następnie poddano po 27 dniach zakażeniu domięśniowemu 0,5 ml 24 godz. bulionowej hodowli zjadliwego szczepu *P. multocida*, rozcieńczonej 1:100 (gr. 1) lub 1:1000 (gr. 2). Grupę kontrolną stanowiły kurczęta niezaszczepione, które zakażono jak grupę badaną.

Ponadto przeprowadzono badania nad swoistym działaniem ochronnym surowicy pobranej od 10 kur, które zaszczepiono domięśniowo po 1 ml badanej szczepionki, a następnie pobrano od nich krew 7 i 21 dnia po szczepieniu, w celu wykazania swoistych przeciwciał. Do tego celu użyto: a) metody hamowania wzrostu odpowiednich szczepów bakterii przez badaną surowicę oraz b) próby biologicznej.

Ad a) Szczepy: *Str. pyogenes*, *P. multocida*, *C. pyogenes* oraz *E. coli* namnażano w bulionie zwykłym w ciągu 24 godz. w temperaturze 37°C i określano wg skali McFarlanda liczbę bakterii w 1 ml kultur. Następnie do kultur tych — rozcieńczonych od 10^{-1} do 10^{-5} — dodawano w równych ilościach surowicę rozcieńczoną 1:2, pobraną od kur 7 dnia po szczepieniu. Mieszanie tę wstawiano do ciepłarki na 1 godz., po

czym wysiewano na płytki agarowe i liczone uzyskane kolonie. Kontrolę stanowiły płytki posiane tymi samymi szczepami, inkubowane bez surowicy oraz płytki z dodatkiem surowicy pochodzącej od kur niezaszczepionych. Różnicę liczby uzyskanych kolonii uznawano za wskaźnik procentowy swoistego hamującego działania surowicy.

Ad b) Do badania użyto 10 kur, którym równocześnie z zakażeniem hodowlą *P. multocida* wstrzyknięto po 5 ml surowicy pobranej od kur 21 dnia po ich szczepieniu. Równocześnie zakażono 5 kur kontrolnych (bez surowicy). Wszystkie kury poddano obserwacji na długość okresu inkubacji oraz natężenie objawów chorobowych.

Badania terenowe przeprowadzono w stadzie gęsi liczącym 200 szt. w którym przed i w czasie doświadczenia stwierdzono zachorowania i upadki z powodu kolibakteriozy. W stadzie tym wybrano losowo 70 gęsi zdrowych, które zaszczepiono domięśniowo po 2 ml szczepionki i całe stado obserwowano przez okres 4 miesięcy notując zachorowania i upadki, zmiany sekcyjne oraz wyniki badania bakteriologicznego.

Drugą część terenowych badań nad skutecznością szczepionki przeprowadzono w zagrożonym pasterelozą gospodarstwie indywidualnym, w którym zaszczepiono dwukrotnie co 7 dni 120 kur, 40 kaczek, 20 indyków oraz 12 gęsi. Zaszczepione ptaki obserwowano przez 2 miesiące.

Wyniki

Z badań nad stopniem nieszkodliwości szczepionki dla różnych gatunków ptaków domowych — młodych i starych — wynika, że była ona nieszkodliwa. Spośród 30 myszek nie padła żadna. Dawka 1 ml powodowała jedynie w miejscu iniekcji guzki, które utrzymywały się przez 34 dni po czym zniknęły.

Odczynów ogólnych i miejscowych nie stwierdzono u kurcząt i gęsi biłgorajskich — mimo użycia dawki 4 lub 6 ml szczepionki oraz u ptaków użytych do badań nad skutecznością szczepionki w warunkach laboratoryjnych i terenowych. Szczepione ptaki rozwijały się prawidłowo, wykazały taką samą nieśność oraz analogiczne przyrosty ciężaru ciała.

W badaniu właściwości uodporniających wykazano, że kurczęta szczepione a następnie zakażone szczepem zjadliwym *P. multocida* — były mniej wrażliwe na zakażenie niż kurczęta grup pozostałych. Padły one dopiero 3—5 dnia po zakażeniu, a 1 kurczę przeżyło zakażenie. Natomiast kurczęta kontrolne padały w ciągu 24—48 godz.

Wyniki badań uzyskane nad hamującym działaniem surowicy pobranej od ptaków 7 dnia po szczepieniu zebrane są w tab. 1.

Z tabeli tej wynika, że badana surowica hamowała wzrost pałeczek *C. pyogenes* w 50% oraz wzrost *E. coli* w ok. 25%. Nie stwierdzono natomiast w tym układzie hamowania wzrostu *P. multocida* oraz *Str. pyogenes*.

Tab. 1. Wyniki prób hamowania wzrostu niektórych szczepów bakteryjnych przez surowicę kurcząt szczepionych szczepionką „Polivac”

Szczepy	Ilość bakterii w 1 ml wg skali McFarlanda	Rozcieńczenie	Wskaźnik hamowania wzrostu bakterii w %
<i>P. multocida</i>	3×10^8	10^{-1}	0
		10^{-2}	0
		10^{-3}	0
		10^{-4}	0
<i>Str. pyogenes</i>	3×10^8	10^{-1}	0
		10^{-2}	0
		10^{-3}	0
		10^{-4}	0
<i>C. pyogenes</i>	3×10^8	10^{-1}	0
		10^{-2}	0
		10^{-3}	50
		10^{-4}	50
<i>E. coli</i>		10^{-1}	n.b.
		10^{-2}	0
		10^{-3}	25
		10^{-4}	25
		10^{-5}	25

Hamujące działanie surowicy na rozwój pałeczek *P. multocida* stwierdzono natomiast w próbie biologicznej *in vivo*: kury, którym oprócz zarazków wstrzyknięto surowicę, zachorowały na pasterelozę z reguły o 5 dni później, niż kury grupy kontrolnej. Przebieg choroby u tych kur był ponadto znacznie łagodniejszy i trwał dłużej niż u kur kontrolnych. Wynik ten wskazuje, że kury uodpornione szczepionką „Polivac” mają w surowicy 21 dnia po szczepieniu swoiste dla *P. multocida* przeciwciała, które hamują częściowo rozwój tych zarazków w organizmie zakażonym.

W badaniach nad ochronnym działaniem szczepionki „Polivac” w warunkach terenowych uzyskano wyniki następujące:

W fermie drobiu RZD — zaszczipione gęsi pozostały zdrowe przez 3 mies. po szczepieniu. W 4 mies. padły w tej grupie 3 gęsi, u których klinicznie stwierdzono kulawiznę i niechęć do ruchu, sekcyjnie zaś — zapalenie otrzewnej, wysięk w jamie brzusznej z nitkami włókniaka i ścięte masy żółtkowe, zapalenie jajnika i jajowodu oraz zwyrodnienie wątroby i śledziony. Badaniem bakteriologicznym stwierdzono u nich *E. coli*. W grupie gęsi kontrolnych padło 5 gęsi we wcześniejszym okresie doświadczenia. Przyczyną upadków była kolibakterioza. W pozosta-

łym okresie doświadczenia (4 mies.) stan zdrowotny ptaków badanych był dobry, a przyrosty ciężaru ciała oraz nieśność były normalne.

W gospodarstwie indywidualnym, zagrożonym pasterelozą stwierdzoną w okresie zakładania doświadczenia w sąsiednich gospodarstwach, zaszczipione kury, kurczęta, kaczki, gęsi i indyki pozostały zdrowe przez cały okres doświadczenia.

O m ó w i e n i e

Szczepionkę „Polivac” wolno uznać za nieszkodliwą dla myszek oraz dla kaczek, kurcząt, kur, gęsi i indyków. Ptaki szczepione zarówno dawkami większymi, jak i mniejszymi nie wykazywały klinicznych odchyśleń od normy. W szczególności nie stwierdzono u nich zmniejszenia nieśności oraz przyrostów ciężaru ciała.

W badaniach nad uodporniającym działaniem szczepionki wykazano, że powoduje ona u szczepionego drobiu powstawanie swoistej odporności przeciwzakaźnej. Wynika to zarówno z przebiegu prób sztucznego zakażenia kur szczepionych, jak i z rezultatów pozostałych badań laboratoryjnych i terenowych. Uzyskane wyniki nad ochronnym działaniem szczepionki w stosunku do pasterekozy należy oceniać w świetle dwóch podstawowych faktów: a) pastereloza jest chorobą, przy której uzyskanie 100% odporności u zwierząt szczepionych jest b. trudne (2, 5) oraz b) użyta do challenge'u dawka *P. multocida* przewyższała dawkę LD₅₀ ok. milion razy (6, 7). Uzyskanie więc w tych warunkach charakterystycznego przedłużenia okresu trwania i łagodniejszego przebiegu choroby u ptaków szczepionych oraz przedłużenia okresu jej wylegania u ptaków które oprócz dużej dawki zakaźnej otrzymywały 5 ml surowicy kurcząt szczepionych — wskazuje niewątpliwie na uodporniające działanie badanej szczepionki — również przeciw pasterelozie. Jest to zgodne z wynikami innych autorów (1, 3, 4, 7), którzy do uodporniania drobiu przeciw pasterelozie użyli szczepionki swoistej inaktywowanej i wstrzykiwanej parenteralnie.

Uodporniające właściwości szczepionki „Polivac” w stosunku do niektórych innych bakterii chorobotwórczych wynikają z wykazanego hamowania ich wzrostu przez surowicę pochodzącą od kurcząt szczepionych oraz z wyników uzyskanych w RZD.

Wolno przyjąć, że wyniki uodporniania badanej szczepionką mogą być znacznie wyższe po dwukrotnym jej zastosowaniu, na co m.in. wskazuje praca Truszczyńskiego i wsp. (7).

W n i o s k i

1. Szczepionka „Polivac” — przeznaczona do swoistego i nieswoistego (bódcowego) zapobiegania niektórym bakteryjnym chorobom wychowu drobiu — jest nieszkodliwa.

2. Szczepionka wywiera działanie uodporniające przeciw chorobotwórczym zarazkom — odpowiednio do zawartych w niej antygenów.

3. Szczepionka „Polivac” może być dopuszczona do dalszych prób w warunkach terenowych — w celu wypróbowania jej właściwości ochronnych na większym materiale zwierząt i w różnych warunkach środowiskowych.

Piśmiennictwo

1. Bhasin J. L., Biberstein E. B.: Avian Dis. 12, 159, 1968.
2. Gołębiowski S.: Medycyna Wet. 17, 707, 1961.

3. Heddleston K. L., Gallagher J. E., Rebers P. A.: Avian Dis. 14, 626, 1970.
4. Maheswaran S. K., McDowell I. R., Pomeroy B. S.: Avian Dis. 17, 396, 1973.
5. Samól S.: Medycyna Wet. 16, 204, 1960.
6. Tereszczuk S.: Medycyna Wet. 21, 156, 1965.
7. Truszczyński M., Tereszczukowa M., Rutkowska-Jurga I.: Medycyna Wet. 31, 199, 1975.

Adres autora: doc. dr habil. Irena Janowska, ul. Jasna 1 m. 29, 10-427 Olsztyn.

JERZY RZEDZICKI, BOŻENA BORKOWSKA-SKORA

Zastosowanie ilościowego oznaczania klas immunoglobulin surowiczych u bydła

Z Instytutu Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych Wydziału Weterynaryjnego AR w Lublinie

Najbardziej swoistymi cechami immunoglobulin są ich właściwości immunogenów i przeciwciał. Dzięki tym właściwościom immunoglobuliny są jednym z kluczowych czynników warunkujących humoralną odporność przeciwzakaźną (9). Szczególnie ważną rolę białka te odgrywają w kształtowaniu odporności u zwierząt nowo narodzonych (9, 24). Ponadto immunoglobuliny pełnią w organizmie szereg funkcji nieswoistych. Między innymi wpływają na utrzymanie ciśnienia osmotycznego oraz biorą udział w procesach katabolicznych organizmu.

Szczególna rola immunoglobulin w organizmie spowodowała szybki postęp wiedzy w dziedzinie immunologii doświadczalnej. Aspektem praktycznym tych badań było wprowadzenie przez Manciniego i wsp. (20) metody radialnej immunodyfuzji do ilościowego oznaczania poziomu poszczególnych klas immunoglobulin. W ostatnim dziesięcioleciu metoda ta znalazła szerokie zastosowanie w medycynie do diagnozowania szeregu zespołów chorobowych, którym towarzyszą hipogammaglobulinemie lub dysgammaglobulinemie (5, 8). Metoda Manciniego i wsp. stosowana jest także do określania poziomu immunoglobulin w zespołach chorobowych związanych z nadprodukcją tych białek oraz substancji takich, jak: białko C-reaktywne, globulina B_{1c}, transferyna (26).

Odmienna budowa łożyska, a tym samym inny mechanizm przekazywania odporności matki na potomstwo warunkuje, że w weterynarii badania poziomu immunoglobulin mogą mieć o wiele większe znaczenie praktyczne. Szczególne zainteresowanie w światowej immunologii weterynaryjnej wzbudza mechanizm przekazywania immunoglobulin drogą siary oraz początkowy okres ich syntezy u młodych zwierząt (3, 25, 29, 31). Mimo to w polskim piśmiennictwie weterynaryjnym brak jest doniesień dotyczących oceny stanu odporności zwierząt w oparciu o ilościowe oznaczenie poziomu poszczególnych klas immunoglobulin. Stąd też wydaje się słusznym przedstawienie możliwości wykonania oraz wykorzystania tej metody do celów badawczych,

a także w laboratoryjnej praktyce weterynaryjnej.

Izolacja immunoglobulin klas IgG, IgM i IgA

Isolację oczyszczonych klas immunoglobulin koniecznych do immunizacji królików wykonano w oparciu o technikę podaną przez Butlera i wsp. (6). Badania wstępne wykazały konieczność niewielkich modyfikacji powyższej techniki. Przy izolacji immunoglobulin klasy IgG, aby ułatwić dalsze oczyszczanie już w etapie wstępnym do surowicy niedializowanej dodawano uprzednio przygotowany sephadeks DEAE A-50 (preparat w formie Cl⁻) w ilości 10 g na 50 ml surowicy. Preparację wstępną przeprowadzono dwukrotnie. W przypadku klasy IgM badania kontrolne wykazały, że celem uzyskania wysokiego stopnia czystości niezbędna jest chromatografia na DEAE-celulozie, która została wyważona buforem fosforanowym o pH 6,3. Elucję przeprowadzono za pomocą gradientu linearnego. W ten sposób otrzymano trzy frakcje białkowe. Frakcja I uzyskana po chromatografii na DEAE-celulozie i rechromatografii na sephadeksie G-200 jest czystą globuliną IgM. W odniesieniu do immunoglobulin klasy IgA konieczne było zastosowanie rechromatografii na sephadeksie G-200. Stopień czystości wyizolowanych klas kontrolowano spektrofotometrycznie przy dług. fali 280 μm (spektrofotometr „Specord” UV-Vis) oraz metodą immunoelektroforezy.

Otrzymywanie surowic odpornościowych swoistych dla poszczególnych klas immunoglobulin

Surowice uzyskano drogą uodpornienia królików. Jednorazowa dawka antygeny w cyklu immunizacyjnym wynosiła dla poszczególnych klas: IgG 2—6 mg, IgM 2,5—8 mg, IgA 5—10 mg. Antygen podawano domięśniowo z kompletnym adiuwantem Freund'a. Okres immunizacji wynosił dla poszczególnych klas od 6—8 tygodni. Króliki skrwawiano po ośmiu dniach od ostatniej iniekcji, kiedy miano precypitacyjne surowic wynosiło od 1:2560 do 1:6120. Swoistość uzyskanych surowic kontrolowano w reakcjach