

ZYGMUNT CYGAN

## Nekrotyczne zapalenie jelit u kurcząt

Zakład Higieny Weterynaryjnej, ul. Słowicza 2, 20-336 Lublin

Przemysłowy chów kurcząt rzeźnych pozwala uzyskiwać duże, i to w krótkim czasie, przyrosty masy ciała, ale jednocześnie sprzyja wybuchom nowych, mało znanych chorób zakaźnych, do jakich m.in. należy nekrotyczne zapalenie jelit — NZJ (łac. — *enteritis necroticans gallinarum*, ang. — *necrotic enteritis in broilers*). W warunkach powstających bowiem — na tle niefizjologicznego żywienia — zaburzeń homeostazy organizmu ograniczone stają się również jego możliwości przystosowawcze (19). W przypadku NZJ dotyczy to kurcząt szczególnie ras mięsnych, tj. cechujących się wyjątkowo szybkim wzrostem (36).

### Historia

Pierwszy opis choroby, która wybuchła w Anglii — podał w 1961 r. Parish (39). Następne doniesienia o występowaniu NZJ pochodzą z różnych kontynentów, tj. Australii (4, 17, 36), Ameryki (5, 18, 21), Azji (27) i Europy (23, 25, 35, 37), w tym także Polski (11, 12). Proces szerzenia się w świecie NZJ, przypadający w większości krajów na lata 1960—1970, początkowo wykazywał paralelizm z wprowadzaniem intensywnych systemów tuczu kurcząt, ale później zarysowały się tendencje spadkowe (19).

### Etiologia

Pewniejsze są poglądy wiążące nekrotyczne zapalenie jelit u kurcząt z działaniem beztlenowców *C. perfringens C*, a ściślej — z wytwarzaną przez nie letalną nekrotoksyną beta (11, 22, 23, 25, 36, 39). Mniej natomiast przekonują opinie o roli przyczynowej drobnoustrojów *C. perfringens A* (2, 5, 30, 46), a to

z powodu niestwierdzenia dotychczas w organizmie chorych ptaków jadu alfa (lecytynaza C), tj. głównej toksyny letalnej tego serotypu (32). Sugerowany związek niektórych szczepów — silnych producentów lecytynazy C — z chorobą (19) nie przesądza jeszcze o ich roli, zwłaszcza w świetle danych wskazujących na podobną aktywność izolatów pochodzących z tkanek całkowicie zdrowych zwierząt (8). Również niska moc enterotoksyny, produkowanej przez laseczkę zgorzeli gazowej (33, 34), i słaba na nią wrażliwość kurcząt (38), wyklucza raczej jej znaczenie w etiologii NZJ (2). Zatem obraz choroby i śmierć ptaka jest następstwem dominujących oddziaływań toksyny beta *C. perfringens C* (39, 45).

Formułę toksynogenności szczepów *C. perfringens C* — wyosobnionych w naszym kraju od kurcząt — charakteryzuje toksyna beta, stwierdzana w hodowli bakteryjnej w koncentracji 1000 DLM<sub>100</sub>/ml (przy 5 godzinnej inkubacji), a poza tym czynnik ni (dezoksyrybonukleaza) w wysokim mianie 1/1024 — 1/2048 i w niskim, tj. nie przekraczającym 1/16 również antygen alfa, mianowany enzymatycznie jako lecytynaza (12). Ciepłooporność drobnoustrojów izolowanych od ptaków w Anglii (100°C w ciągu 2 godzin) oraz zespół produkowanych przez nie toksyn sprawia, że są one nie do odróżnienia od szczepów *C. perfringens C* (podgrupa 2a) wyosobnionych w Europie z przypadków NZJ u człowieka (14, 47, 48). Izolaty natomiast pochodzące od mieszkańców z Nowej Gwinei (podgrupa 2b), chorujących z objawami nekrotycznego zapalenia jelit cechuje brak termorezystentnych endospor i szerszy skład antygenów ubocznych (dodatkowo teta oraz mi). Dane te są zestawione w tab. 1.

Tab. 1. Antygeny toksyczne szczepów pochodzących z różnych przypadków NZJ u ptaków oraz człowieka

Serotyp toksyczny	Podgrupa	Pochodzenie	Antygeny toksyczne								Ciepłooporność endospor		
			główne		uboczne								
			alfa	beta	gamma	delta	eta	teta	kappa	lambda		mi	ni
C	2a	Anglia (ptaki, człowiek)	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	c+
	2b	Nowa Gwinea (człowiek)	+	+	nb	-	-	+	?	-	+	nb	c-

Objaśnienia: + — wytwarzanie toksyny, c+ — wytwarzanie ciepłoopornych endospor, — — niewytwarzanie toksyny, c- — niewytwarzanie ciepłoopornych endospor, nb — niebadano.

### Patogeneza

Nekrotyczne zapalenie jelit przedstawia w większości przypadków typową enterotoksemię, którą cechuje gwałtowne namnożenie w jelicie laseczek *C. perfringens* C wraz z wytworzeniem letalnej i łatwo adsorbowanej do krwi toksyny beta (36, 39, 48).

W złożonym patomechanizmie NZJ dostrzec można koincydencję różnorodnych czynników wzajemnie ze sobą skorelowanych we wpływie na makroorganizm, rozwój zarazka i wytworzoną toksynę (9,10). Wzrost liczby zarazka inicjuje staza jelitowa wywołana nadmiernym spożyciem przez ptaki paszy o dużej zawartości skrobi i białka, a szczególnie mączki rybnej (20, 36). W warunkach przekarmienia proces rozpadu skrobi zatrzymuje się na etapie dekstryn, co — jak można sądzić z badań Logana (28) — potencjuje toksynogenność beztlenowców *C. perfringens* C. Szybkość ich rozwoju warunkuje nadto sprawność naturalnego systemu regulacji liczby *C. perfringens* C determinowana inhibicyjnym wpływem lizolecytyny powstałej w rezultacie działania lecytynazy A zawartej w soku trzustkowym na lecytynę obecną w żółci (10). Dłużej trwający stan stazy jelitowej wzmacnia akumulację wytworzonej toksyny beta i przyspiesza jej działanie. Powstałe w międzyczasie zaburzenia w kwasowości środowiska jelit, głównie w kierunku jego alkalizacji, stymulują wzrost zarazka, ale jednocześnie wzmagają również aktywność trypsyny inaktywującej antygen beta (13). Takie odchylenia w pH są możliwe w warunkach nagłych przejść ptaków od względnego głodowania, zdarzającego się przy zbyt dużym zagęszczeniu stada (44), do okresowego ich przekarmienia (10).

Dodatkową predyspozycję w patogenezie NZJ stanowi uszkodzenie błony śluzowej wywołane kokcydiozą (1, 18). Powstająca anoksja i spadek Eh sprzyjają rozwojowi zarazków, a w konsekwencji możliwe staje się ich wniknięcie wraz z toksyną do krwi (22). Szczególnie predystrybuowanym miejscem (*locus minoris resistentiae*) dla rozwoju nekrotycznego zapalenia jelit jest uchyłek Meckela (*diverticulum Meckel*), w którym naturalny zastój treści pokarmowej sprzyja rozmnożeniu laseczek *C. perfringens* C. Podkreślić należy, że ich liczba w rozwiniętym stadium choroby osiąga wysoką koncentrację, tj.  $10^8$  —  $10^9$ /g zawartości jelita (46).

### Przebieg kliniczny

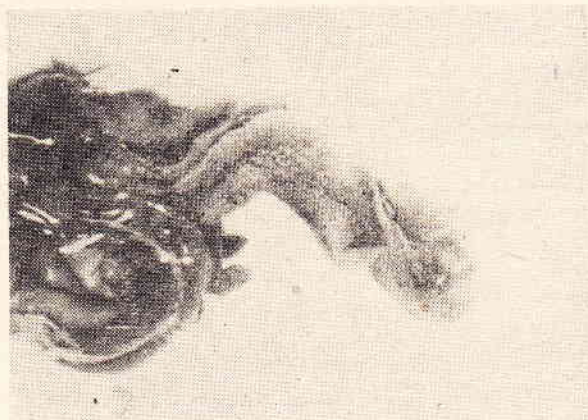
Choroba atakuje najczęściej dobrze odżywione kurczęta (36, 39, 40, 41), w szerokim przedziale wiekowym od 10 do 56 dni (19), ale apogeum zachorowań przypada na 3 — 4 tydzień życia (6, 24, 25, 36). O wiele rzadziej natomiast pojawia się u kur i to tylko w po-

czątkowym okresie ich nieśności (6, 26). W większości przypadków NZJ przebiega w formie nadostrej, na ogół bez charakterystycznych objawów klinicznych. Na pełny bowiem obraz choroby składają się jedynie krótkotrwałe stany depresji i apatii oraz biegunka, przy czym kał jest płynny, biało-szary, kiedy indziej suchy i ciemny, niekiedy tylko podbarwiony krwią (1, 18, 39). Choroba trwa krótko, zwykle kilka godzin, a śmierć ptaków poprzedzają dryblujące ruchy kończyn (36).

W niektórych stadach obserwowano tendencję do nawrotów zachorowań (19). Śmiertelność — w przypadkach nieleczenia — równa się zachorowalności i osiąga praktycznie 100% (5, 6, 31). Rozmiary strat są zróżnicowane i w poszczególnych stadach kształtują się od 0,5% do 12% (17, 19), aczkolwiek mogą one osiągać nawet 40% (26). U chorujących kur spada nieśność, a gwałtownym padnięciom towarzyszą również subkliniczne zakażenia (19). Enzootie nekrotycznego zapalenia jelit są rejestrowane w różnych porach roku, chociaż może nieco częściej występują w lecie (6, 29).

### Zmiany chorobowe

Padle na NZJ ptaki wykazują przy braku wychudzenia — znaczny stopień odwodnienia tkanek (30). W typowym przebiegu, tj. toksemicznym, obserwowane są suche naloty martwicze, zwykle zielonkawe, rzadziej szare, pokrywające błonę śluzową jelita czczego i biodrowego (11), a wyjątkowo również dwunastnicy (ryc. 1), co wynikać może z zaburzeń w dopływie soku trzustkowego przewodem Wirsunga, wywołanych skurczem zwieracza Odiego w brodawce Vatera. Zatem wysuwany pogląd o bezwzględnej inaktywacji przez trypsynę toksyny beta *in situ* wydzielania tego enzymu nie jest taki pewny (3, 11). Obraz zmian chorobowych uzupełnia jeszcze zgrubienie ściany jelit cienkich oraz brak w przewodzie pokarmowym płynnej zawartości i gazu (9, 11). Ich pojawienie się wskazuje na etiologicznie odmienną in-



Ryc. 1. Martwica błony śluzowej dwunastnicy

fekcję z udziałem kokcydii i *C. perfringens* A. Zalegające światło jelit masy martwicze tworzą obumarłe komórki nabłonka oraz różne krwinki, a poza tym włókniki i wreszcie drobno-ustroje, głównie laseczki *C. perfringens* oraz oocysty *Eimeria* sp. (30). Przy dłuższym trwaniu choroby zniszczeniu ulega cały nabłonek kosmków jelitowych (*villi intestinales*) i podstawaowa ich struktura, jaką stanowi warstwa właściwa śluzówki (*lamina propria*). W konsekwencji tych uszkodzeń powstaje zahamowanie procesów wchłaniania.

W narządach mięszzowych nie stwierdza się natomiast wyraźnych odchyień od normy, poza niekiedy tylko spotykanym przekrwieniem wątroby i miernym obrzękiem śledziony (41). Apriorycznie zakładany brak w nich zmian mikroskopowych (18) podważył Parish (39), wykazując obecność mikroognisk nekrozy, a w naczyńkach zakrzepów (*thrombosis*).

Pewną osobliwość stanowi występowanie zmian destrukcyjnych obok mniej lub bardziej nasilonych procesów regeneracji nabłonka krypt Lieberkuhna (*cryptae intestinales*), czego przejawem jest pojawienie się komórek z różnymi stadiami mitozy (30).

### Rozpoznanie

Podjęzienie NZJ nasuwa zawsze toksemiczny przebieg choroby i obecność zmian martwiczych w przewodzie pokarmowym (39). Ostateczną jednak diagnozę umożliwia dopiero wyosobnienie beztlenowców *C. perfringens* C oraz stwierdzenie w zawartości jelit padłych ptaków toksyny beta i wysokiej koncentracji zarazka (11, 45).

Wykazanie obecności toksyny beta polega na przygotowaniu trypsynowanych i nie poddawanych działaniu tego enzymu wyciągów z treści jelitowej, a następnie na badaniu ich szkodliwości metodą próby biologicznej. Brak aktywności pierwszych ekstraktów wyklucza obecność jądów epsilon i jota, wytwarzanych przez *C. perfringens* B, D i E. Stwierdzenie natomiast, że wyciągi nietrypsynowane oddziaływały letalnie (śmierć myszy w ciągu kilku godzin) oraz nekrotyzującą (czerwona martwica skóry u świnki morskiej), a przy tym są neutralizowane surowicą przeciwzgorzelową B i C, dowodzi obecności w nich toksyny beta *C. perfringens* C.

Helmboldt i Bryant (18) zalecają różnicować NZJ przede wszystkim z tzw. chorobą przepiórek (quail disease), manifestującą się objawami wrzodziejącego zapalenia jelit (*enteritis ulcerosa*) oraz z kokcydiozą jelit cienkich podobną co prawda w obrazie sekcyjnym, ale różniącą się występowaniem martwicy wilgotnej (*necrosis humida*), a także odrębnym przebiegiem klinicznym i obecnością licznych oocyst *Eimeria* (sp.).

### Leczenie i zapobieganie

Beztlenowce *C. perfringens* wykazują wrażliwość na wpływ wielu antybiotyków i to z różnej generacji penicylin, tetracyklin oraz chloramfenikolu (6, 7, 15, 31, 43), a w mniejszym stopniu także związków furanowych (17, 36). Są natomiast względnie odporne wobec streptomycyny, neomycyny i kanamycyny (16). W ogólnej profilaktyce NZJ, jak również prowadzonej w ognisku choroby, zalecane jest podawanie z wodą do picia penicyliny w dawce 100 000 j.m./l, (31), lub oksytetracykliny (mepatar) w koncentracji 3 g/l przez 3 dni (11). Gorzej natomiast jest oceniany chloramfenikol (110 mg/l), pomimo dużej wrażliwości *in vitro* szczepów *C. perfringens*, co próbuje się tłumaczyć słabszą jego aktywnością w środowisku chorobowo zmienionych jelit (31). Nairn i Bamford (36) zalecają w celach profilaktycznych dodatek do karmy penicyliny lub siarczanu bacytracyny (200 g/l tonę), względnie furazolidonu (400 g/l tonę przez 5 dni). Poza tym ryzyko zachorowania ptaków znacznie obniża, jak wykazano w próbach doświadczalnych zakażeń (46), obecność w paszy linkomycyny (20 — 25 g/l tonę), lub w podobnej dawce avoparcyny (42).

### Piśmiennictwo

1. Al-Sheikhly F., Al-Saleg A.: Avian Dis. 24, 324, 1980.
2. Al-Sheikhly F., Truscott R. B.: Avian Dis. 21, 230, 1977.
3. Arabuckle J. B. R.: J. Path. 106, 65, 1972.
4. Bains B. S.: Aust. vet. J. 44, 40, 1968.
5. Bernier G., Fillion R.: J. Am. vet. med. Ass. 152, 1896, 1971.
6. Bernier G., Phaneuf J. B., Fillion R.: Can. J. comp. Med. 38, 280, 1974.
7. Biobel H., Schlessner T.: Handbuh der bakteriellen infektionen bei Tieren, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena 1931.
8. Cygan Z.: Clostridia w narządach zwierząt zdrowych i padłych. Praca dokt., Lublin 1967.
9. Cygan Z.: Drob. 22, 17, 1974.
10. Cygan Z.: Medycyna Wet. 30, 139, 1974.
11. Cygan Z., Nowak J.: Medycyna Wet. 30, 209, 1974.
12. Cygan Z., Nowak J.: Medycyna Wet. 30, 262, 1974.
13. Dalling T., Ross H. E., Dave D.: Poult. Sci. 50, 737, 1971.
14. Diekmann C.: Br. med. J. i, 270, 1949.
15. Eleazer T. H., Harrell J. S.: Avian Dis. 20, 774, 1976.
16. Finegold S. M., Miller L. G.: J. Bact. 94, 1443, 1967.
17. Gardiner M. R.: Aust. vet. J. 43, 359, 1967.
18. Helmboldt C. F., Bryant E. S.: Avian Dis. 15, 775, 1971.
19. Hogg P., Muller J.: The present of haemorrhagic necrotizing enteritis and botulism. W: IV Symp. of the Commission for the study of animal diseases caused by anaerobes, Paris 1982, s. 45.
20. Johanson D. C., Pinedo C.: Avian Dis. 15, 835, 1971.
21. Julian R. J.: Quarterly Bulletin 4, nr 2, Toronto 1969, s. 2.
22. Katitch R., Chibalitch S., Kositch L. J., Voukitchovitch Z., Djoukitch B., Tomanovitch B.: Bull. Acad. vet. Fr. 39, 101, 1966.
23. Katitch R., Kositch L., Djoukitch B., Voukitchevitch Z., Tchavitch B.: Recl. Méd. vét. 141, 1019, 1965.
24. Kohler B., Kolbach B., Bauman S., Wodarra A.: Mh. Vet.-Med. 29, 420, 1974.
25. Kohler B., Kolbach S., Meine J.: Mh. Vet.-Med. 29, 335, 1974.
26. Kohler B., Marx G., Kolbach S., Bottcher E.: Mh. Vet.-Med. 29, 330, 1974.
27. Kwatra M. S., Chaudhury B.: Avian Dis. 20, 401, 1976.
28. Logan M. A., Tytell A. A., Danielson J. S., Griner A. M.: J. Immun. 51, 317, 1945.
29. Long J. R.: Can. J. comp. Med. 37, 302, 1973.
30. Long J. R., Pettit J. R., Barnum D. A.: Can. J. comp. Med. 38, 467, 1974.
31. Long J. R., Truscott R. B.: Can. J. Comp. Med. 40, 53, 1976.
32. MacLennan J. D.: Bact. Rev. 26, 177, 1962.
33. McDonel J. L.: Infect. Immun. 10, 1156, 1974.
34. McDonel J. L., Duncan C. L.: Infect. Immun. 12, 1214, 1975.
35. McKay W. M.: Vet. Rec. 87, 366, 1970.
36. Nairn M. E., Bamford V. W.: Aust. vet. J. 43, 49, 1967.
37. Nilsson N. G.: Nekrotiserande enterit hos broiler i Sverigespatologisk anatomiska och histologiska undersökningar, w Proc. 11 th Nordic Vet. Congress, Bergen 1970, s. 41.

38. Nillo L.: Appl. Microbiol. 28, 889, 1974.  
 39. Parish W. E.: J. comp. Path. 71, 377, 1961.  
 40. Parish W. E.: J. comp. Path. 71, 394, 1961.  
 41. Parish W. E.: J. comp. Path. 71, 405, 1961.  
 42. Prescott J. F.: Avian Dis. 24, 1072, 1979.  
 43. Saunders J. R., Bickford A. A.: Avian Dis. 9, 317, 1965.  
 44. Shane S. M., Faber, G. L.: Vet. Rec. 87, 597, 1970.  
 45. Sterne M., Batty I.: Pathogenic Clostrida, Butterworths, London and Boston 1975.  
 46. Truscott R. B., Al-Shelkhy F.: Am. J. vet. Res. 38, 857, 1977.  
 47. Warrack G. H.: Bull. Off. int. Epizoot. 59, 1393, 1963.  
 48. Zeissler J., Rassfeld-Sternberg L.: Br. med. J. 1, 267, 1949.

Adres autora: prof. dr hab. Zygmunt Cygan, ul. Żelazowej Woli 6 m 13, 20-854 Lublin

STANISŁAW KOSTRZYŃSKI, KONRAD DZIĄBA

## Próba swoistego zapobiegania kolibakteriozie prosiąt osesków

Katedra Epizootiologii Wydziału Weterynaryjnego SGGW-AR, ul. Grochowska 272, 03-849 Warszawa

Duże znaczenie w zapobieganiu kolibakteriozie prosiąt osesków ma wartość biologiczna siary i mleka macior, a szczególnie zawartość swoistych przeciwciał. Od wartości tej zależy stopień odporności biernej prosiąt. Obserwacje terenowe wskazują, że odporność ta nie zawsze zabezpiecza przed zachorowaniem prosiąt w pierwszych dniach życia. Najczęstszą przyczyną biegunek w tym okresie jest patogenna pałeczka *E. coli*. Aby podwyższyć poziom przeciwciał w siarze w kierunku kolibakteriozy, szczepi się obecnie maciory w końcowym okresie ciąży szczepionką Colivac.

W Anglii Chidlow i wsp. (2) wprowadzili do praktyki kombinowane szczepienia doustne i parenteralne macior uzyskując dobre wyniki w zapobieganiu kolibakteriozie prosiąt. Podobne wyniki uzyskali Kohler i wsp. (5) podając z karmą maciorom żywe, patogenne pałeczki *E. coli*. Natomiast Baljer i wsp. (1) wykazali, że podanie *E. coli* w dawce  $10^{10}$  bakterii/ml wyzwała w przewodzie pokarmowym prosiąt odporność mniejszą.

Celem pracy było określenie wartości różnych metod immunizacji macior i prosiąt w zapobieganiu kolibakteriozie prosiąt w warunkach terenowych.

### Materiał i metody

Badania przeprowadzono w ciągu 4 lat na 830 prosiątach pochodzących od 78 macior w gospodarstwie K. Warunki chowu były niezadowalające. Maciory żywno odpadami kuchennymi ze stołówek zakładów pracy i przedszkoli, uzupełnione paszą treściwą. Okre-

sowo dodawano premiksy do paszy, a w okresie od wiosny do jesieni uzupełniano ją zielonką z traw lub lucerny. Rozpoznanie kolibakteriozy oparto na badaniu klinicznym, anatomopatologicznym i bakteriologicznym. Autoszczepionkę sporządzano ze szczepów *E. coli* O149 K91 K88 i O138 K81 izolowanych od padłych prosiąt. Po inkubacji przez 24 godziny i po określeniu gęstości hodowli bulionowej szczepionkę inaktywowano przez kilkunutowe gotowanie, następnie ustalano jej gęstość na  $1 \times 10^{10}$  bakterii/ml. Tab. 1. przedstawia schemat uodporniania macior i prosiąt.

W doświadczeniu pierwszym w grupie I 10 macior na 2—3 tygodnie przed wyproszeniem otrzymywało z karmą pięciokrotnie co drugi dzień szczepionkę w dawce  $5 \times 10^{10}$  bakterii/ml.

W grupie II było 16 macior, które podobnie jak grupa I otrzymywały z karmą szczepionkę. Prosiąta (142 szt.) w okresie od 2 do 11 dnia życia, a więc przez 10 dni, otrzymywały indywidualnie strzykawką z wężykiem szczepionkę w dawce  $1 \times 10^{10}$  bakterii/ml. Grupa III, licząca 12 macior i 115 prosiąt, stanowiła kontrolę.

W doświadczeniu drugim (tab. 2) oprócz szczepienia czynnego macior i prosiąt doustnie (grupa II), prosiąta grupy I i II zaraz po urodzeniu otrzymywały w iniekcji podskórnej 10 ml krwi macior lub podawano im w 1 i 3 dniu surowicę macior (konserwowaną fenolem do 0,5%) w dawce 5 ml/prosię. Prosiąta grupy III (126 szt.) stanowiły kontrolę.

Przy ocenie klinicznego przebiegu zachorowań prosiąt z objawami biegunki wyróżniono, podobnie jak to czynili Baljer i wsp. (2): a) biegunkę o przebiegu lekkim, obejmującą najczęściej kilka prosiąt w miocie, krótkotrwałą (1—3 dni), na ogół bez objawów ogólnych, b) biegunkę o przebiegu ciężkim — długotrwałą — obejmującą najczęściej cały miot, przy której obserwowano — obok częstego oddawania wodnistego kału — posmutnienie, postępujące odwodnienie ustrój, podwyższoną, a następnie obniżoną ciepłotę ciała. Pomimo leczenia przypadki te często kończyły się śmiercią prosięcia. Do oceny statystycznej wyników zastosowano test  $\chi^2$ .

Tab. 1. Wyniki doustnego uodporniania macior i prosiąt ssących autoszczepionkę *E. coli*

Grupa	Liczba macior	Uodpornione doustnie autoszczepionką <i>E. coli</i> (tak +, nie -)	W pierwszych 2 tygodniach życia			W 3 - 6 tygodniu życia			Łączne prosiąt do 6 tyg życia %		
			Liczba prosiąt	Zachorowało z objawami biegunki o przebiegu ciężkim %	lekkiem %	padło %	Liczba prosiąt	Zachorowało z objawami biegunki o przebiegu ciężkim %		lekkiem %	padło %
I	10	+	98	16,3 <sup>**</sup>	20,4	12,2 <sup>*</sup>	86	25,6	16,3	5,8	17,3
II	46	+	142	16,9 <sup>**</sup>	4,9 <sup>**</sup>	9,2 <sup>*</sup>	129	10,8 <sup>*</sup>	16,3	3,9	12,7 <sup>*</sup>
III	12	-	115	48,7	-	19,1	93	41,0	18,2	12,9	29,5

Objasnienia: \*\* — istotność różnic przy  $p \leq 0,01$ , \* — istotność różnic przy  $p \leq 0,05$ .