

JERZY MOLENDĄ

Enzymatyczne składniki pozakomórkowe wytwarzane przez gronkowce wyosobnione z przypadków mastitis u krów

Z Zakładu Higieny Weterynaryjnej we Wrocławiu

Badania wielu autorów (1, 2, 12, 17) wskazują na wzrastające w ostatnich latach znaczenie gronkowców jako czynnika etiologicznego zapaleń gruczołu mlekowego u krów. Zwykle stwierdza się u nich właściwości charakteryzujące gronkowce potencjalnie chorobotwórcze takie jak zdolność beztlenowej fermentacji mannitolu i wytwarzania koagulazy. Gronkowce chorobotwórcze wytwarzają ponadto szereg substancji enzymatycznych, wydzielanych pozakomórkowo, takich jak: lipaza, fibrynolizyna, dezoksyrybonukleaza, hialuronidaza itp., których obecność wzmacnia a niekiedy warunkuje zjadliwość i właściwości inwazyjne tych drobnoustrojów. W przedstawionych badaniach podjęto próbę analizy enzymów wydzielanych pozakomórkowo i oceny ich ewentualnej przydatności jako pośrednich kryteriów chorobotwórczości, szczególnie w odniesieniu do pyrrolidonyl-peptydazy (PLP) odkrytej przez Mulczyka i Szewczuka (13), wytwarzaniu której autorzy przypisują podstawowe znaczenie w różnicowaniu gronkowców potencjalnie chorobotwórczych i saprofitycznych wyosobnionych od ludzi.

Materiał i metody

Badaniom poddano 232 szczepy gronkowców beta-hemolitycznych, wyosobnionych z mleka krów reagujących dodatnio w terenowym odczynie komórkowym (TOK), stosowanym w celu wykrywania zaburzeń w stanie zdrowia gruczołu mlekowego oraz 27 szczepów gronkowców saprofitycznych, pochodzących ze skóry wymienia i środowiska obory. U wszystkich uprzednio wymienionych szczepów określono następujące właściwości: wytwarzanie katalazy, ureazy, acetoiny, żelazyny i indolu, zdolność fermentacji glukozy w warunkach beztlenowych, redukcji azotanów oraz zakwaszania mleka lakmusowego, laktozy, sacharozy, glicerolu, rafinozy, salicyny i inuliny. Zachowanie się badanych szczepów wobec powyższych testów pozwoliło na zaklasyfikowanie ich do rodzaju *Staphylococcus*.

Obecnie przyjmuje się, że podstawowe kryterium podziału między gronkowcami potencjalnie chorobotwórczymi a saprofitycznymi stanowi zdolność beztlenowej fermentacji mannitolu i wytwarzanie koagulazy. Uwzględniając powyższe kryteria, gronkowce wyosobnione z przypadków *mastitis* podzielono na dwie grupy. Do grupy I zaliczono 172 szczepy fermentujące mannitol w warunkach beztlenowych i wytwarzające koagulazę, natomiast do grupy II 60 szczepów mannitolu-dodatnich, niewytwarzających koagulazy. Grupę III (kontrolną) stanowiło 27 szczepów gronkowców saprofitycznych — niefermentujących mannitolu i niewytwarzających koagulazy.

Właściwość kwaśnej fermentacji mannitolu określano na podłożu Hugh-Leifsona, natomiast wytwarzanie koagulazy wykrywano stosując cytrynianowane osocze królika rozcieńczone 1:5 fizjologicznym roztworem NaCl.

Ponadto u wszystkich szczepów w poszczególnych grupach określano zdolność wytwarzania następujących substancji enzymatycznych: fibrynolizyny — stosując metodę opisaną przez Lack i Wailling (5), fosfatazy, lipazy — na podłożu z Tweenem 80 (5), dezoksyrybonukleazy wg Weckman i Catin (16), muramidazy wg Hawigera (5) oraz pyrrolidonyl-peptydazy wg Mulczyka i Szewczuka (13). Test CF (clumping factor) wykonywano używając nierozcieńczonej plazmy króliczej.

Wyniki

Obecności fibrynolizyny (stafylokinazy) nie wykazano u żadnego z badanych szczepów mimo stosowania jako substratu fibrynogenu ludzkiego i króliczego. Wydaje się to potwierdzać spostrzeżenia, że fibrynolizyna jest zwykle wytwarzana przez gronkowce wyosobnione z drążących zakażeń ropnych u ludzi natomiast z reguły nie jest produkowana przez szczepy patogenne dla zwierząt.

Wśród gronkowców mannitolu i koagulazo-dodatnich (grupa I) wykazano 75 szczepów wytwarzających wszystkie poza fibrynolizyną badane enzymy. Dalsze 24 szczepy wytwarzały 6 spośród 8 badanych składników pozakomórkowych a tylko 5 szczepów z tej grupy produkowało mniej niż 4 enzymy (tab. 1). Należy podkreślić, że w grupie tej występowały wszystkie (poza fibrynolizyną) badane enzymy a zdolność ich wytwarzania (poza lipazą) wykazano u znacznego odsetka szczepów. Wysoką korelację z wytwarzaniem

Tab. 1. Częstotliwość występowania badanych enzymów wśród szczepów grupy I (koagulazo+, mannitolu+)

Enzym	Razem badanych szczepów	Ilość szczepów w których stwierdzono enzymów (liczby poniżej oznaczają ilośći enzymów)										Razem
		7	6	5	4	3	2	1	0	0	0	
Koagulaza	172	75	15	4	5	3	6	3	15	4	4	172 (100,00%)
Fosfataza	172	75	15	4	5	3	6	3	15	4	4	162 (94,18%)
Muramidaza	172	75	15	4	5	3	6	3	15	4	4	147 (85,47%)
CF	172	75	15	5	6	3	15	4	9	11	3	146 (84,88%)
DNA-za	172	75	15	4	3	3	15	4	9	5	2	139 (80,81%)
PLP	172	75	15	4	5	3	3	4	5	3	3	126 (73,25%)
Lipaza	172	75	4	5	6	4	3	3	3	3	2	97 (56,39%)

koagulazy wykazywały: fosfataza a następnie muramidaza i CF (czynnik zlepiający). W nieco słabszym stopniu miało to miejsce w odniesieniu do DNA-zy i PLP. Stosunkowo najmniej szczepów z tej grupy wytwarzało lipazę (tab. 4).

Wśród szczepów mannitolu-dodatnich i koagulazo-ujemnych (grupa II) w żadnym wypadku nie stwierdzono wytwarzania wszystkich enzymów przez jeden szczep. Spośród 60-ciu badanych szczepów 16 wytwarzało 5 enzymów natomiast aż 31 szczepów produkowało dwie i mniej pozakomórkowych substancji enzymatycznych (tab. 2). Najczęściej stwierdzanymi

Tab. 2. Częstość występowania badanych enzymów wśród szczepów grupy II (koagulazo—, mannitolu+)

Enzym	Razem badanych szczepów	Ilość szczepów w których stwierdzono enzymów (liczby ozn. Ilość enzymów)					Razem
		5	4	3	2	1	
PLP	60	9	7	3	4	6	57 (95,00%)
DNA-za	60	9	7	3	4	6	50 (83,33%)
Fosfataza	60	9	7	3	4	6	19 (31,66%)
Muramidaza	60	9	7	3			19 (31,66%)
Lipaza	60	9	7		6	2	15 (25,00%)
CF	60	9	7	4			13 (21,61%)

enzymami u gronkowców z tej grupy były pyrolidonyl-peptydaza i DNA-za. Pozostałe składniki pozakomórkowe były wytwarzane przez zdecydowanie niższą liczbę szczepów (tab. 4).

Wśród gronkowców saprofitycznych stwierdzono 1 szczep wytwarzający zarówno DNA-zę jak i PLP, które były jedynymi enzymami u nich wykazanymi. Pozostałe wytwarzały albo DNA-zę (16 szczepów) albo PLP (10 szczepów). Nie stwierdzono natomiast ani jednego szczepu, któryby nie posiadał zdolności wytwarzania choćby jednego z badanych enzymów (tab. 3).

Tab. 3. Częstość występowania badanych enzymów wśród szczepów grupy III (koagulazo—, mannitolu—)

Enzym	Razem badanych szczepów	Ilość szczepów w których stwierdzono enzymów			Razem
		1	2	3	
DNA-za	27	16	1	0	17 (62,91%)
PLP	27	0	1	10	11 (40,74%)
Pozostałe enzymy	27	0	0	0	0 (0%)

Omówienie wyników

Znaczenie pozakomórkowych składników wytwarzanych przez gronkowce w patogenezie zakażeń gronkowcowych nie zostało do chwili obecnej całkowicie wyjaśnione. Są one brane pod uwagę przy ocenie potencjalnej chorobotwórczości badanego szczepu, chociaż obecność którejkolwiek z tych substancji nie może stanowić bezwzględnego kryterium różnicującego. Z badań Kaprala i Li (6) wynika, że nawet wytwarzanie koagulazy nie zawsze jest bezwzględnie markerem zjadliwości. W badaniach własnych koagulaza stanowiła podstawowe kryterium podziału badanych szczepów i w odniesieniu do niej porównywano wytwarzanie pozostałych enzymów. Czynnik zlepiający jest substancją odrębną od koagulazy, działającą zarówno na fibrynogen jak i kompleksy rozpuszczalnych monomerów fibryny bez udziału aktywatora — koniecznego dla działania koagulazy (11). Większość (85%) badanych szczepów koagulazo-do-

datnich wytwarzała równocześnie CF, niemniej jednak wykazano jego obecność u pewnej grupy (21%) szczepów mannitolu-dodatnich, koagulazo-ujemnych. Czynnika tego nie stwierdzono u szczepów saprofitycznych.

Fosfataza jest enzymem rozbijającym połączenia organiczne kwasów fosforowych i poprzez ingerencję w procesy metabolizmu tkankowego może odgrywać pewną rolę w patogenie zakażeń gronkowcowych. Wśród wykazanych enzymów wytwarzanie fosfatazy było w najsilniejszym stopniu skorelowane z wytwarzaniem koagulazy. Obecność jej stwierdzono również u niemal trzeciej części gronkowców z grupy II. Nie wytwarzały jej gronkowce saprofityczne.

Tab. 4. Odsetek enzymów stwierdzonych u gronkowców w poszczególnych grupach

Enzym	Grupa I	Grupa II	Grupa III
Koagulaza	100,00	0	0
Fosfataza	94,18	31,66	0
Muramidaza	85,47	31,66	0
CF	84,88	21,61	0
DNA-za	80,81	83,33	63,00
PLP	73,25	95,00	40,00
Lipaza	56,39	25,00	0

Podobnie wysoką korelację z wytwarzaniem koagulazy stwierdzono w przypadku muramidazy — lizozymu gronkowcowego, który zdaniem Hawigera (3) może odgrywać wybitną rolę w zakażeniu gronkowcowym, a także stanowić istotne kryterium pośrednie ich chorobotwórczości. Wytwarzanie muramidazy obserwowano u wszystkich fosfatazo-dodatnich gronkowców z grupy II, natomiast nie stwierdzono jej u gronkowców saprofitycznych. Gronkowce saprofityczne nie produkowały również lipazy. Wytwarzały ją natomiast gronkowce mannitolu-dodatnie, koagulazo-ujemne (25%) oraz koagulazo-dodatnie, u których enzym ten występował u ponad połowy badanych szczepów (57%). Rola lipazy w patogenie zakażeń gronkowcowych jak i jej znaczenie taksonomiczne nie są także jednoznacznie określone. Wytwarzanie lipazy i koagulazy było dokładnie skorelowane u gronkowców wyosobnionych z mięsa i produktów mięsnych (15). Znacznie natomiast rozbieżności między wytwarzaniem tych dwóch enzymów stwierdzono u szczepów pochodzących z przypadków mastitis u krów (8) oraz z zakażeń u ludzi (4, 7).

Zdolność wytwarzania DNA-zy a zwłaszcza parolidonyl-peptydazy występowała u nieco niższego odsetka szczepów koagulazo-dodatnich niż to miało miejsce w wypadku muramidazy i CF. Enzymy te natomiast, wykazano u większości gronkowców mannitolu-dodatnich, koagulazo-ujemnych (grupa II). Jednocześnie były to jedyne substancje pozakomórkowe jakie stwierdzono u gronkowców saprofitycznych. Znaczenie DNA-zy w procesach chorobowych wywołanych przez gronkowce nie jest znane. Kordecki i Jeliasewicz (9) wskazują na możliwość działania synergicznego DNA-zy i alfa-hemolizyny na komórki w hodowli in vitro. Mulczyk (14) natomiast donosi o wysokiej wartości taksonomicznej pyrolidonyl-peptydazy w różnicowaniu gronkowców chorobotwórczych izolowanych od ludzi. Wśród 232 badanych gronkowców pochodzących od krów ze stanami zapalnymi wymion, 183 (79%) wytwarzało ten enzym. Niemniej jednak stwierdzono go również u 40% gronkowców saprofitycznych. Wydaje się więc, że zarówno określenie przydatności wytwarzania PLP jako kryterium pośredniego chorobotwórczości gronkowców wyosabnia-

nych z przypadków chorobowych u zwierząt jak i jej ewentualnej roli w procesie chorobowym wymaga dalszych badań.

Badania powyższe wykazały, że wśród gronkowców wyosobnionych z przypadków *mastitis* mogą występować oprócz szczepów koagulazo-dodatnich także koagulazo-ujemne — fermentujące mannitol w warunkach beztlenowych, wytwarzające równocześnie kilka pozakomórkowych składników enzymatycznych. Częstość ich występowania jest zdecydowanie najwyższa wśród gronkowców koagulazo-dodatnich, spośród których tylko 5 szczepów wytwarzało mniej niż 4 enzymy. Podobne wyniki uzyskali Lack i Wailling (10) u szczepów izolowanych z zakażeń gronkowcowych od ludzi. Ponadto zdolność wytwarzania takich składników pozakomórkowych jak: koagulaza, CF, muramidaza, fosfataza i lipaza obserwowano tylko u gronkowców izolowanych z przypadków *mastitis* (szczepy grupy I i II). Być może substancje te posiadają specyficzne znaczenie dla rozwijania się gronkowcowych zakażeń wymienia u krów. Żadna z cech wymienionych wyżej nie posiada znaczenia kryterium bezwzględnego, niemniej jednak większość szczepów potencjalnie chorobotwórczych wytwarza te enzymy. Szczepy bardziej zjadliwe zwykle wytwarzają ich więcej.

Z przedstawionych badań wynika, że zdecydowana większość (82%) gronkowców wyosobnionych z zapalenia wymienia produkowała wszystkie lub co najmniej 4 spośród badanych enzymów. Szczepy wytwarzające mniej niż 4 enzymatyczne składniki pozakomórkowe występowały głównie wśród gronkowców mannitolu-dodatnich — niewytwarzających koagulazy. Należy jednak podkreślić, że szczepy te produkowały wyraźnie więcej enzymów zarówno pod względem zróżnicowania jak i liczebności od gronkowców saprofitycznych. Być może pozostaje to w związku z możliwością działania chorobotwórczego tych szczepów.

Piśmiennictwo

- Chilkiewicz M. M., Moczulowa N. J.: Weterynaria 4, 116, 1973.
- Gajewski D.: Medycyna Wet. 24, 662, 1968.
- Hauwiler J.: J. Bacteriol. 95, 376, 1968.
- Jessen O., Rosendal K., Faber V., Eriksen K. R.: Acta Path. Microb. Scand. 58, 85, 1963.
- Jellaszewicz J., Cybulska J., Hauwiler J., Zak C.: Zia- renkowce Gram-dodatnie Wzd. Metod. PZH, 1969.
- Kapral F. A., Li J. W.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 104, 151, 1960.
- Koskitalo L. D., Milling M. E.: Can. J. Microb. 15, 132, 1969.
- Kurek C.: Medycyna Wet. 27, 470, 1970.
- Korbecki M., Jellaszewicz J.: J. Infect. Dis. 115, 205, 1965.
- Lack C., Wailling D. J.: J. Path. Bact. 63, 431, 1954.
- Linowski B., Hauwiler J., Jellaszewicz J.: J. Exptl. Med. 126, 979, 1967.
- Marshall R. B.: New Zealand Vet. J. 12, 57, 1964.
- Mulczyk M., Szezech A.: J. General. Microb. 61, 9, 1970.
- Mulczyk M.: Referat wygłoszony na zebraniu Pol. Tow. Mikrobiol. Oddział Wrocław 1973.
- Odzińska E., Kafel S.: Medycyna Wet. 22, 225, 1968.
- Weekman B. G., Catlin B. W.: J. Bacteriol. 73, 747, 1957.
- Wiśniewski J., Grziewski P.: Występowanie oraz niektóre problemy zwalczania chorób wymion Bydgoszcz 1963.

Adres autora: dr Jerzy Molenda, 51-637 Wrocław, ul. Roda- kowskiego 6.

Autor pragnie podziękować doc. dr hab. M. Mulczukowi z Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu za udostępnienie substratu i cenny pomocy umożliwiający wykonanie testu wykrywającego pirrolidonyl-pep- tydazę PLP.

Molenda E. — Энзиматические внеклеточные компоненты вырабатываемые стафилококками изолированными из случаев мастита коров.

Исследованиям подвергли 232 штаммов бета-гемолизующих стафилококков, изолированных из молока коров больных маститом, и 27 сапрофитических штаммов. У всех штаммов определяли способности к продукции коагулазы, CF, фосфатазы, мурамидазы, дезоксирибонуклеазы, пиридонил-пептидазы (PLP) и липазы.

Установили, что среди штаммов выделенных из случаев мастита встречаются также штаммы маннитол-положительные, коагулазо-отрицательные которые одновременно выделяют несколько энзиматических внеклеточных компонентов. Чаще всего их находили среди коагулазо-положительных штаммов. Коагулазо-отрицательные штаммы из случаев мастита коров производили в общем меньше энзимов чем штаммы коагулазо-положительные но бесспорно больше, как в отношении к дифференциации так и многочисленности, от сапрофитических стафилококков. Кроме того продукцию таких энзимов как: коагулаза, CF, мурамидаза, фосфатаза и липаза наблюдали только у стафилококков изолированных из случаев мастита а никогда у сапрофитических штаммов.

Molenda J. — Enzymatic extracellular elements produced by staphylococci isolated from cows with mastitis.

There were studied 232 strains of beta-haemolytic staphylococci isolated from milk of cows with mastitis and 27 saprophytic strains. For all strains there was determined the ability of coagulase, CF, phosphatase, muramidase, desoxyribonuclease, pyrrolidonyl-peptidase (PLP) and lipase production. It was found that among strains isolated from mastitis appeared mannitol-positive strains, coagulase-negative, producing few enzymatic extracellular elements. They appeared the most often among coagulase-positive strains, coagulase-negative strains isolated from mastitis cows produced generally less enzymes than those coagulase-positive, but more (qualitatively and quantitatively) than saprophytic strains. Coagulase, CF, muramidase, phosphatase and lipase were produced only by staphylococci isolated from cows with mastitis. Saprophytic strains were devoid that property.

CATSARAS M., GULISTANI A. W., MOSSEL D. A. A.: Powierzchnowe zakażenie mrożonych tusz bydła i koni. (Contaminations superficielles des carcasses réfrigérées de bovins et de chevaux). Recl. Méd. vét. 150, 287, 1974 (4).

Przeprowadzono badania 40 mrożonych tusz bydłowych i 122 mrożonych tusz końskich w kierunku salmonelli, E. coli, Enterobacteriaceae oraz psychrofilnych laseczek gramujemnych. Próby pobierano przy użyciu wacików z powierzchni 10×10 cm z 5 dokładnie określonych miejsc tuszy. Salmoneli w tuszach bydłowych nie stwierdzono, natomiast w tuszach końskich tylko w 3 przypadkach. Stopień zakażenia tusz bydłowych drobnoustrojami E. coli, Enterobacteriaceae i psychrofilnymi laseczkami gramujemnymi był niższy w porównaniu z zakażeniem mięsa wołowego pobranego z wybranych doświadczalnych, sklepów rzeźniczych. Mięso tusz końskich było zakażone drobnoustrojami z rodziny Enterobacteriaceae w tym samym stopniu co handlowe mięso wołowe, jednak miało mniejszą ilość psychrofilnych laseczek gramujemnych.

Na podstawie przeprowadzonych badań, przy pomocy metody wymazów, otrzymano następujące mikrobiologiczne wskaźniki dla mięsa: E. coli: + w ≤70 na 100 wymazów z 10 cm² i ≤20 na 100 wymazów z 1 mm²; Enterobacteriaceae: ilość bakterii ≤10³ na 100 cm²; psychrofilnych laseczek gramujemnych ≤10³ na 100 cm².

d.i.