

BIOASSAY OF SALMONELLA GALLINARUM ENDOTOXIN

Todov Kokosharov

Regional Veterinary Station, Haskovo, Bulgaria

МЕТОДА ЗА УТВДУВАЊЕ НА ЕНДОТОКСИНОТ НА SALMONELLA GALLINARUM

Тодор Кокошаров

Регионална ветеринарна станица, Хасково, Буџарија

SUMMARY

Toxic activity of *Salmonella gallinarum* endotoxin was investigated by mouse lethality and Schwartzman reaction tests. The interrelate between Schwartzman phenomena and an element (thrombocyte count) of disseminated intravascular coagulation was presented. Phenol-extracted *S. gallinarum* endotoxin produced high lethality in mice ($LD_{50} = 530 \mu\text{g} / \text{mouse}$) and caused Schwartzman reaction in rabbits. Statistical examination revealed an excellent correlation between the dose of endotoxin and mouse lethality ($r = 0.961$) and Schwartzman phenomena ($r = 0.894$). The local Schwartzman reaction was considerable more sensitive than mouse toxicity test. The blood coagulation mechanism in cocks was altered. During the first 24 h after i.v. injection of *S. gallinarum* endotoxin cocks demonstrated clinical symptoms of shock and gradually decreased of thrombocytes. Using these tests we could précis bioassay of *S. gallinarum* endotoxin. These data showed that this endotoxin disturbed the clotting system of the birds and plays the main role in pathogenesis of fowl typhoid.

Key words: *Salmonella gallinarum* endotoxin, mouse lethality, Schwartzman phenomena, clotting system, birds

INTRODUCTION

In parallel with biochemical efforts to define the active principal of endotoxin (IO) were equally intensive

КРАТКА СОДРЖИНА

Ја испитувавме реакцијата на токсичност на ендотоксинот на *Salmonella gallinarum* преку тестовите на смртност на глвци и Шварцмановата реакција. Ја покажавме врската помеѓу Шварцмановиот феномен и елементите (број на тромбоцити) на дисеминираната интраваскуларна коагулација. Ендотоксинот на *S. gallinarum* екстрахиран со фенол предизвикува висок морталитет кај глвците ($LD_{50} = 530 \mu\text{g} / \text{глушец}$) и предизвикува Шварцманова реакција кај зајаци. Статистичката обработка на податоците покажа висока корелација помеѓу дозата на ендотоксинот и морталитетот кај глвците ($r = 0.961$) и Шварцмановиот феномен ($r = 0.894$). Локалната Шварцманова реакција беше посензитивна од тестот за токсичност за глвците. Кај петлите системот за коагулација на крвта беше пореметен. Во текот на првите 24 часови по интравенозна инјекција на ендотоксин од *S. gallinarum* кај петлите се појавија клинички симптоми на шок и опаѓање на бројот на тромбоцитите. Со користењето на овие тестови развиваме метода за ендотоксинот на *S. gallinarum*. Овие резултати ни покажуваат дека овој ендотоксин го нарушува системот за коагулација кај птиците и игра главна улога во патогенезата на тифот кај живината.

Клучни зборови: *Salmonella gallinarum* ендотоксин, смртност кај глвците, Шварцманов феномен, систем на коагулација, птици

investigations to probe the mechanism responsible for endotoxin toxicity.

The median lethal dose of endotoxin in mice injected intraperitoneally has been employed routinely as a measure of toxicity of *Salmonella* (18). For the first time (9) was used rabbit skin test as a means of comparing the endotoxin activity of various preparations from *Salmonella pullorum* and other Gram-negative bacteria. They reported that endotoxin injected into the skin of normal albino rabbits produces local tissue damage that was evidenced by edema, erythema and occasionally necrosis and that severity of response was proportional to the dose of toxin injected. Later (2) was reported that the local and generalized Schwartzman reaction are the classic manifestations of abnormal clotting from endotoxin. Abnormality in coagulation is frequently observed in patients with septic shock and disseminated intravascular coagulation (DIC) is an important pathogenic factor for development of multiple organ failure and death evoked by endotoxin.

Widespread micro vascular thrombosis in various organs is a common feature of lethal septic shock and may substantially contribute to organ dysfunction (3, 13, 6, 4). Acute inflammatory illnesses including the sepsis syndrome often include a component of coagulation (11). No data concerning toxic activity of *Salmonella gallinarum* endotoxin. In this study we present the results from both the mouse lethality and Schwartzman phenomena. The observation of Schwartzman reactions interrelate with DIC (2) prompted us to investigate modes of crosstalk between these two mechanisms in present of *Salmonella gallinarum* endotoxin in a controlled fashion.

MATERIALS AND METHODS

Groups of 5 adult 10 weeks old white mice were inoculated intraperitoneally (i.p.) with 0.5 ml aliquot of serial twofold dilution (from 0.025 mg -0.05 -0.1 to 1.6 mg) of endotoxin in saline and death were recorded 12-72 hours following injections. The calculation of median lethal dose (LD₅₀) was made by the method of Reed and Mench (19). For Schwartzman phenomena we used 6 New Zealand white rabbits of both sexes weighing 2 to 3 kg in apparent health. Doses of 0.2 ml of each serial dilution (from 100 µg to 0.78 µg) were injected into closely clipped skin of the rabbits in shaved abdomen. In the usual test each rabbits received all (8) dilutions. After 20 hours all of the rabbits were given 25 µg from the same endotoxin intravenously (i.v.) into the marginal auricular vein. The spot of hemorrhagic necrosis were measured and the product of diameter was reported (20). The thrombocytes determination was performed in seven cocks six-month old Tetra SL breed for eggs, injected i.v. with *S. gallinarum* endotoxin 50 mg/kg body weight.

Blood samples for thrombocytes count were obtained at 0,1,3,5 and 24 h in melanger for red blood cells,

ВОВЕД

Паралелно со истражувањата за дефинирање на биохемиските основи на активноста на ендотоксините (10) се испитуваа и механизмите одговорни за токсичноста на ендотоксините.

Средната летална доза на ендотоксинот врз глвците рутински се користи како мерка за токсичноста на салмонелите (18). За прв пат (9) се користи и кожен тест кај зајаци како компаративна метода за токсичноста на *Salmonella pullorum* и други Грам негативни бактерии. Тие известуваат дека ендотоксинот аплициран во кожата на нормални албино зајаци предизвикува оштетување на локалното ткиво со појава на едем, еритем и повремено некроза и дека степенот на оштетување на ткивото е пропорционален со дозата на токсинот која е аплицирана. Подоцна (2) постојат податоци дека локалната и Шварцмановата реакција се класични манифестации на пореметување на коагулацијата предизвикано од ендотоксинот. Пореметување на коагулацијата често се среќава кај пациентите со септичен шок и дисеминираната интраваскуларна коагулација (ДИК) е важен патоген фактор во појавата на оштетувања на повеќе органи и смрт предизвикана од ендотоксинот.

Широкораспространетата микроваскуларна тромбоза во различни органи е честа појава кај септичните шокови и може значајно да придонесе во дисфункцијата на органите (3, 13, 6, 4). Акутното инфламаторно заболување вклучувајќи го и синдромот на сепсата, подразбира и компонента на коагулација (11). Не постојат податоци во однос на токсичната активност на ендотоксинот на *Salmonella gallinarum*. Во овој труд ги прикажуваме резултатите од тестот на смртност кај глвците и Шварцмановиот феномен.

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ

На групи од по пет 10 недели возрасни глвци им беа инокулирани интраперитонеално по 0.5 мл од растворот во сериски разредувања (од 0.025 мг до 1.6 мг) на ендотоксин и беше следен морталитетот во наредните 12-72 часови. Пресметувањето на средната летална доза (LD₅₀) беше направено со методата на Рид и Манч (19). За Шварцмановиот феномен користевме 6 Новозеландски бели зајаци од обата пола со тежина помеѓу 2 и 3 килограми. Аплицирани се дози во разредувања од по 0.2 ml, секое во кожата на абдоменот. Во тестот на секој зајак му е аплицирано од сите разредувања. По 20 часови на сите зајаци им беа аплицирани 25 милиграми од истиот ендотоксин интравенозно во аурикуларната вена. Беше мерен дијаметарот на хемора-

used vital color brillantkresylblau (Loba Chemse) in 3.8 % sodium citricum and thrombocytes were counted in Bürker camera (15). A phenol-extracted endotoxin of the original starting material (*S. gallinarum* S form) was prepared (22).

RESULTS

Results from mouse toxicity and Schwartzman phenomena are presented (Table I).

Table I. Mouse lethality and Schwartzman phenomenon of *Salmonella gallinarum* endotoxin

Dose of endotoxin (mg)	Mouse lethality (No. dead / No. injected)	Schwartzman reactions (diameter in mm)
0.78	0 / 5	0
1.56	0 / 5	0
3.12	0 / 5	3
6.25	0 / 5	3
12.50	0 / 5	4
25.00	0 / 5	5
50.00	0 / 5	5
100.00	1 / 5	7
200.00	2 / 5	N D
400.00	3 / 5	N D
800.00	5 / 5	N D

LD₅₀ of mouse lethality = 530 µg/mouse

r between the dose of endotoxin and mouse lethality = 0.961

r between the dose of endotoxin and Schwartzman phenomenon = 0.894

N D = not data

The LD₅₀ for the S form of *S. gallinarum* endotoxin was 530 µg /mouse. The maximal used dose (100 µg) endotoxin produce a lesion at least 7 mm in diameter and minimal dose from 3.12 µg caused inflamed areas of reaction 3 mm in diameter but failed to show a change at sites injected with lesser amount of toxin (Photo I). Statistical examination revealed an excellent correlation between the dose of toxin and mouse lethality ($r = 0.961$) and between the dose and the diameter of the hemorrhagic lesions ($r = 0.894$).

H	0	1	3	5	24
M ± SE	140.1 ±3.5	123.4 ±5.4	90.5 ±6.3	75.6 ±4.1	86.7 ±8.6
P <	-	0.001	0.001	0.001	0.001

Figure I. Mean thrombocyte counts of cocks given intravenously *S. gallinarum* endotoxin (see fig1.xls- attach 2)

As demonstrated in Figure I there was a significant drop in the thrombocyte level. The blood thrombocytes count gradual decreased significantly particularly

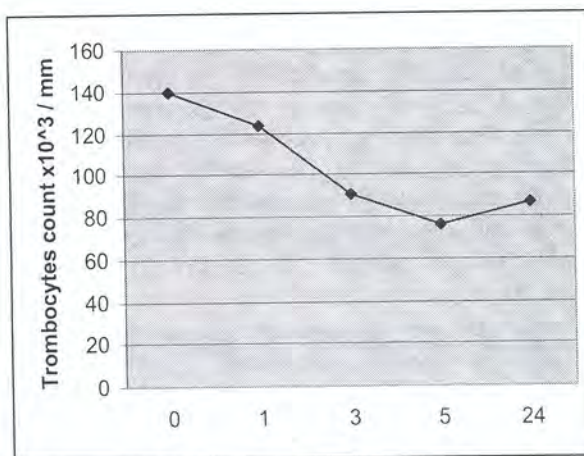
гичната некроза (20). Тестот на детерминација на тромбоцитите беше изведен со седум 6 месеци возрасни петли Тетра СЛ на кои им се аплицира интравенозно ендотоксин (50 мг/на кг телесна тежина).

Земени се и проби крв за броење на тромбоцитите и тоа 0, 1, 3, 5 и 24 часови по апликацијата во меланжер за крвни клетки, користевме брилианткрезилблау (Loba Chemse) во 3.8% натриум цитрат и тромбоцитите беа броени во Букер-ова комора (15). Исто така беше приготвен и ендотоксин од основните колонии (*S. gallinarum* S форма).

РЕЗУЛТАТИ

Утврдивме дека LD₅₀ за S формата на *S. gallinarum* ендотоксинот е 530 µg по глушец. Максималната доза која беше аплицирана (100 µg) предизвика лезии со дијаметар од 7 мм а минималната доза 3.12µg предизвика инфламаторна реакција, додека помалите дози непредизвикаа промени (слика 1). Статистичката обработка покажа одлична корелација помеѓу дозата на токсинот и смртноста на глушците ($r = 0.961$) како и помеѓу дозата и дијаметарот на хеморагичните лезии ($r = 0.894$).

Како што е прикажано во табелата 1 постои значајно намалување на бројот на тромбоцитите особено 1 час по апликацијата на ендотоксинот. Петлите



покажуваа знаци на шок што се манифестираше со сомноленца, депресија, неподвижност, губиток на апетитот и непиене вода. Ниту еден од петлите неугина. Тромбоцитопенијата и елементите на ДИК продолжија и во наредните 24 часови по интравенозната апликација на ендотоксинот. Промените беа сигнификантни ($P < 0.001$).

after the 1-st h of endotoxin application. The cocks display the symptoms of shock which manifested by somnolence, depression, reluctant to move, loss of appetite and inhibition of drinking (data not shown). None of the cocks died. The thrombocytopenia at the element of DIC continued till 24-th h following i.v. injection of *S. gallinarum* endotoxin. Changes were significant ($P < 0.001$).

DISCUSSION AND CONCLUSIONS

Data presented here tend to show that phenol-extracted *S. gallinarum* endotoxin produces high lethality in mice and causes Schwartzman reaction in rabbits. Statistical examination revealed an excellent correlation between the dose of endotoxin and mouse lethality and Schwartzman phenomena. This both tests measure the same active substance (*S. gallinarum* endotoxin) may be used as a quantitative assay for this toxin and they should be, for most practical purposes, interchangeable. The local Schwartzman reaction is considerable more sensitive than mouse lethality test.

The blood coagulation mechanism was altered (Fig. 1). In our experiment we established thrombocytopenia, as early as 1 h after the endotoxin injection of the cocks, which continued till 2.4 th h. Thrombocytopenia is an early warning sign in cases of septicemia (17) and it is an important symptom of DIC (7,16). In vivo endotoxin interacts with thrombocytes causing aggregation, destroyed cell membrane and release biologically active substances that activated the clotting system (1,8). Activated from endotoxin thrombocytes release endogenous platelet-activating factor (PAF), a potent pro-inflammatory agent (12, 5).

The data provided by this experiments indicate that the response of the cocks to the i.v. administration of *S. gallinarum* endotoxin appeared to be similar to that elicited by the use of *S. gallinarum* to induce experimental acute fowl typhoid with thrombocytopenia, hyperfibrinogenemia and circulatory changes in the hemodynamics having diagnostic values for the disseminated blood coagulation (13). Later

we demonstrated increased activity of the B-lysing in birds with experimental acute fowl typhoid (14). Perhaps they were released by activated thrombocytes (21) at coagulation of blood after action of *S. gallinarum* endotoxin. Hemorrhagic necrosis, which we observed at Schwartzman phenomena, is the result of intravascular coagulation and the selective occlusion of small vessels by fibrin polymers (2). The necrotic lesions brought about by endotoxin still constitute one of the more potent deleterious effects of those bacterial products. The number of circulating thrombocytes falls rapidly after i.v. injection



Слика 1

ДИСКУСИЈА И ЗАКЛУЧОЦИ

Презентираните резултати во овј труд покажуваат дека ендотоксинот на *S. gallinarum* кој беше екстрахиран со фенол предизвикува висока смртност кај глувците и Шварцманова реакција кај зајациите. Статистичката обработка покажа одлична корелација помеѓу дозата на ендотоксинот и смртноста кај глувците и Шварцмановиот феномен. И двата теста ја мерат истата активна супстанца (ендотоксинот на *S. gallinarum*) и можат да се користат како квантитативна метода за овој токсин. Локалната Шварцманова реакција е далеку поосетлива од тестот на смртност на глувците.

Утврдивме дека доаѓа до пореметување на механизмите на коагулација на крвта (табела 1). Во нашиот експеримент потврдивме појава на тромбцитопенија уште 1 час по апликацијата на ендотоксинот која траеше 24 часови по апликацијата. Тромбцитопенијата е ран знак во случаите

tion of *S. gallinarum* endotoxin and they are found in thrombocyte-aggregated thrombi in small vessels of the lung and liver (13).

The development of these phenomena is not specific for *S. gallinarum* endotoxin and they are secondary reactions by thrombocyte mediator system (2,16). Our studies might have led us to conclude that *S. gallinarum* endotoxin possess ability to kill mice and to disturb clotting system of birds.

Using, these tests we could précised bioassay this endotoxin. Observed clinical features and laboratory finding indicate the main role of *S. gallinarum* endotoxin in pathogenesis of fowl typhoid.

на септикемија (17) и е значаен симптом на ДИК (7,16). In vivo ендотоксинот реагира со тромбоцитите и предизвикува нивно слепување, деструкција на клеточната мембрана и ослободување на биолошки активните супстанции кои го активираат системот на коагулација (1,8). Активирани од страна на ендотоксинот, тромбоцитите ослободуваат ендоген фактор и јак проинфламаторен агенс (12,5).

Податоците кои ги добивме со овие експерименти покажуваат дека одговорот на интравенската апликација на ендотоксинот е сличен со тој при експериментално предизвикување на тиф со тромбоцитопенија, хиперфибриногемиија и промени во циркулацијата (13). Подоцна утвдивме зголемена активност на Б-лизин кај птиците со експериментален акутен тиф (14). Најверојатно е ослободен од лезираните тромбоцити (21) при коагулацијата на крвта по делувањето на ендотоксинот на *S. gallinarum*. Хеморагичната некроза кај Шварцмановиот феномен е резултат на интраваскуларната коагулација и селективната оклузија на малите крвни садови од фибринските полимери (2). Некротичните лезии се практично најголемите лезии предизвикани од ендотоксинот. Бројот на тромбоцитите во циркулацијата опаѓа брзо по интравенската апликација на ендотоксинот на *S. gallinarum* и најдени се агрегати од тромбоцити во малите крвни садови на белите дробови и црниот дроб (13).

Појавата на овие феномени не е специфична само за ендотоксинот на *S. gallinarum* и претставува секундарна реакција од тромбоцитите (2,16). Нашите истражувања потврдија дека токсинот на *S. gallinarum* поседува способност да ги убие глувците и го наруши системот на коагулација кај птиците.

Овие тестови се добар начин да ги утврдиме делувањата на ендотоксинот. Забележените клинички знаци и лабораториските наоди ја покажуваат главната улога на ендотоксинот на *S. gallinarum* во патогенезата на тифот кај живината.

REFERENCES

1. Abdelnoor A.M. (1983). Effects of LPS on the clotting system. In: Beneficial effects of endotoxin, Nowotny, A. (Ed). Plenum Press, New York and London, 75-90
2. Braude A.I. (1982). Bacterial endotoxins. In: Microbiology, Braude A.I. (Ed). Philadelphia, Saunders Co. Chapter 6, 51-61.
3. Carrico C.J., Meakins J.L., Miarshall J.C., Fry D., Maler R.V., (1986). Multiple-organ failure syndrome, Arch. Surgery, 121,196-203.
4. Collins T. (1996). Elements of vascular pathobiology in cellular and molecular pathogenesis. In: Pathobiology, : Sirica, AE (Ed). Lippincott-Raven Publ., Philadelphia, 125-155.
5. Ephgrave K., Kremer T., Broadhurst K., Cullen J. (1997). The role of platelet-activating factor in conscious normotensive endotoxemia, J. Surg. Res., 68, 170-174.

6. Fourrier A., Chopin C., Gondemand J., Hendrick S., Caron C., Rime A., Marey A., Lestavel P., (1992). Septic shock, multiple organ failure and DIC, *Chest*, 101,816-822.
 7. Girinsky T., Conard J., Samama M. (1976). Le syndromes de defibrination, *Gaz. Med. France*, 15, 1529-1533.
 8. Gonias S.L.(1996). Pathophysiology of thrombosis and blood clotting disorder. In: *Cellular and molecular pathogenesis*, Sirica, AE (Ed). Lappincott-Raven Publ., Philadelphia, 109-124.
 9. Hanks, J.H., Rettger L.F., (1932). Bacterial endotoxin. Search for a specific intracellular toxin in *Salmonella pullorum*, *J. Immun.*, 22, 283-7
 10. Holst O., Ulmer A.J., Brade N., Flad H.D., Rietschel E.T. (1996). Biochemistry and cell. biology of bacterial endotoxins, *FEMS Immun.Med. Microb.*, 16, 83-104.
 11. Johnson K., Aarden L., Chol J., de Groot E., Creasey A. (1996). The proinflammatory cytokine response to coagulation and endotoxin in Whole blood, 87,2,5051-5060.
 12. Koltai M., Hosford D., Braquat P. (1992). Role of PAF and cytokines in microvascular tissue injury. *J. Lab. Clin. Med.*, 119,461-466.
 13. Kokosharov T., Hristov H., Nicolov N. (1990). About the participation of disseminated intravascular coagulation in chickens having experimental acute typhoid, *Vet. Sbirka, Sofia*, 7-8,28-31.
 14. Kokosharov T. (1997). Factors of nonspecific resistance in hens experimentally infected with *Salmonella gallinarum*, *Vet. Med., Sofia*, 3, 135-137.
 15. Nikolov N. (1994). Ph.D. Thesis, Sofia.
 16. Pak S.G., Sivelmkova M.P. (1987). Disturbance in platelet unit hemostasis at endotoxemia and their correction with inhibitor of biosynthesis prostaglandine-indomethazin. *Biol. Sci., USSR*, 7,68-72.
 17. Samama M. (1984). Le diagnostic des syndrome de defibrination en pathologie infectieuse, *Ann. Biol. Clin.*, 42, 41-45.
 18. Ribí E., Milner K.S., Perine TD. (1959). Endotoxic and antigenic fractions from the cell wall of *Salmonella enteritidis*. Methods for separation and some biological activities. *J. Immun.*, 82,75-83.
 19. Sepetliev D. (1986). Principles of medical statistics. Medd. and Fizkult. Publ. House, Sofia.
 20. Schwartzman G. (1928). Studies on *Bacillus typhosa* toxic substance. I. Phenomen of local skin reactivity to *B. typhosus* culture filtrate. *J. Exper. Med.*, 38, 247-268.
 21. Taylor P.W. (1983). Bactericidal and bacteriolytic activity of serum against Gram-negative bacteria. *Microbiol. Rev.*, 47,1; 46-83.
 22. Westphal O., Lüderitz O., Bister F. (1952). Über der Extraction von bakterien mit phenol Wasser, *Z. Naturforsch.*, 76, 148-155.
-