

ZENON MINTA, GINETTE DAMBRINE*

Zastosowanie przeciwciał monoklonalnych w teście DAS ELISA do wykrywania u kur zakażeń wirusami białaczek*)

Zakład Chorób Drobiu Państwowego Instytutu Weterynaryjnego, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

*Unite de Virologie et Oncologie Aviaire, Station de Pathologie Aviaire et de Parasitologie, INRA, 37380 NOUZILLY (Francja)

Summary

Administration of monoclonal antibodies in the DAS ELISA for the detection of hens infected with avian leucosis viruses

Three hybridoma cell lines (AC2, DC6, PC2) secreting monoclonal antibodies (MCA) against protein 27, a major component of group specific antigens of avian leucosis viruses, have been employed. All three monoclonal antibodies reacted with p27. The epitope topological studies demonstrated that MCA, DC6 and PC2 were directed to different epitopes of ALV-p27. Comparative studies of different MCA sets for the detection of ALV gs-antigens with the ELISA test demonstrated that the sensitivity of the test, using MCA PC2 for adsorption and a HRP as a conjugate, was the same as one in the commercial kit and was higher when compared with another commercial DAS ELISA kit.

Zakażenia egzogennymi wirusami białaczek ptaków (ALV) są przyczyną strat ekonomicznych w hodowli kur, będących wynikiem chorób nowotworowych oraz obniżonej produktywności i ogólnej zdrowotności ptaków (4, 5, 10, 14). Walka z białaczkami kur polega przede wszystkim na eliminowaniu z hodowli ptaków zakażonych. W ten sposób przerywa się cykl kongenitalnej transmisji wirusa, która jest najważniejszą drogą rozprzestrzeniania ALV (4, 5, 10, 12). Antygeny grupowe swoiste (gs) ALV można wykryć w surowicy, w wymazach z kloaki ptaków oraz w białku jaj (12, 13). Test immunoenzymatyczny oparty na metodzie podwójnych przeciwciał (DAS ELISA) pozwala obecnie najskuteczniej wykrywać ptaki będące nosicielami i siewcami wirusa białaczek kur (1, 2, 11).

W kraju brak dotąd opracowanych metod wykrywania zakażeń ALV u kur. Przeprowadzone, po raz pierwszy badania przy użyciu testu DAS ELISA wykazały zakażenie ALV we wszystkich badanych stadach czystych linii kur kierunku mięsnego i nieśnego, a stopień przenoszenia wirusa przez jajo wahał się od 6 do 31% (8). Istnieje więc potrzeba wprowadzenia w kraju programu uwalniania stad hodowlanych kur od zakażeń wirusami białaczek.

Celem pracy było opracowanie testu DAS ELISA, który mógłby znaleźć zastosowanie w takich programach. Realną możliwość opracowania takiego testu stworzyło uzyskanie PM swoistych dla białka p27, głównego składnika antygenów gs wirusów białaczek ptaków (7).

Materiał i metody

Wirus. Materiał wirusowy stanowiła plazma kurcząt leukemicznych (chorych na mieloblastozę) zakażonych wirusem AMV/MAV-B.

Klony hybridom. Linie komórek hybridom oznaczone AC2, DC6 i PC2 uzyskano wcześniej (7) i przechowywano w stanie głębokiego zamrożenia w ciekłym azocie.

Kurczęta. Kurczęta rasy Leghorn Dore (LD) oraz Leghorn (L) lęzono z jaj SPF (sprawdzonych odpowiednio z INRA, Francja oraz z Lohmann, Niemcy).

Myszy. Syngeniczne myszy szczepu wsobnego BALB/c pochodziły z hodowli INRA, Francja.

Namnażanie i oczyszczanie wirusa. Jednodniowe pisklęta LD i L zakażono wirusem AMV wprowadzając dootrzewnowo po 0,1 ml materiału wirusowego (plazma). Rozwój choroby (leukemii) śledzono prowadząc okresowo badania morfologiczne krwi. Kurczęta, u których stwierdzono leukemię (wzrost liczby mieloblastów) skrwawiano i z uzyskanej krwi wydzielano plazmę. Obecność wirusa w plazmie sprawdzano w teście DAS ELISA.

Wirus oczyszczano, po wstępnym klarowaniu plazmy, przez wirowanie 4000xg, przez ultrawirowanie w gradiencie stężenia sacharozy 20% i 60% przez 2 h przy 95 000xg, a następnie w pięciostopniowym gradiencie sacharozy 24-60% przez 18 h przy 95 000xg. Frakcję z prążkiem wirusa ponownie wirowano (2 h przy 95 000xg), uzyskaną peletkę wirusa zawieszano w buforze TEN (0,01 M Tris, 0,001 M EDTA, 0,1 M NaCl, pH 8,1) i przechowywano w temperaturze -70°C. Oczyszczony wirus badano na aktywność antygenową w teście DAS ELISA, a koncentrację białka określano wg metody BCA (7).

Podłoże do hodowli hybridom. Podłoże wzrostowe składało się z płynu Eagle'a (MEM) z dodatkiem 10% płodowej surowicy cielęcej (Biological), L-glutaminy, pirogronianu sodu oraz antybiotyków: penicyliny, streptomycyny, fungizonu.

Namnażanie klonów hybridom w hodowli. Po rozmrożeniu żywe komórki liczone i zakładano hodowlę hybridom o gęstości 10⁵ komórek w 1 ml podłoża wzrostowego. Po kilku dniach inkubacji supernatant hodowli wykazującej intensywny wzrost hybridom badano na aktywność w teście ELISA i swoistość w teście immunoblotting.

Otrzymywanie PM z wysięku otrzewnowego. Potrzebną w końcowym etapie dużą ilość PM produkowano na myszach BALB/c poprzez indukcję wysięku otrzewnowego. W 10 dni po podaniu pristanu (Sigma) myszom wprowadzono i.p. około 10⁶ komórek hybridom. Po 1-3 tygodniach pobierano od nich gromadzący się w jamie otrzewnowej wysięk. Zebrany wysięk klarowano przez wirowanie

*) Praca wykonana w ramach projektu badawczego nr 5 5875 91 05 finansowanego przez KBN.

(3000 obr./min, 15 min), mianowano testem ELISA i do czasu użycia w dalszych badaniach przechowywano w temperaturze -20°C .

Oczyszczanie PM. Oczyszczanie immunoglobulin (IgG) PM z płynu wysiękowego myszy przeprowadzono w oparciu o niechromatograficzną metodę opisaną przez Reika i wsp. (15). Metoda ta polega na eliminowaniu innych poza IgG białek (albumin) w dwustopniowym wytrącaniu przy użyciu kwasu kaprylowego a następnie siarczanu amonu. Uzyskany osad oczyszczonych immunoglobulin PM zawieszano w PBS i po dializie przechowywano w stanie zamrożenia (-20°C).

Przygotowanie koniugatu PM. Koniugowanie oczyszczonych IgG PM z enzymem peroksydazą chrzanową (HRP) przeprowadzono w oparciu o metodę nadjodanową podaną przez Talbota (16). Otrzymane koniugaty konserwowano dodając glicerol (równą objętość) oraz mertiolat.

Test ELISA. Obecność PM w płynie hodowli hybrydom wysięku otrzewnowego myszy oraz aktywność (miano) przygotowanych immunoreagentów: oczyszczone immunoglobuliny (IgG) i koniugaty z PM badano metodą ELISA. Wykonanie testu przedstawiało się w skrócie następująco: mikroplastyki F (Plastomed lub Nunc-Poly Sorb) opłaszczano oczyszczonym AMV. Po saturacji 0,1% roztworem albuminy bydlęcej (BSA) w PBS i przepłukaniu PBS z 0,05% Tweenu 20 (PBST), płytki inkubowano z badanymi próbkami. Obecność swoistych przeciwciał wykrywano stosując, po uprzednim płukaniu, znakowany peroksydazą chrzanową (HRP) koniugat anty-mysim IgG (Sigma). Jako substratu użyto ABTS (Boehringer Mannheim). Inkubację mikroplastyk z BSA, próbkami, koniugatem i substratem prowadzono przez 1 h w 37°C .

Test DAS ELISA. Wykrywanie AMV oraz antygenów gs w plazmie krwi i białku jaj oparto na metodzie podwójnych przeciwciał. Zasadniczo test wykonywano używając komercyjne reagenty: króliczą IgG przeciw białku p27 AMV (R-AMV) do opłaszczania płytek oraz jako koniugat R-AMV znakowaną HRP (R-AMV+HRP) produkcji Life Sciences Inc. Optymalne rozcieńczenie, zalecane przez producenta do stosowania, wynosiło dla obu reagentów 1:1000. Opaszczane mikroplastyki F (Plastomed lub Nunc-Maxi Sorb), przed nałożeniem prób, poddawano saturacji BSA, a jako substratu używano ABTS. Płukanie i warunki inkubacji były takie same jak przy teście ELISA.

Immunobloting. Swoistość PM oceniano za pomocą techniki immunobloting (7). Paski nitrocelulozy z wcześniej przeniesionymi z żelu poliakrylamidowego po rozdzielaniu elektroforetycznym białek strukturalnych AMV inkubowano z supernatantem hodowli hybrydom lub wysiękiem otrzewnowym myszy przez 90 min. w temperaturze pokojowej. Miejsce związania przeciwciał uwidaczniano stosując koniugat anty-mysi IgG znakowany HRP (Bio Rad), a następnie substrat 4-chlorek 1-naftolu (Bio Rad).

Określenie epitopowej swoistości. Dla oceny czy przeciwciała produkowane przez różne klony hybrydom rozpoznają ten sam lub odmienne epitopy antygeny przeprowadzono testy ELISA blokowanie i ELISA konkurencja.

W teście ELISA blokowanie, płytki opaszczane uprzednio AMV inkubowano przez 2 h z serią 4-krotnych rozcieńczeń każdego z PM (IgG PM) przed dodaniem koniugatów PM znakowanych HRP (PM+HRP). Etapy testu, począwszy od koniugatu, przeprowadzono w sposób wcześniej podany.

W teście ELISA konkurencja, na opaszczony AMV płytki nakładano mieszaninę koniugatu i rozcieńczeń PM (10^{-1} – 10^{-5}). Stopień konkurencji wyrażało najwyższe rozcieńczenie IgG PM konkurujące w co najmniej 50% wiązanie koniugatów z AMV.

Próby do badań w teście DAS ELISA. Wybrane o najwyższej czułości kombinacje testu DAS ELISA na bazie własnych PM oceniano porównując je w wykrywaniu antygenów gs ALV z testem DAS ELISA opartym na komercyjnych immunoreagentach (Life Sciences Inc) oraz komercyj-

nym zestawem Avian Leukosis Virus Antigen Test Kit (ELISA ALV-Ag) produkcji IDEXX. W badaniach tych, poza oczyszczonym AMV, użyto 2 próby plazmy kurcząt zakażonych AMV, 4 próby białek z jaj kur zakażonych AMV, 10 prób ujemnych białek z jaj SPF (Lohman) oraz po 10–15 prób białek jaj pochodzących z pięciu krajowych stad reprodukcyjnych kur nieśnych i ogólnoużytkowych. Próby białka pobierano ze świeżo zniesionych jaj. Wszystkie materiały przechowywano w temperaturze -70°C .

Wyniki i omówienie

Kurczęta SPF-L (Lohman) okazały się niewrażliwe na zakażenie wirusem AMV (brak leukemii i obecności wirusa w plazmie po zakażeniu). Natomiast dużą wrażliwość wykazywały kurczęta SPF-LD (linia kur wyselekcjonowanych w IN-RA). U prawie 100% zakażonych ptaków wystąpiła leukemia w 2–4 tygodnie p.i. Miano wirusa w plazmie kurcząt leukemicznych określone testem DAS ELISA wynosiło od 6400 do 51 200. Aktywność oczyszczonego AMV była wysoka (miano 102 400–204 800), a stężenie białka wynosiło średnio około 7 mg/ml (od 6,1 do 8,4 mg/ml w poszczególnych partiach oczyszczania). Optymalną ilość antygeny do opaszczania mikroplastyk ustalono na 10 $\mu\text{g/ml}$.

Charakterystykę użytych w pracy PM przedstawiono w tab. 1. Klasyfikację immunoglobulin PM określono wcześniej (7). Ponieważ komórki klonów hybrydoma wytwarzające te PM przechowywane były kilka lat w stanie zamrożenia sprawdzono ich żywotność, aktywność sekrecyjną i swoistość. Wszystkie trzy klony zachowały dobrą żywotność i aktywność sekrecyjną przeciwciał o określonej wcześniej swoistości, reagując monospecyficjnie z białkiem wirusa AMV o masie cząsteczkowej 27 kD (białko p27).

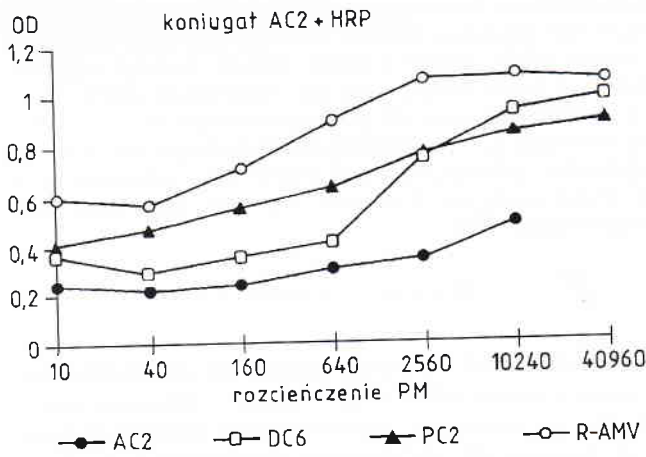
Oczyszczone z wysięku otrzewnowego IgG PM posiadały wysokie miano w teście ELISA (tab. 1). Użyto je do przygotowania koniugatów znakowanych HRP, w próbach określenia epitopowej topografii oraz do opaszczania mikroplastyk w teście DAS ELISA. Optymalne rozcieńczenia robocze, ustalone w próbach mianowania, przedstawiono w tab. 1. W podobny sposób wybierano optymalne rozcieńczenia koniugatów użyte w testach ELISA blokowanie i konkurencja oraz DAS-ELISA (tab. 1).

Wyniki testu ELISA blokowanie przedstawiono na ryc. 1–3. Najsilniejszy stopień blokowania (około 80%) wykazano w układach homologicznych. W zbliżonym stopniu blokowany był koniugat PC2+HRP przez PM AC2. W grupie PM najsłabiej blokowało PM PC2 koniugaty DC6+HRP, a następnie AC2+HRP. Użyte w teście przeciwciała poliklonalne R-AMV (królicza IgG anty-p27 AMV) wykazywało prawie całkowity

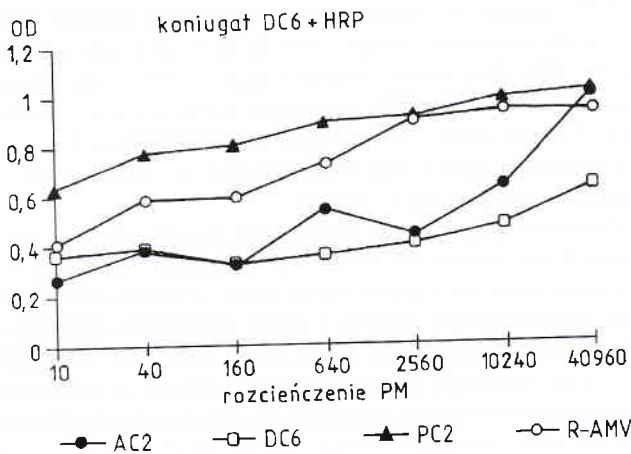
Tab. 1. Charakterystyka PM^a dla antygenów gs ALV

PM	Swoistość	Izotyp Ig	Miano ELISA (×1000)	ELISA blokowanie konkurencja	DAS ELISA	
					opaszczanie	koniugat HRP
AC2	p27	IgG 2b	128 ^b	500 ^c	2000 ^d	500 ^e
DC6	p27	IgG 2b	64	1000	2000	1000
PC2	p27	IgG 1	128	1000	2000	1000

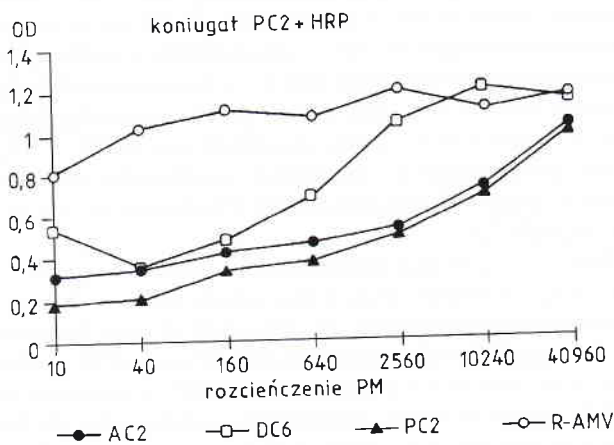
Objaśnienia: ^a – przeciwciała monoklonalne, ^b – miano IgG PM w teście ELISA z AMV, ^c – końcowe rozcieńczenie koniugatu dające maksymalną ekstynkcję w teście ELISA z AMV, ^d – optymalne rozcieńczenie IgG PM określone w teście ELISA z AMV, ^e – optymalne rozcieńczenie koniugatu określone w teście ELISA z AMV.



Ryc. 1. ELISA blokowanie koniugat AC2+HRP



Ryc. 2. ELISA blokowanie koniugat DC6+HRP



Ryc. 3. ELISA blokowanie koniugat PC2+HRP

Tab. 2. ELISA konkurencja pomiędzy PM i ich odpowiednikiem koniugat HRP

Przeciwciała monoklonalne (PM)	Koniugaty HRP			
	AC2	DC6	PC2	R-AMV
AC2	3+*	2+	2+	-
DC6	3+	4+	-	-
PC2	4+	3+	4+	-
R-AMV	5+	4+	3+	3+

Objaśnienie: * 50% konkurencji wiązania koniugatu przez PM w rozcieńczeniach odpowiednio: 2+ - 10^{-2} , 3+ - 10^{-3} , 4+ - 10^{-4} , 5+ - 10^{-5} .

brak blokowania koniugatu PC2+HRP oraz umiarkowane blokowanie koniugatów AC2+HRP i DC2+HRP.

Wyniki testu ELISA konkurencyjności na wiązanie koniugatu przez homologiczne PM (tab. 2). W kombinacji heterologicznej PM AC2 konkurowało w takim samym stopniu z koniugatami DC2+HRP i PC2+HRP. Natomiast PM DC6 nie konkurowało zupełnie z koniugatem PC2+HRP. Brak konkurencji wykazywały również wszystkie trzy PM z koniugatem przeciwciał poliklonalnych R-AMV. Z kolei przeciwciała R-AMV silnie konkurowało zarówno w układzie homologicznym, jak i też z koniugatami wszystkich trzech PM.

Przeprowadzone badania epitopowej topografii PM, przy użyciu testów blokowania i konkurencji wykazały, że DC6 i PC2 rozpoznawały różne determinanty antygenowe białka p27. Podobnie trzy PM, uzyskane przez De Boer i Osterhaus (3), rozpoznawały dwa różne epitopy na białku p27 ALV. Z kolei Persons i wsp. (9) przy użyciu 10 PM wykazali istnienie pięciu niezależnych determinant antygenowych na tym polipeptydzie.

Wyniki porównawczych badań zastosowania różnych kombinacji PM w teście DAS ELISA do wykrywania oczyszczonego AMV przedstawiono w tab. 3. Z dwóch testów komercyjnych (kombinacje nr 16 i nr 17) znacząco czulszy w wykrywaniu AMV okazał się test DAS ELISA oparty na poliklonalnych przeciwciałach R-AMV i koniugacie R-AMV (Life Sciences). Tylko jedna kombinacja z PM w teście DAS ELISA (nr 10) wykazywała tak samo wysoką czułość. Kombinacje PM nr 7 i 9 okazały się mniej aktywne w wykrywaniu antygenu gs AMV. Pozostałe kombinacje PM (nr 1, 2, 3, 5, 6 i 11) były nieaktywne w wykrywaniu AMV w najniższym użytym rozcieńczeniu prób.

Wyniki porównawczych badań dwóch wybranych kombinacji testu DAS ELISA na bazie PM (nr 9 i 10) z testami komercyjnymi (nr 16 i 17) do wykrywania antygenu gs ALV

Tab. 3. Wykrywanie oczyszczonego AMV przez różne kombinacje PM w teście DAS ELISA

Nr kombinacji	Oplaszczanie	Koniugat HRP	AMV ($\times 1000$)
1	PM AC2	PM AC2	-
2	PM AC2	PM DC6	-
3	PM AC2	PM PC2	-
4	PM AC2	R-AMV ^b	64 ^a
5	PM DC6	PM AC2	-
6	PM DC6	PM DC6	-
7	PM DC6	PM PC2	8
8	PM DC6	R-AMV	128
9	PM PC2	PM AC2	8
10	PM PC2	PM DC6	8192
11	PM PC2	PM PC2	-
12	PM PC2	R-AMV	512
13	R-AMV ^c	PM AC2	32
14	R-AMV	PM DC6	32
15	R-AMV	PM PC2	32
16	R-AMV	R-AMV	8192
17	ELISA ALV-Ag	(IDEXX)	128

Objaśnienia: a - rozcieńczenie, w którym wykryto AMV, b - koniugat-królicza IgG przeciw p27 AMV (Life Sciences Inc.) w rozcz. 1:1000, c - królicza IgG przeciw p27 AMV (Life Sciences Inc.) w rozcz. 1:1000.

Tab. 4. Wykrywanie antygeny gs ALV w badanych próbach przez wybrane kombinacje testu DAS ELISA

Kombinacja DAS ELISA	Oplaszczanie	Koniugat HRP	Plazma kurcząt zakażonych AMV (×1000)		Białko jaj kur zakażonych AMV (×100)				Białko jaj kur badanych stad					
			1	2	1	2	3	4	SPF	Lg	RIR	Sx	Aw	Sx+RiR
9	PM PC2	PM AC2	8 ^a	8	8 ^a	2	0,1	0,1	0/10 ^b	0/15	0/15	0/15	1/10	0/10
10	PM PC2	PM DC6	512	128	128	32	0,5	0,5	0/10	0/15	0/15	1/15	4/10	0/10
16	R-AMV	R-AMV	512	128	128	16	0,5	0,5	0/10	0/15	0/15	1/15	4/10	0/10
17	ELISA ALV-Ag	(IDEXX)	32	8	2	8	0,5	0,1	0/10	0/15	0/15	0/15	4/10	0/10

Objaśnienia: a – miano antygeny gs AMV, b – liczba prób dodatnich w teście DAS ELISA/liczba prób badanych.

w wybranych próbach przedstawiono w tab. 4. Najbardziej czułe okazały się dwie kombinacje testu DAS ELISA nr 10, oparta na PM PC2 i koniugacie PM DC6 oraz nr 16, z poliklonalnymi przeciwciałami R-AMV i koniugatem R-AMV. W odniesieniu do badanych prób plazmy ich czułość była 16× wyższa od kombinacji nr 17 (kit ALV-Ag) oraz 16–64× czulsza od kombinacji nr 9 (PM PC2 z PM AC2+HRP). Podobnie wyższą czułość (5–64×) wykazywały obie kombinacje przy badaniu czterech prób białek jaj dodatnich. W serii badań białek jaj pochodzących z pięciu stad reprodukcyjnych kur używając kombinacji testu DAS ELISA nr 10 i 16 wykryto w sumie po 5 prób dodatnich na 75 badanych, testem nr 17 (ALV-Ag) 4 próby, natomiast w kombinacji nr 9 tylko 1 próbę.

Zastąpienie tradycyjnie otrzymywanych immunoreagentów przeciwciałami monoklonalnymi podnosi swoistość i czułość testu oraz zmniejsza występowanie reakcji niespecyficznych, związanych z częstą obecnością u ptaków antygenów pochodzenia endogenego (6).

Czułość testu DAS ELISA, w którym użyto PM PC2 do oplaszczania płytek i PM DC6 jako koniugatu była wysoka i porównywalna z testem DAS ELISA opartym na komercyjnych immunoreagentach R-AMV (Life Sciences) oraz wyższa w porównaniu z innym komercyjnym zestawem ELISA ALV-Ag (IDEXX). Użycie przeciwciał monoklonalnych przez innych autorów (3) w teście DAS ELISA znacznie zwiększyło jego czułość. Wykrywalność antygenów gs ALV w białku jaj wzrosła 16–32-krotnie. Również w badaniach porównawczych nad efektywnością wykrywania antygenów gs w białku jaj testem DAS ELISA, w którym użyto PM wykryto wyższy odsetek niosek wydających wirus ALV niż odczynem wiązania dopełniacza (4).

Uzyskane wyniki wskazują, że na bazie posiadanych przeciwciał monoklonalnych można opracować zestaw DAS ELISA do wykrywania zakażeń kur wirusami białaczek i stosować go zarówno w rutynowej diagnostyce białaczek kur jak również w programach uwalniania stad kur od wirusów białaczek ptasich.

·Piśmiennictwo

1. *Clarc D. F., Dougherty R. M.*: J. Gen. Virol. 47, 283, 1980.
2. *De Boer G. F.* i wsp.: Avian Path. 12, 447, 1983.
3. *De Boer G. F., Osterhaus A. D. M. E.*: Avian Path. 14, 39, 1985.
4. *De Boer G. F., Osterhaus A. D. M. E., Kouwenhoven B.*: Avian Path. 14, 435, 1985.
5. *De Boer G. F.*: Approaches To Control Avian Lymphoid Leukosis, t. 13, Development in Veterinary Virology, 1987.
6. *Gavora J. S., Spencer J. L., Gowe R. S., Harris D. L.*: Poult. Sci. 59, 2165, 1980.

7. *Minta Z.*: Uzyskanie przeciwciał monoklonalnych przeciwko białku p27 wirusów białaczek ptaków. Praca hab., IWet, Puławy, 1989.
8. *Minta Z., Dambrine G., Coudert F., Karczewski W.*: Bull. Vet. Inst. Puławy 34, 23, 1991.
9. *Persons S. J., Wilson L. D., Ely C. M., Parsons J. T., Benjamin D. C.*: Hybridoma 3, 25, 1984.
10. *Payne L. N., Purchase H. G.*: Leukosis/Sarcoma Group, red. W. B. Calnek, H. J. Barnes, W. M. Reid, H. W. Yoder Jr.: Diseases of Poultry. Iowa State Univ. Press, Iowa, 1991.
11. *Smith E. J., Fadly A., Okazaki W.*: Avian. Dis. 23, 698, 1979.
12. *Spencer J. L.* i wsp.: Avian Path. 5, 221, 1976.
13. *Spencer J. L.* i wsp.: Avian Dis. 21, 331, 1977.
14. *Spencer J. L.*: Avian Path. 13, 599, 1984.
15. *Reik L. M.* i wsp.: J. Immunol. Meth. 100, 123, 1987.
16. *Talbot P. J.*: Methods Techn. Virology 16, 144, 1993.

Adres autora: doc. dr hab. Zenon Minta, ul. Kościuszki 12/5, 24-100 Puławy

DEVRIESE L. A., HOMMEZ J., VANDAMME P., KERSTERS K., HAESBROUCK F.: *In vitro* oporność na antybiotyki szczepów *Ornithobacterium rhinotracheale* izolowanych od drobiu i dzikich ptaków. (*In vitro* antibiotic sensitivity of *Ornithobacterium rhinotracheale* strains from poultry and wild birds). Vet. Rec. 137, 435–436, 1995 (17)

O. rhinotracheale wywołuje choroby układu oddechowego u indyków, przepiórek i kurcząt. Ze względu na powolny wzrost na podłożach sztucznych nie podejmowano badań nad antybiotykoopornością tego zarazka. Stosując Columbia blood agar oraz hodowlę w atmosferze 5% dwutlenku węgla określono wartość MIC (µg/ml) dla 9 substancji o działaniu przeciwbakteryjnym. Wartość ta dla ampicyliny i ceftiofuru wynosiła 0,12–4,0, doksycykliny 0,25–16,0, eufloksacynu 0,25–2,0, flumechiny 1,0–8,0, linkomycyny 0,25–0,5, penicyliny G 0,12–0,1, spektinomycyny 3,0–15,0 i tylozyny 0,5–4,0, zaś dla sulfometoksazolu-TMP 250.

G.

GUGLICK M. A., MAC ALLISTER C. G., ELY R. W., EDWARDS W. C.: Schorzenie wątroby u ośmiu koni po zastosowaniu anatoksyny tężcowej. (Hepatic disease associated with administration of tetanus antitoxin in eight horses). Am. J. vet. med. Ass. 206, 1737–1740, 1995 (11)

U koni i źrebąt po zastosowaniu anatoksyny tężcowej wystąpiło subkliniczne zapalenie wątroby. Choroba wystąpiła po 30–70 dniach po iniekcji anatoksyny. Bardzo pomocną w ustaleniu subklinicznej postaci zapalenia wątroby była wysoka aktywność surowiczej γ -transferazy glutamylowej i transaminazy asparaginianowej. Ze względu na możliwość wystąpienia po zastosowaniu anatoksyny tężcowej surowiczego zapalenia wątroby wskazane jest szczepienie klaczy ciężarnych na 30 dni przed terminem porodu. Takie postępowanie umożliwi z jednej strony uzyskanie wysokiej ochrony jak i przekazanie bierne źrebietom swoistych przeciwciał za pośrednictwem siary.

G.