

MIECZYŚLAW RADKOWSKI

Przenikanie pałeczek *Salmonella* przez skorupę do wnętrza jaj

Katedra Higieny Produktów Zwierzęcych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej ART, 10-957 Olsztyn

Summary

Penetration of *Salmonella* spp. through the egg-shell into the egg

The examinations were carried out on 1800 eggs. On each egg-shell a drop of solution containing 1000 – 10 000 CFU of *Salmonella enteritidis* was placed. Two strains, i.e. *Salmonella enteritidis* No 87 and No 885, were used for the examinations. After their infection the eggs were stored at 2°, 20° and 30°C for 0, 7, 14, 28 and 56 days. In none of the 1800 eggs infected experimentally was any penetration of *Salmonella* through the egg-shell observed.

Skorupa jajowa może zostać zakażona salmonelami od wewnątrz oraz z zewnątrz. Powszechnie przyjmuje się, że jajnik i jajowód uważane są za jałowe i dlatego zawartość jaja oraz skorupa jajowa także są wolne od tych drobnoustrojów. W niektórych przypadkach jajnik i jajowód mogą być zakażone pałeczkami *Salmonella*, które dostają się do wnętrza jaja przed jego całkowitym wykształceniem i oskorupieniem (18, 25, 26, 31, 36).

Zanieczyszczenia powierzchniowe skorup mają miejsce niewspółmiernie częściej niż zakażenia wewnątrzjajnikowe i odgrywają dużą rolę w zakażeniach pokarmowych w Polsce i innych krajach (1, 17, 23, 27, 38). Skorupa jaj pochodzących od zdrowych ptaków jest wystarczającą przeszkodą dla drobnoustrojów i chroni treść jaja przed zakażeniem. Bakterie znajdujące się na zewnętrznej powierzchni jaja mogą wnikać do jego wnętrza, ale muszą wtedy pokonać istniejące bariery ochronne – skorupy i dwie błony podskorupowe. Według niektórych autorów skorupa jaj nie stanowi jednak całkowitej przeszkody dla bakterii, gdyż różne drobnoustroje mogą przenikać z niej do wnętrza jaja podczas okresu wylęgania jaj lub w innych sytuacjach (4, 14, 29, 39, 45).

Przenikanie drobnoustrojów do wnętrza jaja następuje w kilku etapach (8, 16). W pierwszym drobnoustroje przenikają przez kutikulę i skorupę. W drugim ma miejsce kolonizacja bakterii w błonach podskorupowych, w trzecim zakażenie białka oraz całej zawartości jaja. Wielu autorów badało możliwości przenikania salmoneli przez skorupę jaj, ale stosowany przez nich układ doświadczalny daleko odbiegał od rzeczywistych sposobów naturalnego zanieczyszczenia jaj oraz warunków ich przechowywania (19, 22, 37, 43).

Celem badań było określenie możliwości przenikania pałeczek *Salmonella* przez skorupę jajową w zależności od temperatury i wilgotności przechowywania jaj.

Materiał i metody

W uspołecznionym gospodarstwie produkcyjnym zakupiono 1860 świeżych kurzych jaj. Sześćdziesiąt z nich bezpośrednio

po dostarczeniu do laboratorium zbadano na obecność pałeczek *Salmonella*. Pozostałe 1800 szt. umieszczono pojedynczo w jałowych zlewkach pod nakryciem z folii aluminiowej, po czym na powierzchnię skorupki każdego naniesiono jedną kroplę płynu do rozcieńczeń, zawierającą 10^3 - 10^4 jednostek tworzących kolonie (jtk) *S. enteritidis*. Przedmiotem badań były szczepy *S. enteritidis* nr 87, 885. *Inoculum* pałeczek *Salmonella* rozprowadzono przy pomocy ezy na możliwie jak największej powierzchni skorupy. Następnie jaja podzielono na 12 grup po 150 szt. w każdej. Do każdego wariantu badań użyto jednej grupy jaj. Stosowano następujące warianty: składowanie w temperaturze 2°C, 20°C i 30°C. W każdej temperaturze zapewniono normalną w danym czasie wilgotność powietrza oraz wilgotność względną uzyskaną przez wstawienie tac z wodą do lodówek i ciepłarek w których składowano jaja. Dla każdego wariantu temperatury i wilgotności okres składowania jaj po zakażeniu pałeczkami *Salmonella* wynosił 0, 7, 14, 28 i 56 dni.

Po odpowiednim okresie składowania każde jajo, bezpośrednio przed badaniem bakteriologicznym, przenoszono jałową łyżką do gotującej się wody na 10 sekund w celu zabicia pałeczek *Salmonella* na skorupie. Następnie jaja wkładano do 250 ml zbuforowanej wody peptonowej (ZWP) w zlewkach, rozbijano jałowym skalpelem, mieszano zawartość i inkubowano w temperaturze 37°C przez około 20 godzin. Po tym czasie przesiewano po 1 ml do podłoża Müllera-Kaufmana (MK) i podłoża seleninowo-cystynowego (SC) oraz po 0,1 ml do podłoża Rappaporta-Vasiliadis (RV) (J20). Podłoża te inkubowano w temperaturze 43°C przez 24 godziny, a następnie wykonano posiewy eż na agar z zielenią brylantową i czerwienią fenolową (BGA) oraz na agar bizmutowo-siarczynowy (BSA). Podłoża te przetrzymywano w temperaturze 37°C przez 1 dobę lub 2 doby (BSA). Identyfikację wyrosłych kolonii przeprowadzono według ogólnie przyjętych zasad. W każdym wariantcie wykonano po 10 serii badań.

Wyniki i omówienie

Jaja (60 szt.), których nie zakażono, były wolne od pałeczek *Salmonella*. W żadnym spośród 1800 jaj zakażonych eksperymentalnie *S. enteritidis* nie stwierdzono również pałeczek *Salmonella*. Świadczy to, że bakterie nie przeniknęły do wnętrza jaj we wszystkich stosowanych wariantach temperatury i wilgotności oraz dość długiego okresu składowania.

Stopień zanieczyszczenia mikroflorą skorupy jajowej zależy od czystości powierzchni, na której jaja są znoszone oraz sposobu postępowania z nimi po zniesieniu (5, 25). Bakterie znajdujące się na skorupie mogą przeniknąć do jej wnętrza poprzez pory, przy czym muszą pokonać fizyczne i chemiczne bariery ochronne jaja. W skład barier fizycznych wchodzi: mucyna, skorupa i dwie błony podskorupowe. Błona mucynowa ma grubość 0,01 mm (35), wypełnia pory co utrudnia przenikanie drobnoustrojów przez skorupę (13). Vadehra i wsp. (43) przypuszczają, że ochronne działanie mucyny trwa 96 godzin po zniesieniu jaj. Przenikanie bakterii przez błonę mucynową zależy od: jej grubości (24), postępowania z jajami po zniesieniu – dotykaniu rękami, czyszczenie może uszkadzać

błonę mucynową (10, 11, 13, 35, 42), okresu przechowywania jaj – w miarę upływu czasu błona mucynowa wysycha, kurczy się i opróżnia pory, co ułatwia przenikanie bakterii (33), fumigacji – formaldehyd reaguje z białkiem mucyny i wiąże mucynę (2), temperatury przechowywania – wyższa temperatura przechowywania sprzyja szybkiemu zanikowi mucyny (24), mycie jaj wodą nie powoduje zmian w budowie błony mucynowej lecz może ją uszkadzać.

Skorupa jaja ma grubość 0,2 do 0,4 mm. Jest w niej wiele otworów (7000-17 000) tzw. porów, których średnica wynosi od 6-4 μm . Pory nie są równomiernie rozmieszczone na całej skorupce, największa ich liczba znajduje się na tępych końcach jaja (34, 44). Na końcu ostrym jaja pory mają średnicę 13 μm a na tępych końcach 6 μm . Według Northa (24) niektóre pory są zniekształcone i kilka razy powiększone, co ułatwia przenikanie bakterii do wnętrza jaja. Sauter i Peterson (32) stwierdzili, że grubość skorupy ma największy wpływ na zdolność przenikania bakterii przez skorupę jajową. Według nich grubość skorupy ma większy wpływ niż czas od złożenia jaja. Skorupa jajowa jest bardzo podatna na przenikanie bakterii w krótkim czasie po złożeniu jaja. Świeżo składane jaja, których temperatura wynosi 41°C są następnie oziębiane do poziomu temperatury otoczenia. W wyniku tego zmniejsza się objętość części płynnych jaja, co prowadzi do powstania podciśnienia. Wskutek istniejącej różnicy ciśnień błona mucynowa jest wciągana do wnętrza porów a następnie wysycha i pęka. Umożliwia to oddychanie jaja, ale równocześnie przy obecności wilgoci na jego zewnętrznej powierzchni dochodzi do zetknięcia się wody z błoną podskorupową. Bakterie, które swobodnie poruszają się w środowisku wodnym, mają wtedy łatwy dostęp z powierzchni jaja do osłonki podskorupowej. Wnikanie wody z powierzchni jaja poprzez pory do osłonki podskorupowej jest wynikiem działania wewnętrznego podciśnienia jaja oraz ciśnienia kapilarnego w porze (21). Także Stover (40) sugeruje, że przenikanie pałeczek *Salmonella* w warunkach naturalnych trwa kilka godzin.

Dwie błony podskorupowe jaja są ze sobą ściśle powiązane z wyjątkiem jego tępego końca, gdzie się oddzielają, tworząc komorę powietrzną. Wewnętrzna błona podskorupowa – obiałkowa styka się z białkiem a zewnętrzna ze skorupką. Błona wewnętrzna składa się z trzech warstw włókna a zewnętrzna z dwóch niewyraźnych warstw. Błony podskorupowe także zawierają pory. Błona podskorupowa wewnętrzna zawiera więcej porów niż błona zewnętrzna. Według obserwacji Stokesa i wsp. (39) błona ta działa jak bakteryjny filtr. Niektórzy autorzy przypuszczają, że zawiera ona substancje przeciwbakteryjne, wielu wykazuje, (j.w.) natomiast, że jest ona bardziej nieprzepuszczalna dla bakterii niż skorupa jajowa. Lifshitz i wsp. (20) twierdzą, że błona podskorupowa wewnętrzna najbardziej skutecznie zapobiega przenikaniu bakterii do wnętrza jaja. W następnej kolejności czynność tę spełniają skorupa i błona podskorupowa zewnętrzna. Garibaldi i Stokes (14) wykazali, że błony podskorupowe są bardziej skuteczne w zapobieganiu przenikania pałeczek *Salmonella* niż skorupa jajowa. Stwierdzili oni, że szybkość penetracji bakterii przez błony podskorupowe zależy od rodzaju bakterii, a okres przenikania waha się od 1 do 4 dni.

Chociaż wiadomo, że bakterie przenikają przez pory skorupy mało znany jest sposób przenikania przez błonę podskorupową wewnętrzną. Niektórzy autorzy przypuszczają, że w przenikaniu bakterii przez błony podskorupowe pewną rolę odgrywają enzymy bakteryjne (7, 14). Brown (9) stwierdził, że

wokół bakterii zlokalizowanych w błonach podskorupowych występują strefy hydrolizy, Wederal i wsp. (46) wykazali, natomiast, że większość enzymów, które badali nie powodowała wykrywalnych zmian w przepuszczalności wewnętrznej błony podskorupowej.

Badano przenikanie pałeczek *Salmonella* przez skorupę jajową, stosując zanurzanie lub smarowanie jaj zawiesiną bakterii. Scott (cyt. 47) umieszczał jaja w hodowli bulionowej *S. typhimurium*, następnie inkubował je w temperaturze pokojowej. Pałeczki *Salmonella* przenikały do wnętrza jaj w ciągu kilku dni. Schalm (cyt. 47) smarował powierzchnię skorupy jajowej wyjąłowym kałem kurzym, zakażonym *S. typhimurium*. Jaja inkubowano w temperaturze 99 F (37,2°C). Bakterie te przeniknęły do wnętrza jaj w ciągu 19 dni. Wilson (cyt. 47) smarował hodowlą *S. thompson* skorupę jaj wylęgowych. Pałeczki *Salmonella* przeniknęły do wnętrza w ciągu 3 dni. Lancaster i Crab (19) smarowali hodowlą bulionową *S. thompson* skorupę jaj. Jaja inkubowano w temperaturze 100 F (37,7°C). Pałeczki *Salmonella* nie przeniknęły do wnętrza jaj w ciągu 21 dni. Bigland i wsp. (3) smarowali powierzchnię skorupy jajowej wilgotnym kałem kurzym zakażonym hodowlą pałeczek *Salmonella*. Jaja inkubowano w temperaturze 63 F (23,8°C). Pałeczki *Salmonella* przeniknęły do wnętrza jaja w ciągu 7 dni. Wright i Frank (48) usuwali zawartość jaja i zastępowali ją pożywką płynną dla pałeczek *Salmonella*. Zanurzali 2/3 jaja w hodowli *S. typhimurium* i inkubowali jaja w temperaturze 20°C i 37°C. Pałeczki *Salmonella* przeniknęły do wnętrza jaja w ciągu jednego dnia. Stokes i wsp. (39) jaja o temperaturze 35°C zanurzali w hodowli pałeczek *Salmonella* o temperaturze 5°C przez 0,5 godziny i inkubowali w temperaturze 29°C. Pałeczki *Salmonella* przeniknęły do wnętrza jaj w ciągu 5 dni. Mellor (22) zanurzał jaja w hodowli *S. derby* przez 15 minut i inkubował w temperaturze 12°C. Pałeczki *Salmonella* przeniknęły do wnętrza jaj w ciągu 21 dni. Z prac tych wynika, że przenikanie przez skorupę jajową zależy od różnicy temperatur między jajami a zawiesiną bakteryjną, liczby drobnoustrojów w roztworze tzn. im większa liczba bakterii tym większe przenikanie, okresu zanurzenia – dłuższy czas powoduje, że przenika większa liczba bakterii, sposobu postępowania ze skorupą – pocieranie, owijanie materiałem, smarowanie kałem ułatwia przenikanie, grubości skorupy – cienka skorupa stawia bakteriom mniejszy opór niż grubsza.

Wszystkie przytoczone wyniki badań wskazują, że stosowany w nich układ doświadczalny daleko odbiegał od rzeczywistych sposobów naturalnego zanieczyszczenia jaj pałeczkami *Salmonella* oraz warunków ich przechowywania.

W badaniach własnych nie wykryto ani jednego przypadku przenikania pałeczek *Salmonella* ze skorup do wnętrza jaj, mimo stosowania różnych temperatur, różnej wilgotności oraz różnych, dość długich okresów składowania.

Wyniki badań własnych oraz innych autorów wskazują na to, że problem ewentualnego przenikania pałeczek *Salmonella* przez skorupę do wnętrza jaja jest skomplikowany i nie całkowicie wyjaśniony. Zależy to prawdopodobnie od szczególnego układu różnych czynników.

Piśmiennictwo

1. Anon.: Digest 6, 1, 1989.
2. Baker J. R., Balch D. A.: Biochem. J. 82, 352, 1962.
3. Bigland C. H., Papas G.: Can J. Comp. Med Vet. Sci. 17, 105, 1953.
4. Board R. G.: J. Appl. Bact. 27, 350, 1964.
5. Board R. G., Ayres J. C., Kraft A., Forsythe R. H.: Poult. Sci. 43, 584, 1964.

6. Board R. G., Ayres J. C.: Appl. Microbiol. 13, 385, 1965.
7. Board R. G.: J. Appl. Bact. 28, 437, 1965.
8. Board R. G.: J. Appl. Bact. 29, 319, 1966.
9. Brown W. E., Baker R. C., Naylor H. B.: Poult. Sci. 44, 1323, 1965.
10. Brown W. E., Baker R. C., Naylor H. B.: Poult. Sci. 45, 276, 1966.
11. Brown W. E., Baker R. C., Naylor H. B.: Poult. Sci. 45, 284, 1966.
12. Ellemann G.: Nord. VetMed. 11, 341, 1959.
13. Fromm D.: Poult. Sci. 42, 1271, 1963.
14. Garibaldi J. A., Stokes J. L.: Fd Res. 23, 283, 1958.
15. Gillespie J. M., Scot W. J.: Aust. J. Appl. Sci. 1, 514, 1950.
16. Harry E. G.: Br. Poult. Sci. 4, 63, 1970.
17. Hinton M.: Epidem. Infect. 100, 247, 1988.
18. Hopper S. A., Mawer S.: Vet. Rec. 123, 351, 1988.
19. Lancaster J. E., Crab W. E.: Brit. Vet. J. 109, 139, 1953.
20. Lifshitz A., Baker R. C., Naylor H. B.: J. Fd Sci. 29, 94, 1964.
21. Mac Laury D. W., Moran A. B.: Agric. Expt. St. Bull. 657, 3, 1959.
22. Mellor D. B.: A study of Salmonella derby contamination of shell eggs. Praca dokt., Purdue University, Lafayette Ind., 1965, s. 66.
23. Mishu B., Griffin P., Tauxe R. V., Cameron P. N., Hutcheson R., Schaffner W.: Ann. Inter. Med. 115, 190, 1991.
24. North M. O.: Commercial Chicken Production Manual – AVI Publ. Co. In., Westport Connecticut 1978.
25. O'Brien J. D. P.: Vet. Rec. 122, 214, 1988.
26. Perales J., Audicana A.: Int. J. Fd Microbiol. 8, 175, 1989.
27. Radkowski M.: Medycyna Wet. 46, 331, 1990.
28. Reid W. M., Macy T. A., Boyd F. M., Kleckner A. M., Schmittle C.: Poult. Sci. 40, 1497, 1961.
29. Rizk S. S., Ayers J. C., Kraft A. A.: Poult. Sci. 45, 825, 1966.
30. Rosser F. T.: Can. J. Res. 20 D, 291, 1942.
31. Rowe B.: Proc. Xth WAVFH Symposium, Stockholm 1989, s. 326.
32. Sauter E. A., Peterson C. F.: Poult. Sci. 53, 2159, 1974.
33. Schalm O. W.: J. Inf. Dis. 61, 208, 1937.
34. Schmidt W. J.: J. Orn. Lpz. 102, 456, 1961.
35. Schoorl P., Mos G.: Pluimveeonderzoek. Comm. no 155. Cent. Inst. Poult. Res., Beckbergen the Netherlands 1968.
36. Simkiss K.: Egg Quality. A Study of the Hens Egg. Oliver and Boyd, Edinburg 1968.
37. Snoeynbos G. H., Smyser C. F., Roedel van H.: Avian Dis. 13, 688, 1969.
38. Spark N. H. C., Board R. G.: Aust. Vet. J. 62, 168, 1985.
39. St. Louis M. E., Morse D. L., Potter E., De Melfi T. M., Guzewich R. V., Blake P. A.: J. Am. Med. Ass. 259, 2103, 1988.
40. Stokes J. I., Osborne W. W., Bayne H. G.: Fd Res. 21, 510, 1956.
41. Stover D. E.: Fd Res. 21, 510, 1956.
42. Tyler C., Standen N.: Br. Poult. Sci. 10, 359, 1969.
43. Vadehra D. V., Baker R. C., Naylor H. B.: J. Fd Sci. 35, 5, 1970 a.
44. Walden C. C., Allen I. V. F., Trussel P. C.: Poult. Sci. 35, 1190, 1956.
45. Watanabe S., Hashimoto K., Kume T., Murata M., Sakazaki K.: Bull. Natl. Inst. Animal Hlth Tokyo 34, 47, 1959.
46. Wedral G. M., Vadehra D. V., Baker R. C.: J. Fd Sci. 36, 520, 1971.
47. Williams J. E., Dillard L. H., Hall G. O.: Avian Dis. 12, 445, 1968.
48. Wright G. W., Frank J. F.: Can. J. Comp. Med. Vet. Sci. 20, 453, 1956.

Adres autora: dr hab. Mieczysław Radkowski, ul. Osińskiego 19 m. 14, 10-010 Olsztyn

GRAŻYNA PAPROCKA, GRAŻYNA PŁUCIENNICZAK*, ANDRZEJ PŁUCIENNICZAK*, ANDRZEJ KĘSY, WIESŁAW NIEDBALSKI, ANDRZEJ FITZNER

Określenie sekwencji kodującej region VP1 wirusa pryszczycy typu O

Zakład Pryszczycy Państwowego Instytutu Weterynaryjnego, ul. Wodna 7, 98-220 Zduńska Wola

*Zakład Badawczo Wdrożeniowy Inżynierii Genetycznej, ul. POW 57, 98-200 Sieradz

Summary

Determination of the VP1 coding sequence of foot-and-mouth disease virus (FMDV) type O

A Polish strain of foot-and-mouth disease virus type O from the laboratory virus collection was used. The virus was propagated in BHK-21 monolayer cells. Total RNA was extracted by the Chomczyński and Sacchi method. A synthesis of cDNA was performed with AMV-reverse transcriptase. The first and second cDNA strands were used as a template for the amplification by PCR of the 672 bp of the VP1 coding sequence. The amplified fragment of cDNA was cloned in the phagemid pBS (+). The first DNA strand expressed in the phage M13K07 was sequenced according to the Sanger method. The nucleotide sequences were compared to the earlier data published. Genetic similarities to the Brazilian strain of FMDV O1 Campos 58 were found.

wirusa wchodzi cztery strukturalne polipeptydy z których VP1 jest głównym białkiem immunogennym. Antygenowa zmienność wirusa jest rezultatem zmian w strukturze tego białka. W obrębie 7 serotypów wirusa wyróżnia się szereg podtypów. Od 1987 r. molekularna epizootologia pryszczycy opiera się głównie na porównywaniu różnic genetycznych między izolatami wirusa. Większość danych uzyskano metodą sekwencjonowania DNA. W licznych publikacjach przedstawiono strukturę genetyczną serotypów wirusa pryszczycy, typu O (3, 5, 11, 13, 15, 16), typu A (3, 4, 5, 7, 14, 20, 21, 23), typu C (12, 17, 18, 19, 25), typu SAT1 (9), typu SAT2 (27), typu SAT3 (12), typu Asial (1, 2, 26).

Celem pracy było ustalenie sekwencji nukleotydów fragmentu cDNA wirusa pryszczycy typu O. Do powielenia metodą PCR wybrano region kodujący białko VP1, zawarty między 22 a 694 parą zasad.

Materiał i metody

Wirus. Do badań używano wirusa pryszczycy typu O pochodzącego z kolekcji Zakładu Pryszczycy. Wirus namnażano w hodowli komórek linii BHK-21.

Ekstrakcja RNA. Izolację RNA wykonano w oparciu o metodę Chomczyńskiego (8). Do 200 µl zawiesiny wirusa dodawano

Wirus pryszczycy należący do grupy *Picornia* posiada jednoniciowy RNA o długości 8000 nukleotydów. W skład kapsydu