

się że test skórny P-K na świnkach morskich jako stosunkowo łatwy i szybki w wykonaniu nadaje się do stosowania przy klasyfikowaniu form klinicznych kolibakteriozy prosiąt. Daje on odpowiedź czy dany przypadek przebiegał w mechanizmie szoku anafilaktycznego (alergicznego) z udziałem niekompletnych przeciwciał.

Na podstawie wyników tego odczynu możemy również wywnioskować jaki serotyp *E. coli* dominował w danym przypadku klinicznym.

ZDZISŁAW GLIŃSKI

## Diagnostyka bakteriologiczna zgnilca złośliwego pszczół

Katedra Epizootologii Wydziału Weterynarii WSR w Lublinie  
Kierownik: prof. dr ST. KRAUSS

Zgnilec złośliwy (amerykański) pszczół należy do najczęściej spotykanych w Polsce chorób zakaźnych czerwiu. Chorobę wywołuje *Bacillus larvae* White. W warunkach naturalnych zarazek jest chorobotwórczy dla czerwiu (głównie 5—6 dniowego), u którego obserwuje się typowe zmiany chorobowe. Właściwości morfologiczne, biochemiczne i hodowlane *Bac. larvae* nie są na tyle typowe aby można było na tej podstawie odróżnić ten zarazek od innych laseczek stwierdzonych niejednokrotnie w przypadkach chorobowych u larw pszczoł. Dotyczy to głównie *Bac. alvei* i *Bac. plulton* (drobnoustrojów izolowanych z przypadków kiślicy) oraz laseczek saprofitycznych.

W zwalczaniu zgnilca złośliwego pszczół zasadnicze znaczenie ma prawidłowe rozpoznanie choroby. Opiera się ono na badaniach kompleksowych z uwzględnieniem wywiadu epizootycznego, badania pasieki i badania laboratoryjnego. Szczególnie ważne znaczenie w kompleksie badań posiada to ostatnie, gdyż inne składowe rozpoznania dostarczają raczej danych subiektywnych, nasuwających jedynie podejrzenie choroby.

Rozpoznanie laboratoryjne opiera się głównie na badaniu mikroskopowym w szczególności zwróceniu uwagi na występowanie form wegetatywnych i zarodników. Jednakże w preparatach mikroskopowych nie jest łatwe odróżnienie endospor *Bac. larvae* od endospor innych laseczek chorobotwórczych dla pszczół lub saprofitycznych. Z tego względu dla ostatecznego rozpoznania konieczne jest wyosobnienie czystej kultury *Bac. larvae* i identyfikacji szczepu na podstawie właściwości biochemicznych i serologicznych. Wyosobnienie w czystej hodowli tego zarazka jest również pożądane dla oznaczenia jego lekooporności, co pozwala na stosowanie leczenia sterowanego.

W związku z brakiem w polskim piśmiennictwie opracowań na ten temat, wydawało się

### Piśmiennictwo

1. Buxton A., Thomilson J.: Res. Vet. Sci. 3, 186, 1962.
2. Furowicz A.: Materiały Sesji PTNW. Etiologia chorób przewodu pokarmowego u prosiąt. Warszawa, 1966.
3. Rudzki E.: Alergia, PZWL, 69, 75, 1961.
4. Sharpe H. B.: Res. Vet. Sci. 6, 490, 1965.
5. Sojka W. J.: Escherichia coli in animals, CAB, 1965.
6. Stipkowitz L., Berezani T.: Acta Vet. Acad. Sci. Hung. 17, 2, 1967.
7. Szabo J.: Magy. Allatorv. Lap. 19, 368, 1964.
8. Szilard Z., Rauss K.: It. Arch. Allergy, 2, 160, 1951.

Adres autorki: dr Ewa Sitarska, Warszawa, ul. Grochowska 272, Katedra Fizjopatologii Wydziału Wet. SGGW.

celowe przedstawienie aktualnych metod rozpoznania laboratoryjnego zgnilca złośliwego pszczół.

### Materiał do posiewów

Do badań laboratoryjnych przesyła się, z podejrzenia choroby pni próbki plastrów (o wymiarach 10×10 cm) wykazujące typowe zmiany anatomiczno-patologiczne. Z obumarłych komórek czerwiu wykonuje się preparaty mikroskopowe, barwione alkoholowo-wodnym roztworem fuksyny, 2% roztworemioletu krystalicznego lub 3% roztworem safraniny, celem wykazania obecności zarodników. Dalszemu badaniu poddaje się jedynie materiał w którym stwierdzono zarodniki. Zawartość 10 do 15 komórek ekstrahuje się jałowym roztworem 0,85% NaCl przez 2 godziny. Można również rozetrzeć materiał patologiczny w jałowych moździerzach z 0,85% NaCl lub przez wytrząsanie w buteleczkach z perełkami szklanymi. Uzyskany wyciąg rozlewa się do dwóch probówek, przy czym jedną ogrzewa się na łaźni wodnej o temp. 75°C przez 30 min. celem zabicia form wegetatywnych. Według Azuma (1) endospor *Bac. larvae* są odporne na działanie tej temperatury. Następnie, tak przygotowaną zawiesinę, wysiewa się na odpowiednie podłoże celem uzyskania pojedynczych kolonii.

Dla ustalenia źródła zakażenia należy dodatkowo przebadać węzę miód i wosk. Badania te przeprowadza się w oparciu o metodę podaną przez Kirkora (12). 2 g wosku lub węzy rozpuszcza się w mieszaninie złożonej z 8 g terpentyny i 2 ml wody o temp. 75—80°C. Po rozpuszczeniu zawiesinę wiruje się przy 5000 obr./min. przez 15 min. Badanie miodu polega na odparowaniu na łaźni wodnej o temp. 75—80°C około 40 ml miodu. Uzyskane osady służą do sporządzania preparatów i do posiewów. Kostecki i wsp. (informacja ustna) opisali nowe metody badania wosku przeznaczonego do produkcji węzy.

### Podłoża hodowlane

*Bac. larvae* z powodu swoistych wymagań odżywczych nie rośnie na zwykłych podłożach hodowlanych. Wzrost i zarodnikowanie zachodzi najlepiej w warunkach tlenowych. Zarodniki kiełkują lepiej w zakresie niskich potencjałów oksydo-redukcyjnych. Najważniejszym czynnikiem stymulującym wzrost laseczki zgnilca złośliwego pszczół jest tiamina (15) i dlatego jest ona dodawana albo w postaci czystej, albo jako czynnik zawarty w innych składnikach podłoża. Źródłem tiaminy w podłożu Whita (28, 29) jest żółtko jaja kurzego, w podłożu Holsta (9, 10, 11) wyciąg z marchwi, a w innych

podłożach pyłki roślin (22) i tkanki larw pszcze-lich (22) lub zarodki kurze (25). Pokrycie powierzchni podłoża w czasie hodowli wodą kondensacyjną pozwala na obniżenie potencjału oksydo-redukcyjnego, co sprzyja kiełkowaniu zarodników *Bac. larvae*.

Do kiełkowania zarodników i namnażania form wegetatywnych nadają się najlepiej podłoża Bailey'a i Lee (3), Bailey'a i Gibbsa (2) oraz Forstera i wsp. (5) i Michaëlsa (cyt. za 1).

Wszystkie podane wyżej podłoża nie zawierają w swoim składzie glikozy, która powoduje przedłużenie logarytmicznej fazy wzrostu (5), skraca przeżywalność *Bac. larvae* i hamuje wytwarzanie zarodników (11). Dodatek glikozy ponad 3% hamuje całkowicie wzrost *Bac. larvae*. Podłoża agarowe stałe są bardziej dogodne i dlatego podłoża półpłynne są coraz rzadziej stosowane. Bailey (3) sądzi, że wyniki badań hodowlanych uzyskane przez różnych badaczy na różnych podłożach są uzależnione bardziej od wysokości potencjału oksydo-redukcyjnego podłoża niż od ich składu jonowego i wartości odżywczych.

Do zarodnikowania *Bac. larvae* nadają się najlepiej podłoża opracowane przez Holsta i Sturtewanta w modyfikacji Azumy (1) i podłoża jajowe (28, 29). Dobry wzrost form wegetatywnych uzyskuje się również na agarze z dodatkiem 5% krwi baraniej i 1% glikozy.

W badaniach biochemicznych stosuje się podłoża cukrowe o składzie: wyciąg drożdżowy 10 g, neopepton 10 g, tiamina 0,0001 g, woda destylowana 1000 ml, roztwór wskaźnika (błękit bromofenolowy 0,2%) 24 ml. Do tak sporządzonego i wyjałowionego podłoża dodaje się jałowo 10% roztwór odpowiedniego cukru do końcowego stężenia 1%. Tworzenie siarkowodoru bada się na podłożu o składzie: wyciąg drożdżowy 10 g, poli-pepton 20 g, wyciąg z marchwi 200 ml, woda destylowana 800 ml, pH 6,8. Jako wskaźnik służy paseczek bibuły nasyconej octanem ołowiu.

*Bac. larvae* jest fakultatywnym tlenowcem rosnącym w zakresie temperatur od 35°C do 38°C (temp. optymalna 37°C), w granicach pH 6,0—7,2 (pH optymalne 6,8). Zarodniki mogą kiełkować, a laseczka

może się namnażać w warunkach ściśle beztlenowych. Badania Sturtewanta wykazały istnienie ścisłej zależności pomiędzy ilością zarodników w inoculum, a możliwością uzyskania wzrostu na podłożach sztucznych. Wzrost uzyskiwano jedynie wtedy, gdy inoculum zawierało ponad 10 tys. zarodników. W większości przypadków do otrzymania hodowli potrzeba jednak inoculum z kilkoma milionami zarodników. Jedynie przy wysiewach na podłoża z tkankami embrionalnymi, podłoża Tarra i jego modyfikacje (25), wystarcza inoculum od 100 do 1000 zarodników (schemat 1).

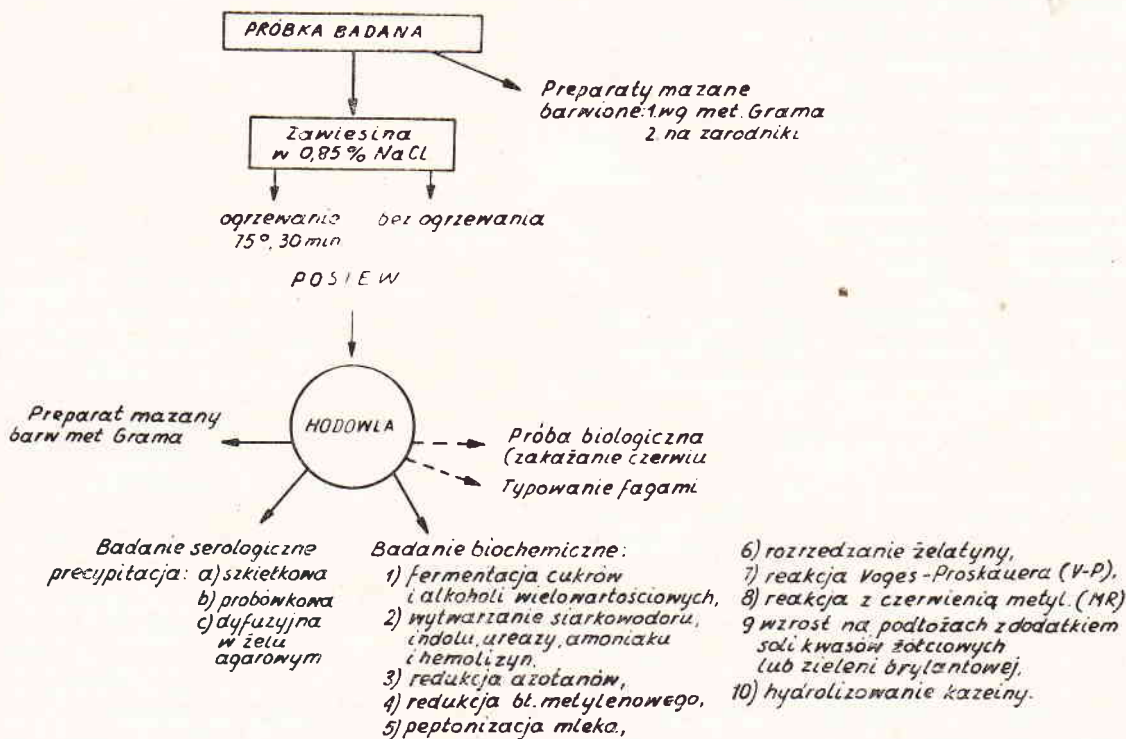
### Morfologia

Według aktualnie obowiązującej systematyki bakteryjnej zarodek zgnilca złośliwego pszczoł zaliczany jest do gromady *Schizomycetes*, rzędu *Eubacteriales*, rodziny *Bacillaceae* i rodzaju *Bacillus* (4). Jest to laseczka długości 2—5  $\mu$ , szerokości 0,3—0,8  $\mu$ , występująca pojedynczo lub w postaci krótkich łańcuszków. Na podłożach płynnych wykazuje ona tendencję do tworzenia nitek. Młode hodowle są Gram-dodatnie, starsze — Gram chwiejne. Drobnoustroj jest obdarzony ruchem (30—35 rzęsek ułożonych peritrichalnie). Wytwarza on cienkościenne, elipsoidalne endospory o wymiarach 0,6—0,7  $\mu$  szerokości, 1,2—1,8  $\mu$  długości (20), które układają się w komórce subterminalnie lub centralnie (wtedy sporangia przyjmują kształt wrzecionowaty).

### Właściwości hodowlane

Na podłożach stałych po 24—48 godz. inkubowaniu w temp. 37°C uzyskuje się bezbarwne, przezroczyste lub szaro-białe, połyskuja-

Schemat badania laboratoryjnego przy zgnilcu złośliwym pszczoł



ce kolonie o różnym, rzadziej postrzępionym, brzegu i pomarszczonej powierzchni. Na podłożu agarowym z dodatkiem drożdży wyrastają po 24 godz. szaro-białe, matowe, suche kolonie o postrzępionych brzegach, mocno wrastające w podłoże. Na agarze krwistym laseczka rośnie w postaci śluzowatych kolonii i nie wytwarza hemolizyn. Na agarze z dodatkiem surowicy końskiej po 48—72 godz. pojawiają się białe kolonie o nierównych brzegach. Na bulionie zawierającym wyciągi z marchwi i drożdży laseczka tworzy osad i zmętnienie. Według Bergey'a (4) na tym podłożu uzyskuje się również wzrost w postaci pływających po powierzchni błon, które po wstrząśnięciu dają jednolite zmętnienie. Na podłożu z kartofla brak wzrostu. W badaniach laboratoryjnych należy uwzględnić możliwość dysocjacji formy *Bac. larvae* na formę S. Według Trilenki (26) dysocjacja zachodzi pod wpływem swoistego dla *Bac. larvae* bakteriofaga. Postać S tworzy kolonie mniejsze, wypukłe, gładkie, połyskujące o równym brzegu. W preparatach sporządzonych z tych kolonii stwierdza się krótkie, grube laseczki, układające się pojedynczo lub palisadowato.

#### Własności biochemiczne

*Bac. larvae* wytwarza siarkowodor i nieznaczne ilości amoniaku, redukuje azotany do azotynów (16) oraz ścina i peptonizuje mleko. Wszystkie szczepy posiadają zdolność wolnego rozrzedzenia żelatyny. Reakcja Voges-Proskauera wypada dodatni, 0,1% roztwór błękitu metylenowego ulega redukcji do leukozwiązku.

Niektóre szczepy hydrolizują kazeinę. Reakcja z czerwinią metylenową w większości przypadków wypada dodatnio. Laseczka ta nie wytwarza indolu, ureazy i hemolizyn nie rośnie na podłożach z dodatkiem soli kwasów żółciowych (taurocholan, dezoksychohan sodu) i zieleni brylantowej. Poglądy odnośnie zdolności fermentowania cukrów i rozkładu alkoholi wielowodorotlenowych nie są jeszcze ujednoczone. Podawane przez różnych autorów schematy przedstawia tabela 1.

Właściwości biochemiczne mogą również zależeć od postaci wzrostowej. Według Połtiewa (20) postać S rozkłada maltozę, mannit i glikozę.

#### Badania serologiczne

Badania biochemiczne ze względu na brak jednolitości poglądów co do własności fermentacyjnych i cech biochemicznych *Bac. larvae* nie rozwiązują problemów identyfikacji zarazka. Opisane w pracy Glińskiego (6) różnice w budowie antygenowej pomiędzy *Bac. larvae*, *Bac. thuringiensis* i *Bac. alvei* pozwalają uzupełnić badania morfologiczne, hodowlane i biochemiczne odczynami serologicznymi. Swoiste frakcje zawarte są głównie w kompo-

Tab. 1. Zdolność fermentowania cukrów i rozkładu alkoholi wielowartościowych przez *Bac. larvae*

Autor	sacharozą	maltozą	arabinozą	mannit	eskulina	dulcytol	ksylozą	laktozą	galaktozą	glikozą	fruktozą	salicyną	inulina	lewulozą
Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (4)	+						+	+	+	+	+	+		
Steinhaus (23)	+						+	+	+	+		+		
Połtiew (20)										+				+
Azuma (1)	+						+		+	+	+	+		
Zahaczewska (30)	+	+	+	+	+			+	+	+				

+ = fermentacja z wytworzeniem kwasu

± = niektóre szczepy fermentują z wytworzeniem kwasu

— = brak fermentacji

mentach wielocukrowych (6). Typowanie serologiczne szczepu można oprzeć na odczynach precypitacji próbówkowej, szkiełkowej i precypitacji dyfuzyjnej w żelu agarowym wg Ouchterlony'ego. Najbardziej przydatne są frakcje antygenowe zawarte w wyciągach wodnych *Bac. larvae* oraz hapteny wielocukrowe sporządzone wg Lancefield (14). Surowicę odpornościową uzyskuje się na królikach uodparnianych wg metody Metzgera (18) spluczyną z 36 godz. hodowli z podłoża stałego, zabita przez dodatek 0,3% formaliny farmakopealnej. Odczyny wykonuje się według ogólnie przyjętych w bakteriologii zasad.

#### Typowanie fagami

W typowaniu wielu drobnoustrojów dużą rolę odgrywają fagi. W 1948 r. wyosobniono liczne szczepy bakteriofagów swoiste dla *Bac. larvae* (7, 8, 13, 19). Smirnow (21) zaleca stosowanie fagodiagnostyki przy pomocy fagów swoistych dla *Bac. larvae* i *Bac. alvei*.

#### Próby biologiczne

Próby biologiczne na zwierzętach laboratoryjnych nie mają zastosowania, ponieważ *Bac. larvae* nie jest dla nich zjadliwy. Próba na pszczołach polega na zakażeniu czerw w mikroulikach zawierających po dwie ramki (1/4 ramki standardowej). Jedna ramka zawiera miód i pierzge, druga czerw odkryty 1—3 dniowy (około 100 komórek) ze zdrowej rodziny. Ujście mikroulika zatykamy siateczką muslinową. W mikrouliku osadza się taką ilość robotnic, ażeby uliczki pomiędzy ramkami były wypełnione. W górną ściankę wstawia się naczynko z około 100 ml syropu cukrowego, które zawiera w 1 ml 2,5 mln zarodników. Po jednodniowym podkarmianiu syropem z zarodnikami, przez dalsze 8—10 dni pszczoły są podkarmiane czystym syropem cukrowym. Czerw bada się cztery razy dziennie przez okres 10 dni od momentu zakażenia. W czasie pobierania do badań padłych larw, pszczoły

dorośle poddaje się narkozie eterowej (około 1—1,5 g eteru do narkozy). Jako wyniki dodatni próby biologicznej przyjmuje się wystąpienie typowych dla zgnilca złośliwego zmian anatomo-patologicznych, stwierdzenie obecności zarodników w preparatach mazanych z obumarłych larw pszczołach oraz uzyskanie z nich czystej hodowli *Bac. larvae*. Przeprowadzenie próby biologicznej na pszczołach jest jednak kłopotliwe i pracochłonne i dlatego też nie jest ona stosowana w rutynowej diagnostyce.

## Piśmiennictwo

1. Azuma R., Kitaoka S.: Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart. 5, 138, 1965.
2. Bailey L., Gibbs A. J.: J. Gen. Microbiol. 28, 385, 1962.
3. Bailey L., Lee D. C.: J. Gen. Microbiol., 29, 711, 1962.
4. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology ed. VII, 1957.
5. Foster J. W., Hardwick W. A., Guirard B.: J. Bact. 59, 463, 1950.
6. Gliński Z.: Annals UMCS, s. DD. 1967 w druku.
7. Gochmayer T. A.: Bee World 36, 101, 1955.

8. Gochmayer T. A.: Proc. X. Int. Congr. Entomol. Montreal, 1991, 1956.
9. Holst E. C., Sturtevant A. P.: J. Bacteriol. 40, 723, 1940.
10. Holst E. C.: Amer. Bee J. 86, 14, 1946.
11. Kitznelson H., Lochhead A. G.: Sci. Agr. 24, 474, 1944.
12. Kirkor S.: Choroby pszczoł. PWRiL, 1953.
13. Krasikow W. J.: Pezeliowodstwo, 33, 43, 1956.
14. Lancefield F.: J. Exp. Med. 47, 12, 1928.
15. Lochhead A. G.: Sci. Agr. 9, 80, 1928.
16. Lochhead A. G.: Canad. J. Res. 15, 79, 1937.
17. Lochhead A. G.: J. Bacteriol. 44, 185, 1942.
18. Mwtzger J., Chauncey F., Smith W.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 110, 903, 1962.
19. Morgenthaler O.: Schweiz. Bienen Ztg. 71, 293, 1948.
20. Poltiew W. I.: Boliezni Peziel, Leningrad, 1964.
21. Smirnow I. J.: Wietrinarija, 5, 100, 1966.
22. Smith R. L., Beck J. W., Anderson B. J.: J. Bacteriol. 57, 213, 1949.
23. Steinhilber E. A.: Insect Pathology, Acad. Press, NY, London, 1963.
24. Stoilova V.: Zent. f. Bakt. II Abt. 99, 124, 1936.
25. Tarr H. L. A.: Ann. Apl. Biol. 25, 633, 1938.
26. Trilenko W. A.: Sbornik Robot. Ken. Wet. Institut. 25, 1963.
27. White G. F.: US. Dep. Agr. Bull. Entomol. Tech. Sci. 14, 50, 1966.
28. White G. F.: Science 49, 362, 1919.
29. White G. F.: US. Dep. Agr. Bull., 809, 1920.
30. Zahaczewska M., Furwicz A.: Medycyna Wet. 12, 739, 1964.

Adres autora: dr Zdzisław Gliński, Lublin, ul. Akademicka 11.

JERZY MIERZEJEWSKI

## Porównanie odczynu immunofluorescencji i metody posiewów przy wykrywaniu pałeczek duru mysiego

Ośrodek Naukowo-Badawczy Służby Weterynaryjnej

Wykrywanie pałeczek rzekomodurowych za pomocą odczynu immunofluorescencji (if) było przedmiotem wielu badań (2—9, 11—13). Początkowo w latach 1957—62 w zasadzie wszyscy autorzy przyjmowali że odczyn if może z powodzeniem zastąpić dotychczasowe klasyczne metody posiewów przy wykrywaniu pałeczek rzekomodurowych. Nowsze prace z tej dziedziny a szczególnie praca Michajłowa i Persa (8) wskazują na mniejsze możliwości użycia w tym celu odczynu if, ze względu na powiązania antygenowe w obrębie rodziny *Enterobacteriaceae*.

W dotychczasowych pracach autorzy nie porównali czułości odczynu if i obecnie stosowanej metody posiewów przy wykrywaniu pałeczek rzekomodurowych, zmieszanych z bakteriami saprofitycznymi. Większość badań nad oceną odczynu if prowadzono na jednorodnych hodowlach pałeczek rzekomodurowych. Tymczasem w praktyce laboratoryjnej spotyka się bardzo często hodowle mieszane, w których obok pałeczek rzekomodurowych wyrastają inne bakterie często zupełnie saprofityczne. Wzrost tych ostatnich może być tak znaczny, że na pożywkach stałych zupełnie nie stwierdza się kolonii pałeczek rzekomodurowych, mimo że w badanym materiale mogły one występować. Przypadki takie zdarzają się szczególnie często przy badaniu materiału nieświeżego, w którym namnaża się postronna flora bakteryjna i „zagłusza” wzrost bakterii chorobotwórczych.

W związku z tym w badaniach własnych

postanowiono porównać odczyn if i metodę posiewów przy wykrywaniu pałeczek duru mysiego, które mieszano w odpowiednich ilościach z hodowlami bakterii saprofitycznych namnożonych z próbek mięsa.

### Materiał i metody

Do badań użyto: 1. Surowicę diagnostyczną poliwalentną „HM” i grupową „OB” dla pałeczek rzekomodurowych produkcji Krakowskiej Wytwórni Surowic i Szczepionek.

2. Antyglobulinę króliczą oznakowaną (Fluorescein-conjugated anti-rabbit globulin goat GARY-FITC) produkcji Instytutu Surowic i Szczepionek w Pradze Czeskiej „Sevac”.

3. Hodowle 24-godzinne bakterii z próbek mięsa namnożone na pożywce z zielenią brylantową pochodzące z Laboratorium Weterynaryjnej Inspekcji Sanitarnej (WIS) w Puławach.

4. Nieoznaczony szczep pałeczek duru mysiego wyizolowany z próbki mięsa wieprzowego.

Hodowle 24-godzinne z próbek mięsa uznane przez Laboratorium WIS jako niechorobotwórcze zakażano nieoznaczonym szczepem pałeczek duru mysiego. W zależności od doświadczenia na 1 ml hodowli dawano określoną liczbę pałeczek od  $10^4$  do  $10^7$  w formie zawiesiny w płynie fizjologicznym. Zawiesinę tę przygotowywano ze spluczyn 24-godzinnej hodowli agarowej i ustalano gęstość według skali McFarlanda. W próbkach hodowli zakażonych wykrywano pałeczki duru mysiego za pomocą odczynu if oraz metody posiewów. Jednocześnie dla kontroli metod przeprowadzono takie same badania pewnej liczby hodowli niezakażonych pałeczkami.

Odczyn if nastawiano następująco: robiono rozmazy na szkiełkach podstawowych, utrwalało się płomieniem, zalewano surowicą diagnostyczną „HM” lub „OB” rozcieńczoną 1:4, przetrzymywano przez 30 min. w komorze wilgotnej, po czym płukano wodą i zalewano oznakowaną antyglobuliną króliczą też