

JACEK KLIMCZAK

Haemophilus equigenitalis – czynnik etiologiczny zakaźnego zapalenia macicy u klaczy

Zakład Higieny Weterynaryjnej, ul. Powstańców Wlkp. 10, 85-090 Bydgoszcz

Na przełomie kwietnia i maja 1977 r. w stadninie koni w Newmarket w Wielkiej Brytanii stwierdzono liczne przypadki ostrych zapaleń macicy, którym towarzyszył spadek płodności klaczy (4, 16). Dane kliniczne i epidemiologiczne różniły się od danych, opisywanych przy innych zakażeniach dróg rodnych u klaczy. U ok. 40% pokrytych klaczy stwierdzono objawy ostrego zapalenia macicy i szyjki macicznej z towarzyszącym obfitym ropnym wypływem z pochwy. Konwencjonalne metody badań bakteriologicznych wymazów szyjkowych w tlenowych warunkach nie dały oczekiwanych rezultatów. Z wymazów hodowanych w beztlenowych warunkach wyizolowano kilka szczepów *Bacteroides fragilis*. Przy zastosowaniu innych metod inkubacji udało się od 9 z 10 klaczy wyizolować gramujemną, niekwasooporną kokopaleczkę. Podobne bakterie wykryto w wymazach z zewnętrznych narządów płciowych od wszystkich 6 ogierów z opisywanej stadniny; ogiery w tym czasie nie wykazywały żadnych objawów chorobowych. Te gramujemne kokopaleczki nie odpowiadały w swych biochemicznych, wzrostowych i antygenowych właściwościach żadnym innym znanym bakteriom. Dane te oraz badania nad czynnikiem etiologicznym dały podstawę do oznaczenia nowej jednostki chorobowej nazwą zakaźne zapalenie macicy u klaczy (zzmk). Podobne opisy przypadków chorobowych, o mniej lub bardziej ostrym przebiegu, notowane były w Wielkiej Brytanii, Irlandii, Australii, Stanach Zjednoczonych, Kanadzie, Francji, Belgii i Republice Federalnej Niemiec (3, 11, 22, 27, 31). Wszyscy donosili o wyizolowaniu wyżej opisanych gramujemnych kokopaleczek. Problemowi zzmk poświęcono znaczną uwagę na konferencji Komisji Norm i Biopreparatów i Komisji Kodeksu ZOO-Sanitarnego Międzynarodowego Urzędu Epizootii jesienią 1977 r. (35).

Eksperymenty wykonane w Stacji Badawczej Koni w Newmarket w Wielkiej Brytanii (15) udowodniły, że zdrowe klacze kuców mogą być zakażone: a) czystą kulturą zarazka; b) przez przeniesienie materiału otrzymanego z szyjki macicy kuców doświadczalnie zakażonych czystą kulturą zarazka; c) poprzez stosunek płciowy zdrowych klaczy z ogierami eksperymentalnie zakażonymi czystą kulturą zarazka. U zakażonych klaczy trzema powyżej opisanymi metodami wystąpiły typowe objawy chorobowe wykazujące, że opisywane gramujemne kokopaleczki są głównym czynnikiem etio-

logicznym zzmk. Eksperyment ten został potwierdzony przez innych badaczy (6, 12, 22, 32).

Taylor i wsp. (28) zaproponowali włączenie zarazka wywołującego zzmk do rodzaju *Haemophilus* i określenie gatunku jako *Haemophilus equigenitalis* (szczep wzorcowy 61717) (NCTC 11184). Propozycja Taylora i wsp. została przedłożona do zaopiniowania komisji Międzynarodowego Komitetu Systematyki Bakteriologicznej. Komisja ta nie zaakceptowała włączenia omawianego drobnoustroju do rodzaju *Haemophilus*; nazwa ta może być jednak używana do czasu zaproponowania i zaakceptowania innej nazwy (10).

Haemophilus equigenitalis jest gramujemną, niekwasooporną pałeczką o rozmiarach 0,3–0,4 um na 0,7–1,0 um. W preparatach ze starszych hodowli można obserwować dłuższe formy bakterii (do 1,8 um). W mikroskopie elektrycznym oraz skaningowym wykazano, że posiada otoczkę (26, 28). Nie zauważono natomiast fimbrii i rzęsek. Nie stwierdzono zdolności wytwarzania przetrwalników. Drobnoustrój ten nie ma właściwości ruchu. Szczep *Haemophilus equigenitalis* wymaga do swojego wzrostu warunków mikroaerofilnych. Najlepszy wzrost otrzymuje się w aparatach do hodowli beztlenowców, w atmosferze powietrza z dodatkiem 10% dwutlenku węgla lub w atmosferze wodoru z dodatkiem 10% dwutlenku węgla. Obserwowano wzrost w zakresie temperatur od 30°C do 41°C (optimum 37°C). Do swojego wzrostu wymaga odpowiednich wzbogaconych podłoży. Dobry wzrost uzyskuje się na agarze czekoladym z dodatkiem 10% krwi końskiej lub baraniej. Najlepsze efekty wzrostu otrzymano na agarze czekoladowym, sporządzonym na bazie Columbia agar lub Eugon agar (10). Obserwowano także wzrost na zwykłym agarze krwawym lub agarze DST (Oxoid) z dodatkiem 7% odwiłknionej krwi baraniej; autorzy zaznaczają jednak, że był to prawdopodobnie wynik adaptacji laboratoryjnej szczepu (11). Wypróbowano również metodę hodowli *Haemophilus equigenitalis* na podłożach półstałych i płynnych, którą zastosowano w badaniach immunologicznych tegoż drobnoustroju (7).

Nie stwierdzono konieczności dodawania do podłoży dla *Haemophilus equigenitalis* heminy (czynnik X) i neukleotydu dwufosfopirydyny (czynnik V), przeciwnie niż w przypadku szeregu gatunków rodzaju *Haemophilus*

(28). Co prawda niektórzy autorzy (7) stosują nieznaczny dodatek pochodnych heminy. Obserwowano również słaby wzrost *Haemophilus equigenitalis* wokół krążków nasączonych czynnikiem X (23). Do podłoży stałych w celu uniknięcia przerostów inną mikroflorą większość autorów dodaje streptomycynę, ostatnio jednak coraz częściej donosi się o izolowaniu z przypadków zmk szczepów streptomycynowrażliwych, co przy stosowaniu dodatku omawianego antybiotyku może dać znaczną ilość wyników „fałszywie ujemnych” (27).

Okres wzrostu *Haemophilus equigenitalis* na podłożach stałych, przy zachowaniu opisanych wyżej warunków inkubacji, wynosi 2—5 dni. Po 48 godzinach inkubacji można zauważyć wzrost, lecz najlepsze efekty uzyskuje się po 72 godzinach. Kolonie są wtedy okrągłe, wypukłe z gładką, świecąca powierzchnią i całkowitym brzegiem, koloru szarego lub kremowego, wielkości ok. 1 mm. Wśród kolonii normalnie wyrosniętych można spotkać kolonie drobniejsze. Przezroczyste kolonie po dalszej inkubacji ulegają zmętnieniu. Platt i wsp. (15) obserwowali po okresie inkubacji, wynoszącym 6 dni na podłożu czekoladowym, sporządzonym na bazie agaru Eugon, kolonie średnicy 3—4 mm. Drobnoustrój ten nie powoduje hemolizy na podłożach z dodatkiem krwi.

Haemophilus equigenitalis okazał się niezwykle mało biochemicznie aktywnym zarazkiem. W typowych konwencjonalnych testach różnicujących bakterie, okazał się jedynie katalazo-dodatni, oxydazo-dodatni i fosfatazo-dodatni (tab. 1).

Haemophilus equigenitalis jest wrażliwy na wysokie temperatury oraz środki dezynfek-

cyjne. Sahu i wsp. (21), którzy badali jego przeżywalność w różnych podłożach transportowych w różnym zakresie temperatur, stwierdzili wzrost drobnoustroju w posiewach na podłożu z wymazów przetrzymywanych m.in. w temperaturze 0°C i -70°C.

Na podstawie badań laboratoryjnych oraz doniesień terenowych o skutecznym leczeniu zmk (10, 11, 13, 17, 28, 29) można stwierdzić, że omawiany drobnoustrój jest wrażliwy na wiele środków przeciwbakteryjnych. Ze środków odkażających zaleca się stosować roztwór chlorheksydyny lub nitrofurazon.

Badając właściwości antygenowe m.in. Taylor i wsp. (28) przeprowadzili próby reakcji krzyżowych między aglutynogenami *Haemophilus equigenitalis* i innymi drobnoustrojami z rodzaju *Haemophilus*, *Brucella*, *Pasteurella*, *Yersinia*, *Moraxella*, *Neisseria*, *Actinobacillus*. W aglutynacji probówkowej wszystkie reakcje krzyżowe były bardzo słabe, wyraźną aglutynację obserwowano jedynie ze szczepem *Haemophilus influenzae* (rozcieńczenie 1:40 — wynik wątpliwy, rozcieńczenie 1:20 — wynik dodatni). W aglutynacji szkiełkowej wyraźniejsze reakcje krzyżowe zauważono tylko w rozcieńczeniu 1:2 antysurowicy z *Haemophilus influenzaemurium*, *Neisseria elongata* i *Pasteurella pneumotropica*.

Od chwili stwierdzenia po raz pierwszy zmk wprowadzono szereg badań serologicznych jako prób pomocniczych w rozpoznawaniu tej choroby (1, 5, 6, 8, 9, 20). Odczyn aglutynacji i antyglobulinowy w diagnostyce zmk wprowadzili Benson i wsp. (1). Odczyn antyglobulinowy wyjaśnia wiele wątpliwych

Tab. 1. Właściwości biochemiczne *Haemophilus equigenitalis*

Reakcje biochemiczne	Wynik
Wytwarzanie	
— katalazy	dodatni
— oxydazy cytochromowej	dodatni
— indolu	ujemny
— beta-galaktozydazy	ujemny
— deoxyrybonukleazy	ujemny
— fosfatazy	dodatni
— siarkowodoru	ujemny
Rozkładanie	
— kazeiny	ujemny
— mocznika	ujemny
— lecytyny	ujemny
— alkoholi	ujemny
Fermentacja cukrów	
Dekarboksylacja	
— lizyny	ujemny
— ornityny	ujemny
Wytwarzanie	
— dwuhydrolazy argininy	ujemny
— desimidazy argininy	ujemny
Redukcja azotanów	ujemny
Uplynnianie	
— żelatyny	ujemny
— surowicy (Loefflera)	ujemny
Wykorzystywanie cytrynianów	ujemny

Tab. 2. Wrażliwość *Haemophilus equigenitalis* na wybrane środki przeciwbakteryjne

Nazwa środka przeciwbakteryjnego	Stopień wrażliwości szczepu
Penicylina	wrażliwy
Ampicylina	wrażliwy
Cefalorydyna	wrażliwy
Karbenicylina	wrażliwy
Tetracyklina	wrażliwy
Erytromycyna	wrażliwy
Klindamycyna	oporny
Linkomycyna	oporny
Gentamycyna	wrażliwy
Kanamycyna	wrażliwy
Neomycyna	wrażliwy
Streptomycyna	oporny *)
Amykacyna	wrażliwy
Tobramycyna	wrażliwy
Chloramfenikol	wrażliwy
Kwas nalidiksynowy	wrażliwy
Nitrofurantoina	wrażliwy
Polimyksyna B	wrażliwy
Sulfametaksazol	oporny
Trimetoprim	oporny
Metronidazol	oporny

Objaśnienie: *) wyizolowano odmianę *Haemophilus equigenitalis* streptomycyno-wrażliwą (27).

wyników aglutynacji, ale oba te testy dają szansę wykrycia dodatnich mian w surowicy tylko w ostrej postaci choroby i to przez krótki okres. Odczyn wiązania dopełniacza jest bardziej czuły niż omawiane wyżej testy i pozwala wykryć przeciwciała u zainfekowanych klaczy przez *Haemophilus equigenitalis* szczególnie w przypadkach chronicznych oraz u zdrowych nasicieli, u których mogą wystąpić trudności z uzyskaniem i wyhodowaniem czystej kultury zarazka. Stwierdzony przez Croxton-Smitha i wsp. (5) pewien procent antydopełniaczowej aktywności umniejsza wartość odczynu w diagnostyce zsmk. Fernie i wsp. (8) wprowadzili do rutynowej diagnostyki odczyn hemaglutynacji biernej, który okazał się najbardziej czuły i szybszy. Pozwala on wykryć przeciwciała w okresie, gdy zainfekowane klacze znajdują się we wczesnym lub późniejszym stadium choroby.

Najpewniejszą metodą diagnostyczną jest jednak wyizolowanie *Haemophilus equigenitalis* z dróg rodnych klaczy lub zewnętrznych narządów płciowych ogiera, ewentualnie z płynu przed ejakulacyjnego (10, 17, 19, 25, 28). Wymazy pobiera się wacikiem, który należy przenieść do podłoża transportowego Stuarta lub Amiesa. Następnie przesiewa się je na dwie płytki agaru czekoladowego (z dodatkiem streptomycyny oraz bez antybiotyku), podłoże agarowe z krwią i podłoże Mac Conkeya. Obie płytki z agarem czekoladowym inkubuje się w temperaturze 37°C w aparacie do hodowli beztlenowców lub szklanym eksykatorze z zawartością 10% dwutlenku węgla w atmosferze powietrza lub wodoru. Posiewy na podłożu agar z krwią i Mac Conkey'a należy przetrzymywać w warunkach tlenowych w celu wykluczenia zakażeń inną florą bakteryjną. Z pobranych wymazów należy sporządzić ponadto preparaty barwione metodą Grama. Wyizolowane na agarze czekoladowym drobnoustroje należy zidentyfikować, potwierdzając omawiane w artykule cechy morfologiczne, biochemiczne oraz przeprowadzając ewentualnie aglutynację badanego szczepu z surowicą anti-*Haemophilus equigenitalis*.

Haemophilus equigenitalis jest zarazkiem o dużej zakaźności, patogennym jedynie dla koni. Timoney i wsp. zakazili skutecznie samicę osła (33). Próby zakażenia zwierząt domowych (świń, owiec, kotów) poprzez wprowadzenie kultury zarazka do dróg rodnych zakończyły się niepowodzeniem (30). Udało się natomiast zakazić samicę białej myszki (34). Przebieg choroby opisał wielu autorów (2, 4, 11, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 24, 27, 29, 31, 35). *Haemophilus equigenitalis* wywołuje jedynie u klaczy zapalenie szyjki macicznej i pochwy, przeważnie z obfitym śluzowo-ropnym wypły-

wem z pochwy. W przypadkach o łagodniejszym przebiegu obserwuje się jedynie nieznaczną ilość wydzieliny ropnej na wargach sromowych lub w pochwie. U zakażonych ogierów nie obserwuje się żadnych objawów chorobowych. U klaczy zdrowej, pokrytej zakażonym ogierem, objawy zsmk mogą wystąpić już po 48 godzinach, czasami jednak pierwsze objawy choroby zauważa się po pewnym okresie czasu, np. po przebytej rui. U chorych klaczy nie obserwuje się ogólnych objawów chorobowych. Choroba szerzy się drogą kontaktu płciowego, jednak z uwagi na wysoką zaraźliwość drobnoustroju należy wyeliminować możliwość ewentualnego przeniesienia zarazka drogą pośrednią, np. przez rękawice, rozwieracz pochwy, wziernik itp.

Piśmiennictwo

1. Benson J. A., Dawson F. L. M., Durrant D. S., Edward P. T., Powell D. G.: Vet. Rec. 102, 277, 1978.
2. Bielański W.: Medycyna Wet. 34, 487, 1978.
3. Blobel H., Kitzrow D., Blobel K.: Tierärztl. Umsch. 33, 523, 1978.
4. Crowhurst R. C.: Vet. Rec. 100, 476, 1977.
5. Croxton-Smith P., Benson J. A., Dawson F. L. M., Powell D. G.: Vet. Rec. 103, 275, 1978.
6. Dawson F. L. M., Benson J. A., Croxton-Smith P.: Equine vet. J. 10, 145, 1978.
7. Fernie D. S.: Vet. Rec. 103, 187, 1978.
8. Fernie D. S., Cayzer I., Chalmers S. R.: Vet. Rec. 104, 260, 1979.
9. Fernie D. S., Batty I., Walter P. D., Platt H., Macintosh M. E., Simpson D. J.: Res. vet. Sci. 28, 362, 1980.
10. Macintosh M. E.: Vet. Rec. 108, 52, 1981.
11. Mumme J., Ahlsweede L.: Dts. tierärztl. Wschr. 86, 257, 1979.
12. Pierson R. E., Sahu E. P., Dardiri A. M., Wilder F. W.: J. Am. vet. med. Ass. 173, 402, 1978.
13. Platt H., Atherton J. G., Simpson D. J., Taylor C. E. D., Rosenthal R. O., Brown D. F. J., Wreghitt T. G.: Vet. Rec. 101, 20, 1977.
14. Platt H., Atherton J. G., Dawson F. L. M., Durrant D. S.: Vet. Rec. 102, 19, 1978.
15. Platt H., Atherton J. G., Simpson D. J.: Equine vet. J. 10, 153, 1978.
16. Powell D. G.: Equine vet. J. 10, 1, 1978.
17. Powell D. G.: Vet. Med. small Anim. Clin. 75, 1591, 1980.
18. Ricketts S. W., Rosedale P. D., Wingfield-Digby N. J., Falk M. M., Hopes R., Hunt M. D. N., Peace C. K.: Vet. Rec. 101, 65, 1977.
19. Ricketts S. W.: Vet. Rec. 108, 46, 1981.
20. Rommel F. A., Dardiri A. H., Sahu S. P.: Vet. Rec. 103, 564, 1978.
21. Sahu S. P., Dardiri E. H., Rommel F. A., Pierson R. E.: Am. J. vet. Res. 40, 1040, 1979.
22. Sahu S. P., Pierson R. E., Dardiri A. H.: Am. J. vet. Res. 41, 5, 1980.
23. Shreeve J. E.: Vet. Rec. 102, 20, 1978.
24. Simpson D. J., Eaton-Evans W. E.: Vet. Rec. 102, 19, 1978.
25. Swaney N. M., Sahu S. P.: Vet. Rec. 102, 43, 1978.
26. Swaney L. M., Sydney S. B.: Am. J. vet. Res. 41, 127, 1980.
27. Swerczek T. W.: Vet. Rec. 102, 512, 1978.
28. Taylor C. E. D., Rosenthal R. O., Brown D. F. J., Lapage S. P., Hill L. R., Legros R. M.: Equine Vet. J. 10, 136, 1978.
29. Timoney P. J., Ward J., Kelly P.: Vet. Rec. 101, 103, 1977.
30. Timoney P. J., O'Reilly P. J., Mc Ardle J. F., Ward J.: Vet. Rec. 102, 152, 1978.
31. Timoney P. J.: Vet. Rec. 103, 475, 1978.
32. Timoney P. J., Mc Ardle J. F., O'Reilly P. J., Ward J.: Equine Vet. J. 10, 148, 1978.
33. Timoney P. J., Mc Ardle J. F., O'Reilly P. J.: Vet. Rec. 104, 84, 1979.
34. Timoney P. J., Geraghty V. P., Dillon P. B.: Vet. Rec. 104, 84, 1979.
35. Truszczyński M.: Medycyna Wet. 34, 460, 1978.

Adres autora: lek. wet. Jacek Klimczak, ul. Beskidzka 1/8, 85-166 Bydgoszcz.