

PELAGIA SKWAREK, CEZARIUSZ ŻÓRAWSKI

Wpływ metod homogenizacji materiału i doboru podłoża na wyniki izolowania prątków kwasoopornych

Pracownia Immunologii Gruźlicy Instytutu Weterynarii, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

W rozpoznawaniu chorób zwierząt wywołanych przez prątki kwasooporne, badanie mikrobiologiczne jest niezbędnym uzupełnieniem badania alergicznego. Pozwala ono potwierdzić lub wykluczyć podejrzenie zakażenia swoistego, a także często ustalić przyczynę nieswoistego reagowania zwierząt na tuberkulinę.

Izolowanie i określenie czynnika wywołującego stan alergii tuberkulinowej ułatwia w znacznym stopniu podjęcie właściwego postępowania epizootiologicznego. Hodowla prątków z materiału pobranego od zwierząt, a szczególnie ze środowiska (pasza, ściółka, woda) następuje jednak często trudnościami. Dodatni wynik próby hodowlanej jest uzależniony bowiem od szeregu czynników, a mianowicie od ilości prątków w badanym materiale, od stopnia zanieczyszczenia próbek florą towarzyszącą, od wrażliwości prątków na środki chemiczne stosowane do homogenizacji materiału i wreszcie od doboru odpowiednich podłoża bakteriologicznych. W izolowaniu prątków kwasoopornych szczególne znaczenie ma homogenizacja, która winna zniszczyć florę towarzyszącą znajdującą się w obrabianej próbce, a nie uszkadzać prątków. Wybór odpowiedniego środka chemicznego oraz czasu jego działania na przygotowywany do posiewu materiał ma istotne znaczenie. Po zastosowaniu bowiem zbyt łagodnego środka do homogenizacji może nastąpić przerost, a nawet gnicie podłoża, które uniemożliwia uzyskanie jakiegokolwiek wyniku. Silnie działający preparat może natomiast uszkodzić prątki kwasooporne, w efekcie czego uzyskamy fałszywie ujemny wynik próby hodowlanej.

Ważnym elementem w procesie izolowania prątków kwasoopornych są podłoża bakteriologiczne. Jak wiadomo wymagania hodowli poszczególnych typów prątków gruźlicy, a także prątków atypowych (pomijając już *Myc. johnei*) są różne.

W dostępnym piśmiennictwie spotyka się wprawdzie prace dotyczące uszkadzającego działania związków chemicznych używanych do homogenizacji na żywotność prątków kwasoopornych w czystych hodowlach (1, 3, 4, 5, 6, 7), nieliczne natomiast dotyczą wpływu tych związków na prątki znajdujące się w materiale tkankowym pochodzącym od zwierząt poddawanych opracowywaniu.

Celem niniejszej pracy była ocena najczęściej stosowanych metod homogenizacji (szczawianowa, ługowa, fosforanowa) oraz przydat-

ności różnych podłoża (Petraganiego, Stonebrinka, Lowensteina-Jensena) do izolowania prątków kwasoopornych z materiałów pobieranych od zwierząt, głównie węzłów chłonnych.

Materiał i metody

Materiał stanowiły chorobowo zmienione węzły chłonne świń i bydła pobierane od zwierząt poddawanych ubojowi w zakładach mięsnych oraz narządy wewnętrzne świnek morskich, królików i kur zakażonych sztucznie prątkami gruźlicy różnych typów. Każdy materiał dzielono na 3 części i opracowywano trzema metodami: 5% roztworem kwasu szczawowego ($H_2C_2O_4$), 4% roztworem ługu sodowego (NaOH) oraz 23% roztworem fosforanu sodu (Na_3PO_4). Materiał homogenizowany kwasem szczawowym i ługiem sodowym wstawiano do cieplarki na 30 minut, zaś z trójsodowym fosforanem pozostawiano w temperaturze pokojowej na 24 godz. co pewien czas energicznie wstrząsając. Dalej postępowano z homogenatami według ogólnie przyjętych zasad (8). Tak opracowany materiał wysiewano na podłoża Petraganiego i Stonebrinka lub dodatkowo na Lowensteina-Jensena. Po upływie 2—4 tygodni odczytywano posiewy, określając wzrost prątków w sposób następujący: — brak wzrostu; + wzrost 1—10 kolonii; ++ wzrost 10—50 kolonii; +++ wzrost ponad 50 kolonii i ++++ wzrost zlewny, liczba kolonii niepoliczalna. Wyzolowane szczepy prątków identyfikowano za pomocą prób hodowlanych i biochemicznych wg przyjętych zasad (8).

Wyniki i omówienie

Wyniki badań hodowlanych materiałów pochodzących od zwierząt, po opracowaniu ich trzema różnymi metodami, zestawiono w tab. 1.

Jak wynika z danych zawartych w tej tabeli, spośród 220 zbadanych materiałów stanowiących węzły chłonne świń, wyizolowano 161 szczepów prątków kwasoopornych, co stanowi 73,2% pozytywnych wyników. Z tej liczby 155 (96,3%) hodowli uzyskano z próbek, które opracowywano 5% kwasem szczawowym, 130 (80,7%) gdy działano na nie 23% Na_3PO_4 , natomiast najmniej, bo 114 (70,8%) szczepów wyrosło po homogenizacji 4% NaOH.

Spśród 37 zbadanych materiałów pochodzących od bydła, wyizolowano 37 (100%) szczepów prątków kwasoopornych. Wszystkie te szczepy uzyskano po homogenizacji 5% kwasem szczawowym, 35 (91,9%) po opracowaniu materiału fosforanem trójsodowym i podobnie jak w poprzedniej grupie najmniej, bo tylko 32 (86,4%) szczepy wyrosły po działaniu na badany materiał ługiem sodowym. Natomiast ze wszystkich 21 materiałów pochodzących z narządów wewnętrznych zwierząt laboratoryj-

Tab. 1. Liczba i odsetek szczepów prątków kwasoopornych wyizolowanych z materiałów tkankowych po zastosowaniu różnych metod do ich homogenizacji

Materiał	Liczba zbadanych materiałów	Liczba wyizolowanych szczepów	Liczba wyizolowanych szczepów po opracowaniu:		
			5% kwasem szczawiowym	4% NaOH	23% Na ₃ PO ₄
Węzły chłonne świń	220	161	155 (96,3%)	114 (70,8%)	130 (80,7%)
Węzły chłonne bydła	37	37	37 (100%)	32 (86,4%)	35 (91,9%)
Narządy wewnętrzne zwierząt laboratoryjnych	21	21	21 (100%)	21 (100%)	20 (95,2%)

Tab. 2. Liczba i odsetek szczepów prątków kwasoopornych wyrosłych na podłożach Petragnaniego (P) i Stonebrinka (S) po opracowaniu materiału porównywanymi metodami

Gatunek	Liczba wyizolowanych szczepów ogółem	Liczba szczepów wyizolowanych po opracowaniu materiału:								
		5% kwasem szczawiowym			4% ługiem sodowym			23% trójfosforanem sodu		
		ogółem	P	S	ogółem	P	S	ogółem	P	S
<i>Myc. bovis</i>	46	46	46 (100%)	45 (97,8%)	41	40 (97,6%)	41 (100%)	43	42 (97,7%)	41 (95,3%)
<i>Myc. tuberculosis</i>	9	9	9 (100%)	7 (77,7%)	9	9 (100%)	3 (33,3%)	9	8 (88,9%)	6 (66,7%)
<i>Myc. avium</i>	140	136	129 (94,8%)	120 (88,2%)	100	92 (92%)	66 (66%)	112	108 (96,4%)	80 (71,4%)
Prątki atypowe	24	22	22 (100%)	18 (81,8%)	17	15 (88,2%)	9 (52,9%)	21	20 (95,2%)	14 (66,7%)

Tab. 3. Liczba i odsetek szczepów prątków kwasoopornych wyrosłych na podłożach Petragnaniego (P), Stonebrinka (S) i Lowensteina-Jensena (L-J) po opracowaniu materiału trzema metodami

Gatunek	Liczba wyizolowanych szczepów ogółem	Liczba szczepów wyizolowanych po opracowaniu materiału											
		5% kwasem szczawiowym			4% ługiem sodowym			23% trójfosforanem sodu					
		ogółem	P	S	L-J	ogółem	P	S	L-J	ogółem	P	S	L-J
<i>Myc. bovis</i>	32	32	32 (100%)	31 (96,9%)	22 (68,7%)	27	27 (100%)	26 (96,3%)	14 (51,9%)	28	27 (96,4%)	26 (92,9%)	16 (57,1%)
<i>Myc. tuberculosis</i>	9	9	9 (100%)	7 (77,8%)	9 (100%)	9	9 (100%)	3 (33,3%)	8 (88,9%)	9	8 (88,9%)	6 (66,7%)	9 (100%)
<i>Myc. avium</i>	36	36	30 (83,3%)	33 (91,7%)	26 (72,2%)	27	22 (81,5%)	18 (66,6%)	17 (62,9%)	29	25 (86,2%)	26 (89,7%)	20 (68,9%)
Prątki atypowe	4	3	3 (100%)	3 (100%)	2 (66,6%)	4	3 (75%)	3 (75%)	1 (25%)	4	3 (75%)	3 (75%)	2 (50%)

Tab. 4. Prątki kwasooporne wyizolowane z badanych materiałów

Materiał	Liczba wyizolowanych szczepów				
	ogółem	<i>Myc. bovis</i>	<i>Myc. tuberculosis</i>	<i>Myc. avium</i>	prątki atypowe
Węzły chłonne świń	161	-	1 (0,6%)	136 (84,4%)	24 (14,9%)
Węzły chłonne bydła	37	37 (100%)	-	-	-
Narządy wewnętrzne zwierząt laboratoryjnych	21	9 (42,8%)	8 (38,1%)	4 (19,0%)	-

nych sztucznie zakażonych prątkami bydłęcymi, ludzkimi i ptasimi, opracowanych kwasem szczawiowym i ługiem sodowym, wyhodowano prątki kwasooporne, a tylko z jednego materiału homogenizowanego 23% Na₃PO₄ nie uzyskano wzrostu prątków. Z porównania stopnia intensywności wzrostu hodowli prątków na użytych podłożach wynika, że obfitszy wzrost uzyskuje się z materiałów poddawanych działaniu 5% kwasu szczawiowego, niż po homogenizacji pozostałymi dwoma związkami chemicznymi.

Na podstawie przeprowadzonych badań można stwierdzić, że wszystkie trzy związki chemiczne użyte do homogenizacji materiału tkankowego, pochodzącego od zwierząt, wywierają pewien niekorzystny wpływ na żywotność prątków znajdujących się w tych materiałach.

Jednakże najwięcej dodatnich i najobficiej wyrosłych hodowli otrzymuje się z materiałów po opracowaniu prób kwasem szczawiowym.

Podobne wyniki uzyskali Kostrzeński i wsp. (2) opracowując chorobowo zmienione węzły krezkowe świń 4% ługiem sodowym i 5% kwasem szczawiowym. Autorzy ci uzyskali około 30% więcej dodatnich hodowli i mniej kontaminacji po opracowaniu materiału kwasem szczawiowym, niż po działaniu ługiem sodowym.

Wyniki badań porównawczych nad przydatnością różnych podłoży do izolowania prątków z materiału tkankowego zestawiono w tab. 2. Tabela przedstawia liczbę uzyskanych hodowli poszczególnych typów prątków gruźlicy i prątków atypowych na podłożu Petragnaniego i Stonebrinka w zależności od użytej metody homogenizacji. Największą liczbę pozytywnych

hodowli na obu podłożach uzyskano po zastosowaniu do opracowania materiału 5% kwasu szczawiowego. Na podłożu Petragnaniego wyrosły wszystkie szczepy prątków typu bydłęcego, ludzkiego oraz prątki atypowe. Tylko hodowli prątków ptasich uzyskano nieco mniej. Spośród 136 szczepów *Myc. avium* wyizolowanych z węzłów chłonnych świń, na podłożu Petragnaniego wyrosło 129 (94,8%). Natomiast na podłożu Stonebrinka odsetek uzyskanych hodowli wahał się od 77,7% (*Myc. tuberculosis*) do 97,8% (*Myc. bovis*).

Bardziej zróżnicowane wyniki uzyskano po homogenizacji materiału ługiem sodowym. I tak prątki typu ludzkiego wyrosły na podłożu Petragnaniego w 100%, natomiast na pożywce Stonebrinka tylko w 33,3%. Także mniejszy odsetek hodowli na podłożu Stonebrinka uzyskano w przypadku izolowania innych typów prątka. Podobne wyniki otrzymano po opracowaniu materiału fosforanem trójsodowym. Należy jednak zwrócić uwagę, że niezależnie od metody użytej do homogenizacji materiału, jak i typu izolowanych prątków, zawsze większą liczbę hodowli uzyskiwano na podłożu Petragnaniego niż Stonebrinka. Na podkreślenie zasługuje także to, że największą zgodność pozytywnych hodowli na obu podłożach, bez względu na użyty do opracowania materiału związek chemiczny, stwierdzono przy izolowaniu prątków typu bydłęcego.

Część materiałów opracowywanych porównywanymi metodami posiewano dodatkowo na podłoże Lowensteina-Jensena. Jak wynika z tab. 3, spośród trzech porównywanych podłoży, na pożywce Lowensteina-Jensena bez względu na rodzaj badanego materiału, jak i metody jego homogenizacji, uzyskiwano najmniejszy odsetek hodowli prątków bydłęcych, ptasich i atypowych. Odsetek ten wahał się od 72,2% do 25%. Natomiast podłoże to okazało się bardziej przydatne do izolowania szczepów prątków typu ludzkiego. Szczepy te wyrastały w takiej samej liczbie na pożywce Lowensteina—Jensena, jak i na podłożu Petragnaniego, które jest, co potwierdzają także dane przedstawione w omawianej tabeli, najbardziej przydatne do izolowania prątków kwasoopornych z próbek pobranych od zwierząt.

W tabeli 4 zestawiono typy i gatunki prątków kwasoopornych wyizolowanych z badanych materiałów. Spośród 161 szczepów uzyskanych z węzłów chłonnych świń 136 (84,4%) określono jako prątki ptasie i jeden jako *Myc. tuberculosis*. Prątki atypowe reprezentowały 24 (14,9%) szczepy; w tym 8 — *Myc. terrae*, 10 — *Myc. fortuitum* i 6 — *Myc. vaccae*. Wszystkie hodowle uzyskane z materiału pochodzącego od bydła zidentyfikowano jako *Myc. bovis*. Natomiast wśród szczepów izolowanych z narządów wewnętrznych zwierząt laboratoryjnych 9 reprezentowało *Myc. bovis*, 8 — *Myc. tuberculosis* i 4 — *Myc. avium*.

Wnioski

1. Spośród trzech porównywanych metod przygotowywania materiałów tkankowych pochodzących od zwierząt do posiewu, homogenizacja 5% kwasem szczawiowym wywiera najmniejszy wpływ ujemny na żywotność prątków kwasoopornych. Stosując tę metodę uzyskuje się największy odsetek pozytywnych prób hodowlanych.

2. Podłoże Petragnaniego jest najbardziej przydatne do izolowania wszystkich trzech głównych typów prątka gruźlicy oraz prątków atypowych z materiałów zwierzęcego pochodzenia. Dodatkowe użycie pożywki Stonebrinka zwiększa liczbę izolowanych szczepów, szczególnie *Myc. bovis*.

Piśmiennictwo

1. Błitek-Golec D., Antosiewicz-Roszkowska A., Zdunczyk-Pawelek H.: *Gruźlica* 43, 441, 1975.
2. Kostrzeński W., Paklerska-Pobratyn H.: *Gruźlica* 39, 987, 1971.
3. Kostrzeński W., Paklerska-Pobratyn H.: *Gruźlica* 42, 17, 1974.
4. Kostrzeński W., Paklerska-Pobratyn H.: *Gruźlica* 42, 21, 1974.
5. Pelczarska B., Janowiec M.: *Gruźlica*, 49, 637, 1972.
6. Pelczarska B., Janowiec M.: *Gruźlica* 41, 489, 1973.
7. Szymaczek-Meyer L.: *Gruźlica* 36, 1104, 1968.
8. Zórawski C., Skwarek P.: Metody i testy stosowane do izolowania i identyfikacji prątków kwasoopornych. Inst. Wet. 1980.

* Adres autora: dr Pelagia Skawrek, ul. Krańcowa 21 m. 8, 24-100 Puławy

Скварек П., Журавский Ц. — Влияние методов гомогенизации материалов и подбора сред на результаты изолирования кислотоустойчивых палочек

Происследовали вместе 278 тканевых материалов, которые обрабатывали 5% щавелевой кислотой, 4% NaOH и 23% Na₃PO₄. Изолировали 219 штаммов палочек, в том 46 *Myc. bovis*, 9 *Myc. tuberculosis*, 140 *Myc. avium* и 24 штаммы атипических палочек. Констатировали, что среди трёх сравниваемых методов гомогенизация 5% щавелевой кислоты имеет менее всех отрицательное влияние на жизнеспособность кислотоустойчивых палочек. Применяя этот метод, получают самый высокий процент положительных культивированных проб. Среда Петрагнани оказалась более пригодной для изолирования так палочек туберкулеза, как и атипических палочек. Дополнительное применение питательной среды Stonebrinka повышало количество изолированных *Myc. bovis*.

Skwarek P., Zórawski C. — Effect of homogenization methods and kind of media on the results of isolation of acid-fast bacilli

Two hundred and seventy eight samples treated with solutions of oxalic acid (5%), caustic soda (4%) or a 2% solution of Na₃PO₄ were examined. Two hundred and nineteen strains of acid-fast bacilli were isolated including 46 strains of *Myc. bovis*, 9 — *Myc. tuberculosis*, 140 — *Myc. avium* and 24 strains of atypical bacilli. It was found that out of three methods compared, homogenization with 5% oxalic acid was slightest harmful for acid-fast bacilli. By using this method the largest percentage of positive results of growth on artificial media was obtained. Petragnani's medium was proved to be the most useful for isolation of both tubercle and atypical bacilli. Additional use of Stonebrink's medium increased the number of *Mycobacterium bovis* strains isolated.