

J. BRILL, Z. SZYMKIEWICZ

## Podłoże wybiórcze do hodowli włoskowców różycy świń

Z Zakładu Mikrobiologii i Serologii Wydz. Wet. Uniw. Warszawskiego oraz z Wojew. Zakładu Higieny Wet. PIW w Łodzi  
Kierownik: Prof. dr JULIUSZ BRILL.

Diagnostyka różycy z narządów świń, nadsyłanych do pracowni rozpoznawczych z terenu następuje zwłaszcza latem, wiele trudności, a to wskutek obecności w badanym materiale, różnorodnej flory bakteryjnej. Flora ta jest przeważnie wyrazem ubocznych wtórnych zakażeń materiału, w skład tej tzw. flory bakteryjnej zakażeń wtórnych, wchodzi najczęściej bakterie przewodu pokarmowego i *Bact. proteus*, *B. mesentericus*, różne ziarniaki, flora beztlenowocowa-gnilna. Flora ta często uniemożliwia postawienie rozpoznania.

Wydział rozpoznawczy P.I.W. oraz wszystkie pracownice bakt. przy W.Z.H.W. stosują z reguły przy posiewach materiałów nadsyłanych w kierunku diagnozowania różycy, posiew na agarze odżywczym z ewentualnym dodatkiem cukru gronowego, lub surowicy, ustalając pH pożywki na 7,6. Na pożywkach takich włoskowce różycy rosną szybko bo już w ciągu 16-tu do 24-ch godzin.

Trudności, na jakie napotyka diagnostyka różycy w postaci „wtórnych” zakażeń skłoniły nas do poszukiwania selektywnych pożywek namnażających. Ideałem pożywki byłaby pożywka, hamująca wzrost drobnoustrojów towarzyszących, a pozwalająca wyłącznie na wzrost włoskowca różycy. Przygotowaniu takiej pożywki poświęcone są dalsze rozważania i eksperymenty opisane w tej pracy.

Nauka o czynnikach wzrostowych dla drobnoustrojów i ich antagonistach, stanowi obecnie w mikrobiologii, jeden z poważniejszych rozdziałów. Różne drobnoustroje zachowują się różnie w stosunku do rozmaitych inhibitorów, co daje szerokie możliwości ich stosowania dla celów praktycznych.

Jednym z potężniejszych inhibitorów wzrostu bakterii jest z grupy barwników fiolet gentiany, wprowadzony w roku 1912 przez Churchna. Jeszcze silniejsze działanie wywierają zielen brylantowa, zielen malachitowa, a także fiolet krystaliczny. Barwniki anilinowe zasadowe działają intensywniej w środowisku zasadowym, a poza tym, co jest rzeczą godną uwagi, działają intensywniej hamując na wzrost drobnoustrojów gramododatnich, niż na wzrost gramujemnych.

W szeregu inhibitorów katalazy takich jak cyanek potasu, siarkowodor i hydroxylamina, a zatem inhibitorów, które hamują procesy syntezy i rozkładu w komórce bakteryjnej, znajdujemy azydek sodu —  $\text{NaN}_3$ , którego własności analizował jeszcze Schattentroph w 1896 r., a później szereg badaczy jak Keilin, Hartre, Blaschko, Clifton, Corbert.

Azydek sodu działa głównie hamując na wzrost drobnoustrojów gramujemnych. Podobnie jak azydek sodu zachowują się też inne czynniki oksydujące, takie jak chromian potasu, nadmanganian potasu, żelazocyanek potasu i roztwory jodu.

Bryan, Devereux, Hirschey, Corbert stosowali azydek sodu do konserwacji mleka, przy-syfanego do badań bakteriologicznych na obecność paciorkowców, wywołujących zakaźne zapalenie wymion u krów. Zdaniem tych autorów działa on lepiej od zielen brylantowej. Hartman dodawał azydek do pożywek stałych, na które wysiewał próbki mleka. Według Marshalla, Snydera i Lichtsteina 0,01% azydku sodu w pożywce z krwią hamuje wzrost rozlany pałeczki odmieńca i zezwala na izolację paciorkowców z mieszaniny drobnoustrojów. Mallmann, Botwright, Churchill zastosowali do izolacji paciorkowców pożywki stałe z dodatkiem azydku sodu i dwuchromianu potasu, stwierdzili że dodatek cukru gronowego wzmacnia działanie inhibicyjne wyżej wymienionych związków.

W badaniach nad izolacją paciorkowców z otoczenia krów, chorych na zakaźne zapalenie wymion, duże zasługi ma nasz badacz Chodkowski (1940-49), który samodzielnie, względnie w pracach wspólnych z badaczami angielskimi (Stableforth) — wprowadza nowe kombinacje między inhibitorami i podłożem, ulepszając też pożywki Edwardsa (agar z krwią i fioletem krystalicznym oraz eskulą, bulion z azydkiem sodu i fioletem krystalicznym 1933 — 1938 r.).

## Badania własne.

Badania nasze rozpoczęliśmy od azydku sodu, ( $\text{NaN}_3$ ) tj. inhibitora dla drobnoustrojów gramujemnych. Jako podłoża stosowaliśmy agar odżywczy na wyciągu z mięsa końskiego o pH 7,6 z dodatkiem 1% peptonu, 2% agar-agar i 0,5% glukozy. Do posiewów używaliśmy stale 20-to do 24-ro godzinnych hodowli *B. coli*, *B. proteus*, *B. subtilis*, *Erysipelotrix rhusiopathie suum*, na bulionie odżywczym. Szczepy pochodziły z W.Z.H.W. Posiewano czą standardową. Posiewy materiałów badanych dotyczyły wycinków narządów mięsnych świń, nadsyłanych do Zakładu.

Jałowy azydek sodu przygotowywano w postaci 1%-owego roztworu wodnego, który dodawano po sterylizacji.

Ponieważ na agarze o podanym składzie, w obecności inhibitora wzrost włoskowców był skąpy, przeto dla wzbogacenia podłoża dodano 1% surowicy i zwiększono % glukozy z 0,5 do 1%. Uzyskano w ten sposób obfitszy wzrost włoskowca przy równoczesnym zahamowaniu wzrostu *B. coli*, *B. proteus*, *B. subtilis* (103 posiewów).

Z kolei przystąpiliśmy do posiewów materiałów, nadsyłanych do badań z terenu, a znajdujących się często w stanie rozkładu gnilnego (163p). Siano metodą odciskową z następowym rozprowadzeniem materiału czą po powierzchni płytki.

Po szeregu prób, których, jako nie istotnych in

extenso nie przytaczamy doszliśmy do wniosku, że rozcieńczenie 1:100.000 fioletu kryst. i fioletu goryczkowego najlepiej spełnia rolę inhibitorów w stosunku do gramododatnich drobnoustrojów, przy tym rozcieńczeniu ulegają zahamowaniu nawet paciorkowce, a włoskowce rosną bardzo dobrze, pod warunkiem, że do pożywki doda się 2% surowicy i 1% glukozy.

Nie będziemy tutaj przytaczać szeregu poszczególnych etapów naszych prób, albowiem nie wnoszą nic nowego do tematyki. Podamy raczej ostateczny skład stosowanej przez nas pożywki obecnie, nadmieniając, że w zależności od stosowanego podłoża, a w szczególności od pH jako też od zawartości surowicy w podłożu, można zauważyć czasami pewne nieznaczne wahania wartości inhibicyjnej pożywki. Nie bez znaczenia jest również wartość gatunkowa użytych inhibitorów, która usprawiedliwiać może konieczność przeprowadzenia wstępnych prób przez poszczególne laboratoria, gdyby pożywka ta miała być przez nie wprowadzona do codziennego użytku.

W tabelicy podajemy zasięg działania stosowanej obecnie pożywki już dla celów praktyki codziennej, a poniżej receptę jej przygotowania.

Tabela

Zasięg działania pożywki z azydkiem sodu i fioletem krystalicznym agar odżywczy pH 7,4, 7,6 z dodatkiem: 1% glukozy i 2% surowicy azydek sodu 1:10000 fiolet krystaliczny wzg. goryczkowy 1:100.000 wzrost po 16/24 godz.

Wzrost po 16/24 godz.								
<i>Staphylococcus</i> aur. wzgl. alb.	<i>B. coli</i>	<i>B. proteus</i>	<i>Streptococci</i> wg Lancefield				<i>B. subtilis</i>	Krysz. pelotica rhodosphe.
			A	C	D	E		
Wyjątkowo rosną gromadzą barwnik	-	-	-	-	-	-	+++	

Legenda + wzrost, — brak wzrostu.

W posiewach materiałów z terenu, a zatem z nerek, śledziony, wątroby padłych świń, spotykamy się ze wzrostem pojedynczych kolonii drobnoustrojów „zanieczyszczających”, co jednak nie zmniejsza selektywnej wartości pożywki. Kolonie te gromadzą barwnik, są nieprzezroczyste, co od razu zezwala na ich odróżnienie od charakterystycznych kolonii różycy.

Rp.

Bulion odżywczy z mięsa końskiego (peptonu 1%)	100 cm
Agar - agar	2,0 „
Cukier gronowy chem. czysty	1,0 „
Fiolet kryst. wzgl. gorycz. — rozt. 0,25% wodn. (Grübler, B.D.H.)	0,4 „

Surowica końska konserwowana chloroformem 2,0 cm  
Azydek sodu — NaNa — roztw. 1% wodny 1 „

Uwaga! Cukier zagotować w 5 cm wody destylowanej i wlać do rozpuszczonego agaru.

Azydek sodu w miarę możliwości świeżo przygotowany wlać do pożywki ostudzonej do około 50—60° C. Pożywka rozlana na płytki stopniowo traci swoją wartość. Kolor dobrze przygotowanej pożywki jest lekko fioletowy.

Oddając powyższą pożywkę łącznie z podstawami jej przygotowania do dyspozycji zainteresowanych pracowni badawczo - rozpoznawczych, jesteśmy przekonani, że przyczyni się ona w dużej mierze do usprawnienia diagnostyki różycy świń, skróci czas badań poszczególnych materiałów, a tym samym pozwoli na poczynienie dużych oszczędności w dziedzinie celowego wykorzystania pracy człowieka i posiadanych materiałów laboratoryjnych. W.Z.H.W. w Łodzi i w Warszawie zastosowały powyższą pożywkę do codziennej diagnostyki, i wydały o niej przychylną opinię. W.Z.H.W. w Łodzi stwierdza wzrost dodatnich wyników badań o kilkaset procent.<sup>\*)</sup>

Uwaga. Już po wykończeniu powyższej publikacji znaleźliśmy się w posiadaniu pracy Paackera, który stosując agar tryptonowy z krwią, podobnie jak i my z dodatkiem azydku sodu i fioletu krystalicznego poddał badaniu ponad 20 gatunków drobnoustrojów. Autor doszedł do wniosku, że odpowiednie koncentracje wspomnianych dwóch inhibitorów pozwalają na izolację paciorkowców i włoskowców różycy. Użyte przez Paackera koncentracje są zasadniczo zbliżone do podanych przez nas. Podłoże to przebadaliśmy i stwierdzamy jego pełną wartość, zwłaszcza dla paciorkowców, lecz mniejszą wartość do izolacji włoskowców z materiałów terenowych.

#### Piśmiennictwo.

- Baerthlein K.: Hb Path. Mikr. Kolle Kraus Uhlenthuth 1931, Bd 3/2, 1175.  
Chodkowski A.: Med. Wet. 1949, 9 688.  
Churchmann J. Exper. Med. 37: 1, 1923.  
Edwards S., J.: J. Comp. Path. Therap. 1933, 46, 211.  
Edwards S., J.: J. Comp. Path. Therap. 1938, 51, 250.  
Gilbert R., E. M. Humphreys: J. of. Bact. 1926, 11, 2, 141.  
Hartman G., Milchw. Forsch. 1935, 27, 116.  
Mallmann W. L., W. E. Botwrigh, E. Churchill: J. Inf. Dis 1941, 69, 3, 215.  
Marshal L., Snyder C., Lichtstein J.: Inf. Dis. 1940, 67, 113.  
Paacker A. R.: J. of. Bact. 1943, 46, 3, 343.  
Stearn E. W., Stearn A. E.: J. of Bact. 1926, 11, 5, 345.

<sup>\*)</sup> Praca in extenso ukaże się w Medycynie Doświadczalnej i Mikrobiologii.