

MARIAN TRUSZCZYŃSKI, JOZEF PILASZEK

## Ocena metod izolacji i identyfikacji gatunków *Mycoplasmatales* występujących u bydła

Z Zakładu Mikrobiologii Instytutu Weterynarii w Puławach

Metodyka izolacji i identyfikacji gatunków *Mycoplasmatales* stanowi zagadnienie wymagające wciąż lepszego niż dotychczas opracowania. Konieczne jest to ze względu na potrzebę dokładniejszego określenia ich roli w wywoływaniu chorób oraz jako podstawa ich rozpoznawania. Względy te w pełni odnoszą się do przedstawicieli *Mycoplasmatales* występujących u bydła.

Zgodnie z dotychczasowym stanem wiedzy w etiologii enzootycznej pneumonii bydła (11, 25, 30) znaczenie wydają się mieć mykoplazmy T (14), *M. bovirhinis* (15, 20, 27), *M. dispar* (8, 12, 13, 28) i *M. arginini* (18). *M. agalactiae* var. *bovis* oraz *M. bovigenitalium* mogą wywołać zmiany chorobowe układu płciowego i gruczołów mlecznych (1, 5, 6, 17, 19). *Acholeplasma* (*A. laidlawii*, *M. alkalescens* i *A. modicum* występują u bydła również, lecz uważane są za niechorobotwórcze. Znane są jednak doniesienia o udanym eksperymentalnym zakażeniu cieląt *A. modicum* (4).

Izolacja mykoplazm jest trudno. Do wzrostu wymagają podłoża specjalnych. Dotychczas w tym celu używano podłoża VF wg Barbera i Fabricanta (3), E wg Robertsa i Pijoana (26), HP wg Whittlestone'a (31) oraz wiele innych (2, 9). Brak jest jednak badań nad równoczesną oceną kilku z nich pod kątem największej przydatności do izolacji mykoplazm z tkanek zwierzęcych.

Oprócz izolacji istotna jest identyfikacja w hodowanych drobnoustrojów. W tym celu używa się głównie metod serologicznych (7, 16, 20, 21, 22). Brakuje jednakże jednoznacznej oceny odnośnie ich wartości w określaniu przynależności gatunkowej mykoplazm, występujących u bydła.

Z podanych względów przedmiotem niniejszych badań było ustalenie, które ze stosowanych metod izolacji i identyfikacji mykoplazm występujących u bydła są najbardziej przydatne do tego celu.

### Materiał i metody

Szczepki bakteryjne. Jako szczepów wzorcowych użyto po jednym szczepie *M. bovirhinis* i *M. dispar*. Szczepki te otrzymano z Instytutu Mikrobiologii Uniwersytetu w Arthus — Dania. Użyto również szczepów *M. agalactiae* var. *bovis* i *M. bovigenitalium*. Otrzymano je z Instytutu Chorób Bakteryjnych w Jenie — NRD oraz szczep *A. modicum* z Instytutu Weterynarii w Brnie — CSRS.

Podłoża. Do izolacji i namnażania mykoplazm służyły jednocześnie cztery rodzaje pożywek.

Podłoża VF wg Barbera i Fabricanta, E wg Robertsa i Pijoana oraz HP wg Whittlestone'a — zostały opisane uprzednio (29). Stosowano również podłoża HP<sub>1</sub> w modyfikacji własnej. Polegała ona na zastąpieniu w podłożu HP bulionu z płuc świń, takim samym bulionem, lecz sporządzonym z płuc cieląt oraz surowicy świń — surowicą cieląt.

Materiał do izolacji szczepów. Do badań użyto 24 wycinki z płuc, pobrane od cieląt poddanych ubojowi. W płucach tych były zmiany anatomopatologiczne, wskazujące na zapalenie płatów szczytowych. Użyto również 24 próbek wymazów z nosa cieląt pochodzących ze stada, w którym stwierdzono w dużym odsetku schorzenia płuc o nieustalonej etiologii.

Zwierzęta doświadczalne. Do produkcji surowic odpornościowych użyto 12 królików białych o ciężarze około 2 kg, pochodzących z hodowli własnej Instytutu Weterynarii w Puławach.

Surowice odpornościowe. Otrzymano je podobnie jak w pracy poprzedniej (29).

Izolacja szczepów. Izolację szczepów z płuc cieląt poddanych ubojowi wykonano wg metody opisanej przez Truszczyńskiego i Pilaszka (29). Natomiast próbki pobrane z nosa cieląt, były posiewane w ten sposób, że wacikiem nasączonym śluzem podczas wymazu z jamy nosowej, posiewano wszystkie używane podłoża stałe a następnie cały wacik zanurzano w 2 ml pożywki VF i dokładnie wyciskano jego zawartość. Podłoża płynne posiewano dodając do 10 ml pożywki 0,2 ml płynu powstałego po wymieszaniu pożywki VF z zawartością wacika. Dalszą część izolacji przeprowadzono wg metody opisanej uprzednio (29).

Aglutynację płytową i próbkową oraz odczyn zahamowania wzrostu wykonano jak w pracy poprzedniej (29).

### Wyniki i omówienie

Celem doświadczeń, których wyniki przedstawiono w tab. 1, była ocena przydatności kilku pożywek do izolacji drobnoustrojów z rodzaju *Mycoplasma* i *Acholeplasma* z płuc cieląt. Stosowane podłoża nadawały się do hodowli szczepów standardowych użytych w pracy. Szczepki wyizolowane identyfikowano metodą aglutynacji próbkowej.

Z tab. 1 wynika, iż na 24 próby izolacji, stosując cztery różne podłoża, najwięcej (7 szczepów) wyosobniono na podłożu przygotowanym wg Barbera i Fabricanta (VF). Najmniej szczepów, bo 3, wyosobniono na podłożu HP<sub>1</sub>. Na podłożu E wg Robertsa i Pijoana wyhodowano 5 szczepów a na podłożu HP wg Whittlestone'a 4 szczepki. Wyosobnione na pożywkach przygotowanych wg Barbera i Fabricanta (VF) oraz Whittlestone'a (HP) szczepki można było zaliczyć metodą aglutynacji próbkowej do trzech gatunków mykoplazm: *M. bovirhinis*,

Tab. 1. Wyniki izolacji szczepów rodzaju *Mycoplasma* i *Acholeplasma* z płuc cieląt przy zastosowaniu kilku podłoży bakteryjnych

Liczba badanych próbek	Podłoża przygotowano wg metody opisanej przez:	Liczba szczepów wyosobnionych	Szczepy zaliczono do*:					Szczepy nieokreślone**
			<i>M. bovirhinis</i>	<i>M. dispar</i>	<i>A. modicum</i>	<i>M. bovigentialium</i>	<i>M. agalactiae</i>	
24	Barbera i Fabricanta (VF)	7	1	1	2	—	—	3
	Robertsa i Pijoana (E)	5	—	1	2	—	—	2
	Whittlestone'a (HP)	4	1	1	1	—	—	1
	Podłoże HP w modyfikacji własnej (HP <sub>1</sub> )	3	—	1	—	—	—	1

Objaśnienia: \* = wyosobnione szczepy określono metodą aglutynacji próbówkowej; \*\* = w grupie szczepów nieokreślonych znajdowały się szczepy reagujące z surowicami diagnostycznymi oraz szczepy, nie dające się pasażować na pożywkach płynnych.

*M. dispar* oraz *A. modicum*. Natomiast szczepy izolowane na podłożu sporządzonym wg metody opisanej przez Robertsa i Pijoana (E) oraz na pożywce HP<sub>1</sub> należały do gatunków: *M. dispar* i *A. modicum*. Stosowane do określenia szczepów surowice anti-*M. bovigentialium* i anti-*M. agalactiae* var. *bovis* nie reagowały dodatnio w próbie aglutynacji próbówkowej z żadnym z wyosobnionych szczepów.

W tab. 2 przedstawiono wyniki izolacji szczepów mykoplazm ze śluzu pobranego z jamy nosowej cieląt. W badaniach tych stosowano te same podłoża jak w tab. 1.

też z błony śluzowej jamy nosowej — nadają się wszystkie ze stosowanych pożywek. Jednak najbardziej przydatną do tego celu jest pożywka VF, sporządzona wg metody opisanej przez Barbera i Fabricanta oraz pożywka E wg Robertsa i Pijoana. Obie są stosunkowo łatwe w przygotowaniu. Za stosowaniem pożywki VF przemawia również i to, że nie wymaga ona składników importowanych.

W kolejnych doświadczeniach oceniono wartość kilku prób serologicznych do określania przynależności gatunkowej mykoplazm. W tym celu posłużono się próbą aglutynacji próbów-

Tab. 2. Wyniki izolacji szczepów rodzaju *Mycoplasma* i *Acholeplasma* z błony śluzowej jamy nosowej cieląt przy zastosowaniu kilku podłoży bakteryjnych

Liczba badanych próbek	Podłoża przygotowano wg metody opisanej przez:	Liczba szczepów wyosobnionych	Szczepy zaliczono do*:					Szczepy nieokreślone**
			<i>M. bovirhinis</i>	<i>M. dispar</i>	<i>A. modicum</i>	<i>M. bovigentialium</i>	<i>M. agalactiae</i>	
24	Barbera i Fabricanta (VF)	10	2	3	2	—	—	3
	Robertsa i Pijoana (E)	11	3	2	2	—	—	4
	Whittlestone'a (HP)	7	2	1	2	—	—	2
	Podłoże HP <sub>1</sub>	7	2	2	2	—	—	1

Objaśnienia: \*; \*\* = jak w tab. 1.

Z tab. 2 wynika, iż największą liczbę — 11 szczepów wyosobniono na podłożu E wg Robertsa i Pijoana oraz na podłożu VF wg Barbera i Fabricanta — 10 szczepów. Na podłożach HP wg Whittlestone'a i HP<sub>1</sub> wyosobniono po 7 szczepów. Szczepy izolowane na każdym ze stosowanych podłoży udało się zaliczyć metodą aglutynacji próbówkowej do: *M. bovirhinis*, *M. dispar* lub *A. modicum*. Żadnego z wyosobnionych w pracy szczepów nie udało się określić jako *M. agalactiae* var. *bovis* lub *M. bovigentialium*. Halen i Antoine (15) oraz Shimizu i wsp. (27) szczepy izolowane od cieląt w większości przypadków określili jako *M. bovirhinis* a Gourlay i Leach (12) oraz Mensik i wsp. (23) wykazali wśród izolowanych szczepów w większości przypadków takie gatunki jak *M. bovirhinis* i *M. dispar*. Powyższe dane z literatury wskazują na to, że na stosowanych w pracy własnej podłożach, izolowano gatunki najczęściej występujące u cieląt i mające znaczenie w etiologii schorzeń układu oddechowego u tych zwierząt.

Z uzyskanych danych wynika, iż w celu izolacji mykoplazm od cieląt zarówno z płuc, wykazujących zmiany anatomopatologiczne, charakterystyczne dla enzoptycznej pneumonii, jak

kowej, aglutynacji płytowej oraz odczynem zahamowania wzrostu. W tym ostatnim stosowano krążki bibułowe nasączone surowicami odpornościowymi.

Tab. 3 i 4 zawierają wyniki badań wykonanych przy użyciu próby aglutynacji płytowej i próbówkowej. Użyto zawiesiny aglutynacyjnej standardowych szczepów *M. bovirhinis*, *M. dispar*, *A. modicum*, *M. bovigentialium* i *M. agalactiae* var. *bovis* oraz surowice królicze, swoiste dla wymienionych gatunków.

Z tab. 3 wynika, że w układach homologicznych zawiesin aglutynacyjnych i odpowiadających im surowic uzyskano zawsze odczyn najbardziej zaznaczony, określany jako „++++”. Wynik dodatni określany jako „++++” uzyskano również w układach heterologicznych zawiesin aglutynacyjnych i surowic odpornościowych *M. agalactiae* var. *bovis* oraz *M. bovigentialium*. Wyniki te świadczą, iż próba aglutynacji płytowej nie nadaje się do różnicowania użytych w pracy przedstawicieli gatunków *M. agalactiae* var. *bovis* i *M. bovigentialium*. Odczyn określany jako „++” postanowiono przyjąć podobnie jak to określał Pilaszek (24) w odniesieniu do szczepów izolowanych od świń, jako nie wskazujące na wynik dodatni. Wy-

Tab. 3. Aglutynacja płytowa zawiesin aglutynacyjnych szczepów wzorcowych mykoplazm oraz surowic królików uodpornionych tymi szczepami

Surowica \ Antygen	<i>M. bovirhinis</i>	<i>M. dispar</i>	<i>A. modicum</i>	<i>M. agalactiae</i>	<i>M. bovigentalium</i>
<i>M. bovirhinis</i>	++++	—	++	—	—
<i>M. dispar</i>	—	++++	++	—	—
<i>A. modicum</i>	++	++	++++	+	+
<i>M. agalactiae</i>	—	—	—	++++	++++
<i>M. bovigentalium</i>	—	—	—	++++	++++

Objaśnienia: ++++ = odczyn dodatni występujący do 1 minuty; +++ = odczyn dodatni występujący do 2 minut; ++ = odczyn dodatni występujący do 3 minut; — = brak odczynu dodatniego.

stępujących w doświadczeniu reakcji krzyżowych nie udało się uniknąć przez inaktywowanie stosowanych surowic w temperaturze 56°C przez 30 minut. Surowice takie dawały wyniki identyczne jak przed inaktywacją.

*tiae* i *M. bovigentalium*. Reakcje krzyżowe w aglutynacji probówkowej wykazali również Harbourne i wsp. (16) oraz Bokori i wsp. (4).

Stosując do badań odczyn zahamowania

Tab. 4. Aglutynacja probówkowa wzorcowych zawiesin aglutynacyjnych oraz odpowiadających im surowic odpornościowych

Surowica \ Antygen	<i>M. bovirhinis</i>	<i>M. dispar</i>	<i>A. modicum</i>	<i>M. agalactiae</i>	<i>M. bovigentalium</i>
<i>M. bovirhinis</i>	256*	—**	—	—	—
<i>M. dispar</i>	—	256	—	—	—
<i>A. modicum</i>	8	8	256	8	8
<i>M. agalactiae</i> var. <i>bovis</i>	—	—	—	128	16
<i>M. bovigentalium</i>	—	—	—	16	128

Objaśnienia: \* = najwyższe rozcieńczenie surowicy, w którym wystąpił odczyn odadni; \*\* = brak odczynu dodatniego.

Jak widać w tab. 4, reakcje krzyżowe w układach heterologicznych zawiesin aglutynacyjnych i surowic odpornościowym uzyskano też w próbie aglutynacji probówkowej, lecz były one mniej zaznaczone. Najwyższe miano współaglutynacji w tym przypadku wynosiło 16, natomiast w układach homologicznych uzyskano miano od 128 do 256. Antygen *M. bovigentalium* reagował z surowicą anty-*M. agalactiae* var. *bovis* w najwyższym rozcieńczeniu 1:16, podobnie jak antygen *M. agalactiae* var. *bovis* z surowicą anty-*M. bovigentalium*. Zatem odczynem aglutynacji probówkowej przeciwnie niż płytowej, możliwe było odróżnienie tych dwóch gatunków *Mycoplasma*.

wzrostu zachowano podobny układ doświadczenia jak w tab. 3 i 4. Wyniki przedstawiono w tab. 5.

Wyniki przedstawione w tab. 5 wskazują na to, że największą strefę zahamowania wzrostu obserwowano w układach homologicznych. Strefa ta była wyraźnie zaznaczona i w przypadku szczepów dobrze rosnących widoczna była gołym okiem. Średnica jej wahała się w granicach od 15 do 20 mm (wliczając średnicę krążka). W układach heterologicznych obserwowano w niektórych przypadkach również strefę zahamowania wzrostu wokół krążków nasączonych surowicą lecz była ona bardzo mała — mniejsza niż 8 mm (wliczając również średnicę krążka). Najczęściej widoczna była ona dopiero przy 50-krotnym powiększeniu mikroskopu świetlnego. Próba wzrostu okazała się

Tab. 5. Odczyn zahamowania wzrostu przez surowice odpornościowe królików uodpornionych użytymi w doświadczeniu szczepami wzorcowymi mykoplazm

Szczep \ Surowica anty:	<i>M. bovirhinis</i>	<i>M. dispar</i>	<i>A. modicum</i>	<i>M. bovigentalium</i>	<i>M. agalactiae</i>
<i>M. bovirhinis</i>	+	—	—	—	—
<i>M. dispar</i>	—	+	—	—	—
<i>A. modicum</i>	+—	—	+	+—	+—
<i>M. bovigentalium</i>	+—	+—	+—	+	+—
<i>M. agalactiae</i>	+—	+—	—	—	+

Objaśnienia: + = strefa zahamowania dobrze zaznaczona (15–20 mm wraz z krążkiem); +— = strefa zahamowania słabo zaznaczona (mniejsza od 8 mm wraz z krążkiem) lub widoczna tylko pod mikroskopem.

Wyniki podobne do opisanych otrzymali również Kehoe i wsp. (19). Autorzy ci stosując odczyn wiązania dopełniacza wykazali silnie zaznaczoną reakcję krzyżową z antygenami i odpowiadającymi im surowicami *M. agalac-*

zatem najbardziej przydatna do określania przynależności gatunkowej mykoplazm. O dużej wartości odczynu zahamowania wzrostu donosili Truszczyński i Pilaszek (29) odnośnie szczepów *Mycoplasma* izolowanych od świń oraz wielu innych autorów (16, 19, 20, 22).

Oceniając wyniki tab. 3, 4 i 5 należy wnosić, iż w identyfikacji gatunków mykoplazm najlepsze wyniki uzyskuje się przy pomocy odczynu zahamowania wzrostu. Nieco mniej przydatny pod tym względem okazał się odczyn aglutynacji probówkowej. Odczynem aglutynacji płytowej uzyskano wyniki gorsze, zwłaszcza przy różnicowaniu *M. bovigentalium* i *M. agalactiae* var. *bovis*.

W dalszej części pracy, mającej na celu określenie wartości diagnostycznej stosowanych prób serologicznych do określenia przynależności gatunkowej szczepów *Mycoplasma*, postanowiono zbadać szczepy izolowane uprzednio z płuc oraz z błony śluzowej jamy nosowej cieląt. Do badań użyto te szczepy, które dały się pasażować zarówno na podłożach stałych jak też na podłożach płynnych. Uzyskane wyniki przedstawiono w tab. 6.

Tab. 6. Określanie przynależności gatunkowej izolowanych szczepów mykoplazm przy pomocy trzech odczynów serologicznych

Liczba szczepów badanych	Gatunek	Aglutynacja probówkowa	Aglutynacja płytowa	Odczyn zahamowania wzrostu
37 <sup>x</sup>	<i>M. bovirhinis</i>	11	10	10
	<i>M. dispar</i>	12	9	8
	<i>A. modicum</i>	14	14	14
	<i>M. agalactiae</i>	—	—	—
	<i>M. bovigentalium</i>	—	—	—

Objasnienie: x = do badań użyto szczepy izolowane zarówno z płuc jak też z błony śluzowej jamy nosowej cieląt.

Jak wynika z tab. 6 na ogólną liczbę 37 szczepów badanych, 11 zaliczono w próbie aglutynacji probówkowej do gatunku *M. bovirhinis*. Stosując odczyn aglutynacji płytowej i odczyn zahamowania wzrostu do gatunku tego zaliczono 10 szczepów a więc jeden ze szczepów określanych próbą aglutynacji probówkowej nie reagował w dwu pozostałych odczynach. Do gatunku *M. dispar* udało się zaliczyć przy pomocy aglutynacji probówkowej 12 szczepów na 37 badanych. 9 szczepów zaliczono do tego gatunku metodą aglutynacji płytowej a 8 szczepów odczynem zahamowania wzrostu. Każdym ze stosowanych odczynów serologicznych do *A. modicum* zaliczono 14 szczepów. Żaden z badanych szczepów mykoplazm nie reagował w trzech stosowanych próbach z surowicami diagnostycznymi anty-*M. agalactiae* var. *bovis* i anty-*M. bovigentalium*.

Shimizu i wsp. (27) badając 117 cieląt w 63 przypadkach izolowali mykoplazmy, spośród których 55 szczepów zidentyfikowali jako *M. bovirhinis*, 4 szczepy zaliczyli do rodzaju *Acholeplasma* a 4 pozostałych szczepów autorzy nie określili. Podobne wyniki uzyskali również Halen i Antoine (15), którzy na 22 szczepy izolowane, 14 określili jako *M. bovirhinis*. O izolowaniu *M. bovirhinis* donosili również Mensik

i wsp. (23). Autorzy ci izolowali również z układu oddechowego cieląt *M. dispar* podobnie jak Gourlay i Leach (12). Z przedstawionych danych wynika, iż na stosowanych podłożach w pracy własnej, izolowano gatunki mykoplazm najczęściej występujące u cieląt.

Na podstawie przeprowadzonych badań należy również wnosić, iż w celu identyfikacji szczepów mykoplazm, izolowanych od cieląt z układu oddechowego, winno się stosować nie jedną lecz przynajmniej dwie metody serologiczne. Najbardziej odpowiednią z nich, na podstawie przytoczonych badań, jest odczyn zahamowania wzrostu przez surowice odpornościowe.

### Wnioski

1. Wszystkie ze stosowanych podłoży (wg Barbera i Fabricanta, Roberts'a i Pijoana, Whittlestone'a i podłoże w modyfikacji własnej) nadawały się do izolacji mykoplazm z płuc i błony śluzowej jamy nosowej cieląt. Jednak podłoże opisane przez Barbera i Fabricanta (VF) oraz Roberts'a i Pijoana (E) okazały się najbardziej przydatne do tego celu.

2. Na stosowanych podłożach izolowano szczepy dające się zaliczyć do *M. bovirhinis*, *M. dispar* oraz *A. modicum*. Na podłożach tych wyosobniono również szczepy, których przynależność gatunkowa nie została ustalona.

3. W badaniach mających na celu identyfikację przynależności gatunkowej mykoplazm izolowanych od cieląt, za podstawową próbę należy uważać odczyn zahamowania wzrostu.

### Piśmiennictwo

1. Afshar A., Stuard P., Huck R. A.: Vet. Rec. 78, 512, 1966.
2. Bannerman E. S. N., Nicolet J.: Schweizer Arch. Tierheilk. 113, 697, 1971.
3. Barber T., Fabricant J.: J. Bact. 82, 1269, 1962.
4. Bokori J., Horvath Z., Stipkovits L., Molnar L.: Acta vet. hung. 21, 61, 1971.
5. Erno H., Aalund O.: Acta vet. scand. 13, 597, 1972.
6. Erno H., Blom E.: Acta vet. scand. 13, 161, 1972.
7. Erno H., Jurmanova K.: Acta vet. scand. 14, 524, 1973.
8. George T. D., Hosfall S., Sullivan S. D.: Aust. Vet. J. 49, 12, 580, 1973.
9. Gois M., Valicek L., Sovadina M.: Zentbl. VetMed. (B). 15, 230, 1968.
10. Gourlay R. N.: Res. vet. Sci. 9, 376, 1968.
11. Gourlay R. N.: J. Am. vet. med. Ass. 163, 905, 1973.
12. Gourlay R. N., Leach R. H.: J. med. Microbiol. 3, 111, 1970.
13. Gourlay R. N., Mackenzie A., Cooper J. E.: J. comp. Path. 80, 575, 1970.
14. Gourlay R. N., Tomas L. H.: J. comp. Path. 80, 585, 1970.
15. Halen P., Antoine O.: Ann. Rech. Vet. 4/3, 389, 1973.
16. Harbourne J. F., Hunter D., Leach R. H.: Res. vet. Sci. 6, 178, 1965.
17. Hartman H. A., Tourtellotte J. M., Nielsen S. W., Plastringe W. N.: Res. vet. Sci. 5, 303, 1964.
18. Jurmanova K., Krejci J.: Vet. Rec. 89, 585, 1971.
19. Kehoe J. M., Norcross N. L., Carmichael L. E.: Ann. N. Y. Acad. Sci. 143, 337, 1967.
20. Leach R. H.: Ann. N. Y. Acad. Sci. 143, 305, 1967.
21. Leach R. H.: Vet. Rec. 87, 319, 1970.
22. Leach R. H.: J. gen. Microbiol. 75, 135, 1973.
23. Mensik J., Jurmanova K., Hajkova M.: Docum. vet. 8 in press; wg Jurmanova K., Krajci J.: Vet. Rec. 89, 585, 1971.
24. Pilaszek J.: Właściwości antygenowe i toksyczne kilku gatunków *Mycoplasma* wyosobnionych od świń. Praca doktorska. Instytut Weterynarii, Puławy, 1972.
25. Pilaszek J.: Post. Mikrobiol. 3-4, 119, 1974.
26. Roberts D. H., Pijoan C.: Br. vet. J. 127, 582, 1971.
27. Shimizu T., Nosaka D., Nakamura N.: Jap. J. vet. Sci. 35, 535, 1973.
28. Thomas L. H., Howard C. J.: J. comp. Path. 84, 193, 1974.
29. Truszczyński M., Pilaszek J.: Medycyna Wet. 9, 521, 1974.
30. Truszczyński M.: Medycyna Wet. w druku.
31. Whittlestone P.: Isolation methods for microbiologists. Edited by D. A. Shapton and G. W. Gauld 1969.

Adres autora: prof. dr Marian Truszczyński, Al. Partyzan-tów 57, 24-100 Puławy.

Труциньски М., Пиляшек Я. — **Оценка методов изоляции и идентификации видов *Mycoplasma* у крупного рогатого скота.**

Сравнивали пригодность для лабораторной диагностики микоплазм нескольких питательных сред и серологических методов. Применяли одновременно жидкие и плотные питательные среды, описанные Барбером и Фабрикантом (VF), Робертсом и Пижоаном (E), Уайтльстоном (HP) и средой собственной модификации. (HP<sub>1</sub>). Из серологических методов сравнивали, принимая во внимание диагностическую пригодность, плиточную и пробирочную реакции агглютинации, а также реакцию торможения роста.

Установили, что все из вышеназванных сред были пригодны для изолирования микоплазм из исследуемого материала. Однако, применяя питательные среды VF и E, изолировали из того же самого материала больше штаммов микоплазм чем из двух остальных. Изолированные штаммы удалось зачислить к *M. bovirhinis*, *M. dispar* и *A. mo-*

dicum. Среди серологических реакций наиболее пригодной для идентификации указанных штаммов оказалась реакция связывания комплемента.

Truszczyński M., Pilaszek J. — **The evaluation of the methods of isolation and identification of *Mycoplasma* in cattle.**

There were compared the usefulness of various media and diverse serological methods applied for isolation and identification of *Mycoplasmas*. The following media were used: (liquid and solid), VF (Barber and Fabricant), E (Roberts and Pijoan), HP (Whittlestone) and the own modified medium (HP<sub>1</sub>). Serological estimations were performed by the use of tube and plate agglutination tests and growth inhibition test. All the media tested were suitable for the isolation of *Mycoplasmas* from the examined material. However, using VF and E media more *Mycoplasma* strains were recovered from the same material than on the two other media. The isolated strains belonged to *M. bovirhinis*, *M. dispar* and *M. modicum*. The most suitable serological method for the identification of the strains proved to be the growth inhibition test.

KRZYSZTOF J. WOJCIECHOWSKI

## Próba charakterystyki biologicznej szczepu wirusa wścieklizny ulicznej: „Błonie 22/69/kot”

Z Pracowni Wirusologii Zakładu Higieny Weterynaryjnej w Warszawie

W poprzednim doniesieniu (9) przeprowadzono wszechstronną analizę właściwości szczepu wirusa wścieklizny ulicznej „Błonie 22/69/kot” opartą o wyniki wykonanych badań laboratoryjnych. Szczep wykazywał m. in. krótki okres inkubacji po zakażeniu zwierząt doświadczalnych, wysoką wirulentność i wybitną zdolność tworzenia ciałek Babes-Negriego. Ze względu na możliwość występowania podobnych szczepów w terenie (6, 7) i celowością ich różnicowania szczególnie ze szczepami izolowanymi z przypadków tzw. wścieklizny poszczepiennej (7, 8) — wywołanej przez wirus ustalony wścieklizny, podjęto dodatkowe badania biologiczne szczepu.

### Materiał i metody

Zwierzęta laboratoryjne: myszy białe „Porton” wagi 11—13 g z hodowli o wysokim standardzie zdrowotności.

Szczepy wirusów wścieklizny:

1. szczep wirusa ulicznego: Błonie 22/69/kot wyizolowany z mózgu kota (8) i przechowywany w 50% glicerynie buforowanej w temp. ca -40° po pasażu mózgowym na myszach. Przed rozpoczęciem badań szczep przeszedł 7 pasaży domózgowych i 12 domięśniowych na myszach;

2. szczep wirusa ustalonego wścieklizny: „Puławy” używany w Zakładach „Biowet” — Puławy do produkcji szczepionki p-w wściekliznie zwierząt „Rabiesvac”;

3. szczepy wirusów ustalonych: „Paryż”, „Kraków” i „Lublin” stosowane do 1973 r. w produkcji szczepionki p-w wściekliznie pro usu humanum przez zakłady „Biomed” w Warszawie — uzyskane w formie zakażonych mózgów króliczych;

4. szczep referencyjny wirusa ustalonego wścieklizny: CVS-IP-9 uzyskany w formie liofilizatu zawieszony w mózgu myszy z WHO.

Jako metodę oceny biologicznej szczepu wirusa ulicznego wobec szczepów wirusa ustalonego wścieklizny przyjęto próby zakażenia donosowego (1—5, 7). Zakażenie donosowe myszy przeprowadzono przez wkropienie 0,1 ml 20% zawiesiny poszczególnych szczepów do nozdrzy myszy w płytkiej narkozie eterowej. Zawiesiny przygotowywano w PBS z 2% surowicy końskiej inaktywowanej. Doświadczenie wykonano w dwóch etapach: 1. ze szczepami: Błonie 22/69/kot i wirusami ustalonymi: „Puławy”, CVS-IP9, „Paryż”, „Kraków”, „Lublin” oraz 2. szczepami: „Błonie” 22/69/kot, „Puławy” i „Paryż” po próbie adaptacji w następstwie 12 pasaży domózgowych na myszach. Pa-

Tab. 1. Próby zakażenia donosowego myszy szczepami wirusa ustalonego (fixe) i szczepem wirusa ulicznego wścieklizny (materiał wyjściowy)

Szczepy wirusa	Materiał do zakażenia 0,1 ml-20% zawiesiny	Dni padnięć po zakażeniu: liczba myszy/dzień		Zachorowało zakażone
Fixe (Puławy)	mózg owcy	4/7, 2/12	4/11, 2/14	12/20
Fixe - CVS-IP9	mózg myszy	10/7, 2/11	2/10, 2/14	16/20
Fixe (Paryż)	mózg królika	2/10	2/12	4/20
Fixe (Kraków)	mózg królika	2/8	2/11	4/20
Fixe (Lublin)	mózg królika	2/7	2/10	4/20
Uliczny	mózg myszy	2/7	4/10	6/20

Objaśnienia: 1 = szczep stosowany do produkcji szczepionki typu Umeno-Doi; 2—4 = szczepy stosowane (do 1973 r.) do produkcji szczepionki typu Semple'a.