

Winiarczyk S., Kostro K. — *Pityrosporium canis* in case of otitis externa in dogs

The purpose of the work was to determine on the basis of bacteriological and mycological examinations the kind of microorganisms, especially of yeasts, occurring in cases of otitis externa in 84 dogs tested.

The most often isolated microorganisms appeared to be yeasts classified as *Pityrosporium canis* (62%), staphylococci (56%), *Pseudomonas* sp. (11%), and streptococci (8%). *P. canis* was isolated in monocultures mainly from chronic cases.

MARCIN SZULC, ANNA PLISZKA, JANINA PĘCONEK

## Wpływ napromieniowania pałeczek *Salmonella* promieniami X na wytwarzanie enterotoksyny\*)

Katedra Higieny Żywności Pochodzenia Zwierzęcego, Wydziału Weterynaryjnego SGGW-AR, ul. Nowoursynowska 166, 02-975 Warszawa

Poglądy na mechanizm wywoływania przez pałeczki *Salmonella* zaburzeń jelitowych zmieniły się radykalnie w ostatnich latach. Do niedawna główną rolę w powstawaniu tych zaburzeń przypisywano endotoksynie, która miałaby się uwalniać podczas rozpadu komórek. Obecnie wiadomo, że bakterie te, podobnie jak niektóre inne pałeczki należące do rodziny *Enterobacteriaceae*, mogą wytwarzać enterotoksynę, uwalnianą z komórek do środowiska również w hodowlach *in vitro* (7, 8, 9, 10). Enterotoksynie przypisuje się obecnie główną rolę w wywoływaniu biegunek dziecięcych przez *E. coli* (14). Prace nad tą enterotoksyną prowadzone są również w Polsce (20, 23).

Szczegółowe badania dotyczące wytwarzania enterotoksyny przez pałeczki *Salmonella* rozpoczęto dopiero w latach siedemdziesiątych, chociaż pierwsze publikacje dotyczące tego zagadnienia datują się z roku 1961 (21). Pierwsze wyniki były kontrowersyjne (5, 6, 21), ale dalsze badania (8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 22, 24) wykazały niewątpliwie, że większość szczepów *Salmonella* wytwarza swoisty czynnik enterotoksyczny i że ta właściwość odgrywa ważną rolę w powstawaniu zaburzeń jelitowych (6, 9, 10, 11, 12).

Dotychczas nie uzyskano jeszcze enterotoksyny pałeczek *Salmonella* w postaci oczyszczonej, co pozwoliłoby na produkcję swoistej surowicy i zastosowanie metod serologicznych do wykrywania tej enterotoksyny. Prace te są w toku w różnych ośrodkach (11, 12, 16). Obecnie poszczególni autorzy stosują do wykrywania tej enterotoksyny różne testy biologiczne. Thapliyal i Singh (22), a także Sakazaki i wsp. (15) stosowali test na izolowanych pętłach jelitowych królika. Koupal i Deibel (9) używali próby na oseskach mysich. Sandefur i Peterson (16), a także Tschäpe i wsp. (10, 24) stosują test skórny na królikach, gdyż jak wykazały badania, enterotoksyna pałeczek *Salmonella* wykazuje — podobnie jak enterotoksyna LT *E. coli* i cholerygen *V. cholerae* — obok działania enterotoksycznego również

działanie dermatotoksyczne. Mechanizm w obu przypadkach jest taki sam; polega na aktywowaniu cykazy adenylowej i powstawaniu cyklicznego AMP, zwiększającego przepuszczalność błon komórkowych. W jelitach objawia się to zaburzeniami resorpcji wody i elektrolitów prowadzących do biegunki, w skórze powoduje zwiększenie przepuszczalności naczyń włosowatych i powstanie ograniczonych zmian rumieniowych (16). Ponadto różni autorzy przeprowadzali badania dotyczące działania enterotoksyny pałeczek *Salmonella* na różne komórki (4, 13, 16).

Celem pracy było poznanie zdolności wytwarzania toksyn przez szczepy *Salmonella*, które przetrwały działanie promieniowania jonizującego. W warunkach, gdy przy utrwalaniu środków spożywczych promieniami jonizującymi pewna część bakterii pozostawałaby żywa, co się obecnie zakłada, zagadnienie to wydaje się interesujące i istotne dla higieny żywności oraz dla ochrony zdrowia konsumentów. Jednocześnie, biorąc pod uwagę przedstawione wyżej informacje postanowiono przyjmując jako przedmiot pracy zdolność wytwarzania omawianej enterotoksyny przez badane szczepy *Salmonella*. Bliższe rozeznanie tego zjawiska, dotychczas jeszcze nie w pełni poznanego i nadal kontrowersyjnego było więc dodatkowym celem badań.

### Materiał i metody

Bakterie. Do badań użyto dwa szczepy *Salmonella*: *S. enteritidis* nr 410 i *S. typhimurium* nr 29. Oba te szczepy, wyizolowane od chorych z zatruciem pokarmowym, otrzymano z Wolskiego Szpitala Zakaźnego w Warszawie.

Napromieniowanie bakterii. Bakterie napromieniano promieniami X przy następujących parametrach pracy aparatu: napięcie lampy 200 kV, natężenie 10 mA, moc dawki 0,11 Gy/s (11 radów/s). Ustalono i przyjęte we wstępnych doświadczeniach wielkości dawek napromieniowania wynosiły 1, 100, 200 Gy. Przygotowując bakterie do napromieniowania rozcieńczano 24-godziną hodowlą badanego szczepu w stosunku 1:4 roztworem fizjologicznym (PBS) i wlewano po 1,2 cm<sup>3</sup> do specjalnych próbek. Zawiesiny, oprócz próbek kontrolnej poddawano napromienianiu wyżej wymienionymi dawkami.

Określenie radiowrażliwości bakterii. Bezpośrednio po napromieniowaniu sprawdzano przeżywalność ba-

\*) Praca wykonana w ramach problemu resortowego MNSzWiT w latach 1979—1980.

kterii. W tym celu wykonywano rozcieńczenia w takim stopniu, aby przy posiewach na podłoże stałe (agar odżywczy) otrzymać wzrost 30—300 kolonii na płytce. Na powierzchnię jednej płytki wysiewano 0,1 cm<sup>3</sup>. Każde rozcieńczenie wysiewano na trzy równoległe płytki.

Przygotowanie toksyn. Po napromieniowaniu przenoszono z każdej próbki (także i z kontrolnej) po 0,5 cm<sup>3</sup> do 4,5 cm<sup>3</sup> podłoża BHI Difco (wyciąg mózgowo-sercowy) i hodowano w temp. 37°C przez 16 godzin na wstrząsarce typ 327, przy następujących warunkach pracy aparatu: częstotliwość drgań 2—3 obr/s, wielkość amplitudy 4 mm. Następnie hodowle odwirowywano na wirówce szybkoobrotowej Janetki typ T-24 przy 17.500 g i sączono przez sączki membranowe (miliporefilter) o średnicy porów 0,45 μm. Jalo-wość przesączu sprawdzano przez posiew na płytce z agarem odżywcym. Przesącze do czasu wprowadzenia królikom przetrzymywano w lodówce w temp. około 4°C.

Oznaczenie enterotoksyny. Dla oceny właściwości enterotoksycznych badanych pałeczek *Salmonella* przyjęto test skórny, opracowany przez Tschäpe i wsp. (24) i zastosowany przez tych samych autorów do badania enterotoksyczności szczepów *Salmonella* (10), gdyż obok stosunkowo łatwego wykonania test ten daje możliwość ilościowej oceny toksyny zawartej w supernatantach z hodowli badanych pałeczek *Salmonella*. Do metody tej wprowadzono jednak pewne modyfikacje. Oprócz reakcji opóźnionej oznaczano również reakcję szybką, opierając się na pracy Sandefur i Peterson (16). Autorzy ci stwierdzili, że badany przez nich szczep *S. typhimurium* wytwarzał dwa odmienne czynniki dermatotoksyczne: jeden „szybki”, powodujący szybkie powstawanie krótkotrwałych zmian rumieniowych w skórze i drugi „powolny”, powodujący reakcję opóźnioną, ale bardziej intensywną, połączoną z naciekami i trwającą znacznie dłużej. Autorem udało się przez przepuszczenie przez kolumnę Sephadex G-100 rozdzielić te dwa czynniki. Na podstawie analizy epidemiologicznej przypadków salmoneloz są oni skłonni przypisywać działanie enterotoksyczne raczej czynnikowi „powolnemu”.

Toksyczność filtratów określano na młodych królikach o masie 2,5—3,5 kg, albinosach, rasy białej nowozelandzkiej. Wykonanie odczynu poprzedzało dokładne wygołenie skóry na grzbiecie. Test na czynnik szybki wykonywano po lewej stronie grzbietu, test na czynnik powolny — po prawej stronie grzbietu. W obu testach wprowadzano śródskórnie po 0,1 cm<sup>3</sup> supernatantu. Następnie po 1 godzinie (dla oznaczenia czynnika szybkiego) lub po 18 godzinach (dla oznaczenia czynnika powolnego) wprowadzano królikowi dożylnie błękit Evansa (Evans blue) w ilości 400 mg/kg masy ciała. Błękit ten podawano w celu zwiększenia widoczności reakcji. Po 4 godzinach od wprowadzenia błękitu Evansa króliki uśmiercano, zdejmowano skórę i po jej stronie wewnętrznej odczytywano reakcję wyrażającą się strefą zniebieszczenia wokół wprowadzonego supernatantu. Przy ocenie uwzględniano również zgrubienie skóry. W celu wykluczenia odczynu nieswoistego wykonywano iniekcje kontrolne podłoża BHI lub szczepu *Escherichia coli* K-12, nie wytwarzającego enterotoksyny. Szczep ten otrzymano z Zakładu Bakteriologii Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie. Z każdym szczepem *Salmonella* przeprowadzono 5 oddzielnych doświadczeń.

### Wyniki i omówienie

Dawka promieniowania X wielkości 1 Gy nie miała wpływu na przeżywalność badanych szczepów *Salmonella*, ani nie wykazywała działania stymulującego. Otrzymane średnie różnice liczebności populacji mieściły się w granicach błędów metody (tab. 1 i 2). Dawka 100 Gy powodowała już znaczne obumieranie bakterii,

średnio o ok. 1 rząd wielkości, (dawka D<sub>10</sub>) chociaż w poszczególnych doświadczeniach zaobserwowano znaczne wahania w ilości komórek przeżywających napromieniowanie. Dawka 200 Gy zmniejszyła liczbę badanych bakterii o niecałe 3 rzędy wielkości, tj. 2—3 D<sub>10</sub> (tab. 1 i 2).

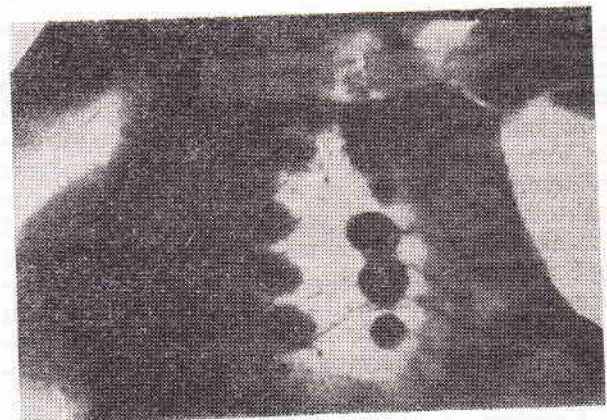
Żadna z zastosowanych dawek nie miała wpływu na późniejsze wytwarzanie enterotoksyny przez badane szczepy *Salmonella*. Wpraw-

Tab. 1. Radiowrażliwość szczepu *Salmonella enteritidis* nr 410 (% przeżywalności)

Doświadczenie	Kontrola (bakterie nie naprom.)	Bakterie napromieniowane dawkami		
		1 Gy	100 Gy	200 Gy
I	100	103,14	4,15	0,12
II	100	96,69	6,04	0,06
III	100	101,37	35,93	0,57
IV	100	98,74	19,35	0,18
V	100	84,49	25,13	0,22
Srednio	100	96,88	18,12	0,20

Tab. 2. Radiowrażliwość szczepu *Salmonella typhimurium* nr 29 (% przeżywalności)

Doświadczenie	Kontrola (bakterie nie naprom.)	Bakterie napromieniowane dawkami		
		1 Gy	100 Gy	200 Gy
I	100	100,73	2,33	0,36
II	100	106,02	2,54	0,30
III	100	116,00	7,75	0,62
IV	100	100,00	5,41	0,40
V	100	105,00	4,00	0,42
Srednio	100	105,68	4,40	0,42



Ryc. 1. Tekst dermatotoksyczny na króliku. Kolejność wprowadzanych przesączy: Strona prawa — czynnik szybki; pierwszy od góry — próbka nie napromieniowana, drugi od góry — próbka napromieniowana 1 Gy, trzeci od góry — kontrola przy użyciu nieenterotoksycznego szczepu *Escherichia coli* K-12, czwarty od góry — próbka napromieniowana 50 Gy, piąty od góry — próbka napromieniowana 100 Gy, szósty od góry — próbka napromieniowana 200 Gy. Strona lewa — czynnik powolny. Kolejność wprowadzania analogiczna jak po stronie prawej.

Tab. 3. Wpływ napromieniowania *Salmonella enteritidis* nr 410 na wytwarzanie enterotoksyny (strefa zniebieszczenia w mm)

Doświad- czenie	Czynnik szybki				Czynnik powolny			
	Kontrola	Bakterie napromieniowane dawkami			Kontrola	Bakterie napromieniowane dawkami		
		1 Gy	100 Gy	200 Gy		1 Gy	100 Gy	200 Gy
I	16	20	16	10	15	18	15	15
II	18	18	18	18	17	17	18	19
III	17	20	18	16	15	15	15	15
IV	16	17	18	19	16	17	18	19
V	17	17	15	16	17	17	15	16
Średnio	16,8	18,4	17,0	15,8	16,0	16,8	16,2	16,8

Tab. 4. Wpływ napromieniowania *Salmonella typhimurium* nr 29 na wytwarzanie enterotoksyny (strefa zniebieszczenia w mm)

Doświad- czenie	Czynnik szybki				Czynnik powolny			
	Kontrola	Bakterie napromieniowane dawkami			Kontrola	Bakterie napromieniowane dawkami		
		1 Gy	100 Gy	200 Gy		1 Gy	100 Gy	200 Gy
I	20	20	20	20	13	13	13	13
II	18	18	18	18	13	13	13	13
III	20	20	20	20	20	20	20	20
IV	23	23	23	23	18	20	18	18
V	20	20	20	20	16	16	20	16
Średnio	20,2	20,2	20,2	20,2	16	16,4	16,8	16

dzie w pierwszym doświadczeniu przeprowadzonym z *S. enteritidis* nr 410 zaobserwowano dość wyraźne zahamowanie wytwarzania szybkiego czynnika dermatotoksycznego (ryc. 1) po dawce promieniowania 200 Gy, lecz wynik ten nie potwierdził się w następnych doświadczeniach. W żadnym przypadku nie stwierdzono wpływu na wytwarzanie czynnika powolnego, identyfikowanego przez Sandefur i Peterson z enterotoksyną.

Problem zakażeń pałeczkami *Salmonella* nabiera w ostatnich latach coraz większego znaczenia wobec rozszerzenia się nosicielstwa tych pałeczek u zwierząt i wzrostu liczby przypadków salmoneloz u ludzi (1). W tej sytuacji duże znaczenie mają badania dotyczące wpływu różnych czynników na chorobotwórczość tych bakterii. Zgodnie z wynikami pracy Epps i Idziak (3) jednym z takich czynników może być napromieniowanie. Autorzy ci w doświadczeniach przeprowadzonych na kurczętach stwierdzili obniżenie chorobotwórczych właściwości pałeczki *Salmonella*, które przeżyły napromieniowanie.

Uzyskane wyniki wskazują na brak wpływu promieniowania jonizującego na zdolność wytwarzania enterotoksyny (dermotoksyny) przez szczepy *Salmonella*, które przeżyły napromieniowanie.

Podobnie negatywny wynik otrzymał Bernhardt (2), który badał wpływ napromieniowania na późniejsze wytwarzanie enterotoksyny przez enterotoksyczny szczep *Clostridium perfringens*. Również negatywne wyniki otrzyma-

no przy badaniu wpływu napromieniowania na wytwarzanie enterotoksyn przez *Staphylococcus aureus* (19).

### Wnioski

1. Badane szczepy *S. enteritidis* i *S. typhimurium*, cechowała podobna radiowrażliwość na promieniowanie X; dawka promieniowania 100 Gy zmniejszała liczbę bakterii o ok. 1 rząd wielkości (ok.  $D_{10}$ ), a dawka 200 Gy o niepełne 3 rzędy (2—3  $D_{10}$ ).
2. Napromieniowanie szczepów *S. enteritidis* i *S. typhimurium* dawkami 1 Gy, 100 Gy i 200 Gy promieniowania X nie wywierało wpływu na wytwarzanie enterotoksyny (czynnika dermatotoksycznego) przez populacje namnożone z bakterii, które przetrwały zabieg napromieniowania.

### Piśmiennictwo

1. Anusz Z.: Przeg. epid. 31, 55, 1977.
2. Barnhardt H. M. Jr.: Praca dokt. 1976, s. 105.
3. Epps N. A., Idziak E. S.: Appl. Microbiol. 19, 338, 1970.
4. Fumarola D., Miroglotta G., Palma R., Ponaro A.: Ciorn. Batt. Virol. Immunol. 70, 28, 1977.
5. Gianella R. A., Formal S. B., Dammin G. J., Collins H.: J. clin. Invest. 52, 441, 1973.
6. Gianella R. A., Gots R. E., Charney A. N., Greenough W. B., Formal S. B.: Gastroenterology 69, 1238, 1975.
7. Hościacka A., Ciznar J., Karolček J.: Čsílka Epidem. Mikrobiol. Immunol. 27, 296, 1978.
8. Houston C. W., Koo F. C., Peterson J. W.: Infect. Immun. 32, 916, 1981.
9. Koupal L. R., Deibel R. H.: Infect. Immun. 11, 14, 1975.
10. Kühn H., Tschäpe H., Rische H.: Zentbl. Bakt. Parasit. Kde I. 240, 171, 1978.
11. Peterson J. W.: Pharm. Ther. 11, 719, 1980.
12. Peterson J. W., Houston C. W., Koo F. C. W.: Infect. Immun. 32, 232, 1981.
13. Richter B., Tschäpe H., Kühn H.: Dtsch. Gesundheitswes. 33, 1094, 1978.
14. Sack R. B.: A. Rev. Microbiol. 29, 333, 1975.

15. Sakazaki R., Tamura K., Nakamura A.: Jap. J. Sci. Biol. 27, 45, 1979.
16. Sandefur P. D., Peterson J. W.: Infect. Immun. 15, 988, 1977.
17. Sedlock D. M., Deibel R. H.: Can. J. Microbiol. 24, 268, 1978.
18. Sedlock D. M., Koupal L. R., Deibel R. H.: Infect. Immun. 20, 375, 1978.
19. Szulc M., Pliszka A., Peconek J.: Medycyna Wet. 36, 543, 1980.
20. Szykiewicz Z., Binek M., Niemiński M., Klimuszko D.: Mat. XIX Zjazdu Pol. Tow. Mikrobiologów, Szczecin, 3-6 września, 178, 95, 1979.
21. Taylor J., Wilkins M. P.: Indian J. Med. Res. 49, 549, 1961.
22. Thapliyal D. C., Singh J. P.: Indian J. exp. Biol. 16, 386, 1978.
23. Truchanowicz-Jarmolowicz Z., Stypulkowska-Misturewicz H., Noworyta J., Bielecka Z.: Ped. pol. 53, 723, 1978.
24. Tschäpe H., Kühn H., Rische H.: Dtsch. Gesundheitswes. 32, 2283, 1977.

Adres autora: prof. dr hab. Marcin Szulc, ul. Bielańska 3 m. 25, 00-086 Warszawa.

Шульц М., Плишка А., Пенцонек Я. — Влияние облучения палочек *Salmonella* лучами X на образование энтеротоксина

Исследовали влияние облучения палочек *Salmonella*: *S. enteritidis* и *S. typhimurium* на образование энтеротоксина. Для оценки энтеротоксических свойств приняли кожный тест, разработанный Чепе и сотр. Кроме замедленной реакции определяли

также скорую реакцию, опираясь на работу Сандефур и Петерсон. Оба исследуемых штамма *Salmonella* отличались подобной радиочувствительностью к лучам X. Доза облучения 100 Gy уменьшила число бактерий на ок. 1 порядок величин (ок.  $D_{10}$ ), а доза 200 Gy — на неполных 3 порядка (2—3  $D_{10}$ ). Облучение штаммов дозами 1 Gy, 100 Gy и 200 Gy облучения X не влияло на образование энтеротоксина (дермотоксического фактора) через популяции, размноженные из бактерий, выдержавших облучение.

Szulc M., Pliszka A., Peconek J. — Production of enterotoxin by *Salmonella* exposed to X rays

The influence of irradiation on enterotoxin production by *Salmonella enteritidis* and *S. typhimurium* was evaluated using skin test elaborated by Tschäpe and others. Apart from delayed reaction there was determined also quick reaction taking into consideration Sandefur and Peterson's findings. The strains examined appeared to be sensitive of the same degree to X rays. A dose of 100 Gy decreased the number of bacterial cells at approx. 10  $D_{10}$  and 200 at 2—3  $D_{10}$ . Irradiation with 100 and 200 Gy of X rays did not influence enterotoxin production by the population of microorganisms which were resistant to the process of irradiation.

MAŁGORZATA SZCZAWIŃSKA, JACEK SZCZAWIŃSKI, MARCIN SZULC

## Wpływ napromieniowania na przeżywalność pałeczek *Salmonella* w chłodzonym mięsie<sup>\*)</sup>

Katedra Higieny Żywności Pochodzenia Zwierzęcego, Wydziału Weterynaryjnego SGGW-AR w Warszawie, ul. Nowoursynowska 166, 02-975 Warszawa

Salmonelloza uważana jest w chwili obecnej za jedną z najważniejszych zoonoz, przy której głównym źródłem zakażenia człowieka jest żywność pochodzenia zwierzęcego (8). Najczęstszym źródłem zbiorowych zakażeń i zatruc pokarmowych w Polsce, w latach 1971—1977, było mięso i jego przetwory (1). Pomimo znacznego postępu dokonanego w świecie w ostatnich latach w zakresie leczenia zwierząt oraz higieny i technologii żywności, problem salmoneli pozostaje ciągle aktualny, czego wymownym świadectwem są publikowane w Polsce i innych krajach dane statystyczne dotyczące salmoneloz ludzi i zwierząt (2—6, 11, 12, 18).

Jedną z głównych przeszkód w walce z salmonelami jest ich nosicielstwo u zwierząt rzeźnych (13, 14). Przy braku objawów klinicznych oraz zmian anatomopatologicznych typowych dla salmoneloz, służba weterynaryjna praktycznie nie jest w stanie zapobiec dopuszczeniu do obrotu surowców pochodzenia zwierzęcego zawierających nieznaczne ilości pałeczek *Salmonella*, co wielokrotnie potwierdzają wyniki badań bakteriologicznych (9, 12, 13). Zdaniem wielu autorów skutecznym rozwiązaniem tego problemu byłoby poddawanie mięsa działaniu małych dawek promieniowania w krótkim czasie po uboju zwierząt (10, 15).

\*) Praca wykonana w ramach programu rządowego PR-4.

Celem badań było określenie:

1. radioodporności w mięsie serotypu *Salmonella*, który najczęściej powoduje zachorowania ludzi w Polsce,
2. radioodporności w mięsie wołowym, wieprzowym i drobiowym serotypów salmoneli najbardziej typowych dla tych rodzajów mięsa w naszym kraju,
3. przeżywalności badanych serotypów salmoneli, napromieniowanych w mięsie, przy przechowywaniu napromieniowanego mięsa w temp. 0—2°C oraz 8—10°C.
4. orientacyjne określenie wpływu napromieniowania na cechy organoleptyczne oraz trwałość różnych rodzajów mięsa.

### Material i metody

Do badań użyto szczepy: *S. typhimurium* 77, *S. typhimurium* 266/78, *S. dublin* 220/67 — otrzymane z Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie, *S. choleraesuis* 17/80, *S. gallinarum* (pullorum) 11 — uzyskane z Instytutu Weterynarii w Puławach. Inokulum przygotowywano z 24-godzinnych hodowli bulionowych o gęstości takiej, aby po zmieszaniu z mielonym mięsem uzyskać ok.  $10^8$ — $10^7$  bakterii w 1 g.

Badania wykonano na 3 następujących rodzajach mięsa: wołowym, pochodzącym z rostbefu, wieprzowym, pochodzącym ze schabu oraz drobiowym, brojlerów, pochodzącym z mięśni piersi i ud brojlerów. Po dokładnym wymieszananiu, skażone mięso dzielono na 4 części (po 50 g), z których jedna stanowiła