

ELŻBIETA JÓŻWIK, JOANNA SZTEYN

Wpływ czasu przednamnażania i selektywnego namnażania na częstotliwość izolacji pałeczek *Salmonella*

Katedra Higieny Produktów Zwierzęcych Wydziału Weterynaryjnego AR-T, ul. Oczapowskiego 14, 10-957 Olsztyn-Kortowo

Summary

The frequency of *Salmonella* spp. isolation as influenced by the time of preincubation and multiplication in selective media

The frequency of *Salmonella* spp. isolation was compared depending upon the time of preincubation and multiplication in selective media for 24 hours. Out of 326 samples salmonellae were isolated from 161 samples. By use of the control method the bacteria were isolated from 128 samples (79.5 per cent). The most effective method proved to be the C variant, i.e. preincubation for 12 hours in buffered peptone solution (ZWP) and for an additional 12 hours in the selective medium of Rappaport-Vassiliadis (RV): 138 positive findings (85.7 per cent). Variant B – preincubation in ZWP medium and subculturing of 0,1 ml of the culture after 6 hours and again after 12 hours in the RV medium (time of preincubation and incubation = 24 hours): salmonellae were isolated from 123 samples (76.4 per cent). Variant A – preincubation for 6 hours and growth in the selective media for 18 hours appeared to be the least effective one; this trial was discontinued after the examination of 100 samples.

W ostatnich latach liczba zatruc pokarmowych, spowodowanych przez pałeczki *Salmonella* obecne w żywności stale wzrasta (11, 12, 13). Z tego względu niezwykle istotne jest posługiwanie się odpowiednio szybkimi i czułymi metodami wykrywania tych bakterii. Pomimo rozwoju wielu szybkich technik izolacji salmoneli tzw. skryningowych, żadna z nich nie została oficjalnie uznana za lepszą lub równie efektywną, co konwencjonalne metody hodowlane. Te ostatnie są nadal obowiązujące i zalecane zarówno przez Międzynarodową Organizację Standaryzacyjną (ISO), jak i Polską Normę (1, 10). Metody hodowlane są jednak czasochłonne i wymagają 4-5 dni do wyizolowania i identyfikacji salmoneli z badanych prób żywności.

Podejmowane próby skrócenia tych metod poprzez skrócenie czasu przednamnażania, stosowanie bezpośredniego namnażania, względnie skrócenie namnażania selektywnego są nieliczne, a ich wyniki często sprzeczne (3, 4, 5, 8, 15). Z tego względu podjęto badania, których celem było określenie wpływu czasu przednamnażania i namnażania selektywnego na częstotliwość izolacji pałeczek *Salmonella*, a tym samym ustalenie, czy istnieje możliwość skrócenia czasu trwania tych etapów do 1 doby.

Materiał i metody

Materiał do badań stanowiły wymazy naturalnie zakażonych tuszek kurcząt – 220 oraz wymazy pobierane ze środowiska zakładów drobiarskich (z urządzeń, sprzętu, ścian, podłóg itp.) – 106. Każdą próbę badano porównawczo

na obecność salmoneli przy pomocy standardowej metody hodowlanej obejmującej etapy:

- 1 – przednamnażanie w zbuforowanej wodzie peptonowej (ZWP) w 37°C,
- 2 – namnażanie selektywne w podłożu Rappaport-Vassiliadis (RV) w 43°C,
- 3 – selektywna izolacja na agarze z zielenią brylantową i czerwienią fenolową (BGA) 24-48 godzin w temperaturze 37°C,
- 4 – potwierdzenie wyniku badaniem biochemicznym i serologicznym.

Przeprowadzono 15 serii badań porównawczych, stosując równolegle 4 warianty metody, różniące się czasem trwania pierwszych dwóch etapów – przednamnażania i namnażania selektywnego:

- K – kontrolny – 20 godzin przednamnażania w ZWP i 24 godziny namnażania selektywnego w RV,
 A – 6 godzin przednamnażania w ZWP i 18 godzin namnażania selektywnego w RV,
 B – przednamnażania w ZWP i przeniesienie 0,1 ml hodowli po 6 godzinach oraz po raz drugi po 12 godzinach do RV i namnażanie w nim aż do osiągnięcia łącznego czasu przednamnażania i namnażania – 24 godzin,
 C – 12 godzin przednamnażania w ZWP i 12 godzin namnażania w RV.

Wyniki i omówienie

Otrzymane wyniki przedstawiono w tab. 1. Z 326 ogółem zbadanych prób obecność pałeczek *Salmonella* stwierdzono w 161 (100%). W żadnym z zastosowanych wariantów metodycznych nie osiągnięto pełnej, 100% wykrywalności. Największą efektywność uzyskano w wariacie

Tab. 1. Liczba izolacji pałeczek *Salmonella* w badanych wariantach metodycznych, w których zastosowano różne czasy przednamnażania i namnażania selektywnego

Wariant	Czas przednamnażania w ZWP (h)	Czas namnażania w RV (h)	Łączny czas przednamnażania i namnażania (h)	Liczba prób badanych (w tym dodatnich)	Liczba wyników dodatnich (%)
K	20	24	44	326 (161)	128 (79,5)
A	6	18	24	100 (48)	31 (64,6)
B*	6	18	24	326 (161)	123 (76,4)
	12	12			
C	12	12	24	326 (161)	138 (85,7)

Objaśnienie: * – po 6 godzinach przednamnażania próby w ZWP pobierano 0,1 ml i przesiewano do podłoża RV, poddając je inkubacji. Po dalszych 6 godzinach, czyli z 12-godzinnej już hodowli przednamnażanej w ZWP ponownie pobierano 0,1 ml, dodawano do hodowli inkubowanej już 6 godzin w RV i kontynuowano namnażanie selektywne przez dalsze 12 godzin, osiągając łączny czas przednamnażania i selektywnego namnażania tej samej próby – 24 godzin.

C, w którym przednamnażanie i namnażanie selektywne trwały po 12 godzin – 138 prób dodatnich (85,7%).

Za pomocą kontrolnej metody standardowej wykryto 128 prób dodatnich (79,5%). Stosując wariant B – przenosząc dwukrotnie 0,1 ml hodowli po 6 i po 12 godzinach przednamnażania do podłoża RV i namnażając ją w nim, aż do osiągnięcia łącznego czasu przednamnażania i namnażania – 24 godzin, wykryto 123 próby dodatnie (76,4%). Po 5 seriach doświadczeń zaprzestano badania wariantu A – 6 godzin przednamnażania i 18 godzin namnażania selektywnego – jako najmniej efektywnego.

W próbach żywności, bądź środowiskowych, salmonelle zwykle są obecne w niewielkich ilościach w stosunku do towarzyszącej mikroflory i to najczęściej w stanie osłabienia, bądź uszkodzenia na skutek zabiegów technologicznych, którym żywność jest poddawana, względnie dezynfekcji – w odniesieniu do prób środowiskowych. Dlatego też w metodyce oznaczania pałeczek *Salmonella* konieczne jest stosowanie przednamnażania jako pierwszego etapu badania, poprzedzającego namnażanie selektywne, który umożliwia regenerację tych bakterii i stwarza większą szansę ich wykrycia (4, 6, 9). Na efektywność izolacji salmoneli ma wpływ nie tylko ich liczebność w stosunku do mikroflory towarzyszącej w badanej próbce, ale także okres trwania lag fazy i czas generacji tych drobnoustrojów, a także czas trwania przednamnażania i namnażania selektywnego. Żeby w pełni wyjaśnić te uwarunkowania można posłużyć się koncepcją Jamesona (7) tzw. pierwszej i drugiej fazy namnażania nieselektywnego, której słuszność potwierdziły badania innych autorów (2, 14, 17). Teza ta dotyczy dynamiki wzrostu mieszanych grup mikroorganizmów i zakłada, że przebiega on dwufazowo. Podczas pierwszej fazy rozwoju dwa mikroorganizmy namnażają się niezależnie od siebie, aż jeden z nich osiągnie pewien maksymalny poziom, określony jako „stężenie molarne”, a oznaczający fazę stacjonarną; w tym momencie rozpoczyna się druga faza namnażania, podczas której organizm będący w mniejszości kontynuuje namnażanie i po pewnym czasie osiąga poziom dominującej wcześniej bakterii. Czas osiągnięcia pierwszej, a następnie drugiej fazy namnażania uzależniony jest od początkowej ilości mikroorganizmów – tak salmoneli, jak i mikroflory towarzyszącej oraz ich wzajemnych proporcji, a ponadto od czasu trwania ich lag fazy i czasu generacji.

Jeśli ilość mikroflory towarzyszącej w próbce niewiele będzie przewyższała liczbę salmoneli, jedne i drugie zaczną namnażać się po zakończeniu ich lag faz. W momencie, gdy mikroflora towarzysząca osiągnie poziom maksymalny – stan równowagi, zakończy się I faza namnażania, a rozpocznie II faza – dalsze namnażanie pałeczek *Salmonella* i możliwe będzie osiągnięcie przez te ostatnie jeszcze w etapie przednamnażania liczby – 10^4 , a nawet 10^6 /g. Wtedy etap namnażania selektywnego byłby konieczny jedynie do redukcji mikroflory towarzyszącej (17, 18). Czas przednamnażania w takim przypadku, jak również czas namnażania selektywnego można byłoby skrócić, bowiem zgodnie z wynikami badań van Leusdena i wsp. (16) – 10^2 , 10^3 lub wyższe liczby salmoneli na mililitr muszą osiągnąć taki poziom na koniec okresu przednamnażania, aby w trakcie namnażania selektywnego, po redukcji mikroflory towarzyszącej, możliwe było wykrycie pałeczek *Salmonella* na podłożach stałych.

Duże zakażenie mikroflorą towarzyszącą może spowodować co prawda, że I faza namnażania zakończy się szybciej, lecz następujący w II fazie wzrost salmoneli może okazać się niedostatecznie wysoki ze względu na wydłużenie czasu generacji, jak też oddziaływanie namnożonej już mikroflory (szkodliwe oddziaływanie produktów jej metabolizmu). Dalszy wzrost pałeczek *Salmonella*, w etapie namnażania selektywnego, może nastąpić jedynie przy dostatecznej redukcji mikroflory towarzyszącej (17).

Van Schothorst i Renaud (17) wykazali, że liczba mikroflory towarzyszącej nie może przewyższać liczby salmoneli o 3 rzędy wielkości, na koniec okresu namnażania w podłożu RV, aby izolacja tych ostatnich na podłożu BGA była możliwa. Skrócenie czasu przednamnażania, bądź namnażania selektywnego, wydaje się być w takim przypadku ryzykowne dla skuteczności izolacji salmoneli. Nadmierne skrócenie etapu przednamnażania sprawić może, że salmonelle nie zregenerują się i nie namnożą w odpowiedniej ilości, natomiast skrócenie etapu namnażania selektywnego może sprawić, że mikroflora towarzysząca nie zostanie zredukowana w dostatecznym stopniu.

Potwierdzeniem tych rozważań są wyniki badań własnych osiągnięte w wariantcie A. Czas przednamnażania – 6 godzin – był za krótki dla regeneracji i wzrostu salmoneli, uniemożliwiając ich izolację na podłożach stałych. Wyniki te pozostają w zgodzie z wynikami badań D'Aoust i Maishment (3).

Rezultaty uzyskane w wariantcie B, gorsze w porównaniu z metodą kontrolną i wariantem C, dowodzą, że zastosowane tu warunki przednamnażania i selektywnego namnażania były niewłaściwe. Po 6 godzinach przednamnażania w ZWP komórki salmoneli nie były jeszcze zregenerowane, ani tym bardziej namnożone, podczas gdy z pewnością nastąpiło namnożenie mikroflory towarzyszącej. Wprowadzenie 0,1 ml takiej hodowli do podłoża RV mogło spowodować częściowe zredukowanie tej mikroflory. Jednakże dodanie po dalszych 6 godzinach następnej porcji przednamnożonej hodowli, tym razem już 12-godzinnej sprawiło, że liczba ich ponownie wzrosła i jakkolwiek liczba salmoneli w tej drugiej porcji także była wyższa, w końcowym efekcie okazało się, że stosunek jednych bakterii do drugich pozwalał na wykrycie salmoneli w badanych próbach.

Najbardziej interesujące wyniki uzyskano stosując wariant C. Wskazują one, że możliwe jest skrócenie czasu przednamnażania, jak i namnażania selektywnego tak, że łącznie te dwa etapy trwają 1 dobę. Czas 12 godzin przednamnażania z ZWP wydaje się być wystarczającym, by komórki salmoneli uległy regeneracji i namnożyły się w dostatecznym stopniu w stosunku do liczby mikroflory towarzyszącej. Prowadzone przez następne 12 godzin namnażanie selektywne pozwalało na poprawienie ich wzajemnych proporcji na tyle, że uzyskiwano lepsze rezultaty w częstotliwości izolacji salmoneli z badanych prób, niż w metodzie kontrolnej. Wyniki te wymagają jednak dalszych badań i dalszych potwierdzeń na bardziej różnorodnych próbach żywności i znacznie większej ich liczbie.

Piśmiennictwo

1. Anon.: International Organization for Standardization. Microbiology – General guidance for the detection of *Salmonella*. ISO 6579, 1981.
2. Beckers H.J., Heide J.V.D., Fenigsen-Narucka U., Peters R.: J. appl. Bact. 62, 97, 1987.

3. D'Aoust J.-Y., Maishment C.: J. Fd Prot. 42, 153, 1979.
4. D'Aoust J.-Y.: J. Fd Prot. 44, 369, 1981.
5. D'Aoust J.-Y., Sewell A.M., Daley E.: J. Fd Prot. 55, 326, 1992.
6. Edel W., Kampelbacher E.H.: Bull. Wild Hlth Org. 48, 167, 1973.
7. Jameson J.E.: J. Hyg. Camb. 60, 193, 1962.
8. Kafel S., Bryan F.L.: Appl. Microbiol. 34, 285, 1977.
9. North W.R.: Appl. Microbiol. 9, 188, 1961.
10. Polska Norma – PN-64/A-04023.
11. Przybylska E.: Przegł. Epid. 42, 56, 1988.
12. Przybylska E.: Przegł. Epid. 43, 54, 1989.
13. Przybylska E.: Przegł. Epid. 45, 61, 1991.
14. Radkowski M.: Medycyna Wet. 48, 326, 1992.
15. Rappold H., Bolderdijk R.F., De Smedt J.M.: J. Fd Prot. 47, 46, 1984.
16. Van Leusden F.M., Van Schothorst M., Beckers M.J.: Soc. Appl. Bact. Tech. Series No 17., Acad. Press, London 1982.
17. Van Schothorst M., Renaud A.M.: J. appl. Bact. 54, 209, 1983.
18. Van Schothorst M., Renaud A.M.: J. appl. Bact. 59, 223, 1985.

Adres autora: dr Elżbieta Józwik, ul. Puszkina 14/21, 10-295 Olsztyn

KLINIKA MEDYCYNY WETERYNARYJNEJ

JANUSZ DANEK, EUGENIUSZ WIŚNIEWSKI, WIESŁAW KRUMRYCH

Przypadek urospermii u ogiera

Zakład Chorób Koni Bydgoskiego Oddziału Instytutu Weterynarii w Puławach, Al. Powstańców Wlkp. 10, 85-090 Bydgoszcz

Summary

A case of urospermia in a stallion

A case of urospermia in a stallion aged 10 years, coming from the Wielkopolska breed, has been described. The condition resulted in a low efficiency of the semen. Its first fractions were of yellow colour and, in the plasma, an increased level of urea (16.4 mml per 1 l) and creatinine (584 ummol per 1 l) were stated. The libido of the animal was normal; however, the quality of the semen was poor compared with the prior seasons.

Obok nieprawidłowych składników nasienia ogiera, takich, jak: krew – *haemospermia* (20), czy ropa – *pyospermia* (4, 7), może wystąpić też mocz – *urospermia*. Przypadłość ta występuje wprawdzie rzadko u koni, niemniej jednak jest zaburzeniem bardzo kłopotliwym, mogącym w znacznym stopniu upośledzać płodność samców tego gatunku zwierząt (13, 19). Niniejszy opis przypadku obecności moczu w ejakulacie ogiera stanowi pierwsze tego typu opracowanie w krajowym piśmiennictwie naukowym.

Opis przypadku

Ogier rasy wielkopolskiej, w wieku 10 lat, jako nieprzydatny w sporcie, został przekazany do rozrodu do jednej z krajowych stadnin koni. Był w dobrej kondycji i utrzymaniu, bez podejrzeń w przeszłości o urazy lub infekcje dróg moczowo-płciowych. W pierwszym sezonie krył skutecznie, natomiast w drugim, opisywanym, tylko w 30% (z 15 pokrytych klaczy tylko 5 zostało zażrebionych). Niska skuteczność krycia była powodem zgłoszenia ogiera do badań przed zakończeniem sezonu rozrodczego w maju (oznaczono jako badanie II) w celu ustalenia przyczyny tych niepowodzeń. Przeprowadzono badanie kliniczne wraz z oceną narządów płciowych i analizą odruchów płciowych oraz szereg badań hematologicznych i seminologicznych. Oprócz tego pobrano mocz do analiz oraz prób bakteriologicznych według zaleceń podanych wcześniej (4). Ejakulat pobierano przy pomocy sztucznej pochwy, pozwalającej na obserwację poszczególnych jego frakcji (18). Uzyskane nasienie (tylko pierwszy ejakulat,

gdyż w czasie kolejnych skoków ogier oddawał bezpłonne frakcje silnie zanieczyszczone moczem) poddawano następnie ogólnie przyjętej analizie makro- i mikroskopowej. W osoczu nasienia natomiast określano aktywność fosfatazy zasadowej metodą optymalizowaną przy użyciu zestawu Bio-Test, Lachema, zawartość białka całkowitego metodą biuretową, a stężenie mocznika i kreatyniny aparatem Ektachem DC 60 firmy Kodak.

Badania wykazały, że stan kliniczny ogiera (w tym narządów płciowych) nie odbiegał od normy, a wyniki analizy krwi i moczu były w zakresach uznanych za prawidłowe dla tego gatunku zwierząt. Badaniem bakteriologicznym nie stwierdzono obecności bakterii chorobotwórczych w wymazach z napletka i prącia, w płynie przed ejakulacyjnym i w nasieniu oraz w cewce moczowej (po ejakulacji), a także w moczu. Ogier oddawał nasienie prawidłowo z tym, że pierwsza część ejakulatu była w sposób widoczny zanieczyszczona moczem, natomiast nigdy nie zauważono moczu we frakcji śluzowej. Jakość tego nasienia była bardzo niska. Wyniki badań przedstawiono w tab. 1. Dla porównania zestawiono je z wynikami uzyskanymi w czasie badania ogiera w czerwcu, w poprzednim sezonie rozrodczym (oznaczono jako badanie I).

Omówienie

Reakcje płciowe ogiera w czasie I i II badania były podobne, a przedstawione wielkości mieściły się w zakresach uznanych za normalne (2, 11). Takie zachowanie było więc typowe, gdyż jak podają inni autorzy opisujący ten problem, ogiery dotknięte urospermią posiadają generalnie normalne *libido* i oddają nasienie prawidłowo (13, 19). Obecność moczu, jego ilość może mieć jednak decydujący wpływ na barwę i zapach ejakulatu oraz na jego odczyn.

U badanego ogiera, w porównywanym okresie, szczególnie wyraźna była zmiana barwy i pH nasienia. Jak wykazały badania Bielańskiego (1) ejakulat ogierów jest przeważnie mlecznobiały (57,2%), a tylko w niewielkim odsetku mlecznożółty (0,8%). Zapach ma specyficzny, nieco zbliżony do woni potu końskiego, który ulega wyjątkowo zmianom przy dużej ilości takich zanieczyszczeń,