

EWA SITARSKA

# Badania nad odczynami alergicznymi w chorobie obrzękowej i krwiotocznym zapaleniu jelit u prosiąt.

## I. Chemiczne i immunologiczne badania porównawcze wyciągów ściany jelit prosiąt zdrowych i chorych na chorobę obrzękową

Katedra Fizjopatologii Wydziału Weterynaryjnego SGGW w Warszawie  
Kierownik: doc. dr J. MAZURCZAK

Duża różnorodność określeń podawana przez różnych autorów odnosząca się do schorzeń przewodu pokarmowego na tle pałeczki okrężnicy u prosiąt, stwarza konieczność wyjaśnienia na wstępie jaki schemat podziału kolibakterioz prosiąt będzie używany w niniejszej pracy. Ogólnie przyjmuje się że schorzenia przewodu pokarmowego na tle *E. coli* określane są ogólnym terminem kolibakteriozy. Szczegółowa nomenklatura jak krwiotoczne zapalenie żołądka i jelit, choroba obrzękowa, określają poszczególne formy kliniczne, różniące się między sobą przebiegiem i zmianami anatomo-patologicznymi [2].

Ostatnio coraz szersze grono autorów przyjmuje podział proponowany przez pracowników Instytutu w Weybridge, oparty na grupach wiekowych prosiąt, u których najczęściej występują schorzenia przewodu pokarmowego na tle *E. coli*. Według tego podziału wyróżnia się:

1. Zapalenie jelit bardzo młodych prosiąt,
2. Zapalenie jelit u prosiąt w wieku trzech tygodni,
3. Zapalenie jelit u prosiąt po odsadzeniu — z tą grupą wiekową związane są dwie najczęściej spotykane formy kolibakteriozy: krwiotoczne zapalenie żołądka i jelit, oraz choroba obrzękowa (niektórzy autorzy uważają te dwie jednostki za odmienne formy kliniczne tego samego schorzenia — Buxton i Thomlison)

Na ogół autorzy są zgodni w interpretacji etiologii kolibakteriozy występującej u dwu pierwszych grup wiekowych. Fakt chorobotwórczego działania *E. coli* wiąże się z brakiem lub obniżeniem poziomu ciał odpornościowych (4, 7).

W tych dwu grupach wiekowych kolibakterioza najczęściej manifestuje się biegunką, następnie w zależności od stanu odporności i stopnia zakażenia rozwija się bakteremia prowadząca do zejść śmiertelnych, lub następuje stopniowy powrót do zdrowia.

Zupełnie odmiennie przedstawia się przebieg kolibakteriozy występujący u prosiąt w okresie odsadzenia. Zarówno krwiotoczne zapalenie jelit jak i choroba obrzękowa charakteryzują się szybkim przebiegiem. Na ogół zachorowują silniejsze sztuki z miotu, przy czym biegunek raczej nie obserwuje się. Przypadki zachorowań kończą się szybkim zejściem śmiertelnym. Wydaje się, że w tym wypadku nie mamy do czynienia z obniżeniem

odporności jak to miało miejsce w dwu poprzednich grupach wiekowych. Etiologia choroby obrzękowej stała się najbardziej kontrwersyjnym zagadnieniem w pracach odnoszących się do kolibakteriozy występującej u prosiąt w wieku odsadzenia.

W chwili obecnej istnieje na ten temat cały szereg teorii, z których każda ma swoich zwolenników i przeciwników.

Wystarczy wymienić w dużym skrócie:

„Teorię pokarmową” wg tej teorii jako czynniki odpowiedzialne za powstanie choroby obrzękowej są: zaburzenia w metabolizmie, brak lub niedobór poszczególnych witamin, zaburzenia w układzie enzymatycznym.

Teoria infekcyjna — (Barron i Howell) sugeruje istnienie wirusa, który przy hipowitaminozie B wywołuje chorobę obrzękową. Schmid (1955) etiologię choroby obrzękowej wiąże się z obecnością *Vibrio coli*. Największą ilość zwolenników zyskała sobie teoria wyjaśniająca powstawanie choroby obrzękowej na drodze toksemii. Ten pogląd reprezentuje większość autorów angielskich (Gregory 1957, Sojka, Erskine, Lloyd 1957, Rastegajeva 1957 i inni). Autorzy ci uważają, że choroba obrzękowa wywoływana jest bezpośrednim działaniem toksycznych produktów wytwarzanych przez pewien serotyp *E. coli*, a więc jest to kolienterotoksemia. Teoria ta oparta jest na wynikach doświadczeń, w których udało się autorom wywołać typowe objawy choroby obrzękowej przez dożylnie iniekcje kultur lub ekstraktów bakteryjnych patogennych serotypów *E. coli* (cyt. wg 5). Timoney uzyskiwał symptomy choroby obrzękowej u świń, którym wprowadzał dożylnie płyn z nad osadu treści jelit prosiąt padłych na to schorzenie. Autor ten wyniki swoich doświadczeń podsumowuje jako toksemię wywołaną działaniem toksyn powstałych w ścianie jelit, lub wprowadzonych z pokarmem. Lemke, Bellis, Hirsch w 1957 r. wysuwają hipotezę, że choroba obrzękowa na charakter szoku anafilaktycznego. Buxton i Thomlison (1961) oznaczyli w teście aglutynacji antyglobulinowej przeciwciała nie aglutynacyjne wspólne dla serotypów *E. coli* O138, O8, O141. Autorzy ci przyjęli hipotezę że polisacharydy *E. coli* działają jako anafilakto-geny. Organizm prosiąt ciągle stykając się z *E. coli*, resorbuje poprzez układ siateczkowo-śródbłonkowy polisacharydy i w odpowiedzi wytwarza przeciwciała. W ten sposób uczulony organizm przy zetknięciu się ze znaczną ilością *E. coli* w okresie odsadzenia — reaguje szokiem uczuleniowym. Buxton i Thomlison (1962) przeprowadzili doświadczenia na świnkach morskich wywołując sytomy przedłużonego szoku anafilaktycznego podobne do stwierdzanych w chorobie obrzękowej. Świnki morskie były uczulane dożylnie lub dootrzewnowo antyserum zawierającym przeciwciała dla *E. coli* O138 i O139. Wprowadzenie do przewodu pokarmowego polisacharydów *E. coli* wywoływało objawy szoku u uczulonych świnek morskich.

Eksperymenty Stersona (1960) wykazały, że bardzo małe ilości polisacharydów są zdolne do stymulowania przeciwciał powodujących uczulenie.

Szereg innych autorów, jak Erdős, Hirst, Szabo (1957) Ryn Pan Yeh (1958) na podstawie badań histopatologicznych naczyń włosowatych i węzłów chłonnych z przypadków choroby obrzękowej sugerują tło alergiczne. Thus i Hess w 1956 roku dla wyjaśnienia etiologii choroby obrzękowej zaproponowali termin „alimentary allergy”. W świetle tych hipotez działanie toksycznych produktów *E. coli* wywołuje w pierwszym stadium stan uczulenia, następstwem czego może być szok, w przeciwnieństwie do zwolenników teorii toksycznych, którzy uważają że choroba obrzękowa jest wynikiem bezpośredniego działania toksyn *E. coli* na organizm prosiąt (cyt. wg 5).

Wobec bezspornych faktów, że zarówno choroba obrzękowa jak i krwiotoczne zapalenie żołądka jelit przebiega z udziałem B-hemolitycznych szczepów *E. coli* i proces chorobowy dotyczy głównie jelit, w badaniach własnych podjęto próbę wyjaśnienia mechanizmu oddziaływania *E. coli* na przewód pokarmowy w procesie rozwoju krwiotocznego zapalenia jelit i choroby obrzękowej. W pierwszym etapie badań starano się odpowiedzieć na następujące pytania: 1) czy istnieją różnice w składzie białkowym wyciągów z jelit prosiąt zdrowych i padłych na chorobę obrzękową, 2) czy wyciągi jelit zdrowych i chorobowo zmienionych różnią się właściwościami immunologicznymi w reakcjach aglutynacji, precipitacji i hemaglutynacji ze szczepami B-hemolitycznymi *E. coli*, 3) czy w jelitach chorobowo zmienionych występują substancje mogące być przyczyną powodującą powstanie zaburzeń hemodynamicznych w obrębie przewodu pokarmowego w przebiegu choroby obrzękowej.

W celu znalezienia odpowiedzi na postawione pytania, przeprowadzono badania porównawcze z wyciągów jelit prosiąt zdrowych i padłych na chorobę obrzękową i krwiotoczne zapalenie jelit. W tym celu określono poziom białka całkowitego w wyciągach, wykonano elektroforezę bibułową i immunoelektroforezę w agarze, chromatografię bibułową, aglutynację i hemaglutynację z antygenami *E. coli*, odczyn Schultza-Dala na uczulonych macicach i jelitach świnek morskich, oraz na jelitach prosiąt, jak również odczyn Prausnitz-Küstnera na skórze świnek morskich.

#### Materiał i metody

Wszystkie wymienione w założeniach badania przeprowadzone były z użyciem wyciągów z jelit prosiąt i świni klinicznie zdrowych i prosiąt padłych na chorobę obrzękową lub krwiotoczne zapalenie jelit (w dalszym ciągu pracy dla wyciągów z jelit zwierząt klinicznie zdrowych używane będą określenia wyciągi „zdrowe” dla wyciągów z jelit pochodzących z materiału sekcyjnego przypadków choroby obrzękowej i krwiotocznego zapalenia jelit przyjmując się symbol wyciągi „chore”). Jelita „zdrowe” w ilości 26 pochodziły ze świni ubojowych jak również od prosiąt doświadczalnych zdrowych w wieku 8—10 tygodni. Jelita „chore” w ilości 35 sztuk pochodziły ze sztuk doświadczalnych, padłych na jedną z wyżej wymienionych form kolibakteriozy, jak również z materiału sekcyjnego otrzymanego z gospodarstw PGR i z WZHW — Warszawa.

Do badań użyto jelit z wyraźnymi zmianami anatomiczno-patologicznymi. Rozpoznanie opierano na wy-

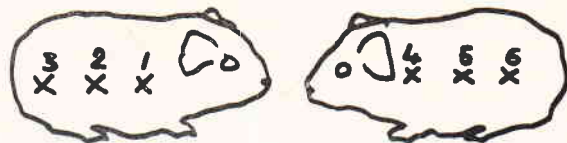
nikach sekcji i posiewach bakteriologicznych (brano jelita z których wyhodowano czyste kultury B-hem. *E. coli*). Do badań użyto jelit cienkich, grubych, dna żołądka i śluzu ze światła jelit cienkich. Materiał przechowywano w zamrażarce przy  $-30^{\circ}\text{C}$  lub liofilizowano.

#### Przygotowanie wyciągów

Określone wagowo ilości liofilizatów bądź jelit świeżych, homogenizowano następnie zawieszano w roztworze fizjologicznym, wodzie destylowanej lub buforze fosforanowym. Zawiesinę pozostawiano w temp.  $+4^{\circ}\text{C}$  na okres 12 godzin następnie wirowano przy 10—15 tys. obrotów. Zbierano płyn z nad osadu, sączono go przez bibuły filtracyjne i wykonywano posiewy bakteriologiczne. Białko całkowite określano w wyciągach metodą biuretowa rozdział frakcji białkowych wykonano metodą elektroforezy bibułowej wg przyjętych zasad. Badanie składu białkowego przeprowadzono również w teście dyfuzyjnym Ouchterlony i immunoelektroforezie wg Scheidegera z użyciem antyserum anti-surowica świni i anty-gamma-globulina świni. Przebadano 10 wyciągów 7 jelit „chorych”. Aglutynacyjną wykonano wg przyjętych w bakteriologii zasad z mieszaniną różnych serotypów B-hem. *E. coli*. Hemaglutynację wykonano wg metody podanej przez Sojkę i wg metody opisanej przez Stipkowicza. W hemaglutynacji sprawdzono również po 10 wyciągów „zdrowych” i „chorych”.

Odczyn Schultza-Dala wykonano na macicach i jelitach świnek morskich jak również na wycinkach jelit prosiąt doświadczalnych uczulając te wycinki *in vitro* zarówno wyciągami z jelit jak i antygenami *E. coli*. Ogółem wykonano próby na 35 odcinkach pochodzących od 7 prosiąt, oraz na 50 odcinkach jelit i macic świnek morskich.

Odczyn skórny Prausnitz-Küstnera (P-K) wykonano z użyciem wyciągów z jelit (w oryginalnej metodzie używa się surowicy krwi) (3) Odczyn ten wykonano w następujący sposób: w dokładnie wygoloną po obu bokach skórę białej świnki morskiej wstrzykiwano śródskórnie 0,1 ml wyciągu na buforze fosforanowym. Po 24 godzinach mierzono noniuszem średnicę powstałego odczynu i wstrzykiwano w to samo miejsce 0,1 ml zawiesiny *E. coli* (kultury bulionowe, zawiesinę w roztworze fizjologicznym mieszaninę serotypów, lub poszczególne serotypy w zależności od potrzeb). Próby kontrolne wykonywane zawsze na tej samej śwince co badany wyciąg stanowiły: wyciąg „zdrowy” + *E. coli*, samo *E. coli*, sam bulion lub RE. Wyniki odczytywano po 1 godzinie od chwili podania *E. coli*. Przykładowo: schemat przeprowadzonego odczynu przedstawia się jak na rycinie 1. W odczynie tym wykonano 41 prób z 26 różnych wycinków jelit prosiąt zdrowych z mieszaniną różnych serotypów *E. coli*, 55 prób z wyciągami „chorych” również z mieszaniną serotypów, 11 wyciągów „chorych” sprawdzono z następującymi serotypami: O139, O138, O141, O8. W tym układzie jako kontrola służyły wyciągi z jelit „zdrowych” z tymi



Ryc. 1. Schemat wykonania testu skórno-ego na śwince morskiej

#### Oznaczenia:

- 1 — wyciąg badany + mieszanina serotypów
- 2 — wyciąg badany + *E. coli* niehemolizujące (kontrola)
- 3 — wyciąg badany + serotyp B-hemolityczny
- 4 — wyciąg z jelit „zdrowych” + mieszanina serotypów (kontrola)
- 5 — tylko mieszanina serotypów (kontrola)
- 6 — wyciąg z jelit „zdrowych” + serotyp B-hemolityczny (kontrola).

samymi serotypami, jak również wyciągi „chorych” + *E. coli* nie hemolizujące — szczepy cielęce i wyhodowane z wymazów od prosiąt.

Przeprowadzono również próbę odczynu odwróconego; w którym mieszaninę *E. coli* podano śródskórnie, a po 24 godzinach wyciąg podano do tętnicy szyjnej w ilości 2 ml. Wyniki odczytywano po 4 godzinach.

### Wyniki

Należy podkreślić, że wszystkie badania zmierzające do znalezienia różnic w składzie białkowym i właściwościach immunologicznych wyciągów z jelit „zdrowych” i chorobowo zmienionych nie dały zadawalających rezultatów. Rozdział wyciągów w elektroforezie, immunoelektroforezie i chromatografii bibulowej nie wykazał istotnych różnic w składzie białkowym porównywanych wyciągów. Aglutynacja i hemaglutynacja wyciągów z mieszaniną różnych serotypów B-hemolitycznych *E. coli* dawała równe miana w zależności od stopnia zagęszczenia wyciągów, nie stwierdzono jednak znamiennych różnic między wyciągami jelit „zdrowych” i „chorych”. Również próby zapisów kimograficznych w reakcji uczuleniowej Schultza-Dala wykonane na odcinkach jelit świń morskich i prosiąt nie dały wyników znamienne różniących reakcje wyciągów jelit „zdrowych” i „chorych”. Również próby zapisów kimograficznych w reakcji uczuleniowej Schultza-Dala wykonane na odcinkach jelit świń morskich i prosiąt nie dały wyników znamienne różniących reakcje wyciągów jelit „zdrowych” i „chorych”. Również próby zapisów kimograficznych w reakcji uczuleniowej Schultza-Dala wykonane na odcinkach jelit świń morskich i prosiąt nie dały wyników znamienne różniących reakcje wyciągów jelit „zdrowych” i „chorych”. Również próby zapisów kimograficznych w reakcji uczuleniowej Schultza-Dala wykonane na odcinkach jelit świń morskich i prosiąt nie dały wyników znamienne różniących reakcje wyciągów jelit „zdrowych” i „chorych”.

Ciekawie natomiast przedstawiają się wyniki uzyskane w zmodyfikowanym odczynie Prausnitz-Küstnera. Testem tym przebadano ogółem 26 wyciągów z jelit pochodzących od prosiąt i świń klinicznie zdrowych, oraz 35 wyciągów z materiału sekcyjnego prosiąt padłych w wyniku krwiotocznego zapalenia jelit i choroby obrzękowej. Porównanie wyników tych prób z mieszaniną serotypów B-hemolitycznych *E. coli* (O139, O138, O141, O8) przedstawia tabela 1.

Tab. 2. Wyniki odczynu w odwróconym teście P-K

Ilość prób	Rodzaj wyciągu	Odczyn po 24 godz. od podania <i>E. coli</i> Ø cm	Odczyn po 4 godz. od podania wyciągu Ø cm	Różnica podana w cm
8	wyciąg z jelit „zdrowych”	1,40	1,57	0,17
8	wyciąg z jelit „chorych”	1,44	2,20	0,76

Wyniki odczynu w odwróconym teście Prausnitz-Küstnera (P-K) w którym mieszaninę serotypów *E. coli* podawano śródskórnie, a po 24 godzinach do tętnicy szyjnej podawano 2 ml wyciągu. Wyniki odczytywano po 4 godzinach do momentu wlewu dotętnicznego. (tab. 2).

Wyniki odczynu w reakcji P-K między wyciągami jelit z różnych przypadków krwiotocznego zapalenia jelit i choroby obrzękowej,

Tab. 1. Porównanie wyników w odczynie Prausnitz-Küstnera dla wyciągów jelit „zdrowych” i „chorych” z mieszaniną serotypów *E. coli* oraz wyników prób kontrolnych.

Ilość prób	Rodzaj wyciągu	Odczyn po 24 godz. od podania wyciągu Ø cm	Odczyn po 1 godz. od podania <i>E. coli</i> Ø cm	Różnica podana w cm
41	wyciągi z jelit „zdrowych”	0,90	1,24	0,34
53	wyciągi z jelit „chorych”	0,85	1,82	0,97
próby kontrolne				
10	wyciąg z jelit „zdrowych” <i>E. coli</i> niehemolizujące	0,81	1,21	0,40
15	wyciągi z jelit „chorych” + <i>E. coli</i> niehemolizujące	0,81	1,21	0,40

\*) Wyniki podano w średnich arytmetycznych.

a poszczególnymi serotypami *E. coli* przedstawia tabela 3.

### Podsumowanie wyników i dyskusja

Wyniki uzyskane w odczynie P-K dają odpowiedź twierdzącą na postawione w założeniach pytania czy w jelitach pochodzących z materiału sekcyjnego sztuk padłych na krwiotoczne zapalenie jelit i chorobę obrzękową istnieje substancja, której można przypisać udział w powstawaniu zaburzeń hemodynamicznych w przewodzie pokarmowym występujących przy tych jednostkach chorobowych. Porównanie wyników odczynu P-K uzyskanego dla wyciągów jelit „zdrowych” z wynikami jelit „chorych” wskazuje na prawie trzykrotnie większy odczyn w przypadku tych ostatnich. Ten znamieny dodatni odczyn uzyskiwano z wyciągami jelit „chorych” cienkich, grubych, dna żołądka i śluzu jelit cienkich. W pracy nie podano wyników dla poszczególnych odcinków przewodu pokarmowego, ponieważ w przypadku jelit „chorych” wyniki ze wszystkich odcinków były b. zbliżone. Fakt ten wskazuje na istnienie czynnej substancji, silnie reagującej z antygenami patogennych serotypów *E. coli* w obrębie przewodu pokarmowego. Niemożność wykrycia tych substancji w aglutynacji, hemaglutynacji i odczynie Schultza-Dala nasuwa przypuszczenie, że są to przeciwciała nie kompletne, nie dające się wykrywać normalnymi metodami immunologicznymi. Są to prawdopodobnie reaginy. O występowaniu reagin powstałych w organizmie pod wpływem działania *E. coli* donosi Szilard (1951). Inni autorzy podkreślają, że „w anafilaksji czynne są przeciwciała związane przez tkanki, a nie krążące we krwi” (Wilson i Miles) (cyt. za 3). To ostatnie stwierdzenie wyjaśnia w pewnym stopniu reakcje zachodzące w krwio-

Tab. 3. Wyniki odczynu w reakcji P-K między wyciągami z jelit, a poszczególnymi serotypami *E. coli*

Wyciągi z jelit	Ilość wykonań prób	Serotypy				<i>E. coli</i> niehemol.
		O139:K 82(B) H4	O141:K 85ab (B) 88 ab	O138:K 81 (B)	O8:K 87(B)	
A-prosię 3 mies. krwiotoczne zapalenie żołądka i jelit	2	<u>0,85</u>	0,20	0,48	0,30	0,10
B-1 roczna świnka choroba obrzękowa	2	<u>1,07</u>	0,40	0,75	0,58	0,12
35/29 V 67 prosię 7 tyg. enterotoksemia O8:K 87(B)	2	<u>0,50</u>	0,20	0,25	<u>0,95</u>	0,35
41/29 V 67 7 tyg. enterotoksemia O8:K 87(B)	2	<u>0,05</u>	0,20	-	<u>0,76</u>	0,40
Ż/31 V 67 prosię 9 tyg. krwiotoczne zapalenie żołądka i jelit	2	<u>0,40</u>	<u>0,80</u>	-	<u>0,45</u>	0,30
14/15 XI 66 prosię 7 tyg. enterotoksemia	1	<u>0,70</u>	<u>0,60</u>	<u>0,50</u>	<u>0,95</u>	0,25
39/9 XI 66 prosię 9 tyg. krwiotoczne zapalenie żołądka i jelit	2	<u>0,75</u>	0,35	0,15	0,30	0,42
32/10 XI 66 prosię 9 tyg. choroba obrzękowa	2	<u>1,40</u>	0,50	0,35	0,40	0,50
31/15 XI 66 prosię 10 tyg. O141 K 85 ab (B) 88 ab	2	<u>0,60</u>	<u>0,90</u>	0,65	0,50	-
12/11 67 prosię 12 tyg. O139 K 82(B) H4	1	<u>0,80</u>	0,20	-	-	0,30
39/9 XI 67 prosię 11 tyg.	1	<u>0,75</u>	0,35	0,15	0,30	0,25
kontrola						
wyciąg jelit „zdrowych” materiał rzeźniany	5	0,40	0,40	0,45	0,47	0,50
prosię zdrowe 9 tyg. 26/10 XI 66	2	0,55	0,80	0,60	0,70	0,70

Uwaga:

Wyniki są średnią arytmetyczną różnic między odczynem po 1 godzinie od podania serotypu, a odczynem po 4 godzinach od podania wyciągu, (podane w centymetrach).

Serotyp „reagujący” podkreślono.

W rubryce „wyciągi z jelit” podano rozpoznanie kliniczne nadesłane z materiałem sekcyjnym, oraz serotyp stwierdzony w tym materiale.

tocznym zapaleniu jelit czy chorobie obrzękowej umiejscowione w obrębie przewodu pokarmowego.

Analizując wyniki testu P-K wyciągów z jelit „chorych” z poszczególnymi serotypami *E. coli* (sprawdzono 11 wyciągów) z różnych przypadków krwiotocznego zapalenia żołądka i jelit i choroby obrzękowej z czterema najczęściej występującymi serotypami: O139, O138, O141, O8. Jako kontroli użyto wyciągów z jelit „zdrowych” z tymi samymi serotypami, oraz wyciągi „chore” z serotypem cielęcym *E. coli*. Stwierdzono istnienie specyficznej reakcji między danym wyciągiem i jednym z serotypów *E. coli*. Zaobserwowano, że najsilniejsza reakcja występuje między danym wyciągiem, a serotypem wyhodowanym z tego samego co wyciąg jelita. (tabela 3 — cyfry podkreślone) Wyniki te dowodzą istnienia zależności w nasileniu odczynu P-K między wyciągiem z jelit „chorych” a serotypem występującym w danym materiale sekcyjnym. Należy podkreślić, że dany wyciąg reagował najsilniej z jednym serotypem, jednak odczyn z pozostałymi serotypami nie był wyrównany, przeciwnie rozpiętość wyników jest dość znaczna. Fakt ten może nasuwać przypuszczenie, że w przypadku wywołania choroby obrzękowej u danego prosięcia brały udział dwa lub więcej serotypów *E. coli* z wyraźną przewagą jednego np. wyciąg zaznaczony literą „B” w tabeli 3 najsilniej zareagował z serotypem O139 ale również serotyp O138 dał stosunkowo duży odczyn w porównaniu z pozostałymi, podobnie wyciąg 14/15 XI 66 zareagował z serotypem O8, można przyjąć, że również z O139. Spostrzeżenie to znalazło potwierdzenie w próbach biologicznych wykonanych na jelitach świnek morskich i prosiąt (zagadnienie to jest przedmiotem dalszych badań).

Wyniki uzyskane z różnymi serotypami dla wyciągów jelit „zdrowych” były wyrównane, zawarte w granicach 0,40—0,50 cm. Wyższe

wyniki uzyskano w przypadku wyciągu z jelit prosięcia zdrowego 9 tygodniowego. Można przypuszczać, że było ono uczulone na *E. coli* w większym stopniu niż świnka dorosła.

Podsumowując wyniki uzyskane w teście skórnym P-K jako jedynie dostępnej obecnie metodzie wykrywania reagin, należy podkreślić, istnienie całego szeregu zastrzeżeń metodycznych.

1. Odczyn ten wymaga bardzo dokładnego wykonania iniekcji śródskórnych z zachowaniem aseptycznych warunków.

2. Obecne białko zawarte w wyciągach wywołuje odczyn pierwotny (mierzony po 24 godzinach od chwili podania wyciągu)

3. Odczyn P-K wymaga obwarowania wyników szeregiem testów kontrolnych wykonywanych na tych samych świnkach morskich co wyciąg badany.

4. Wyniki odczynu wyciągów z jelit „chorych” stają się miarodajne dopiero przez porównanie wyników uzyskanych dla wyciągów „zdrowych” z mieszaniną tych samych serotypów *E. coli*, ponieważ istnieją odchylenia w nasileniu odczynu u poszczególnych świnek morskich.

5. Mierzenie rozległości odczynu jest w pewnym stopniu subiektywne, ponieważ odczyn manifestuje się jedynie nacieczeniem bezbarwnego płynu tkankowego powodującym rozpułchnienie skóry. Nie stwierdzamy tu jednak wyraźnego odgraniczenia konturów odczynu od tkanki nie zmienionej (kilkakrotne pomiary tego samego odczynu wykazały różnice ( $\pm$ ) 0,1 cm). Uwagi powyższe odnoszą się do odczynu wykonywanego z użyciem wyciągów z tkanki jelitowej. Oryginalny odczyn P-K stosowany jest z użyciem surowic, co znacznie upraszcza testy kontrolne, ponieważ nie stwarza tak dużych możliwości wystąpienia odczynów niespecyficznych, jak to ma miejsce przy użyciu wyciągów z tkanki jelit. Mimo wielu zastrzeżeń krytycznych, wydaje

się że test skórny P-K na świnkach morskich jako stosunkowo łatwy i szybki w wykonaniu nadaje się do stosowania przy klasyfikowaniu form klinicznych kolibakteriozy prosiąt. Daje on odpowiedź czy dany przypadek przebiegał w mechanizmie szoku anafilaktycznego (alergicznego) z udziałem niekompletnych przeciwciał.

Na podstawie wyników tego odczynu możemy również wywnioskować jaki serotyp *E. coli* dominował w danym przypadku klinicznym.

ZDZISŁAW GLIŃSKI

## Diagnostyka bakteriologiczna zgnilca złośliwego pszczół

Katedra Epizootologii Wydziału Weterynarii WSR w Lublinie  
Kierownik: prof. dr ST. KRAUSS

Zgnilec złośliwy (amerykański) pszczół należy do najczęściej spotykanych w Polsce chorób zakaźnych czerwiu. Chorobę wywołuje *Bacillus larvae* White. W warunkach naturalnych zarazek jest chorobotwórczy dla czerwiu (głównie 5—6 dniowego), u którego obserwuje się typowe zmiany chorobowe. Właściwości morfologiczne, biochemiczne i hodowlane *Bac. larvae* nie są na tyle typowe aby można było na tej podstawie odróżnić ten zarazek od innych laseczek stwierdzonych niejednokrotnie w przypadkach chorobowych u larw pszczołich. Dotyczy to głównie *Bac. alvei* i *Bac. plulton* (drobnoustrojów izolowanych z przypadków kiślicy) oraz laseczek saprofitycznych.

W zwalczaniu zgnilca złośliwego pszczół zasadnicze znaczenie ma prawidłowe rozpoznanie choroby. Opiera się ono na badaniach kompleksowych z uwzględnieniem wywiadu epizootycznego, badania pasieki i badania laboratoryjnego. Szczególnie ważne znaczenie w kompleksie badań posiada to ostatnie, gdyż inne składowe rozpoznania dostarczają raczej danych subiektywnych, nasuwających jedynie podejrzenie choroby.

Rozpoznanie laboratoryjne opiera się głównie na badaniu mikroskopowym w szczególności zwróceniu uwagi na występowanie form wegetatywnych i zarodników. Jednakże w preparatach mikroskopowych nie jest łatwe odróżnienie endospor *Bac. larvae* od endospor innych laseczek chorobotwórczych dla pszczół lub saprofitycznych. Z tego względu dla ostatecznego rozpoznania konieczne jest wyosobnienie czystej kultury *Bac. larvae* i identyfikacji szczepu na podstawie właściwości biochemicznych i serologicznych. Wyosobnienie w czystej hodowli tego zarazka jest również pożądane dla oznaczenia jego lekooporności, co pozwala na stosowanie leczenia sterowanego.

W związku z brakiem w polskim piśmiennictwie opracowań na ten temat, wydawało się

### Piśmiennictwo

1. Buxton A., Thomilson J.: Res. Vet. Sci. 3, 186, 1962.
2. Furowicz A.: Materiały Sesji PTNW. Etiologia chorób przewodu pokarmowego u prosiąt. Warszawa, 1966.
3. Rudzki E.: Alergia, PZWL, 69, 75, 1961.
4. Sharpe H. B.: Res. Vet. Sci. 6, 490, 1965.
5. Sojka W. J.: Escherichia coli in animals, CAB, 1965.
6. Stipkowitz L., Berezani T.: Acta Vet. Acad. Sci. Hung. 17, 2, 1967.
7. Szabo J.: Magy. Allatorv. Lap. 19, 368, 1964.
8. Szilard Z., Rauss K.: It. Arch. Allergy, 2, 160, 1951.

Adres autorki: dr Ewa Sitarska, Warszawa, ul. Grochowska 272, Katedra Fizjopatologii Wydziału Wet. SGGW.

celowe przedstawienie aktualnych metod rozpoznania laboratoryjnego zgnilca złośliwego pszczół.

### Materiał do posiewów

Do badań laboratoryjnych przesyła się, z podejrzenia choroby pni próbki plastrów (o wymiarach 10×10 cm) wykazujące typowe zmiany anatomiczno-patologiczne. Z obumarłych komórek czerwiu wykonuje się preparaty mikroskopowe, barwione alkoholowo-wodnym roztworem fuksyny, 2% roztworemioletu krystalicznego lub 3% roztworem safraniny, celem wykazania obecności zarodników. Dalszemu badaniu poddaje się jedynie materiał w którym stwierdzono zarodniki. Zawartość 10 do 15 komórek ekstrahuje się jałowym roztworem 0,85% NaCl przez 2 godziny. Można również rozetrzeć materiał patologiczny w jałowych moździerzach z 0,85% NaCl lub przez wytrząsanie w buteleczkach z perełkami szklanymi. Uzyskany wyciąg rozlewa się do dwóch probówek, przy czym jedną ogrzewa się na łaźni wodnej o temp. 75°C przez 30 min. celem zabicia form wegetatywnych. Według Azuma (1) endospor *Bac. larvae* są odporne na działanie tej temperatury. Następnie, tak przygotowaną zawiesinę, wysiewa się na odpowiednie podłoże celem uzyskania pojedynczych kolonii.

Dla ustalenia źródła zakażenia należy dodatkowo przebadać węzę miód i wosk. Badania te przeprowadza się w oparciu o metodę podaną przez Kirkora (12). 2 g wosku lub węzy rozpuszcza się w mieszaninie złożonej z 8 g terpentyny i 2 ml wody o temp. 75—80°C. Po rozpuszczeniu zawiesinę wiruje się przy 5000 obr./min. przez 15 min. Badanie miodu polega na odparowaniu na łaźni wodnej o temp. 75—80°C około 40 ml miodu. Uzyskane osady służą do sporządzania preparatów i do posiewów. Kosteczki i wsp. (informacja ustna) opisali nowe metody badania wosku przeznaczonego do produkcji węzy.

### Podłoża hodowlane

*Bac. larvae* z powodu swoistych wymagań odżywczych nie rośnie na zwykłych podłożach hodowlanych. Wzrost i zarodnikowanie zachodzi najlepiej w warunkach tlenowych. Zarodniki kiełkują lepiej w zakresie niskich potencjałów oksydo-redukcyjnych. Najważniejszym czynnikiem stymulującym wzrost laseczki zgnilca złośliwego pszczół jest tiamina (15) i dlatego jest ona dodawana albo w postaci czystej, albo jako czynnik zawarty w innych składnikach podłoża. Źródłem tiaminy w podłożu Whita (28, 29) jest żółtko jaja kurzego, w podłożu Holsta (9, 10, 11) wyciąg z marchwi, a w innych