

CZESŁAW KUREK

Modyfikacja agaru żółtkowego wg Cartera do równoczesnego oznaczania lipazy i fosfatazy gronkowców w korelacji z występowaniem koagulazy

Zakład Higieny Weterynaryjnej w Gdańsku
Kierownik: dr A. CZARNOWSKI

Jak wynika z badań licznych autorów (13, 14, 22, 24, 26, 29) wytwarzanie koagulazy przez gronkowce jest cechą potencjalnej chorobotwórczości tych drobnoustrojów dla zwierząt i ludzi. Jest jednak wiele doniesień o zmianach właściwości fizjologicznych gronkowców pod wpływem antybiotyków, które powodują opóźnianie względnie zanik wykrzepiania plazmy króliczej (1, 5, 12, 15, 16).

Z dostępnego piśmiennictwa wynika, że wytwarzanie fosfatazy przez gronkowce zachodzi w dość ścisłej korelacji z występowaniem koagulazy i może być wskaźnikiem chorobotwórczości gronkowców (3, 4, 10, 13, 19, 21, 28). Wyniki prób zmierzających do wykazania analogicznych korelacji zachodzących między występowaniem lipazy i koagulazy są mniej zgodne. Alder i wsp. (2) oraz Richou i wsp. (23) sugerują, że czynnik enzymatyczny wytwarzający wokół gronkowców strefę zmętnienia na podłożu agarowym z żółtkiem jaja określanym jako „staphylococcus egg yolk factor”, a będący wg Shaha i Wilsona (25) lipazą, powstaje podobnie jak koagulaza w związku z chorobotwórczością tego drobnoustroju. Ożdżyńska i Kafel (18) wykazali w temp. 44°C zupełną zgodność prób na lipazę i koagulazę gronkowców wyosobnionych ze środków spożywczych, jednak inne doniesienia mówią o braku takiej korelacji (8, 11, 17). Panuje pogląd, że rozbieżności w ocenie właściwości fizjologicznych gronkowców mogą być wywoływane stosowaniem różnych substratów i metod badawczych (20, 27, Kasarow i Bajlczaw cyt. za 18).

Agar żółtkowy do izolacji koagulazododatnich gronkowców wprowadził Colbeck i wsp. (9), a Carter (7) zastosował do tego celu żółtko jaja w podłożu *Staphylococcus* 110. Barber i Kuper (3) zastosowali w podłożu stałym do wykrywania fosfatazy gronkowców substrat w postaci kwasu fenoltaleinodwufosforowego w stężeniu 0,01%. Wyrosłe kolonie poddawali działaniu par amoniaku, pod wpływem których gronkowce wytwarzające fosfatazę uwalniającą z substratu wolną fenoltaleinę, przyjmowały zabarwienie czerwone. Wg Pakuły i wsp. (19) sposób ten stwarza trudności w ocenie szczepów fosfatazododatnich ponieważ w przypadku zanieczyszczeń bakteryjnych pary amoniaku barwią wszystkie kolonie wyrosłe na podłożu stałym.

Na podstawie obserwacji własnych stwierdzono, że bardzo często nie ma zgodności między zdolnością wykrzepiania plazmy króliczej przez gronkowce wyosobniane z chorych zwierząt, a wytwarzaniem przez nie lipazy i fosfatazy. Postanawiono określić, czy wytwarzanie fosfatazy zależy od rodzaju podłoża na którym następuje wzrost gronkowców. Określono również stopień korelacji zachodzącej między występowaniem lipazy i fosfatazy oraz koagulazy gronkowców wyosobnionych ze zwierząt.

Materiał i metody

Badaniom poddano 679 szczepów gronkowców wyosobnionych z mleka krów hodowli wielkostatnej dotkniętych klinicznymi i podklinicznymi postaciami *mastitis*, oraz przypadków bezobjawowego niezapalnego stanu utajonego zakażenia bakteryjnego gruczołów mlecznych krów. Szczepy wyosobniano na agarze

Tab. 1. Wpływ podłoża na wytwarzanie przez gronkowce lipazy i fosfatazy w korelacji z występowaniem koagulazy

Szczepów ogółem	R o d z a j p o d ł o ż a													
	Staphylococcus 110				Staphylococcus 110 *				Bulion *					
	Lipaza				F o s f a t a z a									
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-		
	22	657	409	270	180	48	451							
679	k o a g u l a z a													
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-		
	2	20	124	533	125	284	1	269	103	77	5	43	18	433

* Dodatek substratu w postaci 0,01% wodnego roztworu soli dwuzasadowej kwasu fenoltaleinodwufosforowego.

++ Odczyn słabo dodatni (zabarwienie różowe).

odżywczym z dodatkiem 5% krwi końskiej. Celem wykazania obecności wytwarzanej przez gronkowce lipazy, przesiewano wybrane losowo kolonie na podłożu *Staphylococcus* 110 z dodatkiem żółtka jaja (7) i inkubowano w temp. 44°C przez 24 godziny (18). Próbie na obecność fosfatazy wykonywano równolegle w 18 godzinnej hodowli bulionowej w temp. 37°C z dodatkiem wodnego roztworu soli dwuzasadowej kwasu fenoltaleinodwufosforowego ($C_{20}H_{16}O_{10}P_2 \cdot Na_2$) w stężeniu 0,01% (6), oraz podłożu *Staphylococcus* 110 z żółtkiem jaja w temp. 44°C, które zmodyfikowano przez dodanie analogicznego substratu o podobnym stężeniu jak w bulionie. Wodny roztwór substratu wyjaławiano przez filtr Seitza.

Wytwarzanie lipazy określano w oparciu o występowanie wokół kolonii gronkowców strefy strąconych kwasów tłuszczowych. Obecność fosfatazy stwierdzano na podstawie reakcji barwnych, dokonując równocześnie odczytu w kierunku lipazy. Reakcje barwne wykonywano w sposób następujący: do 18 godzinnej hodowli bulionowej gronkowców dawano kilka kropli 10% NaOH, a na kulturę bakteryjną wyrosłą na zmodyfikowanym podłożu *Staphylococcus* 110 z dodatkiem żółtka jaja nakraplano ług sodowy bezpośrednio na wyrosłe kolonie. Zabarwienie podłoża płynnego o odcieniu amarantowo-czerwonym określano jako odczyn dodatni, odcień różowy traktowano jako reakcję słabo dodatnią. Na podłożu stałym reakcja dodatnia charakteryzowała się wytworzeniem amarantowo-czerwonej plamy zanikającej po upływie 1—3 godzin. Dokonywano kontroli podłoży nieposianych zawierających substrat, które inkubowano w temp. 37°C i 44°C i alkalizowano w sposób wyżej opisany po upływie 18, 24, 48 godzin.

Badania na koagulazę wykonywano przy użyciu plazmy króliczej rozcieńczonej 1:5 inkubując próby w temp. 37°C przez 3 godziny. Wyniki odczytywano co godzinę, a ostatnie sprawdzenie właściwości wykrzepiania plazmy króliczej przez gronkowce przeprowadzano po 18 godz. przetrzymywania próbek w temp. pokojowej.

Wyniki

Z danych zawartych w tab. 1 wynika, że zależnie od rodzaju podłoża wzrostowego wystąpiły znaczne różnice ilościowe w zakresie dodatnich odczynów na fosfatazę. Na zmodyfikowanym podłożu wg Cartera uzyskano dodatkowo 181 odczynów na fosfatazę (44,2%), których nie wykazano u szczepów gronkowcowych hodowanych na bulionie odżywczym. Ponadto, na podłożu stałym wszystkie wyniki wystąpiły w postaci amarantowo-czerwonych plam, gdy tymczasem w hodowli bulionowej stwierdzono 48 odczynów słabo dodatnich. Odczyny ujemne cechował brak reakcji barwnych, których nie stwierdzano też na podłożach kontrolnych. Z tab. 1 wynika również, że na podłożu *Staphylococcus* 110 z dodatkiem żółtka jaja i substratu oraz na podłożu bez substratu, stwierdzono taką samą ilość dodatnich odczynów na lipazę. Korelowały one z występowaniem koagulazy zaledwie w 9,1%. Zgodność wytwarzania koagulazy z występowaniem fosfatazy wynosiła dla drobnoustrojów hodowanych na bulionie odżywczym w 43,7%, a na zmodyfikowanym agarze żółtkowym wg Cartera 30,5%.

Omówienie wyników

Z poczynionych obserwacji wynika, że gronkowce wyosobnione z gruczołów mlecznych krów zachowały w większym stopniu właściwości wytwarzania fosfatazy aniżeli koagulazy, a pojawienie się enzymu uwalniającego wolną fenoltaleinę z substratu zachodziło wielokrotnie częściej na zmodyfikowanym podłożu aniżeli w bulionie. Wynika z tego, że u pewnej ilości szczepów bakteryjnych nastąpiła rewersja właściwości enzymatycznych, które gronkowce utraciły *in vivo*. Można przypuszczać, że na zjawisko to mogły wpłynąć antybiotyki stosowane masowo u krów w leczeniu *mastitis* podawane na zasadzie *ex iuvantibus*, co potwierdzono wywiadem w odniesieniu do zwierząt hodowli wielkostatnej od których wyosobniono badane szczepy gronkowcowe. Zmiana właściwości biochemicznych gronkowców pod wpływem działania antybiotyków jest znana (1, 5, 12, 15), jednak z dostępnego piśmiennictwa nie wynika aby cecha ta dotyczyła również i fosfatazy. Ponieważ wytwarzanie koagulazy następuje w ścisłej korelacji z występowaniem fosfatazy (4, 5, 10, 13, 19, 21, 28) nie można wykluczyć, że w warunkach *in vivo* badane szczepy utraciły właściwości wykrzepiania plazmy króliczej pod wpływem niekorzystnych czynników rozwojowych. Na uwagę zasługuje stwierdzenie, że na agarze *Staphylococcus* z żółtkiem jaja i substratem, spośród 270 szczepów fosfatazoujemnych tylko jeden szczep wytwarzał koagulazę (0,37%), natomiast spośród 451 analogicznie reagujących szczepów na podłożu bulionowym, koagulazę wytwarzało 18 szczepów (4%).

Trudny do interpretacji jest wynik uzyskany w zakresie niskiej korelacji zachodzącej między wytwarzaniem lipazy i koagulazy u badanych szczepów, co potwierdza spostrzeżenia innych autorów (8, 11, 17). Wyniki badań uzyskane przez Ożdżyńską i Kafla (18) wg których zgodność w zakresie wytwarzania lipazy i koagulazy gronkowców wyosobnionych ze środków spożywczych wynosiła 100% zdaje się wskazywać, że zmiana cech biochemicznych tych drobnoustrojów zachodzi *in vivo* w większym stopniu w organizmach chorych zwierząt aniżeli poza nimi.

Ocena potencjalnej chorobotwórczości badanych gronkowców w odniesieniu do klinicznych i podklinicznych postaci *mastitis* u krów stanowi przedmiot osobnych badań.

Wnioski

1. Zmodyfikowany agar żółtkowy wg Cartera umożliwia równoczesne określenie lipazy oraz fosfatazy gronkowców.

2. Wielokrotnie zwiększona czułość odczynu w wykrywaniu fosfatazy gronkowców na podłożu zmodyfikowanym, umożliwia dokładniej-

sze określenie właściwości biochemicznych tych drobnoustrojów, może też stanowić usprawnienie w rutynowej pracy diagnostycznej.

3. Stopień korelacji zachodzącej między występowaniem lipazy i koagulazy gronkowców wyosobnionych z gruczołów mlecznych krów jest niższy, aniżeli analogiczny stosunek zachodzący pomiędzy fosfatazą a koagulazą tych samych drobnoustrojów.

Piśmiennictwo

1. Agnew S., Kaplan M., Spink W. W.: J. Immun. 51, 307, 1945.
2. Alder V. G., Gillespie W. A., Herdan G.: J. Path. Bact. 66, 205, 1953.
3. Barber M., Kuper S. W. A.: J. Path. Bact. 1, 65, 1951.
4. Barber M., Brooksbank B. W. L., Kuper S. W. A.: J. Path. Bact. 33, 57, 1951.
5. Boniece W. S., Holmes D. W., Wick W. E.: Antibiotica Chemother. 6, 550, 1956.
6. Burbianka M., Pińska A.: Mikrobiologiczne badanie produktów żywnościowych, PZWL, 1963.
7. Carter G. H.: J. Bact. 79, 5, 1960.
8. Clark W. S., Jr More T. D., Nelson F. E.: Appl. Microbiol. 9, 195, 1961.
9. Colbeck J. C., Wreken H., Gough J. E., Allman A. L.: Can. Services Med. J. 12, 563, 1956.
10. Dobrzański T.: Prz. epid. 9, 281, 1955.
11. Jay J. M.: Appl. Microbiol. 10, 247, 1962.
12. Krzywy T., Stanecki J., Fast J.: Med. dośw. 2, 185, 1958.
13. Lachowicz T., Romanowski T.: Med. dośw. 4, 339, 1957.
14. Łominski J., Roberts G. B. S.: J. Path. Bact. 58, 187, 1946.
15. Mason H. C.: J. Immun. 51, 307, 1945.
16. Miale J. B.: Blood, 4, 1039, 1949.
17. Munch-Peterson E.: Zentbl. Bakt. ParasitKde I Orig. 178, 279, 1961.
18. Ożdżyńska E., Kafel S.: Medycyna Wet. 24, 225, 1968.
19. Pakula R., Rabczyńska F., Załęska H.: Med. Dośw. 1, 71, 1953.
20. Raj H., Liston J.: J. Bact. Proc. 72, 1961.
21. Rangam C. M., Katdare: Excerpta Medica, S IV, 9, 2, 75, 1958.
22. Richou R.: Revue Path. comp. Med. exp. 53, 178, 1953.
23. Richou R., Quinchon C., Chiral C.: Comp. rend. de la Soc. Biol. 154, 962, 1960.
24. Ruffo G.: Vet. ital. 17, 627, 1966.
25. Shah D. B., Wilson J. B.: J. Bact. 35, 516, 1963.
26. Smith H. W.: J. comp. Path. 57, 98, 1947.
27. Vadehra D. V., Harmon L. G.: Appl. Microbiol. 15, 450, 1967.
28. White W. L., Pickett M. J.: Am. J. vet. cin. Path. 23, 1161, 1953.
29. Wilweber D.: Die Staphylokokkenmastitis des Rindes. Eine Literatur studie, Diss. Berlin, 82, 1967.
30. Wright S. G., Purcel E. M., Wilcox C., Broderick M. K., Finland M.: J. Lab. clin. Med. 42, 977, 1953.

Adres autora: dr Czesław Kurek, Gdańsk-Oliwa, ul. Kaprów 10.

Autor pragnie podziękować dr Edwardowi Strzeleckiemu, z Instytutu Medycyny Morskiej w Gdańsku, za pomoc w uzyskaniu odczynników oraz Pani Elżbiecie Matyjaszyk, z Zakładu Higieny Weterynaryjnej w Gdańsku za wykonanie prac technicznych.

Курек Ч. — Модификация агаровой среды с желтком яйца по Carter для одновременного определения липазы и фосфатазы стафилококков в корреляции с обнаружением коагулазы.

Исследовали 679 штаммов стафилококков выделенных из молочной железы коров на способность продукции липазы, фосфатазы и коагулазы на агаровой среде „Staphylococcus 110” с желтком яйца (по Carter) модифицированной путем прибавки субстрата в виде 0,01 водного раствора фенол-фталейноу-фосфорной кислоты (модифицированная желточная среда = МЖС). Установили что

на МЖС количество положительных реакции на фосфатазу оказалась на 44,2% выше чем в булионной культуре; количество положительных реакций на МЖС на липазу было такое же, как на немодифицированной среде по Carter. Степень корреляции между обнаружением липазы, фосфатазы определяемой в булионе и на МЖС а коагулазой составлял 9,1%, 47,3% и 30,5%. Модифицированная желточная среда является многократно более чувствительной при обнаруживанию фосфатазы стафилококков, позволяет одновременного определить присутствие липазы и может быть принята как усовершенствование в рутинной диагностической работе.

Kurek C. — The modification of Carter's yolk egg agar for simultaneous determination of lipase and phosphatase from staphylococci in correlation with the presence of coagulase.

The production of lipase, phosphatase and coagulase by 679 strains of Staphylococcus genus, isolated from udders, was examined. On Carter's agar (Staphylococcus 110 with yolk egg), modified by the addition of 0.01% water solution of dibasic salt of phenolphthalein diphosphoric acid, the production of lipase and phosphatase was determined. On the above medium 44.2% more positive reactions against phosphatase were obtained than that in broth. The number of positive reactions for lipase on Carter's yolk egg agar with or without the substrate was the same. The extent of correlation between the production of lipase, phosphatase — determined in broth and on the modified medium — and coagulase was 9.1%, 47.3% and 30.5%. The modified medium is much more sensitive for the detection of staphylococcal phosphatase and it also enables to determine the presence of lipase.

MCBEATH D. G., PENHALE W. J., LOGAN E. F.: Badanie wpływu hodowli na poziom immunoglobulin plazmy u nowo narodzonych cieląt w oparciu o szybki test refraktometrycznego oznaczenia poziomu immunoglobulin. (An examination of the influence of husbandry on the plasma immunoglobulin level of the new born calf, using a rapid refractometer test for assessing immunoglobulin content). Vet. Rec., 88, 266-270, 1971 (11).

Określono poziom immunoglobulin w surowicy 80 nowo narodzonych cieląt z trzech różnych farm hodowlanych. Pierwszą grupę stanowiły cielęta oddzielone od krów zaraz po urodzeniu i karmione siarą z wiadra. Do grupy drugiej należały cielęta pochodzące z farm, w których nie była prowadzona hodowla zarodowa. Cielęta te karmiono mlekiem. Do trzeciej grupy włączono cielęta, które ssaly matki. Wyniki oznaczeń uzyskane w oparciu o szybki test refraktometryczny uzupełniono testem zmętnienia roztworu siarczanu cynku oraz testem dyfuzji pierścieniowej (testy te umożliwiły oznaczenie trzech typów immunoglobulin IgG, IgM, i IgA występujących w surowicy bydła). W oparciu o wyniki trzech zastosowanych testów nie stwierdzono różnic w zawartości immunoglobulin w surowicy cieląt z grupy pierwszej i drugiej. Dla cieląt z grupy pierwszej w teście refraktometrycznym uzyskano 4,80 g%, w teście zmętnienia siarczanu cynku 13,0 jedn. zaś poziom IgG wyniósł 6,25 mg/ml a IgM 0,97 mg/ml. Dla cieląt z grupy drugiej wartości te wyniosły odpowiednio 5,08%, 21,47 jedn., oraz 7,26 i 0,75 mg/ml. U cieląt z grupy trzeciej stężenie immunoglobulin w surowicy osiągało wartości najwyższe. Stwierdzono występowanie statystycznie istotnej korelacji pomiędzy wynikami testu refraktometrycznego oraz wynikiem oznaczenia całkowitej zawartości immunoglobulin w surowicy. Z.