

CEZARIUSZ ŻÓRAWSKI, MAREK LIPIEC

Przydatność różnych podłoży i preparatów czynnika wzrostowego mycobactin do hodowli *Mycobacterium paratuberculosis*

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

Summary

Usefulness of Different Media and Growth Factor Preparations for Culturing and Isolating *Mycobacterium Paratuberculosis*

The growth rate and the number of positive cultures of *M. paratuberculosis* on Nemoto's, serum agar and Herrold's media with the addition of mycobactins have been compared. The mycobactins were prepared from *M. phlei*, *M. intracellulare*, *M. avium* and *M. tuberculosis*. The suspensions of *M. paratuberculosis* culture or tissues, intestines and lymph nodes, collected from cattle affected with John's disease were used for inoculation. The best results were obtained on Nemoto's medium with the addition of a dried mass of *M. phlei* or *M. paratuberculosis*, strain TEPS.

Paratuberkuloza (choroba Johnego) jest przewlekłą, zaraźliwą chorobą przeżuwaczy. Występuje na całym świecie (1, 14), także w Polsce (11, 13, 15). Chorobę wywołuje *Mycobacterium paratuberculosis*. Zarazek ten ma powinowactwo do błony śluzowej i podśluzowej przewodu pokarmowego, gdzie namnaża się, powodując przerostowy nieżyt jelit, a w konsekwencji uporczywą biegunkę i postępujące wychudzenie zwierząt.

W diagnostyce paratuberkulozy wykorzystuje się badania bakteriologiczne, serologiczne, alergiczne i histopatologiczne, jednakże najistotniejsze znaczenie posiada próba hodowlana, pozwalająca z całą pewnością potwierdzić infekcję *M. paratuberculosis*. Próba ta ma jednak istotną wadę. Wynik otrzymuje się po długim okresie oczekiwania, wynoszącym zwykle 6—12 tyg. od chwili posiewu. *M. paratuberculosis* rośnie wolno i wymaga do swego wzrostu dodatku do podłoża czynnika wzrostowego o nazwie mycobactin, sporządzanego najczęściej z *M. phlei*. W wielu laboratoriach prowadzi się badania mające na celu opracowanie podłoża przyspieszającego wzrost *M. paratuberculosis* (5, 6, 7). Poszczególne autorzy zalecają różne podłoża i mycobactin sporządzony w różny sposób (8, 9, 10).

Celem pracy było porównanie przydatności do izolowania i hodowli *M. paratuberculosis* trzech różnych podłoży z dodatkiem mykobaktinu sporządzonego we własnym zakresie z różnych mykobakterii.

Materiał i metody

Czynnik wzrostowy. Do sporządzenia mykobaktinu użyto szczepów: *M. phlei*, *M. avium* D4ER, *M. intracellulare* ser. 16 oraz *M. paratuberculosis* TEPS.

M. phlei namnażano na bulionie odżywcym, zawierającym 4% peptonu i 10% glicerolu. Po 4 tygodniach inkubacji uzyskiwano wzrost w postaci grubego kożucha powstającego na powierzchni pożywki. *M. avium* i *M. intracellulare* namnażano na podłożu Lowensteina-Jensena we flaszki Roux. Czas wzrostu hodowli obu szczepów wynosił 4 tyg. *M. paratuberculosis* posiewano na podłoże Nemoto, po czym inkubowano przez okres 12 tygodni.

Po uzyskaniu dostatecznie obfitego wzrostu, podłoża z hodowlą prątków zabijano w autoklawie w temp. 121°C przez 30 min., a następnie masę bakteryjną splukiwano na filtr z gazy i bibuły filtracyjnej, przepłukiwano trzykrotnie wodą destylowaną, po czym suszono w temp. 60°C.

Z każdego szczepu sporządzano mykobaktin w postaci wyciągu alkoholowego. W tym celu 20 g suchej masy prątków ekstrahowano trzykrotnie 150 ml alkoholu etylowego 96% przez 20 min. Wszystkie porcje ekstraktu zbierano do kolby i odstawiano na noc. Płyn z nad osadu sączono przez filtr bibułowy, a następnie zagęszczano oddestylowując całkowicie alkohol. Do pozostałej masy dodawano 80 ml 50% wodnego roztworu glicerolu i wstawiano do łaźni wodnej o temp. 100°C na okres 10 min., po czym pozostawiano w temperaturze pokojowej przez 24 godz. Po tym czasie usuwano wierzchnią warstwę substancji woskowatych, a przezroczysty płyn zlewano do ampulek, zatapio i autoklawowano przy 121°C przez 20 min.

Sporządzano także z poszczególnych szczepów prątków wyciąg alkoholowy w postaci 5-krotnie zagęszczonej (po oddestylowaniu alkoholu dodawano nie 80, a 16 ml 50% roztworu glicerolu).

Podłoża. Badaniami objęto trzy podłoża: Nemoto (4), surowiczko-agarowe (3) oraz Herrolda (2). Partię każdego podłoża (1000 ml) dzielono na 4 części, dodając różne postaci i dawki czynnika wzrostowego.

Podłoże Nemoto:

- do 1 części (A) — dodawano 5 mg suchej masy prątków (zgodnie z recepturą tego podłoża)
- do 2 części (B) — 25 mg suchej masy prątków
- do 3 części (C) — 20 ml mykobaktinu w glicerolu
- do 4 części (D) — 20 ml mykobaktinu w glicerolu o koncentracji 5-krotnie większej

Podłoże surowiczko-agarowe i Herrolda:

- do 1 części (A) — dodawano 0,16 g suchej masy prątków (zgodnie z recepturą podłoża surowiczko-agarowego)
- do 2 części (B) — 0,8 g suchej masy prątków
- do 3 części (C) — 20 ml mykobaktinu w glicerolu (zgodnie z recepturą podłoża Herrolda)
- do 4 części (D) — 20 ml mykobaktinu o koncentracji 5-krotnie większej.

Wszystkie trzy podłoża (Nemoto, surowiczko-agarowe i Herrolda) z dodatkiem odpowiedniego czynnika wzrostowego sporządzano równocześnie, a posiewy wykonywano w tym samym czasie. Większą część podłoży z każdej partii przeznaczano na posiew z materiału tkankowego (wycinki jelita lub węzłów chłonnych), a mniejszą na posiew zawiesziny hodowli *M. paratuberculosis* (0,2 ml o gęstości 1 mg półsuchej masy prątków w 1 ml 0,9% roztworu NaCl). Wykonano łącznie posiewy na 1296 podłoża sporządzonych w 11 partiach. Z obliczeń wyłączono posiewy, na których zanieczyszczenia utrudniały ustalenie wyniku. Wykorzystano 6 materiałów pochodzących od bydła dotkniętego paratuberkulozą. Materiał do posiewów przygotowywano według obowiązujących zasad (16). Posiewy inkubowano w temp. 37°C przez okres 20 tyg., kontrolując co 7 dni pojawianie się wzrostu *M. paratuberculosis*.

Wyniki i omówienie

W tab. 1 przedstawiono liczbę i odsetek dodatnich posiewów uzyskanych na trzech badanych podłożach z dodatkiem mykobaktinu sporządzonego z różnych mykobakterii. Na podłożu Nemoto z dodatkiem suchej ma-

Tab. 1. Wzrost *M. paratuberculosis* na podłożach z dodatkiem różnych preparatów czynnika wzrostowego

Pochodzenie mykobaktinu	Rodzaj materiału	Liczba posiewów na każde podłoże	Podłoża											
			Nemoto				surowiczo-agarowe				Herrolda			
			A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
<i>M. phlei</i>	zawiesina	16	16*	16	2	11	4	9	0	0	8	10	0	3
	materiał tkankowy	23	23	23	9	10	3	3	0	0	2	11	0	2
	Łącznie — %	39	100	100	28,2	53,8	17,9	30,7	0	0	25,6	53,8	0	12,8
<i>M. intracellulare</i>	zawiesina	8	8	8	0	0	1	2	0	0	2	3	0	0
	materiał tkankowy	15	9	8	0	0	1	2	0	0	2	3	0	0
	Łącznie — %	23	73,9	69,5	0	0	8,6	17,3	0	0	17,3	26,0	0	0
<i>M. avium</i>	zawiesina	8	8	8	0	0	2	2	0	0	1	1	0	0
	materiał tkankowy	14	6	4	0	0	1	2	0	0	1	1	0	0
	Łącznie — %	22	63,6	54,5	0	0	13,6	18,1	0	0	9,0	9,0	0	0
<i>M. paratuberculosis</i>	zawiesina	8	8	8	2	4	2	3	1	1	3	3	0	2
	materiał tkankowy	16	13	13	3	5	6	3	2	2	11	8	0	5
	Łącznie — %	24	87,5	87,5	20,8	37,5	33,3	25,0	12,5	12,5	58,3	45,8	0	29,1

Objaśnienia: * — liczba dodatnich posiewów, A — dodatek suchej masy prątków, dawka recepturowa, B — dodatek suchej masy w dawce 5× większej, C — dodatek wyciągu alkoholowego, dawka recepturowa, D — dodatek wyciągu alkoholowego w dawce 5× większej.

Tab. 2. Czas wzrostu *M. paratuberculosis* w posiewach z hodowli (w tyg.)

Czynnik wzrostowy ze szczepu	Postać czynnika wzrostowego	Podłoża		
		Nemoto	surowiczo-agarowe	Herrolda
<i>M. phlei</i>	A	4	15	5
	B	4	13	5
	C	7	b.w.	b.w.
	D	4	b.w.	10
<i>M. avium</i> D4ER	A	13	b.w.	b.w.
	B	10	10	15
	C	b.w.	b.w.	b.w.
	D	b.w.	b.w.	b.w.
<i>M. intracellulare</i> ser. 16	A	10	b.w.	15
	B	5	13	10
	C	b.w.	b.w.	b.w.
	D	b.w.	b.w.	b.w.
<i>M. paratuberculosis</i> TEPS	A	6	7	13
	B	4	7	13
	C	7	15	b.w.
	D	7	7	15

Objaśnienia: ABCD — jak w tab. 1; b.w. — brak wzrostu w okresie 20 tyg.

sy prątka tymotki w ilości zgodnej z recepturą (A) oraz pięciokrotnie zwiększonej (B) wzrost uzyskano we wszystkich posiewach (100%). Obfity wzrost *M. paratuberculosis* nastąpił zarówno w posiewach czystej zawiesiny szczepu, jak i z tkanek.

Znacznie mniej dodatnich wyników posiewu zanotowano na podłożu surowiczo-agarowym. Wzrost *M. paratuberculosis* wystąpił tylko na podłożach z dodatkiem mykobaktinu w postaci suchej masy prątków tymotki i tylko na 17,9—30,7% posiewach. Lepsze wyniki od

Tab. 3. Czas wzrostu *M. paratuberculosis* w posiewach z materiału tkankowego (w tyg.)

Czynnik wzrostowy ze szczepu:	Postać czynnika wzrostowego	Podłoża		
		Nemoto	surowiczo-agarowe	Herrolda
<i>M. phlei</i>	A	5	15	5
	B	5	13	5
	C	15	b.w.	15
	D	5	13	5
<i>M. avium</i> D4ER	A	13	b.w.	15
	B	15	10	15
	C	b.w.	b.w.	b.w.
	D	b.w.	b.w.	b.w.
<i>M. intracellulare</i> ser. 16	A	7	15	15
	B	7	13	13
	C	b.w.	b.w.	b.w.
	D	b.w.	b.w.	b.w.
<i>M. paratuberculosis</i> TEPS	A	7	7	13
	B	6	7	10
	C	7	15	b.w.
	D	7	7	15

Objaśnienia jak w tab. 1.

tych ostatnich uzyskano na podłożu Herrolda, szczególnie gdy suchą masę *M. phlei* dodawano w 5-krotnie większej ilości (53,8% posiewów dodatnich).

Na podłożach z dodatkiem czynnika wzrostowego sporządzonego ze szczepu *M. intracellulare* ser. 16 i *M. avium* D4ER wzrost *M. paratuberculosis* nastąpił tylko na części posiewów i tylko po dodaniu suchej masy tych prątków. Najwięcej dodatnich posiewów stwierdzono na podłożu Nemoto (63,6—73,9%).

Znacznie lepiej, niż preparaty z dwu poprzednich szczepów, wzrost prątka Johnego stymulował mykobaktin ze szczepu *M. paratuberculosis* TEPS. I tu najlepsze wyniki — 87,5% posiewów dodatnich uzyskano na podłożu Nemoto z dodatkiem suchej masy prątków tego szczepu.

W tab. 2 podano czas wzrostu *M. paratuberculosis* w posiewach z hodowli. Najwcześniej, 4 tyg. po posiewie, pojawił się wzrost prątka Johnego na podłożu Nemoto z dodatkiem suchej masy *M. phlei* lub wyciągów alkoholowych tego prątka w koncentracji 5-krotnie zwiększonej. Równie szybki wzrost uzyskano na podłożu Nemoto z dodatkiem suchej masy prątka Johnego w ilości 5-krotnie większej niż recepturowa. Stosunkowo szybko, po 5 tyg. uzyskano wzrost *M. paratuberculosis* na podłożu Herrolda z dodatkiem suchej masy prątka tymotki, a także na podłożu Nemoto z suchą masą *M. intracellulare*, w 5-krotnie zwiększonej ilości. Na pozostałych podłożach wzrost pojawił się po upływie 6—15 tyg. lub w ogóle go nie stwierdzono w okresie 20 tyg. obserwacji.

W posiewach z materiału tkankowego (tab. 3) najlepsze wyniki hodowli *M. paratuberculosis* uzyskano na podłożu Nemoto lub Herrolda z dodatkiem suchej masy *M. phlei* lub wyciągu alkoholowego tego prątka w ilości 5-krotnie zwiększonej. Na podłożach tych kolonie prątka Johnego widoczne były już po 5 tyg. inkubacji. Stosunkowo szybko, po 6—7 tyg., uzyskano wzrost *M. paratuberculosis* na podłożu Nemoto i surowiczo-agarowym z dodatkiem mykobaktinu ze szczepu *M. paratuberculosis* TEPS. Na wielu podłożach, szczególnie zawierających mykobaktin w postaci wyciągu alkoholowego ze szczepów *M. intracellulare* i *M. avium*, nie stwierdzono wzrostu w okresie 20 tyg. inkubacji.

W warunkach przeprowadzanych doświadczeń najlepsze wyniki w hodowli i izolowaniu *M. paratuberculosis* uzyskano na podłożu Nemoto. Spośród przedstawicieli czterech badanych gatunków prątków, mycobactin sporządzony z prątka tymotki i prątka Johnego znacznie lepiej stymulował wzrost *M. paratuberculosis*, niż podobne preparaty przygotowane z *M. intracellu-*

lare lub *M. avium*. Dodatek suchej masy prątków tymotki lub prątka Johnego do podłoża bardziej korzystnie wpływał na wzrost *M. paratuberculosis*, niż alkoholowe wyciągi z tych drobnoustrojów. Doniesienia Mercala i McCullougha (10) świadczące, że wyciągi z *M. johnei* (mycobactin J.) stanowią lepszy czynnik wzrostowy, niż wyciągi z *M. phlei* (mycobactin P.), nie znalazły potwierdzenia w przeprowadzonych badaniach. Być może odegrała tu rolę metoda sporządzenia mykobaktinu, użyte podłoża lub szczepy, które na nie posiewano. Thorel i Haagsma (12) porównywali wzrost na różnych podłożach kilkunastu szczepów mykobaktinowych, wyizolowanych od dzikich gołębi. Część szczepów rosła tylko na określonych podłożach, część tylko na innych, mimo obecności w nich tego samego mykobaktinu.

Prace nad podłożami, czynnikiem wzrostowym oraz metodami obróbki materiału tkankowego przed posiewem, mające na celu przyspieszenie wzrostu *M. paratuberculosis*, będą przedmiotem dalszych badań.

Piśmiennictwo

1. Chiodini R. J., Van Kruiningen H. J., Mercal R. S.: Cornell vet. 74, 218, 1984.
2. Gilmour N. J. L.: Paratuberculosis. OIE Manual 3, 1/17, 1991.
3. Lagadic M., Le Menec M., Argente G.: Recl. Med. vet. 159, 801, 1983.
4. Nemoto H.: J. Jap. vet. med. Ass. 19, 155, 1966.
5. Mercal R. S.: J. Am. vet. med. Ass. 184, 139, 1984.
6. Mercal R. S., Kompecki K. E., Larsen A. B., Thurston J. R.: Am. J. vet. Res. 25, 1290, 1964.
7. Mercal R. S., Larsen A. B.: Am. J. vet. Res. 23, 1307, 1962.
8. Mercal R. S., Curran B. J.: App. Microbiol. 76, 276, 1974.
9. Mercal R. S., McCullough W. C., Takayama K.: Bull. Pasteur 79, 251, 1981.
10. Mercal R. S., McCullough W. G.: Current Microbiol. 7, 333, 1982.
11. Ramisz A., Czakata S., Szańkowska Z., Hoffman., Zahaczewski J.: Medycyna Wet. 26, 203, 1970.
12. Thorel M. F., Haagsma J.: Ann. Inst. Pasteur/Microbiol. 138, 745, 1987.
13. Wozikowski R.: Medycyna Wet. 43, 400, 1987.
14. Zórawski C.: Medycyna Wet. 47, 103, 1991.
15. Zórawski C., Spryszak A., Karpiński T.: Medycyna Wet. 28, 290, 1972.
16. Zórawski C., Skwarek P.: Metody i testy stosowane do izolowania i identyfikacji prątków kwasopornych. IWet. Puławy, 1983.

Adres autora: prof. dr hab. Cezariusz Zórawski, ul. Kaniowczyków 6 m 16, 24-100 Puławy

HALBUR P. C., PAUL P. S., ANDREWS J. J., SANDERSON T. P., ROSS R. F., SCHWARTZ K. J., ERIKSON B. J., HILL H. T., HOFFMAN L. J.: Doświadczalne przeniesienie zapalenia wirusowego płuc na normalne i gnotobiotyczne prosięta. (Experimental transmission of an apparent viral pneumonia in conventional and gnotobiotic pigs). Vet. Rec. 132, 263—266, 1993 (11)

Endemiczne zapalenie płuc występujące u prosiąt w wieku 5—8 tygodni życia o charakterze zapalenia śródmiąższowego posiada etiologię wirusową. Zakażenie udało się przenieść na konwencjonalne i gnotobiotyczne prosięta za pośrednictwem przesączu (filtry o średnicy 0,22 μm) homogenatu płuc chorych osobników. W hodowli komórkowej w mikroskopie elektronowym wyróżniano dwa rodzaje cząsteczek wirusa: cząsteczki o średnicy około 70 nm z otoczką posiadającą wypustki oraz cząsteczki pleomorficzne o wymiarach 80—320 nm, pokryte przeciwciałami. Wirus wywołuje zmiany cytopatyczne (liza komórek pierwotnych hodowli makrofagów pęcherzyków płucnych, tworzenie dużych syncytiów).

G.

GOUGH R. E., ALEXANDER D. J.: Choroba Pacheco u papugowatych w Wielkiej Brytanii w latach 1987—1991. (Pacheco's disease in psittacine birds in Great Britain 1987—1991). Vet. Rec. 132, 113—115, 1993 (5)

Choroba Pacheco jest wysoce zakaźną chorobą papugowatych wywołaną przez wirus z grupy herpes. Ptaki, które przeżyły zakażenie stają się uodpornionymi nosicielami zarazka. Może on być wydalany w pewnych okolicznościach z ustroju i powodować skażenie środowiska. W Wielkiej Brytanii wyosobniono i zidentyfikowano 32 szczepy wirusa choroby Pacheco wyizolowane od papug. Większość szczepów pochodziła od ptaków, które padły nagle. Dwadzieścia trzy szczepy wyosobniono od papug z rodzaju Amazona. W 1987 r. zdiagnozowano trzy przypadki choroby Pacheco, zaś w 1991 r. 13 przypadków tej choroby.

G.