

BOZENA STRAS  
Poznań

## Wybrane właściwości biologiczne gronkowców koagulazo-dodatnich wyizolowanych z mleka krów dotkniętych zapaleniem gruczołu mlekowego

W literaturze fachowej, dotyczącej problemu *mastitis* u krów wyrażono pogląd, że specyficznym drobnoustrojem wywołującym zapalenie gruczołu mlekowego jest *Streptococcus agalactiae* (3, 7, 8, 20, 22). Jednak w ostatnich latach, na skutek intensywnego zwalczania tego drobnoustroju przez stosowanie antybiotyków, udział jego w wywoływaniu zapalenia wymienia stopniowo zmniejsza się, natomiast wzrasta liczba przypadków zachorowań na tle zakażenia gronkowcami. Obserwacje te znajdują potwierdzenie zarówno w badaniach własnych (21), jak również w publikacjach autorów krajowych i zagranicznych (3, 16, 18, 23).

Wobec tego faktu, uznano za celowe podjęcie badań nad biologiczną charakterystyką szczepów gronkowców wyizolowanych z mleka krów dotkniętych zapaleniem gruczołu mlekowego.

### Material i metody

W pierwszej kolejności, wyizolowane szczepy gronkowców badano w kierunku fermentacji mannitolu w warunkach beztlenowych i wytwarzania koagulazy. 221 szczepów koagulazo i mannitolo-dodatnich scharakteryzowano pod względem innych właściwości biologicznych, świadczących o ewentualnej chorobotwórczości szczepu oraz poddano testowi wrażliwości na podstawowe antybiotyki.

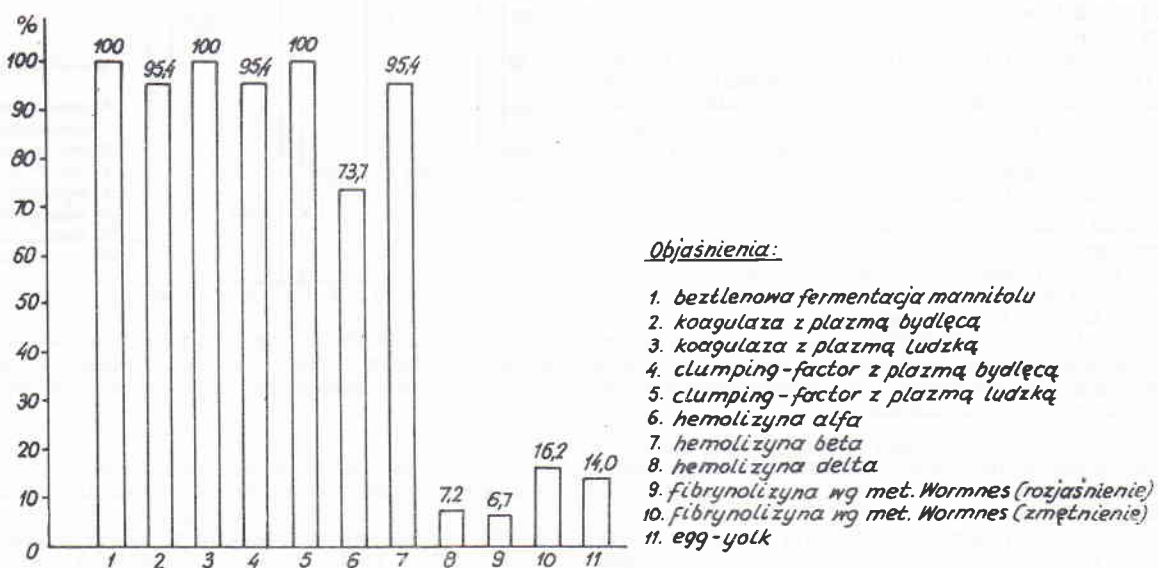
Beztlenową fermentację mannitolu, koagulazę i „clumping factor” z plazmą bydlęcą i plazmą ludzką,

toksyny hemolityczne (alfa, beta, delta), fibrynolizynę, określano metodami podanymi przez Jeliaszewicza (6), a lipazę na podłożu Cartera. W celu określenia *in vitro* wrażliwości na antybiotyki stosowano metodę krążkową zalecaną przez Wytwórnę Surowic i Szczepionek w Warszawie. Aktywność stosowanych w badaniach podłoża bakteriologicznych kontrolowano przy użyciu standardowych szczepów gronkowców.

### Wyniki i omówienie

Ogólną charakterystykę szczepów przedstawiają ryc. 1 i 2. W pierwszej kolejności zróżnicowano badane szczepy w oparciu o dwie właściwości: fermentację mannitolu w warunkach beztlenowych oraz wytwarzanie koagulazy. Te dwie właściwości umożliwiają odróżnienie *Staphylococcus aureus* od *Staphylococcus epidermidis*. W praktyce jednak różnicowanie oparte jest na wytwarzaniu przez szczepy koagulazy. Właściwość ta dostatecznie określa potencjalną chorobotwórczość szczepów gronkowców.

Koagulaza jest silnym czynnikiem wywołującym krzepnięcie krwi (6). Powoduje wykrzepienie włókniaka wokół komórek gronkowców, chroniąc je tym samym przed działaniem mechanizmów obronnych organizmu. Do działania wykrzepiającego fibrynogen wymaga obecności tzw. aktywatora koagulazy (coagulase-reaction factor), występującego w osoczu krwi i w surowicy (6). Badanie koagulazy *in vitro* jest



Ryc. 1. Właściwości biologiczne gronkowców wyizolowanych z mleka krów dotkniętych zapaleniem gruczołu mlekowego

najważniejszą próbą różnicowania potencjalnie chorobotwórczych gronkowców.

Wyniki badań własnych wykazały, że testowane szczepy w 100% fermentowały mannitol w warunkach beztlenowych, w 100% reagowały dodatnio z plazmą ludzką, zarówno w próbie na koagulazę wolną („prawdziwa”) jak „clumping-factor” (czynnik zlepiający), nazywany koagulazą związaną. Natomiast reakcja dodatnia z plazmą bydłą, w próbie na koagulazę i „clumping-factor” wystąpiła u 95,4% szczepów.

Innym czynnikiem decydującym o chorobotwórczości gronkowców są wytwarzane przez nie hemolizyny. Większość szczepów gronkowców złocistych wytwarza dwie lub trzy różne hemolizyny. Na ogół szczepy patogenne pochodzenia ludzkiego wytwarzają alfa i delta hemolizynę, natomiast szczepy pochodzenia zwierzęcego — alfa, beta i delta hemolizynę (16).

Alfa toksyna jest jedną z najsilniej działających toksyn bakteryjnych. Szczepy wytwarzające hemolizynę alfa, dają po posiewie na podłożu agarowe z krwią króliczą lub baranią kolonie otoczone dość szeroką strefą zupełnej hemolizy, niezbyt ostro odgraniczonej (1, 4, 6, 22). Wytwarzanie jej jest charakterystyczne dla szczepów gronkowców wyizolowanych od ludzi (1, 6, 16, 22); również szczepy bydłych gronkowców wytwarzają często obok beta-hemolizyny — alfa i delta hemolizynę (11). Zdaniem Gładstone (5), niewytwarzanie alfa-hemolizyny *in vitro* nie dowodzi, iż nie może ona być wytwarzana *in vivo*.

Wyniki badań wykazały, że stosunkowo wysoki procent (73,7%) szczepów gronkowców wyizolowanych z mleka krów wytwarzało hemolizynę alfa.

Beta-hemolizyna jest mniej toksyczna niż alfa-hemolizyna (5). Nie wykryto jej letalnego działania na myszach, jedynie wywołuje ona charakterystyczny rumień na skórze królików (5). Beta-hemolizynę wytwarzają najczęściej szczepy gronkowców izolowanych od zwierząt (1, 4, 5, 6, 9, 16, 22). Na podłożu z krwią bydłą, baranią, kozią, powstaje wokół kolonii szczepów gronkowców wytwarzających beta-hemolizynę szeroka, ostro odgraniczona strefa niezupełnej hemolizy, charakteryzująca się wyraźnym ściemnieniem, która po przeniesieniu do lodówki całkowicie się przejaśnia (hemolizyna ciepło-zimna). Obecność beta-hemolizyny stwierdzono u 95,4% szczepów.

Delta toksyna występuje u większości szczepów potencjalnie chorobotwórczych (1). Zgodnie z obserwacjami Gładstone (5), jest silnie toksyczna dla leukocytów ludzkich i zwierzęcych. Wywołuje również martwicę skóry i lisę erytrocytów człowieka i konia (6). Obecność jej można wykazać, hodując szczepy gronkowców na podłożu agarowym z dodatkiem krwinek ludzkich lub końskich; wytwarza wokół kolonii charakterystyczną, wąską, ostro odgraniczoną strefę hemolizy zupełnej (1, 4, 5). Obecność delta-hemolizyny stwierdzono tylko u 7,3% szczepów.

Badania nad wytwarzaniem fibrylizyny przez szczepy gronkowców przeprowadziło wielu autorów, mając na celu między innymi porównanie szczepów pochodzenia ludzkiego ze szczepami pochodzenia bydłowego. Wyniki tych badań (1, 11, 12, 13, 14, 16, 17) są na ogół zgodne. Twierdzą oni, że szczepy gronkowców pochodzenia bydłowego w niskim procencie wytwarzają fibrylizynę, w przeciwieństwie do szczepów pochodzenia ludzkiego.

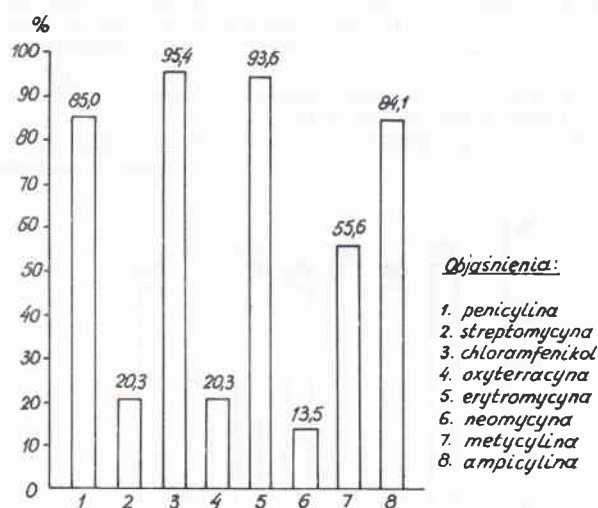
Podobne wyniki uzyskano w badaniach własnych. Fibrylizynę wytwarzało tylko 6,7% badanych szczepów. Fibrylizyna silnie aktywuje plazminogen człowieka, królika i świnki morskiej (6). Gronkowce wytwarzające fibrylizynę wydzielają ją do podłoża; o ile w podłożu znajduje się wytrącony fibrynogen, to w miejscu działania fibrylizyny następuje rozkład zdenaturowanego fibrynogeny, efektem czego jest przejaśnienie podłoża (6).

Lipaza jest enzymem lipolitycznym (1, 2, 6, 10). Reakcja dodatnia obserwowana na agarze z żółtkiem jaj jest wynikiem działania lipazy lipoproteinowej na lipovitellinę znajdującą się w żółtku jaja (10).

Na temat aktywności lipolitycznej gronkowców wypowiedzieli się wielu autorów (10, 14, 17, 19). Uważają oni, że szczepy pochodzenia bydłowego, w przeciwieństwie do szczepów pochodzenia ludzkiego oraz szczepów wyizolowanych z produktów żywnościowych w nielicznych wypadkach dają reakcję dodatnią na podłożu z żółtkiem jaja.

Powyższe wyniki znalazły również potwierdzenie w badaniach własnych. Tylko 14% szczepów gronkowców wykazało reakcję pozytywną na podłożu Cartera. Badania Winifreda i wsp. (23) wykazały, że 73,3% szczepów pochodzących z ostrych form *mastitis* wytwarzało zmętnienie na podłożu z żółtkiem jaja. Jest to duża liczba w porównaniu do szczepów izolowanych z chronicznych *mastitis* (6,9%) i z wymion normalnych (7,7%). Na podstawie powyższych badań autorzy wnioskują, że szczepy gronkowców złocistych izolowanych z gruczołu mlekowego krów mogą być podzielone na dwie grupy — lipazo-dodatnie, pochodzące z ostrych form *mastitis* i lipazo-ujemne — z chronicznych *mastitis* i z wymion normalnych. Ten niski procent wyników dodatnich w odczynie egg-yolk uzyskany w badaniach własnych wskazuje w świetle dokumentacji terenowej, że szczepy te wyizolowano z chronicznych zapaleń gruczołu mlekowego krów.

W pracy Ozdzyńskiej i Kafla (15) przedstawiono wyniki badań nad korelacją pomiędzy wytwarzaniem koagulazy a lipazy u szczepów gronkowców pochodzących z produktów żywnościowych. Na podstawie uzyskanych wyników autorzy wnioskują, że odczyn na koagulazę może być zastąpiony odczytnem na lipazę. Badania własne nad szczepami gronkowców pochodzenia bydłowego nie potwierdziły przewidywanej korelacji między tymi dwoma odczynami.



Ryc. 2. Wrażliwość na antybiotyki gronkowców koagulazo-dodatnich wyizolowanych z mleka krów dotkniętych zapaleniem gruczołu mlekowego

Badania nad wrażliwością wyizolowanych szczepów gronkowców na antybiotyki wykazały, że są one *in vitro* najbardziej wrażliwe na chloramfenikol (95,4%) i erytromycynę (93,6%), w niższym procencie na penicylinę (85%), ampicylinę (84,1%) i metycylinę (55,6%). Jeszcze niższą wrażliwość ujawniły na streptomycynę (20,3%) i oxytetracylinę (20,3%). Najmniej szczepów było wrażliwych na neomycynę (13,5%).

## Wnioski

1. Wykazanie wytwarzania przez zdecydowaną większość badanych szczepów (73,7%) alfa-toksyny stanowi potwierdzenie ich potencjalnej chorobotwórczości.

2. Wytwarzanie beta-hemolizyny okazało się ściśle skorelowane z dodatnim testem na koagulazę („prawdziwą”) i „clumping-factor” (czynnik zlepiający), przy użyciu plazmy bydłej.

3. Stwierdzenie wytwarzania lipazy tylko u 14% badanych szczepów wskazuje, że przy ocenie patogenności gronkowców pochodzenia bydłego, odczyn na koagulazę nie może być zastąpiony odczynem na lipazę.

4. Niski procent gronkowców lipazo-dodatnich wydaje się wskazywać, że szczepy te wyizolowano z mleka krów dotkniętych zapaleniem gruczołu mlekowego o charakterze przewlekłym.

## Piśmiennictwo

- Burbianka M., Piłszka A.: Mikrobiologia żywności. PZWŁ, Warszawa, 1971.
- Carter Ch. H.: J. Bact. 79, 753, 1959.
- Aktualne poglądy na zwalczanie schorzeń wymienia (praca zbiorowa). PWRiL, Warszawa, 1966.
- Gedek W.: Die Staphylokokken-Mastitis bei Haustieren. Gustav Fischer Verlag, Jena, 1972.
- Gladstone G. P.: Post. Mikrobiol. 5, 145, 1966.
- Jeliaszewicz J., Cybulska J., Hawiger J., Zak C.: Ziarenkowce Gram-dodatnie, biologia, rozpoznawanie i różnicowanie. Wyd. Med. PZH, 1969.
- Kurek Cz., Stawicki W.: Medycyna Wet. 28, 462, 1972.
- Kurek Cz., Preis E.: Medycyna Wet. 28, 661, 1972.
- Lokem K. I., Hoyt H. H.: Am. J. vet. Res. 24, 534, 1962.
- Lundbeck H., Tirunaryanan M. O.: Acta path. microbiol. scand. 68, 123, 1966.
- Marandon J. L., Oeding P.: Acta path. microbiol. scand. 67, 149, 1966.
- Meyer W.: Zentbl. Bakt. ParasitKde I 201, 331, 1966.
- Meyer W.: Post. Mikrobiol. 5, 148, 1966.
- Meyer M.: V Colloquium über Fragen der Lysotypie. Wernigerode 1965.
- Ozdzyńska E., Kafel S.: Medycyna Wet. 24, 225, 1968.
- Piłszka A.: Gronkowcowe zatrucia pokarmowe. PZWŁ, Warszawa, 1973.

- Pulverer G.: Post. Mikrobiol., 5, 2, 1966.
- Samborski Z.: Medycyna Wet. 26, 449, 1969.
- Sandvik O.: Vet. Congr. Bergen 1970. s. 283.
- Schalm O., Woods G. M.: Am. J. vet. Res. 14, 530, 1953.
- Straś B.: Właściwości biologiczne szczepów gronkowców koagulazo-dodatnich, wyizolowanych z mleka krów z klinicznym lub podklinicznym zapaleniem gruczołu mlekowego. Praca dokt. Instytut Biologii Stosowanej ART, Olsztyn, 1975.
- Truszczyński M.: Bakteriologia weterynaryjna. PWRiL, Warszawa, 1969.
- Winifred B., Reid M. S., Wilson J. B.: Am. J. vet. Res. 20, 78, 1959.

Adres autora: dr Bożena Straś, ul. Gołęcińska 13/11, 60-626 Poznań.

Стрась Б. — Избранные биологические свойства штаммов коагулазо-положительных стафилококков, изолированных из молока коров, подверженных маститу.

В результате проведенных исследований 221 штамма коагулазо-положительных стафилококков было показано образование явным большинством штаммов (73,7%) альфа-токсина, что является подтверждением из потенциальной болезнетворности.

Образование бета-гемолизина оказалось тесно скоррелированным с положительным тестом на свободную коагулазу („настоящую”) и „clumping-factor” (склеивающий фактор) при применении плазмы скота. Кроме того был обнаружен низкий процент (14%) липазо-положительных штаммов, что указывает на то, что при оценке патогенности стафилококков, происходящих от скота, реакция на коагулазу не может быть замещена реакцией на липазу и что эти штаммы были изолированы из молока коров, подверженных хроническому маститу.

Straś B. — Some biological properties of coagulase positive strains of *Staph. aureus* isolated from cow milk derived from animals with mastitis.

Out of 221 strains of *S. aureus* which were coagulase positive 73.7 per cent produced alpha-toxin. The production of beta-toxin was related with the presence of free coagulase and clumping factor in case of cattle plasma. Besides, only 14 per cent of the strains was lipase positive. The data indicate that the reaction on coagulase cannot be replaced by test on lipase. The strains were isolated from animals suffered from chronic mastitis.

RIS D. R., HAMEL K. L.: Szczepionki dla bydła oparte o *Leptospira interrogans* serovar. pomona zawierające różne adjuwanty. (*Leptospira interrogans* serovar. pomona vaccines with different adjuvants in cattle). N. Z. vet. J. 27, 169—171, 1979 (8).

Badania przeprowadzono na 16 jałówkach w wieku 9 miesięcy w czterech grupach doświadczalnych liczących po 4 zwierzęta. Zwierzęta z trzech grup zaszczepiono dwukrotnie w odstępie 11 tygodni szczepionką A — przeciwko serotypowi pomona zawierającą 10% wodorotlenku glinu, szczepionkę podawano podskórnym; szczepionką B — 7 dniową hodowlę serotypu pomona zawierającą dodatek 10% wodorotlenku glinu, oraz szczepionką C — zabita hodowla serotypu pomona zawierającą kompletny adjuwant Freund'a, stosowaną dootrzewnowo w dawce 2,7 ml. Po 47 tygodniach po szczepieniu drugim wszystkie sztuki zakażono domięśniowo  $65 \times 10^8$  komórek zjadliwego szczepu *L. interrogans* serovar. pomona. Największe działanie immunogenne wywierała szczepionka C. Wszystkie szczepione zwierzęta, zarówno szczepionką A, B jak i C były odporne na zakażenie doświadczalne. Po zakażeniu leptospiry występowały w moczu jedynie sztuk niezaszczepionych w okresie 10—46 dnia po zakażeniu w ilości  $10^7$  komórek/ml.

G.

HORTON G. M. J., STOCKDALE P. H. G.: Wpływ amprolium i monezinu na wydalanie oocyst, wykorzystanie paszy i metabolizm żywca u jagniąt chorych na kokcydiozę. (Effects of amprolium and monezin on oocyst discharge, feed utilization, and ruminal metabolism of lambs with coccidiosis). Am. J. vet. Res. 40, 966—970, 1979 (2).

Wpływ stosowania amprolium (10 mg/kg paszy) oraz monezinu (11 mg/kg paszy) na wydalanie oocyst kokcydiów, pobieranie i wykorzystanie paszy oraz dzienne przyrosty wagowe przebadano na 56 dniowych jagniętach o średniej wadze 18 kg w trzech grupach (jedna grupa kontrolna, dwie grupy doświadczalne). W oparciu o założone przetoki do żywca oznaczono ponadto zawartość lotnych kwasów tłuszczowych i amoniaku. Wszystkie jagnięta były zarażone kokcydiami, przy czym średnia liczba oocyst wydalanych z kałem wynosiła  $206,9 \times 10^5$ . Monezin, zaś w mniejszym stopniu amprolium obniżały wydalanie oocyst *E. ninakohlyakimova* i *E. enhasta*. U leczonych jagniąt wyższe wartości osiągały przyrosty wagowe oraz wykorzystanie paszy było lepsze w porównaniu do grupy kontrolnej. Monezin i amprolium nie wywierały wpływu na poziom lotnych kwasów tłuszczowych i stężenie amoniaku w żywcu.

G.