

Rola beztlenowców *C. novyi* w nagłych padnięciach świń

ZYGMUNT PEJSAK, ZYGMUNT CYGAN*, JAN BUCZEK**

Zakład Chorób Świń Państwowego Instytutu Weterynaryjnego, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

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

**Katedra Mikrobiologii Weterynaryjnej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

Pejsak Z., Cygan Z., Buczek J.

The role of infection with anaerobes *C. novyi* in sudden deaths of pigs

Summary

Sudden deaths have already been reported in pigs with pathological findings suggesting Clostridia involvement. The number of cases that were noted in the period of 1995-1998 in a herd of about 2000 sows, showed a tendency to increase (from 2.5% up to 5.8%). In the post mortem examination performed on the intestine, liver, spleen and muscle samples, no anaerobic toxins were detected, while the number of Clostridia cells was found to be the highest in the liver (concentration from 3×10^4 to $2 \times 10^6/g$). A total number of 15 strains of *C. novyi* and 15 strains of *C. perfringens* were isolated from the internal organ samples (liver and spleen) taken from 5 dead pigs. Serological diagnostics was performed for 5 isolates of *C. novyi* (3 isolated from the liver, 1 from the spleen and 1 from the muscles of 5 dead sows). Four isolates of *C. novyi* were identified as serotype B and one isolate as serotype A (none of them was lethal alpha toxin producing strain). All *C. perfringens* serotypes were revealed to be defective in regard to their toxinogenic properties (low alpha toxin concentration).

The authors ruled out toxemia as a possible cause of death of the animals. However, they suggested a possible accumulation in the liver of extremely easily sporulating *C. novyi*, possibly their multiplication in vivo or even to some extent their influence by means of lecithinase production which are C (toxin β) and D (toxin γ). Such toxins were able to extend their effect on the organism by causing the vascular disorders in the liver, and perhaps in the spleen.

Keywords: *C. novyi*, toxins, sudden deaths of pigs.

Znaczenie *C. novyi* stosunkowo niezłe już poznane w odniesieniu do owiec (14, 16) i bydła (13), pozostaje otwartą, wciąż dyskutowaną kwestią w badaniach nad etiologią, nadto patomechanizmem nagłych padnięć świń (sudden death, wg 17). Drobnoustrój ten bowiem, aczkolwiek rzadko u zwierząt spotykany (11), jest podejrzewany o powodowanie niespodziewanych, niekiedy nawet znacznych strat w stadach trzody chlewnej (7). W większości jednak przeprowadzonych dotychczas badań, rozpoznanie oddziaływań tego beztlenowca, wyjątkowo kłopotliwego w hodowli (11, 16), przeprowadzono w oparciu zaledwie o zmiany sekcyjne (wg 17) i mało przekonujący z uwagi na zawodność (10), odczyn immunofluorescencyjny (fluorescent antibody test – FAT, wg 3). Natomiast udane, a stosunkowo nieliczne próby wyosobnienia *C. novyi* z tkanek padłych świń nie kończyły się z reguły identyfikacją serotypu (7), względnie w przypadku nawet zrealizowania w jakimś stopniu tych diagnostycznych wymagań (16) nie uwzględniały oceny właściwości toksynogennych drobnoustrójów (3).

W związku z powyższym celem badań własnych było opisanie przypadku nie rejestrowanych dotychczas w kraju nagłych padnięć macior sugerujących etiologię beztlenowcową schorzenia, oznaczenie liczby laseczek *Clostridium* w badanych tkankach, nadto przeprowadzenie identyfikacji serotypowej wyosobnionych szczepów i ocenę ich właściwości toksynogennych.

Materiał i metody

Zwierzęta. W gospodarstwie „Z” prowadzono rejestrację nagłych padnięć macior, określano rodzaj zmian anatomopatologicznych, oceniano związek choroby z ciążą i porą roku.

Posiewy i izolacja. Materiał z błony śluzowej jelit cienkich oraz wycinków chorobowo zmienionych mięśni, wątroby i śledziony – pochodzące od 5 padłych macior – wysiewano na selektywne podłoże Zeisslera (dodatek 50 $\mu g/ml$ siarczanu neomycyny). Inkubację prowadzono w 37°C przez 2 dni w atmosferze beztlenowej metodą Gas Pak (zestaw bioMérieux, Francja). Następnie podejrzone, pojedyncze kolonie wycinano wraz z agarem i wprowadzano do

próbówek z podłożem Gouillaumie i Kreguera (4). Użytkane w ten sposób hodowle bakteryjne sprawdzano na brak zanieczyszczeń mikroflorą tlenową (wysiewy na podłoże Zeisslera bez neomycyny, namnażanie w warunkach tlenowych). Jednocześnie wykonywano posiewy bezpośrednie z materiałów w kierunku mikroflory aerobowej (agar z krwią, SS, inkubacja w 37°C w ciągu 48 godzin).

Badanie ilościowe. W tym celu oznaczano – metodą rozcieńczeń – liczbę kolonii rutynowo rozpoznawanych *Clostridium* wyrosłych z wątroby, mięśni i śledziony przy zastosowaniu selektywnej pożywki Zeisslera (zawartość 50 µg/ml siarczanu neomycyny). Wyniki przedstawiono jako koncentrację zarazka w 1 g tkanek.

Identyfikacja gatunku. Określano morfologię komórki bakteryjnej i kolonii, właściwości fermentacyjne (w półpłynnym środowisku substraty: laktoza, glukoza, sacharoza, maltoza, mannit, salicyna) oraz proteolityczne (mleko lakmusowe, ścięta surowica końska, 15% żelatyna), ponadto wytwarzanie lecytynazy, indolu i ureazy.

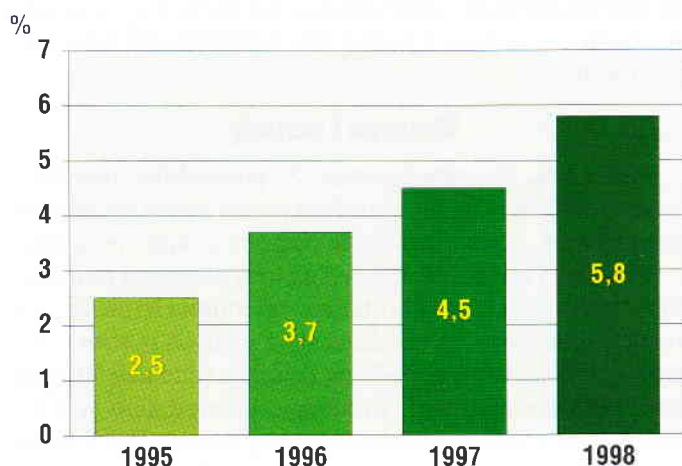
Identyfikacja serotypu. Sprawdzano efekt lecytynazowy metodą płytkową i kolumnową z użyciem podłoża Willisa – Hobbs (2, 9). Określano odrębność antygenową lecytynaz swoiście neutralizowanych przez monowalentne surowice antytoksykcyjne *C. novyi* A i B (uzyskane we własnym zakresie).

Badanie na obecność toksyn. Badanie wykonano według metodyki przedstawionej we wcześniejszych pracach własnych (1, 2).

Chorobotwórczość szczepów. Zakażano dootrzewnowo białe myszy dawką 0,5 ml hodowli w podłożu VF pojedynczych izolatów, a także ich mieszane zestawy dwugatkowe (łączna objętość hodowli stale 0,5 ml/mysz). Czas obserwacji zwierząt 24 godziny.

Wyniki i omówienie

Od 1995 r. w gospodarstwie „Z” (stado liczące ponad 2000 macior) systematycznie wzrastała liczba padnięć wynosząca w skali 1995 r. – 2,5%, następnie osiągała 3,7% i 4,5% (kolejne lata), wreszcie 5,8% w 1998 r. (ryc. 1). Podkreślić należy, że były to nagłe przypadki śmierci, praktycznie bez zauważalnych objawów chorobowych, występujące najczęściej w okresie okołoporodowym, zwłaszcza w chłodnych miesiącach



Ryc. 1. Narastanie padnięć świń w latach 1995-1998

Tab. 1. Liczba laseczek *Clostridium* w badanych tkankach

Maciora	<i>Clostridium</i> w 1 g		
	wątroba	mięśnie	śledziona
1	2×10^5	1×10^1	8×10^1
2	1×10^5	1×10^2	1×10^2
3	2×10^6	1×10^2	2×10^1
4	3×10^4	2×10^1	1×10^2
5	4×10^5	4×10^1	2×10^1

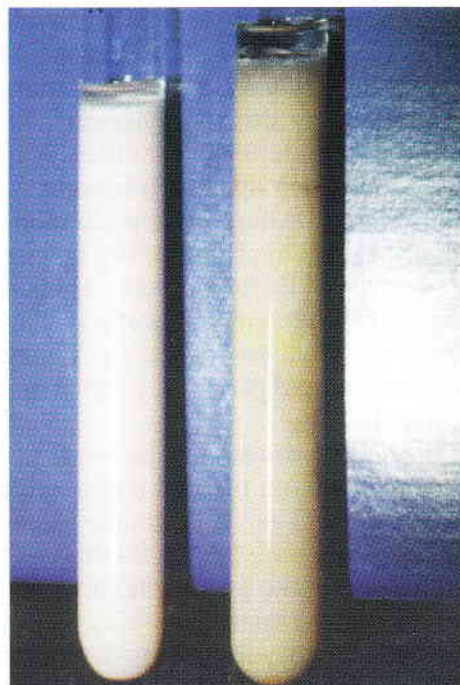
roku (w porze jesienno-zimowo-wiosennej ok. 60% zejść śmiertelnych). Zatem zachorowania te ogólnie odpowiadały przebiegowi podanemu ostatnio przez Durana i Waltona (10). Odnosi się to również do podobieństwa zmian anatomopatologicznych w postaci gwałtownego wzdęcia i rozkładu gnilnego zwłok, obecności pęcherzyków gazu w wątrobie, zwykle powiększonej, ciemnozielonkawej, niekiedy znowu jasnej, ale zawsze przy ucisku szeleszczącej, nadto ciemnej, wielokrotnie powiększonej śledziony (splenomegalia, nawet 5-krotna), wreszcie występowania wodobrzucha (*ascites*) oraz gazowego obrzęku tkanki podskórnej (*oedema emphysematosa*). Dość często rejestrowano pęknięcie torebki, nadmiernie powiększonej śledziony, rzadziej wynaczynienia w tkance podskórnej. Powyższe zmiany, nadzwyczaj intrygujące, trudno jest w sposób bezdyskusyjny łączyć z działaniem laseczek *Clostridium* chociażby ze względu na brak odczynów martwiczych jakie charakteryzują wpływ wytwarzanych *in situ* toksyn beztlenowcowych (8, 11, 12, 15, 16). Rozważaniu temu przeczy jednocześnie stwierdzana, anormalnie wysoka liczba laseczek *Clostridium* w badanych tkankach, zwłaszcza w wątrobie, w której stale przekraczała wartość 10^4 - 10^5 /g, a niekiedy osiągała nawet 10^6 /g (przypadek 3, tab. 1). Co się natomiast tyczy mięśni i śledziony to zawartość w nich *Clostridium* nie przewyższała koncentracji 10^2 /g (tab. 1). Zatem niewątpliwie źródłem beztlenowców była wątroba, ale do rozstrzygnięcia pozostawał dalej dylemat czy był to aktywny proces przyżyciowy, czy jedynie inwazja pośmiertna. Wspomnieć bowiem wypada, że narządy te, także zawartość jelit, nie zawierały toksyn beztlenowcowych.

Dalszą interpretację przedstawionej kwestii wiązano z identyfikacją wyosobnionych od wszystkich 5 macior (dotyczy mięśni, wątroby, śledziony) laseczek z rodzaju *Clostridium* (łącznie 30 szczepów), które stanowiły – zdiagnozowane w oparciu o właściwości morfologiczne, nadto cechy biochemiczne – mieszane zespoły *C. novyi* z *C. perfringens*.

Identyfikację serotypu przeprowadzono z grupą wybranych 5 izolatów *C. novyi* (3 z wątroby, 1 – mięśnie, 1 – śledziona, łącznie od 5 macior). Przedstawiały one duże laseczki z zarodnikami (ryc. 2), wyrasta-

Ryc. 2. Komórki *C. novyi* BRyc. 3. Kolonie *C. novyi* BRyc. 4. Efekt lecytynazowy dookoła kolonii *C. novyi* B (górną połowę płytki, wpływ toksyny beta) i jego neutralizacja (dół płytki)

jące na agarze Zeisslera jako kolonie hemolityczne (alfa, beta), nitkowate (ryc. 3), powodujące efekt lecytynazowy (ryc. 4) neutralizowany w przypadku 4 szczepów surowicą antylecytynazową beta (ryc. 4), co umożliwiło zdiagnozowanie ich jako *C. novyi* B (charakterystyczna także koagulacja, a potem wyraźne trawienie kazeiny mleka (ryc. 5). Badany piąty szczep, wyodrębniony z wątroby, który wytwarzał lecytynazę i

Ryc. 5. Koagulacja i trawienie kazeiny mleka przez *C. novyi* B (obok próbówka z podłożem nie zasianym, kontrolna)Ryc. 6. Wytwarzanie efektu lecytynazowego (oddziaływanie toksyny gamma) i perłowej warstwy (wpływ toksyny epsilon) przez *C. novyi* A

tw. perłową warstwę (ryc. 6) podlegał zobojętnieniu w aktywności zmętnieniowej przez surowicę antytoksykacyjną gamma i dlatego został uznany za *C. novyi* A. Żaden jednak z tych izolatów nie wytwarzał toksyny alfa, tj. głównej toksyny, która decyduje o chorobotwórczości *C. novyi* (6, 11, 16).

Drużga partia 15 szczepów obejmowała izolaty *C. perfringens* A (charakterystyczne właściwości fermentacyjne, burzliwa koagulacja kazeiny mleka bez trawienia kazeiny, nadto nie wytwarzanie indolu i ureazy). Produkowały one co prawda toksynę alfa, ale w niskiej koncentracji (brak efektu letalnego u myszy inokulowanych supernatantem hodowli). W związku z tym uznano je za izolaty defektywne serotypu A (brak wzrostu aktywności po trypsynizacji wykluczał obecność toksyny epsilon i jota, kryteria wg 12, 16).

Na koniec sprawdzono wpływ mieszanych hodowli *C. novyi* oraz *C. perfringens* A. Zakażone myszy i w tym przypadku przeżywały, a u świnek morskich powstawał poiniekcyjny dość silny obrzęk bez efektu letalnego, w swojej intensywności identyczny jak po inokulacji hodowlą pojedynczych szczepów *C. novyi* A, względnie B. Był on najprawdopodobniej wywołany działaniem wykazanych lecytynaz, tj. toksyny beta właściwej serotypowi B (fosfolipaza C) i toksyny gamma (fosfolipaza D) charakteryzującej serotyp A. Wspomnieć jednak wypada, że wpływ tych enzymów na organizm, mało na ogół poznany, ciągle wymaga dalszych badań (11, 14).

Reasumując, przeprowadzone badania nie wykazujące w tkankach padłych macior, nadto w hodowlach badanych szczepów *C. novyi* A, B oraz *C. perfringens* A specyficznych dla nich toksyn letalnych (typ alfa), wykluczają toksemię jako przyczynę śmierci tych zwierząt. Także charakter zmian chorobowych, tj. nie występowanie ognisk martwiczych i wybroczynowości – typowych dla oddziaływań toksyny alfa *C. novyi* A i B (6), a nie obserwowanych w przypadku nagłej śmierci świń, dodatkowo wspierają taki właśnie pogląd (3, 5).

Stwierdzona wysoka zawartość w wątrobie laseczek *Clostridium* (10^5 - 10^6 /g) może być wynikiem przedłużonego akumulowania w jej tkankach spor, szczególnie łatwo zarodnikujących laseczek *C. novyi* A i B, nie wykluczone, że częściowo także ich przyżyciowego namnażania, a nawet w jakimś stopniu oddziaływania poprzez wytwarzane lecytynazy (stwierdzona toksynogenność szczepów w zakresie komponent beta i gamma). Tak zinterpretowany patomechanizm wyrażałby zatem w zasadzie bakteriemię (odczynowością splenomegalia). W tym ujęciu zejścia śmiertelne macior, zwykle nagłe, następujące bez uprzednich objawów chorobowych (3, 5, 7) przedstawiałyby wynik inicjowanych miejscowo w wątrobie zaburzeń, przede

wszystkim naczyniowych. Wtedy wzrastać by też mogła opisywana niekiedy przesiekowość do jam ciała (*ascites*, *hydrothorax*, wg 3). Notowany z kolei obrzęk tkanki podskórnej, w badaniach niniejszych obserwowano jako proces niewielki, wręcz marginalny, w dodatku bez wynaczynień (nie potwierdzone spostrzeżenia Durana i Waltona, wg 3), nie sposób wiązać z przyżyciowym wpływem *C. novyi* A i B. Podkreślić bowiem należy, że dla zapoczątkowania zmian w mięśniach fizjologicznie natlenionych potrzebna jest koncentracja chorobotwórczego drobnoustroju wynosząca 10^4 /g (w badaniach własnych zbyt niska zawartość *Clostridium*, zaledwie 10^1 - 10^2 , a izolaty pod względem toksynogennym defektywne).

Piśmiennictwo

1. Cygan Z., Buczek J.: Medycyna Wet. 50, 316, 1994.
2. Cygan Z., Jastrzębski T., Cygan R.: Medycyna Wet. 32, 520, 1976.
3. Duran C. O., Walton J. R.: Pig J. 39, 37, 1997.
4. Gouillaumie M., Kreguer A.: Rev. Immunol. 15, 47, 1951.
5. Itoh H., Uchida M., Sugiura H.: J. Jap. Vet. Med. Ass. 40, 365, 1987.
6. MacLennan J. D.: Bact. Rev. 26, 177, 1962.
7. Marco E.: Pig. J. 35, 157, 1995.
8. McDonel J. L.: Toxins of *Clostridium perfringens* Types A, B, C, D and E: (W:) Pharmacology of Bacterial Toxins. [ed. Dorner F. and Drews J.], Pergamon Press, Oxford 1986.
9. Oakley C. L., Warrack G. H., Clarke P. H.: J. gen. Microbiol. 1, 91, 1947.
10. Poxton I. R.: J. gen. Microbiol. 130, 975, 1984.
11. Smith L. D.S.: The Pathogenic Anaerobic Bacteria. Thomas Ch. C. Publisher, Springfield, USA 1975.
12. Songer J. G.: Clin. Microbiol. Rev. 9, 216, 1996.
13. Songer J. G.: Clostridial Diseases of Animals. (W:) The Clostridia, molecular biology and pathogenesis. [ed. Rood J. I., McClane B. A., Songer J. G., Titball R. W.], Academic Press, San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto 1997.
14. Songer J. G.: Vet. Res. 29, 219, 1998.
15. Sterne M.: Br. vet. J. 137, 444, 1981.
16. Sterne M., Batty J.: Pathogenic Clostridia. Butterworths, London 1975.
17. Taylor D. J., Bergeland M. E.: Clostridial Infections. [ed. Leman A. D., Straw B. E., Mengeling W. L., D Allaire S., Taylor D. J.], Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA, 1992.

Adres autora: prof. dr hab. Zygmunt Pejsak, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

GROSS S. J., RYAN W. G., PLOEGER H. W.: Odrobaczanie krów mlecznych i jego wpływ na produkcję mleka. (Anthelmintic treatment of dairy cows and its effect on milk production). Vet. Rec. 144, 581-587, 1999 (21)

W oparciu o wyniki ponad 80 prac dotyczących inwazji nicieni żołądkowo-jelitowych u bydła mlecznego oceniono wpływ odrobaczania na wydajność mleka. Stopień inwazji oceniono w oparciu o badania rzeźniane krów eliminowanych z produkcji, liczbę jaj w kale krów produkcyjnych. W badaniach uwzględniono następujące grupy: krowy zakażone na drodze naturalnej i leczone w środkowym okresie laktacji, krowy zakażone na drodze naturalnej i leczone 1-3 krotnie w okresie zasuszenia względnie tuż przed zasuszeniem, krowy zakażone na drodze naturalnej i leczone kilkakrotnie na początku okresu laktacji lub poddanych leczeniu strategicznemu w ciągu roku. W terapii stosowano preparaty fosforoorganiczne, benzimidazol, imidazotiazol, laktony makrocykliczne. W 80% eksperymentów wystąpił wzrost mleczności po stosowaniu leków przeciwpasożytniczych. Średnio wzrost ten wynosił 0,63 kg mleka/dzień. W 26 na 35 eksperymentów leczenie zwiększało też zawartość tłuszczu w mleku.

G.

GRILLO M. J., MARIN C. M., BARBERAN M., BLASCO J. M.: Doświadczalne zakażenie ciężarnych owiec *Brucella ovis*. (Experimental *Brucella ovis* infection in pregnant ewes). Vet. Rec. 144, 555-558, 1999 (20)

Owce przed pierwszą strzyżką zakażono do worka spojówkowego *Brucella ovis* we wczesnym (45-75) lub późnym okresie (120) dni ciąży. Średnia dawka zakaźna patogena wynosiła $1,3 \times 10^9$. Tylko niewielka ilość owiec wydalala zarazek w okresie ciąży oraz porody przedwczesne występowały u niewielkiej liczby ciężarnych samic. Większość zwierząt wydalala *B. ovis* w trakcie porodu oraz w okresie laktacji. Jedno z 11 jagniąt padłych przed odsadzeniem było zakażone podczas gdy 45 jagniąt trzymany w izolacji od matek aż do osiągnięcia dojrzałości były wolne od zakażenia. W czasie odsadzania 40 macioerek pokryto trykami wolnymi od brucelozy. Chociaż wiele z tych macioerek wydalala *B. ovis* nie zakaziły one tryków. Większość owiec która wydalala *B. ovis* w czasie pierwszej ciąży była wolna od infekcji w drugiej ciąży. Jednak u 3 owiec zakażenie utrzymywało się i wydalaly one zarazek z mlekiem w drugiej laktacji. Wszystkie jagnięta pochodzące od tych matek były wolne od zakażenia.

G.