

MARIAN TRUSZCZYŃSKI, J. MICHAŁ SADOWSKI

## Ocena metod identyfikacji drobnoustrojów z rodzaju *Chlamydia* (*Miyagawanella*) w materiale pochodzenia bydłęcego

Zakład Mikrobiologii Instytutu Weterynarii w Puławach

Kierownik: prof. dr M. TRUSZCZYŃSKI

Szereg prac (1, 2, 6, 8, 9, 12) wskazało na znaczenie drobnoustrojów z rodzaju *Chlamydia* w wywoływaniu chorób u zwierząt, a zwłaszcza u drobiu i bydła. Ich rola patogenetyczna jest jednak jeszcze niedostatecznie określona. Łączy się to m. in. z za mało doskonałymi metodami ich izolacji i identyfikacji oraz zbyt szczupłymi wiadomościami na temat ich właściwości biologicznych.

Spośród stosowanych dotychczas metod izolacji i identyfikacji drobnoustrojów z rodzaju *Chlamydia* wymienić należy pasażowanie materiału diagnostycznego przez zarodki kurze, myszki białe, świnki morskie i hodowle tkankowe (1, 4, 6, 7, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17). Przydatne okazało się badanie mikroskopowe preparatów mazanych lub odciskowych z narządów zwierząt, barwionych metodą Stampa, Macchiavello, Giemzy oraz oglądanie ich pod immersją w mikroskopie świetlnym. Do identyfikacji drobnoustrojów z rodzaju *Chlamydia* w materiale biologicznym użyto również z powodzeniem odczyn immunofluorescencji (3, 5, 6, 11, 12).

Najsluszniejsze okazało się stosowanie wszystkich z wymienionych metod równocześnie. Zależnie od rodzaju materiału jedne spośród nich mają przewagę nad pozostałymi.

Celem badań własnych była adaptacja w warunkach polskich metod izolacji oraz identyfikacji drobnoustrojów z rodzaju *Chlamydia* jak również ocena ich wartości diagnostycznej. Dotychczas badania tego rodzaju w odniesieniu do zwierząt gospodarskich nie były w kraju wykonywane.

### Materiał i metody

Badaniu poddano jądra 9 buhajów, nasienia pobrane od 53 buhajów, podejrzanych o *orchitis granulomatosa* oraz wycinki płuc, wątroby i śledziony 7 poronionych płodów bydłych. Przedmiotem badań był również szczep *Chlamydia* 145/67 otrzymany od dra V. Popovici z Instytutu Weterynarii w Bukareszcie<sup>\*</sup>). Szczep ten wyizolowano na terenie Rumunii z płuc cieląt, u których stwierdzono bronchopneumonię. Szczep *Chlamydia* 145/67 był dziesięciokrotnie pasażowany (ośmiokrotnie w Instytucie Pasteura w Bukareszcie i dwukrotnie w Instytucie Weterynarii w Puławach) na błonie żółtkowej zarodków kurzych i używany do badań w rozcieńczeniu  $10^{-8}$ .

Dla kontroli równolegle prowadzono badania z wycinkami płuc, wątroby i śledziony 10 zdrowych cieląt

(materiał pobrany przy uboju od zdrowych zwierząt) oraz z nasieniem pobranym od 41 buhajów zdrowych i z wycinkami jąder 7 zdrowych buhajów w różnym wieku.

Z wszystkich próbek nasienia, wycinków narządów wewnętrznych i szczepu *Chlamydia* 145/67 sporządzono preparaty mazane lub odciskowe na szkiełkach przedmiotowych. Następnie preparaty te barwiono metodami Stampa i Macchiavello. Metodą Giemzy barwiono preparaty sporządzone z jąder i nasienia buhajów oraz ze szczepu *Chlamydia* 145/67. Zabarwione preparaty oglądano w mikroskopie świetlnym pod immersją. Koniugatę używaną do badań immunofluorescencyjnych sporządzono z owczej surowicy anty-*Chlamydia* o mianie w odczynie wiązania dopełniacza 500. Znakowano ją izotocyjanianem fluoresceiny wg metodyki podanej uprzednio (6, 11, 12). Tą surowicą traktowano preparaty mikroskopowe przygotowane z wymienionych uprzednio materiałów chorobowych i od zwierząt zdrowych oraz ze szczepu *Chlamydia* 145/67. Oglądano je przy pomocy mikroskopu luminescencyjnego ML-2 produkcji ZSRR.

Izolację drobnoustrojów z rodzaju *Chlamydia* przeprowadzono poprzez pasażowanie badanego materiału na błonie żółtkowej 6-dniowych zarodków kurzych, na białych myszkach o ciężarze ciała 8 g, zakażonych dootrzewnowo lub donosowo oraz na komórkach L hodowli tkankowej. Do zakażenia zarodków kurzych i białych myszek przygotowywano z jąder buhajów oraz płuc, wątroby i śledziony 7 poronionych płodów bydłych i 10 zdrowych cieląt wyciągi zgodnie z metodyką omawianą w uprzednich badaniach własnych (6, 12). Wyciągi przeznaczone do zakażenia komórek L hodowli tkankowej, dodatkowo homogenizowano w homogenizatorze MSE-7700B przez 4 minuty i rozcieńczano 1:5 bulionem o pH 7,6. Następnie wirowano dwa razy przy ciężarciu 1500 g w ciągu 30 minut, używając do zakażenia komórek L płynu z nad osadu.

Nasienia buhajów przed użyciem do pasażowania, uprzednio zamrażano do temperatury  $-65^{\circ}\text{C}$  i rozmrażano a następnie homogenizowano w szklanym homogenizatorze ręcznym i rozcieńczano bulionem zwykłym o pH 7,6 w stosunku 1:5. Na 1 ml takiej zawiesiny dodawano 10 mg streptomycyny i pozostawiono w temperaturze pokojowej na 2 godziny. Po tym czasie zawiesinę wirowano przez 15 minut przy 1000 g. Do zakażenia brano płyn z nad osadu.

Wszystkie sporządzone wyciągi przed użyciem do zakażeń sprawdzano na obecność bakterii poprzez posiewanie ich na agar z krwią oraz bulion PPLO.

Nie zawierającymi bakterii płynami z nad osadu rozcierów z jąder i nasienia buhajów, płuc, wątroby i śledziony poronionych płodów bydłych i zdrowych cieląt oraz rozcieńczonym  $10^{-8}$  szczepem *Chlamydia* 145/67 zakażano 6 dniowe zarodki kurze dożytkowo po 0,2 ml, biorąc po 5 zarodków dla każdego badanego materiału. Kolejny pasaż wykonywano przy użyciu rozcieru woreczka żółtkowego.

Białe myszki w grupach po 3 zakażano jednocześnie dootrzewnowo po 0,2 ml i donosowo po 2 krople

<sup>\*</sup>) Autorzy dziękują dr V. Popovici za przekazanie szczepu *Chlamydia* 145/67.

plynu znad osadu oraz dootrzewnowo i donosowo oddzielnie. Do kolejnego pasaży brano płuca, śledzionę i wątrobę myszek, które padły między 4—10 dniem lub zostały zabite w 9 dniu po zakażeniu.

Hodowlę tkankową normalnych komórek L otrzymano z Zakładu Wirusologii Instytutu Weterynarii w Puławach\*). Do hodowli komórek L używano butelek Le Groux i płynu odżywczego o składzie: płyn Hanksa i Parkera w równych ilościach z dodatkiem 10% surowicy cielęcej. Jednowarstwową hodowlę komórek L zakażano po zlanii płynu odżywczego dawką 2 ml płynu znad osadu materiałów badanych. Zakażone hodowle komórkowe inkubowano w termostacie (37°C) przez 15—30 minut. Następnie płyn zakażający zlewano a wprowadzano płyn utrzymujący o składzie: płyn Hanksa i Parkera w równych ilościach po 9 ml. Zakażano każdym badanym materiałem 3 butelki Le Groux i przetrzymywano je przez 3 doby w termostacie w temperaturze 37°C, obserwując zachowanie się komórek 2 razy dziennie. Zmiany cytopatyczne oceniano wg przyjętych zasad.

Próbki jąder i nasienia buhajów podejrzanych o *orchitis granulomatosus* w liczbie odpowiednio 9 i 53 oraz płuc, śledziony i wątroby poronionych płodów w liczbie po 7 pasażowano przez 6 pasaży na zarodkach kurzych, białych myszkach i w hodowli komórkowej. W odniesieniu do poszczególnych próbek w obrębie każdego rodzaju materiału określono pasaż, w którym po raz pierwszy padło co najmniej 50% zakażonych zwierząt lub wystąpił efekt cytopatyczny w co najmniej 50% zakażonych hodowli komórkowych. Dane te posłużyły do obliczenia średnich z wyżej określonych pasaży, obrazujących do jakiej średniej liczby pasaży każdy z wymienionych rodzajów materiału powodował efekt patogeny w przynajmniej 50%. W analogiczny sposób zbadano szczep *Chlamydia* 145/67 w 3 powtórzeniach oraz wycinki płuc, śledziony i wątroby zdrowych cieląt w liczbie po 10. Materiały te stanowiły kontrolę doświadczenia.

### Wyniki i omówienie

W tab. 1 przedstawiono wyniki uzyskane za pomocą mikroskopii świetlnej i immunofluorescencyjnej w trakcie badania preparatów barwionych metodami Stampa, Macchiavello lub Giemzy, względnie traktowanych znakowaną dodatnią surowicą anti-*Chlamydia* i surowicą ujemną. Do sporządzenia preparatów użyto wszystkie uprzednio wyszczególnione materiały, pochodzące zarówno od sztuk podejrzanych o zakażenie chlamydiami jak też od osobników zdrowych. Uzyskane dodatnie wyniki badania mikroskopowego porównano z liczbą prób materiału, z którego wyizolowano drobnoustroje z rodzaju *Chlamydia* przy pomocy pasażowania przez zarodki kurze, białe myszki i hodowlę tkankową komórek L.

Jak widać z tab. 1 najwięcej wyników dodatnich identyfikacji drobnoustrojów z rodzaju *Chlamydia* w przypadku metod mikroskopowych, uzyskano przy metodzie immunofluorescencji. Przy pomocy mikroskopii świetlnej wykryto nieco rzadziej chlamydie, przy czym najlepsza okazała się metoda barwienia wg Stampa.

W badaniu mikroskopowym preparatów sporządzonych z jąder i nasienia buhajów zdrowych nie stwierdzono charakterystycznych dla chlamydii ziarnistości ani też swoistego świecenia.

\*) Autorzy dziękują doc. dr L. Żebrowskiemu za przekazanie hodowli tkankowej komórek L

Tab. 1. Częstość wykrywania drobnoustrojów z rodzaju *Chlamydia* w preparatach mikroskopowych przygotowanych różnymi metodami w porównaniu z liczbami wyników dodatnich, uzyskanymi z tych samych próbek przy pomocy pasażowania.

Metoda	Liczba badanych preparatów	Liczba preparatów w których stwierdzono ciążka <i>Chlamydia</i>	Liczba próbek z których wyizolowano <i>Chlamydia</i>
Stampa	1620 *)	726	760
Macchiavello	1620	712	760
Giemzy	1110	406	550
Immunofluorescencja (konjugata dodatnia anti-Miyagawanelia)	1620	748	760
Immunofluorescencja (konjugata ujemna)	1620	0	760

Objaśnienie: \*) materiały, z których sporządzono preparaty do badań mikroskopowych lub pasaży przez zarodki kurze, myszki białe i hodowle komórkowe zostały podane w tekście.

W omawianych badaniach chlamydie izolowano z 8 jąder i 46 próbek nasienia od buhajów podejrzanych o *orchitis granulomatosus* oraz z płuc, wątroby i śledziony 7 poronionych płodów bydłych.

W tab. 2 przedstawiono średnio liczby pasaży materiału badanego, po których następowało zejście śmiertelne przynajmniej 50% zwierząt zakażonych lub efekt cytopatyczny przynajmniej 50% zakażonych hodowli komórkowych. Do zakażeń używano tego samego materiału jak do sporządzania preparatów mikroskopowych oraz szczep *Chlamydia* 145/67.

Tab. 2. Wykrywalność drobnoustrojów z rodzaju *Chlamydia* przy stosowaniu kilku metod pasażowania.

Rodzaj badanego materiału	Liczba próbek badanych	Średnia pasaży poszczególnych materiałów po których poraż pierwszy wystąpił efekt cytopatyczny lub padło (zamarło) 50% zakażonych			
		zarodków kurzych d.o.	białych myszek d.o.	d.o.	hodowli tkankowej
Jądra buhajów *)	9	2,2	4,4	4,0	2,6
Nasienia buhajów *)	53	2,6	4,8	3,2	2,8
Śledziony, wątroby, płuca poronionych płodów bydłych	21	2,0	2,2	2,2	4,0
Szczep <i>Chlamydia</i> 145/67	3	1,3	2,0	1,6	1,3
Materiał kontrolny **)	78	bs	bs	bs	bs

Objaśnienie: \*) materiał pobrany od buhajów podejrzanych o *orchitis granulomatosus*; \*\*) materiał (jądra i nasienie buhajów oraz płuca, wątroba i śledziony cieląt) pobrany od zdrowych zwierząt; d.o. — zakażenie dootrzewnowe; d.n. — zakażenie donosowe; bs — brak wystąpienia śmiertelności u zwierzęt zakażonych materiałem kontrolnym.

Z tab. 2 wynika, iż najszybciej bo po 1,3 pasaży zamierało 50% zarodków kurzych, zakażonych szczepem *Chlamydia* 145/67. W kolejności później zamierały zarodki zakażone narządami wewnętrznymi poronionych płodów bydłych oraz materiałem z jąder buhajów podejrzanych o *orchitis granulomatosus*. Białe myszki zakażane jednocześnie dootrzewnowo i donosowo padały wcześniej niż zakażone bądź donosowo lub dootrzewnowo. Najmniej wrażliwe na działanie drobnoustrojów z rodzaju *Chlamydia* okazały się komórki I hodowli tkankowej. W dalszych pasażach śmiertelność zwierząt doświadczalnych znacznie przekraczała 50%. Czas wystąpienia reakcji u zakażonych zarodków, myszek czy w hodowli komórek L

zależał też od rodzaju pasażowanego materiału. Można by przypuszczać, iż jest to zależne od koncentracji form zakaźnych (ciałek elementarnych) drobnoustrojów z rodzaju *Chlamydia* w jednym *inoculum* oraz od powinowactwa szczepów bydłych do danych komórek zwierzęcych. W związku z powyższym wydaje się, iż do pasażowania materiału pochodzenia bydłego w celu izolacji chlamydii najbardziej przydatne są 6—7 dniowe zarodki kurze oraz 8—9 g białe myszki zakażane jednocześnie donosowo i dootrzewnowo.

### Wnioski

1. Metoda immunofluorescencji okazała się bardziej przydatna do wykrywania drobnoustrojów z rodzaju *Chlamydia* w bydłym materiale chorobowym lub nasieniu buhajów niż badanie przy pomocy mikroskopii świetlnej preparatów barwionych.

2. Spośród porównywanych metod barwienia wg Stampa, Macchiavello lub Giemzy najlepszą okazała się tu pierwsza.

3. Do izolacji chlamydii z tkanek zwierzęcych lub nasienia bardziej nadawały się zarodki kurze niż myszki białe lub hodowle komórek L, które były na nie najmniej wrażliwe.

4. Równoczesne zakażenie myszek donosowo i dootrzewnowo dawało lepsze wyniki w pasażowaniu zarodka niż oddzielne zakażenie jednym z podanych sposobów.

### Piśmiennictwo

1. Blanco, Loizeller A.: Revta Patron. Biol. anim. 13, 179, 1969.
2. Ders, Cordy D. R.: J. Comp. Path. Therap. 72, 49, 1962.
3. Eugster A. K., Joyce B. K., Storz J.: Infection Immunity 2, 351, 1970.
4. Grimes J. E., Grumbles L. C., Moore R. W.: Can. J. Comp. Med. 34, 256, 1970.
5. Hakon N., Cooke K. O.: J. Bact. 89, 1465, 1965.
6. Jaśkowski L., Truszczyński M., Zebrowski L., Sadowski J. M., Matusiewicz J., Biewejnis-Kłosowska D.: Zesz. Probl. Post. Nauk Roln. 124, 99, 1971.
7. Meyer K. F.: Arch. ges. Virusforsch. 31, 1, 1970.
8. Mitscherlich E.: Vet. med. Nachricht. 129, 1955.
9. Popovici V., Hiastru F., Grigore C., Darie P.: Archiva Vet. 4, 75, 1968.
10. Robinson G. W.: Br. vet. J. 125, 23, 1969.
11. Roth M. und Schabiński G.: Zschr. Immforsch. All. u. Klin. 3, 193, 1968.
12. Sadowski J. M., Truszczyński M.: Medycyna Wet., 28, 229, 1972.
13. Schoop G., Krilger-Hansen U., Wachendorfer G.: Zbl. Vet. Med. B12, 25, 1965.
14. Surdan C., Hiastru F.: Archiva vet. 3, 101, 1967.
15. Tomarin R.: Refuah Veterinarith. 26, 23, 1969.
16. Wachendorfer G.: Dt. Tierärztl. Wschr., 76, 201—204, 1969.
17. Weiss E.: J. Inf. Dis. 86, 27, 1950.

Adres autora: prof. dr Marian Truszczyński, Puławy, Al. Parzyantów 57.

Труцински М., Садовски Ю. М. — Оценка методов идентификации микроорганизмов из рода *Chlamydia* (*Miyagawanella*) выделенных из материала от крупного рогатого скота.

Целью работы была оценка диагностической пригодности микроскопических и биологических исследований (на куриных эмбрионах, белых мышцах и тканевых культурах клеток L) в случае инфекции крупного рогатого скота микроорганизмами из рода *Chlamydia*. Установили, что метод иммунофлюоресценции является более пригодным для обнаружения *Chlamydia* в патологическом материале чем исследование при помощи светового микроскопа окрашенных препаратов. Среди сравниваемых методов окрашивания (Stamp, Macchiavello, Giemza) самые лучшие результаты получили по методу

Stamp'a. При изолировании *Chlamydia* из тканей или спермы животных самыми чувствительными оказались куриные эмбрионы, потом белые мыши а наименее чувствительными тканевые культуры клеток L. При пассаживании хламидий одномоментное двойное заражение то есть интраназальное и интраперитонеальное оказалось более эффективным чем заражение только одним из выше указанных методов.

Truszczyński M., Sadowski J. M. — Evaluation of the methods for the identification of *Chlamydia* (*Miyagawanella*) organisms in bovine materials.

The purpose of the investigations was to determine the diagnostic value of microscopic methods and biological tests on chick embryos, white mice and L cell cultures in *Chlamydia* infection in cattle. It was found that the immunofluorescence method was more suitable for demonstrating the organisms in diagnostic materials than direct microscopic examination of stained smears. Among three compared staining methods acc. to Stamp, Macchiavello and Giemza, the first one proved to be the most valuable. Chick embryos were more suitable for the isolation of *Chlamydia* from animal tissues or sperm than white mice, or L cell cultures, which were the least sensitive. Simultaneous intranasal or intraperitoneal inoculations of white mice yielded better results in passaging the organism than the separate inoculation by one of these routes.

LIVINGSTON C. W., STAIR E. L., UNDERDAHL N. R., MEBUS C. A.: Patogeneza mykoplazmowego zapalenia płuc u świń. (Pathogenesis of mycoplasma pneumoniae pneumonia in swine). Am. J. vet. Res., 33, 2249—2258, 1972 (11).

Dwadzieścia dziewięć próśnięt uzyskanych na drodze histerektomii nie karmionych siałę, zakażono w wieku 1 tygodnia hodowlę bulionową (około 1000 kom./ml) *Mycoplasma hyopneumoniae*. Próśniętę które zakażano dotchawicowo poddawano ubojowi w odstępach 4-dniowych począwszy od 6 dnia po zakażeniu. Zmiany pod postacią bardzo drobnych eruzelków w podśluzówce nabłonka oskrzeli wystąpiły u jednego próśnięt 6 dnia po zakażeniu, u pozostałych sztuk 10 dnia po zakażeniu. Zmiany makroskopowe w płucach notowano począwszy od 14 dnia po zakażeniu. Mł. *hyopneumoniae* izolowano z płuc sztuk zakażonych od 10 dnia po zakażeniu. Do wykrywania zakażeń najbardziej przydatny okazał się odczyn immunofluorescencji. Badania przeprowadzone w mikroskopie elektronowym wykazały, że mykoplazmy przylegają ściśle do rzęsek i błony plazmatycznej nabłonka oskrzeli i oskrzelików i nie występują w cytoplazmie komórek zakażonych.

Z.

PAGE A. C., LOEFFLER J. E., HENDRICKSON H. R., HUSTON C. K., DE VRIES D. M.: Metabolizm dichlorvos u świń. (Metabolic fate of dichlorvos in swine). Arch. Toxikol., 30, 19, 27, 1972 (1).

Przemiany metaboliczne dichlorvos w organizmie świń przebadano przy doustnym i wziewnym stosowaniu znakowanego preparatu P<sup>32</sup>, Cl<sup>36</sup> i C<sup>14</sup>. Pojedyncza dawka dichlorvos w paszy wynosiła 40 mg/kg. U ciężarnych macior w okresie 4 tygodni przed oproszeniem dichlorvos stosowano w dawce 4 mg/kg wagi ciała. Steżenie dichlorvos w badaniach inhalacyjnych wynosiło 0,1 mg/m<sup>3</sup> powietrza. W przeprowadzonych badaniach nie stwierdzono nierozłożonego preparatu we krwi i tkankach badanych sztuk. Spośród produktów metabolizmu dichlorvos, wykryto w tkankach dwuchloroetanol. Badania oparte o preparat znakowany radioaktywnym chlorem przekonywująco udowodniły brak akumulacji produktów przemiany dichlorvos w tkankach. Niezależnie od drogi wprowadzenia do organizmu dichlorvos ulega odtoksycyzacji i rozpadowi.

Z.