

ALINA WIELICZKO

# Rola *Campylobacter* w patologii ptaków.

## II. Badania nad określeniem obecności czynników wirulentnych u szczepów *Campylobacter jejuni*\*

Katedra Epizootologii i Klinika Chorób Zakaźnych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, Pl. Grunwaldzki 45, 50-366 Wrocław

### Summary

The role of *Campylobacter sp.* in the pathology of poultry.  
II. Studies on the determination of virulent factors in *Campylobacter jejuni*

The present study was carried out to determine the presence of virulent factors in *C. jejuni* isolated from the alimentary tracts and livers of layer and broiler chickens. A tissue culture assay *in vivo* and invasiveness test *in vitro* on chicken embryos to detect the presence of the virulent factors mentioned above.

It was found that the polymyxin extract of *C. jejuni* exhibited cytotoxic effects which were most clear in chicken kidney cells (94% of *C. jejuni*: the titer ranged from 4 log 2 to 12 log 2). Chicken embryo fibroblasts were less sensitive to *Campylobacter* filtrates (84% of *C. jejuni*: the titer ranged from 1 log 2 to 9 log 2). The lowest sensitivity was found in Vero cells.

The invasive factor was determined in *C. jejuni* after the inoculation of 11-day-old chicken embryos onto the chorioallantoic membrane and into the allantoic cavity. There was a correlation between mortality of embryos and reisolation *C. jejuni* from their livers. However, this relationship was not observed after the inoculation of the embryos into the allantoic cavity.

*Campylobacter jejuni* i *C. coli* są często źródłem ostrych zatruc pokarmowych u ludzi (7, 8, 9, 13, 18, 22, 36, 37). Rezerwuarem *C. jejuni/coli* jest przede wszystkim drób oraz zwierzęta gospodarskie i dzikie (1, 3, 4, 10, 14, 17, 34, 40, 42), a transmisja zarazka odbywa się poprzez mięso i jego przetwory, wodę oraz mleko (6, 9, 17, 23, 39, 41). U ludzi kamylobakterioza przebiega najczęściej w postaci ostrego zapalenia żołądka i jelit z wodnistą, często krwawą biegunką (5, 8, 11, 35). Wymienione objawy kliniczne sugerują obecność czynników patogennych, które w przypadku szczepów *Campylobacter* nie są w pełni poznane, a ich mechanizm działania nie do końca wyjaśniony. Wśród czynników warunkujących patogenność termofilnych szczepów *Campylobacter* wymienia się często:

- obecność czynnika inwazyjnego warunkującego zdolność przenikania do komórek nabłonka jelit, krwi, wątroby i innych narządów wewnętrznych (8, 11, 12, 16, 25, 32),
- obecność czynnika adhezyjnego, warunkującego przyleganie bakterii do komórek nabłonka jelit w czasie kolonizacji (26, 32, 38),
- zdolność produkowania toksyn, w tym enterotoksyny i/lub cytotoksyny (19, 24, 30, 32, 33, 39, 44).

Celem niniejszej pracy była ocena patogenności szczepów *Campylobacter jejuni* wyizolowanych od ptaków.

### Materiał i metody

Materiał do badań stanowiły szczepy *C. jejuni* wyizolowane z narządów wewnętrznych klinicznie zdrowych kur niosek oraz kurcząt brojlerów. Spośród ocenianych ogółem 50 szczepów, 6 wyizolowano z wątroby (w tym 1 szczep ze stada kur niosek po leczeniu kamylobakteriozy), a pozostałe z treści przewodu pokarmowego.

Szczepy od momentu wyizolowania od ptaków pasażowane były nie więcej jak 3-4 razy i przetrzymywane w temperaturze  $-70^{\circ}\text{C}$ . Przed użyciem do badań inkubowano je przez 48 godzin w temp.  $42^{\circ}\text{C}$  w warunkach mikroaerofilnych na agarze z krwią, bez dodatku antybiotyków (Blood Agar Base No 2 firmy Difco).

Do wykrycia obecności czynników patogennych u badanych szczepów *C. jejuni* wykonano w warunkach *in vitro* test cytotoksyczności względem hodowli komórkowych oraz w warunkach *in vivo* – test inwazyjności na zarodkach kurzych.

Test cytotoksyczny wykonano używając ekstraktów polimiksynowych 50 szczepów *Campylobacter*, jednowarstwowych hodowli komórkowych komórek nerki ptaka i fibroblastów zarodka kurzego oraz hodowli linii ciągłych komórek nerki małpy typu Vero.

Hodowle fibroblastów kurzych oraz komórek nerki ptaka przygotowano we własnym zakresie używając 11 dniowych zarodków kurzych oraz 3-4 tyg. kurcząt. Linie ciągłe komórek Vero zakupiono w Wytwórni Surowic i Szczepionek. Hodowle komórkowe prowadzono na płytkach mikro firmy Nunc, według ogólnie przyjętych zasad. Gęstość użytych do testów hodowli ustalono na  $2,0 \times 10^6$  komórek/ml podłoża.

Z kolei toksyny bakteryjne szczepów *C. jejuni* przygotowano w opisany poniżej sposób. Każdy badany szczep posiewano na 10 płytek agaru z dodatkiem odwiłkniętej krwi baraniej, inkubowano przez 48 godzin w temp.  $42^{\circ}\text{C}$ . Po tym czasie wyrosłe kolonie zmywano sterylnym roztworem NaCl oraz dodawano Polimiksynę B w ilości 2 mg/ml splotczyny (Polimiksyn B sulphate, Sigma). Następnie zawiesinę w objętości 10 ml inkubowano przez 20 min. w temp.  $37^{\circ}\text{C}$  i wirowano przez 25 minut przy 3000 g a supernatant filtrowano używając sterylne filtry Millipore o średnicy 0,22  $\mu\text{m}$ . Tak przygotowany ekstrakt polimiksynowy szczepów *Campylobacter* używano do testu cytotoksycznego, który wykonywano na płytkach mikro firmy Nunc, używając rozcieńczenia toksyn od 1:2 do 1:4028 oraz świeżo przygotowanych hodowli komórkowych w koncentracji  $2,0 \times 10^6$  komórek/ml. Kontrolę stanowiły odpowiednie hodowle komórkowe z dodatkiem 2 mg/ml Polimiksyny B.

Płytki inkubowano przez 72 godziny w atmosferze stałego przepływu 10%  $\text{CO}_2$ , przy czym w odstępach 24 godzinnych kontrolowano w odwróconym mikroskopie świetlnym wzrost i morfologię komórek. Efekt cytopatycznego działania ekstraktu bakteryjnego na hodowle komórkowe oceniano po 48 i 72 godzinach w mikroskopie obliczając miano cytotoksyn, tj. najwyższe rozcieńczenie ekstraktu, które powodowało uszkodzenie komórek hodowli w 50 i więcej %. Zmiany te polegały na obecności form kulistych komórek oraz ich destrukcji. Następnie, po ocenie mikroskopowej wykonywano test kolorymetryczny wg metody podanej przez Yadav i wsp. (43), wykorzystując

\*) Praca wykonana w ramach problemu 9/9-W/92/G

sól bromową tetrazolium (MTT, Sigma, No 2128). Natężenie niebieskiego zabarwienia uzyskanego w wyniku reakcji pomiędzy żywymi, nieuszkodzonymi komórkami hodowli a solą tetrazolium określano w czytniku Elisa przy długości fali 570 nm dla reakcji barwnej oraz 630 nm dla tła. Następnie obliczano log 2 miana odpowiadającego 50% uszkodzonych komórek.

Dla oznaczenia właściwości inwazyjnych wybranych losowo 16 szczepów *C. jejuni* użyto 11 dniowych zarodków kurzych (SPF, firma Lohmann), które zakażano na błonę kosmówkowo-omocznioową oraz do jamy omocznioowej – płynną, żywą hodowlą *C. jejuni*, w ilości 0,2 ml, używając rozcieńczenia od  $10^{-3}$  do  $10^{-6}$ . Kontrolna grupa otrzymała 0,2 ml podłoża do hodowli *Campylobacter* rozcieńczonego sterylnym NaCl. Na każde rozcieńczenie użyto po 6 zarodków.

Po zakażeniu zarodki prześwietlano 2 razy dziennie, notowano śmiertelność oraz wykonywano badania bakteriologiczne celem reizolacji *Campylobacter* z wątroby zarodków. Zamarte zarodki kontrolowano również bakteriologicznie na obecność innych poza *Campylobacter* czynników patogennych.

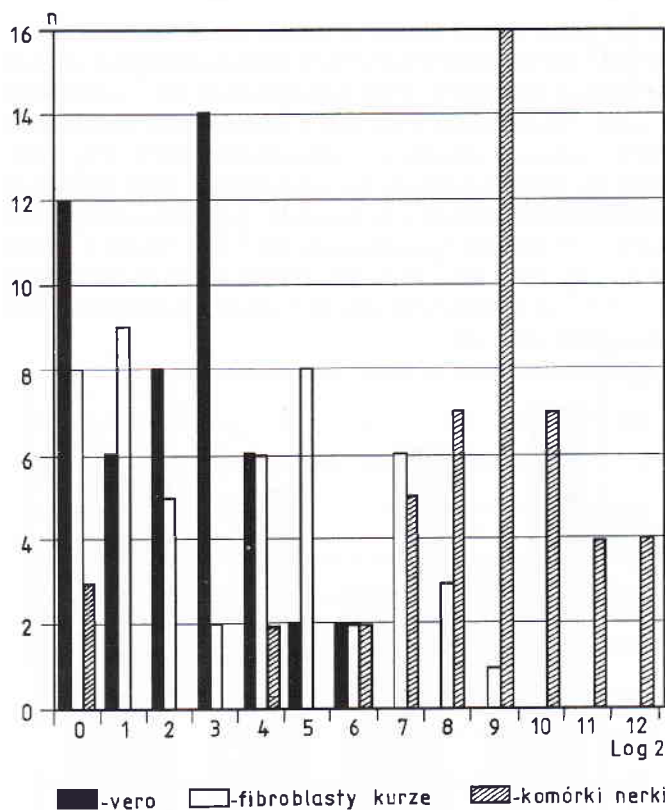
### Wyniki i omówienie

Na podstawie uzyskanych wyników badań stwierdzono, że użyte w teście toksyczności ekstrakty polimiksynowe wyizolowanych od drobiu szczepów *C. jejuni* wykazywały działanie cytotoksyczne. Wyrażało się to zmianami morfologicznymi w postaci komórek zdeformowanych oraz obecnością form kulistych.

Efekt działania cytotoksycznego najbardziej widoczny był w odniesieniu do komórek nerki ptaka. Spośród 50 badanych szczepów aż 47 (94%) wykazywało działanie cytotoksyczne, w tym wszystkie izolaty z wątrób (tab. 1).

Nieco mniej wrażliwe na działanie filtratów *Campylobacter* okazały się fibroblasty kurze – 84% wszystkich badanych szczepów, w tym również wszystkie izolaty z wątrób. Natomiast najmniejsza liczba filtratów *Campylobacter* wywoływała zmiany morfologiczne w komórkach Vero – 76% badanych szczepów, w tym 66,7% izolatów pochodzących z wątrób.

Stwierdzane miano cytotoksyczne dla szczepów patogennych było zróżnicowane w odniesieniu do użytych hodowli komórkowych. Dla najbardziej wrażliwych komórek nerki log 2



Ryc. 1. Działanie cytotoksyczne szczepów *C. jejuni* w odniesieniu do hodowli komórkowych

miano wynosił od 4 log 2 do 12 log 2, dla fibroblastów kurzych 1 log 2 do 9 log 2, a dla komórek Vero 1 log 2 do 6 log 2 (ryc. 1).

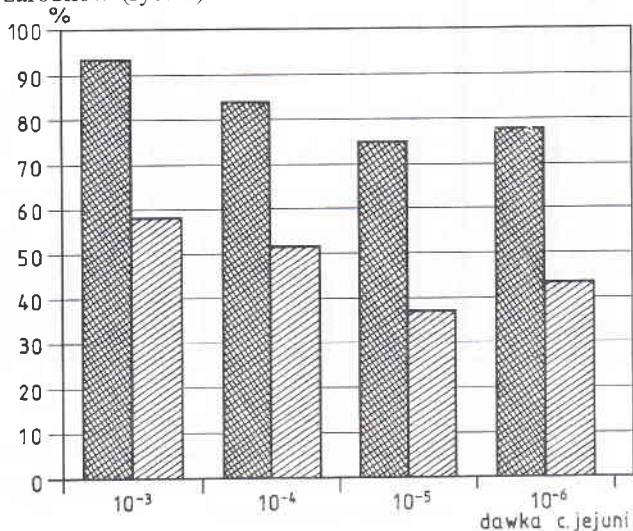
Wyniki określające właściwości inwazyjne filtratów *C. jejuni* w odniesieniu do zarodków kurzych przedstawiono na ryc. 2, 3 i 4.

Reizolację *Campylobacter* w 7 dniu po zakażeniu uzyskiwano częściej z zarodków zakażanych do jamy omocznioowej

Tab. 1. Efekt działania cytotoksycznego *Campylobacter jejuni* na hodowle komórkowe

Hodowle komórkowe	Miano ekstraktu polimiksynowego <i>Campylobacter</i> (t)	Liczba (%) szczepów <i>Campylobacter jejuni</i> o działaniu cytotoksycznym wyizolowane z:		Razem
		przewodu pokarmowego	wątroby	
Komórki nerki	$t \geq 10^3$	13 (29,6)	2 (33,3)	15 (30,0)
	$t \geq 10^2$	25 (56,8)	3 (50,0)	28 (56,0)
	$t \geq 10$	3 (6,8)	1 (16,7)	4 (8,0)
	$t \geq 1$	0	0	0
	$t = 0$	3 (6,8)	0	3 (6,0)
Fibroblasty kurze	$t \geq 10^3$	0	0	0
	$t \geq 10^2$	7 (15,9)	3 (50,0)	10 (20,0)
	$t \geq 10$	14 (31,8)	2 (33,3)	16 (32,0)
	$t \geq 1$	15 (34,1)	1 (16,7)	16 (32,0)
	$t = 0$	8 (18,2)	0	8 (16,0)
Komórki Vero	$t \geq 10^3$	0	0	0
	$t \geq 10^2$	0	0	0
	$t \geq 10$	7 (15,9)	3 (50,0)	10 (20,0)
	$t \geq 1$	27 (61,4)	1 (16,7)	28 (56,0)
	$t = 0$	10 (22,7)	2 (33,3)	12 (24,0)

niż na błonę kosmówkowo-omocznioową, przy czym obserwowano zależność pomiędzy użytą dawką zakażającą a ilością uzyskanych reizolatów. Przy rozcieńczeniu  $10^{-3}$  i zakażeniu do jamy omoczniowej reizolację *Campylobacter* uzyskano w 93,8% badanych zarodków i odpowiednio 58,1% przy zakażeniu na błonę kosmówkowo-omocznioową. Przy kolejnych rozcieńczeniach wyniki te były niższe i wynosiły odpowiednio 84,4% i 51,6% dla rozcieńczenia  $10^{-4}$  oraz 75,0% i 37,5% dla rozcieńczenia  $10^{-5}$ . Przy tym różnice w dawce zakażającej  $10^{-3}$  i  $10^{-4}$  nie wpłynęły istotnie na % reizolacji *Campylobacter* z zarodków (ryc. 2).

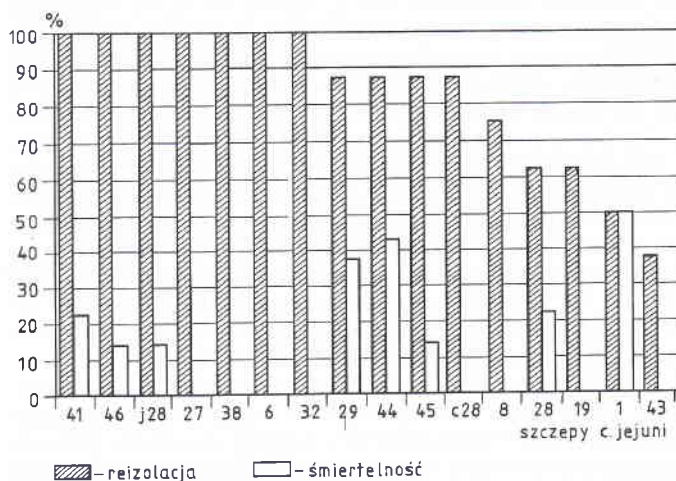


Ryc. 2. Reizolacja *Campylobacter jejuni* z zarodków w 7 dni po zakażeniu

Po zakażeniu zarodków do jamy omoczniowej nie można było ustalić bezpośredniej zależności pomiędzy śmiertelnością zarodków a reizolacją *Campylobacter*. Nawet przy 100% reizolacji *Campylobacter* nie stwierdzono śmiertelności zarodków, bądź też była ona relatywnie niska i wahała się od 12,5% do 22,0%. Z drugiej zaś strony, w przypadku innych szczepów notowano wyższą śmiertelność zarodków przy niższym wskaźniku reizolacji zarazka z wątrób. Istotnym jest również fakt wysokiej reizolacji zarazka oraz śmiertelności zarodków (50,0%) w przypadku użycia do zakażeń szczepu *C. jejuni* wyizolowanego pierwotnie ze stada kur niosek, w którym wcześniej leczono kliniczną postać kamylobakteriozy (ryc. 3).

Po zakażeniu zarodków na błonę kosmówkowo-omocznioową obserwowano większą zależność pomiędzy śmiertelnością zarodków a reizolacją *Campylobacter* z ich wątrób (ryc. 4). Wiele szczepów *Campylobacter* (68,7%) powodowało zamieranie zarodków przy jednoczesnej reizolacji zarazka z wątrób. W grupie tej znalazło się 5 na 6 badanych szczepów pierwotnie wyizolowanych z wątroby ptaków. Natomiast 3 spośród badanych szczepów *C. jejuni* (18,7%) nie powodowało zamarcia zarodków w czasie obserwacji oraz nie izolowano ich z wątrób w 7 dni po zakażeniu na błonę kosmówkowo-omocznioową.

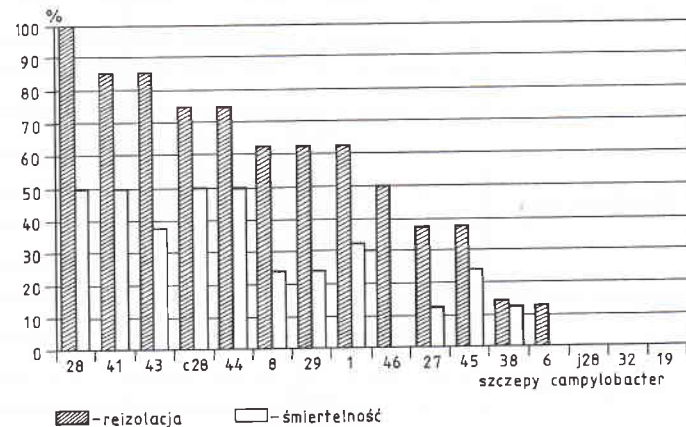
*Campylobacter jejuni* jak i *C. coli* mogą produkować cytotoksynę, nie stwierdzono przy tym zależności między tworzeniem toksyn a gatunkiem *Campylobacter* (20, 39, 43). Przeprowadzone przez Newell i wsp. (32) badania w warunkach *in vitro* wykazały, że izolaty *Campylobacter* pochodzące od pacjentów z kamylobakteriozą cechowała wyższa inwazyjność oraz efekt



Ryc. 3. Reizolacja *C. jejuni* oraz śmiertelność zarodków po zakażeniu do jamy omoczniowej

cytotoksycznego działania w odniesieniu do komórek HeLa, w porównaniu z izolatami ze środowiska – wody pitnej. Autorzy podkreślają jednak, że obecność w środowisku szczepów o niskiej patogenności może tłumaczyć wysoki stopień bezobjawowego nosicielstwa *Campylobacter* u zwierząt domowych i dzikich. Z kolei spożycie nieprzepracowanej, zanieczyszczonej tymi drobnoustrojami wody (kałem zwierząt), może być przyczyną zatruc pokarmowych u ludzi (6). Taylor i wsp. (38) stwierdzili, że szczepy *Campylobacter* wyizolowane od ludzi i zwierząt z klinicznymi objawami choroby lepiej przylegają w warunkach *in vitro* do hodowli komórek, aniżeli wyizolowane ze źródeł asymptomatycznych.

Podobne wyniki uzyskali Akhtar i wsp. (2). Cytotoksycznie na komórki HeLa działało tylko 7% bezobjawowych ludzkich izolatów *C. jejuni*, 33% szczepów wyizolowanych od klinicznie zdrowych ptaków i ssaków oraz 84% izolatów pochodzących z klinicznych przypadków kamylobakteriozy u ludzi. Natomiast na obecność czynnika cytotoksycznego i cytotonicznego u szczepów *C. jejuni* i *C. coli* wyizolowanych z innych niż od ludzi źródeł wskazuje Johnson i Lior (19). W innych badaniach Johnson i Lior (21) wykazali u szczepów *Campylobacter* obecność nowego czynnika toksycznego, określanego przez autorów jako „cytolethal distending toxin-CLDT”. Toksyna ta wywoływała postępujące zmiany destrukcyjne w morfologii komórek Vero, CHO, HeLa i HEP-2.



Ryc. 4. Reizolacja *C. jejuni* oraz śmiertelność po zakażeniu na błonę kosmówkowo-omocznioową

Podobnie niższą, jak w badaniach własnych wrażliwość komórek Vero na działanie filtratów *C. jejuni* wyizolowanych od drobiu wykazał Yadav i wsp. (43). Uzyskane przez autorów miano cytotoksycznego działania wynosiło dla komórek Vero od 3,4 log 2 do 4,9 log 2 zaś dla komórek WEHI od 6,1 log 2 do 7,1 log 2. Podobne wyniki wykazali McFarland i Neill (31). Z kolei Guerrant (16) nie wykazał cytotoksycznego działania ekstraktu polimyksynowego *C. jejuni* na komórki Vero, podczas gdy komórki CHO i HeLa były w pełni wrażliwe.

W badaniach własnych nie stwierdzono oddziaływania cytotonicznego szczepów *Campylobacter* w odniesieniu do użytych hodowli komórkowych. Działania cytotonicznego enterotoksyny szczepów *Campylobacter jejuni*, manifestującego się obecnością w hodowli komórek silnie wydłużonych nie potwierdzili również Yeen i wsp. (44) oraz Manninen i wsp. (29). Natomiast Lindblom (27) podaje o enterotoksynie *Campylobacter* działającej cytotonicznie na komórki CHO.

Wydaje się, że istnieje co najmniej kilka przyczyn, które warunkują zróżnicowane wyniki badań nad obecnością czynników cytotoksycznych u szczepów *Campylobacter*. Zdolność produkcji toksyn przez szczepy *Campylobacter* może być zahwiana (lub obniżona) poprzez użycie zróżnicowanych podłoży i warunków do hodowli *Campylobacter* (2, 15, 27). Również pasaż *Campylobacter* na podłożach syntetycznych obniża te zdolności (19, 21). Z kolei dodatek Polimyksyny B, w ilości 2 mg/ml wzmacnia uwalnianie cytotoxyn z komórek *Campylobacter* (2, 16, 31), chociaż niektórzy autorzy (21) uważają, że nie ma ona wpływu, bądź też w większych dawkach działa toksycznie w odniesieniu do hodowli komórek. W badaniach własnych nie zanotowano ujemnego wpływu 2 mg/ml Polimyksyny B na użyte hodowle komórkowe. Podobne wyniki uzyskali również Akhtar i Huq (2).

Pierwszymi, którzy wykorzystali zarodki kurze, jako model w warunkach *in vitro* dla oceny zdolności inwazyjnych szczepów *Campylobacter jejuni* byli Davison i Salomon (cyt. 12).

Badania własne nad obecnością czynnika inwazyjnego u szczepów *Campylobacter jejuni* izolowanych od ptaków wykazały, że po zakażeniu 11 dniowych zarodków kurzych na błonę kosmówkowo-omocznioową istnieje korelacja pomiędzy śmiertelnością zarodków a stopniem reizolacji zarazka, co może świadczyć o obecności u tych ostatnich czynnika inwazyjnego. Również Field i wsp. (12) u szczepów *Campylobacter jejuni* i *C. coli* wyizolowanych od ludzi wykazali obecność czynnika inwazyjnego po zakażeniu zarodków na błonę kosmówkowo-omocznioową, przy czym określone miano LD<sub>50</sub> było zróżnicowane i wynosiło dla szczepów *C. jejuni* uznanych za najbardziej patogenne  $2,2 \times 10^2$  zaś dla *C. coli*  $1,9 \times 10^6$ . Z kolei dla szczepów o niskiej patogenności odpowiednio  $3,3 \times 10^8$  i  $6,4 \times 10^6$ . Generalnie szczepy *Campylobacter* powodowały zamieranie zarodków po 72-96 godzinach, a stopień reizolacji *Campylobacter* z wątroby zarodków był odwrotnie proporcjonalna do LD<sub>50</sub>.

Badania Fielda i wsp. (12) dowiodły, że zakażenie dożylnie zarodków wysokimi dawkami ( $10^6$ - $10^7$ ) żywych, a także zabitych hodowli *Campylobacter* powodowało również zamieranie zarodków. Podobne wyniki uzyskał Mahajan i wsp. (28). Określone przez autorów miano LD<sub>50</sub> dla szczepu *C. jejuni* wyizolowanego od chorego pacjenta świadczyło o dużej wirulencji w odniesieniu do zarodków kurzych. Zakażone zarodki zamierały po 3-6 dniach, a określone miano LD<sub>50</sub> wynosiło  $8,0 \times 10^3$  po zakażeniu na CAM oraz  $9,5 \times 10^4$  po zakażeniu do jamy omoczniowej. Cytowani autorzy wykazali

również, że bezbakteryjne filtry *C. jejuni* podane dożylnie zarodkom kurzym powodowały podobne zmiany patologiczne w zarodkach jak po zakażeniu żywym szczepem, a toksyczne działanie tego filtratu zostało wyeliminowane po ogrzaniu do temp. 60°C. Również Ruiz-Palacios (35) oraz Klippstein i Engert (24) opisali inaktywację termo-labilnej toksyny przez ogrzewanie.

Podobne wyniki uzyskano również w badaniach własnych określając miano LD<sub>50</sub> dla 10 wybranych szczepów *Campylobacter* na 5 dniowych zarodkach kurzych, zakażanych dożylnie żywą i zabitym kulturą *Campylobacter*. Miano LD<sub>50</sub> po zakażeniu żywymi kulturami wynosiło od  $10^2$  do  $10^3$  dla 30% badanych szczepów oraz od  $10^{3,5}$  do  $10^{5,5}$  dla pozostałych 70%. Natomiast przy użyciu zabitych kultur odpowiednio  $10^5$  do  $10^7$  dla 80% szczepów oraz powyżej  $10^7$  dla 20% szczepów *C. jejuni* (dane nie publikowane). Clark i wsp. (11) podają, że dla wykazania cech wirulentnych *Campylobacter* nie jest konieczne życie żywych kultur bakteryjnych. Autorzy stwierdzili zróżnicowaną patogenność badanych szczepów po zakażeniu dożylnym 5 dniowych zarodków kurzych żywymi lub zabitymi kulturami tych bakterii. Oznaczone miano LD<sub>50</sub> wynosiło od  $10^6$  do  $10^{-2}$  dla żywych kultur i odpowiednio od  $10^6$  do  $1,9 \times 10^0$  dla drobnoustrojów inaktywowanych.

Prezentowane badania wskazują, że inwazyjność szczepów *Campylobacter* jest ściśle powiązana ze śmiertelnością zarodków, natomiast nie jest ona jedynym wskaźnikiem wirulencji, ponieważ za zamieranie zarodków odpowiedzialne mogą być zarówno endotoksyna jak i/lub inne toksyczne komponenty ściany komórki bakteryjnej.

W świetle badań własnych, jak też innych autorów można stwierdzić, że u szczepów *Campylobacter* zakres wirulencji uzależniony jest zarówno od czynników toksycznych, jak też inwazyjności bakterii. Nie można także wykluczyć w patogenie kamylobakteriozy udziału innych patogennych czynników.

#### Piśmiennictwo

- Aho M., Hirn J.: Acta vet. scand. 29, 451, 1988.
- Akhtar S. Q., Huq F.: J. trop. Med. Hyg. 92, 80, 1989.
- Altmeyer M., Krabisch P., Dorn P.: Dtsch. tierärztl. Wschr. 92, 456, 1985.
- Blaser M. J., La Force F. M., Wilson N. A., Wang W. L. L.: J. infect. Dis. 141, 665, 1980.
- Blaser M. J., Reller R. B.: New Engl. J. Med. 305, 1444, 1981.
- Blaser M. J., Taylor D. N., Feldman N. A.: Epidem. Rev. 5, 157, 1983a.
- Blaser M. J., Duncan D. J., Ostermalm M. T., Istre G. R., Wang W. L.: J. infect. Dis. 147, 820, 1983b.
- Butzler J. P., Skirrow M. B.: Clin. Gastroenterol. 8, 737, 1979.
- Butzler J. P., Oosterom J.: Int. J. Fd Microbiol. 12, 1, 1991.
- Chowdhury S., Nair G. B., Pal S. C.: Indian J. med. Res. 79, 171, 1984.
- Clark A. G., Bueschgens D. A.: Epidem. Inf. 103, 577, 1989.
- Field L. H., Headley V. L., Underwood J. L., Payne S. M., Berry L. J.: Infect. Immunity, 54, 118, 1986.
- Giessen A., Mazurier S. I., Jacobs-Reitsma W., Jansen W., Berkers P., Reitsema W., Wernars K.: Appl. Environ. Microbiol. 58, 1913, 1992.
- Glünder G., Petermann S.: J. Med. Vet. B 36, 123, 1989.
- Goossens H., Rummens E., Cadranel S., Butzler J-P., Takeda Y.: Lancet, II 511, 1985.
- Guerrant R. L., Wanke C. A., Pennie R. A., Barrett L. J., Lima A. A. M., O'Brien A. D.: Infect. Immunity, 55, 2526, 1987.
- Harris N. V., Weiss N. S., Nolan C. M.: Am. J. pub. Hlth. 76, 407, 1986.
- Humprey T. J.: Br. Fd J. 94, 21, 1992.
- Johnson W. M., Lior H.: Lancet, ü, 229, 1984.
- Johnson W. M., Lior H.: J. Clin. Microbiol. 24, 275, 1986.
- Johnson W. M., Lior H.: Microbial Pathogenesis 4, 115, 1988.
- Johnston A. M.: Lancet British edition 336, 856, 1990.
- Kazwala R. R., Collins J. D., Hannan J., Crinion R. A. P., Mahony H. O.: Vet. Rec. 126, 305, 1990.

24. Klipstein F. A., Engert R. F.: Infect. Immun. 45, 314, 1984.
25. Klipstein F. A., Engert R. F., Short H., Schenk A.: Infect. Immun. 50, 43, 1985.
26. Lee A., O'Rourke J. L., Barrington P. J., Trust T. J.: Infect. Immun. 38, 536, 1986.
27. Lindblom G-B., Kaijser B., Sjorgen E.: J. Clin. Microbiol. 27, 1272, 1989.
28. Mahajan S., Rodgers F. G.: J. Clin. Microbiol. 27, 1377, 1989.
29. Manninen K. I., Prescott J. F., Dohoo I. R.: Infect. Immun. 38, 46, 1982.
30. McCardell B. A., Madden J. M., Lee E. C.: J. Food Prot. 47, 943, 1984.
31. McFarland B. A., Neill S. D.: Vet. Microbiol. 30, 257, 1992.
32. Newell D. G., McBride H., Saunders F., Dehele Y., Pearson A. D.: J. Hyg. Camb. 94, 45, 1985.
33. Prasad K. N., Narang P., Dhone P. M.: Indian vet. med. J. 14, 221, 1990.
34. Rosef O., Kapperud G.: Appl. Environ. Microbiol. 45, 381, 1993.
35. Ruiz-Palacios G. M., Torres J., Torres N. I., Escamilla B., Tamayo J.: Lancet ü, 250, 1983.
36. Sjorgen E., Ruiz-Palacios G., Kaijser B.: Epidem. Inf. 102, 47, 1989.
37. Skirrow M. B.: Epidem. Inf. 99, 647, 1987.
38. Taylor D. E., Bryner.: Am. J. Vet. Res. 45, 2201, 1984.
39. Walker R. I., Caldwell M. B., Lee E. C., Guerry P., Trust T. J., Ruiz-Palacios G. M.: Microbiol. Rev. 50, 81, 1986.
40. Wieliczko A., Pawiak R., Mazurkiewicz M.: Internationale Fachtagung über Geflügelkrankheiten, Budapest, 1991, s. 26.
41. Wieliczko A.: Berl. Münch, tierärztl. Wschr. 107, 115, 1994.
42. Wieliczko A.: Medycyna Wet. (w druku).
43. Yadav M., Noorlia J., Ansary A.: Trop. Biomedicine 7, 175, 1990.
44. Yeen W. P., Puthuchearry S. D., Pang T.: J. Clin. Pathol. 36, 1237, 1983.

Adres autora: dr Alina Wieliczko, ul. Handelsmana 6, 51-605 Wrocław

JERZY MOTZ, BOLESŁAW RUBAJ\*\*, LEON SABA\*, JERZY SŁAWOŃ,  
HANNA BIS-WENCEL\*, ZBIGNIEW NOZDRYN-PŁOTNICKI\*\*

## Badania anatomo- i histopatologiczne w zespole płucno-sercowym lisów pospolitych\*)

Stacja Badawcza Zwierząt Futerkowych Instytutu Zootechniki, ul. Kołobrzeska 54, 05-510 Konstancin-Jeziorna

\* Pracownia Biologii Rozrodu Katedry Higieny Zwierząt i Środowiska Wydziału Zootechnicznego AR, ul. Akademicka 13, 20-934 Lublin

\*\* Katedra Anatomii Patologicznej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, ul. Głęboka 30, 20-612 Lublin

### Summary

**The anatomic and histopathological examination in the chronic cor pulmonale syndrome of foxes (*Vulpes vulpes*)**

**Anatomic and histopathological examinations were carried out on 24 foxes 2 to 4-month old that died with symptoms typical of the chronic cor pulmonale syndrome. Some posthumous changes were determined in the chronic cor pulmonale syndrome characteristic of circulation insufficiency, myocardial hypertrophy, ventricle dilator. Massive adipose degeneration of the liver and parenchymatous of the kidney, including necrosis were determined. No changes in the lymphatic system were reported, that could imply a possibility of a bacterial or viral infection.**

Zespół płucno-sercowy lisów zwany przez niektórych kardiomiopatią zastoinową (1), bądź zastoinową niewydolnością serca (4) jest jednostką chorobową dotyczącą głównie młodych lisów srebrzystych w wieku od 2 do 6-ciu miesięcy życia. Istnieją dane o pojedynczych przypadkach jej występowania u lisów innych odmian. Szeroki opis choroby podali w latach osiemdziesiątych autorzy kanadyjscy – Onderka (4) oraz Ferns i Clark (1). Z autorów polskich problemem tym zajmowali się Kopczewski i wsp. (2) oraz Maciołek (3). Dotychczasowe badania nie pozwoliły na określenie etiologii i patogenezę tej choroby. Istnieje wiele hipotez postawionych głównie przez Onderkę (4) oraz Fernsa i Clarka (1). Nie były one jednak przedmiotem odpowiednio metodycznie dostosowanych badań. Jedną z hipotez dotyczy niedoboru tauryny (1), druga zaś mówi, że przyczyna leży być może w błędach żywienia (4). Wszyscy zajmujący się tym problemem są jak dotychczas zgodni, że choroba nie ma charakteru zakaźnego.

W Polsce choroba występuje ze zmiennym nasileniem w poszczególnych latach, a straty z tym związane oceniane są w zależności od roku i fermy na 10 do 40% pogłowia młodych lisów.

Celem badań było określenie zmian anatomo- i histopatologicznych powstałych w wyniku zespołu płucno-sercowego u lisów pospolitych.

### Materiał i metody

Badaniu poddano 24 lisy srebrzyste w tym 22 martwe i 2 w stanie agonialnym. Zwierzęta były w wieku od 3 do 4 miesięcy i pochodziły z ferm środkowo-wschodniej Polski. Padłe zwierzęta utrzymywane były w systemie klatkowym i żywione tradycyjnie, tj. ciastową karmą z udziałem pasz mięsnych i roślinnych. Żywnienie odpowiadało normom opracowanym przez Sławonia (6).

Dane wywiadu oraz objawy kliniczne stwierdzone przed śmiercią lisów wskazywały, że zachorowania miały charakter niewydolności układu płucno-sercowego i pojawiały się masowo, samoistnie u zwierząt w wieku 2 do 4 miesięcy, bez uprzednich objawów zwiastunowych wskazujących na określony czynnik etiologiczny. Choroba miała najczęściej przebieg ostry, rzadziej podostry i wygasła po osiągnięciu przez zwierzęta dojrzałości somatycznej. Podejmowane próby leczenia w zasadzie nie dawały pozytywnych rezultatów.

Lisy poddano badaniu sekcijnemu. Wycinki do badań histopatologicznych pobrano z narządów wewnętrznych takich jak: serce, płuca, grasica, węzły chłonne śródpiersiowe, śledziona, wątroba i nerki. Z materiału utrwalonego w 10% obojętnym roztworze formolu sporządzono preparaty histologiczne metodą parafinową i mrożeniową. Preparaty zostały wybarwione metodą rutynową z użyciem hematoksyliny i eozyny, a w przypadku wątroby dodatkowo skrawki wykonane metodą mrożeniową zabarwiono barwnikiem sudanowym wg metody Daddi'ego na obecność tłuszczów obojętnych.

\*) Praca finansowana przez KBN nr projektu 5S 31000 607