

CHOROBY ZAKAŻNE I INWAZYJNE

ZYGMUNT CYGAN, REGINA CYGAN

Badania nad aktywnością chorobotwórczą laseczek *Cl. perfringens* A o różnych właściwościach toksynogennych

Z Zakładu Higieny Weterynaryjnej w Lublinie

Znaczenie chorobotwórcze laseczek *Cl. perfringens* A polega na powodowaniu różnorodnych form klinicznych zakażeń przyrannych (3, 11, 17) oraz zatruc pokarmowych (5, 6, 8, 9, 21). Częstotliwość występowania tych schorzeń jest stosunkowo duża, co wynika z rozpowszechnienia tego zarazka w przyrodzie tj. głównie w ziemi (16, 23) oraz w przewodzie pokarmowym człowieka i zwierząt (14, 15). Wymienione wyżej schorzenia rozwijają się jako następstwo działania określonych toksyn czyli tzw. czynników lub antygenów rozpuszczalnych. Tematem niniejszych rozważań będą tylko toksyny ważne w etiopatogenezie zakażeń przyrannych.

Aktywność chorobotwórcza laseczek *Cl. perfringens* A zależy od rodzaju i koncentracji wytworzonych toksyn. Szczególne przy tym znaczenie posiada letalny i zgorzelotwórczy czynnik alfa o równoczesnym działaniu fosfolipazy C (10). Rola innych wytwarzanych przez laseczki zgorzeli gazowej antygenów rozpuszczalnych tj. przede wszystkim teta (hemolizyna), kappa (prokolagenaza), mi (hialuronidaza) i ni (dezoksyrybonukleaza) jest znana tylko fragmentarycznie.

W związku z powyższym zadaniem badań własnych było poznanie letalnego i zgorzelotwórczego działania wyosobnionych z ziemi szczepów *Cl. perfringens* A w kontekście produkowanych ilości toksyn alfa, teta, kappa, mi i ni.

Materiał i metody

1. Izolacja. Ogółem z 25 próbek ziemi pobranej z pól uprawnych województwa „L” wyosobniono 48 szczepów *Cl. perfringens*. Powyższe szczepy uzyskano przy użyciu 2 metod, tj.: a) wysiewu mieszaniny ziemi w bulionie w stosunku 1:8 na podłoże Zeisslera z siarczanem neomycyny (100 mcg/ml) oraz b) namnażania próbek ziemi w podłożu Wrzoska (37°C — 18 godz.) i ogrzania w 90°C przez 5 min. z kolejnym przesiewem na podłoże Zeisslera bez antybiotyku. Dla otrzymania wzrostu beztlenowców na podłożach stałych stosowano metodę pyrogalolową hodowli. Pojedyncze kolonie odpowiadające morfologicznie *Cl. perfringens* wycinano wraz z agarem i namnażano w podłożu Wrzoska.

2. Identyfikacja. Wszystkie wyosobnione szczepy beztlenowców poddano identyfikacji gatunkowej w oparciu o właściwości fermentacyjne w stosunku do laktozy, glukozy, sacharozy, maltozy, salicyny i manitu oraz o cechy proteolityczne w odniesieniu do mleka lakmusowego, 15% żelatyny i ściętej surowicy końskiej (80°C — 1 godz.).

Identyfikacja typowa zarazka obejmowała wykrywanie tzw. antygenów głównych w trypsynowanych i nietrypsynowanych hodowlach 20 szczepów w podłożu trawionym VF opisanym w pracy Meisla i Albrycht (13). W tym celu używano odczyn nekrotyzujący na świnkach morskich oraz letalny na białych myszach (2). Dowodem przynależności zarazka do *Cl. perfringens* typu A było wykazanie w hodowli nietrypsynowanej aktywności chorobotwórczej swoiście neutralizowanej surowicą antytoksynową p-ko laseczce zgorzeli gazowej (Wellcome Research Laboratories, Anglia).

3. Oznaczanie ilościowe toksyn. U wszystkich 20 szczepów *Cl. perfringens* A określono skład ilościowy produkowanych toksyn — alfa, teta, kappa, mi oraz ni.

Toksynę alfa mianowano określając aktywność lecytynazową i hemolityczną płynów hodowli przeliczoną na ilość w 1 ml jednostek zmętnieniowych i hemolitycznych — DHM „Dosis Haemolytica Minima” (7, 10).

Toksynę teta (hemolizyna) oznaczano ilościowo odczynem hemolitycznym wg metodyki stosowanej przez Cygana (2). Wyniki przedstawiano w jednostkach hemolitycznych DHM.

Toksynę kappa (kolagenaza) mianowano przy użyciu kolagenu A metodą stosowaną w pracy Cygana (2). Aktywność tej toksyny wyrażano w najmniejszych dawkach trawiących kolagen DCM — „Dosis Collagenasica Minima”. Wyniki podawano określając ilość DCM w 1 ml płynu hodowli.

Toksynę mi (hialuronidaza) oznaczano metodą ACRA wg Oakleya i Warrack (18). Za jednostkę aktywności hialuronidazy przyjmowano najmniejszą ilość toksyny powodującą utratę lepkości tzw. 1 dawki wskazującej substratu (płyn stawowy koński), a ostateczne wyniki przeliczano na aktywność 1 ml płynu hodowli.

Toksynę ni (dezoksyrybonukleaza) określano metodą leukocytową wg Warrack i wsp. (22). Działanie tej toksyny oceniono podając ilość dawek wskazujących w 1 ml hodowli.

4. Określanie chorobotwórczości szczepów. Wszystkie szczepy *Cl. perfringens* A przebadano pod względem posiadanych właściwości letalnych i zgorzelotwórczych.

Właściwości letalne sprawdzano zakażając do otrzewnowo po 3 myszki dawką 0,5 ml odwirowanego płynu z 18 godz. hodowli zarazka w podłożu trawionym VF.

Aktywność zgorzelotwórczą wykazywano wprowadzając domięśniowo świnkom morskim 0,5 ml kilkunastogodzinnej hodowli beztlenowców w podłożu Wrzoska z 0,5% glukozy. U zakażonych świnek morskich diagnozowano zgorzeli mięśni na podstawie wystąpienia przyżyciowych objawów toksemii i charakterystycznych pośmiertnych zmian w mięśniach.

Wyniki

Ogółem z 25 próbek ziemi wyosobniono 48 szczepów beztlenowców. Pod względem morfologicznym były to laseczki gramdodatnie, da-

jące na podłożu Zeisslera kolonie wypukłe z hemolizą alfa i beta lub płaskie z hemolizą wyłącznie typu alfa. Wszystkie drobnoustroje fermentowały z wytwarzaniem gazu laktozę, glukozę, sacharozę i maltozę, a ponadto koagulowały mleko lakmusowe oraz nieznacznie rozpuszczały ściętą surowicę. Żaden z zarazków nie fermentował mannitu i salicyny. Zdolności proteolityczne w stosunku do 15% żelatyny posiadało 35 szczepów.

Powyżej podany zespół cech biochemicznych u wyosobnionych beztlenowców odpowiadał właściwościom uznanym za typowe dla laseczek grupy *Cl. perfringens*. Jednocześnie przeprowadzona identyfikacja typowa wykazała, że badane drobnoustroje produkowały spośród antygenów głównych jedynie czynnik alfa i na tej podstawie zostały zaliczone do serotypu A.

Wyniki badań nad właściwościami toksynogennymi laseczek *Cl. perfringens* A oraz ich aktywnością letalną i zgorzelotwórczą podaje załączona tabela. Wynika z niej, że tylko 9 szczepów posiadało pełny skład złożony z 5 produkowanych toksyn. Pozostałe beztlenowce wykazywały cechy defektywności toksynogennej, dotyczącej u 11 szczepów czynnika ni, 7 — mi oraz 6 kappa. Jedynie w zakresie wytwarzania toksyn alfa i teta nie stwierdzono u żadnego szczepu całkowitej utraty tych zdolności.

cej od 400 do 2000 jedn./ml. U większości szczepów dających efekt letalny tj. u 6 na 8 stwierdzono pełny skład badanych antygenów. Pozostałe 2 szczepy były defektywne pod względem mi oraz ni.

Aktywność zgorzelotwórczą występującą przy ilości toksyny alfa od 100 do 2000 jedn./ml stwierdzono u 12 (60%) szczepów *Cl. perfringens* A. W większości zarazki te posiadały kompletny zestaw badanych antygenów toksycznych. Obserwowana defektywność dotyczyła u wszystkich 3 szczepów czynnika ni, a u 2 z nich także toksyny mi.

Pozostała grupa 8 szczepów całkowicie niechorobotwórczych produkowała antygen alfa w niskiej koncentracji tj. od 10 do 100 jedn./ml. Podkreślić przy tym należy, że żaden z tych drobnoustrojów nie posiadał pełnego składu badanych toksyn.

Dyskusja

Chorobotwórcze działanie laseczek *Cl. perfringens* A określają różne czynniki, głównie wrażliwość organizmu, właściwości toksynogenne zarazka oraz Eh i pH tkanek. Według Mac Lennana (11) wymienione czynniki posiadają zasadniczy wpływ na wystąpienie określonej formy klinicznej infekcji przyrannej. W niniejszej pracy, na przykładzie wyosobnio-

Tab. 1. Działanie chorobotwórcze szczepów *Cl. perfringens* w zależności od rodzaju i ilości wytwarzanych toksyn

Nr szczepu	Produkowane toksyny						Działanie chorobotwórcze zarazka	
	alfa		teta	kappa	mi	ni	letalne	zgorzelotwórcze
	jedn. zm/ml	DHM/ml	DHM/ml	DCM/ml	jednostek hial./ml	dawek wsk/ml		
1	2000	2000	100	2	256	100	3/3	zg
2	1000	2000	100	2	1024	10	3/3	zg
3	1000	2000	100	10	1024	100	3/3	zg
4	1000	800	200	10	512	100	3/3	zg
5	400	400	20	2	512	20	3/3	zg
6	400	400	20	2	256	10	3/3	zg
7	400	400	20	+	-	-	3/3	zg
8	400	400	20	+	-	-	3/3	zg
9	200	200	20	10	1024	100	1/3	zg
10	100	100	100	10	1024	200	0/3	zg
11	100	100	200	10	1024	-	0/3	zg
12	100	100	100	2	512	100	0/3	zg
13	100	100	2	1	-	-	0/3	bzg
14	100	100	100	-	-	-	0/3	bzg
15	100	100	2	-	512	-	0/3	bzg
16	100	100	2	-	1024	-	0/3	bzg
17	100	100	10	-	512	-	0/3	bzg
18	20	20	20	-	-	-	0/3	bzg
19	20	20	2	-	-	-	0/3	bzg
20	10	10	10	1	-	-	0/3	bzg

Objaśnienia: zg = zgorzel gazowa; bzg = brak zgorzeli gazowej; licznik = ilość myszy padłych; mianownik = ilość myszy zakażonych; + = wytwarzanie toksyny; - = niewytwarzanie toksyny.

Aktywność laseczek w zakresie wytwarzania poszczególnych czynników była b. zróżnicowana i wahała się dla toksyny alfa od 10 do 2000 jedn./ml; toksyny teta 2 — 200 DHM/ml; kappa 0 — 10 DCM/ml; mi 0 — 1024 jedn. hial./ml oraz ni 0 — 200 dawek wsk./ml hodowli.

Działanie letalne dla białych myszy wykazało 8 (40%) zbadanych szczepów. Powyższe właściwości zarazka stwierdzono przy wysokiej koncentracji w hodowli toksyny alfa wynoszą-

nych z ziemi 20 szczepów *Cl. perfringens* A analizowano jedynie znaczenie składu i ilości produkowanych toksyn dla chorobotwórczości zarazka.

Przeprowadzone badania własne wykazały, że patogenność laseczki zgorzeli gazowej ściśle wiąże się z rodzajem i ilością produkowanych toksyn. Wszystkie szczepy, które wytwarzały pełny skład toksyn zawsze powodowały efekt letalny i zgorzelotwórczy. Natomiast beztle-

nowce z defektywnością toksynogenną były z reguły niechorobotwórcze.

Szczególne znaczenie dla patogenności laseczek *Cl. perfringens* typu A posiadała ilość produkowanej fosfolipazy C (toksyna alfa). Przy koncentracji tego antygenu w hodowli wynoszącej 400 jedn./ml, bez względu na rodzaj i ilość pozostałych czynników, zawsze dochodziło do działania letalnego i zgorzelotwórczego odnośnego zarazka. Natomiast nie obserwowano aktywności chorobotwórczej bakterii produkujących toksynę alfa w stężeniu poniżej 100 jedn./ml.

Powyższe wyniki wskazują na podstawowe znaczenie fosfolipazy C dla patogenności *Cl. perfringens* A. Słusznie więc Ewans (4) oraz Mac Lennan (11) przypisują fosfolipazie C główną rolę w patogenezie zgorzeli gazowej. Mechanizm jej działania polega na niszczeniu w błonie komórkowej fosfolipidów tj. przede wszystkim lecytyn, sfingomielinę oraz kefaliny (1, 12).

Drugą toksyną istotną w chorobotwórczości laseczki zgorzeli gazowej wydaje się być czynnik kappa (prokolagenaza) wytwarzany w wysokiej na ogół koncentracji (2 — 10 DCM/ml) przez wszystkie szczepy chorobotwórcze (Nr 1 — 12) oraz niewielkiej ilości (1 DCM/ml) przez 2 tylko szczepy niechorobotwórcze (Nr 13 i 20). Uzyskany rezultat tych badań przemawia za słusnością poglądu Oakleya i wsp. (19, 20) oraz Mac Lennana (11) przypisujący prokolagenazie ważną rolę w szerzeniu się procesu zgorzeli gazowej w organizmie na drodze niszczenia kolagenu i retikuliny tkanek.

Znaczenie czynnika mi (hialuronidaza) dla oddziaływania zarazka na organizm polega na ułatwianiu penetracji tkanek przez rozkładanie w nich kwasu hialuronowego. Jednak wyniki własnych badań wskazują, że wytwarzanie hialuronidazy przez *Cl. perfringens* A nie posiada decydującego wpływu na jego patogenność. Przemawia za tym fakt, że również beztlenowce niechorobotwórcze Nr 15, 16 i 17 produkowały czynnik mi w wysokiej koncentracji od 1/256 do 1/1024 jedn./ml.

Odnosnie hemolizyny teta to stwierdzono ją u wszystkich badanych laseczek beztlenowych. Należy przy tym podkreślić, że na ogół wyższą aktywność hemolityczną posiadały szczepy chorobotwórcze (20—200 DHM/ml) aniżeli niechorobotwórcze (2—100 DHM/ml).

Ostatnią badaną toksyną był czynnik ni (dezyksyrybonukleaza) wytwarzany tylko przez chorobotwórcze laseczki *Cl. perfringens* A. Jednak produkowana przez nie ilość dezyksyrybonukleazy była b. zróżnicowana i wynosiła od 0 do 200 dawek wsk./ml. Może to wskazywać na ograniczone znaczenie tego antygenu dla letalnych i zgorzelotwórczych właściwości zarazka.

Reasumując wyniki własnych badań można stwierdzić, że patogenne działanie laseczek *Cl.*

perfringens A zależy od wielu wytwarzanych czynników toksycznych, z których jednak najważniejsze znaczenie posiada aktywność toksyny alfa.

Piśmiennictwo

1. Bingham A. D., Dawson R. M. C.: Biochim. biophys. Acta 59, 103, 1962.
2. Cygan Z.: Clostridia w narządach zwierząt zdrowych i padłych, praca doktorska, Lublin 1967.
3. Cygan Z., Wawrzekiewicz K.: Medycyna Wet. 9, 518, 1966.
4. Ewans D. G.: J. Path. Bact. 57, 75, 1945.
5. Hall H. E., Angelotti R., Lewis K. H., Foter M. J.: J. Bact. 45, 1094, 1963.
6. Hauschild A. H. W., Thatcher F. S.: J. Fd. Sci. 32, 467, 1967.
7. Heyningen v. W. E.: Biochem J. 35, 1246, 1941.
8. Hobbs B. C.: J. appl. Bact. 20, 74, 1956.
9. Hobbs B. C., Smith M. E., Oakley C. L., Warrack G. H., Cruickshank J. C.: J. Hyg., Camb. 51, 75, 1953.
10. Mac Farlane M. G., Knight B. C. J. G.: Biochem. J. 35, 384, 1941.
11. Mac Lennan J. D.: Bact. Rev. 26, 177, 1962.
12. Matsumoto M.: J. Biochem., Tokio 49, 23, 1961.
13. Meisel H., Albrycht H.: Med. dośw. 1, 27, 1955.
14. Meisel H., Trembouler P., Pogorzelska B.: Med. dośw. 4, 359, 1950.
15. Narayan C. G.: Acta vet. hung. 16, 65, 1966.
16. Nishida S., Nakagawara J.: J. Bact. 88, 1636, 1964.
17. Oakley C. L.: Br. med. Bull. 10, 52, 1954.
18. Oakley C. L., Warrack G. H.: J. Path. Bact. 63, 45, 1951.
19. Oakley C. L., Warrack G. H., Heyningen v. W. E.: J. Path. Bact. 58, 229, 1946.
20. Oakley C. L., Warrack G. H., Warren M. E.: J. Path. Bact. 60, 495, 1948.
21. Sutton R. G. A., Hobbs B. C.: J. Hyg., Camb. 66, 135, 1968.
22. Warrack G. H., Bidwell E., Oakley C. L.: J. Path. Bact. 63, 233, 1951.
23. Wijewanta E. A.: J. Path. Bact. 88, 339, 1964.

Adres autora: doc. dr habil. Zygmunt Cygan, ul. Słowicza 2/7, 20-336 Lublin.

Цыган З., Цыган Р. — Исследования по патогенности штаммов *Cl. perfringens* A, обладающих разной токсиногенностью.

Исследовали детальные и гангреногенные свойства 20 изолированных из земли штаммов *Cl. perfringens* A с учетом количества вырабатываемых ими токсинов альфа, тета, каппа, ми и ни. Активность продукции отдельных факторов была очень дифференцирована и колебалась в пределах: токсин альфа — от 10 до 2000 нефелометрических единиц/мл; тета — от 2 до 200 минимальных гемолитических доз/мл; каппа — от 0 до 10 dosis collagenasica minimum/мл; ми — от 0 до 1024 гиалуронидозовых единиц/мл; ни — от 0 до 200 индикаторных единиц/мл культуры.

Патогенным действием обладало 12 штаммов *Cl. perfringens* A, вырабатывающих токсин альфа в количестве от 400 до 2000 нефелометрических единиц/мл независимо от рода и титра других токсинов. Остальные 8 штаммов, которые были полностью апатогенные, производили токсин альфа в слабой концентрации т.е. от 10 до 100 нефелометрических единиц/мл. Авторы подчеркивают, что ни один из этих штаммов не вырабатывал полного состава т.е. всех 5 токсинов.

Cygan Z., Cygan R. — Studies on the pathogenic activity of *Cl. perfringens* A of different toxinogenic properties.

There have been studied lethal and gangraenogenic properties of 20 strains of *Cl. perfringens* A isolated from soil in relation to the quantity of produced toxins of alpha, theta, kappa, mi and ni types. The activity of the production of toxins by different strains was variable, and for alpha toxine it varied from 10 to 2000 u/ml; theta 2—200 DHM/ml, kappa 0—10 DCM, mi 0—1024 hyal. u/ml, and ni 0—200 dose/ml of culture. Pathogenic properties revealed 12 strains of *Cl. perfringens* A producers of alpha toxine at the concentration 400—2000 u/ml, irrespectively on the quality and quantity of the other antigens studied. Eight non-pathogenic strains produced alpha toxine at the concentration very low (10—100 u/ml). It is worthy to note, that none of the bacteria possessed full complet of 5 toxins.