

# MEDYCYNA WETERYNARYJNA

ORGAN POLSKIEGO TOWARZYSTWA NAUK WETERYNARYJNYCH

CZASOPISMO POŚWIĘCONE NAUCE I PRAKTYCE WETERYNARYJNEJ  
ZAŁOŻONE W 1945 R. PRZEZ WYDZIAŁ WETERYNARYJNY W LUBLINIE

## REDAKCJA

Redaktor naczelny: prof. dr Edmund PROST

Członkowie Komitetu Redakcyjnego: prof. dr Ryszard BADURA, prof. dr Jerzy MAZURCZAK,  
prof. dr Abdon STRYSZAK, prof. dr Stanisław WOŁOSZYN

Sekretarz naukowy: dr Elżbieta PEŁCZYŃSKA

## RADA PROGRAMOWA

Dr Anatol BACHAREWICZ, prof. dr Henryk BALBIERZ, prof. dr Władysław BIELAŃSKI, prof. dr Stanisław CAKAŁA, prof. dr Zygmunt EWY, doc. dr Stefan JAKUBOWSKI, prof. dr Lech JĄSKOWSKI, prof. dr Stefan KOSSAKOWSKI, prof. dr Zdzisław LARSKI, dyr. dr Henryk LIS, doc. dr Władysław LUTYŃSKI, prof. dr Edward PINKIEWICZ, prof. dr Zbigniew SAMBORSKI, prof. dr Wiktor STEFANIAK, prof. dr Eustachy SZELIGOWSKI, doc. dr Krzysztof ŚWIEŻYŃSKI, prof. dr Marian TRUSZCZYŃSKI, prof. dr Janusz WELENTO, prof. dr Eugeniusz ŻARNOWSKI

## HIGIENA ŻYWNOŚCI ZWIERZĘCEGO POCHODZENIA

ZYGMUNT CYGAN, EDMUND PROST

### *Cl. perfringens* jako czynnik zatruc pokarmowych człowieka

Z Zakładu Higieny Weterynaryjnej w Lublinie  
Z Instytutu Higieny Żywności Zwierzęcego Pochodzenia Wydziału Weterynaryjnego AR w Lublinie

Beztlenowce *Cl. perfringens*, obok drobnoustrojów z rodzaju *Salmonella* i *Staphylococcus*, stanowią jeden z najczęstszych czynników bakteryjnych w zatruciach pokarmowych człowieka (18, 20, 53, 54, 66). Według oceny Hobbs (54) laseczki *Cl. perfringens* wywołują w Anglii aż 25% tych zachorowań. Również Vernon i Tilett (109) donieśli, że w okresie od 1969 do 1974 r. zarejestrowano w Anglii i Walii prawie 200 ognisk chorobowych, stanowiących 20,4% wszystkich przypadków zatruc pokarmowych. W Kalifornii Kemp i wsp. (59) określili wskaźnik występowania odnośnego schorzenia na 21,6%. Podobnie Riemann (83) podał, że w USA częstotliwość zatruc pokarmowych tej etiologii wynosi 12—18%. Natomiast według starszych danych Boyda i wsp. (8) beztlenowce *Cl. perfringens* mają być przyczyną zachorowań człowieka w 40—45%. Podkreślić przy tym należy, że powyższe schorzenia nie posiadają cech czystych intoksykacji, lecz raczej typowych toksoinfekcji przebiegających przy typie A z objawami „*enteritis acuta*” (40, 53, 54), a w przypadku serotypu C jako „*enteritis necroticans*” (28, 72, 73, 114). Pod tym względem przypominają występujące u zwierząt enterotoksemie.

Przeprowadzone w ostatnich latach badania pozwoliły lepiej poznać nie tylko podstawowe właściwości zarazka, ale także zagadnienie sporogenezy i enterotoksynogenezy, ponadto właściwości wytwarzanych enterotoksyn A, C i D oraz innych czynników chorobotwórczych, a także mechanizm ich działania. Przedstawienie tej problematyki jest celem niniejszego artykułu.

#### Podstawowe właściwości zarazka

Laseczki *Cl. perfringens* tworzą 5 odrębnych typów toksycznych A, B, C, D i E (98), jednak znaczenie etiologiczne w zatruciach pokarmowych posiadają tylko enterotoksynogenne szczepy głównie serotypu A (20, 52), a niekiedy C (28). W obrębie typu A wyróżnia się bakterie ciepłooporne dające hemolizę alfa (54) oraz ciepło-wrażliwe z hemolizą beta (40). Luźno związane wielocukry otoczkowe posiadają znaczenie w serologicznej klasyfikacji tych beztlenowców (3, 14, 63). Początkowo Hobbs i wsp. (54) wykazali tylko 13 odrębnych serotypów aglutynacyjnych, ale ostatnio Hughes i wsp. (57) w oparciu o antygeny otoczkowe określili ich liczbę na 45. Na podkreślenie zasługuje pokrewieństwo antygenowe laseczek pochodzących z przypadków zatruc pokarmowych i zgorzeli ga-

zowej. Wydaje się przy tym, że niektóre serotypy jak np. 3/4, 11 i 25 są szczególnie często spotykane w toksoinfekcjach pokarmowych.

Baine i Cherniak (3) donieśli, że otoczka laseczek serotypu 5 Hobbs posiada wielocukier złożony z glukozy, galaktozy, mannozy, glukozaminy, galaktozaminy i kwasu glukuronowego w proporcji molarnej 1,2:1,2:1,2:2:2:2,6. Natomiast Cherniak i Frederick (13) stwierdzili w składzie otoczki serotypu 9 Hobbs przede wszystkim glukozę, galaktozę i glukozaminę w stosunku molarnym 1:1,6:1,1, a ponadto kwas uronowy i ślady rybozy.

Namnażanie odnośnych beztlenowców w podłożach wymaga 11—14 aminokwasów oraz 5—6 dodatkowych czynników wzrostowych (10, 32). Zdaniem Muhammeda i wsp. (71) najaktywniej stymulują wzrost zarazka alanina, kwas asparaginowy i metionina, a ponadto glukoza. Natomiast kwas mlekowy i mrówkowy nie są wykorzystywane, co wskazuje, że rozwój laseczek *Cl. perfringens* nie przebiega poprzez cykl kwasów trójkarboksylowych. Białka sojowe na ogół sprzyjają namnażaniu się komórek, podczas gdy kazeinian sodu z reguły działa inhibicyjnie (11).

Optymalna temperatura wzrostu *Cl. perfringens* wynosi 45°C (16, 96). W tych warunkach czas powstawania jednej generacji tych bakterii wynosi zaledwie 10 minut (33). Świadczy to o niezwykłej aktywności metabolicznej zarazka. Również zakres temperatur i pH w jakich zachodzi namnażanie się laseczek jest wyjątkowo szeroki i waha się w granicach 18,5°C—50°C i wartości pH 5—9 (33, 104). W temperaturze 50—51°C ginie już większość komórek wsiewanego „inoculum”. Jednak niektóre spośród nich przeżywają, dając początek nowym populacjom *Cl. perfringens*. Jest to w terminologii Collee i wsp. (16) tzw. „fenomen Feniksa” („Phoenix phenomenon”), tłumaczony przez Shoemakera i Piersona (90) termiczną destrukcją większości bakterii.

Przetrzymywanie hodowli w warunkach różnych temperatur wpływa na liczbę przeżywających komórek. Na podkreślenie zasługuje, że w odniesieniu do spor (przetrwalników) procesy ich destrukcji zachodzą zwykle wolniej w temperaturze —20°C niż w —5°C (4). Jednocześnie zwraca uwagę szkodliwość temperatur dodatnich. Jak podają Strong i wsp. (100) przechowywanie hodowli przez 10 dni w 5°C bardziej redukowało liczbę laseczek i przetrwalników aniżeli przy działaniu —17,7°C.

W aspekcie zatruc pokarmowych ważne wydają się być dane odnośnie wrażliwości zarazka na kwasowość. W tym względzie podnosi się rolę wieku hodowli. Laseczki pochodzące z fazy logarytmicznego wzrostu są zwykle najłatwiej niszczone przez normalną kwasowość w żołądku człowieka (33).

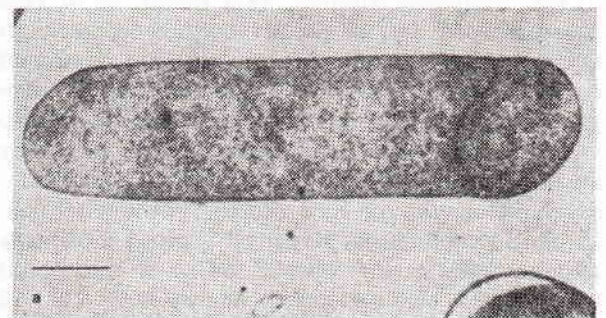
Drobnoustrój produkuje ponadtlenkową dysmutazę i jest mało wrażliwy na działanie tlenu oraz produktów jego redukcji (39). Rośnie już w podłożach o potencjale oksydo-redukcyjnym od  $E_h = +31$  mV w pH 7,7 do  $E_h = +230$  mV w pH 6. Za najoptymalniejszą dla niego wartość potencjału oksydo-redukcyjnego w podłożu przyjmuje się  $E_h = -200$  mV. Jednak i w tych warunkach rozwój *Cl. perfringens* jest częściowo determinowany jeszcze przez pH, wielkość „inoculum” i stan metaboliczny znajdujących się w nim bakterii.

Wspomnieć też trzeba o wrażliwości laseczek *Cl. perfringens* na działanie NaCl i NaNO<sub>2</sub>. Co się tyczy chlorku sodu, to efekt inhibicyjny zależy od użytej koncentracji soli oraz temperatury inkubacji hodowli (96). Ponadto zakłada się większą w tym względzie oporność szczepów ziemnych niż kałowych (6). Zdaniem Smitha (96) minimalne stężenie NaCl hamujące w 20°C wzrost większości szczepów wynosi od 2 do 4%, a w 37°C od 4 do 5%. Podkreślić przy tym należy, że słaby rozwój nielicznych szczepów zaznacza się jeszcze przy zawartości w podłożu 8% NaCl (37). Natomiast dodatek 10% chlorku sodu wstrzymuje już całkowicie namnażanie się zarazka i kiełkowanie spor (37). Na uwagę przy tym zasługuje, że wyższa koncentracja soli decyduje o niższym dla inicjacji wzrostu beztlenowca  $E_h$  (70).

Odnośnie mechanizmu aktywności inhibicyjnej NaNO<sub>2</sub>, to polega on na blokowaniu podziału komórek bakteryjnych i oddziaływaniu na proces kiełkowania przetrwalników. Labbe i Duncan (62) wykazali, że stężenie 0,01—0,02% NaNO<sub>2</sub> hamuje w podłożu kiełkowanie termicznie uszkodzonych spor, a koncentracja 0,02—0,04% w podobny sposób wpływa na nieuszkodzone przetrwalniki. Jednak w produktach mięsnych związek ten zatracza aktywność inhibicyjną (58). Zaskakujące przy tym są sugestie, że wyższe zawartości azotynów mogą nawet stymulować kiełkowanie (62).

### Sporogeneza

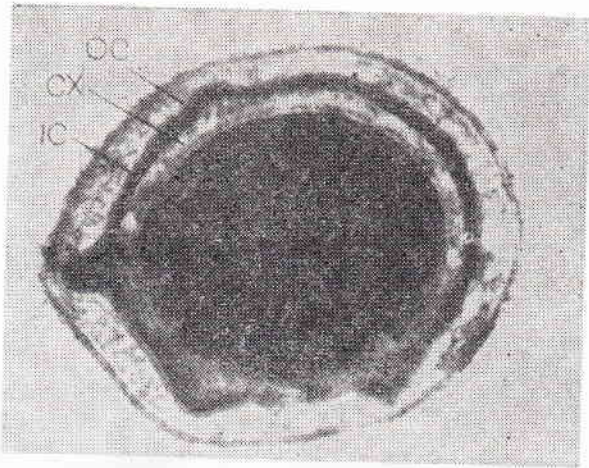
Laseczki *Cl. perfringens* wytwarzają przetrwalniki tylko w specjalnych warunkach i to z dużą trudnością. Roberts (84) sądzi, że łatwiej sporulują szczepy zgorzeli gazowej niż zatruc pokarmowych, podczas gdy Rymkiewicz (85)



Ryc. 1. Powstawanie przegrody „septum” w laseczce *Cl. perfringens* A (wg 21)

wyklucza taką zależność. Natomiast zgodnie przyjmuje się, że proces sporulacji aktywniej przebiega w przewodzie pokarmowym (33), a słabiej w mięsnych produktach (4, 60). Wykazano bowiem, że w przebiegu zatruc koncentracja spor w jelitach osiąga  $4,6 \times 10^7/g$  (95), a w konserwach doświadczalnie zakażonych szczepem BP6K —  $8,7 \times 10^5/g$  (17).

Wytwarzane spory są owalne i z reguły położone subterminalnie, a tylko wyjątkowo na biegunach (96). Jednym z wstępnych sygnałów powstawania przetrwalnika jest odcięcie części cytoplazmy z chromatyną przez tworzącą się przegrodę tzw. „septum” (ryc. 1). Wielowarstwową strukturę dojrzałego przetrwalnika z 6—7 godzinnej hodowli *Cl. perfringens* w syntetycznym podłożu według Serczyńskiej i Meisel — Mikołajczyk (89) przedstawia kolejna ryc. 2.



Ryc. 2. Struktura przetrwalnika z syntetycznego podłoża (wg 89); IC = osłonka wewnętrzna, CX = warstwa korowa, OC = osłonka zewnętrzna

Wytwarzane spory charakteryzuje znaczna lecz zróżnicowana oporność na ogrzewanie. Zgodnie z Hobbs i wsp. (54) szczepy niehemolityczne, pochodzące z przypadków zatruc pokarmowych, przeżywają w podłożu bulionowo-mięsny („cooked meat medium”) ogrzewanie w  $100^\circ C$  przez 1 godzinę, podczas gdy tzw. „klasyczne” szczepy tj. beta hemolityczne giną w tych warunkach w ciągu kilku minut. Określony dla nich czas śmierci termicznej w  $90^\circ C$  (dla 90% populacji bakteryjnej) tj. tzw. współczynnik  $D_{90^\circ C}$  wynosi od 3 do 145 minut (84). Szczepy zgorzeli gazowej charakteryzuje  $D_{90^\circ C} = 3$  minuty, a zatruc pokarmowych  $D_{90^\circ C} = 145$  minut. Na uwagę zasługuje przeżywalność w  $100^\circ C$  niektórych sporulujących hodowli szczepów A przez 1—8 godzin, a kultur C w ciągu 1—4 godzin (84, 112).

Wrażliwość termiczną spor określają nie tylko bliżej nieznanne ich właściwości strukturalne, ale także dawka „inoculum” i skład ogrzewanego podłoża. Zdaniem Collee i wsp. (16) nawet 8 godzinne gotowanie niektórych hodowli za-

wierających ogółem  $10^6$  przetrwalników w podłożu CMM nie doprowadza do całkowitego wyjałowienia. Natomiast czas przeżycia spor przy dawce  $1,5 \times 10^3$  wynosił w tych warunkach 4 godziny, a w środowisku wody destylowanej 50 minut.

Ogrzewanie przetrwalników prowadzi do ich częściowej lub całkowitej destrukcji. Dlatego problemem diagnostycznym staje się wykrywanie takich częściowo uszkodzonych spor. Adams (1) opracował w tym celu specjalną metodykę z użyciem jako stymulatorów kiełkowania preparatu EDTA (10 mM) i lizozymu (1  $\mu g/ml$ ). Bradshaw i wsp. (9) stosując tę metodykę określili współczynniki  $D_{98,9^\circ C}$  dla szczepów NCTC 8798 i NCTC 10240, które w przypadku podłoża TYCS z lizozymem kolejno wynosiły 18 i 20 minut, a w TYCS bez lizozymu 12,5 oraz 15 minut.

Uwarunkowane genetycznie właściwości zarazka do tworzenia przetrwalników podlegają indukcji przez liczne stymulatory. Spośród nich jako związki białkowe wymienia się różne peptony (15, 22, 29, 80), preparaty typu Trypticase (15) i Casamino Acids (2, 60) oraz ekstrakty drożdżowe (22, 29), a z węglowodanów skrobię (22, 29) i dekstrynę (86). Wytwarzanie spor wzmagają także niektóre aminokwasy jak tyamina (101), arginina (81) i kwas glutaminowy (101), a ponadto tioglikolan sodu (22, 60, 101), agar (15), jony Mg (29) i Mn (15), a także metyloksantyny (86). Natomiast zgodnie z Hardwickiem i wsp. (41) inhibycyjnie działają jony Ca, a zwłaszcza występujące często w peptonach nasycone kwasy tłuszczowe jak np. kapronowy (C10), laurynowy (C12) i myrystynowy (C14).

Normalnie dodatek glukozy, poprzez szybkie obniżanie pH, działa represyjnie na produkcję przetrwalników (29, 102). Jednak obecność glukozy w dwufazowym podłożu Clifforda i Anelisa (15) stymuluje wytwarzanie spor osiągających wysoką koncentrację  $1,9 \times 10^8/ml$ . Natomiast w pozbawionej glukozy pożywce Dunca i Strong (22) liczba przetrwalników tworzonych przez te same szczepy dochodziła do  $6,5 \times 10^5/ml$ , a w podłożu Hala i wsp. (40) osiągała stężenie  $4,7 \times 10^5/ml$ .

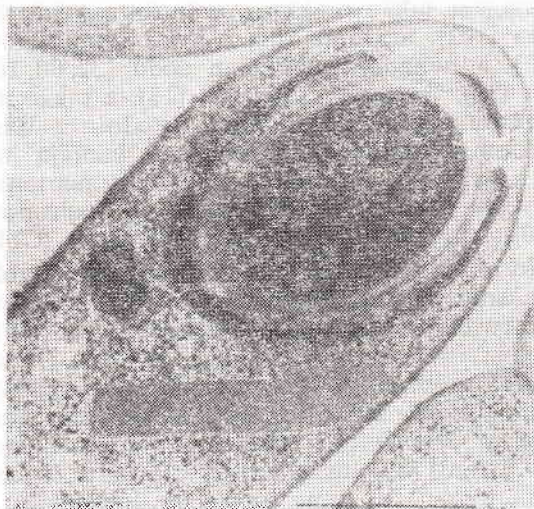
Podkreślić należy, że tylko pewne gatunki peptonu aktywują sporulację laseczek *Cl. perfringens*. Według Nishidy i wsp. (80) dodatek do pożywek płynnych 2% peptonu „Popi” silnie wzmagal wytwarzanie spor szczepów typu A i C, a słabo pod tym względem oddziaływał na aktywność szczepów typu D. Rola wprowadzanego do podłoża płynnych 0,1% agaru polega na zwiększaniu ich lepkości oraz dostarczeniu tą drogą stymulujących sporulację jonów Mg i Mn. Szerzej omawiany przez Lunda (65) oraz Kima i wsp. (60) indukujący powstawanie przetrwalników wpływ tioglikolanu sodu ma polegać głównie na obniżaniu potencjału oksydo-redukcyjnego. Natomiast metyloksantyny tj. 1,3 — dwumetyloksantyna (teofilina) oraz 1, 3, 7 —

trójmetyloksantyna (kofeina) w koncentracjach 100—1000  $\mu\text{g/ml}$  aktywują sporulację poprzez wpływ chelatujący (103) oraz inhibicję procesu kiełkowania (12).

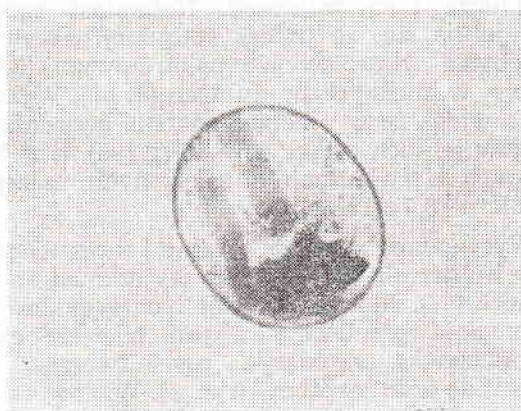
Porównawcza ocena podłoży do wytwarzania przetrwalników jest trudna do przeprowadzenia. Badania Duncana i Strong (22) oraz Clifforda i Anellisa (15) wskazują na duże różnice wynikające z właściwości poszczególnych szczepów. Liczba spor w pożywce Duncana i Strong (22) osiągnęła koncentrację  $1,63 \times 10^8/\text{ml}$ . Jednocześnie podkreślić należy, że szereg szczepów w ogóle w tych podłożach nie sporulowało. Posiada to szczególne znaczenie, gdyż proces produkcji przetrwalników jest ściśle sprzężony z wytwarzaniem enterotoksyny (19, 21, 25, 26, 48).

### Enterotoksynogeneza

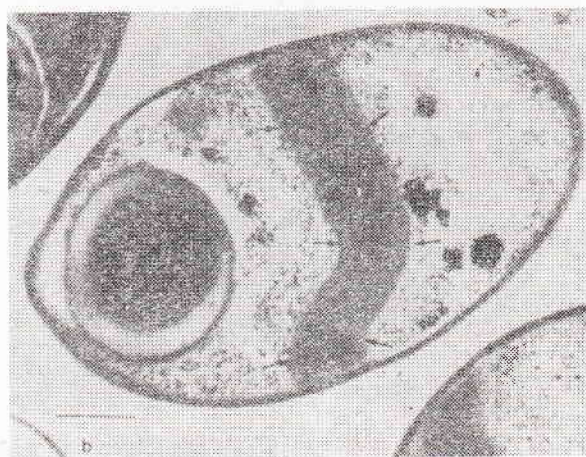
Enterotoksyna („entoks”) stanowi główny czynnik przyczynowy w złożonym mechanizmie zatrucia pokarmowych na tle *Cl. perfringens*. W sporulujących hodowlach szczepów enterotoksynogennych pojawia się już w 2—3 godzinie ich wzrostu, początkowo wewnątrzkomórkowo w postaci charakterystycznych struktur morfologicznych tzw. „paracrystalline inclusion” (ryc. 3), a w następstwie lizy sporangium, zwykle po-



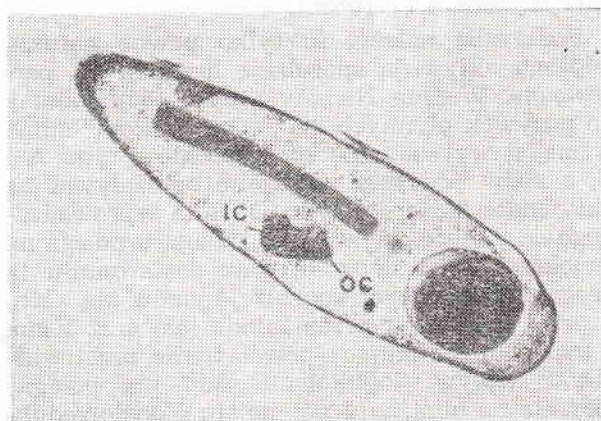
Ryc. 3. Parakryształy enterotoksyny (wg 21)



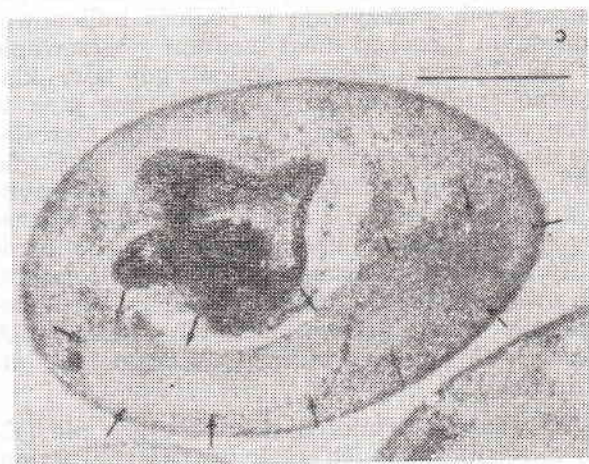
Ryc. 5. Podwójne wtręty parakryształów enterotoksyny (wg 21)



Ryc. 6. Położony poprzecznie parakryształ enterotoksyny (wg 21)



Ryc. 4. Pojedyńczy, podłużnie położony parakryształ enterotoksyny (wg 21)



Ryc. 7. Parakryształ enterotoksyny wciśnięty pomiędzy przetrwalnik, a sporangium (wg 21)

między 11—14 godziną, występuje także poza-komórkowo (19, 22, 107). Parakryształ „entoks” pojawiają się w komórce jako wtręty pojedyncze (ryc. 4) lub podwójne (ryc. 5), ułożone w płaszczyźnie podłużnej (ryc. 4) względnie poprzecznej (ryc. 6). Niekiedy w następstwie pewnej restrykcji są wciśnięte pomiędzy przetrwalnik, a sporangium (ryc. 7).

Niilo (74) wykorzystując odczyn immunofluorescencji (IF) prześledził proces akumulacji toksyn w laseczkach *Cl. perfringens* A. Z badań tych, a także Uemury (105) wynika, że osłonki spor nie zawierają „entoks”, w przeciwieństwie do rezultatów Friebera i Duncana (31) wskazujących na obecność w nich enterotoksynopodobnych protein. W tym przypadku niewykluczone, że wielowarstwowa struktura przetrwalnika stanowi pewną barierę przed penetracją fluoryzujących przeciwciał (FA). Ponadto ważnym stwierdzeniem odnośnych badań było wykazanie, że zarówno poszczególne szczepy jak i komórki bakteryjne są zróżnicowane pod względem aktywności enterotoksynogennej.

Enterotoksynę produkują ciepłooporne i ciepłowrażliwe laseczki *Cl. perfringens* A, pochodzące z przypadków zatruc pokarmowych (23, 38, 44, 47, 49, 97). Ponadto syntetyzują ją także szczepy typu C izolowane z przypadków toksoinfekcji typu „pig bel” (28, 72, 91) i „darmbrand” (114) oraz bakterie typu D (108).

Indukowanie aktywności enterotoksynogennej laseczek *Cl. perfringens* polega na termicznym wzbudzaniu sporogenezy. W tym celu Uemura (105) zaleca kilkakrotne ogrzanie (w temperaturze 75—85°C przez 20 min.) hodowli w podłożu Duncana i Strong (22). Przy użyciu tej metody można było wykazać, że aż 31% szczepów (11 spośród 35), pochodzących od zdrowych ludzi, wytwarzało „entoks” w koncentracji powyżej 0,1 µg/ml. Natomiast wcześniejsze obserwacje Yasukawy i wsp. (113) wskazywały na ich sporadyczne występowanie w zawartości jelit.

Mechanizm tej aktywacji nie jest jeszcze ostatecznie wyjaśniony. Zdaniem Uemury (105) wzbudzony „szok termiczny” może oddziaływać zarówno na genetyczną regulację sporogenezy (sprzężonej z enterotoksynogenezą) jak i na selekcję najłatwiej sporulujących laseczek.

### Właściwości enterotoksyny

Enterotoksyna, niezależnie od serotypu z którego pochodzi przedstawia termolabilny związek białkowy, inaktywowany w temperaturze 60°C w ciągu 10 minut, niedializujący przez błony półprzepuszczalne i posiadający punkt izoelektryczny przy pH 4,3 (25, 44, 48). Określony metodą ultrawirowania ciężar molekularny (CM) wynosi w przypadku monomerów „entoks” typu A 34 000 (30, 38, 46, 75, 97), a C 33 000 (92).

Na podstawie poliakrylamidowej żelektroforezy przeprowadzonej w obecności sodowego

dodecylsulfianu (SDS) stwierdzono, że enterotoksyna jest agregatem różnych peptydów o CM od 17 000 do 175 000 daltonów (30). Podkreślić przy tym należy, że jej ciężar molekularny w zasadzie nie zmienia się przy ekspozycji na 0,1 M β-merkaptotanol i 6 M chlorowodorek guaniny (38). Stąd też założono, że monomer „entoks” o CM 34 000 stanowi pojedynczy łańcuch peptydowy złożony z 2 podjednostek o CM 17 000 (30). Reduktory grup tiolowych SH nie naruszają antygenowej i biologicznej integralności tego toksycznego białka (38). Natomiast estryfikacja enterotoksyny kwasem bursztynowym w pH 7,6 całkowicie inaktywuje jej biologiczną aktywność (38).

„Entoks” o CM 34 000 przy koncentracji wyższej niż 4 mg/ml i w punkcie izoelektrycznym podlega spontanicznej agregacji z wytworzeniem dimerów, trimerów, tetramerów itp. (97). Zdaniem Duncana (19) wzrost jej wewnątrzkomórkowej koncentracji, przy braku lizy sporangium, sprzyja agregacji i powstawaniu parakryształicznych wtrętów.

Według Granum i Skjelkvale (38) w skład enterotoksyny A wchodzi 18 aminokwasów przy zawartości 1 rodnika cysteinowego w cząsteczce. Natomiast Hauschild i wsp. (45) uważają, że na 1 molekułę przypadają 2 rodniki cysteinowe.

Odnośne białka cytotoksyczne, ekstrahowane z laseczek serotypów A, C i D, są pod względem właściwości antygenowych i biologicznych całkowicie podobne (91). Są one dobrymi antygenami, które wywołują powstawanie w organizmie swoistych przeciwciał (79).

Oczyszczone preparaty enterotoksyny A wykazują toksyczność dla myszy wynoszącą 3500—4700 DL<sub>50</sub>/mg N (35, 87), a C 1900 DL<sub>50</sub>/mg N (92). Najmniejszą dawkę śmiertelną dla myszy, przy dożylnym podaniu oczyszczonej enterotoksyny A, stanowi 3 µg tego preparatu (46, 97).

### Mechanizm działania enterotoksyny

Występowanie w produktach żywnościowych przetrwalników enterotoksynogennych szczepów *Cl. perfringens* przedstawia potencjalne zagrożenie dla zdrowia konsumenta, zwłaszcza, że warunki podgrzewania i przechowywania pokarmów mogą sprzyjać kiełkowaniu i prowadzić do wzrostu liczby bakterii niezbędnej do wywołania schorzenia (34). Jednocześnie należy podkreślić, że w jelicie zachodzi dalsze namnażanie i sporulacja zarazka, co w konsekwencji doprowadza do objawów „gastroenteritis” (99), którym towarzyszą niekiedy także bóle głowy, nudności i wymioty (43, 110). Orientacyjnie podaje się przy tym, że dawkę „challenge” dla człowieka stanowi pokarm zawierający sporulujące laseczki w koncentracji 10<sup>4</sup>—10<sup>7</sup>/g (33, 94). Według Skjelkvale i Uemury (94, 95) objawy intoksykacji u doświadczalnie zakażonych ochotników występowały już po spożyciu 6—10 µg enterotoksyny. Koncentracja „entoks” w kale

przy przebiegu podostrym schorzenia osiągała 3—4  $\mu\text{g/g}$ , a w formie ostrej dochodziła do 13—16  $\mu\text{g/g}$  (93).

Enterotoksyna powoduje akumulację płynów w podwiązanych pętlach jelit np. u królików (27) i jagniąt (47). Potrzebna dla powstania tej reakcji dawka „entoks” wynosi 6,25  $\mu\text{g}$  (47). Natomiast wprowadzenie śródskórne śwince morskiej 0,125  $\mu\text{g}$  toksyny wywołuje rumień o średnicy 8 mm (42).

Niilo (77) doniósł, że enterotoksyna podana dożylnie owcom doprowadza do spadku ciśnienia krwi. Również jako główny objaw obserwowany u cieląt wymienia się spadek ciśnienia krwi, a ponadto zaburzenia oddechowe typu „dyspnoe” i „hyperpnoe”, wzrost tętna do 105/min oraz objawy ogólnej prostracji (76). Minimalna dawka chorobotwórcza MED („Minimum Effective Dose”), podana w tzw. jednostkach rumieniowych na kg wagi ciała, wynosi dla cieląt 2,28 i królików 2,4, podczas gdy dawka śmiertelna (w iniekcji dożylniej) jest dla cieląt przy 4,96, a królików przy 5,6 jedn. rumień./kg (76).

Patogenetyczne działanie enterotoksyny wyraża się w warunkach normalnych wywoływaniem biegunek u człowieka (50) oraz u doświadczalnie zakażonych małą (24, 51, 106), cieląt (78), owiec (5, 48, 49, 79), królików (23, 25) i szczurów (67). Mechanizm tej aktywności wiąże się z zaburzeniami procesu jelitowego wchłaniania i wydalania, jako czynnego transportu różnych jonów w kierunku śluzówka  $\rightarrow$  surowiczkówka (M  $\rightarrow$  S) i surowiczkówka  $\rightarrow$  śluzówka (S  $\rightarrow$  M). McDonel (67) wykazał, że przy 15 minutowej ekspozycji izolowanej pętli jelita szczura na enterotoksynę — ulega silnemu zahamowaniu transport glukozy w kierunku M  $\rightarrow$  S. W tym przypadku wskaźnik wchłaniania dla glukozy wynosił 18,4 nmola/cm/min., a u zwierząt kontrolnych 54,8 nmola/cm/min. Jednocześnie stymulowany był proces wydalania (S  $\rightarrow$  M) jonów  $\text{Na}^+$  i  $\text{Cl}^-$ , a wraz z nimi również wody. Odnośne wartości przedstawiały się dla  $\text{Na}^+$  — 88,2 nmola/cm/min., podczas gdy dla  $\text{Cl}^-$  — 4,5 nmola/cm/min., wobec kolejnych oznaczeń kontrolnych +125,5 i +181,4 nmola/cm/min. Natomiast w tych warunkach transport  $\text{HCO}_3^-$  i  $\text{K}^+$  pozostawał niezmienny.

Gilman i Koelle (36) dowiedli znaczenia energetycznych procesów oksydacyjnego metabolizmu w prawidłowym funkcjonowaniu energobiorczego transportu jonów w jelicie szczura. W tym kontekście szczególne znaczenie posiadają badania McDonela i Duncana (69) wykazujące, że enterotoksyna redukując o 26—41% zużycie  $\text{O}_2$  przez mitochondria komórek wątroby może doprowadzić do pewnego „deficytu” energii w komórce. Natomiast sam proces glikolizy pozostaje niezachwiany (68). W tym ujęciu istotą działania „entoks” jest ostatecznie hamowanie syntezy ATP, a pośrednio również energobiorczych procesów wchłaniania w jelicie.

### Inne czynniki cytotoksyczne

Spotykany niekiedy w zatruciach pokarmowych *Cl. perfringens* C wytwarza jako główny czynnik chorobotwórczy toksynę beta, która jest odpowiedzialna za objawy „*enteritis necroticans*” w schorzeniach opisanych pod nazwą „la maladie de Hambourg” (96), „darmbrand” (114) oraz syndrom „pig bel” (72). Oczyszczona przez Sakurai i Duncana (88) toksyna beta szczepu CN 5386 przedstawia pojedynczy łańcuch polipeptydowy o CM 30 000. Jest ciepłochwiejna i przy ogrzaniu do 50°C traci w ciągu 5 minut 75% swojej aktywności. Również trypsyna wywiera na nią niszczący wpływ. Dawka DLM<sub>50</sub> dla myszy jest zawarta w 1,87  $\mu\text{g}$  oczyszczonego preparatu. Najwyższe koncentracje tego toksycznego białka wytwarzają młode, 4—5 godzinne hodowle bulionowe (bulion mięsny, 2% peptonu, 0,5% fosforanu sodu i 1% glukozy). Optymalna produkcja występuje przy pH 7,5 (82). W tych warunkach, stężenia toksyny beta mogą dochodzić do 100 000 DLM/ml hodowli (96).

Wspomnieć też trzeba o roli toksycznych amin, stwierdzanych w hodowlach wszystkich serotypów *Cl. perfringens*. Spośród nich szczególne znaczenie posiada histamina wytwarzana w dużej koncentracji tj. powyżej 50 mg/l (7). Powstaje ona w następstwie dekarboksylacji histydyny. Jak podaje Koslowski i wsp. (61) spełnia ona ważną rolę w patogenezie „*enteritis necroticans*”. Histaminie przypisuje się wpływ na rozszerzanie kapilar i tętniczek, czego następstwem jest spadek ciśnienia krwi i zwiększona przesiękowość (56). Działając miejscowo na skórę powoduje „triple reponse” („trojaka reakcja”) w postaci lokalnego zaczerwienienia, obrzęku i nacieczenia tkanek (64). Przy działaniu enteralnym silnie pobudza sekrecję różnych gruczołów, w tym i jelitowych (55, 111).

Reasumując należy stwierdzić, że w zatruciach pokarmowych na tle *Cl. perfringens* A najistotniejszą rolę spełnia enterotoksyna, a w przypadku laseczek serotypu C — toksyna beta i enterotoksyna. Natomiast mniejsze znaczenie posiada histamina oraz niekiedy produkowane lotne związki jak butylo i etyloaminy. Jednak ostateczny obraz schorzenia wydaje się być wypadkową działania wszystkich omówionych czynników cytotoksycznych.

### Piśmiennictwo

- Adams D. M.: Appl. Microbiol. 27, 787, 1974.
- Angelotti R., Hall H. E., Foter M. J., Lewis K. H.: Appl. Microbiol. 10, 193, 1961.
- Baine H., Cherniak R.: Biochem., Easton 10, 2948, 1971.
- Barnes E. M., Despaul J. E., Ingram M.: J. appl. Bact. 26, 415, 1963.
- Bartlett M. L., Walker H. W., Ziprin R.: Appl. Microbiol. 23, 196, 1972.
- Beerens H., Delcourte F.: Anns Inst. Pasteur, Lille 95 739, 1958.
- Billy C.: Anns Inst. Pasteur, Paryż 103, 464, 1962.
- Boyd M. J., Logan M. A., Tytell A. A.: J. biol. Chem. 174, 1013, 1948.
- Bradshaw J. G., Peeler J. T., Twedt R. M.: Appl. Environ. Microbiol. 34, 280, 1977.
- Bryan F. L.: J. Milk Fd Tech. 32, 382, 1969.
- Busta F. F., Schroder D. J.: Appl. Microbiol. 22, 177, 1971.

12. Cassone A., Simonetti N.: *Experientia* 27, 981, 1971.
13. Cherniak R., Frederich H. M.: *Infect. Immun.* 15, 765, 1977.
14. Cherniak R., Henderson B. G.: *Infect. Immun.* 6, 32, 1972.
15. Clifford W. J., Anellis A.: *Appl. Microbiol.* 22, 856, 1971.
16. Collee J. G., Knowlden J. A., Hobbs B. C.: *J. appl. Bact.* 24, 326, 1961.
17. Dework F. M.: *Appl. Microbiol.* 24, 834, 1972.
18. Dische F. E., Elek S. D.: *Lancet* 13, 71, 1957.
19. Duncan C. L.: *J. Bact.* 113, 932, 1973.
20. Duncan C. L.: *J. Milk Fd Tech.* 33, 35, 1970.
21. Duncan C. L., King G. J., Frieben W. R.: *J. Bact.* 114, 845, 1973.
22. Duncan C. L., Strong D. H.: *Appl. Microbiol.* 16, 82, 1968.
23. Duncan C. L., Strong D. H.: *J. Microbiol.* 15, 765, 1969.
24. Duncan C. L., Strong D. H.: *Infect. Immun.* 3, 167, 1971.
25. Duncan C. L., Strong D. H.: *J. Bact.* 100, 86, 1969.
26. Duncan C. L., Strong D. H., Sebald M.: *J. Bact.* 110, 378, 1972.
27. Duncan C. L., Sugiyama H., Strong D. H.: *J. Bact.* 95, 1560, 1968.
28. Egerton J. R., Walker P. D.: *J. Path. Bact.* 88, 275, 1964.
29. Ellner P. D.: *J. Bact.* 71, 495, 1956.
30. Enders G. L., Duncan C. L.: *Can. J. Microbiol.* 22, 1410, 1976.
31. Frieben W. R., Duncan C. L.: *Europ. J. Biochem.* 39, 393, 1973.
32. Fuchs A. R., Bonde G. J.: *J. gen. Microbiol.* 16, 317, 1957.
33. Genigeorgis C.: *J. Am. vet. med. Ass.* 167, 821, 1975.
34. Genigeorgis C., Hauschild A. H. W.: *Can. Inst. Fd Sci. Tech.* 6, 106, 1973.
35. Genigeorgis C., Sakaguchi G., Riemann H.: *Appl. Microbiol.* 26, 111, 1973.
36. Gilman A., Koelle E. S.: *Am. J. Physiol.* 199, 1025, 1960.
37. Gough B. J., Alford J. A.: *J. Fd Sci.* 30, 1025, 1965.
38. Granum P. E., Skjelkvale R.: *Acta path. microbiol. scand.* 85, 89, 1977.
39. Gregory E. M., Moore W. E. C., Holdeman L. V.: *Appl. Environ. Microbiol.* 35, 983, 1973.
40. Hall H. E., Angelotti R., Lewis K. H., Forter M. J.: *J. Bact.* 85, 1094, 1963.
41. Hardwick W. A., Gutrand B., Forster J. W.: *J. Bact.* 61, 145, 1951.
42. Hauschild A. H. W.: *Can. J. Microbiol.* 16, 651, 1970.
43. Hauschild A. H. W.: *J. Milk Fd Tech.* 34, 596, 1971.
44. Hauschild A. H. W., Hülshelmer R.: *Can. J. Microbiol.* 17, 1425, 1971.
45. Hauschild A. H. W., Hülshelmer R., Martin W. G.: *Can. J. Microbiol.* 19, 1379, 1973.
46. Hauschild A. H. W., Hülshelmer R., Rogers C. G.: *Can. J. Microbiol.* 17, 1475, 1971.
47. Hauschild A. H. W., Niilo L., Dorward W. J.: *Appl. Microbiol.* 16, 1235, 1968.
48. Hauschild A. H. W., Niilo L., Dorward W. J.: *Can. J. Microbiol.* 16, 339, 1970.
49. Hauschild A. H. W., Niilo L., Dorward W. J.: *J. infect. Dis.* 117, 379, 1967.
50. Hauschild A. H. W., Thatcher F. S.: *J. Fd Sci.* 32, 467, 1967.
51. Hauschild A. H. W., Walcroft M. T., Campbell W.: *Can. J. Microbiol.* 17, 1141, 1971.
52. Hobbs B. C.: *Clostridium perfringens* and *Bacillus cereus* Infections. (W) *Food Borne Infections and Intoxications*, Ed. H. Riemann 131—173, 1969.
53. Hobbs B. C.: *J. appl. Bact.* 28, 74, 1965.
54. Hobbs B. C., Smith E. M., Oakley C. L., Warrack G. H., Cruickshank J. C.: *J. Hvg.* Camb. 51, 74, 1953.
55. Hollander F., Schaotra A.: *Am. J. Physiol.* 205, 625, 1963.
56. Holtz P.: *Klin. Wschr.* 16, 1561, 1937.
57. Hughes J. A., Turnbull P. C. G., Stringer M. F.: *J. med. Microbiol.* 9, 475, 1976.
58. Johnston M. A., Pivnick H., Samson J. M.: *Can. Inst. Fd Tech.* 2, 52, 1969.
59. Kemp G. E., Proctor R., Brovne A. S.: *Publ. Hlth Rep.* Wash. 77, 910, 1962.
60. Kim C. H., Cheney R., Woodburn M.: *Appl. Microbiol.* 15, 871, 1967.
61. Koslowski L., Schneider H. H., Heisl C.: *Klin. Wschr.* 29, 29, 1951.
62. Labbe R. G., Duncan C. L.: *Appl. Microbiol.* 19, 353, 1970.
63. Lee L., Cherniak R.: *Infect. Immun.* 9, 318, 1974.
64. Levis T.: *Blood vessels of the human skin and their responses*. Shaw, London 1927.
65. Lund A. J.: *Hormel Inst. Univ. Minn. Ann. Rept.* 1955, 88, 1958.
66. McClung L. S.: *J. Bact.* 50, 229, 1945.
67. McDonell J. L.: *Infect. Immun.* 10, 1156, 1974.
68. McDonell J. L., Duncan C. L.: *Infect. Immun.* 12, 274, 1975.
69. McDonell J. L., Duncan C. L.: *Infect. Immun.* 15, 999, 1977.
70. Mead B. C.: *J. appl. Bact.* 32, 468, 1969.
71. Muhammed S. I., Morrison S. M., Boyd W. L.: *J. appl. Bact.* 38, 245, 1975.
72. Murrell T. G. C., Eberton J. R., Rampling A., Samels J., Walker P. D.: *J. Hvg.* Camb. 64, 375, 1966.
73. Murrell T. G. C., Roth L.: *Med. J. Aust.* 1, 61, 1963.
74. Niilo L.: *Can. J. Microbiol.* 23, 908, 1977.
75. Niilo L.: *Infect. Immun.* 7, 1, 1973.
76. Niilo L.: *J. comp. Path.* 83, 265, 1973.
77. Niilo L.: *Res. vet. Sci.* 13, 503, 1972.
78. Niilo L., Dorward W. J.: *Res. vet. Sci.* 12, 376, 1971.
79. Niilo L., Hauschild A. H. W., Dorward W. J.: *Can. J. Microbiol.* 17, 391, 1971.
80. Nishida S., Seo N., Nakagawa M.: *Appl. Microbiol.* 17, 303, 1969.
81. Perkins W. E., Tsuji K.: *J. Bact.* 84, 86, 1962.
82. Pivnick H., Habeeb A. F. S. A., Gornstein G., Stuart P. F., Hauschild A. H. W.: *Can. J. Microbiol.* 10, 329, 1963.
83. Riemann H. P.: *Medycyna Wet.* 30, 193, 1974.
84. Roberts T. A.: *J. appl. Bact.* 31, 133, 1968.
85. Rymkiewicz D.: *Med. dośw.* 29, 255, 1977.
86. Sacks L. E., Thompson P. A.: *Appl. Environ. Microbiol.* 34, 189, 1977.
87. Sakaguchi G., Uemura T., Riemann H.: *Appl. Microbiol.* 62, 762, 1973.
88. Sakurai J., Duncan C. L.: *Infect. Immun.* 21, 678, 1978.
89. Serezyńska H., Meisel — Mikolajczyk F.: *Bull. Acad. pol. Sci. Ser. Sci. biol.* 23, 31, 1974.
90. Shoemaker S. P., Pierson M. D.: *Abst. Ann. Meeting Am. Soc. Microbiol.*, 1974.
91. Skjelkvale R., Duncan C. L.: *Infect. Immun.* 11, 563, 1975.
92. Skjelkvale R., Duncan C. L.: *Infect. Immun.* 11, 1061, 1975.
93. Skjelkvale R., Uemura T.: *J. appl. Bact.* 42, 355, 1977.
94. Skjelkvale R., Uemura T.: *J. appl. Bact.* 43, 281, 1977.
95. Skjelkvale R., Uemura T.: *J. appl. Bact.* 43, 632, 1977.
96. Smith L. D.S.: *The Pathogenic Anaerobic Bacteria*, Ch. C. Thomas, USA 1975.
97. Stark R. L., Duncan C. L.: *Infect. Immun.* 6, 662, 1972.
98. Sterne M., Warrack G. H.: *J. Path. Bact.* 88, 279, 1964.
99. Strong D. H., Duncan C. L., Perna G.: *Infect. Immun.* 3, 171, 1971.
100. Strong D. H., Weiss K. F., Higgins I. W.: *J. Am. Diet. Ass.* 49, 191, 1966.
101. Ting M. N., Fung D. Y. C.: *Appl. Microbiol.* 24, 755, 1972.
102. Torrey J. C., Kahsi M. C., Salinger M. H.: *J. Bact.* 2, 85, 1930.
103. Tu A. T., Friederick C. G.: *Biochem.*, Easton 7, 4367, 1968.
104. Tuomi S., Mattheus M. E., Marth E. H.: *J. Milk Fd Tech.* 37, 494, 1974.
105. Uemura T.: *J. appl. Bact.* 44, 411, 1978.
106. Uemura T., Sakaguchi G., Sakai S.: *Jap. J. med. Sci. Biol.* 28, 165, 1975.
107. Uemura T., Sakaguchi G., Riemann H. P.: *Appl. Microbiol.* 26, 381, 1973.
108. Uemura T., Skjelkvale R.: *Acta path. microbiol. scand.* 84, 414, 1976.
109. Vernon E., Tillet H. E.: *Publ. Hlth.*, Lond. 88, 225, 1974.
110. Walker H. W.: *Fd Sci. Nutr.* 7, 71, 1975.
111. Ward S., Gillespie I. E., Passaro E. P., Grossman M. I.: *Gastroenterology* 44, 620, 1963.
112. Willis A. T.: *Clostridia of Wound Infection*, Butterworth and Company, London 1969.
113. Yasukawa A., Okada Y., Kitasho T., Miyamoto S.: *J. Fd Hvg. Soc. Jap.* 16, 313, 1975.
114. Zeissler J., Rossfeld — Sternberg L.: *Br. med. J.* 12, 267, 1949.

Adres autora: doc. dr hab. Zygmunt Cygan, ul. Stowicza 2/7, 20-336 Lublin.

**EDWARDS S. A., BROOM D. M.: Okres między urodzeniem i pierwszym pobraniem siary u cieląt. (The period between birth and first suckling in dairy calves).** *Res. vet. Sci.* 26, 255—256, 1979 (2).

Obserwacje przeprowadzono na 82 krowach i ich potomstwie w okresie 6 godzin po wycieleniu. W okresie 6 godzin po wycieleniu 89% cieląt pochodzących od matek po pierwszej laktacji, 65% cieląt pochodzących od matek po drugiej laktacji i 54% cieląt pochodzących od matek po trzeciej laktacji i 43% cieląt od matek po 4—7 laktacji ssało własne matki. Wszystkie cielęta, które otrzymały siarę w okresie pierwszych sześciu godzin wykazywały w wieku 48 godzin życia wysoki poziom immunoglobulin klasy IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgM i IgA.

G.

**MORTON H., CLUNIE G. J. A., SHAW F. D.: Test wczesnego wykrywania ciąży u owiec. (A test for early pregnancy in sheep).** *Res. vet. Sci.* 26, 261—264, 1979 (2).

Do wykrywania wczesnej ciąży u owiec zastosowano odczyn hamowania tworzenia rozetek pod wpływem występującego w surowicy zwierząt ciężarnych czynnika wczesnej ciąży (EPF). Średnie wartości miana zahamowania tworzenia rozetek dla owiec nieciężarnych wynosiło  $9,8 \pm 0,34$ , zaś dla owiec ciężarnych po 72 godzinach po pokryciu  $21,1 \pm 1,2$ . U owiec z ciążą jednomiesięczną wartość tego testu wynosiła  $19,0 \pm 0,8$ , natomiast w drugim miesiącu ciąży  $15,3 \pm 1,3$ , zaś w trzecim miesiącu ciąży  $14,2 \pm 1,2$ . Począwszy od czwartego miesiąca ciąży wartość testu zarówno u owiec ciężarnych jak i nieciężarnych nie różniły się w sposób istotny.

G.