

Drugim czynnikiem różniącym obie metody jest ilość surowicy, potrzebnej do przeprowadzania badań. Do aparatu Tiseliusa potrzeba około 12 ml surowicy, gdy do elektroforezy bibułowej wystarczy 0,01 ml (0,6 mg białka). Ma to tę dobrą stronę, że ilość białka w stosunku do buforu nasycającego bibułę jest tak mała, że można pominąć zjawisko dializy. Metoda jest tania, wystarcza bowiem pewna ilość pasków bibuły, komora wilgotna, prostownik i fotometr do oznaczeń ilościowych.

Po zakończeniu rozdziału otrzymuje się dobrze oddzielone od siebie frakcje, czego nie udaje się uzyskać w wolnej elektroforezie (ryc. 2).

Za pomocą barwienia, którego zasada oparta jest na barwieniu stosowanym w histologii, można uwidocznić nie tylko białka, ale także lipoproteidy, glikoproteidy, a nawet fosfolipidy i prześledzić z jakimi frakcjami one wędrują. Elektroforeza bibułowa pozwala poza

tym lokalizować pierwiastki znakowane, związane z poszczególnymi frakcjami bibułowymi. Metoda ta jest obecnie szeroko stosowana zarówno w badaniach chemicznych, jak i klinicznych i pozwala wyjaśnić szereg problemów tak złożonych substancji jakimi są białka.

#### Piśmiennictwo

1. Nagórski F.: Dynamika białek syworołki krwi krupnego skota w ontogenezie s uczetom niekotozych fizjologiczeskich faktorow. Dysertacja Moskwa, 1962.
2. Neirat G., Beili K.: Białki. Izdatielstwo inostrannoj literatury. Moskwa, 1958.
3. Riva G.: Das Serumweißbild, 1957.
4. Tiselius A.: Electrophoresis, past, present and future. Clinica chimica acta 3, 1, 1-9, 1958.
5. Zinowiew A. A.: Chimia zyrow. Moskwa, 1952.
6. Kirk N.: Chemiczeskoje opredielenije białkow. Izdatielstwo inostrannoj literatury. Moskwa, 1949.

Adres autora: doc. dr Feliks Nagórski, Warszawa, Grochowska 272.

## HIGIENA I TECHNOLOGIA ŚRODKÓW SPOŻYWCZYCH

STANISŁAW KAFEL, JOHN C. AYRES

### Enterokoki oraz ich znaczenie z punktu widzenia higieny produktów zwierzęcych

Z Zakładu Badania Produktów Zwierzęcych Instytutu Weterynarii w Puławach

Kierownik: doc. dr ZBIGNIEW GAUGUSCH,

oraz Food Processing Laboratory, Iowa State University, Ames — Iowa — U.S.A.

Kierownik: prof. dr JOHN C. AYRES

Określenie enterokoki używane jest niekiedy błędnie jako równoznaczne z pojęciem paciorkowce kałowe lub paciorkowce grupy D. W roku 1937 Sherman (38) usystematyzował drobnoustroje należące do rodzaju *Streptococcus* na podstawie ich własności fizjologicznych i podzielił je na 4 grupy: *Pyogenes*, *Viridans*, *Lactis*, *Enterococcus*. Grupa *Enterococcus* obejmowała wtedy takie paciorkowce jak *Str. faecalis*, *Str. zymogenes*, *Str. liquefaciens* i *Str. durans*. Drobnoustroje te odpowiadały tzw. kryteriom Shermana dla grupy *Enterococcus* (40) co oznacza, że posiadały one następujące właściwości fizjologiczne: wzrost w obecności 6,5% NaCl, wzrost w temp. 45° jak również 10°, wzrost w bulionie z dodatkiem 40% żółci, przeżywalność w temperaturze 60° przez 30 minut, wzrost w środowisku o pH 9,6 oraz przynależność do grupy D Lancefield. Dalsze badania wykazały, że *Str. zymogenes* i *Str. liquefaciens* są bardzo blisko spokrewnione ze *Str. faecalis* i że te trzy typy paciorkowców różnią się między sobą tylko właściwościami hemolitycznymi i proteolitycznymi. Wszystkie opisane powyżej paciorkowce zostały uwzględnione w ostatnim wydaniu systematyki bakteriologicznej Bergey'a (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 1957), w której grupa enterokoków obejmuje następujące typy: *Str. faecalis*, *Str. faecalis var. liquefaciens*, *Str. faecalis var. zymogenes* oraz *Str. durans*. Okazało się na-

stępnie (17), że również *Str. faecium* z grupy D paciorkowców odpowiada kryterium Shermana i może on być włączony do grupy enterokoków. Sherman (40) i Niven (26) stwierdzili następnie na podstawie właściwości serologicznych, że również *Str. bovis* posiada antygen odpowiadający grupie D Lancefield. Podobnie badania Smith i Shattock (37) wykazały obecność antygeny D u *Str. equinus*. Jednak zarówno *Str. bovis* jak i *Str. equinus* nie odpowiadają niektórym kryteriom Shermana i dlatego nie mogą być włączone do grupy *Enterococcus*. Historyczne określenie *Enterococcus* Shermana utrzymuje się do dzisiaj w piśmiennictwie i zgodnie z kryteriami przyjętymi przez tego autora należą tu: *Str. faecalis*, *Str. faecalis var. liquefaciens*, *Str. faecalis var. zymogenes*, *Str. durans* i *Str. faecium*.

Pojęcie paciorkowce kałowe z punktu widzenia taksonomii jest bardzo trudne do sprecyzowania. Można by przyjąć, że wszystkie drobnoustroje z rodzaju *Streptococcus*, których naturalnym siedliskiem jest przewód pokarmowy ludzi i zwierząt ciepłokrwistych lub często spotykane w przewodzie pokarmowym, są paciorkowcami kałowymi i wówczas praktycznie paciorkowce prawie wszystkich grup mieściłyby się pod tym pojęciem. Dziś przyjmuje się jednak (22,35), że mianem paciorkowce kałowe objąć można tylko te paciorkowce spotykane w przewodzie pokarmowym, które posiadają antygen D Lancefield,

a więc *Str. faecalis*, *Str. faecalis var. liquefaciens*, *Str. faecalis var. zymogenes*, *Str. faecium*, *Str. durans*, *Str. bovis* i *Str. equinus*.

Enterokoki obok *E. coli* i *Cl. perfringens* niejednokrotnie brane są pod uwagę w środkach spożywczych jako wykładnik zanieczyszczenia kałowego. Nie ulega wątpliwości, że naturalnym siedliskiem tych drobnoustrojów jest przewód pokarmowy ludzi i zwierząt. Z drugiej strony wiadomo jednak, że są one bakteriami w pewnym stopniu ubikwitalnymi, szeroko rozpowszechnionymi w przyrodzie i że ich obecność w gotowych produktach nie musi być związana z bezpośrednim zakażeniem pochodzenia kałowego. Tak np. Sherman (39) stwierdzał regularnie enterokoki na roślinach a inni autorzy (10, 23, 24, 25) wykazywali je podobnie w glebie i na powierzchni uprawianych oraz dziko rosnących roślin.

*Str. faecalis* oraz jego warianty były dotychczas wykrywane najczęściej w przewodzie pokarmowym ludzi a stosunkowo rzadko spotykano je u zwierząt. Dlatego też niektórzy autorzy uważają, że ich obecność w żywności może być w pewnym stopniu traktowana jako wskaźnik zakażenia kałowego pochodzenia ludzkiego (1, 2). Badania innych autorów wykazały jednak obecność *Str. faecalis* w przewodzie pokarmowym zwierząt (11, 16) i odwrotnie inne enterokoki spotykane są w przewodzie pokarmowym człowieka (28, 39). Tak więc wykrycie *Str. faecalis* lub jego wariantów w produktach spożywczych tylko w pewnym stopniu prawdopodobieństwa mogłoby być ewentualnie brane pod uwagę za wskaźnik zakażenia kałowego ludzkiego.

*Str. faecium* opisywany był niejednokrotnie jako dominujący typ w przewodzie pokarmowym świń, choć występuje on również i u innych zwierząt. W badaniach niektórych autorów (13) był on wykazywany nawet jako dominujący typ w przewodzie pokarmowym człowieka. *Str. bovis* spotykany jest najczęściej u bydła i niekiedy u świń, podczas gdy *Str. equinus* występuje głównie w przewodzie pokarmowym koni i świń.

Na podstawie licznych prac dotyczących powyższego zagadnienia przeprowadzonych w różnych warunkach i w różnych szerokościach geograficznych można wnioskować, że ilościowy stosunek poszczególnych rodzajów enterokoków w przewodzie pokarmowym ludzi i zwierząt nie da się ująć jak dotychczas w jakiś ścisły schemat.

Enterokoki spotykane są często w różnych produktach spożywczych, choć największym problemem w naszym kraju jest częste ich występowanie w szynkach puszkowanych pasteryzowanych. Niektórzy autorzy przypisują im, zwłaszcza *Str. faecium*, zdolność wztwarzania w szynkach zmian organoleptycznych, takich jak kwaśny zapach i smak oraz zmniejszona trwałość barwy po wyjęciu produktu

z puszkki. Nie posiadają one jednak zdolności wywoływania bombaży. *Str. faecium* wydaje się odgrywać w konserwach pasteryzowanych największą rolę ze względu na jego dużą wytrzymałość na działanie wysokiej temperatury, dużą tolerancję na działanie soli oraz zdolność wzrostu w niskich temperaturach przewidzianych dla składowania omawianego produktu. Drobnoustrój ten może przetrwać temperaturę pasteryzacji przewidzianą dla szynek pasteryzowanych. Dlatego też w każdym przypadku występowania niepowodzeń produkcyjnych na tle enterokoków, należałoby temperaturę pasteryzacji podnieść do tego stopnia by w centrum puszkki osiągnąć 70° i temperaturę tę utrzymać przez czas nie krótszy niż 30 minut.

Pomimo ujemnego wpływu, jaki zdaniem niektórych autorów wywierają enterokoki na szynki puszkowane, drobnoustroje te mogą wywierać korzystny wpływ w procesie fermentacji innych produktów spożywczych. Tak np. mają one odgrywać ważną rolę w procesie tworzenia właściwego aromatu niektórych kiełbas fermentowanych, których produkcja bez udziału enterokoków byłaby nawet niemożliwa (6, 7). Kultury enterokoków stosowane też są w produkcji niektórych serów (9) wywierając korzystny wpływ w procesie ich dojrzewania.

Rozstrzygnięcia wymaga problem chorobotwórczych zdolności enterokoków. W piśmiennictwie były opisywane nieliczne przypadki zatruc pokarmowych przypisywanych enterokokom. Opisywane objawy chorobowe w tych przypadkach posiadały cechy lekkich schorzeń jelitowych, przy czym okres wylegania choroby w poszczególnych przypadkach i u poszczególnych pacjentów wahał się od dwóch do osiemnastu godzin. Należy wspomnieć, że w przypadkach krótkiego okresu inkubacji choroby, zasadniczym objawem zatrucia były wymioty, zaś przy dłuższej inkubacji dominującym symptomem była biegunka. W opisywanych przypadkach zatruc paciorkowce występowały w środkach spożywczych w dużych ilościach sięgających rzędu milionów w jednym gramie, przy czym w grę wchodziły różne produkty, jak np. mleko i produkty mleczne oraz potrawy przyrządzone z mięsa gotowanego. Pierwsze zatrucia pokarmowe na tle paciorkowców opisano już w 1926 r. (19). Wyizolowane paciorkowce z tych przypadków wywoływały również objawy chorobowe u kotów po podaniu drobnoustrojów *per os*. Omawiane szczepy bakteryjne rozpoznano później jako *Str. faecalis*. *Str. faecalis* opisany był następnie jako czynnik chorobotwórczy w dalszych sześciu zatruciach pokarmowych (41). Patogeneza zatruc pokarmowych na tle enterokoków nie jest jeszcze dostatecznie wyjaśniona. Początkowo przypuszczano, że enterokoki podobnie jak gronkowce mogą wytwarzać enterotoksynę i że mechanizm wywoływania choro-

by przez enterokoki jest podobny do mechanizmu zatruc gronkowcowych. Tak więc badano możliwości wytwarzania enterotoksyny przez szczepy enterokoków wyizolowane z przypadków zatruc, jak również szczepy pochodzące z innych źródeł. Przesącze hodowli enterokoków wyizolowanych z przypadków zatruc próbowano podawać doustnie małpom (15) i u niektórych zwierząt udawało się nawet wywoływać powtarzalne zatrucia, lecz większość małp była niewrażliwa, wobec czego autorzy tych doświadczeń nie sugerują stań konkretniejszych wniosków. W innych doświadczeniach podawano doustnie ludziom kultury *Str. faecalis* wyizolowane przypadkowo z kału ludzkiego a także z mleka, które było przyczyną zatrucia (29). Objawy chorobowe wystąpiły u sześciu spośród 26 ochotników po spożyciu młodych 5-godzinnych hodowli bakteryjnych podanych w mleku lub sałatce z jajek kurzych. Nie udało się jednak wykazać zatruc po podaniu ludziom 20-godzinnych kultur, przy zachowaniu wszystkich innych warunków doświadczenia.

*Sherman, Gunsalus i Bellamy* (41) postawili tezę, że przyczyną wywoływania zatruc może być któryś z produktów metabolizmu występującego w czasie wzrostu enterokoków. Autorzy ci po wykonaniu badań z sześcioma szczepami *Str. faecalis* wyosobnionymi z przypadków zatruc pokarmowych doszli do wniosku, że produktem tym jest tyramina powstająca wskutek dekarboksylacji tyrozyny. W r. 1949 *Dack* i współpracownicy (8) wykazali jednak, że sama tyramina czy też podawana z mlekiem nie wywołuje objawów zatruc u ludzi. Dekarboksylacja tyrozyny przy tym jest cechą wszystkich szczepów *Str. faecalis* a nie tylko szczepów izolowanych z zatruc pokarmowych. Enterokoki wytwarzające tyraminę występują w produktach spożywczych niejednokrotnie w bardzo dużych ilościach, sięgających rzędu milionów w 1 gramie, nie wywołując jednak objawów chorobowych u ludzi (34). W innych badaniach, *Str. faecalis* wyosobniony z przypadku zatrucia pokarmowego został użyty w postaci kultury starterowej do produkcji sera. Po spożyciu tego sera przez 37 ochotników ludzkich nie wystąpiły objawy chorobowe, pomimo że drobnoustrój ten występował w bardzo dużych ilościach a przy tym wytworzył w produkcie duże ilości tyraminy (8). W ostatnich latach różni autorzy coraz częściej wysuwają wątpliwości co do specyficznej roli enterokoków w zatruciach pokarmowych. Opublikowano szereg wyników doświadczeń, w których nie udało się wywołać objawów zatruc po spożyciu przez ludzi dużych ilości *Str. faecalis* w różnych produktach. *Silliker i Deibel* (36) próbowali wykazać objawy chorobowe u ludzi przy użyciu 24 szczepów *Str. faecalis* i *Str. faecium*, spośród których 9 szczepów pochodziło z przypadków zatruc. W

doświadczeniach przeprowadzonych przez wyższych autorów nie udało się jednak wykazać żadnych objawów chorobowych u ochotników ludzkich, po spożyciu przez nich czystych kultur uzyskanych na różnych podłożach bakteryjnych a także po spożyciu mleka oraz szynki zakażonej tymi drobnoustrojami.

Zakładając, że enterokoki są drobnoustrojami potencjalnie enteropatogennymi, zastanawiający jest fakt, że zatrucia pokarmowe przypisywane tym drobnoustrojom występują tak rzadko, pomimo że bakterie te często i niejednokrotnie w dużych ilościach spotykane są w produktach spożywczych (5, 18, 20, 30). Ponadto są one drobnoustrojami ubikwitalnymi, szeroko rozprzestrzonymi w przyrodzie i zdolnymi do rozwoju w różnych środowiskach. Dziś na pewno wiadomo, że jeśli enterokoki zdolne są do wywoływania zatruc pokarmowych, to w grę wchodzić mogą tylko wyjątkowe nie rozpoznane jeszcze bliżej szczepy oraz specjalne, rzadko istniejące warunki środowiskowe niezbędne do wywołania zatruc. Można by przypuszczać, że patogenesa zatruc przypisywanych enterokokom jest podobna do patogenesy niektórych schorzeń wywoływanych przez *E. coli*. Oba te rodzaje drobnoustrojów wchodzi w skład flory jelitowej ludzi i zwierząt. Wiadomo przy tym, że *E. coli* obejmuje około 140 grup serologicznych oraz nie określoną jeszcze bliżej liczbę serotypów, lecz tylko niektóre serotypy brane są pod uwagę jako czynnik etiologiczny w stanach zapalnych przewodu pokarmowego u ludzi. Również enterokoki przedstawiają różne typy serologiczne i być może, że tylko niektóre serotypy mogą przyczyniać się do powstawania schorzeń. Dzisiaj nie można jeszcze postawić enterokoków w rzędzie drobnoustrojów chorobotwórczych. W dotychczasowych obserwacjach przeprowadzonych w przypadkach zatruc, pomiędzy spożyciem odpowiedniego posiłku a wystąpieniem objawów chorobowych i rozpoczęciem dochodzenia epidemiologicznego, istniała zwykle dość duża różnica czasu, wystarczająca do obfitego namnożenia enterokoków w pozostałych resztkach pożywienia oraz do ewentualnego zamaskowania właściwego czynnika etiologicznego. Zjawisko to coraz częściej obserwowane jest przez badaczy amerykańskich w przypadkach zatruc, których właściwym czynnikiem etiologicznym jest *Cl. perfringens*. Zagadnienie to wymaga jednak jeszcze dalszych badań.

Bakteriologiczna ocena produktów spożywczych zakażonych enterokokami wymaga dziś wiele rozsądku. Być może, że ilość enterokoków w tych produktach jest w pewnym sensie wskaźnikiem jakości. Z drugiej strony wiadomo, że postawienie ścisłych a przy tym niskich granic ilościowych dla enterokoków w produktach spożywczych takich jak np. mleko i produkty mleczne, mięso i niektóre pro-

dukty mięsne jak np. fermentowane kiełbasy, mogłoby wyeliminować te produkty od spożycia zbyt często i w zbyt dużych ilościach, co niemożliwe jest do przyjęcia ze względów ekonomicznych.

Ze względu na dużą wagę jaką przypisuje się enterokokom w produktach spożywczych, celowe wydaje się omówienie niektórych cech fizjologicznych oraz składu antygenowego tych drobnoustrojów, co może mieć znaczenie w diagnostyce tych bakterii a także w dochodzeniach epidemiologicznych przeprowadzanych w czasie zatruc pokarmowych.

Serologiczne określenie przynależności badanych drobnoustrojów do grupy D Lancefield jest rzeczą zasadniczą. Produkcja surowic precypitacyjnych dla grupy D paciorkowców jest jednak często dość kłopotliwa i niekiedy nie daje spodziewanych wyników. Ostatnie badania dotyczące lokalizacji antygenu grupowego w komórkach enterokoków wyjaśniły jednak przyczynę tych trudności. Antygen grupowy tych drobnoustrojów nie jest częścią składową ściany komórkowej (12, 14) tak jak to jest np. w przypadku paciorkowców grupy A (21) lecz jest zlokalizowany we wnętrzu komórek bakteryjnych; nie może więc być łatwo dostępny dla komórek organizmu wytwarzających przeciwciała. Dlatego też produkcja surowic precypitacyjnych dla paciorkowców grupy D jest łatwiejsza i pewniejsza przy użyciu rozbitych komórek bakteryjnych. Sposób wykonywania próby precypitacji przy określaniu przynależności grupowej nie pozostaje też bez znaczenia, przy czym niektóre szczepy bakteryjne wymagają użycia skoncentrowanego antygeny (33).

Poszczególne typy enterokoków różnią się między sobą pod względem antygenowym. *Str. faecalis* i jego warianty (*liquefaciens* i *zymogenes*) według dotychczasowych obserwacji obejmują niewielką ilość, bo około 20 typów serologicznych (31, 42). Antygeny różniące poszczególne typy zlokalizowane są w ścianie komórki bakteryjnej, przy czym różnią się one od antygenów charakterystycznych dla innych paciorkowców z grupy D. *Str. faecium* i *Str. durans* obejmują większą ilość typów antygenowych przy czym niektóre antygeny są wspólne dla obu tych typów bakterii (32). *Str. bovis* przedstawia również dużą nieokreśloną ilość typów serologicznych, zaś *Str. equinus* nie został jeszcze opracowany pod względem antygenowym.

Na podstawie właściwości fizjologicznych paciorkowce kałowe można by podzielić na 3 następujące grupy:

1. *Str. faecalis* i jego warianty — *liquefaciens* i *zymogenes*,
2. *Str. faecium* i *Str. durans*,
3. *Str. bovis* i *Str. equinus*.

W ostatnich latach pojawiło się wiele prac dotyczących właściwości fizjologicznych i po-

działu taksonomicznego paciorkowców kałowych. Dotychczasowe dane na ten temat przedstawia sumarycznie tabela 1.

Tabela 1.

	Str. faecalis i jego warianty	Str. faecium	Str. durans	Str. bovis	Str. equinus
Wzrost w temp. 10°	+	+	+	-	-
Wzrost w temp. 45°	+	+	+	+	+
Wzrost w temp. 50°	+	+	-	-	-
Oporność na temp. 60° przez 30 min.	+	+	+/-	-	-*
Wzrost przy pH 9,6	+	+	+/-	-	-
Wzrost w 6,5% NaCl	+/-	+/-	+/-	-	-
Wzrost w 40% żółci	+	+	+	+	+
Hemoliza beta	-/+	-	+/-	-	-
Upłynnienie żelatyny	-/+	-	-	-	-
Wytw. NH <sub>3</sub> z argininy	+	+	+	-	-
Tolerancja 0,04% teluryny potasu w podłożu	+	-	-	-	-
Hydrolyza skrobi	-	-	-	+	-*
Redukcja TTC przy pH 6,0	+	-	-	+/-	-
Wytwarzanie kwasu z: Glicerolu (warunki bez-tlen.)	+	-	-	-	-
Mannitolu	+	+	-*	-/+	-
Sorbitolu	+	-*	-	-/+	-
Laktozy	+	+	+	+	-
Sacharozy	+	+/-	-	+	+
Rafinozy	-*	-*	-	+	-*
Melibiozy	-	+	-*	+	-*
Melezitozy	+	-	-	-	=

+ = wynik dodatni, - = wynik ujemny, +/- = w większości wynik dodatni, -/+ = w większości wynik ujemny, \* = spotykane są szczepy nietypowe.

Jak widać z przytoczonej tabeli, wszystkie paciorkowce grupy D mogą rozmnażać się w temp. 45° a także w środowisku zawierającym 40% żółci bydlęcej. Wszystkie enterokoki odpowiadają kryteriom Shermana (*Str. faecalis* i jego warianty, *Str. faecium*, *Str. durans*), posiadają zdolność wzrostu w temp. 10° oraz 45°, rosną w obecności 6,5% NaCl oraz przy pH 9,6, przeżywiają temp. 60° przez 30 minut a także wytwarzają amoniak z argininy. Należy jednak podkreślić, że wzrost w bulionie z dodatkiem 6,5% NaCl, a także oporność na działanie temp. 60% przez 30 minut są cechami nie zawsze stałymi.

*Str. faecalis* oraz jego warianty różnią się między sobą tylko na podstawie właściwości proteolitycznych i hemolitycznych. Dotychczas przyjmowano, że upłynnienie żelatyny wywołują *Str. liquefaciens* i *Str. zymogenes*, nie posiada zaś tej właściwości *Str. faecalis*. Hemoliz-

zę na agarze z dodatkiem krwi końskiej wywołuje tylko *Str. zymogenes*. Ostatnio Niven (27) zaobserwował jednak na przykładzie enterokoków, że stosowanie konwencjonalnej metody przy użyciu 5% żelatyny w podłożu nie daje ścisłych wyników. Tak np. w jego badaniach niektóre enterokoki uznane za nieproteolityczne (wiele szczepów *Str. faecium*) przy zastosowaniu metody konwencjonalnej, hydrolyzowały żelatynę przy 0,3% lub 1,0% tego substratu w podłożu, zwłaszcza przy przedłużeniu czasu inkubacji. Być może, że te obserwacje w przyszłości rzucą pewne światło na rolę enterokoków w produktach spożywczych dłużej składowanych. Niven stwierdził też w przytoczonych badaniach, że niektóre szczepy enterokoków wykazujące pierwotnie właściwości hemolityczne, traciły te właściwości przy dalszym badaniu. W konkluzji autor poddaje w wątpliwość dotychczasowy podział enterokoków na podstawie zdolności proteolitycznych i hemolitycznych.

*Str. faecalis* różni się od *Str. faecium* następującymi właściwościami:

a) jest on oporny na działanie 0,04% teluryanu potasu (42) i rośnie dobrze w postaci czarnych kolonii na agarze zawierającym tę ilość teluryanu. Niektóre szczepy *Str. faecium* mogą rosnąć również na tym podłożu, lecz tworzą one małe szare kolonie,

b) posiada zdolność fermentacji glicerolu w warunkach beztlenowych. Zdolność tę określa się na podłożu zawierającym 1% pentonu, 1% wyciągu drożdżowego (akceptor wodoru), 0,5% glicerolu, przy czym podłoże to przed użyciem należy zregenerować a następnie inkubować w warunkach beztlenowych przez 7 dni,

c) fermentuje sorbitol i melezytozę (z nielicznymi wyjątkami),

d) nie rozkłada L-arabinozy i melibiozy,

e) redukuje TTC (chlerek 2, 3, 5 tróifenyltetrazolu) do farmazanu w podłożu zawierającym glukozę, przy pH podłoża = 6,0. Reakcja ta wykazuje jednak często zmienny stopień intensywności. Również *Str. bovis* posiada zdolność redukcji TTC. *Str. faecium* różni się od *Str. durans* tym, że zakwasza mannitol, L-arabinozę, sacharozę oraz melibiozę. Różnice te nie są jednak stałe i dlatego coraz częściej sugeruje się by *Str. durans* uznać za wariant *Str. faecium* (17, 27).

*Str. bovis* i *Str. equinus* jak już wspomniano, nie odpowiadają kryteriom Shermana gdyż nie rosną w temp. 10°, nie rosną przy pH 9,5 oraz przy zawartości 6,5% NaCl w podłożu, nie przeżywaia temp. 60° przez 30 minut (choć większość szczepów przeżywa 60° przez 15 minut). Fermentacja rafinozy oraz hydrolyza skrobi jest cechą charakterystyczną *Str. bovis* (choć szczepy pochodzące z kału ludzkiego nie zawsze hydrolyzują skrobię). Charakterystyczną właściwością *Str. equinus* jest brak zdolności fermentowania laktozy.

Badania wielu enterokoków wyizolowanych z roślin wykazały (23), że istnieją szczepy, które posiadają cechy fizjologiczne charakterystyczne dla *Str. faecalis* i równocześnie dla *Str. faecium*. Spotykane są też szczepy bardzo trudne do sklasyfikowania, wobec czego omawiana grupa drobnoustrojów wymaga jeszcze dalszych badań.

#### Piśmiennictwo

- Barnes E. M., Ingram M.: The identity and origin of faecal streptococci in canned hams. Ann. Inst. Pasteur, Lille, 7, 115, 1915.
- Barnes E. M., Ingram M., Ingram G. C.: The distribution and significance of different species of faecal streptococci in bacon factories. J. Appl. Bacteriol. 19, 204, 1956.
- Barnes E. M.: Tetrazolium reduction as a means of differentiating *Streptococcus faecalis* from *Streptococcus faecium*. J. Gen. Microbiol. 14, 57, 1956.
- Barnes E. M.: Differential and selective media for the faecal streptococci. J. Sci. Food Agr. 12, 656, 1959.
- Buttraux R., Moriaméz J.: Le comportement des germes tests de contamination fécale dans les saumures de vandes. H. M. Stat. Off. 247, 1957.
- Ten Cate L.: De microbiologie der „geschwitzte“ snijwurst. Tijdschr. Diergeneesk. 85, 743, 1960.
- Ten Cate L.: Het aroma der snijwurst. Tijdschr. Diergeneesk. 85, 859, 1960.
- Dack G. M., Niven C. F., Korsner J. B., Marshall H.: Feeding tests on human volunteers with enterococci and tyramine. J. Infect. Dis. 85, 131, 1949.
- Dahlberg A. C., Kosikowsky F. V.: The bacterial count, tyramine content and quality score of commercial American cheddar and stirred curd cheese made with *Streptococcus faecalis* starter. J. Dairy Sci. 32, 630, 1949.
- Eaves G. N., Mundt J. O.: Distribution and characterization of streptococci from insects. J. Insect. Path. 2, 289, 1960.
- Elliot S. D., Barnes E. M.: Changes in serological type and antibiotic resistance of Lancefield group D streptococci in chickens receiving dietary chlorotetracycline. J. Gen. Microbiol. 20, 426, 1959.
- Elliot S. D.: Type and group polysaccharides of Group D streptococci. J. Exp. Med. 111, 621, 1960.
- Guthof O.: Streptokokken und Dysbakterie—Problem. Zbl. Bakt. 1. Orig. 70, 327, 1957.
- Jones D., Shattock P. M. F.: The location of group antigen of Group D streptococcus. J. Gen. Microbiol. 23, 335, 1960.
- Jordan E. O., Burrows W.: *Streptococcus* food poisoning. J. Infect. Dis. 53, 363, 1934.
- Kenner B. A., Clark H. F., Kabler P. W.: Faecal streptococci. II. Quantification of streptococci in feces. Am. J. Public Health. 50, 1553, 1960.
- Lake D. E., Deibel R. H., Niven C. F. Jr.: The identity of *Streptococcus faecium*. Bacteriol. Proc. p. 13, 1957.
- Larkin E. P., Litsky W., Fuller J. E.: Faecal streptococci in frozen foods. I. A bacteriological survey of some commercial frozen foods. Appl. Microbiol. 3, 98, 1955.
- Linden B. A., Turner W. R., Thom C.: Food poisoning from a streptococcus in cheese. Publ. Hlth. Rep. Wash. 41, 1647, 1926.
- Mattick A. T. R., Shattock P. M. F.: Group D streptococci in English hard cheese. Mon. Bul. Emerg. Publ. Ulth. Lab. Serv. 2, 73, 1943.
- McCart M.: The lysis of Group A hemolytic streptococci by extracellular enzymes of *Streptomyces albus*. I. Production and fractionation of the lytic enzymes. J. Exp. Med. 96, 555, 1952.
- Mossel D. A. A., van Diepen H. M. J., de Bruin A. S.: The enumeration of faecal streptococci in foods, using Packer's crystal violet sodium azide blood agar. J. Appl. Bacteriol. 20, 265, 1957.
- Mundt J. O., Johnson A. H., Khatchikian R.: Incidence and nature of enterococci on plant materials. Food Res. 23, 186, 1958.
- Mundt J. O., Johnson A. H.: Physiological properties of streptococci isolated from plants. Food Res. 24, 218, 1959.
- Mundt J. O.: Occurrence of enterococci: Bud. blossom, and soil studies. Appl. Microbiol. 9, 541, 1961.
- Niven C. F. Jr.: Serological grouping of the enterococci. Ph. D. Thesis, Cornell University, 1939.
- Deibel R. H., Lake D. E., Niven C. F. Jr.: Physiology of the enterococci as related to their taxonomy. J. of Bacteriol. 86, 1275, 1963.
- Orla-Jensen S.: The lactic acid bacteria: A monograph. A. F. ost, Kopenhagen, 1919.
- Osler A. G., Buchbinder L., Steffen G. I.: Experimental enterococcal food poisoning in man. Proc. Soc. Exp. Biol. N. Y. 67, 456, 1948.

30. Raj H., Wiebe W. J., Liston J.: Detection and enumeration of fecal indicator organisms in frozen sea foods. II. Enterococci. Appl. Microbiol. 9, 295, 1961.
31. Sharpe M. E., Shattock P. M. F.: The serological typing of Group D streptococci associated with outbreaks of neonatal diarrhea. J. Gen. Microbiol. 6, 150, 1952.
32. Sharpe M. E.: Serological typing of strains of Streptococcus faecium and unclassified Group D streptococci isolated from canned hams and pig intestines. J. Gen. Microbiol. 23, 621, 1960.
33. Shattock P. M. F.: The streptococci of Group D: the serological grouping of Streptococcus bovis and observations on serologically refractory Group D strains. J. Gen. Microbiol. 3, 80, 1949.
34. Shattock P. M. F.: The faecal streptococci. 12th Int. Dairy Congress. Stockholm. 2, 598, 1949.
35. Shattock P. M. F.: The identification and classification of Streptococcus faecalis and some associated streptococci. Ann. Inst. Pasteur Lille. 7, 95, 1955.
36. Silliker J., Deibel R. H.: On the association of enterococci with food poisoning. Bact. Proc. 48, 1960.
37. Smith D. G., Shattock P. M. F.: The serological grouping of Streptococcus equinus. J. Gen. Microbiol. 29, 731, 1962.
38. Sherman J. M.: The streptococci. Bacteriol. Rev. 1, 3, 1937.
39. Sherman J. M., Wing H. U.: Streptococcus durans. J. Dairy Sci. 20, 165, 1937.
40. Sherman J. M.: The enterococci and related streptococci. J. Bacteriol. 35, 81, 1938.
41. Sherman J. M., Gunsalus I. C., Bellamy W. D. 57th Ann. Rep., New York State Coll. Agr., Cornell Univ. Agr. Exper. Stat. 116, 1944.
42. Skadhauge K.: Studies of enterococci. Kopenhagen: Einar Munksgaards, 1950.

Adresy autorów: dr Stanisław Kafel, Puławy, Instytut Weterynarii; prof. dr John C. Ayres, Food Processing Laboratory, Iowa State University, Ames, Iowa, U.S.A.

## FIZJOLOGIA

ALEKSANDRA MALINOWSKA

### Aktywność L-leucylo-aminopeptydazy (LAP) w krwi bydła zdrowego z uwzględnieniem niektórych badań hematologicznych

Z Katedry Chemii Fizjologicznej SGGW w Warszawie  
Kierownik: prof. dr STEFAN NYREK

Dotychczasowe badania aktywności LAP dotyczyły w znacznej mierze płynów ustrojowych. Prace histochemiczne prowadzone przez Nachlasa i wsp. (10), Monisa i wsp. (9), oraz Wilczoka i wsp. (13) wykazały różne nasilenie aktywności enzymatycznej LAP w zdrowych tkankach ludzi i zwierząt laboratoryjnych oraz przy nowotworach. Wilczok i Steplewski (14) badali aktywność LAP w poszczególnych frakcjach homogenizowanych komórek wątrobowych.

Wiele badań aktywności LAP przeprowadzono w surowicy u ludzi (7). Porównawcze badania Arsta i wsp. (1) wykazały różnicę w poziomie tej aktywności. Całkowicie zhemolizowana krew człowieka wykazuje 3,5-krotnie wyższą aktywność niż surowica. Brak jest danych dotyczących zachowania się enzymu w elementach morfotycznych krwi. Próby tego rodzaju badań zostały podjęte przez Haschena (4), który ozna- czał aktywność LAP w ludzkich erytrocytach.

Jak wynika z poprzednich badań autorki (8) zhemolizowana krew bydła wykazuje około 4-krotnie wyższą aktywność LAP w porównaniu z surowicą i osoczem.

Aktywność enzymów w krwi zwierząt hodowlanych jest zagadnieniem, któremu dotychczas poświęcano mało uwagi. Wydaje się więc konieczne prowadzenie badań nad czynnikami, które mogą wywierać wpływ na tę aktywność.

Praca niniejsza przedstawia aktywność LAP w zhemolizowanej krwi bydła oraz wyniki badania statystycznego regresji aktywności enzymatycznej zależnie od wieku zwierząt, od liczby erytrocytów i leukocytów, od ilości hemoglobiny oraz od wskaźnika hematokrytowego.

#### Badania własne

Materiał i metody. Badania przeprowadzono na bydło rasy nizinnej czarno-białej, zdrowym klinicznie, pochodzącym z majątków SGGW z obór wolnych od gruźlicy i brucelozy. Zwierzęta zostały podzielone na trzy grupy. Do grupy pierwszej zakwalifikowano 31 cieląt w wieku od 1 tygodnia do 6 miesięcy, do grupy drugiej 24 jałówki w wieku od 7 miesięcy do 2,5 lat, grupę trzecią stanowiło 37 krów w wieku od 3 do 8 lat.

Krew do badań pobierano z żyły jarzmowej rano przed pierwszym karmieniem zwierząt. Jako środka zapobiegającego krzepnięciu krwi używano heparyny.

1) Oznaczanie kolorymetryczne aktywności LAP metodą Goldbarga i Rutenburga (2, 3) z modyfikacją Sigma Chemical Company (12). Do oznaczeń aktywności enzymu przygotowywano rozcieńczenia krwi wodą destylowaną w proporcji 1:10. Przygotowane rozcieńczenia odstawiano do czasu wystąpienia całkowitej hemolizy. Na podstawie wyników dwu prób równoległych obliczano średnią wartość dla każdego oznaczenia. Natężenie barwy mierzono za pomocą kolorymetru Langego, używając filtru VG — 9 (525 mμ). Wartości otrzymane w jednostkach Goldbarga i Rutenburga odpowiadały aktywności LAP w 0,1 ml krwi, dlatego też w przeliczeniu na 1 ml wyniki mnożono przez 10.

Błąd statystyczny metody oznaczania aktywności LAP ustalono na podstawie 30 badań krwi od jednej krowy, przy  $P = 0,95$ . Średnia arytmetyczna aktywności enzymu w jedn. G.—R.  $y = 289,50$ . Przedział ufności dla średniego odchylenia wynosił:  $9,90 < 0 < 16,72$ , odchylenie średnie próby  $s = 12,44$ , a współczynnik zmienności  $v = 4,29\%$ .

2) Obliczanie liczby erytrocytów w 1 mm<sup>3</sup> krwi.

3) Obliczanie liczby leukocytów w 1 mm<sup>3</sup> krwi.

Licze erytrocytów i leukocytów oznaczano przy użyciu mieszalników Potaina i komory typu Thoma — Zeissa.

4) Obliczanie ilości hemoglobiny za pomocą hemoglobinometru Sahliego.

5) Obliczanie wskaźnika hematokrytowego.

#### Wyniki

W tab. 1 podano wyniki badania aktywności enzymatycznej krwi bydła.

Widoczne są wyraźne różnice zachowania się enzymu w poszczególnych grupach zwierząt, zależnie od wieku. Istotność tych różnic sprawdzono metodą analizy wariancji (tab. 2).