

ANTONI JAKUBCZAK, ALEKSANDRA PLATT-SAMORAJ, JAN SIEMIONEK, ZBIGNIEW ANUSZ

Badania nad etiopatogenezą jersiniozy zakażonych doświadczalnie świń

Katedra Epizootologii z Kliniką Chorób Zakaźnych Wydziału Weterynaryjnego AR-T, 10-957 Olsztyn-Kortowo

Summary

Etiopathogenesis of yersiniosis in experimentally infected pigs

The aim of the studies was to evaluate the carrier state of *Yersinia enterocolitica* and its effect on the immune response in experimentally infected pigs. The experiment was performed on 15 piglets aged eight weeks divided into three groups: I – piglets infected intravenously, II – animals infected intragastrically, III – a control group (non-infected). In experimentally infected piglets the bacterial colonization caused by *Y. enterocolitica* was found in the intestines and tonsils and the carrier state lasted for 8 to 12 weeks. The infection brought about an increase in the level of specific antibodies (O:3). There was no correlation between the concentration of specific antibodies and the detectability of *Y. enterocolitica* in faeces of the piglets.

Badania licznych autorów oraz własne wykazały, iż świnie są naturalnym rezerwuarem chorobotwórczych dla ludzi szczepów należących do *Y. enterocolitica* serotyp O:3, biotyp 4, fagotyp 8 (1, 3, 4, 11, 12, 19). Szczepy tego serobiofagotypu są chorobotwórcze również dla świń (11, 14, 21). U świń występują również i inne serotypy tego gatunku, które nie wywołują zachorowań u ludzi. U świń dochodzi do infekcji i reinfekcji *Y. enterocolitica* w wyniku kontaktu z bezobjawowymi nosicielami tych pałeczek (8), po spożyciu wody czy paszy zanieczyszczonej tym drobnoustrojem (14). Wśród wektorów przenoszących *Y. enterocolitica* w chlewniach i rzeźniach dominującą rolę odgrywają szczury, myszy i muchy (1, 7). W związku z perspektywą tworzenia stad wolnych od patogenów zoonotycznych poznanie dróg rozprzestrzeniania się tej bakterii wydaje się być uzasadnione.

Celem badań była ocena nosicielstwa *Y. enterocolitica* i jego wpływu na reakcję immunologiczną u świń eksperymentalnie zakażonych tym drobnoustrojem.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na 15 prosiątach w wieku 8 tygodni o m.c. 10–11 kg, które zakażano eksperymentalnie *Y. enterocolitica*. Do zakażenia zwierząt użyto szczepu 17/93 *Y. enterocolitica* O:3 wyizolowanego z kału 4-tygodniowego chorego prosięcia z objawami biegunki. Szczep ten w testach na wirulencję wykazywał zahamowanie wzrostu w temp. 37°C na agarze MOX (magnesium-oxalate agar) oraz pozytywną autoaglutynację w temp. 37°C. Do zakażenia użyto szczepu namnożonego na podłożu TSA (Tryptic Soy Agar – Difco) w temp. 22°C przez 48 godz., z którego sporządzono zawiesinę w płynie fizjologicznym o gęstości $2,7 \times 10$ kom/ml.

Zwierzęta podzielono na trzy grupy, po 5 prosiąt w każdej. Pierwszą grupę zakażono sondą dożołądkowo dawką 10 ml zawiesiny żywych bakterii. Drugą grupę zakażono dożylnie (żyła brzeżna ucha) również dawką 10 ml wcześniej przygotowanej zawiesiny *Y. enterocolitica* 17/93. Trzecią grupę stanowiły zwierzęta kontrolne – nie zakażone. Wszystkie zwierzęta przed doświadczeniem zostały poddane trzykrotnemu badaniu,

co 2 dni na nosicielstwo *Y. enterocolitica*. Nosicielstwa nie stwierdzono. Po zakażeniu prosięta badano na nosicielstwo przez pierwszy tydzień codziennie oraz przez następne 13 tygodni co 7 dni. Do badania bakteriologicznego pobierano wymazy z odbytu, które posiewano bezpośrednio na agar CIN (Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin-Agar-Difco) oraz zanurzano w 10 ml płynnego podłoża ITC wg Wautersa (22). Izolacji i identyfikacji szczepów dokonywano wg metod opisanych wcześniej (12). Obecność *Y. enterocolitica* na podłożach oceniano wg kryteriów: (-) brak wzrostu, (+) wzrost po namnożeniu próbki na podłożu ITC, (++) wzrost na agarze CIN 1:10 kolonii w posiewie bezpośrednim, (+++) wzrost na agarze CIN 10:100 kolonii w posiewie bezpośrednim.

Do badania serologicznego pobierano krew w ilości 5 ml z żyły brzeżnej ucha w odstępach dwutygodniowych.

Antygen użyty w odczynie aglutynacji probówkowej stanowiła zawiesina żywych komórek bakteryjnych sporządzonych z 48-godzinnej hodowli przeprowadzonej w temp. 22°C na podłożu ATD (Agar-Tryptose-Difco). Odczytu wyników dokonywano po 18 godz. inkubacji prowadzonej w temp. 22°C, przyjmując za miano aglutynin najwyższe rozcieńczenie surowicy, w którym jeszcze widoczna była aglutynacja (11).

W 14 tyg. doświadczenia zwierzęta poddano ubojowi diagnostycznemu. W celu stwierdzenia obecności *Y. enterocolitica* od każdego prosięcia pobrano wycinki migdałków, węzłów chłonnych krezki oraz wątroby, śledziony, nerek i płuc. Ponadto pobrano w ilości 1 g treści żołądka, dwunastnicy, jelita czczego, okrężnicy, jelita ślepego oraz prostonicy. 1 ml przygotowanego homogenatu badanych narządów oraz 1 g pobranych treści badano według wym. metody hodowlanej.

Wyniki i omówienie

W tabeli 1 przedstawiono częstość izolacji *Y. enterocolitica* w wymazach z odbytu od świń zakażonych doświadczalnie. Analiza wyników badania bakteriologicznego wskazuje, iż u wszystkich prosiąt zakażonych dożołądkowo w pierwszym dniu eksperymentu wykazano obecność *Y. enterocolitica* 17/93. Systematyczne siewstwo tej bakterii obserwowano od drugiego tygodnia po zakażeniu do 13 tygodnia. Do piątego tygodnia u prosiąt nr 7 i 11 oraz do siódmego tygodnia u prosiąt nr 1, 2, 5 izolowano ten drobnoustrój po uprzednim namnożeniu próbki. Świadczy to o małej liczbie obecnych komórek *Y. enterocolitica* O:3 w wydalanych kale. U prosięcia nr 7 wykrywano ten drobnoustrój w posiewach bezpośrednich w okresie pomiędzy 6. a 11. tygodniem, a u prosięcia nr 11 między 6. a 13. tyg. W takich przypadkach liczba bakterii w 1 g kału wynosi przeciętnie 10^2 kom/g i 10^9 kom/g (7, 8, 10). W posiewach bezpośrednich wykryto ten drobnoustrój u prosięcia nr 1 pomiędzy 7. a 11. tyg., a u prosięcia nr 5 pomiędzy 8. a 12. tyg. (tab. 1).

Wydalanie *Y. enterocolitica* 17/93 z kałem u prosiąt zakażonych dożylnie miało inny charakter. Tylko u jednego prosięcia (nr 14) w pierwszym tygodniu eksperymentu stwierdzono obecność tej bakterii po namnożeniu próbki. Systematyczne siewstwo wykazano u prosiąt nr 6 pomiędzy 8. a 13. tyg., a u nr 5 pomiędzy 7. a 13. tyg. Prosięta nr 9 i 13 wydalały z kałem taką liczbę bakterii, która wykrywana była w posiewach bez-

Tab. 1. Wyniki badań bakteriologicznych świń zakażonych dożołądkowo i dożylnie pałeczkami *Yersinia enterocolitica* O:3

Nr świni	Droga zakażenia	Dawka	Dni po zakażeniu							Tygodnie po zakażeniu											
			1	2	3	4	5	6	7	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII
6	dożylnie	$2,7 \times 10^9$ kom/ml	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	++	+++	+	+++	+++
9			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-	-	++	-	++	+++	+++
12			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-
13			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-	-	++	+++	++	++	-
14			+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+++	+++	++	+++	++	++	++
1	dożołądkowo	$2,7 \times 10^9$ kom/ml	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+++	++	+	++	+++	-	-
2			+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+++	+++	+	-	++	+	+
5			+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	++	++	++	++	+++	+
7			+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	++	++	-	++	+++	++	+	+
11			+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+++	++	+++	++	+++	+	+++	++
3	grupa kontrolna	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Objaśnienia: - brak wzrostu, + ITC - CIN, ++ CIN 10jtk, +++ CIN10 - 100jtk, jtk - jednostki tworzące kolonie.

Tab. 2. Obecność przeciwciał anti-*Yersinia enterocolitica* w surowicach świń zakażonych eksperymentalnie wobec serotypu O:3

Nr świni	Droga zakażenia	Dawka	Miano w kolejnych pobraniach krwi - tyg.							
			0	I	III	V	VII	IX	XI	XIII
6	dożylnie	$2,7 \times 10^9$ kom/ml	1:20	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80
9			1:10	1:80	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160
12			1:10	1:80	1:80	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160
13			-	1:40	1:80	1:640	1:640	1:640	1:640	1:640
14			-	1:40	1:80	1:80	1:80	1:160	1:160	1:160
1	dożołądkowo	$2,7 \times 10^9$ kom/ml	1:10	1:20	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80
2			1:10	1:40	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80
5			1:10	1:640	1:1280	1:1280	1:1280	1:640	1:640	1:640
7			-	1:320	1:320	1:320	1:320	1:320	1:320	1:320
11			-	1:80	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160
3	grupa kontrolna	-	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10
4			-	-	-	-	-	-	-	-
8			-	-	-	-	-	-	-	-
10			1:10	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10
15			-	-	-	-	-	-	-	-

pośrednich. Jedynie prosię nr 12 wydalato *Y. enterocolitica* wykrywalne tylko po namnożeniu próbki na podłożu ITC.

Dotychczasowe doniesienia na temat badań nad nosicielstwem *Y. enterocolitica* u świń dotyczyły zwierząt poddawanych ubojowi. W przypadku izolacji tych bakterii z migdałków ubijanych świń, częstość izolacji wynosiła od 2,7% w Anglii do 80% w Norwegii (cyt. 4), w Polsce zaś od 8,4% (19) do 31,5% (12). Częstość stwierdzania w kale *Y. enterocolitica* była zdecydowanie niższa i wynosiła w krajach europejskich od 0,1% do 27,3% (cyt. 4). Wśród izolowanych serotypów dominował serotyp O:3, w następnej kolejności O:9, O:6, O:5 i O:8 (2, 3, 4).

We wcześniejszych badaniach własnych wykazano, że wykrywalność *Y. enterocolitica* w kale świń zdrowych wynosiła

0,6%, a świń chorych 0,8% (11). Szczepy pochodzące od świń chorych, z objawami biegunki, izolowano tylko w najmłodszej grupie wiekowej - do 8 tyg. życia. Spośród wszystkich szczepów wyizolowanych z kału świń hodowlanych 83,8% stanowiły szczepy pochodzące od zwierząt w wieku do 20 tyg. życia (11).

Wyniki zawarte w tab. 1 wskazują, iż ośmiotygodniowe prosięta po zakażeniu dożołądkowym od 4 tygodnia od zakażenia do 13 tygodnia wykazują systematyczne siewstwo *Y. enterocolitica* O:3. Największą liczbę bakterii w badanym kale stwierdzano przez 7 tygodni, tj. pomiędzy 6. a 12. tyg. Fukushima i wsp. (9) po zakażeniu dożołądkowym 10-tygodniowych prosiąt pałeczkami *Y. enterocolitica* O:3 dawką

10^9 kom/ml stwierdzali ten drobnoustrój w kale przez 5 tygodni. Wartości mian żywych komórek w 1 g kału wynosiły od 10^2 do 10^9 komórek. Ci sami autorzy (8), obserwując świnie zakażone naturalnie, wykrywali w kale *Y. enterocolitica* O:3 przez 5 do 9 tygodni.

W badaniach nad doświadczalnym zakażeniem świń potencjalnie chorobotwórczymi szczepami *Y. enterocolitica* wykazano ich zdolność do kolonizacji warunkowanej obecnością czynnika adhezyjnego, umożliwiającego zasiedlenie i namnażanie się tej bakterii w jelicie cienkim. Czynniki adhezyjne związane jest z obecnością w komórkach tych szczepów plazmidów wirulencji, których obecność można wykazać m. in. w testach, takich jak autoaglutynacja w 37°C , czy wapniozależny wzrost w temp. 37°C (12, 19). Wielu autorów potwierdziło korelację pomiędzy obecnością plazmidów wirulencji w komórkach *Y. enterocolitica* a ich chorobotwórczością dla zwierząt zakażonych doświadczalnie (2, 4, 18, 21). Dotyczyło to myszy, szczurów, gerbilów, królików, świń, małą (5, 6, 8, 15, 18, 21).

Badania bakteriologiczne próbek pochodzących od świń poddanych ubojowi diagnostycznemu dały następujące wyniki. U czterech świń (nr 1, 2, 5 i 7) zakażonych dożołądkowo stwierdzono obecność *Y. enterocolitica* O:3 w migdałkach, u świń nr 1, 5 i 11 w wątrobie, a świnie nr 1, 2, 7 i 11 wykazywały obecność tego drobnoustroju w śledzionie. Treść jelita ślepego i prostnicy u świnie nr 1 zawierała pałeczki *Y. enterocolitica* O:3. Ponadto u świń nr 2 i 5 otrzymano dodatni wynik badania bakteriologicznego treści prostnicy. U świń zakażonych dożylnie pozytywne rezultaty izolacji uzyskano z wątroby, śledziony oraz treści prostnicy u świnie nr 14, a także z płuc, migdałków i treści prostnicy u świnie nr 12. Od żadnej z zakażonych świń nie izolowano *Y. enterocolitica* z nerek, węzłów chłonnych krezki, języka, treści żołądka, dwunastnicy, jelita czczego i okrężnicy.

Wauters i Pohl (21) donoszą o kolonizacji w kryptach migdałków szczepów *Y. enterocolitica* O:3 i O:9, którymi doustnie zakażano świnie. Shiozawa i wsp. (17) uważają, że migdałki są wstępnym miejscem kolonizacji *Y. enterocolitica* u świń. Obecność zaś bakterii w wątrobie, śledzionie, płucach, jelicie ślepym oraz prostnicy u świń zakażonych doświadczalnie sugeruje pewne powinowactwo *Y. enterocolitica* do określonych tkanek, na co wskazują różni autorzy w przebiegu doświadczalnych i naturalnych zakażeń u zwierząt (6, 18, 21).

Występowanie przeciwciał anti-*Y. enterocolitica* O:3 w surowicach świń zakażonych doświadczalnie wobec serotypu O:3 przedstawia tab. 2. U trzech świń zakażonych dożołądkowo stwierdzono miano o wartościach diagnostycznych (miano 1:160 i powyżej). Spośród 5 świń zakażonych dożylnie u 4 występowały miano 1:160 i powyżej. Najwyższe miano wśród świń zakażonych dożołądkowo stwierdzono u świnie nr 5 – 1:1280, a wśród świń zakażonych dożylnie 1:640 u świnie nr 13. Na fakt wskazujący podwyższone wartości mian przeciwciał w surowicach świń, od których izolowano jednocześnie szczepy *Y. enterocolitica* wskazują inni autorzy (13, 14).

We wcześniejszych badaniach własnych (11) wykazano u świń hodowlanych miano anti-*Y. enterocolitica* O:3 1:160 u 0,4% badanych zwierząt, a dla serotypu O:9 u 1,1%. Wykazano również związek pomiędzy obecnością przeciwciał anti-*Y. enterocolitica* a wykrywalnością tych samych serotypów w kale badanych zwierząt. Staroniewicz (20) w 12,5% badanych surowic pochodzących od zdrowych świń stwierdził obecność przeciwciał anti-*Y. enterocolitica* O:3 o mianach 1:160, a dla

serotypu O:9 u 9,4% badanych świń podobne wartości mian. Rusu i wsp. (16), badając 1189 surowic pochodzących od świń na obecność aglutynin anti-*Y. enterocolitica*, stwierdzili w 3,4% surowic podwyższone miana, z których najwyższe wynosiło 1:320. Fukushima i wsp. (8) u 9 świń naturalnie zakażonych nie stwierdzili mian aglutynin wyższych niż 1:40, mimo iż serotyp O:3 był izolowany od tych zwierząt. Autorzy ci nie stwierdzili żadnego związku między odpowiedzią humoralną a liczbą bakterii wykazywaną w czasie trwania zakażenia. Nattermann (14) podczas enzootii u świń wywołanej przez *Y. enterocolitica* u 30,6% chorych zwierząt stwierdził miana przeciwciał wobec serotypu O:3 1:160.

Analiza wyników zawartych w tab. 1 i tab. 2 wskazuje na brak korelacji pomiędzy wysokością mian anti-*Y. enterocolitica* O:3 a wykrywalnością tej bakterii w kale doświadczalnie zakażonych świń.

Wnioski

1. U świń zakażonych doświadczalnie dożołądkowo i dożylnie pałeczkami *Y. enterocolitica* O:3 występuje kolonizacja w jelitach i migdałkach oraz siewstwo tych bakterii trwające od 8 do 12 tygodni.
2. Doświadczalne zakażenie świń powoduje wzrost poziomu przeciwciał anti-*Yersinia enterocolitica* wobec serotypu O:3 w surowicach świń.
3. Brak jest korelacji pomiędzy wysokością mian anti-*Y. enterocolitica* O:3 a wykrywalnością tej bakterii w kale doświadczalnie zakażonych świń.

Piśmiennictwo

1. Aldova E., Skorkovsky B., Kapinus J., Jehovska M., Soukupova G.: Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A. 246, 344, 1980.
2. Brewre R. A., Corbel M. J.: J. Hyg., Camb. 90, 425, 1983.
3. Boer E., Nouws J. F. M.: Int. J. F. Microbiol. 12, 375, 1991.
4. Bulthe M., Klein G., Reuter G.: Fleischwirtschaft 71, 1, 1991.
5. Cornelis G., Laroche Y., Balligand G., Sory M. P., Wauters G.: Rev. Infect. Dis. 9, 64, 1987.
6. Konji F., Maruyama T.: Contr. Microbiol. Immunol. 5, 310, 1979.
7. Fukushima H., Ito Y., Saito K., Tsubokura M., Otsuki K.: Appl. Environ. Microbiol. 38, 1009, 1979.
8. Fukushima H., Nakamura R., Ito Y., Saito K., Tsubokura M., Otsuki K.: Vet. Microbiol. 8, 469, 1983.
9. Fukushima H., Nakamura R., Ito Y., Saito K., Tsubokura M., Otsuki K.: Vet. Microbiol. 9, 375, 1984.
10. Fukushima H., Ito Y., Saito K., Tsubokura M., Otsuki K.: Vet. Microbiol. 9, 383, 1984.
11. Jakubczak A.: Trzoda chlewna jako potencjalny rezerwuar pałeczek *Yersinia enterocolitica*. Praca dokt., AM Białystok, 1985.
12. Jakubczak A., Platt-Samoraj A., Siemionek J., Terech-Majewska E., Anusz Z.: Medycyna Wet. 49, 301, 1993.
13. Leemann R.: Zbl. Vet. Med. 26, 214, 1979.
14. Nattermann H.: Mh. Vet.-Med. 40, 366, 1985.
15. Rakovsky J.: Contr. Microbiol. Immunol. 2, 81, 1973.
16. Rusu V., Muscan A., Ciocalteu L., Lazaroae D.: Arch. Rom. Pathol. Exp. Microbiol. 40, 25, 1981.
17. Shiozawa K., Nishina, Miwa Y., Mori T., Akahane S., Ito K.: Contr. Microbiol. Immunol. 12, 63, 1991.
18. Mc Sporan K. D., Honsen L. M., Sauders B. W., Darmsteegt A.: N. Z. vet. J. 32, 38, 1984.
19. Staroniewicz Z.: Mat. VIII Kongresu PTNW, Warszawa 4, 129, 1987.
20. Staroniewicz Z.: Medycyna Wet. 42, 97, 1986.
21. Wauters G., Pohl P.: Rev. Ferment. Int. Aliment. 7, 16, 1972.
22. Wauters G., Goossens V., Janssens M., Vandepitte J.: Appl. Environ. Microbiol. 54, 851, 1988.

Adres autora: prof. dr hab. Zbigniew Anusz, ul. M. Oczapowskiego 12, 10-719 Olsztyn-Kortowo II