

KRYSTYNA WAWRZKIEWICZ, JANUSZ WAWRZKIEWICZ, GRAŻYNA ZIÓLKOWSKA

## Swoista immunoprofilaktyka grzybicy bydła przy użyciu inaktywowanej szczepionki skojarzonej

Zakład Mikrobiologii Weterynaryjnej Wydziału Weterynaryjnego AR,  
ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

### Summary

#### Specific immunoprophylaxis against cattle ringworm by means of inactivated combined vaccine

The main purpose of the studies was to evaluate the possibility to replace alive monovalent vaccines with a combined one possessing a wide spectrum of activity. The experiments were carried out on calves (16 animals) in two periods, i.e. in autumn-winter season (group I and Ia) and in spring-summer season (group II and IIa). The group I was given the combined vaccine twice at intervals of 10 days intramuscularly, and group II apart from the vaccine received levamisole 4 times, i.e. before vaccination and at day 3, 10 and 17 after the first dose of the vaccine.

The combined vaccine contained an inactivated suspension of the *Trichophyton verrucosum* and *T. mentagrophytes* var. *granulosum* strains, prepared separately according to the method described previously (61) and inactivated with formaldehyde. It was found that the combined vaccine elicited a distinct immune response of cellular type. At week 4 after the first dose of the vaccine there was found in all the animals except one a positive result of leukocyte migration inhibition (from 22% to 54%). The increased values of the test lasted for the next two weeks. After 8 weeks they decreased especially in the group of animals that had not received levamisole. A delayed type of hypersensitivity accompanied the positive reactions assessed by the cell migration inhibition test. A drop of lymphocytes producing rosettes took place at day 3 after vaccination, however, at day 10, particularly in the group treated with levamisole, there was observed an increase of the percentage of T lymphocytes ( $p \leq 0.001$ ). With the both groups of calves the percentage of T lymphocytes forming E rosettes came back to the state before vaccination at day 17. Fungicidal activity of leukocytes, determined in the same periods of time increased at day 3 following vaccination. However, at day 10 there was observed not only a drop of fungicidal activity but a growth stimulation of the fungus. After 4 weeks fungicidal activity attained the level before vaccination. The challenge trial performed at week 6 after the first dose of the vaccine confirmed a distinct resistance of the animals immunised (tab. 4). The calves treated with the combined vaccine possessed a congenial immunity against the two species of *Trichophyton* which had been used for experimental infection.

Trudności w zwalczaniu i zapobieganiu grzybicy skórnej zwierząt przy użyciu środków chemicznych czy antybiotyków sprawiają, że główną uwagę koncentruje się obecnie na opracowaniu swoistych immunopreparatów. Pierwszą generacją tego typu szczepionek opracowanych w latach sześćdziesiątych stanowiły preparaty inaktywowane (15, 17, 18, 29, 38), które jednak ze względu na niską immunogenność nie znalazły zastosowania praktycznego. Lata późniejsze przyniosły zdecydowany postęp w tej dziedzinie dzięki opracowaniu nowej serii szczepionek zawierających żywe, atenuowane szczepy dermatofitów (33, 44, 48, 49, 59). Były to preparaty monowalentne, odrębne dla poszczególnych gatunków zwierząt i skuteczne w przypadkach infekcji patogenem homologicznym. W sytuacji, kiedy zwierzęta ulegają zakażeniu heterologicznym gatunkiem grzyba, szczepionki monowalentne są mało efektywne (58).

Wiadomo, że najczęstszym czynnikiem etiologicznym trychofityzy bydła jest *Trichophyton verrucosum* (16, 22), znane są jednak przypadki, gdy schorzenie jest wywołane przez *T. mentagrophytes* (7, 27, 28, 30, 31, 40, 41, 45, 47, 52). Natomiast u lisów, u których grzybica jest przede wszystkim następstwem zakażenia *T. mentagrophytes* (1, 36, 49, 66), zdarzają się infekcje spowodowane *T. verrucosum* (36, 49), a także *T. quinckeanum* i *M. canis* (13). Są również doniesienia o infekcjach mieszanych u zwierząt, gdzie rolę etiologiczną odgrywają dwa odrębne gatunki dermatofitów (6, 41). Ponadto ogólną niedogodnością szczepionek żywych jest ich stosunkowo krótki termin ważności (nielifilizowane) oraz niebezpieczeństwo zakażenia środowiska i personelu lekarsko-zootechnicznego szczepem, który może ulec rewersji do postaci zjadliwej. W związku z tym odżyła ponownie idea opracowania szczepionek inaktywowanych (24, 35, 46, 60, 62, 63).

Obecne badania dotyczyły przygotowania inaktywowanej szczepionki skojarzonej, zawierającej wyselekcjonowane szczepy *T. verrucosum* i *T. mentagrophytes* (najczęstsze czynniki trychofityzy zwierząt) i oceny jej właściwości immunogennych i ochronnych u cieląt przetrzymywanych w warunkach ściśle kontrolowanych. Dodatkowo dla poprawienia stanu odpornościowego zastosowano u niektórych cieląt lewamizol — jako immunoregulator.

Zasadniczym celem pracy było określenie, czy inaktywowana szczepionka skojarzona, jako preparat o szerokim spektrum działania, mogłaby zastąpić stosowane dotąd odrębne, żywe szczepionki monowalentne.

### Materiał i metody

Grupy zwierząt. Badania przeprowadzono w dwóch terminach, tj. jesienno-zimowym (I, II, III) i wiosenno-letnim (Ia, IIa, IIIa). Każde badanie obejmowało 8 zwierząt podzielonych na 3 grupy:

- grupa I i Ia (po 3 sztuki) otrzymała dwukrotnie domięśniowo szczepionkę skojarzoną;
- grupa II i IIa (po 3 sztuki) otrzymała oprócz szczepionki dodatkowo lewamizol jako immunoregulator;
- grupa III i IIIa (po 2 sztuki) stanowiła grupę kontrolną, nie poddaną żadnym zabiegom.

Preparaty. Szczepionkę skojarzoną stanowiła inaktywowana zawiesina szczepów *Trichophyton verrucosum* 43 oraz *Trichophyton mentagrophytes* var. *granulosum* o gęstości około  $2-8 \times 10^7$  c.f.u./ml<sup>-1</sup>. Każdą ze szczepionek monowalentnych przygotowywano oddzielnie wg metody opisanej uprzednio (61) i inaktywowano formaliną. Cielętom podawano domięśniowo szczepionkę skojarzoną dwukrotnie co 10 dni w dawce po 4-6 ml. Lewamizol (Nilwerm inieccio Biowet — Gorzów Wielkopolski) stosowano podskórnie w dawce 1,0 do 1,5 ml na sztukę 4-krotnie, tj. przed szczepieniem oraz na 3, 10 i 17 dzień po pierwszej dawce szczepionki.

Test hamowania migracji. Technika wykonania testu została podana uprzednio (61). Źródłem uczulonych komórek była krew pobierana z żyły jarzmowej cieląt, a jako swoisty antygen służyła trychofityna (M<sub>1</sub>) uzyskana ze szczepu *T. mentagrophytes* 1, stosowana w stężeniu

0,005 ml na 1 ml podłoża. Badania przeprowadzono po 4, 6 i 8 tygodniach od pierwszej dawki szczepionki.

Test rozetowy E. Krew do badań pobierano po 0, 3, 10, 17, 27, 41 i 56 dniach po pierwszej iniekcji szczepionki. Do 20 ml heparynizowanej krwi ( $10 \text{ j ml}^{-1}$ ) dodawano 0,3 g karbamylku żelaza i inkubowano na trzęsawce w  $37^\circ\text{C}$  przez 45 minut. Następnie krew mieszano z równą objętością buforowanego roztworu soli (PBS), nawarstwiano na gradient „Lymphoprep” (Nycomed As, Oslo, Norway), stosując 5 ml preparatu i wirowano w temperaturze pokojowej przez 35 minut przy 1100 g. Zbierano warstwę limfocytów i uzyskane komórki przepłukiwano dwukrotnie PBS wirując każdorazowo przez 15 minut przy 200 g. Osad komórek zawieszano w płynie odżywcym (płyn Eagle'a, 2% surowicy cielęcej inaktywowanej, penicylina  $100 \text{ j ml}^{-1}$ , streptomycyna  $50 \text{ ug ml}^{-1}$ ), ustalając gęstość około  $10^6$  komórek  $\text{ml}^{-1}$ . Do odczynu stosowano erytrocyty barana w zawiesinie o składzie: 0,1 ml przemytych 5-krotnie PBS krwinek barana, 2 ml roztworu heparyny ( $200 \text{ j ml}^{-1}$  PBS), 2,8 ml 24% roztworu Ficoll 400. Zawiesinę limfocytów bydłych (50 ul) i erytrocytów barana (50 ul) wirowano w temperaturze  $4^\circ\text{C}$  przez 15 minut przy 450 g, a następnie pozostawiano w tej temperaturze przez noc. Z wym. materiału wykonywano preparaty i pod mikroskopem określano liczbę rozetek przypadającą na ogólną liczbę 500 limfocytów. Wyniki przedstawiano w procentach.

Grzybobójczość leukocytów. Leukocyty z krwi obwodowej cieląt uzyskiwano podobnie jak przy teście hamowania migracji; używano zawiesiny w płynie odżywcym o gęstości około  $2 \times 10^7 \text{ ml}^{-1}$ . Aktywność bójczą leukocytów określano w stosunku do zarodników szczepu *Trichophyton mentagrophytes* var. *granulosum* (gęstość około  $2 \times 10^6$  komórek  $\text{ml}^{-1}$ ). Badanie przeprowadzono w szklanych probówkach silikonowanych, do których dodawano po 0,25 ml zawiesiny leukocytów, zawiesiny zarodników, świeżej surowicy autologicznej i płynu odżywczego. Równocześnie nastawiano kontrolę surowicy (0,25 ml surowicy autologicznej, 0,25 ml zawiesiny zarodników i 0,50 ml płynu odżywczego); kontrolę leukocytów (0,25 ml zawiesiny leukocytów, 0,25 ml zawiesiny zarodników i 0,50 ml płynu odżywczego) i kontrolę wzrostu grzyba (0,25 ml zawiesiny zarodników i 0,75 ml płynu odżywczego). Inkubację prowadzono w łaźni wodnej w  $37^\circ\text{C}$  przez 2 godziny, a następnie celem destrukcji leukocytów dodawano do probówek po 0,25 ml 2,5% dezoksychołanu sodu o pH 8,7. Z kolei wykonywano posiewy na stałe podłoże Sabourauda (po 2 płytki na każde rozcieńczenie). Po 4 dniach inkubacji liczone kolonie grzyba na poszczególnych płytkach. Aktywność bójczą leukocytów wyrażoną w procentach obliczano według wzoru:

$$1 - \frac{\text{średnia liczba kolonii w próbie badanej}}{\text{średnia liczba kolonii w kontroli}} \times 100$$

Badania przeprowadzono w analogicznych terminach jak przy teście rozetkowym E.

Test skórnny. Jako alergen stosowano filtrat 4-miesięcznej hodowli szczepu *T. mentagrophytes* 1 na cukrowym podłożu Sabourauda. Trychofitynę podawano śródskórnie w okolicy szyi w ilości 0,4 ml, a wyniki oceniano po 24 godzinach. Różnice w grubości fałdu skórny powyżej 3 mm traktowano jako wynik dodatni.

Odczyn HA biernej. Do uczulania erytrocytów baranich używano antygeny przygotowanego z grzybni 4 tygodniowej hodowli *T. mentagrophytes* 1. Przemyte mycelium grzyba liofilizowano, a następnie rozbijano w mikserze ( $12\,000 \text{ rpm}$  przez 30 minut), zawieszano w jałowej wodzie destylowanej i wirowano przy 3000 g przez 30 minut. Uzyskanym supernatantem oślaszczano krwinki baranie. Odczyn wykonywano mikrometoda w płytkach plastikowych wprowadzając do poszczególnych baseneków po 80 ul kolejnych rozcieńczeń badanych surowic i 80 ul 1% zawiesiny uczulonych erytrocytów. Wyniki odczytywano po 24-godzinnej inkubacji w  $37^\circ\text{C}$ .

Próba challenge. Po 6 tygodniach od podania pierwszej dawki szczepionki przeprowadzono doświadczalne zakażanie zwierząt szczepionych i kontrolnych zawiesiną zjadliwych szczepów *T. verrucosum* „Z” i *T. mentagrophytes* var. *granulosum* 58. Każde zwierzę inokulowano równocześnie dwoma różnymi szczepami stosując po 4 różne dawki zakażające grzyba. Obserwacje kliniczne prowadzono przez 6 tygodni, a ze zmian chorobowych pobierano materiał do badań mikologicznych.

## Wyniki i omówienie

Badania miały na celu rozszerzoną ocenę inaktywowanej szczepionki skojarzonej przeciwko trychofitozie oraz rolę lewamizolu jako immunomodulatora w poszczepiennej odpowiedzi immunologicznej. Badania wykonano na 2 zasadniczych grupach zwierząt (tab. 1), z których jedna (I i Ia) otrzymywała jedynie szczepionkę, a druga (II i IIa) szczepionkę oraz lewamizol.

Odpowiedź immunologiczną typu komórkowego i humoralnego badanych zwierząt ilustruje tab. 2. Stwierdzono, że inaktywowana szczepionka skojarzona niezależnie od pory roku spowodowała wyraźną odpowiedź typu komórkowego u wszystkich badanych cieląt. Po 4 tygodniach po I dawce szczepionki (poza 1 sztuką) odnotowano u zwierząt pozytywny wynik hamowania migracji sięgający od 22% do 54%. Podwyższone wartości tego testu utrzymywały się przez następne dwa tygodnie. Po 8 tygodniach ulegały one obniżeniu, zwłaszcza w grupie zwierząt nie otrzymujących immunomodulatora. Pozytywnym reakcją hamowania migracji komórek towarzyszyła nadwrażliwość typu późnego; wartości testu skórny mierzone 4 i 6 tygodni po szczepieniu wahały się od 2,9 do 9,6 zależnie od zwierzęcia i czasu badania. Nie stwierdzono, aby lewamizol wywierał wpływ na intensywność reakcji alergicznej.

Dwukrotne podanie szczepionki nie indukowało wyraźniejszego wzrostu miana przeciwciał wykrywanych odczynem HA biernej w okresie 2 miesięcy po podaniu preparatu. Miana wahały się w granicach 20 do 160 w zależności od badanego zwierzęcia. Dopiero po dawce challenge (mimo słabo zaznaczonych zmian klinicznych — tab. 5) u większości zwierząt miana przeciwciał wzrosły w 11 tygodniu obserwacji do wartości 320—1280.

Kolejnym testem *in vitro* pozwalającym na pośrednią ocenę stanu odporności komórkowej był test rozetowy E. Wykazano, że na 3 dzień po szczepieniu u wszystkich cieląt nastąpił statystycznie znaczny ( $p \leq 0,10$ ) spadek odsetka limfocytów tworzących rozetki. Po 10 dniach, szczególnie w grupie zwierząt którym podawano lewamizol, stwierdzono wzrost odsetka limfocytów T ( $p < 0,001$ ); u pozostałych zwierząt obserwowano niższe wartości komórek tworzących rozety. Po 17 dniach w obu grupach cieląt procent limfocytów tworzących rozety osiągnął stan wyjściowy utrzymujący się na zbliżonym poziomie do końca obserwacji. W tych samych przedziałach czasowych badano aktywność bójczą zawiesiny leukocytów w surowicy autologicznej szczepionych cieląt (tab. 3). Uzyskane dane wskazują na wzrost, w stosunku do stanu wyjściowego, aktywności przeciwgrzybowej w 3 dniu po podaniu szczepionki ( $p \leq 0,01$ ). Z kolei, w 10 dniu obserwowano spadek działania grzybobójczego, a w wielu przypadkach, zwłaszcza w grupie zwierząt nie otrzymujących lewamizolu, nastąpiło zjawisko pobudzenia wzrostu komórek grzyba. Po 4 tygodniach wartości aktywności grzybobójczej osiągnęły poziom sprzed okresu szczepienia i taki poziom utrzymywał się z niewielkimi odchyleniami do końca badań.

Próba challenge przeprowadzona w 6 tygodniu po I dawce szczepionki wykazała wyraźnie zwiększoną niewrażliwość immunizowanych zwierząt w porównaniu do kontroli (tab. 4). Dawki zjadliwych szczepów *T. verrucosum* Z i *T. mentagrophytes* var. *granulosum* zawierające ok. 1000 DIM i niższe nie powodowały najczęściej u badanych zwierząt zmian klinicznych. Dopiero aplikacja wyższej dawki grzyba przełamywała barierę ochronną. Niemniej jednak zmiany kliniczne były wyraźnie

Tab. 1. Charakterystyka badanych grup zwierząt

Grupa badana	Zwierzę Nr	Wiek w tyg. w dniu szczepienia	Dawki						Wiek w tyg. w dniu challenge	Data challenge Warunki środowiskowe
			szczepionka		Lewamizol					
			I	II	I	II	III	IV		
I	48805	9	6	5					15	7—8.12.1988 9—11°C 77—86‰  13—14.04.1989 19—20°C 89—91‰
	55485	2	5	5					8	
	459	7	6	5					13	
408	4	6	5	1,5	1,0	1,3	1,3	10		
II	71641	5	6	5	1,5	1,0	1,3	1,3	11	
	71642	5	6	5	1,5	1,0	1,3	1,3	11	
III	49984	—							8	
kontrola	29103	—							11	
Ia	71649	5	5	5					11	
	45048	3	5	5					9	
	35551	2	5	5					8	
IIa	75851	2	4	5	1,2	1,0	1,3	1,3	8	
	71650	3	5	5	1,5	1,0	1,3	1,3	9	
IIIa	48807	3	5	5	1,5	1,0	1,3	1,3	9	
	48810	—							8	
kontrola	48812	—							10	

Tab. 2. Odpowiedź immunologiczna cieląt po podaniu inaktywowanej szczepionki skojarzonej przeciwko grzybicy skórnej

Grupa badana	Zwierzę Nr	Test hamowania migracji leukocytów ‰ hamowania			Test alergiczny		Odczyn HA biernej (wysokość miana)		
		4 tyg.	6 tyg.	8 tyg.	4 tyg.	6 tyg.	0 tyg.	8 tyg.	11 tyg.
I	48805	30	35	19	4,8	5,3 *	40 **	160	320
	55485	26	39	21	5,0	5,0	0	30	320
	459	16	30	11	3,0	3,2	0	160	320
Ia	71649	54	36	18	9,2	9,6	0	40	40
	45048	35	35	46	3,9	4,2	20	40	1280
	35551	37	50	-20	5,8	6,5	20	40	1280
II	408	22	41	28	4,2	7,5	40	160	1280
	71641	23	30	27	3,0	3,2	40	160	1280
	71642	32	38	24	2,9	3,7	80	160	320
IIa	75851	50	38	52	3,2	4,9	40	20	40
	71650	29	33	41	5,2	8,3	20	40	640
kontrola	48807	32	31	27	6,0	7,4	20	80	320
	49984				1,5	1,2			
	III	29103			1,0	0,9			
IIIa	48810				2,2	1,9			
	48812				1,4	2,3			

Objaśnienia: \* — różnica w grubości fałdu skórniego w mm, \*\* — miana przeciwciał przed iniekcją szczepionki.

słabiej wyrażone i szybciej ustępowały niż u zwierząt kontrolnych.

Badania mikologiczne wykazały niższy procent izolacji grzyba z materiału pobranego od zwierząt szczepionych w porównaniu do kontrolnych, potwierdzając tym samym zwiększoną odporność zwierząt immunizowanych. Zwierzęta którym podano szczepionkę skojarzoną cechowały się zbliżonym stopniem niewrażliwości na obydwa szczepy użyte do doświadczenia.

Domięśniowe podanie inaktywowanej szczepionki, zawierającej antygeny *T. verrucosum* i *T. mentagrophytes*, stanowiło wystarczający bodziec do stymulacji odpowiedzi immunologicznej typu komórkowego, mierzonej testem hamowania migracji, testem rozetowym i testem skórnym. Można przyjąć, że w pierwszym etapie wprowadzanie obcych antygenów grzybowych spowodowało zaangażowanie się leukocytów w miejscu iniekcji szczepionki. Niewykluczone, że pewną rolę mogły mieć tu chemotaktyczne oddziaływanie preparatów grzybowych natury enzymatycznej (11, 12) uwalnianych podczas dezintegracji grzyba i powodujących włączenie się limfocytów tworzących rozety w proces rozpoznawania antygeny. Stąd 3 dni po podaniu szczepionki, obserwuje się spadek we krwi obwodowej badanych cieląt (w porównaniu z grupą kontrolną) liczby limfocytów T. Podobne, przejściowe obniżenie liczby limfocy-

Tab. 3. Poziom limfocytów T we krwi obwodowej oraz aktywność grzybobójcza leukocytów cieląt poddanych immunizacji inaktywowaną szczepionką skojarzoną przeciwko grzybicy bydła

Dzień badania	Grupa zwierząt	‰ limfocytów tworzących rozetki E (x; ± s)		Stopień inaktywacji (pobudzenia) komórek grzyba (x; ± s)	
		x	± s	x	± s
0	I	32,97	3,21	30,3	7,7
	II	39,12	2,10	63,7	12,0
3	I	22,62	4,47	75,3	10,5
	II	22,60	4,29	78,3	10,1
10	I	18,05	2,00	-198,3	233,3
	II	35,37	3,28	8,2	104,2
17	I	35,25	4,26	0,2	48,8
	II	35,63	5,66	43,7	8,3
27	I	32,18	5,42	57,5	19,8
	II	39,66	7,19	60,8	14,6

Objaśnienia: x — średnia arytmetyczna, I — grupa zwierząt uodpornionych szczepionką (6 sztuk), II — grupa zwierząt uodpornionych szczepionką i otrzymujących dodatkowo lewamizol (6 sztuk).

tów T stwierdzono we wczesnym stadium niektórych chorób wywoływanych przez bakterie i wirusy (37). Obniżenie natomiast liczby komórek T tworzących rozety obserwowano u bydła z enzoptyczną białaczką (56) oraz ludzi w przypadkach chronicznych dermatomikoz (3, 4), ciężkich systematomikoz (50) lub ziarnicy złośli-

Tab. 4. Wyniki doświadczalnego zakażenia cieląt poddanych immunizacji inaktywowaną szczepionką skojarzoną przeciwko grzybicy skórnej

Grupa badana	Zwierzę Nr	Badanie kliniczne															Badanie mikologiczne (hodowla) % pozytywn. hodowli									
		Dawka zakażająca															TvZ	Tm vgr								
		I			II			III			IV			Tm vgr												
2	3	5	2	3	5	2	3	5	2	3	5	2	3	5	2	3	5	2	3	5	TvZ	Tm vgr				
I	48805	—	(+)*	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	10	10	
	55485	—	(+)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	10	10	
	459	—	(+)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	20	20	
	71649	(+)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	10	20	
Ia	45048	—	(+)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	10	10	
	35551	(+)	+	—	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	20	20	
	408	(+)	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	10	20	
II	71641	—	(+)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	20	10	
	71642	—	(+)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	20	20	
	75851	(+)	±	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	10	30	
IIa	71650	(+)	+	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	20	10	
	48807	—	(2+)	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	30	30	
kontrola	49984	—	(2+)	+	—	+	+	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	40	80
	29103	+	(2+)	+	+	2+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	60	70
III	48810	—	(3+)	2+	+	3+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	50	90
	48812	(2+)	3+	2+	+	2+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	70	70

Objaśnienia: I — dawka masywna; II — 1000 DIM; III — 100 DIM; IV — 10 DIM; DIM — minimalna dawka infekcyjna —, ±, +, 2+, 3+ = intensywność zmian klinicznych; 2, 3, 5 — wyniki po 2, 3, 5 tygodniach po zakażeniu (+)\* — materiał badany mikologicznie.

wej (55). Należy je rozważać w kategoriach związanych z immunosupresją. W naszym jednak przypadku preparat nie wydaje się wywierać efektu immunosupresyjnego, jak to ma miejsce po zastosowaniu niektórych szczepionek atenuowanych. Obserwowany spadek limfocytów T miał charakter krótkotrwały, a sprawność bójcza leukocytów w tym czasie (3 dzień badania) była nie tylko zachowana, ale nawet podwyższona. Świadczy to, że pierwsza linia obrony odporności komórkowej nieadaptacyjnej nie uległa zachwianiu. Podobną nasiloną aktywność bójczą leukocytów obserwowano u ludzi z infekcją *T. mentagrophytes* (53), przy czym wydaje się, że o fungicydym działaniu decydował czynnik, czy czynniki, zawarte w homologicznych surowicach. W naszych badaniach nie odnotowano większego wpływu surowic na proces inaktywacji zarodników grzyba, co przemawiałoby za pobudzeniem przez antygeny obecne w preparacie raczej samych komórek (leukocytów).

Po 10—17 dniach od iniekcji szczepionki zarówno liczba limfocytów T, jak i działanie bójcze leukocytów wykazują tendencję powrotu do stanu z okresu przed immunizacją. Ten powrót do homeostazy immunologicznej jest szybszy o około 7 dni w grupie zwierząt otrzymujących lewamizol, co wskazywałoby na jego pozytywne oddziaływanie immunoregulacyjne. Lewamizol traktowany jest powszechnie jako modulator reakcji immunologicznych (14). Powoduje on m.in. powrót do normalnego poziomu liczby i funkcji limfocytów T (34), odnawia częściowo funkcję makrofagów uszkodzonych działaniem wirusa (39), zmienia mobilność limfocytów i komórek wielojądrowych (5), a także zwiększa aktywność fagocytarną neutrofilów (19, 25, 43, 51). Lewamizol wpływa również korzystnie na swoistą odpowiedź immunologiczną typu komórkowego (61) i humoralnego (9, 57).

O swoistym pobudzeniu mechanizmu komórkowego przez inaktywowaną szczepionkę skojarzoną świadczą pozytywne wyniki testu hamowania migracji komórek i odczynów alergicznych. Podobnego typu reakcje obserwowano uprzednio u bydła po stosowaniu monowalentnych przeciwgrzybowych szczepionek żywych (67), a także inaktywowanych (62, 63). Alergię typu późnego

opisano też u zwierząt z naturalną trychofitozą oraz u ozdrowieńców (26, 65). Przeprowadzona próba challenge wykazała współzależność między odpowiedzią typu komórkowego szczepionych cieląt a ich odpornością ogólną, potwierdzając raz jeszcze pogląd, że głównym, swoistym mechanizmem ochronnym przeciwko infekcji dermatofitów jest odporność komórkowa (10, 21, 24). Odporność ta wyrażała się znaczną niewrażliwością w stosunku do obydwu zjadliwych szczepów użytych w teście challenge, świadcząc o odpowiednim doborze komponentów antygenowych do szczepionki. Niezależnie bowiem od występujących reakcji krzyżowych (44, 58, 64) każdy ze szczepów stymulował swoistą odporność charakterystyczną dla danego gatunku grzyba.

Badania serologiczne przeprowadzone przy zastosowaniu odczynu HA biernej wykazały, że domięśniowe podanie szczepionki inaktywowanej, jakkolwiek spowodowało pewien wzrost miana przeciwciał w stosunku do wartości kontrolnych, to jednak ogólnie miana te były bardzo niskie. Świadczy to o nieznacznym pobudzeniu układu odporności humoralnej i potwierdza wyniki innych autorów (8, 23, 24, 67). Można przypuszczać, że wprowadzone domięśniowo antygeny szczepionki nie stanowią wystarczająco mocnego bodźca do stymulacji mechanizmów odpowiedzialnych za produkcję przeciwciał. Wyraźne podwyższenie poziomu przeciwciał nastąpiło dopiero po próbie challenge, mimo, że zmiany kliniczne u nich były na ogół słabo wyrażone. Być może w tym przypadku kontakt obcego antygeny z komórkami inicjującymi odpowiedź humoralną był przedłużony i ułatwiony poprzez częściowe mechaniczne usunięcie zewnętrznych warstw naskórka przy wykonywaniu próby challenge. Wyniki te korespondują w pewnym stopniu z poglądem, że dermatofity zakażające silnie skeratynizowane obszary ciała nie powodują wytwarzania przeciwciał, podczas gdy infekcje miejsc słabiej skeratynizowanych prowadzą do odpowiedzi humoralnej (2). Tworzenie przeciwciał, jako swoistej odpowiedzi na infekcję dermatofitami, nie jest jednak ogólnie akceptowane, a wyniki uzyskiwane przez różnych autorów są bardzo rozbieżne, zależne — jak się wydaje — od miejsca, intensywności i charakteru zmian chorobowych (2,

20, 42, 54), czasu trwania infekcji (23, 42), a także metody badania (32, 54).

Reasumując należy stwierdzić, że poprzez dobór odpowiednich szczepów i zastosowanie właściwej technologii produkcji uzyskano inaktywowaną szczepionkę skojarzoną, która indukowała u uodpornianych zwierząt wyraźną odpowiedź immunologiczną typu komórkowego i zabezpieczała je przed zakażeniem zjadliwymi szczepami *T. verrucosum* i *T. mentagrophytes*.

#### Piśmiennictwo

- Aho R.: Acta path. microbiol. scand. B 88, 79, 1980.
- Attapattu M. C., Clayton Y. M.: Sabouraudia 20, 273, 1982.
- Balogh E., Forizs E., Debreczeni M., Szabolesy M.: Mykosen 24, 34, 1981.
- Balogh E., Forizs E., Debreczeni M.: Mykosen 28, 490, 1985.
- Bardana E. J.: J. All. Clin. Immunol. 75, 423, 1985.
- Bussieras J., Chermette R., Bourdeau P.: Pratique Medicale et Chirurgicale de l'Animal de Compagnie 19, 152, 1984.
- Chatterjee A., Sengupta D. N.: Ind. J. Anim. Hlth. 18, 38, 1979.
- Chrol M.: Badania nad swoista profilaktyką i leczeniem trychofilozji bydła. Praca dokt., AR Luolin 1977.
- Cofner A. W., Hall S. M., Espe B. H.: Am. J. vet. Res. 46, 2440, 1985.
- Dahl M. V.: Aust. J. Derm. 35, 98, 1985.
- Davies R. R., Zaini F.: Sabouraudia 22, 65, 1984.
- Davies R. R., Zaini F.: Sabouraudia 22, 235, 1984.
- Dawson Ch. O.: Rev. med. vet. Mycol. 6, 223, 1968.
- Dębowy J., Obmińska-Domaradzka B.: Medycyna Wet. 43, 357, 1987.
- Dokudovskij E. G.: Veterinarija, Moskwa 11, 32, 1982.
- Evans E. G. V., Gentles J. C.: Essentials of Medical Mycology. Churchill Livingstone, Edinburgh—London 1985, s. 47.
- Florian E., Nemeseri L., Louas G.: Magy. Allatorv. Lap. 19, 529, 1964.
- Fomin A. J., Rozumnyi R. G.: Veterinarija, Moskwa 12, 41, 1987.
- Goranov Kh., Bonowska M.: Vet. Med. Nauki 24, 72, 1987.
- Grappel S. F., Blank F., Bishop C. T.: Dermatologica 144, 1, 1972.
- Hauck H., Skorepova M., Simon M. Jr., Djawari D.: Arch. Dermatol. Res. 278, 77, 1985.
- Howard D. H., Howard L. F.: Fungi Pathogenic for Humans and Animals, Wyd. D. H. Howard, M. Dekker INC. New York, Basel, 1983, s. 137.
- Hussin Z., Smith J. M. B.: Proc. Univ. Otago med. School 58, 14, 1980.
- Hussin Z., Smith J. M. B.: Mycopathologia 81, 71, 1983.
- Ivanov I. E., Arsov R., Simov I., Dimov I., Sizov I.: Vet. Med. Nauki 24, 23, 1987.
- Jaksch W.: Medycyna Wet. 21, 90, 1965.
- Kamyszek F.: Pol. Arch. Wet. 18, 63, 1975.
- Kielstein P.: Mh. Vet.-Med. 19, 174, 1964.
- Kielstein P., Richter W.: Arch. exp. Vet.-Med. 24, 1205, 1970.
- Krauss S., Wotoszyn S.: Medycyna Wet. 34, 712, 1968.
- Krentel G., Kühne K.: Mykosen 5, 122, 1962.
- Lee K. H., Lee J. B., Lee M. G., Song D. H.: Arch. Dermatol. Res. 280, 45, 1988.
- Litvinov A. M.: Bjull. vses. in-ta eksp. vet. 42, 30, 1981.
- Matusiewicz R., Lebedowski K.: Pol. Arch. Med. Wewn. 73, 17, 1985.
- Mosher C. L., Langendoen K., Stoddard P.: Vet. Med. small Anim. Clin. 72, 1343, 1977.
- Nikiforov L. J.: Bjull. vses. in-ta eksp. vet. 32, 27, 1978.
- Niklasson P. M., Williams R. C.: Infect. Immun. 9, 1, 1974.
- Noskov A. J.: Tr. Vsesojuz. nauc. issled. 14, 86, 1959.
- Ogunbiyi P. O., Conlon P. D., Black W. D.: Int. J. Immunopharmac. 10, 377, 1988.
- Otcenasek M., Stros K., Komarek J., Tomskova A., Raskova H., Hamacek F.: Vet. Med. Praga 26, 193, 1981.
- Pal M., Singh D. K.: Mykosen 26, 317, 1983.
- Papini M., Simonetti S.: Mykosen 28, 419, 1985.
- Paulik S., Slauina L., Dubaj J., Skotnický J., Gedeon V.: Vet. Med. Praga 32, 93, 1987.
- Petrovich S. V., Sarkisov A. Kh.: Veterinarija, Moskwa 9, 40, 1981.
- Rahbari S.: J. vet. Fac. Teheran 41, 39, 1986.
- Rybnikar A., Chumela J., Vrzal V.: Vet. Med. Praga 31, 219, 1986.
- Sarkar S., Sinka R. P., Thakur D. K.: Indian vet. J. 62, 1017, 1985.
- Sarkisov A. Kh., Petrovitch S. V., Nikiforov L. J., Yablochnick L. M., Koralev V. P.: Veterinarija, Moskwa 2, 54, 1971.
- Sarkisov A. Kh., Nikiforov L. J.: Veterinarija, Moskwa 7, 37, 1981.
- Seebacher C., Bästler E.: Mykosen 24, 668, 1981.
- Shiokawa J.: Int. J. Immunother. 1, 79, 1985.
- Sisak M.: Veterinarstvi 33, 396, 1980.
- Skorepova M., Hauck H., Hornstein O. P., Simon M., Djawari D., Freymüller G.: Mykosen 28, 485, 1985.
- Svejjgaard E.: Acta Derm. Venerol. (Stockh.) Suppl. 121, 85, 1983.
- Ściborski R.: Pol. Arch. Med. Wewn. 75, 135, 1986.
- Villouta G., Jara M. A., Correa J., Lagunas M.: Zbl. Vet. Med. B. 31, 241, 1984.
- Vyas G. P., Dholakia P. M., Kathiria L. G.: Indian vet. J. 64, 55, 1987.
- Wawrzkiwicz J., Wawrzkiwicz K.: Medycyna Wet. 45, 605, 1989.
- Wawrzkiwicz K., Chrol M.: Medycyna Wet. 33, 337, 1977.
- Wawrzkiwicz K., Rzechowski T.: Medycyna Wet. 39, 72, 1983.
- Wawrzkiwicz K., Wawrzkiwicz J.: Annales UMCS, Lublin, s. DD, 39, 53, 1984 (1987).
- Wawrzkiwicz K., Wawrzkiwicz J.: Pol. Arch. Wet. 28, 5, 1988.
- Wawrzkiwicz K., Wawrzkiwicz J., Misiarz K.: Medycyna Wet. 44, 648, 1988.
- Weiss R., Böhm K. H., Taha El-Sayed M.: Mykosen 20, 54, 1977.
- Wotoszyn S.: Pol. Arch. Wet. 27, 5, 1987.
- Wotoszyn S., Andrychiewicz J., Kostro K., Grądzki Z.: Medycyna Wet. 39, 387, 1983.
- Ziótkowska G.: Annales UMCS (Lublin), s. DD, 39, 79, 1987.

Adres autora: prof. dr hab. Krystyna Wawrzkiwicz, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

ANTONI JAKUBCZAK, ZBIGNIEW ANUSZ\*, ALICJA BERNAD\*\*

## Występowanie oraz wrażliwość na wybrane chemioterapeutyki szczepów *Aeromonas hydrophila* izolowanych od ryb na terenie województwa olsztyńskiego

Zakład Higieny Weterynaryjnej, ul. Nowogrodzka 160, 18-400 Żomża

\* Katedra Epizootologii i Klinika Chorób Zakaźnych Wydziału Weterynaryjnego ART, ul. Oczapowskiego 13, 10-957 Olsztyn-Kortowo

\*\* Zakład Higieny Weterynaryjnej, ul. Warszawska 109, 10-701 Olsztyn

### Summary

#### Occurrence of *Aeromonas hydrophila* strains in fish in the region of the Olsztyn province and their susceptibility to chemotherapeutics

The studies were carried out on 67 fish coming from six breeding stations. It was found that the fish were a potential reservoir of *A. hydrophila* and therefore might be a source of infections and alimentary poisonings in humans. From the surface of fish there were isolated 17 strains of *A. hydrophila* (25.3%), from the homogenates of internal organs — 10 strains (14.9%) and from muscles — 2 strains (2.9%). All the examined strains were susceptible to streptomycin, neomycin, gentamycin, chloramphenicol and nalidixic acid. They were resistant to penicillin, ampicillin and tylosin. As to other antibiotics: 83% strains were susceptible to oxytetracycline, 25% to sulphonamides, 55% to trimethoprim plus sulphametoazol and 25% to nitrofurantoin.

Analiza piśmiennictwa ostatniego dziesięciolecia dotycząca potencjalnej chorobotwórczości gatunków *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia enterocolitica* oraz *Listeria monocytogenes* wykazuje ciągły wzrost znaczenia tych drobnoustrojów w zakażeniach i zatruciach pokarmowych u ludzi (1, 2, 3, 4, 6). Powszechne występowanie bakterii w środowisku wynika m.in. ze zdolności do przeżywania oraz namnażania się ich w temp. 0—4°C (3). Niektórzy autorzy stwierdzają, że *Aeromonas* sp. z tego powodu mógłby być lepszym wskaźnikiem zanieczyszczenia żywności niż *E. coli* (11). W przypadku *Aeromonas hydrophila* istotne jest nosicielstwo tego drobnoustroju w środowisku wodnym przez ryby oraz ptaki wodne, które wydają się być naturalnym rezerwuarem tego gatunku (5, 7).

W latach osiemdziesiątych pojawiło się szereg prac,