

ZYGMUNT CYGAN, JAN BUCZEK\*

# Właściwości immunogenne dwukomponentowej autoszczepionki Perseptivac łączącej toksoidy *C. perfringens* D i *C. septicum*\*)

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

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

## Summary

**Immunogenic properties of a two-component autovaccine Perseptivac based on *C. perfringens* D and *C. septicum* toxoids**

**Immunogenic properties of a two-component autovaccine against enterotoxemia and braxy of sheep based on *C. perfringens* D and *C. septicum* toxoids have been evaluated. Experiments on 49 pregnant sheep immunized 3-2 weeks before parturition and on 50 lambs at the age of 2-3 months vaccinated twice, showed that the prepared autovaccine induced antibodies against  $\epsilon$ -toxin and  $\alpha$ -toxin at a titre of 4-64 antitoxic units/ml in sheep and 8-64 antitoxic units/ml in lambs. An induced level of antitoxic antibodies protected lambs in a fattening period against enterotoxemia and braxy and sheep against *C. septicum* toxoinfection.**

Bradsot owiec i enterotoksemia beztlenowcowa jagniąt należą do najczęstszych u tych zwierząt chorób (1, 7, 9, 13, 14, 17, 18, 19, 20) powodujących wyjątkowo wysokie straty, które sięgają nawet 30% stanu stada (3, 12, 21). Wobec gwałtowności zachorowań, nadto szybkiego ich przebiegu, tylko dostępność swoistej szczepionki stwarza realną możliwość wygaszenia takich enzootycznych ognisk (1, 5, 8, 14, 22).

Obie choroby charakteryzuje sezonowa zbieżność w ich występowaniu z nasileniem w okresie jesiennym (3, 12), tj. w czasie zwiększonych predyspozycji do wybuchu bradsotu i odbywających się najczęściej wtedy wykotów stwarzających jednocześnie groźbę szerzenia się u nowo narodzonych jagniąt enterotoksenu (3, 7, 10, 21). Fakty te uzasadniają potrzebę skoordynowanego przeciwdziałania obu tym schorzeniom, głównie metodą zalecaną immunoprofilaktyki czynnej (1, 2, 3). Warunkiem jednak jej wprowadzenia jest uzyskanie immunogennej szczepionki łączącej toksoid epsilon *C. perfringens* D (komponent chroniący przed enterotoksemią) z anatoksyną alfa *C. septicum* (składnik zabezpieczający przed bradsotem).

W związku z powyższym celem niniejszej pracy było opracowanie dwukomponentowej, skojarzonej autoszczepionki (w terminologii autorów Perseptivac) przeciwko jednocześnie enterotoksenu oraz bradsotowi i ocenienie jej właściwości immunogennych poprzez przesłedzenie poziomu stymulowanych antytoksyn (anty epsilon, anty alfa) przy zastosowaniu różnych dawek preparatu, nadto ustalenie czasu utrzymywania się wzbudzonej odporności.

## Materiał i metody

**Autoszczepionka.** Preparat (nazwa tymczasowa Perseptivac) przygotowano z supernatantu trypsynowanej hodowli bakteryjnej w podłożu VF z 0,5% skrobi (szczypty C90, C92 – *C. perfrin-*

*gens* D oraz odwirowanej kultury w pożywce VF z 0,5% glukozy z dodatkiem wątroby (szczypty C91, C93 – *C. septicum*). Uzyskane toksyny letalne (epsilon, alfa), mianowano na myszach, a następnie inaktywowano wprowadzając 0,7% formaliny (detoksykacja w 37°C w ciągu 10 dni). Do uzyskanych anatoksyn wprowadzano adiuwant olejowy Emulsigen w objętości 10%. Sporządzoną w ten sposób autoszczepionkę sprawdzano na jałowosc (wysiewy na pożywkę Zeisslera i Wrzoska, inkubacja w warunkach tlenowych oraz beztlenowych metoda GasPak) i nieszkodliwosc (iniekcja podskórna 4 myszkom dawki 0,5 ml, nadto domięśniowa 2 świnkom morskim dawki 2 ml, czas obserwacji zwierząt 7 – 10 dni).

**Uodpornianie.** Immunizowano owce ciężarne na 3-2 tygodnie przed terminem porodu (dawki 5 ml, 10 ml) oraz 2-3 miesięczne jagnięta pochodzące od nieuodpornionych matek (dawka 2 ml s.c., iniekcja jednokrotna, względnie dwukrotna). Przy dwukrotnych szczepieniach przestrzegano miesięcznego interwału immunizacyjnego.

**Próby.** Po tygodniu od porodu pobierano krew od owiec – matek i ich jagniąt (siarę natomiast między 2 a 4 dniem po wykocie), a poza tym krew od 2-3 miesięcznych jagniąt (10-16 dni od iniekcji preparatu).

Mianowanie antytoksyn. Badanie przeprowadzono odczynem seroneutralizacji (SN). Jako reagenty stosowano surowicę oraz siarę (60 000 obr./min. – 1 godzina). Źródłem toksyny epsilon był supernatant 18 godzinnej hodowli w pożywce VF ze skrobią szczepów C90, C92 (trypsynowanie w pH 7,8 – 8,0 w ciągu 1 godz., dawka enzymu 2 mg/ml, producent – WSS Warszawa). Toksynę alfa *C. septicum* (szczypty C91, C92) uzyskiwano w podłożu VF z 0,5% glukozy (skład pożywki uzupełniony dodatkiem cząstek wątroby). Aktywnosc letalną obu toksyn oznaczano w DLM<sub>100</sub>/ml (dawka dla myszy 0,5 ml, i.p., czas obserwacji zwierząt 24 godziny). Wyniki wyrażono liczbą jednostek antytoksycznych w ml (1 jedn. antyt. = najwyższe rozcieńczenie surowicy, względnie siary, zubożniona po wiązaniu reagentów w 37°C w ciągu 1 godziny – dawkę 1 DLM<sub>100</sub> toksyny).

## Wyniki i omówienie

W przygotowaniu autoszczepionki Perseptivac uwzględniono 2 nadzwyczaj chorobotwórcze szczepy: *C. perfringens* D (miano toksyny epsilon 512 – 1024 DLM<sub>100</sub>/ml), *C. septicum* – 2 izolaty (jad alfa wytwarzany w mianie 8 – 16 DLM<sub>100</sub>/ml). Zostały one wyosobnione w ostatnich latach (od owiec, krowy, źrebęcia), co pozwoliło wymienić wcześniej wyosobnione szczepy własne używane w produkcji monowalentnych szczepionek, a stopniowo tracące toksynogenność (spadek przeciętnie dwukrotny).

Na wstępie przeprowadzonej oceny preparatu sprawdzono zdolność stymulowania nim antytoksyn, przy użyciu różnych dawek (owce – 5, 10 ml), a także stałej dawki (2 ml) podanej jednokrotnie i dwukrotnie 2-3 miesięcznym jagniętom, (tab. 1). Okazało się, że po iniekcji dorosłym owcom 10 ml szczepionki poziom przeciwciał był bardzo wysoki. Przeciętnie

\*) Praca finansowana przez KBN, Nr 505259101.

Tab. 1. Wpływ różnych dawek autoszczepionki Perseptivac na poziom we krwi zwierząt antytoksyny epsilon *C. perfringens* D i alfa *C. septicum*

Gatunek zwierzęcia	Dawka	Antytoksyna epsilon (jedn. antyt./ml)					Antytoksyna alfa (jedn. antyt./ml)				
		4	8	16	32	64	4	8	16	32	64
Owca	10 ml			1	7	5		5	5	2	1
	5 ml		1	3	3		1	4	1	1	
Jagnię	2 ml (1 X)*		2	3			1	2	2		
	2 ml (2 X)**			2	2	1		2	1	2	
Ogółem zwierząt			3	9	12	6	2	13	9	5	1

Objaśnienia: (1 X) \* = iniekcja jednokrotna, (2 X) \*\* = iniekcja dwukrotna.

Tab. 2. Poziom antytoksyny epsilon *C. perfringens* D i alfa *C. septicum* we krwi i siarze zwierząt stymulowany autoszczepionką Perseptivac

Gatunek zwierzęcia	Ogółem zbadanych zwierząt (prób siary*)	Antytoksyna epsilon (jedn. antyt./ml)										Antytoksyna alfa (jedn. antyt./ml)											
		krew					siara					krew					siara						
		4	8	16	32	64	4	8	16	32	64	2	4	8	16	32	64	4	8	16	32	64	
Owca	49 (41*)	11	14	12	7	5	10	13	12	5	1	2	10	15	16	5	1	7	12	12	9	1	
		49%					43,9%					44,9%					53,7%						
Jagnię	50	11	10	9	18	2						2	11	15	18	4							
		40%										44%											
Razem	99 (41*) = 140																						

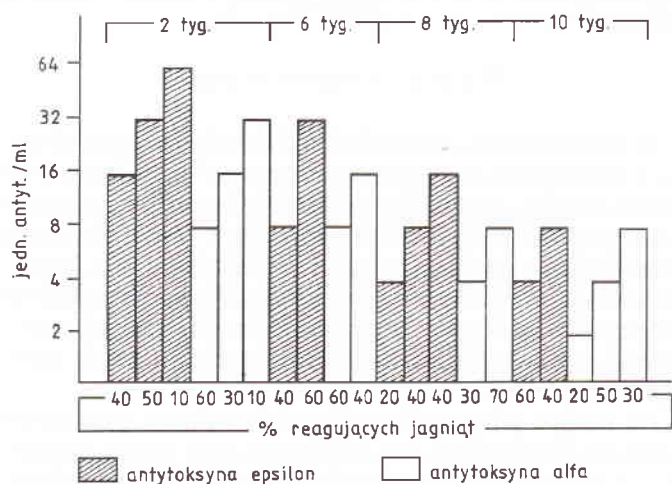
Objaśnienie: \* liczba zbadanych prób siary.

przewyższał dwukrotnie (przeważnie 8-16 jedn. antyt./ml) koncentrację ciał odpornościowych uzyskanych przy dawce 5 ml i osiągał w odniesieniu do antytoksyny epsilon najczęściej 32 – 64 jedn. antyt./ml, a alfa 16 – 64 jedn. antyt./ml. Zatem był on całkowicie porównywalny z aktywnością nadzwyczaj immunogennych monowalentnych szczepionek (Pervac, Closeptivac, wg 4, 6). U jagniąt natomiast koncentracja przeciwciał po jednokrotnej iniekcji preparatu wynosiła dla antytoksyny epsilon i alfa odpowiednio od 8 – 16 jedn. oraz od 4 – 16 jedn. antyt./ml. Poziom odporności wzrastał jednak znacznie w następstwie drugiego podania autoszczepionki osiągając kolejno 16 – 64 jedn. antyt./ml oraz 8 – 32 jedn. antyt./ml. Wyniki te świadczą o potrzebie dwukrotnej immunizacji jagniąt – przy interwale czterotygodniowym – podobnie jak w

przypadku szczepionek zagranicznych (11, 23, 24). Poza tym dowodzą, że dwukomponentowy preparat stymuluje poziom antytoksyn gwarantujących efekt ochronny (zahamowanie zachorowań w stadach dotychczas nękanymi tymi schorzeniami).

Dalsze wyniki rozszerzające naszą wiedzę o koncentracji antytoksyn epsilon i alfa w krwi oraz siarze zwierząt, po podaniu im autoszczepionki Perseptivac, przedstawiono w tab. 2. Na reprezentatywnej liczbie przebadanych prób (ogółem 140) wykazano, że w przypadku wszystkich 49 owiec ciężarnych – uodpornianych na 3 tygodnie przed terminem porodu – poziom przeciwciał wahał się od 4 do 64 jedn. antyt./ml, osiągając przy tym wyjątkowo wysoki wskaźnik anty epsilon oraz anty alfa wynoszący 16 – 64 jedn. antyt./ml aż u 44% – 54% zwierząt. W podobny sposób zareagowało 50 jagniąt 2-3 miesięcznych szczepionych dwukrotnie (wskaźnik 16 – 64 jedn. antyt./ml u 40 – 44% zwierząt). Zatem preparat dwukomponentowy Perseptivac pozwala uzyskać poziom odporności jak przy stosowaniu wcześniej opracowanych szczepionek monowalentnych (4, 5).

Czas utrzymywania się odporności – u dwukrotnie immunizowanych jagniąt – był wyjątkowo długi, w dodatku niejednolity w trakcie jej trwania (ryc. 1). Uzyskiwała ona apogeum w 2-6 tygodni (miano antytoksyn 16 – 64%, 40 – 100% zwierząt) i pozostawała na wysokim poziomie przez dalsze 2 tygodnie (w 8 tyg. miano 8 – 16 jedn. antyt./ml, 40 – 80% jagniąt), aby obniżyć się wyraźnie w 10 tygodniu (2 – 8 jedn. antyt./ml). Wskazuje to, że poziom antytoksyn i czas ich utrzymywania się odpowiada wartościom charakteryzującym monowalentne preparaty własne (4, 6), a także zagraniczne (2, 15, 16, 23, 24). Zatem taka koncentracja przeciwciał zabezpiecza całkowicie jagnięta przed enterotoksemią i bradsetem podczas ich tuczu, jak również chroni owce dorosłe narażone na toksoinfekcję na tle *C. septicum*. Co więcej opracowany



Ryc. 1. Czas utrzymywania się odporności u dwukrotnie immunizowanych jagniąt

dwukomponentowy preparat Perseptivac znacznie przybliży autorów w dążeniach zmierzających do uzyskania w kilkuletniej perspektywie bardziej jeszcze złożonej szczepionki o działaniu uniwersalnym przeciwko praktycznie wszystkim chorobom beztlenowcowym zwierząt (preparat 6 – 7 składnikowy).

#### Piśmiennictwo

1. Blood D. C., Radostits O. M., Henderson J. A.: Veterinary Medicine: a textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses. Bailliere Tindall 1983.
2. Cameron C. M.: Onderstepoort J. vet. Res. 47, 287, 1980.
3. Cygan Z. M.: Choroby beztlenowcowe zwierząt, AR Lublin 1991.
4. Cygan Z.: Medycyna Wet. 46, 365, 1990.
5. Cygan Z., Barcz I., Deptuła D.: Medycyna Wet. 34, 31, 1978.
6. Cygan Z., Buczek J.: Medycyna Wet. 45, 614, 1989.
7. Daube G.: Annales Méd. vét. 136, 5, 1992.
8. Dhein C. R., Gorham J. R.: Vet. Clin. North Am. 16, 227, 1986.
9. Gay C. C., Blood D. C., Wilkinson J. S.: Aust. vet. J. 51, 266, 1975.
10. Griner L. A.: Bull. Off. int. Epizoot. 59, 1443, 1963.
11. Hepple J. R., Chodnik K. S.: Vet. Rec. 71, 201, 1959.
12. Istamatin N., Ungureanu C.: Bull. Off. int. Epizoot. 67, 1251, 1967.
13. Jensen R.: Diseases of sheep, Lea and Febiger, Philadelphia 1974.
14. Katitch R. V.: Les maladies des animaux domestiques causées par les microbes anaerobies. Vigot Frères, Paris 1965.
15. Kerry J. B., Craig G. R.: Vet. Rec. 105, 551, 1979.
16. Odendaal M. W., Visser J. J., Bergh N., Botha W. J.: Onderstepoort J. vet. Res. 56, 251, 1989.
17. Popoff M. R.: Bull. Soc. Vet. Prat. 66, 535, 1982.
18. Popoff M. R.: Rev. Méd. vét. 140, 479, 1989.
19. Smith L. D.S.: The pathogenic anaerobic bacteria. Butterworths, London and Boston 1975.
20. Smith L. D.S.: Rev. Infect. Dis. 1, 245, 1979.
21. Sterne M.: Br. vet. J. 134, 443, 1981.
22. Sterne M., Batty I.: Pathogenic Clostridia. Butterworths, London and Boston 1975.
23. Thompson J. J., Liardet D. M.: N. Z. vet. J. 34, 126, 1966.
24. Thomson A., Batty I.: Vet. Rec. 65, 659, 1958.

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

WOJCIECH KOŚCIŃSKI, MARIA SZELAĞIEWICZ\*, ANDRZEJ CHMIELEWSKI

## Wpływ podawania immunostymulacyjnych dawek levamisolu na ekstensywność inwazji nicieni żołądkowo-jelitowych u bydła

Katedra Położnictwa i Patologii Rozrodu,

\*Katedra Parazytologii i Chorób Inwazyjnych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR-T, 10-722 Olsztyn-Kortowo

### Summary

**The influence of the administration of immunostimulative doses of levamisole on the extensiveness of gastro-intestinal nematodes invasion in cattle**

The study were carried out on 90 breed dairy cows chosen at random and divided into two groups: the control one (K) and the experimental one (D). The animals from the experimental group were injected with immunostimulative doses of 10% levamisole (2,5 mg/kg of body weight) three times before delivery in weekly intervals during a 2-year period from 1991 to 1993. The extensiveness of gastro-intestinal nematodes invasion in all experimental and control cows was investigated by the coproscopic method during the period from October 1992 to September 1993. The extensiveness of invasion was 56% in the experimental group, about 33% lower than in the control group. This difference was unchanged during the whole period of the investigation independently of the observed seasonal changes of gastro-intestinal nematodes invasion in each group.

Levamisol – substancja aktywna preparatu Nilverm należy do grupy związków wykazujących silne działanie na nicienie jak też posiada właściwości immunostymulacyjne, co stwierdzono w odniesieniu do wielu chorób zwierząt, m.in. w leczeniu i profilaktyce zapalen gruczołu mlekowego i macicy u bydła (1, 3, 5, 6, 10). Okazało się także, że profilaktyczne podawanie levamisolu klinicznie zdrowym jałówkom w okresie przejścia z chowu alkierzowego na pastwiskowy (kwiecień-maj) wyraźnie poprawiło ich kondycję, co obserwowali

Sobucki i wsp. (cyt. 3). Okazuje się bowiem, że levamisol wzmacnia odporność zwierząt przed agresją środowiskową (7). Powstaje zatem pytanie, czy dawki immunostymulacyjne tego leku mogą powodować zwiększenie odporności na inwazje pasożytnicze.

W tym celu, korzystając z przeprowadzanych badań immunostymulacyjnego działania levamisolu na przebieg okresu poporodowego u krów mlecznych, sprawdzono jednocześnie przebieg ekstensywności inwazji nicieni żołądkowo-jelitowych.

### Materiał i metody

Badania prowadzono od 1991 do 1993 r., w tym parazytologiczne od października 1992 do września 1993 r. Użyte do badań zwierzęta utrzymywane były w systemie pastwiskowo-alkierzowym. Zimą karmiono je kiszonką z kukurydzy, sianem i paszą treściwą, a latem korzystały z pastwiska.

Utworzono dwie grupy po 45 zwierząt w każdej: pierwsza – doświadczalna (D) otrzymywała 3 razy przed porodem w odstępach tygodniowych, immunostymulacyjne dawki (2,5 mg/kg m.c. i.m.) 10% levamisolu, a druga (K) stanowiła kontrolę.

Od października 1992 do września 1993 r. od wszystkich krów raz w miesiącu pobierano kał z prostonicy, który badano w laboratorium metodą flotacji Fülleborna na obecność nicieni.

### Wyniki i omówienie

Ekstensywność inwazji nicieni żołądkowo-jelitowych u krów otrzymujących levamisol wyniosła średnio 56% i była o 33% niższa niż u kontrolnych. Różnica ta utrzymywała się proporcjonalnie przez cały czas badań (X.92 – IX.93) niezależnie