

12. Kita J., Anusz K., Dziąbka K., Piusiński W., Kowalski B., Krasieński Z., Bielecki W., Osińska B.: Medycyna Wet. 51, 386, 1995.
13. Kita J., Dziąbka K., Piusiński W., Anusz K., Lenartowicz Z., Kowalski B., Krasieński Z., Krupa J., Leśniewski S.: Medycyna Wet. 46, 474, 1990.
14. Ladds P. W.: Inflammation of the Penis and Prepuce w: Jubb K.V.F., Kennedy P.C., Palmer N.: Pathology of Domestic Animals. T. 3 Academic Press, San Diego, 1993, s. 480.
15. Piusiński W., Bielecki W., Malicka E., Lenartowicz-Kubrat Z.: Pamiętniki X Kongresu PTNW, Wrocław 3, 619, 1996.
16. Piusiński W., Malicka E., Bielecki W., Osińska B., Lenartowicz-Kubrat Z.: Medycyna Wet. 52, 386, 1996.
17. Szabajło W. E., Piererwa W. J.: Mat. nauč.prakt. Konf. 50 let issled. Belovežskoj Pusce, Mińsk 1990, s. 219.
18. Šašeņko A. S., Krasočko P. A., Krasočko I. A., Gaevskij V. I., Bunevič A. N.: Mat. meždunarod. simpoz. po zubru, Mińsk 1994, s. 74.
19. Šašeņko A. S., Krasočko P. A., Krasočko I. A., Gaevskij V. I., Bunevič A. N.: Mat. meždunarod. simpoz. po zubru, Mińsk 1994, s. 75.
20. Weiss E.: Penis und Präputium, w: E. Joest: Handbuch der Speziellen Pathologischen Anatomie der Haustiere T. 4, Verlag Paul Parey, Berlin-Hamburg 1985, s. 84-129.
21. Veremej E. J., Maksymovič V. V., Sinica N. V., Terešeņkov A. S., Gaevskij V. I., Bunevič A. N.: Mat. nauč. prakt. Konf. 50 let issled. Belovežskoj Pusce, Mińsk 1990, s. 201.
22. Wróblewski K.: Żubr Puszczy Białowieskiej, Wyd. Polskie, Poznań 1927, s. 141-143.

Adres autora: dr hab. Wojciech Piusiński, prof. nadzw. SGGW, ul. Grochowska 272, 03-849 Warszawa

CEZARIUSZ HUŁAS, MAGDALENA RZEWUSKA*, TERESA CIANCIARA,
ARTUR DOBRZYŃSKI, MARIAN BINEK*

Udział bakterii beztlenowych w zakażeniach przewodu pokarmowego psów*). I. Izolacja laseczek z rodzaju *Clostridium* z przewodu pokarmowego chorych psów

Katedra Epizootologii z Kliniką Chorób Zakaźnych oraz *Katedra Mikrobiologii i Immunologii
Wydziału Weterynaryjnego SGGW, ul. Grochowska 272, 03-849 Warszawa

Summary

The role of anaerobes in infections of the alimentary tract of dogs. I. Isolation of *Clostridium spp.* from the alimentary tract

Haemorrhagic gastroenteritis observed in dogs which had previously been vaccinated against parvovirus and coronavirus suggested the occurrence of the disease known as haemorrhagic gastroenteritis syndrome of dogs also in Poland. The disease is caused most probably by *Clostridium spp.* To test this, 90 samples of faeces taken from the infected dogs were examined. In 46 cases (51.11%) the strains of *Clostridium perfringens* were isolated in higher numbers (10^6 - 10^8 /g). Out of these 8.7% produced enterotoxin, which was discovered by the PET-RPLA (Oxoid) test. *Clostridium difficile* was not found in any of the 30 samples of faeces under study. The occurrence of toxigenic *Cl. perfringens* strains in the alimentary tract of dogs may constitute a threat to the health of humans and animals.

Schorzenia przewodu pokarmowego stanowią około 30% wszystkich zgłaszanych przypadków zachorowań psów. Wymioty i biegunki są najczęściej wynikiem zakażeń parwowirusami i koronawirusami.

Zasady postępowania terapeutycznego w klinice wirusowych schorzeń przewodu pokarmowego są znane i skutecznie realizowane w praktyce weterynaryjnej. Prowadzone od kilku lat rutynowe szczepienia przeciwko parwowirozowi i koronawirozowi ewidentnie zmniejszyły liczbę zachorowań. Ostatnio obserwuje się zachorowania psów wcześniej zaszczepionych. Choroba zaczyna się nagle obfitymi wymiotami, po kilku godzinach dołącza tryskająca, krwista biegunka. Psy szybko słabną, leżą, a z zięjącego odbytu bezwolnie wypływa brunatno-czarny kał o trupim odorze. Postępujące odwodnienie powoduje zaburzenie równowagi kwasowo-zasadowej, osłabienie mięśniowo-ścięgnowe, utratę elastyczności skóry, zmatowienie sierści, zaostrenie rysów twarzy, obniżenie ciepłoty wewnętrznej poniżej 37°C. Następstwem hipowolemii jest wstrząs, często prowadzący do śmierci. Przebieg kliniczny oraz dane wywiadu pozwalają podejrzewać zakażenie przewodu pokarmowego laseczkami beztlenowymi z rodzaju *Clostridium*, które mogą być czynnikiem etiologicznym choroby znanej z piśmiennictwa jako syndrom krwotocznego zapalenia żołądka i jelit psów (skzżjp) (2, 4, 8, 9).

Laseczki *Clostridium* są składnikiem endogennej flory przewodu pokarmowego psów. Te z nich, które cechuje chorobotwórczość uwarunkowana wytwa-

*) Praca realizowana w ramach grantu KBN 5P06K02411

rzaniem silnych egzotoksyn, wywołują toksykoinfekcje, enterotoksemie i toksemie. W określonych warunkach środowiskowych *Cl. perfringens* i *Cl. difficile* wytwarzają przetrwalniki, powodujące zakażenie *per os* z ciężkim przebiegiem klinicznym, krwawymi wymiotami, biegunkami, intoksykacją i wstrząsem septycznym. Z badań Carman i wsp. (4) oraz Kruth i wsp. (8) wynika, że enterotoksyczne szczepy *Cl. perfringens* mogą być czynnikami etiologicznymi zakaźnych biegunek psów nie związanych z zakażeniami pokarmowymi. Zdolność do wytwarzania enterotoksyny nie jest związana z serotypem, a nawet może się zdarzyć, że enterotoksyczne szczepy obecne w jelitach psów należą do wielu serotypów.

Siewstwo zarazka wraz z kałem przez zwierzęta chore lub nosicieli powoduje zakażenia *per os* psów wrażliwych. Przekarmianie lub długotrwałe leczenie antybiotykami sprzyjają wystąpieniu zachorowań.

W piśmiennictwie krajowym brakuje opracowań na temat udziału zakażeń wywołanych bakteriami beztlenowymi w chorobach przewodu pokarmowego psów. Dlatego wydaje się niezbędne podjęcie badań nad wyjaśnieniem ich roli w etiopatogenezie syndromu krwotocznego zapalenia żołądka i jelit psów.

Materiał i metody

W latach 1995-1996 badaniem objęto 90 psów obydwu płci, różnych ras, w wieku od 16 tygodni do 8 lat, aktualnie wykazujących objawy różnie nasilonej biegunki, w tym budzące podejrzenie skrzyżp. Ustalono, że zwierzęta były profilaktycznie szczepione przeciwko nosowce, chorobie Rubartha, parwowirozie, niektóre również przeciwko koronawirozie. Wobec nadal szerokiego rozpowszechnienia zakażeń wirusem CPV-2 kał psów zbadano testem lateksowym (On-Site Biotech, Uppsala – Szwecja) dla wykluczenia parwowirusy. Przeprowadzono także 90 rutynowych badań koproskopowych w celu wyeliminowania etiologii pasożytniczej schorzenia. Materiał do badań mikrobiologicznych stanowiły próbki kału od psów chorych pobieranego bezpośrednio z prostnicy. Kał wysiewano ilościowo na podłoża stałe Brewer Anaerobic Agar (BAA, Merck) z dodatkiem 5% krwi bydlęcej oraz na Tryptase Sulfite Neomycin Agar (TSN, bioMerieux). Z części próbek kału (30) wykonano dodatkowo posiewy na podłożu *Clostridium Difficile Selective Medium* (Oxoid) w celu izolacji *Clostridium difficile*. Posiewy inkubowano 48-72 godzin w temperaturze 37°C, w warunkach beztlenowych uzyskanych metodą GasPak. Z wybranych kolonii wykonywano preparaty barwione metodą Grama. W przypadku stwierdzenia obecności laseczek Gram-dodatnich wykonywano posiew odpowiednich kolonii na podłożu BAA w celu uzyskania czystej hodowli izolowanego szczepu. Laseczki redukujące siarczyn, w tym *Cl. perfringens* izolowano na podłożu TSN oraz określano ich liczbę jako CFU/g. Szczepy Gram-dodatnich laseczek beztlenowych różnicowano na podstawie cech biochemicznych przy użyciu testu API 20 A (bioMerieux). Do badań

biochemicznych przygotowywano zawiesiny bakteryjne z 24-godzinnych czystych hodowli na podłożu BAA. Wykrywanie enterotoksyny wytwarzanej przez szczepy *Cl. perfringens* wykonano przy pomocy testu lateksowego PET – RPLA (Oxoid). Szczepy namnażano na podłożu płynnym Schaedlera pod parafiną. Po 48-godzinnej inkubacji w temperaturze 37°C hodowlę odwirowywano przy 8000 rpm przez 10 minut. Toksynę poszukiwano w supernatancie zgodnie z zaleceniami producenta testu. Posiew w kierunku bakterii tlenowych wykonywano na agar odżywczy z krwią oraz podłożu MacConkeya i inkubowano przez 24 godziny w temperaturze 37°C. Względnie beztlenowe pałeczki jelitowe identyfikowano na podstawie cech wzrostu na podłożach stałych oraz cech biochemicznych oznaczanych testem API 20 E (bioMerieux).

Wyniki i omówienie

W wyniku bakteriologicznego badania 90 próbek kału psów z objawami biegunki w 46 przypadkach (51,11%) wyizolowano *Cl. perfringens* w liczbie 10^6 – 10^8 CFU/g. W pozostałych przypadkach liczba laseczek wahała się od 10^2 do 10^5 CFU/g, w tym w 10 próbkach 10^2 CFU/g i poniżej. Wyższe liczby *Cl. perfringens* hodowano z reguły z kału zwierząt z silniej zaznaczonymi objawami biegunki określanej jako tryskająca. W brunatno-ciemnym kale o przykrym zapachu można było także zauważyć domieszkę krwi. Izolowane szczepy *Cl. perfringens* na podłożach stałych rosły w postaci kolonii typu R lub S, charakterystycznych dla gatunku (6, 13). Jeden szczep był niehemolityczny, pozostałe na podłożu z krwią bydlęcą tworzyły hemolizę typu β . Na podłożu TSN wszystkie izolowane szczepy wykazywały zdolność redukcji siarczynu do siarczku. Pod względem cech biochemicznych oznaczanych testem API 20 A, izolaty wykazywały pewne różnicowanie dotyczące rozkładu: glicerolu, salicyny, sorbitolu, rafinozy i trehalozy. Do testu na enterotoksyczność wybrano szczepy *Cl. perfringens* izolowane z kału psów w podwyższonej liczbie (10^6 – 10^8 CFU/g). Na 46 hodowli w 2 przypadkach uzyskano wynik silnie dodatni i w 2 przypadkach wynik słabo dodatni. Razem stanowi to około 8,7% szczepów, u których stwierdzono wytwarzanie enterotoksyny.

Udział *Cl. perfringens* w powodowaniu zakażeń pozapokarmowych i w konsekwencji enterotoksemii u ludzi i zwierząt gospodarskich podnoszony był przez wielu autorów (2, 3, 5, 8–12). W mniejszym stopniu podobne zjawiska znane są u psów. Udział *Cl. perfringens* typu A w wywoływaniu chronicznych biegunek u psów oraz obecność w kale toksyny neutralizowanej przez antytoksynę A wykazali Carman i wsp. (4). Natomiast szpitalne zakażenia psów szczepami enterotoksycznymi *Cl. perfringens* wykazali Kruth i wsp. (8). W obydwu przypadkach czynnikami przemawiającymi za udziałem tych bak-

Tab. 1. Wyniki ilościowych badań kału psów w kierunku *Clostridium perfringens*, w tym szczepów enterotoksycznych i *Clostridium difficile*

Liczba próbek kału	Liczba próbek, z których izolowano			
	<i>Clostridium perfringens</i>			<i>Clostridium difficile</i>
	10 ⁶ -10 ⁸ CFU/g	liczba szczepów wytwarzających enterotoksynę	< 10 ⁶ CFU/g	
90	46	4	44	—
30*	30		0	0

Objaśnienie: * część próbek kału z puli 90 badanych.

terii w wywoływaniu biegunek była podwyższona liczba zarazków w kale i obecność toksyny A wykazanej przez Carmana i wsp. (4) oraz enterotoksyny wykazanej przez Krutha i wsp. (8). Przedstawione przez nas dane zbieżne są z omówionymi wyżej obserwacjami i podobnie stwierdzono wyższą liczbę *Cl. perfringens* w kale psów, u których dominującym objawem była biegunka. Ponieważ w doświadczeniu brały udział zwierzęta, które trafiały do kliniki z różnym rozpoznaniem, w różnym stadium choroby, w tym także po przechorowaniu i wcześniejszym leczeniu, należy założyć, że właściwą grupą badaną były psy, od których izolowano 10⁶ i powyżej CFU/g. Z podanych względów nie można było także oznaczyć bezpośrednio toksyny w kale. Wytwarzanie jednak przez część izolatów *Cl. perfringens* (8,7%) enterotoksyny wskazuje na jej potencjalną rolę w chorobotwórczości, w tym w wywoływaniu biegunek. Niewątpliwie na przebieg choroby i manifestowanie się jej objawów mogą mieć wpływ inne egzotoksyny uwalniane przez gwałtownie namnażające się *Cl. perfringens*, czego dowodem były odnotowane przypadki szybkiego przebiegu choroby i padnięć we wstrząsie sugerujące toksykoinfekcje. Podobne sugestie wysuwane są również przez innych autorów (8). Wykluczenie obecności wirusa CPV-2 oraz ewidentnego zarobaczenia u badanych zwierząt, pozwala podejrzewać, że laseczki *Cl. perfringens* mogą stanowić istotny czynnik etiologiczny syndromu krwotocznego zapalenia żołądka i jelit psów. Laseczką beztlenową rzadziej izolowaną z kału psów ze schorzeniami przewodu pokarmowego jest *Cl. difficile* (1, 2, 10, 12). Z przebadanych 30 próbek kału, w którym stwierdzono wysokie liczby *Cl. perfringens* nie wyizolowano *Cl. difficile*. Uwarunkowane może to być faktem, iż drobnoustrój ten wykrywany jest stosunkowo rzadziej jako czynnik etiologiczny wymienionego schorzenia lub też nieodpowiednio dobranymi warunkami hodowli. Nie wykluczone także, że pewien wpływ na uzyskane wyniki wywarła zaobserwowana zależność między częstością występowania *Cl. difficile* w przewodzie

pokarmowym a wcześniejszym stosowaniem antybiotyków u psów (3). Po długotrwałej antybiotykoterapii bowiem częstotliwość izolacji wzrasta o około 8%.

Wydaje się także, że występowanie toksynotwórczych szczepów *Cl. perfringens* w przewodzie pokarmowym psów może stanowić zagrożenie dla zdrowia ludzi i zwierząt, co sugeruje konieczność podjęcia dalszych badań w celu bliższej charakterystyki zarazka i jego roli epidemiologicznej.

Piśmiennictwo

- Berry A. P., Levett P. N.: Vet. Rec. 118, 102, 1986.
- Borriello S. P., Honour P., Turner T., Barclay F.: J. clin. Path. 36, 84, 1983.
- Borriello S. P., Honour P., Turner T., Barclay F.: J. med. Microbiol. 18, 47, 1984.
- Carman R. J.: Vet. Rec. 112, 342, 1983.
- Cygan Z.: Medycyna Wet. 53, 73, 1997.
- Holt J. G., Krieg N. R., Sneath P. H., Staley J. T., Williams S. T.: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Williams & Wilkins, Baltimore 1994, s. 560.
- Kato H., Kato N., Watanabe K., Ueno K., Ushijima H., Hashira S., Abe T.: J. clin. Microbiol. 32, 2067, 1994.
- Kruth S. A., Prescott J. F., Welch M. K., Brodsky M. H.: J. Am. vet. med. Ass. 195, 3, 1989.
- Martirosian G., Sokół-Leszczynska B., Mierzejewski J., Meisel-Mikotajczyk F.: Med. dośw. 44, 49, 1992.
- Perrin J., Buogo C., Gallusser A., Burnens A. P., Nicolet J.: J. Vet. Med. B 40, 222, 1993.
- Pykiel M.: Post.Mikrobiol. 30, 1, 1991.
- Riley T. V., Adams J. E., O'Neil G. L., Bowman R. A.: Epidemiol. Infect. 107, 659, 1991.
- Willis A. T.: Clostridia of Wound Infection, Butterworths, London 1969.

Adres autora: dr Cezariusz Hułas, ul. Marokańska 9, 03-977 Warszawa

YERUHAM I., ELAD D., VAN-HAM M., SHPIGEL N. Y., PERL S.: Zakażenie bydła w Izraelu przez *Corynebacterium pseudotuberculosis*: badania kliniczne i epidemiologiczne. (*Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in Israeli cattle: clinical and epidemiological studies). Vet. Rec. 140, 423-427, 1997 (16)

Corynebacterium pseudotuberculosis wywołuje chorobę zakaźną o chronicznym przebiegu u bydła, bawołów i koni. W okresie 1989-1995 wystąpiły w Izraelu przypadki zakażenia bydła przez ten zarazek. Choroba występowała sporadycznie w 17 stadach i obejmowała 5% pogłowia oraz epidemicznie w 12 stadach, w których zachorowania wahały się od 5 do 35%. Bardziej podatne na zakażenie były zwierzęta starsze. Choroba nie występowała w stadach bydła o produktywności mięsnej. Postać skórna choroby występowała w 92,5%, postać skórna łącznie z zapaleniem gruczołu mlekowego w 5,9% przypadków, postać skórna i trzewna w 1,6% przypadków. W 10 stadach *C. pseudotuberculosis* izolowano z gruczołu mlekowego wykazującego zmiany zapalne oprócz zmian skórnych. W 23 stadach choroba wystąpiła na wiosnę i w lecie, przy czym w 25 stadach zakażenie utrzymywało się przez 5 miesięcy. Zmiany skórne cofały się po leczeniu ogólnym i miejscowym po 23,4 dniach. 16,7% zwierząt, u których choroba przebiegała w ciężkiej formie, eliminowano z hodowli. Żaden z wyizolowanych szczepów *C. pseudotuberculosis* nie redukował azotanów.