

KAROL KOTOWSKI
Rychtal

Znaczenie efektu kolicynogenii w zapobieganiu zaburzeniom jelitowym noworodków

Prawidłowe funkcjonowanie organizmu uzależnione jest między innymi od współdziałania określonych mikroorganizmów, znajdujących się w poszczególnych odcinkach przewodu pokarmowego. Stąd też sukces lub porażka w produkcji zwierzęcej w dużej mierze zależy od stanu flory bakteryjnej jelit. Wytlumaczenie tych zjawisk mechanizmami kolicynogenii wydaje się najbardziej słuszne.

Petuely (17) badając skład flory jelitowej u niemowląt karmionych mlekiem matki i niemowląt karmionych mlekiem krowim stwierdził, że skład mikroflory jelit jest różny. Jakkolwiek autor ten bakteriocydią nie zajmował się w sposób bezpośredni, to w swych badaniach wykazał w mleku kobiet karmionych obecność czynnika, który stymulował wzrost bezflenowców z rodzaju *Lactobacillus*. Mimo, że bakterie te były znane już od dawna (Tissier 1899), to dopiero Petuely zwrócił na nie uwagę. Stwierdził on w kale niemowląt karmionych mlekiem matki obecność *Lactobacillus bifidus*. W dalszych badaniach udowodnił, że ekstrakt mleka kobiecego stabilizował skład mikroflory jelitowej niemowląt karmionych mlekiem krowim. Innymi słowy ustępowała u tych niemowląt biegunka pod wpływem stosowanego wyciągu mleka kobiecego. Mechanizm tego zjawiska nie był wówczas zrozumiały, ale według aktualnych poglądów były to zjawiska, które obecnie można zaliczyć do kolicynogenii. Stwierdzono również, że czynnik, który występował w mleku kobiet był polipeptydem galaktozo-acetyloglukozamina o mieszanej budowie węglowodanowo-peptydowej i działaniu stymulującym wzrost *Lactobacillus bifidus*. Jak z opisanego doświadczenia wynika, zjawisko kolicynogenii wykrywane było już wcześniej, jednakże nie umiano z tych spostrzeżeń wyciągnąć praktycznych wniosków.

Obecnie wiadomo (15, 19, 20), że stosując *Streptococcus faecium* SF-68 uzyskuje się analogiczne zjawiska dotyczące stabilizacji flory jelitowej młodych zwierząt. Można twierdzić, że mechanizm przeciwbakteryjnego działania rejestrowany również po stosowaniu *Str. faecium* SF-68, działający na wzrost *Escherichia coli* na zasadzie inhibitora, jest taki sam jak stosowany wyciąg z mleka kobiecego, który stymulował wzrost *L. bifidus*. Badania wykazały (18), że obecność w przewodzie pokarmowym bakterii z rodzaju *Lactobacillus* hamuje namnażanie się hemolitycznych form *Escherichia coli*. Ten mechanizm nie został do końca potwierdzony badaniami teoretycznymi, nato-

miast praktyczne stosowanie takiego postępowania ma za sobą paroletnią historię.

Ostatnie lata przyniosły znaczne spopularyzowanie regulowania stosunków mikroflory jelit przy użyciu wybranych preparatów bakteryjnych (7, 9, 10, 11, 15, 18, 20, 21). Jest to słuszne postępowanie, bowiem etiopatogeneza zaburzeń jelitowych, i nie tylko, rozpoczyna się właśnie od zmiany rozmieszczenia i lokalizacji poszczególnych rodzajów bakterii, które w warunkach fizjologicznych znajdują się w ściśle określonych odcinkach przewodu pokarmowego i nie mogą bezkarnie zmieniać swej lokalizacji oraz stosunków ilościowych. Sygnalizowano korzystne efekty stosowania bakterii kwasu mlekowego z rodzaju *Lactobacillus* i *Streptococcus* grup D i N w zapobieganiu dysfunkcji jelitowej pochodzenia bakteryjnego u prosiąt. Do tych celów używano preparatu handlowego o nazwie LBC Cernelle, który otrzymano z AB Cernelle Vegeholm 6250, S-262 Enfelholm Szwecja. Mechanizm działania tak traktowanej profilaktyki jest dopiero w trakcie jej poznawania (1, 5, 20, 21).

Bakteriocyny, znane też pod nazwą kolicyn, zostały najwcześniej poznane u pałeczki jelitowej. Są to najczęściej bakteriocyny drobno-cząsteczkowe. Ich wytwarzanie jest cechą dziedziczną uwarunkowaną obecnością w komórce determinant genetycznych, zwanych czynnikami kolicynogennymi, przekazywanych z generacji na generację komórki potomnej. Poszczególne kolicyny oznaczono w miarę ich wyosobniania kolejnymi literami alfabetu. Determinanty genetyczne kolicynogenii mają w większości przypadków charakter plazmidów (6, 8).

Ostatnie lata przyniosły szereg informacji, na podstawie których zaczął kształtować się coraz bardziej krytyczny pogląd na stosowanie antybiotyków w paszach dla zwierząt gospodarskich. Z tych względów zrozumiałe zainteresowanie budzą nowe możliwości, polegające na zapobieganiu technopatiom przewodu pokarmowego w oparciu o tworzenie bardziej naturalnych warunków ekologicznych flory jelitowej. Jedną z takich możliwości jest wprowadzenie do przewodu pokarmowego zwierząt gospodarskich drobnoustrojów, z grupy pałeczki kwasu mlekowego, z rodzaju *Lactobacillus* i *Streptococcus* grup D i N. Próby wyjaśnienia tych zjawisk są tym bardziej zasadne, że dotychczasowe wyniki obserwacji klinicznych potwierdzają skuteczność leczniczą i profilaktyczną takiego postępowania (2, 17, 19, 22). Dla bliższego wyjaśnienia tych stosunkowo

Tab. 1. Szybkość wzrostu streptokoków i bakterii kwasu mlekowego (wg 13)

Szczep bakterii	Wzrost bakterii w min.
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	64
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	40
<i>Streptococcus thermophilus</i>	46
<i>Streptococcus faecium</i>	19

Tab. 2. Porównanie stref zahamowania wzrostu *Escherichia coli* przez hipotetyczne kolicyny streptokoków i pałeczki kwasu mlekowego (wg 13); średnica strefy zahamowania wzrostu podana w cm

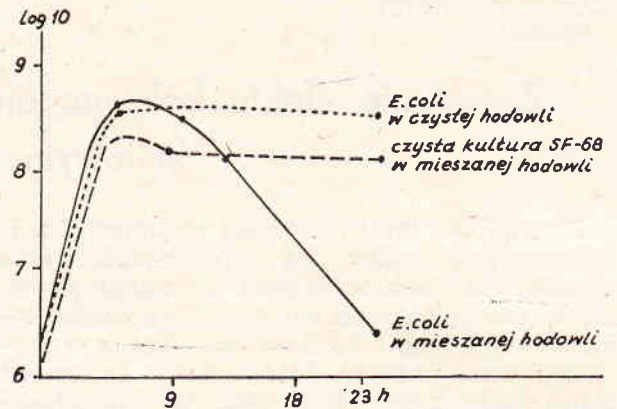
<i>E. coli</i> (serotyp)	<i>Lactobacillus</i>		<i>Streptococcus</i>	
	<i>acidophilus</i>	<i>bulgaricus</i>	<i>thermophilus</i>	<i>faecium</i>
02	3,4	5,6	5,1	7,2
0141	5,2	4,8	4,8	7,5
0149	2,8	5,2	4,0	6,6
B41:K99	3,6	4,7	4,4	5,8

nowych mechanizmów wykonano stosowne badania (3, 13).

Objawy kolicynogenii *in vitro* przedstawiono na przykładzie *Streptococcus faecium* (LBC Cernelle). *Str. faecium* SF-68 jest szczepem muzealnym (NCIB) i odznacza się cechami, które są szczegółowo opisane w pracy Lewensteina i wsp. (13). Jedną z najbardziej istotnych cech szczepu SF-68 *Str. faecium* jest krótki czas namnażania w odniesieniu do innych rodzajów bakterii fermentacji kwasu mlekowego. Ilościowe dane na ten temat zawarte są w tab. 1. Szczegółowa analiza poszczególnych faz wzrostu wykazała, że faza przygotowawcza, tzw. log-faza, dla *Str. faecium* SF-68 jest znacznie krótsza, niż analogiczna faza dla pałeczek *Lactobacillus*. Stwierdzono również, że faza logarytmiczna wzrostu badanych szczepów jest bardziej dynamiczna dla testowanego szczepu SF-68, niż pozostałych. Z tych badań warto przytoczyć następujące dane. Po 8 h wzrostu w hodowli *in vitro* przy pH 6,5 ilość komórek SF-68 wynosiła 10^9 , natomiast komórek *Lactobacillus acidophilus* 10^7 . Ta cecha dotycząca bardzo szybkiego wzrostu omawianego szczepu jest ważna, jeżeli bierze się pod uwagę całość stosunków ekologicznych drobnoustrojów bytujących w przewodzie pokarmowym ssaków.

Z innych źródeł wiadomo (14), że zasiedlenie patogenów i powstawanie monokultury (w przypadku *E. coli*), jest pierwszym etapem etiopatogenezy schorzeń jelitowych młodych zwierząt. Powszechnie dyskutowana etiologia biegunek noworodków może być rozpatrywana z uwzględnieniem omawianego mechanizmu. To samo dotyczy następstw zmiany składu flory bakteryjnej jelit u loch w okresie okołoporodowym w wyniku działania niekorzystnych bodźców środowiskowych.

Kolejnym zagadnieniem jest zachowanie się badanych szczepów w warunkach zmiany pH. Wiadomo powszechnie, że zmiana pH w kierunku alkalicznym jest istotnym warunkiem rozwoju *E. coli* i wstępem do rozwijających

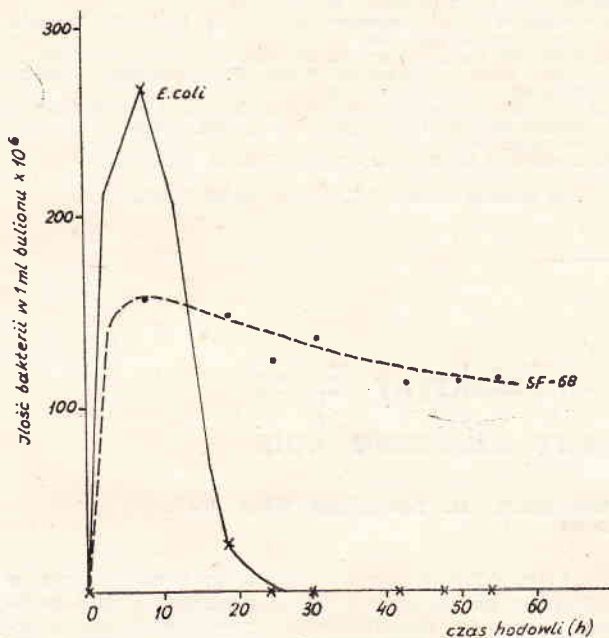
Ryc. 1. Zahamowanie wzrostu *E. coli* przez SF-68 w mieszanej hodowli *in vitro* w temperaturze 38°C (wg 13)

Objaśnienia: 1 — *E. coli* w czystej hodowli, 2 — czysta kultura SF-68 w mieszanej hodowli, 3 — *E. coli* w mieszanej hodowli.

się objawów chorobowych. W tym przypadku omawiany szczep SF-68 odznacza się również korzystnymi cechami. Zarówno przy pH 7,8, jak i w silnie zakwaszonym środowisku, badany szczep wykazywał większe zdolności wzrostu i przeżywania niż *Lactobacillus acidophilus*, użyty w tych badaniach jako szczep kontrolny (13).

Przedstawione cechy fizjologiczne omawianego szczepu są bezpośrednio związane z tytułem pracy, bowiem dotyczą praktycznego wykorzystania kolicynogenii. Połączenie tych cech z występowaniem genetycznych determinant, doprowadzających na drodze biosyntezy do wytwarzania kolicyny, czyni ten szczep szczególnie interesującym.

Dla potwierdzenia hipotezy kolicynogennego działania szczepu SF-68, Lewenstein i wsp. (13) wykonali stosowne doświadczenie. Autorzy obserwowali strefy zahamowania wzrostu *E. coli in vitro*, jeśli do *inoculum* dodawano szczep SF-68. Wyniki tych doświadczeń podane są w tab. 2. Z zawartych w niej danych wynika, że największe strefy zahamowania uzyskano przy *Str. faecium* SF-68. W porównaniu do *Lactobacillus acidophilus* te strefy dla *Str. faecium* są prawie dwukrotnie większe, niż w hodowlach z pałeczką kwasu mlekowego. Powyższe obserwacje nasunęły przypuszczenie, że hamowanie wzrostu *E. coli* i tym samym tłumaczenie korzystnych efektów w profilaktyce zaburzeń jelitowych, jakie notuje się w praktyce weterynaryjnej, odbywa się poprzez kolicyny. Cały mechanizm tego zjawiska określa się w piśmiennictwie jako kolicynogenia (8). Poszczególne kolicyny różnią się zakresem działania antybakteryjnego, jak również rodzajem procesów biosyntezy bakteryjnej, której funkcjonowanie hamują. Dla porównania obserwowanych zjawisk Lewenstein i wsp. (13) wykonali następujące doświadczenie. Poddano inkubacji mieszaną florę bakteryjną, *Str. faecium* SF-68 z *E. coli* i obserwowano wzrost tych bakterii.

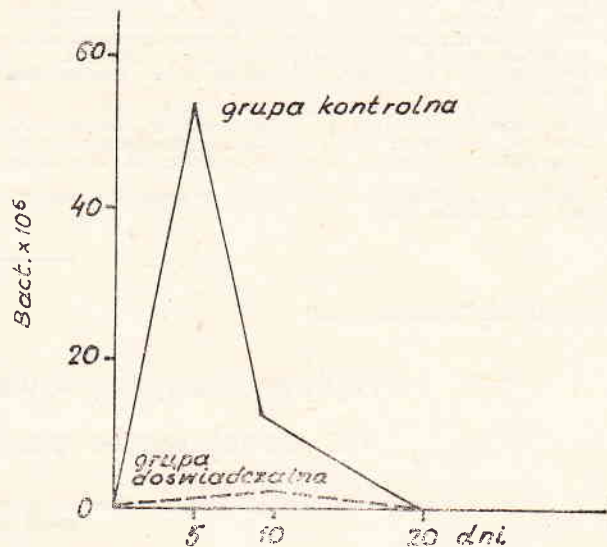


Ryc. 2. Zahamowanie wzrostu *E. coli* serotyp O149 w obecności *Str. faecium* SF-68 (wg 12)

Rezultaty tego doświadczenia przedstawia ryc. 1. Stwierdzono, że *Str. faecium* SF-68 doprowadza do zahamowania wzrostu *E. coli* w ciągu 5 h. Ten efekt działania SF-68 został następnie potwierdzony przez Klingström (12), z zastosowaniem *E. coli* serotyp O149. Wyniki tego doświadczenia przedstawiono na ryc. 2. Ten kolejny wykres potwierdza efekty badań wyżej cytowanych autorów oraz tłumaczy skuteczność profilaktyczną i leczniczą, obserwowaną dotychczas w praktyce terenowej przy użyciu wybranych bakterii. Zjawisko kolicynogenii, jakie zostało stwierdzone przy SF-68 w stosunku do *E. coli* O149 oraz innych serotypów, odnosi się również do *Salmonella typhimurium* (13).

Opierając się na opisanych doświadczeniach *in vitro* Lewenstein i wsp. (13) przeprowadzili ilościowe oznaczenia zawartości *E. coli* w kale prosiąt odsadzonych od matek, którym profilaktycznie podawano z paszą *Str. faecium* SF-68 w dawkach dziennych 10^9 bakterii na zwierzę. Grupy kontrolne stanowiły prosięta, u których tego dodatku nie stosowano. Wyniki badań przedstawiono na ryc. 3. Wykazano, że zjawisko kolicynogenii stwierdzone w badaniach *in vitro* ma również miejsce *in situ*. W przeprowadzonych doświadczeniach miano *E. coli* w kale badanych prosiąt po odsadzeniu między 5 i 10 dniem wynosiło 50×10^6 , zaś w grupie doświadczalnej utrzymywało się w śladowych ilościach przez cały okres obserwacji, tj. do 20 dnia po odsadzeniu. Te zjawiska zanotowane przez Lewenstein i wsp. (13) znalazły pełne potwierdzenie w licznych badaniach (9, 10, 11).

W niniejszej monografii przedstawiono za-



Ryc. 3. Koncentracja *E. coli* w kale prosiąt odłączonych od matek i traktowanych SF-68 w dawce 1×10^9 bakterii w porównaniu do prosiąt kontrolnych (wg 13)

równy badania oryginalne szeregu autorów, jak i poglądy teoretyczne. Z przedstawionych informacji wynika, że zjawisko kolicynogenii było tylko doceniane w aspekcie teoretycznych rozważań. Badania Lewenstein i wsp. (13) oraz badania krajowe (9, 10, 11, 15, 21) znacznie poszerzyły i przybliżyły do praktyki te teoretyczne wyniki.

Zjawisko kolicynogenii jest uzależnione obecnością w komórce bakteryjnej determinant genetycznych, zwanych czynnikami kolicynogennymi. W niniejszej monografii zaprezentowano wyniki badań przeprowadzonych na dwu komensalach, tj. *Lactobacillus bifidus* oraz *Str. faecium* SF-68. Nagromadzony materiał dowodowy w tym względzie jest duży, a podany przegląd piśmiennictwa jest potwierdzeniem rozwijającego się kierunku, preferującego wytwarzanie mechanizmów adaptacyjno-obronnych młodych zwierząt przy użyciu wybranych bakterii. Ten system profilaktyki czyni organizm bardziej odpornym na zjawiska określane jako „dysbakteriemia” i może przynosić znaczne korzyści praktyczne. Zagadnienia te są tematem dalszych dociekań naukowych.

Piśmiennictwo

1. Apuzzo V., Salzberg R.: M. prakt. Med. 39, 12, 1982.
2. Bellomo G., Manglagli A., Nicastrò L., Frigerto G.: Curr. therap. Res. 23, 927, 1980.
3. Bergey's manual of determinative bacteriology. Williams and Wilkins, Baltimore, 1974, s. 490.
4. Camarri E., Belvisti A., Guidoni G., Martini G., Frigerto G.: Chemotherapy 27, 466, 1981.
5. Han I. K., Chae B. J., Ung B., Lee G. D.: Effects of feeding *Streptococcus faecium* (SF-68) on the growing performance, incidence of diarrhea and intestinal microbiological flora of the suckling and growing finishing pigs. Seoul Natl Univ. Suweon, Korea, 1982.
6. Hanson L. A., Brandtzaeg P.: In immunologic disorders in infants and children. Saunders, Philadelphia, 1973.
7. Harenza T., Stwecki J., Jabłoński Z.: Nowości wet. 10, 360, 1980.
8. Kotelko K., Sedlaczek L., Lachowicz T.: Biologia bakterii, PWN, 1977.
9. Kotowski K.: Medycyna Wet. 39, 205, 1983.
10. Kotowski K.: Trzoda chlewna 21, 18, 1983.

11. Kotowski K., Lipińska E., Gajewska J., Owczarczyk B.: Mat. VII Kongresu PTNW, Lublin, tom II, s. 825, 1983.
12. Klingström B.: Test *Streptococcus faecium* Strain Cernelle 68 (SF-68) and E. coli 0149. Microbiological Lab. 1977.
13. Lewenstein A., Frigerio G., Moroni M.: Curr. Therap. Res. 26, 967, 1979.
14. Mazurczak J.: Fizjopatologia zwierząt PWN, 1968.
15. Mazurczak J., Lipińska E., Owczarczyk B., Bielecka J., Jozt B., Kochowicz W., Kotowski K.: Zastosowanie LBC w produkcji zwierzęcej. Mat. konferencyjne, Warszawa, 1982.
16. Mazurczak J.: Higiena i profilaktyka w produkcji zwierzęcej. T. 1, PWN, 1983.
17. Petuely L.: Naturwiss. 40, 349, 1953.
18. Pollmann D. S., Danielson D. N., Peo, Jr E. R.: J. Anim. Sci. T. 51, s. 638, 1980.
19. Rabsztyń H., Kaczmarczyk J.: Nowości wet. 12, 61, 1982.
20. Prac. Symp. concerning lactic acid-producing bacteria. Belgrad — Jugostawia, 1975.
21. Prac. Symp. Use of LBC in nutrition and prophylaxis of gastrointestinal tract disease in young animals. April 24, Warsaw, 1976.
22. Underdahl N. R.: Am. J. vet. Res. 43, 2227, 1982.

Adres autora: dr Karol Kotowski, 63-630 Rychtal

EUGENIUSZ WIŚNIEWSKI

Wpływ różnych dawek endotoksyny *E. coli* na podstawowe parametry kliniczne koni

Pracownia Badania Chorób Koni Instytutu Weterynarii, Al. Powstańców Wlkp. 10,
85-090 Bydgoszcz

Endotoksyny są ciepłostalymi produktami toksycznymi bakterii głównie Gram-ujemnych, występującymi w postaci kompleksów wielocukrowo-białkowo-lipidowych lub lipowielocukrowych. Kompleks ten jest ściśle związany ze ścianą bakterii, stąd też do uwolnienia jego dochodzi tylko w przypadku zaburzenia jej struktury, szczególnie w przypadku obumierania komórki bakteryjnej. Endotoksyny stwierdza się u wielu bakterii zarówno patogennych, jak i niepatogennych dla ludzi i zwierząt, przede wszystkim z rodziny *Enterobacteriaceae*. Powodują one m.in. u ludzi i zwierząt wzrost gorączki (stąd nazywa się je też pyrogenami) oraz znaczne zmiany we krwi. Duże dawki endotoksyn wywołują szok endotoksynowy, prowadzący do śmierci ludzi i zwierząt. Największą wrażliwość na endotoksyny wykazują konie, króliki i ludzie (8), natomiast niewrażliwe nawet na wysokie dawki są szympansy i kaczkodany (16). U koni występują one w związku z niektórymi schorzeniami morzyskowymi, przy niezżytach jelit, ochwacie i niektórych stanach zapalnych macicy (1, 11, 12, 13). Badaniem wpływu endotoksyn na organizm zwierząt domowych zajmowało się wielu autorów (4, 5, 6, 7, 9, 10, 14, 15, 16), ale najmniej prac na ten temat poświęcono koniom (2, 3, 8, 11). W dostępnym mi piśmiennictwie krajowym nie ukazała się ani jedna praca dotycząca endotoksyn u tego gatunku zwierząt.

Celem badań było określenie wpływu endotoksyn na podstawowe parametry kliniczne koni oraz ustalenie efektywnej, ale bezpiecznej dla życia koni dawki, która mogłaby być stosowana w przyszłych badaniach nad wpływem endotoksyn na wskaźniki biochemiczne krwi.

Materiał i metody

Materiał doświadczalny stanowiło 9 koni rasy konik polski, różnej płci (4 klacze, 2 ogiery, 3 wałachy), w wieku od 1,5 roku do 17 lat o masie od 223 kg do 408 kg, budowie i konstytucji właściwej

dla rasy, dobrego stanu odżywienia i utrzymania, o łagodnym charakterze i temperamencie. Przed przystąpieniem do doświadczenia przeprowadzono trzykrotnie rutynowe badania kliniczne oraz termometrowano konie w odstępach godzinnych przez 3 dni poprzedzające doświadczenie. Bezpośrednio przed podaniem endotoksyny badano temperaturę rektalną koni trzykrotnie w odstępach 20 min. i średnią tych odczytów zarejestrowano jako temperaturę wyjściową, po czym stosowano dożylnie Pyrogen Standard (seria 10581) Krakowskiej Wytwórni Surowic i Szczepionek w następujących dawkach: 0,01, 0,02, 0,03, 0,05, 0,1, 0,15, 0,2, 0,3, 0,4 mcg/kg masy ciała. Pyrogen rozpuszczano w izotonicznym roztworze chlorku sodu do iniekcji (seria 240583) produkcji Gorzowskich Zakładów Przemysłu Bioweterynaryjnego w takim stężeniu, aby 1 ml płynu fizjologicznego zawierał 1 mcg endotoksyny. Płyn fizjologiczny sprawdzano w kierunku obecności ciał pyrogennych podając go koniowi kontrolnemu. Przed stosowaniem pyrogenu konie nie były karmione i pojone, a samą iniekcję wykonywano zawsze w godzinach rannych (7.00 — 8.00). Po iniekcji endotoksyny prowadzono obserwacje i podstawowe badania kliniczne ze szczególnym uwzględnieniem pomiaru temperatury, który wykonywano co 30 minut termometrem lekarskim do czasu powrotu temperatury do normy. Wyniki pomiarów temperatury nanoszono na papier milimetrowy i obliczano planimetrem indeks gorączki wg metody opisaną przez Cakałę (4). Obserwacje prowadzono w warunkach stałego przebywania z końmi.

Wyniki i omówienie

Badania kliniczne przed podaniem endotoksyny nie wykazały odchyleń od ogólnie przyjętych norm dla koni zdrowych, a kontrola temperatury rektalnej nie wykazała znaczących różnic w poszczególnych porach dnia. Maksymalna rozpiętość w odczytach u jednego konia wynosiła 0,5°C. Koń nr 2 (ogier, 17 lat) posiadał silnie zdeformowane kopyta kończyn przednich, świadczące o wielokrotnie przebytym, ciężkim ochwacie. U pozostałych koni nie stwierdzono oznak przebytych chorób.

Wyniki obserwacji 2 koni po najniższych dawkach pyrogenu (0,01 i 0,02 mcg/kg m.c.) nie wykazały żadnych zmian w zachowaniu. U koni, u których stosowano dawkę od 0,03 do 0,3 mcg/kg m.c. w kilka minut po iniekcji pojawiło