

10. Jong M. F. de Schaake J., Borst G. H. A.: Proc. 9th Intern. Pig Vet. Soc. Congr., Barcelona, 1986, s. 221.
11. Kobisch M., Lagadic M., Le Menec M., Irgens K.: Rec. Méd. vét. 160, 573, 1984.
12. Kume K., Nakai T., Yoshikawa H., Oyamada T., Yoshikawa T.: Proc. 9th Intern. Pig Vet. Soc. Congr., Barcelona, 1986, s. 223.
13. Martineau-Doize B., Martineau G., Dhém A.: Zentbl. Vet. Med. C 11, 193, 1982.
14. Nagy L. K., Mackenzie T., Scarnell J.: Proc. 9th Intern. Pig Vet. Soc. Congr., Barcelona, 1986, s. 224.
15. Nakagawa M., Shimizu T., Motoi Y.: Natn. Inst. Anim. Hlth Qt., Tokio 14, 61, 1974.
16. Nielsen J. P., Bisgaard M., Pedersen K. B.: Acta path. microbiol. immun. scand. Sect. B 94, 203, 1986.
17. Oyamada T., Yoshikawa T., Yoshikawa H., Shimizu M., Nakai T., Kume K.: Jap. J. vet. Sci. 48, 377, 1986.
18. Pedersen K. B., Barfod K.: Nord. Vet. Med. 33, 513, 1981.
19. Pedersen K. B., Barfod K.: Nord. Vet. Med. 34, 293, 1982.
20. Pedersen K. B., Elling F.: J. Comp. Path. 94, 231, 1981.
21. Pedersen K. B., Nielsen J. P., Foged N. T., Elling F., Nielsen N. C., Willeberg P.: Vet. Rec. 122, 190, 1988.
22. Pijoan C., Lastra A., Ramirez C., Leman A. D.: J. Am. vet. med. Ass. 185, 522, 1984.
23. Ross R. F., Duncan J. R., Switzer W. P.: Vet. Med. 58, 566, 1963.
24. Rudy A., Giedroń A., Tarasiuk K.: Medycyna Wet. 42, 214, 1986.
25. Rutter J. M., Collings L.: The virulence of Bordetella bronchiseptica in atrophic rhinitis of pigs, w: Atrophic rhinitis in pigs, red. K. B. Pedersen, N. C. Nielsen, Office Official Publ. Europ. Communities, Luxembourg, 1983.
26. Rutter J. M.: Adv. vet. Sci. comp. Med. 29, 239, 1985.
27. Sawata A., Nakai T., Tsuji M., Kume K.: Jap. J. vet. Sci. 46, 141, 1984.
28. Schimmelpfennig H., Jahn B.: Dt. tierärztl. Wschr. 95, 285, 1988.
29. Schöss P.: Dt. tierärztl. Wschr. 89, 176, 1982.
30. Schöss P.: Clinical diagnosis of atrophic rhinitis, w: Atrophic rhinitis in pigs, red. K. B. Pedersen, N. C. Nielsen, Office Official Publ. Europ. Communities, Luxembourg, 1983.
31. Schöss P.: Tierärztl. Umsch. 41, 281, 1986.
32. Seffner W., Heckendorf U.: Mh. Vet.-Med. 28, 941, 1973.
33. Switzer W. P.: J. Am. vet. med. Ass. 123, 45, 1953.
34. Switzer W. P.: Am. J. vet. Res. 17, 478, 1956.
35. Switzer W. P.: Dt. tierärztl. Wschr. 70, 216, 1963.
36. Tratwal Z.: Medycyna Wet. 37, 212, 1981.
37. Underdahl N. R., Socha T. E., Doster A. R.: Am. J. vet. Res. 43, 622, 1983.
38. Volkova A. M.: Sb. nauč. Trud. Mosk. Vet. Akad. 79, 124, 1975.
39. Yoshikawa T., Hanada T.: Jap. J. vet. Sci. 43, 221, 1981.

Adres autora: dr Tadeusz Frymus, ul. Dunikowskiego 5 m. 15, 02-784 Warszawa

ZYGMUNT CYGAN

## Aktywność immunogenna autoszczepionki Closeptivac przygotowanej przeciwko bradsetowi owiec

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

Bradset owiec powoduje często poważne straty sięgające nawet 50 proc. padłych zwierząt w stadzie (wg 1, 21). Wobec gwałtowności zachorowań tylko dostępność swoistej szczepionki stanowi realną możliwość wygaszenia takich enzootycznych ognisk (8). Odpowiedzialna za toksoinfekcję laseczka *C. septicum* występuje dość powszechnie w przewodzie pokarmowym różnych zwierząt (9), a także w ziemi niektórych rejonów (1, 2, 9, 10), stając się — w sprzyjających okolicznościach — źródłem nękających zakażeń wychodzących z błony śluzowej trawieńca (9, 16), gdzie następuje rozwój i penetracja zarazka w głąb tkanek, warunkowana wpływem różnych toksyn, przede wszystkim letalnej alfa (10, 11, 15). Wspomniany drobnoustrój jest poza tym sprawcą przyrannych i endogennych schorzeń u bydła oraz koni (12, 18, 20, 22).

Wykładnię zwalczania bradsetu tworzy stała gotowość do stosowania czynnej immunizacji zagrożonych zwierząt (8). Warunkiem jednak uzyskania aktywnej szczepionki, dotychczas nie produkowanej w kraju, jest wyizolowanie chorobotwórczych szczepów, w dodatku o ustabilizowanych właściwościach toksynogennych.

W związku z powyższym celem niniejszych badań było wyosobnienie — od padłych na bradset owiec — izolatów *C. septicum*, scharakteryzowanie ich toksyn, nadto wyprodukowanie immunogennej autoszczepionki, określenie dawek i sprawdzenie jej wartości ochronnych w czynnym ognisku choroby.

### Materiał i metody

Izolacja szczepów. Kroplę płynu wysiękowego z jamy otrzewnowej, a także zawartości trawieńca, wysiewano na podłoże Zeisslera, inkubowane przez 2 dni metodą pyrogalolową (19). Podejrzane kolonie wycinano wraz z agarem i wprowadzano na dno próbek z podłożem VF wzbogaconym o dodatek 0.5% glukozy (czas namnażania w 37°C — kilkanaście godzin, uzyskane hodowle sprawdzano na brak zamieszczzeń mikroflorą tlenową).

Identyfikacja. Dla ustalenia gatunku bakteryjnego stosowano seroneutralizację (SN) w oparciu o odczyn letalny przeprowadzony na zakażanych dootrzewnowo myszach (reagenty: odwirowany płyn z 24-godzinnej kultury bakteryjnej w pożywce VF jako źródło toksyny, dawka 0,5 ml, zobojętnianie aktywności letalnej surowicą antytoksyzną produkcji Wellcome Reagents Ltd., czas wiązania — 60 min.).

Badane toksyny:

— alfa wykrywana odczynem letalnym i charakteryzowana liczbą  $DLM_{100}$ /ml hodowli;  
— beta (dezoksyrybonukleaza) mianowana metodą leukocytową wg Warrack i wsp. (23) oraz Meisla i wsp. (14), wyniki przedstawiane w tzw. dawkach wskazujących („dosis indicating”) w przeliczeniu na 1 ml supernatantu hodowli (miano toksyny = najwyższe jej rozcieńczenie powodujące destrukcję jąder 50% leukocytów);

— gamma (hialuronidaza) oznaczana metodą ACRA, adaptowaną przez Oakleya i Warrack (17), przy czym za 1 jednostkę hialuronidazy przyjęto najmniejszą ilość toksyny powodującą utratę lepkości 1 dawki wsk. substratu (mieszanina kwasu hialuronowego z czerwieńią Kongo);

— delta (hemolizyna) wykrywana wg techniki zastosowanej w pracy Meisla i Albrycht (13, 1 jedn. aktywności hemolitycznej — *dosis haemolytica minima* DHM = najmniejsza dawka toksyny powodująca wyraźny ślad hemolizy, końcowe wyniki przeliczane na ilość DHM/ml).

Autoszczepionka Closeptivac. Przygotowano ją z hodowli najbardziej toksynogennych szczepów *C. septi-*

cum (C88<sub>2</sub> i C88<sub>3</sub>), inaktywowanej dodatkiem formaliny (0,7%) i adsorbowanej w pH 6,3 wodorotlenkiem glinu (10%).

Próby. Badaniem poddano próby krwi (ogółem 68) pochodzące od 28 immunizowanych owiec (8 doświadczalnych, dawki zróżnicowane 5—25 ml, sprawdzanie sześciokrotne poziomu przeciwciał, a 20 zwierząt terenowych z miejscowości Ł., określanie antytoksyn jednokrotne, dawka 10 ml, s.c.).

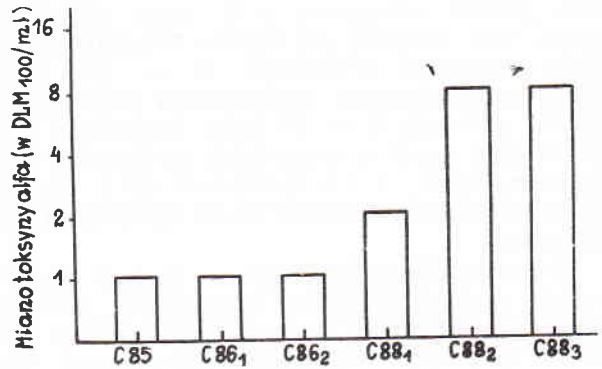
Mianowanie antytoksyn. Wykonywano odczyn seroneutralizacji z użyciem — jako reagentów — odwirowanej krwi (3000 obr./min. — 15 min.) oraz toksyny alfa (wirowanie 4500 obr./min. — 1 godz.). Aktywność toksyny alfa oznaczano w DLM<sub>100</sub>/ml (dawka dla myszy 0,5 ml, i.p., czas obserwacji zwierząt 24 godz.). Inkubacja reagentów w 37°C w ciągu 1 godz., a wyniki wyrażano liczbą jednostek antytoksynicznych zawartych w ml (1 jedn. antyt. = najwyższe rozcieńczenie surowicy zobojętniające 1 dawkę DLM<sub>100</sub> toksyny).

Wyniki i omówienie

Z badanych materiałów (wysiłek z jamy otrzewnowej i treść trawieńca), pobranych od padłych nagle 6 owiec (wiek 1—6 lat, 3 ogniska choroby — 85, 86, 88), wyosobniono 6 szczepów (C85, C86<sub>1</sub>, C86<sub>2</sub>, C88<sub>1</sub>, C88<sub>2</sub>, C88<sub>3</sub>), które zidentyfikowano jako *C. septicum* (pełna neutralizacja właściwości letalnych zarazka możliwa jedynie surowicą antytoksyniczną *C. septicum*). Moc wytwarzanej — przez poszczególne izolaty — toksyny alfa nie była jednakowa (ryc. 1). Najbardziej toksynogenne szczepy C88<sub>2</sub> i C88<sub>3</sub> produkowały czynnik letalny w koncentracji 16 DLM<sub>100</sub>/ml wykazując stabilność w tej aktywności (wahania w zakresie 8—16 DLM<sub>100</sub>/ml).

Właściwości toksynogenne wszystkich 6 izolatów zbadanych pod względem wytwarzania pozostałych czynników chorobotwórczych, tj. beta (dezoksyrybonukleaza), gamma (hialuronidaza) i delta (hemolizyna), przedstawia tab. 1. Wynika z niej, że tylko antygen delta występował w jednakowej koncentracji (2 DHM/ml), podczas gdy zawartość dalszych toksyn była zróżnicowana (beta od 320 do 2560 dawek wsk./ml, a gamma 64 — 256 dawek wsk./ml), ale najaktywniejsze szczepy C88<sub>2</sub> i C88<sub>3</sub> wyróżniały się również dobrą produkcją obu tych enzymów (poziom dezoksyrybonukleazy i hialuronidazy kolejno 1280 i 128 dawek wsk./ml). Izolaty te charateryzowała zatem, obok wysokiej mocy letalnej (toksyna alfa 8 — 16 DLM<sub>100</sub>/ml), także silna inwazyjność (jej determinanty — antygeny beta i gamma). Dlatego tylko one zostały wykorzystane do przygotowania autoszczepionki Closeptivac.

Na wstępie prowadzonej oceny preparatu Closeptivac, sporządzonego z bardzo toksycznej hodowli (toksyna alfa w mianie 16 DLM<sub>100</sub>/ml), sprawdzono zdolność stymulowania nim antytoksyn — w dodatku różnymi dawkami (5—25 ml) — i czas utrzymywania się ciał odpornościowych w krwi — po jednorazowej iniekcji — u 8 owiec doświadczal-



Ryc. 1. Wytwarzanie toksyny alfa przez wyosobnione szczepy *C. septicum*

Tab. 1. Aktywność toksynogenna szczepów *C. septicum* w zakresie innych toksyn

Szczepy	Toksyny		
	beta (dawek wsk./ml)	gamma (dawek wsk./ml)	delta (DHM/ml)
C 85	320	128	2
C 86 <sub>1</sub>	640	64	2
C 86 <sub>2</sub>	320	64	2
C 88 <sub>1</sub>	2560	256	2
C 88 <sub>2</sub>	1280	128	2
C 88 <sub>3</sub>	1280	128	2

Tab. 2. Utrzymywanie się antytoksyn przeciwko toksynie alfa w krwi immunizowanych różnymi dawkami owiec

Nr owcy	Dawka szczepionki (w ml)	Czas od uodpornienia (w dniach)					Miano w jednostkach antytoksynicznych/ml
		8	15	27	35	44	
1	25	2	4	1	1	0	0
2	10	2	16	2	4	1	2
3	7	2	4	2	4	1	1
4	5	2	4	2	2	1	0
5	5	2	4	1	1	1	0
6	5	2	4	1	1	1	0
7	5	2	4	1	1	1	0
8	5	2	2	1	1	0	0

Tab. 3. Koncentracja antytoksyn w krwi uodpornionych owiec ze stada terenowego Ł

Grupa owiec	Wysokość miana (w jedn. antyt./ml)				Ogółem owiec
	1	2	4	8	
A	2				2
B			15		15
C				1	1
D					2
<b>Razem</b>					<b>20</b>

nych (tab. 2). Okazało się, że poziom przeciwciał, jeszcze jednakowy w 8 dniu (2 jedn. antyt./ml), zmieniał się szybko osiągając w 15 dniu apogeum wynoszące 2 — 16 jedn. antyt./ml (najwyższa koncentracja przy dawce 10 ml wynosiła 8 — 16 jedn. antyt./ml), aby w 51 dniu spaść u wszystkich zwierząt z wyjątkiem owiec 3 i 4 (zawartość od 1 do 2 jedn. antyt./ml po dawce 10 ml uznanej za optymalną).

Preparat Closeptivac dobrze spełnił oczekiwania praktyków, gdyż zastosowany podczas enzootii bradsotu w Ł. (śmierć 27 spośród 100 owiec w stadzie) całkowicie zlikwidował dalsze padnięcia. Zatem nie zaskakuje wysoki poziom wykrywanych antytoksyn wynoszący — po 4 tyg. od uodpornienia zwierząt — od 1 do 16 jedn. antyt./ml, najczęściej jednak 4 jedn. antyt./ml (tab. 3). Wynik ten popiera tezę o zasadniczej, może nawet dominującej roli przeciwciał antytoksycznych spośród wszystkich antygenów *C. septicum* biorących udział w działaniu ochronnym (3). Poza tym wydaje się, że jednokrotną nawet iniekcją autoszczepionki Closeptivac można uzyskać pełną protekcję owiec na zakażenie, co przeczyłoby postulowanej zasadzie o potrzebie dwukrotnej immunizacji (11, 16).

Wyższą jeszcze niż owce wrażliwość na infekcje *C. septicum* wykazuje bydło (9). Schorzenia tej etiologii, opisywane u nas od dawna (4, 5, 6), stawały się nawet niekiedy prawdziwym problemem (60 krów padłych w miejscowości P, wg 7, kiedy indziej 356 przypadków śmierci bukatów podczas enzootii w K, wg 6). W takich ogniskach czynne uodpornienia zwierząt stanowią najlepszy sposób ograniczenia strat (w USA zużywa się rocznie 7 milionów dawek, cyt. wg 3).

### Wnioski

1. Autoszczepionka Closeptivac stymuluje wysoką odporność antytoksyczną przeciwko bradsotowi owiec (poziom przeciwciał najczęściej 4 — 16 jedn. antyt./ml po jednokrotnej dawce 10 ml), a zastosowana w czynnym ognisku tej choroby całkowicie likwiduje padnięcia zwierząt.

2. Powstały bezwzględnie uzasadnienia do uruchomienia w kraju produkcji tego preparatu na większą skalę.

### Piśmiennictwo

1. Beer J. i wsp.: Choroby zakaźne zwierząt domowych, przekład H. Janowski i wsp., PWRL, Warszawa 1980.
2. Blood D. C., Radostitis O. M., Henderson J. A., Gay C. C.: Veterinary Medicine, Bailliere Tindall, London 1983.
3. Cardella M. A., Kolbe D. R.: Develop. biol. Stand. 32, 1976, s. 115.
4. Cygan Z., Kucharski B.: Medycyna Wet. 22, 18, 1966.
5. Cygan Z., Wawrzkiwicz K.: Medycyna Wet. 22, 518, 1966.
6. Cygan Z., Wołoszyn S., Guzik Z., Jakubowicz W.: Medycyna Wet. 40, 195, 1984.

7. Jakubowicz W.: Clostridia w zakażeniach mięsni u bydła i owiec, praca doktorska, Lublin 1986.
8. Jensen R.: Diseases of sheep, Lea and Febiger, Philadelphia 1974.
9. Kennedy K.: Develop. biol. Stand. 32, 1976, s. 1.
10. MacLennan J. D.: Bact. Rev. 26, 177, 1962.
11. Martin W. B.: Diseases of sheep, Blackwell Scientific Publ., London — Boston — Melbourne 1983.
12. McLaughlin S. A., Rebhun W. C., Winkle T. J.: Equine Pract. 1, 17, 1979.
13. Meisel H., Albrzycht H.: Med. dośw. 1, 27, 1955.
14. Meisel H., Rymkiewicz D., Kudelski Z.: Bull. Acad. pol. Sci. Ser. biol. 9, 391, 1961.
15. Moussa R. S.: J. Bact. 76, 538, 1958.
16. Newsom I. E.: Sheep diseases, Williams and Wilkins Comp., Baltimore 1952, s. 16.
17. Oakley C. L., Warrack G. H.: J. Path. Bact. 63, 45, 1951.
18. Pedrizet J. A., Callhan D. R., Shin S. J.: Cornell Vet. 77, 328, 1987.
19. Pesti L.: Acta vet. hung. 15, 447, 1965.
20. Rebhun W. C., Shin S. J., King J. M., Baum K. H.: J. Am. vet. med. Ass. 187, 732, 1985.
21. Smith L. D.S.: The pathogenic anaerobic bacteria, Ch. C. Thomas, Publisher, USA 1975.
22. Smith L. D.S.: Adv. Vet. Sci., Acad. Press Inc., Publishers, New York, v. III, 1957, s. 494.
23. Warrack G. A., Bidwell E., Oakley C. L.: J. Path. Bact. 63, 293, 1951.

Adres autora: prof. dr hab. Zygmunt Cygan, ul. Żelazowej Woli 6 m 13, 20-854 Lublin

### Cygan Z. — Immunogenic activity of an autovaccine Closeptivac prepared against braxy

Six strains of *Clostridium septicum* were isolated from the content of the abomasum and the exudation of the peritoneal cavity of the suddenly died sheep. The disease occurred in three different flocks. Two isolates, C88<sub>2</sub> and C88<sub>3</sub>, most pathogenic producing among others alpha toxin at the concentration of 16 DLM<sub>100</sub>/ml. were used to prepare an autovaccine Closeptivac. The vaccine administered in the flock afflicted with the disease (out of 100 sheep 17 died) elicited a high antitoxic immune response following a single injection of the vaccine. The level of antibodies ranged between 4—16 units/ml and protected all the animals from the disease.

PETERS A. R.: Zmiany w oporze elektrycznym śluzówki pochwy krów, u których zastosowano prostaglandynę. (Changes in electrical resistance of the vaginal mucosa in prostaglandin treated ewes). Vet. Rec. 124, 505—507, 1989 (19)

Dziesięć krów (krzyżówka hereford-fryzy) otrzymało w iniekcji podskórnej między 5 a 6 dniem cyklu jajnikowego po 1 mg fenoprostalenu. Iniekcje powtórzone po 17 dniach. Przebieg cyklu jajnikowego kontrolowano oznaczając codziennie stężenie progesteronu w plazmie krwi. Równocześnie dokonywano pomiarów oporu elektrycznego śluzówki pochwy aparatem Wallsmeta. Luteoliza pojawiała się po wykonaniu 13 z 20 iniekcji, zaś stężenie progesteronu w plazmie tych krów osiągało wartość minimalną w okresie 40 h po iniekcji (średnio 7,60±0,40 ng/ml). Wśród 13 przypadków szybkiej luteolizy, którą wykryto w oparciu o spadek poziomu progesteronu, opór elektryczny śluzówki pochwy obniżył się w 10 przypadkach, nie wzrastał w trzech przypadkach (wyniki fałszywie ujemne). W trzech przypadkach uzyskano wyniki fałszywie dodatnie — przy braku spadku poziomu progesteronu po iniekcji fenoprostalenu obniżył się opór elektryczny błony śluzowej pochwy.

G.