

## DIAGNOSTYCZNE PODŁOŻE WYBIÓRCZE Z TELLURYNEM POTASOWYM, NEOMYCYNĄ I KARBOMYCYNĄ DLA *PASTEURELLA MULTOCIDA*

KAZIMIERZ BUKOWSKI, ZBIGNIEW SZYNKIEWICZ

Katedra Mikrobiologii Wydziału Weterynaryjnego SGGW, Warszawa  
Kierownik: Prof. dr Juliusz Brill

Diagnostyka bakteriologiczna pastereloz zwierząt domowych na podstawie świeżego materiału sekcyjnego nie przedstawia żadnych trudności. Prawie zawsze można wyizolować czyste kultury *P. multocida* pod warunkiem, że zwierzę nie było leczone antybiotykami.

Jeżeli materiał jest źle zabezpieczony podczas wysyłki do laboratorium, zwłaszcza w lecie, to najczęściej rozwija się w nim przypadkowa flora bakteryjna, która utrudnia właściwe rozpoznanie. Na trudności napotyka się również przy poszukiwaniu *P. multocida* w materiale z przypadków zakażeń bezobjawowych nosowo-gardłowych, w odchodach zwierzęcych oraz ze środowiska przebywania zwierząt.

Celem niniejszej pracy było poszukiwanie podłoża namnażająco-wybiórczego lub wybiórczego dla *P. multocida*. Podłoże takie byłoby pomocne przy rozwiązywaniu trudności napotykanych do tej pory w laboratoriach badawczo-rozpoznawczych. Miałoby ono również poważne znaczenie dla pogłębienia naszych wiadomości o drogach i źródłach rozprzestrzeniania się *P. multocida*.

Dla większości drobnoustrojów chorobotwórczych, takich jak salmonelle, shigele, paciorkowce, gronkowce, włoskowce różycy — znane są liczne podłoża diagnostyczne szeroko stosowane z dobrym wynikiem. Natomiast dla pastereli, a zwłaszcza *P. multocida* znane są tylko nieliczne podłoża tego rodzaju. Wyniki osiągnięte za pomocą tych podłoży są raczej niezadowalające. W związku z tym na konferencji zorganizowanej przez Wydział V Polskiej Akademii Nauk w dniu 20. VI. 60, poświęconej zagadnieniu pastereloz zwierząt domowych, wypłynęła konieczność opracowania nowego podłoża wybiórczego lub poddania krytycznej analizie już znanych podłoży wybiórczych.

W celu przyspieszenia biegu przedsięwziętych badań podzielono tematykę między poszczególne zakłady naukowe. Właśnie Katedrze Mikrobiologii Wydz. Wet. SGGW przypadło w udziale m. in. zadaniami opracowanie podłoża wybiórczego.

Badania nad wyosobnianiem czystych kultur drobnoustrojów chorobotwórczych na określonych podłożach sięgają początków ery mikrobiologicznej. Z biegiem czasu, gdy pojawiły się substancje hamujące wzrost drobnoustrojów (inhibitory), poczęły pojawiać się nowe opracowania podłoży wybiórczych dla określonych drobnoustrojów.

Poddano badaniom działanie licznych substancji chemicznych i określono ich rolę jako inhibitorów wstrzymujących wzrost bakterii zarówno chorobotwórczych, jak i niechorobotwórczych. Duże możliwości stworzyło odkrycie bakteriostatycznych i bakteriobójczych właściwości barwników anilinowych. Odkrycie antybiotyków znacznie powiększyło liczbę stosowanych inhibitorów i możliwości opracowywania w oparciu o nie nowych lepszych podłoży wybiórczych. Spośród inhibitorów, które znalazły zastosowanie w podłożach wybiórczych, należą ze związków nieorganicznych chlorek kobaltowy, azydek sodowy, telluryn i telluran potasowy, zaś z barwników anilinowych — fuksyna, fiolet krystaliczny i goryczkowy, zieleń malachitowa i wiele innych. Z antybiotyków należy wymienić penicylinę, neomycynę, tyrotrycynę, karbomycynę, bacytracynę.

Wielu badaczy przed odkryciem antybiotyków opracowywało podłoża wybiórcze dla pastereli. Należą do nich: D r e m a n n, T e a g u a (1917), M e y e r, B a t c h e l d e r (1926), T h a l C h e n (1930) oraz D a s (1948). Podłoża opracowywane przez wymienionych badaczy nie spełniały jednak pokładanych nadziei, gdyż pasterele wykazywały skąpy wzrost, a drobnoustroje z flory przypadkowej, zarówno Gram +, jak Gram —, wyrastały nie rzadko prawie tak, jak na normalnych podłożach odżywczych. Podłoże Dasa próbowano wykorzystać u nas ale wyniki były niezadowalające i dalszych prób z nim zaniechano.

Do bardzo nowoczesnych podłoży wybiórczych dla *P. multocida* należy podłoże opracowane przez M o r r i s a (1958). Na podstawie danych autora daje ono bardzo dobre możliwości wyosobniania pastereli z badanego materiału. Jednak zastosowane w tym podłożu wybiórczym standartowe podłoże podstawowe firmy „Difco” jest trudne do nabycia, a antybiotyk tyrotrycyna również nie jest u nas łatwo osiągalny. Nie pozwoliło to autorom ocenić to podłoże i porównać własne wyniki z wynikami M o r r i s a.

Podjmując niniejsze opracowanie wzięto pod uwagę zarówno inhibitory z grupy substancji nieorganicznych, barwników anilinowych, jak też i antybiotyki. Kierowano się również względami dostępności w kraju składników potrzebnych do opracowywanego podłoża. Stanowi ona podstawowy warunek możliwości powszechnego zastosowania podłoża w diag-

nostyce laboratoryjnej przez placówki usługowe i badawcze. Odpowiedni dobór podłoża podstawowego i inhibitorów, ustalenie ich zakresu działania stanowi cel niniejszej pracy.

**Materiały i metody badań.** Podłoża: w badaniach własnych nad podłożem wybiórczym użyto jako podłoża podstawowe pożywki płynnej i stałej. Skład pożywki płynnej był następujący: sacharoza — 2,0 lub glikoza 10,0,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  — 1,0,  $KH_2PO_4$  — 2,74,  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$  — 10,745. Składniki te rozpuszczano w bulionie do objętości 1000 ml. Pożywka stała zawierała te same składniki z dodatkiem 2% agaru i 5% surowicy inaktywowanej przez 30 min. przy 60°C lub 5% odwłóknionej krwi baraniej albo końskiej. Przed wyjałowieniem pH obu pożywek doprowadzono do 7,4 lub 7,6; sterylizowano pod ciśnieniem  $\frac{3}{4}$  atm. przez 20 min.

Inhibitory: z azydku sodowego, tellurynu i telluranu potasowego przygotowywano 1-procentowe roztwory wodne, a z chlorku kobaltowego 10-procentowy roztwór wodny, które wyjaławiano w aparacie Kocha przez 15 min. Fiolet krystaliczny, akryflawinę, zieleń malachitową, zieleń brylantową przygotowywano jako 0,25-procentowe roztwory wodne i wyjaławiano w aparacie Kocha przez 30 min. Roztwory antybiotyków, karbomycyny, neomycyny i maksypenu przygotowywano w jałowej wodzie destylowanej o pH 7,4 w stężeniu 25 mg/ml i przechowywano w potrzebnych porcjach w stanie zamrożenia.

Szczepy laboratoryjne użyte w doświadczeniu: 26 terenowych szczepów *P. multocida* otrzymane z WZHW; trzy szczepy standartowe typu serologicznego A B D — od dr Cartera. Poza tym użyto: 6 szczepów *E. coli*, 2 — *Proteus vulgaris*, 3 — *Erysipelothrix insidiosus*, 2 — *Bac. subtilis*, 4 — *Salmonella* z grup serologicznych B i C, 3 — *Streptococcus viridans*, 1 — *Klebsiella scleromatis*, 3 — *Staph. aureus*.

Pierwsze serie doświadczeń wykonano na podłożu płynnym z wymienionymi uprzednio inhibitorami, metodą seryjnych rozcieńczeń, stosowanych w badaniach wrażliwości drobnoustrojów na antybiotyki. W doświadczeniach tych chodziło o zbadanie przydatności inhibitorów do użycia w opracowywanym podłożu wybiórczym, zarówno dla drobnoustrojów Gram +, jak Gram -. W tych wstępnych próbach używano tylko szczepów *P. multocida*, *E. coli* i *Staph. aureus*. Do dalszych doświadczeń wybierano inhibitory, które w stężeniu dwukrotnie wyższym od hamującego wzrost *E. coli* lub *Staph. aureus* pozwalały na normalny wzrost wszystkich badanych 29 szczepów *P. multocida*. Rozcieńczenia seryjne roztworów wyjściowych inhibitorów przygotowywano w 2 ml pożywki wsiewając z kolei do każdej probówki 0,1 ml 24-godzinnej hodowli szczepów *P. multocida*, *E. coli* lub *Staph. aureus* w rozcieńczeniu 1/100. Kontrolę stanowił posiew na pożywce podstawowej używanej do rozcieńczeń inhibitorów. Wyniki przeprowadzonych badań ilustruje tabela 1.

Tabela 1

## Wpływ inhibitorów w pożywce płynnej

pH	Stężenie inhibitorów w mcg/ml pożywki	Rodzaj drobnoustrojów			Wzrost na pożywce bez inhibitorów			
		<i>P. multocida</i>	<i>E. coli</i>	<i>Staph. aureus</i>	<i>P. multocida</i>	<i>E. coli</i>	<i>Staph. aureus</i>	
7,2—7,4	Azydek sodowy	200	+	—	0	+	+	+
		100	+	+	0			
		50	+	+	0			
	Chlorek kobaltowy	1000	—	—	0			
		500	+	+	0	+	+	+
		250	+	+	0			
	Telluran potasowy	100	±	—	0			
		50	+	—	0	+	+	+
		25	+	+	0			
		12,5	+	+	0			
	Telluryn potasowy	100	+	—	0			
		50	+	—	0	+	+	+
		25	+	+	0			
	Fiolet krystaliczny	10	—	+	±			
		5	+	+	+	+	+	+
		2,5	+	+	+			
	Zieleń brylantowa	2,5	+	+	—	+	+	+
	Zieleń malachitowa	2,5	—	—	—	+	+	+
	Akryflawina	2,5	—	0	0	+	+	+
	Karbomycyna	100	+	0	—			
		50	+	0	—	+	+	+
	Neomycyna	25	—	—	—			
		12,5	+	—	—	+	+	+
		6,2	+	+	—			
	Maksypen	0,2	±	0	—	+	+	+

Legenda: + = wzrost  
 — = brak wzrostu  
 0 = nie badano  
 ± = niektóre szczepy rosną

Stwierdzono, że azydek sodowy w stężeniu 200 mcg/ml, telluryn potasowy w stężeniu 50 mcg/ml, neomycyna w stężeniu 12,5 mcg/ml hamują całkowicie wzrost drobnoustrojów Gram —, a karbomycyna w stężeniu 50 mcg/ml i neomycyna w stężeniu 12,5 mcg/ml hamują całkowicie wzrost

drobnoustrojów Gram + i Gram -. W oparciu o te wyniki, które pozwoliły na dobór odpowiednich inhibitorów i określiły ich dawkę optymalną hamującą wzrost flory bakteryjnej przypadkowej, a w stężeniach wyższych niż dla tych drobnoustrojów ustalono, nie hamowały wzrostu *P. multocida*, przystąpiono do badań nad zachowaniem się ostatniego z drobnoustrojów oraz kantaminantów na pożywce stałej wzbogaconej dodatkiem surowicy, lub krwi oraz neomycyny, karbomycyny i tellurynu potasowego i azydku sodowego.

Ponieważ inhibitory na podłożu stałym działają około 10-krotnie silniej, to do pożywek stałych dodawano odpowiednio niższe dawki inhibitora niż do pożywek płynnych. Przed przygotowaniem podłoży z różnymi stężeniami inhibitorów agar rozpuszczony ochładzano do 49—52°C, a następnie dodawano określone porcje inhibitorów. Jak wiadomo, na działanie wysokich temperatur antybiotyki są szczególnie wrażliwe. Na tak przygotowane płytki posiewano 24-godzinne hodowle badanych drobnoustrojów stale używając tej samej ezy o średnicy oczka 2 mm.

Wyniki uzyskane na podłożach stałych, do których dodawano inhibitory o różnych stężeniach, przedstawiono w tabeli 2.

Z tabeli tej wynika, że przy opracowywaniu podłoży wybiórczych nie tylko wchodzi w grę jako pierwszorzędne czynniki rodzaj inhibitorów i ich stężenie, ale również stężenie jonów wodorowych pożywki oraz rodzaj substancji wzbogacającej wzrost. Wyniki uzyskane wskazują, że surowica ma zdolność osłaniającą dla wszystkich drobnoustrojów. Z drugiej strony jednak wiadomo, że surowica dodana do pożywki znacznie obniża jej pH, a co za tym idzie obniża działanie inhibitorów. Wiadomo również, że i neomycyna, jak i karbomycyna najlepiej działają przy słabo zasadowych wartościach pH. W związku z tym stosowano podłoże o pH 7,6, a zamiast surowicy użyto krew, która ma znacznie korzystniejszy wpływ na wzrost *P. multocida* na podłożu stałym\* i nie zmienia dostrzeżalnie pH pożywki, co nie jest obojętne przy stosowanych inhibitorach.

Ostateczny skład podłoża na podstawie przeprowadzonych ustaleń powinien być następujący: agar 2-procentowy według przepisu podanego powyżej — 100 ml, neomycyna — 300 mcg, karbomycyna — 300 mcg, telluryn potasowy — 270 mcg, odwłókniona krew barania — 5 ml. Podłoże można przechowywać w chłodni w temperaturze +4°C przez okres 10 dni.

Zastosowanie podłoża wybiórczego do diagnostyki. Na opracowywanym podłożu wybiórczym przeprowadzono badanie wycinków narządów mięsnych z 35 zwierząt padłych na pasterelozę. Stwierdzono, że podłoże spełnia swoje zadanie z niewielkimi odchyleniami.

\* Porównaj: K. Bukowski (1962) — Zeszyty Problemowe Post. Nauk Rol., nr 33.

Tabela 2

## Wpływ inhibitorów w pożywce stałej

pH	Czynniki wzbogacające pożywkę	Inhibitory w mcg/ml											
			<i>Pasteurella multocida</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Erysipelothrix insidiosa</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Salmonella typ. serol. B i C</i>	<i>Klebsiella scleromatis</i>		
7,4	surowica końska 5 ml	neomycyna 4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
		neomycyna 4											
		azydek so- dowy 50	+/-	-	-	+	+	+	0	0	0	0	
		neomycyna 4											
		azydek so- dowy 5	+/-	+	+	+	+	+	0	0	0	0	
		neomycyna 4											
		karbomy- cyna 4	+	+	+	-	-	-	0	0	0	0	
7,4		neomycyna 4											
		telluryn potasowy 4	+	+	+	-	+	0	0	0	0		
		neomycyna 4											
		karbomy- cyna 4	+	+	+	-	-	0	0	0	0		
7,6	krew ba- rania od- włókniona 5 ml	karbomy- cyna 3	+	+	+	-	-	-	-	+	0		
		neomycyna 3											
		telluryn potasowy 2,7	+	-	+	+	+	-	-	-	-	0	
		neomycyna 3											
		karbomy- cyna 3	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		neomycyna 3											
karbomy- cyna 3	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
		telluryn potasowy 2,7											

Legenda: + wzrost normalny  
 +. rosną pojedyncze kolonie  
 +/- rosną tylko niektóre szczepy  
 - brak wzrostu  
 0 nie badano

W niektórych przypadkach na podłożu tym pojawiają się pojedyncze kolonie z grupy ziarniaków lub nie pełzające kolonie *Proteus vulgaris*. Są one jednak zabarwione na kolor czarnostalowy. *P. multocida* rośnie obficie i tworzy kolonie niczym nie różniące się od kolonii wyrosłych na pożywkach zwykłych.

#### PIŚMIENNICTWO

1. Bukowski K. (1961) — Z. Probl. Post. Nauk Rol., 33, 35.
2. Das M S. (1958) — J. comp. Path. 68, 288.
3. Dremann J. G. Teagua O. (1917) — J. med. Res. 36, 519.
4. Meyer K. F., Batchelder A. P. (1926) — J. infect. Dis. 39, 370.
5. Morris E. J. (1958) — J. Gen. Microb. 19, 305.
6. Thal E., Chen T. H. (1955) — J. Bact. 69, 103.

К. Буковски, З. Шинкевич

#### ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ СЕЛЕКТИВНАЯ ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА С ТЕЛЛУРИТОМ КАЛИЯ, НЕОМИЦИНОМ И КАРБОМИЦИНОМ ДЛЯ *PASTEURELLA MULTOCIDA*

##### Резюме

В исследованиях по селективной питательной среде критически анализировалось 11 ингибиторов, тормозящих рост бактерий. Из них к селективной питательной среде применялись, как наиболее соответствующие предпосылкам питательной среды — неомицин, карбомицин и теллурит калия.

Установлено следующий состав селективной питательной среды: питательный 2% агар — 100 мл; сахароза — 0,2;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  — 0,1;  $KH_2PO_4$  — 0,274;  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$  — 1,074; неомицин — 300 мкг; карбомицин — 300 мкг; теллурит калия — 270 мкг, а также дефибрированная баранья или лошадиная кровь — 5 мл. Кровь и ингибиторы прибавлялись при 5°C из-за возможности инактивирования при повышенной температуре.

На питательной среде были произведены посеы бактерий из лабораторных штаммов и непосредственно с материала от 35 павших животных. Констатировано, что питательная среде вышеупомянутого состава выполняет свою задачу с незначительными отклонениями. На этой питательной среде, в исключительных случаях, растут отдельные колонии из группы кокков или не ползающие колонии *Proteus vulgaris*. Их легко отличить, так как они окрашиваются

в темностальной цвет, зато колонии *P. multocida* не изменяют своего вида. Среда может храниться в температуре 4°C около 10 дней от момента изготовления; после этого срока она постепенно утрачивает свои селективные свойства.

K. Bukowski and Z. M. Szykiewicz

## SELECTIVE AGAR MEDIUM FOR *PASTEURELLA MULTOCIDA* WITH POTASSIUM TELLURITE, NEOMYCIN AND CARBOMYCIN

### Summary

The origin of the present experiment was to prepare most suitable selective medium for *Pasteurella multocida*. For this purposes eleven bacterial growth inhibitors were tested. *Pasteurella multocida* appears to be resistant to carbomycin, neomycin and potassium tellurite but these reagents inhibits the growth of many other bacterial strains.

The final composition of selective medium is as follows: 100 ml of two per cent nutrient-agar, sucrose 0,2 g,  $MgSO_2 \cdot 7-H_2O$  0,1 g,  $KH_4PO_4$  0.274 g,  $Na_2HPO_4 \cdot 12-H_2O$  1.074 g, neomycin 300 mg, carbomycin 300 mg, potassium tellurite 270 mcg, and 5 ml of horse or sheep blood.

The medium was tested in laboratory experiments and in diagnosis of 35 fatal cases of pasteurellosis. In few cases on selective medium few colonies of streptococci and proteus were found, but it was easy to distinguish them because of their being gray while *Pasteurella multocida* remains colourless.

The selective medium can be stored in the refrigerator within 10 days after this period of time it loses its selectivity.