

ZYG MUNT CYGAN, JANUSZ WIERCIŃSKI, IRENA BARCZ

Dynamika wytwarzania i swoistość substratowa proteaz szczepów *Bacillus* sp. i *C. pyogenes* stwierdzanych w „kulawce” owiec

Z Zakładu Higieny Weterynaryjnej w Lublinie
Z Centralnego Laboratorium Aparaturowego AR w Lublinie

Aktywność proteolityczna beztlenowców *B. nodosus* — uznanych za główny czynnik etiopatogenetyczny tzw. „kulawki” owiec (KO) w formie „foot rot” — stanowi przyjęte kryterium względnej chorobotwórczości tych bakterii (11, 23). Wykazano bowiem, że ten rodzaj właściwości enzymatycznych zarazka koreluje z jego wirulencją (10). Zdolność do wytwarzania proteaz oceniano zwykle w stosunku do kazeiny (11), preparatów z rogu racicowego (22), elastyny (20, 22) i fibrynogenu (20). Podkreślić przy tym należy, że w takim zakresie dotychczas nie sprawdzano — występującej przy tym schorzeniu — mikroflory tlenowej. Ostatnio bowiem zdobyte dane ograniczały się tylko do ogólnej charakterystyki cech elastolitycznych tych bakterii (6).

W związku z powyższym celem niniejszej pracy było przebadanie — wyosobnionych z przypadków „kulawki” owiec — szczepów *Bacillus* sp. i *C. pyogenes* w zakresie dynamiki wytwarzania proteaz w hodowlach tych bakterii i ich swoistości substratowej.

Materiał i metody

Szczepy i ich hodowla. W badaniach użyto 3 szczepów laseczek *Bacillus* sp. z tzw. grupy A, B i C (6) oraz 1 szczep *C. pyogenes* — TB1 (7). Hodowlę tych bakterii prowadzono w podłożu bulionowym z 0,5% glukozy i 0,5% surowicy końskiej.

Dynamika aktywności proteolitycznej. Hodowle laseczek *Bacillus* sp. (B1) oraz *C. pyogenes* (TB1) badano na aktywność proteolityczną w różnych fazach ich wzrostu. Stopień proteolizy określano wobec kazeiny (BDH) i syntetycznego substratu BAPNA przedstawiającego chlorowodorek N-alfa-benzoilo-DL-argininy-p-nitro anilid (BDH). W tym celu z bulionowych hodowli bakteryjnych pobierano — przy różnych interwałach — próbki płynów, które wirowano w ciągu 1 godziny przy 3000×g, a następnie przeprowadzano oznaczanie poziomu aktywności enzymatycznej (inkubacja w 30°C—30 minut). Działanie proteaz na kazeinę sprawdzano według Davidsona i Wellsa (8) tj. metodą określenia uwolnionych z kazeiny grup karboksylowych, miareczkowanych alkoholowym roztworem 0,05 N KOH (etanolowy blok zasadowych grup aminokwasów). Z różnic objętościowych zużytego KOH przy analizie próby badanej i kontrolnej (płyn samego podłoża) oznaczano ilość gramorównoważników grup karboksylowych przeliczanych na liczbę jednostek międzynarodowych w 1 litrze hodowli. Natomiast do oceny aktywności proteolitycznej kultur — względem syntetycznego substratu BAPNA — stosowano metodę Erlangera i wsp. (12). Hydrolizę BAPNA śledzono w dwuzwiązkowym spektrofotometrze rejestrującym UV—VIS (C. Zeiss-Jena). Powstały produkt reakcji, tj. p-nitroanilinę identyfikowano przy długości fali 410 nm. Aktywność plyn-

nów podawano jako ilość jednostek międzynarodowych (JM) wyliczoną z wzoru Bergmeyer'a (2):

$$JM = \frac{\Delta A/\min \cdot 10^6}{E \times d} \frac{V_k}{V_p} \mu M/L/\min$$

gdzie:

$\Delta A/\min$ — przyrost absorbancji roztworu na minutę;
 V_k — objętość końcowa próby w cm^3 ;
 V_p — objętość badanego preparatu w cm^3 ;
 E — molowy współczynnik absorbancji w cm^2/mol ;
 d — długość drogi optycznej kuwety spektrometru w cm .

Poza tym sprawdzono także aktywność proteolityczną — wobec BAPNA i kazeiny — 2 pozostałych szczepów *Bacillus* sp. (tzw. grupa A i C). W tym przypadku badane płyny pochodziły z 5-dniowych kultur (szczyt produkcji proteaz).

Substraty białkowe

a) Fibrynogen przygotowywano metodą podaną przez Christie i Wilsona (3). W tym celu do podłoża agarowego o temp. około 50°C wprowadzano 12% sterylnej plazmy krwi owczej. Przed wylaniem na płytki, podłoże podgrzewano przez 15 min. do około 56°C celem spreycytowania fibrynogenu. Jako dowód fibrynogenolizy przyjęto całkowite przejaśnienie podłoża dookoła wyrosłych kolonii.

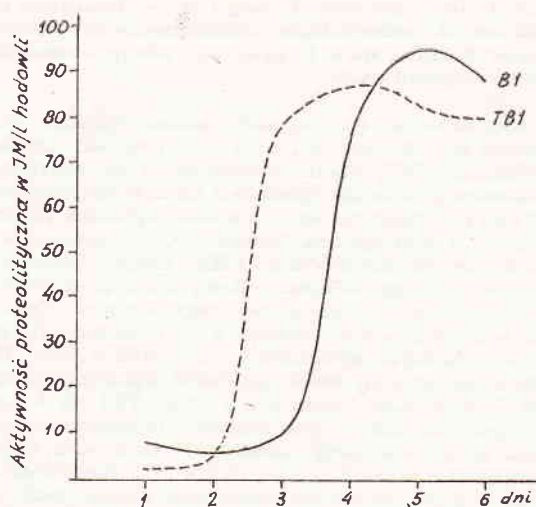
b) Sproszkowany róg racicowy łączony z czerwienią Kongo (POCH, Gliwice) sporządzano według preparatyki Rinderknechta i wsp. (18).

c) Kolagen badano zgodnie z metodyką przedstawioną w pracy Cygana (5).

Ocenę lizy fibrynogenu i proszku rogowego przeprowadzano na podłożach agarowych — stosując liniiny posiew dużej dawki bakterii (inkubacja w 37°C przez 5 dni). Poza tym rozpuszczanie rogu dodatkowo sprawdzano w warunkach 8-tygodniowej inkubacji tego substratu w 37°C (dawka 10 mg) w bulionowej hodowli bakteryjnej (makroskopowa ocena procesu trawienia).

Wyniki i omówienie

Poziom aktywności proteolitycznej w hodowlach laseczek *Bacillus* sp. (szczep B1) i pałeczek *C. pyogenes* (szczep TB1) ilustrują ryc. 1 i 2. Z ryc. 1 wynika, że krzywa dla kazeiny przedstawia — w przypadku szczepu TB1 — szybką progresję koncentracji proteaz ze szczytem w 4 dniu hodowli. Natomiast szczep B1 charakteryzuje wolniejszy wzrost poziomu tych enzymów z apogeum przypadającym w 5 dniu. Również wyniki oznaczeń z syntetycznym substratem BAPNA wypadły nieco inaczej dla bakterii *Bacillus* sp. i *C. pyogenes* (ryc. 2). Szczep B1 po 1 dniowym namnażaniu wytwarzał wyższą aktywność (1,14 JM/I) niż TB1 (0 JM). Maksimum tego działania przypadło dla B1 w 5 dniu (2,35 JM/I), a w przypadku TB1 — w 4 dniu hodowli (2,50 JM). Stąd też badanie 2 pozostałych izolatów *Bacillus* sp. (A1 i C1) przeprowadzono z użyciem już 5-dniowych kul-



Ryc. 1. Dynamika aktywności proteolitycznej szczepów *Bacillus* sp. (— B1) i *C. pyogenes* (--- TB1) wobec kazeiny

tur. W tych warunkach poziom aktywności kazeinolitycznej wyniósł dla szczepów A1 i C1 — 36 i 10 JM, a wobec BAPNA kolejno 1,89 i 0,74 JM/I hodowli.

Zakres proteolitycznej aktywności szczepów *Bacillus* sp. (A1, B1 i C1) oraz *C. pyogenes* (TB1), ustalony w stosunku do różnych substratów białkowych, przedstawiono w tab. 1.

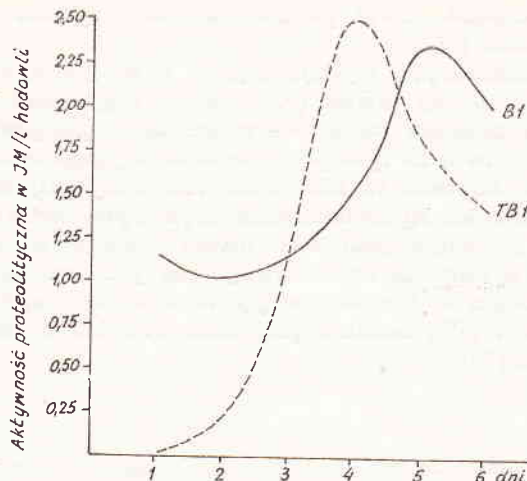
Tab. 1. Swoistość substratowa proteaz w hodowli badanych szczepów

Szczepy	Substraty				
	rog racicowy	kazeina	fibrinogen	kolagen	BAPNA
<i>Bacillus</i> z grupy:					
A	— (±)	+	+	—	+
B	— (±)	+	+	—	+
C	—	+	+	—	+
<i>C. pyogenes</i>	—	+	+	—	+

Objaśnienia: + = liza substratu, (±) = obecność lizy substratu tylko w hodowli bulionowej zarazka, — = brak lizy substratu.

Wynika z niej, że wszystkie izolaty, oprócz hydrolizowania kazeiny i BAPNA, posiadały również zdolność trawienia fibrynogenu, a częściowo także preparatu rogowego. Jednak efekt keratynolityczny wystąpił tylko w warunkach przedłużonej inkubacji substratu z hodowlą bulionową 2 szczepów *Bacillus* sp. tj. A1 i B1. Te same szczepy na podłożach stałych nie posiadały już tej aktywności. Żaden ze szczepów — przy zastosowanej metodzie — nie działał kolagenolitycznie.

Przeprowadzone badania wykazały, że występujące w „kulawce” owiec laseczki *Bacillus* sp. (tzw. grupy A, B i C) oraz maczugowce *C. pyogenes* (szczep TB1) cechują na ogół silne i zróżnicowane właściwości proteolityczne. Stwierdzono przy tym, że proteazy są syntetyzowane i uwalniane do podłoża głównie w stacjonarnej



Ryc. 2. Dynamika aktywności proteolitycznej szczepów *Bacillus* sp. (— B1) i *C. pyogenes* (--- TB1) w stosunku do syntetycznego substratu BAPNA

fazie wzrostu tych bakterii. Potwierdzono zatem aktualny w tym względzie pogląd Colemana (4).

Laseczki *Bacillus* sp. (A1, B1 i C1) oraz maczugowce *C. pyogenes* (TB1) posiadały szeroką swoistość substratową. Wszystkie bowiem szczepy hydrolizowały fibrynogen, kazeinę i BAPNA, a 2 spośród tych izolatów wykazywały również pewną aktywność keratynolityczną. Wspomnieć należy, że wcześniej Cygan i wsp. (6) opisali właściwości elastolityczne tych bakterii. Zatem enzymy badanych szczepów *Bacillus* sp. i *C. pyogenes* swoją swoistością substratową przypominały właściwości beztlenowców *B. nodosus* (główny czynnik etiologiczny „kulawki” owiec). Aktywność płynów hodowli *Bacillus* sp. i *C. pyogenes* wobec BAPNA sugeruje trypsynopodobny mechanizm działania poprzez hydrolizę wiązań peptydowych — wytwarzanych przez grupy karboksylowe argininy. Podobnie zachowują się peptydazy z grupy hydrolaz peptydylo-peptydów [3.4.4.].

Na uwagę zasługuje stwierdzenie u 2 szczepów *Bacillus* sp. (A1 i B1) zdolności keratynolitycznych. Fakt ten — w świetle danych Warda i Lundgrena (24) o dużej zawartości argininy w keratynie racic — wskazuje na możliwość wykorzystywania przez niektóre szczepy *Bacillus* tych niezwykle opornych białek. Właściwość tę opisano już wcześniej w grupie laseczek glebowych (15, 16). Podkreślić też należy, że argininie przypisuje się również rolę czynnika stymulującego wzrost beztlenowców *B. nodosus* (19).

Żaden z badanych szczepów nie posiadał zdolności kolagenolitycznych. Wynik ten, w kontekście danych o braku argininy w kolagenie (9), przemawia za słusznością powyższych rozważań. Tym bardziej staje się to logiczne przy stwierdzeniu, że aminokwas ten nie występuje w wełnie owczej (21), która też nie podlega ke-

ratynolizie nawet po zadziałaniu enzymów *B. nooosus* (1).

Reasumując, wydaje się, że w etiopatogenezie „kulawki” owiec (KO) można sugerować udział łaseczek *Bacillus* i pałeczek *C. pyogenes*. Przemawia za tym powszechność występowania tych bakterii w KO oraz ich enzymatyczne możliwości hydrolizowania niektórych struktur skóry. Zatem „kulawki” owiec posiadałyby cechy syndromu chorobowego, co już wcześniej zakładali — nie motywując tego dostatecznie — Prevot (17), Katitch (13) oraz Katitch i Matitch (14).

Piśmiennictwo

1. Broad T. E., Skerman T. M.: N. Z. J. agric. Res. 19, 317, 1976.
2. Bergemyer H. U.: Methoden der enzymatischen Analyse, Akademie Verlag, Berlin 1970.
3. Christie R., Wilson H.: Aust. J. exp. Biol. med. Sci. 19, 329, 1941.
4. Coleman G.: J. gen. Microbiol. 49, 421, 1967.
5. Cygan Z.: Clostridia w narządach zwierząt zdrowych i padłych, praca doktorska, Lublin 1967.
6. Cygan Z., Barcz I.: Występowanie elastolitycznej mikroflory tlenowej w „kulawce” owiec — Medycyna Wet. — w druku.
7. Cygan Z., Wierciński J., Rubaj B., Barcz I.: Właściwości maczugowców *C. pyogenes* i *P. aenes* oraz ich występowanie w infekcjach rąb owiec — Medycyna Wet. — w druku.
8. Davidson J., Wells B. B.: Clinical diagnosis by laboratory methods, W. B. Saunders Comp., Philadelphia 1962.
9. De Bersaques J.: Curr. Probl. Dermatol. 6, 34, 1976.
10. Deplazzi L. J., Richards R. B.: Aust. vet. J. 55, 23, 1979.
11. Egerton J. R., Parsonson I. M.: Aust. vet. J. 45, 345, 1969.
12. Erlanger B. F., Kohovsky N., Cohen W.: Archs Biochem. Biophys. 95, 271, 1961.
13. Katitch R. V.: Rec. Med. vet. 147, 179, 1971.
14. Katitch R. V., Matitch G.: Bull. Sci. Vet. Med. Comp., Lyon 4, 189, 1977.
15. Piechowska M.: Med. dośw. 2, 313, 1950.
16. Piechowska M.: Acta microb. pol. 5, 57, 1956.
17. Prevot A. R.: Bull. Off. int. Epizoot. 50, 1527, 1973.
18. Rinderknecht H., Geokas M. C., Silverman P., Haverback B. J.: Clinica chim. Acta 21, 197, 1968.
19. Skerman T. M.: J. gen. Microbiol. 87, 107, 1975.
20. Stewart D. J.: Res. Vet. Sci. 27, 99, 1979.
21. Swart L. S.: Nature New Biol. 243, 27, 1973.
22. Thomas J. H.: Aust. agric. Res. 15, 417, 1964.
23. Thomas J. H.: Aust. vet. J. 38, 159, 1962.
24. Ward W. H., Lundgren H. P.: The formation, composition and properties of the keratins: Advances in Protein Chemistry, Acad. Press, New York, 9, 243, 1954.

Adres autora: doc. dr hab. Zygmunt Cygan, ul. Żelazowej Woli 6 m. 13, 20-834 Lublin.

Цыган З., Верцинский Я., Барч И. — Динамика образования и субстратная специфичность протеаз штаммов *Bacillus* sp. и *C. pyogenes*, обнаруживаемых в пиосептицимии овец.

Изолированные из случаев пиосептицимии овец 3 штамма *Bacillus* sp. (A1, B1 и C1), а также 1 штамм *C. pyogenes* (TB1) были обследованы относительно динамики образования протеаз и их субстратной специфичности относительно казеина, порошка копытного рога с конгортотом, фибриногена, коллагена и синтетического препарата BAPNA (хлористоводородная соль N-альфа-бензилол-DL-аргинин-р-нитроанилида). Относительно динамики образования протеаз после 1-дневного размножения в 37°C штамм B1 показывал высшую активность (1,14 JM/л) чем TB1 (0 JM/л). Максимум этого действия приходился для B1 на 5 день (2,35 JM/л), а в случае TB1 на 4 день культуры (2,50 JM/л). Все штаммы гидролизировали казеин, BAPNA и фибриноген, а 2 среди них также переваривали порошок рога (A1 и B1). Керанолитический эффект появился лишь при продленной инкубации субстрата в бульонной культуре. В работе продискутирован предполагаемый механизм действия протеаз штаммов *Bacillus* sp. и *C. pyogenes*, а также их возможная роль в контексте этиопатогенеза пиосептицимии овец.

Cygan Z., Wierciński J., Barcz I. — Production and specificity of proteases produced by *Bacillus* sp. and *Corynebacterium pyogenes* discovered in „lameness” of sheep.

Three strains of *Bacillus* sp. (A1, B1 and C1) and one strain of *C. pyogenes* (TB1) were examined towards the proteases production and their specificity against casein, powder of the hoof horn with Congo red, fibrinogen, collagen and synthetic preparation BAPNA (N-alpha-benzoyl-DL-arginine-p-nitro-anilid hydrochloride). The strain B1 showed higher dynamics activity in reference to proteases generation following one day multiplication at 37°C compared with TB1 (1,14 JM/L and 0 JM/L). The nic of that production for the strain B1 was on day 5th (2,35 JM/L) and of day 4th in case of TB1 (2,50 JM/L). All the strains split casein, BAPNA and fibrinogen, and two of them also digested the hoof powder (A1 and B1). Keratinolytic effect occurred only at extended incubation of the substrate in broth culture. The possible mechanism of proteases action produced by the strains and their role in the etiopathogenesis of lameness have been discussed.

LEEuw P. W., ELLENS D. J., TALMON F. P., ZIMMER G. N.: Zakażenia cieląt rotawirusami: skuteczność szczepień doustnych w stadach zakażonych endemicznie. Rotavirus infections in calves: efficacy of oral vaccination in endemically infected herds. Res. vet. Sci. 29, 142—147, 1980 (2).

Obserwacje przeprowadzone na cielętach pozbawionych siary i zaszczepionych doustnie szczepionką opartą o żywy zmodyfikowany rotawirus (4 ml, 10^{4.5} TCID₅₀) wykazały, że szczepienie chroniło 1 z 3 zaszczepionych cieląt przed zakażeniem zjadliwym szczepem wirusa podanym po 72 godzinach po szczepieniu. Efektywność szczepionki oceniono również w dwóch stadach krów mlecznych w okresie wycieleń. Nie obserwowano znamiennych różnic zarówno w zapadalności jak i natężeniu objawów biegunki u noworodków między 74 cielętami szczepionymi i 76 cielętami którym podano placebo. Neutralizacja wirusa w przewodzie pokarmowym cieląt przez przeciwciała siarowe była główną przyczyną nieskuteczności szczepień doustnych.

G.

LEEuw P. W., ELLENS D. J., STRAVER P. J., VAN BALKEN J. A. M., MOERMAN A., BAANVIGER T.: Zakażenia wirusowe u cieląt w stadach krów mlecznych. (Rotavirus infections in calves in dairy herds). Res. vet. Sci. 29, 135—141, 1980 (2).

U 115 cieląt noworodków pochodzących z jednego stada krów mlecznych prześladowano występowanie biegunki. Biegunka przebiegała w formie dwóch syndromów: jako tzw. łagodna, krótkotrwała „wczesna” biegunka u cieląt w pierwszych trzech dniach życia oraz jako „późna” biegunka o ciężkim przebiegu u cieląt w wieku 4—14 dni życia. Ten ostatni syndrom notowano u cieląt w okresie od stycznia do czerwca. Rotawirusy wydalano 34 z 45 cieląt z późną biegunką i jedno z 34 cieląt z biegunką wczesną. Rotawirusy z kałem wydalano również cielęta zdrowe i ozdrowieńcy. Siara większości krów zawierała swoiste przeciwciała dla rotawirusów. Nie obserwowano jednak zależności między wielkością początkowego miana tych przeciwciał w sianie i występowaniem biegunek u cieląt.

G.