

28. Siemionek J.: Hod. Drobn. Inwest. 37, 6, 1989.  
 29. Sinell H. J.: Ernährungswiss. 31, 157, 1992.  
 30. Strzałkowski I., Kopczewski A.: Życie Wet. 44, 210, 1991.  
 31. Strzałkowski I., Kopczewski A.: Medycyna Wet. 49, 534, 1993.  
 32. Szpakiewicz W.: Medycyna Wet. 41, 205, 1985.  
 33. Tauxe R. V.: Food Prot. 54, 563, 1991.  
 34. Ustawa z dnia 31 stycznia 1980 o ochronie i kształtowaniu środowiska.  
 35. Wojtoń B.: Życie Wet. 40, 237, 1990.  
 36. Zarządzenie Ministra Administracji, Gospodarki Terenowej i Ochrony Środowiska nr 241 z dnia 9 listopada 1982 w sprawie szczegółowych zasad wyznaczania granic i obszarów stref ochronnych oraz orientacyjnych wskaźników ich szerokości.  
 37. Zarządzenie Ministra Ochrony Środowiska i Zasobów Naturalnych nr 170 z dnia 7 lipca 1986 w sprawie rolniczego wykorzystania ścieków.  
 38. Zdunkiewicz T.: Hod. Drobn. Inwest. 36, 12, 1988.

Adres autora: dr inż. Jerzy Sławoń, ul. Pereca 13/19 m. 715, 00-849 Warszawa

ZYGMUNT CYGAN, JAN BUCZEK\*

## Aktywność uodporniająca dwukomponentowej autoszczepionki Dipervac przeciwko beztlenowcowej biegunce cieląt\*)

Zakład Higieny Weterynaryjnej, ul. Słowicza 2, 20-336 Lublin

\*Katedra Mikrobiologii Weterynaryjnej Wydziału Weterynaryjnego AR, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

### Summary

Protective immunity of two-component auto vaccine Dipervac against anaerobic calf diarrhea

Effectiveness of the auto vaccine Dipervac prepared by the authors and containing toxoids alpha and beta of *C. perfringens* A and C in protecting calves against a toxic diarrhea was examined. The vaccine was used in pregnant cows at 7 and 2–3 weeks before parturition. The vaccine induced a high level of antitoxic antibodies (4–64 ai/ml for alpha and 8–64 ai/ml for beta toxin) without negative effects on immunized animals. Dipervac used in 375 cows on two farms with endemic toxic anaerobic calf diarrhea decreased losses of calves from 22.3% to 3.1%. Dipervac can be used in prophylaxis of diarrhea in calves induced by alpha and beta toxin of *C. perfringens* A and B.

Beztlenowcowa biegunka cieląt pozostaje wciąż niedoceniana, mimo że coraz częściej występuje w różnych krajach (6, 7, 9, 12, 16, 17), w tym także w Polsce (1, 4). Jej etiologię – znajdującą odbicie w przebiegu enzootii – warunkuje działanie toksyny beta (1, 4, 12), a najprawdopodobniej także alfa *C. perfringens* (serotyp A, C. wg 5, 14, 19). Straty z powodu padnięć cieląt, jakie wywołuje choroba, są poważne i mogą sięgać nawet 26% stanu stada (wg 1, 4). Jednocześnie zwalczanie zachorowań jest uciążliwe ze względu na ostry, w dodatku często uporczywy jej przebieg (1, 4, 5, 9). Kłopotliwość sytuacji zwiększa nadto potrzeba nakładu dużego wysiłku dla likwidacji źródła zakażeń (częste nosicielstwo zarazka, duża jego oporność na środki dezynfekcyjne, nawroty przedłużające czas trwania infekcji, cyt. wg 8). Poza tym ponoszone koszty leczenia są wysokie (1, 4) – zwłaszcza przy stosowaniu metody tradycyjnej antybiotykoterapii – natomiast możliwość uodporniania zagrożonych stad była niedostatecznie poznana (5).

Fakty te inspirowały podjęcie badań nad opracowaniem dwukomponentowej szczepionki swoistej (preparat o proponowanej nazwie Dipervac) – przeciwko toksynom alfa, beta *C. perfrin-*

gens, a oznaczenie jej aktywności immunogennej (poziomu stymulowanych antytoksyn) oraz efektywności profilaktycznej (ograniczenia zachorowań w ogniskach choroby) stanowiło etapowe cele niniejszej pracy.

### Materiał i metody

1. Autoszczepionka. Preparat przygotowano z hodowli toksynogennych szczepów *C. perfringens* A (izolat A-2) oraz *C. perfringens* C (szczep B-10) wyisobnionych od padłych cieląt w poprzednich badaniach (1, 3). Uzyskane hodowle, po namnożeniu szczepów w pożywce VF z 0,5% glukozy (inkubacja 14-godzinna w 37°C), odwirowano (4000 obr/min.), a następnie sprawdzano na aktywność toksyczną dla myszy (alfa 4 – 8 DLM<sub>50</sub>/ml, beta 8 DLM<sub>50</sub>/ml), po czym neutralizowano dodatkiem 0,6% formaliny (w 37°C przez 10 dni) i dodawano adjuwant (objętościowo 10%). Przygotowaną w ten sposób autoszczepionkę Dipervac kontrolowano na jałowość (wysiewy na podłoże Wrzoska i Zeisslera, inkubacja w atmosferze tlenowej oraz beztlenowej metodą GasPak), a także na nieszkodliwość (inokulacja podskórna myszy dawką 0,5 ml, nadto domięśniowa świnki morskiej objętością 1 ml).

2. Badane próby. Badaniom poddano ogółem 171 prób obejmujących krew od 57 krów i 57 cieląt, a także siarę 57 krów. Krowy były immunizowane dwukrotnie, tj. w 7–8 i 2–3 tygodniu przed terminem porodu, dawką 10 ml autoszczepionki Dipervac podanej podskórnie (miejsce iniekcji – okolica nad łopatką). Próby od uodpornionych krów, jak również od pochodzących od nich cieląt, pobierano w każdym przypadku jednocześnie (1–4 dni po porodzie, zatem w odniesieniu do narodzonych zwierząt pokrywało się to z wiekiem ich życia).

3. Oznaczanie antytoksyn. Badanie przeprowadzono odczynem seroneutralizacji SN (wirowanie krwi przy 3000 obr/min. – 15 min., siary 60 000 obr/min. – 1 godz., źródłem toksyny alfa i beta – odwirowane 14-godzinne hodowle szczepów A-2 i B-10 w pożywce VF z 0,5% glukozy, czas wiązania reagentów – 1 godzina w 37°C). Stopień uodpornienia zwierząt wyrażano liczbą jednostek antytoksynicznych zawartych w 1 ml (1 jedn. antyt. = najwyższe rozcieńczenie surowicy i siary zobojętniające 1 DLM<sub>50</sub> toksyny alfa oraz beta).

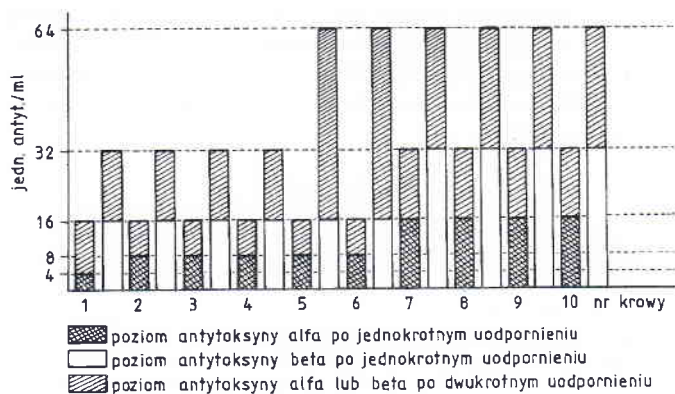
\*) Praca finansowana przez KBN.

Wyniki i omówienie

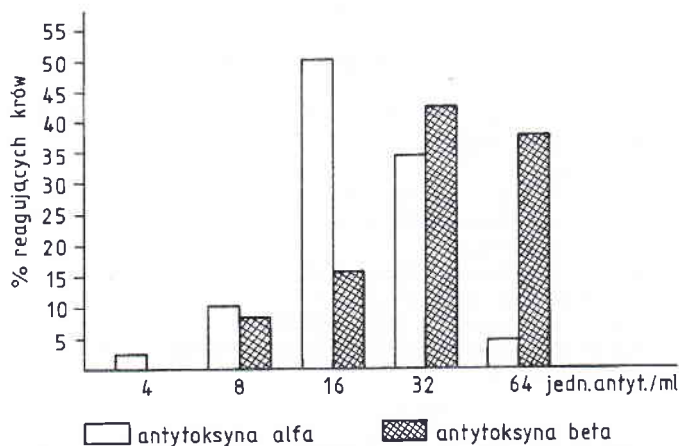
Aktywność immunogenną autoszczepionki Dipervac przebadano na ogólnej liczbie 114 zwierząt (krew pobrano od 57 krów, a także od 57 pochodzących od nich cieląt) i 57 próbach siary (łącznie 171 prób, tab. 1). W materiałach tych skontrolowano poziom stymulowanych uodpornieniem antytoksyn przeciwko toksynie alfa i beta *C. perfringens* A i C, a wyniki tych oznaczeń przedstawiają kolejne ryciny 1-4.

W pierwszym etapie badań prześlędzono wpływ immunizacyjny pojedynczej i dwukrotnej iniekcji autoszczepionki Dipervac na stan indukowanej u 10 krów odporności. Z ryc. 1 wynika, że jednorazowe podanie preparatu (2-3 tydzień przed porodem) wzbudzało u większości zwierząt (6 na 10 krów) koncentrację antytoksyny alfa sięgającą 4-8 jedn. antyt./ml (u 4 osobników 16 jedn. antyt./ml). Dla antytoksyny beta wartości te wynosiły odpowiednio 16 jedn. (6 krów) i 32 jedn. antyt./ml (pozostałe 4 zwierzęta). Natomiast po dwukrotnym uodpornieniu (w 7-8 oraz 2-3 tygodniu przed porodem) poziom dla antytoksyny alfa i beta znacznie wzrastał osiągając odpowiednio 16-32 jedn. antyt./ml oraz 32-64 jedn. antyt./ml. Zatem w odniesieniu do jadu beta *C. perfringens* C indukowana wysokość odporności u krów była porównywalna z koncentracją przeciwciał osiągniętych u świń po dwukrotnej ich immunizacji monowalentną szczepionką Clopervac (większość zwierząt z 32 jedn. antyt./ml, wg 2).

Wyniki te zdecydowały o stosowaniu - w dalszych badaniach - dwukrotnych szczepień krów, a ich procentowy udział skorelowany z poziomem wzbudzonych przeciwciał ilustruje

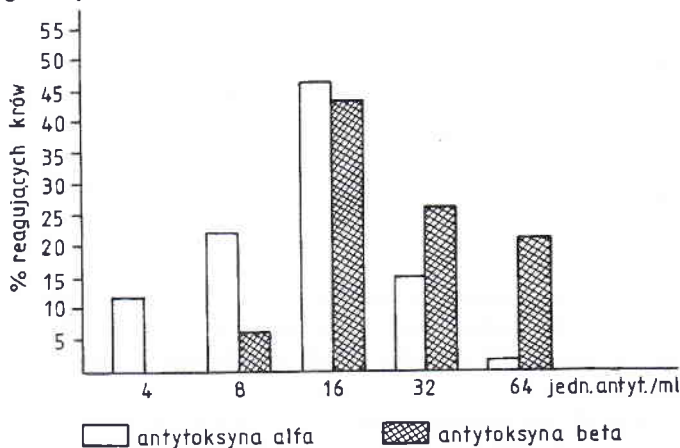


Ryc. 1. Poziom antytoksyny w surowicy krów immunizowanych jednokrotnie i dwukrotnie antytoksyną alfa i beta

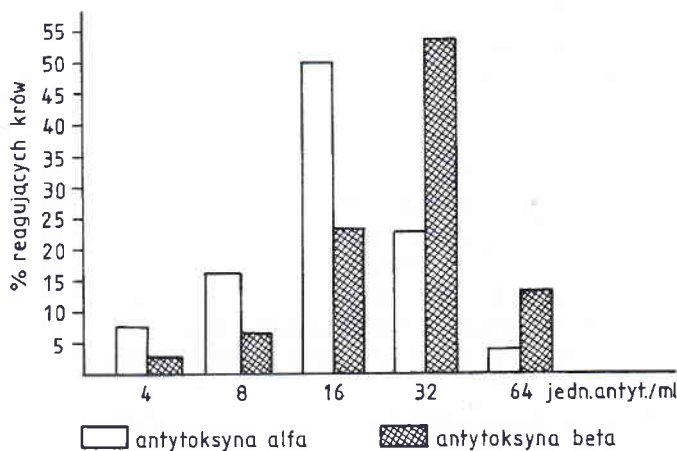


Ryc. 2. Poziom antytoksyny alfa i beta w surowicy krów immunizowanych dwukrotnie

ryc. 2. Wytworzenie ciał odpornościowych, co prawda w różnicowanej koncentracji (alfa 4-64 jedn. antyt./ml, beta 8-64 jedn. antyt./m.), wykazano u wszystkich zwierząt, a wysoki stopień uodpornienia w odniesieniu do antytoksyny alfa dotyczył 86% krów (przy 16-64 jedn. antyt./ml), natomiast w przypadku antytoksyny beta był jeszcze wyższy i obejmował 92% stada (16-64 jedn. antyt./ml). U przeżuwaczy występuje - według klasyfikacji Grossera - syndesmochorialny typ łożyska (5 warstw tkankowych oddzielających krwiobieg płodu i matki). Przy tej budowie anatomicznej niemożliwa jest transmisja przeciwciał drogą krwionośną (9, 18). Zatem nowo narodzone cielęta mogą uzyskiwać odporność wyłącznie poprzez siarę (*via colostrum*, wg 18). Określenie w niej poziomu stymulowanych antytoksyn stanowiło - w przypadku niniejszej pracy - kolejny etap podjętych badań (ryc. 3). Wynika z nich, że w pierwszych dniach po porodzie (1-4 dni) zawartość przeciwciał w sianie wykazywała różnicowanie (antytoksyny: alfa 4-64 jedn. antyt./ml, beta 8-64 jedn. antyt./ml). Zasluguje na podkreślenie, że wysoki procent krów zareagował na podanie szczepionki silną odpowiedzią immunologiczną 87% zwierząt z koncentracją antytoksyny alfa 8-64 jedn. antyt./ml, a u 92% krów poziom antytoksyny beta osiągał 16-64 jedn. antyt./ml. Zatem stwierdzono korelację poziomu antytoksyn we krwi krów i pochodzącej od nich sianie. Co więcej, stopień uodpornienia zwierząt dwukomponentowym preparatem Dipervac odpowiadał aktywności wprowadzonej niedawno dla świń jednoskładnikowej szczepionki Clopervac (2), aczkolwiek w składzie obu tych preparatów występuje tylko jeden wspólny komponent antygenowy (toxoid beta).



Ryc. 3. Poziom antytoksyny alfa i beta w sianie krów w pierwszych (1-4) dniach po porodzie



Ryc. 4. Poziom antytoksyny alfa i beta w surowicy cieląt



Tab. 1. Liczba badanych zwierząt i pobranych prób

Zwierzęta	Ogółem zwierząt	Rodzaj prób		Ogółem zbadanych prób
		krew	siara	
Krowy	57	57	57	114
Cielęta	57	57		57
Razem	114	114	57	171

Tab. 2. Najczęstsze relacje w kształtowaniu się poziomu antytoksyn\* alfa, beta w układzie transmisyjnym krew krowy – siara – krew cielęcia

Krowa	Krowa		Cielę
	krew	siara	krew
1	64*(64)*	64 (64)	64 (64)
2	64 (32)	64 (32)	64 (32)
3	64 (16)	64 (16)	64 (16)
4	32 (16)	32 (16)	32 (16)
5	32 (16)	32 (16)	32 (16)
6	16 (16)	16 (16)	16 (16)
7	16 (16)	16 (16)	16 (16)
8	16 (8)	16 (8)	16 (8)

Objaśnienia: \* – jedn. antyt./ml, liczba bez nawiasu – antytoksyna beta, liczba w nawiasie – antytoksyna alfa.

Tab. 3. Straty z powodu padnięć cieląt w stadach krów uodparnianych i nie immunizowanych autoszczepionką Dipervac

Badane stado krów	Liczba cieląt od krów				% padnięć spośród zwierząt	
	nie uodparnianych		uodparnianych		nie uodparnianych	uodparnianych
	urodzonych	padłych	urodzonych	padłych		
A	103	23	193	3	22,3	1,5
B	531	120	164	8	22,6	4,9
Razem	634	143	357	11	22,6	3,1

Możliwość przekazania przeciwciał drogą laktogenną przedstawia ryc. 4. Wynika z niej, że ten sposób transmisji zapewniał 92,5% wszystkich zwierząt wyjątkowo wysoki poziom antytoksyny alfa (wartość rzędu 8–64 jedn. antyt./ml). Co więcej, jeszcze wyższy procent uodpornionych zwierząt – przy takiej samej koncentracji przeciwciał – uzyskano dla toksyny beta (98% reagujących na immunizację cieląt).

Analizowanie dynamiki przekazywania antytoksyn w układzie transmisyjnym krowa – jej cielę pozwoliło wykazać – w przypadku obu typów przeciwciał (anty jadom alfa, beta) – różną co prawda ich koncentrację (przeważnie 16, 64 jedn. antyt./ml), ale za to najczęściej linearnie identyczną (dla krwi matki, noworodka, nadto siary zwykle na poziomie 16, 32, 64 jedn. antyt./ml, tab. 2). Inną, rzadziej jednak stwierdzaną formułę charakteryzowała dominacja zawartości przeciwciał we krwi krów i cieląt nad obecnością w siarze (zwykle poniżej tylko jednego rzędu wartości), co mogło wynikać z istotniejszych dla siary niż krwi różnic w czasie pobierania prób (w 1–4 dniu po porodzie). Kiedy indziej znowu poziom przeciwciał był u cieląt niższy niż u krów. Takie przypadki, zresztą niezbyt liczne, tłumaczyć z kolei można pobraniem przez noworodka niedostatecznej jeszcze – w chwili badania – masy mleka (dotyczy zwierząt w pierwszym dniu ich życia). Czynniki temu przypisują znaczenie także inni autorzy (13, 15).

Wyniki niniejszej pracy własnej wskazują na łatwość wchłaniania immunoprotein z przewodu pokarmowego cieląt. Użytkowały one zatem potrzebną odporność w czasie nasilonych zachorowań na biegunkę toksyczną (pierwsze 2–3 dni, wg 1, 4). Wyrazem tego była wysoka efektywność przeprowadzonych w dwóch oborach szczepień ochronnych (357 krów immunizowanych). Z tab. 3 wynika, że wskaźnik padnięć w przypadku cieląt nieuodpornionych sięgający średnio 22,3% (obora A – 22,3% stado B – 22,6) gwałtownie zmalał po wakcynacji preparatem Dipervac do 3,1% (w stadzie A – 1,5%, w B – 4,9%). Dowodzi to dużej aktywności immunogennej tej autoszczepionki, nawet po zastosowaniu w ogniskach choroby (toksycznej biegunki beztlenowcowej). Poza tym wynik ten wspiera tezę o zasadniczej, nawet dominującej roli przeciwciał antytoksyny alfa i beta spośród wszystkich antygenów *C. perfringens* A, C biorących udział w działaniu ochronnym (10, 11). Walorem preparatu, nader pożądanym, jest niewywołanie jakichkolwiek niekorzystnych oddziaływań ubocznych (ogólnych i w miejscu iniekcji), nawet przy immunizacji krów w wysokiej ciąży (2–3 tygodnie przed terminem porodu).

### Wnioski

1. Immunogenność autoszczepionki Dipervac A, C – charakteryzowana poziomem stymulowanych przez nią antytoksyn alfa i beta (najczęściej 16, 32, 64 jedn. antyt./ml) jest wyjątkowo wysoka, a po zastosowaniu w ognisku toksycznej biegunki beztlenowcowej (na tle *C. perfringens* A, C) powoduje istotne zmniejszenie ponoszonych strat z powodu padnięć cieląt.

2. Preparat powinien wejść niezwłocznie do przemysłowej produkcji dla potrzeb krajowych, ponieważ przypadki choroby – z reguły nie rozpoznawane – są częste, natomiast szczepienia krów zapewniają efekt ochronny i są całkowicie bezpieczne (brak oddziaływań ubocznych u immunizowanych zwierząt w wysokiej ciąży).

### Piśmiennictwo

1. Cygan Z., Buczek J.: Medycyna Wet. 49, 469, 1993.
2. Cygan Z., Buczek J.: Medycyna Wet. 44, 587, 1988.
3. Cygan Z., Tereszczuk S., Pejsak Z., Tarasiuk K., Chwesiuk W.: Medycyna Wet. 42, 583, 1986.
4. Cygan Z., Buczek J.: Medycyna Wet. w druku.
5. Daube L. A.: Anns Méd. vét. 136, 5, 1992.
6. Griner L. A., Bracken F. K.: J. Am. vet. med. Ass. 125, 125, 1945.
7. Hepple J. R.: Vet. Rec. 64, 633, 1952.
8. Hogh P., Muller J.: IVE Symposium de la commission pour l'étude de maladies animales causées par les anaerobies Paris 1982, s. 45.
9. Hogle R. M.: Vet. Med. small Anim. Clin. 70, 983, 1975.
10. Kennedy K. K., Norris S. J., Beckenhauer W. H., White R.: Vet. Med. small Anim. Clin. 72, 1213, 1977.
11. Kennedy K. K., Norris S. J., Beckenhauer W. H., White R.: Am. J. Vet. Res. 38, 1515, 1977.
12. Lozano E. A., Catlin J. E., Hawkins W. K.: Cornell Vet. 60, 347, 1970.
13. McGuire T. O., Pfeiffer N. E., Weikel J. M.: J. Am. vet. med. Ass. 169, 713, 1976.
14. Niilo I.: Can. vet. J. 21, 141, 1980.
15. Shearer J., Mohamed H. O., Brennehan J. S., Tran T. Q.: Prev. Vet. Med. 14, 143, 1992.
16. Smith L. DS.: The pathogenic anaerobic bacteria, Ch. C. Thomas, I. L. Springfield, USA, 1979.
17. Smith L., DS.: Rev. infect. Dis. 1, 245, 1979.
18. Tizard I. R.: An introduction to veterinary immunology, W. B. Saunders Comp., Philadelphia 1977, s. 160.
19. Worrall E. E., Ronohardjo P., Partuotomo S.: Vet. Rec. 121, 278, 1987.

Adres autora: prof. dr hab. Zygmunt Cygan, ul. Żelazowej Woli 6 m. 13, 20-845 Lublin