

# MEDYCINA WETERYNARYJNA

ORGAN POLSKIEGO TOWARZYSTWA NAUK WETERYNARYJNYCH

CZASOPISMO POSWIĘCONE NAUCE I PRAKTYCE WETERYNARYJNEJ  
ZALOŻONE W 1945 R. PRZEZ WYDZIAŁ WETERYNARYJNY W LUBLINIE

## REDAKCJA

Redaktor naczelny: prof. dr Edmund PROST

Członkowie Komitetu Redakcyjnego: prof. dr Ryszard BADURA, prof. dr Jerzy MAZURCZAK,  
prof. dr Abdon STRYSZAK, doc. dr Stanisław WOŁOSZYN,

Sekretarz naukowy: dr Ryszard SŁUŻEWSKI.

## RADA PROGRAMOWA

Dr Anatol BACHAREWICZ, prof. dr Henryk BALBIERZ, prof. dr Władysław BIELAŃSKI, prof. dr Stanisław CAKAŁA, prof. dr Zygmunt EWY, prof. dr Roman HOPPE, prof. dr Tadeusz JASTRZĘBSKI, prof. dr Lech JAŚKOWSKI, plk. doc. dr Stefan KOSSAKOWSKI, prof. dr Zdzisław LARSKI, dyr. dr Henryk LIS, dr Władysław LUTYŃSKI, prof. dr Wincenty PEZACKI, prof. dr Wiktor STEFANIAK, prof. dr Marian TRUSZCZYŃSKI, prof. dr Janusz WELENTO, prof. dr Aleksander ZAKRZEWSKI, prof. dr Eugeniusz ŻARŃOWSKI.

# CHOROBY ZAKAŻNE I INWAZYJNE

ZYGMUNT CYGAN, TADEUSZ JASTRZĘBSKI

## Współczesne poglądy na taksonomię i rolę w patologii gramujemnych, niezarodnikujących pałeczek beztlenowych

Z Zakładu Higieny Weterynaryjnej w Lublinie

Z Instytutu Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych  
Wydziału Weterynaryjnego AR w Lublinie

### Taksonomia

Niezarodnikujące gramujemne pałeczki beztlenowe obecnie są zaliczane do rodziny *Bacteroidaceae*. Jednak ich taksonomia rodzajowa i gatunkowa, pomimo intensywnych badań, jest ciągle jeszcze nierozpracowana. Za jedną z pierwszych prób klasyfikacji uznać należy propozycję Castellaniego i Chalmersa (14) włączającą wszystkie niezarodnikujące pałeczki beztlenowe bez względu na sposób barwienia Gramem do rodzaju *Bacteroides*. Powyższa klasyfikacja została przyjęta przez autorów pierwszego wydania podręcznika Bergeya i wsp. (11). W 1923 r. Knorr (23) zaproponował wydzielenie beztlenowych wczecionowców gramujemnych w oddzielny rodzaj *Fusobacterium*. W obrębie powyższych rodzajów jedynym kryterium klasyfikacyjnym były początkowo właściwości morfologiczne zarazka. Później Eggerth i Gagnon (18) wprowadzili w charakterze dalszych kry-

teriów także testy biochemiczne. Zostały one na szeroką skalę wykorzystane w niezwykle szczegółowej systematyce francuskiej i angielskiej (13, 25). Należy jednak podkreślić, że zarówno właściwości morfologiczne jak i biochemiczne stanowią dla nowoczesnej szczegółowej taksonomii beztlenowców niezarodnikujących kryteria zbyt mało pewne i niewystarczające.

W aktualnej systematyce Breeda i wsp. (13) niezarodnikujące gramujemne pałeczki beztlenowe zostały zgrupowane w rodzinie *Bacteroidaceae*, w 4 rodzajach:

- Bacteroides* (30 gat., pałeczki niepleomorficzne, końce okrągłe, średnica 0,3 $\mu$ );
- Fusobacterium* (6 gat., pałeczki niepleomorficzne, końce wydłużone, średnica 0,3 $\mu$ );
- Dialister* (2 gat., niepleomorficzne, średnica 0,15 $\mu$ );
- Sphaerophorus* (18 gat., pałeczki wybitnie pleomorficzne z tendencją tworzenia sferoidów).

Powyższa systematyka, zwłaszcza w odniesieniu do gatunków bakteryjnych, jest w praktyce laboratoryjnej bardzo często niemożliwa do zastosowania. Wynika to przede wszystkim z niestabilności cech morfologicznych i biochemicznych stanowiących jej zasadę taksonomiczną. W związku z tym wydaje się, że wiele słuszności mają Wilson i Miles (36), którzy każdą szczegółową kwalifikację gatunkową tych drobnoustrojów uważają na razie za przedwczesną.

Podstaw dla nowoczesnej systematyki beztlenowców niezarodnikujących poszukuje się obecnie przez określanie kierunku metabolizmu glukozy i treoniny, współczynnika  $\frac{A+T}{G+C}$  i GC% oraz właściwości enzymatycznych i antygenowych. Szczególne znaczenie posiada badanie metabolicznej rozbudowy glukozy i treoniny (4, 8). Powyższe właściwości metaboliczne oraz dodatkowo wrażliwość zarazka na żółć bydłą i wartość pH hodowli w bulionie z glukozą stanowią zasadnicze kryteria klasyfikacji według Beerensa i wsp. (5, 6). Zaletą systematyki Beerensa i wsp. (6) jest wykorzystanie stosunkowo pewnych podstaw klasyfikacyjnych związanych z metabolizmem zarazka, natomiast poważną wadą jest konieczność stosowania kłopotliwej metodyki oznaczania enzymów i ostatecznych produktów ich działania tj. kwasów tłuszczowych. Dlatego duże znaczenie praktyczne posiadają badania nad uproszczeniem tej pracochłonnej metodyki. Znalazły one wyraz w badaniach Beerensa i Castel (4), którzy opracowali stosunkowo prosty test z błękitem Nilu dla oznaczenia dehydrogenaz treoniny. Często jednak badanie powyższe nie wystarcza gdyż, jak wynika z badań Guillaumie i wsp. (21), proces enzymatycznej rozbudowy treoniny do kwasu propionowego może zachodzić także w następstwie działania dezaminaz treoniny. Najbardziej odpowiednią metodą oznaczania tych enzymów w oparciu o spektrofotometrię została podana przez Lessie i Whiteleya (24).

Klasyfikacja według Beerensa i wsp. (6) wprowadza podział gramujemnych beztlenowców niezarodnikujących na 5 rodzajów w oparciu o wytwarzanie kwasu propionowego z treoniny i masłowego z glukozy (pałeczki *Fusobacterium* i *Sphaerophorus*) oraz kwasu masłowego z glukozy bez zdolności wykorzystania treoniny (pałeczki *Ristella* i *Dialister*). W powyższej systematyce pałeczki, które nie produkują kwasu propionowego i masłowego z treoniny i glukozy są zaliczane do rodzaju *Eggerthella*. Wśród pałeczek rodzaju *Eggerthella* w zależności od zachowania się w podłożu z żółcią wyróżnia się 2 reprezentatywne gatunki tj. *E. convexa* (stymulacja wzrostu) i *E. Barnes—Goldberg* (inhibicja wzrostu) (9).

Niektóre nowoczesne propozycje w taksonomii gramujemnych pałeczek beztlenowych uwzględniają także różnice w składzie zasad DNA (27, 30). Jednak oparcie klasyfikacji bak-

terii wyłącznie na tej podstawie daje także wyniki niezbyt pewne. Często bowiem zdarza się, że nawet drobnoustroje zupełnie odrębne posiadają zbliżone współczynniki zasad DNA. Niemniej jednak badania DNA są użyteczne dla określenia taksonomii rodzaju. Ostatnio np. wykorzystane zostały w systematyce francuskiej z 1966 r. (27). Według tej systematyki gramujemne pałeczki beztlenowe zalicza się do rzędu *Bacteriales*, który obejmuje 3 rodziny:

1. *Parvobacteriaceae* (pałeczki gramujemne  $0,3 \times 0,15 \mu$  i  $1,8 \times 0,6 \mu$ ) z rodz.:

a. *Pasteurella* (5 gat., pałeczki bipolarne);

b. *Dialister* (2 gat., pałeczki przesączalne przez filtry Berkefelda V i Chamberlanda L2);

2. *Ristellaceae* (pałeczki gramujemne  $1 - 3 \times 0,5 - 1,2 \mu$  i  $6 - 20 \times 0,5 - 1,2 \mu$ ) z rodz.:

a. *Ristella* (33 gat.,  $\frac{A+T}{G+C}$  1,4, ruch —, otoczka —);

b. *Capsularis* (3 gat., otoczka +, ruch —);

c. *Zuberella* (12 gat.,  $\frac{A+T}{G+C}$  1,16, ruch +).

3. *Sphaerophoraceae* (pałeczki gramujemne pleomorficzne tworzące sferoidy) z rodz.:

a. *Sphaerophorus* (21 gat.,  $\frac{A+T}{G+C}$  1,9, ruch —);

b. *Sphaerocillus* (3 gat., j.w. ale ruch +).

Niedawno Barnes i Goldberg (3) za pomocą taksonomii numerycznej dokonali zróżnicowania niezarodnikujących pałeczek beztlenowych na 4 fenony obejmujące szczepy:

1. *Sphaerophorus*, *Fusobacterium* i *Bac. melaninogenicus*;

2. *Bacteroides*;

3. i 4. pochodzące od ptaków.

Zasadnicze cechy tych fenonów są następujące:

1. Pałeczki *Sphaerophorus* i *Fusobacterium* produkowały kwas propionowy z treoniny, kwas masłowy z glukozy, wyrastały na podłożu z zielenią brylantową w koncentracji 1:100 000 oraz zakwaszały bulion z glukożą do pH 5,6 — 6,5. Ponadto szczepy *Sphaerophorus* wytwarzały lecytynazę, produkowały kwas propionowy, octowy i masłowy w bulionie z glukożą oraz gaz. Polimyksyna B hamowała ich wzrost w stężeniu 10  $\mu$ g/ml, natomiast żółć wykazywała działanie stymulujące. Szczepy *Fusobacterium* przedstawiały się jako pałeczki o ostrych końcach, nie wytwarzały lecytynazy i hemolizyn oraz kwasu propionowego w bulionie z glukożą. Ponadto były hamowane przez dodatek żółci do podłoża z glukożą.

Szczepy *Bact. melaninogenicus* pod względem morfologii, wytwarzania kwasu mrówkowego, octowego i masłowego oraz fermentacji niektórych węglowodanów zbliżone były do *Sphaerophorus*. Natomiast odróżniały się od *Sphaerophorus* i *Fusobacterium* produkcją barwnika, wrażliwością na zielen brylantową i opornością na polimyksynę B. Ponadto szczepy tego fenonu nie rozbudowywały treoniny.

2. Szczepy określone jako *Bacteroides* nie wytwarzały kwasu propionowego z treoniny i masłowego z glukozy, silnie zakwaszały bulion z glukozą do pH 4,6 — 5,5, fermentowały większość węglowodanów, a w stosunku do żółci wykazywały znaczne różnice we wrażliwości.

3. Szczepy ptasie wyodrębnione z kału kur miały cechy wspólne dla *Sphaerophorus* i *Bacteroides*.

4. Szczepy wyodrębnione z kału kur, kaczek i indyka, były wybitnie pleomorficzne, lecz nie wytwarzały kwasu masłowego z glukozy.

Trudności na jakie napotyka taksonomia beztlencowców niezarodnikujących doprowadziła niektórych autorów do wprowadzenia poważnych uproszczeń klasyfikacyjnych. Tendencje takie zaznaczyły się w USA np. w propozycji Finegolda i Millera (20), zakładającej podział tych drobnoustrojów na 5 grup: *Bacteroides fragilis*, *B. melaninogenicus* i *B. oralis* oraz *Sphaerophorus* i *Fusobacterium*. Powyższy podział został dokonany głównie na podstawie kierunku metabolizmu treoniny i glukozy, wpływu żółci na wzrost, pH hodowli w bulionie z glukozą oraz częściowo właściwości fermentacyjnych i morfologicznych.

W związku z uzyskanymi u beztlencowców niezarodnikujących wynikami badań nad składem DNA, antygenów i enzymów powstała możliwość dalszych uproszczeń taksonomicznych na drodze zredukowania ilości rodzajów. Badania Sebald (29) dotyczące struktury DNA wykazały bowiem, że u pałeczek beztlencowych z rodzaju *Sphaerophorus* i *Fusobacterium* GC% wynosi 34,3, a u pałeczek rodzaju *Bacteroides*, *Ristella* i *Eggerthella* GC% — 41,7. Również badania Suzuki i wsp. (32) wskazały na ścisły genetyczny związek zachodzący pomiędzy drobnoustrojami *Sphaerophorus* i *Fusobacterium*. Werner i Sebald (35) serologicznie wykazali, że pomiędzy pałeczkami grupy *Sphaerophorus* i *Fusobacterium* z jednej strony, a pałeczkami *Bacteroides*, *Ristella* i *Eggerthella* z drugiej istnieje również odrębność antygenowa. Ostatnio Keudell i Goldber (22) zwrócili uwagę na znaczenie składu dehydrogenaz w różnicowaniu gramujemnych pałeczek beztlencowych. Okazało się bowiem, że pałeczki *Sphaerophorus* i *Fusobacterium* nie zawierają w przeciwieństwie do pałeczek *Bacteroides* dehydrogenazy kwasu jabłkowego i glukozo-6-fosforanowej.

Na podstawie powyższych wyników badań Międzynarodowy Komitet Nomenklatury Drobnoustrojów w 1970 r. zaproponował zgrupowanie wszystkich niezarodnikujących pałeczek beztlencowych w 2 rodzaje *Fusobacterium* i *Bacteroides*.

Wyjątkowe trudności napotyka klasyfikacja gatunkowa beztlencowców niezarodnikujących. W aktualnie obowiązujących systematykach stosowane jako kryteria taksonomiczne właściwości morfologiczno-hodowlano-biochemiczne są mało stałe i pewne. Również ograniczone zna-

czenie dla ustalenia pozycji gatunku posiada współczynnik GC%, gdyż często jest on podobny nawet u całkowicie odrębnych beztlencowców i dlatego nie może stanowić jedynej zasady identyfikacji gatunku. Dopiero zespół wyżej wspomnianych cech, uzupełniony przez właściwości antygenowe, hemaglutynacyjne, hemolityczne, enzymatyczne i patogenne musi być użyty do scharakteryzowania gatunku. W oparciu o zasadę badania wszystkich tych właściwości podano krytyce stanowisko Prevot (25) przyjmujące odrębność gatunkową laseczek *Fusobact. necrophorum*, *Fusobact. funduliformis* i *Fusobact. pseudonecrophorum*. Beerens i wsp. (7) oraz Watre i wsp. (33) wykazali bowiem, że powyższe drobnoustroje stanowią jedynie mutanty A, B, C lub w terminologii Fievez (19) typy jednego gatunku *Fusobact. necrophorum*, różniące się między sobą właściwościami hemaglutynacyjnymi, hemolitycznymi, częściowo antygenowymi i patogennością.

Również wątpliwości budzi pozycja niektórych gatunków w rodzaju *Bacteroides*. Dla przykładu podam, że drobnoustroje określone jako *Egg. clostridiiformis* i *F. biacutum* nie posiadają żadnych związków antygenowych z pałeczkami rodzaju *Bacteroides* i *Fusobacterium*. Ponadto wykazano, że powyższe drobnoustroje w podłożu RCM produkują zarodniki. Stwierdzone odchylenia w tych właściwościach stały się podstawą do wyłączenia drobnoustrojów *Egg. clostridiiformis* i *Fusobact. biacutum* z rodziny *Bacteroidaceae*.

W składzie mikroflory jelitowej człowieka przyjmuje się obecnie istnienie 5 referencyjnych gatunków pałeczek tej grupy a mianowicie: *B. convexa*, *B. thetaiotaomicron*, *B. vulgatus*, *B. ovatus* i *B. distasonis* (10, 34). Pałeczki *B. convexa* są niejednolite i wykazują antygenowe różnicowanie na szereg serotypów (35).

Dotychczas nie została ostatecznie jeszcze ustalona w taksonomii pozycja pałeczek *B. melaninogenicus*. Okazało się bowiem, że powyższe drobnoustroje pod względem składu DNA i niektórych właściwości metabolicznych są zbliżone do pałeczek rodzaju *Bacteroides*, podczas gdy właściwościami morfologicznymi i wrażliwością na barwniki odpowiadają raczej pałeczkom *Fusobacterium*.

### Rola beztlencowych pałeczek niezarodnikujących w patologii.

Znaczenie w patologii pałeczek rodziny *Bacteroidaceae* wynika z ogólnego postępu, jaki ostatnio dokonał się w medycynie i biologii. Zastosowanie bowiem leków immunodepresyjnych i cytostatycznych, a w szczególności kortyzonowych i radioterapii stało się głównym czynnikiem aktywującym chorobotwórcze działanie tych drobnoustrojów.

Podobną rolę aktywującą spełnia również niefizjologiczne odżywianie zwierząt w szeroko rozwijanym obecnie systemie tuczu przemysłowo-

wego. Pośrednio również antybiotykoterapia wpływa na selekcję zwłaszcza pałeczek *Bacteroides* obdarzonych dużą opornością.

Wzrastającą rolę beztlenowych pałeczek niezarodnikujących w patologii człowieka ilustrują dobrze dane autorów francuskich (30). Wynika z nich, że w laboratoryjnej praktyce medycznej udział niezarodnikujących pałeczek beztlenowych w przypadkach dodatnich hemokultur jest b. wysoki i wynosi 10 — 20%. Najczęściej przy tym izolowana jest pałeczka *B. convexa*. Rezerwuarem niezarodnikujących pałeczek beztlenowych jest wyłącznie organizm zwierzęcy, głównie błony śluzowe przewodu pokarmowego, moczowo-płciowego oraz skóra, gdzie stanowią dominującą mikroflorę bakteryjną (20). Ogólnie przymuje się, że większość infekcji wywołanych przez powyższe drobnoustroje jest pochodzenia endogennego. W odnośnych procesach chorobowych pałeczki beztlenowe występują zwykle łącznie z innymi drobnoustrojami jelitowymi (2).

Pałeczki *Bacteroides* stanowią około 50% mikroflory jelita grubego u człowieka. Spośród nich dominują gatunki *Bact. thetaiotaomicron* i *Bact. vulgatus*. Infekcje wywołane przez pałeczkę *Bacteroides* przebiegają u człowieka w postaci zlokalizowanych ropień jako „pleuritis”, „cholecystitis”, „appendicitis”, „endometritis”, „meningitis” itp. oraz jako uogólnienie posocznicowe (2). Patogenność tych drobnoustrojów jest związana głównie z *Bact. convexa*. Również poważne znaczenie w patologii człowieka posiada pałeczka *Bact. melaninogenicus* spotykana często w mieszanych infekcjach, głównie o charakterze ropnym. Natomiast wg Prevot (26) u zwierząt pałeczki *Bacteroides* są rzadkim czynnikiem chorobowym.

W patologii zwierząt szczególne znaczenie posiada pałeczka *Fusobacterium necrophorum*. Drobnoustroj ten występuje jako pierwotny czynnik przyczynowy w zanokcicy owiec (12, 17, 28), w ropniach wątroby zwierząt tuczonych (1, 15) i tzw. „digital suppurative” owiec. W przypadku zanokcicy owiec, pałeczka *Fusobact. necrophorum* współdziała synergistycznie z niezarodnikującą, beztlenową pałeczką *Fusobact. nodosum*. Powyższy synergizm polega na produkowaniu przez *Fusobact. nodosum* ciepłoodpornego czynnika wzrostowego dla *Fusobact. necrophorum*. Natomiast *Fusobact. necrophorum* wytwarza egzotoksynę, która paraliżuje fagocytozę makroorganizmu i w ten sposób zapewnia przetrwanie w tkankach pałeczki *Fusobact. nodosum*. Rozwój charakterystycznych objawów chorobowych zanokcicy owiec jest uwarunkowany właściwościami biologicznymi pałeczki *Fusobact. nodosum* w zakresie produkcji silnych proteaz (12, 16). Natomiast pałeczce *Fusobact. necrophorum* przypisuje Roberts i Egerton (28) inicjację schorzenia przez spowodowanie „dermatitis interdigitalis”, a później zmian zapalno-martwiczych w postaci „hiperkeratozy” i „parakeratozy”.

Ponadto pałeczce *Fusobact. necrophorum* przypisuje się rolę etiologiczną w wywoływaniu ropni wątroby u tuczonego bydła (1, 15, 31). W tym przypadku duże znaczenie posiada działanie czynnika żywieniowego prowadzące do „rumenitis” i zatorów drobnych naczyń wątroby (31). Wg Smitha (31) duża częstotliwość występowania tego schorzenia dochodząca u tuczonego bydła nawet do 60% jest przyczyną poważnych strat gospodarczych.

Charakterystyczną właściwością pałeczki *Fusobact. necrophorum* jest także działanie wnikające w szereg schorzeń etiologii wirusowej, przy ropniach płuc cieląt, przy „rhinitis”, przy dyzenterii świń i grudzie koni.

Mechanizm działania chorobotwórczego niezarodnikujących pałeczek beztlenowych jest wyjątkowo złożony. Wiąże się on głównie ze zdolnością tych bakterii do wytwarzania enzymów ułatwiających penetrację tkanek. Spośród nich wymienić należy kolagenazę szczepów *Bact. melaninogenicus*, heparynazę i neuraminidazę *Bact. convexa*, elastazę *Fusobact. nodosum*. Ponadto pewne znaczenie mogą posiadać sympleksy lipido-wielocukrowo-białkowe o cechach endotoksyn oraz aminy toksyczne, a zwłaszcza histamina, tryptamina i tyramina produkowane w znacznych ilościach przez liczne niezarodnikujące beztlenowce. Powyższe właściwości chorobotwórczego oddziaływania niezarodnikujących pałeczek beztlenowych na makroorganizm są ujawniane w endogennych infekcjach, powstających stosunkowo często w warunkach współczesnej terapii przy stosowaniu kortizonów, cytostatyków, antybiotyków i immunodepresorów. Dlatego słuszny wydaje się być pogląd Sebald (30), że powyższe drobnoustroje są zakaźnymi czynnikami nie tylko chorób teraźniejszości ale i przyszłości człowieka i zwierząt.

#### Piśmiennictwo

1. Aalbaek B.: Acta vet. scand. 12, 344, 1971.
2. Aalbaek B.: Nord. VetMed. 25, 409, 1973.
3. Barnes E., Golberg H. S.: J. gen. Microbiol. 51, 313, 1968.
4. Beerens H., Castel M. M.: Annl. Inst. Pasteur, Paryż 108, 682, 1965.
5. Beerens H., Castel M. M., Abraham R.: Annl. Inst. Pasteur, Paryż 99, 454, 1960.
6. Beerens H., Castel M. M., Fievez L.: Abstracts VIII th. Int. Congr. Microbiol., Montreal 1962.
7. Beerens H., Fievez L., Wattré P.: Annl. Inst. Pasteur, Paryż 121, 37, 1971.
8. Beerens H., Guillaume J., Petit H.: Annl. Inst. Pasteur, Paryż 96, 211, 1959.
9. Beerens H., Schaffner Y., Guillaume J., Castel M. M.: Annl. Inst. Pasteur, Lille 14, 5, 1963.
10. Beerens H., Wattré P., Shinjo T., Ramond C.: Annl. Inst. Pasteur, Paryż 121, 187, 1971.
11. Bergey D. H., Harrison F. C., Breed R. S., Hammer E. W., Huntoon F. M.: cyt. wg poz. 2.
12. Beveridge W. I. B.: Biull. Count. Scient. ind. Res., Australia 140, 58, 1941.
13. Breed R. S., Murray E. G. D., Smith N. R.: Bergey's manual of determinative bacteriology, Baltimore 1957.
14. Castellani A., Chalmers A.: cyt. wg. poz. 2.
15. Cygan Z., Jastrzębski T., Gależa J., Pielecki M.: Pol. Arch. wet. 17, 237, 1974.
16. Egerton J. R., Parsonson I. M.: Aust. vet. J. 45, 346, 1969.
17. Egerton J. R., Roberts D. S.: J. comp. Path. 79, 247, 1969.
18. Eggerth A. H., Gagnon B. H.: J. Bact. 25, 389, 1933.
19. Fievez L.: Etude comparee des souches de Sphaerophorus necrophorus isolées chez l'homme et chez l'animal. Presses Academiques Europeennes, Bruxelles 1963.
20. Finegold S. M., Miller L. G.: Les bacteries anaerobies, Laval — des — Rapides, Montreal 1967.
21. Guillaume J., Beerens H., Osteux R.: Annl. Inst. Pasteur, Lille 9, 68, 1957.

22. Keudell K. C., Goldberg H. S.: Appl. Microbiol. 19, 505, 1970.
23. Knorr M.: cyt. wg. poz. 2.
24. Lessie T. G., Whiteley H. R.: J. Bact. 100, 878, 1969.
25. Prevot A. R.: Manuel de classification et de determination des bacteries anaerobies. Masson, Paris 1948.
26. Prevot A. R.: Bull. Off. int. Epizoot. 59, 1261, 1963.
27. Prevot A. R.: Manual for the classification and determination of the anaerobic bacteria. Lea and Febiger, Philadelphia 1966.
28. Roberts D. S., Egerton J. R.: J. comp. Path. 79, 217, 1969.
29. Sebald M.: Etude sur les bacteries anaerobies gram -- negatives asporulees. These, Paris 1962.
30. Sebald M.: Gazette Medicale de France 81, 1335, 1974.
31. Smith L.D. S.: Bull. Off. int. Epizoot. 59, 1517.
32. Suzuki S., Ushijima T., Ichinose H.: Jap. J. Microbiol. 10, 193, 1966.
33. Wattré P., Fievez L., Beerens H.: Annls Inst. Pasteur, Paryż 120, 643, 1971.
34. Werner H.: Zentbl. Bakt. ParasitKde I. 210, 192, 1969.
35. Werner H., Sebald M.: Annls Inst. Pasteur, Paryż 115, 350, 1968.
36. Wilson G. S., Miles A. A.: Topley and Wilson's principles of bacteriology and immunity, E. Arnold Publ., London 1964.

Adres autora: doc. dr habil. Zygmunt Cygan, ul. Słowicza 2/7, 20-336 Lublin.

MARIAN TRUSZCZYŃSKI, MARIA TERESZCZUKOWA, IRENA RUTKOWSKA-JURGA

## Wstępne badania nad czynnym uodpornianiem drobiu przeciw pasterelozie

Z Instytutu Weterynarii w Puławach

Pastereloza powoduje znaczne straty w hodowli drobiu w wielu krajach, w tym również w Polsce (5, 12, 14). W ostatnich latach szczególnie ważnym problemem stała się u nas pastereloza gęsi, powodująca duże straty w gospodarce uspołecznionej. Stosowane w takich przypadkach postępowanie, polegające na podawaniu preparatów chemoterapeutycznych, jest kosztowne i często nie daje pożądanego efektu. Wydaje się, że najbardziej skutecznym i właściwym, ze względów ekonomicznych, sposobem walki z tą chorobą byłoby czynne uodpornianie drobiu przeciw pasterelozie. Dotychczas w skali międzynarodowej, w tym również i w Polsce, odczuwa się brak szczepionki chroniącej ptactwo w dostatecznym stopniu przed zakażeniem zjadliwymi szczepami *Past. multocida*.

Mając powyższe na uwadze podjęto badania, których celem były próby opracowania skutecznej szczepionki przeciw pasterelozie drobiu. W badaniach tych uwzględniono prace szeregu autorów zagranicznych, którzy uzyskiwali zachęcające wyniki przy uodpornianiu ptaków doświadczalnie przygotowanymi szczepionkami inaktywowanymi (1, 6, 7, 8, 9, 10), lub żywymi -- zawierającymi atenuowane szczepy *Past. multocida* (2, 3, 4, 11). Dobór szczepów do sporządzania doświadczalnych szczepionek oparto na poprzednich badaniach własnych (13).

W niniejszej pracy postanowiono przygotować i zbadać na skuteczność szczepionkę: inaktywowaną formaliną, inaktywowaną termicznie oraz żywą, zawierającą szczep *Past. multocida* o bardzo małej zjadliwości dla drobiu.

### Materiał i metody

Szczepy bakteryjne. Do przygotowania szczepionek inaktywowanych użyto szczep nr 97, wyizolowany od gęsi padłej na ostrą postać pasterelozy. Szczep ten na podstawie badań biochemicznych, serologicznych i immunologicznych został zaliczony do najczęściej w Polsce występującego u drobiu typu *Pasteurella multocida* (typ II wg Tereszczuka). Szczepionkę żywą przy-

gotowano ze szczepu nr 20, wyizolowanego z kury padłej na przewlekłą postać pasterelozy. Szczep ten, jak wykazano w poprzednich badaniach własnych (13), różnił się od większości szczepów wyosobnionych z drobiu właściwościami biochemicznymi, serologicznymi oraz stopniem zjadliwości dla kurcząt i gęsi.

Do zakażania uodpornionych zwierząt używano oprócz szczepu homologicznego również szczep nr 67, wyosobniony z ostrej formy pasterelozy kur, oraz szczep nr 3, pochodzący z przewlekłej postaci tej choroby.

Przygotowanie szczepionek inaktywowanych. Po 16 godzinach namnażania na agarze szczepu nr 97 splukiwano wyrosłe kolonie 7-dniową hodowlą bulionową tegoż drobnoustroju. Po dokładnym wymieszaniu zawiesiny w kolbce z perełkami oznaczano metodą płytkowa Kocha jej gęstość, która wynosiła około 20 miliardów bakterii w 1 ml. Zawartość kolbki dzielono na dwie części. Do jednej dodawano 0,2% formaliny i pozostawiano przez 48 godzin w temperaturze 37°C, druga natomiast inaktywowano w łaźni wodnej przez 30 minut w temperaturze 70°C. Celem sprawdzenia skuteczności inaktywacji, posiewano szczepionki na dwie próbówki z bulionem zwykłym i dwie z agarem, zawierającym 5% surowicy. Nieszkodliwość uzyskanych preparatów sprawdzano, szczepiąc podskórnie po 2 myszki białe dawką 0,2 ml.

Badanie wartości ochronnej szczepionek. W przypadku stwierdzenia braku zanieczyszczeń bakteryjnych i nieszkodliwości szczepionek, uodporniano nimi zwierzęta doświadczalne. Kurczęta 14-tygodniowe i kury otrzymywały podskórnie po 1 ml, a gęsi po 2,5 ml szczepionki. Po 7-dniowej przerwie stosowano powtórne szczepienie takimi samymi dawkami.

Po upływie trzech tygodni od ostatniego szczepienia dzielono ptaki na 6 grup, po 3 kurczęta i 2 gęsi w każdej grupie. Poszczególne grupy zakażano domięśniowo wzrastającymi rozcieńczeniami danego szczepu w dawce 0,25 ml. Szczepami nr 3 i 67 zakażano ptaki w rozcieńczeniach od  $10^{-2}$  do  $10^{-7}$ , natomiast szczepem nr 97 od  $10^{-8}$  do  $10^{-9}$ . Równolegle w ten sam sposób zakażano taką samą liczbę ptaków kontrolnych. Z krwi padłych zwierząt sporządzano preparaty mikroskopowe i barwiono je metodą Löfflera, a narządy wewnętrzne oraz krew wysiewano na agar z krwią.

Po 7 dniach od daty zakażenia określano, na podstawie upadków w grupie kontrolnej, dawkę śmiertelną danego szczepu (najwyższe rozcieńczenie zarazka powodujące śmierć 100% zwierząt). Porównując, w odpowiednich grupkach, upadki zwierząt uodpornianych w stosunku do zwierząt kontrolnych, określano jaką wartość ochronną posiadała badana szczepionka. Jeśli np. padły zwierzęta kontrolne w grupach zakażonych