

- A Monoclonal Antibody Enzyme Immunoassay for the Detection of *Listeria* in Foods and Environmental Samples, w: Foodborne Listeriosis, red. A. J. Miller, J. L. Smith, G. A. Somkuti, Elsevier, Amsterdam — New York — Oxford 1990, s. 103.
19. Fedio W. M., Jackson H.: Letters Appl. Microbiol. 9, 157, 1969.
 20. Fernández Garayzabal J. F., Domínguez — Rodríguez L., Vázquez — Boland J. A., Blanco Canceis J. L., Suarez — Fernández G.: Can. J. Microbiol. 32, 149, 1986.
 21. Fernández Garayzabal J. F., Domínguez — Rodríguez L., Vázquez — Boland J. A., Rodríguez Ferrí V., Briones Dieste J. L., Blanco Canceis J. L., Suarez Fernández G.: J. Appl. Bacteriol. 63, 533, 1987.
 22. Furowicz A. J., Broda D., Łoczewski P., Czernomysy-Furowicz D.: Medycyna Wet. 45, 289, 1989.
 23. Furowicz A. J., Zyska W., Czernomysy-Furowicz D., Pawiński J.: Pol. Arch. Wet. 30, 126, 1990.
 24. Furowicz A. J., Jakubowska L., Czernomysy-Furowicz D., Dąbrowski W., Misiura M.: Mat. Nauk. XII Zjazdu Pol. Tow. Epid. Lek. Chorób Zak., Warszawa 1991, s. 58.
 25. Furowicz A. J., Czernomysy-Furowicz D., Jakubowska L., Dąbrowski W., Misiura M.: Mat. XII Zjazdu Pol. Tow. Epid. Lek. Chorób Zak., Warszawa 1991, s. 46.
 26. Gitter M.: Listeriosis in Farms in Great Britain, w: Isolation and Identification of Microorganisms of Medical and Veterinary Importance, red. C. H. Collins, J. M. Grande, Academic Press, London — Toronto 1985, s. 191.
 27. Heisick J. E., Harrell F. M., Peterson E. H., McLaughlin S., Wagner D. E., Wesley I. V., Bryner J.: J. Fd Prot. 53, 154, 1989.
 28. Hird D. W., Gentgeorgias C.: Listeriosis in Food Animals as Potential Source of Direct (Nonfoodborne) Infection for Humans, w: Foodborne Listeriosis, red. A. J. Miller, J. L. Smith, G. A. Somkuti, Elsevier, Amsterdam — New York — Oxford 1990, s. 31.
 29. Kahn M. A., Newton I. A., Seaman A., Woodbine H.: The Survival of *Listeria monocytogenes* inside and outside its host, w: Problems of Listeriosis, red. M. Woodbine, Leicester Univ. Press Great Britain 1975, s. 75.
 30. Kathariou S., Pine L.: Laboratory Studies of Virulence of *Listeria monocytogenes*, w: Foodborne Listeriosis, red. A. J. Miller, J. M. Smith, G. A. Somkuti, Elsevier, Amsterdam — New York — Oxford 1990, s. 15.
 31. Knabel S. J., Walker H. W., Hartman P. A., Mendonca A. F.: Appl. Environ. Microbiol. 56, 370, 1990.
 32. Lammerding A. M., Doyle M. P.: Int. J. Fd Microbiol. 9, 249, 1989.
 33. Lammerding A. M., Doyle M. P.: Stability of *Listeria monocytogenes* to Non-thermal Processing Conditions, w: Foodborne Listeriosis, red. A. J. Miller, J. M. Smith, G. A. Somkuti, Elsevier, Amsterdam — New York — Oxford 1990, s. 195.
 34. Lemaire V., Cerf O., Audurier A.: Ann. Rech. Vét. 20, 493, 1989.
 35. Lorber B.: Clinical Listeriosis — Implications and Pathogenesis w: Foodborne Listeriosis, red. A. J. Miller, J. L. Smith, G. A. Somkuti, Elsevier, Amsterdam — New York — Oxford 1990, s. 41.
 36. Lovett J.: Taxonomy and General Characteristics of *Listeria* spp w: Foodborne Listeriosis, red. A. J. Miller, J. L. Smith, G. A. Somkuti, Elsevier, Amsterdam — New York — Oxford 1990, s. 9.
 37. Lovett J., Francis D. W., Bradshaw J. G.: Outgrowth of *Listeria monocytogenes* in Foods, w: Foodborne Listeriosis, red. A. J. Miller, J. M. Smith, G. A. Somkuti, Elsevier, Amsterdam — New York — Oxford 1990, s. 183.
 38. Marth E. H., Ryser E. T.: Occurrence of *Listeria* in Foods: Milk and Dairy Foods, w: Foodborne Listeriosis, red. A. J. Miller, J. L. Smith, G. A. Somkuti, Elsevier, Amsterdam — New York — Oxford 1990, s. 151.
 39. McCarthy S. A.: *Listeria* in the Environment, w: Foodborne Listeriosis, red. A. J. Miller, J. L. Smith, G. A. Somkuti, Elsevier, Amsterdam — New York — Oxford 1990, s. 25.
 40. Mengaud J., Gormley E., Vicente M. F., Chenevert J., Baquero F., Perez-Diaz J. C., Cossart P.: Listeriolysin O Gene — Role in Virulence and Use as a DNA Probe, in: Foodborne Listeriosis, red. A. J. Miller, J. L. Smith, G. A. Somkuti, Elsevier, Amsterdam — New York — Oxford 1990, s. 125.
 41. Ortel S.: Acta Microbiol. Hung. 36, 153, 1989.
 42. Outteridge P. M.: Veterinary Immunology. Academic Press, London — Sydney 1985.
 43. Ralovich B.: Listeriosis Research. Present Situation and Perspective, Akadémiai Kiadó, Hungary, Budapest 1984.
 44. Rodler M., Körbler W.: Acta Microbiol. Hung. 36, 259, 1989.
 45. Roitt I., Brostoff J., Male D.: Immunology, Churchill Livingstone, Gower Medical Publishing, London — New York 1989.
 46. Różalska B.: Post. Mikrobiol. 27, 307, 1988.
 47. Schleich III W. F.: *Listeria*, Animals and Man: Aspects of Virulence, w: Foodborne Listeriosis, red. A. J. Miller, J. L. Smith, G. A. Somkuti, Elsevier, Amsterdam — New York — Oxford 1990, s. 51.
 48. Schönberg A., Teufel P., Weise E.: Acta Microbiol. Hung. 36, 249, 1989.
 49. Schwartz B., Pinner R. W., Broome C. V.: Dietary Risk Factor for Sporadic Listeriosis: Association with Consumption of Uncooked Hot Dogs and Undercooked Chicken, w: Foodborne Listeriosis, red. A. J. Miller, J. L. Smith, G. A. Somkuti, Elsevier, Amsterdam — New York — Oxford 1990, s. 67.
 50. Seeliger H. P. R.: Listeriosis. S. Karger, Basel — New York, 1961.
 51. Seeliger H. P. R.: Listeriosis — Avoidable Risk?, w: Foodborne Listeriosis, red. A. J. Miller, J. L. Smith, G. A. Somkuti, Elsevier, Amsterdam — New York — Oxford 1990, s. 1.
 52. Selective Microbiology for the Clinical Laboratory: Oxoid Quality Culture Media, Unipath Limited, Basingstoke, Hampshire 1991, s. 31.
 53. Skovgaard N.: Acta Microbiol. Hung. 36, 239, 1989.
 54. Slade P. J., Collins-Thompson D. L.: J. Fd Sci. 53, 1694, 1988.
 55. Watkins S. A.: *Listeria monocytogenes*, w: Isolation and Identification of Microorganisms of Medical and Veterinary Importance, red. C. H. Collins, J. M. Grande, Academic Press, London — Toronto 1985, s. 101.
 56. Walker S. J., Archer P., Appleyard J.: Fd Microbiol. 7, 335, 1990.

Adres autora: prof. dr hab. Antoni J. Furowicz, ul. Monte Cassino 16/2, 71-466 Szczecin

ANNA BRONICKA, ZYGMUNT DEMBIŃSKI

Próba przygotowania szczepionki przeciw kamylobakteriozie owiec

Zakład Profilaktyki Niepłodności Instytutu Weterynarii, Oddział w Poznaniu,
ul. Poznańska 35, 62-020 Swarzędz

Summary

An attempt of preparing vaccine against campylobacteriosis in sheep

The aim of the work was to prepare an inactivated vaccine against ovine campylobacteriosis and evaluate its immunogenic properties. For the vaccine production there was used 4 strains of *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*, serotype B, isolated from the fetus of an aborted sheep. The prepared vaccine was first tested on laboratory animals and later administered intramuscularly at a dose of 4 ml (0.38×10^{11} bacteria per 1 ml) to 61 sheep being in the second month of pregnancy. The level of neutralizing antibodies was tested 6 times.

It was found that vaccination elicited a high level of specific antibodies whose titers were rising especially between 4 and 6 weeks after vaccination. A high level of antibodies persisted up to the end of pregnancy.

Kamylobakterioza owiec jest schorzeniem powodującym w hodowli tych zwierząt znaczne straty ekonomiczne w następstwie poronień, rodzenia martwych

plodów lub słabych, nie dających się odchowac jagniąt (6). W następstwie zachorowania często dochodzi do powikłań poporodowych bądź poporodowych, przynoszących straty wśród owiec dorosłych. Objawy schorzenia są na tyle nieswoiste, że w praktyce choroba jest nierozpoznawalna. Czynnikiem etiologicznym są bakterie przynależne głównie do podgatunku *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* (2, 6) oraz w mniejszym stopniu do podgatunku *Campylobacter jejuni* (5). Notowane przypadki kamylobakteriozy owiec, jak również skutki tej infekcji, wskazują na potrzebę usprawnienia dotychczas stosowanych w praktyce metod w zakresie profilaktyki i leczenia. Dane z piśmiennictwa wskazują, że dobre efekty zapobiegawcze, szczególnie w stadach o dużym zagęszczeniu zwierząt, uzyskuje się w wyniku pobudzania przeciwważnych sił obronnych organizmu na drodze szczepienia inaktywowaną szczepionką (9, 13). W warunkach krajowych pozytywne rezultaty po zastosowaniu szczepionki w chorobie mętlikowej u bydła uzyskał Roslanowski i wsp. (7, 8).

Celem pracy było przygotowanie inaktywowanej szcze-

pionki przeciw kamylobakteriozie owiec oraz ocena jej właściwości immunologicznych.

Materiał i metody

Do produkcji szczepionki użyto 4 szczepów *Campylobacter fetus subsp. fetus*, serotyp B, wyizolowanych z poronionych płodów owczych na terenie kraju. Jako kryterium zaliczenia ich do określonego podgatunku przyjęto zestaw cech biochemicznych według Smibert'a (10, 11). Wszystkie szczepy charakteryzowały się zdolnością wytwarzania katalazy oraz siarkowodoru na podłożu zawierającym cysteinę. Nie wytwarzały tego gazu na podłożu trójcukrowym z siarczanem żelazowym, a także były odporne na działanie kwasu naldyksynowego. Wykazywały zdolność wzrostu na podłożu zawierającym 1% glicyny, nie tolerując w pożywce 3,5% NaCl. Wyhodowane szczepy *Campylobacter fetus subsp. fetus* posiadały zdolność wzrostu na podłożu tioglikolanowym w temperaturze 25°C, natomiast nie uzyskano ich wzrostu w temperaturze 42°C. Serotyp wyizolowanych szczepów określono w oparciu o wyniki odczynu aglutynacji próbówkowej, zachodzącej między wzorcowymi surowicami anty-*Campylobacter* a antygenami pełnokomórkowymi, otrzymanymi z wyhodowanych bakterii *Campylobacter* (12). Antygeny uzyskiwano po 72-godzinnej inkubacji szczepów na podłożu Brucella-bulion (Merck), w temperaturze 37°C, w warunkach mikroaerofilnych (10% CO₂, 85% N₂, 5% O₂). Namnożoną hodowlę wirowano przy 4,5 tys. obrotów/minutę przez 45 minut, a następnie przemywano 0,85% roztworem NaCl. Czynność przemywania i wirowania wykonywano dwukrotnie. Otrzymany osad zawieszano w 0,4% roztworze formaldehydu, a po 12 godzinach odwirowano i dodano taką ilość 0,85% roztworu NaCl, aby uzyskać 9–12 × 10⁸ bakterii w 1 cm³ zawiesiny, co odpowiada gęstości antygeny 3–4 według skali McFarlanda.

Metodą tą otrzymywano antygeny pełnokomórkowe, stosowane w dalszych badaniach serologicznych.

Zidentyfikowane szczepy *Campylobacter fetus subsp. fetus* posiewano na podłoże jajowe według Bartletta i inkubowano w temperaturze 37°C przez 72 godziny, w atmosferze mikroaerofilnej. Uzyskane czyste hodowle wyjściowe posiewano na płynne podłoże namnażające o składzie: Brucella-bulion 28,0, MgCl₂ × 6 H₂O 1,0, FeSO₄ × 7 H₂O 0,05, tioglikolan sodu 0,025, H₂O destylowana 1000,0, a następnie inkubowano w warunkach niezbędnych dla wzrostu bakterii z rodzaju *Campylobacter*. Po uzyskaniu pozytywnych wyników wzrostu i czystości szczepu, w celu zabicia drobnoustrojów dodano 36% formalinę w ilości 8,4 ml/l hodowli. Po 24 godzinach zawiesinę zabitych bakterii poddano 3-krotnemu przemywaniu i wirowaniu. Po ustaleniu kon-

centracji drobnoustrojów na 0,77 × 10¹¹ bakt./cm³, mieszało je z taką samą objętością niekompletnego adiuwantu Freund'a. Jako emulgatora użyto Tweenu 80 w stężeniu końcowym 1%. Stężenie końcowe szczepionki wynosiło 0,38 × 10¹¹ bakt./cm³ (1, 3, 4).

Wyprodukowane 4 kolejne serie szczepionek poddano ocenie biologicznej na owcach i królikach, określając jej skuteczność i nieszkodliwość. Poziom przeciwciał anty-*Campylobacter* oznaczano w okresie od 1 do 8 tygodnia po przeprowadzonym szczepieniu. Pozytywne wyniki uzyskane na zwierzętach doświadczalnych były punktem wyjścia do badań terenowych, które przeprowadzono na 61 owcach krotnych, będących w 2 miesiącu ciąży. Owce zaszczepiono domięśniowo przetestowaną szczepionką w ilości 4 ml na zwierzę. Szczepione owce w okresie doświadczenia przebywały w owczarni. U 18 owiec, począwszy od dnia szczepienia, pobierano krew 6-krotnie w odstępach dwutygodniowych oraz u 43 3-krotnie w odstępach czterotygodniowych, określając miano przeciwciał anty-*Campylobacter* metodą aglutynacji próbówkowej z antygenem pełnokomórkowym. Grupę kontrolną stanowiło 20 owiec nie szczepionych, przebywających razem ze zwierzętami szczepionymi, od których krew do badań serologicznych pobierano 6-krotnie w odstępach dwutygodniowych. Przed podaniem szczepionki od wszystkich zwierząt pobrano wymazy z błony śluzowej odbytu do badań bakteriologicznych w kierunku bakterii z rodzaju *Campylobacter*.

Wyniki i omówienie

Wyniki badań zwierząt doświadczalnych przedstawiono w tab. 1. Zastosowana szczepionka wywołała wzrost miana w surowicy badanych zwierząt już w 1 tygodniu po szczepieniu, którego wartość wahała się w granicach od 160 do 640 u owiec i od 40 do 160 u królików. U owiec poziom przeciwciał wzrastał sukcesywnie, dochodząc w 3–4 tygodniu od 640 do 5120 i utrzymywał się na poziomie od 320 do 1280 jeszcze w 8 tygodniu badania. Miano przeciwciał anty-*Campylobacter* u królików wzrastało stopniowo, osiągając w 4 tygodniu po szczepieniu wysokość od 320 do 640. Przez cały okres obserwacji badane zwierzęta nie wykazywały przedmiotowych objawów chorobowych.

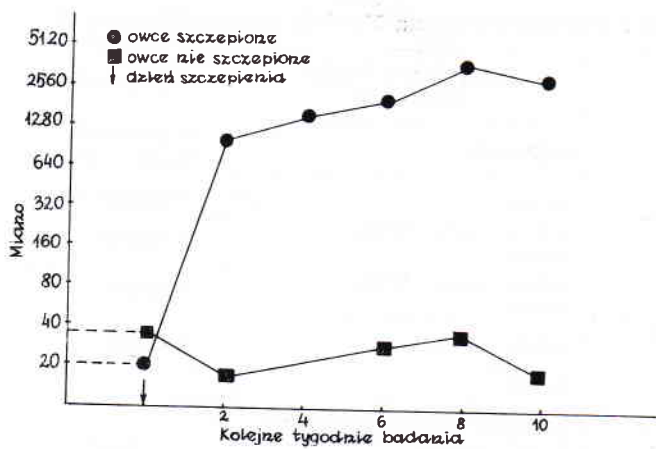
Korzystne efekty po zastosowaniu szczepionki na zwierzętach doświadczalnych pozwoliły na podanie jej owcom przebywającym w owczarni. Przeprowadzone wstępne badania bakteriologiczne wymazów błony ślu-

Tab. 1. Poziom przeciwciał anty-*Campylobacter* w surowicy zwierząt doświadczalnych

Nr szczepu	Zwierzęta	Kontrola	Wysokość miana w poszczególnych tygodniach							
			I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
1/87	owca	40	160	2560	5120	5120	2560	2560	2560	1280
	owca	40	640	1280	1280	1280	640	640	640	320
	królik	0	160	320	640	640	320	320	320	320
4/87	owca	20	1280	1280	2560	2560	2560	1280	640	640
	owca	20	640	1280	1280	2560	1280	640	640	320
	królik	0	160	320	640	320	160	160	160	160
2/87	owca	20	640	1280	2560	2560	2560	1280	2560	1280
	owca	20	1280	2560	2560	2560	640	640	640	640
	królik	0	80	160	80	320	320	320	320	320
6/87	owca	20	320	1280	2560	2560	2560	1280	1280	640
	owca	40	640	1280	2560	2560	2560	1280	640	640
	królik	0	160	320	320	320	320	160	320	160

Tab. 2. Poziom przeciwciał anty-*Campylobacter* u owiec szczepionych

Badanie	Liczba badanych owiec	Miano									
		0	20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120
I	61	18	21	15	3	4					
II	18							10	8		
III	61						2	14	26	17	2
IV	15								5	8	2
V	18								4	7	7
VI	60				4	10	18	8	8	8	4



Ryc. 1. Średnie wartości miana przeciwciał anti-Campylobacter u owiec szczepionych i nie szczepionych

zowej odbytu nie wykazały obecności drobnoustrojów z rodzaju *Campylobacter*. Uzyskane wyniki miana przeciwciał anti-Campylobacter w surowicy szczepionych zwierząt przedstawiono w tabeli 2, a średnie wartości miana z uwzględnieniem wyników otrzymanych u owiec grupy kontrolnej — w formie wykresu (ryc. 1). U owiec poziom przeciwciał w 2 tygodniu po szczepieniu wyniósł od 640 do 1280. Najwyższe ich miano stwierdzono w 4 i 6 tygodniu po szczepieniu, które wynosiło od 1280 do 5120. Tak wysoki poziom przeciwciał stwierdzono jeszcze w 8 tygodniu po iniekcji. U kilku owiec wysokość miana przez cały okres doświadczenia utrzymywa-

ła się na niezmiennym, wysokim poziomie, wynoszącym 5120 (tab. 2). W 10 tygodniu badania u większości zwierząt wystąpił niewielki spadek poziomu przeciwciał anti-Campylobacter. U owiec kontrolnych poziom przeciwciał przez cały okres obserwacji wahał się w granicach od 20 do 40.

Uzyskane wyniki serologiczne i bakteriologiczne wskazują, że wzrost poziomu przeciwciał anti-Campylobacter u szczepionych owiec wywołany został podaniem szczepionki. Korzystne efekty immunologiczne po jej zastosowaniu pozwalają na kontynuowanie badań w ogniskach choroby.

Piśmiennictwo

- Berg R. L., Firehammer B. D.: J. Am. vet. med. Ass. 173, 467, 1978.
- Bird M. M. E., Stephens D. J., Wall E. P., deLisle G. W.: N. Z. vet. J. 32, 14, 1984.
- Bryner J. H., Foley J. W., Thompson K.: Am. J. vet. Res. 40, 433, 1979.
- Clark B. L., Dufly J. H., Monsbourgh J.: Aust. vet. J. 51, 333, 1975.
- Diker K. S., Istanbuloglu E.: Vet. Rec. 118, 307, 1986.
- Pellerin J. L.: Revue Méd. vét. 132, 717, 1981.
- Rostanowski K., Wyszanowski J., Szpryngiel I.: Biuletyn XVIII Sesji Sekcji Fizjologii i Patologii Rozrodu PTNW Bydgoszcz 1979, s. 38.
- Rostanowski K., Wyszanowski J.: Medycyna Wet. 39, 592, 1983.
- Rostanowski K., Szpryngiel I., Wyszanowski J.: Zesz. probl. Post. Nauk Rol. 263, 539, 1986.
- Rostanowski K., Andrzejewska E.: Wytyczne wdrożeniowe dotyczące uaktualnionej klasyfikacji i diagnostyki drobnoustrojów rodzaju *Campylobacter*, Instytut Wet. 1987.
- Smibert R. M.: W: Bergey's manual of determinative bacteriology. Williams and Wilkins Comp. Baltimore, 1974.
- Varga J., Mezes B., Fodor L., Hajtos I.: J. Vet. Med. B 37, 148, 1990.
- Williams C. E., Renshaw H. W., Meinershagen W. A., Everson D. O., Chamberlain R. K., Hall R. F., Waldhalm D. G.: Am. J. vet. Res. 4, 409, 1976.

Adres autora: lek. wet. Anna Bronicka, Os. Wichtowe Wzgórze 36 i/82, 61-699 Poznań

ANTONI JAKUBCZAK, JAN SIEMIONEK, ZBIGNIEW ANUSZ

Ocena testów na patogenność szczepów *Yersinia enterocolitica* izolowanych od ludzi i zwierząt

Katedra Epizootologii i Kliniki Chorób Zakaźnych Wydziału Weterynaryjnego AR-T, 10-957 Olsztyn-Kortowo

Summary

Evaluation of tests for the pathogenicity of *Yersinia enterocolitica* strains isolated from humans and animals

Pathogenicity of *Yersinia enterocolitica* in vitro was determined simultaneously by means of three tests: production of pyrazinamide at 30°C, autoagglutination at 37°C and inhibition of growth on MOX agar medium plate at 37°C. The strains were collected from diseased people, a dead chinchilla and from healthy pigs and foxes after their slaughter.

The findings showed that the test for pyrazinamide production proved to have better usefulness to distinguish pathogenic strains from apathogenic ones. Pigs in contrast to foxes were found to be the reservoir of *Yersinia enterocolitica* strains pathogenic for man.

W badaniach nad określaniem patogenności wyizolowanych szczepów *Yersinia enterocolitica* zaproponowano szereg testów. Zdecydowana większość szczepów izolowanych z przypadków zachorowań u ludzi i zwierząt należała do gatunku *Yersinia enterocolitica*. Wykazano, że nie wszystkie szczepy należące do tego gatunku są

patogenne. Typowanie serologiczne, biotypowanie oraz fagotypowanie szczepów izolowanych z przypadków chorobowych od ludzi i zwierząt dowiodło iż tylko określone typy odpowiedzialne są za zachorowania. Wśród serotypów dominują u ludzi 0:3, 0:5, 27, 0:8 i 0:9, biotypy 4, 3, 2, 1b oraz fagotypy II, VIII, IXa, IXb, X₃, X₂ (12), u zwierząt zaś serotypy 0:1, 0:2, 0:3, 0:5, 27 (1, 4, 12, 18).

Ponadto wykazano istnienie korelacji pomiędzy biotypami, serotypami, ekologią a patogennością wśród szczepów należących do gatunku *Yersinia enterocolitica* (tab. 1) (14). Kondolo i Wauters (10) wykazali przydatność testu na wytwarzanie pyrazinamidazy do różnicowania szczepów *Y. enterocolitica* na chorobotwórcze i niechorobotwórcze. Inni autorzy z powodzeniem wykorzystali ten test w badaniach nad patogennością szczepów izolowanych od ludzi, zwierząt i środowiska naturalnego (4, 22, 23).

Schiemann i Davenish (17) zwrócili uwagę na fakt braku zdolności do fermentacji salicyny oraz hydrolizy eskuliny przez szczepy chorobotwórcze w przeciwieństwie do szczepów niechorobotwórczych. Badania wykazały, że właściwości biochemiczne, jak i zdolność do