

Kaszubkiewicz Cz., Madej J. A. — **Cerebral meningitis and encephalitis in foxes due to salmonellosis.**

In 50 foxes with the symptoms of disturbances of the central nervous system there was found post mortem the infection due to *S. dublin* and *S. enteritidis*, and in the rest 50% caused by *S. dublin* only.

At necropsy there was noticed the inflammation of the cerebral chambers, especially lateral ventricles. Histological examinations revealed infiltrations of histiocytes, and in the smaller amounts neutral granulocytes in the cerebral tissue and the pia mater. There was found no injuries of the cerebral neurons.

JERZY MIERZEJEWSKI, ANDRZEJ SKOCZEK, TADEUSZ LIS

Porównanie aktywności immunogennej unieczynnionych formolem toksyny i zawiesiny laseczek *Cl. botulinum C*

Z Ośrodka Naukowo-Badawczego Służby Weterynaryjnej

Stosowane w szeregu krajach szczepionki przeciw botulizmowi dla zwierząt, tzw. anakultury stanowią całe hodowle bulionowe toksynogennych szczepów *Cl. botulinum C*, a niekiedy i D, unieczynnione formolem i adsorbowane na wodorotlenku glinu (2—5, 9—12, 15, 18—20, 22—27, 29, 32, 34, 35). Również w Polsce produkuje się taką szczepionkę przeciw botulizmowi dla zwierząt futerkowych (36).

Tymczasem w RFN firma Behringa produkuje szczepionkę przeciwko botulizmowi nerek w postaci tzw. anatoksyny, tj. pozbawionego bakterii płynu z hodowli *Cl. botulinum C*, unieczynnionego formolem i adsorbowanego na wodorotlenku glinu. Autorzy amerykańscy (7, 8), a następnie radzieccy (17) opisali metody otrzymywania oczyszczonej anatoksyny przeciw botulizmowi m. in. typu C pozbawionej zarówno komórek bakteryjnych i ich resztek strukturalnych, jak i substancji płynnych pozabiałkowych.

Dotychczas nie wiadomo jest, w jakim stopniu unieczynnione formolem laseczki *Cl. botulinum* obecne w anakulturach wzmacniają aktywność immunogenną anatoksyny. Przebadań tego zagadnienia powinno wyjaśnić przydatność stosowania w swoistej profilaktyce botulizmu anakultur lub też samych anatoksyn.

Celem badań własnych było porównanie aktywności immunogennej unieczynnionych formolem toksyny i zawiesiny laseczek *Cl. botulinum C*.

Materiał i metody

Do badań użyto:

1. Anatoksynę otrzymaną przez detoksykację 0,5% roztworem formaliny rozpuszczonego w płynie fizjologicznym liofilizatu oczyszczonej toksyny botulinowej C (6). Miano toksyny przed detoksykacją wynosiło 10^4 DLM/ml.

2. Trzykrotnie odwirowaną i przepłukaną płynem fizjologicznym zawiesinę masy bakteryjnej z 48 godz. hodowli *Cl. botulinum C* Nerz na pożywce Wrzoska o mianie 10^4 DLM/ml. Masa bakteryjna bezpośrednio po ostatnim płukaniu była traktowana 0,5% roztworem formaliny.

3. Surowicę wzorcową przeciwbotulinową typu C zawierającą 46 JA/ml produkcji Państwowego Kontrolnego Instytutu Preparatów Medyczno-Biologicznych w Moskwie.

4. Króliki mieszańce ok. 3 kg pochodzące z hodowli własnej.

5. Myszkę białą wagi ok. 20 g pochodzące z tej samej hodowli.

Zarówno anatoksynę, jak i zawiesinę masy bakteryjnej z dodatkiem formaliny przetrzymywano przez 14 dni w temp. 37° , po czym oznaczono w nich azot metodą Kiejdahla i doprowadzono przez odpowiednie rozcieńczenie do ekwiwalentnych ilości 40 mg N/ml. Uzyskane w ten sposób antygeny adsorbowano na 25% roztworze wodorotlenku glinu (36).

Każdym antygenem w dawkach po 0,1 ml na kg wagi ciała szczepiono po 8 królików codziennie przez 3 kolejne dni. Serie szczepień powtarzano 2 razy podskórną i 1 raz dożylną w odstępach 9-dniowych. Po upływie 7 dni od zakończenia ostatniej serii szczepień uodpornione zwierzęta skrwawiano i uzyskaną surowicę poddawano badaniom immunologicznym określając wielkość frakcji gamma-globulinowych, miano antytoksyn i aglutynin oraz ilość precypityn.

Frakcję gamma-globulinową mierzono przy pomocy elektroforezy bibułowej (33) i odczytywano w densitometrze ERI-65 firmy Zeiss.

Poziom antytoksyn określano metodą swoistej neutralizacji na myszkach białych i porównywano ze standardową surowicą antybotulinową C zawierającą 46 JA/ml (28). Do próby seroneutralizacji użyto toksyny zawierającej wyjściowo 10^4 DLM dla myszek białych.

Miano aglutynin w surowicach określano metodą probówkową. Jako antygen użyto 24-godz. hodowli bakteryjnej na podłożu Wrzoska, odwirowanej, przepłukanej 2-krotnie płynem fizjologicznym i zawieszanej w 0,5% roztworze formaliny do gęstości 8 probówki w skali McFarlanda. Jako graniczne miano aglutynacyjne przyjęto takie jej rozcieńczenie, które powodowało aglutynację oznaczoną na ++.

Precypityny określano w żelu agarowym wg metody Ouchterlony'ego (1) stosując jako antygen frakcję neurotoksykacyjną *Cl. botulinum C* Nerz pozbawioną hemaglutynin (16). Optymalne stężenia reagentów oraz wzajemne odległości baseników dobrano w serii wstępnych doświadczeń. Odczyn przetrzymywano przez kilka dni, aż do wyraźnego ukształtowania się linii precypitacyjnych.

Wyniki i omówienie

Oznaczenie elektroforetyczne frakcji gamma-globulinowej surowic 6 wybranych dowolnie

królików immunizowanych badanymi antygenami przedstawia tab. 1.

Tab. 1. Poziom gamma-globulin w surowicach wybranych dowolnie 6 królików

Rodzaj surowicy	Nr królika	Poziom gamma-globulin w %		Średni wzrost w %
		przed immunizacją	po immunizacji	
Antykomórkowa	1	16	28	75
	2	19	30	
	3	15	26	
Antytoksyczna	1	15	23	26
	2	17	17	
	3	15	19	

Przedstawione wartości średnie wskazują na wzrost frakcji gamma-globulinowej w króliczej surowicy antykomórkowej i antytoksycznej w porównaniu z poziomem przed immunizacją. Wzrost poziomu frakcji gamma-globulinowej po immunizacji w surowicach antykomórkowych był wyższy i wyniósł średnio 75%, natomiast w surowicach antytoksycznych 26%.

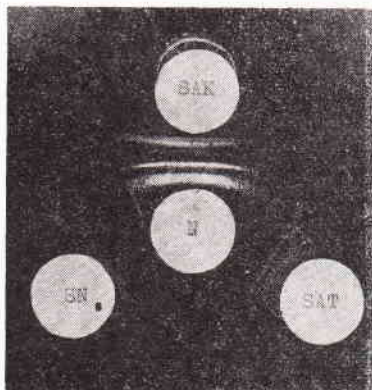
Oznaczenia miana antytoksycznego w mieszaninach surowic antykomórkowych i antytoksycznych przedstawia tab. 2.

Tab. 2. Miano antytoksyczne w mieszaninie surowic antykomórkowych i antytoksycznych w porównaniu z surowicą wzorcową

Surowice	Ilość jednostek antytoksycznych w 1 ml
Antykomórkowa	46
Antytoksyczna	0,46
Wzorcowa	46

Z tab. 2 wynika, że surowica antykomórkowa zawierała taką samą ilość jednostek antytoksycznych w 1 ml, jak i surowica wzorcowa, a surowica antytoksyczna 100 razy mniej.

Odczyn immunodiffuzji w żelu agarowym obrazuje ryc. 1.



Ryc. 1. Odczyn immunodiffuzji surowicy antykomórkowej (SAK), antytoksycznej (SAT) i normalnej (SN) z neurotoksyną *Cl. botulinum* C (N).

Fot. J. Pacewicz

Przedstawiony obraz zawiera trzy układy. W układzie surowica antykomórkowa — neurotoksyna (SAK-N) stwierdzono trzy wyraźne i 2 słabiej zaznaczone skupiska linii precipitacyjnych. Linie powstałe najbliższej basenika z neurotoksyną miały bardziej zatarte kontury, były natomiast najsłabsze i intensywniej opalizujące. Skupisko linii najbardziej zewnętrznych wykazywało słabszą opalescencję.

W układzie surowica antytoksyczna — neurotoksyna (SAT-N) stwierdzono 2 skupiska linii precipitacyjnych słabo zaznaczonych, z których skupisko przyśrodkowe było bardziej ostre i intensywniej opalizujące.

W układzie kontrolnym surowica normalna — neurotoksyną (SN-N) wytworzyły się jedynie ślady linii precipitacyjnych.

Oznaczenie mian aglutynacyjnych we wszystkich badanych surowicach przedstawia tab. 3.

Tab. 3. Miana aglutynacyjne w surowicach królików immunizowanych unieczynnionymi formołem, toksyną i zawiesiną laseczek *Cl. botulinum*

Surowica	Króliki	Miana aglutynacyjne surowic	Średnie miana aglutynacyjne surowic
Antykomórkowa	1	1:800	1:800
	2	1:800	
	3	1:400	
	4	1:800	
	5	1:1600	
	6	1:800	
	7	1:800	
	8	1:400	
Antytoksyczna	1	1:400	1:387
	2	1:400	
	3	1:400	
	4	1:800	
	5	1:200	
	6	1:100	
	7	1:400	
	8	1:400	

Z przedstawionych danych w tab. 3 wynika, że miano aglutynacyjne surowic antykomórkowych było ponad 2-krotnie wyższe, niż miano surowic antytoksycznych.

Z przeprowadzonych doświadczeń wynika, że wprowadzenie do organizmu królika antygeny komórkowego powoduje powstanie znacznie wyższego miana aglutynin i precipityn, frakcji gamma-globulinowej oraz większej odporności swoistej antytoksycznej, niż wprowadzenie tą samą drogą takiej samej ilości antygeny toksycznego.

Uzyskane wyniki badań stanowią interesujący przyczynek do lepszego poznania immunogenezy i immunologii, a pośrednio nawet etiologii i patogenezy botulizmu. Od lat toczy się dyskusja na temat roli, jaką w etiologii botulizmu odgrywają toksyna botulinowa i laseczka *Cl. botulinum* (20). Nowsze prace nad immunochemią toksyny botulinowej z jednej strony, (13, 14) a patogenezą botulizmu z drugiej (37) jednoznacznie wskazują na toksynę, jako czynnik etiologiczny.

W takim ujęciu drobnoustrój *Cl. botulinum* jest rozpatrywany wyłącznie jako producent i nośnik określonej ilości toksyny. Tymczasem uzyskane wyniki wskazują, że drobnoustroje podane w eskwiwalentnym stosunku białkowym mają przewagę immunogenną nad toksyną botulinową.

Można przeprowadzić różne interpretacje tych wyników.

Laseczka *Cl. botulinum* jest bardziej aktywnym immunogenem dzięki obecności, prócz

neurotoksyn, innych ciał wywołujących w immunizowanym organizmie większą odporność antytoksyyczną, niż sama antytoksyna.

Plazma komórki *Cl. botulinum* może wykazywać większą aktywność toksyczną w przeliczeniu na ekwiwalent białka, niż toksyna pozakomórkowa (21).

Zawiesina komórek podana jako szczepionka ulega bardziej powolnej sorpcji przez organizm, co powoduje powstanie długotrwałego stanu immunogenezy.

Słuszność wymienionych prób interpretacji wymaga weryfikacji doświadczalnej. Z punktu widzenia praktycznego, dotychczas uzyskane wyniki wskazują na celowość produkowania szczepionki przeciw botulizmowi zwierząt z całych hodowli płynnych *Cl. botulinum*.

Wnio ski

1. Procentowy poziom frakcji gamma-globulinowej jest wyższy w surowicy antykomórkowej, niż w surowicy antytoksyicznej.

2. Surowica antykomórkowa zawiera 100 razy więcej jednostek antytoksyicznych w 1 ml, niż surowica antytoksyiczna.

3. Linie precypitacji dyfuzyjnej w układzie surowica antykomórkowa — neurotoksyna są wyraźniejsze, niż w układzie surowica antytoksyiczna — neurotoksyna.

4. Miano aglutynacji próbówkowej surowicy antykomórkowej jest wyższe, niż surowicy antytoksyicznej.

Piśmiennictwo

- Albrycht A., Rymkiewicz D.: Post. Hig. 16, 881, 1962.
- Appleton G. S., White P. G.: Am. J. vet. Res. 20, 166, 1959.
- Boroff D. A., Reilly J. R.: Bact. Proc. 78, 1958.
- Boroff D. A., Reilly J. R.: J. Bact. 77, 142, 1959.
- Boroff D. A., Reilly J. R.: Bact. Proc. 5, 89, 1960.
- Brühl A., Komorowska-Rycerz A.: Med. dośw. 19, 43, 1967.
- Cardella M. A., Duff J. T., Gottfried C., Begel S.: Bact. Proc. 90, 1956.
- Cardella M. A., Duff J. T., Gottfried C., Begel S.: J. Bact. 75, 360, 1958.
- Dalling T.: Bull. Off. int. Epizoot. 59, 1650, 1963.
- Dinter Z., Kull K. E.: Nord. VetMed. 2, 906, 1950.
- Dinter Z.: Nord. VetMed. 7, 1056, 1955.
- Dräger K., Schindler R., Vock G.: Tierärztl. Umsch. 12, 136, 1957.
- Iwanowa Ł. G., Butatowa T. I., Matwiejew K. I.: Z. Mikrobiol. Epidem. Immunobiol. 45, 10, 1968.
- Iwanowa Ł. G., Butatowa T. I., Matwiejew K. I.: Z. Mikrobiol. Epidem. Immunobiol. 46, 51, 1969.
- Larsen A. E., Nicholes P. S., Gebhardt L. P.: Am. J. vet. Res. 16, 573, 1955.
- Lowenthal J. P., Lamanna C.: Am. J. Hyg. 57, 46, 1953.
- Markin A. P., Łukin E. P., Pietrowa E. K., Worobiew A. A.: Z. Mikrobiol. Epidem. Immunobiol. 32, 96, 1961.
- Mason I. K., Steyn H. P.: J. S. Afr. vet. med. Ass. 9, 65, 1938. (cyt. wg Matwiejew K. I.: Botulizm, Medgiz, Moskwa, 1959).
- Matwiejew K. I., Butatowa T. I., Sergiejewa T. I.: Wietierinarija, Moskwa, 35, 42, 1958.
- Matwiejew K. I.: Botulizm, Medgiz, Moskwa, 1959.
- Mierzejewski J.: Pol. Arch. wet. 10, 37, 1966.
- Pitre J., Quitte P. L.: Bull. Acad. vet. Fr. 31, 379, 1958.
- Prevot A. R.: Bull. Soc. vet. prat. Fr. 33, 1, 1949.
- Prevot A. R., Brygoo E. R.: Anns Inst. Pasteur, Paris, 79, 1, 1950.
- Prevot A. R., Collin P., Silliac R.: Recl. Med. vet. 82, 188, 1956.
- Prevot A. R., Raynaud M., Turpin A., Silliac R.: C. r. Acad. Sci., Paris, 246, 1632, 1958.
- Prevot A. R., Moutoin R. J., Silliac R.: Bull. Acad. vet. Fr. 32, 147, 1959.
- Rymkiewicz D., Switalska A., Trembowler P.: Postępowanie z materiałem badanym w kierunku obecności toksyn i lasieczek botulinowych — Wyd. Metodyczne PZH, 38, 27, 1972.

- Scheibner G.: Monat. für Tierheilkunde 7, 195, 1955.
- Sterne M., Mason J. H.: J. S. Afr. vet. med. Ass. 9, 71, 1938.
- Sterne M., Mason J. H.: J. S. Afr. vet. med. Ass. 12, 82, 1941.
- Sterne M., Wentzel L. M.: Rep. XIV-th Int. Vet. Congr. 3, 319, 1952.
- Tuleczyński M.: Metody laboratoryjne diagnostyki klinicznej, PZWL, 1962.
- Verge J.: Recl. Med. vet. 127, 767, 1951.
- Weinberg M., Goy P.: C. r. Seanc. Soc. Biol., Paris, 92, 564, 1925.
- Wiśniewski Z., Różańska M.: Norma techniczna produkcji szczepionki dla zwierząt futerkowych przeciwko zatruciom jadem kiełbasianym typu C — maszynopis.
- Zacks S. J., Metzger J. F., Smith C. W.: J. Neuropath. exp. Neurol. 21, 610, 1962.

Adres autora: dr habil. Jerzy Mierzejewski, ul. Krańcowa 1/15, 24-100 Puławy.

Межеевски Е., Скочек А., Лис Т. — Сравнение иммуногенной активности инактивированных формальдегидом токсина и суспензии бацилл *Cl. botulinum* C.

В сыворотке иммунизированных кроликов определяли уровень гаммаглобулиновой фракции антитоксического титра и уровень преципитинов и агглютининов. Полученные результаты указывают, что иммуногенная активность инактивированных формальдегидом бацилл является более высокой чем соответственного анатоксина.

Mierzejewski J., Skoczek A., Lis T. — The comparison of immunogenic activity of formal inactivated toxine and suspension of *Clostridium botulinum* C.

There was compared immunogenic activity of formal inactivated toxine and suspension of *Cl. botulinum* C, on the basis of the determination of the level of gamma-globulin fraction, antitoxine titer and the level of precipitin and agglutinin in sera of immunized rabbits. The obtained results showed to the higher immunogenic activity of formal inactivated suspension of *Cl. botulinum*.

ROBERTS T. A., COLLINGS D. F.: Enzootia botulizmu typ C u brojlerów. (An outbreak of type C-botulism in broiler chickens). Avian Dis. 17, 650—658, 1973 (3).

U siedmiotygodniowych brojlerów rozpoznano botulizm wywołany toksyną typu C. Rozpoznanie choroby oparto o badanie biologiczne na myszach z użyciem jednoważnych i wieloważnych surowic dla typów A—E *Clostridium botulinum*. Typ C *Cl. botulinum* wyizolowano ze ściółki z pomieszczeń, w których hodowano brojlery. U kurcząt zakażonych doustnie lub dożylnie czystą hodowlą wyosobnionego szczepu (0,5 ml = 10,000 MLD toksyny dla myszki) nie wystąpiły objawy choroby. Objawy zatrucia uzyskano natomiast po doustnym podaniu badanym zwierzętom tkanki mięśniowej brojlerów zakażonych na drodze naturalnej. 1 gram zakażonej tkanki zawierał 20,000 MLD toksyny dla myszek.

Z.

WATTS T. C., OLSON S. M., RHODES C. S.: Leczenie izoniazidem promienicy u bydła. (Treatment of bovine actinomycosis with isoniazid). Can. Vet. J. 14, 223—224, 1973 (9).

Promienica powoduje znaczne straty ekonomiczne u bydła na terenach zachodnich prowincji Kanady. W 19 przypadkach promienicy stosowano izoniazyd w dawce 5—10 mg/funt wagi ciała przez okres 28—31 dni. Lek podawano doustnie w kapsułkach żelatynowych. Stwierdzono, że izoniazyd hamował rozwój zmian chorobowych. Jednakże jedynie w nielicznych przypadkach dochodziło do cofania się zmian. Objawy zatrucia objawiające się utratą łanknienia i depresją wystąpiły tylko u jednej leczzonej sztuki przy maksymalnej dawce leku. Po leczeniu nie obserwowano nawrotów choroby.

R.