

ZYG MUNT CYGAN, JAN BUCZEK *

Właściwości immunizacyjne autoszczepionki Perfrinvac D*)

Zakład Higieny Weterynaryjnej, ul. Słowicza 2, 20-336 Lublin
 * Instytut Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych Wydziału Weterynaryjnego AR,
 ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

Beztlenowcowa enterotoksemia (choroba miękkiej nerki) — wywołana przez *C. perfringens* D — należy do najczęstszych chorób bakteryjnych owiec (1, 5, 6, 9, 10, 11, 13, 14, 17). Powodowane przez nią straty sięgają 30% wszystkich padnięć zwierząt w stadzie (2, 7). Co więcej, szybki przeważnie przebieg schorzenia, praktycznie bez objawów zwiastunowych, niemal całkowicie wyklucza możliwość jakiegokolwiek ingerencji leczniczej (5). Stąd wynika szczególne znaczenie dla immunoprofilaktyki, zwłaszcza czynnej, ale warunkiem jej wprowadzenia jest uzyskanie biopreparatu w oparciu o izolat *C. perfringens* D o silnych właściwościach toksynogennych, przede wszystkim w zakresie toksyny epsilon determinującej immunogenność oraz ekspresję wszystkich objawów i zmian chorobowych (14).

Celem niniejszych badań — podjętych z zamiarem opracowania podstaw produkcji szczepionki przeciwko beztlenowcowej enterotoksemii owiec — było wyosobnienie chorobotwórczych szczepów *C. perfringens* D i poznanie ich aktywności w zakresie wytwarzania czynnika epsilon, poza tym przygotowanie aktywnego preparatu oraz przeprowadzenie oceny jego właściwości immunizacyjnych.

Materiał i metody

Padłe owce. Badaniom bakteriologicznym poddano 13 padłych jagniąt (wiek 1—8 miesięcy), pochodzących z 7 różnych stad (A, B, C, D, E, F, G). Wybuchie w nich schorzenie miało przebieg nadostry, a objawy toksemii, zaburzeń nerwowych i biegunki były rzadko zauważalne.

Wykrywanie i identyfikacja toksyny epsilon. Z zawartości jelit cienkich, głównie odcinka biodrowego, sporządzano 50% wyciągi w płynie fizjologicznym, wirowane i trypsynowane według metodyki Sterne i Batty (17). Następnie zakażono nimi myszy dawką 0,5 ml (i.p.) oraz śródskórnie świnki morskie (0,1 ml). W podobny sposób wykrywano toksynę epsilon w supernatancie z 24 godz. hodowli zarazka w pożywce VF (dowód obecności toksyny — śmierć myszy wśród symptomów nerwowych i białoczerwona martwica u świnki morskiej, czas obserwacji zwierząt zwykle 3—12 godz.). Jad epsilon identyfikowano odczynem seroneutralizacji (SN) z użyciem monowalentnych surowic antytoksykcyjnych przeciwko *C. perfringens* (Wellcome Reagents Ltd., Anglia). Wyniki aktywności letalnej przedstawiono w DLM₁₀₀/ml płynu.

Izolacja i identyfikacja zarazka. Przeprowadzono wysiewy treści jelit i narządów mięszo- wych na podłoże Zeisslera (inkubacja metodą pyrogallolową według Pestiego, 11). Kolonie przypominające *C. perfringens* wycinano wraz z agarem i wprowadzano na dno próbówki z pożywką VF (identyfikacja gatunku zarazka odczynem SN według metodyki wcześniej stosowanej, 6).

Autoszczepionka. Porównawczo sprawdzono 2 anatoksyny, tj. hodowle najbardziej toksycznego szczepu *C. perfringens* D (C87—88) w pożywkach VF i A70 (wg receptury Drwalewskich Zakładów Przemysłu Biowet.), inaktywowane formaliną (0,45%) i adsorbowane wodorotlenkiem glinu (10%). Do badań terenowych użyto autoszczepionki przygotowanej z hodowli w podłożu VF (preparat określany jako Perfrinvac D), podaną jednokrotnie owcom ciężarnym (na 3 tyg. przed porodem) oraz niekrotnym (w obu przypadkach dawka 10 ml, podskórnie w przypiersiowy rejon szyi), nadto jagniętom (3—7 miesięcy, dawki od 4 do 6 ml).

Oznaczanie przeciwciał. Badanie przeprowadzono odczynem SN (wirowanie krwi przy 3000 obr./min. — 15 min., siary w 60 000 obr./min. — 1 godz., źródło toksyny epsilon: 18 godz. hodowla szczepu C87—88 w pożywce VF, trypsynowanie w pH, 7,8—8,2 w ciągu 1 godz., dawka enzymu 2 mg/ml, producent — WSS Warszawa, czas wiązania reagentów 1 godz. w 37°C). Wyniki wyrażano liczbą jednostek antytoksykcyjnych w ml (1 jedn. antyt. = najwyższe rozcieńczenie surowicy i siary zobojętniające 1 DLM₁₀₀ toksyny epsilon).

Wyniki i omówienie

W 7 różnych stadach owiec (A—G, tab. 1) wystąpiły zachorowania i nagłe padnięcia jagniąt (wiek 1—8 miesięcy), rzadko poprzedzane objawami biegunki i zaburzeń nerwowych, mylnie jednak wtedy uznawanych za listeriozę, natomiast nie identyfikowanych z enterotoksemią, którą mógłby sugerować tak charakteryzowany przebieg schorzenia (9, 14). Podjęte badania dowodziły obecności letalnej i martwicotwórczej toksyny w wyciągu z jelit i w hodowli bakteryjnej wszystkich 13 wyosobnionych szczepów (tab. 1). Powodowała ona bowiem śmierć myszy, zwykle w ciągu 1—4 godzin, wśród charakterystycznych symptomów nerwowych (stany pobudzenia przechodzące w porażenie). U inokulowanych natomiast śródskórnie świnek morskich powstawała jeszcze szybciej — w miejscu iniekcji — białoczerwona martwica, typowa dla oddziaływań toksyny epsilon (15, 17). Poza tym chorobotwórczość płynów wzrastała znacznie w wyniku trypsynizacji (wpływy letalne natywnych ekstraktów i supernatantów hodowli oraz po ich uczynnieniu charakteryzowały odpowiednie dawki 10—160 DLM₁₀₀/ml i 2—512 DLM₁₀₀/ml). Stwierdzenie zatem toksyczności aktywowanej w jad o dużej mocy letalnej (wyciąg 160 DLM₁₀₀/ml, hodowle nawet 512 DLM₁₀₀/ml), popierało sugestię obecności toksyny epsilon, uznawanej powszechnie właśnie za protoksynę (3, 15, 17, 18, 19). Ostatecznie

*) Praca zrealizowana w temacie RR-II-24

Tab. 1. Aktywność letalna toksyny epsilon w wyciągach z jelit padłych jagniąt i w hodowli bakteryjnej szczepów *C. perfringens* D

| Liczba badanych zwierząt-stado | Toksyna epsilon (w DLM ₁₀₀ /ml)* | | | | Odczyn SN z surowicą wzorcową | Identyfikacja zarazka |
|--------------------------------|---|--------------|--------------------|---------------|-------------------------------|-------------------------|
| | wyciąg z jelit | | hodowla bakteryjna | | | |
| | natywny | trypsynowany | natywna | trypsynowana* | | |
| 2 - A | 10 | 40 | 1/4, 1/16 | 2/32 | antyepsilon | <i>C. perfringens</i> D |
| 1 - B | 20 | 80 | 1/8 | 1/32 | antyepsilon | <i>C. perfringens</i> D |
| 1 - B | 20 | 160 | 1/16 | 1/64 | antyepsilon | <i>C. perfringens</i> D |
| 2 - C | 40 | 160 | 1/8, 1/8 | 1/64, 1/64 | antyepsilon | <i>C. perfringens</i> D |
| 2 - D | 80 | 160 | 1/4, 1/16 | 1/128, 1/256 | antyepsilon | <i>C. perfringens</i> D |
| 2 - E | 80 | 160 | 1/16, 1/16 | 1/256, 1/512 | antyepsilon | <i>C. perfringens</i> D |
| 1 - F | 80 | 160 | 1/16 | 1/256 | antyepsilon | <i>C. perfringens</i> D |
| 2 - G | 20 | 80 | 1/2, 1/2 | 1/32, 1/32 | antyepsilon | <i>C. perfringens</i> D |

Tab. 2. Miano toksyny epsilon w hodowli szczepionkowej a właściwości immunizacyjne anakultury

| Hodowla szczepionkowa w podłożu | Miano toksyny epsilon (w DLM ₁₀₀ /ml) | Liczba owiec immunizowanych | Poziom stymulowanej antytoksyny (w jedrz. antyt./ml) | | | | | |
|---------------------------------|--|-----------------------------|--|---|----|----|----|-----|
| | | | 4 | 8 | 16 | 32 | 64 | 128 |
| VF | 256 | 15 | 1 | 2 | 3 | 5 | 3 | 1 |
| A70 | 16 | 15 | 3 | 6 | 5 | 1 | | |

ustabilizowany pod względem mocy wytwarzanej toksyny (miano hodowli w pożywce VF zwykle 128 — 256 DLM₁₀₀/ml, wyjątkowo 512 DLM₁₀₀/ml), wykorzystano w pracach nad autoszczepionką. Zastosowano ją w 2 fermach, gdzie wystąpiły padnięcia jagniąt — nie likwidowane antybiotykoterapią — a będące przyczyną dotkliwych strat sięgających w stadzie E 14% (śmierć 70 jagniąt spośród 500), a w F nawet 17% (17 na 100 posiadanych). W

Tab. 3. Poziom antytoksyny u owiec i jagniąt immunizowanych autoszczepionką Perfrinvac D

| Grupa | Badane owce | | Dawka preparatu w ml | Miano przeciwciał (w jedrz. antyt./ml) | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------|-------------------------|--------|----------------------|--|---|---|----|----|----|-------|-----|-----|---|-----|----|----|-----|------|------|------|------|------|
| | Wiek | Liczba | | Krew | | | | | | Siara | | | | | | | | | | | | |
| | | | | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 | 64 | 128 | 256 | 4 | 8 | 16 | 32 | 64 | 128 | | | | | |
| I | dorośle (1-5 lat) | 76 | 10 | | | 1 | 3 | 18 | 28 | 15 | 11 | | | | | | | 1/12 | 3/12 | 3/12 | 4/12 | 1/12 |
| | | | | | | | | | | | | 71% | | 67% | | | | | | | | |
| II | jagnięta (3-7 miesięcy) | 52 | 4-6 | 2 | 2 | 2 | 26 | 9 | 8 | 3 | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | 88% | | | | | | | | | | |
| | | 128 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Tab. 4. Koncentracja przeciwciał we krwi uodpornionych siarą jagniąt

| Jagnięta | | Miano antytoksyny (w jedrz. antyt./ml) | | | |
|------------|--------|--|----|----|-----|
| Wiek | Liczba | 16 | 32 | 64 | 128 |
| 4 tygodnie | 9 | 2 | 3 | 3 | 1 |

i najpewniej jednak zidentyfikowano czynnik chorobotwórczy odczynem SN (całkowita neutralizacja letalnych i nekrotyzujących oddziaływań wyłącznie antytoksyną przeciwko jadowi epsilon). Wszystkie zatem izolaty uznano za *C. perfringens* D, a najbardziej chorobotwórczy szczep C 87 — 88, w dodatku najlepiej

piśmiennictwie światowym znane są opisy takich enzootii powodujących podobne i liczniejsze jeszcze padnięcia (2, 7).

Istotny w trakcie przygotowywania autoszczepionki stał się wybór podłoża dla osiągnięcia maksymalnych w nim zbiorów toksyny epsilon odpowiedzialnej — jako antygen — za immunogenność preparatu oraz poziom stymulowanej antytoksyny (15). Rezultaty przeprowadzonych w tym kierunku badań przedstawia tab. 2. Wynika z niej, że aktywność letalna hodowli była zdecydowanie wyższa w pożywce VF niż A70 (miano toksyny 256 DLM₁₀₀/ml wobec 16 DLM₁₀₀/ml). Duże różnice wystąpiły również w koncentracji przeciwciał wzbudzonych u 30 owiec jednokrotną

iniekcją anakultur w VF i A70 (w większości przypadków odpowiednio 32—256 jedn. antyt./ml i 4—16 jedn. antyt./ml). Dlatego w dalszej pracy nad preparatem wykorzystywano tylko hodowle zarazka w podłożu VF.

Wstępnej immunizacji autoszczepionką Perfrinvac D poddano 76 owiec (dawka 10 ml s.c.) i 52 jagnięta (dawka 4—6 ml, tab. 3). Jej immunogenność okazała się wielce obiecująca. Poziom bowiem stymulowanej antytoksyny wahał się u 71% owiec (wiek 1—5 lat) od 64 do 256 jedn. antyt./ml, a u 88% jagniąt (3—7 miesięcy) oscylował pomiędzy 16—128 jedn. antyt./ml. Równie wysoką koncentrację przeciwciał zawierała siara od uodpornionych, na 3 tyg. przed wykotem, matek (67% od 32 do 128 jedn. antyt./ml).

Proces wchłaniania immunoprotein z przevodu pokarmowego zachodził łatwo, co sugeruje wysoka zawartość antytoksyny we krwi uodpornionych drogą laktogenną jagniąt (tab. 4). Miano bowiem przeciwciał sięgało — jeszcze po 4 tygodniach — u 1 jagnięcia 128 jedn. antyt./ml, a u 6 spośród 9 pozostałych mieściło się w granicach 32—64 jedn. antyt./ml. Było ono zatem porównywalne z poziomem antytoksyn stwierdzanych w siarce.

Pozytywne wyniki oceny preparatu Perfrinvac D znalazły pełne potwierdzenie w praktyce klinicznej. Zastosowany bowiem interwencyjnie w 2 ogniskach enterotoksemii owiec (stado E i F) pozwolił uzyskać — po jednokrotnej iniekcji — całkowitą likwidację padnięć z powodu tej choroby (ustąpienie również biegunki).

W piśmiennictwie przytaczane są fakty, że zawartość antytoksyn we krwi o mianie 10—20 jedn. m./ml chroni przed działaniem jadu w dawce nawet 10 000—20 000 DLM₁₀₀/g treści jelitowej (4). Ich wpływ zabezpieczający występuje — w warunkach naturalnych — jeszcze przy niższej koncentracji, tj. wynoszącej od 0,15 jedn. m./ml (3, 8) do 0,3 jedn. m./ml (16). Tłumaczy się to opornością bariery jelitowej i przechodzeniem toksyny do krwi w małych porcjach (3). W świetle tych danych indukowana — autoszczepionką Perfrinvac D — odporność chociaż dotychczas nie scharakteryzowana w jedn. międzyn., wydaje się osiągać, a nawet znacznie przekraczać poziom przeciwciał gwarantujących wpływ ochronny.

Wnioski

1. Immunogenność autoszczepionki Perfrinvac D — determinowana dawką antygeny epsilon (128—256 DLM₁₀₀/ml) — zapewnia wytworzenie antytoksyn w koncentracji zabez-

pieczającej przed zachorowaniem na enterotoksemię.

2. Zastosowanie preparatu u ciężarnych owiec stymuluje u nich wysoki poziom przeciwciał (przeważnie ponad 64 jedn. antyt./ml), łatwo przekazywanych poprzez siarę (na ogół >32 jedn. antykt./ml) jagniętom (miano w 4 tyg. najczęściej 32—64 jedn. antyt./ml).

3. Powstała potrzeba produkcji szczepionki Perfrinvac D w skali ogólnokrajowej z przeznaczeniem do stałego stosowania w fermach prowadzących tucz przemysłowy (szczepienie ciężarnych owiec, doszczepianie 2—3-miesięcznych jagniąt).

Piśmiennictwo

1. Ardahali M., Darakhshan H., Moosavi M.: 4e Symp. malad. anim. anaérob., Paris 16—18 novembre 1982, s. 95.
2. Baughton I. B., Hardy W. T.: Tex. agric. exp. Sta. Bull. 598, 1, 1941.
3. Bullen J. J.: Role of toxins in host — parasite relationships, w Microbial toxins, t. I, red. Ail S. J., Kadis S., Montie T. C., Acad. Press, New York and London 1970.
4. Bullen J. J., Batty I.: Path. Bact. 73, 511, 1957.
5. Bullen J. J., Batty I.: Vet. Rec. 69, 1268, 1957.
6. Cygan Z., Barcz I., Deptuła D.: Medycyna Wet. 34, 31, 1978.
7. Hoath G.: Vet. Rec. 67, 529, 1955.
8. Jansen B. C.: J. S. Afr. vet. med. Ass. 31, 205, 1960.
9. Katitch R. V.: Les maladies des animaux domestiques causées par les microbes anaérobies, red. Vigot Freres, Paris 1963, s. 86.
10. Montgomerie R. F.: Can. vet. J. 2, 439, 1961.
11. Nillo L.: Can. vet. J. 2, 439, 1961.
12. Pestl L.: Acta vet. hung. 15, 447, 1965.
13. Simos E. C.: The present status of clostridial diseases of farm animals in Greece with special emphasis of small ruminants, w Off. Int. Epizoot., 4e Symp. malad. anim. anaérob., Paris 16—18 novembre 1982, s. 103.
14. Smith L. D.S.: Clostridial diseases of animals, w Advances in Veterinary Sci., t. 3, s. 463, red. Brandly C. A., Jungherr E. L., Acad. Press, New York 1957.
15. Smith L. D.S.: Rev. Infect. Dis. 1, 254, 1979.
16. Smith L. D.S., Marsh H.: Am. J. Vet. Res. 14, 408, 1953.
17. Sterne M., Patty J.: Pathogenic Clostridia, Butterworths, London and Boston 1975, s. 25.
18. Thomson R. O.: Nature, Lond. 193, 69, 1962.
19. Werthington R. W., Mulders M. S., Van Resenburg J. J.: Onderstepoort J. vet. Res. 46, 153, 1973.

Adres autora: prof. dr hab. Zygmunt Cygan, ul. Żelazowej Woli 6 m 13, 20-854 Lublin

Cygan Z., Buczek J. — An immunostimulant action of an autovaccine Perfrinvac D

Thirteen strains of *C. perfringens* D were isolated from dead lambs (age 1—8 months) in 7 outbreaks of enterotoxaemia. The most virulent isolate C 87—88 producing epsilon toxin at a titre 512 DLM₁₀₀/ml was used to produce an autovaccine Perfrinvac D. The autovaccine injected once induced in pregnant sheep a high level of antitoxic antibodies (mostly more than 64 antitoxic units/ml), easily transferred via colostrum (generally more than 32 au/ml) to lambs (in 4 weeks old lambs a titre of antibodies reached 31—64 au/ml). In outbreaks of enzootic form of enterotoxaemia this titre protected lambs completely against disease.