

dowlę prątków gruźliczych, która rosła w postaci suchych, twardych, chropowatych kolonii koloru białego. Próba biologiczna na świn-kach morskich i test tuberkulino-alergiczny u wszystkich 20 świń dały wynik dodatni. Ponadto nadmienia się, że odpadki kuchenne ze szpitala przeciwgruźliczego Potok nie były wykorzystane do skarmiania świń, lecz magazynowano je w pomieszczeniach obok chlewni, co przypuszczalnie stało się źródłem zakażenia szczurów prątkami gruźlicy, a prawdopodobnie poprzez szczury świń.

Przeprowadzone badania stanowią potwierdzenie danych piśmiennictwa (2, 3, 4), że szczur wędrowny (*Rattus Norvegicus*) może być no-sicielem: salmoneli, gronkowca chorobotwór-czego, włoskowca różycy i prątków gruźliczych.

Piśmiennictwo

1. Instrukcja Min. Rol. Dep. Wet. — w sprawie zasad prze-prowadzenia mikrobiologicznych badań nad gruźlicą zwie-rząt. 1968.
2. Służewska M., Truszczyński M.: Medycyna Wet. 26, 455, 1970.
3. Służewska M., Truszczyński M.: Medycyna Wet. 31, 138, 1975.
4. Gotębiowski S.: Medycyna Wet. 30, 151, 1974.

Adres autora: lek. wet. Andrzej Garbacik, ul. Sciegiennego 2a, 38-400 Krosno n/W.

MARIAN ŚWIDERSKI, ANTONI JĘDRZEJOWSKI
Gryfice

Infekcyjna lekooporność i wirulencja pałeczek *Citrobacter* z ogniska intoksykacji prosiąt

W diagnostyce bakteriologicznej coraz czę-sciej spotykamy się z przypadkami, w których czynnikiem etiologicznym schorzenia są drob-noustroje uważane do niedawna za niechoro-botwórcze.

Tak np. pałeczki okrężnicy często wywołują zakażenia dróg moczowych, biegunki niemow-lęce i kolibakteriozy (14). Izoluje się je rów-nież z zakażeń przyrannych, zapaleń oskrzeli, woreczka żółciowego oraz ropni różnych narządów (6). Przyczyną zatruc pokarmowych mogą być pałeczki z rodzaju *Proteus*, *Str. fe-calis*, *B. cereus* lub szczepy *E. coli* serotypów O111, 055 i 026 (1).

W wyniku różnych mechanizmów selekcyj-nych wśród bakterii patogennych i warunkowo patogennych często pojawiają się szczepy odpor-ne na działanie antybiotyków i chemioterapeu-tyków, co poważnie utrudnia leczenie schorzeń nierzadko o ciężkim przebiegu. W związku z wprowadzeniem antybiotyków jako dodatków paszowych, w celu uzyskiwania szybszych przyrostów wagi zwierząt hodowlanych, obser-wuje się coraz częstsze występowanie u drob-noustrojów stanowiących naturalną mikroflorę jelitową infekcyjnej lekooporności, uwarunko-wanej czynnikiem R. Warunkowo patogeniczne bakterie mogą czasem wywoływać ciężkie schorzenia przewodu pokarmowego zwierząt hodowlanych przebiegające w postaci enzoo-tii, które w hodowlach wielkostadnych i tuczu przemysłowym powodują poważne straty go-spodarcze (3, 4).

W pracy przebadano pałeczki *Citrobacter* z ogniska intoksykacji prosiąt w hodowli wiel-kostadnej w rejonie Gryfic w 1975 r., gdzie zachorowało około 1000 tych zwierząt, z któ-rych 6% padło. Określono jednocześnie naturę genetyczną czynników R i Vi, występujących u patogennych szczepów *Citrobacter* oraz spo-sób ich przekazywania.

Materiał i metody

Przebadano 40 padłych i 60 chorych prosiąt w kie-runku wykrycia czynnika etiologicznego choroby. U zwierząt występowała biegunka, odwodnienie, nie-chęć do ruchu, osłabienie, ospałość, brak apetytu, po-smutnienie, podwyższona temperatura i szare zabar-wienie skóry. Kał był rzadki, wodnisty, żółtoszary z domieszką śluzu i niekiedy krwi o nieprzyjemnej, gnilnej woni. Na sekcji stwierdzano nieżytowe zapa-lenie błony śluzowej żołądka i jelit, obrzęk i prze-krwienie krezkowych węzłów chłonnych, przekrwie-nie wątroby i śledziony.

Od chorych prosiąt badano kał, a w przypadku gdy zwierzęta padły — do badania pobierano również ma-teriał sekcyjny (wątroba, śledziona, nerki, serce, płu-ca, krew, jelito cienkie, jelito grube, treść jelit). Ba-daniami objęto również paszę (śruta jęczmienna, śru-ta pszenna, serwatka, mleko chude, ziemniaki goto-wane, mieszanka T, mieszanka W).

Tylko z mieszanki T i z mieszanki W oraz jelit cienkich, grubych i kałów wyizolowano szczepy *Citro-bacter*. Z pozostałych produktów paszowych i ma-teriału sekcyjnego nie wyizolowano tych bakterii.

Cechy biochemiczne izolowanych szczepów:

glukoza +; cytrynian +; laktoza —; KCN +; in-dol —; fenyloalanina —; H₂S +; lizyna —; mocz-nik —; malonian —; MR +; ruch +; VP —.

Antybiogram badanych szczepów:

oxyterracyna	—	oporny
erytromycyna	—	„
ampicylina	—	„
metycylina	—	„
penicylina	—	„
kloksacylina	—	„
cefalorydina	—	„
kolimycyna	—	„
karbenicylina	—	wrażliwy
chloromycetyna	—	„
streptomycyna	—	„
neomycyna	—	„
garamycyna	—	„
fucydina	—	„
kanamycyna	—	„
nitrofurantoina	—	„
negram	—	„
biseptol	—	„
sulfatiazol	—	„

Wszystkie szczepy *Citrobacter* wyizolowane od zwierząt chorych i padłych oraz mieszanek T i W miały identyczne cechy biochemiczne i antybiogram.

Wykrywanie przekazywania czynnika R.

W charakterze dawców czynnika R używano patogenne szczepy *Citrobacter*, a w charakterze biorców szczepy *E. coli* K12F⁻ otrzymane z PAN Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej we Wrocławiu oraz *E. coli*-SM i *Citrobacter*-SM, wyizolowane z kału zdrowych prosiąt, pochodzących z hodowli, gdzie nie występowała choroba. Wszystkie szczepy biorcy były odporne na negram, a wrażliwe na oxytetracynę. Do podłoża selekcyjnych dodawano taką ilość negramu, aby jego stężenie wynosiło 30 µg/ml, a oxytetracyny 20 µg/ml.

A. Jakościowe

Po 1 ml 18 godz. hodowli bulionowej dawcy i biorcy dodawano do 10 ml świeżego bulionu odżywczego. Hodowlę inkubowano 18 godzin w temperaturze 37°C, po czym eż wykonywano posiew krzyżówki na całą płytkę Petriego z odpowiednim podłożem selekcyjnym (podłoże Lewine'a i Sołtysa z negramem i oxytetracyną).

Ponieważ szczepy dawcy były wrażliwe na negram, a szczepy biorcy odporne na ten lek, lecz wrażliwe na oxytetracynę, na podłożu selekcyjnym mogły tylko wyrosnąć komórki biorcy, które nabyły w procesie koniugacji oporność na oxytetracynę. Wyniki badań odczytywano po 48 godz. inkubacji podłoża selekcyjnych w temp. 37°C.

B. Ilościowe

Krzyżówki dawcy i biorcy po 18 godz. inkubacji wysiewano na podłoże selekcyjne (podłoże Lewine'a i Sołtysa), zawierające tylko negram. Na podłożu tym mogły wyrosnąć tylko kolonie biorcy zarówno te, które nabyły cechy oporności na antybiotyki jak i te, które pozostały na nie nadal wrażliwe. Z podłoża selekcyjnych izolowano po 1000 kolonii biorcy i metodą replik Lederberga (7) badano efektywność przekazywania czynnika R wyrażoną w %.

Badanie natury czynnika Vi.

Z wyizolowanych od zakażonych chorych prosiąt szczepów *E. coli* i *Citrobacter* z nabytym czynnikiem R i Vi zakładano 18 godz. bulionowe hodowle. Każdą hodowlę dzielono na dwie równe części i jedną z nich zabijano przez dodanie chloroformu (1 ml na 100 ml hodowli) i energicznie wytrząsanie. Posiewy kontrolne tej hodowli były ujemne. Żywą i zabita hodowlą zakażono prosięta dodając do 10 l karmy 0,25 l

18 godz. hodowli bulionowej pałeczek *Citrobacter* lub *E. coli* z nabytym czynnikiem R i Vi.

Wykrywanie niezależnego przekazywania czynnika Vi.

Z pojedynczych kolonii biorcy *E. coli*-SM i *Citrobacter*-SM, które w procesie koniugacji z patogennym szczepem *Citrobacter* nie były odporne na oxytetracynę, sporządzano 18 godz. bulionowe hodowle i zakażano nimi prosięta przez dodanie do 10 l paszy 0,25 l 18 godz. bulionowej hodowli. Zakażone prosięta obserwowano w ciągu 18–24 godz. czy wystąpią u nich objawy intoksykacji.

Wyniki

Wszystkie badane patogenne szczepy *Citrobacter* wyizolowane z mieszanek paszowych, jelit i kałów prosiąt padłych i chorych przekazywały oporność na oxytetracynę niepatogennym szczepom *E. coli* K-12F⁻, szczepom *E. coli*-SM i *Citrobacter*-SM wyizolowanym od zwierząt zdrowych.

Jak widać z tab. 1 najlepszym biorcą czynnika R okazał się szczep *Citrobacter*-SM. Przy użyciu w charakterze biorcy tego szczepu % przekazywania wahał się od 16 do 29. Gdy biorcą był szczep *E. coli*-SM % przekazywania był mniejszy i wynosił od 12 do 25. Najniższym biorcą czynnika R był szczep *E. coli* K-12F⁻. Procent przekazywania wahał się od 10 do 20.

Z analizy danych zebranych w tab. 2 wynika, że patogenne szczepy *Citrobacter* przekazują szczepom niepatogennym *E. coli* i *Citrobacter* wyizolowanym z kału zdrowych prosiąt oprócz czynnika R również czynnik Vi. Na 15 zakażonych prosiąt hodowlami *Citrobacter* założonymi z pojedynczych kolonii tych drobnoustrojów z nabytym czynnikiem R zachorowało 8. Z 15 zakażonych prosiąt hodowlami pałeczek okrężnicy założonymi z pojedynczych kolonii tych bakterii, które nabyły czynnik R — zachorowało tylko 5.

Wynika z tego, że częstość łącznego przekazywania plazmidów R i Vi pierwszemu biorcy jest większa i wynosi 53,3%, natomiast drugiemu tylko 33,3%.

Z kontrolnych zwierząt, którym podano hodowle niepatogennych szczepów *Citrobacter* i *E. coli* używanych w charakterze biorców czynników R i Vi nie zachorowało żadne. Mimo przebadania 40 padłych prosiąt nigdy nie udało się z narządów wewnętrznych i krwi tych zwierząt wyizolować patogennych szczepów *Citrobacter*. Izolowano je natomiast zawsze

Tab. 1. Przekazywanie oporności na oxytetracynę przez patogenne szczepy *Citrobacter* niepatogennym szczepem *E. coli* i *Citrobacter*

Dawca czynnika R(Ox)	% przekazywania czynnika R(Ox) biorcom			Kontrola
	<i>E. coli</i> K-12F ⁻	<i>E. coli</i> -SM	<i>Citrobacter</i> -SM	
<i>Citrobacter</i> wyizolowany z mieszanki T	15	17	21	100
„ „ „ W	14	18	23	100
„ „ z jelita cienkiego	17	20	26	100
„ „ „ grubego	13	16	19	100
„ „ z treści jelita cienkiego	15	19	24	100
„ „ z kału prosięcia nr 1	20	20	27	100
„ „ „ nr 2	18	23	28	100
„ „ „ nr 3	11	13	18	100
„ „ „ nr 4	14	16	23	100
„ „ „ nr 5	11	12	16	100
„ „ „ nr 6	16	18	24	100
„ „ „ nr 7	13	14	19	100
„ „ „ nr 8	10	12	18	100
„ „ „ nr 9	15	17	26	100
„ „ „ nr 10	19	25	29	100

Objaśnienia: R(Ox) = czynnik warunkujący oporność na oxytetracynę; *E. coli* K-12F⁻ = szczep pałeczek *E. coli* lac wrażliwy na oxytetracynę, odporny na negram, otrzymany z PAN Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej we Wrocławiu; *E. coli*-SM = szczep pałeczek okrężnicy wyizolowany z kału zdrowych prosiąt wrażliwy na oxytetracynę, odporny na negram; *Citrobacter*-SM = szczep pałeczek *Citrobacter* wyizolowany z kału zdrowych prosiąt wrażliwy na oxytetracynę, odporny na negram.

Tab. 2. Przekazywanie wirulencji przez patogenne szczepy *Citrobacter* niepatogennym szczepom *E. coli* i *Citrobacter*

Drobnoustroje używane do zakażenia prosiąt	Liczba prosiąt zakażonych	Liczba prosiąt chorych po zakażeniu	% przekazywania czynnika Vi w stosunku do czynnika R	Liczba prosiąt kontrolnych	Liczba prosiąt kontrolnych zdrowych po zakażeniu
<i>Citrobacter</i> z nabytym czynnikiem R	15	8	53,3	15	15
<i>E. coli</i> z nabytym czynnikiem R	15	5	33,3	15	15

Objaśnienia: Czynniki R = plazmid warunkujący przekazywalną oporność na leki; Czynniki Vi = plazmid warunkujący przekazywalną chorobotwórczość — wirulencję.

z treści jelit cienkich i kałów wszystkich badanych padłych prosiąt. Zachodziło więc podejrzenie, że patogenność tych drobnoustrojów jest związana z wytwarzaniem enterotoksyny. Hipoteza ta została potwierdzona w badaniach, których wyniki przedstawia tab. 3.

Omówienie wyników

Z wykonanych badań wynika, że przyczyną intoksykacji w ognisku, w którym zachorowało około 1000 prosiąt, z czego 6% padło, był pato-

Tab. 3. Natura wirulencji patogennych szczepów *Citrobacter*

Rodzaj hodowli używanej do zakażenia prosiąt	Liczba prosiąt zakażonych	Liczba prosiąt chorych po zakażeniu	Uwagi o przebiegu choroby
Żywa hodowla bulionowa szczepów <i>Citrobacter</i> z nabytym czynnikiem R(Ox) i Vi	9	9	przebieg choroby typowy — ostry
Zabita chloroformem hodowla bulionowa szczepów <i>Citrobacter</i> z nabytym czynnikiem R(Ox) i Vi	9	9	przebieg choroby łagodniejszy
Żywa hodowla bulionowa szczepów <i>E. coli</i> z nabytym czynnikiem R(Ox) i Vi	9	9	przebieg choroby typowy — ostry
Zabita chloroformem hodowla bulionowa szczepów <i>E. coli</i> z nabytym czynnikiem R(Ox) i Vi	9	9	przebieg choroby łagodniejszy

Po zakażeniu 9 prosiąt żywą hodowlą pałeczek *Citrobacter* z nabytym czynnikiem R i Vi i 9 zwierząt taką samą zabita chloroformem hodowlą wszystkie prosiąta zachorowały. Zachorowały również wszystkie prosiąta po zakażeniu ich żywą i zabita hodowlą pałeczek okrężnicy z nabytym czynnikiem R i Vi. Wynika z tego, że do wywołania choroby udział żywych komórek nie jest konieczny.

Krótki okres inkubacji 18—24 godz., krótkotrwały przebieg i ograniczenie infekcji do przewodu pokarmowego wskazuje, że choroba jest typową intoksykacją. Na uwagę zasługuje fakt, że przebieg choroby u zwierząt zakażonych zabitymi hodowlami zarówno *Citrobacter* jak i *E. coli* był łagodniejszy i po 2—3 dniach następowało samowyleczenie.

Z tab. 4 widać, że żadne z zakażonych 30 prosiąt hodowlami pałeczek *Citrobacter* i *E. coli*, które w procesie koniugacji nie nabyły oporności na oxyteracynę nie zachorowało. Wynika z tego, że patogenne pałeczki *Citrobacter* w procesie koniugacji nie przekazują czynnika Vi niezależnie od czynnika R.

W doświadczeniach zakażono prosiąta 8—10-tygodniowe. Przy doborze zwierząt doświadczalnych kierowano się faktem, że w ognisku intoksykacji około 60% chorych prosiąt było w tym wieku.

genny szczep *Citrobacter*. Przemawiają za tym następujące fakty:

Od wszystkich badanych chorych i padłych prosiąt izolowano ten sam szczep pałeczek *Citrobacter*. W posiewach zawsze stwierdzano obfity wzrost drobnoustrojów a czasem czystą kulturę. Z badanego materiału nie wyizolowano żadnych innych chorobotwórczych bakterii.

Tab. 4. Wykrywanie niezależnego przekazywania czynnika Vi

Rodzaj hodowli używanej do zakażenia prosiąt	Liczba prosiąt zakażonych	Liczba prosiąt chorych po zakażeniu	% przekazywania czynnika Vi
<i>Citrobacter</i> — SM bez czynnika R	15	0	0
<i>E. coli</i> — SM bez czynnika R	15	0	0

Objawy chorobowe i zmiany anatomopatologiczne u prosiąt, które zachorowały w sposób naturalny, zakażonych doświadczalnie czystą hodowlą pałeczek *Citrobacter*, wyizolowanych od padłych zwierząt i biorców z nabytymi czynnikami R i Vi były identyczne.

Według danych niektórych autorów (2, 8, 10, 11) pałeczki *Citrobacter* mogą być przyczyną zarówno sporadycznych, jak i epidemicznych zaburzeń jelitowych u ludzi i zwierząt, a także mogą powodować schorzenia układu moczowego, dróg żółciowych, ucha wewnętrznego i opon mózgowo-rdzeniowych.

Badane patogenne drobnoustroje przekazywały cechy lekooporności i wirulencji niepatogennym szczepom *E. coli* i *Citrobacter*, wyizolowanym od zdrowych prosiąt.

Już w 1928 r. Griffith przekazał wirulencję z patogennych dwoinek zapalenia płuc niepatogennym w procesie transformacji. Dokonali tego również w 1944 roku Avery, Mc Carty i MacLeod (5). Przekazywanie czynnika R, Col, Hly jest obecnie zjawiskiem powszechnie znanym.

Z faktu, że szczepy biorcy w procesie koniugacji nie nabyły od dawcy poza lekoopornością i wirulencją żadnych innych cech wynika, że geny warunkujące oporność na oxyteracyne i wirulencję są zlokalizowane w plazmidach R i Vi. Episomy te są przekazywane z większą efektywnością na szczepy *Citrobacter* niż na pałeczki z rodzaju *E. coli*.

Watanabe (16) podaje, że czynniki F, Col i R mogą być przekazywane jednocześnie. Również Świdorski i Lachowicz (13) oraz Świdorski i Jędrzejowski (15) stwierdzili, że czynniki R, Col, Hly występujące u szczepów *E. coli* odpowiedzialnych za kolibakteriozy prosiąt mogą być przekazywane razem.

Niektórzy badacze jak np. Ørskov i Ørskov (9), Smith i Linggood (12) donoszą, że czynnik odpowiedzialny za wytwarzanie enterotoksyny i czynnik odpowiedzialny za syntezę antygenu K-88, które, jak się przyjmuje, mogą mieć duże znaczenie w patogenezie kolibakteriozy, są przekazywane szczepom nie posiadającym tych plazmidów.

W badaniach ustalono, że czynnik Vi warunkujący patogenność pałeczek *Citrobacter* jest odpowiedzialny za wytwarzanie enterotoksyny i może być przekazywany tylko łącznie z czynnikiem R. Natomiast plazmid R jest często przekazywany samodzielnie, niezależnie od czynnika Vi.

Drobnoustroje niepatogenne po nabyciu tych plazmidów zaczynają wytwarzać enterotoksynę i stają się chorobotwórcze.

Piśmiennictwo

1. Burbianka M., Pliszka A.: Mikrobiologia żywności. PZWL 1971.
2. Edwards P. R., West M. G., Bruner D. W.: J. Bact. 711, 55, 1948.
3. Furowicz A., Janowski H., Kądzioła A., Mazurczak J., Truszczyński M.: Kolibakteriozy zwierząt domowych. PWRiL 1970.
4. Glantz P. J.: Appl. Microbiol. 16, 417, 1968.
5. Kunicki-Goldfinger W.: Życie bakterii. PWN 1971.
6. Lachowicz K., Wojciechowska E., Kalużewski S., Macierewicz M.: Wyd. Metod. PZH Warszawa 1964.
7. Lederberg J., Lederberg E. M.: J. Bact. 339, 63, 1952.
8. Moran A. B., Bruner D. W.: J. Bact. 695, 58, 1949.
9. Ørskov J., Ørskov F.: J. Bact. 91, 69, 1966.
10. Sedlak J., Słajsowa M.: Acta Univ. Carol. Med. 505, 7, 1959.
11. Sedlak J., Rische H.: Enterobacteriaceae-Infektionen. VEB Georg Thieme. Leipzig 1961.
12. Smith H. W., Linggood M. A.: J. Med. Microbiol. 467, 4, 1971.
13. Świdorski M., Lachowicz T. M.: Acta Microbiologica Polonica 155, 6, 1974.
14. Świdorski M.: Charakterystyka szczepów *E. coli* z biegunek niemowlęcych. Praca doktorska. PAN Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej. Wrocław 1974.
15. Świdorski M., Jędrzejowski A.: Medycyna Wet. 22, 32, 1976.
16. Watanabe T., Ogata C.: J. Bacteriol. 43, 91, 1966.

Adres autora: dr Marian Świdorski, ul. M. Buczka 7, 72-300 Gryfice.

Съвидърски М., Енджейовски А. — Инфекционна лекарственна устойчивост и вируленция палочек *Citrobacter* из очага интоксикация поросят.

В 1975 г. в районе города Gryfice в крупном животноводческом хозяйстве у ок. 1000 поросят проявились симптомы интоксикации. Несмотря на интенсивное лечение ок. 6% поросят пало. Установили, что этиологическим фактором болезни были патогенный штамм палочек *Citrobacter*. Эти бактерии передавали окситетрацино устойчивость и вируленцию непатогенным палочкам *E. coli* и *Citrobacter* изолированным от здоровых поросят из естественной микрофлоры пищеварительного тракта. Лекарственная устойчивость к окситетрацину и вируленция имели эпизомальный характер, а эффективность их передачи в процессе конъюгации была выше если в качестве реципиента применяли палочки *Citrobacter*. Установили, что ответственный за продукцию энтеротоксина фактор Vi может быть передан только вместе с плазмидом R, а фактор R бывает часто передаван независимо от плазмиды Vi. Непатогенные микробы после приема этих факторов становятся устойчивыми к окситетрацину и создают энтеротоксин что обуславливает их патогенность.

Świdorski M., Jędrzejowski A. — Drug resistance and virulence of *Citrobacter* isolated from the focus of piglets toxication.

In the great scale breeding of piglets in the region of Gryfice there occurred the signs of toxication in about 1000 animals. Approximately 6% of piglets died although they were cured. It was established that the strain of *Citrobacter* was the etiological factor of the disease. The bacterium was capable to induce the resistance to oxytetracycline and virulence in apathogenic bacteria of *E. coli* and *Citrobacter* isolated from the content of the alimentary tract of normal piglets. The drug resistance and virulence were of episomal nature and the efficacy of their transmission was higher if bacteria of *Citrobacter* genus were used as receivers. It was found that Vi factor responsible for the production of enterotoxin could be transmitted only together with R plasmid, but R factor could be conveyed independently on Vi plasmid. Apathogenic bacteria following the acquirement of these factors appeared to be resistant to the antibiotic and produced enterotoxin.