

JERZY NOWACKI, STANISŁAW KLIMENTOWSKI, STANISŁAWA LEWANDOWSKA

Właściwości immunogenne i ochronne żywej niejadliwej szczepionki przeciw listeriozie dla ciężarnych owiec i ich potomstwa*)

Katedra Epizootologii i Klinika Chorób Zakaźnych Wydziału Weterynaryjnego AR,
pl. Grunwaldzki 45, 50-366 Wrocław

Summary

Immunogenic and protective properties of an attenuated vaccine against listeriosis of pregnant sheep and their offspring

The examinations were carried out on 20 sheep of which 12 animals were immunized in the second half of pregnancy. 5 were infected and 3 served as controls. All the lambs (17) coming from the sheep were infected with virulent strains of *L. monocytogenes* (aged 8 weeks) to assess the state of immunity acquired from mothers. For immunization an attenuated vaccine prepared by the authors was used. Sheep and lambs were examined clinically, immunologically, bacteriologically and at necropsy. It was found that vaccinations with the vaccine developed the immune response of humoral and cellular type. The level of agglutinins in the immunized sheep was higher than that in controls. An increase of phagocytosis of neutrophils expressed in the tests of chemiluminescence and NBT pointed to a high reactivity of neutrophils following vaccination. An increased index of blastic transformation of lymphocytes took place after two weeks since immunization until the end of observations. Biological tests indicated that an active immunization of sheep in the second half of pregnancy influenced the immunity of mothers and their offspring.

Pierwszy etap wykonanych w 1987 r. badań obejmował wstępną ocenę odpowiedzi immunologicznej typu humoralnego (aglutynacja) i komórkowego (test NBT, test Chl) u ciężarnych myszy uodpornionych przygotowaną we własnym zakresie żywą niejadliwą szczepionką przeciw listeriozie i następnie zakażonych pałeczkami *Listeria monocytogenes*. Zarówno w próbach biologicznych, jak i przyjętych testach immunologicznych stwierdzono ochronne działanie szczepionki dla matek oraz ich potomstwa (4). Celem pracy było zbadanie właściwości immunogennych i działania ochronnego tej szczepionki (3) dla owiec ciężarnych i ich potomstwa.

Materiał i metody

Do badań użyto 20 owiec rasy merynos polski, w wieku 2—4 lat, klinicznie zdrowych i serologicznie ujemnych, żywionych w lecie mieszanką CJ i zielonką, a w zimie mieszanką CJ, sianem i burakami. Badaniu poddano 17 jagniąt pochodzących od wymienionych owiec.

Do uodporniania owiec zastosowano przygotowaną we własnym zakresie żywą, niejadliwą szczepionkę złożoną z 2 serotypów listerii 1 i 4b o gęstości 10^8 komórek w 1 ml zawieszonych w płynie fizjologicznym o pH 7,6 zawierającym 5% glicerolu i 2% sacharozy. Do zakażenia użyto zawiesiny zjadliwych szczepów *L. monocytogenes* serotyp 1 i 4b o gęstości 10^8 w 1 ml.

Owce podzielono na trzy grupy. W grupie I uodporniono jednorazowo 12 owiec w drugiej połowie ciąży szczepionką po 5 ml podskórnie. Grupa II składała się z 5 owiec nie uodpornionych, które zakażono w drugiej połowie ciąży zawiesiną zjadliwych listerii serotyp 1 i 4b w ilości 10 ml podskórnie i 1 ml dowargowo. Grupę kontrolną stanowiły 3 owce nie uodpornione i nie zakażone.

Zwierzęta poddano badaniom klinicznym i immunolo-

gicznym przed uodpornieniem i zakażeniem oraz po uodpornieniu i zakażeniu 1, 2, 4, 8, 12, 16 i 20 tygodnia.

Po wykotach pobierano od matek siarę i mleko 1, 7, 14, 21 i 28 dnia do badań serologicznych. Serwatkę uzyskiwano przez strącenie kazeiny podpuszczką.

Spośród 17 jagniąt — 11 pochodziło od matek uodpornionych, 3 od matek nie uodpornionych, a tylko zakażonych i 3 — od matek nie uodpornionych i nie zakażonych. Wszystkie jagnięta zakażono około 8 tyg. życia zawiesiną zjadliwych listerii w ilości 1 ml podskórnie celem sprawdzenia ochronnego działania szczepionki dla potomstwa. Jagnięta poddano badaniom klinicznym i immunologicznym 1, 2, 3, 4 i 8 tyg. po urodzeniu oraz 2 i 4 tyg. po zakażeniu. Zwierzęta po zakończonej obserwacji poddano badaniom anatomopatologicznym i bakteriologicznym.

Badania immunologiczne obejmowały odczyn aglutynacji (OA) oraz testy: NBT, chemiluminescencji (Chl) i transformacji blastycznej limfocytów z (Tbl).

Aglutynację wykonano z antygenem somatycznym O i rząskowym H (1), test redukcji NBT przeprowadzono wg Raman i Poland (5) w modyfikacji własnej (4). Metodą chemiluminescencji określono aktywność fagocytarną neutrofilii stymulowaną opsonizowanymi cząsteczkami zymosanu A wg metodycznych przesłanek Müller-Peddighausa i wsp. (2) w modyfikacji własnej (4). Test transformacji blastycznej limfocytów krwi obwodowej owiec przeprowadzono w mikroplytkach. Ogólna objętość każdego dołka wynosiła 175 μ l, z czego 125 μ l stanowiło RPMI 1640, 25 μ l zawiesina limfocytów w RPMI 1640 o koncentracji 4×10^6 /1 ml, co odpowiada 10^8 limfocytów/dolek oraz 25 μ l mitogenu rozpuszczonego również w RPMI 1640. Koncentracja konkanowaliny A (Con A) wynosiła 10 μ g/dolek, a fitohemaglutyniny (PHA) 7,5 μ g/dolek. Test stymulacji limfocytów trwał 72 godziny. Na 6 godz. przed zakończeniem inkubacji dodawano do każdego dołka mikroplytki 1 μ Cu 3 H — tymidyny w 25 μ l RPMI 1640. Ostatecznie komórki zbierano przy użyciu harvestera (Fa Skatron) na bibułę filtracyjną (Skatron), po czym suszono i mierzono w liczniku scyntylacyjnym promieni beta (Fa Packard). Indeks stymulacji był obliczany wg wzoru:

$$IS = \frac{\text{średnie CPM próby stymulowanej}}{\text{średnie CPM próby kontrolnej}}$$

Wyniki i omówienie

Badaniem klinicznym po podaniu szczepionki stwierdzono jedynie u niektórych owiec wzrost temperatury o 0,6°C. Owce nie uodpornione, a tylko zakażone chorowały w okresie 6—10 dni wśród objawów podwyższonej temperatury do 41°C, osowienia i braku apetytu.

Wykoty nastąpiły między 3 a 8 tyg. po uodpornieniu lub zakażeniu. Spośród 3 jagniąt urodzonych od owiec tylko zakażonych 1 padło po urodzeniu, a 2 pozostałe przy życiu rozwijały się słabiej. Natomiast wszystkich 11 jagniąt urodzonych od owiec uodpornionych i 3 od owiec kontrolnych było dobrej kondycji i rozwijały się prawidłowo. U wszystkich jagniąt po zakażeniu stwierdzono wzrost temperatury od 1 do 2°C przez 3—4 dni z tym, że jagnięta pochodzące z grup kontrolnych wykazywały ponadto osowienie, brak apetytu i biegunkę. Po 4 tyg. od zakażenia 2 jagnięta od owiec nie uodpornionych, a tylko zakażonych padły. Badaniem sekcyjnym u tych jagniąt stwierdzono płyn w jamie brzusznej i drobne guzki w

*) Praca wykonana w ramach CPBP 05.06.2.2.3.

Tab. 1. Wyniki badań immunologicznych owiec ciężarnych uodpornionych żywą niezdadliwą szczepionką przeciw listeriozie (\bar{x})

Grupa owiec	Metody	Tygodnie							
		przed	po uodpornieniu lub po zakażeniu						
		0	1	2	4	8	12	16	20
I uodpornionych	OA O H	10 15	133 103	143 87	91 182	65 160	80 218	80 189	58 204
	NBT	0,60	0,99	1,08	0,95	0,93	1,18	0,98	0,60
	Chl	198	401	580	385	431	315	310	237
	Tbl PHA Con A	1,06 1,05	0,58 0,77	1,44 1,23	1,42 1,30	1,23 1,48	1,02 1,05	1,19 1,31	1,31 1,10
II zakażonych	OA O H	0 8	136 68	208 112	176 112	44 88	80 80	64 56	72 40
	NBT	0,55	0,74	1,06	0,64	0,73	0,68	0,65	0,56
	Chl	195	332	456	337	236	218	190	210
	Tbl PHA Con A	1,05 0,93	0,22 0,86	0,82 0,96	1,08 1,12	1,20 1,05	1,10 1,03	1,03 0,95	1,05 0,90
III nie uodpornionych i nie zakażonych (kontrolnych)	OA O H	0 13	20 20	13 20	13 13	20 0	13 0	7 7	13 20
	NBT	0,58	0,58	0,60	0,51	0,54	0,56	0,50	0,61
	Chl	192	183	206	178	192	185	168	190
	Tbl PHA Con A	1,01 0,95	0,95 0,82	1,05 0,98	1,02 1,00	0,98 0,88	0,86 0,75	0,92 0,91	0,38 0,78

wątrobie. Podobne zmiany wykazywano u jagniąt pochodzących od owiec nie uodpornionych i nie zakażonych, które poddano ubojowi diagnostycznemu w 6 tyg. po zakażeniu. Z narządów wewnętrznych tych jagniąt wyizolowano listerie. Natomiast u jagniąt od owiec uodpornionych poddanych też ubojowi diagnostycznemu — sekcynie nie stwierdzono zmian w narządach wewnętrznych i nie wyizolowano listerii. U owiec — matek poddanych ubojowi diagnostycznemu nie wykazano widocznych makroskopowo zmian sekcyjnych, a badanie bakteriologiczne w kierunku listeriozy wypadło ujemnie.

Wyniki badań immunologicznych owiec przedstawia tab. 1. Stwierdzono, że do 2 tyg. po uodpornieniu miana aglutynacyjne z antygenem O były wyższe niż z antygenem H. Od 4 tyg. po uodpornieniu do końca obserwacji miana przeciwciał anty H były znacznie wyższe niż anty O. Natomiast u owiec zakażonych takiej zależności nie obserwowano.

Badając aktywność fagocytarną neutrofilii krwi obwodowej w teście Chl stwierdzono wydatny wzrost żerności tych komórek od 1 do 16 tyg. u owiec uodpornionych i od 1 do 4 tyg. u owiec zakażonych. Obrazując to liczbowo aktywność fagocytarna neutrofilii była u owiec uodpornionych 2-krotnie wyższa jeszcze w 8 tyg., natomiast u zakażonych w 2 tyg. w porównaniu z grupą owiec kontrolnych.

W teście redukcji NBT obserwowano u owiec uodpornionych wzrost żerności już od 1 tyg. utrzymujący się do 16 tyg. W grupie owiec zakażonych wyraźny wzrost fagocytozy notowano do 2 tyg. i spadek od 4 tyg. po zakażeniu.

W teście transformacji blastycznej limfocytów krwi obwodowej stwierdzono w 1 tyg. po uodpornieniu, jak i zakażeniu spadek indeksu stymulacji, zwłaszcza przy użyciu fitohemaglutyniny (IS = 0,58 i 0,22). Natomiast od 2 tyg. szczególnie po uodpornieniu nastąpił wzrost indeksu stymulacji i to przy użyciu obu mitogenów: fitohemaglutyniny i konkanowaliny, utrzymujący się

Tab. 2. Średnie miana aglutynacyjne siary i mleka badanych owiec

Grupa owiec	Antygen	Dni po porodzie				
		1	7	14	21	28
I uodpornionych	O	96	72	56	38	0
	H	152	176	100	48	24
II zakażonych	O	20	20	0	0	0
	H	80	20	10	0	0
III nie uodpornionych i nie zakażonych (kontrolnych)	O	13	20	0	0	0
	H	40	20	0	0	0

w grupie I do końca obserwacji, a w grupie II do 12 tyg.

Średnie miana aglutynacyjne siary i mleka owiec uodpornionych przeciw listeriozie lub zakażonych obrazuje tab. 2. U owiec uodpornionych zarówno w sianie, jak później w mleku wykazano znacznie wyższy poziom przeciwciał H niż O utrzymujący się do końca obserwacji, tzn. do 28 dnia po porodzie. U owiec zakażonych wyższy poziom przeciwciał H wykazano tylko w sianie w 1 dniu po porodzie, podobnie jak u zwierząt grupy kontrolnej.

Wyniki badań immunologicznych jagniąt przedstawia tab. 3. Jagnięta pochodzące od matek uodpornionych badane serologicznie (OA) od 1 do 8 tyg. po urodzeniu wykazywały wyższy poziom mian O i H niż jagnięta pochodzące od matek nie uodpornionych tzn. zakażonych i kontrolnych. Po próbie challenge obserwowano wzrost poziomu przeciwciał O i H we wszystkich 3 grupach jagniąt z tym, że wyraźniej zaznaczony był w grupie I. Wyższe miana przeciwciał H stwierdzono w całym okresie obserwacji jedynie u jagniąt od matek uodpornionych.

U jagniąt pochodzących od owiec uodpornionych, jak i od owiec zakażonych obserwowano wzrost aktywności fagocytarnej w teście Chl i teście redukcji NBT

Tab. 3. Wyniki badań immunologicznych jagniąt (\bar{x})

Grupa jagniąt	Metody		Tygodnie						
			po urodzeniu				po p. challenge		
			1	2	3	4	8	2	4
I zakażonych w 8 tyg. życia (od owiec nie uodpornionych)	OA	O	73	71	50	40	57	77	110
		H	90	103	77	52	80	102	151
	NBT		0,80	0,88	0,72	0,83	0,60	1,18	0,94
	Chl		563	403	363	404	349	568	418
	Tbl	PHA	1,17	1,29	1,24	1,17	1,25	1,11	1,34
Con A		1,26	1,25	1,15	1,12	1,28	1,16	1,28	
II zakażonych w 8 tyg. życia (od owiec nie uodpornionych, a zakażonych)	OA	O	40	60	30	30	30	80	60
		H	40	60	20	30	30	80	40
	NBT		0,72	0,76	0,70	0,62	0,58	0,80	0,74
	Chl		465	390	395	215	212	452	312
	Tbl	PHA	1,12	1,15	1,08	1,06	1,16	1,04	1,25
Con A		0,98	1,12	1,05	0,96	1,12	0,98	1,19	
III zakażonych w 8 tyg. życia (od owiec nie uodpornionych i nie zakażo- nych)	OA	O	27	20	13	20	20	66	80
		H	27	20	7	27	20	40	53
	NBT		0,55	0,60	0,58	0,55	0,62	0,75	0,62
	Chl		185	198	158	172	185	412	318
	Tbl	PHA	1,02	0,98	0,89	0,86	1,02	0,95	1,18
Con A		0,83	0,72	1,01	0,88	0,97	0,92	1,08	

od 1 do 4 tyg. po urodzeniu w porównaniu z grupą kontrolną. Natomiast po próbie challenge notowano we wszystkich 3 grupach wyraźny wzrost tych wartości.

W teście transformacji blastycznej limfocytów krwi obwodowej stwierdzono u jagniąt po urodzeniu w grupach I i II wyższy indeks stymulacji niż w grupie kontrolnej. Po próbie challenge zaznaczył się we wszystkich 3 grupach jagniąt spadek indeksu stymulacji w 2 tyg. po zakażeniu oraz ponowny wzrost tych wartości w 4 tyg. z tym, że najwyższe notowano u jagniąt od owiec uodpornionych.

W podsumowaniu można stwierdzić, że odporność immunologiczna typu humoralnego, jak i komórkowego pojawia się w 1 tyg. po uodpornieniu i zakażeniu. Wyższe wartości i dłuższy czas utrzymywania się tej odpowiedzi obserwowano w grupie owiec uodpornionych. Na uwagę zasługuje fakt, że w teście transformacji blastycznej następuje znaczny spadek indeksu stymulacji w 1 tyg. po uodpornieniu, a zwłaszcza po zakażeniu. Jagnięta pochodzące od matek uodpornio-

nych w drugiej połowie ciąży urodziły się w przewidzianym terminie, rozwijały się prawidłowo i zakażone zjadliwymi szczepami listerii w 8 tyg. życia nie chorowały i nie padły. W próbach biologicznych wykazano więc, że szczepienie czynne owiec w drugiej połowie ciąży miało istotny wpływ na odporność matek i ich potomstwa.

Opracowana żywa niezdadliwa szczepionka przeciw listeriozie cechuje się dobrymi właściwościami immunogennymi i może być przydatna do szczepień ochronnych ciężarnych owiec.

Piśmiennictwo

- Lewandowska S., Nowacki J., Staroniewicz Z., Wachnik Z.: Medycyna Wet. 36, 710, 1980.
- Müller-Peddinghaus R., Hoppe G., Schumacher W.: Zentbl. Vet. Med. 30, 559, 1933.
- Nowacki J., Lewandowska S.: Medycyna Wet. 43, 335, 1987.
- Nowacki J., Klimientowski S., Lewandowska S.: Medycyna Wet. 43, 395, 1987.
- Raman M., Poland R. L.: Pediatric Res. 9, 334, 1975.

Adres autora: dr Jerzy Nowacki, ul. Reja 42/14, 50-338 Wrocław

GILES C. J., GRIMSHAW W. T. R., SHANKE D. J., SMITH D. G.: Skuteczność danofloxacin w leczeniu ostrego bakteryjnego zapalenia płuc u bydła mięsnego w chowie wielko-stałym. (Efficacy of danofloxacin in the therapy of acute bacterial pneumonia in housed beef cattle). Vet. Rec. 128, 296-300, 1991 (13)

Ostre zapalenie płuc stanowi ważny problem zdrowotny i ekonomiczny w hodowli cieląt. Choroba ma etiologię złożoną bakteryjno-mykoplazmową, przy czym czynniki usposabiające odgrywają bardzo ważną rolę. Najważniejsze znaczenie wśród czynników zakaźnych odgrywają drobnoustroje z rodzaju Pasteurella, które są z reguły komensalami górnych odcinków dróg oddechowych. W leczeniu ostrego zapalenia płuc zastosowano lek z grupy fluorochinolonów — danofloxacin. Preparat podany w iniekcji domięśniowej cielętom o masie około 250 kg w dawce 1,25 mg/kg dziennie przez 3 do 5 kolejnych dni powodował szybkie ustąpienie gorączki i poprawę stanu klinicznego. Nie notowano przy tym nawrotów choroby.

BATES P. G., GROVES B. A.: Niepowodzenie jednorazowego leczenia świerzbu (*Psoroptes ovis*) przy użyciu ivermectin u owiec zarażonych sztucznie. (Failure of a single treatment with ivermectin to control sheep scab (*Psoroptes ovis*) artificially infested sheep). Vet. Rec. 128, 250-253, 1991 (11)

Ivermectin w dawce 200 µg/kg masy ciała zastosowany jednorazowo w iniekcji podskórnej lub podany peroralnie nie likwidował zarażenia wywołanego u owiec przez *Psoroptes ovis*. Owce zarażone sztucznie tym pasożytem. Lek podany peroralnie obniżał populację pasożyta w ciągu 24 godz. o 45%. Jednakże przez dalsze 38 dni obserwacji nie stwierdzano obniżenia liczby pasożytów. Iniekcja podskórna ivermectin spowodowała spadek populacji pasożyta o 90% w ciągu 10 dni. Niezależnie od sposobu stosowania leku w okresie 84 dni po leczeniu stwierdzano żywe świerzbowce. Leczenie nie wpływało na objawy kliniczne świerzbu pomimo, że część świerzbowców padała.