
Zakład Antropozoonoz Instytutu Medycyny Pracy i Higieny Wsi w Lublinie
Kierownik: prof. dr Józef Parnas

Anna KOZICKA i Józef PARNAS

Wyniki badań histopatologicznych narządów wewnętrznych małych ssaków w kierunku leptospirozy

**Результаты гистопатологических исследований внутренних
органов мелких млекопитающих, зараженных лептоспирами**

**Results of Histopathological Examination of Internal Organs
of Small Mammals for Detection of Leptospirosis**

MATERIAŁ BADAŃ

II i III ekspedycja badawcza naszego Instytutu dla opracowania ognisk leptospirozy na Lubelszczyźnie (1956, 1957) posiadała odrębną pracownię histopatologiczną. Dzięki temu można było uzupełnić metodykę badawczą ekspedycji, badaniami histopatologicznymi. Badania te, prowadzone w ciągu lata w Tomaszowie Lubelskim kontynuowane są w dalszym ciągu w Zakładzie Antropozoonoz.

Materiałem naszych badań były małe ssaki, głównie gryzonie, odłowione w ramach ekspedycji przez grupę zoologiczno-ekologiczną. Małe ssaki z odłowów dostarczono do naszej pracowni w liczbie 1127 zwierząt. Ponadto zbadano 80 świnek morskich zakażonych doświadczalnie.

Przy przeglądaniu literatury światowej (1—7), nie spotkaliśmy wypadku aby bezpośrednio w skład ekspedycji badawczej w ogniskach przyrodniczych antropozoonoz, a w szczególności leptospiroz, wchodziła pracownia histopatologiczna. Badania histopatologiczne małych ssaków wykonywane były dotąd w badaniach leptospirologicznych tylko fragmentarycznie i na małym materiale. Dlatego też, oprócz histopatologii choroby Weila u człowieka, szczura i świnki morskiej, — znaleźliśmy w literaturze krajowej i zagranicznej znikome dane o histopatologii leptospirozy małych ssaków. Nasze badania systematycznie prowadzone na 1127 małych ssakach dziko żyjących i na 80 świnkach morskich, eksperymentalnie zakażonych, można uznać za pierwsze tego rodzaju.

METODYKA PRACY I WYNIKI

Badacze radzieccy, a w szczególności *W a r f o ł o m i e j e w a* *), przywiązują dużą wagę do badania mikroskopowego materiału, pobranego świeżo z tkanki nerkowej małych ssaków. Metoda ta polega na tym, że

*) informacja ustna.

odrazu przy sekcji małego ssaka pobiera się pipetą pasteurowską nieco materiału z kilku miejsc nerek, zawiesza się materiał w roztworze fizjologicznym i bada się w ciemnym polu widzenia.

W naszych badaniach mikroskopowych zastosowaliśmy również metodę barwienia leptospir. Nie mając własnego doświadczenia wypróbowaliśmy kilka sposobów barwienia, a mianowicie metody: K i k t e n k i, P u l c h e r a, R o m a n o w s k i e g o - G i e m z y, metodę kombinowaną M a y - G r ü n w a l d a - P a p p e n h e i m a, i metodę impregnacji wg F o n t a n y.

W wyniku tych prób wstępnych doszliśmy do przekonania, że najbardziej odpowiada nam metoda F o n t a n y. Tą metodą przebadaliśmy 800 szt. małych ssaków.

Biorąc pod uwagę, że preparaty mazane sporządzano każdorazowo ze śledziony, wątroby i nerek, trzeba było przebadać 2400 preparatów mikroskopowych. To zadanie zostało wykonane w czasie ekspedycji. Metoda impregnowania polega na tym, że przygotowuje się trzy różne roztwory w skład których wchodzi: formaldehyd, kwas octowy, tanina, fenol, AgNO₃ i amoniak.

Barwienie: na wysuszony na powietrzu preparat nalewa się trzykrotnie przez 30 sek. roztwór pierwszy. Potem spłukuje się alkoholem absolutnym, w którym pozostawiamy go na 3 minuty. Po odparowaniu alkoholu i wyschnięciu, preparat zadaje się na 30 sek. roztworem drugim i podgrzewa do ukazania się pary. Następnie dokładnie spłukuje się najpierw wodą bieżącą, potem destylowaną i zanurza się w roztworze trzecim, który podgrzewa się przez 1 minutę; następnie spłukuje się wodą destylowaną i pozostawia do wyschnięcia.

Przeglądając preparaty spostrzegaliśmy leptospiry w wątrobie w postaci krętków impregnowanych srebrem w skupiskach między komórkami. Podobny obraz spostrzegano w śledzionie. W niektórych preparatach były to tylko pojedyncze leptospiry, w innych mniejsze lub większe zgrupowania. W tkance nerkowej zauważono krętki bardziej wydłużone pojedynczo lub w skupiskach. Oczywiście tego rodzaju badania mikroskopowe przyjmowaliśmy jako kontrolne, starając się przy tym odróżnić leptospiry od artefaktów. Jednakże, przy zestawieniu wyników badań mikroskopowych z wynikami pracowni serologicznej, stwierdzaliśmy, że są zgodne one w dużym odsetku; w innych przypadkach, badanie mikroskopowe uzupełniało badanie serologiczne. Ogólnie podamy, że wśród 800 małych ssaków zbadanych metodą F o n t a n y, mikroskopowo dodatnich było:

1. <i>Microtus arvalis</i>	na ogólną liczbę bad.	373 dodatnich	— 24
2. <i>Arvicola terrestris</i>	„ „ „ „	100	„ — 25
3. <i>Fiber zibethicus</i>	„ „ „ „	29	„ — 0
4. <i>Rattus norvegicus</i>	„ „ „ „	9	„ — 0
5. <i>Erinaceus roumanicus</i>	„ „ „ „	57	„ — 1
6. <i>Sorex araneus</i>	„ „ „ „	6	„ — 1

7. <i>Neomys fodiens</i>	na ogólną liczbę bad.	20	dotadnich	—	4
8. <i>Apodemus agrarius</i>	„ „ „ „	1	„	—	0
9. <i>Cricetus cricetus</i>	„ „ „ „	50	„	—	9
10. <i>Micromys minutus</i>	„ „ „ „	13	„	—	4
11. <i>Talpa europaea</i>	„ „ „ „	2	„	—	1
12. <i>Sorex minutus</i>	„ „ „ „	28	„	—	5
13. <i>Crocidura leucodon</i>	„ „ „ „	3	„	—	0
14. <i>Mustella nivalis</i>	„ „ „ „	7	„	—	7
15. <i>Microtus ratticeps</i>	„ „ „ „	188	„	—	41
16. <i>Clethrionomys glareolus</i>	„ „ „ „	3	„	—	1
17. <i>Mustella putorium</i>	„ „ „ „	1	„	—	0

Badania histopatologiczne małych ssaków:

Od każdego małego ssaka (1127 szt.) pobierano nerki, śledzionę, wątrobę, płuca, serce i węzły chłonne. Narządy te odpowiednio numerowane, utrwalono w 7—10% roztworze obojętnego formolu. Utrwalony materiał zanurzano w 95% alkoholu, stąd przenoszono do wody destylowanej kilkakrotnie zmienianej. Potem przenoszono do świeżo przyrządzonego 1—3% azotanu srebra na 2—3 dni przy temp. 37°C w termostacie a po dokładnym spłukaniu wodą destylowaną zanurzano w utrwalaczu zawierającym kwas pyrogallowy i formol, na 1—2 dni w temp. pokojowej. Następnie skrawki płukano w wodzie destylowanej i odwadniano alkoholem absolutnym i ksylenem. Po dokładnym odwodnieniu i zamknięciu w parafinie wykonywano skrawki mikrotomowe grubości 3—5 mikronów, a następnie sporządzano preparaty. Jest to skrócona przez nas metoda Levaditiego. Równocześnie wykonywano preparaty barwione hematoksyliną i eozyną celem określenia zmian w komórkach narządów. Preparaty barwione metodą Levaditiego dają piękniejszy obraz aniżeli preparaty mikroskopowe barwione metodą Fontany.

Szczególnie charakterystyczny jest układ leptospir w tkance nerkowej. W świetle własnych spostrzeżeń możnaby podać następujące typy tego układu:

Typ I: W świetle kanalików nerkowych widoczne są gęste, intensywnie barwiące się zlepy leptospir, przylegające ściśle do nabłonka.

Typ II: W świetle kanalików nerkowych widać skupiska przypominające luźne kłębki.

Typ III: W świetle kanalików nerkowych widoczne są luźne i nieregularne skupiska, częściowo tylko przylegające do nabłonka.

Typ IV: Małe, punkcikowate skupiska leptospir w świetle kanalików nerkowych.

Preparaty te wyjaśniają nam jak wielką rolę odgrywa tkanka nerkowa, a w szczególności kanaliki, jako długotrwałe siedlisko leptospir u małych ssaków. Mocz, przepływając kanaliki nerkowe, unosi z sobą masę leptospir i nic dziwnego, że Warfołomiejew a i współpracownicy stwierdzali czasem w moczu małych ssaków około 300 leptospir w polu widzenia. Fakt ten ma duże znaczenie epidemiologiczne. Małe ssaki, u których w nerkach stwierdzono leptospiry bez obecności swoistych przeciwciał w surowicy krwi są klasycznymi nosicielami i siewcami leptospir (tab. 1).

W badanych narządach małych ssaków zakażonych leptospirami stwierdzaliśmy następujące zmiany histopatologiczne: objawy zwyrodnienia mięszowego, drobne ogniska martwicy w mięszu, pojedyncze nacieki limfocytarne i leukocytarne, wybroczyny krwawe w tkance podścieliskowej narządów mięszowych z minimalnym odczynem łącznotkankowym. Spostrzegane przez nas zmiany anatomiczno-patologiczne w narządach małych ssaków wskazują na to, że leptospiroza przebiega u nich, jeśli mowa o naszych badaniach i o leptospirach: *L. grippotyphosa*, *L. sejroe* i inne, — z wyłączeniem *L. icterohaemorrhagiae*, *L. canicola*, — w postaci raczej przewlekłej, bez ognisk martwicy i większych nacieków zapalnych. Świadczy to o symbiotycznych stosunkach układających się w pewnych granicach, między ustrojem małych ssaków, a bytującymi u nich leptospirami. Pozostaje to zapewne w związku ze wspólną, długą drogą wzajemnego rozwoju ewolucyjnego.

WNIOSKI

1. W kompleksie badań leptospirologicznych nie można zarówno w ekspedycjach, jak i w pracach doświadczalnych, pomijać metodyki mikroskopowej i histopatologicznej; w tym zakresie nasza praca wnosi pewien wkład do piśmiennictwa polskiego i zagranicznego.

2. Zarówno badania mikroskopowe narządów małych ssaków, wykonywane metodą Fontany, jak również bardziej dokładne badania histopatologiczne wykonywane metodą Lewaditiego i barwione hematoksyliną i eozyną, wykazały, że wśród 1127 małych ssaków, odłowionych w ogniskach przyrodniczych leptospiroz, stwierdzono liczne przypadki dodatnie. Pokrywały się one w części z badaniami serologicznymi krwi małych ssaków, oraz z posiewami bakteriologicznymi ich narządów. Pewna część dodatnich wyników mikroskopowo-histopatologicznych, uzupełniała wyniki badań mikrobiologicznych. Jak przedstawiono w tabeli 1, u części małych ssaków stwierdzono w tkance nerek leptospiry bez obecności przeciwciał antyleptospirozowych w surowicy krwi. Są to klasyczni nosiciele i siewcy leptospir, odgrywający dużą rolę epidemiologiczną w ogniskach przyrodniczych gorączki błotnej.

3. Można było wyróżnić 4 postaci charakterystycznego układu leptospir w tkance nerkowej.

4. Badania histopatologiczne wykazały w narządach małych ssaków, zakażonych leptospirami, zmiany następujące: objawy zwyrodnienia mięszowego, drobne ogniska martwicy w mięszu, pojedyncze nacieki limfocytarne, wybroczyny krwawe w tkance podścieliskowej narządów mięszowych z minimalnym odczynem łącznotkankowym.

PIŚMIENNICTWO

1) Austoni M.: Le Leptospirosi — monografia, Padova 1953, 2) Gsell O.: Leptospirosen. monografia. Basel 1952, 3) Попова Е. М. и Амосенкова Н. Я.: Rezultaty diagnostiki leptospiroznoj zeltuchy metodom bioprob. Z.M.E.I. Moskwa 1953, 4) Rozanow N. J.: Mikrobiologiczeskaja diagnostika zaboiewanji siel.-chaz. ziwotnych. Moskwa 1952, 5) Salminen A.: Studies on the Occurrence of various Leptospirae types in Finland — monografia — Helsinki 1956, 6) Zwiery J.: Leptospirozy. PZWL, Warszawa 1957, 7) Zoonoses — connaissances et techniques nouvelles — WHO — Geneve. monografia 1954.

РЕЗЮМЕ

Следует подчеркнуть, что в комплексе лептоспирологических исследований нельзя как в научных экспедициях, так и в экспериментальных лабораторных работах, упускать из виду микроскопическую и гистопатологическую методику; в этом отношении работа авторов в некоторой степени обогащает как соответствующую польскую, так и зарубежную научную литературу.

И микроскопические исследования органов мелких млекопитающих, производимые по методу Фонтаны, и более точные и подробные гистопатологические исследования, проводимые по методу Левадити и методом окрашивания гематоксилином и эозином показали, что среди 1127 мелких млекопитающих, словленных в натуральных очагах лептоспирозов, были установлены многочисленные положительные случаи, которые частично совпадали с результатами серологических исследований крови мелких млекопитающих, а равно и с посевами бактерий, выделенных из их органов. Определенная часть положительных микроскопически — гистопатологических результатов была дополнением микробиологических исследований.

Как показано на таблице I, у части мелких млекопитающих обнаружены в почечной ткани лептоспиры при полном отсутствии соответствующих антител в сыворотке крови. Эти млекопитающие являются подлинными носителями лептоспир, играющими огромную эпидемиологическую роль в природных очагах водной лихорадки.

В почечной ткани авторам удалось выделить четыре штамма лептоспир характерных для этой ткани.

На основании гистопатологических исследований в органах мелких млекопитающих, зараженных лептоспирами, обнаружены следующие изменения: симптомы паренхиматозного вырождения, мелкие очаги некроза в паренхиме, единичные лимфатические инфильтраты, кровоизлияния в подстилающей ткани паренхиматозных органов с минимальной соединительнотканевой реакцией.

SUMMARY

In the complex of leptospirological investigations, both during expeditions and in experimental research work, the microscopic and histopathological methods should not be neglected; in this connection the present paper is a certain contribution to the Polish and foreign literature on this subject.

Both microscopic examination of organs of small mammals carried out with the use of Fontana's method, and more exact histopathological investigations conducted according to Levaditi with the use of haematoxylin and eosin staining showed that in 1127 small mammals caught in natural foci of leptospirosis, numerous positive cases could be found; they partly fitted in with serological blood tests and with bacteriological cultures from organs of small animals. A certain part of positive microscopic and histopathological results supplemented the results of microbiological tests.

It follows from table I that in a number of small mammals there were found *Leptospira* in the kidney tissue while antileptospirosis antibodies were absent from blood serum. These are the classic carriers and spreaders of *Leptospira* and they play an important epidemiological role in natural foci of swamp fever.

4 forms of the characteristic behaviour of *Leptospira* in the kidney tissue could be distinguished.

Histopathological examination revealed the following changes in the organs of small mammals infected with *Leptospira*: symptoms of parenchymatous degeneration, small necrotic foci in the parenchyma, single lymphocytic infiltrates, extravasations in the lining tissue of parenchymatous organs with a very weak connective tissue reaction.