

JÓZEF PILASZEK

Występowanie *Ureaplasma diversum* w układzie oddechowym cieląt

Zakład Mikrobiologii Instytutu Weterynarii, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Drobnoustroje zaliczane do rodzaju *Ureaplasma*, nazywane do niedawna szczepami T-mycoplazm, a obecnie ureaplazmami zostały po raz pierwszy wyosobnione w 1954 r. przez Sheparda (14) z cewki moczowej człowieka. W 1967 r. zarazki te wyizolowano z układu moczopłciowego bydła (17), a w rok później z płuc cieląt (2). Obecnie lista autorów, którym udało się wyosobnić ureaplazmy od bydła jest stosunkowo długa i stale się powiększa. Wyosobniono je z błony śluzowej jamy nosowej, tchawicy, oskrzeli, płuc i worka spojówkowego cieląt; z pochwy, macicy i jajowodów krów oraz napletka, nasieniowodów, najądrzy, jąder i nasienia buhajów. Udało się je również izolować z łożyska i poronionych płodów. W celu odróżnienia ureaplazm występujących u innych gatunków zwierząt zarazki występujące u bydła od 1982 r. określa się jako *Ureaplasma (U) diversum*.

W Polsce drobnoustroje te od bydła zostały po raz pierwszy wyosobnione przez autora w 1981 r. (11). Niniejsza praca stanowi część tych badań, w których poczyniono udane próby izolacji ureaplazm od bydła ze szczególnym uwzględnieniem układu oddechowego cieląt. Uwzględnia ona również próby wyjaśnienia udziału tych drobnoustrojów w wywoływaniu pneumonii u cieląt.

Material i metody

Podłoża. Do izolacji ureaplazm użyto pożywki opisanej przez Livingstona (8) w modyfikacji własnej. Wykonano ją w ten sposób, że do 70 ml jałowego bulionu PPLO (Difco) dodano: wyciągu drożdżowego Fleischmann typ 2040 — 10 ml, surowicy końskiej nieinaktywowanej — 20 ml, 20% roztworu mocznika — 0,5 ml oraz penicyliny krystalicznej w ilości 1000 j.m./ml. Jako wskaźnika barwnego użyto 0,2% roztworu czerwieni fenolowej w ilości 1 ml. Końcowe pH podłoża ustalono na 6,0. Celem otrzymania podłoża stałego, do wyżej wymienionego podłoża bulionowego dodano 1% Ionagaru nr 2 (Oxoid). Modyfikacja własna polegała na dodaniu do podłoża stałego 0,5 ml 3% wodnego roztworu siarczynu manganowego wg Sheparda i Luncforda (15) i ustaleniu jego pH przy pomocy buforu fosforanowego, składającego się z 1,5M roztworów KH_2PO_4 i Na_2HPO_4 , zmieszanych w stosunku 7:3 wg Windsora i wsp. (20).

Zwierzęta doświadczalne. Do badań pobrano materiał od 342 cieląt i 119 buhajów.

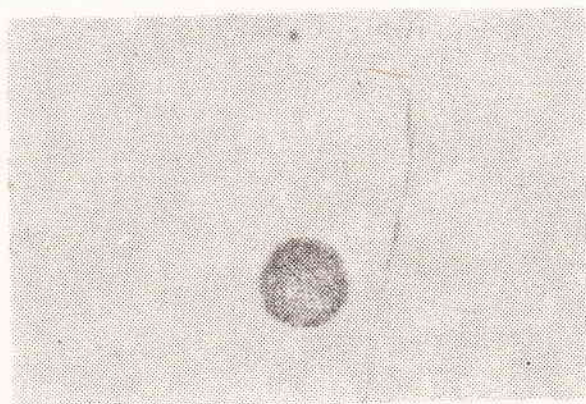
W badaniach wstępnych, mających na celu wykazanie obecności *U. diversum* u bydła, przebadano 52 wymazy z błony śluzowej jamy nosowej cieląt w wieku około 3 miesięcy, pochodzących z obór, w których występowały zachorowania charakterystyczne dla enzootycznej pneumonii. W tym celu użyto też 5 próbek z płuc cieląt, u których występowały zmiany zapalne. Wykonano również próby izolacji szczepów z nasienia 113 buhajów oraz od 6 buhajów z jąder i pęcherzyków nasiennych. Ureaplazmy próbowano też wy-

osobnić z worka spojówkowego 25 cieląt z objawami keratoconjunctivitis.

W dalszych badaniach do izolacji ureaplazm użyto wymazów z błony śluzowej jamy nosowej 183 cieląt pochodzących z 8 gospodarstw hodowlanych. U zwierząt tych występowały objawy kliniczne ze strony układu oddechowego lub były one w bezpośrednim kontakcie ze zwierzętami chorymi. Użyto również 288 wymazów pochodzących od 24 cieląt. Wymazy te były pobierane w okresie 1 roku w odstępach jednomiesięcznych od cieląt przebywających w oborze, w której od kilku lat nie obserwowano zachorowań ze strony układu oddechowego. Wykonano też próby izolacji ureaplazm od 23 cieląt poddanych ubojowi diagnostycznemu, z błony śluzowej jamy nosowej, tchawicy, oskrzeli i płuc. W płucach tych cieląt występowały zmiany zapalne. Podobne badania wykonano również na 30 cielętach zdrowych, poddanych ubojowi w rzeźni.

Wyniki i omówienie

Izolację *U. diversum* starano się przeprowadzić przy użyciu płynnego i stałego podłoża podanego przez Livingstona (8). Stosując podłoża bulionowe, uzyskiwano wyniki zadowalające. Natomiast istniały trudności w odczytywaniu wyników na podłożu stałym. Stosunkowo małe wymiary wyrosniętych kolonii (około 30 μm) oraz mało kontrastowy ich wygląd w mikroskopie świetlnym, stwarzały możliwość fałszywego odczytania wyniku posiewu. Dlatego też wykorzystując obserwacje Sheparda i Luncforda (15) oraz Windsora i wsp. (20), w badaniach własnych zmodyfikowano stałe podłoża Livingstona przez dodanie siarczynu manganowego i ustalenie jego pH buforem fosforanowym. Stosując tak zmodyfikowane podłoża otrzymano stosunkowo duże (około 120 μm , a niekiedy dochodzące do 300 μm) zabarwione na kolor ciemnobrązowy kolonie (ryc. 1). Wielkością były one zbliżone do kolonii obserwo-



Ryc. 1. Kolonia *Ureaplasma diversum* na zmodyfikowanym podłożu Livingstona (obraz w mikroskopie świetlnym, pow. 470 $\times$)

Tab. 1. Wyniki izolacji drobnoustrojów *Ureaplasma* od bydła

Rodzaj prób	Liczba prób badanych	Liczba prób dodatnich
Wymazy z błony śluzowej jamy nosowej cieląt*	52	32
Płuca zmienione zapalnie	5	1
Wymazy z worka spojówkowego cieląt**	25	5
Nasienie buhajów	113	52
Jądra buhajów	6	0
Pęcherzyki nasienne buhajów	6	0

Objaśnienia: * wymazy pobrano od cieląt pochodzących ze stada, w którym występowały zmiany ze strony układu oddechowego, ** u cieląt występowały objawy keratoconjunctivitis.

wanych przez innych autorów (9, 20), którzy również stosowali podłoże zbuforowane. Tak zmodyfikowanego stałego podłoża Livingstona użyto do dalszych badań mających na celu izolację szczepów *Ureaplasma*.

W badaniach wstępnych wykonano próby izolacji ureaplazm od bydła. Uzyskane wyniki zamieszczono w tab. 1.

Jak wynika z danych tab. 1, ureaplazmy udało się wyosobnić z błony śluzowej jamy nosowej cieląt pochodzących ze stada, w którym obserwowano zachorowania charakterystyczne dla enzootycznego zapalenia płuc u tych zwierząt. Badając 52 wymazy z błony śluzowej jamy nosowej w 32 przypadkach wyosobniono ureaplazmy. Drobnoustroje te wyizolowano też z nasienia buhajów. Na 113 prób badanych w 52 przypadkach otrzymano wynik pozytywny. Udało się również wyosobnić szczep *Ureaplasma* w 1 przypadku na 5 badanych płuc zmienionych zapalnie oraz w 5 przypadkach na 25 badanych prób pobranych z worka spojówkowego cieląt z objawami keratoconjunctivitis. Zarazków tych nie udało się wyizolować z jąder i pęcherzyków nasiennych 6 buhajów, u których występowało zapalenie tych narządów.

W przeprowadzonych badaniach wykazano więc te zarazki w materiale pochodzącym z błony śluzowej jamy nosowej, płuc i worka spojówkowego cieląt oraz z nasienia buhajów. Uzyskane wyniki potwierdziły badania autorów zagranicznych (1, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 12, 13, 16), dotyczące występowania ureaplazm u bydła.

W dalszej części pracy starano się bliżej określić występowanie *U. diversum* w układzie oddechowym cieląt oraz sprawdzić, czy istnieje korelacja między obecnością tych drobnoustrojów w układzie oddechowym a występowaniem schorzeń ze strony tego układu. W tym celu zbadano 183 cielęta chore lub pozostające w bezpośrednim kontakcie z nimi. Pochodziły one z 8 gospodarstw, w których od kilku lat notowano zachorowania charakterystyczne dla enzootycznej pneumonii. Od cieląt tych pobrano wymazy z błony śluzowej jamy nosowej i wykonano próby izolacji ureaplazm. W ten sam spo-

Tab. 2. Wyniki izolacji szczepów *Ureaplasma* z błony śluzowej jamy nosowej cieląt z objawami klinicznymi ze strony układu oddechowego lub cieląt pozostających w bezpośrednim kontakcie z cielętami chorymi

Gospodarstwo	Liczba badanych zwierząt	Liczba dodatnich izolacji	Procent dodatnich izolacji
A	22	17	77,3
B	30	11	36,7
C	30	13	43,3
D	15	2	13,3
E	17	4	23,5
F	22	16	72,7
G	14	8	57,1
H	33	16	48,5
Razem K	138 24	87 —	47,5 —

Objaśnienie: K — cielęta zdrowe. Pochodziły one z gospodarstwa, w którym nie obserwowano zachorowań cieląt ze strony układu oddechowego; badano je 12-krotnie w odstępach miesięcznych.

sób przebadano również 24 cielęta zdrowe, które stanowiły grupę kontrolną. Pochodziły one z obory, w której na przestrzeni kilku lat nie obserwowano zachorowań ze strony układu oddechowego. Badania te przeprowadzono 12-krotnie w odstępach jednomiesięcznych. Otrzymane wyniki przedstawiono w tab. 2.

Z tabeli wynika, że na 183 pobrane wymazy z błony śluzowej jamy nosowej cieląt chorych lub podejrzanych o zakażenie w 87 przypadkach, co stanowiło 47,5%, wyosobniono ureaplazmy. Odsetek zakażonych cieląt w poszczególnych oborach wahał się w granicach od 13,3% do 77,3%. Natomiast badając wymazy pobrane od 24 cieląt zdrowych, pochodzących z obory, w której nie obserwowano u tych zwierząt objawów klinicznych ze strony układu oddechowego, w żadnym przypadku nie udało się wyosobnić ureaplazm mimo, iż badania powtarzano przez 12 kolejnych miesięcy.

Od cieląt pochodzących z gospodarstw, w których występowały zachorowania ze strony układu oddechowego, ureaplazmy izolowali również Shimizu i wsp. (16). Wykonali oni udane próby izolacji tych zarazków od cieląt we wszystkich 4 badanych przez siebie gospodarstwach, a Morgan i Levis (9) wykazali ureaplazmy w błonie śluzowej jamy nosowej 15 cieląt pochodzących z 5 gospodarstw.

Prześlędzono również w pewnym sensie drogę szerzenia się infekcji w poszczególnych odcinkach układu oddechowego. W tym celu wykonano próby izolacji *U. diversum* równocześnie z błony śluzowej jamy nosowej, tchawicy, oskrzeli i płuc 23 cieląt, u których po uboju diagnostycznym stwierdzono zmiany anatomiczno-patologiczne w płucach. Podobne badania wykonano na 30 cielętach zdrowych. Wyniki tych badań przedstawia tab. 3.

Spośród 23 cieląt, ze zmianami chorobowymi w płucach, u 15 wykazano ureaplazmy w jamie nosowej i tchawicy, u 14 w oskrzelach i u 13 w

Tab. 3. Wyniki izolacji szczepów *Ureaplasma* z różnych odcinków układu oddechowego cieląt

Grupa cieląt	Liczba cieląt badanych	Odcinek układu oddechowego			
		śluzowa jamy nosowej	tchawica	oskrzela	płuca
I	23	15*	15	14	13
II	30	—**	—	—	—

Objaśnienia: I — cielęta poddane ubojowi diagnostycznemu, u których stwierdzono zmiany anatomopatologiczne w płucach, II — cielęta poddane ubojowi w rzeźni, u których nie stwierdzono zmian w płucach, * — liczba cieląt, od których wyosobniono ureaplazmy, ** — wynik negatywny izolacji.

płucach. Od wszystkich cieląt, od których wyosobniono ureaplazmy z płuc, drobnoustroje te udało się wyizolować równocześnie z pozostałych odcinków układu oddechowego. W pozostałych przypadkach od 1 cielęcia izolowano je z nosa, tchawicy i oskrzeli oraz od 1 cielęcia z nosa i tchawicy. Dowodzi to, iż zarazki dostają się drogą zakażenia kropelkowego na błonę śluzową jamy nosowej, skąd infekcja rozszerza się do płuc. Na 30 przeprowadzonych prób izolacji od cieląt zdrowych w żadnym przypadku nie udało się wyosobnić tego drobnoustroju. O nieudanych próbach izolacji ureaplazm z płuc cieląt zdrowych donoszą również Thomas i Smith (19), Shimizu i wsp. (16) oraz Pirre i Allan (12).

Uzyskane w badaniach własnych pozytywne wyniki izolacji szczepów *Ureaplasma* z błony śluzowej jamy nosowej, tchawicy, oskrzeli i płuc cieląt wykazujących zmiany kliniczne lub anatomopatologiczne ze strony układu oddechowego oraz nieudane próby izolacji tych szczepów od cieląt zdrowych, mogą świadczyć o udziale tych drobnoustrojów w etiologii zapalenia płuc cieląt.

Wnioski

1. Dodanie do stałego podłoża Livingstona siarczanu manganowego i ustalenie jego pH buforem fosforanowym zwiększa jego przydatność do izolacji ureaplazm.

2. *Ureaplasma diversum* winna być brana pod uwagę w etiologii zapalenia płuc cieląt.

Piśmiennictwo

1. Bitsch V., Friis N. F., Krough H. V.: Acta vet. scand. 17, 32, 1976.
2. Gourlay R. N.: Res. vet. Sci. 9, 376, 1968.
3. Gourlay R. N., Mackenzie A. A., Cooper J. E.: J. comp. Path. 80, 575, 1970.
4. Gourlay R. N., Thomas R. H.: Vet. Rec. 84, 416, 1969.
5. Harbourn J. F., Hunter D., Leach R.: Res. vet. Sci. 6, 188, 1965.
6. Ishino S., Oka M., Terui S., Ikeda S.: Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart. 19, 91, 1979.
7. Jurmanova K., Cerna J., Jiranek E.: Vet. Med. Praha 22 (L), 81, 1977.
8. Livingston C. W.: Am. J. vet. Res. 33, 1925, 1972.
9. Morgan J. H., Levis J.: Med. Lab. Sci. 34, 177, 1977.
10. Muenster O. A., Ose E. E., Matsuoka T.: Can. J. comp. Med. 43, 392, 1979.
11. Pilaszek J.: Udział szczepów *Ureaplasma* w etiologii zapalenia płuc u cieląt. Praca hab. Puławy 1982.
12. Pirre H. M., Allan E. M.: Vet. Rec. 97, 345, 1975.
13. Rhunke H. L., Dreumel A. A.: Can. J. comp. Med. 36, 317, 1972.

14. Shepard M. C.: Am. J. Syph. gonorrhea Vener. Dis. 38, 114, 1954.
15. Shepard M. C., Lunceford C. D.: J. clin. Microbiol. 3, 613, 1976.
16. Shimizu T., Nosaka D., Nakamura N.: Jap. J. vet. Sci. 37, 121, 1975.
17. Taylor-Robinson D., Haig D. A., Williams M. H.: Ann. NY. Acad. Sci. 143, 517, 1967.
18. Taylor-Robinson D., Thomas M., Dawson T. L.: J. med. Microbiol. 2, 527, 1969.
19. Thomas L. H., Smith G.: J. comp. Path. 82, 1, 1972.
20. Windsor G. D., Edward D. G., Trigwell J. A.: J. med. Microbiol. 8, 183, 1975.

Adres autora: doc. dr hab. Józef Pilaszek, ul. Cichockiego 5/15, 24-100 Puławy

Пилишек Ю. — Появление *Ureaplasma diversum* в дыхательной системе телят.

Для изоляции уреаплазм применено модифицированную питательную среду, описанную Ливингстоном. На этом субстрате выполнено попытки изолирования возбудителя болезни из материала от 342 телят и 119 быков. Штаммы *U. diversum* удалось изолировать из слизистой оболочки носовой полости, легких и конъюнктивного мешка телят и из семени быков. В слизистой оболочке носовой полости больных телят или находящихся в непосредственном контакте с ними уреаплазмы появлялись у 47,5% исследуемых животных. Не отмечено же этих возбудителей болезни у здоровых телят. Похожие результаты получено в исследованиях, имеющих целью изоляцию уреаплазм из легких. Полученные результаты могут свидетельствовать об участии микроорганизмов *Ureaplasma* в этиологии воспаления легких у телят.

Pilaszek J. — Occurrence of *Ureaplasma diversum* in the respiratory tract of calves

A modified medium described by Livingston was used to isolate ureaplasma strains. Attempts of isolation were carried out by plating the samples from 342 calves and 119 bulls. The strains of *Ureaplasma diversum* were isolated from the mucosa of the nose, lungs and conjunctiva, and from the semen of bulls. In the mucosa of the nose of sick calves or being in close touch with them ureaplasmas were noted in 47.5% of calves under study. Instead no ureaplasmas were found in healthy calves. Similar results were obtained with the samples taken from the lungs. The findings may indicate that the microorganisms of *Ureaplasma* sp. take part in the etiology of pneumonia of calves.

EMERY D. L., DUFTY J. H., CLARK B. L.: Biochemiczne i czynnościowe właściwości leukocydyny szczepów *Fusobacterium necrophorum*. (Biochemical and functional properties of a leucocidin produced by several strains of *Fusobacterium necrophorum*). Aust. vet. J. 61, 382—387, 1984 (12).

Ropuszczalna egzotoksyna (leukocydyna) *F. necrophorum* o masie 250—300 tys. daltonów wywiera działanie niszczące na leukocyty bydła, owiec, królików i człowieka. Wytwarzają ją formy nitkowate w hodowlach płynnych. Maksymalną produkcję leukocydyny uzyskuje się przy stężeniu bakterii wynoszącym 4×10^7 — 4×10^8 krótkich form *F. necrophorum* na ml podłoża płynnego. Przy przedłużeniu hodowli w następstwie obniżenia pH hodowli do poniżej 6 miano leukocydyny spada. Leukocydyna *F. necrophorum* nie traci swojej aktywności przez 30 dni w 4°C, nie ulega inaktywacji przy pH w granicach 4—9 w 18°C przez 1 godz., wykazuje maksymalną aktywność w 37°C przy pH 7 i 8. Ogrzewanie (56°C, 30 min) inaktywuje egzotoksynę.

G.