

WIESŁAWA EMIRSAJŁOW-ZALEWSKA, ANTONI J. FUROWICZ

Ocena wyznaczników patogenności w szczepach *Yersinia pseudotuberculosis* wyizolowanych od szynszyli

Katedra Immunologii i Mikrobiologii Wydziału Zootechnicznego AR, ul. Doktora Judyma 24, 71-460 Szczecin

Summary

Evaluation of pathogenicity determinants of *Yersinia pseudotuberculosis* strains isolated from chinchillas

The purpose of the examinations was to evaluate the pathogenicity of 6 strains of *Yersinia pseudotuberculosis* isolated from chinchilla in Western Pomerania. Five tests served as a basis for regarding specific features of bacterial cells containing the virulence plasmids like: cell surface hydrophobicity, autoagglutination at 37°C, calcium dependency at 37°C, lack of pyrazinamidase production at 30°C and production of enterotoxin LT.

Chorobotwórczość *Yersinia pseudotuberculosis* (*Y.p.-tbc*) jest determinowana przez cały szereg czynników, których synteza kodowana jest przez elementy chromosomalne lub plazmidy. Ekspresja tych czynników zależy w dużym stopniu od warunków środowiskowych, takich jak: temperatura, pH, stężenie jonów wapnia, magnezu i żelaza (4). W dużej mierze o zjadliwości tych bakterii decydują białka zewnętrznej membrany ściany komórkowej (OM) (9, 12, 13). U szczepów o znacznej inwazyjności i toksyczności, duża liczba czynników patogenności w OM sprawia, iż komórki nabierają specyficznych właściwości koniecznych do szybkiej adhezji, kolonizacji i penetracji do komórki zaatakowanego organizmu. Obecność w komórce bakteryjnej plazmidów wirulencji sprawia, że nabiera ona cech hydrofobowych („cell surface hydrophobicity”) (15), wykazuje właściwości autoaglutynacyjne w temp. 37°C (12), zahamowanie wzrostu na podłożach ubogich w wapń w temp. 37°C (8), nie syntezuje pyrazinamidazy w temp. 30°C oraz wytwarza enterotoksynę LT (7).

Celem pracy było określenie zjadliwości wyizolowanych szczepów *Y.p.-tbc*. na podstawie kilku testów, uwzględniających specyficzne właściwości komórek bakteryjnych, posiadających plazmidy wirulencji.

Materiał i metody

Materiał do badań stanowiło 6 szczepów *Y.p.-tbc*, wyizolowanych z przypadków jersiniozy szynszyli (*post mortem: pseudotuberculosis hepatitis, enteritis catarrhalis, splenitis haemorrhagica, pneumonia interstitialis*).

Przed przystąpieniem do analizy zjadliwości wszystkie szczepy zostały poddane identyfikacji biochemicznej i oznaczone serologicznie w testach aglutynacyjnych. Wirulencję każdego szczepu oceniano na podstawie 5 testów.

Właściwości enterotoksyczne szczepów *Y.p.-tbc* oceniano za pomocą testu RPLA – odwróconej biernej aglutynacji lateksowej, wykorzystując zestaw Oxoid, przeznaczony do oznaczania enterotoksyczności LT *E. coli* i *Vibrio cholerae* (17). Zdolność do autoaglutynacji badano wg Laird i Cavanaugh w modyfikacji Doyle i wsp. (6). Szczepy autoaglutynujące (AA⁺) podczas wzrostu w temp. 37°C, wytwarzały w płynnej pożywce TSB (Tryptic Soy Broth) osad na dnie próbówki, natomiast podłoże nad osadem było klarowne. Natomiast hodowla każdego szczepu w temp. 26°C prowadziła do całkowitego zmętnienia podłoża oraz braku osadu. Jednocześnie wzrost dający zmętnienie w ww. temperaturach był traktowany jako wynik ujemny (AA⁻). Zahamowanie wzrostu badanych szczepów na agarze MOX (Magnesium Oxalate Agar) badano wg Gemskiego i wsp. (8). Szczep traktowano jako wapniozależny CAD⁺ (Calcium dependency), gdy na podłożu MOX, inkubowanym w temp. 37°C obserwowano zahamowanie wzrostu (kolonie ledwo dostrzegalne), podczas gdy na podłożach inkubowanych w temp. 26°C, kolonie osiągały średnicę do 1 mm. Na podłożach zawierających agar z 5% krwi baraniej, zarówno w temp. 26°C, jak 37°C wielkość i liczba kolonii były zbliżone.

Test pyrazinamidazowy wykonano wg Kandolo i Waueters'a (10). Wyizolowane szczepy namnażano na skośnym podłożu agarowym TSA (Tryptic Soy Agar) z dodatkiem 0,1% pirazyny. Po 48 godzinach inkubacji w temp. 30°C powierzchnie skosu zalewano 1 ml 1% roztworu wodnego siarczynu amonowego. Pojawienie się barwy brązowo-różowej świadczyło o obecności kwasu pirazynowego (PYZ⁺) i wyniku dodatnim reakcji, a szczep traktowano jako niechorobotwórczy. Brak zabarwienia oceniano jako wynik ujemny testu (PYZ⁻), a szczep jako potencjalnie chorobotwórczy. Test na hydrofobowość (Salting-Out Test) przeprowadzono wg metody Lindahl'a i wsp. (15). Po 24-godzinnej inkubacji pałeczek *Y.p.-tbc* na podłożu Minca (Colonization Factor Antigen Medium) (14), w temp. 37°C i 25°C, niewielką ilość materiału bakteryjnego zmieszano z 5 µl roztworu soli fizjologicznej na szkiełku podstawowym. Pojawienie się agregacji po upływie 1 minuty traktowano jako wynik pozytywny – a szczep jako posiadający właściwości hy-

Tab. 1. Występowanie cech chorobotwórczości *Yersinia pseudotuberculosis*, wyizolowanych od szynszyli

Symbol szczepu	Serotyp	Pochodzenie	Rodzaj testu				
			AA 37°C	CAD 37°C	PYZ 30°C	ENT	SALTING-OUT TEST
Sz 1	O : 1b	wątroba	+	+	-	+	+
Sz 2	O : 1a	nerka	+	+	-	+	+
Sz 3	O : R	piód	+	+	-	+	+
Sz 4	O : 1b	płuca	+	+	-	+	+
Sz 5	O : 1a	śledziona	+	+	-	+	+
Sz 6	O : 1a	serce	+	+	-	+	+

Objaśnienia: O : R – szczep szorstki, AA – autoaglutynacja w temp. 37°C, CAD – wapniozależny wzrost w temp. 37°C, PYZ – wytwarzanie pyrazynamidazy w temp. 30°C, ENT – wytwarzanie enterotoksyny LT, SALTING-OUT TEST – właściwości hydrofobowe w 0,9% roztworze NaCl w temp. 37°C.

drofobowe, charakterystyczne dla szczepów chorobotwórczych.

Wyniki i omówienie

W badaniach oceniono potencjalną chorobotwórczość 6 szczepów *Y.p.-tbc* wyizolowanych z narządów wewnętrznych szynszyli padłych na jersiniozę na podstawie 5 testów (tab. 1).

Aktywność enterotoksyczną typu LT stwierdzono u wszystkich badanych szczepów *Y.p.-tbc*. Enterotoksyna ta odgrywa prawdopodobnie ważną rolę w patogenezie jersiniozy, zwłaszcza w formie jelitowej (7).

W badaniach własnych wykazano ścisłą korelację między brakiem syntezy pyrazynamidazy, a przynależnością do szczepów chorobotwórczych; enzymu tego nie wytwarzała żaden z badanych szczepów. Badania Kandolo i Wauters'a (10) przeprowadzone na szczepach z rodzaju *Yersinia*, wykazały zróżnicowanie w hydrolizie pirazyny. Drobnoustroje wytwarzające pyrazynamidazę, która hydrolizowała pirazynę, nie zawierały plazmidów wirulencji. Szczepy potencjalnie chorobotwórcze reagowały ujemnie w teście pyrazynamidazowym.

Kolejne dwa testy (autoaglutynacji i wapniozależnego wzrostu) określały potencjalną chorobotwórczość badanych szczepów, warunkowaną obecnością plazmidów wirulencji. Wszystkie badane szczepy posiadały właściwości autoaglutynacyjne w temp. 37°C. W temp. 26°C zjawisko to nie zachodziło, ponieważ synteza antygenów powierzchniowych w postaci białka V i kwaśnej lipoproteiny W, występuje tylko w temp. 37°C (12). Zaobserwowano również zahamowanie wzrostu u wszystkich badanych szczepów *Y.p.-tbc* na agarze MOX w temp. 37°C. Gemski i wsp. (8) wykazali, że na syntezę antygenów V i W ma wpływ stężenie w podłożu jonów Ca⁺². Deficyt wapnia uniemożliwia rozwój szczepów o tzw. „pełnej” chorobotwórczości („full virulent strains”) (2).

W obrębie danego szczepu te dwie cechy (autoaglutynacja i wapniozależny wzrost) są ze sobą ściśle

skorelowane. Występują z reguły, jako ujemne lub dodatnie, na co wskazują badania wielu autorów (3, 12, 16). Korelacja tych cech nie zawsze jednak zachodzi w 100% (11). Negatywne wyniki testów autoaglutynacji i wapniozależnego wzrostu są często wynikiem spontanicznej utraty plazmidów wirulencji. Dzieje się tak głównie w efekcie częstego pasażowania szczepów w temp. 37°C, czy też długiego przechowywania w warunkach laboratoryjnych w temp. 4°C (1, 5).

Wszystkie badane szczepy, wykazujące autoaglutynację i wapniozależny wzrost, reagowały także pozytywnie w teście pozwalającym ocenić właściwości hydrofobowe powierzchni komórek bakteryjnych w temp. 37°C. Cecha ta jest ściśle związana z obecnością plazmidów wirulencji i w sposób pośredni świadczy o chorobotwórczości analizowanych szczepów (15).

Wnioski

1. Wykazano możliwość wykorzystania *in vitro* pośrednich, stosunkowo prostych metod, pozwalających ocenić chorobotwórczość drobnoustrojów *Y.p.-tbc*.
2. Testy te mogą z powodzeniem zastąpić drastyczne próby biologiczne, realizowane na zwierzętach laboratoryjnych.

Piśmiennictwo

1. Bercovier H., Mollaret H. H.: Bergeys Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 1 ed. Krieg N. R. Baltimore, Williams, Wilkins, 498, 1984.
2. Carniel E., Mazigh D., Mollaret H. H.: Infect. Immun. 55, 277, 1987.
3. Chang M. T., Schink J., Shimaoka J., Doyle M. P.: J. Clin. Microbiol. 20, 589, 1984.
4. Corbel M. J.: *Yersinia*, [w:] Topley and Wilson' Principles of Bacteriology, Systematic Bacteriology, red. M. T. Parker, B. J. Duerden, t. 2, A Division of Hodder and Stoughton, London 1990.
5. Cornelis G., Laroche Y., Balligand G., Sory M. P.: Rev. Infect. Dis. 9, 64, 1987.
6. Doyle M. P., Hugdahl B., Taylor S. L.: Appl. Environ. Microbiol. 42, 661, 1981.
7. Furowicz A. J., Czernomysy-Furowicz D., Misiura M., Kowalczywska M.: Medycyna Wet. 52, 116, 1996.
8. Gemski P., Lazere J. R., Casey T.: Infect. Immun. 27, 682, 1980.
9. Isberg R. R., Falkow S.: Nature 317, 262, 1985.

10. Kandolo K., Wauters G.: J. Clin. Microbiol. 21, 980, 1985.
11. Kaneko S., Maruyama T.: Jpn. J. Vet. Sci. 48, 205, 1986.
12. Laird W. J., Cavanaugh D. C.: J. Clin. Microbiol. 11, 430, 1980.
13. Miller V. L., Falkow S.: Infect. Immun. 59, 1242, 1988.
14. Misiura M.: Praca doktorska. AR Szczecin 1992.
15. Tomita M., Matsusaki S., Katayama A., Endo R., Miyamura S.: Zbl. Bakt. 279, 231, 1993.

16. Okamoto K., Kobayashi T., Shinoda S., Inoute T., Yukitake J., Shimizu K., Kawamoto Y., Moriyama A., Miyama A.: Microbiol. Immunol. 28, 23, 1984.
17. The Oxoid Manual (katalog), 6th Ed. Revised, 1990.

Adres autora: mgr inż. Wiesława Emirsajłow-Zalewska, ul. Unii Lubelskiej 7, 71-344 Szczecin

RECENZJE I BIBLIOGRAFIA

Zwierzęta laboratoryjne, metody hodowli i doświadczeń. Praca zbiorowa pod redakcją J. Brylińskiej i J. Kwiatkowskiej. Wydawca – Tow. Autorów i Wydawców Prac Naukowych Universitas, Kraków 1996, str. 282, cena 19,50 zł. ISBN 83-7052-328-5.

W książce omówiono nowoczesne metody, warunki i wyposażenie hodowli zwierząt laboratoryjnych oraz techniki humanitarne obchodzenia się ze zwierzętami poddawanych eksperymentom czy testom. W licznych rozdziałach podano podstawową wiedzę z zakresu genetyki, fizjologii rozrodu i żywienia oraz międzynarodowe zasady nazewnictwa zwierząt. Uwzględniono problemy etyczne-prawne prowadzenia doświadczeń na zwierzętach. Warto zacytować tytuły 13 rozdziałów książki: 1) Rozwój wiedzy o zwierzętach doświadczalnych, 2) Nazewnictwo zwierząt laboratoryjnych, 3) Metody hodowli, 4) Projek-

towanie, budowa i wyposażenie zwierzęciarni, 5) Reżim sanitarny i organizacja pracy w zwierzęciarniach, 6) Kontrola genetyczna, 7) Monitorowanie zdrowia, 8) Ogólne wiadomości o rozrodzie, 9) Ogólne zasady żywienia, 10) Szczegółowa hodowla zwierząt laboratoryjnych, 11) Czynniki wpływające na wyniki doświadczeń, 12) Zabiegi na zwierzętach, 13) Normy etyczne i prawne.

Książka winna się znaleźć, z różnych zresztą względów, we wszystkich weterynaryjnych i zootechnicznych zakładach naukowych, a także zalecić ją można dla lekarzy wet., jako potencjalnych opiekunów hodowli tej grupy zwierzęcej.

Dystrybucja książki, wysyłanej na zamówienie: Księgarnia wysyłkowa TAIWPN „Universitas”, ul. Karmelicka 34, 31-128 Kraków.

E. K. Prost

HAMISH R. DENNY: Ortopädische Chirurgie an Hund und Katze (Chirurgia ortopedyczna psów i kotów). 2 niemieckojęzyczne wydanie, 1996, str. 386, ryc. 286, tab. 4. Ferdinand Enke Verlag Stuttgart, cena 98,- DM. ISBN 3 432 93402 5.

Wydana w 1996 r. w języku niemieckim ortopedia, jest tłumaczeniem trzeciego z 1993 r. wydawnictwa angielskiego pochodzącego z Katedry Chirurgii Weterynaryjnej Uniwersytetu w Bristolu. Zamysłem Autora było ukazanie najnowszych kierunków w chirurgii ogólnej i technik operacyjnych w postępowaniach ortopedycznych. Stąd obszernie dwa pierwsze rozdziały dotyczące patologii układu kostnego, mięśniowego, stawowego, więzadeł i ścięgien. Bardzo szerokie omówienie zyskała traumatologia, choroby systemowe, miopatie, zwyrodnienia, przeciążenia, nowotwory. W tej części jest też diagnostyka rentgenowska, podstawy gojenia się złamań, powikłania w osteogenezie, podstawy oraz zasady stabilizacji unieruchamiania opatrunkiem zewnętrznym, choroby rozwojowe, przemiany materii, zaburzenia wzrostu, zasady żywienia. Część druga zawarta w trzech rozdziałach ujmuje w sposób szczegółowy, regionalny choroby ortopedyczne. Podział jest następujący: czaszka i kręgosłup, kończyna przednia, kończyna tylna. Każdy z rozdziałów zawiera wszystkie choroby ujawniające się symptomatycznie, naj-

bardziej typowo, w danej okolicy anatomicznej. Tam, gdzie to jest niezbędne podane są sposoby badania klinicznego. Odnosi się to do diagnostyki neurologicznej i narządu ruchu, w jego zaburzeniach, z podziałem na kończynę przednią i tylną. Szczególnie wartościowe są schematy operacyjne przedstawione rysunkiem. Prostota ich wykonania z zachowaniem najważniejszych i najistotniejszych elementów, pozwala na ogromną czytelność. W ten sposób sprzężenie tekstu z obrazem, umożliwia śledzenie i przyswojenie sobie kolejno prowadzonych etapów operacji. Ujęć graficznych zamieszczono 386 pozycji, ale ich uszczegółowienie w podpunktach tworzy liczbę 697 schematów uzupełniających tekst. Jest to niespotykana koncepcja w tak zwiezłych wydawnictwach. Wypełniona została tym samym założona koncepcja Autora. Student bowiem zyskuje przewodnik dot. złożonej dyscypliny, jaką jest chirurgia ortopedyczna, co pozwala mu na uzyskanie podstawowej wiedzy w tym zakresie. Lekarz praktykujący może łatwo odszukać interesujące go schorzenie i podjąć stosowne leczenie. Ułatwiają osiągnięcie tego jeszcze dwie rzeczy. Dobry skorowidz rzeczowy na końcu i wykaz piśmiennictwa po każdym rozdziale książki. Można uznać, że wydany podręcznik chirurgii ortopedycznej będzie przydatny i u nas, zarówno lekarzom jak i studentom.

R. Badura