

CHOROBY ZAKAŻNE I INWAZYJNE

ZYGMUNT CYGAN, ZOFIA GUZIK, MIROSLAWA TOMASZEWSKA

Właściwości i rola chorobotwórcza beztlenowców *C. sordelli* wyosobnionych od owiec

Zakład Higieny Weterynaryjnej, ul. Słowicza 2, 20-336 Lublin

Rola chorobotwórcza beztlenowców *C. sordelli* w schorzeniach owiec wobec niewielu opisanych przypadków chorobowych, wymaga ciągle badań. Dość wspomnieć, że do 1942 r. wyosobniono zaledwie 2 szczepy tego gatunku (23). Z późniejszych lat pochodzą trzy dalsze opisy udanej izolacji *C. sordelli* od owiec (1, 16, 18). Stąd też wiedza na temat właściwości i znaczenia w patologii tych drobnoustrojów jest nadal niewystarczająca.

Zakażenia na tle *C. sordelli* przypominają obrazem chorobowym infekcje wywoływane przez *C. novyi* (13, 19). Dlatego w diagnostyce schorzeń tej etiologii postuluje się stosowanie prób różnicujących przede wszystkim powyższe beztlenowce i dodatkowo również *C. bifementans* (5, 20).

Celem niniejszej pracy było poznanie podstawowych właściwości — wyosobnionych od owiec — szczepów *C. sordelli* oraz rozważenie ich roli chorobotwórczej.

Materiał i metody

Padłe owce. Do badań diagnostycznych dostarczono trupy 2 jagniąt w wieku 7—8 tygodni oraz 1 owcy liczącej 5 lat. Zwierzęta te pochodziły z jednej owczarni i były nadesłane w stanie świeżym, tj. bez widocznych zmian gnilnych.

Poszukiwanie toksyny. Z treści jelit cienkich sporządzono 50% wyciągi w płynie fizjologicznym z dodatkiem antybiotyków (400 j/ml penicyliny i 200 µg/ml streptomycyny), a uzyskany po ich odwirowaniu płyn znad osadu (4000 obr./min. w ciągu 45 minut) wprowadzono dootrzewnowo myszom w jednorazowej dawce 0,5 ml. Czas obserwacji zwierząt wynosił 3 dni.

Posiewy. Badania objęły poszukiwanie chorobotwórczej mikroflory beztlenowej i tlenowej. Dla wykrycia beztlenowców dokonywano wysiewów krwi z narządów i treści jelit na podłoże Zeisslera. Czas inkubacji w 37°C — metodą pyrogalloową (15) — wynosił 3 dni. W tych samych warunkach prowadzono posiewy w celu określenia liczby drobnoustrojów beztlenowych i występujących pomiędzy nimi stosunków ilościowych. Jednocześnie sprawdzano występowanie tlenowców — w badanych próbach — poprzez wysiewy na podłoża rutynowe, tj. agar z krwią i SS (czas inkubacji w 37°C — 1 dzień).

Izolacja. Poszczególne kolonie beztlenowców wyrosłe na podłożu Zeisslera wycinano wraz z agarem i wprowadzano do pożywki Wrzoska. Czas inkubacji w 37°C wynosił 1—2 dni. Uzyskane hodowle sprawdzano na jednorodność morfologiczną komórek bakteryjnych (preparaty barwione metodą Grama) i kolonii (hodowle inkubowane w atmosferze beztlenowej), jak również na brak zanieczyszczeń tlenowca-

mi (posiewy na agarze z krwią, namnażanie w warunkach tlenowych).

Identyfikacja. U wyosobnionych szczepów rodzaju *Clostridium* sprawdzano morfologię komórek bakteryjnych i kolonii, zdolność do wytwarzania zarodników w podłożu Ellnera oraz barwienia się metodą Grama. Określano też ich aktywność fermentacyjną (wobec laktozy, glukozy, sacharozy, maltozy, mannozy, fruktozy, sorbitolu, glicerolu i mannitolu) oraz proteolityczną (w stosunku do mleka lakmusowego, 15% żelatyny i surowicy ściętej w siupku). Poza tym badano zdolność szczepów do wytwarzania lecytynazy (pożywka Willisa — Hobbs), indolu i skatolu (tzw. test wanilinowy), a także ureazy badanej według metody Fergussona i Hooka w modyfikacji Rolanda i wsp. (17) oraz Tataka i Huet (21).

Właściwości chorobotwórcze. Działanie letalne beztlenowców określano na świnkach morskich zakażanych domięśniowo dawką 0,5 ml jednodobowej hodowli ze wzbogaconej pożywki Wrzoska (dodatek 0,5% glukozy i 1% surowicy końskiej) podaną razem z 0,5 ml 10% CaCl₂ (czas obserwacji zwierząt — 5 dni). W badaniu pośmiertnym opisywano rodzaj wywołanych zmian chorobowych.

Wyniki i omówienie

Rozpatrzono właściwości 15 wyizolowanych szczepów laseczek beztlenowych, na ogół łatwo zarodnikujących w pożywce Ellnera i stąd też zaliczonych do rodzaju *Clostridium*. Różnice jakie występowały w wyglądzie ich komórek i kolonii stanowiły podstawę do różniczenia 4 grup morfologicznych (tab. 1). W najliczniejszej grupie I ujęto 10 szczepów (CGT1 — CGT10) przedstawiających osekłowate laseczki gramododatnie, średniej długości, rzadziej tylko krótsze (ryc. 1). Tworzyły one kolonie średnicy 2—3 mm, płaskie i nieregularne (ryc. 2), bardzo często z wyrostkowatym brzegiem (ryc. 3). Natomiast rzadziej wyrastały jako kolonie nitkowato-strzępiaste (ryc. 4). Pod koloniami na podłożu Zeisslera pojawiała się zwykle strefa hemolizy typu beta. Szczepy tej grupy fermentowały glukozę, maltozę i glicerol, podczas gdy żaden z nich nie rozkładał laktozy, sacharozy, fruktozy,

Tab. 1. Różnicowanie na grupy morfologiczne wyosobnionych szczepów *Clostridium*

Przypadek chorobowy	Grupa morfologiczna			
	I	II	III	IV
Jagnię 1	4 (CGT1-CGT4)			
Jagnię 2	4 (CGT5-CGT8)			1 (CGT14)
Owca	2 (CGT9-CGT10)	2 (CGT11-CGT12)	1 (CGT13)	1 (CGT15)

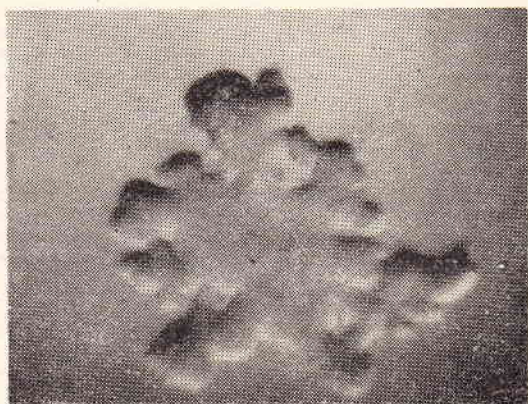
Objaśnienia: cyfry przed nawiasem — liczba szczepów, w nawiasach — oznaczenia szczepów.



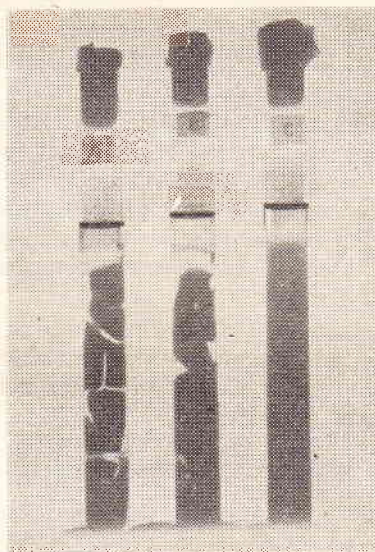
Ryc. 1. Komórki bakteryjne szczepu CGT1 (pow. 900X)



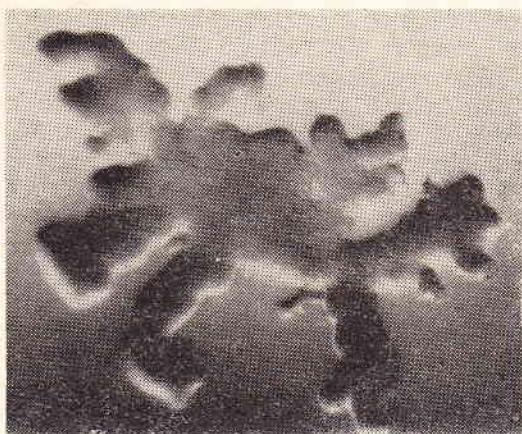
Ryc. 4. Nitkowato-strzępiaste kolonie szczepu CGT8 (pow. 32X)



Ryc. 2. Kolonie szczepu CGT-1 na agarze z dodatkiem surowicy (pow. 32X)



Ryc. 5. Efekt wywołanej proteolizy ściętej surowicy, A — wzrost szczepu CGT1, B — wzrost szczepu CGT8, C — podłoże kontrolne (pow. 0,6X)



Ryc. 3. Wyrostkowy brzeg kolonii szczepu CGT9 (pow. 32X)

mannitu i sorbitolu. Jedynie 4 izolaty (CGT1 — CGT4) rozbudowywały mannozę. Wszystkie szczepy wykazywały aktywność proteolityczną, tj. ścinały, a następnie trawiły kazeinę mleka, rozrzedzały żelatynę oraz rozpuszczały ściętą surowicę (ryc. 5). Poza tym produkowały one ureazę i indol, ale bez obecności skatolu (test wanilinowy ujemny). Dookoła kolonii wyrosłych na podłożu Willisa-Hobbs pow-



Ryc. 6. Aktywność lecytynazowa szczepu CGT1 na podłożu Willisa — Hoobs (pow. 2X)

stawała strefa zmętnienia, wskazująca na wytwarzanie lecytynazy (ryc. 6).

Uwzględniając powyższe właściwości można było wykluczyć przynależność badanych szczepów do *C. novyi* i *C. septicum*. Te dwa bowiem

gatunki określa całkowicie odmienny profil fermentacyjny i brak aktywności proteolitycznej (6, 20). Zdolność izolatów CGT1 — CGT10 do wytwarzania ureazy wykluczała możliwość ich identyfikacji jako *C. bifermentans*, natomiast wskazywała na przynależność do gatunku *C. sordelli*. Wprawdzie ureazę produkują również beztlenowce *C. perfringens* (19), ale ten gatunek charakteryzuje zespół innych cech hodowlanych i biochemicznych. Z podobnych powodów odpadła możliwość rozpoznania szczepów I grupy jako *C. difficile*. Podobieństwo bowiem *C. difficile* do *C. sordelli* dotyczy tylko toksyn odpowiedzialnych — jak się dziś uważa — za niektóre przypadki tzw. „colitis pseudomembranacea” (4, 8, 11).

Izolaty owcze CGT1 — CGT10 okazały się chorobotwórcze dla świnek morskich. Powodowały one bowiem śmierć tych zwierząt, najczęściej na 2 względnie 3 dzień od zakażenia, wśród objawów typowych dla obrzęku złośliwego. Zatem również w oparciu o kryterium chorobotwórczości — różnicujące gatunki *C. sordelli* i *C. bifermentans* — należało uznać wszystkie szczepy za *C. sordelli*.

Właściwości fermentacyjne wyosobnionych szczepów *C. sordelli* były zgodne z opisem innych autorów (5, 6, 12, 19). Uwagę zwracała jednak łatwość, z jaką izolaty CGT1 — CGT10 rozkładały glicerol. Zwykle bowiem zdolność taka nie jest immanentną cechą drobnoustrojów *C. sordelli* (1). Również Richards i Hunt (16) nie potwierdzili u wyosobnionego przez nich szczepu owczego aktywności w tym zakresie.

Identyfikacja innych wyizolowanych beztlenowców, przeprowadzona w oparciu o test sro-neutralizacyjny, pozwoliła sklasyfikować szczepy II grupy (CGT11 i CGT12) jako *C. septicum*, III (CGT13) — *C. novyi* A oraz IV (CGT14 i CGT15) — *C. perfringens* A. Poza tym należy jeszcze wspomnieć, że spośród tlenowców izolowano pałeczki *E. coli* oraz ziarenkowce *Staphylococcus* sp. i *Streptococcus* sp.

Tab. 2. Pochodzenie wyosobnionych szczepów z rodzaju *Clostridium*.

Przypadek chorobowy	<i>C. sordelli</i>	<i>C. septicum</i>	<i>C. novyi</i> A	<i>C. perfringens</i> A
Jagnię 1	MWNS			
Jagnię 2	MWNS			J
Owca	MN	MW	M	J

Objaśnienia: M — mięśnie, W — wątroba, N — nerka, S — serce, J — jelito.

Blizsze dane na temat pochodzenia owczych szczepów z rodzaju *Clostridium* przedstawia tab. 2. Wynika z niej, że laseczki *C. sordelli* zostały wykazane we wszystkich próbkach mięśni i większości badanych narządów mięsnych. Drobnoustroje te stanowiły u obu jagniąt jędną florę beztlenowcową, podczas

gdy u owcy występowały w mieszanym zespole z *C. novyi* A i *C. septicum* (mięśnie) oraz tylko z *C. septicum* (wątroba). Jednak i u owcy drobnoustroje *C. sordelli* wyraźnie dominowały nad towarzyszącymi beztlenowcami w stosunku liczbowym wynoszącym w przypadku mięśni 10:1,5:1 oraz wątroby 10:3. Nie wykryto natomiast obecności *C. sordelli* oraz toksyn beztlenowców w treści jelit, która zawierała normalną ilość zarazków *C. perfringens* A osiagających koncentrację u jagnięcia $2,1 \times 10^2/g$ i owcy $1,4 \times 10^9/g$. Zatem osiągnięte wyniki były typowe dla obrzęku złośliwego, a jednocześnie wykluczały one enterotoksemię.

Powyzszą diagnozę potwierdzał również obraz sekcyjny przedstawiający u obu jagniąt gazowy, ciemnoczerwony naciek galaretowaty tkanki podskórnej i mięśni, sięgający od przestrzeni międzyżuchwowej do końca mostka. Uwagę zwracał też wyraźny obrzęk głowy oraz zwirodnienie mięśnia sercowego i wątroby. Podobną infiltrację tkanek rejestrowano również u świnek morskich zakażonych hodowlą izolatów *C. sordelli* i *C. novyi* A, podczas gdy obraz sekcyjny — po podaniu kultur *C. septicum* — charakteryzował brak takich nacieków.

Badane schorzenie przynomiinało lokalizacja zmian chorobowych obrzek złośliwy, opisany jako tzw. „duża głowa” („big head” — „bh”). Miało też podobną etiologię zważywszy na istniejący związek „bh” z *C. novyi* i *C. sordelli* (7, 14). Natomiast pewną osobliwością było chorowanie tylko samic, podczas gdy postać „bh” występuje wyłącznie u tryków (14). Źródłem chorobotwórczych laseczek *C. novyi* A i *C. sordelli* bywa zawsze ziemia (23). Nie można bowiem wiązać z organizmem owiec stwierdzonej obecności tych beztlenowców w runie (7, 23). Dalsze różnice — jakie dają się wykazać — dotyczą powstawania bram wejścia dla zarazków. W przypadku formy „big head” wnikięcie drobnoustrojów przez skórę ułatwiaia urazy głowy powstałe u atakujących się tryków (7, 23). Przeciwnie, u badanych przez nas owiec obrażenia pozostawały w ścisłym związku z zaburzeniami zborności ruchów na tle stwierdzonych niedoborów Cu, Mg i Se. Do obrażeń zwierząt dochodziło bowiem w czasie napadów gwałtownych skurczów mięśniowych oraz nie kontrolowanych ruchów, a nawet uderzeń głowa i szwia. przy istniejącym niedowładzie i porażeniu kończyn. Poza tym uważa się, że sam niedobór Mg stwarza już predyspozycję do wystąpienia zakażeń beztlenowcowych (9). Nie można też nie wspomnieć o możliwości działania innych jeszcze czynników alimentarnych, podobnych do tych, jakie warunkują patogenezę szelestnicy (23) oraz tzw. syndrom nagłej śmierci („Sudden Death Syndrome”, 2, 3, 10, 22).

Piśmiennictwo

1. Al-Mashat R. R., Taylor D. J.: Vet. Rec. 102, 19, 1983.
2. Anthony H. D.: J. Am. vet. med. Ass. 160, 97, 1972.
3. Anthony H. D.: Kansas Vet. 25, 7, 1971.
4. Bolton R. P., Sheriff R. J., Read A. E.: Lancet I, 383, 1980.
5. Brooks M. E., Epps H. E.: J. gen. Microbiol. 21, 144, 1959.
6. Buchanan R. E., Gibbons N. E.: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, The Williams and Wilkins Company, Baltimore 1974.
7. Bull L. B.: J. comp. Path. 48, 21, 1935.
8. Burdon D. W.: Med. Lab. Sci. 33, 253, 1981.
9. Cakala S.: Choroby owiec, PWRIL, Warszawa 1975.
10. Coleman J. D., Hill J. S., Bray H. T., Armstrong D. A., Morgan C. O.: Vet. Med. small Anim. Clin. 70, 191, 1975.
11. Dinnoek F., Brown J. D., Arabi Y., Shingawa N., Keighley M. R., Alexander-Williams J., Burdon D. W.: Br. med. J. 1, 695, 1978.
12. Jensen R.: Diseases of Sheep. Lea Febiger, Philadelphia 1974.
13. MacLennan J. D.: Bact. Rev. 26, 177, 1962.
14. Marsh H., Welch H., Jungherr E.: cyt. wg poz. 23.
15. Pestl L.: Acta vet. hung. 15, 447, 1965.
16. Richards S. M., Hunt B. W.: Vet. Rec. 111, 22, 1982.
17. Roland F., Bourbon M., Szturm M.: Annls Inst. Pasteur, Paryż 73, 914, 1947.
18. Smith L. D.S.: Cornell Vet. 52, 62, 1962.
19. Smith L. D.S., Holdeman L. V.: The Pathogenic Anaerobic Bacteria. Ch. C. Thomas, Springfield, USA 1968.
20. Sterne M., Batty I.: Pathogenic Clostridia. Ed. Butterworths, London and Boston 1976.
21. Tataki H., Huet M.: Annls Inst. Pasteur, Paryż 84, 390, 1953.
22. Turner T. N.: Vet. Med. small Anim. Clin. 66, 803, 1971.
23. Vawter L. R.: Am. J. vet. Res. 3, 382, 1942.

Adres autora: prof. dr hab. Zygmunt Cygan, ul. Żelazowej Woli 6/13, 20-854 Lublin

Цыган З., Гузик З., Томашевская М. — Свойства и болезнетворная роль анаэробов *C. sordelli*, изолированных от овец

Исследовали свойства и болезнетворную роль 10 штаммов *C. sordelli* изолированных из мышц и паренхиматозных органов в чистой культуре от 2 7—8-недельных ягнят, а в смешанном составе с *C. novyi* А и *C. septicum* от 1 5-летней овцы. Все

штаммы вызывали у морских свинок характерные симптомы злокачественного отека. Также другие свойства этих анаэробов оказались типичными для вида *C. sordelli* (м.пр. уреазы +, лецитиназа +, индол +, ферментация глюкозы +, мальтозы + и глицерола +).

Исследуемое заболевание напоминала локализацией болезненных изменений злокачественный отек, описанный как т.наз. „большая голова”. Инфекции развивались у овец, показывающих локомоторную атаксию, возникающую на фоне дефицитов Cu, Mg и Se. Проникновение анаэробов делали возможными травмы животных с плегиями во время выполнения резких движений шей и неконтролированных ударов головой.

Cygan Z., Guzik Z., Tomaszewska M. — Properties and the function of pathogenic anaerobes — *C. sordelli* isolated from sheep

There were examined the properties and the function of 10 strains of *C. sordelli*, isolated from muscles and internal organs in a pure culture from two lambs, 7—8 weeks old, and in the mixed form with *C. novyi* A. and *C. septicum* from a sheep at the age of 5 years. All the strains induced in guinea pigs characteristic signs of a malign tumour. Other properties of those bacteria proved to be typical for *C. sordelli* (urease +, lecithinase +, indole +, fermentation of glucose, maltose and glycerol +). The disease reminded owing to the localization of the pathological changes a malign tumour, the illness described as big head. The disease developed in sheep with ataxy due to deficiency of Cu, Mg, and Se. The invasion of anaerobic bacteria in animals with paralysis of legs was possible through the wounds aquired by the sheep during rapid neck motions and uncontrolled strokes of head.

JANUSZ WAWRZKIEWICZ *, ELŻBIETA CZERWIŃSKA, ELŻBIETA ZDUN

Właściwości biologiczne atenuowanego szczepu wirusa nosówki namnażanego na fibroblastach kurzych w podłożu produkcji własnej

* Zakład Mikrobiologii Wydziału Weterynaryjnego AR, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin
Zakłady Przemysłu Błoweterynaryjnego, 24-100 Puławy-Michałowka

Nosówka, zaraźliwa choroba psów, lisów, norek, fretek i wilków wywoływana jest przez wirus (1, 2) z rodziny *Paramyxoviridae*. Występuje ona na całym świecie, powodując największe straty ekonomiczne w hodowli zwierząt futerkowych, szczególnie zaś norek. Zapobieganie polega głównie na szczepieniach ochronnych, zapoczątkowanych przez Laidlaw i Dunkina w 1928 r. (5). przy użyciu materiału zawierającego wirus inaktywowany formaliną. Obecnie produkowane szczepionki zawierają z reguły żywe szczepionki atenuowane, zaadaptowane do różnych hodowli komórek.

W Polsce od kilkunastu lat produkowana jest szczepionka przeciwko nosówce przy użyciu szczepu replikującego w hodowli fibroblastów zarodka kurzego, w płynie utrzymującym Parkera 199, dostarczonym przez Wytwórnę Surowic i Szczepionek w Lublinie. Podłoże to zawiera poza solami sodu, potasu, magnezu oraz

glukoza szereg aminokwasów, witamin i innych składników umożliwiających podtrzymanie metabolizmu komórkowego *in vitro*. Korzystną właściwością tego płynu jest zapewnienie względnie wvstandaryzowanych warunków hodowli, nieodzownych przy niektórych pracach naukowych lub przy pasażowaniu szczepów wzorcowych i macierzystych. Jednakże stosunkowo wysoka ocena takiego podłoża, przygotowanego ze składników importowanych, rzutuje niekorzystnie na koszt produkcji szczepionki i uzależnia wytwórcę od importu wielu związków chemicznych.

W celu obniżenia kosztów produkcji szczepionki przeciwko nosówce i uniezależnienia się od innych producentów, wykonano badania zmierzające do zastąpienia syntetycznego płynu Parkera 199 podłożem znacznie tańszym, o uproszczonym składzie, przygotowywanym we własnym zakresie.