



Fot. 2

komórki nabłonkowe z pyknotycznymi jądrami lub bez jąder oraz wolne jądra komórkowe. Stan ten szybko pogarszał się, aż wreszcie w lutym przeszedł trwałą azoospermie. Jądra szczególnie prawe, nieznacznie powiększone, bolesne; (fot. 1) termoregulacja zachowana oraz niemożność podciągnięcia jąder. Badania wydzieliny jąder na gruźlicę ujemne. Guzy w fałdzie przedpiersia (fot. 2) osiągnęły rozmiary dwu pięści. Spadek wagi żywej. W kwietniu dołączyły się objawy ciężkiej kamicy nerkowej i zwierzę zostało przekazane do uboju z konieczności.

Badania poubojowe: W tkankach fałdu przedpiersia 2 guzy o utkaniu łącznotkankowym, średnicy około 12 cm każdy, wypełnione gęstą serowatoropną masą o żółtym zabarwieniu. Przeciętna grubość ścian guzów 1,5 cm. Zrosty zapalne osłonek jądrowych. Jądra powiększone, twardej konsystencji, na powierzchni przekroju stwierdza się bardzo liczne, guzki gruźlicze wielkości ziarna grochu, całkowicie przerastające mięsz jądra. Węzły chłonne okołogardzielowe powiększone. W płucach ogniska nieżyłowego zapalenia płuc z przeświecającymi żółtawymi guzkami. W warstwie korowej nerek liczne ogniska zawałowe. Miedniczki nerkowe wypełnione piaskiem lub kamieniami dochodzącymi do wielkości laskowego orzecha. W przewodach i pęcherzu moczowym kamyczki wielkości kawioru. Badanie bakteriologiczne wycinków płuc, nerek, jąder i zawartości guzów ubitego z konieczności buhaja przeprowadzone przez WZHW w Gdańsku wykazało prątki kwasoodporne, odpowiadające morfologicznie prątkom gruźlicy.

Niniejszy przypadek świadczy o tym, że ujemny wynik, nawet kilkakrotnych, badań bakteriologicznych nasienia nie stanowi podstawy do wykluczenia procesu gruźliczego. Jeśli zaistnieje w tym zakresie uzasadnione podejrzenie należy przeprowadzić biopsję.

Adres autorów: Pow. Zakład Weterynarii, Tczew, ul. Dzierżyńskiego 29.

PRAKTYKA LABORATORYJNA

PAWEŁ POŁUJAŃSKI

Mikrobiologiczna metoda oznaczania oksytetracyliny w krajowych koncentratkach i mieszankach paszowych

Zakład Technologii i Kontroli Leków Weterynaryjnych Instytutu Weterynarii
Kierownik: doc. Z. SYNOWIEDZKI

Przemysłowe mieszanki i koncentraty paszowe stanowią obecnie ważne zagadnienie w naszej gospodarce hodowlanej. Zawarte bowiem w nich, obok wielu innych składników czynnych, niewielkie ilości antybiotyków, głównie z grupy tetracykliny, wykazują działanie stymulujące wzrost i przyrost wagowy (2,9) oraz podnoszące zdrowotność zwierząt młodych (1,3,4).

Dodatkem antybiotycznym w paszach, produkowanych przez krajowy przemysł paszowy, jest oksytetracylina (terramycyna). Normy przemysłowe, zależnie od ogólnego składu paszy i celu żywienia zwierząt, przewidują jej ilości w koncentratkach od 2 g/kg do 3 g/kg, zaś w mieszankach paszowych od 15 mg/kg do 180 mg/kg.

Zawartość oksytetracyliny w paszach można oznaczyć zarówno metodami fizyko-chemicznymi, jak i mikrobiologicznymi. Najbardziej dokładną i powszechnie stosowaną jest metoda mikrobiologiczna (5,8). Wg niej oksytetracylinę ekstrahuje się z paszy metanolem kwaśnym (980 ml metanolu i 20 ml stężonego kwasu solnego) w ilości 100 ml na każdą 10 g próbkę, a następnie oznacza się stężenie antybiotyku na dwupoziomym podłożu agarowym. Metoda ta, wymaga więc sporządzania dwójakiego rodzaju pożywek, z których jedna zawiera 2%, a druga 1% agaru. Sporządzenie dwu różnych pożywek i dwukrotne ich rozlewanie do płytek Petri'ego, tj. po 8 ml 2%, i po 4 ml 1% agaru zasianego szczepem wzorcowym wymaga wielu pracochłonnych czynności:

Szczególnie przy badaniach masowych, jest ona nie tylko pracochłonna, ale ze względu na drogie odczynniki, również kosztowna.

Zamierzeniem niniejszej pracy było opracowanie metody mikrobiologicznego oznaczania oksytetracyliny w koncentratkach i mieszankach paszowych, produkowanych przez krajowy przemysł paszowy, która byłaby tańsza i mniej pracochłonna, niż metoda zazwyczaj stosowana.

Materiał i metoda

Oznaczenie oksytetracyliny w koncentratkach i mieszankach paszowych przeprowadzono metodą mikrobiologiczną płytkowo-cylinderkową. Jako szczep wzorcowy użyto *Bacillus cereus* ATCC 8145, otrzymany z PZH w Warszawie. Szczep ten przechowywano w chłodni o tem. +4° na zwykłym 1,5% agarze skośnym o pH 6,0. Przesiewu dokonywano co 10 dni. Przed przystąpieniem do oznaczeń przeszczepiano go do bulionu zwykłego o pH 7,0 (1 eza o Φ 1 mm) i inkubowanego przez 24 godz. w cieplarni o temp. 37°. Oznaczenia przeprowadzano z hodowlą bulionową świeżo wyrosniętą.

Jako standard roboczy stosowano oksytetracyklinę zasadę o mocy 900 j/mg. Do oznaczeń odważano na wadze analitycznej 10,002 mg antybiotyku i rozpuszczono go w 1 ml 1n kwasu solnego. Roztwór przeniesiono do kolby miarowej o pojemności 100 ml i uzupełniono buforem fosforanowym o pH 4,5. Otrzymany roztwór zawierał 100 mcg/ml. Z tego roztworu sporządzano tymże buforem dalsze rozcieńczenia o stężeniu antybiotyku 1 mcg/ml („standard duży”) i 0,25 mcg/ml („standard mały”). Standardem o stężeniu 100 mcg/ml,

przechowywanym w chłodni przy temp. $+4^{\circ}$ posługiwano się przez 3 dni, natomiast rozcieńczenia 1 mcg/ml i 0,25 mcg/ml przygotowywano każdorazowo świeże.

Pasze zarówno granulowane, jak i niegranulowane (z wyjątkiem koncentratów) dokładnie rozcierano w moździerzu lub mielono na młynku na ziarna o ϕ nie większej niż 0,4 mm. 10 g badanej paszy przenoszono do kolby kulistej, płaskodennej o pojemności 250 ml. Ekstrakcji antybiotyku dokonywano kwasem solnym w ilości 100 ml. Kwas dodawano ostrożnie, porcjami, dla uniknięcia burzenia się mieszaniny szczególnie przy koncentratkach, zawierających duży dodatek kredy. Zawartość kolby wytrząsano na trzęsawce przez 15 min., a następnie płyn z nad osadu zlewarowywano do jałowej próbówki wirówkowej w ilości ok. 50 ml i wirowano przez 10 min. przy 4000 obr/min.

Do oznaczeń pobierano 10 ml odwirowanego wyciągu. Silnie kwaśny odczyn doprowadzono do pH 4,5 ługiem sodowym ln. Dalsze rozcieńczenia, dla otrzymania stężenia antybiotyku w wyciągu, które by odpowiadało 1 mcg/ml („badana duża”) i 0,25 mcg/ml („badana mała”) przeprowadzano buforem fosforanowym o pH 4,5. Przy rozcieńczeniu buforem wliczano uprzednio dodaną ilość ługu sodowego. Wyciąg z pasz i jego roztwory przygotowywano w dniu przeprowadzania badań.

Pomiaru odczynu roztworów dokonywano pehametrem lampowym typu LBS-3A.

Do badań używano płaskodennych płytek Petri'ego o ϕ 9 cm, produkcji czechosłowackiej firmy „Anumbra”.

Agar 1,5% rozgrzewano na łaźni wodnej do zupełnie płynnej konsystencji, po czym odpowiednią jego ilość (w zależności od ilości ba'ań i płytek) przenoszono do jałowej kolby. Po ochłodzeniu agaru do 47° zakażano go świeżo wyrosniętą, 24 godz. hodowlą bulionową *Bac. cereus*, w ilości 0,5 ml na każde 100 ml podłoża. Agar, po dokładnym wymieszaniu go z kulturą, rozlewano po 8 ml do płytek uprzednio wyjałowionych. Płytki, po równomiernym rozproszczeniu agaru, ustawiano na dokładnie wypoziomowanym stole. Po całkowitym skrzepnięciu podłoża, płytki umieszczano w drewnianych, czteromiejscowych statywach.

Dla przeprowadzenia oznaczenia antybiotyku w jednej próbce paszy używano 4 płytek. Na powierzchni agaru każdej płytki ustawiano po 5 jałowych cylindereków z nierdzewnej stali o ϕ wewn. 6 mm, ϕ zewnętrznej 8 mm, i wys. 10 mm. Na obwodzie płytek zaznaczano dermatografem miejsce ustawienia jednego z cylindereków. Każdy cylinderdek wypełniano odpowiednimi rozcieńczeniami standardu i wyciągu paszy badanej. Poczynając więc od miejsca zaznaczonego dermatografem i posuwając się z ruchem wskazówek zegara, napełniano cylinderki wg następującej kolejności: „standard mały” (s), „standard duży” (S), „badana mała” (b), „badana duża” (B) i „badana mała” (b). Do rozlewu każdego roztworu używano oddzielnych jałowych pipet pasterowskich, zaopatrzonych w gumowe baloniki (smoczki).

Płytki z napełnionymi cylinderekami umieszczano w cieplarni i inkubowano przy tem. 37° przez 18 godz.

Po tym czasie odczytywano za pomocą odpowiednio skonstruowanego lanometru MP2 średnicę (w milimetrach) kolistych stref zahamowania wzrostu szczepu wzorcowego. Wyniki pomiarów z czterech płytek zapisywano w tabelce wg kolejności: s, S, b, B, b. Dla „badanej malej” otrzymywano dwie liczby, które sumowano i podobnie jak dla pozostałych wartości wliczano średnią arytmetyczną. Dla określenia procentowej zawartości antybiotyku w paszy z otrzymanych liczb wliczano wartość v i w wg wzoru:

$$v = (b + B) - (s + S)$$

$$w = (B + S) - (b + s)$$

Wyliczone wartości v odkładano na osi odciętych (x), a w na osi rzędnych (y) nomogramu. Poszuki-

waną procentową wartość antybiotyku odczytywano na prostej przechodzącej przez punkt przecięcia się prostopadłych, poprowadzonych od odpowiednich wartości v i w. Przy bardzo małych wartościach v i w, utrudniających odczyt przy zagęszczeniu linii nomogramu, mnożono je przez określoną liczbę np 5 lub 10 i dalej postępowano j.w.

Przy obliczeniach procentowej zawartości antybiotyku w paszach standard przyjmowano za 100%.

Zawartość antybiotyku w mcg/g paszy obliczano wg wzoru:

$$A = \frac{a \cdot b}{10}$$

gdzie A wyraża ilość antybiotyku w mcg/g paszy, a — stopień rozcieńczenia wyciągu, b — procentową zawartość antybiotyku w paszy odczytaną z nomogramu, 10 — ilość ml wyciągu pobraną do badań, a odpowiadającą 1 g paszy.

Oznaczenie oksytetracyliny zmodyfikowaną metodą (HCl) przeprowadzano: w koncentratkach Bowitan, Suwitan, Mikro A, Mikro TA, Mikro TA-wit, Mikro Bekon, Mikro DKA, Prowit i Bekon, wyprodukowanych przez Wytwórnę Pasz w Koźminie Wlkp. w mieszankach paszowych DKA-starter, DKA-finisher, produkcji Wytwórni Pasz w Szamotułach oraz w mieszankach granulowanych MR 58/3 i MR 60/3, nadesłanych przez Ministerstwo Rolnictwa. Równolegle wykonywano oznaczenia oksytetracyliny w tych samych paszach metodą klasyczną (MK). Oznaczenie tego antybiotyku w każdej z w/w pasz powtarzano obu metodami 6—10-krotnie (tabela 1).

Tab. 1

Lp.	Rodzaj paszy	Ilość badań	Średnia zawartość oksytetracyliny w %	
			metoda	
			HCl	MK
1	Bowitan	10	103.0	101.0
2	Suwitan	8	75.0	76.25
3	Mikro A	6	97.5	97.75
4	Mikro TA	9	83.0	81.5
5	Mikro TA-wit	9	56.6	56.0
6	Mikro Bekon	6	50.25	50.5
7	Mikro DKA	6	90.25	89.25
8	Prowit	6	96.9	96.5
9	Bekon	6	93.5	92.75
10	DKA-starter	10	100.0	100.0
11	DKA-finisher	10	87.0	86.5
12	MR 58/3	6	79.5	80.0
13	MR 60/3	6	25.0	24.7

Dla kontroli wartości metody przeprowadzano oznaczenie antybiotyku w koncentratkach Mikro Bekon, Mikro Prowit i Mikro DKA pozbawionych oksytetracyliny, a którą celowo dodawano po 10 mg na każde 10 g koncentratu. Oznaczenie przeprowadzano podobnie jak w poprzednim przypadku obydwojmi metodami, przy czym oznaczenie w każdym koncentracie powtarzano dziesięciokrotnie (tabela 2).

Tab. 2

Lp.	Rodzaj paszy	Ilość badań	Średnia zawartość oksytetracyliny w %	
			metoda	
			HCl	MK
1	Mikro Bekon	10	100.5	99.75
2	Mikro Prowit	10	100.5	99.7
2	Mikro DKA	10	99.3	99.0

O m ó w i e n i e

Wyniki średnie procentowej zawartości oksytetracyliny w 9 koncentratkach i 4 mieszankach paszowych, uzyskane przy jej oznaczaniu metodą zmodyfikowaną (HCl) i klasyczną (MK) przedstawiono w tabeli 1. Przedstawione w tabeli dane przekonują, że wyniki przy ekstrakcji oksytetracyliny z pasz 1 n kwasem solnym i oznaczaniu jej % zawartości na jednowarstwowym 8 ml podłożu, zawierającym 1,5% agaru, są prawie identyczne, jak przy ekstrakcji antybiotyku metanolem kwaśnym i przy oznaczaniu na dwuwarstwowym podłożu. Uwidocznione niewielkie różnice dochodzące w niektórych przypadkach tylko do ok. 2% mogą wynikać z nierównomiernego wymieszania antybiotyku w paszy, bądź z błędu przy odczycie.

Metoda ekstrahowania oksytetracyliny z pasz 1 n kwasem solnym i oznaczania antybiotyku na jednowarstwowym podłożu, zawierającym 1,5% agaru, pozwala na całkowite wyeliminowanie metanolu i zmniejszenie ogólnej ilości pożywki o 33%, a w tym agaru o 40%. Dzięki więc całkowitej, względnie częściowej redukcji drogich i trudno osiągalnych surowców, koszt badania jednej próbki paszy, przeprowadzane go na 4 płytkach, obniża się wg obliczeń z 7,90 zł przy metodzie klasycznej, do 0,90 zł przy metodzie zmodyfikowanej, czyli o prawie 89%. Ograniczenie się zaś do sporządzania tylko jednego rodzaju pożywki agarowej i do jednokrot-

nego napełniania tą pożywką płytek Petriego — zmniejsza czas i pracochłonność o ok. 20%.

Nawiązując do tabeli 2 należy podkreślić, że przy ekstrahowaniu oksytetracyliny z koncentratów, zarówno metanolem kwaśnym, jak i kwasem solnym 1 n, wyniki były powtarzalne i prawie identyczne (100%).

W n i o s k i

1. Opracowana zmodyfikowana metoda mikrobiologicznego oznaczania oksytetracyliny w paszach, polegająca na ekstrakcji antybiotyku 1 n kwasem solnym i przy użyciu jednowarstwowego agaru 1,5% w ilości 8 ml na jedną płytkę o ϕ 9 cm, w niczym nie ustępuje metodzie zazwyczaj stosowanej (MK).

2. Koszt analizy opracowaną metodą zmniejsza się o ok. 89%, a czas pracy o ok. 20%.

P i ś m i e n n i c t w o

1. Braude R., Kon S. K., Porter J. W. G.: Nutrit. Abstr. Rev. Aberdeen 23, 3, 437, 1953.
2. Ewdokimow P. D.: Antibiotiki w wietierinarii i żywotnowodstwie. Lenizdat 103, 1964.
3. Gauze G. F.: Lekcii po antibiotikam. Moskwa 14—15, 1956.
4. Giernuch A. M., Kivman T. J.: Antibiotiki grupy tetracyklinow. Medgiz 296—316, 1962.
5. Grove D. C., Randall W. A.: Assay methods of antibiotics a laboratory manual. Medical encyklopedie. Nev York 1955.
6. Korzybski T., Kuryłowicz W.: Antybiotyki. PWN W-wa 1959, 399—408.
7. Kramery V., Ciznar I., Helcłova M., Zelkova E.: Veterinarni Medicina 2, 1964.
8. Rzewniś K., Roślik D.: Medycyna Wet. 593—596, 1959.
9. Stokstad E. L. R., Jukes T. H.: Prec. Soc. Expr. Biol. and Med. 73:523, 1950.

Adres autora: dr Paweł Połujański, Warszawa, ul. Białobrzaska 19/42.

JERZY ZAHACZEWSKI, ANDRZEJ KOMOROWSKI

Prosty zestaw do hodowli drobnoustrojów beztlenowych

Wojewódzki Zakład Higieny Weterynaryjnej w Rzeszowie
Kierownik: dr J. ZAHACZEWSKI

Zagadnienie diagnostyki drobnoustrojów beztlenowych nastęrcza duże trudności w pracowniach bakteriologicznych. Szczegółowa diagnostyka laseczek beztlenowych posiada wielkie znaczenie zarówno w badaniach produktów spożywczych (rozróżnianie drobnoustrojów beztlenowych chorobotwórczych — *Cl. botulinum*, *Cl. perfringens* od drobnoustrojów niechorobotwórczych mających jednak zasadniczy wpływ na jakość i trwałość produktów), jak i w badaniach bakteriologicznych na szelestnicę, bradsołowiec, enterotoksemię itp.

Stosowane dotychczas powszechnie u nas, w terenowych laboratoriach metody diagnostyk laseczek beztlenowych, szczególnie w badaniu środków spożywczych, opierają się na prostych podłożach (bulion Wrzoska, agar słupkowy, podłoże Wilson-Blaira) pozwalających jedynie na identyfikację grupową w obrębie tego rodzaju drobnoustrojów.

Poważną przyczyną tych trudności diagnostycznych jest między innymi brak, lub niedoskonałość posiadanych przez terenowe laboratoria bakteriologiczne odpowiedniego sprzętu do hodowli drobnoustrojów beztlenowych.

Według Willisa (6) i Hallmana (2) Lwowa (4) i Kowalenki (3) istnieją 4 zasadnicze metody hodowli drobnoustrojów beztlenowych.

1) Hodowla w aparacie Mc Intosh'a — uważana za

najdoskonalszą. Polega na obniżeniu w słoju potencjału oksydoredukcyjnego przez spalanie wodoru w obecności tlenu przy katalitycznym działaniu rozżarzonego włókna platynowego. Wobec braku w handlu aparatów Mc Intosha, stosowanie ich u nas jest bardzo ograniczone.

2) Metody chemiczne. Polegają one na umieszczeniu w szczelnym naczyniu posiewu wraz z mieszaniną związków pochłaniających tlen. Do najczęściej używanych związków pochłaniających należą: pyrogallol dwutlenku sodu w mieszaninie z węglanami. Metody te charakteryzuje duża wygoda, praktyczność i niewielkie wymagania w sprzęcie. Istnieje wariant metody, polegający na bezpośrednim dodaniu do podłoża płynnego związków silnie redukujących (np. cysteiny, soli sodowej kwasu tioglikolowego) co pozwala na hodowlę w warunkach tlenowych.

3) Metoda próżniowa. Polega ona na hodowli drobnoustrojów w warunkach obniżonego ciśnienia parcjalnego tlenu usuniętego z naczynia lub termostatu próżniowego pompą próżniową. Metoda dawniej propagowana w starszych podręcznikach przed rozpowszechnieniem aparatu Mc Intosha i metod chemicznych, ma jednak szereg wad. Za najważniejszą wadę należy uznać słabą gwarancję osiągnięcia odpowiedniej próżni. Równocześnie, często obserwuje się kondensację pary na powierzchni podłoża stałych. Wilgot-