

ustrojów wyróżnić można było dwie postacie różniące się morfologicznie: jedna z nich wykazywała małe, elektronowe, gęste struktury, które ulegały podwójnemu podziałowi wewnątrz wakuoli w cytoplazmie komórek. Druga forma miała większe rozmiary, o mniejszej gęstości elektronowej i tworzyła skupiska otoczone ściśle przylegającą błoną komórkową gospodarza (cyt. za 13). Niekiedy obie postacie drobnoustrojów można było obserwować w tej samej wakuoli.

Obserwacje terenowe wykazują, że konie po przechorowaniu pozostają odporne i nie istnieje ryzyko ponownego zakażenia. Potwierdzają to obserwacje z końmi zakażonymi doświadczalnie (14). Opracowano już też doświadczalną szczepionkę, która daje wysoki poziom przeciwciał i chroni przed doświadczalnym zakażeniem. Obecnie szczepionka przechodzi próby terenowe (cyt. za 13).

Do rozpoznania choroby wykorzystuje się przygotowane rozmazy z krwi lub z kożuszka białych ciałek krwi od koni zakażonych, barwione metodą Giemzy lub immunofluorescencyjnie (9, 11). Do rozpoznania stosuje się też hodowlę komórek, takich jak histocyty człowieka lub monocyty psa, w których zarazek się namnaża (4, 10). Badanie par surowic do wykazania wzrostu poziomu przeciwciał może mieć jedynie zastosowanie w tych przypadkach, w których nie jest konieczna szybka diagnostyka. Diagnostyka różnicowa musi w przypadku biegunki uwzględniać salmonelozę.

Leczenie choroby dotychczas opiera się na stosowaniu

antybiotyków. Najlepsze efekty dało zastosowanie tetracyklin (15). Wskazane są jednak dalsze obserwacje. W postępowaniu terapeutycznym zasadniczą sprawą jest wyrównanie odwodnienia, a także dalsze leczenie objawowe. Rokowanie o przebiegu choroby jest jednak bardzo trudne, gdyż czasami lekkie przypadki kończą się śmiercią, natomiast ostre kończą się pomyślnie. Objawy ochwatu zwykle przemawiają za rokowaniem niepomyślnym.

#### Piśmiennictwo

1. Cordes D. O., Perry B. D., Rikihisa Y., Chickering W. R.: Vet. Pathol. 23, 471, 1986.
2. Ehrlich M., Perry B. D. i wsp.: J. Am. vet. med. Ass. 185, 433, 1984.
3. Gribble D. H.: J. Am. vet. med. Ass. 155, 462, 1969.
4. Holland C. J., Ristic M., Cole A. I. i wsp.: Science 227, 522, 1985
5. Holland C. J., Johnson P., Baker G., Goetz T.: Vet. Rec. 115, 554, 1984.
6. Kuehn N. F., Gaunt S. D.: J. Am. vet. med. Ass. 6, 355, 1985.
7. Lewis G. E., Jr.: Vet. Parasit. 2, 61, 1976.
8. Madigan J. E., Gribble D. H.: Proc. Ann. Con. Am. Ass. Equine Pract. 27, 365, 1982.
9. Perry B. D., Rikihisa Y., Saunders G. K.: Vet. Rec. 116, 246, 1985.
10. Rikihisa Y., Perry B. D.: Vet. Rec. 115, 554, 1984.
11. Ristic M., Holland C. J., Dawson J. i wsp.: J. Am. vet. med. Ass. 189, 39, 1986.
12. Stannard A. A., Gribble D. H., Smith R. S.: Vet. Rec. 84, 149, 1969.
13. Timoney J. F., Gillespie J. H., Scott F. W., Barlough J. E.: Hagan's and Bruner's Microbiology and Infectious Diseases of Domestic Animals. Cornell Univ. Press. Ithaca, London, 1988.
14. Whitlock R. H. i wsp.: 27th Annual Proc. Amer. Assn. Vet. Lab. Diagnost. 1984, s. 103.
15. Whitlock R. H.: J. Am. vet. med. Ass. 185, 1210, 1984.
16. Ziemer E. L., Whitlock R. H. i wsp.: Am. J. Vet. Res. 48, 63, 1987.

Adres autora: prof. dr hab. Jerzy Kita, ul. Grochowska 272, 03-849 Warszawa

TADEUSZ FRYMUS, WOJCIECH BIELECKI, TADEUSZ JAKUBOWSKI

## Patogenność dermonekrotycznej toksyny *Pasteurella multocida* dla królików \*)

Katedra Epizootiologii i Katedra Patologii Wydziału Weterynaryjnego SGGW-AR, ul. Grochowska 272, 03-849 Warszawa

### Summary

#### Pathogenicity of the *Pasteurella multocida* toxin for rabbits

The toxin used was a sterile crude extract of a sonicated strain A11/2a of *Pasteurella multocida* (P.m.) type D, isolated from a pig with atrophic rhinitis. Fifteen rabbits aged 8–12 days were being given 8 or 12 doses of the toxin every 3–4 days intramuscularly or subcutaneously. According to the same schedule 9 control litter-mates were being given an extract from the nontoxic strain 01d9 of P.m., type D. All the rabbits were then sacrificed, necropsied and the specimens were taken for histopathological evaluation and the nasal swabs for bacteriological examination. No toxigenic P.m. or *Bordetella bronchiseptica* were isolated from those animals as tested by the guinea pig skin test. All the rabbits which had received the toxin showed from mild to severe atrophy of the nasal turbinates. Microscopic lesions included degeneration of their osseous core, necrotic changes of the osteocytes and an increased number of osteoblasts and osteoclasts. Hyperaemia of the nasal mucosa was also seen and in a few cases bionecrosis was found in the osteoblasts. Degeneration was found in the liver and myocardium. In the lymphatic tissue hypertrophy of the follicles was observed. Control rabbits showed no changes with the exception of one animal with mild turbinate atrophy. It is concluded that in natural atrophic rhinitis in rabbits the dermonecrotic toxin of P.m. plays a similar role as in this kind of disease in pigs.

W zespole chorobowym określanym jako tzw. zakaźny katar królików występuje schorzenie, którego objawy kliniczne, przebieg w stadzie, a także zmiany anatomiczno-patologiczne i histopatologiczne przypominają zakaźne zanikowe zapalenie nosa (*rhinitis atrophicans*) u świń (2, 7). Co więcej, w jamach nosowych chorych królików stwierdza się w takich przypadkach obecność m.in. *Bordetella bronchiseptica* oraz szczepów *Pasteurella multocida* wytwarzających tzw. toksynę dermonekrotyczną (8). Oba te zarazki, a w szczególności wspomniana toksyna, odgrywają ważną rolę w etiopatogenezie enzoptycznej (postępującej) formy *rhinitis atrophicans* u świń (1, 5, 6). Pojawiało się zatem przypuszczenie, że króliki i świny chorować mogą na *rhinitis atrophicans* o tej samej etiologii (8). By rzucić więcej światła na to zagadnienie podjęto badania nad patogennością dla królików podstawowego czynnika chorobotwórczego w enzoptycznej formie *rhinitis atrophicans* świń — dermonekrotycznej toksyny *Pasteurella multocida*.

### Materiał i metody

Toksyna. Toksynę dermonekrotyczną uzyskiwano ze szczepu A11/2a *Pasteurella multocida* typu D wyizolowanego z jamy nosowej świni z objawami *rhinitis atrophicans*. Bakterie namnażano na agarze z krwią w temperaturze 37° przez 18 godzin, a następnie spłukiwano 0,86% roztworem NaCl o pH 5. Po odwirowaniu (9000 g przez 30 mi-

\* Praca wykonana w ramach programu RR II 24.

nut w temp. 4°C) bakterie zawieszano w wodzie o pH 8 tak, by uzyskać gęstość optyczną 0,7 przy długości fali 650 nm w kuwecie o długości drogi optycznej 10 mm. Zawiesinę tę poddawano w łaźni lodowej działaniu ultradźwięków 3 razy po 4 minuty sygnałem pulsującym, a następnie zamrażano w łaźni alkoholowej w temperaturze -70°C. Cykl działania ultradźwiękami oraz zamrażania powtarzano pięciokrotnie. Następnie podnoszono pH do 8 i przez 2 godziny ekstrahowano toksynę w temperaturze pokojowej przez ciągłe mieszanie, po czym zawiesinę wirowano (15 000 g przez 30 minut w temperaturze 4°C). Supernatant wyjaławiano sączeniem przez filtr miliporowy o średnicy porów 0,2 µm i używano jako toksynę. Przechowywano ją w stanie zliofilizowanym do czasu doświadczenia. W celu określenia LD<sub>50</sub> dla myszy (mLD<sub>50</sub>) sporządzano szereg rozcieńczeń pięciokrotnie wzrastających. Z każdego wstrzykiwano dootrzewnowo 3—5 myszom szczepu Swiss, samcom o masie ciała 18—20 g dawkę 0,2 ml na zwierzę. Czwartego dnia wyliczano LD<sub>50</sub> według metody Reeda i Muencha.

Postępowaniem analogicznym jak przy wytwarzaniu toksyny uzyskiwano dla królików kontrolnych filtrat — nazywany dalej preparatem kontrolnym — z nietoksynogennego szczepu 01d9 *Pasteurella multocida* typu D wyizolowanego z jamy nosowej klinicznie zdrowej świni ze stada wolnego od *rhinitis atrophicans*.

Króliki. Badania przeprowadzono na krzyżówkach nowozelandzów z termontami. Pochodziły one ze stada wolnego od zakaźnego kataru i pasterelozy. W dwóch doświadczeniach użyto ogółem 24 królików rozpoczynając eksperymenty w wieku 8—12 dni.

Układ doświadczeń. Celem pierwszego doświadczenia było dobranie dawki toksyny optymalnej do dalszych badań. W tym celu miot podzielono losowo na 4 grupy liczące po 3—4 króliki. Następnie co 3—4 dni podano im domięśniowo ogółem 12 dawek toksyny, przy czym w jednej grupie każda iniekcja zawierała 1 mLD<sub>50</sub>, w drugiej grupie — 3 mLD<sub>50</sub>, a w trzeciej — 9 mLD<sub>50</sub>. Zwierzęta czwartej grupy utrzymywały w tym samym czasie zamiast toksyny preparat kontrolny o ilości białka takiej samej jak w *inoculum* zawierającym 9 mLD<sub>50</sub>. Przez cały czas trwania doświadczenia wszystkie grupy przebywały razem z matką. Po 3—4 dniach od ostatniej dawki toksyny lub preparatu kontrolnego pobrano krew z serca i króliki poddano eutanazji barbituranowej. Następnie zwłoki ważono, wykonywano sekcję i pobierano wymazy z jamy nosowej i migdałków do badania bakteriologicznego oraz wycinki narządów i tkanek do badań histopatologicznych.

Podobnie wykonano następne doświadczenie, lecz przy-

jęto w nim dawkę toksyny 3 mLD<sub>50</sub> wprowadzaną podskórną również do 3—4 dni, ogółem 8 razy.

Badania bakteriologiczne. Badania w kierunku obecności *Pasteurella multocida* i *Bordetella bronchiseptica* oraz określanie toksynogenności izolatów przeprowadzono w sposób uprzednio opisany (5).

Badania patologiczne. Do badań histopatologicznych pobierano następujące narządy i tkanki: okolica nosowa, serce, płuco, wątroba, jelito czcze, węzeł chłonny krezkowy, śledziona i nerka. Wycinki utrwalano w 10% formalinie. Głowy po utrwaleniu poddawano elektrolitycznemu odwapnianiu stosując 0,1 n roztwór kwasu mrówkowego. Prąd stały o natężeniu 0,5 A i mocy 3 W przepuszczano przez elektrolit za pomocą elektrod węglowych przez 6 godzin. Po odwapnieniu głów wykonywano cięcia poprzeczne nosa w 1/2 długości krawędzi międzyczodołowej w celu dokonania oceny stanu małżowin nosowych i przegrody nosowej. Po przeprowadzeniu tych czynności pobierano wycinki o grubości 5 mm.

Wycinki narządów utrwalonych zatapiano w parafinie. Skrawki parafinowe o grubości 5 µm barwiono hematoksylina i eozyną. Preparaty nerki barwiono ponadto metodą PAS, a skrawki z wątroby i mięśnia sercowego Sudanem III w celu wykrycia obecności tłuszczów.

## Wyniki i omówienie

W tab. 1 przedstawiono wyniki badań bakteriologicznych, masy ciała królików doświadczalnych i kontrolnych oraz ewentualny zanik małżowin nosowych. Od żadnego zwierzęcia nie wyizolowano toksynotwórczych szczepów *Pasteurella multocida* lub *Bordetella bronchiseptica*. Pozwala to zmiany i objawy widoczne u królików doświadczalnych, a nieobecne u kontrolnych, wiązać z działaniem wstrzykiwanej toksyny. Z danych przedstawionych w tab. 1 wynika, że zwierzęta doświadczalne wykazywały niejednokrotnie dużego stopnia zanik małżowin nosowych, podczas gdy u królików kontrolnych — z wyjątkiem jednego — brak było zmian w małżowinach. Wygląd kości trzewioczaszki królików doświadczalnych był normalny. Zaniki małżowin stwierdzone u zwierząt otrzymujących toksynę były podobne do obserwowanych przez nas wcześniej u królików z na-

Tab. 1. Wyniki badań bakteriologicznych, masy ciała oraz zanik małżowin nosowych u królików otrzymujących co 3—4 dni toksynę *Pasteurella multocida* lub preparat kontrolny

Doświadczenie	Liczba dawek toksyny	Jednorazowa dawka toksyny i droga podania	Numer królika	Masa ciała po eutanazji (g)	Wynik badania bakteriologicznego jamy nosowej po eutanazji	Stopień zaniku małżowin nosowych
I	12	1 mLD <sub>50</sub> i.m.	8	1345	B.b. (—)	+/-
			9	1215	P.m. (—)	+/-
			12*	n.b.	n.b.	++
		3 mLD <sub>50</sub> i.m.	6	1000	B.b. (—)	+
			7	1060	B.b., P.p. (—) (—)	+
			10*	n.b.	n.b.	++
		9 mLD <sub>50</sub> i.m.	11*	n.b.	n.b.	++
			4*	n.b.	n.b.	+/-
			5	815	P.m. (—)	+
		preparat kontrolny i.m.	13*	n.b.	n.b.	++
			1	1725	B.b. (—)	—
			2	1330	0	—
3	1300		0	—		
II	8	3 mLD <sub>50</sub> s.c.	15*	n.b.	n.b.	—
			409	329	0	++
			410	673	0	+
			411	803	0	+
			412	756	0	+/-
		413	673	0	+/-	
		preparat kontrolny s.c.	414	847	0	—
			415	697	0	—
			416	863	0	—
			417	849	0	—
418	862		0	+/-		

Objaśnienia: \* — króliki padłe przed planowanym zakończeniem doświadczenia, mLD<sub>50</sub> — LD<sub>50</sub> dla myszy, B.b. (—) — nietoksynotwór — czy szczep *Bordetella bronchiseptica*, P.m. (—) — nietoksynotwór — czy szczep *Pasteurella multocida*, 0 — nie wyizolowano *Bordetella bronchiseptica* ani *Pasteurella multocida*, n.b. — nie badano, — — małżowiny nosowe bez zmian, +/- — mały zanik małżowin nosowych, + — średni zanik małżowin nosowych, ++ — duży zanik małżowin nosowych.

turalnych ognisk *rhinitis atrophicans* (7). W narządach wewnętrznych zwierząt doświadczalnych stwierdzano zazwyczaj przekrwienie płuc i nerek, cechy wątroby muszkatołowej oraz obrzęk śledziony. W kilku przypadkach obserwowano zmiany w mięśniach sercowym manifestujące się jego kremoworóżowym zabarwieniem. Zwierzęta kontrolne wykazywały jedynie przekrwienie wątroby, nerek i płuc, co należy wiązać z eutanazją barbituranową.

W badaniach histopatologicznych okolicy nosowej zwierząt doświadczalnych obserwowano zwyrodnienie tkanki kostnej beleczek małżowin nosowych, nekrobiozę osteocytów, rozplem osteoblastów i osteoklastów oraz przekrwienie błony śluzowej. W kilku przypadkach stwierdzono zmiany nekrobiotyczne także w komórkach osteoblastów, manifestujące się wakuolizacją cytoplazmy oraz obkurczeniem i hiperchromazją jąder komórkowych. Belecзки kostne małżowin nosowych objęte zmianami uszkodzeniowymi czasami przypominały „rzeżo”. W jednym przypadku stwierdzono całkowity zanik beleczek kostnych i obkurczenie małżowin. W każdym przypadku zmiany obserwowane w przewodach nosowych miały charakter symetryczny. Nie stwierdzono zmian histopatologicznych w przegrodzie nosowej oraz w kościach trzewioczaszki, podobnie jak i nie obserwowano zmian w małżowinach królików kontrolnych. Wiele z wyżej wymienionych zmian mikroskopowych w małżowinach zwierząt doświadczalnych obserwowaliśmy uprzednio w materiale z terenowych przypadków *rhinitis atrophicans* u królików (7) z jedną zasadniczą różnicą — u zwierząt doświadczalnych brak było nacieku zapalnego, z reguły obecnego w materiale terenowym. Różnica ta jest zrozumiała, gdyż króliki doświadczalne nie były zakażane, lecz traktowane jałową toksyną i to wprowadzaną podskórnie lub domięśniowo. Nie rozwijał się zatem stan zapalny jamy nosowej, ale dochodziło w małżowinach do zmian wstecznych bardzo zbliżonych do tych, jakie toksyna ta wywołuje w małżowinach prosiąt (3, 4, 5, 12).

Zwierzęta doświadczalne wykazywały również szereg zmian histopatologicznych w narządach wewnętrznych. W sercu obserwowano przekrwienie mięśnia sercowego i zmiany o charakterze zwyrodnienia szklanego lub tłuszczowego w komórkach mięśniowych. Niekiedy zmianom tym towarzyszył naciek komórek jednojądrzastych. W wątrobie stwierdzano cechy przekrwienia i zwyrodnienia tłuszczowego lub wodniczkowego hepatocytów. Podobne zmiany w wątrobie były wielokrotnie opisywane po podawaniu tej toksyny prosiątom lub szczurom (5, 12, 13).

W śledzienie i węzły chłonne krezki jelit królików doświadczalnych stwierdzono rozplem komórek układu siateczki oraz rozrost grudek chłonnych. Zwraca uwagę fakt, iż ta ostatnia zmiana powodowana była rozplemem limfoblastów, natomiast strefa brzeżna grudek chłonnych ulegała zanikowi. Ta mała liczba limfocytów w grudkach i poza nimi spowodowana mogła być albo nekrotycznym działaniem toksyny — co sugerowali Rüschoff i wsp. (13) u szczurów — albo jej mitogennym działaniem. Dermonekrotyczna toksyna *Pasteurella multocida* uchodzi bowiem za jeden z najsilniejszych mitogenów *in vitro* (11). Rozenfurt i wsp. (11) wysunęły hipotezę, iż rozplem osteoblastów i osteoklastów w zrębie kostnym małżowin nosowych, charakterystyczny dla *rhinitis atrophicans* u świń, jest również wynikiem mitogennego działania toksyny na te komórki.

Użyta w niniejszej pracy toksyna pochodziła z zarazka wyizolowanego od świni. Szczep *Pasteurella multo-*

*cida* pochodzące od królików wytwarzają toksynę o tych samych lub bardzo zbliżonych właściwościach co szczepy izolowane od świń (10). Tak więc nie można wykluczyć wzajemnego zakażenia się świń i królików *rhinitis atrophicans*. Niedawno doniesiono z Norwegii o wybuchu pasterelozy królików w związku z zakaźnym zanikowym zapaleniem nosa świń (9).

## Wnioski

1. Dermonekrotyczna toksyna *Pasteurella multocida* powoduje u królików zaniki małżowin nosowych podobne pod względem anatomopatologicznym i histopatologicznym do tych obserwowanych w naturalnych ogniskach *rhinitis atrophicans* u królików i świń.

2. Wydaje się, że w etiopatogenezie *rhinitis atrophicans* u królików dermonekrotyczna toksyna *Pasteurella multocida* ma podobne znaczenie jak w zakaźnym zanikowym zapaleniu nosa świń.

3. Nie można wykluczyć wzajemnego zakażenia się świń i królików *rhinitis atrophicans*.

## Piśmiennictwo

1. Chanter N., Rutter J. M.: Pasteurellosis in pigs and the determinants of virulence of toxigenic *Pasteurella multocida*. W: red. Adlam C., Rutter J. M.: *Pasteurella and pasteurellosis*. Academic Press London 1989.
2. DiGiacomo R. F., Deeb B. J., Giddens W. E., Bernard B. L., Chenappa M. M.: Am. J. vet. Res. 50, 1460, 1989.
3. Dominick M. A., Rimler R. B.: Am. J. vet. Res. 47, 1532, 1986.
4. Dominick M. A., Rimler R. B.: Vet. Pathol. 25, 17, 1988.
5. Frymus T.: Rola dermonekrotycznej toksyny *Pasteurella multocida* w patogenie zakaźnego zanikowego zapalenia nosa świń oraz możliwości immunoprofilaktyki tej choroby. Praca hab. SGGW-AR. Warszawa, 1988.
6. Frymus T.: Aktualne poglądy na etiopatogenezę zakaźnego zanikowego zapalenia nosa świń. Medycyna Wet. 46, 3, 1990.
7. Frymus T., Jakubowski T., Bielecki W.: Naturalne zachorowania królików na *rhinitis atrophicans*, Medycyna Wet. w druku.
8. Frymus T., Bielecki W., Jakubowski T.: Toxigenic *Pasteurella multocida* in rabbits with naturally occurring atrophic rhinitis. J. vet. Med. B., w druku.
9. Lund A., Framstad T.: Norsk VetTidsskr. 100, 899, 1988.
10. Rimler R. B., Brooden K. A.: Am. J. vet. Res. 47, 730, 1986.
11. Rozenfurt E., Higgins T., Chanter N., Lar A. J., Stoddon J. M.: Proc. 11-th IPVS Congr. Lausanne 1990, s. 66.
12. Rutter J. M., Mackenzie A.: Vet. Rec. 114, 89, 1984.
13. Rüschoff B., Hermanns W., Petzoldt K.: J. vet. Med. B 34, 691, 1987.

Adres autora: doc. dr hab. Tadeusz Frymus, ul. Dunikowskiego 5 m. 15, 02-784 Warszawa

**KUMAR A., GARG D. N.: Izolacja mykoplazm F-38 z mleka krów z zapaleniem gruczołu mlekowego. (Isolation of mycoplasma F-38 from the milk of mastitic cows). Vet. Rec. 128, 429, 1991 (18)**

Pierwsze ognisko zapalenia gruczołu mlekowego na tle zakażenia mykoplazmami wywołane było przez *Mycoplasma bovis*. Następnie opisano zapalenia gruczołu mlekowego krów spowodowane przez *M. canadense*, *M. californicum*, *M. alkalescens*, *M. bovirhinis*, *M. go 7*, *M. dispar*, *Ureaplasma*, *Acholeplasma laidlawii*, *A. axanthum* i *A. arginini*. Badanie mleka 136 krów z objawami zapalenia gruczołu mlekowego i 145 zdrowych zwierząt wykazało obecność *Mycoplasma F-38* w trzech przypadkach zapalenia gruczołu mlekowego, przy całkowitym jej braku w mleku zdrowych krów. Tylko w jednym przypadku *M. F-38* występowała w czystszej postaci, ponieważ w pozostałych dwóch przypadkach współistniała z *M. bovis* i *M. bovirhinis* i *Staphylococcus epidermidis* lub z *M. bovis* i *M. bovirhinis*, *A. laidlawii* i *S. epidermidis*. Wszystkie izolaty *F-38* były wrażliwe na erytromycynę, kanamycynę, linkomycynę, ledermycynę, spiramycynę, wibramycynę, tetracykliny i tylozynę, odporne na ampicylinę i streptomycynę. Wyizolowane szczepy powodowały zakażenie wyizolowanych pierścieni tchawicy chemika i powodowały zapalenie gruczołu mlekowego krów po wprowadzeniu do ewiartki wymienia hodowli bulinowej zawierającej około  $10^6$  cfu zarazka.