

BEATA MIZAK, MARTA CHROBOCIŃSKA, JERZY GÓRSKI

Nieszkodliwość i skuteczność jednoczesnego szczepienia królików przeciwko pomorowi i myksomatozie

Pracownia Immunoprofilaktyki Instytutu Weterynarii, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Summary

Safety and efficacy of simultaneous vaccination of rabbits against haemorrhagic pneumonia (pest of rabbits) and myxomatosis

Ten rabbits were simultaneously vaccinated against infectious haemorrhagic pneumonia (pest of rabbits) and myxomatosis using Cunivac and Myxovac M, respectively. Six rabbits were vaccinated using one of the examined vaccines. Vaccinated animals were normal during 21–24 days of observation and they were resistant to challenge with one or simultaneously two infective viruses. Out of 4 control rabbits infected with virus of haemorrhagic pneumonia 3 died, in two infected with myxomatosis virus developed generalized nodular form of the disease. A similar dynamics of an increase of the level of antibodies measured in the HI test was noted both in rabbits vaccinated against two diseases and against the pest of rabbits. Viral antigen was found in internal organs of a control rabbits challenged with the virus of pest of rabbits using the HA, immunofluorescence and immunoperoxidase tests. Virus was not detected in internal organs of vaccinated and challenged animals.

Spośród chorób wirusowych najpoważniejsze zagrożenie dla pogłowia królików, także w Polsce, stanowią: pomór (wirusowa krwiotoczna bronchopneumonia, viral haemorrhagic disease, VHD) i myksomatoza (1, 4, 6, 7, 10). Dla ograniczenia strat stosuje się opracowane w Instytucie Weterynarii monowalentne szczepionki przeciwko pomorowi (Cunivac) i myksomatozie (Myxovac M). Specyfika chowu królików i stałe zagrożenie epizootyczne jedną lub jednocześnie obydwooma jednostkami chorobowymi, stwarzają dla praktykującego lekarza i hodowcy trudny do rozstrzygnięcia problem kolejności stosowania szczepionek monowalentnych. Jednoczesne szczepienie eliminuje ponadto potrzebę dwukrotnego chwytania zwierząt i dodatkowego ich niepokojenia oraz zmniejsza koszt zabiegów. W związku z powyższym uznano za w pełni uzasadnione sprawdzenie nieszkodliwości i skuteczności jednocześnie stosowanych szczepionek monowalentnych przeciwko pomorowi i myksomatozie królików.

Materiał i metody

Króliki. Do badań użyto zwierząt o masie ciała od 2,20–3,40 kg, nie szczepionych, z hodowli wolnej od VHD i myksomatozy królików.

Szczepionki. Szczepionka przeciwko pomorowi królików zawierała inaktywowany formaliną szczep SGM, z dodatkiem żelu wodorotlenku glinu (5). Szczepionka przeciwko myksomatozie zawierała liofilizowany szczep MAV o mianie $10^{5,0}$ TCID₅₀ (2, 11). Szczepionki stosowano podskórnym, w oddzielnych iniekcjach. W dniu szczepienia oraz co 3–7 dni w okresie obserwacji pobierano krew do badania serologicznego i sprawdzano masę ciała oraz codziennie mierzono ciepłotę wewnętrzną. Wszystkie króliki szczepione oraz kontrolne do czasu zakażenia przebywały w jednym pomieszczeniu.

Zakażenie kontrolne. Użyto szczepu KGM wirusa pomoru (4), o mianie HA = 5120 oraz szczepu ZA wirusa myksomatozy (3), o mianie $10^{6,2}$ ID₅₀ (oznaczonym w teście zakażenia śródskórnego). Wirus pomoru wprowadzono domięśniowo w objętości 1 ml, a wirus myksomatozy podskórnym w ilości 1 ml i 4–5 kropel dospójówkowo. Do-

świadczenie prowadzono w 2 oddzielnych pomieszczeniach: w jednym przebywały króliki zakażone jednocześnie wirusami pomoru i myksomatozy oraz tylko wirusem pomoru, a w drugim zwierzęta zakażone tylko wirusem myksomatozy i kontrolne, nie zakażone.

Badanie sekcyjne i pobieranie materiału. Wszystkie króliki padłe lub uśpione badano sekcyjnie. W czasie sekcji pobierano wycinki wątroby, śledziony, płuc i nerek w celu przygotowania homogenizatu do badania odczynem hemaglutynacji (HA) w kierunku stwierdzenia zakażenia wirusem pomoru. Odczyn HA wykonywano w sposób uprzednio opisany (12). Również w czasie sekcji przygotowywano na szkiełkach podstawowych preparaty mazane lub odciskowe z narządów wewnętrznych.

Badanie metodą bezpośredniej immunofluorescencji (IF) wykonano w sposób podany przez Kubicę (8), a odczynem immunoperoxydazowym (IP) według zaleceń Kurstaka i wsp. (9). Koniugat IF stanowiła znakowana FITC surowica odpornościowa królika przeciwko pomorowi (Koniugat k dg. moru kraliku s. V-010989), a w odczynie IP używano mysich przeciwciał monoklonalnych, przeciwko wirusowi pomoru (MAbrHVD) i znakowanych peroksydazą immunoglobuliny kozy, przeciwko immunoglobulinom myszy (EIA — GAM s. V-020989) produkcji Bioveta Ivanovice.

Badanie serologiczne. Dynamikę narastania przeciwciał VHD oznaczano odczynem zahamowania hemaglutynacji (HI). Używano 4 j. HA szczepu KGM o mianie 5120 (4) oraz erytrocytów człowieka. Ogrzane w 56°C, przez 30 min., surowice rozcieńczano PBS 1:5, a następnie przygotowywano 2-krotnie wzrastające rozcieńczenie (do 1:640). Wiązanie antygeny z przeciwciałami prowadzono przez 60 min. w temperaturze pokojowej, dodawano 0,75% krwinki i wyniki oceniano po 6–18 godzinach.

Wyniki i omówienie

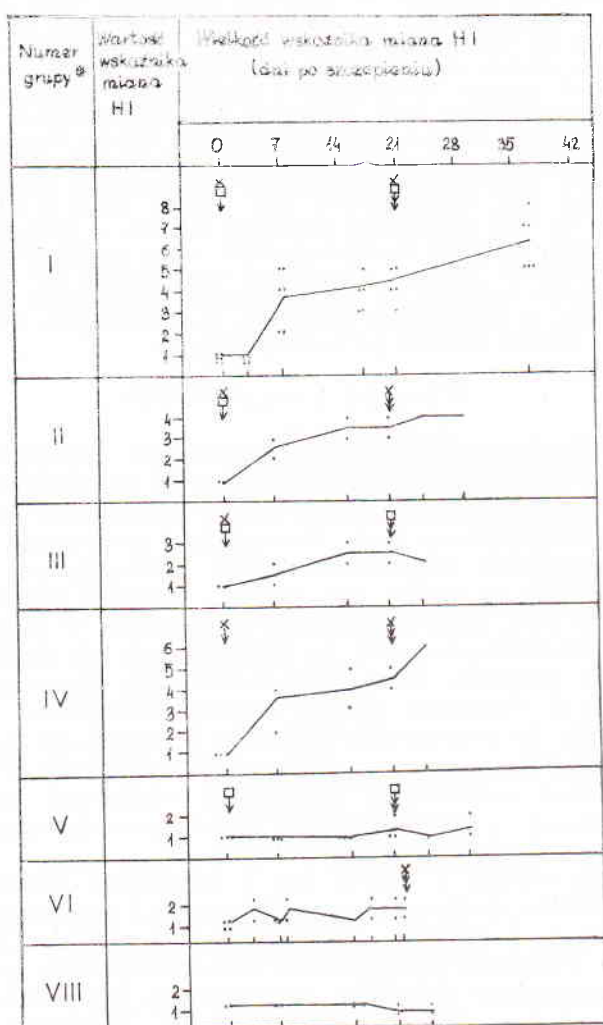
Obserwacje 10 królików jednocześnie szczepionych Cunivac i Myxovac M wskazywały, że zwierzęta zniosły zabieg tak samo dobrze jak po zastosowaniu szczepionek monowalentnych. Szczepienie 2 preparatami nie spowodowało zwiększenia reakcji lokalnych oraz nie wpłynęło na ogólny stan zdrowia, apetyt i przyrosty masy ciała, które kształtowały się podobnie w grupach doświadczalnych I–III, jak i kontrolnych lub szczepionych wyłącznie szczepionką Cunivac lub Myxovac M (tab. 1). Codzienne pomiary ciepłoty wewnętrznej wykazały, że utrzymywała się ona w granicach od 38,3°C do 39,5°C. Jedynym wyjątkiem był królik z III grupy zwierząt szczepionych jednocześnie obydwooma szczepionkami, u którego w 7 i 8 dniu obserwacji wystąpił wzrost ciepłoty do 41,0°C i 40,0°C.

Jak wynika z danych tab. 1 jednoczesne zakażenie kontrolne zjadliwymi wirusami pomoru i myksomatozy przeżyło 6 królików szczepionych równocześnie Cunivac i Myxovac M. Odporność wykazywały także króliki szczepione przeciwko pomorowi lub myksomatozie, ale zakażone tylko 1 z tych 2 wirusów. Natomiast z 4 królików nie szczepionych przeciwko VHD, 3 padły przed upływem 48 godzin, a 1 uśpiono. U zwierząt padłych obserwowano charakterystyczne, rozwinięte zmiany w narządach wewnętrznych, odpowiadające uprzednio opisanym (4, 6). U królika uśpionego zmiany były mało charakterystyczne. Spośród zwierząt szczepionych i zakażonych wirusem pomoru po 3 i 8 dniach zgładzono po 1 króliku; pozostałe uśpiono po 18 dniach od zakażenia. Jakichkolwiek objawów klinicznych i anatomo-

Tab. 1. Występowanie odporności na zakażenie kontrolne wirusem pomoru królików i/lub wirusem myksomatozy po 20–21 dniach po zastosowaniu szczepionek Myxovac M i Cunivac

Nr grupy	Liczba królików	Zastosowanie szczepionki przeciwko:		Wynik zakażenia wirusem:	
		pomorowi Cunivac	myksomatozie Myxovac M	pomoru królików *	myksomatozy królików *
I	6	+	+	6/6	6/6
II	2	+	+	2/2	n.z.
III	2	+	+	n.z.	2/2
IV	3	+	—	3/3	n.z.
V	3	—	+	n.z.	3/3
VI	4	—	—	0/4	n.z.
VII	2	—	—	n.z.	0/2
VIII	2	—	—	2/2 **	2/2 **

Objaśnienia: * — w liczniku liczba królików zdrowych, w mianowniku liczba zwierząt zakażonych, ** — króliki kontrolne — nie szczepione i nie zakażone, n.z. — nie zakażono.



Objaśnienia:

- * — układ doświadczenia wg tab. 1
- x — szczepienie przeciwko pomorowi
- y — szczepienie przeciwko myksomatozie
- — zakażenie kontrolne wirusem pomoru
- ◇ — zakażenie kontrolne wirusem myksomatozy

Ryc. 1. Dynamika narastania przeciwciał hamujących hemaglutynację (HI) u królików szczepionych przeciwko pomorowi i/lub myksomatozie

Tab. 2. Wykrywanie wirusa pomoru królików w narządach wewnętrznych zwierząt doświadczalnie zakażonych, odczynami hemaglutynacji (HA), immunofluorescencji (IF) i immunoperoksydazowym (IP)

Charakterystyka materiału	Rodzaj narządu	Miano HA	Sposób przygotowania preparatu do barwienia	Wynik badania odczynu	
				IF	IP
Królik zakażony doświadczalnie, padł po 36 godzinach z objawami silnej duszności, podczas sekcji obserwowano charakterystyczne krwiotoczne zapalenie płuc, obrzęk, przekrwienie i zwyrodnienie wątroby, oraz obrzęk śledziony i nerek	wątroba	1280	rozmaz odcisk	+	+
	śledziona	1280	rozmaz odcisk	+ / —	+
	płuca	640	rozmaz odcisk	+	+
	nerka	1280	rozmaz odcisk	+	+
Królik zakażony doświadczalnie, uśpiony po 48 godzinach, podczas sekcji obserwowano nieliczne punkcikowate wybroczyny płuc i nieznaczny obrzęk wątroby	wątroba	40	rozmaz odcisk	+ / —	+
	śledziona	< 10	rozmaz odcisk	—	—
	płuca	< 10	rozmaz odcisk	+ / —	+ / —
	nerka	< 10	rozmaz odcisk	—	+ / —

Objaśnienia: + — wynik dodatni, — — wynik ujemny, + / — — wynik wątpliwy.

mopatologicznych wskazujących na VHD nie zaobserwowano. Zakażenie doświadczalne zjadliwym wirusem myksomatozy wykazało, że odporne były króliki szczepione (2 jednocześnie przeciwko pomorowi i myksomatozie i 3 tylko przeciwko myksomatozie). Natomiast u 2 królików kontrolnych wystąpiła uogólniona forma guzowata. Króliki kontrolne nie szczepione i nie zakażone pozostały zdrowe przez 18-dniowy okres obserwacji.

Poza zakażeniem doświadczalnym efekt immunogeny szczepionki przeciwko VHD oceniano na podstawie dynamiki narastania przeciwciał. Z ryc. 1 wynika, że okazała się ona podobna u królików szczepionych jednocześnie przeciwko pomorowi i myksomatozie (gr. I, II, III) z obserwowaną u królików szczepionych tylko przeciwko pomorowi (gr. IV). Ponadto ujawnił się wyraźny efekt stymulujący zakażenia doświadczalnego (gr. I i II). Natomiast u królików szczepionych wyłącznie przeciwko myksomatozie i u kontrolnych nie stwierdzono wzrostu miana przeciwciał przeciwko VHD. Omawiając ryc. 1 wyjaśnia się dodatkowo, że miano HI w dniu szczepienia wahało się od 5 do 80, a potem wzrastało. Stąd też wartość miana w dniu szczepienia przyjęto jako 1, a kolejne liczby odpowiadają rozcieńczeniu, w których stwierdzono wynik dodatni. Np. jeżeli miano w dniu szczepienia wynosiło 40, po 3 dniach 40, po 7 dniach 80, po 17 dniach 160, a po 21 dniach 320, to odpowiednie liczby wynoszą 1, 1, 2, 3 i 4. Umożliwiło to, jak się wydaje, bardziej czytelne przedstawienie wyników. Należy zaznaczyć, że ciepłota inibitory hemaglutynacji wirusa pomoru w surowicach królików występują stosunkowo często, a ich usunięcie

następcza poważne trudności. Natomiast w dotąd prowadzonych badaniach nie wykazano jednoznacznie ich wpływu na występowanie odporności na zakażenie doświadczalne oraz na dynamikę wzrostu miana przeciwciał HI po zastosowaniu szczepionki.

W celu dodatkowej oceny odporności poszczepiennej podjęto poszukiwanie obecności wirusa (antygeny) pomoru królików w narządach wewnętrznych. W homogenizacie oraz w preparatach odciskowych i mazanych, sporządzonych z wątroby, śledziony, płuc i nerek królików jednocześnie szczepionych Cunivac i Myxovac M, a następnie zakażonych wirusem pomoru, metodami HA, IF i IP nie wykazano obecności antygeny wirusowego. Badaniom poddano 1 królika uśpionego 3 dnia po zakażeniu, 1 uśpionego 7 dnia i 2 sekcjonowane po 18 dniach obserwacji. Wyniki badania 2 królików kontrolnych przedstawiono w tab. 2. Z tabeli wynika, że wysokie miano HA (640—1280) wystąpiło tylko w homogenizatach sporządzonych z narządów królika padłego po 36 godzinach po zakażeniu, wśród charakterystycznych objawów klinicznych i anatomopatologicznych VHD. Natomiast u królika, którego uśpiono po 48 godzinach, a niewielkie zmiany obserwowano jedynie w wątrobie i płucach, dodatni odczyn HA wystąpił jedynie z homogenizatem płuc (miano 40). Z tab. 2 wynika ponadto, że odczyn HA okazał się bardziej niezawodnym niż testy IF i IP. Szczególnie niekorzystnym było występowanie wyników wątpliwych.

Reasumując wyniki można stwierdzić, że jednoczesne zastosowanie krajowych szczepionek przeciwko pomorowi (Cunivac) i myksomatozie (Myxovac M) powoduje zwiększenia reakcji w miejscu iniekcji oraz zaburzeń w ogólnym stanie zdrowia. Uzyskiwana odporność poszczepienna może być uznana jako co najmniej równorzędna z występującą po stosowaniu szczepionek monowalentnych. Uzyskane wyniki umożliwiły podjęcie jednoczesnego stosowania szczepionek w szerokich doświadczeniach terenowych.

Piśmiennictwo

1. Górski J., Mizak B.: Życie wet. 50, 148, 1985.
2. Górski J., Mizak B.: Medycyna Wet. 41, 113, 1985.
3. Górski J., Mizak B., Mizak Z.: Medycyna Wet. 41, 282, 1985.
4. Górski J., Mizak B., Mizak Z., Komorowski A.: Życie wet. 43, 268, 1988.
5. Górski J., Mizak B., Kęsy A., Fitzner A., Łój H.: Medycyna Wet. 45, 519, 1989.
6. Górski J., Kęsy A., Fitzner A., Łój H., Mizak B.: Hod. Drob. Inw. 37, 14, 1989.
7. Górski J., Mizak B., Kęsy A., Fitzner A.: Hod. Drob. Inw. 38, 17, 1990.
8. Kubica J. F.: Immunofluorescencja. PZWL, Warszawa 1967.
9. Kurstak E., Tijssen P., Kurstak C.: Immunoperoxidase technique in diagnostic virology and research: principles and applications. W: Comparative diagnosis of viral diseases. t. 11, Academic Press, New York 1977.
10. Lis H., Grudziński J.: Życie wet. 60, 152, 1985.
11. Mizak B.: Właściwości wybranych szczepów wirusów fibromatozy i myksomatozy, ze szczególnym uwzględnieniem przydatności do produkcji szczepionki. Praca dokt. Instytut Weterynarii. Puławy 1987.
12. Mizak B., Górski J., Kozaczyński W.: Bull. vet. Inst. Puławy, w druku.

Adres autora: prof. dr hab. Jerzy Górski, ul. Kościuszki 19/8, 24-103 Puławy

LEONARD STRZAŁKOWSKI, ANTONI KOPCZEWSKI

Przeżywalność w ziemi i w wodzie pałeczek rodzaju *Salmonella* izolowanych od lisów

Zakład Higieny Weterynaryjnej, ul. Kaprów 10, 80-316 Gdańsk-Oliwa

Summary

Survival of *Salmonella* sp. isolated from foxes in the soil and water

The examinations were performed in 1988—1990. The purpose of the work was to investigate the survival of *Salmonella* in the soil and water. *Salmonellae* originated from dead or killed foxes and swabs taken from the vagina or anus. The isolated strains were classified as *S. choleraesuis*, *S. dublin*, *S. enteritidis* and *S. typhimurium*. Seedings were done on solid media, i.e. basic agar medium, the BGA, Endo, McConkey's and Slavin's media and liquid media, i.e. MK and SF. An average period of survival in the soil of individual serotypes was: *S. choleraesuis* — 257 days, *S. dublin* — 381 days, *S. enteritidis* — 451 days and *S. typhimurium* — 321 days. An average survival period in water was: *S. choleraesuis* — 18 days, *S. dublin* — 14 days, *S. enteritidis* — 25 days and *S. typhimurium* — 22 days.

gdyż kontakt zwierząt z glebą jest zdecydowanie częstszy niż ze zbiornikami wody. Prace Slavkova (cyt. 4) wykazały, że niektóre serotypy salmoneli mogą przeżyć w glebie od 120 do 150 dni, natomiast ich przeżywalność uzależniona była od temperatury, pH oraz składników odżywczych znajdujących się w glebie. Według autorów amerykańskich salmonela w ziemi ogrodowej przeżywa około 8—9 miesięcy (14).

Podobnie jak w ziemi, przeżywalność pałeczek *Salmonella* w wodzie i ściekach zależy od wielu czynników, przy czym najważniejszymi wydają się być: działanie promieni słonecznych, obecność w środowisku bakteriofagów i drobnoustrojów antagonistycznych, z których najczęściej wymienia się: *E. coli* i *Pseudomonas aeruginosa* oraz pierwotniaki i grzyby (4, 6, 13, 16). Taylor (cyt. 16) podkreśla, że drobnoustroje te o wiele wolniej obumierają w czystej wodzie niż w zanieczyszczonej wodzie rzecznej. Najwięcej salmoneli izolowano na północy b. NRD i RFN wzdłuż rzek i na bagnistych łąkach (4). Z wody rzecznej izolowano najczęściej *S. typhi*, *S. paratyphi*, *S. typhimurium* i *S. enteritidis* (4, 16). Badania Poppa (13) wód rzeki Oker (RFN) wykazały występowanie ponad 50 serotypów rodzaju *Salmonella* w próbkach wody, przy czym najczęściej była to: *S. oranienburg*, *S. mandschica*, *S. braenderup*, *S. virchow*, *S. typhimurium*. Epizootia i epidemia salmonelozy w Szwecji spowodowana była zakażeniem rzek, do któ-

Salmonelozy z punktu widzenia epidemiologii i epizootologii są klasycznymi zoonozami (1, 4, 7, 10, 12, 16, 17, 20, 22). Liczne publikacje dotyczące przeżywalności salmoneli w glebie wskazują, że jest ona ważnym ogniwem w przekazywaniu zarazka w środowisku zewnętrznym (2, 4, 15, 19). Ziemia uprawna oraz pastwiska są stale narażone na zanieczyszczenia wydaliniami chorych ludzi i zwierząt. Gleba może odgrywać praktycznie większą rolę w przenoszeniu zarazków niż woda,