

JERZY MIERZEJEWSKI

## Rola fagów w syntezie i determinacji swoistości toksyny *Clostridium botulinum*

Z Ośrodka Naukowo-Badawczego Służby Weterynaryjnej w Puławach

Bakteriofagi odgrywają istotną rolę w syntezie niektórych toksyn bakteryjnych. Prace Freemana (7) nad udziałem faga w produkcji toksyny dyfterytycznej zapoczątkowały badania nad powiązaniem faga z komórką gospodarza — bakterią ulegającą konwersji. Późniejsze badania wykazały złożoną naturę tych powiązań i ustaliły, że swoiste fagi kierują toksynogenezą *Corynebacterium diptheriae*. Podobnie Blair i Carr (1) wykazali, że nietoksynogenne szczepy gronkowców mogą być konwertowane do roli producentów  $\alpha$ -toksyny przez lizogenizację ich fagami toksynogennych szczepów. Konwersja nietoksynogennych szczepów w toksynogenne została już opisana u paciorkowców grupy A (19).

W 1968 r. Vinet i wsp. (18) prowadząc badania molekuł toksyny botulinowej za pomocą mikroskopu elektronowego po raz pierwszy stwierdzili obecność fagów w hodowli w wórczkach celofanowych *Clostridium botulinum* C, dokonali pomiarów i opisali ich cechy morfologiczne. W tym samym roku Inoue i Iida (9) wykazali możliwość uwalniania fagów ze szczepów toksynogennych wszystkich znanych wówczas typów *C. botulinum* (A—F) za pomocą lizy wywołanej światłem ultrafioletowym lub mitomycyną C. Autorzy dokonali podziału fagów botulinowych na 3 grupy w zależności od kształtów i wielkości określonych w mikroskopie elektronowym. Z użytych szczepów tylko reprezentant typu A był proteolityczny, a pozostałe nieproteolityczne, z tym, że typy C i D znacznie różniły się od B, E i F właściwościami morfologicznymi i biochemicznymi. Ponadto szczepy typów B i E wytwarzały substancje bakteriocynopodobne.

Wkrótce potem Eklund i wsp. (3) potwierdzili występowanie właściwości lizogenicznych u różnych typów *C. botulinum*, zarówno proteolitycznych, jak i nieproteolitycznych. Dokonali oni podziału fagów *C. botulinum* na 4 grupy, a nie na 3 — jak Inoue i Iida (9). Do czwartej grupy zaliczyli struktury odpowiadające pod względem morfologicznym ogonkom fagowym, wytwarzane przez szczepy *C. botulinum* typu E i szczep botulinopodobny (nietoksynogenne). Podobne zresztą struktury wytwarzane przez szczepy *C. botulinum* typów E i nieproteolitycznych B i F były obserwowane przez wspomnianych autorów (9).

Inoue i Iida (8) badając właściwości produktów lizy hodowli szczepów botulinowych po zadziałaniu światłem nadfioletowym lub mito-

mycyną C stwierdzali zdolność tych produktów do wywoływania aglutynacji i lizy hodowli niektórych innych szczepów botulinowych, a ponadto *C. sporogenes* i szczepów należących do rodzaju *Clostridium*, izolowanych z próbek gleby. Częsteczki odpowiadające fagom, występujące w hodowlach uległych lizie, okazały się jednak niezdolne do namnażania we wrażliwych bakteriach. Takie lizogeniczne szczepy z ułomnościami (defektami) genetycznymi są znane u wielu rodzajów bakterii i fagi umiarkowane otrzymane z takich szczepów wykazują czasami niekompletną morfologię (17). Wyniki badań Inoue i Iida (8) są interesujące w aspekcie dyskusji nad fagami ułomnymi i bakteriocynami.

Bardziej jednak interesujące pozostawało zagadnienie konwersji fagowej toksynogenezy u *C. botulinum*. Od dawna znane były przypadki izolacji ze środowiska morskiego lub ziemnego nietoksynogennych szczepów podobnych do *C. botulinum* i pozostawało otwartym zagadnienie ich stosunku do szczepów toksynogennych. Fakt, że są to szczepy mające powiązania z grupą *C. botulinum*, udowodniły badania Inoue i Iida, wyraźnie przemawiające za możliwością włączenia faga w toksynogenezę *C. botulinum* (10). Autorom tym udało się otrzymać hodowlę toksynogenną typu C, z nietoksynogennej, w pożywce z filtratami toksynogenego szczepu typu C. W hodowli występowała wyraźna liza.

Eklund i Poysky (4) poszukując zależności między toksynogenezą a lizogেনią, zdołali wyizolować 2 fagi z toksynogenego szczepu *C. botulinum* C, przy czym tylko od jednego z nich w pewnym stopniu była zależna toksyczność. Hodowle toksynogenne zakażone tym fagiem, po potraktowaniu ich surowicą antyfagową, stałe zatracaly toksyczność i faga. Gdy te nietoksynogenne hodowle były reinfekowane fagiem, ponownie stawały się toksynogenne. Niektóre inne typy *C. botulinum* uwalniały się od swojego profaga, ale nadal pozostawały toksynogenne. Możliwe, że albo zachowywały one inne bakteriofagi, albo zdaniem autorów, nie wszystkie toksyny *C. botulinum* są indukowane przez bakteriofagi. Inoue i Iida (11), podobnie jak Eklund i Poysky (4) uzyskali 2 różne fagi dla typu C, a ponadto tak samo 2 dla typu D *C. botulinum*. Gdy mutanty szczepów *C. botulinum* Nielizogeniczne i nietoksynogenne były traktowane indukowanymi lizatami z toksynogennych wyjściowych szcze-

pów, 96% i 88% przeżywających komórek sta-  
wało się lizogenicznymi i toksynogennymi.

Szczególnie interesujący wynik uzyskali  
Inoue i Iida z pewnym szczepem typu D trak-  
towanym oranżem akrydyny. Otóż ten nietok-  
synogenny mutant ulegał konwersji do tok-  
synogennego przez indukujący lizat z jednego  
ze szczepów typu C. Toksyna wytwarzana  
przez tę konwertowaną hodowlę ulegała zobo-  
jętnieniu swoistemu antytoksyną typu C w  
teście zobojętniania.

W miarę pojawiania się nowych danych za-  
gadnienie występowania i roli fagów w ho-  
dowlach *C. botulinum* stawało się coraz bar-  
dziej atrakcyjne. Na różnorodność form fagów  
wytwarzanych przez *C. botulinum* zwrócili  
uwagę Dolman i Chang (2). Autorzy doszli do  
wniosku, że charakterystyczne cząsteczki fa-  
gów spotyka się w niewielkiej ilości w więk-  
szości młodych toksynogennych hodowli nieza-  
leżnie od ich typu. W większości przypadków  
obserwuje się rozwój wielu form fagów, a na-  
wet dwojaką lizogeniczność, co powiększa tyl-  
ko ilość pytań wokół funkcji tych fagów, a co  
może być wyjaśnione tylko drogą eksperymen-  
talną. Podany przez Dolmana i Chang podział  
wstępny laseczek botulinowych według cech  
morfologicznych fagów, jest przedstawiony w  
tab. 1. W tabeli nie uwzględniono fagów szcze-  
pów nietoksynogennych botulinopodobnych.  
Szczepy te, o czym już była mowa, bardzo  
rzadko wytwarzają formy nitkowate fagów i  
pozbawione są właściwości lizogenicznych.

Morfologiczna różnorodność fagów botulino-  
wych, a szczególnie pojawianie się dwóch róż-  
nych odmian u toksynogennych szczepów ty-  
pów A, B i F stwarza wiele niejasności. Hipo-  
teza o uwarunkowaniu toksynogenezy zmien-  
nością metabolizmu bakteryjnego, spowodowa-  
nego przez lizogeniczny zespół fagowy, wyda-  
je się być interesująca. Można przyjąć za Dol-  
manem i Chang, że do mechanizmu tego mu-  
siałyby być włączone 2 zespoły fagów. Jeden  
z nich grałby rolę wspólnego mianownika wa-  
runkującego produkcję podstawowej struktury  
molekularnej, służącej jako prokursor wszyst-  
kich toksyn botulinowych, a drugi wpływałby  
na te zmiany metabolizmu, które determinują  
swoistość typową wytwarzanej toksyny. Z da-  
nych tab. 1 wynika, że taką rolę wspólnego  
mianownika przy produkcji toksyn u proteoli-  
tycznych typów A, B i F, może właśnie od-  
grywać fag o główce w kształcie kolby sito-  
wia.

Konwersja fagowa toksynogenezy *C. botuli-  
num* C i D opisana po raz pierwszy we wspom-  
nianej pracy Inoue i Iida (10, 11), a następnie  
zweryfikowana przez Eklunda i wsp. (4, 5)  
stała się szczególnie atrakcyjnym tematem ba-  
dawczym. Między innymi Oguma i wsp. (13)  
podjęli badania nad konwersją fagową z uży-  
ciem szczepów *C. botulinum* typów C i D wy-

Tab. 1. Główne formy morfologiczne bakteriofagów  
obserwowane u toksynogennych typów *C. botulinum*  
(wg 2)

Grupa	Typ	Proteolit. P Niepro- teol. NP	Formy morfologiczne bakteriofagów Średnica główki, długość ogonka w nm
1	A,B,F,	P	1. Główki dwudziestościenne, 50—75; Ogonki kurczliwe, 85—165 2. Główki o kształcie kolb sito- wia, 75—85×35—45, ogonki giętkie, 215—300 (jeden toksyczny szczep B wytwa- rzał faga o małej główce 25—30 z kurczliwym ogon- kiem 180 obok faga o głów- ce w kształcie kolb sito- wia).
2	B	NP	Główki dwudziestościenne 50— 60; ogonek kurczliwy 100—110 1. Główki ośmiościenne, 50— 60; ogonki giętkie ponad 200 2. Główki dwudziestościenne 55—65; ogonki kurczliwe 90—100
3	C	NP	Główki ośmiościenne 80—87; ogonki półkurczliwe, zazwy- czaj otoczone osłonką, 275—325 (jeden szczep C uwalniał faga tylko z główką dwudziesto- ścienną 55—65; ogonek kurcz- liwy 190)
	D	NP	Główki ośmiościenne 85—100; ogonki kurczliwe 400—420
4	E	NP	Główki dwudziestościenne 50— 65; ogonki kurczliwe 85—135; niekiedy pozbawione osłonki; często towarzyszą im dodatko- we struktury podobne do ogonków.

izolowanych w różnych krajach. Wyniki ba-  
dań konwersji przez fagi indukowane z róż-  
nych szczepów przedstawiono w tab. 2.

Z danych tab. 2 wynika, że typ wytwarza-  
nej toksyny był determinowany nie przez na-  
mnażającą bakterię gospodarza, ale przez faga.  
Można także rozróżnić przynajmniej 2 grupy  
fagów typu C. Grupa 1 — fagi szczepów  
Sztokholm<sup>tox+</sup> i 468<sup>tox+</sup> i grupa 2 — fagi szcze-  
pów DGF<sup>tox+</sup> i 203<sup>tox+</sup>. Nietoksynogenny  
szczep 151<sup>tox-</sup> wydaje się posiadać przynaj-  
mniej 2 różne receptory fagowe: jeden dla fa-  
gów typu C, a drugi dla typu D.

Wreszcie jakby podsumowaniem wymienio-  
nych badań, a jednocześnie istotnym postę-  
pem wiedzy, były kolejne badania Eklunda i Poy-  
skiego (6) nad interkonwersją typu C i D przez  
swoiste fagi. Autorzy wykazali, że hodowle  
*C. botulinum* C i D mogą być uwolnione od  
swoistych profagów i przekształcone w jeden  
z 2 typów C lub D w zależności od specy-

Tab. 2. Konwersja toksynogenezy przez indukowane lizaty z konwertowanych szczepów *C. botulinum* C i D (wg 13)

Lizaty ze szczepów konwertow. (tox <sup>+</sup> )	Mutanty nietoksynogenne (tox <sup>-</sup> )											
	Typ C										Typ D	
	AO-2	468	468	203	203-	201-	6813-	6814-	6816-	71-	139	151
	416	431	428	438	NT	NT	NT	NT	N			
AO-2 (Sztokholm)	C	C	C	—	—	—	—	—	—	C	—	
468 „	C	C	C	—	—	—	—	—	—	C	—	
139 „	C	C	C	—	—	—	—	—	—	C	—	
151 (DGF)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	C	
151 (203)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	C	
151 (1873)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	D	

fiki użytych fagów. Gdy hodowle typów C i D są uwalniane od profagów, przestają równocześnie wytwarzać toksyny C<sub>1</sub> oraz D i stają się nierozróżnialne, gdyż obie wytwarzają toksynę C<sub>2</sub>. Tak więc typy C i D *C. botulinum* mogą wywodzić się ze wspólnego szczepu uwolnionego od fagów. Dominacja danego typu toksyny (C<sub>1</sub> lub D) wymaga ciągłego udziału swoistych fagów. To jednakże nie wyklucza faktu, że małe ilości toksyn C<sub>1</sub> i D muszą być wytwarzane, gdy nastąpi infekcja fagiem odpowiednio C i D.

Czynione były próby systematyki fagów konwertujących typów C i D (15). Konwersja fagowa toksynogenności u typów C i D *C. botulinum* była dokonywana przez użycie szczepów nietoksynogennych i oczyszczonych fagów. Chociaż morfologia fagów konwertowanych wydaje się być taka sama, zostały one podzielone na 3 grupy na bazie ich spektrum konwersji. Do pierwszej grupy zaliczono fagi otrzymane z toksynogennych szczepów *C. botulinum* typu C, druga z fagów szczepów należących do typów C i D i trzecia typu D. Te konwertujące fagi były sklasyfikowane na takie same 3 grupy za pomocą testu neutralizacji ze swoistymi surowicami antyfagowymi. Jednakże krzyżową neutralizację obserwowano między fagami należącymi do grupy 1 i grupy 2 zarówno w tekście neutralizacji zdolności konwertowania, jak i w doświadczeniu z lysinkami, gdzie stopień przeżywania fagów był obliczany po traktowaniu ich każdą surowicą antyfagową. Zróznicowanie antyfagowe pośród tych konwertujących fagów jest prawdopodobnie przyczyną istnienia swoistego spektrum infekcyjnego u *C. botulinum* typów C i D.

Niektóre szczepy *C. botulinum* typów C i D, które uległy lizogenizacji do stanu toksynogenego przez fagi, po przepasażowaniu przez pożywkę mięsną z surowicą antyfagową ztraciły toksynogenność (14). Większość lizogenizowanych szczepów traciła swoją toksynogenność nawet w czasie pasażowania bez surowicy

i powstałe nietoksynogenne warianty były odporne na lizogenizację i konwersję przez oryginalnego faga. Jednakże, w pewnych skojarzeniach faga i bakterii gospodarza toksynogenność była stała po 10 pasażach, chociaż wykazywała przejściowe obniżenie, a nietoksynogenne warianty, jakie powstawały, pozostawały wrażliwe na lizę i konwersję. Gdy szczepy lizogeniczne były pasażowane na pożywkę zawierającą surowicę antyfagową, toksynogenność była ztracana szybciej, niż przy braku surowicy. Nietoksynogenne warianty, jakie pojawiały się w takiej hodowli, pozostawały wrażliwe na lizę i konwersję przez fagi wyjściowe.

Filtraty supernatantów hodowli szczepów pasażowanych bez surowicy antyfagowej wywołują w różnym stopniu konwersję szczepów nietoksynogennych w toksynogenne. Jednakże w jednym z filtratów wykazano obecność faga nielizogenicznego. Fag ten był identyczny z oryginalnym fagiem lizogenicznym pod względem morfologii, oporności na ciepło i antygenowości. Szczepy indykatorowe traktowane takim fagiem pozostawały odporne na lizę fagów wyjściowych.

Wyniki te wskazują, że reinfekcja i konwersja do toksynogenności zachodzi w układzie wykazującym stałą toksynogenność po 10 pasażach. Jednakże w takich kombinacjach, w których następowała utrata toksynogenności, reinfekcja nielizogenicznym mutantem faga oryginalnego może przebiegać z takim wynikiem, że nietoksynogenne warianty stają się odporne na konwersję za pośrednictwem faga. Wydaje się to być jedną z przyczyn utraty toksynogenności, która jest wspólną u niektórych szczepów *C. botulinum* typów C i D.

Od dawna znane jest zjawisko wytwarzania przez szczepy różnych gatunków *C. botulinum* hemaglutynin obok neurotoksyny. Oguma i wsp. (16) podjęli próbę wyjaśnienia roli konwersji fagowej w pojawianiu się i zanikaniu syntezy hemaglutynin. Podobnie jak w przypadku neurotoksyny, szczepy wytwarzające hemaglutyniny posiadały także fagi. Fagi o-

trzymane ze szczepów toksynogennych i hemaglutynujących zmieniały nietoksynogenne szczep wskaźnikowy w szczep wytwarzający zarówno neurotoksynę, jak i hemaglutyniny. Fagi otrzymane ze szczepu toksynogennego, a nie wytwarzającego hemaglutyniny mogły jedynie indukować hodowle do produkcji toksyny, natomiast fagi ze szczepu nietoksynogennego, ale wytwarzającego hemaglutyniny indukowały szczep wskaźnikowy tylko do wytwarzania hemaglutynin. Badania te wskazują, że wytwarzanie hemaglutynin u szczepów *C. botulinum* jest kierowane przez fagi i zdolność do produkcji hemaglutynin może być przenoszona oddzielnie lub wspólnie ze zdolnością do produkcji neurotoksyny.

Z przedstawionych danych piśmiennictwa wynika, że fagi odgrywają istotną, a być może nawet i decydującą rolę w syntezie i determinacji swoistości toksyny. Najbardziej interesujące są badania dotyczące determinacji swoistości toksyny. Badania te w latach najbliższych ze względu na dynamiczny rozwój genetyki i immunochemii, winny ostatecznie roz-

strzygnąć wiele jeszcze niejasności w omawianych zagadnieniach.

#### Piśmiennictwo

1. Blair J. E., Carr M. J.: J. Bacteriol. 82, 984, 1961.
2. Dolman C. E., Chang E.: Can. J. Microbiol. 18, 67, 1972.
3. Eklund M. W., Poysky F. T., Boatman E. S.: J. Virol. 3, 270, 1969.
4. Eklund M. W., Poysky F. T., Reed S. M., Smith C. A.: Science 172, 480, 1971.
5. Eklund M. W., Poysky F. T., Reed S. M.: Nature New Biology 235, 19, 1972.
6. Eklund M. W., Poysky F. T.: Appl. Microbiol. 27, 251, 1974.
7. Freeman V. J.: J. Bacteriol. 61, 675, 1951.
8. Inoue K., Iida H.: w książce pt. „Proc. First U.S. — Japan Conf. on Toxic Micro-organisms and the US department of the Interior. Honolulu 1968, s. 427.
9. Inoue K., Iida H.: J. Virol. 2, 537, 1968.
10. Inoue K., Iida H.: Jap. J. Microbiol. 14, 87, 1970.
11. Inoue K., Iida H.: Jap. J. Med. Sci. Biol. 24, 53, 1971.
12. Nakamura S., Serikawa T., Yamakawa K., Nishioka S., Kozaki S., Oguma K., Iida H., Kotsuhiro J.: Jap. J. Microbiol. 17, 425, 1973.
13. Oguma K.: J. Gen. Microbiol. 92, 67, 1976.
14. Oguma K., Iida H., Shiozaki M., Inoue K.: Infect. Immun. 13, 855, 1976.
15. Oguma K., Iida H., Shiozaki M.: Infect. Immun. 14, 597, 1976.
16. Seaman E., Tarmy E., Marmur J.: Biochemistry 3, 607, 1964.
17. Vinet G., Bertillaume L., Fredette V.: Rev. Can. Biol. 27, 73, 1968.
18. Zabriske J. B.: J. exp. Med. 119, 761, 1964.

Adres autora: prof. dr hab. Jerzy Mierzejewski, ul. Wojska Polskiego 5 m. 4, 24-100 Puławy.

ZENON TRATWAL

## Straty ekonomiczne w hodowli świń spowodowane występowaniem zanikowego zapalenia nosa u świń — Rhinitis atrophicans suum (R.a.)

Z Zakładu Higieny Weterynaryjnej w Poznaniu

Wzrost ujawniania się zanikowego zapalenia nosa u świń (R.a.) w ostatnich latach jest wynikiem specjalizacji i koncentracji produkcji trzody chlewnej, jak również wysokiego uszlachetnienia krajowego pogłowia świń.

Z przeglądu piśmiennictwa (1, 4, 5, 7, 10) wynika, że wielkość strat w hodowli trzody chlewnej z powodu R.a. jest podawana łącznie z enzoptyczną pneumonią (E.P.). Największe szkody ekonomiczne są spowodowane przy E.P. i R.a. nie przez padnięcia zwierząt, ale przez zmniejszenie przyrostów masy ciała, nadmierne zużywanie paszy, wydłużenie okresu tuczu świń oraz zaburzenia w rozrodzie. Według Hamori (6) zwiększone zużycie paszy na 1 kg przyrostu m. c. przy tych schorzeniach wynosi 2,4 kg, natomiast Schimel (9) podaje, że zwierzęta chore używają o 20—30% paszy więcej od zdrowych. Dla osiągnięcia 110 kg m.c. zwierzęta z E.P. i R.a. używają o 40 kg paszy więcej (4). Tucz takich zwierząt wydłuża się od 8 dni do 3 miesięcy (3, 6, 9), a różnice dziennych przyrostów m.c. wynoszą 167 g (10).

Straty ekonomiczne spowodowane występowaniem E.P. i R.a. w hodowli świń w NRD rocznie w latach sześćdziesiątych wynosiły 29

do 36 mln. marek (4), w Wielkiej Brytanii w 1953 r. podobne straty wynosiły rocznie 15 mln. funtów angielskich (1), a w USA w 1956 r. 120 mln. dolarów (5). Czerkasowa i wsp. (2) określają wielkość strat spowodowanych występowaniem R.a. tylko w jednym Sowchozie na 150 tys. rubli rocznie. Hamori (6) obliczył, że na Węgrzech straty przy występowaniu R.a. spowodowane przez przymusowe uboje, padnięcia, dodatkowe koszty związane z żywieniem, aż do uzyskania 110 kg m.c. w stosunku do jednej świni wynoszą o 400 forintów więcej w porównaniu do średniej krajowej w państwowych gospodarstwach rolnych.

Wielkość strat ekonomicznych występująca przy R.a. w znacznym stopniu rzutuje na efektywność produkcji w hodowli trzody chlewnej. Straty te nabierają ciężaru gatunkowego, szczególnie wtedy, kiedy dotyczą hodowli zarodkowej. Wyniki przeprowadzonych badań w innych krajach, stanowiły inspirację do podjęcia obserwacji dla określenia wielkości strat ekonomicznych w hodowli trzody chlewnej, spowodowanych występowaniem zanikowego zapalenia nosa u świń w warunkach krajowych.