

Występowanie toksynotwórczych szczepów *Pasteurella multocida* u świń w południowo-wschodniej Polsce

Katedra Epizootologii i Klinika Chorób Zakaźnych Zwierząt Wydziału Weterynaryjnego AR, ul. Głęboka 30, 20-612 Lublin

Summary

Prevalence of *Pasteurella multocida* toxinogenic strains in pigs in the South-East of Poland

Prevalence of *Pasteurella multocida* toxinogenic strains in pigs in the South-East of Poland was investigated. Nasal swabs from 355 pigs aged 7 weeks to 4 months were taken and examinations were done using ELISA. Toxinogenic strains of *P. multocida* were identified in nasal swabs of 91 (25%) of pigs. The highest percentage of positive results (64%) was noted on a farm where pigs suffered from typical symptoms of infectious atrophic rhinitis.

Pasteurella multocida jest drobnoustrojem często izolowanym z dróg oddechowych od ludzi i różnych gatunków zwierząt (5). W oparciu o strukturę antygenową (obecność antygeny otoczkowego) w obrębie podgatunku *P. multocida ssp. multocida* wyodrębniono 4 typy: A, B, D, E, przy czym szczepy izolowane od świń należą głównie do typu A i D (20). Istotne znaczenie z punktu widzenia epizootologii mają zakażenia świń toksynogennymi szczepami *P. multocida* typu D, uznawanymi aktualnie za główny czynnik przyczynowy progresywnego, zakaźnego, zanikowego zapalenia nosa (zzzn) (9). Choroba ta powoduje znaczne straty ekonomiczne związane głównie z obniżeniem tempa wzrostu młodych zwierząt oraz gorszym wykorzystaniem paszy. Do tego dochodzą koszty związane z koniecznością wprowadzania długofalowych programów prewencyjnych. Z danych amerykańskich wynika, że w skali roku koszty globalne związane z występowaniem zzzn sięgają w tym kraju rzędu 300 mln dolarów (2). Ograniczenie tych strat jest możliwe, jeśli choroba zostanie w miarę wcześniej rozpoznana w stadzie, zaś sztuki zakażone zostaną wyeliminowane z hodowli. Istotne znaczenie dla właściwego rozpoznania choroby ma potwierdzenie występowania na błonie śluzowej nosa u świń toksynogennych szczepów *P. multocida*. Jest to możliwe *in vivo* poprzez wykazanie właściwości letalnych lub lientotoksycznych ekstraktów bakteryjnych w teście na myszkach lub zdolności produkowania dermonekrotoksyny w teście na świnkach morskich (17). Alternatywnie można zastosować techniki *in vitro*, takie jak testy cytotoksyczności w hodowli komórkowej (21) lub metody immunoenzymatyczne (10).

Celem pracy była ocena częstości występowania toksynotwórczych szczepów *P. multocida* u świń w fermach trzody chlewnej na terenie południowo-wschodniej Polski.

Materiał i metody

Materiał do badań stanowiły wymazy z błony śluzowej nosa pobrane od 355 świń w wieku od 7 tyg. do 4 mies. pochodzących z 4 ferm (K, P, U, N) o obsadzie od 400 do 1200 świń. W wywiadzie ustalono, że w dwóch spośród wymienionych ferm (K, U) w poprzednich sezonach produkcyjnych występowały pojedyncze przypadki klinicznej formy zanikowego za-

palenia nosa w postaci pojawiających się okresowo krwawień z otworów nosowych i deformacji kości trzewioczaszki, prowadzących do charłactwa. Świnie te były sukcesywnie eliminowane z hodowli. Ponadto w fermie U przez 2 lata prowadzono szczepienia profilaktyczne stada podstawowego świń przy użyciu szczepionki biwalentnej Suirhinovac. W fermie P będącej gospodarstwem o skrajnie złych warunkach zoohigienicznych około 10% pogłowia świń w różnym wieku wykazywało typowe objawy kliniczne zzzn, przy czym nie stosowano tutaj żadnego zwalczania choroby. Natomiast w fermie N posiadającej bardzo dobre warunki sanitarno-żywniowe nie stwierdzono dotychczas przypadków klinicznej formy choroby. W żadnej z wymienionych ferm nie stosowano chemioprophylaktyki ani też nie podawano antybiotyków w formie premiksów paszowych.

Wymazy pobierano przy pomocy jałowych wacików wprowadzanych głęboko do jamy nosowej, po czym umieszczano je w bulionie odżywczym i transportowano do laboratorium w łaźni lodowej. W ciągu 3 godzin od chwili dostarczenia do pracowni próbki posiewano na podłoże agarowe z krwią baranią z dodatkiem siarczanu neomycyny (2 µg/ml) i bacytracyny (3,5 µg/ml) i inkubowano przez 18-24 godz. w temp. 37°C. Wyroste kolonie bakteryjne stanowiły materiał wyjściowy do identyfikacji toksynotwórczych szczepów *P. multocida*. Wszystkie oznaczenia wykonywano przy użyciu komercyjnego zestawu ELISA (Dako Elisa PMT kit) firmy Dakopatts A/S. Wstępnie przygotowano ekstrakty bakteryjne poprzez preinkubację zawiesiny wyrosłych kultur w buforze fosforanowym (PBS) z dodatkiem tweenu 20 przez 18 godz. w 37°C. Tak przygotowane ekstrakty nanoszono do studzienek mikropłytki opłaszczonych mysimi przeciwciałami monoklonalnymi skierowanymi przeciwko dermonekrotoksynie *P. multocida*. Po 60-minutowej inkubacji w temp. pokojowej (22°C) płytki przepłukiwano 4-krotnie buforem fosforanowym, a następnie dodawano rozcieńczoną frakcję γ -globulinową antysurowicy krocicznej przeciwko toksynie, sprężoną z peroksydazą. Po kolejnej 60-minutowej inkubacji w temp. pokojowej i płukaniu, do studzienek nanoszono roztwór substratu – O-fenylendodwuaminy i inkubowano około 10 min. w temp. pok., po czym wynik reakcji oceniano wizualnie. Dodatkowo blokowano reakcję enzymatyczną 1,0 M roztworem kwasu siarkowego i dokonywano pomiaru absorbancji w czytniku do mikropłytek typu Multiscan przy długości fali $\lambda = 492$ nm. Skład chemiczny buforów, warunki wykonywania oraz interpretacji wyników reakcji immunoenzymatycznej dostosowano ściśle do wskazań producenta testu ELISA.

Wyniki i omówienie

Uzyskane wyniki ilustruje tab. 1. Jak wynika z zawartych w niej danych toksynogenne szczepy *P. multocida* zidentyfikowano w 91 wymazach z błony śluzowej nosa na 355 badanych, co stanowi średnio 25%. Najwyższy odsetek wyników dodatnich stwierdzono w fermie P (63%), w której zzzn ze zmiennym nasileniem utrzymywało się od wielu lat i aktualnie typowe objawy stwierdzono u około 10% pogłowia. W fermie N, w której dotychczas nie notowano przypadków klinicznej formy

Tab. 1. Wyniki badań wymazów z błony śluzowej nosa świń testem ELISA na obecność toksynotwórczych szczepów *Pasteurella multocida*

Ferma	Liczba próbek badanych	Liczba próbek dodatnich (%)
K	126	48 (38,09)
P	38	24 (63,15)
U	76	19 (25,00)
N	115	0 (0)
Ogółem	355	91 (25,63)

choroby, nie stwierdzono również występowania toksynotwórczych szczepów *P. multocida* w badanych wymazach.

Zakaźne zanikowe zapalenie nosa świń występuje aktualnie we wszystkich krajach świata prowadzących intensywną hodowlę trzody chlewnej (18). Scheidt i wsp. (22) oraz Backstrom i wsp. (3) podają w oparciu o wyniki badań poubojowych, że w USA choroba pojawia się we wszystkich większych stadach świń, przy czym około 70% badanych zwierząt wykazywało zmiany zanikowe małżowin nosowych. Z danych piśmiennictwa i obserwacji własnych wynika, że w Polsce zzzn stanowi także istotny problem w fermach trzody chlewnej, przy czym nasilenie występowania klinicznej postaci choroby jest zróżnicowane i pozostaje w związku z prowadzonymi programami prewencyjnymi (19, 24).

W świetle aktualnych poglądów na etiologię tej choroby, jej infekcyjne podłoże nie budzi wątpliwości, jakkolwiek nie wyklucza się możliwości udziału czynników dodatkowych, takich jak stres czy warunki środowiskowe (9, 11, 18). Zwrócenie uwagi na toksynotwórcze szczepy *P. multocida* typu D oraz powiązanie faktu kolonizacji błony śluzowej górnych dróg oddechowych u świń przez te drobnoustroje z rozwojem progresywnej formy zzzn (6, 14) pozwoliło ostatecznie sprecyzować etiologię choroby. Błona śluzowa jamy nosowej świń stanowi dogodnie miejsce do namnażania się wielu drobnoustrojów chorobotwórczych, w tym *P. multocida* o zaprogramowanej genetycznie zdolności do produkcji dermonekrotoksyny oraz szczepów atoksynogennych. Zróżnicowanie szczepów toksynotwórczych i nietoksynotwórczych *P. multocida* ma kluczowe znaczenie dla prawidłowego rozpoznania oraz zwalczania zzzn (4, 15). Detekcja egzotoksyny *P. multocida* wymaga jednak zastosowania specjalnych metod badawczych i nie jest możliwa w oparciu o rutynowe badanie bakteriologiczne wymazów z błony śluzowej nosa. Wykorzystywane w tym celu metody *in vivo* wymagają pracy na zwierzętach doświadczalnych, są kosztowne i czasochłonne (8, 15). Również wykrywanie efektu cytopatycznego w hodowli komórkowej Vero lub w komórkach płuc zarodków bydłecych pod wpływem badanych ekstraktów bakteryjnych wiąże się z koniecznością posiadania specjalistycznej pracowni, sprzętu i odczynników. Ponadto obie te metody nie nadają się do wykorzystania w badaniach masowych. Dopiero uzyskanie przeciwciał monoklonalnych przeciwko dermonekrotoksynie *P. multocida* oraz opracowanie testu ELISA (10) stworzyło możliwości szybkiej i prostej analizy wielu próbek jednocześnie, co jest szczególnie przydatne w badaniach skryningowych. Prowadzone w wielu ośrodkach badania diagnostyczne wykazały bardzo wysoką czułość i specyficzność tej metody w wykrywaniu toksynotwórczych szczepów *P. multocida* (1, 4, 8, 10, 15, 23). Warto również podkreślić, że w metodzie tej nie jest wymagane sto-

sowanie czystych kultur bakteryjnych, natomiast detekcję dermonekrotoksyny można wykonywać w oparciu o wyjściowe mieszane hodowle bakteryjne izolowane w posiewach z błony śluzowej nosa. Istotną zaletą metody ELISA jest także możliwość wykrywania subklinicznych form zzzn. Fakt występowania takich postaci choroby w fermach świń stanowi poważny problem epizootyczny, gdyż uniemożliwia to wczesne wykrycie osobników zakażonych oraz ich eliminację z hodowli (7).

W badaniach własnych przeprowadzonych w kilku wytypowanych fermach trzody chlewnej na terenie południowo-wschodniej Polski stwierdzono występowanie toksynotwórczych szczepów *P. multocida* średnio w 25% badanych próbek, co świadczy o częstym występowaniu tych zarazków w populacji świń. Stanowi to potwierdzenie danych piśmiennictwa o szerokim rozprzestrzenieniu toksynogennych szczepów *P. multocida* w stadach świń oraz występowaniu tych bakterii tak u zwierząt z typowymi objawami klinicznymi, jak i u sztuk pozornie zdrowych (12, 13, 16). Najwyższe odsetki wyników dodatnich, sięgające powyżej 60% badanych próbek, stwierdzano jednak tylko w tych fermach, w których obserwowano charakterystyczne dla progresywnej formy zzzn deformacje kości trzewioczaszki (16). Zależność tę potwierdzono także w badaniach własnych. Zwalczanie tej choroby jest trudne. Stosowana immunoprofilaktyka i chemioprofilaktyka pozwala jednak na znaczne zredukowanie występowania i nasilenia choroby, zwłaszcza w stadach zakażonych (19).

W podsumowaniu niniejszych badań należy stwierdzić, że toksynotwórcze szczepy *Pasteurella multocida* występowały w ocenianych stadach świń z dużą częstotliwością, zwłaszcza w fermach, w których nie stosowano zwalczania ani swoistej profilaktyki zzzn. Fakt ten uzasadnia celowość przeprowadzenia badań skryningowych na terenie całego kraju, co umożliwiłoby dokładne określenie sytuacji epizootycznej w zakresie występowania potencjalnych ognisk szerzenia się choroby.

Piśmiennictwo

- Alt M., Bechmann G., Schoss P.: Dt. tierärztl. Wschr. 100, 99, 1993.
- Bäckström L.: Agri-Practice 13, 21, 1992.
- Bäckström L., Hoefling D., Morkoc A.: J. Am. vet. med. Ass. 187, 712, 1985.
- Bowersock T. L., Hooper T., Pottenger R.: J. Vet. Diagn. Invest. 4, 419, 1992.
- Chanter N., Rutter J. N.: Pasteurellosis in pigs, w: Pasteurella and Pasteurellosis, red. Adlam C., Rutter J. M., Academic Press, London 1989, s. 162.
- De Jong M. F., Oei H. L., Tetenburg J.: Proc. 6th Congress Intern. Pig Vet. Soc. Copenhagen, Denmark 1980, s. 211.
- De Schaepdryver L.: Br. vet. J. 143, 246, 1987.
- Erler W., Hänel J., Hotzel H., Müller W., Schimmel D.: Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 106, 194, 1993.
- Foged N. T.: Acta path. microbiol. immunol. scand. 100, suppl. 25, 1992.
- Foged N. T., Nielsen J. P., Pedersen K. B.: J. clin. Microbiol. 26, 1419, 1988.
- Frymus T.: Medycyna Wet. 46, 3, 1990.
- Gardner I. A., Eamens G. J., Turner M. J., Hornitzky C. L.: Aust. vet. J. 66, 318, 1989.
- Goodwin R. W., Chanter N., Rutter J. M.: Vet. Rec. 126, 452, 1990.
- Il'Ina Z. M., Zasukhin M. I.: Sb. Nauchn. Rab. Sib. Nauchn. Issled. Vet. Inst. Omsk 25, 76, 1975.
- Kobisch M., Blanchard B., Morvan P., Labbe A., Toquin D., Le Menec M., Morvan H.: Recl Méd. vét. 167, 407, 1991.
- Lariviers S., Leblanc L., Mittal K. R., Martineau G. P.: J. clin. Microbiol. 30, 1398, 1992.
- Magyar T.: Acta vet. hung. 37, 319, 1989.
- Moes J., Dewaele A.: Annl. Méd. vét. 131, 229, 1987.

19. Pejsak Z., Hogg A., Wasińska B., Foreman K.: J. Vet. Med. B 37, 593, 1990.
20. Rutter J. M.: Recl Méd. vét. 163, 439, 1987.
21. Rutter J. M., Luther P. D.: Vet. Rec. 114, 393, 1984.
22. Scheidt A. B., Mayrose V. B., Hill M. A., Clark L. K., Einstein M. E., Frantz S. F., Runnels L. J., Knox K. E.: J. Am. vet. med. Ass. 200, 1492, 1992.
23. Vena M. M., Blanchard B., Thomas D., Kobisch M.: Ann. Rech. vét. 22, 211, 1991.
24. Wołoszyn S., Krauss S., Ziolo T.: Annl. Univ. Mariae Curie-Skłodowska Sect. DD, 20, 243, 1965.

Adres autora: dr Zbigniew Grądzki, ul. Tatarakowa 2/52, 20-541 Lublin

ANTONINA Sopińska, HANNA Lutnicka, LESZEK Guz

Badania nad działaniem lewamisolu po przewlekłej intoksykacji karpia związkami azotowymi

Katedra Chorób Ryb, Wydział Weterynaryjny AR, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

Summary

Studies on the influence of levamisole in carps after the chronic intoxication with nitro-compounds

The influence of poisoning with nitro-compounds on the immunological system of carp has been assessed under natural conditions using water diversion of the Nitrogen Plant at Puławy. The examinations were carried out on 80 carps weighing 250-300 g each which were maintained for six weeks in the water diversion and in which an increased level of nitro-compounds was found. Twenty fishes transported from a healthy environment served as control animals. After the period of poisoning the fish were placed in aquaria with water free from contaminants and remained under the influence of levamisole (5 mg per 1 l of water) in order to stimulate immune mechanisms after nitro-compounds immunosuppression. The reaction of the immunological system was assessed on the following basis: the number of leukocytes and neutrocytes in 1 μ l of blood, metabolic activity of granulocytes, the level of lysozyme in the serum and in the mucus of the carp. It was found that a chronic poisoning of carp caused irreversible changes in their immune system; the fish could not respond to the immunostimulating action of levamisole. The findings give the reasons to believe that fish kept for a longer time in water with an elevated concentration of nitro-compounds may be more susceptible to various disease-causing factors.

Poważnym problemem ekologicznym w dzisiejszych czasach są zanieczyszczenia wód związkami chemicznymi, których źródłem są najczęściej wycieki z oczyszczalni ścieków oraz zakładów przemysłowych. Oddziaływanie substancji chemicznych zanieczyszczających środowisko na organizm ryb jest najczęściej wielokierunkowe (3). Uszkadzają one bezpośrednio lub pośrednio strukturę i funkcje wielu narządów i układów. Badaniem zmian immunologicznych zachodzących pod wpływem związków chemicznych zanieczyszczających środowisko wodne zajmuje się immunotoksykologia ryb.

Nieliczne badania przeprowadzone na karpkach dotyczą wpływu preparatów fosforoorganicznych (6, 8), lindanu (7), związków azotynowych (13) na ich mechanizmy obronne. Większość badań nad wpływem azotanów i azotynów na organizm ludzi i zwierząt zwraca uwagę na wystąpienie pod

wpływem tych związków oksydacji hemoglobiny do met-hemoglobiny (2, 4, 9, 10, 11, 21). Uniemożliwia to transport tlenu do tkanek i przyczynia się do wystąpienia anemii hemolitycznej. Brak jednak danych dotyczących reakcji układu immunologicznego na przewlekłe działanie związków azotowych na organizm karpia.

Niektóre prace zalecają stosowanie preparatów chemicznych, które wykazują działanie stymulujące odporność nieswoistą ryb i przeciwdziałają immunosupresji wywołanej intoksykacją związkami chemicznymi. Takim preparatem okazał się lewamisol stosowany przy intoksykacji związkami fosforoorganicznymi u karpia (18) oraz nitrogranulogen podawany rybom przed krótkotrwałym (24-godzinnym) oddziaływaniem azotynów na ich organizm (13). Dotychczasowe badania nad wpływem związków chemicznych na układ immunologiczny ryb były wykonywane w warunkach eksperymentalnych, natomiast badania własne wykonano w warunkach naturalnych, wykorzystując jako środowisko życia ryb kanał zrzutowy Zakładów Azotowych w Puławach, który wpada do rzeki Wisły i jest miejscem występowania wielu gatunków ryb.

Celem pracy było określenie wpływu długotrwałego oddziaływania (6-tygodniowego) środowiska wodnego o zwiększonym stężeniu związków azotowych na układ immunologiczny ryb oraz na reakcję tego układu po podaniu rybom immunostymulatora – lewamisolu.

Materiał i metody

Badania wykonano u karpia K1, o masie 250-300 g, przywiezionych ze środowiska nie zanieczyszczonego (gospodarstwo rybackie w Zagrodzie), które umieszczono w sadzach w kanale zrzutowym Zakładów Azotowych w Puławach.

W oparciu o analizę chemiczną wody obejmującą: azot amonowy, azot azotanowy, azot azotynowy, azot ogólny, odczyn wody, wybrano dwa stanowiska (1 i 2) różniące się poziomem zanieczyszczeń związkami azotowymi, odległe od siebie o około 1 km. W każdym sadzu, każdego stanowiska, umieszczono po 40 sztuk karpia. Ryby przetrzymywano w kanale zrzutowym przez okres 6 tygodni. Po tym okresie karpie przeniesiono do akwariów 100 l. z wodą nie zawierającą zanieczyszczeń chemicznych. Każdą z grup podzielono na dwie podgrupy, uzyskując w ten sposób następujące grupy doświadczalne: grupę I i II – obejmującą ryby pochodzące ze stanowiska 1, grupę