

# Występowanie *Clostridium tetani* w środowisku hodowlanym koni

Paweł Różański<sup>1</sup>, Dorota Różańska<sup>2</sup>, Henryk Krukowski<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Katedra Higieny Zwierząt i Środowiska

<sup>2</sup> Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Katedra i Klinika Chirurgii Zwierząt

## Streszczenie

**Wstęp.** W dobie propagowania aktywnego wypoczynku zagrożenie zakażenia tężcem u ludzi mających kontakt z końmi przez uprawianie sportów jeździeckich lub choćby rekreacyjnie nie budzi wątpliwości. Przeprowadzone w niniejszej pracy badania nad izolacją toksyno twórczych szczepów *Clostridium tetani* z otoczenia koni potwierdziły aktualne niebezpieczeństwo zachorowania na tężec u ludzi i zwierząt.

**Cel badań.** Celem badań była próba wyizolowania *Clostridium tetani* z otoczenia hodowlanego koni.

**Materiał badań.** Badania przeprowadzono w 2 ośrodkach hodowli koni i 1 prywatnym ośrodku jeździeckim. Materiał badawczy stanowiło po 8 próbek: siana i owsa, kurzu stajennego, kału, ściółki i gleby. W każdym z ośrodków pobrano próby wg tego samego schematu. Z każdych 8 prób z poszczególnych obiektów stworzono po 1 próbę zbiorczą, którą traktowano jako próbę reprezentatywną.

**Wyniki.** Kolonie bakteryjne charakteryzujące się cechami typowymi dla *Clostridium tetani* wyizolowano z prób: kału, ściółki, kurzu i paszy. Bakterii takich nie wyhodowano z wierzchnich warstw gleby okresowo lub stale znajdujących się pod wpływem działania promieni słonecznych. W oparciu o uzyskane wyniki badań stwierdzono, że materiał biologiczny środowiska hodowlanego koni zawierał bakterie *Cl. tetani*, przez co stanowił zagrożenie dla zdrowia i życia zwierząt oraz ludzi.

## Słowa kluczowe

*Clostridium tetani*, konie, środowisko

## WSTĘP

Choroby odzwierzęce towarzyszą człowiekowi od wieków [1]. Do najbardziej znanych i najgroźniejszych zaliczamy m.in.: wściekliznę, gruźlicę i salmonelozę. O ile jednak w ich przypadku zagrożenie antropozoonozą może zostać zlikwidowane wraz z eliminacją zarażonych zwierząt i pochodzących od nich produktów, to niebezpieczeństwo wynikające z braku skutecznych metod uwolnienia środowiska od chorobotwórczych bakterii beztlenowych do dziś pozostaje poważnym problemem epizootologicznym i epidemiologicznym.

Różnorodność tych bardzo ważnych i niebezpiecznych chorób oraz skutków, jakie niosą ze sobą, nakłania do dokładnego badania elementów otoczenia zwierząt i człowieka zwłaszcza, że środowiska te często istotnie się pokrywają. Do tej grupy schorzeń zaliczyć należy m.in. tężec [2].

Występowanie chorobotwórczych bakterii beztlenowych w środowisku wiąże się z ich zdolnością do wytwarzania endospor. Zdaniem Cygana [1] do namnażania niektórych laseczek, w tym chorobotwórczych, może prowadzić zachwianie warunków tlenowych w glebie.

Oprócz czynników środowiskowych na zanieczyszczenie środowiska bakteriami beztlenowymi mogą mieć wpływ również czynniki socjoekonomiczne i kulturowe. Wprawdzie zdaniem niektórych autorów [3, 4] industrializacja, wzrost kultury rolnej i świadomości społeczeństwa wpłynęły na spadek zapadalności i umieralności ludzi z powodu tężca, to zagrożenia nim w dalszym ciągu nie należy lekceważyć [3, 5-8]. Potwierdzają to badania, które wykazały obecność przetrwalników *Clostridium tetani* w kale koni i ludzi [3, 7]

oraz meldunki Państwowego Zakładu Higieny Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego [9].

Podkreślić należy, że tężec znajduje się na liście szczepień obowiązkowych w Polsce, więc immunoprofilaktyką swoistą objęte jest całe społeczeństwo. Przytoczony rejestr dotyczy wyłącznie zachorowań u ludzi. Nie występuje niestety analogiczny wykaz dotyczący zachorowań u zwierząt.

## CEL BADANIA

Celem pracy była próba wyizolowania *Clostridium tetani* z materiału pochodzącego ze środowiska hodowlanego koni.

## MATERIAŁ I METODA

Badania przeprowadzono w dwóch stadninach i jednym prywatnym ośrodku jeździeckim.

W obiektach tych utrzymywano konie obu płci w różnym wieku, czystej krwi arabskiej, półkrwi angloarabskiej oraz szlachetnej półkrwi.

We wszystkich badanych stajniach dezynfekcja polegała głównie na oczyszczaniu mechanicznym i bieleniu ścian wapnem. Zabiegi te wykonywano dwukrotnie w ciągu roku – wiosną i jesienią.

Materiał do badań stanowiły: pasza, kał, ściółka, kurz ze żłobów i powierzchni poziomych stajni oraz gleba. Miejsca, z których pobierano próbki do badań wyznaczone zostały losowo. Glebę pobierano z części przyległych do głównych szlaków komunikacyjnych oraz z wybiegów i padoków. Probki ściółki i gleby pochodziły z warstw wierzchnich podłoża o głębokości do ok. 10 cm. W trakcie pobierania prób prze-

prowadzono również oznaczenia zoohigieniczne polegające na określeniu temperatury powietrza oraz wilgotności względnej wewnątrz stajni.

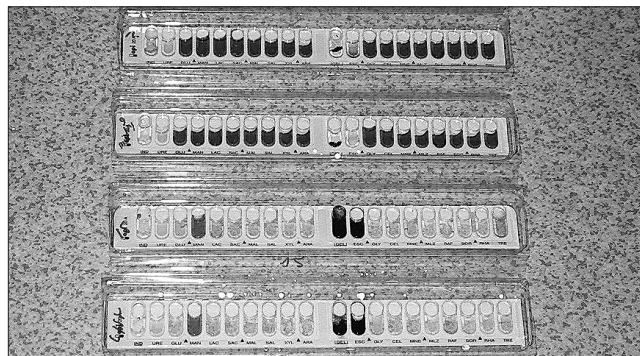
Z każdego analizowanego elementu środowiska w badanych obiektach pobierano po 8 prób, z których stworzono grupy reprezentatywne (Tab. 1).

Badany materiał inkubowano w temp 37°C przez 72 godziny wg metod opisanych przez Cruickshank [10] i Willis [11]. Uzyskane w warunkach beztlenowych kolonie po przesiewach na podłożach agarowych z dodatkiem krwi baraniej oceniano metodą mikroskopową pod względem ich cech morfologicznych. Do dalszych badań wykorzystano kolonie pobrane z punktu najbardziej oddalonego od miejsca posiewu. Wytypowane tą drogą szczepy po ponownym namnożeniu poddawano testom biochemicznym celem potwierdzenia wyników badań mikroskopowych. Oznaczenia te wykonano z zastosowaniem testów API 20 A produkcji bioMérieux Polska Sp. z o.o. (Fot. 1) oraz programu komputerowego API-Web.

Próbę biologiczną przeprowadzono na myszach laboratoryjnych.

## WYNIKI BADAŃ

Przeprowadzone analizy wykazały obecność bakterii *Clostridium tetani* w większości z pobranych prób zbiorczych.



Fot. 1 Testy API 20 A – dwa górne z wynikiem pozytywnym.

Wynik pozytywny uzyskano w przypadku 2 prób paszy i 2 prób kurzu stajennego. We wszystkich analizowanych próbach kału potwierdzono obecność *Cl. tetani*. Identyczna sytuacja dotyczyła badanej ściółki. Bakterii nie wyizolowano jedynie z gleby, padoków i głównych szlaków komunikacyjnych. Wyniki badań przedstawia Tabela 1.

Tabela 1 Wykaz badanego materiału –wyniki oznaczeń.

Obiekt	Liczba prób			Wyniki badań		
	A	B	C	A	B	C
	– pobranie zbiorcze					
Siano i owies	8 (1)	8 (1)	8 (1)	+	-	+
Kurz ze stajni	8 (1)	8 (1)	8 (1)	-	+	+
Kał	8 (1)	8 (1)	8 (1)	+	+	+
Ściółka	8 (1)	8 (1)	8 (1)	+	+	+
Gleba	8 (1)	8 (1)	8 (1)	-	-	-
Razem	40 (5)	40 (5)	40 (5)	3	3	4
	<b>120 (15)</b>			<b>10</b>		

## OMÓWIENIE

Uzyskanie czystej hodowli bakteryjnej z materiału biologicznego jest zadaniem trudnym zwłaszcza, jeśli jest to materiał tak zanieczyszczony mikrobiologicznie jak kał, ściółka czy gleba. W dostępnym piśmiennictwie opisano różne metody izolacji poszczególnych szczepów mikroorganizmów. Podstawową właściwością *Cl. tetani* opisywaną przez autorów jest bardzo duża oporność na działanie czynników fizycznych i chemicznych [4,12].

Cechą charakterystyczną bakterii beztlenowych są wymagania dotyczące braku bądź niskiej zawartości tlenu w atmosferze, które warunkują ich wzrost. Zdaniem autorów jednak szczepy *Clostridium tetani* mogą adaptować także do wzrostu w warunkach tlenowych [13].

Badania własne prowadzono na podłożach krwawych w stałej temperaturze 37°C. Wśród hodowli uzyskanych w warunkach beztlenowych obserwowano bakterie wykazujące ruch własny. *Clostridium tetani* zawdzięczają tą zdolność obecności rzęsek.

Obraz mikroskopowy (Fot. 2, 3) ukazywał przetrwalniki umiejscowione typowo przy jednym z końców komórki, co jest jedną z cech typowych dla *Clostridium tetani* [13].



Fot. 2 Obraz mikroskopowy *Clostridium tetani* z biegunowo ułożonymi przetrwalnikami.

W preparatach mikroskopowych z hodowli pełzającej obok typowych postaci, stwierdzono również formy nitkowate (Fot. 3). Identyczne formy bakterii opisał też Kośla [14]. Czy-



Fot. 3 Obraz mikroskopowy *Cl. tetani* z formą nitkowatą.

ste kolonie uzyskane po 48h wzrostu miały średnicę 3–4 mm, posiadały nieregularne brzegi, były lekko wzniesione, o ziarnistej powierzchni i szarym zabarwieniu. Wokół części kolonii stwierdzono strefę hemolizy  $\alpha$  przechodzącą w  $\beta$ , co wraz z upływającym czasem stawało się bardziej wyraziste. Kolejną cechą izolowanych bakterii było obserwowane barwienie się osobników z hodowli młodych Gram – dodatnio, a bakterii pochodzących z hodowli 48-godzinnej i starszych Gram – ujemnie.

Wyniki próby biologicznej potwierdziły rezultaty badań mikroskopowych i testów biochemicznych wykazując obecność *Clostridium tetani* w badanym materiale.

## DYSKUSJA

Właściwości mikroklimatyczne stajni z zalecaną temperaturą od 6-8 zimą do 20°C latem oraz wilgotnością względną powietrza na poziomie ok. 50-80% sprawiają, że stajnie zagrożone są stacjonarnym występowaniem bogatej mikroflory, w tym patogennej dla człowieka. W okresie badań średnia temperatura powietrza wewnątrz stajni wahała się od 7 do 18°C, a wilgotność względna mieściła się w zakresie 60-70%.

Gatunek wyizolowanych bakterii zależy w dużym stopniu od geograficznego usytuowania fermy i zasiedlających ją zwierząt. Rodzaj występujących w nawozie mikroorganizmów determinowany jest też przez skład fizyczny i chemiczny mieszaniny odchodów i ściółki. Istotnym czynnikiem wpływającym na obecność mikroflory w nawozie jest też sposób postępowania z nim. Większość bakterii patogennych jest bowiem skutecznie niszczone podczas kompostowania w procesie biotermicznego odkażania. Niektóre jednak, np. bakterie z rodzaju *Clostridium* w takich warunkach zachowują żywotność i zdolności chorobotwórcze.

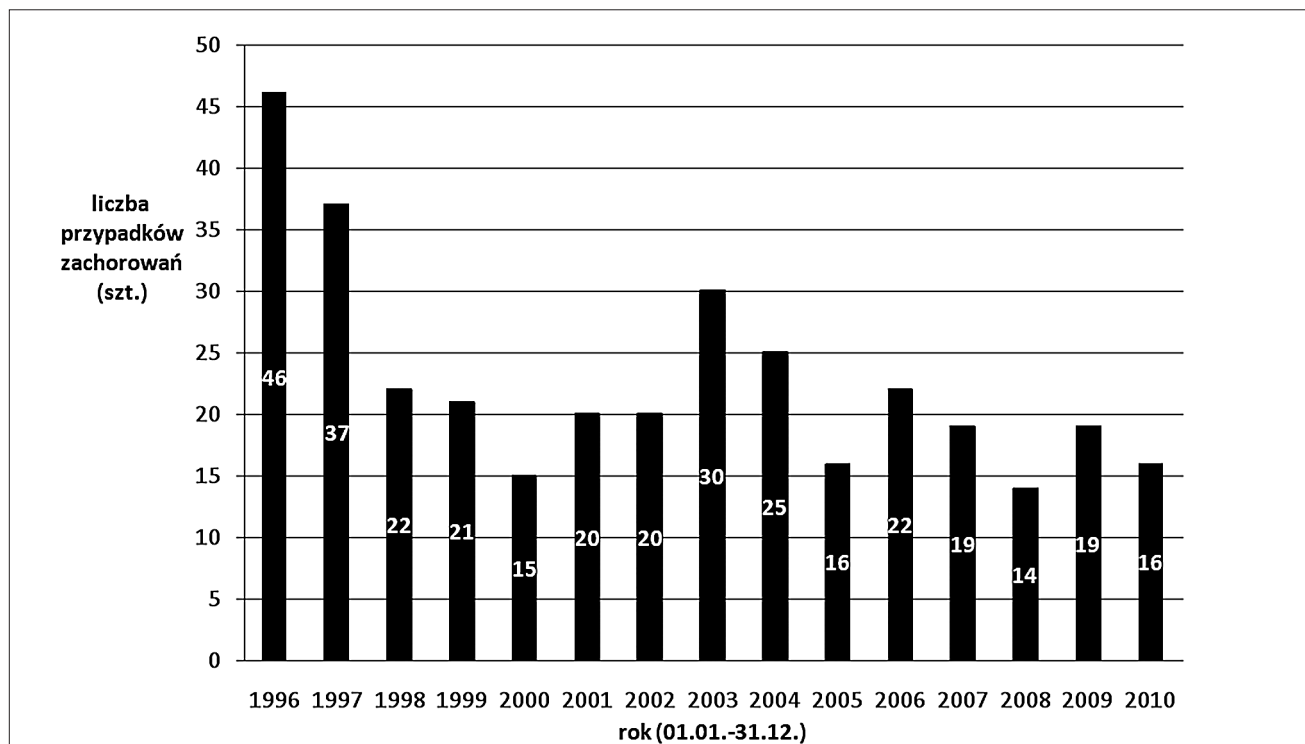
Postępowanie z nawozem w przypadku *Cl. tetani* nie wpływa zatem w żaden sposób na ich przeżywalność. Faktem tym można tłumaczyć izolację przetrwalników zarówno ze starego jak i świeżego nawozu, co wykazano w niniejszej pracy. Obserwacje te znalazły potwierdzenie w dostępnym piśmiennictwie [3].

Dodatkowym zagrożeniem infekcją *Cl. tetani* potwierdzonym w toku realizacji niniejszej pracy była obecność przetrwalników w próbach paszy. We wszystkich tych przypadkach, przetrwalniki izolowano z płynu, w którym inkubowany był analizowany materiał. Nie można jednak wysnuć wniosku, że przetrwalniki znajdują się w samej paszy, bowiem wraz z paszą analizowany był też kurz i inne zanieczyszczenia typowe dla owsa i siana. Potwierdziła to izolacja bakterii z kurzu pobieranego w stajniach.

W Polsce liczba zachorowań na tężec u ludzi w ostatnich 10 latach utrzymuje się na poziomie 15-30 przypadków rocznie. Według Państwowego Zakładu Higieny Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego w okresie od 1 stycznia 1996 roku do 30 września roku 2008, zgłoszonych zostało 301 przypadków klinicznych tej choroby (Ryc. 1).

Szczególnie duża zapadalność na tężec i śmiertelność z nim związaną obserwuje się w krajach tropikalnych i rozwijających się [3, 7, 8]. Fakt ten związany jest prawdopodobnie z sytuacją sanitarną, a nie np. z warunkami glebowymi. Uwzględniając zdolności różnych rodzajów gleb do samoczyszczania stwierdzić należy, że kluczową rolę w zapobieganiu zachorowaniom na tężec pełni więc profilaktyka. W krajach o najwyższej zachorowalności występują podobne gleby, a sytuacja epidemiologiczna poprawiała się wraz z rozwojem ekonomicznym.

Podsumowując stwierdzić należy, że kolonie bakteryjne charakteryzujące się cechami typowymi dla *Clostridium tetani* wyizolowano z prób: kału, ściółki, kurzu i paszy. Bakterii takich nie wyhodowano z wierzchnich warstw gleby



Ryc. 1 Zgłoszone przypadki zachorowań na tężec u ludzi w latach 1996-2010. (wg meldunków Państwowego Zakładu Higieny - Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego).

okresowo lub stale znajdujących się pod wpływem działania promieni słonecznych.

W oparciu o uzyskane wyniki badań stwierdzono, że materiał biologiczny środowiska hodowlanego koni zawierał bakterie *Cl. tetani*, przez co stanowił zagrożenie dla zdrowia i życia zwierząt oraz ludzi.

## WNIOSKI

1. Bakterie *Cl. tetani* występują powszechnie w środowisku hodowlanym koni.
2. Szczególne zagrożenie epizootologiczne stanowią odchody koni, ściółka oraz kurz w stajniach.
3. Warunki mikroklimatyczne wywierają znaczny wpływ na stan epizootologiczny i środowiska hodowlanego.
4. Brak skutecznych metod eliminacji beztlenowej mikroflory chorobotwórczej ze środowiska bytowania zwierząt sprawia, że nadal stanowi ono jej rezerwuuar.
5. Jedynym sposobem wpływającym na zmniejszenie zagrożenia epizootycznego jest prowadzenie szczepień profilaktycznych oraz zwrócenie bacznej uwagi na wszelkie uszkodzenia tkanek, ze szczególnym uwzględnieniem ran powstałych w środowisku hodowlanym.

## PIŚMIENNICTWO

1. Cygan Z M. Choroby beztlenowcowe zwierząt. Wyd. Pol. Kraków, 1999.
2. Gliński Z, Kostro K. Zoonozy – zagrożenie i wyzwanie dla lekarzy weterynarii. *Życie Wet* 2000; 76:85-88.
3. Edlich RF, Hill LG, Mahler CA, Cox MJ, Becker DG, Horowitz JH, Nichter LS, Martin ML, Lineweaver WC. Management and prevention of tetanus. *J Long-Term Eff Med* 2003; 13(3):139-54.
4. Gliński Z, Kostro K, Swoboda-Mazurek M. Zoonozy XXI wieku. *Med Wet* 2002; 58:18-19.
5. Brüggemann H, Baumer S, Fricke WF, Wiezer A, Liesegang H, Decker I, Herzberg C, Martinez-Arias R, Merkl R, Henne A, Gottschalk G. The genome sequence of *Clostridium tetani*, the causative agent of tetanus disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003 Feb 4;100(3):1316-21. Epub 2003 Jan 27.
6. Pagliuca LM, Feitoza AR, Feijão AR. Tetanus in the geriatric population: is it a collective health problem? *Rev Lat-Am Enferm* 2001; Nov-Dec 9(6):69-75.
7. Roper MH, Vandelaar JH, Gasse FL. Maternal and neonatal tetanus. *Lancet* 2007; Dec 8;370(9603):1947-59.
8. Sheffield JS, Ramin SM. Tetanus in pregnancy. *Am J Perinatol* 2004; May:21(4):173-82.
9. Meldunki o zachorowaniach na choroby zakaźne, zakażeniach i zatruciach w Polsce. [http://www.pzh.gov.pl/oldpage/epimeld/index\\_p.html](http://www.pzh.gov.pl/oldpage/epimeld/index_p.html)
10. Cruickshank R. Medical Microbiology. E i S Livingstone Limited, Edinburgh and London, 1965.
11. Willis AT, Hobbs G. Some new media for the isolation and identification of Clostridia. *J Pathol Bacteriol* 1959; 77(2):511-521.
12. Brook C. Current concepts in the management of *Clostridium tetani* infection. *Expert Rev Anti-Infe* 2008; 6(3):327-36.
13. Brüggemann H, Bauer R, Raffestin S, Gottschalk G. Characterization of a heme oxygenase of *Clostridium tetani* and its possible role in oxygen tolerance. *Arch Microbiol* 2004; 182(2-3):259-63.
14. Kośla T. Ćwiczenia z higieny zwierząt. Wyd. SGGW. Warszawa, 2001.

# Occurrence of *Clostridium tetani* in horse breeding environment

## Abstract

**Introduction.** At the age of promoting the spending of an active free time, the risk of tetanus infection among people who have contact with horses by practicing horse riding as a sport, or even recreationally, is not in doubt. The isolation of toxigenic strains of *Clostridium tetani* in the horse breeding environment carried out in the presented study confirmed the actual risk of contracting tetanus by humans and animals.

**Objective.** The objective of the study was an attempt to isolate *Clostridium tetani* from the horse breeding environment.

**Material.** The studies were conducted in 2 horse breeding centres and 1 private horse riding centre. The material for the study were 8 samples each of: hay and oats, horse stable dust, faeces, straw bedding and soil. At each centre, samples were collected according to the same scheme. Out of each 8 samples from individual objects, 1 collective sample was produced, which was considered as a representative sample.

**Results.** The bacterial colonies possessing characteristics typical of *Clostridium tetani* were isolated from the samples of: faeces, bedding, dust and fodder, whereas no such bacteria were cultivated from surface layers of soil temporarily or permanently remaining under the effect of sunshine. Based on the results obtained, it was noted that the biological material from the horse breeding environment contained *Cl. tetani* bacteria, therefore creating risk for life and health of humans and animals.

## Key words

*Clostridium tetani*, horses, environment

## Проявление *Clostridium tetani* в коневодстве

### ■ Аннотация

**Введение.** В эпоху пропаганды активного отдыха, угроза заражения людей столбняком, которые имеют контакт с лошадьми, занимаясь конным спортом или для отдыха не вызывает сомнений. Проведенные в данной работе исследования изоляции токсических штаммов *Clostridium tetani* в окружении лошадей подтвердили актуальный риск заболеваемости столбняком людей и животных.

**Цель исследования.** Цель данного исследования состояла в попытке изолировать *Clostridium tetani* в среде обитания лошадей.

**Материал исследований.** Исследования были проведены в двух коневодческих центрах и в одном частном конном центре. Материал состоял из 8 образцов: сено и овес, пыль из конюшни, кал, подстилка и почва. В каждом центре были сняты образцы в соответствии с той же схемой. Из каждых 8 образцов из отдельных объектов создано по одному обобщающему образцу, который рассматривалась, как репрезентативный.

**Результаты.** Бактериальные колонии, характеризующиеся типичными чертами для tetani Clostridium, были изолированы из таких образцов, как: экскременты, мусор, пыль и корм. Эти бактерии не удалось вырастить в верхних слоях почвы, временно или постоянно находящихся под влиянием солнечных лучей. На основании полученных результатов исследования установлено, что биологический материал из коневодческой среды содержал бактерии Cl. tetani, вследствие чего представляет угрозу для жизни и здоровья животных и людей.

### ■ Ключевые слова

*Clostridium tetani*, лошади, окружающая среда

## Прояв *Clostridium tetani* в конярстві

### ■ Анотація

**Вступ.** В епоху пропаганди активного відпочинку, загроза зараження людей на правець, які мають контакт з кіньми, займаючись кінним спортом або для відпочинку, не викликає сумнівів. Проведені в даній роботі дослідження ізоляції токсичних штамів *Clostridium tetani* в оточенні коней підтвердили актуальний ризик захворюваності на правець людей і тварин.

**Мета дослідження.** Мета даного дослідження полягала у спробі ізолювати *Clostridium tetani* в середовищі існування коней.

**Матеріал досліджень.** Дослідження були проведені у двох конярських центрах і в одному приватному кінному центрі. Матеріал складався з 8 зразків: сіно та овес, пил зі стайні, екскременти, підстилка і ґрунт. У кожному центрі були зняті зразки відповідно за такою самою схемою. З кожних 8 зразків з окремих об'єктів створено по одному узагальнюючому зразку, який розглядався, як репрезентативний.

**Результати.** Бактеріальні колонії, які характеризуються типовими рисами для tetani Clostridium, були ізолювані з таких зразків, як: екскременти, сміття, пил і корм. Ці бактерії не вдалося виростити у верхніх шарах ґрунту, тимчасово або постійно перебуваючих під впливом сонячних променів. На підставі отриманих результатів дослідження встановлено, що біологічний матеріал з конярського середовища містив бактерії Cl. tetani, внаслідок чого представляє загрозу для життя і здоров'ю тварин і людей.

### ■ Ключові слова

*Clostridium tetani*, коні, навколишнє середовище