

fat and moisture in mutton in relation to individual muscles, age and sex, and quality carcass grade. The studies were carried out on 32 sheep taking into considerations the following variation factors: a — 6 different muscles (m. longissimus dorsi, biceps femoris, quadriceps femoris, semitendineus, infraspinatus and triceps brachii), b — two age groups: young sheep aged 9—12 months and adult ones at the age of 2—3 years, c — two sex groups: females and castrates, d — two quality carcass grades. The results were statistically analysed. There were found significant differences in the content of protein, fat and water among some muscles only. The highest content

of protein and the lowest amounts moisture had musculus longissimus dorsi which belonged also to the group of muscles with the highest content of fat. Musculus infraspinatus was characterized by the lowest content of protein and the highest one of fat. The sex of animals influenced significantly only the content of fat: meat of castrates contained less fat than that obtained from females. It was not stated any significant influence of age and the quality carcass grade on the characteristics under study.

Supported by PL-480 Grant No FG-Po-229 from the U. S. Department of Agriculture.

## CHOROBY ZAKAŻNE I INWAZYJNE

JERZY MAZURCZAK, MAREK TERLECKI, WITOLD KLAWE

### Przegląd metod laboratoryjnych stosowanych w diagnostyce dysenterii świń

Z Instytutu Fizjologii Zwierząt Wydziału Weterynaryjnego AR w Warszawie

Wobec częstych trudności w diagnozowaniu dysenterii świń, na podstawie obrazu klinicznego i zmian anatomopatologicznych, laboratoryjne metody diagnostyczne mogą spełniać dużą rolę w diagnostyce różnicowej tej choroby. Dużą trudność w ustaleniu niezawodnych metod diagnostycznych stanowi fakt, że etiologia procesu chorobowego nie jest dotychczas wyjaśniona.

Po raz pierwszy dysenteria została opisana w 1921 r. w USA przez Whiting'a, Doyle'go i Spray'a a w Europie w 1944 r. przez Manninger'a (9), który sugerował wirusowe tło schorzenia. Schmid i Klinger (13) uważali, że przyczyną dysenterii jest infekcja *Vibrio coli*. Pogląd ten dominował w zasadzie do końca lat sześćdziesiątych, wielu badaczy wskazywało jednak na inne drobnoustroje jako czynniki etiologiczne (8, 14).

Pod koniec lat sześćdziesiątych Terpstra postawił hipotezę o etiologicznej roli spirochet (17). Stwierdził on w kale chorych zwierząt „krętkowate mikroorganizmy”. Odkrycie jego potwierdzili Tesauro Vallejo (19), dając krótką charakterystykę tych mikroorganizmów oraz Roberts i Simon (12), a później Espinanse i Radon (4). Blakemore i Taylor (1) donieśli, że u doświadczalnie zarażonych świń spirochety można było znaleźć nie tylko w kryptach śluzówki, lecz również wewnątrz komórek nabłonka jelit. W 1970 r. Taylor (15) opisał udany eksperyment wyizolowania spirochet, a w 1971 r. Taylor i Alexander (16) przeprowadzili dwa eksperymenty z izolowanymi spirochetami.

Objawy dysenterii u świń doświadczalnych wystąpiły w 8—11 dni od momentu zakażenia. Również Harris i wsp. (6) wyizolowali ze ślu-

zówki chorobowo zmienionych jelit pochodzących od świń chorych na dysenterię „małą” i „dużą” spirochety. Dużym spirochetom autorzy dali nazwę *Treponema hyodysenteriae*.

Doświadczalne świny, które otrzymywały *Treponemy* w formie czystej kultury lub w kombinacji z *Vibrio coli* reagowały klinicznymi zmianami charakterystycznymi dla dysenterii.

Znaczenie spirochet (*Treponema hyodysenteriae*) w etiologii dysenterii świń potwierdził Glock (5). Przeprowadzał on badania w 6-ciu grupach zwierząt zakażonych doustnie zawartością okrężnicy i zeszkrobinami śluzówki pochodzącymi od świń chorych. W śluzówce okrężnicy wszystkich zwierząt zakażonych znajdował duże spirochety, nie było ich natomiast w grupie kontrolnej. Stwierdził on również, że duże spirochety można znaleźć nawet na trzy dni przed wystąpieniem objawów klinicznych.

Na ostatnim Kongresie IPVS (1974) Brandenburg (2) przedstawił wyniki doświadczeń dotyczących wywołania dysenterii za pomocą *Treponema hyodysenteriae* i *Vibrio coli* u świń gnotobiotycznych. Stwierdził on, że ani *Treponema* ani *Vibrio* nie spowodowały wystąpienia choroby. W świetle najnowszych badań coraz więcej badaczy skłonnych jest uważać, że bezpośrednim powodem wystąpienia dysenterii są warunki środowiskowe (10) i jest to choroba dużych ferm i tuczarni, natomiast różnego rodzaju mikroorganizmy towarzyszące tej jednostce, spełniają rolę czynników wtórnych, zachowują się one jednak w trakcie inkubacji i przebiegu choroby na tyle charakterystycznie (3), że współczesna diagnostyka laboratoryjna opiera się głównie na obserwacji tych czynników. Brane są tu przede wszystkim pod uwagę

*Treponema hyodysenteriae* i *Vibrio coli*. Materiał do badań stanowi ściana jelita grubego i ślepego, treść pokarmowa i surowica chorych zwierząt. Metodami obserwacji i wykazywania obecności wtórnych czynników etiologicznych będą: barwienia prep. histologicznych, treści jelita i obserwacje drobnoustrojów pod mikroskopem optycznym i elektronowym, izolacja i namnażanie *Vibrio* i *Treponem*, fluorescencyjna metoda wykazywania *Treponem* w kale chorych zwierząt, hemaglutynacja surowicy świń badanych z antygenem pochodzącym z patogennych szczepów spirochet.

Barwienie, izolacja i hodowla *V. coli* są już ogólnie znane. W poniższym opracowaniu podany jest zarys mniej znanych metod postępowania, mających na celu wykazanie w materiale badanym *Treponema hyodysenteriae*, ponieważ ten drobnoustrój uważany jest nadal za istotny czynnik diagnostyczny.

Najlepszą, bo stosunkowo prostą i dającą dobre efekty, wydaje się być met. barwienia *Treponem* za pomocą Victoria Blue 4-R opisana przez Olsona (11). Metoda ta może być również stosunkowo łatwo dostosowana do pracy z odczynnikami ogólnie dostępnymi na rynku krajowym.

#### I. Barwienie Victoria Blue.

Jest to proste barwienie, przy pomocy którego można obserwować spirochety w gruczołach śluzowych w histologicznych preparatach okrężnicy świń chorych na dysenterię.

#### Materiał i metody

Chorobowo zmieniony odcinek okrężnicy umieszcza się w 10% buforowanej formalinie, następnie odwadnia przy pomocy odczynnika Dehydrant (może być alkohol etylowy), przejaśnia za pomocą Clearing Agent (można tu użyć ksylenu) i utwardza przez nasączenie preparatem Paraplast (lub parafiną w temp. 55°C). Mikrotomen tnie się preparat na skrawki o grubości 6  $\mu$ , które następnie odparafinowuje się i suszy na powietrzu. Skrawki zalewa się 0,5% wodnym roztworem barwnika Victoria Blue 4-R na okres 3 min. Następnie preparaty przepłukuje się wodą destylowaną, odbarwia za pomocą 0,05% kwasu siarkowego przez około 15 sek. i ponownie przepłukuje wodą. Tak przygotowane preparaty nawarstwia się natychmiast żelazem glicerynowym lub poliwinylpyrolidonem.

#### Wyniki i omówienie

Mikroorganizmy barwione za pomocą Victoria Blue 4-R były wyraźnie widoczne w świetle słuzówki okrężnicy świń chorych, podczas gdy w preparatach porównawczych barwionych hematoksyliną i eozyną były one widoczne znacznie słabiej. U świń z uporczywą biegunką, trwającą dłuższy czas, liczba mikroorganizmów była mniejsza. Barwione spirochety miały średnicę od 0,3  $\mu$ , długość do 10  $\mu$  i były podobne do mikroorganizmów opisywanych już przez innych badaczy (1, 4, 6, 12, 17, 19).

Umieszczenie preparatów w 10% buforowanej formalinie zwiększa intensywność barwienia. W barwionych preparatach można znaleźć kryształki o nieokreślonej strukturze. Są to twory powstające pod działaniem barwnika.

II. Obserwacje pod mikroskopem elektronowym.

Obserwacje pod mikroskopem elektronowym mają duże znaczenie w identyfikacji spirochet

zarówno z izolowanych hodowli, jak i skrawków histopatologicznych okrężnicy oraz treści jelitowej chorych świń. Większość autorów stosuje w mikroskopii elektronowej barwienie PTA (phosphotungstic acid stain). Olson (11) oglądając cienkie skrawki preparatów pochodzących od świń chorych na dysenterię stwierdza, że spirochety zbudowane są z cylindra protoplazmatycznego zawierającego włókienka osiowe, otoczonego cienką otoczką. Harris i Glock (6) stwierdzają u „małych spirochet” obecność jednego lub dwóch włókieńek osiowych wychodzących z każdego końca cylindra protoplazmatycznego. Włókienka osiowe pokrywają się w centrum cylindra w układzie 1-2-1 lub 2-4-2, średnica komórki wynosi 0,24 — 0,30  $\mu$ .

Małe spirochety barwione PTA przypominają nieruchome spirochety typu „b” opisywane uprzednio przez Taylora. Obserwacje „dużych spirochet” wykazywały obecność od 7 do 9 włókieńek wychodzących z każdego końca cylindra w układzie 7-14-7 lub 9-18-9, a średnica komórki wynosi 0,29 — 0,38  $\mu$  w najgrubszym miejscu. Duże spirochety podobne były pod względem morfologicznym do spirochet opisywanych przez Taylora i Blakemorea, którzy donieśli, że spirochety typu „a” czyli tzw. duże (*Treponema hyodysenteriae*) występują tylko u świń chorych.

#### III. Metoda fluorescencji.

W 1968 r. holenderscy badacze Terpstra i Akkermans (17) próbowali zastosować do diagnostyki dysenterii metodę immunofluorescencyjną. Wytraćili oni z surowicy świń z chroniczną formą dysenterii immunoglobulinę. Immunoglobulina ta łączona była z izothiocyjanatem fluoresceiny i dodawana do wymazów kału i treści przewodu pokarmowego chorych i zdrowych świń. Stwierdzono swoistą fluorescencję tylko u świń zakażonych i była ona ściśle związana z organizmami, które określono jako „spirochetopochodne”.

Nie wykazano reakcji z fluoresceiną w kale zdrowych świń ani z organizmami z gr. *Vibrio* sp. Metoda ta nie została jednak jeszcze dokładnie dopracowana i na razie nie znajduje jeszcze zastosowania jako pewna metoda diagnostyczna.

#### IV. Metoda hemaglutynacji.

Próbowano także włączyć do metod diagnostycznych i testy hemaglutynacyjne. Hunter i Saunders (7) w 1973 r. opisuja próbę wykorzystania testu hemaglutynacyjnego do diagnozy dysenterii. Test aglutynacyjny przeprowadzili oni w 15 stadach świń na płytkach aglutynacyjnych WHO. Antygen pochodził z patogennych szczepów spirochet. 261 badanych surowic otrzymanych było od świń w wieku 18 tyg. podczas uboju z wyjątkiem próbek pochodzących z jednej fermi od żywych świń w wieku 5 tyg.

Próbki podzielono na trzy grupy:

1. od stad, w których notowano dysenterię,
2. od stad, w których badaniami klinicznymi nie stwierdzono dysenterii,
3. od stad wolnych od specyficznych czynników patogennych.

Wyniki wykazały, że największy stopień hemaglutynacji posiadały stada, u których uprzednio stwierdzono dysenterię, a najniższą hemaglutynację wyka-

zała grupa 5-cio tygodniowych świń, które nie miały jeszcze kontaktu z dysenterią.

Badacze sugerują, że po dopracowaniu tej metody i dokładnym określeniu, jaki najniższy stopień aglutynacji może być traktowany jako wynik dodatni, metoda ta mogła by mieć zastosowanie do diagnozowania dysenterii w stadach.

V. Izolacja i namnażanie spirochet od zwierząt chorych na dysenterię.

Spirochety, które są zwykle obecne w jelicie grubym człowieka i zwierząt były mało poznane z powodu trudności w izolacji i rozmnażaniu ich w warunkach „*in vitro*”. Spirochety były już izolowane z prostnicy myszy, ale nie było konkretnych prób izolowania i identyfikacji tych organizmów z jelita grubego innych zwierząt. Dopiero gdy skojarzono obecność spirochet z występowaniem dysenterii badacze zainteresowali się hodowlą tych mikroorganizmów. Były to jednak jedynie hodowle symbiotyczne (18).

Izolacja i hodowla czystej kultury udało się dopiero Harrisowi i wsp. w 1972 r. (6). Niżej opisaną metodą wyizolował on i wyhodował 4 rasy „dużych” i 4 rasy „małych” spirochet. Spirochety były izolowane od czterech świń. Każda świnka pochodziła z innego stada, a wiek ich różnicował się od 8 do 14 tygodni. Wszystkie świnki wykazywały objawy śluzowo-krwotocznego zapalenia jelita grubego. Badaniem mikroskopowym stwierdzono przekrwienie i obrzęk podśluzówki i śluzówki okrężnicy. Płytkie warstwy nekrotycznej tkanki pokryte były śluzowo-włóknikowymi pseudomembranami.

Do izolacji użyto 30 centymetrowych odcinków okrężnicy od każdej świnki. Po wzdłużnym rozcięciu nabłonek jelita usunięto za pomocą ostrza mikrotomu, umieszczono w moździerzku i emulsyfikowano za pomocą tuczka w roztworze fizjologicznym z buforem fosforanowym pH 7,4. Zawiesinę następnie odwirowano, a płyn nadosadowy przepuszczano przez serię filtrów miliporowych o średnicy od 5,0  $\mu$  do 0,45  $\mu$ , o kolejno malejących średnicach otworów.

Mikroskopowe obserwacje przesadzały obecność organizmów podobnych do *Vibrio* sp. i dwóch typów spirochet różniących się morfologicznie. Spirochety były ruchome i charakterystycznie skręcone. Duże spirochety były zwinięte luźnie, a małe ciasniej. Z filtratu zrobiono dziesięciokrotne rozcieńczenia w PBS (roztw. fizjol.+bufor fosforan). W celu izolacji małych spirochet materiał umieszczono w PRAS E-agarze (pre-reduced anaerobically sterilized) w probówkach w atmosferze CO<sub>2</sub>. Probówki poddano inkubacji przez pięć do ośmiu dni w temp. 37°C.

W celu izolowania dużych spirochet rozcieńczony materiał umieszczono w sterylizowanych płytkach Petriego. Płytki zalano następnie agarem tryptozowym z

dotądkiem 5% krwi bydlęcej z cytrynianem (TBA) w temp. 45°C.

Po zakrzepnięciu agaru płytki umieszczono w beztlenowym kontenerze i inkubowano w temp. 37°C przez 1 do 10 dni. *Vibrio* rośnie na obu pożywkach PRAS-agar i TBA, ale rozcieńczenie w PBS umożliwia rozdzielenie *Vibrio* od spirochet. Małe spirochety rosną początkowo jako małe kolonie kształtu łebka szpilki, stopniowo koncentrycznie się rozprzestrzeniając. W PRAS E-agarze rosną szybko, ale adaptują się także na pożywkę PRAS z ekstraktem drożdżowo-pentonowym, zawierającym inaktywowaną surowicę świńską w atmosferze azotu.

Duże spirochety wytwarzały w TBA strefy hemolityczne i czasami dawały się zauważyć w obrębie tych stref małe kolonie. Obserwacje mikroskopowe wykazywały w tych strefach obecność dużej liczby mikroorganizmów. Próby namnażania dużych spirochet na samej pożywce tryptozowej zakończyły się niepowodzeniem.

W diagnostyce laboratoryjnej dysenterii pamiętać trzeba, że wobec skomplikowanej i nie poznanej jeszcze dokładnie etiologii tego procesu chorobowego, obecnie stosowane metody diagnostyczne mają za zadanie wykazać pewne charakterystyczne zmiany, ilościowe i jakościowe, flory bakteryjnej w trakcie inkubacji i przebiegu choroby.

Dalsze postępy badań nad etiologią dysenterii powinny przynieść nowe, doskonalsze metody diagnozowania tego schorzenia, którego rola w krajowej gospodarce trzodą chlewną rośnie w miarę rozwoju hodowli wielkostatnej i tuczu przemysłowego.

#### Piśmiennictwo

1. Blakemore W. F., Taylor D. J.: Vet. Rec. 87, 59, 1970.
2. Brandenburg A. C.: Proc. III Congr. IPVS, Lyon 1974.
3. Elazhary Y.: Proc. III Congr. IPVS, Lyon 1974.
4. Espinase J., Redon P.: Vet. Rec. 86, 24, 1970.
5. Glock R. D.: Proc. II Congr. IPVS, Hannover 1972.
6. Harris D. L. i wsp.: Can. J. Comp. Med. 36, 74, 1972.
7. Hunter D., Saunders C. N.: Vet. Rec. 93, 107, 1973.
8. Kielstein P., Linke D., Günther H.: Mh. Vet.-Med. 26, 2, 55, 1971.
9. Manninger R.: Dt. tierärztl. Wschr. 52, 137, 1944.
10. Mazurczak J.: Medycyna Wet. 29, 449, 1973.
11. Olson L. D.: Am. J. vet. Res. 34, 853, 1973.
12. Roberts R. M., Simmons J. R.: Vet. Rec. 86, 22, 1970.
13. Schmid G., Klünger K.: Schweizer Arch. Tierheilk. 91, 4, 232, 1949.
14. Sienikov S. T.: Bolezni svinej, Selchoziz, Moskva, 1958.
15. Taylor D. J.: Vet. Rec. 86, 416, 1970.
16. Taylor D. J., Alexander T. J. L.: Br. Vet. J. 127, Ivii, 1971.
17. Terpstra J. I., Akkermans J. P., Ouwerkerk H.: Neth. J. vet. Sci. 1, 1, 5, 1968.
18. Terpstra J. I., Akkermans J. P.: XIX Congr. Mund. Med. Vet. Zootechn. Mexico 1971.
19. Vallejo M. T.: Vet. Rec. 85, 562, 1969.

Adres autora: prof. dr Jerzy Mazurczak, ul. Nowoursynowska 166, 02-766 Warszawa.

**BLUE J. L., DAWE D. L., GRATZEK J. B.:** Zastosowanie odczynu hemaglutynacji biernej do wykrywania przeciwciał przeciwko wirusowi bluetongue. (The use of passive hemagglutination for the detection of bluetongue viral antibodies). Am. J. vet. Res. 35, 139—142, 1974 (1).

Częściowo oczyszczony wirus bluetongue zastosowano do opłaszczania krwinek konia. Opłaszczane krwinki stosowano do wykrywania przeciwciał przeciwko temu wirusowi w surowicy owiec. Swoistość odczynu hemaglutynacji biernej potwierdzano odczynem zahamowania tego testu. Wirus stosowany do opłaszczania krwinek i zakażania owiec namnożono na jednowar-

stwowej hodowli nerki cielęcia (Madin-Derby BK). Surowice owiec zakażonych sztucznie reagowały w odczynie hemaglutynacji biernej w mianie 1:40 lub wyżej począwszy od 3 dnia po zakażeniu. Następnie miano przeciwciał wzrastało do 1:160 i utrzymywało się na tym poziomie do 42 dnia po zakażeniu. Po nadkażeniu obserwowano dwu — czterokrotny wzrost miana swoistych przeciwciał. Przy użyciu odczynu precypitacji dyfuzyjnej w żelu przeciwciała w surowicy zakażonych owiec wykrywano dopiero po 49 dniach po zakażeniu.

G.