

# Odpowiedź immunologiczna zwierząt na autoszczepionkę Clovac 5\*

ZYGMUNT CYGAN, JAN BUCZEK\*

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

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

Cygan Z., Buczek J.

## Immunological response of animals against the Clovac 5 autovaccine

### Summary

An analysis has been made of the preparation process of the 5-component Clovac 5 autovaccine and its immunological activity observed in 142 animals (pigs, cattle, sheep, goats and horses) vaccinated twice. The vaccine stimulated a strong immune response, including an antitoxic response (against toxins  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\epsilon$  of *C. perfringens*, *C. septicum*, 4-32 1/2560). The obtained results appeared to be comparable with the mean titer of antibodies noted after vaccination with monovalent vaccines earlier used in veterinary practice (Clopervac, Pervac and Closeptivac). It is worth noting that contrary to current opinion, the immunologic response in goats was generally identical with that in sheep. Only horses who had undergone vaccination developed an allergy disappearing without any treatment after 8-9 days. The authors state that Clovac 5 may be used in the prophylactic of anaerobic bacterial diseases of animals commonly found in Poland.

**Keywords:** autovaccine, immunology.

Choroby beztlenowcowe zwierząt, wywoływane przez toksogenne laseczki *Clostridium sp.*, stanowią znaczący w wielu krajach problem gospodarzy (13, 15, 16, 18-20, 22, 23), w tym także w Polsce (5, 8, 9). Zachorowania mają bowiem ostry przebieg, często nawrotowy (*enterotoxemia recidiva*), będący powodem wysokich strat sięgających 26% (9), a niekiedy nawet 50% stanu stada (4). Niska efektywność działań związanych z eliminacją źródła zakażeń, tj. nosicielstwa toksynotwórczych drobnoustrojów, w dodatku wyjątkowo opornych na środki dezynfekcyjne, wpływa na długie utrzymywanie się zachorowań w stadzie (5, 9, 16). Poza tym gwałtowny rozwój toksoinfekcji poważnie ogranicza skuteczność antybiotykoterapii. Wreszcie likwidację enzootii utrudnia także niemożność przeprowadzenia szybkiej diagnozy, zwykle wymagającej oceny ilościowej, tj. określenia liczby zarazka i koncentracji toksyn w przewodzie pokarmowym (warunki obligatoryjne w rozpoznawaniu klostridioz, wg 16, 23). Dlatego efektywne wygaszanie takich ognisk choroby wiąże się ze stosowaniem immunoprofilaktyki, zwłaszcza czynnej, najczęściej z użyciem wieloważnej szczepionki.

W poprzedniej pracy (8) wskazano na znaczenie etiologiczne występujących w Polsce zachorowań – różnych zwierząt – na tle *C. perfringens* (Cp) A, C i

D, nadto *C. septicum* (Cs) oraz *C. chauvoei*. Jednocześnie dokonano wyboru najbardziej toksynogennych szczepów – powyższych gatunków – w kontekście opracowania 5. komponentowej autoszczepionki. Sprawdzenie natomiast aktywności uodparniającej tego preparatu (tymczasowa nazwa Clovac 5) jest celem poniższych badań.

### Materiał i metody

**Autoszczepionka.** Preparat sporządzono z hodowli toksynogennych szczepów *C. perfringens* A, C i D, nadto *C. septicum* oraz *C. chauvoei*. W przypadku laseczki zgorzeli gazowej serotypu A i C namnażanie prowadzono w pożywce VF z 0,5% glukozy, ale bez dodatku kawałków wątroby (inkubacja 12 godzinna w 37°C). Z kolei anaeroby serotypu D hodowano w podłożu VF z 0,5% skrobi (zmodyfikowana pożywka Duncana-Strong). Natomiast co się tyczy beztlenowców obrzęku złośliwego i szelestnicy to wzrost uzyskiwano w podłożu VF z kawałkami wątroby przy stosowaniu przedłużonej, 24 godzinnej inkubacji w 37°C. Otrzymane w ten sposób hodowle (w przypadku *C. perfringens* D trypsynowane) sprawdzano – po odwirowaniu próbek hodowli – na aktywność letalną dla myszy (warunkiem przydatności szczepionkowej jad alfa Cp i Cs w koncentracji 4-8 DLM<sub>50</sub>/ml, beta 16-32 DLM<sub>50</sub>/ml, epsilon 512-1024 DLM<sub>50</sub>/ml). W celu zobojętnienia toksyn stosowano dodatek 0,6% formaliny (w 37°C przez 14 dni). Łączenie jądów *C. perfringens* alfa, beta i epsilon, nadto *C.*

\*) Praca finansowana przez KBN, grant nr 5PO6K00209.

*septicum* alfa prowadzono w ściśle określonych stosunkach objętościowych. Masę bakteryjną *C. chauvoei* stanowił odwirowany osad komórkowy z 48 godzinnej hodowli w podłożu Wrzoska (inaktywacja dodatkiem 0,6% formaliny w 37°C w ciągu 2 tygodni). Na koniec wprowadzano adjuwant olejowy (Emulsigen, USA). Przygotowaną autoszczepionkę Clovac 5 kontrolowano na jałowość (wysiewy na podłożu Wrzoska i Zeisslera, inkubacja w atmosferze tlenowej i beztlenowej metodą GasPak), a także na nieszkodliwość (podskórna inokulacja dawki 0,5 ml myszom i domięśniowa w objętości 1-1,5 ml świnkom morskim).

**Badane próby.** Właściwości uodparniające preparatu sprawdzano – poprzez iniekcje podskórne – na jałówkach i maciorach (dawka 10 ml), owcach (5 ml), kozach (3 ml) oraz koniach (2 i 5 ml). Szczepionkę podawano jednokrotnie i dwukrotnie (odstęp między iniekcjami 2 tygodnie). Krew pobierano po 14 dniach od ostatniego uodpornienia. W przypadku porównywania aktywności immunogennej szczepionki Clopervac przestrzegano zaleceń producenta (Biowet Drwalew).

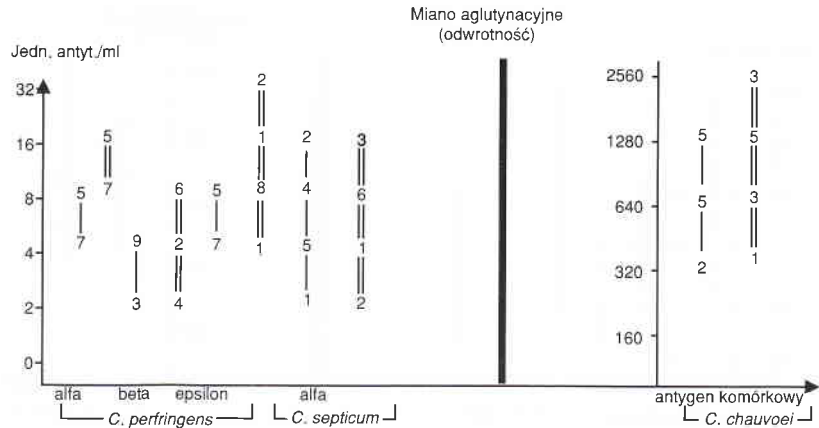
**Oznaczanie antytoksyn.** Badanie przeprowadzono stosując odczyn seroneutralizacji SN (wirowanie krwi przy 3000 obr./min. – 15 minut, źródłem toksyn odwirowane hodowle *C. perfringens* A, C, D (w przypadku serotypu D trypsynowane), nadto *C. septicum* w pożywce VF (czas wiązania reagentów w 37°C – 1 godzina). Stopień uodpornienia zwierząt wyrażano liczbą jednostek antytoksylicznych zawartych w 1 ml krwi (1 jedn. antyt. = najwyższe rozcieńczenie surowicy zobojętniające 1 DLM<sub>50</sub> toksyny dla myszy).

**Określanie miana aglutynin.** Badanie przeprowadzono w sposób rutynowy odczynem aglutynacji próbówkowej (antygen: odwirowana, inaktywowana formaliną hodowla szczepu *C. chauvoei*, ściślej osad z komórek bakteryjnych zawieszonych w płynie fizjologicznym; inkubacja reagentów w 37°C – 18 godzin).

**Kontrola obecności naturalnych przeciwciał.** W tym celu pobierano krew każdorazowo od 2-3 zwierząt nieuodpornianych, z każdej grupy doświadczalnej, u których oznaczano poziom przeciwciał.

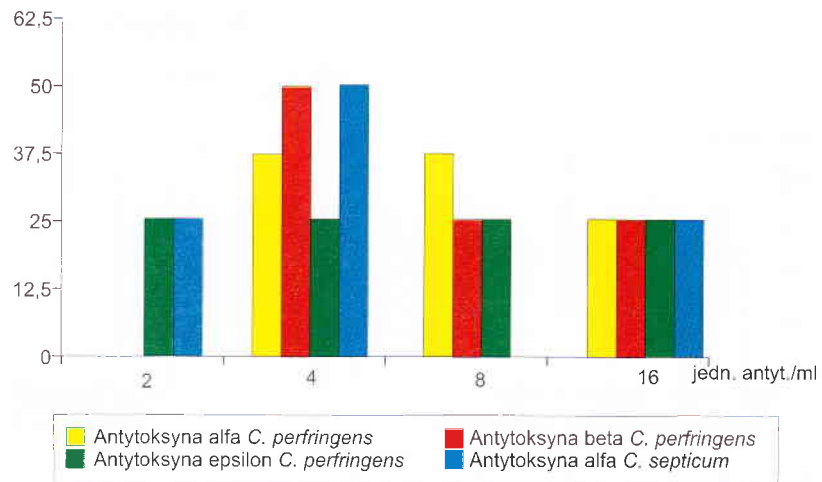
**Wyniki i omówienie**

Odpowiedź immunologiczną na iniekcję autoszczepionki Clovac 5 przebadano u 142 zwierząt, w tym u 12 jałówek, 68 macior, 48 owiec, 12 kóz i 2 koni, od których pobrano łącznie 284 prób krwi przeprowadzając 1420 oznaczeń poszczególnych przeciwciał antybakteryjnych (zwierzęta z 10 gospodarstw). Określano zatem poziom stymulowanych antytoksyn przeciw toksoidom alfa, beta i epsilon *C. perfringens* oraz alfa *C. septicum*, nadto wysokość miana aglutynin wzbudzonych antygenem komórkowym *C. chauvoei*. Wyniki tych badań przedstawiają kolejne ryciny 1-5. Kontrolowane jednocześnie próby krwi pochodzące od nieszczepionych zwierząt nie wykazały u nich obec-

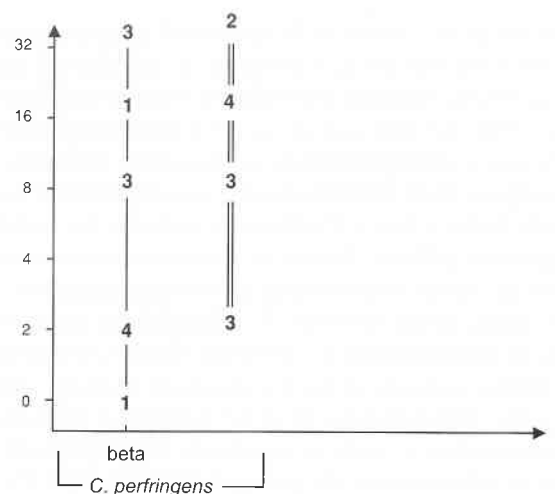


**Ryc. 1. Poziom stymulowanych przeciwciał u bydła**

Objaśnienia: – immunizacja jednokrotna, = immunizacja dwukrotna; oznaczenia cyfrowe – liczba zwierząt



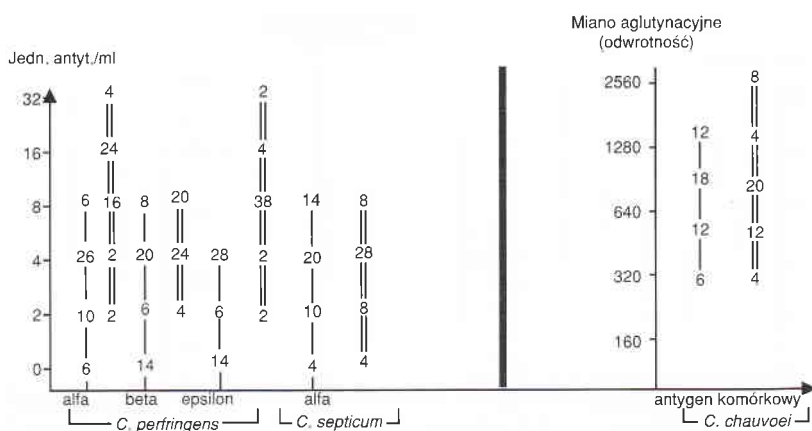
**Ryc. 2. Procent reagujących macior przy poszczególnych poziomach antytoksyn**



**Ryc. 3. Poziom przeciwciał u macior stymulowanych toksyną beta Cp**

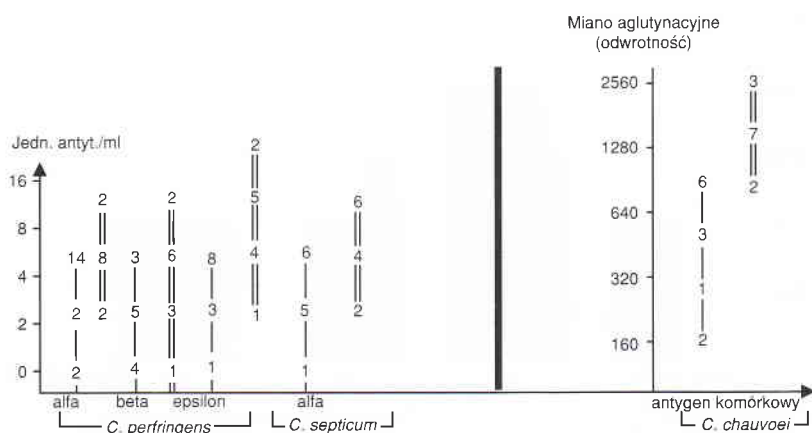
Objaśnienia: jak w ryc. 1.

ności naturalnych antytoksyn (<1 jedn./ml), a poziom aglutynin przeciwko antygenowi *C. chauvoei* był również niski (miano poniżej 1/20).



Ryc. 4. Poziom stymulowanych przeciwciał u owiec

Objaśnienia: jak w ryc. 1.



Ryc. 5. Poziom stymulowanych przeciwciał u kóz

Objaśnienia: jak w ryc. 1.

Poziom przeciwciał wzbudzonych preparatem Clovac 5 wykazywał zróżnicowanie, tj. zależał od gatunku zwierzęcia, rodzaju antytoksyn i liczby iniekcji preparatu. Jednokrotne już podanie autoszczepionki powodowało u zdecydowanej większości zwierząt wyraźną odpowiedź immunologiczną (najsłabsza wobec toksoidu beta u kóz). Podkreślić należy, że najsilniej zareagowały jałowki, bowiem stosunkowo wysoką odpornością charakteryzowaną zakresem przeciwciał od 2 do 32 jedn. antyt./ml (ryc. 1). Najwyższą jednak koncentrację stwierdzono w stosunku do antytoksyny epsilon, która zwłaszcza po dwukrotnej iniekcji, sięgała 8-32 jedn. antyt./ml (u 11 z 12 jałówek). Niższa, ale porównywalna w tych warunkach, reaktywność wystąpiła w odniesieniu do antygenów alfa Cp i Cs (poziom przeciwciał najczęściej 4-16 jedn. antyt./ml). Natomiast najsłabiej wyrażona była odpowiedź immunologiczna manifestująca antytoksynę beta (4-8 jedn. antyt./ml, ryc. 1). Z kolei uzyskane miano aglutynin przeciwko antygenowi *C. chauvoei*, po końcowej immunizacji, przeważnie charakteryzowały wartości od 1/640 do 1/2560 (u 11 z 12 jałówek).

Zatem można uznać, że autoszczepionka Clovac 5 indukuje u bydła, szczególnie po 2-krotnej iniekcji,

wysoki poziom przeciwciał przeciwko wszystkim pięciu antygenom tego preparatu. Wzbudzoną odpowiedź antytoksyczną można porównać ze stymulacją preparatami jedno/dwuskładnikowymi (10, 11), a w odniesieniu do aglutynin *C. chauvoei* uzyskiwano ich koncentrację zdecydowanie przekraczającą wysokość miana ochronnego (ponad 1/500, wg 16, 17).

Indukowany u macior – podaniem szczepionki Clovac 5 – poziom przeciwciał ilustruje ryc. 2. Wynika z niej, że dwukrotna immunizacja powodowała znaczący wzrost antytoksyn (2-16 jedn. antyt./ml). Wskaźnik uodpornienia macior, charakteryzowany różną zawartością antytoksyn, osiągał przy poziomie przeciwciał anty alfa 8 jedn. antyt./ml – 37,5% i beta 4-8 jedn. – 50% (ryc. 2). Co więcej, 25% zwierząt reagowało wzrostem wszystkich antytoksyn Cp (przeciwko alfa, beta, epsilon) przy wysokiej ich koncentracji wynoszącej 16 jedn. antyt./ml (ryc. 2). Zatem autoszczepionka Clovac 5 zapewniała większości macior odporność przeciwko beztlenowcowym toksoinfekcjom prosiąt, w tym na tle *C. perfringens* A, C, tj. chorobom najczęściej spotykanym u trzody chlewnej (12, 16, 22). Analizowany porównawczo wzrost antytoksyny beta Cp łatwo osiągał poziom przeciwciał stymulowanych jednoskładnikową szczepionką Clopervac produkcji Biowet-Drwalew (wg 6, po dwukrotnej iniekcji preparatu niemal regułą wartość 4-32 jedn. antyt./ml, ryc. 3).

Uodpornione dwukrotnie owce i kozy reagowały w większości przypadków podobnym wzrostem przeciwciał, zaledwie nieco wyższym u tych pierwszych (2-32 jedn. antyt./ml, ryc. 4) niż drugich zwierząt (2-16 jedn. antyt./ml, ryc. 5). Stosunkowo najsłabszą odpowiedź immunologiczną stwierdzono – u wspomnianych przeżuwaczy – na antytoksynę beta Cp (kozy do 8 jedn. antyt./ml, ryc. 5). Ostatecznie jednak nie potwierdzono obserwacji Greena i wsp. (14) sugerujących znaczną trudność w osiągnięciu odporności antytoksycznej u kóz. Niekorzystnym przejawem przedstawionych przez tych autorów szczepień było pojawienie się w ich miejscu znacznego obrzęku (średnica 2-3 cm), co więcej długo nie ustępującego (obecny jeszcze w 28 dniu po iniekcji). Natomiast takich odczynów nie rejestrowano nigdy w badaniach własnych, w dodatku niezależnie od gatunku uodpornianego zwierzęcia. Wspomnieć należy, że najsilniejszą odpowiedź immunologiczną uzyskano u 75%-90% owiec oraz 65%-90% kóz wobec antytoksyn alfa i epsilon *C. perfringens*, a także alfa *C. septicum* (regułą koncentracja w zakresie 4-32 jedn. antyt./ml). Posiada to praktyczne znaczenie, bowiem toksoinfekcje wywołane działaniem szczególnie toksyny epsilon (serotyp D) najczęściej występują u tych przeżuwaczy (1, 5, 21, 22, 25). Zatem stymulowana – podaniem dwu-



Ryc. 6. Zmiany uczuleniowe (2. dzień)



Ryc. 7. Ustąpienie zmian uczuleniowych (9. dzień)

krotnym preparatu Clovac 5 – koncentracja antyjadowi epsilon Cp (z reguły 8-32 jedn. antyt./ml osiągała średni poziom odporności indukowanej monowalentną autoszczepionką Perfrinvac (wg 7, w obecnej terminologii Pervac). Natomiast co się tyczy antytoksyny alfa *C. septicum* to u owiec dochodziła ona nawet do górnej granicy odporności stymulowanej podaniem monowalentnej szczepionki Closeptivac, bardzo skutecznej w profilaktyce bradsotu (4).

Również obydwa uodparniane konie – mimo użycia stosunkowo małych dawek (5 ml, 2 ml) – reagowały wzrostem antytoksyn i aglutynin (odpowiednio 4 jedn. antyt./ml, miano aglutynacyjne 1/640). W tych jednak przypadkach występowały miejscowe objawy uczuleniowe (ryc. 6), jednak ustępujące bez leczenia w ciągu 8-9 dni (ryc. 7). Niemniej fakt ten ogranicza zastosowalność preparatu Clovac 5 jedynie do sytuacji wyjątkowych.

Konfrontując powyższe wyniki z wcześniej opublikowanymi danymi należy stwierdzić, że autoszczepionka Clovac 5 wzbudza, zwłaszcza po dwukrotnej iniekcji, dostatecznie wysoką koncentrację antytoksyn porównywalną z ich średnim poziomem występującym po podaniu preparatów monowalentnych (przykładem Closeptivac wg 4, Clopervac wg 6) i dwukomponentowych (Dipervac wg 10, Perseptivac wg 11).

Wreszcie oddzielnego omówienia wymaga wysokość stymulowanego miana aglutynin przeciwko antygenowi *C. chauvoei*. Osiągnęło ono, po jednokrotnej iniekcji, a niezależnie od gatunku zwierzęcia, przeważnie poziom 1/320-1/640 (szczyt 1/1280). Natomiast po dwukrotnym podaniu regułą była wartość ponad 1/640 (apogeum 1/2560). Zatem były to miana wysokie mogące zapewnić efekt ochronny, zwykle łączony z poziomem przeciwciał co najmniej 1/500 (wg 16, 17). Jest on warunkowany, zdaniem wielu autorów, przez aglutyniny przeciwmórkowe (2, 3, 17, 24), aczkolwiek mechanizm tych oddziaływań nie został ostatecznie wyjaśniony (3).

### Wnioski

1. Pięcioskładnikowa autoszczepionka Clovac 5 stymuluje u różnych zwierząt (głównie bydło, świnie, owce, kozy) odpowiedź immunologiczną przeciwko

wszystkim najczęściej występującym w kraju chorobom beztlenowcowym, tj. wywoływanych przez *C. perfringens* A, C i D, *C. septicum* oraz *C. chauvoei*.

2. Stwierdzona, w zasadzie podobna, reaktywność immunologiczna u badanych małych przeżuwaczy nie potwierdza panującego poglądu o trudności uzyskania u kóz odpowiedzi immunologicznej na anatoksyny beztlenowcowe.

3. Preparat Clovac 5 powinien znaleźć zastosowanie w weterynaryjnej profilaktyce chorób beztlenowcowych, zwłaszcza przy braku możliwości stawiania szybkiej diagnozy niezbędnej w stosowaniu specyficznych, monowalentnych preparatów, ostatnio wykorzystywanych w praktyce weterynaryjnej (Clopervac, Pervac, Closeptivac).

### Piśmiennictwo

1. Blackwell T. E., Butler D. G.: J. Am. vet. med. Ass. 200, 214, 1992.
2. Chandler H. M., Gulasekharan J.: J. gen. Microbiol. 84, 128, 1974.
3. Cortinas T. J., Micalizzi B., Guzman A. M.: J. appl. Bact. 77, 382, 1994.
4. Cygan Z.: Medycyna Wet. 46, 6, 1990.
5. Cygan Z.: Choroby beztlenowcowe zwierząt. Wyd. Akademii Rolniczej, Lublin, 1991.
6. Cygan Z., Buczek J.: Medycyna Wet. 44, 586, 1988.
7. Cygan Z., Buczek J.: Medycyna Wet. 45, 614, 1989.
8. Cygan Z., Buczek J.: Medycyna Wet. 49, 469, 1993.
9. Cygan Z., Buczek J.: Medycyna Wet. 50, 548, 1994.
10. Cygan Z., Buczek J.: Medycyna Wet. 51, 475, 1995.
11. Cygan Z., Buczek J.: Medycyna Wet. 53, 464, 1997.
12. Cygan Z., Tereszczuk S., Pejsak Z., Tarasiuk K., Chwesiuk W., Tomaszewska M.: Medycyna wet. 42, 583, 1986.
13. Daube G.: Annl. Méd. vét. 136, 5, 1992.
14. Green D. S., Grees M. J., Hillyer M. H., Morgan K. L.: Vet. Rec. 120, 435, 1987.
15. Hatheway Ch. L.: Microbiol. Rev. 54, 66, 1990.
16. Johnson S., Gerding D. N.: Enterotoxemic infections. W: The Clostridia: molecular biology and pathogenesis. (wyd.) J. L. Rood, B. A. McClane, J. G. Songer, R. W. Titball, Academic Press, San Diego, 1997.
17. Macheak M. E., Claus K. D., Maloy S. E.: Am. J. vet. Res. 33, 1053, 1972.
18. Manteca Ch., Daube G.: Annl. Méd. vét. 138, 155, 1994.
19. Popoff M. R.: Revue Méd. vét. 140, 479, 1989.
20. Radostits O. M., Blood D. C., Gay C. C.: Veterinary Medicine. Bailliere Tindall, London, 1994.
21. Smith M. C., Sherman D. M.: Goat medicine, Lea and Febiger, Pensylwania 1994.
22. Songer J. G.: Clostridial diseases of animals. W: The Clostridia: molecular biology and pathogenesis. (wyd.) J. L. Rood, B. A. McClane, J. G. Songer, B. W. Titball, Academic Press, San Diego, 1997.
23. Sterne M.: Br. vet. J. 137, 444, 1981.
24. Tamura Y., Tanaka S.: Infect. Immun. 43, 632, 1984.
25. Uzal F. A., Kelly W. R.: J. comp. Path. 116, 63, 1997.

Adres autora: prof. dr hab. Zygmunt Cygan, ul. Żelazowej Woli 6/13, 20-853 Lublin