

JERZY ZAHACZEWSKI, ANDRZEJ KOMOROWSKI

Usprawnienie sporządzania podłoża Willisa-Hobbs do hodowli drobnoustrojów beztlenowych

Zakład Higieny Weterynaryjnej w Krakowie
Kierownik: doc. dr hab. A. RAMISZ

Diagnostyka drobnoustrojów beztlenowych z rodzaju *Clostridium* opiera się głównie na badaniu morfologii komórki i kolonii oraz oznaczeniu właściwości enzymatycznych. Własności enzymatyczne szczepów laseczek beztlenowych najłatwiej można wykazać w czasie wzrostu na podłożach stałych. Podłoża te powinny zawierać substraty białkowe, tłuszczowe i węglowodanowe. W przypadku drobnoustrojów chorobotwórczych końcowym etapem diagnostyki jest analiza toksyn bakteryjnych metodą biologiczną.

Klasycznym podłożem stałym używanym do diagnostyki beztlenowców jest podłoże Zeisslera (1, 2). Różnicowanie gatunków drobnoustrojów na tym podłożu opiera się wyłącznie na ocenie rodzaju hemolizy i morfologii kolonii. Reed i Orr (4) wprowadzili do diagnostyki laseczek beztlenowych podłoże zawierające mleko, a Mc Clung i Toabe (4) podłoże z żółtkiem jaja kurzego. Były to pierwsze próby oparcia diagnostyki beztlenowców na zdolnościach wytwarzania enzymów. Willis i Hobbs (4, 5) opracowali podłoże stałe sumujące cechy obu tych podłoży. Zawarte w podłożu Willisa-Hobbs mleko pozwala wykazać obecność enzymów proteolitycznych, żółtka — lecytynazy C i lipazy, a laktoza — enzymu fermentacyjnego — laktazy. Podłoże pozwalające na równoczesne wykazanie czterech rodzajów enzymów znalazło szerokie zastosowanie w mikrobiologicznych laboratoriach diagnostycznych i jest obecnie uważane za najbardziej nowoczesne w bakteriologii beztlenowców.

W oparciu o właściwości biochemiczne, laseczki beztlenowe z rodzaju *Clostridium* zostały przez Willisa (4) zestawione w tab. 1 oddającej duże usługi we wstępnej diagnostyce.

Zdolność wytwarzania enzymów jest różna u poszczególnych gatunków beztlenowców. Jak wynika z tab. 1 laseczki beztlenowe posiadają zdolność wytwarzania jednego lub kilku enzymów. Zjawisko to można również zaobserwować w obrębie typów jednego gatunku np. *Cl. botulinum* i *Cl. oedematiens*. Podłoże Willisa-Hobbs może być również zastosowane do odczynu hamowania lecytynazy (3). Wymaga to jedynie nasączenia podłoża surowicą *Cl. perfringens* typu A. Dzięki temu odczynowi można różnicować *Cl. perfringens*, *Cl. oedematiens* i *Cl. bifermentans-Cl. sordelli*.

Podłoże Willisa-Hobbs zawiera proste i łatwo dostępne składniki: agar, laktozę, czerwień o-

bojętną, odtłuszczone mleko i żółtka jaja kurzego. Częste przygotowywanie niewielkich ilości podłoża jest jednak pracochłonne i kłopotliwe. Dlatego też, celem niniejszej pracy było usprawnienie przygotowania podłoża.

Tab. 1

Gatunek drobnoustroju	Strefa zmętnienia		Lipaza	Fermentacja laktozy	Proteinaza
	Wytwarzanie	Hamowanie			
<i>Cl. perfringens</i> A—E	+	+	—	+	—
<i>Cl. bifermentans</i>	+	+	—	—	+
<i>Cl. sordelli</i>	+	+	—	—	+
<i>Cl. botulinum</i> A—B	+	—	+	—	+
<i>Cl. botulinum</i> C—E	+	—	+	—	—
<i>Cl. botulinum</i> F	+	—	+	—	+
<i>Cl. sporogenes</i>	+	—	+	—	+
<i>Cl. oedematiens</i> A	+	+	+	—	—
<i>Cl. oedematiens</i> B	+	—	—	—	—
<i>Cl. oedematiens</i> C	—	.	—	—	—
<i>Cl. oedematiens</i> D	+	—	—	—	—
<i>Cl. histolyticum</i>	—	.	—	—	+
<i>Cl. septicum</i>	—	.	—	+	—
<i>Cl. chauvoei</i>	—	.	—	+	—
<i>Cl. tetani</i>	—	.	—	—	—

Sposób przygotowania podłoża.

Składniki podłoża podzielono na dwie części. Część A stanowiła zawiesina żółtka w roztworze mleka, laktozy i wskaźnika. Część B — agar zwykły.

Do 60 ml mleka należy dodać 4,8 g laktozy i sterylizować w kolbie z perełkami w autoklawie przy ciśnieniu 0,5 atm. przez 30 min. Po ochłodzeniu dodać jałowo żółtka oraz 1,3 ml 1% alkoholowego roztworu czerwieni obojętnej. Następnie należy sporządzić zawiesinę przez silne wytrząsanie kolby. Rozlać do jałowych buteleczek w porcjach po 40 ml i przechowywać w stanie zamrożonym. Bardzo dobrze nadają się do tego celu butelki „plazmówki” o pojemności 100 ml. Przy sporządzaniu podłoża należy zwrócić uwagę na świeżość używanego mleka oraz jaj. Nieprzydatne jest mleko zawierające składniki konserwujące.

Podłoże Willisa-Hobbs sporządza się przez zmieszanie 40 ml zawiesiny i 200 ml agaru zwykłego 2% o pH 7,4. Przed zmieszaniem zawiesinę należy rozmrozić, dokładnie wymieszać i ogrzać do ok. 40°C. Temperatura agaru nie powinna przekraczać 60°C. Prawidłowo sporządzone podłoże ma kolor łososiowy.

Według podanej metodyki sporządzono 12 porcji zawiesiny, które przez okres 1 roku przechowywano w stanie zamrożenia, w lodówce (temp. —15°C). W odstępach 3 miesięcznych przygotowywano z zawiesiny tej podłoża Wil-

lisa-Hobbs i oceniano ich przydatność diagnostyczną przy pomocy wzorcowych szczepów laseczek beztlenowych. Używano szczepu *Cl. perfringens* typu A, B, C, D, *Cl. botulinum* typu A, B, *Cl. sporogenes* i *Cl. bifermentans*. Oceniano zdolność wytwarzania enzymów proteolitycznych, lecytynazy C i lipazy oraz fermentację laktozy. W kolejnych czterech badaniach stwierdzano powtarzające się z jednakową intensywnością reakcje charakterystyczne dla poszczególnych gatunków i typów laseczek. Wskazuje to na pełną przydatność podłoża Willisa-Hobbs przygotowanego z długotrwałe przechowywanej w stanie zamrożenia zawiesiny.

Wnioski

1. Modyfikacja przygotowania podłoża Willisa-Hobbs przedłuża jego trwałość do 1 roku.
2. Składniki podłoża nie tracą w czasie przechowywania w stanie zamrożonym swych właściwości.
3. Opisane usprawnienie pozwala na szybkie i ekonomiczne przygotowanie podłoża Willisa-Hobbs.

Piśmiennictwo

1. Kowalenko J. R.: Anaerobnyje infekcji sielskochozajstwiennych ziwotnych, Moskwa, 33, 1954.
 2. Meisel H.: Mikrobiologia lekarska — Warszawa 1952.
 3. Truszczyński M.: Bakteriologia weterynaryjna, PWRiL, 1969.
 4. Willis A. T.: Anaerobic Bacteriology in Clinical Medicine — Londyn, 34, 1964.
 5. Willis A. T.: Clostridia of Wound Infection — London, 20, 1969.
- Adres autora: dr Jerzy Zahaczewski, Kraków, ul. Brodowicza 13a, ZHW.

ŚWIĘTOSŁAW BILECKI,

MIECZYŚLAW CHAJKOWSKI

Warszawa

Puławy

Międzynarodowy Kongres Antropozoonoz

W dniach od 6—8 października 1971 r obradował w miejscowości Štrbske Pleso w Wysokich Tatrach Czechosłowackich Międzynarodowy Kongres Antropozoonoz. Organizatorem Kongresu były: Słowackie Towarzystwo Medyczne, Słowackie Towarzystwo Chorób Zakaźnych, Słowackie Towarzystwo Mikrobiologiczne i Epidemiologiczne oraz Wydział Medyczny Uniwersytetu Safarika w Koszycach. W Kongresie wzięło udział 355 osób, w tym z Czechosłowacji 293, Polski — 7, Węgier — 10, Bułgarii — 5, ZSRR — 1, NRD — 12, NRF — 5, Berlina Zach. — 5, Jugosławii — 7, Austrii — 5, Szwajcarii — 2, Anglii — 1, WHO — 2.

Językami oficjalnymi Kongresu były: czeski, rosyjski i niemiecki. Obrady toczyły się w 12 sekcjach.

Uroczystego otwarcia Kongresu dokonał jego przewodniczący prof. dr J. Hruzik, po czym wygłoszono 5 referatów wprowadzających. Prof. dr F. Potočka (Czechosłowacja) mówił o zagadnieniu mikrobiologii antropozoonoz, prof. dr J. Hruzik (CSRS) poruszył aktualne problemy kliniczne chorób odzwierzęcych, doc. dr Z. Kmety (CSRS) omówił rozpoznawanie zoonoz, dr S. Haladej (CSRS) zreferował obecne problemy walki z ważniejszymi zroborami odzwierzęcymi, a dr H. Abdussalam (WHO) nakreślił perspektywy globalne dotyczące zoonoz.

Spośród plenarnych referatów wygłoszonych na Kongresie na szczególną uwagę zasługuje wystąpienie dr Abdussalama. Zwrócił on uwagę na pojawianie się ważnych zoonoz na dotychczas niezakażonych terenach i wywoływanie przez nie alarmujących reakcji psychologicznych i społecznych, np. wybuch wścieklizny w Europie (Czechosłowacja, NRD) i wenezuelskiego zapalenia mózgu koni w Środkowej i Północnej Ameryce.

Omawiając problem brucelozy dr Abdussalam zaznaczył, że obecnie zauważa się wzrost zakażeń u owiec i kóz pałeczką *B. melitensis*, szczególnie w Środkowej Azji i Ameryce Łacińskiej. Zakażenia bydła nie wykazują spadku. Poza tym wykryto nowy drobnoustroj (*B. canis*), który może się przenosić na człowieka.

Referent podał, że odczyn hemaglutynacji pośredniej, stosowany w diagnostyce brucelozy człowieka, jest swoisty i bardziej czuły niż odczyn aglutynacyjny. U bydła uzyskuje się dodatni wynik hemaglutynacji pośredniej w pierwszym tygodniu zakażenia i daje ona wysokie miana przed porodem. Ośrodek Brucelozy WHO w Instytucie im. Gamalei w Moskwie izolował

lipopolisacharyd z *B. melitensis*, który jest aktywnym komponentem uczulającym krwinki barana używane w tym odczynie.

Uodpornianie ludzi przeciwko brucelozie szczepionką 19-BA daje dobre wyniki szczególnie w Środkowej Azji. Do uodporniania młodych zwierząt używa się trzech szczepionek: szczepu 19 i szczepu Ref. I jako żywych szczepionek oraz szczepionkami inaktywowanej H 38 z adiuwantem.

Dr Abdussalam wspomniał o izolowaniu wirusa wścieklizny od myszy polnych i wilków w Środkowej Europie. Ośrodek zwalczania chorób w Altanie (USA) doniósł o doustnym uodpornianiu lisów przeciwko wściekliznie żywym szczepem ERA hodowanym na kulturze tkankowej. Ostatnio wykryto za pomocą metody fluorescencyjnej występowanie wirusa wścieklizny w rogówce oka u ludzi i zwierząt.

Następnie dr Abdussalam przedstawił pogląd dotyczący możliwości zakażeń ludzi grypą w rezerwuarach zwierzęcych i podał, że echinokokoza występuje obecnie endemicznie u owiec wokół morza Śródziemnego, w Południowej Ameryce, Środkowej Azji i lokalnie w Południowej Azji i Środkowej Afryce.

Na zakończenie referent zaznaczył, że w wielu miejscach świata zoonozy stanowią ważny problem. Znaczenie tych chorób wzrasta wraz z nasilającym się obrotem zwierząt i produktów pochodzenia zwierzęcego. Istnieje więc konieczność zwiększenia wysiłku w dziedzinie badań nad zwalczaniem zoonoz, które odgrywają niepoślednią rolę w ekonomice światowej. Zwalczanie chorób zwierzęcych pozwoli na wzrost ilości produktów pochodzenia zwierzęcego i surowców, co warunkuje zdrowie i dobre warunki życia ludzi.

Po referatach wprowadzających przystąpiono do obrad w sekcjach.

Toksoplazmoza

W sekcji dotyczącej toksoplazmozy wygłoszono 18 referatów, z których na uwagę zasługują doniesienia dotyczące diagnostyki, epidemiologii i terapii tej choroby. Dr Brhlikova z CSRS omówiła 27 przypadków rozpoznania toksoplazmozy u ludzi przyjętych do szpitala z objawami wirusowego zapalenia wątroby. Zakażenie *Toxoplasma gondi* nastąpiło przez picie surowego mleka, spożywanie mięsa i kontakty z chorymi zwierzętami.