

medycyna weterynaryjna

ORGAN POLSKIEGO TOWARZYSTWA NAUK WETERYNARYJNYCH

Czasopismo poświęcone nauce i praktyce weterynaryjnej oraz biologii stosowanej, założone w 1945 r. przez Wydział Weterynaryjny UMCS w Lublinie.
Wydawane z dotacją Komitetu Badań Naukowych

Referowane w: Biological Abstracts, Focus On: Veterinary Science and Medicine, FSTA, Veterinary Bulletin, Index Veterinarius

REDAKCJA: prof. dr hab. Edmund K. PROST – redaktor naczelny, prof. dr hab. Elżbieta PEŁCZYŃSKA – z-ca redaktora naczelnego,
dr Krzysztof SZKUCIK – sekretarz administracyjny, mgr inż. Elżbieta STACHYRA – sekretarz redakcji

RADA REDAKCYJNA: prof. dr hab. Ryszard Badura, prof. dr hab. Zdzisław Larski, prof. dr hab. Marian Tischner, prof. dr hab. Stanisław Wołoszyn
RADA PROGRAMOWA: prof. dr hab. Wiesław Barej, prof. dr hab. Stanisław Cąkała, prof. dr hab. Zygmunt Cygan, prof. dr hab. Zdzisław Gliński,
prof. dr hab. Marian Grundboeck, prof. dr hab. Tomasz Janowski, prof. dr hab. Teodor Juszkiewicz, prof. dr hab. Jerzy Kita, prof. dr hab. Włodzimierz Kluciński, prof. dr hab. Władysław Lutyński, dyr. dr Henryk Maciołek, prof. dr hab. Michał Mazurkiewicz, prof. dr hab. Zygmunt Pejsak, prof. dr hab. Zbigniew Samborski, prof. dr hab. Tadeusz Studziński, prof. dr hab. Eustachy Szeligowski, prof. dr hab. Krzysztof Świeżyński, prof. dr hab. Jan Tropiło,
prof. dr hab. Marian Truszczyński, prof. dr hab. Janusz Wawrzekiewicz, prof. dr hab. Jan Żmudzki.

ZDZISŁAW LARSKI
Olsztyn

artykuł przeglądowy

Niektóre nowsze dane dotyczące mikrobiologii i chorób zakaźnych (IV)

Bakteriologia

Do kontynuacji serii tak ujętych artykułów składają zachęcające głosy głównie młodych lekarzy weterynarii chcących aktualizować swą wiedzę wyniesioną z uczelni, a także opinie pracowników naukowych zainteresowanych bardzo wąską dziedziną, którym brak czasu na czytanie *in extenso* prac i artykułów z pokrewnych dziedzin. Tak jest zresztą w wielu innych naukach. Pisze o tym m.in. Wróblewski (49), że śledzenie na bieżąco postępu wiedzy stało się niemożliwe już nawet w ramach jednej specjalności (gałęzi wiedzy) i konieczna jest popularyzacja osiągnięć nauki; powinna ona odbywać się na kilku poziomach, najwyższym dla uczonych, gdy na przykład biolog pisze dla fizyków, fizyk dla techników itd. Sposób ujęcia niniejszego artykułu dostosowany jest głównie do możliwości recepcji terenowych lekarzy wet. (23) i młodych pracowników naukowych naszego zawodu. Podobnie ujmuje to redakcja angielskiego medycznego czasopisma „Lancet”: „pisząc warto pamiętać, że większość czytelników jest specjalistami w innych dziedzinach niż Twoja. Przed wysłaniem artykułu „wybróbuj” go na jednym lub kilku kolegach z innych dyscyplin medycznych. Załóż, że niektórzy czytelnicy startują z poziomu bliskiego ignorancji”. Bardziej zainteresowanym dotarcie do szczegółowych opracowań źródłowych umożliwia cytowane piśmiennictwo.

Nowe i odradzające się zagrożenia bakteryjne. Powagę sytuacji przedstawia między innymi artykuł Beardsley'a (4), w którym podano, że w październiku 1995 r. Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) powołała specjalne biuro mające kierować zwalczaniem tych zagrożeń. Alarmujące są nie tylko dane dotyczące dżumy płucnej w Indiach czy zakażenia wirusem Ebola w Zairze, ale niebezpieczeństwa ze strony bardziej pospolitych mikroorganizmów, będące następstwem narastania u nich lekooporności. Malaria i gruźlica – choroby powodujące prawdopodobnie najwięcej zgonów na świecie, często nie poddają się terapii nie tylko lekami standardowymi, ale też stosowanymi w drugiej i trzeciej kolejności. W USA pneumokoki są coraz mniej wrażliwe na skuteczne dotąd leki; gronkowiec złocisty jest odporny na penicylinę oraz często na metycylinę, jest wrażliwy na wankomycynę, ale istnieje obawa, że nie potrwa to długo. Lekooporność będąca do niedawna problemem w szpitalach, teraz pojawia się poza nimi. Oporność enterokoków na wankomycynę wzrosła w USA w latach 1989-1993 dwudziestokrotnie. Większość ze 150 mln recept na leki wypisuje się w przypadku chorób, których nie da się nimi wyleczyć; ponadto około połowy antybiotyków używanych w Stanach Zjednoczonych podaje się zwierzętom. W Wielkiej Brytanii Parlamentarne

Biuro Nauki i Techniki stwierdziło nieuzasadniony wzrost liczy recept przepisywanych na leki przeciwbakteryjne (16); jest to nie tylko wyrzucanie pieniędzy w błoto, ale zwiększa selektywny mechanizm powstawania lekooporności drobnoustrojów. Jest ona bowiem głównie następstwem stosowania zbyt małych i zbyt krótko preparatów przeciwbakteryjnych, co umożliwia w bardzo zróżnicowanej populacji bakterii przeżycie wykazujących większą oporność na lek. Oprócz tego selekcyjnego mechanizmu znane są jeszcze inne umożliwiające nabywanie niewrażliwości na lek przez bakterie nie mające z nim bezpośredniego kontaktu. Polegają one na przekazaniu tej cechy z bakterii lekoopornej na bakterię lekowrażliwą. Następuje to wskutek przeniesienia materiału genetycznego kodującego lekooporność w procesie koniugacji, lub przez bakteriofaga (transdukcja). Geny warunkujące oporność znajdują się w chromosomach, transpozonach i plazmidach i mogą się przenosić także z jednego gatunku bakterii na drugi. Zarówno mechanizmy powstawania lekooporności bakterii jak też tło biochemiczne tej niewrażliwości na chemioterapeutyki bardziej szczegółowo omawiają m.in. Roliński i Właż (39) oraz Hryniewicz (19). Narastanie zjawiska lekooporności stwierdza się też u bakterii chorobotwórczych dla zwierząt, o czym świadczą wyniki licznych badań także krajowych (6, 38-41, 45, 48).

Hryniewicz (19) przedstawia konieczność prowadzenia odpowiedniej polityki antybiotykowej, ograniczenia dostępności i prawa do zapisywania niektórych antybiotyków ważnych w leczeniu ciężkich, zagrażających życiu zakażeń; ma to na celu przedłużenie czasu „życia” leku na rynku przez opóźnienie szerzenia się szczepów lekoopornych. Autorka apeluje też do lekarzy wet. o właściwe podawanie i nienadużywanie antybiotyków. Roliński i Właż (39) podali szczegółowe zalecenia wymagane dla zahamowania częstotliwości występowania lekooporności bakterii. Można się spodziewać, że powołane biuro WHO do tych spraw wyda stosowne zarządzenia obowiązujące zarówno służbę zdrowia jak i weterynarię.

W obecnej sytuacji, gdy coraz więcej bakterii staje się opornymi na dotychczas stosowane chemioterapeutyki, a otrzymanie nowych, często niewiele bardziej skutecznych wymaga długiego czasu, niekiedy nawet 10 lat i więcej, oraz olbrzymich kosztów, wydaje się, że powodzenie w walce z zakażeniami zależeć będzie w przyszłości w dużym stopniu od szerszego stosowania immunoprofilaktyki i immunoterapii. Tę pierwszą zapewnić może wzbogacony arsenał nowych, bardziej skutecznych szczepionek, też być może szczepionek polinukleotydowych, omówionych w dalszej części tego artykułu. W immunoterapii, oprócz stosowania surowic zawierających swoiste dla danego zarazka przeciw-

ciała, istotną rolę odegra adoptywny transfer przygotowanych *in vitro* swoistych cytotoksycznych limfocytów T. Taka adoptywna immunoterapia znajdzie zastosowanie w zakażeniach, w których decydującą rolę odgrywa иммунитет komórkowy (tab. 1), a więc głównie w chorobach wirusowych (w nich seroterapia jest nieskuteczna). Na takie perspektywy wskazują pomyślne wyniki dotychczasowych badań dotyczących zakażeń wirusami (cyt. wg 32): LCM, grypy, herpes simplex, wścieklizny, rotawirusami i mysimi cytomegalowirusami; wykazano działanie ochronne i wyraźną redukcję miana wirusa w tkankach. Murali-Krishna i wsp. (32) stwierdzili skuteczność takiego adoptywnego transferu także w modelowych doświadczeniach na myszach przy japońskim zapaleniu mózgu. Również immunoterapia przy użyciu autoszczepionek, działających jako immunomodulatory, może w wielu przypadkach z powodzeniem zastąpić antybiotykoterapię.

Rozważanie takiej koncepcji głównego kierunku postępowania przywodzi na myśl anegdotę związaną z Aleksandrem Flemingiem, który właśnie w trakcie badań nad szczepionką przeciw ropnym zakażeniom przypadkowo odkrył penicylinę niszczącą wywołujące je bakterie; jego przełożony miał wtedy powiedzieć: „i tak wrócisz do immunologii”. Czyżby to miało potwierdzić żartobliwą regułę, że szef ma zawsze rację, w odniesieniu do obecnych następców Fleminga? Antybiotyki zawodzą – wielka nadzieja w immunologii.

Rola wspomnianego biura WHO do zwalczania nowych i odradzających się zagrożeń bakteryjnych nie ogranicza się tylko do opanowania zjawiska lekooporności, którego wyłącznie nie można obwiniać za wzrost takich zagrożeń. Istotną rolę odgrywają bowiem także inne usposabiające czynniki, przede wszystkim osłabienie immunologicznej obrony organizmu, albo wskutek choroby albo w następstwie stosowania leków. Na przykład stan taki u ludzi powodować mogą (cyt. wg 12): ostra i chroniczna białaczka limfatyczna, leczenie cytostatykami i środkami immunosupresyjnymi, oparzenia, hiperglikemia, rozległe urazy, kwasica ketonowa, choroba Hodgkina, zakażenie wirusem HIV, leczenie kortykoidami. Niektóre z tych czynników odgrywają też rolę u zwierząt, m.in. zakażenia analogicznymi do wirusa HIV, wirusami upośledzającymi иммунитет u kotów (FIV), bydła (BIV) i małp (SIV), a także wirusem choroby Gumboro czy wirusem anemii kurcząt. Również złe warunki zoohigieniczne i niska jakość pasz obniżają sprawność układu odpornościowego (39). W zależności od rodzaju defektu mechanizmu ochronnego u ludzi i zwierząt dominują zakażenia określonymi rodzajami zarazków, co przedstawia tab. 1.

Pojawianie się nowych groźnych zakażeń może być też następstwem zmian genetycznych u dobrze znanych od dawna bakterii. Na przykład przypuszcza

Tab. 1. Stopień dominacji zarazków w zależności od rodzaju upośledzenia mechanizmu obronnego organizmu (12)

Bakterie	Upośledzenie mechanizmu obronnego:		
	fagocytozy	immunitetu:	
		humoralnego	komórkowego
Ziarenkowce gramdodatnie	+++	+++	-
Enterobakterie	+++	+	-
<i>Ps. aeruginosa</i>	+++	++	-
<i>H. influenzae</i>	+	+++	-
<i>Legionella spp.</i>	+	++	-
<i>Salmonella spp.</i>	-	-	+++
<i>L. monocytogenes</i>	-	-	+++
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	-	-	+++
<i>Nocardia spp.</i>	-	-	+++
Grzyby			
<i>Candidia spp.</i> , w drożdżycy:			
układowej	+++	-	-
śluzowo-skinnej	-	-	+++
<i>Aspergillus spp.</i>	+++	-	-
<i>Mucor-Absidia-Rhizopus</i>	+++	-	-
<i>Cryptococcus neoformans</i>	-	-	+++
<i>Histoplasma capsulatum</i>	-	-	+++
Wirusy			
<i>Herpes simplex</i>	-	+	+++
Ospy wietrznej-półpaśca	-	-	+++
Cytomegalii	-	-	+++
Krowianki	-	-	+++
Różyczki	-	-	+++
Papowawirusy	-	-	+++
Enterowirusy	-	++	+
Hepatitis B	-	++	+
Influenzy	-	+	+
Adenowirusy	-	+	+

się, że chorobotwórczy dla człowieka serotyp *Escherichia coli* O157:H7 posiadający toksynę bardzo podobną lub nawet identyczną jak u pałeczek rodzaju *Shigella*, nabył zdolność jej wytwarzania w następstwie wprowadzenia genetycznego materiału przez wirus (37). Tę groźną dla ludzi pałeczkę, występującą u zdrowego bydła omówiono w innym artykule (24).

***Ornithobacterium rhinotracheale* – nowy patogen drobiu i dzikiego ptactwa.** Wywołuje wysiękowe zapalenie płuc i worków powietrznych, a wyizolowali go z narządu oddechowego chorych indyków, kurcząt, kuropatw oraz gawronów, i opisali

w 1994 r. VanDamme i wsp. (cyt. wg 9). Choroba pojawiła się w Niemczech i w Belgii. Hinz i wsp. (17) opisali u indyków następujące objawy, które obserwuje się dopiero w niewiele godzin przed śmiercią ptaków: osłabienie, wyraźna duszność, wykrztuszanie śluzu zabarwionego krwią, a bezpośrednio przed śmiercią sinica nieupierzonych części głowy. Sekcyjnie stwierdza się obustronne ciężkie surowiczowo-włóknikowe odoskrzelowe zapalenie płuc z krwią w tchawicy i oskrzelach, oraz włóknikowe zapalenie piersiowych worków powietrznych. W rozpoznaniu różnicowym brano pod uwagę cholere (pasterelozę) drobiu. VanBeek i wsp. (cyt. wg 9) stwierdzili u kur i indyków opóźnienie wzrostu oraz stany zapalne stawów związane z zakażeniem *O. rhinotracheale*.

Praca Hinz i wsp. (17) zawiera też dane dotyczące właściwości hodowlanych i biochemicznych *Ornithobacterium rhinotracheale*; po 24-48 godz. inkubowania na agarze z krwią barana, w 37°C, w warunkach mikroaerofilnych w badanych preparatach stwierdza się nie wykazujące ruchu gram-ujemne pałeczki. Izoluje się je najczęściej w czystej hodowli z prób pobranych z tchawicy, płuc i wysięku z worków powietrznych, natomiast nie ma ich w sercu, śledzionie i wątrobie.

Z uwagi na wysoką śmiertelność i piorunujący przebieg choroby, po oddzieleniu chorych ptaków, zdrowym Hinz i wsp. (17) podawali amoksycylinę (Amoxycyllin) w wodzie do picia w ilości 300 ppm przez jeden lub 200 ppm przez dwa dni. Antybiotyk ten okazał się bardzo skuteczny i choroba szybko ustąpiła po jego zastosowaniu. Devriese i wsp. (9) wykonali szczegółowe badania wrażliwości kilkunastu szczepów *O. rhinotracheale* na antybiotyki metodą rozcieńczeń w agarze i wykazali, że typowy szczep tego drobnoustroju był dotąd błędnie określany jako wrażliwy na penicylinę na podstawie oceny metodą krążkową.

Wirusologia

Nowa szczepionka przeciw wirusowej bieguncie bydła. Celowość czynnego uodparniania przeciw temu, znacznie rozprzestrzenionemu w całym świecie zakażeniu, była do niedawna przedmiotem kontrowersji a jak podaje Marschang (29) obecnie wyłania się konieczność zastosowania szczepień w stadach „problemowych”. To skrótowe określenie używane jest bez cudzysłowu w językach obcych, np. w niemieckim – Problembetriebe, w angielskim – problem herds. Oznacza ono stada, które nie reagują na ogólnie przyjęte programy zwalczania określonej choroby i wymagają specjalnego badania dla wyjaśnienia błędów w postępowaniu i podjęcia dodatkowych kroków zaradczych (5). Gromadzi się coraz więcej danych wskazujących jak wielkie szkody wywołuje zakażenie omawianym wirusem w sta-

dach problemowych. Jego krążenie i różnorodność procesów chorobowych, poza najgroźniejszą śmiertelną „mucosal disease”, to: schorzenia dróg oddechowych, charłactwo, zaburzenia płodności, zanokcica, śmiertelność noworodków a ponadto czasowa immunosupresja, zmniejszona wydajność i wykorzystanie paszy, zmiany jakości mleka (zwiększona liczba komórek). Szczegółowo omawia to Marschang (29), a w piśmiennictwie krajowym Polak i Żmudziński (35), Januszewski i Budzyk (20) oraz Kita (21).

Konieczne są więc szczepienia, przy użyciu do- brych szczepionek. Zawierające żywy wirus nie tylko nie dały zadowalających wyników, ale nawet stwarzały niekiedy zagrożenie dla uodpornianych zwierząt w postaci komplikacji poszczepiennych. Duże nadzieje wiąże się z nową inaktywowaną szczepionką opracowaną przez Brownlie'go i wsp. (7) będącą owocem ponad dziesięcioletnich badań nad wirusem biegunki bydła (1). Wiadomo, że występuje on w przyrodzie w dwu typach – niecytopatogennym (nie wywołującym uszkodzenia komórek w hodowli *in vitro*) i cytopatogennym (wywołującym takie zmiany). Choroba istnieje w dwu postaciach, jako biegunka i jako choroba błon śluzowych (mucosal disease). Szczegółne zainteresowanie budziła przyczyna występowania tej drugiej formy; opisano ją po raz pierwszy w 1953 r. (1). Brownlie i wsp. (8) postawili w 1984 r. hipotezę, że do jej rozwoju konieczne jest podwójne zakażenie. Pierwsze, płodu w macicy, powoduje niecytopatogenny szczep wirusa – jedynie on może przenikać przez łożyszcze i zakażać płód w dowolnym okresie ciąży, ale zakażenie ma charakter trwały, tylko jeżeli nastąpi w pierwszych jej 110-120 dniach, gdyż wtedy płód jest jeszcze niezdolny do odpowiedzi immunologicznej. Wirus jest tolerowany i często nie powoduje żadnych klinicznych zmian. Jednak jeżeli w jakiś czas po urodzeniu, zwykle w wieku 6-18 miesięcy, nastąpi zakażenie zwierzęcia cytopatogennym szczepem wirusa, ten gwałtownie się namnaża i powoduje chorobę błon śluzowych (mucosal disease) prowadzącą nieuchronnie do śmierci w ciągu 2-3 tygodni (1).

Dalsze badania potwierdziły słuszność podanej hipotezy i stworzyły podstawę do przygotowania przez Brownlie'go i wsp. (7) szczepionki zawierającej inaktywowany niecytopatogenny szczep wirusa, która nie tylko chroni płód przed zakażeniem, ale ma też dużą wartość epidemiologiczną, gdyż przyczynić się może do przerwania łańcucha zakaźnego wirusowej biegunki bydła. Trwale zakażone cielęta stanowią groźne źródło wirusa a użycie tej nowej szczepionki umożliwi jego eliminację z zakażonych stad. U 20 jałówek szczepionych podskórnie w okresie krycia a następnie poddanych donosowemu zakażeniu kontrolnemu (challenge) między 25. a 80. dniem ciąży nie stwierdzono wi-

remii; nie wykazano też zakażenia u 13 urodzonych cieląt i dwu poronionych płodów. W innych badaniach Howard i wsp. (18) wykazali, że szczepionka zawierająca inaktywowany niecytopatogenny szczep wirusa biegunki bydła wprowadzona podskórnie trzykrotnie cielętom chroniła je przeciw donosowemu zakażeniu kontrolnemu tym samym żywym szczepem wirusa; wiadomo z innych badań, że niecytopatogenny wirus stwierdzany jest w przypadkach schorzeń narządu oddechowego cieląt, często łącznie z innymi drobnoustrojami.

Przedkliniczny test na choroby prionowe. Wstępna, wczesna diagnostyka tych zakaźnych gąbczastych encefalopatii zwierząt i ludzi, omówionych w innym artykule (26), opiera się obecnie na stwierdzeniu charakterystycznych objawów klinicznych, zastosowaniu encefalografii lub rezonansu magnetycznego a także inwazyjnej metody – biopsji mózgu. Ostateczne rozpoznanie uzyskuje się na podstawie pośmiertnego histologicznego badania mózgu. Brak dotąd metod przyżyciowej diagnostyki tych chorób w stadium przedklinicznym, gdyż w tym okresie zakażenie nie powoduje swoistej odpowiedzi immunologicznej ani typowych zmian biochemicznych, hematologicznych i makroskopowych anatomopatologicznych. Istnieje więc pilna potrzeba opracowania takiego testu, zwłaszcza w odniesieniu do gąbczastej encefalopatii bydła (BSE) w obecnej sytuacji, gdy sugeruje się jej powiązanie z chorobą Creutzfeldta-Jakoba, CJD (Creutzfeldt-Jakob Disease) u ludzi. Niezależnie od ostatecznego wyjaśnienia etiologii tych chorób – prion czy wirus (10, 11, 13), wiadomo obecnie z całą pewnością, że obecność PrP^{Sc} jest ich stałą i swoistą cechą.

W czerwcu 1996 r. Schreuder i wsp. (43), jako pierwsi, opisali na modelu trzęsawki (scrapie) owiec metodę rozpoznawania tego zakażenia w stadium przedklinicznym. Po stwierdzeniu stałej obecności białka PrP^{Sc} przy użyciu przeciwciał dla wybranych syntetycznych peptydów białka prionowego (47), w migdałkach owiec naturalnie zakażonych, wykazujących objawy kliniczne, podjęli próby wykazania tą metodą PrP^{Sc} w migdałkach owiec w stadium przedklinicznym. Do badań użyli jagniąt urodzonych i wychowanych w farmie, gdzie trzęsawka panowała od kilku lat. Zwierzęta te wykazywały ponadto genotyp pozwalający oczekiwać wystąpienia u nich obrazu klinicznego w ciągu około 25 miesięcy po urodzeniu. Biopsję i badanie migdałków tych zwierząt wykonano w 10. miesiącu po urodzeniu, kiedy żadne z nich nie wykazywało objawów chorobowych; u wszystkich immunologiczną metodą barwienia, przy użyciu znakowanej peroksydazą streptawidyny-biotyny, wykazano wyraźnie dodatni wynik. U cieląt kontrolnych o genotypowo zwiększonej rezystencji na trzęsawkę, wyniki były ujemne. Tak więc użyta metoda pozwoliła wykryć PrP^{Sc} w po-

łowie okresu inkubacyjnego, około roku przed oczekiwaniem wystąpieniem objawów choroby. Autorzy sądzą, że ta metoda może okazać się jeszcze bardziej przydatna w odniesieniu do CJD u ludzi, przy której zakaźność stwierdzono w różnych tkankach limfoidalnych, natomiast być może zawiedzie przy BSE, przy której nie udało się dotąd wykazać zakaźności obwodowych tkanek bydła; ponieważ jednak próby na myszach są może zbyt mało czułe, konieczne jest dalsze prowadzenie badań przy użyciu opisanych metod immunohistochemicznych, zwłaszcza, że biopsja migdałków u bydła jest łatwiejsza niż u owiec.

Z uwagi na niezwykle długi okres inkubacji BSE dopiero posiadanie metody przedklinicznej diagnostyki zakażenia umożliwi racjonalne zwalczanie tej choroby, nie przez obecnie planowaną (i częściowo już realizowaną) masową rzeź zwierząt uważanych za potencjalnie zakażone, lecz przez eliminację rzeczywiście zakażonych. Pozwoli to również zminimalizować, wciąż jeszcze tylko sugerowane, nie udowodnione (hipotetycznie) zagrożenie zdrowia ludzkiego – brak dalej pewnego dowodu.

Nie stanowi go także doniesienie Lasmézas a i wsp. (28) z czerwca 1996 r. o udanym przeniesieniu BSE na małpy *Macacus cynomolgus*. Autorzy zakazili domózgowo 25%-ową zawiesiną mózgu chorego na BSE bydła dwa dorosłe zwierzęta i jednego noworodka. U zakażonych dorosłych małp objawy wystąpiły po 150 tygodniach, a u najmłodszego zwierzęcia po 128 tygodniach i były bardzo podobne do obserwowanych u ludzi chorych na nową odmianę CJD; również pośmiertne badanie mózgu wykazało podobny charakter zmian. Małpy były zakażone domózgowo, natomiast hipoteza ludzkiego zagrożenia przez BSE zakłada doustną drogę zakażenia, jednak autorzy powołując się na swe inne badania (27) sądzą, że w przypadku czynnika BSE stanowiącego pojedynczy ustabilizowany szczep, patogenez a i przebieg choroby najprawdopodobniej nie zależą od drogi zakażenia. Te uderzające, zdaniem autorów, podobieństwa wspierają hipotezę mówiącą o roli BSE w pojawieniu się nowej odmiany CJD. Badania te a także inne dotyczące możliwego powiązania BSE z nową formą CJD omawia w obszernym komentarzu Aguzzi (2) zwracając uwagę na konieczność pilnej odpowiedzi na pytanie czy doustne podanie małpom zarazka BSE spowoduje takie same objawy; badania takie powinny objąć także określenie minimalnej zakaźnej dawki – a to wymaga długich, kilkuletnich badań.

Mikologia

Szybka metoda wykrywania substancji przeciwrzybiczych. Wady dotychczas stosowanych badań przesiewowych (screening) w poszukiwaniu takich substancji to m.in. ich niemieszalność z wodą i czasochłonność metody dyfuzji w żelu agarowym.

Rana i wsp. (36) opisali szybki sposób badania wielu próbek pochodzenia roślinnego, który jak podają, może znaleźć szersze zastosowanie wszędzie tam gdzie obecnie stosuje się metodę dyfuzji w agarze, w identyfikacji mutantów grzybów opornych na pewne substancje. Badany związek (np. ekstrakt roślinny) nanosi się na cienką płytkę żelu krzemionkowego, suszy w temperaturze pokojowej a następnie napyła ją zawiesiną grzyba w odpowiednim dla niego podłożu płynnym i inkubuje w komorze wilgotnej w temperaturze 25°C do czasu uzyskania wyraźnego wzrostu grzyba; aktywność badanej substancji wyraża się wielkością strefy hamowania.

Immunologia

Immunizacja genetyczna. Współczesne koncepcje produkcji szczepionek były ostatnio przedmiotem kilku artykułów, też w krajowym piśmiennictwie (15, 22, 31, 33, 42). Szczepionki zawierające żywe zarazki atenuowane, czyli pozbawione w mniejszym lub większym stopniu zjadliwości wykazują wiele zalet, które omówiono bardziej szczegółowo w innym artykule (22) podając również ich wady. Do najważniejszych zaliczyć trzeba ryzyko wywołania zakażenia u osobnika z niedoborem immunologicznym, oraz możliwość rewersji (powrotu) zarazka do wyjściowej postaci zjadliwej. To ostatnie dotyczyć może szczególnie wirusów zawierających RNA, które wykazują dużą częstość mutacji, zwłaszcza gdy atenuację uzyskano przez pasaż a istota tej mutacji nie jest znana (34). Nie stwarzają takiego ryzyka szczepionki podjednostkowe (cząstkowe), są one jednak dość rzadko stosowane, gdyż ich produkcja jest droga i zwykle wymagane jest ich powtórne podanie z użyciem silnych adiuwantów; ponadto stanowią one słaby bodziec dla powstania cytotoksycznych limfocytów T istotnych dla ochrony przeciw chorobom wirusowym (34).

Ze względów epidemiologicznych najważniejsza jest możliwość odróżnienia osobników szczepionych od naturalnie zakażonych. Zapewnić to mogą szczepionki znakowane, znaczone (ang. marker vaccines, niem. Markerimpfstoffen), to jest zawierające zarazki pozbawione niektórych antygenów nieistotnych dla wywołania odporności. Inny będzie oczywiście zestaw przeciwciał u szczepionych nimi osobników a inny u naturalnie zakażonych. Różne są metody otrzymywania szczepionek znakowanych, przy czym brak jednolitości nazewnictwa ich rodzajów (30, 44).

Najlepsze są szczepionki zawierające nie cały zarazek a tylko te jego antygeny, określane jako antygeny ochronne, powodujące niewrażliwość na zakażenie. Metody ich syntezy chemicznej i biosyntezy omówił ostatnio w piśmiennictwie krajowym Molenda (31); biosynteza polega na tym, że izolowany fragment genomu zarazka kodujący syntezę anty-

genów ochronnych zostaje zintegrowany z DNA plazmidu i wcielony do komórki *E. coli* i ona realizując tę narzuconą sobie obcą informację, staje się ich producentem.

Prawdziwy przełom w produkcji szczepionek zapowiada nowe podejście oparte na genetycznej immunizacji, zaproponowane przez Tanga i wsp. (46). Autorzy ci wykazali, że odpowiedź immunologiczną na obce białko można wywołać wprowadzając do komórki organizmu nie je samo a gen je kodujący. Stwierdzili to u myszy, u których po wprowadzeniu bezpośrednio do skóry plazmidów zawierających kopie genomów dla dwu białek ludzkich (pod kontrolą promotora – np. cytomegalowirusa) pojawiły się swoiste przeciwciała, a po powtórnym podaniu wystąpiła reakcja anamnesticzna. Również Wolff i wsp. (cyt. wg 34) wykazali możliwość długotrwałego utrzymywania się i ekspresji (realizacji) obcej informacji genetycznej po domięśniowym wstrzyknięciu plazmidowego DNA; sugerowało to wykorzystanie takiej transfekcji (przeniesienia obcej informacji) *in vivo* jako obiecującej metody immunizacji.

Stosując tę metodę, posiadającą wiele zalet szczepionek żywych atenuowanych, a pozbawioną ryzyka wywołania zakażenia, inni autorzy (cyt. wg 3) uzyskali obiecujące wyniki w kilku modelach chorobowych: przeciw influencji, HIV-1, zapaleniu wątroby B, zakażeniu herpeswirusem bydła (BHV-1) u myszy i bydła, wścieklicznie, malarii, leiszmaniozie i gruźlicy. Taka immunizacja chroni także myszy przeciw limfocytarnemu zapaleniu opon i splotów naczyńkowych, LCM (cyt. wg 34). Barry i wsp. (3) opisali nową metodę sporządzania szczepionek, wykorzystującą technikę immunizacji genetycznej i wykazali jej skuteczność w uodpornieniu myszy przeciw *Mycoplasma pulmonis* – naturalnemu patogenowi gryzoni. Nawet minimalna ilość DNA (jedna milionowa grama) wprowadzona doskórnice chroni myszy przed zakażeniem kontrolnym (challenge) zjadliwym szczepem *M. pulmonis*; u tych zwierząt nie stwierdzono ani objawów klinicznych ani zmian patologicznych w płucach a także obecności mikoplazm. Autorzy uważają, że to stwarza podstawę do produkcji niezakaźnej szczepionki zapewniającej иммунитет zarówno humoralny jak i komórkowy; sądzą też, że może się okazać skuteczną metodą immunizacji przeciw każdemu zarazkowi, nawet jeżeli jego biologia jest mało poznana. Phillipotts i wsp. (34) stwierdzili, że jednorazowa domięśniowa iniekcja myszom plazmidu, zawierającego informację dla ekspresji antygenów ochronnych flawiwirusa St. Louis zapalenia mózgu (SLE) pod kontrolą promotora wirusa cytomegalii, spowodowała powstanie przeciwciał dla SLE i zwierzęta te były chronione przed śmiertelną dawką zjadliwego wirusa; nie wykluczone, że było to uwarunkowane także nie badanym w tej pracy иммунитетem komórkowym. Skuteczność takiej metody immunizacji przeciw chorobie

Aujeszkyego wykazali Gerds i wsp. (14) u myszy szczepiąc je podskórnice i domięśniowo – u wszystkich zwierząt stwierdzono powstanie swoistych przeciwciał; obecnie prowadzone są próby uodpornienia świń tą metodą.

Podsumowując przedstawione dane warto jeszcze raz podkreślić podstawową nowość metody immunizacji genetycznej. Dotychczasowe szczepionki zawierają pełny zarazek lub tylko wybrane jego antygeny ochronne będące polipeptydami, sporządzone poza organizmem. Ta nowa generacja szczepionek to polinukleotydy, czyli elementy materiału genetycznego, które wprowadzone do organizmu powodują ekspresję (realizację) kodowanych przez nie antygenów i dlatego Phillipotts i wsp. (34) słusznie nazywają te szczepionki polinukleotydowymi. Tu organizm nie otrzymuje gotowych antygenów a tylko genetyczny przepis (informację) ich sporządzania i sam staje się ich producentem. Wywołując odpowiedź tylko na antygeny będące wyrazem ekspresji określonych polinukleotydów zarazka, spełnią równocześnie rolę szczepionek znakowanych, gdyż umożliwią odróżnienie osobników sztucznie immunizowanych od naturalnie zakażonych. Zachodzi tylko pytanie dotyczące stopnia awidności przeciwciał (25) po użyciu tych szczepionek, ponieważ jest ona wyrazem ich wiązania się z różnymi determinantami antygenowymi zarazka.

Po oddaniu do druku niniejszego opracowania ukazał się artykuł Jacka Oska (Medycyna Wet. 52, 549, 1996), w którym zainteresowani znajdą wiele szczegółowych danych na temat immunizacji genetycznej.

Piśmiennictwo

1. Anon.: Vet. Rec. 137, 53, 1995.
2. Aguzzi A.: Nature 381, 734, 1996.
3. Barry M. A., Lai W. C., Johnston S. A.: Nature 377, 632, 1995.
4. Beardsley T.: Świat Nauki nr 3, 13, 1996.
5. Blood D. C., Studert V. O.: Bailliere's Comprehensive Veterinary Dictionary. Bailliere Tindall, London 1988.
6. Błaszczak B., Rzewuska M., Binek M.: Medycyna Wet. 52, 392, 1996.
7. Brownlie J., Clarke M. C., Hooper L. B., Bell G. D.: Vet. Rec. 137, 58, 1995.
8. Brownlie J., Clarke M. C., Howard C. J.: Vet. Rec. 114, 535, 1984.
9. Devriese L. A., Homez J., Vandamme P., Kersters K., Haesebrouck F.: Vet. Rec. 137, 435, 1995.
10. Diringer H.: Lancet 347, 1332, 1996.
11. Diringer H., Beekes M., Oberdieck U.: Ann. N. Y. Acad. Sci. 724, 246, 1994.
12. Ehnert W.: Selecta – Medizin aktuell nr 32, 24, 1995.
13. Finkel E.: Lancet 348, 326, 1996.
14. Gerds V., Jöns A., Mettenleiter T. C.: Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere. Jahresbericht, 57, 1995.
15. Gliński Z., Buczek J.: Medycyna Wet. 46, 80, 1990.
16. Greenwood D.: Lancet 346, suppl. 1, 1995.
17. Hinz K. H., Blome C., Ryll.: Vet. Rec. 135, 233, 1994.
18. Howard C. J., Clarke M. C., Sopp P., Brownlie J.: Vet. Microbiol. 42, 171, 1994.
19. Hryniewicz W.: Magazyn Medyczny, październik 1993, przedruk: Mikrobiologia-Medycyna 1, 19, 1994.
20. Januszewski J., Budzyk J.: Magazyn Wet. 4, 411, 1995.
21. Kita J.: Magazyn Wet. 5, 22, 1996.
22. Larski Z.: Medycyna Wet. 48, 147, 1992.

23. Larski Z.: Medycyna Wet. 48, 243, 1992.
 24. Larski Z.: Medycyna Wet. 51, 4, 1995.
 25. Larski Z.: Medycyna Wet. 51, 499, 1995.
 26. Larski Z.: Medycyna Wet. 52, 479, 1996.
 27. Lasmezias C. I., Deslys J.-P., Demaimay R., Adjou K. T., Hauw J.-J., Dormont D.: J. gen. Virol. 77, 1601, 1996.
 28. Lasmezias C. I., Deslys J.-P., Demaimay R., Adjou K. T., Lamoury F., Dormont D., Robalin O., Ironside J., Hauw J.-J.: Nature 381, 743, 1996.
 29. Marschang F.: Tierärztl. Umsch. 50, 554, 1995.
 30. Moennig V.: Prakt. Tierarzt 77, 83, 1996.
 31. Molenda J.: Medycyna Wet. 50, 353, 1994.
 32. Murali-Krishna K., Ravi V., Manjunath R.: J. gen. Virol. 77, 705, 1996.
 33. Pejsak Z.: Medycyna Wet. 46, 129, 1990.
 34. Phillpotts R. J., Venugopal K., Brooks T.: Arch. Virol. 141, 743, 1996.
 35. Polak M. P., Zmudzinski J. F.: Medycyna Wet. 50, 297, 1994.
 36. Rana B. K., Singh U. P., Taneja V.: World J. Microbiol. Biotechnol. 12, 301, 1996.
 37. Reed C. A.: J. Amer. Vet. Med. Ass. 207, 1534, 1995.
 38. Roliński Z., Wernicka-Furmaga R., Kowalski C.: Medycyna Wet. 44, 461, 1988.
 39. Roliński Z., Wlaz P.: Medycyna Wet. 46, 142, 1990.
 40. Roliński Z., Wlaz P.: Życie wet. 69, 360, 1994.
 41. Roliński Z., Wlaz P., Kowalski C., Pacholczyk S.: Medycyna Wet. 50, 65, 1994.
 42. Rymkiewicz D., Wysokińska T.: Przegl. Epidemiol. 44, 337, 1990.
 43. Schreuder B. E. C., van Keulen L. J. M., Vromans M. E. W., Langeveld J. P. M., Smits M. A.: Nature 381, 563, 1996.
 44. Siebert S., Auer S., Heinen E., Kretzdorn D., Strube W.: Tierärztl. Umsch. 50, 530, 1995.
 45. Staroniewicz Z., Birger M.: Medycyna Wet. 46, 278, 1990.
 46. Tang D., DeVit M., Johnston S. A.: Nature 356, 152, 1992.
 47. van Keulen L. J. M., Schreuder B. E. C., Melen R. H., Mooiharkes G., Vroman M. E. W., Langeveldt J. P. M.: J. clin. Microbiol. 34, 1228, 1996.
 48. Wernicki A., Rzedzicki J.: Medycyna Wet. 44, 85, 1988.
 49. Wróblewski A. K.: Problemy nr 11, 3, 1986.

Adres autora: prof. dr hab. Zdzisław Larski, Kortowo, bl. 105, 10-957 Olsztyn

ZYGMUNT CYGAN

artykuł przeglądowy

Właściwości, mechanizm działania i rola chorobotwórcza toksyny alfa *C. perfringens*

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

C. perfringens należy do najważniejszych i najczęściej występujących chorobotwórczych laseczek *Clostridium* (9, 17, 30, 50, 51). Drobnoustrój wytwarza szereg głównych toksyn letalnych (ang. maior toxins – alfa, beta, epsilon, jota) stanowiących o wyróżnianiu 5 typów toksycznych zarazka (A, B, C, D, E, wg 30), których odrębność antygenowa i specyficzny dla nich mechanizm oddziaływania determinują rolę chorobotwórczą poszczególnych serotypów (22, 32). Przybliżenie w odniesieniu do toksyny alfa tej problematyki – w pewnym z konieczności tylko zarysie – jest celem tego artykułu.

Właściwości

Toksyna alfa (fosfolipaza C, lecytynaza C, komponent alfa, czynnik alfa) jest wytwarzana przez laseczki wszystkich serotypów *C. perfringens* (51), ale w najwyższej koncentracji przez przynależne do typu A (30, 32, 41, 50). Jej wytwarzanie determinują geny vir R i vir S (28, 29) zlokalizowane w przypadku toksyny alfa przypuszczalnie w miejscu plc chromosomu (5, 42). Spekuluje się, że struktura plc stanowi aktywator odpowiedzialny za poziom toksyny alfa wytwarzanej przez szczep *C. perfringens*

(42). Sekwencja około 100 nukleotydów plc koduje jej właściwości enzymatyczne (także aktywność jako sfingomielinazy, wg 26), stanowiącej pojedynczy polipeptyd (43). Jego region końcowy N, zawierający grupę tyrozyny, przypuszczalnie odpowiada za wpływ letalny i hemolityczny, nadto enzymatyczny oraz agregujący płytki (37, 44, 57, 61). Natomiast odcinek C o prawdopodobnej homologii z arachidonato 5-lipooksygenazą warunkuje efekt zapalny (63). Podkreślić należy, że usunięcie regionu C redukuje ale nie znosi całkowicie aktywności toksyny alfa jako sfingomielinazy (63).

Osobliwością komponenty alfa jest fakt, że zawiera w swoim składzie jony Zn^{++} , zatem posiada właściwość enzymatyczną cynko-metalo-fosfolipazy C (lecytynaza C), oddziaływującej letalnie (63), nekrotycznie (31) i hemolizująco (43, 59) – w przeciwieństwie do analogicznej lecytynazy spotykanej u innych bakterii, w tym *Bacillus cereus*, ale pozbawionej podobnej aktywności (28, 70).

Ciężar molekularny toksyny alfa wynosi od 43 000 (25) do 54 000 (51), a punkt izoelektryczny osiąga w pH 5,4 (51, 52), przy którym ujawnia się obecność 2 form jadu (alfa A, alfa B, wg 49, 52). Sugahara i Ohsaka (56) rozdzielili toksynę alfa również na