

# Uzyskanie i ocena świńskiej surowicy odpornościowej anty-*Haemophilus somnus*\*)

ANNA RZAŚA, TADEUSZ STEFANIAK, MARIA NIKOŁAJCZUK

Zakład Prewencji i Immunologii Weterynaryjnej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, ul. Norwida 31, 50-376 Wrocław

Rzaśa A., Stefaniak T., Nikołajczuk M.

## Production and characterization of swine *Haemophilus somnus* immune serum

### Summary

The aim of the study was the estimation of swine immune serum administered to porkers immunized with a self-prepared *H. somnus* vaccine. A common facultative pathogen in cattle, *Haemophilus somnus*, was utilized for the production of swine immune serum. This was inspired by the formerly detected wide cross-reactivity of *H. somnus* antibodies with other Gram-negative bacteria and additionally by the high clinical ability of *H. somnus* antisera used in calves, foals and puppies in Gram-negative infections. It is noteworthy that a higher humoral immune response was indicated by porkers protected as piglets with *H. somnus* immune serum. Moreover, they demonstrated rapid IgG antibody increase from the start of immunization. Porkers given the *H. somnus* vaccine showed an anamnestic-type immune response. No negative influence of the fatteners' immunization on production results was confirmed.

**Keywords:** *Haemophilus somnus*, pigs

Pomimo coraz lepszych warunków chowu, intensyfikacja produkcji zwierzęcej wciąż powoduje wiele problemów zdrowotnych. Zależy to nie tylko od warunków środowiska zewnętrznego, ale też od niedostatków odporności samych zwierząt. Obecnie dąży się do ograniczenia użycia antybiotyków w metafilaktyce chorób, stąd też poszukiwane są inne środki, które pozwalają zabezpieczyć krytyczne momenty w życiu zwierząt. Wykorzystanie antybiotyków w ochronie ich zdrowia może być zredukowane dzięki użyciu biopreparatów. Do tej pory były one odsuwane na plan dalszy, ze względu na często powolniejsze (w porównaniu do antybiotyków) i mniej spektakularne efekty ich działania (6, 7, 13).

W przypadku stosowania autosurowic (surowic uzyskanych od zwierząt z danego stada) lekarzy weterynarii zniechęca konieczność podawania znacznych objętości, stąd większym zainteresowaniem cieszą się surowice odpornościowe oraz skoncentrowane preparaty immunoglobulinowe. Zasadnicza różnica między surowicą normalną a odpornościową polega na zdecydowanie większej skuteczności tej ostatniej. Mechanizm działania surowicy odpornościowej jest powszechnie znany: zawarte w niej swoiste przeciwciała wiążą swoiście antygeny drobnoustrojów, indukują włączenie się innych mechanizmów obronnych, co doprowadza do zahamowania infekcji i jej rozprzestrzeniania. Proces ten jest immunologicznie swoisty, ale mogą zachodzić reakcje krzyżowe.

Wieloletnie badania byłej Katedry Prewencji i Immunologii Weterynaryjnej AR we Wrocławiu wykazały, że przeciwciała anty-*Haemophilus somnus* (*Histophilus somnus* (9), *Histophilus somni* (8)) reagują krzyżowo z in-

nymi bakteriami Gram-ujemnymi. Dotychczas wykonano terenowe badania kliniczne surowic odpornościowych przeciw *H. somnus* u bydła, koni i psów (5, 11, 12). W immunoblottingu wykazano silne reakcje uzyskanych surowic odpornościowych wobec *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. dublin*, *S. gallinarum-pullorum*, *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, *Klebsiella pneumoniae* (11, 15). Warto podkreślić, że surowice odpornościowe przeciw *H. somnus* – patogenowi bydła, wykazały wysoką skuteczność w zakażeniach innymi bakteriami Gram-ujemnymi u szceniąt, źrebiąt, prosiąt i królików. Na tej podstawie zrodził się pomysł przygotowania świńskiej surowicy odpornościowej anty-*H. somnus* i profilaktycznego jej stosowania w odchowcie prosiąt (7).

Celem badań była ocena aktywności surowicy odpornościowej pozyskanej przy uboju tuczników immunizowanych przygotowaną we własnym zakresie szczepionką *Haemophilus somnus*.

### Materiał i metody

W celu przygotowania szczepionki zakupiono referencyjny szczep *H. somnus* CAMP 6280 z Czech Collection of Microorganism w Brnie. Zawiesinę namnożonych bakterii doprowadzono do koncentracji  $10^9$ /ml PBS i następnie dodawano 15% adjuwantu Emulsigen (MPV Laboratories, USA). Otrzymaną szczepionką przeprowadzono cykl immunizacji tuczników, podając im pięć domięśniowych iniekcji (1 ml) w odstępach dwutygodniowych.

Immunizację przeprowadzono w warunkach fermy przemysłowej, na mieszańcach trzyrasowych wbp × pbz × du i wbp × pbz × pi. W doświadczeniu użyto 28 tuczników z dwóch sąsiadujących kojców, z których połowa w każdym kojcu jako prosięta na tydzień przed odsadzeniem otrzymała profilaktycznie

\*) Badania wykonano w ramach projektu badawczego nr 3 PO6Z 014 24 finansowanego przez KBN.

surowicę anti-*H. somnus*. Jeden kocyk stanowił grupę doświadczalną, drugi zaś kontrolną. Zwierzęta zważono przy rozpoczęciu immunizacji i w dniu jej zakończenia. Każdorazowo przed iniekcją pobierano krew od wybranych sztuk (po 6) z kocyka doświadczalnego i kontrolnego, w celu oznaczenia aktywności przeciwciał i wybranych parametrów oceny zdrowia zwierząt. We krwi oznaczono: stężenie hemoglobiny (Hb) metodą Drabkina i fibrynogenu (Fb) wg Millar i wsp. (4), wartość hematokrytu (Ht), koncentrację erytrocytów, leukocytów i obraz białokrwinkowy. W surowicy oznaczono stężenie haptoglobiny (Hp) wg Jones i Mould (2), białko całkowite metodą biuretową oraz proteinogram na podstawie elektroforezy bibułowej.

Pobieranie krwi przy uboju tuczników i uzyskanie surowicy odpornościowej wykonało Przedsiębiorstwo Pro Animali Sp. z o.o. Surowicę uzyskaną od wszystkich immunizowanych tuczników zmieszano, zabezpieczono fenolem w końcowej koncentracji 0,5% i przechowywano w 4°C przez 6 miesięcy, następnie filtrowano, kontrolowano jałowość i rozlewano do butelek szklanych o pojemności 250 lub 500 ml.

Procedura testu ELISA w celu wykrywania przeciwciał anti-*Haemophilus somnus* – była wzorowana na metodzie opracowanej przez Stefaniaka (10) dla surowic bydłych. Antygen fazy stałej stanowił supernatant sonikatu *H. somnus* polskiego szczepu nr 223, uzyskany wg Williams i wsp. (17). Jako drugie przeciwciała zastosowano koniugat peroksydazowy przeciwciał króliczych anti-świńskiej IgG oraz przeciwciała monoklonalne anti-IgM i anti-IgA świni (Serotec), wykrywane następnie koniugatem peroksydazowym przeciwciał kozich anti-IgG myszy (Sigma).

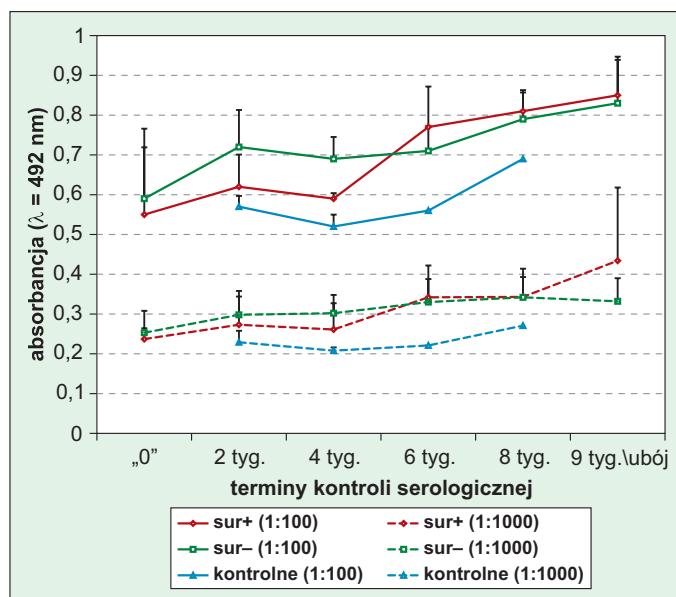
Zebrany materiał liczbowy poddano analizie statystycznej metodą jednoczynnikowej analizy wariancji z wykorzystaniem pakietu statystycznego Statistica 6.0, a istotność różnic oszacowano testem t-Studenta.

## Wyniki i omówienie

Na ryc. 1-3 przedstawiono narastanie przeciwciał anti-*H. somnus* w poszczególnych klasach immunoglobulin.

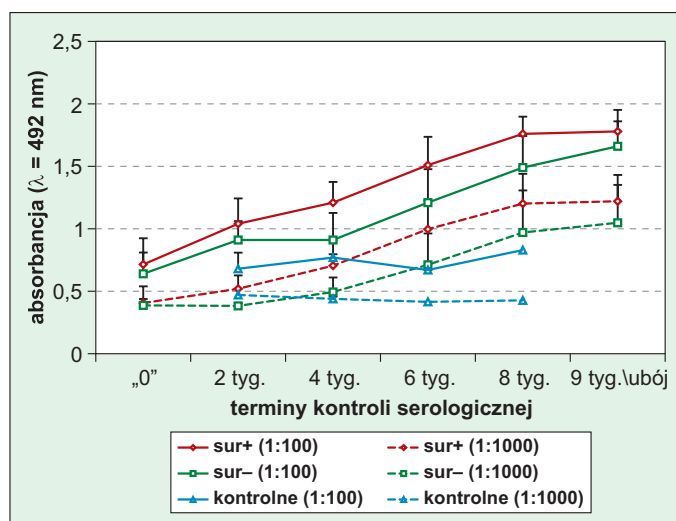
W początkowej fazie immunizacji obserwowano stosunkowo niską reakcję w klasie IgM, zbliżoną we wszystkich grupach tuczników (ryc. 1). U tuczników otrzymujących surowicę w okresie okołoodsadzeniowym, wyraźny wzrost reakcji przeciwciał klasy IgM wystąpił w 6. tygodniu immunizacji. U tuczników, które jako prosięta nie otrzymały surowicy, wzrost intensywności reakcji nastąpił już po pierwszej dawce szczepionki, po czym obserwowano łagodniejszy niż w poprzedniej podgrupie wzrost reakcji w kolejnych tygodniach. U tuczników kontrolnych przez cały okres obserwacji notowano niewielkie wahania intensywności reakcji anti-*H. somnus*.

W obu grupach tuczników szczepionych stwierdzono w rozcieńczeniu surowic 1 : 100 wzrost intensywności reakcji przeciwciał swoistych klasy IgG przez cały okres immunizacji (ryc. 2). Wzrost był wyższy u tuczników, które jako prosięta otrzymały surowicę anti-*H. somnus*. Jednak w surowicach badanych w rozcieńczeniu 1 : 1000 stwierdzono, że tuczniki, które otrzymywały surowicę jako prosięta, zareagowały na szczepienie wzrostem intensywności reakcji już po pierwszej dawce szczepionki, co może wskazywać na reakcję anamnesticzną. Wzrost intensywności reakcji surowicy pozyskanej od tuczników nie zabezpieczonych surowicą w okresie okołoodsadzeniowym obserwowano w klasie IgG dopiero



**Ryc. 1.** Narastanie reakcji przeciwciał klasy IgM w toku immunizacji tuczników przeciw *H. somnus*

Objaśnienia: sur+(1 : 100) i sur+(1 : 1000) – reakcja rozcieńczonej odpowiednio 1 : 100 lub 1 : 1000 surowicy tuczników, które otrzymały surowicę odpornościową anti-*H. somnus* jako prosięta; sur-(1 : 100) i sur-(1 : 1000) – reakcja rozcieńczonej odpowiednio 1 : 100 lub 1 : 1000 surowicy tuczników, które nie otrzymały surowicy odpornościowej anti-*H. somnus* jako prosięta; kontrolne 1 : 100 i 1 : 1000 – reakcja rozcieńczonej odpowiednio 1 : 100 lub 1 : 1000 surowicy tuczników kontrolnych

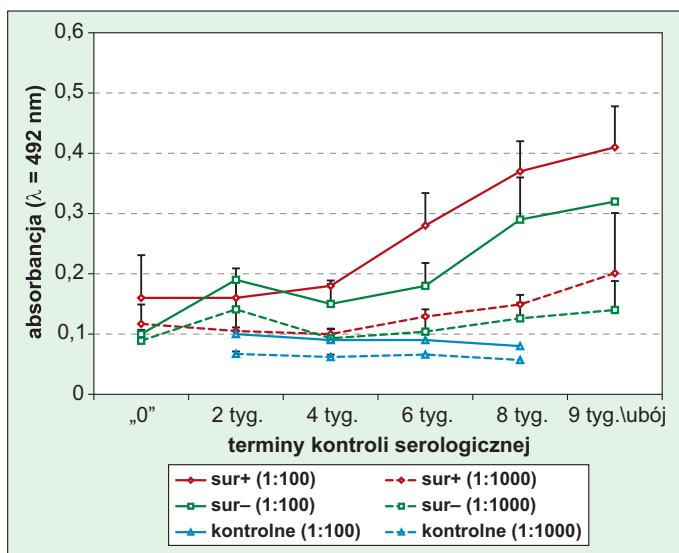


**Ryc. 2.** Narastanie reakcji przeciwciał klasy IgG w toku immunizacji tuczników przeciw *H. somnus*

Objaśnienia: jak na ryc. 1.

po drugiej dawce szczepionki. W obu grupach tuczników immunizowanych do końca okresu immunizacji narastała intensywność reakcji przeciwciał anti-*H. somnus*. U tuczników kontrolnych występował niższy poziom przeciwciał reagujących krzyżowo z antygenami *H. somnus* niż u zwierząt immunizowanych, ponadto w trakcie doświadczenia obserwowano u nich tylko niewielkie wahania intensywności reakcji.

Tuczniki otrzymujące surowicę jako prosięta wykazały nieco wyższą intensywność reakcji przeciwciał anti-*H. somnus* w klasie IgA niż pozostałe grupy zwierząt



**Ryc. 3.** Narastanie reakcji przeciwciał klasy IgA w toku immunizacji tuczników przeciw *H. somnus*  
Objaśnienia: jak na ryc. 1.

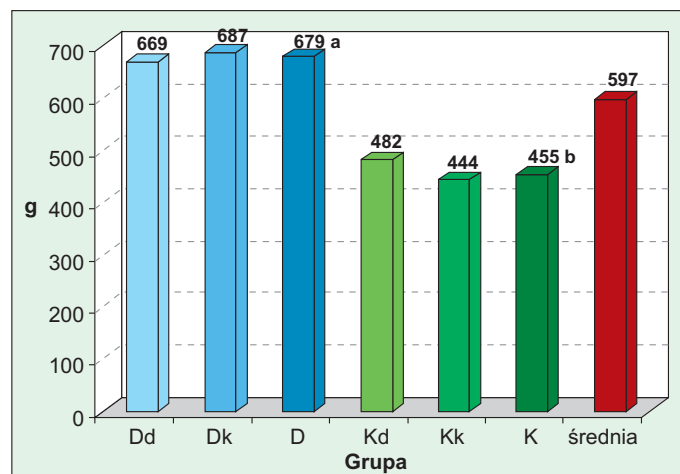
(ryc. 3). W wyniku immunizacji intensywność reakcji surowic w rozcieńczeniu 1 : 100 wzrastała do końca okresu obserwacji. U tuczników, które nie były zabezpieczone surowicą odpornościową w okresie okołoodsadzeniowym, obserwowano także stały wzrost intensywności, ale na niższym poziomie niż w poprzedniej grupie. Tuczniaki kontrolne wykazywały bardzo niską reakcję anty-*H. somnus*, bez wahań w intensywności. W rozcieńczeniu 1 : 1000 początkowo odnotowano śladową reakcję w klasie IgA, choć u tuczników immunizowanych była ona nieco wyższa niż u kontrolnych. Od 6. tygodnia immunizacji odnotowano nieznaczny wzrost intensywności w grupach tuczników immunizowanych i podobnie jak w rozcieńczeniu 1 : 100 silniej reagowały zwierzęta otrzymujące surowicę anty-*H. somnus* w okresie okołoodsadzeniowym.

W toku immunizacji obserwowano narastanie frakcji  $\gamma$ -globulinowej (9,2; 10,2; 15,8; 18 g  $\times$  l<sup>-1</sup> przy kolejnych szczepieniach), w grupie kontrolnej poziomy te były nieco niższe (odpowiednio: 8,9; 11,4; 12,9 i 16,2 g  $\times$  l<sup>-1</sup>). Stwierdzone różnice między grupami nie były jednak statystycznie istotne. Narastanie tej frakcji u wszystkich zwierząt można interpretować jako wynik stymulacji przez antygeny środowiska, a silniejszy wzrost  $\gamma$ -globulin u tuczników doświadczalnych był spowodowany zwiększeniem przez podanie szczepionki spektrum antygenów, wobec których wytwarzane były przeciwciała. Na istniejącą w stadzie infekcję subkliniczną mogą wskazywać także stosunkowo wysokie poziomy białek ostrej fazy (Hp i Fb), wahające się na pograniczu górnej granicy normy i powyżej. W toku immunizacji stwierdzono obniżenie się poziomu Hp (z początkowej wartości 1,11 g  $\times$  l<sup>-1</sup> do 0,74 g  $\times$  l<sup>-1</sup> przy uboju), co mimo że nadal wartości tego białka przekraczały górną granicę referencyjną (0,6 g  $\times$  l<sup>-1</sup>), wskazuje na powrót do normy. Z kolei poziomy Fb były nieco wyższe u tuczników szczepionych niż u kontrolnych przez cały okres obserwacji. Podobną sytuację stwierdzono u cieląt szczepionych *H. somnus* w cielętniku, w którym w trakcie immunizacji występowały stany zapalne narządu oddechowego

(14). Znaczenie diagnostyczne Fb jako białka ostrej fazy u świń jest zdaniem niektórych badaczy ograniczone, co zdaniem autorów może mieć związek z szybką aktywacją krzepnięcia, powodującą zaniżanie wyników w części pobieranych próbek krwi.

Nie stwierdzono znaczących różnic między tucznikami immunizowanymi a kontrolnymi w zakresie pozostałych ocenianych parametrów krwi. Początkowo koncentracja leukocytów wyraźnie przekraczała górną granicę normy (średnio 32 tys./mm<sup>3</sup> u szczepionych i 30 tys./mm<sup>3</sup> u kontrolnych), co mogło być spowodowane okresem adaptacyjnym do nowych kojców, w których były one umieszczone na 2 tygodnie przed rozpoczęciem immunizacji. W dalszym okresie obserwacji stwierdzono powrót liczby leukocytów do wartości prawidłowych.

Średnie tempo przyrostu masy ciała (5.-6. miesiąc życia) tuczników w obiekcie, gdzie przeprowadzono immunizację w świetle danych piśmiennictwa (3, 16) nie było zbyt wysokie: 0,597 kg (ryc. 4). Niespodziewanie odnotowano wyższy przyrost masy ciała wśród zwierząt immunizowanych (0,679 kg) w porównaniu do kontroli (0,455 kg) i różnica ta była statystycznie istotna przy  $p \leq 0,05$ . Wynik ten można próbować tłumaczyć tym, że w trakcie okresu obserwacji u tuczników kontrolnych odnotowano wzrost reakcji przeciwciał w klasie IgM i jednoczesny wzrost stężenia frakcji  $\gamma$ -globulin, co może wskazywać na przebycie przez nie subklinicznej infekcji drobnoustrojem reagującym krzyżowo z *H. somnus*. Szczepienie tuczników doświadczalnych uchroniło je przed tą infekcją i zapobiegło zahamowaniu tempa wzrostu. Poczyniono też ciekawe obserwacje w podgrupach (zwierzęta, które jako prosięta otrzymały surowicę anty-*H. somnus* i nie) w obu kojcach. Otóż w kojcu doświadczalnym tuczniaki, które jako prosięta otrzymały surowicę odpornościową, przyrastały nieco



**Ryc. 4.** Średnie tempo wzrostu tuczników w trakcie trwania immunizacji (5.-6. miesiąc życia)

Objaśnienia: D – tuczniaki immunizowane ogółem, Dd – tuczniaki, które dostały surowicę odpornościową jako prosięta, Dk – tuczniaki, które nie dostały surowicy odpornościowej jako prosięta; K – tuczniaki kontrolne ogółem, Kd – tuczniaki, które dostały surowicę odpornościową jako prosięta, Kk – tuczniaki, które nie dostały surowicy odpornościowej jako prosięta. Dane oznaczone małymi różnymi literami różnią się statystycznie istotnie przy  $p \leq 0,05$

wolniej (0,669 kg) niż te, które z antygenem zetknęły się po raz pierwszy (0,687 kg). To wolniejsze tempo przyrostu masy ciała można próbować tłumaczyć skutkami silniejszego pobudzenia odpowiedzi immunologicznej, co mogło być związane z wyższymi stężeniami niektórych cytokin, mogących negatywnie wpływać na apetyt (1). Odwrotną tendencję zaobserwowano w kojcu kontrolnym. Tam lepiej przyrastały tuczniaki, które jako prosięta otrzymały surowicę (0,482 kg). Te osobniki, które nie były dodatkowo zabezpieczone w czasie odchowu przy matkach, przyrastały wolniej (0,444 kg), co może być skutkiem większego obciążenia układu immunologicznego w pierwszych tygodniach życia, co spowodowało, jak się wydaje, obniżenie tempa przyrostów masy ciała w późniejszym okresie.

W tab. 1 porównano średnią intensywność reakcji surowic tuczniaków immunizowanych *H. somnus* z intensywnością zbiorczej surowicy odpornościowej uzyskanej z krwi pobranej przy uboju i surowicy prosiąt zabezpieczanych tą surowicą. Konserwacja surowicy fenolem spowodowała niewielki spadek jej aktywności wobec sonikatu *H. somnus* w teście ELISA we wszystkich analizowanych klasach przeciwciał. U prosiąt przed podaniem surowicy występowała niewielka reakcja, wynikająca, jak się wydaje, z krzyżowej aktywności przeciwciał siarowych wchłoniętych z przewodu pokarmowego w okresie wchłaniania immunoglobulin, a pochodzących z reakcji loch na antygeny bakterii Gram-ujemnych obecnych w środowisku fermy. Po trzech dniach po podskórnym podaniu prosiętom surowicy odpornościowej doszło do około trzykrotnego wzrostu intensywności reakcji swoistej w klasie IgG, około dwukrotnego wzrostu w klasie IgM i nie zaobserwowano istotnej zmiany aktywności przeciwciał klasy IgA. Można przypuszczać, że wynikało to z szybkiego transportu IgA na błony śluzowe prosięcia.

### Podsumowanie

Wykazano, że w wyniku immunizacji wyższą intensywność reakcji swoistej uzyskują tuczniaki, które jako prosięta otrzymywały surowicę odpornościową anty-*H. somnus*. Ponadto w odpowiedzi humoralnej tej grupy obserwowano bardzo wczesny wzrost przeciwciał klasy IgG, (w przeciwieństwie do tuczniaków nie zabezpieczanych wcześniej surowicą anty-*H. somnus*) co sugeruje anamnesticzny charakter odpowiedzi immunologicznej. To zjawisko pozwala domniemywać, że u prosiąt zabezpieczanych surowicą anty-*H. somnus* dochodziło do rozpoznawania idiotypów swoistych wobec antygenów *H. somnus*, pobudzenia reakcji „sieci antyidiotypowej” i stymulacji klonów limfocytów B posiadających idiotypy swoiste dla antygenów *H. somnus*. W podsumowaniu można stwierdzić, że produkcja świńskiej surowicy odpornościowej anty-*H. somnus* nie odbija się niekorzystnie na wynikach tuczu. Uzyskiwana surowica osiąga wysokie miana i może być stosowana u prosiąt, co potwier-

**Tab. 1. Aktywność przeciwciał anty-*Haemophilus somnus* w surowicy zbiorczej oraz w surowicy prosiąt przed i po podaniu surowicy odpornościowej, w porównaniu do średniej intensywności reakcji surowic tuczniaków immunizowanych, przyjętej za 100%**

| Badane surowice  | Rozcieńczenie          | IgG    | IgM    | IgA    |
|--|------------------------|--------|--------|--------|
|  |                        | %      |        |        |
| Średnia reakcja surowicy tuczniaków pobranej przy uboju (n=14) | (absorbancja) 1 : 100  | (1,71) | (0,83) | (0,36) |
|  | 100                    | 100    | 100    | 100    |
|  | (absorbancja) 1 : 1000 | (1,11) | (0,37) | (0,16) |
|  | 100                    | 100    | 100    |        |
| Zbiorcza surowica konserwowana fenolem                         | 1 : 100                | 115,96 | 86,21  | 114,11 |
|  | 1 : 1000               | 77,39  | 42,70  | 53,13  |
| Prosięta 3 dni po podaniu 3 ml surowicy odpornościowej (n = 2) | 1 : 100                | 37,13  | 20,73  | 25,09  |
| Prosięta przed podaniem surowicy (n = 3)                       | 1 : 100                | 12,28  | 10,00  | 25,83  |

dają wyniki wstępnych badań pilotażowych (7). Swoista immunoprofilaktyka przeciwko patogenowi nieswoistemu dla gatunku nie przeszkadza ponadto w serologicznym kontrolowaniu szlaków rozprzestrzeniania się naturalnych infekcji.

### Piśmiennictwo

1. Dantzer R.: Cytokine-induced sickness behaviour: a neuroimmune response to activation of innate immunity. Eur. J. Pharmacol. 2004, 500, 399-411.
2. Jones G. E., Mould D. L.: Adaptation of the guaiacol (peroxidase) test for haptoglobins to a microtitration plate system. Res. Vet. Sci. 1984, 37, 87-92.
3. Kluczek S.: Magnesium metabolism in pigs during the fattening period, Ann. Anim. Sci. 2003 Suppl., 2, 315-318.
4. Millar H. R., Simpson J. G., Stalker A. L.: An evaluation of the heat precipitation method for plasma fibrinogen estimation. J. Clin. Pathol. 1971, 24, 827-830.
5. Nikolajczuk M., Nowacki W., Tokarska-Rojowska D., Stefaniak T., Molenda J., Grzeszkowiak M.: Krzyżowa reaktywność z bakteriami gram (-) psiej surowicy anty-*Haemophilus somnus*. Mat. X Kongresu PTNW, Wrocław 1996, 366.
6. Nowacki W., Stefaniak T., Chelmońska-Soyta A., Rząsa A., Nikolajczuk M.: Sero-profilaktyka i seroterapia – dzisiejsze spojrzenie. Problemy zdrowia narządu oddechowego młodych zwierząt gospodarskich, ELMA, Wrocław 2002, 87-97.
7. Rząsa A., Nikolajczuk M.: A może jednak seroprofilaktyka? Trzoda Chlewna 2003, nr 8-9, 158-162.
8. Siddaramappa S., Inzana T. J.: *Haemophilus somnus* virulence factors and resistance to host immunity. Anim. Health Res. Rev. 2004, 5, 79-93.
9. Silva S. V., Little P. B., Kaushnik A.: An immunodominant epitope on 40 kilodalton outer membrane protein is conserved among different strains of *Haemophilus (Histophilus) somnus*. Zntbl. Bakteriologie. 1995, 282, 449-456.
10. Stefaniak T.: Detection of the *Haemophilus somnus* antibodies in the bulls' reproductive tract fluids using the ELISA. I. Elaboration of the ELISA for the detection of the specific antibodies in the IgG, IgM and IgA classes. Arch. Vet. Pol. 1993, 33, 79-88.
11. Stefaniak T., Chelmońska-Soyta A., Molenda J., Nowacki W., Wieliczko A., Nikolajczuk M.: Sources and consequences of *Haemophilus somnus* interspecies cross-reactivity; laboratory and clinical results in cattle, horse, pig, dog and poultry. XXX Tagung der Gesellschaft für Immunologie, Hannover, Immunobiology 1999, 200, nr 3-5, s. 747.
12. Stefaniak T., Chelmońska-Soyta A., Molenda J., Nowacki W., Popławski M., Nikolajczuk M.: Krzyżowa reaktywność *Somnubovinu* jako podstawa wysokiej skuteczności klinicznej. Mat. Symp. Aktualne problemy w patologii bydła. Wrocław 1995, s. 32-33.
13. Stefaniak T., Kopeć W., Gąsowska A., Borkowski J., Gierzyńska E., Popławski M.: Zastosowanie immunoglobuliny żółtka jaja w profilaktyce biegunek u prosiąt ssących. Medycyna Wet. 2003, 59, 539-542.
14. Stefaniak T., Nowacki W., Molenda J., Sobiech E., Nikolajczuk M.: Monitorowanie wybranych parametrów krwi cieląt immunizowanych szczepionką *Somnuvac*<sup>®</sup> w warunkach terenowych. Medycyna Wet. 1997, 53, 668-673.
15. Stefaniak T., Wieliczko A., Mazurkiewicz M., Nikolajczuk M.: Krzyżowa reaktywność przeciwciał anty-*Haemophilus somnus* z antygenami szczepów *Salmonella* sp. izolowanych od drobiu. Medycyna Wet. 1998, 54, 601-606.
16. Szulc K., Kaczmarek P., Buczyński J. T., Rząsa A., Luciński P.: The impact of fish meal on production results of pig fattening. Ann. Anim. Sci. 2004 Suppl. 2, 205-209.
17. Williams J. M., Smith G. L., Murdock F. M.: Immunogenicity of *Haemophilus somnus* bacterin in cattle. Am. J. Vet. Res. 1978, 39, 1756-1762.

Adres autora: dr Anna Rząsa, ul. Norwida 31, 50-375 Wrocław; e-mail: rzasa@ozi.ar.wroc.pl