

i wsp. (10) w przypadku IgG1 osiąga wartość 1 g/dziennie, to jednak jest ona zbyt mała, aby zapewnić odpowiedni stopień protekcji w okresie pierwszych trzech tygodni życia. Stąd też, jak powszechnie wiadomo, odpowiednie żywienie osesków siarą zapobiega występowaniu niedoborów odporności. Zawarte w siarze elementy odporności humoralnej i komórkowej tworzą bowiem wysoce skuteczny mechanizm obrony organizmu noworodka przed infekcją, do czasu przejścia przez układ immunologiczny cieląt swojej funkcji.

Piśmiennictwo

- Blom J. Y.: Nord. VetMed. 34, 276, 1982.
- Bouda J., Jagoš P., Klimeš J., Minksova E., Jonakova V.: Vet. Med. Praga 32, 135, 1987.
- Broom D. M.: Ann. Rech. Vet. 14, 342, 1983.
- Buntain B. J., Selman I. E.: Vet. Rec. 107, 745, 1980.
- Cabeilo G., Leveux D.: Ann. Rech. Vet. 9, 309, 1978.
- Cabeilo G., Leveux D.: Ann. Rech. Vet. 11, 1, 1980.
- Caldow G. Z., White D. G., Kelsey M., Peters A. R., Solly K. J.: Vet. Rec. 122, C3, 1988.
- Clover C. K., Zarkover A.: Am. J. vet. Res. 41, 1002, 1980.
- Concha C.: Nord. VetMed. 38, 157, 1986.
- Devery J., Davis C., Larson B.: J. Dairy Sci. 62, 1814, 1979.
- Devery J. E., Larson B. L.: J. Dairy Sci. 66, 221, 1983.
- Dobbelaar P., Noordhuizen J. P., Van Keulen K. A. S.: Prev. Vet. Med. 5, 51, 1987.
- Donovan G., Badinga L., Collier R., Wilcox C., Braun R.: J. Dairy Sci. 69, 554, 1986.
- Fallon R. J.: Ann. Rech. Vet. 9, 347, 1978.
- Foley J. A., Otterby D. E.: J. Dairy Sci. 61, 1033, 1978.
- Gay C. C., McGuire T. C., Parish S. M.: J. Am. vet. med. Ass. 183, 566, 1983.
- Geene J. J.: Tijdschr. Diergeneesk. 111, 571, 1986.
- Geene J. J.: Tijdschr. Diergeneesk. 111, 576, 1986.
- Geene J. J.: Tijdschr. Diergeneesk. 111, 584, 1986.
- Guidry A. J., Paape M. J., Pearson R. E.: J. Dairy Sci. 63, 611, 1980.
- Guilloteau P., Touillec R., Garnot P., Martin P., Brule G.: Reprod. Nutr. Dev. 20, 1279, 1980.
- Husband A. J., Lascalles A. K.: Res. Vet. Sci. 18, 201, 1975.
- Jagoš P., Bouda J., Klimeš J., Mužik J.: Vet. Med. Praga 30, 649, 1985.
- Johnston N. E., Stewart J. A.: Aust. vet. J. 63, 191, 1986.
- Kruse P. E.: Ann. Rech. Vet. 14, 349, 1983.
- Kruse V.: Anim. Prod. 12, 119, 1970.
- Larson B., Heary H., Devery J.: J. Dairy Sci. 63, 685, 1980.
- Logan E. F.: Br. vet. J. 133, 120, 1977.
- Logan E. F.: Vet. Sci. Commun. 2, 39, 1978.
- Logan E., Murray C., O'Neill D., McParland P., McRory E.: Br. vet. J. 134, 758, 1978.
- Marx D. B., Stot G. D.: J. Dairy Sci. 62, 1819, 1979.
- Matte J. J., Girard C. L., Seoane J. R., Brisson G. J.: J. Dairy Sci. 65, 1765, 1982.
- McEwan A. D., Fisher E. W., Selman I. E.: J. comp. Path. 80, 259, 1970.
- Nickerson S. C.: Agri-Pract. 9, 28, 1983.
- Nickerson S. C.: Agri-Pract. 9, 32, 1983.
- Nightengale G. T., Stott G. H.: J. Dairy Sci. 64, 236, 1981.
- Norman L. M., Höhenboken W. D.: J. Anim. Sci. 53, 1465, 1981.
- Odde K. G.: Ed. Anim. Pract. 4, 501, 1988.
- Osburn B., Stabenfeldt G., Ardans A., Trees C., Sawyer M.: J. Am. vet. med. Ass. 164, 195, 1974.
- Osburn B. J., MacLachlan N. J., Terrell T. G.: J. Am. vet. med. Ass. 181, 1049, 1982.
- Paulik S., Slanina L., Malovec B., Polaček M.: Vet. Med. Praga 29, 137, 1984.
- Paulik S., Slanina L., Polaček M.: Vet. Med. Praga 30, 21, 1985.
- Pfeifer N., McGuire T.: J. Am. vet. med. Ass. 170, 809, 1987.
- Penhale W., Logan E., Selman I., Fisher E., McEwan A. D.: Ann. Rech. Vet. 4, 223, 1973.
- Pinciro A., Ortega F., Uriel J.: Biochim. biophys. Acta 379, 201, 1975.
- Pineiro A., Brock J. H., Esparza I.: Ann. Rech. Vet. 9, 281, 1978.
- Rainard P., Poutrel B., Caffin J. P.: Ann. Rech. Vet. 13, 321, 1982.
- Roy J. H. B.: J. Dairy Sci. 63, 650, 1980.
- Rzedzicki J., Gliński Z., Wernicki A.: Medycyna Wet. 36, 176, 1980.
- Rzedzicki J., Mikucki J.: Medycyna Wet. 39, 477, 1983.
- Rzedzicki J., Trawińska B.: Medycyna Wet. 42, 609, 1986.
- Ruckebush Y., Dardillat C., Guilloteau P.: Ann. Rech. Vet. 14, 330, 1983.
- Saif L., Redman D., Smith K., Theil K.: Infect. Immun. 41, 1118, 1983.
- Sandholm M., Honkanen-Buzalski T.: Acta vet. scand. 20, 469, 1979.
- Schultz R. D.: J. Am. vet. med. Ass. 163, 804, 1973.
- Statley T. E., Bush L. J.: J. Dairy Sci. 68, 184, 1985.
- Stott G. H.: J. Dairy Sci. 63, 681, 1980.
- Stott G. H., Fellach A.: J. Dairy Sci. 66, 1319, 1983.
- Studzinski T., Czarnecki A., Głuszak A., Radymka-Wawrzyński K.: Medycyna Wet. 45, 438, 1989.
- Studzinski T., Czarnecki A., Głuszak A., Radymka-Wawrzyński K.: Medycyna Wet. 45, 569, 1989.
- Watson D. L.: Aus. J. biol. Sci. 33, 403, 1980.
- White D. G., Andrews A. H.: Vet. Rec. 119, 112, 1986.
- Williams P., Wright C., Day N.: Br. vet. J. 136, 561, 1980.

Adres autora: prof. dr hab. Jerzy Rzedzicki, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

ZYGMUNT CYGAN, JAN BUCZEK *

Nieenterotoksynogeny beztlenowiec *C. perfringens* A przyczyną biegunki cieląt *)

Zakład Higieny Weterynaryjnej, ul. Słowicza 2, 20-336 Lublin
* Katedra Mikrobiologii Weterynaryjnej Wydziału Weterynaryjnego AR, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

Summary

Nonenterotoxinogenic Anaerobe *C. Perfringens* C as a Cause of Calf Diarrhoea

In two farms (A and B) losses of calves in the first 2–3 days after birth caused by diarrhoea were 25,20% and 36,50%. Bacteriological examinations of the intestines revealed an especially high concentration ($2,4 \times 10^9$ – $3,6 \times 10^{10}$ cells/g) of the highly toxinogenic „in vitro” *C. perfringens* A. Contents of intestines were, however, free of lethal toxins. Examinations of pathological properties of *C. perfringens* A isolates showed that they produced strong alpha, theta and kappa toxins, and the majority of isolates additionally produced mi and ni toxins. Lack of toxins in the intestines may result from their quick binding with body tissues. This observation is confirmed by the high effectiveness of prophylactic measures i.e. immunization of animals against alpha toxin (article in preparation). The result point to the role of nonenterotoxinogenic strains of *C. perfringens* A, producing alpha toxin, in the etiology of diarrhoea of newborn calves.

Znaczenie *C. perfringens* A w patologii cieląt, bezdyskusyjne w odniesieniu do zakażeń przyrannych (beztlenowcowe zapalenie tkanek, zgorzel gazowa, wg 4), wymaga dalszych badań przy sugerowanej — coraz częściej (6, 7, 24) — odjelitowej drodze oddziaływania drobnoustroju (7, 19, 20). W tym przypadku trudno jest ocenić wpływ zarazka, który stanowiąc stały składnik mikroflory przewodu pokarmowego podlega w pewnych tylko warunkach ewidentnemu w nim namnożeniu (stres żywieniowy, transportowy, wg 2, 12). Wtedy ekspresję klinicznych zaburzeń wyraża stan zapalny błony śluzowej jelit, a w następstwie biegunka (11), rzadziej uszkodzenie czerwonych krwinek (20), chociaż, co należy podkreślić, wykazanie głównej toksyny tego sero-

*) Praca finansowana przez KBN Nr umowy PB 1599/5/91.

typu, a mianowicie antygeny alfa zwykle zawodzi (14). Nie zostaje zatem najczęściej spełniony postulat obowiązujący w klasycznych beztlenowcowych enterotoksemiami (typy B, C, D, E), ale ścisły związek ewidentnego namnożenia *C. perfringens* A w przewodzie pokarmowym z rozwojem symptomatycznych zaburzeń sugestywnie przekonuje — w takich przypadkach — o przyczynowej roli tego drobnoustroju (6, 7, 22, 24).

W związku z tym celem badań własnych było ustalenie etiologii choroby u cieląt, manifestującej się głównie biegunką, oraz określenie toksyczności wyisobnionych szczepów z zamiarem ich wykorzystania do uodporniania narażonych na zachorowanie cieląt (następna publikacja).

Materiał i metody

Zwierzęta. Przebadano bakteriologicznie zawartość jelit cienkich i wycinki narządów mięsowych (serce, wątroba, nerka) pobrane bezpośrednio po śmierci od 10 cieląt w wieku 2—3 dni (5 stado A, 5 stado B).

Izolacja. Bakterii beztlenowych poszukiwano wykonując posiewy z jelit i narządów mięsowych na selektywne podłoże Zeisslera z neomycyną (10 µg/ml, wg 3). Inkubację prowadzono przez kilkanaście godzin w 37°C metodą pyrogallolową wg Pestiego (16). Podejrzane kolonie wycinano wraz z agarem i wprowadzano na dno probówek z pożywką Wrzoska. Uzyskane kultury kontrolowano na brak zanieczyszczeń mikroflorą tlenową (wysiew na podłoże Zeisslera bez neomycyny, inkubacja w atmosferze tlenowej). Obecność chorobotwórczych tlenowców sprawdzano w sposób rutynowy (posiew na agar z krwią, SS, czas inkubacji w 37°C — 18 godz.).

Toksyny letalne. Z zawartości jelit cienkich sporządzano 50% wyciągi w płynie fizjologicznym z dodatkiem antybiotyków (400 j./ml penicyliny, 200 µg/ml streptomycyny). Płyn z nad osadu, uzyskany po odwirowaniu (4000 obr./min. — 1 godz.), wprowadzano w dawce 0,5 ml w formie natywnej i po trypsynizacji (supernatant poddany działaniu 2% trypsyny, inkubacja w 37°C w ciągu 45 min.) dootrzewnowo myszom (czas obserwacji zwierząt 2 dni).

Identyfikacja. Określano serotyp toksyny letalnej w wyciągach i płynach odwirowanych hodowli bakteryjnych (podłoże VF z 0,5% glukozy) neutralizowanych przy użyciu monowalentnych surowic antytoksynicznych *C. perfringens* A, B, C, D, E (Wellcome Reagents Ltd Anglia). Pobrane płyny w objętości 0,5 ml łączono z 0,2 ml monowalentnej surowicy antytoksynicznej i wprowadzano białym myszkom (reagenty wcześniej wiązane w 37°C w ciągu 45 min., obserwacja zwierząt 24 godz.).

Skład toksyn. Określono dla wszystkich szczepów ilościowy skład wytwarzanych komponent toksycznych, tj. alfa, theta, kappa, mi oraz ni.

Tab. 1. Wielkość strat powodowanych padnięciami cieląt

Gospodarstwo	Roczna liczba cieląt		% padnięć
	ogółem	padłych	
A	71	18	25,2
B	148	54	36,5

Tab. 2. Właściwości toksynotwórcze szczepów *C. perfringens* A

Oznaczenie szczepu	Wytwarzane toksyny					
	alfa		theta	kappa	mi	ni
	DLM ₁₀₀ /ml	jedn. zm./ml	DHM/ml	DCM/ml	jedn. hial./ml	dawek wsk/ml
A-1	4	2000	100	2	256	10
A-2	8	4000	100	4	1024	100
A-3	4	1000	20	1	—	—
A-4	4	1000	20	1	256	10
A-5	8	2000	200	4	512	100
B-6	8	4000	200	4	512	10
B-7	8	4000	100	1	128	10
B-8	4	2000	20	1	—	10
B-9	4	1000	20	1	—	—
B-10	8	2000	100	4	1024	100

Toksynę alfa mianowano jako czynnik letalny dla białych myszy (wyniki przedstawiono w DLM₁₀₀/ml) i lecytynazowy (oznaczono liczbę jednostek zmętnieniowych w 1 ml).

Antygen theta (hemolizyna) określano odczynem hemolitycznym według metodyki stosowanej w poprzednich pracach (3, 5), a wyniki podano w jednostkach hemolitycznych DHM (Dosis Haemolytica Minima).

Czynnik kappa (kolagenaza) poszukiwano — przy użyciu kolagenu — metodą opisaną w pracy poprzedniej (3).

Toksynę mi (hialuronidaza) oznaczono testem ACRA według Oakleya i Warracka (15). Za jednostkę aktywności hialuronidazy przyjmowano najmniejszą ilość enzymu powodującego utratę lepkości tzw. 1 dawki wskazującej (dosis indicating) kwasu hialuronowego (WSS Warszawa), a końcowe rezultaty przeliczano na aktywność 1 ml płynu hodowli.

Komponentę ni (dezoksyrybonukleaza) identyfikowano metodą leukocytową według Warracka i wsp. (23). Moc enzymu wyrażano jako najwyższe rozcieńczenie hodowli (miano toksyny) powodujące destrukcję jąder 50% leukocytów krwi króliczej w ciągu 24 godzinnej inkubacji rozmazu w 37°C.

Inne testy. Enterotoksynę, której wytwarzanie określa zdolność szczepów do sporulacji (używano podłoża Ellnera, wg 8), określono metodą śródkórną (z użyciem świnek morskich). Badania rutynowe uwzględniały poza tym kokcydiozę (met. Fulleborna), leptospirozę (met. mikroaglutynacji) i zatrucia chemiczne (analizy w kierunku Cu, Zn).

Wyniki i omówienie

Zebrane w tab. 1 dane dowiodły, że zachorowania cieląt z objawami biegunki, jakie uporczywie występowały w 2 oborach (A i B), spowodowały wysokie w skali roku straty w odchowcie nowo narodzonych zwierząt, wynoszące 25% (gospodarstwo A: cieląt urodzonych 71, padłych 18) do 36,5% (majątek B: wycieleń 148, padnięć 54). Przyczyn tych niepowodzeń nie wyjaśniły rutynowe analizy diagnostyczne wykluczające zakażenia tlenowcami, kokcydiozę oraz zatrucie. Dopiero badania bakteriologiczne w kierunku beztlenowców wykazały obecność w jelitach (brak w narządach) w wyjątkowo wysokiej koncentracji ($2,4 \times 10^8$ — $3,6 \times 10^{10}$ /g), w dodatku w warunkach *in vitro* silnie toksynogennej, laseczki *C. perfringens* A (wytwarzanie toksyny alfa brak innych), ale przy tym nieenterotoksynogennej (bez właściwości sporulacyjnych, próby na enterotoksynę ujemne). Nie stwierdzono jednak w zawartości jelit jakichkolwiek toksyn letalnych (ekstrakty aktywowane i nie poddawane działaniu trypsyny bez wpływu na myszy).

Zachorowania dotyczyły nowo narodzonych cieląt, co najwyżej 2—3-dniowych, a główny objaw kliniczny stanowiła u nich biegunka, z reguły żółtawa, przy dłuższym przebiegu z domieszką krwi. W jej następstwie zwierzęta szybko traciły chęć do ssania,

zalegały i w stanie prostracji ginęły pomimo leczenia (stosowano antybiotyki, wlewy elektrolitów, glukozy).

Właściwości chorobotwórcze 10 wyosobnionych szczepów *C. perfringens* A ilustruje tab. 2. Wynika z niej, że wytwarzały one nadzwyczaj silną toksynę alfa (4—8 DLM₁₀₀/ml, 1000—2000 j. zm./ml), theta (20—200 DHM/ml) i kappa (1—4 DCM/ml), a większość z nich także mi (128—1024 j. hial./ml) oraz ni (10—100 dawek wsk./ml).

Blizszego omówienia wymaga fakt nie wykazania toksyny alfa w jelitach padłych cieląt. Wytlumaczyć to można jej szybkim — w miejscu wytworzenia — związaniu przez tkanki (1, 20). Co więcej — wiadomo, że wprowadzona dożylnie zanika w 90% po 5 minutach (20), a dodatkowy wpływ neutralizujący wywiera cystyna i siarkowódór (20).

Uzyskane wyniki upoważniają do uznania etiologicznej roli — w opisanej biegunce cieląt — nienterotoksynogennych, ale aktywnych w zakresie wytwarzania toksyny alfa szczepów *C. perfringens* A. Za takim poglądem przemawia wysoka koncentracja zarazka, wielokrotnie przekraczająca wartość fizjologiczną (10⁸ g, wg 20). Poza tym wyosobnione szczepy cechowała nadzwyczaj silna toksynogenność w zakresie wielu toksyn, nade wszystko alfa — znanej jako czynnik destrukcyjny błon komórkowych (19, 20) i następnych, czasem nawet krwawych biegunek (7, 20, 22) obserwowanych w badanych stadach, a wcześniej opisanych przez innych autorów (cyt.

wg 7). Ostatecznego wreszcie dowodu dostarczyły wyniki badań przekonujące o możliwości zahamowania padnięć cieląt metodą ich immunizacji przeciw toksynie alfa, dawniej sygnalizowane (cyt. wg 7), a w pełni potwierdzone we własnej pracy (następna publikacja).

Piśmiennictwo

1. Aikat B. K., Dible J. H.: J. Path. Bact. 76, 431, 1956.
2. Briant P. C., Riemann H. P., Franti C. E., Torres Anjel M.: Revue Lat. Am Microbiol. 20, 135, 1978.
3. Cygan Z.: Clostridia w narządach zwierząt zdrowych i padłych, praca doktorska, Lublin 1967.
4. Cygan Z. M.: Choroby beztlenowcowe zwierząt. Akad. Roln., Lublin 1991.
5. Cygan Z., Wawrzekiewicz K.: Medycyna Wet. 24, 518, 1936.
6. Dart A. J., Pascoe R. P., Gibson J. A., Harrower B. J.: Aust. vet. J. 65, 330, 1988.
7. Daube G.: Annls Med. vet. 136, 5, 1990.
8. Ellner P. D.: J. Bact. 71, 495, 1956.
9. Griner L. A., Bracken F. K.: J. Am. vet. med. Ass. 124, 99, 1953.
10. Hepple J. R.: Vet. Rec. 55, 203, 1952.
11. MacRae D. R., Murray E. G.: Vet. Rec. 55, 703, 1967.
12. Mansson L., Olhagen B.: Bull. Off. int. Epizoot. 67, 1319, 1967.
13. Meisel H., Albrecht H.: Med. dośw. 1, 27, 1955.
14. Montgomerie R. P.: Rev. vet. Can. 3, 439, 1981.
15. Oakley C. L., Warrack G. H.: J. Path. Bact. 63, 45, 1951.
16. Pesti L.: Acta vet. hung. 15, 447, 1955.
17. Schofield D. V., Frank W. J. Am. vet. med. Ass. 126, 192, 1955.
18. Sigurdsson S., Thorsteinsson T.: Vet. Rec. 126, 517, 1990.
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., Batty L.: Pathogenic Clostridia. Butterworths, London and Boston 1975.
22. Stubbings D. P.: Vet. Rec. 127, 431, 1990.
23. Warrack G. H., Bidwell E., Oakley C. L.: J. Path. Bact. 63, 293, 1951.
24. Worrall E. E., Ronohardjo L. N., Partoutomo S.: Vet. Rec. 121, 278, 1987.

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

JACEK KUŹMAK, LEOKADIA BICKA, JADWIGA GRUNDBOECK-JUŚKO, EWA BUZAŁA*, BOŻENA KOZACZYŃSKA

Zastosowanie metody western blot do wykrywania antygenów wirusa białaczki bydła (BLV) w limfocytach zakażonych zwierząt

Zakład Biochemii i Pracownia Patologii Komórkowej* Instytutu Weterynarii, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Summary

Application of the Western blot method for the detection of viral proteins of bovine leukaemia virus (BLV) in lymphocytes of infected cattle

The protein antigens of BLV were detected in the lysates of bovine lymphocytes stimulated *in vitro* using the Western blot method. Specific antibodies against BLV were detected in the sera of animals by the ELISA test. Protein bands of the molecular weight 72, 51, 35 and 24 kD were detected by the rabbit antiserum against BLV in the blots from infected lymphocytes and FLK cells. The proteins mentioned above were not detected in the lysates of lymphocytes of uninfected animals. Densitometry analysis of immunoblots from FLK cells indicated that a minimal amount of 100 ug of gp51 viral protein can be discovered. The presence of BLV antigens and specific antibodies were detected in 18 of 25 animals. The antibodies were also found in four cows of the remaining seven animals whose lymphocytes were free from BLV proteins.

Western blot, określane też jako immunoblot, jest techniką badawczą stosowaną do analizy białek (27). Poddane elektroforetycznemu rozdzielaniu na żelu poliakrylamidowym (SDS-PAGE) i rozfrakcjonowane pod względem ich ciężaru cząsteczkowego białka, zostają przeniesione z żelu na filtr nitrocelulozowy, gdzie wykrywane są metodami immunoenzymatycznymi (26). Identyfikacja określonych białek, widocznych w postaci barwnych prążków, następuje na zasadzie porównania ich położenia z markerem ciężaru cząsteczkowego. W opinii wielu badaczy metoda western blot, w zależności od użytego systemu detekcji, dorównuje czułością metodzie ELISA i bez wątplenia jest metodą bardziej swoistą

W diagnostyce chorób zakaźnych metodą tą oznaczone mogą być swoiste przeciwciała (4, 6), względnie białka antygenowe. To ostatnie postępowanie stosowane było do wykrywania i identyfikowania antygenów rotawirusów (21), retrowirusów (19) i wirusa RSV (23).

W prezentowanej pracy zastosowano metodę western blot do wykrywania antygenów wirusa BLV