

8. Doll E. R., Knappenberger R. E., Bryans J. T.: Cornell Vet. 47, 69, 1957.
9. Fukunaga Y., McCollum W. H.: Am. J. vet. Res. 38, 2343, 1977.
10. Gólnik W., Michalak T.: Medycyna Wet. 35, 105, 1979.
11. Gólnik W., Michalska Z., Michalak T.: Schweiz. Arch. Tierheilk. 123, 523, 1981.
12. Gólnik W., Moratillon A., Gólnik J.: J. Vet. Med. B 33, 413, 1986.
13. Gólnik W., Pawęska J., Dziś W.: Ogier potencjalnym źródłem zakażenia wirusem zapalenia tętnic koni. Medycyna Wet. 1991 (w druku).
14. Gólnik W., Pawęska J.: Występowanie zakażeń wirusem zapalenia tętnic u koni z różnych stadnin. Medycyna Wet. 1991 (w druku).
15. Gólnik W., Pawęska J., Dziś W.: Katedra Mikrobiologii Weterynaryjnej AR Wrocław 1991, dane niepubl.
16. Herbst W., Schliesser Th.: J. Vet. Med. B 34, 283, 1987.
17. Horzinek M. C.: Non-arthropod-borne Togaviruses. Academic Press, London 1981.
18. Jaksch W., Siballin M., Taussin E., Pichler L., Bürki F.: Dt. tierärztl. Wschr. 80, 317, 1973.
19. Kaaden O. R., Hass L., Kiopries M.: Wien. tierärztl. Mschr. 76, 475, 1989.
20. Kölbl S., Schuller W., Pabst J.: Dt. tierärztl. Wschr. 98, 43, 1991.
21. Lang G., Mitchel W. R.: J. Equine Vet. Sci. 4, 153, 1984.
22. Liebermann H.: Arch. exp. VetMed 42, 265, 1988.
23. McCollum W. H.: J. Am. vet. med. Ass. 155, 318, 1969.
24. McCollum W. H., Prickett M. E., Bryans J. T.: Res. vet. Sci. 2, 459, 1971.
25. McCollum W. H., Swerczek T. W.: J. Equine Med. Surg. 2, 293, 1978.
26. Moratillon A., Moratillon R.: Anns Rech Vét. 9, 43, 1978.
27. Moratillon R., Moratillon A.: Recl. Méd. vét. 150, 1015, 1974.
28. Mumford J. A.: Equine vet. J. 17, 5, 1985.
29. Murphy T. W., Timoney P. J., McCollum W. H.: Proc. 5th Int. Conf. Equine Infectious Diseases, Kentucky 1988, s. 3.
30. Noseto E. O., Etcheverrigary M. E., Oliva G. A., Gonzalez E. T., Samus S. A.: Zentbl. Vet Med B 31, 525, 1984.
31. Timoney P. J., McCollum W. H.: Equine Vet. Sci. 8, 54, 1988.
32. Timoney P. J., McCollum W. H., Roberts A. W.: The blood horse 38, 5892, 1985.
33. Timoney P. J., McCollum W. H., Roberts A. W.: Proc. Am. Ass. Eq. Pract. 32, 57, 1986.
34. Timoney P. J., McCollum W. H., Roberts A. W.: Vet. Rec. 129, 382, 1987.
35. Timoney P. J., McCollum W. H., Roberts A. W., McDonald M. J.: J. Am. vet. med. Ass. 191, 36, 1987.
36. Timoney P. J., McCollum W. H., Roberts A. W.: Current strategies for the control of Equine Viral Arteritis. Proc. 92nd Annual Meeting of the United States Animal Health Ass., Little Rock, Arkansas 1988, s. 211.
37. Van Berlo M. F., Horzinek M. C., Van der Zeijst B. A. M.: Virology 118, 345, 1982.
38. Van der Zeijst B. A. M., Horzinek M. C., Moennig V.: Virology 68, 418, 1975.
39. Westway E. G., Brinton M. A., Gaidamovich S. Ya., Horzinek M. C., Igarashi A., Kaariainen L., Lvov D. G., Porterfield J. S., Russel P. K., Trent D. W.: Togaviridae. Intervirology. 24, 125, 1985.

Adres autora: doc. dr hab. Witold Gólnik, ul. 1 Dywizji, 51-627 Wrocław

JANUSZ ANDZIAK, ZBIGNIEW ANUSZ, ANTONI JAKUBCZAK

Ocena chorobotwórczości *Aeromonas hydrophila* izolowanych od ryb na terenie województwa olsztyńskiego

Katedra Epizootologii i Klinika Chorób Zakaźnych Wydziału Weterynaryjnego AR-T, ul. Oczapowskiego 13, 10-957 Olsztyn-Kortowo II

Summary

Evaluation of pathogenic *Aeromonas hydrophila* isolated from fish in the Olsztyn province

The evaluation of potential pathogenicity of *A. hydrophila* strains isolated from healthy fish was carried out on the basis of their ability to produce enterotoxins, beta-haemolysins and to haemagglutinate blood cells in humans and guinea pigs.

The studies comprised 29 strains of *A. hydrophila* isolated from 67 fish from 6 fish-breeding stations in the Olsztyn province. No correlation was found between the ability of the examined strains to agglutinate human and guinea pig erythrocytes, and the enterotoxicity and hemolytic activity. Some correlation was found between the enterotoxicity of the strains and their hemolytic activity.

Incubation of *A. hydrophila* strains at temp. 25°C allows to detect more enterotoxic strains (31% strains) than at temp. 37°C (13% strains).

Intensywne badania nad patogennością *Aeromonas hydrophila* rozpoczęto w latach osiemdziesiątych po izolacji tej bakterii z przypadków zakażeń i zatrueń pokarmowych u ludzi (5, 10, 12). W poszukiwaniu naturalnego rezerwuaru tego gatunku poddano również badaniom w kierunku toksyczności szczepy izolowane ze środowiska (1, 15, 16, 17). Żywność także została poddana badaniom na obecność tego drobnoustroju, a szczególnie mięso zwierząt hodowlanych (17, 18). Szczególną uwagę w ostatnim okresie zwrócono na ryby, dla których *A. hydrophila* jest patogenny oraz z powodu nosicielstwa tej bakterii, jakie spotykane jest u różnych gatunków ryb hodowlanych oraz dziko żyjących (3, 13, 19, 21).

Badania nad chorobotwórczością szczepów izolowanych od ryb dotyczyły głównie wytwarzania przez nie toksyn o charakterze białkowym, tj. enterotoksyny cyto-

toksycznej, toksyny analogicznej do przecinkowca cholery, beta-hemolizyny (14, 18, 19). Niektórzy autorzy wykazali istnienie koleracji pomiędzy wytwarzaniem toksyn a właściwościami hemolitycznymi poszczególnych szczepów (18) lub wytwarzaniem beta-hemolizyny a rozkładem arabinozy, sacharozy oraz syntezę elastazy (19). Burke i wsp. (5) również wykazali istnienie zależności pomiędzy enterotoksycznością szczepów a dodatnią reakcją Voges-Proskauer i niezdolnością do rozkładu arabinozy. Burke i wsp. (6) sugerują, aby zdolność do hemaglutynacji erytrocytów człowieka brać pod uwagę jako wskaźnik chorobotwórczości.

Celem pracy była ocena potencjalnej chorobotwórczości szczepów *A. hydrophila* izolowanych od zdrowych ryb na podstawie ich zdolności do wytwarzania enterotoksyn, beta-hemolizyn oraz hemaglutynacji krwinek ludzkich i świnki morskiej. Wykazanie potencjalnej chorobotwórczości *A. hydrophila* wyizolowanych od ryb wydaje się istotne, ponieważ ryby stanowią prawdopodobnie rezerwuuar i źródło zakażenia i zatrueń dla człowieka.

Materiał i metody

Badaniu poddano 29 szczepów *A. hydrophila* od 67 ryb pochodzących z 6 obiektów hodowlanych województwa olsztyńskiego. Wyizolowane szczepy były reidentyfikowane w Państwowym Zakładzie Higieny w Warszawie. Hemolityczną aktywność określano na podstawie wykrywania hemolizyn bezpośrednich. Do badań użyto podłoża TSA (trypcase Soy Agar) z dodatkiem 5% odwióknionej krwi baraniej i króliczej. Oznaczenia wykonano zgodnie z metodą Bieleckiej i wsp. (2). Aglutynację krwinek ludzkich i świnki morskiej w temperaturze 20°C i 4°C w obecności D. mannazy wykonano wg Evans i wsp. (9). Enterotoksyczność szczepów hodowlanych na podłożu TSB (Trypcase Soy Broth) w temp. 25°C i 37°C określano w teście na oseskach mysich wg Dean i wsp. (8) i Giannella i wsp. (11). Używano do badań 2—3-dniowych osesków mysich szczepu Balb/c,

które szczepiono dożołądkowo przez powłoki jamy brzusznej 0,1 ml supernatantu płynnej hodowli.

Wyniki i omówienie

Otrzymane wyniki przedstawia tabela 1. Spośród 29 badanych szczepów *A. hydrophila* 9 (31%) wytwarzało enterotoksynę w temperaturze 25°C, a 4 (13%) w temperaturze 37°. Dwa szczepy (7%) były enterotoksyczne zarówno w jednej, jak i drugiej temperaturze. Santos i wsp. (19) u 62% szczepów *A. hydrophila* izolowanych od ryb stwierdzili wytwarzanie enterotoksyn po 3 godz. w temperaturze 30°C w podobnym teście. Podobne wyniki wskazujące na inkubację myśzek w ciągu 3 godzin w temperaturze 28°C w celu wykrycia większej liczby enterotoksycznych szczepów otrzymali Burke i wsp. (4). Badania własne wykazały, iż inkubacja *A. hydrophila* w temperaturze 25°C daje większą wykrywalność enterotoksycznych szczepów niż temperatura 37°C.

Hemolityczną aktywność na podstawie wykrywania hemolizyn bezpośrednich wykazało 19 (65%) szczepów *A. hydrophila* w stosunku do krwinek baranich oraz 2 (7%) do krwinek króliczych. Osuchowska i wsp. (18) u 11 spośród 18 szczepów *A. hydrophila* izolowanych z mięsa ryb oraz wołowiny i wieprzowiny wykazali wytwarzanie beta-hemolizy. Szczepy izolowane od chorych wykazywały najwyższy odsetek właściwości hemolitycznych. Wadström i wsp. (22) taką cechę wykazywał

Tab. 1. Ocena chorobotwórczości *Aeromonas hydrophila* izolowanych od ryb hodowlanych z terenu województwa olsztyńskiego

Szczep Nr	Hemoliza krwinek		Aglutynacja krwinek		Enterotok- syczność w	
	baranich	króli- czych	ludzkich	świnki m.	25°	37°
P1/I	+	—	—	—	—	—
P2/VI	+	—	—	—	+	—
P3/I	+	—	—	—	—	—
P3/IV	—	—	MRHA	—	—	—
P5/VI	+	—	—	—	—	+
7/VIII	—	—	MRHA	—	—	—
62	+	—	MRHA	MSHA	+	—
25	+	—	—	—	+	+
26	+	+	—	—	—	—
27	+	—	—	—	—	—
30	+	—	—	—	+	—
31	+	—	—	—	+	—
32	+	—	—	—	—	—
33	—	—	MRHA	—	—	+
34	+	—	—	—	—	—
35	+	—	—	—	—	—
36	—	—	—	—	—	+
37	—	—	—	—	+	+
38	—	—	—	—	—	—
39	—	—	—	—	—	—
42	—	—	—	—	—	—
43	—	—	—	—	—	—
55	+	—	—	—	—	—
56	+	—	MRHA	—	+	—
58	—	—	—	—	+	—
60	+	—	—	—	+	—
61	+	+	—	—	—	—
63	+	—	—	—	—	—
66	+	—	—	—	—	—

Objaśnienia: MRHA — hemaglutynacja mannozooporna, MSHA — hemaglutynacja mannozowrażliwa.

u 90% szczepów *A. hydrophila* izolowanych z biegunek od ludzi. Szereg autorów wykazało wytwarzanie przez *A. hydrophila* hemolizyny alfa oraz beta. Boulanger i wsp. (3) u 61% szczepów izolowanych od ryb wykazali jednocześnie występowanie dwu typów hemolizy na podłożu agarowym z dodatkiem 5% krwi bydlęcej. Liczni badacze zwracają uwagę na istnienie korelacji pomiędzy enterotoksycznością szczepów *A. hydrophila* a ich aktywnością hemolityczną (1, 7, 19). Badania własne wykazały istnienie również pewnej zgodności między tymi cechami. Na 9 szczepów wykazujących enterotoksyczność w temperaturze 25°C 7 hemolizowało krwinki baranie.

Kolejnym wskaźnikiem wirulencji *A. hydrophila* jest zdolność do hemaglutynacji erytrocytów krwi różnych gatunków zwierząt w tym również i człowieka. W badaniach własnych 5 (17%) szczepów aglutynowało krwinki ludzkie w obecności D-mannozy (MRHA). Jeden zaś szczep wykazywał zahamowanie aglutynacji krwinek świnki morskiej w obecności tego węglowodanu (MSHA) w temp. 37°C. Sanyal i wsp. (20) u 75% szczepów *A. hydrophila* izolowanych od chorych stwierdzili zdolność do aglutynacji erytrocytów krwi ludzkiej w temp. 25°C w obecności toksyny, D-mannozy, D-glukozy, D-galaktozy i D-fruktozy. Odczyn ten jest przydatny w celu wykrycia fimbrii umożliwiających adhezję komórek bakteryjnych do erytrocytów. Na fimbriach zaś zlokalizowane są analogicznie jak u *E. coli* antygeny adhezyjne, mające duże znaczenie w kolonizacji błony śluzowej jelita przez *A. hydrophila* (14, 20).

Analiza wyników badań nie wskazuje na istnienie korelacji pomiędzy zdolnością badanych szczepów do aglutynacji erytrocytów ludzkich i świnki morskiej a ich enterotoksycznością i aktywnością hemolityczną.

Wnioski

1. Brak jest zależności między zdolnością badanych szczepów *A. hydrophila* do aglutynacji erytrocytów ludzkich i świnki morskiej a ich enterotoksycznością.
2. Szczepy enterotoksyczne *A. hydrophila* wykazują pewną zgodność z ich aktywnością hemolityczną.
3. Inkubacja szczepów *A. hydrophila* w temp. 25°C daje większą (31%) wykrywalność enterotoksycznych szczepów niż w temp. 37°C (13%).

Piśmiennictwo

1. Abbey S., Etang B.: Mikrobios. 58, 71, 1988.
2. Bielecka Z., Katuszewski S., Stypulkowska-Misiurewicz H.: Med. Dośw. 37, 67, 1985.
3. Boulanger Y., Lallier R., Cousineau G.: Can J. Microbiol. 23, 1161, 1977.
4. Burke V., Robinson J., Berry R. J., Gracey M.: J. Clin. Microbiol. 14, 401, 1981.
5. Burke V., Gracey M., Robinson J., Pack D., Beaman J., Bunnell C.: J. Infect. Dis. 148, 68, 1983.
6. Burke V., Cooper M., Robinson J., Gracey M., Lesmana M., Echeverria P., Janda J.: J. Clin. Microbiol. 19, 39, 1984.
7. Burke V., Robinson J., Cooper M., Beaman J., Partridge K., Peterson D., Gracey M.: Appl. Environ. Microbiol. 47, 1148, 1984.
8. Dean A., China Y., Williams R., Harden L. B.: J. Infect. Dis. 125, 467, 1972.
9. Evans D. G., Evans D. J., Tjoa W.: Infect. Immun. 18, 339, 1977.
10. George W. L., Nakata M. M., Thompson I., White M.: Arch. Intern. Med. 12, 2207, 1985.
11. Giannella R. A.: Infect. Immun. 14, 95, 1976.
12. Goodwin C. S., Harper W., Stewart I. K., Gracey M., Burke V., Robinson J.: Med. J. Aust. 1, 53, 1983.
13. Jakubczak A., Anusz Z.: Proc. Internat. Symposium of Aeromonas and Plesiomonas. L-D — Skolen, Helsinger, Denmark, 5-6 September, 1990.
14. Jiwa S. F.: Vet. Microbiol. 1, 17, 1983.
15. San Joaquin V. H., Pickett D. A., Walch D. F., Finkhouse B. D.: J. Hosp. Infect. 13, 173, 1989.
16. Mascher F., Reithaler F. F., Stünzner D., Lamberger B.: Zbl. Bakt. Hyg. B. 186, 333-337, 1988.
17. Nashikikawa Y., Kishi T.: Epidemiol. Infect. 101, 213, 1988.
18. Osuchowska E., Dufrenne J., Beckers H., Notermans S.: Medycyna Wet. 48, 295, 1990.

19. Santos Y., Tornanzo A. E., Barja J. L., Nieto T. P., Villa T. G.: Infect. Immun. 56, 3285, 1988.
20. Sanayal S. C., Agarwal R. K., Annapurana E.: Indian J. Med. Res. 78, 324, 1983.
21. Sukroongreung S., Nilakul C., Tantimavanichs S.: Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health 3, 330, 1983.

22. Wadström T., Ljungh A., Wretling B.: Acta Pathol. Microbiol. Scand. B. 84, 112, 1976.

Adres autora: prof. dr hab. Zbigniew Anusz, ul. Dybowskiego 7, p. 1, 10-738 Olsztyn-Kortowo 2

STANISŁAW KLIMENTOWSKI

Wpływ zakażeń BLV i rozwijającego się procesu białaczkowego na zawartość immunoglobulin klasy G, M i A w surowicy krwi krów i ich płodów

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

Summary

The influence of Bovine leukemia virus and developing leukemic process on the content of G, M and A immunoglobulin classes in sera of cows and their fetuses

Sera of 51 cows, including 8 cows with a nodular form of epizootic bovine leukemia, from cowsheds of a high percent of BLV infection (more than 80%) and their fetuses have been examined. The presence and content of IgG, IgM and IgA in sera of cows and their fetuses was determined by the method of a radial single immunodiffusion using standard kits (Miles). The highest content of IgG (1946 mg/100 ml) was noted in sera of cows with a sub-clinical form of leukemia and the lowest one (1579 mg/100 ml) in seropositive cows. However, these differences were not statistically significant. The level of serum IgM was significantly higher in healthy cows (536 mg/100 ml) and in sera of seropositive cows (486 mg/100 ml) comparing to cows with a permanent lymphocytosis (419 mg/100 ml) and with histopathological lesions (441 mg/100 ml). The content of IgA ranged in all groups from 57 to 60 mg/100 ml.

In a group of fetuses from cows with a permanent lymphocytosis the level of serum IgM was higher (13.9 mg/100 ml) comparing to other groups (16.5–17.6 mg/100 ml). A slightly higher level of all immunoglobulin classes was observed in seropositive fetuses against EBL.

Material i metody

Materiał do badań stanowiły surowice krwi pobrane od 51 krów i ich płodów, w tym od 8 krów z guzową postacią EBB, pochodzących z obór o wysokim odsetku (ponad 80%) zakażeń BLV. Krew do badań pobierano podczas uboju sanitarnego w wybranych rzeźniach województwa wrocławskiego.

Do badań jakościowych i ilościowych immunoglobulin klasy G, M i A w surowicy krwi krów-matek i ich płodów zastosowano gotowe zestawy firmy „Miles” do pojedynczej immunodyfuzji radialnej wg metodycznych przesłanek Faheya i Manciniego (4, 10). Zawartość IgG mierzono w przedziale między 500–4000 mg/100 ml, wykorzystując w tym celu 4 surowice standardowe IgG zawierające 500, 1000, 2000 i 4000 mg/100 ml. Zawartość IgM mierzono w przedziale między 60–520 mg/100 ml, wykorzystując w tym celu 4 surowice standardowe IgM zawierające 60, 130, 260 i 520 mg/100 ml. Zawartość IgA mierzono w przedziale 50–400 mg/100 ml wykorzystując 4 surowice standardowe IgA zawierające 50, 100, 200 i 400 mg/100 ml. Gotowe płytki z agarozą zawierały bydlęce monospecyficzne surowice anty-IgG, -IgM i -IgA. Do dołków w żelu agarowym dokładnie odmierzano surowice standardowe i badane przy użyciu mikropipet. W przypadku IgG objętość ta wynosiła 2,5 µl, a przy IgM i IgA — 10 µl. Po 18 godz. (przy IgG) lub 22 godz. (przy IgM i IgA) inkubacji w temperaturze pokojowej w komorze wilgotnej odczytywano średnicę kręgów precypitacyjnych w mm. Na podstawie wartości surowic standardowych, wykorzystując regresję liniową sporządzono krzywą wzorcową, z której odczytywano wartości dla badanych surowic. Surowice krwi krów rozcieńczano do ww. badań w stosunku 1:4, natomiast surowice płodów zagęszczano 10-krotnie poprzez liofilizację.

Uzyskane wyniki opracowano statystycznie obliczając średnie arytmetyczne, odchylenie standardowe oraz istotność różnic pomiędzy dwoma średnimi testem t-Studenta przy $p < 0,05$.

Wyniki i omówienie

Dotychczasowe badania nad zawartością immunoglobulin w surowicy krwi bydła białaczkowego dostarczyły sprzecznych wyników. Trainin i wsp. (27) stwierdzili u 80% bydła z postacią guzową białaczki brak IgM. Pierce i wsp. (19) badając 289 krów białaczkowych wykazali u wszystkich obecność przeciwciał klasy G i M. Matthaeus i Straub (12) na 16 krów mlecznych z guzową postacią białaczki i 23 krowy z trwałą limfocytozą wykazali w przypadkach wyraźnych zmian guzowatych obecność IgM. Natomiast w badaniach Atluru i wsp. (1) oraz ostatnio Gatei i wsp. (5) zdrowe zwierzęta wykazały istotnie wyższy poziom IgM w surowicy krwi niż krowy z trwałą limfocytozą. Z kolei zawartość IgG była wyższa u zwierząt z trwałą limfocytozą w porównaniu z bydlęciem zdrowym i guzową postacią białaczki.

Reasumując można stwierdzić, że przeprowadzone dotychczas badania nie dostarczyły jednoznacznych dowodów na zmiany zawartości immunoglobulin u bydła w przebiegu EBB.

Celem pracy było określenie wpływu zakażeń BLV i rozwijającego się procesu białaczkowego na zawartość immunoglobulin klasy G, M i A w surowicy krwi krów-matek i ich płodów.

Wyniki badań jakościowych i ilościowych zawartości immunoglobulin klasy G, M i A w surowicy krwi krów-matek i ich płodów przedstawiono w tabeli 1. Zawartość IgG była najwyższa (1946 mg/100 ml) u krów z subkliniczną postacią choroby (grupa III), a najniższa (1579 mg/100 ml) u krów z dodatnimi wynikami badań serologicznych (grupa II), przy czym różnice te nie były statystycznie istotne. Pozostałe grupy krów (I i IV) wykazywały wartości pośrednie. Poziom IgM był znacznie wyższy u krów zdrowych (grupa I) — 536 mg/100 ml i wykazujących dodatnie wyniki badań serologicznych (grupa II) — 486 mg/100 ml, w porównaniu do krów grupy III wykazujących trwałą limfocytozę (419 mg/100 ml) i zmiany histopatologiczne (grupa IV) — 441 mg/100 ml. Wykazana najniższa zawartość IgM u krów z limfocytozą (grupa III) — 419 mg/100 ml różniła się