

zmianę pH kału z kwaśnego na zasadowy, biegunkę u licznych prosiąt oraz nagłe zejścia śmiertelne niektórych z nich.

2. Podawanie w analogicznych warunkach tylozyny oraz zwiększonych dawek enteramidu, tego ostatniego w odstępach kilku dni, nie powodowało zmian podanych w p-kcie 1 ani zachorowań i padnięć prosiąt.

3. Sztuczne zmniejszenie liczby i zahamowanie namnażania pałeczek *Lacto* w przewodzie pokarmowym zdrowych prosiąt powoduje liczebną i funkcjonalną przewagę pałeczek *E. coli*; formy te stają się przyczyną zaburzeń czynności przewodu pokarmowego (biegunka) oraz padnięć prosiąt.

Adres autora: prof. dr Henryk Janowski, Olsztyn-Kortowo, Wydział Weterynarii WSR.

HENRYK JANOWSKI, KONRAD WASIŃSKI, BARBARA WASIŃSKA

Wpływ preparatu Lactovac na florę bakteryjną jelit u prosiąt

Zakład Badania Chorób Szwini Instytutu Weterynarii w Puławach
Kierownik: prof. dr H. JANOWSKI *)

Przedmiotem badań opisanych poniżej **) jest żywa liofilizowana hodowla mutantów szczepu *Lactobacillus acidophilus* L₁₅ (L₁₅), przeznaczona jako preparat Lactovac do profilaktyki i leczenia schorzeń przewodu pokarmowego wywołanych przez *E. coli* u cieląt, prosiąt, psów, kotów i zwierząt futerkowych oraz biegunek tych zwierząt o niewyjaśnionej etiologii jak też powstałych w wyniku leczenia ich antybiotykami. Niektóre właściwości tego szczepu oraz odpowiednie podłoże namnażające opisali Denis i Gosiewska (2).

Badania własne miały na celu określenie wartości preparatu przed dopuszczeniem go do szerokiego stosowania w terenie. W tym celu postanowiono wykonać następujące badania szczegółowe:

1. zbadać cechy ogólne preparatu podane w projekcie normy producenta tj. Drwalewskich Zakładów Przemysłu Bioweterynaryjnego,

2) zbadać *in vitro* wpływ szczepu L₁₅ na niektóre bakterie chorobotwórcze — w tym głównie na szczepy *E. coli* izolowane z kału prosiąt,

3) podawać preparat *per os* prosiątom, celem zbadania jego wpływu *in vivo* na niektóre składniki flory bakteryjnej jelit.

Materiał i metody

Badanie cech ogólnych preparatu obejmowało: a) badanie barwy, struktury i konsystencji liofilizatu b) zawieszalności — określanej stopniem łatwości tworzenia homogennej zawiesiny w roztworze fizjologicznym, c) zanieczyszczeń bakteryjnych w preparacie mikroskopowym barwionym metodą Grama, d) żywotności zliofilizowanego szczepu i ewent. obecności zanieczyszczeń bakteryjnych (próbki 0,2 ml zregenerowanego preparatu posiewano na agar skośny zwykły, agar słupkowy cukrowy, agar skośny octanowy o składzie: agaro-bulion na Stauba — 1000 ml, glikoza — 5 g, octan sodu bezwodny — 5 g, agar Difco — 18—20 g i płynną pożywkę LO zawierającą w 1000 ml H₂O dest. glikozy — 5 g, octanu sodu bezwodnego — 5 g i ekstraktu drożdżowego Difco — 5 g. Posiewy inkubowano przez 72 godz. w temp. 37°C), e) oporności na antybiotyki — określonej na

stałym podłożu L.O. przy użyciu krążków bibułowych nasyconych chloromycetyną, streptomycyną, aureomycyną, terramycyną i tetracykliną, f) stopnia nieszkodliwości — zregenerowany preparat wstrzykiwano w dawce 0,5 ml dootrzewnowo 5 zdrowym myszkom, które obserwowano przez następne 7 dni, oraz g) stopnia wilgotności, który określano pośrednią metodą wagową po wysuszeniu preparatu nad P₂O₅ przy ciśnieniu ok. 1 Tr.

Aktywność szczepu L₁₅ *in vitro* w stosunku do szczepów *Salmonella choleraesuis* ***) , *Pseudomonas aeruginosa* ***) , *Erysipelothrix insidiosa* ***) oraz *E. coli* wyizolowanych z kału prosiąt użytych w dalszej części badań, określano wg metodyki Vincenta (10) oraz Frederic'a (3) stosowanej przy badaniu laktocydyny i kolicyn. Jako pożywkę używano podłoże APT z dodatkiem purpury bromokrezolowej. Czas inkubacji wynosił: dla pałeczek *Lacto* 72 godz., dla pozostałych bakterii — 24 godz.

W trzeciej części badań użyto 16 zdrowych prosiąt w wieku 8 tyg. rasy puławskiej, o ciężarze ciała po ok. 20 kg. Zwierzęta żywiono mieszanką P w ilości 1 kg/sztukę dziennie z dodatkiem niewielkiej ilości mleka i parowanych ziemniaków. Prosiąta te podzielono losowo na 4 grupy liczące po 4 prosiąta, z których gr. I — otrzymywała z karmą badany preparat w postaci liofilizatu przez 10 kolejnych dni, gr. II zaś stanowiła kontrolę. Dawka preparatu wynosiła, zgodnie z zaleceniami Wytwórni, 6 ampulek liofilizatu na prosię. W czasie skarmiania szczepionki od prosiąt pobierano próbki kału, w którym po rozcieńczeniu do 10⁻⁴ i 10⁻⁷ określano: liczbę kolonii *E. coli* na podłożu McConkey'a, odsetek kolonii hemolizujących na agarze z dodatkiem 5% krwinek baranich i 2 j/ml penicyliny oraz liczbę kolonii drobnoustrojów z grupy *Lactobacillus* na podłożu APT z dodatkiem kwasu octowego o pH 5,3.

Prosiątom gr. III dodawano do ciepłej karmy tzw. mleko acidowe w ilości 1,5 litra na prosię dziennie. Prosiąta gr. IV stanowiły kontrolę tego doświadczenia. Mleko acidowe otrzymywano przez dodanie do przegotowanego i ostudzonego mleka odtłuszczonego, liofilizowanej hodowli szczepu L₁₅ w stosunku 1 ampulka na 2,5 litra. Mleko to przetrzymywano następnie przez 48—72 godz. w temp. 37°C, po czym sprawdzano je badaniem bakteriologicznym.

Badanie bakteriologiczne kału prosiąt wykonywano wg metodyki opisanej poprzednio.

W y n i k i

Wygląd zewnętrzny oraz cechy fizyczne badanych liofilizatów nie budziły zastrzeżeń. Stopień ich wilgotności był prawidłowy, gdy nie

*) Obecne miejsce pracy: Instytut Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych Wydz. Wet. WSR w Olsztynie.

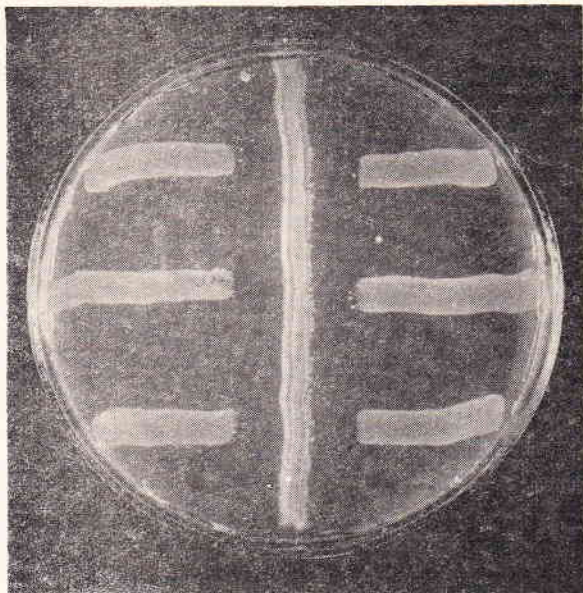
**) Badania zostały podjęte na prośbę Zjednoczenia Przemysłu Bioweterynaryjnego i Zootechnicznego w W-wie.

***) Szczepy pochodziły z Muzeum Szczepów IWet w Puławach oraz ZHW w Kielcach.

przekraczał 3%. W preparacie mikroskopowym z liofilizatu stwierdzano pojedyncze komórki bakteryjne morfologicznie różne od bakterii kwasomlekowych. Jednak wobec stwierdzenia czystego wzrostu szczepu L_{15} namnażającego się obficie na pożywkach LO i braku wzrostu na innych pożywkach, można przyjąć, że w liofilizatach stwierdzano zabite drobnoustroje, które dostały się najprawdopodobniej z mlekiem użytym do liofilizacji. Posiewy kłute na słupku agaru cukrowego wykazały, że szczep L_{15} namnażał się w tych warunkach. Jednakże namnażaniu temu nie towarzyszyło wytwarzanie gazu i rozrywanie podłoża, co jest charakterystyczne dla wzrostu innych, niepożądanych gatunków beztlenowców.

Badany szczep okazał się oporny na użyte antybiotyki w stopniu podanym przez Wytwórnę i był nieszkodliwy dla myszy, które w okresie 7-dniowej obserwacji pozostały zdrowe.

Szczep L_{15} *in vitro* hamował wzrost wszystkich użytych w badaniu szczepów *E. coli*, izolowanych z kału prosiąt doświadczalnych.



Ryc. 1

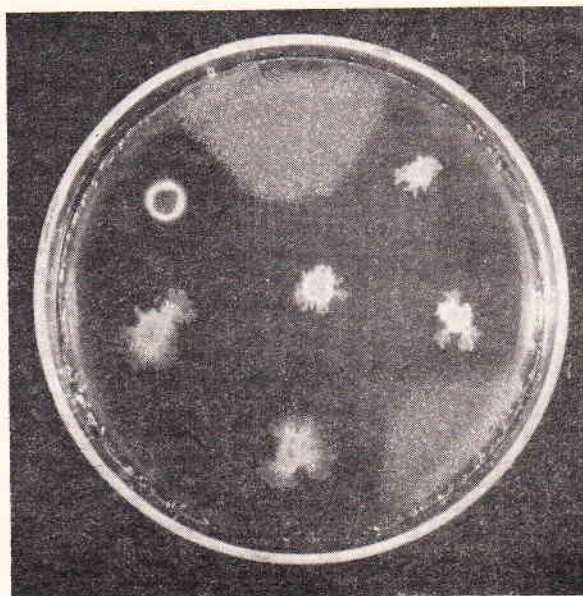
Fot. J. Pacewicz

Wzdłuż średnicy płytki posiano w szerokiej linii badany szczep L_{15} a w liniach prostopadłych — szczepy *E. coli* wyizolowane od prosiąt użytych w doświadczeniu.

Jak widać na ryc. 1 — w pobliżu kolonii szczepu L_{15} został całkowicie zahamowany wzrost szczepów *E. coli*.

To samo zjawisko, wykazane przy użyciu nieco innej techniki, widoczne jest na ryc. 2.

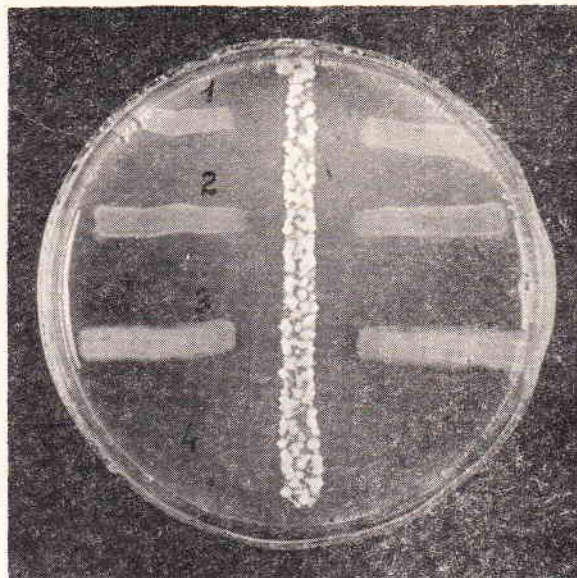
Na płytkę posianą jak poprzednio badanym szczepem L_{15} którego kolonie po 48 godz. inkubacji zabito parami chloroformu, nalano rozcieńczoną 1:1000 hodowlę bulionową szczepu *E. coli* wyizolowanego od prosięcia. Po 24 godz. inkubacji widoczne jest hamujące działanie szczepu L_{15} na rozwój pałeczek okrężnicy.



Ryc. 2

Fot. J. Pacewicz

Działanie *in vitro* badanego szczepu L_{15} na hodowle pałeczek z grupy *Salmonella*, *Pseudomonas aeruginosa* i *E. insidiosa* przedstawione jest na ryc. 3.



Ryc. 3. Wzdłuż średnicy płytki posiano szczep *Lactobacillus acidophilus*, w liniach poprzecznych 1, 2 — szczepy z grupy *Salmonella*, 3 — *Pseudomonas aeruginosa* i 4 — *Erysipelothrix insidiosa*, którego wzrost nie uwidocznił się na rycinie.

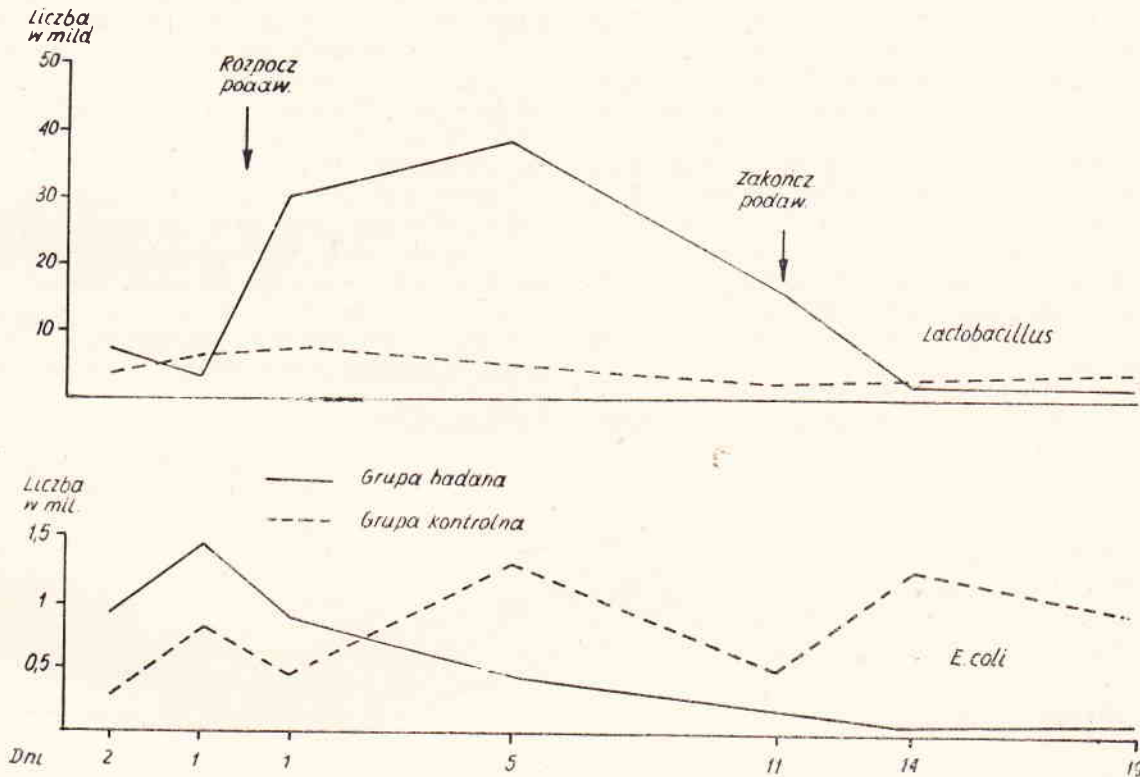
Fot. J. Pacewicz

W doświadczeniu tym stwierdzono również hamujący wpływ szczepu L_{15} na wzrost badanych gatunków drobnoustrojów. Szczególnie silnie hamowany był wzrost włoskowców różnicy.

Wyniki badania bakteriologicznego kału prosiąt, które otrzymywały Lactovac, przedstawiono na ryc. 4.

Na wykresie tym na osi rzędnych zaznaczono liczby bakterii: kwasomlekowych w miliardach i *E. coli* w milionach na gram masy kału. Na osi odciętych zaznaczono dni przed i w

Ryc. 4 Wpływ liofilizowanego preparatu Lactovac na liczbę pałeczek z gr. *E. coli* i *Lactobacillus* w kale prosiąt



czasie podawania Lactovacu a także po zakończeniu jego podawania. Rozpoczęcie i zakończenie podawania zaznaczono strzałkami. Górna krzywa ciągła przedstawia zmiany ilościowe pałeczek z gr. *Lactobacillus* (wyrosłych na podłożu APT) w kale prosiąt, które otrzymywały Lactovac, natomiast górna krzywa przerywana — analogiczne dane u prosiąt kontrolnych.

Dwie dolne krzywe przedstawiają zmiany w zakresie liczby pałeczek *E. coli*: krzywa ciągła — w kale prosiąt, które otrzymywały Lactovac, krzywa przerywana — w grupie kontrolnej.

Z ryc. 4 wynika, że u prosiąt, które otrzymywały Lactovac liczba pałeczek *Lacto* była kilkunastokrotnie wyższa, niż w grupie kontrolnej i najwyższą wartość osiągnęła w piątym dniu stosowania preparatu.

Przy badaniu pałeczek okrężnicy nie stwierdzono większych różnic ilościowych u prosiąt obydwu grup, chociaż liczba *E. coli* w grupie kontrolnej była nieco większa. Nie obserwowano również występowania form beta-hemolitycznych tych pałeczek.

Nieco inne wyniki stwierdzono przy badaniu kału prosiąt, które otrzymywały mleko acidowe. Przedstawiono je na ryc. 5.

Układ i oznaczenia danych na tym wykresie są takie same jak na ryc. 4. Dodatkowo słupkami i liczbami oznaczono odsetki szczepów beta-hemolitycznych *E. coli*, które stwierdzono

w tym doświadczeniu. Z ryc. 5 wynika, że 2 i 3 dnia po rozpoczęciu skarmiania mleka acidowego liczby pałeczek z grupy *Lactobacillus* w kale prosiąt były mniejsze niż u prosiąt grupy kontrolnej. Równocześnie wzrosła ok. 20-krotnie ogólna liczba pałeczek *E. coli* i pojawiły się szczepy beta-hemolityczne w ilości ok. 80% wszystkich izolowanych kolonii. Największy wzrost liczby pałeczek okrężnicy miał miejsce 10 dnia, a najwięcej szczepów hemolizujących stwierdzono 3 dnia po rozpoczęciu skarmiania mleka. Procent szczepów hemolitycznych ulegał zmniejszeniu, ale utrzymywały się one przez cały czas żywienia doświadczonego. Dodać należy, że w tym czasie w stanie zdrowia prosiąt nie stwierdzono innych odchyłań od normy.

O m ó w i e n i e

W wykonanych badaniach stwierdzono, że próbki Lactovacu odpowiadały wymaganiom zawartym w projekcie normy zakładowej zarówno co do cech fizycznych preparatu, jak i właściwości użytego szczepu.

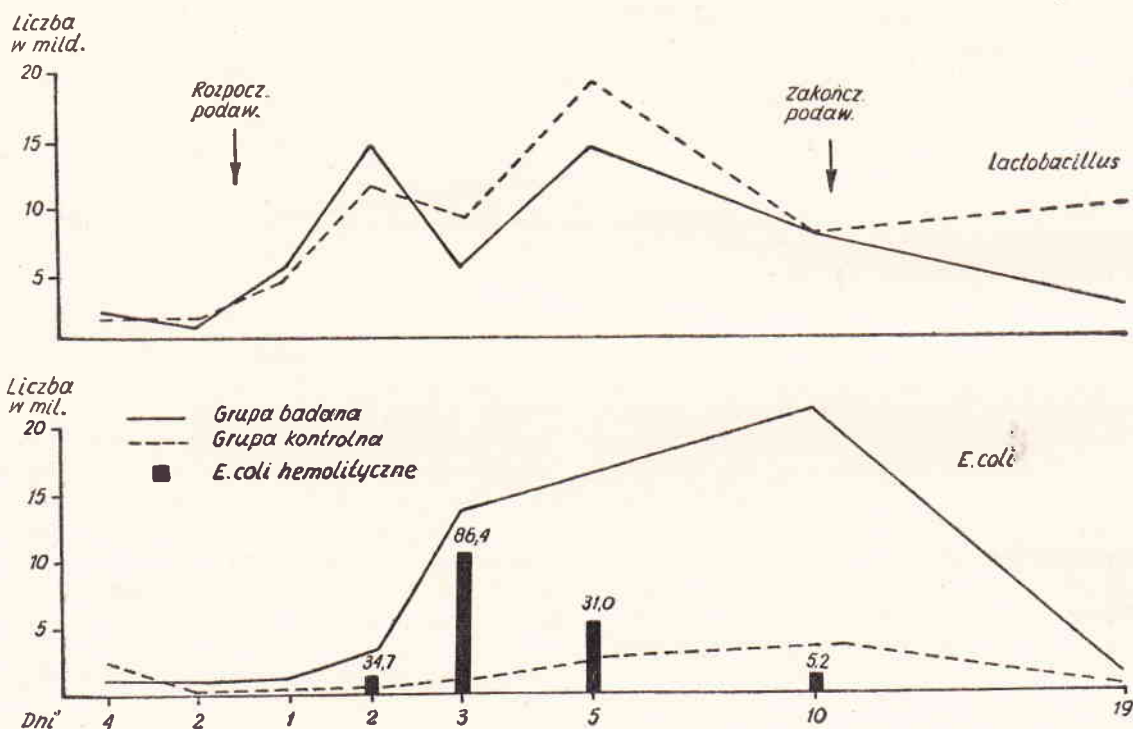
Wyniki badania wpływu szczepu L_{15} na inne bakterie *in vitro* są zgodne z wynikami uzyskanymi przez Denisa i Gosiewską (2) oraz przez Wołoszyna (11): badany szczep hamował wzrost pałeczek okrężnicy wyizolowanych od świń.

Stosunkowo niewielka liczba prosiąt użytych do badań nad wpływem szczepu L_{15} na florę

bakteryjną jelit utrudnia wyprowadzenie ogólniejszych wniosków. Ponieważ jednak uzyskane wyniki są zgodne z wynikami badań wykonanych na większym materiale (4), wydają się one zasługiwać na omówienie. Znaczny wzrost ogólnej liczby pałeczek okrężnicy oraz występowanie znacznej liczby beta-hemolitycznych szczepów tych pałeczek w kale prosiąt, stwierdzany był wielokrotnie w badaniach wpływu różnych diet, nagłej zmiany karmy oraz skarmiania antybiotyków i sulfonamidów (6). Z reguły występowały one także u ok. 50% prosiąt po odłączeniu ich od macior (5). Zjawiska te stwierdzano też bezpośrednio przed wystąpieniem biegunki wzgl. innych objawów kolibakterioz.

sowanie budzi pewne obawy. Produkcja mleka acidowego, stosunkowo łatwa w warunkach laboratoryjnych i w warunkach niektórych mleczarni, może okazać się trudna w warunkach wielu gospodarstw rolnych. Mleko acidowe stanowi nieatrważną hodowlę bakterii kwasomlecznych. Stąd wynika konieczność stosunkowo szybkiego jej zużycia, a w przypadkach przyrządzania jej np. w mleczarniach — sprawnej organizacji zbytu i transportu. Przy tym konieczne jest przestrzeganie rygorów sanitarnych oraz odpowiednie przeszkolenie personelu. Przypomnieć również należy, że odtłuszczone mleko przed zakwaszeniem powinno być pasteryzowane lub przegotowane, co stanowi dodatkowe utrudnienie. Należy dodać

Ryc. 5. Wpływ mleka acidowego na liczbę pałeczek z gr. *E. coli* i *Lactobacillus* w kale prosiąt



Podobne wyniki uzyskiwali również inni autorzy w kraju i za granicą. Zmiany takie we florze bakteryjnej przewodu pokarmowego uważać należy za niewykorzystane. Stwierdzono je również po podaniu mleka acidowego, które w użytej w badaniach ilości — zgodnej z zaleceniami Wytwórni — wydaje się oddziaływać na florę bakteryjną jelit podobnie jak nagła zmiana karmy wzgl. inne czynniki szkodliwe. Z badań wykonanych przez nas uprzednio wynika, że optymalna dawka mleka zarówno słodkiego jak i zsiadłego dla prosiąt w tym wieku nie powinna przekraczać 1 l na sztukę. Mleko acidowe ma tę zaletę, że jest znacznie tańsze od liofilizowanej hodowli szczepu L₁₅ ale ewentualne szerokie jego sto-

także, że skarmianie mleka, w którym proces kwaszenia przebiegał niewłaściwie stanowi zagrożenie dla zdrowia zwierząt.

Uzyskane wyniki badań oraz przytoczone wyżej wnioski zdają się przemawiać za poglądem, że korzystniejsze jest zatem stosowanie Lactovacu w postaci liofilizowanej, zwłaszcza u prosiąt żywionych z małym dodatkiem mleka. Liofilizaty nie tylko nie powodują wtedy niekorzystnych zmian we florze bakteryjnej jelit, ale wywołują korzystny dla zwierząt wzrost liczby bakterii z grupy *Lacto*.

Właściwości biologiczne szczepu L₁₅ są bardzo korzystne, toteż jego użycie do produkcji Lactovacu wolno uważać za celowe. Mechanizm jego działania wydaje się polegać nie tylko na

wywoływaniu zmian ilościowych, lecz także na jego właściwościach antybiotykoopornych oraz na działaniu antagonistycznym w stosunku do pałeczek okrężnicy w przewodzie pokarmowym.

Potrzeba wprowadzenia do lecznictwa weterynaryjnego tego preparatu wynika ze znacznych strat powodowanych przez kolibakteriozy (5), oraz z właściwości bakterii kwasomlecznych. W przewodzie pokarmowym zdrowych zwierząt stanowią one najliczniejszą grupę bakterii (7). Natomiast po odłączeniu prosiąt od macior oraz w chorobach przewodu pokarmowego, przewagę liczbową uzyskują inne bakterie — głównie za *E. coli*. Wzrost wielu szczepów *E. coli* uważanych za przyczynę kolibakterioz jest hamowany *in vitro* przez produkty hodowli bakterii kwasomlecznych. Do produktów tych zaliczany jest kwas mlekowy oraz substancje o charakterze antybiotyku zwana laktocydyną (11). Z publikacji Kinga (9) znany jest również korzystny wpływ skarmiania kultur *Lactobacillus acidophilus* w formie handlowego preparatu, na produkcję bekonu. Wydaje się on być między innymi wynikiem działania witamin z grupy B, wytwarzanych przez te drobnoustroje. Także u świń chowanych w warunkach krajowego tuczu przemysłowego, największe przyrosty ciężaru ciała stwierdzał Bartosz (1) w okresie występowania w ich kale znacznej przewagi liczebnej pałeczek *Lacto* nad pałeczkami *E. coli*.

Reasumując zatem całość wyników badań i przytoczonych rozważań, wolno stwierdzić, że preparat Lactovac nadaje się do szerokiego zastosowania w praktyce.

Wnioski

1. Zliofilizowana hodowla szczepu L_{15} *Lactobacillus acidophilus* przeznaczona jako preparat Lactovac do zapobiegania i leczenia chorób przewodu pokarmowego u zwierząt młodych ma odpowiednie cechy fizyczne, jest wolna od zanieczyszczeń bakteryjnych i nieszkodliwa dla zwierząt laboratoryjnych.

2. Zawarty w preparacie szczep L_{15} *Lactobacillus acidophilus* jest odporny *in vitro* na chloromycetynę, streptomycynę, aureomycynę, terramycynę i tetracyklinę oraz hamuje w szerokiej strefie wzrost szczepów *Salmonella choleraesuis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Erysipelothrix insidiosus* i *E. coli*. Największe zahamowanie stwierdzono w stosunku do *E. insidiosus*.

3. Preparat podany prosiętom *per os* w ilości 6 ampulek liofilizatu dziennie na prosię przez 10 dni — powodował znaczny wzrost liczby pałeczek *Lacto* w kale (najwyższy 5 dnia) — przy niezmienniej liczbie pałeczek *E. coli* i braku ich form hemolitycznych.

4. Ten sam preparat podany prosiętom w postaci tzw. mleka acidowego (zakwaszonego

szczepem L_{15} po uprzednim przegotowaniu) powodował 2—3 dnia spadek liczby pałeczek *Lacto*, któremu towarzyszył wzrost liczby pałeczek *E. coli* oraz wystąpienie do 80% ich postaci hemolitycznych.

5. Preparat Lactovac produkcji Drwalewskich Zakładów Przemysłu Bioweterynaryjnego w Drwalewie, nadaje się, w postaci liofilizatów, do szerokiego stosowania w praktyce jako środek leczniczy i zapobiegawczy przy kolibakteriozach prosiąt.

Piśmiennictwo

1. Bartosz B.: Archiwum wet. — Praca doktorska w druku.
2. Denis B., Gosiewska A.: Biul. Inform. Zjedn. Przem. i Zoopatrz. Wet. — Zoot., 3(19), 10, 1968.
3. Fraerich P.: A. Rev. Microbiol., 11, 7, 1957.
4. Hofman H., Dziemiszewska-Klepcka M.: Pol. Tyg. lek., 1, 13, 1963.
5. Janowski H., Wasiński K., Kowalik B.: Bull. vet. Inst. Puław, 162, 1965.
6. Janowski H.: Zeszyty Probl. Post. Nauk Rol., 89, 11, 1969.
7. Janowski H.: Medycyna Wet., 25, 335, 1969.
8. Kenworthy R., Crabb W. E.: J. comp. Path. Ther., 75, 215, 1963.
9. King J. O. L.: Veterinarian, Oxford, 5, 273, 1968.
10. Vincent J. G., Veomett R. C., Riley R. F.: Journ. act., 78, 477, 1959.
11. Wołoszyn S.: Ocena kliniczna preparatu Lactovac — nie publikowane.

Adres autora: prof. dr Henryk Janowski, Olsztyn—Kortowo, Wydział Weterynarii WSR.

LOZANO E. A., CATLIN J. E., HAWKINS W. W.: Wpływ antytoksyny beta Clostridium perfringens i adsorpcji siary na występowanie białej biegunki cieląt. (Effect of Clostridium perfringens beta antitoxin and colostral absorption on incidence of calf scours). Cornell Vet., 61, 296-310, 1971(2).

Przebadano rolę jaką odgrywa antytoksyna typu beta ze szczepów *Clostridium perfringens* w białej biegunce cieląt. Cielęta otrzymywały antytoksynę albo z siarą krów uodpornionych toksoidem *Cl. perfringens*, względnie cielętom podawano doustnie lub podskórnie surowicę odpornościową koni zawierającą 60000 jednostek międzynarodowych antytoksyny beta. Antytoksynę stosowano u cieląt które nie przekroczyły 14 godzin życia. U cieląt badanych nie zaobserwowano statystycznie istotnego spadku ilości zachorowań na białą biegunkę w porównaniu do cieląt z grupy kontrolnej.

WARD G. M.: Doświadczalne zakażenie ciężarnych owiec wirusem biegunki bydła-choroby błon śluzowych. (Experimental infection of pregnant sheep with bovine viral diarrhea-mucosal disease virus). Cornell Vet. 61, 179—191, 1971(1).

Z 39 wrażliwych ciężarnych owiec zakażonych dożylnie wirusem biegunki bydła-choroby błon śluzowych (BVD-MD) siedem macioerek urodziło w terminie 12 zdrowych jagniąt, u 5 zaś w dwóch przypadkach występowała mumifikacja płodów, w dwóch przypadkach autolizę płodów w jednym przypadku hypoplazja cerebri, wodogłowie i wrodzone zniekształcenie tylnych kończyn. Owce ciężarne zakażono pomiędzy 22—105 dniem po pokryciu, szczepem cytopatogennym NADL (19 sztuk) lub dożylnie niecytopatogennym szczepem 8610. W surowicy jednego jagnięcia, które padło po 4 godzinach od chwili urodzenia i nie było karmione siarą występowały swoiste przeciwciała w mianie 1:6. U zakażonych macioerek swoiste przeciwciała występowały 90 dnia po zakażeniu. U jednej sztuki miano swoistych przeciwciał 4 miesiąca po zakażeniu wynosiło jeszcze 1:256. Z tkanek poronionych płodów oraz z narządów macioerek które poroniły nie udało się wyizolować wirusa BVD-MD.

Z.