

by, nie wpływa ujemnie na rozwój młodych nutrii i daje dobre wyniki w zapobieganiu.

Piśmiennictwo

1. Furowicz A., Steffen J.: *Medycyna Wet.* 11, 660, 1966.
2. Brecht H.: *Dtsch. tierärztl. Wsch.* 21, 626, 1962.

3. Sosnowski A., Zuchowska E.: *Działalność ambulatorium weterynaryjnego łódzkiego ogrodu zoologicznego.* PWRiL, 19 i 24, 1964.
4. Fertig S.: *Medycyna Wet.* 24, 1, 1968.
5. Zahaczewski J., Chwałibóg J., Bartosz B.: *Medycyna Wet.* 18, 25, 1962.

Adres autora: Witold Scheuring, Zbąszynek, ul. Kilińskiego 92.

ANNA CAKAŁA, JACEK ROSZKOWSKI

Ocena metod barwienia ciałek wtretowych przy zakaźnym zapaleniu krtani i tchawicy u kur

Zakład Badania Chorób Drobiu, Instytutu Weterynarii w Puławach

Kierownik: **prof. dr K. MAREK**

Zakład Anatomii Patologicznej, Instytutu Weterynarii w Puławach

Kierownik: doc. dr J. ZADURA

Zakaźne zapalenie krtani i tchawicy u kur (ILT), choroba, którą dawniej charakteryzował bardzo gwałtowny przebieg połączony z typowymi objawami klinicznymi i zmianami sekcyjnymi, obecnie coraz częściej występuje w formie „łagodnej”, atypowej. Obraz kliniczny w takich przypadkach jest zbliżony do objawów występujących przy innych schorzeniach dróg oddechowych i charakteryzuje się nieznaczną dusznością, potrząsaniem głową, mierzalnym wyciekaniem z nosa, stanem zapalnym błony śluzowej worka spojówkowego itp. Rozpoznanie choroby na podstawie objawów klinicznych i zmian sekcyjnych jest trudne. Konieczne staje się wówczas przeprowadzenie próby izolacji zarazka na zarodkach kurzych, próby biologicznej na wrażliwych kurczętach albo badania histopatologicznego, mającego na celu stwierdzenie w komórkach nabłonka błony śluzowej tchawicy zakażonych ptaków charakterystycznych, wewnątrzjądrowych, kwasochłonnych ciałek wtretowych opisanych przez Seifrieda (9). Ponieważ próba biologiczna stosowana przy rozpoznawaniu ILT, jak również izolacja zarazka są kosztowne i wymagają dość długiego czasu, wielu badaczy wykorzystując spostrzeżenia Seifrieda starało się opracować możliwie proste, przydatne w rozpoznawaniu rutynowym, metody oparte na badaniu histopatologicznym (8, 1, 10, 4).

Najprostszą i dającą najszybsze wyniki wydawała się być metoda podana przez Armstronga (1). Polega ona na stwierdzeniu ciałek wtretowych w rozmazach z zeszkrobiny błony śluzowej tchawicy podejrzanego o chorobę ptaków, barwionych metodą Giemsa.

Autorzy niniejszej pracy postanowili sprawdzić przydatność podawanych w piśmiennictwie metod histologicznych dla rutynowej diagnostyki zakaźnego zapalenia krtani i tchawicy u kur. Wydawało się również słusznym przebadanie możliwości rutynowego stwierdzenia ciałek wtretowych w błonach kosmówkowo-omoczniovych zarodków kurzych zakażonych wirusem ILT. Mogłoby to w efekcie przyspieszyć identyfikację wirusa przy próbach izolacji jego na zarodkach kurzych.

Materiał i metody

Kurczęta i zarodki kurze. Do badań użyto 36 siedmioletniowych kurcząt rasy Leghorn oraz 50 dziesięcio i jedenastodniowych zarodków kurzych inkubowanych w temp. 37°C, przy wilgotności 60%. Zarówno kurczęta, jak i jaja pochodziły z fermy, w której w ciągu ostatnich lat nie stwierdzano u ptaków schorzeń dróg oddechowych.

Szczep wirusa ILT. Do zakażenia użyto szczepu 92430, o ustalonej zjadliwości, otrzymanego od dr Van Roekela z USA. Materiał do zakażenia stanowiła zawieszina zhomogenizowanych błon kosmówkowo-omoczniovych zakażonych zamarych zarodków kurzych, zmieszana z jałową gliceryną w stosunku 1:10 i w tym samym stosunku rozcieńczona bulionem zwykłym.

Sposób zakażenia kurcząt. Materiał wirusowy wprowadzano kurczętom w ilości 0,25 ml do lewej zatoki podoczodołowej oraz w ilości 0,5 ml do tchawicy. Jednocześnie dla kontroli 6 ptakom wprowadzano do zatoki podoczodołowej i tchawicy taką samą ilość zawiesiny sporządzonej z błon zarodków normalnych.

Pobieranie materiału z tchawicy. Poczynając od pierwszego dnia po zakażeniu, codziennie przez sześć dni, poddawano ubojowi 5 ptaków zakażonych i 1 kontrolnego. Bezpośrednio po skrwawieniu ptaków wypręparowywano i rozcinano górny odcinek tchawicy, po czym ostrym skalpelem robiono zeszkrob z błony śluzowej. Zebrany materiał umieszczano na odtłuszczonych szkiełkach podstawowych, mieszano z kroplą płynu fizjologicznego i bagietką szklaną delikatnie rozprowadzano po powierzchni szkiełka. Po wysuszeniu na powietrzu rozmazy utrwalono przez 10 min. w 10% obojętnej formalinie, płynie Bouïna, płynie Zenkera lub w płynie Susa. W ten sam sposób utrwalano wycinki tchawic pobrane z miejsc nieuszkodzonych skalpelem dla sporządzenia skrawków parafinowych.

Sposób zakażenia zarodków. Zarodki zakażano metodą podaną przez Larskiego (6), wprowadzając na błonę kosmówkowo-omocniową 0,2 ml zawiesiny zawierającej materiał wirusowy. Kontrolę stanowiły embryony, którym w ten sam sposób wprowadzano zawieszinę sporządzoną z błon nie-zakażonych. Zarodki trzymane w inkubatorze w pozycji poziomej i codziennie prześwietlano.

Pobieranie materiału z błon kosmówkowo-omocniowych. Poczynając od pierwszego dnia po zakażeniu, schładzano codziennie przez sześć dni po 5 zarodków zakażonych i 3 kontrolne. Z błon kosmówkowo-omocniowych wycinano skrawki o wymiarach ok. 1 cm², które następnie rozciągano między dwoma szkiełkami podstawowymi. Rozmazy po wysuszeniu na powietrzu utrwalano w alkoholu metylowym, 10% obojętnej formalinie lub w płynie Zenkera, trzymając je w każdym z utrwalaczy przeciętnie przez 10 minut.

Skrawki histologiczne przygotowywano z wycinków błon utrwalonych w 10% formalinie, płynie Bouina i w płynie Zenkera.

Barwienie. Rozmazy i skrawki barwiono następującymi metodami: hematoksyliną i eozyną, floksyną i tartrazyną wg Lendruma (cyt. wg 7), metodą Giemsy, floksyną i błękitem metylenowym wg Thomasa (cyt. wg 5).

Wyniki i omówienie

Doświadczenie 1. U kurcząt zakażonych wirusem ILT pierwsze objawy kliniczne, w postaci nieznacznej duszności i częstego potrząsania głową, pojawiły się w 48 godz. po zakażeniu. W następnych dniach do objawów tych dołączyło się kichanie, śluzowy wyciek z nosa, a w 5 i 6 dniu wyraźna osowiałość ptaków. Badanie sekcyjne kurcząt poddanych ubojowi w 48 i 72 godz. po zakażeniu, wykazało rozpulchnienie błony śluzowej tchawicy oraz zwiększoną ilość śluzowej wydzieliny w przewodach nosowych i w tchawicy. W następnych dniach stwierdzano silne przekrwienie błony śluzowej tchawicy, a także, w pobliżu krtani i rozwidlenia tchawicy, żółtawe strzępki włókniaka. U 7 ptaków obserwowano czop włóknikowy u wejścia do krtani. Inne narządy nie wykazywały zmian. Rutynowe badanie bakteriologiczne we wszystkich przypadkach dało wynik ujemny.

Badanie mikroskopowe rozmazów sporządzonych z tchawicy kurcząt zakażonych nie wykazało charakterystycznych ciałek wtretowych przez cały czas trwania doświadczenia. Natomiast w skrawkach parafinowych już w 48 godz. po infekcji stwierdzono u 3 z 5 badanych kurcząt obecność typowych dla ILT wewnątrzjądrowych ciałek wtretowych umiejscowionych w komórkach nabłonka błony śluzowej tchawicy (fot. 1). Posiadały one zwykle



Fot. 1. Wewnątrzjądrowe ciała wtretowe w nabłonku błony śluzowej tchawicy. Floksyna i błękit metylenowy. Pow. ok. 1200 ×.

Mikrofotografię wykonał inż. J. Pacewicz.

kształt okrągły lub owalny, rzadziej kielbasowy i wybarwiał się na kolor ciemnoczerwony. Ciała zajmowały najczęściej 1/3 powierzchni jądra lub niekiedy wypełniały je całkowicie. Chromatyna jądrowa przeważnie

była zepchnięta na obwód, a między nią a ciałkiem wtretowym występowała niebarwiąca się obwódka („halo”), której wielkość uzależniona była od rozmiarów ciała. Bardzo często komórki zawierające ciała wtretowe tworzyły różnej wielkości skupiska.

W 72 godz. po zakażeniu ciała wtretowe obserwowano u wszystkich badanych kurcząt. Natomiast u ptaków poddanych ubojowi w czwartym, piątym i szóstym dniu od momentu zakażenia ciałek wtretowych nie udało się wykazać. Nie można jednak w tych przypadkach z całą pewnością wykluczyć obecności ciałek wtretowych. Być może występujący w owym czasie rozpad jąder komórkowych utrudniał ich identyfikację.

Doświadczenie 2. Pierwsze zmiany na błonie kosmówkowo-omoczniowej zakażonych zarodków, typowe dla ILT, pojawiły się w 72 godz. po zakażeniu. Obserwowano zgrubienie błony, a na całej jej powierzchni występowały liczne, drobne, szarawe ogniska martwicze. Często w miejscu wprowadzenia materiału wirusowego stwierdzano również jedno duże ognisko. Zmiany te utrzymywały się do końca doświadczenia. Żadnych zmian nie stwierdzono na błonach zarodków kontrolnych.

W rozmazach sporządzonych z błon zakażonych zarodków nie udało się wykazać obecności ciałek wtretowych. Stwierdzono je natomiast w skrawkach parafinowych, przy czym występowały one między trzecim, a szóstym dniem po zakażeniu. Ciała te nie różniły się niczym od ciałek obserwowanych w preparatach z tchawicy, występowały jedynie w mniejszej ilości. Stosunkowo największą liczbę ciałek wtretowych stwierdzano w trzecim i w czwartym dniu po zakażeniu. Zdaniem Hofstada (cyt. wg 2) okres ten może przesunąć się do pięciu dni po zakażeniu w zależności od ilości i drogi wprowadzenia wirusa do zarodka.

W użytych w badaniach utrwalaczy najlepszymi okazały się płyn Susa i płyn Bouina. Z zastosowanych metod barwienia najlepsze rezultaty uzyskano przy użyciu floksyny i błękitu metylenowego. Metoda barwienia floksyną i tartrazyną, jakkolwiek szczególnie zalecana przy barwieniu ciałek wtretowych, okazała się w naszych doświadczeniach mało przydatna.

Przedstawione badania wykazały, przynajmniej w przyjętym układzie doświadczenia, nieprzydatność metody rozmazów dla wykrywania ciałek wtretowych przy ILT. W żadnym z badanych preparatów nie udało się bowiem stwierdzić obecności charakterystycznych wewnątrzjądrowych wtretów. Stosunkowo łatwo natomiast stwierdzano ciała wtretowe w skrawkach parafinowych sporządzanych z tchawicy i błon kosmówkowo-omocznionych. Wydaje się jednak, że metoda ta w

praktyce może mieć jedynie ograniczone zastosowanie. Stosunkowo krótki okres czasu w którym istnieje największa możliwość wykrycia ciałek wtretowych, ograniczający się praktycznie do 2—3 dni, stwarza konieczność badania większej ilości ptaków znajdujących się w różnych stadiach choroby. Wprawdzie inni autorzy stwierdzali obecność ciałek wtretowych jeszcze w szóstym dniu po zakażeniu, to jednak podkreślają oni zgodnie, że największa ich ilość występowała między drugim a piątym dniem po infekcji (9, 1, 3). W naszych warunkach terenowe pracownice rozpoznawcze nie mają najczęściej możliwości wyboru ptaków do badania. Otrzymują one zwykle ptaki padłe z daleko posuniętymi zmianami chorobowymi, a zatem nieprzydatne do tego rodzaju prób. Tym niemniej metoda wykrywania ciałek wtretowych w skrawkach tchawicy lub błon kosmówkowo-omocznionych może być przydatna do identyfikacji czynnika zakaźnego w przypadku zakażenia kurcząt lub zarodków kurzych materiałem podejrzanym o obecności wirusa ILT (próba biologiczna). Inne sposoby identyfikacji wirusa są na ogół czasochłonne i dość trudne do przeprowadzenia. Dla dalszego skrócenia czasu badania histologicznego należałoby wypróbować jeszcze możliwość wykrywania ciałek wtretowych w skrawkach mrożonych.

Wnioski

1. W badaniach własnych wykazano nieprzydatność rozmazów sporządzonych z błony śluzowej tchawicy kurcząt oraz z błon kosmówkowo-omocznionych zarodków kurzych zakażonych wirusem zakaźnego zapalenia krtań i tchawicy do wykrywania ciałek wtretowych.

2. Wykrywanie ciałek wtretowych było możliwe wyłącznie w skrawkach parafinowych tchawicy sporządzonych w drugim lub trzecim dniu po zakażeniu oraz w skrawkach parafinowych błon kosmówkowo-omocznionych

sporządzonych między trzecim a szóstym dniem.

3. Najlepsze wyniki dawało utrwalenie w płynie Susa lub w płynie Bouina oraz barwienie floksyną i błękitem metylenowym.

Piśmiennictwo

1. Armstrong W. H.: Avian Dis. 3, 80, 1958.
2. Biester H. E., Schwarte L. H.: Diseases of Poultry. Iowa State Univ. Press, 1965.
3. Cover M. S., Benton W. J.: Avian Dis. 2, 375, 1958.
4. Garside J. S.: Vet. Rec. 77, 354, 1965.
5. Humason G. L.: Animal Tissue Techniques. Freeman and Co., San Francisco, 1962.
6. Larski Z.: Wirusologia Weterynaryjna. PWRiL, 1965.
7. Lillie R. D.: Histopathologic Technic and Practical Histochemistry. McGraw-Hill, Inc., New York, 1965.
8. Pirozok R. P., Helmboldt C. F., Jungherr E. L.: J. Amer. Vet. Med. Assoc., 130, 408, 1957.
9. Seifried O.: J. exper. Med. 54, 817, 1931.
10. Sevoian M.: Avian Dis. 4, 474, 1960.

Adres autora: dr Anna Cakała, Puławy, Al. Partyzantów 55, Instytut Weterynarii.

Цонкала А., Рошковски Я. — Оценка методов окраски телец — включений при инфекционном ларинготрахеите птиц (ИЛТ) у кур.

Самые лучшие результаты получили при поисках телец-включений в парафинированных срезах трахеи цыплят и хорио-аллантоической оболочки фиксированных в жидкости по Sus или по Bouina и окрашенных флоксином и метилен-блему по Thomas. Самое большое количество включений нашли в трахеи на 2—3 день после инокуляции, а в хорио-аллантоических оболочках на 3—4 день после инокуляции. Установили также непригодность метода окрашивания мазков.

Cakała A., Roszkowski J. — The evaluation of inclusion bodies staining methods in the Infectious laryngo-tracheitis in hens.

The investigations were made on the usefulness of inclusion bodies staining methods in the diagnostics of Infectious laryngo-tracheitis (ILT) in hens. The best results were obtained in the inclusion bodies detection in parafined slices of chick trachea and in chorio-allantoic membranes of hen embryos fixed in Sus or Bouin's liquid and stained with floxine and methylene blue according to Thomas. The greatest number of inclusion bodies was detected in trachea on the second and third day after the infection and in chorio-allantoic membranes on the third and fourth day. The uselessness was proved of the method of inclusion bodies staining in films made of trachea mucous membrane and in chorio-allantoic membranes.

JAN MIKA

Badania nad własnościami szczepów laseczki larwy (*Bacillus larvae* White) występujących na terenie woj. opolskiego*)

Katedra Epizootologii Wydziału Weterynarii WSR we Wrocławiu
Kierownik: prof. dr T. SOBIECH

Laseczki larwy (*Bac. larvae* White) wywołują zgnilec złośliwy, jedną z najgroźniejszych zaraźliwych chorób czerwii pszczół. Schorzenie to, objawia się zamieraniem z reguły czerwii zasklepionego i cechuje się ciężkim przebiegiem, szybkim rozprzestrzenianiem się, uporczywością w leczeniu oraz częstymi nawrotami choroby (2, 3, 8, 9, 10, 11, 12, 16, 17,

24, 26). Nagminne występowanie tej choroby wyrządza poważne straty gospodarcze (21, 23).

Własności chorobotwórcze laseczki larwy są zależne od postaci w jakiej ona występuje. W formie wegetatywnej jest niechorobotwórcza i można ją stwierdzić jedynie w świeżo zamarym czerwii, gdzie po 3—4 tygodniach przetrwalnikuje (22). Przetrwalniki laseczki larwy posiadają bardzo silne własności chorobotwórcze dla czerwii pszczelego, jednak pojedyncze przetrwalniki zakażenia czerwii nie wywołują. Jedną z własności umożliwiających gwałtowne roz-

*) Autoreferat rozprawy doktorskiej.