

JERZY NOWACKI, STANISŁAWA LEWANDOWSKA, JOANNA GOLNIK

Przebieg doświadczalnego zakażenia psów pałeczkami listerii z równoczesnym zastosowaniem szczepionki przeciw wściekliznie (Rabiesvac)

Instytut Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych Wydziału Weterynaryjnego. AR
Pl. Grunwaldzki 45, 50-366 Wrocław

U psów, jak i innych zwierząt mniej wrażliwych na naturalne zakażenie listeriami, szczególną rolę w występowaniu listeriozy odgrywają czynniki predysponujące, jak np. niedobory żywieniowe lub zakażenia mieszane (4, 5, 6, 12, 14 cyt. 15, 16). Ponieważ uważa się, że wirusy mogą uczynniać bezobjawowe zakażenia bakteryjne, postanowiono prześledzić wpływ szczepionki przeciw wściekliznie zawierającej inaktywowany wirus na przebieg doświadczalnego zakażenia listeriami psów.

Materiał i metody

Badania wykonano na 17 psach, mieszańcach, w różnym wieku, klinicznie zdrowych nie szczepionych przeciw wściekliznie, nie reagujących dodatnio w odczynach serologicznych w kierunku listeriozy i nie wykazujących zmian w obrazie białokrwinkowym. Badaniem bakteriologicznym skrzepów krwi, kału i wymazów ze spojówek nie wykazano obecności listerii.

Do zakażenia psów użyto 48 godzinnej żywej hodowli bulionowej (28°C) pałeczek *L. monocytogenes*, typ serologiczny 1, chorobotwórczy dla myszy.

Psy zakażone podzielono na 2 grupy po 6 zwierząt. Pierwszej grupie podano pałeczki *L. monocytogenes* podskórnie w ilości 2 ml/kg masy ciała (1 ml zawierał 10⁸ L. m.) i szczepionkę przeciw wściekliznie Rabiesvac w ilości od 2 do 5 ml w zależności od wielkości psa. Drugiej — podano tylko pałeczki *L. monocytogenes*. Ponadto 2 psy nadkażano dawkami frakcjonowanymi w ilości od 1 do 3 ml/kg masy ciała 3-krotnie w odstępach 3-dniowych celem ich uodpornienia. Pozostałe 3 psy nie zakażone stanowiły kontrolę.

Badania serologiczne, bakteriologiczne i hematologiczne wykonano przed zakażeniem 2-krotnie w odstępach 2-tygodniowych, a po zakażeniu — 2 dnia, 1, 2, 4, 5, 6, 8 tygodnia i następnie co 4 tygodnie przez okres 10 miesięcy. Odczyn O-aglutynacji wykonywano z antygenem homologicznym. Badanie bakteriologiczne przeprowadzano stosując metodę bezpośrednich posiewów na podłoża stałe (tryptozowe, tryptozowe z dodatkiem kwasu nalidyksynowego, bromotylowe z salicyną) oraz metodą namnażania na bulionie tryptozowym z kwasem nalidyksynowym.

Tab. 1. Wyniki badań psów sztucznie zakażonych *L. monocytogenes*

Grupa	Nr psa	Objawy kliniczne	OA najwyższe miano	Badanie hematologiczne	Badanie sekcyjne	IF	Levađiti	Badania bakteriologiczne				Próby na zwierzętach laboratoryjnych		
								przyżyciowo			pośmiertnie	świnki morskie		myszy
								spojówki	skrzep	kał		OA najwyższe miano	badania bakteriologiczne	
I	1	+	1:320	—	—	—	+	—	—	+	+	1:40	—	—
	2	—	1:20	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	3	—	1:40	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	4	+	1:160	lfp	—	+	—	+	—	+	—	1:80	—	+
	5	+	1:80	lfp	—	+	+	—	—	+	—	1:160	—	+
	6	+	1:160	lfp	—	+	—	—	—	—	—	1:40	—	—
II	7	+	1:320	—	—	+	+	+	+	+	—	1:40	—	—
	8	+	1:20	—	—	—	×	—	—	—	—	—	—	—
	9	—	1:160	—	—	×	×	—	—	+	—	—	—	—
	10	+	1:80	lfp	+	×	×	—	+	+	—	1:40	—	+
	11	+	1:80	lfp	+	+	+	—	—	—	—	1:160	—	—
	12	+	1:80	lfp	—	+	×	—	—	—	+	1:40	—	—
III	13	+	1:1280	—	+	+	+	—	+	+	+	1:80	—	—
	14	+	1:640	lfp	—	+	+	—	+	+	+	1:20	—	—
IV	15	—	1:40	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	16	—	1:40	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	17	—	1:80	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Objaśnienia: I grupa — psy zakażone L.m. i zaszczepione Rabiesvac, II grupa — psy zakażone L.m., III grupa — psy nadkażone, IV grupa — psy kontrolne, + = wynik dodatni, — = wynik ujemny, lfp — limfopenia, × — nie badane.

Szczepy izolowane od psów doświadczalnych identyfikowano na podstawie cech biochemicznych i antygenowych. Określano także obraz białokrwinkowy.

Po zakończonej obserwacji psy uśpiono i wykonano badania sekcyjne, bakteriologiczne, histopatologiczne (met. Levaditiego) i odczyn immunofluorescencji bezpośredniej (IF). Rozcier wątroby, śledziony i nerek uśpionych psów wprowadzano podskórnie 34 świnkom morskim i 85 białym myszom. U świnek morskich badano narastanie miana aglutynacyjnego przeciwa anty-*Listeria*, a po uśpieniu świnek morskich i myszy wykonano badania bakteriologiczne.

IF wykonano wg metody opisanej przez Kubicę (8). Odpornościową surowicę królika zawierającą przeciwciała skierowane przeciw pałeczkom listerii znakowano izotiocjonianem fluoresceiny, rozcieńczano w zbuforowanym roztworze fizjologicznym NaCl o pH 7,2 (PBS) i absorbowano pudrem acetonowym z wątrob mysich.

Zamrożone wycinki nerki, wątroby, mózdzku i rdzenia przedłużonego psów krojono w kriostacie na skrawki o grubości 5 mikronów i utrwalano w acetonie. Na preparaty nakraplano znakowaną surowicę rozcieńczoną w PBS w stosunku 1:4 i oglądano w mikroskopie fluorescencyjnym MŁ zaopatrzonym w lampę rtęciową HBO-200.

W próbkach kontrolnych zastosowano: 1. blokowanie IF: a) nieznakowaną surowicę królika zawierającą przeciwciała skierowane przeciw pałeczkom listerii; b) normalną surowicę królika i c) PBS; 2. nakraplanie na skrawki tkankowe zawierające pałeczki listerii koniugatu FA *Listeria* Poly „Difco” rozcieńczono w stosunku 1:20; 3. nakraplanie znakowanej surowicy na rozmazy antygenów homologicznych i heterologicznych (*Streptococcus faecalis*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli*).

Wyniki i omówienie

Wyniki badań psów zakażonych *L. monocytogenes* ujęto w tab. 1.

Badaniem klinicznym u 8 psów stwierdzono podwyższenie temperatury ciała między 2 a 9 dniem po zakażeniu do 40,8°C, u 7 psów przejściowo osowiałość, brak albo słaby apetyt, w tym u 2 psów zmiany w zachowaniu charakte-

ryzujące się w jednym przypadku agresywnością, a w drugim objawami lęku.

Badaniem hematologicznym stwierdzono jedynie w 2 dniu po zakażeniu u 7 psów limfopenię z równoczesnym zwiększeniem ilości granulocytów obojętnochłonnych.

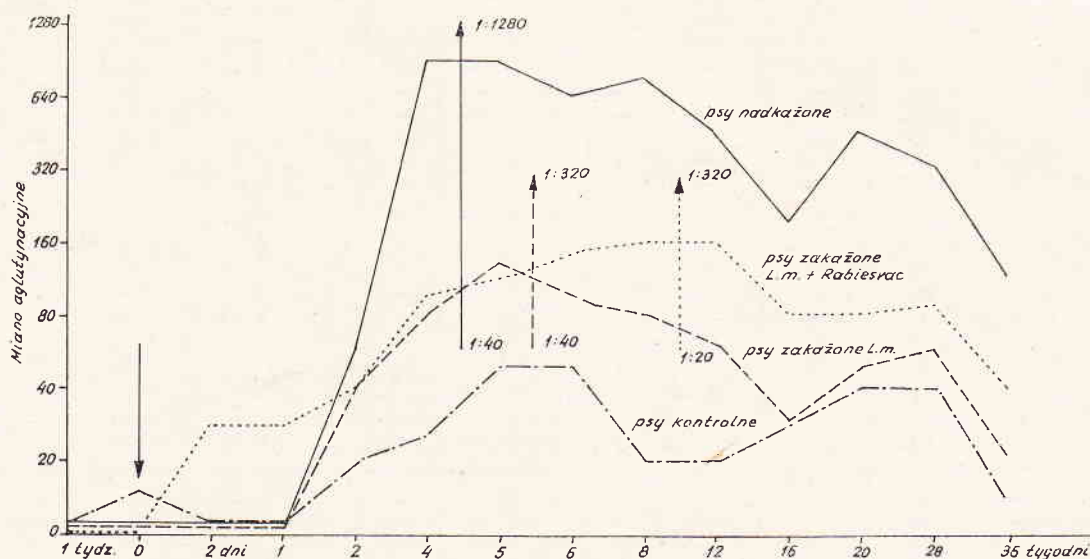
Badaniem bakteriologicznym przyżyciowo wykazano obecność *L. monocytogenes* w posiewach z wymazu ze spojówek u 2 psów, ze skrzepów krwi u 4 psów i z kału u 8 psów od 2 do 8 tygodnia po zakażeniu. U psów po uśpieniu w posiewach bezpośrednich z narządów wewnętrznych i mózgu nie izolowano listerii, natomiast po namnożeniu uzyskano wzrost listerii z narządów wewnętrznych 4 psów.

Badaniem sekcyjnym i histopatologicznym stwierdzono u 3 psów zwyrodnienie wątroby.

Odczynem IF wykazano obecność listerii u 7 psów, a metodą Levaditiego u 6 psów w wątrobie, nerce, mózdzku i rdzeniu przedłużonym.

W surowicach świnek morskich, którym podano podskórnie rozcier narządów wewnętrznych uśpionych psów wykazano odczynem aglutynacji miana od 1:20 do 1:160 (2–4 tygodnie), natomiast nie izolowano z ich narządów wewnętrznych listerii. Pozytywny wynik izolacji uzyskano z myszy zakażonych rozciern narządów wewnętrznych 3 psów. Z powyższych badań wynika, że listerie były obecne w narządach wewnętrznych psów jeszcze po 10 miesiącach od zakażenia. Zastosowanie równocześnie kilku metod zmierzających do wykazania obecności zarazka w narządach podyktowane zostało tym, że listerie nawet w przypadku posocznicy występują w narządach w niewielkich ilościach i często obecne są tylko w określonych miejscach.

Zachowanie się średnich mian aglutynacyjnych u psów zakażonych *L. monocytogenes* przedstawia ryc. 1. Z ryciny tej wynika, że



Ryc. 1. Zachowanie się średnich mian aglutynacyjnych w surowicach psów sztucznie zakażonych *L. monocytogenes*

aglutyniny pojawiły się u psów zakażonych *L. monocytogenes* i szczepionych szczepionką przeciw wściekliznie po 2 dniach od zakażenia. Dopiero po 2 tygodniach u wszystkich psów pojawiły się aglutyniny, lecz w niskich mianach. Najwyższe miana obserwowano między 4 a 8 tygodniem po zakażeniu. U psów, którym dodatkowo podano szczepionkę Rabiesvac najwyższe miana utrzymywały się o miesiąc dłużej. Psy nadkażone reagowały w wyższych mianach utrzymujących się przez cały czas obserwacji. Psy zakażone jednorazowo reagowały w mianach do 1:320, a psy nadkażone do 1:1280. Psy kontrolne w ciągu całego okresu obserwacji nie wykazywały odchylen od normy.

Wyniki badań klinicznych, hematologicznych, bakteriologicznych, sekcyjnych i IF nie wykazały różnic między grupą psów zakażonych a grupą psów zakażonych i szczepionych przeciw wściekliznie. Bush i wsp (4) badając wpływ szczepionki przeciw pomorowi na przebieg listeriozy u świń, jako zwierząt również mało wrażliwych na zakażenie, stwierdzili jedynie różnice w obrazie białokrwinkowym. Nie wykazali też wpływu wirusa na uczynienie procesu chorobowego.

Psy naturalnie zakażone chorują wśród objawów podobnych do nosówki lub wścieklizny (6, 7, 10, 11, 15). Listerioza u psów może przebiegać też bezobjawowo (9). Niejednokrotnie, pomimo braku objawów klinicznych, izolowano od psów listerie, jak również stwierdzano przeciwciała antylisteriowe (2, 3, 9, 13, 15). W badaniach własnych psy sztucznie zakażone wykazywały objawy kliniczne tylko do 9 dnia po zakażeniu, a następnie stały się bezobjawowymi nosicielami. Nosicielstwo stwierdzano na podstawie izolowania listerii przyżyciowo do 2 miesiąca po zakażeniu oraz wzrostu poziomu aglutynin.

Wnioski

1. Podanie szczepionki przeciw wściekliznie Rabiesvac nie wpływa na uaktywnienie procesu chorobowego u psów zakażonych listeriami.

2. Działanie szczepionki Rabiesvac działa bodźcowo na system odpornościowy psów zakażonych listeriami.

3. Najwyższe miana aglutynacyjne obserwowano między 4 a 8 tygodniem po zakażeniu.

4. Psy zakażone doświadczalnie pałeczkami listerii wydają zarazki do 2 miesięcy po zakażeniu.

5. Obecność listerii w narządach mięszo- wych, mózgdzku i rdzenia przedłużonym stwierdzono po 10 miesiącach od zakażenia.

Piśmiennictwo

1. Biegeleisen J. Z.: Second Symposium on Listeric Infection. Bozeman, Montana, 1962.
2. Bochdalek R., Lewandowska S., Nowacki J., Sobiech T.: Weterynaria, Wrocław 27, 173, 1972.

3. Bochdalek R., Lewandowska S.: Zesz. Dolnośląskiego Zespołu do Spraw Zoonoz 2, 40, 1979.
4. Busch R. H., Barnes D. M., Sautler J. H.: Am. J. vet. Res. 32, 1313, 1971.
5. Jakowski R. M., Wyand D. S.: J. Am. vet. med. Ass. 159, 626, 1971.
6. Kampelmacher E. H., Noorle Jansen L. M.: Wien. tierärztl. Mschr. 6, 442, 1961.
7. Kornilowa A. L.: Z. Mikrobiol. Epidem. Immunobiol. 9, 63, 1956.
8. Kubica J. F.: Immunofluorescencja. PZWL, 1967.
9. Larsen H. E.: Nord. Vet. Med. 16, 890, 1964.
10. Pallaske G.: Listeriose Symposium in Giesen 1957. P. Parey, Berlin 1957.
11. Pote J.: Listeriose Symposium in Giesen. 1957, P. Parey, Berlin, 1957.
12. Rhoades H. E., Sutherland A. K.: J. Am. vet. med. Ass. 112, 451, 1948.
13. Seeliger H. P. R.: Listeriosis. Krager, Basel—New York, 1961.
14. Scholters R. G., Birm A.: J. Am. vet. med. Ass. 145, 466, 1964.
15. Winkenwerder W., Pertsch R.: Kleintier-Prax. 2, 43, 1967.
16. Zeller M., Mayer H.: Berl. Munch. tierärztl. Wschr. 70, 302, 1957.

Adres autora: dr Jerzy Nowacki, ul. M. Reja 42/14, 50-223 Wrocław.

Новацкий Е., Левандовская С., Гольник И. — Развитие экспериментального заражения собак палочками листерии с одновременным применением вакцины против бешенства Rabiesvac.

В Польше ведутся вакцинации против бешенства вакциной, содержащей инактивированный вирус. Так как известно, что вирусы могут активировать скрытые бактериальные инфекции, решили проследить влияние вакцины на развитие листериозной инфекции у собак. Для исследований использовали 17 собак: 6 ввели однократно подкожно живые вирулентные палочки *L. monocytogenes* и вакцины, 6 только *L. monocytogenes*, 2 — фракционированные дозы *L. monocytogenes*, а 3 неинфицированные составляли контроль. В течение 1-месячных наблюдений полученные результаты не отличались принципиально между группой инфицированных собак к группой вакцинированных и вакцинированных против бешенства собак кроме более быстрого появления и продолжительного сохранения агглютининов у собак, которым ввели вакцины. От нескольких собак изолировали листерии из кала и крови до 2 месяцев после инфекции; изолировали их также через 10 мес. после инфекции из внутренних органов, мозжечка и продолговатого мозга. Введение вакцины против бешенства не повлияло на активизацию болезненного процесса у собак, зараженных листериями.

Nowacki J., Lewandowska S., Golnik J. — Experimental course of *Listeria monocytogenes* infection in dogs vaccinated against rabies.

The purpose of the work was to assess the influence of the inactivated vaccine (Rabiesvac) against rabies on the course of *Listeria monocytogenes* infection in dogs. There were used 17 dogs from which six were given living cells of *Listeria monocytogenes* (*L. m.*) subcutaneously and the vaccine, six animals received only *L. m.*, two dogs were given two fractionized doses of *L. m.*, and three dogs served as controls. Within 10 months of observation the findings indicated that no essential differences were noticed among the groups of the animals. Only the dogs vaccinated with *L. m.* and the vaccine responded faster to the antigen producing agglutinins lasting for longer time in the blood. From some dogs *L. m.* was isolated from the blood up to 2 months after infection. In some cases the pathogens were isolated also from the internal organs, cerebellum and medulla oblongata after 10 months.