

ilością guzów od wielkości orzecha laskowego do włoskiego (ryc. 1). Guzy te miały kształt okrągły lub wrzecionowaty, sprawiający wrażenie otorbionych. Ponieważ w jamie brzusznej nie stwierdzono innych zmian patologicznych, zdecydowano się na wykonanie splenektomii całkowitej. W tym celu nałożono po dwie podwiązki jedwabne na każdą gałązkę tętnicy śledzionowej. Po kilku sekundach uwidoczniła się linia niedokrwienia, wzdłuż której wykonano przecięcie, uprzednio założywszy dwa giętkie zaciski jeden powyżej drugiego, poniżej tej linii. Po wycięciu śledziony zdjęto zaciski, sprawdzono podwiązanie naczyń kikuta, a następnie po zaopatrzeniu jamy otrzewnowej antybiotykiem przystąpiono do zszycia otrzewnej, powłok brzusznych i skóry. Pies po ustąpieniu znieczulenia ogólnego czuł się dobrze, normalnie reagował na bodźce zewnętrzne, a w trzecim dniu po operacji zaczął przyjmować pokarmy, zgodnie z zaleconą dietą. Przez okres pięciu dni podawano antybiotyk w zastrzyku oraz wlew dożylny z izotonicznej glukozy oraz płyn wieloelektrolityczny.

Ocena histopatologiczna wyciętej śledziony: w obrazie mikroskopowym zauważa się komórki różnokształtne w przeważającej części wrzecionowate różnej wielkości na ogół o dobrze barwiącym się jądrze komórkowym, wy-

kazującym nieprawidłowy podział chromatyny. Nadto obserwuje się charakterystyczną chaotyczność układu komórek i wielokierunkowy nieraz wirowaty układ włókien, mała ilość naczyń oraz częste obrazy martwicy. Inne komórki cechuje duża różnorodność utkania i liczne figury podziału. Komórki olbrzymie widzi się sporadycznie. Wyżej opisane zmiany przemawiają za włókniako-mięsakiem (*fibrosarcoma*). Nowotwory w śledzionie o takim charakterze są zjawiskiem rzadkim. Celem wykluczenia gruźlicy zrobiono badanie bakterioskopowe (metoda Ziehl-Neelsena), które dało wynik ujemny.

Podsumowując opisany przypadek można stwierdzić, że obrana metoda leczenia chirurgicznego w postaci wykonania resekcji śledziony okazała się słuszną i dała pożądaną rezultat końcowy. Trudno jest jednak przypuszczać, na jak długo uzyskano pozytywny wynik w leczeniu, ze względu na rozpoznanie histopatologiczne.

Piśmiennictwo

1. Bouseoner S. R., Mouiel J.: Presse Medicale, 5, 2, 1966.
 2. Carrig C. B., Penny R. H. C.: Vet. Rec., 86, 26, 1970.
 3. Kwietniak I. K.: Pol. Tyg. Lek. 21, 13, 1966.
 4. Kwietniak I. K.: Pol. Tyg. Lek. 21, 26, 1966.
 5. Miklaszewska J., Król J., Kusionowicz J., Krucińska J., Pol. Tyg. Lek. 25, 20, 1970.
 6. Rutter J. V. S.: Vet. Rec. 12, 1960.
- Adres autora: dr Artur Stojko, Katowice, ul. Brynowska 25.

FIZJOLOGIA I PATOLOGIA ROZRODU ORAZ SZTUCZNE UNASIENIANIE

J. MICHAŁ SADOWSKI, MARIAN TRUSZCZYŃSKI

Wykazanie udziału drobnoustrojów z rodzaju *Chlamydia* (*Miyagawanella*) w wywoływaniu ronień u bydła

Zakład Mikrobiologii Instytutu Weterynarii w Puławach
Kierownik: prof. dr M. TRUSZCZYŃSKI

Opisana w 1955 r. przez Schoopa i Kaukera (15) oraz w 1956 r. przez Howartha i wsp. (6), jednostka chorobowa — zwana epizootycznym ronieniem bydła (epizootic bovine abortion — EBA), wywołana jest przez drobnoustroje z grupy *Psittacosis* — *Lymphogranuloma Venereum*, które włączono w 1966 r. do rodzaju *Chlamydia* (12). Ten związek etiologiczny stwierdziło szereg autorów, którzy bądź wykazywali przeciwciała swoiste dla tej grupy drobnoustrojów w surowicy krów roniących (5, 15), bądź w błonach płodowych lub płodach wykryli względnie wyizolowali z nich czynnik chorobowy wymienionej grupy drobnoustrojów (2, 3, 4, 13, 20). W kilku pracach wykazano

też na podstawie zakażenia doświadczalnego krów ciężarnych, iż drobnoustroje z rodzaju *Chlamydia* są przyczyną epizootycznego ronienia bydła (9, 17, 18, 19).

Z powyższego przeglądu piśmiennictwa wynika, że EBA występuje w USA i szeregu krajów Europy. Choroba cechuje się masowo występującymi ronieniami w stadzie między 6—9 miesiącem ciąży. Najczęściej ronią pierwiastki bez uprzednich objawów chorobowych. Łożysko jest obrzękłe z obszarami wybroczyn. W kotyledonach stwierdza się żółtawe ogniska martwicze. Występują one również w narządach wewnętrznych płodów. Dokładniejsze opisy objawów klinicznych i zmian anatomo-patologicz-

nych podają Storz i Mckercher (18, 19) oraz Bassan i Ayalon (1).

Charakterystykę drobnoustrojów *Chlamydia*, przedstawiono uprzednio (14, 21). Drobnoustroje tej grupy cechują się warunkową chorobotwórczością. Stanowią one jeden z czynników etiologicznych bronchopneumonii cieląt (14, 21). Wywołują też *orchitis granulomatosa* u buhajów. Jednostka ta została stwierdzona ostatnio również w Polsce (7).

Celem obecnej pracy były badania nad występowaniem drobnoustrojów z rodzaju *Chlamydia* u krów, które poroniły oraz u poronionych płodów. Uzasadniało to uprzednie wykluczenie w tych przypadkach jako przyczyny choroby drobnoustrojów z rodzaju *Brucella* *) oraz *Vibrio fetus*.

Utrwalone na szkiełkach podstawowych rozmazy narządów wewnętrznych barwiono metodą Stampa (16) oraz Macchiavello (10) i oglądano w mikroskopie świetlnym. Analogiczne preparaty traktowano swoistą surowicą, znakowaną izocjanianem fluoresceiny, produkcji Calbiochem, Los Angeles, USA. Oglądano je w mikroskopie luminescencyjnym ML-2 produkcji ZSRR.

Kontrolę stanowiły preparaty mazane z narządów wewnętrznych zdrowych cieląt. Stosowano też surowicę niezawierającą przeciwciał anti-*Miyagawanella*, znakowaną izocjanianem fluoresceiny (surowica ujemna).

W celu izolacji z określonych uprzednio narządów wewnętrznych drobnoustrojów z grupy *Chlamydia* — sporządzono homogenizaty dodając jałowego bulionu. Do rozcieńczenia tkanki 10^{-1} i 10^{-2} dodawano 6 mg streptomycyny na 1 ml płynu, pozostawiono w temperaturze pokojowej na 2 godziny i trzykrotnie wirovano przy 1500 x g po 10 min. Płyn z nad osadu stanowił materiał, który wstrzykiwano w dawce 0,3 ml. Użyto zarodków 7-dniowych w liczbie 5 na każde roz-

Tab. 1. Zamieralność zarodków w poszczególnych pasażach po zakażeniu materiałem z poronionych płodów

Kolejny pasaż	I					II					III					IV					V									
	4	5	6	7	8	4	5	6	7	8	4	5	6	7	8	4	5	6	7	8	4	5	6	7	8					
Dzień śmierci zarodka po zakażeniu																														
Oznaczenie płodu	Z				P	Z				P	Z				P	Z				P	Z				P	Z				P
778	5			2	1	3	5			1	3	4	5			2	3	5	5		1	3	1	5	5		4	1	5	
664	5			1	1	2	5			1	1	3	5			2	2	4	5		2	3		5	5		1	3	1	5
534	5					0	5			1	1	2	5			2	1	3	5		2	2		4	5		3	2	5	
P1	5		1	1	2	4	5		1	2	1	4	5			4	1	5	5		3	2		5	5		5		5	
P2	5			1	1	5	5			1	2	3	5		1	1	2	4	5		1	2	2		5		5	1	4	5
P3	5			1	1	2	5			1	2	3	5		1	3		4	5		1	3	1		5		5	2	3	5
M	5			1	1	5	5			1	1	2	5			1	2	3	5		1	1	2		4		5	1	2	5
Kontrola	5					0	5					0	5					0	5		1				1		5			0

Z — liczba zakażonych zarodków; P — liczba padłych zarodków w sumie.

Materiał i metody

Badania wykonano w dwóch (I i II) oborach zarodkowych bydła rasy ncb. W oborze I znajdowało się 103 krów a w oborze II — 64 krów. U grupy I roniecia wystąpiły w sezonie wycieleń 1969/70 a u grupy II w analogicznym sezonie 1970/71. Z obory I pobrano krew do badań serologicznych od wszystkich krów a z obory II od 10 krów, które poroniły. Surowice uzyskano w ogólnie przyjęty sposób i przechowywano do chwili badań w temperaturze chłodni. Do badań mikrobiologicznych użyto 7 płodów poronionych w 6, 8 lub 9 miesiącu ciąży oraz 1 martwego noworodka. Po dokonaniu sekcji pobrano z każdego z nich wycinki śledziony, wątroby i płuc. Wycinki te zamrożono w kontenerze z suchym lodem i przechowywano do czasu badania.

Badanie serologiczne wykonano odczynem zimnego wiązania dopełniacza wg techniki Meyera i Eddie (11). Zamiast płynu Meyera użyto do rozcieńczeń płyn fizjologiczny o pH 7,2. Posługiwano się antygenem *Miyagawanella* produkcji Forschungsinstitut für Impfstoffe Dessau (NRD). Jako surowicę kontrolną dodatnią zawierającą przeciwciała anti-*Miyagawanella*, użyto preparat produkcji Bioveta, Ivanowice na Hane (CSSR).

Badanie mikrobiologiczne obejmowało mikroskopię preparatów sporządzonych z wymienionych narządów, badanie na zarodkach kurzych oraz na myszkach.

cieńczenie badanego ekstraktu tkankowego. Zakażano je dożółtkowo.

Z każdym materiałem prowadzono 5 kolejnych pasażów. Materiały do szczepień zarodków stanowiły pobrane od padłych między 4—8 dniem zarodków błony woreczka żółtkowego. Przepuściwano je płynem buforowym PBS i homogenizowano. Materiał do szczepień przygotowano w taki sam sposób jak podano uprzednio dla homogenizacji tkanki płodów cielęcych z wyjątkiem dodawania streptomycyny. Materiał przygotowano bowiem w warunkach jałowych oraz wysiewano w celu kontroli jałowości na agar z krwią i pożywką płynną PPLO. Z błon woreczków żółtkowych sporządzono też preparaty mazane, które badano w mikroskopie świetlnym i luminescencyjnym.

Wyciągi tkankowe cieląt do zakażenia myszek przygotowano w taki sam sposób jak materiał służący do zakażenia zarodków rozcieńczając go 1:5. Podano je donosowo w dawce 3 kropli na myszkę. Liczba każdorazowo szczepionych myszek wynosiła 4. Z każdym badaniem materiałem wykonano 5 kolejnych pasażów. Materiałem do następnego pasażu był rozcieńczenie tkankowy narządów wewnętrznych myszek padłych między 5—10 dniem od szczepienia, przygotowany w taki sam

*) Za przekazane surowice oraz materiały dotyczące badań serologicznych w kierunku *Brucella* autorzy składają p. prof. dr F. Anczykowskiemu podziękowanie.

sposób jak materiał wyjściowy. Materiał ten badano mikroskopowo w kierunku drobnoustrojów z rodzaju *Chlamydia* w sposób podany uprzednio oraz posiewano na agar z krwią i bulion PPL0.

Wyniki

Spośród 103 krów obory I u 38 (36,8%) wykazano miana swoiste dla antygenów rodzaju *Chlamydia* w rozcieńczeniu surowicy 1:16 i wyższym. Wynik dodatni (++++) w rozcieńczeniu 1:16 stwierdzono u 22 krów, u 8 krów w rozcieńczeniu 1:32 i u 8 krów w rozcieńczeniu 1:64. Wszystkie krowy, które poroniły miały miana 32 lub 64. U krów obory II, które poroniły, stwierdzono obecność przeciwciał anti-*Chlamydia* w mianie 32 u 6 sztuk, w mianie 64 u 4 sztuk i w mianie 128 u 3 sztuk.

Powyższe wyniki można uznać za dość pewny dowód etiologicznego udziału drobnoustrojów z rodzaju *Chlamydia* w wywoływaniu roniń w oborze I i II. Przemawia za tym wysokość stwierdzonych mian. Przyjmuje się bowiem na ogół miano 16 za dodatnie i świadczące o czynnej infekcji (8). Wprawdzie wyniki badań serologicznych nie są uważane za pewny dowód infekcji (1). Stwierdzenie jednak mian dodatnich u tak znacznego odsetka zwierząt, w tym mian wyższych u krów po poronieniu, może świadczyć o udziale *Chlamydia* w wywoływaniu roniń tym bardziej, iż wykluczone zostały u tego pogłowia brucele i *V. fetus* jako przyczyna choroby.

Ustalono na podstawie badań własnych oraz udostępnionych materiałów w gospodarstwach I i II objawy kliniczne roniących krów i zmiany anatomo-patologiczne łożyska i płodów były na ogół podobne do opisywanych przez Storza (17, 18, 19) oraz Bassana i Ayalona (1) przy EBA.

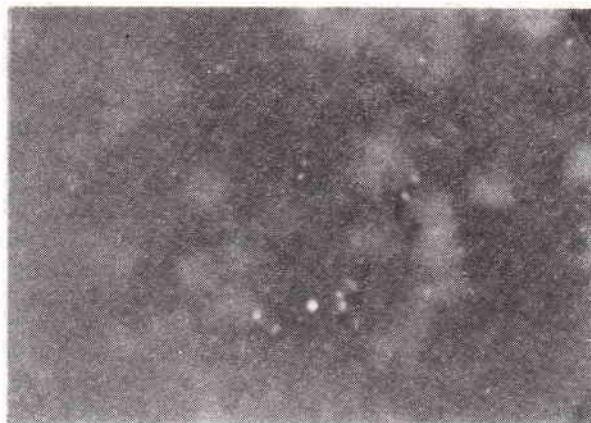


Ryc. 1. Drobnoustroje rodzaju *Chlamydia* barwione metodą Stampa (preparat z płuc poronionego płodu).

Badaniem mikroskopowym preparatów zawierających rozmazy narządów wewnętrznych płodów i martwo urodzonego cielęcia wykazano prawie we wszystkich przypadkach po barwieniu ich metodą Stampa i Macchiavello drobne ziarenka odpowiadające wielkością

i barwą drobnoustrojów z rodzaju *Chlamydia* (ryc. 1). Tego typu ciała elementarne można było sporadycznie wykazać również w preparatach z narządów cieląt zdrowych.

Równolegle wykonano badania preparatów z wymienionych narządów przy użyciu swoistej surowicy immunofluorescencyjnej oraz surowicy ujemnej znakowanej izocjanianem fluoresceiny. Do badań włączono też preparaty stanowiące rozmazy narządów wewnętrznych cieląt zdrowych. W większości badanych preparatów z materiałem płodów poronionych oraz martwego cielęcia stwierdzono obecność świecących ciałek elementarnych (ryc. 2); natomiast preparaty kontrolne nie wykazywały podobnego świecenia. Powyższe wyniki zgodne są zatem z poglądem Bassana i Ayalana (1) o ograniczonym znaczeniu diagnostycznym badań mikroskopowych w przypadku drobnoustrojów z rodzaju *Chlamydia*. Wskazują one, iż formy niechorobotwórcze lub też saprofity — tego rodzaju drobnoustrojów mogą stosunkowo często występować w tkankach zwierząt zdrowych. Na ogół jednak stężenie ich jest mniejsze niż form chorobotwórczych w przypadku chorobowym. Większe znaczenie diagnostyczne wydaje się mieć na podstawie badań własnych odczyn immunofluorescencji. Być może związane jest to z pewnymi różnicami w budowie antygenowej form saprofitycznych i chorobotwórczych drobnoustrojów z rodzaju *Chlamydia*. Wyświetlenie tego zagadnienia wymaga jednakże dalszych badań.



Ryc. 2. Preparat z wątroby poronionego płodu traktowany koniugatą anti-*Chlamydia*. Widoczne jest świecenie ciałek *Chlamydia*.

Tab. 1 przedstawia wyniki izolacji z materiału chorobowego drobnoustrojów z rodzaju *Chlamydia* przy użyciu zarodków kurzych.

Jak wynika z tab. 1 śmierć zarodków występowała nieregularnie. Z poszczególnych grup zakażonych zamierały tylko niektóre na ogół między 4—8 dniem od szczepienia. W miarę kolejnych pasażów stwierdzono zwiększenie regularności zamierania zarodków. Śmiertelność pojawiała się również wcześniej. Badaniem mikroskopowym oraz przy użyciu immuno-

fluorescencji wykazano w rozmazach z woreczków żółtkowych zamarłych zarodków obecność ciałek elementarnych, charakterystycznych dla chlamydii. Badaniem mikroskopowym i hodowlanym nie wykazano obecności bakterii oraz drobnoustrojów z grupy PPLO.

Tab. 2 przedstawia wyniki izolacji z płuc, śledziony i wątroby dwóch płodów drobnoustrojów z rodzaju *Chlamydia* — przy użyciu myszek.

Tab. 2. Śmiertelność myszek w poszczególnych pasażach po zakażeniu materiałem z narządów 2 poronionych płodów

Kolejny pasaż	I	II	III	IV	V	
Materiał badany						
778 *	Płuca	4/2	4/3	4/4	4/4	4/4
	Śledziona	4/2	4/3	4/4	4/4	4/4
	Wątroba	4/1	4/2	4/3	4/2	4/3
Pś1	Płuca	4/2	4/3	4/4	4/4	4/4
	Śledziona	4/3	4/4	4/4	4/4	4/4
	Wątroba	4/0	4/2	4/3	4/3	4/3
K	Płuca	4/0	4/0	4/0	4/1	4/0
	Śledziona	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0
	Wątroba	4/0	4/0	4/1	4/0	4/0

* — symbol badanego płodu, względnie cielęcia zdrowego. Liczba w liczniku oznacza ilość zakażonych myszek. Liczba w mianowniku oznacza ilość padłych myszek między 5—10 dniem po zakażeniu.

Również w doświadczeniach z myszkami stwierdzono nieregularność ich padania. W dalszych pasażach obserwowano zwiększenie się liczby zwierząt padłych. W narządach wewnętrznych padłych zwierząt wykazano za pomocą badania mikroskopowego i odczynu immunofluorescencji obecność ciałek elementarnych drobnoustrojów z rodzaju *Chlamydia*.

Jak wynikało z szeregu uprzednio podanych stwierdzeń określenie w oparciu o badania mikrobiologiczne i serologiczne roli etiologicznej drobnoustrojów z rodzaju *Chlamydia* jest trudne. Wynika to z faktu częstego występowania tych drobnoustrojów w organizmach zwierzęcych. Cechują się one dużą zmiennością w zakresie chorobotwórczości. Obok form chorobotwórczych lub potencjalnie chorobotwórczych mogą występować gatunki lub serotypy saprofityczne. Opierając się jednak na dotąd przyjętych zasadach kompleksowych badań laboratoryjnych, uwzględniających zarówno mikroskopię, immunofluorescencję, próby biologiczne oraz badanie serologiczne — z włączeniem również badań wykluczających jako przyczynę ronień brucele i *V. fetus* — można przypuszczać, że w przedstawionej pracy *Chlamydia* były przyczyną ronień.

Wykazane w badaniach własnych objawy kliniczne u krów roniących oraz zmiany anatomiczno-patologiczne u poronionych płodów były

na ogół zbieżne z uznanymi za charakterystyczne dla epizootycznego ronienia bydła. Wprawdzie zmiany chorobowe tego rodzaju nie są patognostyczne (1) to jednak stanowią one cenną pomoc w postawieniu rozpoznania zwłaszcza przy wykluczeniu ronień na tle *Brucella*.

Można zatem uważać, iż stwierdzono w oparciu o przeprowadzone badania występowanie w Polsce epizootycznego ronienia u bydła, potwierdzając w jego etiologii rolę drobnoustrojów z rodzaju *Chlamydia*.

Piśmiennictwo

- Bassan Y., Ayalon N.: Am. J. Vet. Res. 32, 703, 1971.
 - Beer J., Martin J.: Arch. exp. Vet. Med. 12, 884, 1958.
 - Beer J., Martin J.: Zuchthyg. Fortpflstör. Haustiere 3, 97, 1959.
 - Berberevic M.: Vet. Glasn. 15, 755, 1961.
 - Giroud P.: Archs Inst. Pasteur Tunis 34, 187, 1957.
 - Howarth J. A., Moulton J. E., Frazier L. M.: J. Am. vet. med. Ass. 128, 441, 1956.
 - Jaškouski L., Truszczyński M., Sadowski J. M., Matusiewicz J.: Biul. IV, Zjazdu PTNW, Warszawa, 276, 1970.
 - Kaaden O. R., Lieberman H.: Arch. exp. Vet. Med. 20, 921, 1966.
 - Lincoln S., Kwapleń R. P., Reed D. E., Whiteman C. E., Chow. T. L.: Am. J. vet. Res. 30, 2105, 1969.
 - Macchavello A.: Revta Chilena de Higiene y Medicina Preventiva 1, 101, 1937.
 - Meyer K. F., Eddie B.: 3 rd Ed Am. publ. Heth Ass., New York, 611, 1964.
 - Page L. A.: Int. J. Bact. 16, 223, 1966.
 - Rossi C., Ghittino P.: Vet. ital. 11, 341, 1960.
 - Sadowski J. M.: Medycyna Wet. 27, 466, 1971.
 - Schoop G., Kauker C.: Dtsch. Tierärztl. Wschr. 63, 23 i 233, 1956.
 - Stamp J. T., Mc Ewen A. D., Staub J. A. A., H.: Mh. Tierheilk. 9, 317, 1957.
 - Storz J., Mc Kercher D. G., Howarth J. A., Straub O. C.: J. Am. vet. med. Ass. 137, 509, 1960.
 - Storz J., Mc Kercher D. G.: Zentbl. Vet. Med. 9, 4, 411, 1962.
 - Storz J., Mc Kercher D. G.: Zentbl. Vet. Med. 9, 5, 520, 1962.
 - Storz J., Call W., Jones R. W., Miner M. L.: Cornell Vet. 57, 21, 1967.
 - Truszczyński M.: Biul. inf. Inst. Wet. Puławy 1, 20, 1970.
 - White G., Withnell C. G., Pitfieldn.: Vet. Rec. 87, 790, 1970.
- Adres autora: lek. wet. J. Michał Sadowski, Puławy, Al. Partyzantów 57.

Садовски Й. М., Трущиньски М. — Соучастье микробов из рода *Chlamydia* (*Miyagawanella*) в вызывании выкидыша у коров.

Во внутренних органах недоношенных плодов крупного рогатого скота установили при помощи микроскопического исследования, иммунофлуоресценции и заражения мышшей и эмбрионов кур присутствие микробов из рода *Chlamydia*. Так как исследование на бруцеллез (*Brucella abortus*) и вибриоз (*Vibrio fetus*) дали отрицательные результаты, авторы полагают, что этиологическим фактором выкидыша могли быть микробы из рода *Chlamydia*. В пользу этого предположения говорят также установление у коров с выкидышем относительно высокие титры антител против *Chlamydia*. Анатомопатологические изменения в полодах и в плаценте коров были похожи на наблюдаемые при эпизоотическом аборте крупного рогатого скота вызываемом микробами рода *Chlamydia*.

Sadowski J. M., Truszczyński M. — The role of *Chlamydia* (*Miyagawanella*) in abortion of cattle.

On the strenght of microscopic examinations, immunofluorescence, and biological tests in embryonated eggs and mice there was found out the presence of *Chlamydia* in internal organs of aborted bovine fetuses. After excluding the role of *Brucella abortus* and *Vibrio foetus* in the pathogenesis of the abortion, it was suggested the possible role of *Chlamydia* in abortins. The suggestion was supported by the presence of high levels of CF antibodies against *Chlamydia* in sera of aborted cows. The lesions observed in fetuses and in placenta were similiar to those noted in epizootic abortion of cattle caused by *Chlamydia*.