

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. Samół 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-SKÓRA

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

Izolację 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

krzyżowych w odczynie immunodyszfuzji oraz immunoelektroforezy. Surowice przechowywano w stanie zliofilizowanym.

Standaryzacja surowic swoistych

Standaryzację surowic swoistych przeprowadzono w oparciu o metodę Feya i wsp. (11) w stosunku do poszczególnych klas immunoglobulin w następujących zakresach stężeń: klasa IgG od 1,4 mg/ml do 60 mg/ml, IgM od 1,0 mg/ml do 7,0 mg/ml, IgA od 0,08 mg/ml do 2,6 mg/ml. Wyniki uzyskane dla próbek standardowych naniesiono na wykres, umieszczając na osi odciętych wartości średnicy pierścienia precypitacyjnego w mm, na osi rzędnych logarytm stężenia próbki standardowej.

Technika wykonania oznaczeń

Standaryzowaną surowicę swoistą dla danej klasy mieszano w stosunku 1:1 z 3% roztworem agarozы rozpuszczonej w buforze weronalowym o pH 8,6 i sile jonowej 0,1. Mieszaninę surowicy z agarozą w ilości 10 ml wylewano na płytki szklane o wymiarach 6×9 cm. Następnie wycinano baseniki. Do baseników tych wkraplano 0,1 ml surowicy, w której zamierzano oznaczyć poziom immunoglobulin danej klasy. Minimalny czas potrzebny do osiągnięcia końcowej wielkości średnicy precypitatu wynosił dla klasy: IgG 12 godzin, IgM 24 godziny, IgA 36 godzin. Poziom klas immunoglobulin w badanych surowicach odczytywano przez porównanie średnic uzyskanych pierścieni precypitacyjnych z wykresem uprzednio sporządzonej krzywej standardowej.

Dotychczas w ocenie poziomu białek odpornościowych wykorzystywane były najczęściej testy oparte na koloidowej chwiejności białek (próba z siarczynem sodu lub siarczanem cynku) oraz metoda elektroforezy. Już pierwsze badania nad identyfikacją i rolą poszczególnych klas immunoglobulin w organizmie spowodowały, że dotychczasowe metody stały się mało przydatne w badaniach naukowych oraz w diagnostyce immunologicznej. Stąd też aktualnie do oceny poziomu immunoglobulin w organizmie stosowana jest metoda radialnej dyfuzji Manciniego i wsp. (20) lub Faheya i McKelveya (10). Modyfikacja Faheya i McKelveya różni się od metody klasycznej tym, że autorzy zastosowali między innymi odmienną metodę oceny wyników. Zaproponowane przez Faheya i McKelveya mierzenie średnic precypitatów zabezpiecza niezbędną stopień dokładności wyników w badaniach naukowych oraz wyraźnie zwiększa możliwość zastosowania metody do badań rutynowych. W dotychczasowych badaniach dotyczących zachowania się poszczególnych klas immunoglobulin można wyróżnić następujące kierunki:

— próby określenia norm poszczególnych klas immunoglobulin w zależności od stanu fizjologicznego oraz warunków środowiskowych,

— badania nad określeniem minimalnych poziomów zabezpieczających młode zwierzęta przed zachorowaniem,

— rola poszczególnych klas immunoglobulin w odpowiedzi organizmu na zakażenie,

— próby zastosowania ilościowego oznaczania immunoglobulin w badaniach procesów immunologicznych przebiegających z nadprodukcją tych białek.

Rola i znaczenie immunoglobulin w kształtowaniu odporności spowodowały konieczność opracowania norm fizjologicznych dla poszczególnych klas tych białek. Większość dotychczasowych obserwacji ma najczęściej charakter fragmentaryczny. Roesti i Fey (27) określili poziom immunoglobulin u bydła rasy simentaler. Autorzy ci wykazali różny poziom immunoglobulin u bydła wypasanego na pastwiskach nizinnych i na pastwiskach górskich. George i LaMotte (16) badali wpływ żywienia bezsiarowego na poziom immunoglobulin klasy IgM oraz podklas IgG1 i IgG2 w surowicy krwi w pierwszym okresie po urodzeniu. Poziom immunoglobulin klasy IgM w zależności od wieku określali Williams i Maxwell (35).

Badania dotyczące wpływu określonych stanów fizjologicznych bądź warunków środowiskowych na zachowanie się poziomu białek odpornościowych prowadzili także inni autorzy. Jednakże aby badania takie mogły mieć wartość praktyczną winny uwzględniać zarówno stan fizjologiczny organizmu jak też wpływ podstawowych warunków środowiskowych — parametrów, które często decydują o poziomie poszczególnych rodzajów białek odpornościowych.

W warunkach krajowych określony został poziom immunoglobulin klasy IgM w surowicy krów ciężarnych, w siarce oraz w surowicy cieląt w pierwszych 12 tygodniach życia w przeciętnych warunkach zootechnicznych (28). W trakcie opracowania są normy fizjologiczne dla pozostałych klas immunoglobulin. Prowadzone badania obejmować będą także wpływ warunków środowiskowych na poziom białek odpornościowych klas IgG, IgA i IgM u krów w ostatnim miesiącu ciąży, w siarce oraz u cieląt.

Niektórzy autorzy podjęli próbę określenia minimalnych poziomów klas immunoglobulin zabezpieczających cielęta przed zachorowaniem. Carrol i wsp. (7) podają, że najniższym poziomem immunoglobulin, pozwalającym cielętom w wieku do 5 tygodni utrzymać się przy życiu, jest zawartość klasy IgG w ilości nie niższej niż 7,5 mg/ml i klasy IgM 0,8 mg/ml. Nieco inne wartości podają dla cieląt 24 godzinnych Logan i wsp. (19). Według tych autorów poziom immunoglobulin klasy IgG w zakresie 3,0—5,6 mg/ml oraz klasy IgM 0,12—0,47 mg/ml wskazuje na stan hipogammaglobulinemii i usposabia do wystąpienia zakaźnych biegunek. Poziom immunoglobulin klasy IgA w tej grupie cieląt wahał się od 0,87—0,94 mg/ml. Brock i wsp. (4) przyjmują dla cieląt w wieku 1—2 dni jako stężenie

krytyczne do wystąpienia chorób zakaźnych ogólny poziom immunoglobulin 15–20 mg/ml. Nulty i wsp. (22) badając całkowity poziom immunoglobulin u cieląt w pierwszych 3 tygodniach życia, za stężenie usposabiające do wystąpienia biegunek zakaźnych uznali poziom 30 mg/ml.

Niewiele jest także doniesień dotyczących poziomu poszczególnych klas immunoglobulin zabezpieczających cielęta przed chorobami zakaźnymi. Carrol i wsp. (7) wykazali, że cielęta u których poziom immunoglobulin klasy IgG przekracza 30 mg/ml są niewrażliwe na zakażenie rotawirusem. Natomiast Williams i wsp. (34) badając zachowanie poszczególnych klas immunoglobulin przy „zespole oddechowym” u cieląt, wykazali wyraźny wzrost w ogólnym potencjale immunoglobulinowym podklasy IgG1. Autorzy ci sugerują, że wzrost ten jest wynikiem stymulującego działania raczej czynników bakteryjnych, a nie wirusowych.

Szereg autorów zajmowało się także zależnością między poziomem poszczególnych klas immunoglobulin a podatnością zwierząt na choroby bakteryjne. W tej grupie badań najliczniej reprezentowane są prace dotyczące roli immunoglobulin w zakażeniach u cieląt wywołanych pałeczką okrężnicy (14, 18, 30). Uzyskane dotychczas rezultaty wskazują jedynie na istotną rolę immunoglobulin klasy IgG, IgM nie precyzują jednak, jaki poziom immunoglobulin poszczególnych klas zapobiega kolibakteriozom u cieląt. Badania dotyczące zachowania się poszczególnych klas immunoglobulin w innych chorobach bakteryjnych także nie dały jednoznacznej odpowiedzi co do roli i poziomu poszczególnych klasy tych białek w zabezpieczeniu cieląt przed zachorowaniem (1, 12, 13, 15, 33, 37).

Wielu autorów stosowało metodę ilościowego oznaczania poszczególnych klas immunoglobulin w badaniach nad odpowiedzią gruczołu mlekowego na zakażenia bakteryjne. W tej grupie badań istotną rolę wydają się mieć badania, które starają się wyjaśnić znaczenie poszczególnych klas immunoglobulin w chorobach gruczołu mlekowego w zależności od czynnika etiologicznego (2, 17). Niewielkie znaczenie praktyczne mają natomiast badania, których celem jest określenie pojawiania się immunoglobulin klasy IgA w mleku jako testu wskazującego na subkliniczne zakażenie (21).

Były także czynione próby zastosowania metody ilościowego oznaczania immunoglobulin do oceny stopnia odpowiedzi immunologicznej na niektóre szczepionki eksperymentalne. Behymer i wsp. (2) oceniali skuteczność szczepień przy użyciu *Coxiella burnetti*. Natomiast Wilson i wsp. (36) badali odpowiedź u bydła na wprowadzenie antygeny korpusek *E. coli*.

Metoda ilościowego oznaczania immunoglobulin znajduje także zastosowanie w badaniach jednostek chorobowych lub zespołów chorobowych, przebiegających z nadprodukcją tych białek.

Jednakże interpretacja uzyskiwanych rezultatów w tej grupie schorzeń jest szczególnie skomplikowana. Wynika to bowiem z jednej strony z odmiennego zachowania się wirusa w komórce (zjawisko replikacji), z drugiej zaś ze złożonej etiologii tej grupy schorzeń. W zespołach chorobowych przebiegających z nadprodukcją immunoglobulin można obserwować zarówno typowe zmiany nowotworowe, występujące w szpiczaku i makroglobulinemii oraz przebiegające bezobjawowo zaburzenia białaczkowe. U cieląt do diagnostyki białaczek ilościowe oznaczanie poszczególnych klas immunoglobulin próbowali wykorzystać Trainin i wsp. (32).

Były czynione także próby bliższego poznania etiopatogenezy innych chorób wirusowych u zwierząt przy zastosowaniu ilościowego oznaczania immunoglobulin. Dotyczy to głównie choroby aleuckiej u norek i fretek oraz niedokrwistości zakaźnej koni (23, 34).

Badania dotyczące zachowania się poziomu immunoglobulin są szczególnie istotne w okresie intensyfikacji produkcji zwierzęcej. Zachodzi bowiem wówczas konieczność wykorzystywania materiału hodowlanego o bardzo różnicowanym potencjale odporności. Zwierzęta szczególnie w fermach opasowych są gromadzone z różnych środowisk hodowlanych pracujących na bardzo różnicowanych technologiach. Stąd też wcześniejsze rozpoznanie stanu odporności takiej populacji cieląt dałoby podstawy do podjęcia właściwych akcji profilaktycznych w czasie, kiedy można byłoby maksymalnie ograniczyć straty ekonomiczne.

Piśmiennictwo

1. Bek K. J., Lascelles A. K.: Res. Vet. Sci., 14, 239, 1973.
2. Behymer D. E., Biberstein E. L., Rieman H. B., Franti C. E., Sawyer M., Rupauner R., Crenshaw G. L.: Am. J. Vet. Res., 37, 631, 1976.
3. Brandon M. R., Watson D. L., Lascelles A. L.: Aust. J. exp. Biol. med. Sci., 46, 613, 1971.
4. Brock J. H., Steel E. D., Reiter B.: Res. Vet. Sci., 19, 152, 1975.
5. Buckley R. H., Bradford W. D., Buther S. R.: Pediatrics 39, 506, 1967.
6. Butler J. E., Maxwell Ch. F.: J. Dairy Sci., 55, 151, 1972.
7. Carrol E. J., Crenshaw G. L.: Amer. J. Vet. Res., 37, 389, 1976.
8. Cruchaud A., Girard J. P., Kapanci Y., Lapperrouza C., Megavand R., Schwarzenberg L.: Rev. fr. etud. clin. biol., 13, 245, 1968.
9. Euler W., Jacob B., Kasch G., Meyr H., Stenbach S.: Arch. exp. Vet. med., 26, 349, 1972.
10. Fahey J. L., McKelvey E. M.: J. Immun., 84, 94, 1965.
11. Fey H., Pfister H., Messerli N., Sturzenegger N., Grolimund F.: Zbl. Vet. Med., 23, 269, 1976.
12. Fisher E. W., Martinez A. A., Trainin Z., Meiron R.: Br. Vet. J. 131, 402, 1975.
13. Fisher E. W., Martinez A. A.: Vet. Rec. 14, 527, 1975.
14. Fisher E. W., Martinez A. A., Trainin Z., Meiron R.: Br. Vet. J. 39, 132, 1976.
15. Gough P., Jeenees R., Anderson R. K.: J. Dairy Sci., 49, 718, 1966.
16. George B., LaMotte M. S.: Amer. J. Vet. Res., 38, 263, 1977.
17. Kulkarni P. E.: Acta Vet. Scand., 12, 611, 1971.
18. Logan E. F., Stenhouse A., Ormrod D. J.: Res. Vet. Sci., 17, 290, 1974.
19. Logan E. F., McBeath D. G., Lowman B. G.: Res. Vet. Sci., 94, 367, 1974.
20. Mancini G., Carbonara C. O., Heremans J. F.: Immunochemistry, 2, 235, 1965.
21. Mielke H., Eichel Y., Richter W.: Vet. med., 31, 185, 1976.
22. Nulty M. S., McFerran J. B., Bryson D. G., Logan E. F., Curran W. L.: Vet. Rec., 99, 329, 1976.
23. Porter P., Dixon F. J., Lareen A. E.: Blood, 25, 736, 1965.
24. Porter P., Noakes D. J., Allen W. D.: Immunochemistry, 12, 323, 1975.
25. Porter P.: Immunology, 23, 225, 1972.

26. Roit I. M.: Podstawy immunologii, PWN, Warszawa, 1971.
27. Roesti R., Fey H.: Schweiz. Arch. Tierheilk., 117, 65, 1975.
28. Rzedzicki J., Gliński Z., Wernicki A.: Pol. Arch. Wet., (w druku).
29. Sasaki M., Davis L., Larson B. L.: J. Dairy Sci., 59, 2049, 1976.
30. Steel E. D.: Immunology, 29, 31, 1975.
31. Smith K. L., Conrad H. R., Porter R. M.: J. Dairy Sci., 54, 1427, 1971.
32. Trainin Z., Ungar-Waron H., Meiron R., Barnea A., Sela M.: J. Comp. Path., 86, 571, 1976.

33. Wielkie B. N., Duncan J. R., Winter A. J.: J. Dairy Sci., 54, 1333, 1972.
34. Williams H. C., Kenton A. J., Huntley O. C.: Blood, 67, 309, 1968.
35. Williams M. R., Maxwell D. A. G., Spooner R. L.: Res. Vet. Sci., 18, 314, 1975.
36. Wilson R. A., Jutila J. W.: Inf. Immunity, 13, 100, 1976.
37. Wray C., Sojka W. J., Callow R. J.: Br. Vet. J., 25, 133, 1977.

Adres autora: doc. dr habil. Jerzy Rzedzicki, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin.

MARIA ZAREMBA, JERZY PIOTROWSKI, BOGUSŁAWA BORTNIK-KOZIKOWSKA,
ALINA KACPRZAK-WIATR

Wpływ ampicyliny na przebieg doświadczalnej listeriozy u myszy szczepu Balb/c

Z Zakładu Mikrobiologii Instytutu Biostruktury AM w Białymstoku

Listerioza u zwierząt może przebiegać w formie objawowego lub bezobjawowego zakażenia. Postacie objawowe najczęściej występują jako ostre zapalenie opon i mózgu, posocznice ze zmianami martwiczymi w narządach mięszo- wych, rzadziej inne, bardziej łagodne postacie. Określoną sprawą jest również hystero- tropizm pałeczek listerii, co powoduje poronienia u owiec ciężarnych i bydła w wyniku przenikania bakterii przez łożysko (10, 14, 15, 26).

W piśmiennictwie krajowym najwięcej informacji dotyczy listeriozy owiec (13, 14, 31, 36, 37); u innych zwierząt listeriozę w kraju opisy- wano rzadziej (6, 7, 14, 18, 24).

Uderzające jest podobieństwo form klinicz- nych listeriozy u zwierząt i u ludzi (4, 15, 25, 26).

Zwraca się uwagę na występowanie dość częstego nosicielstwa pałeczek listerii u różnych zwierząt (1, 10, 19, 26), a w ostatnich latach problem ten nabiera również znaczenia u ludzi (17, 19, 26).

Właściwe, wczesne postępowanie chemio- terapeutyczne w listeriozie zwierząt jest istotne, bowiem może ona powodować duże straty eko- nomiczne w wyniku masowego padania chorych zwierząt (1, 10, 15, 26).

O skuteczności wielu chemioterapeutyków w leczeniu listeriozy u ludzi wiadomo jest od dawna.

Celem obecnej pracy było dokonanie oceny skuteczności ampicyliny w doświadczalnej li- steriozie i ustalenie dawek terapeutycznych. Należy zaznaczyć, że w określonych sytuacjach leczenie zwierząt chorych na listeriozę jest niezbędne.

Materiał i metody

I. Oznaczanie aktywności ampicyliny wobec szczepów *Listeria monocytogenes* w warunkach *in vitro*.

1. Preparat

Stosowano sól sodową ampicyliny (s. AS-620 Mar- sing o mocy biologicznej 920 µg/mg). Preparat otrzy- mano z Tarchomińskich Zakładów Farmaceutycznych „Polfa” w Warszawie.

2. Szczepy bakteryjne

Do badań użyto 33 szczepy *Listeria monocytogenes*

należące do wszystkich grup serologicznych od 1 do 7 z podgrupami (33). Szczepy te stanowiły przeważnie szczepy referencyjne. Część z nich pochodziła z kolek- cji własnej, izolowano je z mózgu owcy (36), smółki noworodka (35) i wody (34).

3. Oznaczenie wrażliwości szczepów *Listeria mono- cytogenes* na ampicylinę metodą rozcieńczeniową w podłożu stałym.

Stosowano stałe podłoże Mueller-Hintona, do które- go dodawano ampicylinę w stężeniach od 1024 do 0,003 µg/ml podłoża. Na powierzchnię podłoża posiewa- no badane szczepy *L. monocytogenes* stanowiące 18- godz. bulionową hodowlę inkubowaną w temp. 37°C, nierozcieńczoną i rozcieńczoną 1000-krotnie. Do posie- wu używano inokulum zawierające około 8×10^7 ko- mórek i około 8×10^5 komórek/1 ml. Posiane podłoża inkubowano w temp. 37°C przez 18 godz. Po tym cza- sie określano najmniejsze stężenia ampicyliny hamują- ce wzrost szczepów (MIC).

4. Oznaczenie wrażliwości szczepów *Listeria mono- cytogenes* na ampicylinę metodą rozcieńczeniową w podłożu płynnym.

W tej metodzie oznaczenia MIC dokonano dla 4 wy- branych szczepów *L. monocytogenes*. Stosowano płyn- ne podłoże Mueller-Hintona, do którego dodawano róż- ne stężenia ampicyliny. Do 5 ml podłoża z ampicyliną dodawano 0,1 ml bulionowej hodowli szczepów *L. mo- nocytogenes*. Odczytu dokonywano po 18 godz. inku- bacji w temp. 37°C.

II. Oznaczanie aktywności ampicyliny w warunkach *in vivo*.

1. Wyznaczanie LD₅₀ *Listeria monocytogenes* dla myszy szczepu Balb/c.

Wykonano doświadczenia zmierzające do określenia dawki zakażającej *L. monocytogenes* dla białych my- szy szczepu Balb/c. W tym celu myszy zakażano dożylnie wprowadzając 0,2 ml 48 godz. odpowiednio roz- cieńczonej hodowli bulionowej inkubowanej w temp. 22°C. W doświadczeniach *in vivo* używano referen- cyjny szczep *Listeria monocytogenes* należący do se- rotypu 4b. Grupy myszy liczyły po 10 sztuk. Obser- wację prowadzono przez 14 dni, notując liczby myszy padłych w kolejnych dniach obserwacji.

2. Wyznaczanie dawki ochraniającej (PD₅₀) ampi- cylan dla myszy z doświadczalną listeriozą.

Myszy w grupach po 10 sztuk zakażano drogą dożylną podając w objętości 0,2 ml około 1×10^7 komórek/1 g wagi myszy, co stanowiło LD₁₀₀ na 4 dzień obserwacji. Po 30 min. i po 4 godz. od momentu zakażenia myszom podawano ampicylinę drogą doustną. Dawki podawa- nych preparatów w poszczególnych grupach myszy wynosiły: 2048, 1024, 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8 i 4 mg/kg wagi myszy. Myszy obserwowano przez 14 dni, notując liczbę padłych zwierząt w kolejnych dniach obserwacji.

3. Wyznaczanie dawki terapeutycznej (CD₅₀) ampi- cylan dla myszy z doświadczalną listeriozą.